

**T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**MULTİPL MİYELOMDA
DÜZENLEYİCİ T HÜCRELERİN VE
PROGRAMLI ÖLÜM-1'İN ROLÜ**

AYŞE PINAR ERÇETİN

**TEMEL ONKOLOJİ PROGRAMI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

İZMİR- 2010

**T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**MULTİPL MİYELOMDA
DÜZENLEYİCİ T HÜCRELERİN VE
PROGRAMLI ÖLÜM-1'İN ROLÜ**

**TEMEL ONKOLOJİ PROGRAMI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

AYŞE PINAR ERÇETİN

**Doç. Dr. SAFİYE AKTAŞ
(Danışman)**

Bu araştırma İzmir Kan Hastalıkları ve Kanser Araştırma Yardım Derneği ile DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından 2009 KB. SAG. 22 sayı ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

1. TABLO- ŞEKİL ve KISALTMA DİZİNİ	iii
1.1. Tablo Dizini	iii
1.2. Şekil Dizini	iii
1.3. Kısaltma Dizini	iv
TEŞEKKÜR	viii
2. ÖZET	1
3. YABANCI DİLDE ÖZET	3
4. GİRİŞ VE AMAÇ	5
5. GENEL BİLGİLER	7
5.1. Multipl Miyelom	7
5.1.1. Multipl Miyelom Etiyolojisi	7
5.1.2. Multipl Miyelomda İmmünglobülinler	8
5.1.3. Multipl Miyelomun Klinik Belirtileri	8
5.1.4. Multipl Miyelomun Evreleri	10
5.1.5. Multipl Miyelomda Prognostik Faktörler	12
5.1.6. Multipl Miyelomun Gelişim Basamakları	13
5.1.7. Multipl Miyelomun Genetik Özellikleri	16
5.1.8. Multipl Miyelom ve Mikroçevre İlişkisi	18
5.1.9. Multipl Miyelom Tedavisi	20
5.2. İmmünregulasyon	24
5.3. Düzenleyici T Hücreler (T _{reg})	25
5.3.1. T _{reg} Hücrelerinin Sınıflandırılması	25
5.3.2. T _{reg} Hücrelerinin Etki Mekanizması	27
5.3.3. T _{reg} Hücrelerinin Karakterizasyonu	29
5.3.4. T _{reg} Hücreleri ve Kanseri İlişkisi	30
5.4. CD200 (OX40)	31
5.4.1. CD200 Etki Mekanizması	32
5.4.2. CD200 ve Kanseri İlişkisi	32
5.5. Programlı Ölüm-1 (PD-1)	33
5.5.1. İmmünregulasyonda PD-1 'in Etkisi	33
5.5.2. PD-1 'in T _{reg} Hücrelerle İlişkisi	35
5.5.3. PD-1 ve Kanseri İlişkisi	36

6. GEREÇ VE YÖNTEM	37
6.1. Olgular ve Kan Örnekleri	37
6.2. Kullanılan Solüsyonlar, Kimyasal Maddeler ve Gereçler	37
6.2.1. Kullanılan Solüsyonlar	37
6.2.2. Kimyasal Maddeler	38
6.2.3. Gereçler	38
6.3. Periferik Kan Mononükleer Hücrelerin Dansite Gradient Santrifügasyon Yöntemi ile İzolasyonu	39
6.3.1. Genel İlke	39
6.3.2. Uygulama Basamakları	40
6.4. Akım Sitometri ile CD4+CD25+Foxp3+ T _{reg} Hücrelerin ve PD-1+ T Hücreler ile CD200+ T Hücrelerin Seviyelerinin Tespiti	41
6.4.1. Genel İlke	41
6.4.2. Uygulama Basamakları	42
6.5. Değerlendirme	46
6.6. Etik Kurul Onayı	47
7. BULGULAR	48
7.1. Olgulara Genel Bakış	48
7.1.1. Otolog Kemik İliği Transplantasyonu Alan Olgulara Genel Bakış	51
7.1.2. Otolog Kemik İliği Transplantasyonu Almayan Olgulara Genel Bakış	52
7.2. Akım Sitometri Bulguları	53
7.3. İstatistik Bulguları	56
8. TARTIŞMA	57
9. SONUÇ VE ÖNERİLER	62
10.KAYNAKLAR	63
11.EKLER	71
11.1. ETİK KURUL RAPORU	71
11.2. ÖZGEÇMİŞ	72

1. TABLO, ŞEKİL VE KISALTMA DİZİNİ

1.1. Tablo Dizini

1. Durie- Salmon Evreleme Sistemi
2. Uluslar arası Evreleme Sistemi (ISS)
3. Miyelomda Tanı Kriterleri
4. Sık Kullanılan Tedavi Seçenekleri
5. Yeni/ Klinik Çalışmaları Devam Eden Tedavi Seçenekleri
6. Kan ve Kemik İliği Nakli Tedavi Yanıt Kriterleri
7. Treg Hücrelerin Genel Sınıflaması
8. Tüm Olguların Verileri
9. OKİT Alan Olguların Genel Verileri
10. OKİT Almayan Olguların Genel Verileri

1.2. Şekil Dizini

1. Kemik iliği Mikroçevresinin Multipl Miyelom Patogenezindeki Rolü
2. Treg Hücrelerin Etki Mekanizmaları
3. Treg Hücrelerin Hücre KONTAĞI ve Sitokinlerle Genel Etki Mekanizması
4. PD-1/PD-L Yolağının Otoimmün Sistemi Regülasyondaki Etkinliği
5. Tüm Olguların Sağkalım Analiz Sonuçları
6. Tüm Olguların Tedavi Yanıtı Değerlendirmeleri
7. OKİT Alan ve Almayan Olgularda CD4+ CD25+ Foxp3+ Treg Hücrelerin Bulunma Yüzdeleri
8. OKİT Alan ve Almayan Olgularda CD200+ Hücrelerin Bulunma Yüzdeleri
9. OKİT Alan ve Almayan Olgularda PD-1+ Hücrelerin Bulunma Yüzdeleri
10. CD4+CD25+Foxp3+ Treg Hücrelerin OKİT Alan ve Almayan Olgulardaki Karşılaştırma Sonucu

1.3. Kısaltma Dizini

MM: Multipl miyelom

T_{reg}: T düzenleyici hücre

PD-1 (CD279): Programlı ölüm-1

OKİT (ABMT): Otolog kemik iliği transplantasyonu

PBMC: Periferik kan mononükleer hücreleri

SPSS: Statistical package for the social sciences

Ig: İmmünglobülin

IgG: İmmünglobülin gama

IgA: İmmünglobülin alfa

IgD: İmmünglobülin delta

IgE: İmmünglobülin epsilon

M protein: Monoklonal protein

MRI: Manyetik rezonans görüntüleme

CT: Bilgisayar tomografisi

ISS: Uluslar arası evreleme sistemi

B2M: Beta-2 mikroglobülin

LDH: Laktat dehidrogenaz enzimi

CRP: C reaktif protein

IL: İnterlökin

FISH: Floresans in situ hibridizasyon

PCLI: Plazma hücresi etiketleme indeksi

MGUS: Sebebi bilinmeyen monoklonal gammopati

SMM: İntramedüller/ asemptomatik miyelom

PET: Pozitron emiston tomografisi

GC: Germinal merkez

IgH: İmmüoglobülin ağır zincir lokusu

Maf: "Musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog"

MMSET: Multipl miyelom SET yapısı

FGFR3: Fibroblast büyüme faktörü reseptörü 3

Rb: Retinoblastom

Myc: "Myelocytomatosis viral oncogene homolog"

CD: "Cluster of differentiation"

MAPK: Mitojen aracılı protein kinaz

BMSC: Kemik iliği stroma hücreleri

ERK: "Extracellular signal regulated kinase"

JAK2: Janus kinaz 2

STAT3: "Signal transducer and activator of transcription 3"

NFκB: Nükleer faktör kappa B

IGF1: İnsülin benzeri büyüme faktörü

VEGF: Vasküler endotelyal büyüme faktörü

IAP: Apoptoz inhibitörü proteinleri

MCL1: Miyeloid hücre lösemi sekansı 1

ICAM: İnterselüler adhezyon molekülü

VCAM: Vasküler hücre adhezyon molekülü

bFGF: Basic fibroblast büyüme faktörü

HGF: Hepatosit büyüme faktörü

MIP1α: Makrofaj inflamatuvar protein 1α

RANKL: NFκB reseptörü aktivatör ligandı

OPG: Osteoprotegerin

DKK1: Dickkopf1

MP: Melfalan prednizolon kombinasyonu

VAD: Vinkristin adriamisin deksametazon kombinasyonu

CR: Tam remisyon

PR: Parsiyel remisyon

SD: **Stabil** hastalık

TNF α : Tumor necrosis factor α

DVT: Derin toplardamar trombozu

Th3: Yardımcı T hücre 3

Tr1: Tip 1 regülatör hücre

Foxp3: Forkhead box 3

CTLA4: Cytotoxic T lymphocyte antigen 4

TGF β : Transforming growth factor β

iT_{reg}: **İndüklenmiş** T_{reg} hücre

Ts: T süpresör hücre

IFN: **İnterferon**

TCR: T hücre reseptörü

DC: Dendritik hücre

IDO: Indoleamin- 2,3- deoksigenaz

MHC: Major histocompatibility complex

ILT: **İmmünglobülin benzeri transkript**

GITR: "Glicocorticoid induced tumor necrosis factor"

APC: **Antijen** sunan hücre

NFAT: "Nuclear factor of activated T cells"

GVHD: "Graft versus host disease"

IgSF: **İmmünglobülin** süper ailesi

CSC: Kanser kök hücresi

CLL: Kronik lenfositik lösemi

ATL: **Yetişkin** T hücreli lösemi/ lenfoma

MoAb: Monoklonal antikor

PD-L: Programlı ölüm ligandı

ITIM: Tirozin bazlı inhibitör motifi

NK: Doğal öldürücü hücreler

FITC: "Fluorescein isothiocyanate"

PE: "Phycoerythrin"

PBS: Fosfat tamponu tuz solusyonu

PFA: Paraformaldehit

TEŞEKKÜR

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Temel Onkoloji Yüksek Lisans Programı içerisinde tez çalışmamın planlanması, yürütülmesi ve değerlendirilmesi aşamalarında ilgi, destek ve bilimsel katkılarından dolayı Sayın Prof. Dr. Münir Kınay 'a, Prof. Dr. Nur Olgun 'a, Doç. Dr. Safiye Aktaş 'a, Doç. Dr. Mehmet Ali Özcan 'a, Yrd. Doç. Dr. Özden Pişkin 'e, Dr. Halil Ateş 'e, Dr. Nur Hilal Turgut 'a, Dokuz Eylül Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü ve Hematoloji Ana Bilim Dalı çalışanlarına, istatistik analizlerindeki yardımlarından ötürü Doç. Dr. Hülya Ellidokuz 'a ve tüm bu süreçte bana sabırla destek veren aileme çok teşekkür ederim.

Ayşe Pınar Erçetin

İzmir, Ocak 2010

2. ÖZET

MULTİPL MİYELOMDA DÜZENLEYİCİ T HÜCRELERİN VE PROGRAMLI ÖLÜM-1 'İN ROLÜ

Ayşe Pınar Erçetin

Dokuz Eylül Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi

Yazışma Adresi:

Mithatpaşa Caddesi No: 1606 İnciraltı İzmir

T düzenleyici hücreler (Treg) immünsüpresyonda ve otoimmün sistemin kontrolünde rol alarak tümör hücrelerine verilen immün yanıtta önemli bir görev üstlenmektedir. CD200 T hücre aracılı immünitede immünsüpresif etkiye sahiptir. Etkinliğinin artırılması sonucunda tümör hücrelerinin immün sistemden kaçışı ile ilişkilendirildiği düşünülmektedir. Programlı ölüm-1 (PD-1), T hücreleri, B hücreleri, doğal öldürücü hücreler ve dendritik hücreler üzerinde ekprese edilmektedir. İmmün yanıtta inhibitör sinyallere sahiptir. T hücre apoptozunu uyarır. İnhibisyonu tümör progresyonu ile ilişkilidir.

Bu çalışmanın amacı otolog kemik iliği transplantasyonu (OKİT) alan ve almayan multipl miyelom (MM) hastalarında CD4+ CD25+ Foxp3+ Treg hücrelerin, CD200 ve PD-1 pozitif hücrelerin seviyelerinin kıyaslanmasıdır.

Hücrelerin analizi için yaşları 41 ve 78 arasında değişen 28 multipl miyelom hastasından (10 kadın, 18 erkek) kan örnekleri steril EDTA içeren tüplere alındı. Periferik kan mononükleer hücreleri (PBMC) Biocoll ayırma solusyonu (d 1.077g/ml) ile yoğunluk gradient santrifügasyonu ile izole edilerek hemen akım sitometri analizine tabi tutuldu. Sonuçların Mann Whitney nonparametric test ile Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) (9.05) yazılımı kullanılarak analizi yapıldı. P değerleri <0.05 olanlar istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde değerlendirildi.

Bu çalışmada Treg hücre sayımları OKİT alan hastalarda daha yüksek seviyede tespit edilmiştir (p=0.042). Ayrıca iki grup arasında CD200 ve PD-1

ekspresyonlarının belirgin bir istatistiksel anlam ifade etmediği tespit edilmiştir (sırasıyla $p=0.711$, 0.404). OKIT veya Treg hücrelerin seviyeleri CD200 and PD-1 ekspresyonları ile korelasyon göstermemektedir. Treg hücreleri ve PD-1 seviyeleri arasında literatürde yer alan çalışmalara benzer bir negatif korelasyon gözlenmiştir. Sonraki çalışmalarda MM 'da Treg hücrelerin kemik iliğine kemoterapötik ajanların varlığında ve yokluğundaki etkileri sorgulanmalıdır.

Anahtar Kelimeler: Multipl Miyelom, Düzenleyici T hücreler (Treg), PD-1, CD200, Otolog kemik iliği transplantasyonu

3. YABANCI DİLDE ÖZET – ABSTRACT

THE ROLE OF REGULATORY T CELLS AND PROGRAMMED DEATH-1 IN MULTIPLE MYELOMA

Ayşe Pınar Erçetin

Dokuz Eylül Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi

Corresponding Address:

Mithatpaşa Caddesi No: 1606 İnciraltı İzmir

T regulatory cells (Treg), having roles in immunosuppression and control of autoimmunity are a contemporary issue in immune response to tumor cells. CD200 has an immunosuppressive effect on T cell mediated immunity. Its up regulation is thought to be related with escape of tumor cells from immune system. Programmed Death-1 (PD1) is expressed on T cells, B cells, natural killer cells and dendritic cells. It has inhibitory signals in immune response. It stimulates T cell apoptosis. Its inhibition is related with tumor progression.

Aim of this study is to compare the levels of CD4+ CD25+ Foxp3+ Treg cells, CD200 and PD-1 in multiple myeloma (MM) with and without autologous bone marrow transplantation (ABMT).

Blood samples were collected from 28 MM patients (10 female, 18 male) aged between 41 and 78. in sterile EDTA containers. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated by density gradient centrifugation on Biocoll separating solution (d 1.077g/ml) and underwent immediate analysis by flow cytometry. Results were analyzed with Mann Whitney nonparametric test using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) software (9.05). P values<0.05 were considered statistically significant.

In this study Treg cells are shown to be higher in patients ABMT (p=0.042). But CD200 and PD-1 did not show statistical significance between two groups (p=0.711, 0.404 respectively). ABMT or Treg cells levels are not correlated by CD200 and PD-1 expression. According to our study negative

corelation between Treg and PD-1 levels are observed as previous studies in literatures. Effect of Treg cells on bone marrow with or without chemotherapoetic agents should be questioned on MM.

Key Words: Multiple Myeloma, Regulatory T Cells (T_{reg}), PD-1, CD200, Autologous bone marrow transplantation

4. GİRİŞ VE AMAÇ

Multipl miyelom (MM), plazma hücrelerinin ve plazma hücresi öncülerinin malign proliferasyonu ile karakterize olan bir hematolojik kanserdir (2). Tüm yetişkin malignitelerin %1'ini, hematolojik malignitelerin ise %13'ünü oluşturan bu kanser tipi konvansiyonel kemoterapi ve yüksek doz terapilere rağmen tamamen tedavi edilememektedir (18, 23).

KontROLSÜZ çoğalan klonal plazma hücrelerinin neden olduğu en sık görülen klinik semptomlar; osteolitik kemik lezyonları, anemi, hiperkalsemi, aşırı kemik hassasiyeti, kemik ağrıları, renal yetmezliktir (4, 9, 17).

MM oluşumunda ilk gerçekleşen adım, bir plazma hücresinin klon oluşturmak üzere ölümsüz hale geldiği durgun bir fazdır. İlgili uç organ hasarı veya herhangi bir semptom meydana gelmez ancak hastalarda zamanla çoğunlukla MM gelişir. Plazma hücreleri kemik iliğinde biriktikçe miyelom transformasyonu başlayarak, ilgili uç organ hasarı ile sonuçlanır. İntramedüller miyelom olarak adlandırılan bu hastalık genellikle kemosenstiftir. Son olarak, miyelomun ilaç ve apoptoz direnci geliştirdiği, büyüme faktörleri ve kemik iliği mikroçevresinden bağımsız hale geldiği ekstramedüller miyelom oluşur (9, 16, 17).

MM' da baskılanmış immunoglobülin ekspresyonları ve fonksiyon göstermeyen T-hücre yanıtları söz konusudur (12). Düzenleyici T hücreleri ($T_{düz}$, T regulatory cells, T_{reg}) immunsupresyon ile oto-immun kontrolde, T-hücre homeostazisinde, transplantlara ve tümör hücrelerine karşı tüm immun yanıtın modülasyonunda önemlidir (5, 21). Bu negatif düzenleyici aktivite farklı gerçekleşerek tümörlere karşı normalde olması gereken immun yanıtı baskılayabilir. T_{reg} hücreleri immunsupresif etkisini hücre-hücre kontakıyla ve sitokinler aracılığıyla [interlökin-10 (IL-10) ve "transforming growth factor- β " (TGF- β)] olmak üzere iki yolla gerçekleştirir. Bu özelliklere göre CD4+ ve CD8+ T_{reg} hücreleri olarak iki ana sınıfta toplanırlar. CD4+ T_{reg} hücreleri CD4+CD25+FOXP3+ fenotipe olup, in vitro CTLA-4 yüzey antijeni üzerinden hücre-hücre kontakıyla ve sitokinlerle immunsupresif etkiye sahiptirler. Bizim çalışmamızda değerlendireceğimiz CD4+CD25+FOXP3+ T_{reg} hücreleri toplam

periferal CD4⁺ T hücrelerinin %5–10 unu oluşturup son zamanlarda en çok çalışılan T_{reg} hücre tipidir (1, 5, 12).

Malign plazma hücrelerinde ekspresyonu gerçekleşen CD200 MM için yeni bir prognostik faktördür (56). CD200 tip 1 transmembran glikoproteini olup kostimülatör B7 reseptör ailesiyle ilişkilidir. Kuvvetli bir immunsupresan olan CD200'ün ekspresyonu timositler, T ve B lenfositler, bazı dendritik hücreler, nöronlar ve endotel hücreler üzerinde gerçekleşmektedir. CD200 immun düzenleyici sinyalleri reseptörü olan CD200R ile etkileşimi üzerinden bildirerek T hücre aracılı immunsupresyona yol açar (35, 36, 56).

Programlı ölüm-1–1 (PD–1) ve çoğu tümör tarafından ekspresyonu gerçekleşen ligandları programlı ölüm-1 ligand–1 ve 2 (PD-L1 ve PD-L2) T hücre aktivasyonu, toleransı, immün patolojisi arasında denge oluşturmak üzere inhibitör sinyaller oluştururlar. Hücrenin immün yanıtla patojenlerden ve tümörlerden arındırılması için bu dengenin korunması büyük önem taşır. PD–1 ekspresyonu tümör infiltrasyonunda etkili aktif T-hücreler (CD4⁺ ve CD8⁺), B-hücreler, doğal öldürücü hücreler (NK) ve dendritik hücreler üzerinde gerçekleşir (39, 40, 46).

Tümörlerin konak T hücreleri tarafından tanınabilen antijenler eksprese etmesine karşın immün sistem tarafından ortadan kaldırılmaları nadir olup bu durum tümör mikroçevresi tarafından immün yanıtın baskılanmasından kaynaklanır (71). Burdan yola çıkarak bu çalışmadaki amacımız yeni tanı MM, MGUS, MM ve otolog kemik iliği transplantasyon tedavisi görmüş olan hastaların kemik iliği ve/veya kan örneklerinde immünsupresif etkili T_{reg} hücrelerinin, PD–1' in ve MM' de yeni prognostik faktör olarak görülen CD200'ün incelenmesidir. Bu çalışma ile tümör hücrelerinin immün sistemden kaçışında bu moleküllerin ne derecede etkisi olduğu anlaşılabilecektir.

5. GENEL BİLGİLER

5.1. Multipl Miyelom

MM, plazma hücrelerinin ve plazma hücresi öncülerinin malign proliferasyonu ile karakterize olan bir hematolojik kanser türüdür (1-4). Tüm yetişkin malignitelerin %1 'ini, hematolojik malignitelerin ise %10 'unu kapsamaktadır (2). Konvansiyonel kemoterapi ve yüksek doz terapilere rağmen tamamen tedavi edilemeyen MM hastalarının sağkalım süresi birkaç aydan birkaç yıla kadar değişmektedir. Ortalama sağkalım standart tedavi ile yaklaşık 3 yıl olup %5 gibi küçük bir hasta grubu 10 yıldan fazla yaşamını sürdürebilmektedir (3). Bu heterojen durumun tümörün kendisinin ve konakçısının özgün karakteristik özelliklerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. ABD 'de her yıl yaklaşık on dört bin kişiye MM tanısı koyulurken Türkiye 'de bu rakam yaklaşık üç bindir. Genellikle sinsi bir şekilde başlayarak yavaş ilerleyen MM bir ileri yaş hastalığıdır (5). En sık görüldüğü yaş grubu altmış beş ile yetmiş iken son yıllarda yaş ortalaması elli ile elli beş yaş arasına doğru kayma eğilimindedir (2). MM çocuklarda görülmez (1-3). Ancak son yıllarda hastalık giderek daha genç kişilerde ve daha sık gözlenmektedir. Yaş dışında cinsiyet ve ırk gibi faktörler kesin değerler ifade etmese de yapılan çalışmalara göre hastalığın erkeklerde görülme sıklığının kadınların yaklaşık iki katı ve zenci ırkta görülme sıklığının da beyaz ırkın yaklaşık iki katı olduğu saptanmıştır (2).

5.1.1. Multipl Miyelom Etiyolojisi: MMun ortaya çıkış sebebi tam olarak bilinmemekle beraber genetik yatkınlık, çevresel ve mesleki faktörlerin etken olabileceği düşünülmektedir (8, 9). MM 'lu akrabası olan bireylerde görülme riski dört kat artarken çoğu hastanın aile öyküsünde MM hastası olmadığı gözlenmiştir. Diğer plazma hücresi diskrazilerine sahip hastalarda MM gelişme riski oldukça yüksektir. İyonize radyasyon maruziyeti MM için en geçerli risk faktörü olarak görülür. Atom bombası ile yüksek doz radyasyona maruz kalanlarda uzun zaman sonra MM ortaya çıkmıştır. MM tanısı koyulana dek on - on beş yıl kadar radyasyona maruz kalanlarda daha yüksek mortalite hızı saptanmıştır (2). Ayrıca egzoz dumanına, tarım ilaçlarına (özellikle pestisitlere) ve ağır metal kullanımına maruz kalan çalışanlarda da MM riskinin arttığı saptanmıştır. Metabolitleri kemik iliği toksinleri olarak bilinen benzen MM 'ın en

olası etiyolojik ajanıdır. Propoksifen, fenitoin, fenobarbital, diazepam, propanolol, ibuprofen, diyet ilaçları, uyarıcılar ve müshil gibi ilaçların MM gelişimine katkıda bulunduğu belirlenmiştir. Alkol ve sigara kullanımının MM ile güçlü bir ilişkisi henüz bulunmamıştır (5).

5.1.2. Multipl Miyelomda İmmünglobülinler: Normal koşullarda vücuda bakteri gibi yabancı bir madde (antijen) girmesi halinde bağışıklık sisteminde yer alan plazma hücreleri B lenfosit hücreleri tarafından oluşturulur. Plazma hücreleri bu yabancı maddelere karşı spesifik bir yanıt olarak aynı tipte immünglobülin (Ig) üretmekle sorumludur. Bu nedenle vücutta çok çeşit Ig bulunur. Ig 'ler ağır zincir olarak adlandırılan iki uzun protein zinciri ve hafif zincir olarak adlandırılan iki kısa protein zincirinden oluşurlar. Beş ana çeşit Ig vardır. Bunlar ağır zincirlerinin tiplerine göre immünglobülin gama (IgG), immünglobülin alfa (IgA), IgM, immünglobülin epsilon (IgE), immünglobülin delta (IgD) olarak adlandırılır (1,10). Normal bir plazma hücresi her biri vücutta farklı işleve sahip olan Ig 'lerden yalnızca birini oluşturur. Ancak normal bir B hücresinin malign bir plazma hücreğine dönüşmesi çoklu genetik anomalileri de içeren çok adımlı bir süreçtir. Malign plazma hücreleri tam olarak aydınlatılamayan sebeplerden ötürü bağışıklık sistemi hücrelerinin sinyallerine yanıt verme özelliklerini yitirerek kontrolsüz şekilde proliferasyon gösterir. Prolifere olan malign plazma hücreleri aşırı miktarda monoklonal protein (M proteini) olarak adlandırılan monoklonal immünglobülin veya hafif zincir üretir. M proteini genellikle IgG 'dir (>%60) ancak IgA (%20) veya immünglobülin hafif zinciri olabilir. IgD ile IgE nadirdir ve IgM üreten plazma hücreleri başka bir plazma hücresi neoplazisi olan Waldenström makroglobülinemisinin özelliğidir. Miyelom çeşitleri malign plazma hücresi tarafından immünglobülin ya da hafif zincir tipine göre belirlenir. Buna göre en sık karşılaşılan miyelom tipleri IgG (>%60) ve IgA (%20) 'dir. IgD ve IgE tiplerine çok nadir rastlanır (9-11).

5.1.3. Multipl Miyelomun Klinik Belirtileri: Hastalığın başlarında herhangi bir şikayet olmasa da MM geliştikçe birçok belirti ortaya çıkmaya başlar. Özellikle sırt, kaburga ve bazen de kollarda oluşan kemik ağrıları miyelom hücrelerinin kemikte harabiyete sebep olacak kadar fazla biriktiğine işarettir (4). Normalde kemik iliğinde %5 'in altında bulunan plazma hücreleri,

MMda $\geq \%10$ gibi bir değerde klonal kemik iliği plazma hücresi olarak ortaya çıkar. Kemik iliğinde aşırı monoklonal plazma hücre birikimi hematopoez işleyişini bozarak anemiye yol açar. Hastada normal hemoglobin miktarına sahip normal boyalı eritrositi ifade eden normokromik veya hemoglobin değeri > 2 g/dL olan normositer (normal eritrosit) veya hemoglobin değeri < 10 g/dL olan anemi durumları gözlenebilir (12). Malign plazma hücreleri tarafından salınan sitokinler (interlökin) nedeniyle kemik yıkımını sağlayan osteoklastların miktarındaki artış sonucunda ciddi osteopeni veya patolojik kırıkların eşlik ettiği osteolitik kemik lezyonları meydana gelir. Manyetik rezonans görüntüleme (MRI) veya bilgisayar tomografisi (CT) ile bu lezyonlar görülebilir. Aşırı monoklonal protein üretimi nedeniyle diğer Ig tiplerinde meydana gelen azalma enfeksiyon duyarlılığını artırarak hastada on iki ayda 2 'den fazla olmak üzere sık sık enfeksiyonlara yakalanma şikayeti ile kendini gösterir. Ayrıca serum ve/veya idrarda monoklonal protein varlığı serum elektroforez paterninde belirgin bir pik ile gözlenir. En sık karşılaşılan belirtilerden biri de böbrek yetmezliğidir. Bunun miyelom böbrek yapısı ve hiperkalsemi olmak üzere iki önemli nedeni vardır. İmmünglobülinler yapı olarak bir bütün halindeyken böbreklerdeki glomerüler filtreden geçemeyecek kadar büyüktürler ancak IgG ve IgA miyelomlarının üçte ikisinde idrara geçebilecek kadar küçük monoklonal serbest hafif zincirler de üretilir. Bunlara Bence- Jones proteinleri denir. Bu proteinler renal tübüllerden geçerken çökerler ve etrafını çok çekirdekli dev hücreler sararak miyelom böbrek yapısına dönüşür. Böylece renal tübüllerde genişleme ve atrofi meydana gelerek tüm nefron fonksiyon gösteremez hale gelir (10, 12). Kemik yıkımındaki artışın yol açtığı $\geq 11,5$ mg/dL değerindeki yüksek serum kalsiyum düzeyi (hiperkalsemi) olması ciddi böbrek hasarına yol açar. Bunlardan başka özellikle burun ve dişetlerinde kanamaya eğilim artar çünkü M proteini trombosit fonksiyonlarını ve koagülasyon faktörlerini etkileyebilir ve ilerlemiş hastalıkta trombositopeni meydana gelir. Buna ek olarak çoğu kez kanamayla ilişkilendirilen hiperviskozite ile özellikle IgM miyelom vakalarında karşılaşılır. MM hastalarının $\%10$ 'undan daha azında görülen bu durum serum viskozitesi ölçülerek anlaşılabilir. Tüm bu belirtilerden başka hasta vücutta kolayca meydana gelen çürükler, halsizlik, zihin bulanıklığı, ciltte genel bir hissizlik, tat alma duyu kaybı gibi yakınmalarla doktora başvurabilir (4, 10, 12).

5.1.4. Multipl Miyelomun Evreleri: MM için iki çeşit evreleme sistemi mevcuttur. 1975 'ten beri ilk olarak kullanılan "Durie-Salmon Evreleme Sistemi" dir. 2005 yılında "Uluslararası Evreleme Sistemi (ISS)" geliştirilmiştir (13,14). Durie-Salmon evreleme sistemi ISS 'e göre hastalığın tümör yükü ve biyolojik evresiyle daha fazla uyum gösterir. Ancak karmaşık oluşu ve kemik bulgularına öznel yaklaşım gerektirmesi dezavantajlarıdır. Durie-Salmon evreleme sistemine göre evre 1 olan hasta şu özelliklerin tümünü taşımaktadır: 0 ya da 1 kemik lezyonu, hemoglobin değeri $> 10\text{g/dL}$, normal kalsiyum ve düşük M protein üretimi. Düşük M protein üretimi $\text{IgG} < 5\text{ g/dL}$, $\text{IgA} < 3\text{ g/dL}$, idrarda M piki $>4000\text{ mg/24}$ saat olan değerleri ifade eder. Evre 2, evre 1 ya da evre 3 'deki değerlere uymayan hasta grubunu ifade eder. Evre 3 olan hasta şu özelliklerden bir ya da daha fazlasını taşımaktadır: ilerlemiş kemik lezyonları, hemoglobin değeri $> 8.5\text{ g/dL}$, artmış kalsiyum ya da yüksek M protein üretimi. Yüksek M protein üretimi $\text{IgG} > 7\text{ g/dL}$, $\text{IgA} > 5\text{ g/dL}$, idrar M piki $> 12000\text{ mg/24}$ saat olan değerleri ifade eder. Alt sınıflaması ise şu şekildedir: A alt sınıfı hastaların serum kreatinin değeri $< 20\text{ mg/dL}$, B alt sınıfı hastaların serum kreatinin değeri $< 2.0\text{ mg/dL}$ olmalıdır (13) (Tablo 1). ISS 'e göre evre 1 olan hastanın serum beta-2-mikroglobülin ($\beta 2\text{M}$) düzeyi $< 3.5\text{ mg/L}$ ve serum albümin düzeyi $\geq 3.5\text{ g/dL}$ olmalıdır. Evre 2, evre 1 ya da evre 3 'deki değerlere uymayan hasta grubunu ifade eder. Evre 3 olan hastanın serum $\beta 2\text{M}$ düzeyi $\geq 5.5\text{ mg/L}$ olmalıdır (14) (Tablo 2).

Tablo 1. Durie – Salmon Evreleme Sistemi

Durie ve Salmon Evreleme Sistemi	
Kriter	Ölçülen miyelom hücre kütlesi(hücre sayısı x 10¹²/m²)
Evre I (düşük hücre kütlesi)	< 0.6
Aşağıdakilerin hepsi: • Hemogloblin değeri > 10.0g/dl • Serum kalsiyum değeri normal veya < 2.60 mmol/l • Kemik filminde normal kemik yapısı (skala 0) ve tek bir kemik plazmasitoması • Düşük M bileşeni üretim hızı IgG değeri < 50g/l, IgA değeri < 30g/l, İdrar elektroforezinde hafif zincir M bileşeni < 4g/24h	
Evre II (orta derecede hücre kütlesi)	0.6 - 1.2
Evre I veya Evre III'e uymayanlar.	
Evre III (yüksek hücre kütlesi)	> 1.2
Aşağıdakilerden biri veya daha fazlası: • Hemogloblin değeri < 8.5g/dl • Serum kalsiyum değeri > 3.00mmol/l • İlerlemiş litik kemik lezyonları (skala 3) • Yüksek M bileşeni üretim hızı IgG değeri > 70g/l, IgA değeri > 50g/l, İdrar elektroforezinde hafif zincir M bileşeni > 12g/24h	
Alt sınıflandırma (A veya B) • A: nispeten normal böbrek fonksiyonu (serum kreatinin değeri < 170umol/l) • B: anormal böbrek fonksiyonu, mg/dl olarak (serum kreatinin değeri = 170umol/l)	

Miyeloma Euronet AISBL. Myelom Temel Klavuzu. http://myeloma-euronet.org/dl/multiple-myeloma/Multiple_Myeloma-tr.pdf (Mayıs 2009)

Tablo 2.Uluslararası Evreleme Sistemi (ISS)

Uluslararası Evreleme Sistemi (ISS) B ₂ M = serum beta 2 mikroglobulin, mg/dl olarak ALB = serum albümin, g/dl olarak		
Evre I	B ₂ M ALB	< 3.5 > 3.5
Evre II	B ₂ M ALB or B ₂ M	< 3.5 < 3.5 3.5 - 5.5
Evre III	B ₂ M	> 5.5

Miyeloma Euronet AISBL. Myelom Temel Klavuzu. http://myeloma-euronet.org/dl/multiple-myeloma/Multiple_Myeloma-tr.pdf (Mayıs 2009)

5.1.5. Multipl Miyelomda Prognostik Faktörler: Hastalığın evresi belirlendikten sonra birkaç bağımsız prognostik faktör ile miyelomun

akıbeti öngörülebilir. Ana prognostik faktörler hastanın performans durumu, ISS ve Durie- Salmon evrelemeleri, 13. kromozom delesyonları veya hipodiploidi varlığı, t (4;14) veya t (14;16) translokasyonları, kromozom 17p delesyonu, DNA indeksi, laktat dehidrogenaz enzimi (LDH) düzeyi, plazmablastik morfoloji, kemik iliğindeki plazma hücresi etiketleme indeksi (PCLI) olarak sıralanabilir. Bunlara ek prognostik faktörler ise yaş, C reaktif protein (CRP) ve serum kreatinin düzeyleri, platelet sayısı ve plazma hücre yüzeyinde bulunup serumda değerleri ölçülebilen CD138 antijeni (*syndecan-1*) 'dir (3, 6, 9). Bu prognostik faktörler üç kategoriye ayrılmaktadır. Birinci grupta yaş, performans durumu, renal fonksiyon gibi hastanın kemoterapiyi tolere edebilirliğini yansıtan konakçıya ait faktörler yer alır. Konakçıya ait parametrelerden en iyi aydınlatılan yaştır. Altmış ile yetmiş beş yaş aralığının altındaki hastalar daha uzun sağkalım gösterir. Kırk yaş altındaki hastalar ise normal renal fonksiyon ve düşük β 2M düzeyi ile ortalama 8 yılın üzerinde sağkalım gösterir. Seksen yaş üstü gibi çok ileri yaş ise kötü prognozla ilişkilendirilir. İkinci grupta sitogenetik, moleküler profil, tümör hücresinin proliferatif aktivitesi gibi malign klonun iç faktörler bulunur. Üçüncü grupta ise β 2M, albümin, CRP gibi tümör yükü ve hastalığa ait komplikasyonları yansıtan biyokimyasal belirteçler yer alır. Normalde böbrekler tarafından salınan β 2M 'nin serumdaki düzeyi özellikle tümör yükü, renal fonksiyon ve ISS için miyelomdaki en önemli prognostik belirteçlerden birisidir (3, 11, 12). CRP 'nin serum konsantrasyonu interleükin-6 'nın (IL-6) bir belirteci olup β 2M 'den bağımsız bir prognostik belirteçtir. IL-6 hem proinflamatuvar hem de antiinflamatuvar etkisiyle sistemik inflamatuvar cevabın göstergesi olarak nitelendirilebilen bir sitokindir. Hasta standart tedavi aldığı zaman CRP ve β 2M düzeylerinin kombinasyonuna göre prognostik açıdan üç sınıfta değerlendirilebilir. Serum CRP ve β 2M düzeyi < 6.0 mg/L olanlar düşük riskli grup, serum CRP ve β 2M düzeyi $\geq$ 6.0 mg/L olanlar yüksek riskli grup, ikisinin arasındaki serum CRP ve β 2M düzeyine sahip olanlar orta riskli gruptur. Buna göre düşük riskli grup ortalama 54 ay, orta riskli grup ortalama 27 ay ve yüksek riskli grup ise ortalama 6 ay sağkalım gösterirler (9, 11, 12). Konvansiyonel sitogenetik analizlerine göre kromozom 13 delesyonu (monozomi) ve/veya hipodiploidi, flüoresans in situ hibridizasyon (FISH) analizlerine göre t (4;14), t (14;16) veya 17p delesyonu, PCLI çalışmalarına göre PCLI $\geq$ %3, serum CD138 değeri $\geq$ 1170 U/ml parametrelerine sahip

hastalar yüksek risk grubu hastalardır. Yaklaşık olarak 20–24 aylık sağkalım gösterir (15).

5.1.6. Multipl Miyelomun Gelişim Basamakları: MM gelişimi, benign bir halden oldukça malign bir duruma geçişi kapsayan çok adımlı bir transformasyon süreci olup her hastada bu süreç fark edilemeyebilir. İlk gerçekleşen adım, bir plazma hücresinin klon oluşturmak üzere ölümsüz hale geldiği durgun bir fazdır. Bu aşamada hiperkalsemi, anemi, kemik lezyonları gibi herhangi bir ilgili uç organ hasarı veya belirti meydana gelmez. Miyelom hücrelerinin gelişim ve ölüm hızları yaklaşık olarak aynıdır (16, 17). Sebebi bilinmeyen monoklonal gammopati (MGUS) zamanla MM 'a ilerleyebilecek bir pre-malign durumdur. ABD'de elli yaş ve üstü bireylerin yaklaşık %3.2 'sinde, yetmiş yaş ve üstü bireylerin yaklaşık %5.3 'ünde görülerek MM 'a göre yaklaşık yüz kat daha sık karşılaşılr. Ancak MGUS olan bir bireyin bir yıl içinde MM 'a ilerleme ihtimali %1 olduğundan tüm MGUS hastalarının yaklaşık dörtte üçü 20 yıldan fazla değişim göstermeden yaşamını sürdürebilir. MM 'da karşılaşılan sitogenetik anomalilerin (translokasyonların ve delesyonların) benzer şekilde MGUS 'da da görülür. Ancak bu kromozom anomalileriyle uyumlu belirgin klinik veya biyolojik yansımalar yoktur. MGUS vakalarında serum M proteini <3 g/dL, klonal kemik iliği plazma hücreleri <%10 olarak saptanır (11, 12, 15). İkinci aşamada plazma hücrelerinin kemik iliğinde birikmesiyle miyelom hücre transformasyonu gerçekleşir. Dolayısıyla bu aşamada belirgin bir şekilde monoklonal protein artışı ve ilgili uç organ hasarı gözlenmeye başlar. Serum M proteini (IgG veya IgA) ≥ 3 g/dL ve/veya klonal kemik iliği plazma hücreleri $\geq$ %10 olarak saptanır. İntramedüller veya asemptomatik miyelom (SMM) olarak adlandırılan bu hastalık genellikle kemosensitifdir (15). Hastalık sağkalımı ve gelişimi için tamamen kemik iliği destek dokusuna bağlıdır. Saldırgan bir şekilde gerçekleşen son aşamada, miyelom hücreleri kemik iliği destek dokusundan bağımsız hale gelir. PCLI 'nin %1 'in üzerine çıkması ve LDH düzeyindeki artış ile kendini belli eden bir proliferasyon artışı söz konusudur. Kemik iliği morfolojisi plazmablast görüntüleriyle oldukça saldırgan gözükür. Konvansiyonel sitogenetik ile ekstramedüller veya semptomatik miyelom bulgularını göstermeye başlayan hastaların kromozom anomalileri saptanabilir. Pozitron emisyon tomografisi (PET) bu tip ekstramedüller hastalık varlığını ortaya

koymakta sıklıkla başvurulan bir yöntemdir. Bu aşamada miyelomun kemoterapi ve apoptoz direnci geliştirdiği görülür. Alkilleyici ve hücre döngüsüne spesifik ajanların kombinasyonları ile kemoterapi uygulayarak geçici bir süre için hastalık kontrol altına alınsa da bu yanıtlar kısa sürelidir. Yüksek doz kemoterapi ve transplantasyonlara rağmen sağkalım oldukça kısadır (16, 17).

Bir antijen nedeniyle oluşan üretici sinyaller ile B lenfosit hücrelerinden iki tip plazma hücresi oluşturulur. Pre-germinal merkez (GC) B hücrelerinden farklılaşan plazma hücreleri immünglobülin M (IgM) salgılayabilir ya da immünglobülin ağır zincir lokusu (IgH) rekombinasyonlarına uğrayarak farklı bir Ig izotipi salgılayabilirler. Somatik olarak hipermutant Ig genlere sahip değildirler. Bu plazma hücreleri genellikle yaklaşık 3 günlük kısa bir yaşam süresine sahiptirler. Bunun aksine, post-germinal merkez (post-GC) B hücreleri plazma hücresine farklılaşmadan önce tekrarlanan somatik hipermutasyonlara, antijen seçimlerine ve IgH rekombinasyonlarına uğrayarak plazmablast üretirler. Plazmablastlar MM 'da olduğu gibi kemik iliği mikroçevresine yerleşerek uzun ömürlü plazma hücrelerine dönüşebilirler (1, 5, 12). MMun her aşaması için tanı kriterleri Tablo 3 'de belirtilmektedir.

Tablo 3. Miyelomda Tanı Kriterleri

• Multiple Miyelom (*) Tanı Kriterleri (üçü de bulunmalıdır)
1. Kemik iliğinde $\geq 10\%$ plazma hücresi (monoklonal) ve/veya Plazmasitoma (biyopsi ile kanıtlanmış) 2. Monoklonal protein (serum ve/veya idrarda) (**) 3. Miyeloma ile ilişkili organ disfonksiyonu (en az biri bulunmalıdır) (***) (K)alsiyum yüksekliği (serum $Ca^{++} > 10.5$ mg/l ya da normalin üst sınırında) (R)enal yetmezlik (serum kreatinin > 2 mg/dl) (A)nemi (Hb < 10 gr ya da normalin 2 gr altında) (K)emik lezyonları (litik) ya da osteoporozis (****) * Bu kriterlere göre Durie-Salmon Evre IA miyeloma olguları 'smoldering/indolent' miyeloma olarak yer almaktadır. ** Monoklonal protein saptanamazsa (nonsekreteruar miyeloma) kemik iliğinde $\geq 10\%$ plazma hücresi (monoklonal) ve/veya plazmasitom (biyopsi ile kanıtlanmış) olmalıdır. *** İngilizce akronim CRAB (Ca^{++}, renal, anemi, bone). Bunların dışında olup miyeloma ile ilişkili olduğuna kuşku olmayan diğer organ disfonksiyonları da bu kapsamda değerlendirilir (semptomatik hiperviskozite sendromu, amiloidoz, yinelenen (> 2 epizod / yıl) bakteri enfeksiyonları gibi). **** Soliter plazmasitoma ya da osteoporozis (kırılgan kemik) dışında bulgu yoksa kemik iliği plazma hücresi oranı $\geq 10\%$ olmalıdır.
MGUS tanı kriterleri (üçü de bulunmalıdır)
1. Serum ve/veya idrarda düşük düzeyde monoklonal protein (*) 2. Kemik iliğinde monoklonal plazma hücre miktarı $< 10\%$ 3. Serum Ca^{++}, kreatinin ve hemoglobin düzeyleri normal Kemik lezyonu yok (direkt grafi ve/veya diğer görüntüleme teknikleri ile) Amiloidoz veya hafif zincir birikim hastalığına ait klinik ve laboratuvar bulguları yok. (*) Serum IgG < 3 g/dl, IgA < 2 g/dl, idrar monoklonal kapa veya lambda < 1 g / 24 h.
'Smoldering' veya 'Indolent' Miyelom Tanı Kriterleri (üçü de bulunmalıdır)(*)
1. Serum ve/veya idrarda monoklonal protein 2. Kemik iliğinde ve/veya doku biyopsi örneğinde monoklonal plazma hücreleri 3. MGUS, miyeloma ya da soliter plazmasitoma kriterlerine uymama (*) Bu kriterler Durie-Salmon Evre IA miyelomu tanımlamaktadır.
Soliter Kemik Plazmasitoma Tanı Kriterleri (üçü de bulunmalıdır)
1. Biyopsi ile kanıtlanmış monoklonal kemik plazmasitoma tek bir kemikte (diğer alanlar için yapılan direkt grafi, ve eğer yapıldıysa manyetik rezonans (MRI) ve/veya pozitron emisyon tomografi (PET) negatif) Eğer varsa M-komponent düşük düzeyde IgG < 3.5 g/dl IgG < 2 g/dl İdrar monoklonal hafif zincir < 1 g/24 saat. 2. Kemik iliği monoklonal plazma hücre oranı $< 10\%$ 3. Miyeloma ile ilişkili organ disfonksiyonu yok.

Undar L. Multipl Miyelom: Tanı. 35. Hematoloji Kongresi. Ekim 7-10, 2009, Antalya, Türkiye.

5.1.7. Multipl Miyelomun Genetik Özellikleri: MM 'lu hastalarda en önemli prognostik parametreler arasında sitogenetik anomaliler sayılmasına rağmen olguların %50–70 'inde normal karyotipler gözlenmektedir. Sayısal ve/veya yapısal kromozom anomalileri sitogenetik analizler ile olguların ancak %20–50 'sinde gösterilebilmektedir (18). MM 'da kromozom aberasyonlarının sıklıkları hastalık patogenezinde önemli bir etkidir. Yapılan çalışmalar genetik faktörlerin belirlenmesinin, hastalığın tanısı, etiyopatolojisinin belirlenmesi, prognoz ve tedavi protokollerinin düzenlenmesinde çok önemli olduğunu göstermiştir. En önemli kromozom anomalileri, hipo ve hiperdiploid karyotipler, kromozom 1 anomalileri, kromozom 13 anomalileri ve kromozom 14q32 'deki IgH yeniden düzenlenmeleridir. 13q delesyonu ve hipodiploidi en önemli kısa sağkalım belirteçleridir (19-21). MM olgularında kemik iliğinden yeterli sayı ve kalitede kromozom elde etmek her zaman mümkün olmadığından anomaliye spesifik FISH analizi tanı yöntemi olarak kullanılmaktadır. Kromozom 14 'deki IgH lokusunu (14q32) içeren translokasyonlar MM ve MGUS 'un her ikisinde de ortak görülür. Bu nedenle erken patojenik olaylar olarak yorumlanmaktadır. Bu translokasyonlar IgH ekspresyonunu artırıcı genler ile bir proto-onkogeni birleştirerek oluşan yeni yapıya normalde var olmayan bir özellik kazandırır. Bu özellik aslında büyüme ve yaşam sinyal yollarını aktifleyici ve apoptotik sinyalleri bozucu sonuçlara yol açan genetik bir lezyon olmasıdır (1, 16, 19, 20, 21). MM tümörlerinin yaklaşık %40 'ında bulunan IgH translokasyonlarında sıklıkla etkilenen yedi tane kromozomal partner ve onkogen bulunur. Bunlar, siklin D ilişkili olarak görülme oranlarıyla 11q13 (siklin D1) %15, 12p13 (siklin D2) < %1, 6p21 (siklin D3) %2 şeklindedir. *Musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog* (Maf) ilişkili olarak görülme oranlarıyla 16q23 (c-maf) %5, 21q12 (mafB) %2 ve 8q24.3 (mafa) <%1 şeklindedir. Son olarak da MM SET yapısı (MMSET)/ Fibroblast büyüme faktörü reseptörü 3, (FGFR3) ilişkili olarak görülme oranıyla 4p16 (MMSET ve genellikle FGFR3) %15 şeklindedir. Tümünü birlikte değerlendirildiğinde IgH translokasyonlarının prevalansı medüller MM vakalarının %50 'sinden fazladır. MM tümörlerinin yaklaşık %50 'sinde ve MGUS vakalarının %40–50 'sinde 13 . kromozom kaybı (13q14, A13) vardır. Çoğu vakada A13 tüm kromozomun monozomisini ifade eder. Retinoblastom (Rb) geni kromozom 13 üzerinde yer aldığı için monozomi 13 durumuyla paralel olarak Rb delesyonları da kötü prognozu ifade eder. 13q delesyonu dışında 11q

kazanımının da kötü prognoz ilişkili olduğu bulunmuştur (5, 15, 16, 19, 20, 21, 22). Miyelom oluşumunda diğer sık gerçekleşen genetik olaylar N- ve K- ras onkogenlerinin mutasyonlarıdır. K-ras mutasyonlu hastalar mutasyonu taşımayanlara göre daha kısa sağkalım (2– 3,7 yıl) gösterirler. Ras mutasyonları MM hastalarının %35–50 'sinde görülürken MGUS vakalarında nadirdir. Bu durum bu mutasyonların sekonder bir genetik olay olduğunu ya da MGUS 'dan MM 'a geçişte etken olabileceğini düşündürmektedir (15, 16). Bunun aksine, onkogenik yolların aktivasyonu ve p53 gibi tümör baskılayıcı genlerin mutasyonu MM 'da nadir görülür. Bu olaylar çoğunlukla ilerlemiş hastalık ya da ekstrasmedüller bir belirtiyle ilişkilendirilir (17). *Myelocytomatosis viral oncogene homolog* (Myc) genini kapsayan translokasyonlar MGUS 'ta çok nadir iken MM tümörlerinin %15 'inde görülür. Bu yeniden düzenlemelerin çoğu c-myc iken primer tümörlerin %2 'si n-myc eksprese ettiğinden bazı vakalarında n-myc translokasyonları da görülür. Biallelik c-myc ekspresyonunun interlökin 6 (IL–6) ve diğer sitokinler tarafından tümörjenezin erken safhalarında uyarılmasına rağmen myc translokasyonları MM tümörlerinin daha az destek doku bağımlı ve daha proliferatif halde olduğu hastalığın ilerlediği bir süreçte ortaya çıkar (16, 20). MM 'daki ortak genetik değişikliklerin asıl sonuçları hücre döngüsü regülasyonun bozulması ve apoptoz direnci kazanımıdır. Örneğin, t(4;14) translokasyonu FGFR3 'ün aşırı ekspresyonuna dolayısıyla Ras/ mitojen aracılı protein kinaz (Ras/ MAPK) yolağının uyarılmasına yol açar. Ras/ MAPK yolağının aktivasyonu hücre döngüsünün ilerlemesine ve hücresel yaşamın devamına neden olur. t(11;14) translokasyonu siklin D1 'in aşırı ekspresyonuna bu da miyelom hücreleri düşük bir proliferasyon indeksine sahip olmasına rağmen regülasyonu bozulmuş bir hücre döngüsünün ilerlemesine sebep olur. Sonuç olarak düşük sağkalım ile ilişkilendirilmiş genetik anomalileri özetleyecek olursak bunlar, t(4;14), t(14;16), 17p13 ve 13q14 delesyonu, 1q21 kazanımı durumlarıdır. DNA indeksi >1 olan vakalarda DNA indeksi ≤1 olanlara göre belirgin şekilde daha uzun sağkalım görülür (15, 16, 18, 19).

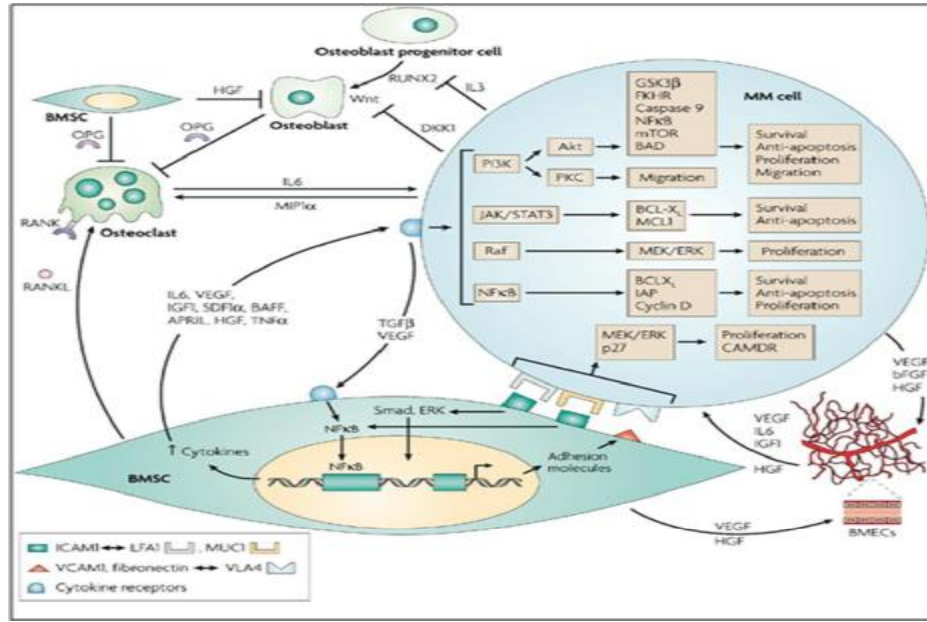
Spesifik biyolojik özellikler, kromozomal aberasyonlar ve klinik bulgularla uyum gösteren farklı gen ekspresyon profillerine göre MM hastaları MM1, MM2, MM3 ve MM4 olmak üzere dört moleküler alt tiptedir. Bu sınıflamaya göre MM1 en iyi prognoz gösterirken MM4 en kötüsüdür. Alternatif bir sınıflama ise

kromozomal translokasyonlar ile siklin D ekspresyonlarının kombinasyonundan oluşan ve MM hastalarını beş gruba ayıran TC sınıflamasıdır. T translokasyonu C ise siklin D 'yi ifade eder. Bu sınıflamanın prognozla ilişkisi tam aydınlatılamamıştır (1, 12, 22).

5.1.8. Multipl Miyelom ve Mikroçevre İlişkisi: MM hücrelerinin kemik iliği stroma hücrelerine (BMSC) adhezyonu sonucu sitokin aracılı tümör hücresi gelişimi, sağkalım, ilaç direnci ve migrasyon olaylarını tetikler. MM hücrelerinin BMSC 'lerine bağlanması ile BMSC 'lerden ve tümör hücrelerinden sitokin sekresyonu artmaktadır. Bu sitokinler majör sinyal yollarını aktive ederler. Bu yollar *extracellular signal-regulated kinase* (ERK); Janus kinaz 2 (JAK2)–*signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3); fostatidilinositol 3-kinaz (PI3K)–Akt; *vef* veya nükleer faktör κ B (NF κ B) 'dir. Bu yolların sonunda yer alan hedefler interleokin 6 (IL-6), insülin benzeri büyüme faktörü 1 (IGF1) ve vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) gibi sitokinler, Bcl-X_L gibi antiapoptotik proteinler, apoptoz inhibitörü proteinleri (IAP), miyeloid hücre lösemi sekansı 1 (MCL1) ve hücre-hücre modölatörleridir (siklin D) (5, 17, 23, 24). Malign plazma hücreleri yavaş proliferasyon hızına ve düşük hücre indeksine sahip olmaları nedeni ile uzun yaşam süresine sahiptirler (25). Miyelom hücrelerinin uzun dönem yaşamalarını sağlayan tanımlanmış en önemli faktör IL-6 'dir. IL-6 'nın öncelikle miyeloma kemik iliği başta olmak üzere makrofaj, fibroblast, osteoblast, osteoklast ve monositlerden salındığı gösterilmiştir ve antiapoptotik özelliğe sahiptir. MM olgularının çoğunda miyelom hücrelerinin IL-6 salgıladığı ve yüzeylerinde IL-6 reseptörleri taşımaları nedeniyle otokrin etki gösterdiği belirlenmiştir. NF κ B 'nin adhezyon aracılı aktivasyonu sonucunda interselüler adhezyon molekülü 1 (ICAM1) ve vasküler hücre adhezyon molekülü 1 (VCAM1) gibi adhezyon moleküllerinin ekspresyonları hem miyelom hücrelerinde hem de BMSC 'lerde artar. Böylece miyelom hücrelerinin BMSC 'lere bağlanması da artmaktadır. VEGF, *basic fibroblast büyüme faktörü* (bFGF) ve hepatosit büyüme faktörü (HGF) gibi anjiyogenik faktörlerin MM hücreleri ve BMSC 'lerden salınması ise neo-anjiyogenezi uyarır. VEGF otokrin etki sonucu miyelom hücrelerinin proliferasyonuna neden olmaktadır. Kemik iliği mikroçevresi ile miyelom hücreleri arasında sinerjistik bir etkileşim vardır. Bu etkileşim sonucu stromal

hücrelerden salınan IL-6, miyelom hücrelerinden IL-1 β , VEGF ve makrofaj inflamatuvar protein-1 α (MIP1 α) salınımına neden olarak osteoklast aktivasyonu ile sonuçlanır. BMSC'ler tarafından üretilen NF κ B reseptör aktivatörü ligandı (RANKL) ve MM hücreleri tarafından üretilen MIP1 α osteoklastogenezini uyarır. Bunun aksine osteoblastlar ve BMSC'ler tarafından üretilen osteoprotegerin (OPG) osteoklastogenezini inhibe eder. Osteoblastogenez ise MM hücreleri tarafından salınan IL3 ve *Dickkopf1* (DKK1) ile BMSC'lerden salınan HGF ile inhibe edilir. Osteoklastogenezin uyarılması ve osteoblastogenezin inhibe edilmesi sonucu osteolizis gelişir. Miyelom hücrelerinin ekstraselüler matrikse ve BMSC'lere adhezyon göstermesi sonucunda bu hücrelerin yaşam sürelerinin uzaması ve proliferasyon göstermelerine ek olarak kazandıkları antiapoptotik özellik ile de konvansiyonel kemoterapiye karşı da dayanıklılık geliştirdiği belirlenmiştir (1, 5, 7, 17, 23, 24). Kemik iliği mikroçevresinin MM patogeneziindeki rolü Şekil 1'de gösterilmektedir.

Şekil 1. Kemik İliği Mikroçevresinin Multipl Miyelom Patogeneziindeki Rolü



Zhou J, Mauerer K, Farina L, Gribben JG. The role of the tumor microenvironment in hematological malignancies and implication for therapy. *Front Biosci.* 2005; 10:1581-1596

5.1.9. Multipl Miyelom Tedavisi: MM tedavisi hastaya göre planlanmalıdır. Evre 1 olan asemptomatik hastaların kemoterapi almadan düzenli bir şekilde takip edilmeleri önerilir. Evre 2 ve 3 olan MM hastalarında ise sıklıkla kemoterapi uygulanır. MM tedavisi uzun zamandır alkilatörler, antrasiklinler ve kortikosteroidler ile yapılmaktaydı. Ancak kemoterapi seçeneklerinden melfalan ve prednizolon kombinasyonu (MP) son kırk yılın altın standartlarından biri haline gelmiştir. Yapılan çalışmalarda melfalana kümülatif maruziyet sonucunda artan ilik toksisitesi ve bozuk kök hücre üretimi özellikle otolog kök hücre nakli adayı yüksek doz kemoterapi alacak hastalar için önemle göz önünde bulundurulması gereken bir durum yaratır. Bu nedenle son yıllarda bu tip yüksek doz kemoterapide melfalan alacak hastalarda sitoredüksiyonda melfalan yerine ilk tedavilerin vinkristin, adriamisin ve deksametazon kombinasyonu (VAD) olarak verilmesi yaygın bir şekilde uygulanmaya başlanmıştır. Bu sayede başarılı bir periferik kök hücre aferezi yapılabilmektedir. MP tedavisi ise yüksek doz kemoterapi almayan ve hematopoetik kök hücre nakli olmayan hastalarda primer tedavi şekli olup hastaların %50 'sinde remisyona ulaşılmaktadır. Bu tedavinin yaşam süresini 1 veya 2 yıl kadar uzatabildiği kabul edilmektedir (1, 3, 10, 18). Konvansiyonel terapi gören hastaların yaklaşık % 5'inde tam remisyona (CR) ulaşılmaktadır. Relaps ya da refrakter hastalık durumunda ilk olarak VAD protokolü uygulanmalıdır. En aktif ajanı deksametazon olan bu kombinasyon tedavisinde relaps hastalarda %30-40, primer refrakter hastalarda ise %30 yanıt alınır. Ancak gerek yüksek enfeksiyon oranları gerekse uygulama biçimindeki zorluklar ile VAD tedavisi de olumsuz yönleri sahiptir (18). Yapılan tüm çalışmaların ışığında altmış beş yaş altı hastalarda otolog hematopoetik kök hücre transplantasyonu ile beraber uygulanan yüksek doz tedavi standart kabul edilmektedir. Allojenik hematopoetik kök hücre transplantasyonu yüksek toksik ölüm riski içermekte olmasına karşın genç hastalarda otolog hematopoetik kök hücre transplantasyonuna kıyasla kür temin edebilecek tek tedavi seçeneğidir. Otolog hematopoetik kök hücre transplantasyonu ise küratif değildir ancak hastanın hastanede kalma süresi ve destek tedavi ihtiyacı daha azdır. Bu tedavilere ek olarak belirli kemiklerde tutulum görülen ve bu nedenle şiddetli kemik ağrısı çeken hastalara ise radyoterapi uygulanmaktadır. Bu şekilde var olan kemik lezyonları tedavi edilebilmektedir (3, 5, 10).

MM standart tedavilerinin ilerleyen süreçlerinde özellikle melfalana direnç gelişmektedir. Bu nedenle son zamanlara sıklıkla tercih edilen talidomid, bortezomib, lenalidomid gibi yeni tedavi seçenekleri değerlendirilmektedir (1, 6, 10). Son yıllarda hematolojik malignitelerde kemik iliğinde anjiyogenez artışının saptanması ile birlikte talidomid antianjiyogenik etki mekanizması ile önem kazanmıştır. Talidomid'in diğer etkileri ise immün modülasyon sağlaması ve *tumor necrosis factor* (TNF- α) inhibisyonudur. Serbest radikaller aracılığıyla DNA hasarını indükleyerek direk sitotoksositeye yol açar. Talidomid altmış beş yaş altı hastalara günlük 50-200 mg, daha yaşlı hastalara ise daha iyi tolere edilebilecek şekilde 50-100 mg olarak verilir. Periferik nöropati, konstipasyon, bitkinlik gibi yan etkilerin yanı sıra deksametazon ile kombine edildiğinde oldukça sık olarak (% 5-20) derin toplardamar trombozuna (DVT) neden olmaktadır. MM için bir diğer yeni tedavi prensibi ise proteazom inhibisyonu yoluyla etki gösteren bortezomibdir. Proteazom hücrenin en önemli lizozomal olmayan proteazı olup hücre döngüsü, posttranskripsiyonel modifikasyonlar ve apoptoz gibi kritik mekanizmalarda rol alan hücresel proteinlerin yıkımından sorumludurlar. Bortezomib hücrelerdeki ubiquitin-proteazom katalitik yolağında 26S proteazom kompleksini direkt olarak bağlayarak inhibe eder. Bunun sonucunda hücresel proteinler bu çok alt birimli yapı tarafından yıkıma uğratılamaz. Bu durum MM tarafından aktive edilen transkripsiyon faktörleri NF κ B inhibitörünün konsantrasyonlarını artırmaktadır. Böylece proteazom inhibisyonunun anti-tümör etkinliği gerçekleşerek tümör hücresinde büyüme baskılanarak apoptoz meydana gelmektedir. Bortezomib hastalara her 21 günde 1., 4., 8. ve 11. günlerinde 1,3 mg/m² olacak şekilde intravenöz yolla uygulanmaktadır. Görülen yan etkiler ise gastrointestinal, geçici sitopeni, yorgunluk, bitkinlik ve periferik nöropati olarak sıralanabilir. Daha düşük toksisiteye sahip bir talidomid analogu olan lenalidomid ise MM tedavi yaklaşımlarından bir başka örnektir. Etki mekanizmasını immün modülasyon ve antianjiyogenik yolla göstermektedir. Hastalara her yirmi sekiz günde 1. günden 21. güne kadar günde 25 mg oral yolla verilmektedir (1, 3, 6, 9, 10, 18). Tüm bunlara ek destek tedavi olarak bifosfonatlar kullanılmaktadır. MM hastalarında şiddetli ağrıların eşlik ettiği patolojik kemik lezyonları meydana gelmektedir. Bifosfonat kullanımı ile bu lezyonların insidansında azalma gerçekleşerek ağrı

palyasyonu ve hiperkalsemi de kontrol altına alınabilmektedir. Hiperkalsemiyi normalize etmek için uygulanacak bir diğer tedavi ise altmış ile doksan mg arası tek doz pamidronat intravenöz yolla yaklaşık 2-4 saat kadar hastaya uygulanmasıdır. Bunun yanı sıra on beş dakika 4 mg zoledronik asitin intravenöz yolla uygulanması da serum kalsiyum değerlerini yirmi dört ila yetmiş iki saat içinde normalize etmektedir (1, 4, 9). Nonsteroid antiinflamatuvar ajanlar dehidrasyon ve enfeksiyonun da eşlik ettiği böbrek hasarına yol açmaktadır. Demir, folat ve B12 eksikliğinden kaynaklanan anemi durumunda haftada 40000 U eritropoietinin subkutan uygulanması ya da 2 haftada bir 200 µg darbepoietinin subkutan yolla uygulanmasıyla tedavi sağlanabilmektedir. Ancak yüksek riskte DVT oluşumu nedeniyle bu tedaviler talidomid ya da lenalidomid kombinasyonlarında sınırlandırılmalıdır. Enfeksiyon riskine karşılık ise mutlaka pnömokok veya gribe karşı aşılama yapılmalıdır (3, 9). MM tedavisi için sık kullanılan seçenekler Tablo 4 'de, yeni ve hala klinik çalışmaları devam eden tedavi seçenekleri Tablo 5 'de belirtilmektedir. Avrupa grubuna göre kan ve kemik iliği nakli cevap kategorileri Tablo 6 'da belirtilmektedir.

Tablo 4. Sık Kullanılan Tedavi Seçenekleri

Tedavi kombinasyonu	Avantajlar	Dezavantajlar
VAD • Vinkristin • Adriamisin • Deksametazon C-VAD • Siklofosfamid • Vinkristin • Adriamisin • Deksametazon C-VAMP • Siklofosfamid • Vinkristin • Adriamisin • Metilprednizolon	• %70 hastada cevap • Kök hücrelere zarar vermez • Kök hücre nakli için temel oluşturur • Aktif hastalık semptomları daha kolay kontrol edilebilir ve ilk remisyon kalitesi daha iyi olabilir	• Yarı kalıcı kateter gerektiren i.v. uygulama • Vinkristin sinir hasarı yapabilir
Tek başına Deksametazon	• Oral uygulama • VAD kombinasyonunun sağladığı faydanın önemli bir yüzdesini sağladığı düşünülmektedir	• Yoğun uygulamada iyi tolere edilmeyebilir
MP • Melfalan • Prednizolon	• Oral uygulama • İyi tolere edilir • %50 vakada cevap alınır • Protokolü iyi bilinmektedir	• Kök hücre hasarına yol açar, bu yüzden ardından yüksek doz terapi planlanıyorsa kök hücre toplama şansını azaltır
Haftalık C • Siklofosfamid	• Oral uygulama • Kök hücre hasarı yapmaz	
ABCM • Adriamisin • BCNU • Siklofosfamid • Melfalan	• Oral ve i.v. kombinasyonu	• Kök hücre hasarı olabilir

Miyeloma Euronet AISBL. Myelom Temel Klavuzu. http://myeloma-euronet.org/_dl/multiple-myeloma/Multiple_Myeloma-tr.pdf (Mayıs 2009)

Tablo 5. Yeni/ Klinik Araştırmaları Devam Eden Tedavi Seçenekleri

Tedavi kombinasyonu	Avantajları	Dezavantajları
CTD • Siklofosfamid • Talidomid • Deksametazon TD • Talidomid • Deksametazon	• Oral uygulama • Kök hücre hasarı yapmaz • Yaklaşık %70 vakada cevap	• Talidomidin olası yan etkileri: tromboz / nörolojik komplikasyonlar
PAD* • Bortezomib • Adriamisin • Deksametazon VD • Bortezomib • Adriamisin	• Kök hücre hasarı yapmaz	• IV uygulama • Sık sık hastaneye gelinmesini gerektirir • Bortezomibin olası yan etkileri, nörolojik komplikasyonlar
MPT • Melfalan • Prednizolon • Talidomid	• Oral uygulama	• Talidomidin yan etkileri • Daha sonra yüksek doz terapi planlanıyorsa kök hücrelere zarar verebilir

Miyeloma Euronet AISBL. Myelom Temel Klavuzu. http://myeloma-euronet.org/_dl/multiple-myeloma/Multiple_Myeloma-tr.pdf (Mayıs 2009)

Tablo 6. Kan ve Kemik İliği Nakli Tedavi Yanıt Kriterleri

Tedavi Sonucu	Tanımı
Tam remisyon cevabı (CR)	Kanda tayin edilebilir düzeyde paraprotein yok, kemik iliğinde plazma hücrelerinin yüzdesi normal veya kemik iliğinde miyelom hücresi yok
Çok iyi kısmi cevap (VGPR)	Paraproteinde tedavinin başlangıcından bu yana %90'dan fazla düşme
Kısmi cevap (PR)	Paraproteinde %50'den fazla düşme
Minimal cevap	Paraproteinde %25'ten fazla, ama %50'den az düşme
Stabil hastalık (SD)	Paraproteinde %25'ten az düşme, ancak artış yok
İlerleyici hastalık (PD)	Paraproteinde %25'ten fazla yükselme, veya yeni kemik lezyonlarının bulunması

Miyeloma Euronet AISBL. Myelom Temel Klavuzu. http://myeloma-euronet.org/_dl/multiple-myeloma/Multiple_Myeloma-tr.pdf (Mayıs 2009)

5.2. İmmünregulasyon

İmmün sistemin ana fonksiyonu patojen ve mikroorganizmalardan enfekte olmuş hücreleri yok etmek ve bu sırada da çevre doku hasarını minimal düzeyde tutmaktır. Antijen sunan hücre tarafından başlatılan immün yanıt humoral ve hücrel bağışıklık, hücre- mediyatör etkileşimleri ve immün sistemi düzenleyici sinyal iletilici fonksiyona sahip bir polipeptit olan lenfokin üretimi ile aktive edilmektedir. Bunun sonucunda sitotoksik efektör T hücreleri oluşarak antijene özgül yanıt oluşturacak antikorlar salgılır. İmmün sistemin vücudun kendi antijenlerini tanıyarak zarar vermeden sadece patojen türevli enfekte molekülleri yani yabancı antijenleri yok etmesi oldukça hassas bir denge gerektirmektedir. Oluşan bu dengeli sisteme immün tolerans denir. İmmün toleransın bozulması halinde organizmanın kendi antijenlerine immün yanıt oluşturması durumunda ortaya çıkan hastalığa otoimmün hastalık denir. Bunun yanı sıra immün yanıtın azalması halinde immün sistem çökebilir veya immün yanıtındaki dengesizlikler alerjiye sebep olabilir (26, 27). Bu durumların ortaya çıkmasını kontrol ederek immünregulasyonu sağlayacak bazı sistemler mevcuttur. İmmün tolerans klonal delesyon yoluyla gerçekleşen merkezi tolerans ve periferik tolerans mekanizmalarına sahiptir. Merkezi toleransta T hücrelerinin timustaki gelişme sürecinde vücudun kendi antijenlerine karşı reseptör taşıyan hücreler yıkıma uğramaktadır. Böylece daha lenfositlerin

olgunlaşma sürecinde negatif seleksiyon gerçekleşerek klonal bir delesyon meydana geydana gelmektedir (28, 29). Periferal toleransta antijen sunan hücrelerin antijen sunumu sırasında ikinci bir sinyal iletmesi bozularak klonal anergi adı verilen durum oluşturulur. Klonal anerjide sıklıkla görev yapan B7 ailesi moleküllerinin etkileşimi önem taşır. Olgunlaşmış bir dendritik hücre veya antijen sunan hücre üzerindeki B7 reseptörü ile aktif haldeki bir T hücresinin üzerindeki CD28 'in ya da *cytotoxic T-lymphocyte antigen 4* (CTLA4) 'ün etkileşimi sonucunda ikincil sinyal iletimi engellenebilmektedir (30-32). Periferal toleransın en önemli parçası olan bir diğer sistem ise düzenleyici T hücreleridir (T_{reg}). Düzenleyici T hücreler immün sistemi baskılayıcı yönde etki ederek otoimmüniteyi ve graft rejeksiyonu önlemekte olup azalan T_{reg} fonksiyon aktivitesi ise otoimmün hastalıklara duyarlılığı artırmaktadır. Ancak T_{reg} hücrelerinin infeksiyöz ajanlara ve tümör hücrelerine karşı tüm immün cevapları module ederken anormal immünsüpresif fonksiyon göstermesi sonucunda infeksiyon veya malign durumlar da ortaya çıkabilmektedir. Monoklonal immünglobülin üretimi ile karakterize olan MMda baskılanmış diğer immünglobülin ekspresyonlarıyla birlikte fonksiyon göstermeyen T hücre yanıtları da mevcuttur. Bu immün fonksiyon bozukluğunun temelindeki sebeplerden birinin T_{reg} hücrelerinin anormal aktivitesi olduğu bilinmektedir (29, 31, 33, 34).

5.3. Düzenleyici T Hücreleri (T_{reg})

Düzenleyici T hücreler ilk kez 1970 yılında süpresör hücreler olarak tanımlanmıştır. 1980 'lerde ise izolasyon ve tanımlanmasının zorluğundan dolayı çalışmalar bırakılmıştır. 1995 yılında Sakaguchi 'nin interleokin-2 (IL-2) reseptörü α zincirinin (*cluster of differentiation 25*, CD25) CD4+ T_{reg} hücreler için fenotipik bir belirteç olduğunu bulmasıyla birlikte T_{reg} hücreleri üzerine çalışmalar tekrar hız kazanmıştır (35).

5.3.1. T_{reg} Hücrelerinin Sınıflandırılması: T_{reg} hücreleri oluşum şekillerine göre ikiye ayrılır. Direkt olarak timus kökenli olanlara doğal T_{reg} hücreleri denirken CD4+ veya CD8+ hücrelerden bir antijene temas sonucu oluşanlara ise uyarı kökenli ya da indüklenmiş T_{reg} hücreler (iT_{reg}) denir. T_{reg} hücreleri hücre tipine göre ise CD4+ ve CD8+ olmak üzere iki ana sınıfa

ayrılmaktadır. CD4⁺ T_{reg} hücreleri beş grupta incelenir. Timus kökenli doğal bulunan T_{reg} hücreler, periferal yolla indüklenmiş T_{reg} hücreler, tip 1 regülör (Tr1) ve T yardımcı 3 (Th3) hücreler ile *transforming growth factor-β* (TGF-β) / IL-10 çift pozitif CD4⁺ T_{reg} hücreler olarak adlandırılmakta olup farklı fenotiplere ve farklı immünsüpresif mekanizmalara sahiptirler. Ayrıca CD4⁺ iT_{reg} hücreler CD4⁺ T hücrelerin in vivo veya ex vivo yolla aktif hale gelmesi sonucunda süpresif etkilerini gösterebilmektedirler. Timus kökenli doğal bulunan T_{reg} hücreler ve periferal yolla indüklenmiş T_{reg} hücreler CD4⁺ CD25⁺ *forkhead box p3* (Foxp3⁺) fenotipine sahiptirler. Immünsüpresif etkilerini invitro (CTLA4) aracılı hücre-hücre kontağı ve in vivo hücre-hücre kontağı ile IL-10 ve TGF-β eksprese ederek sitokin aracılı olarak gerçekleştirirler. Tr1 hücreler CD4⁺ CD25[±] Foxp3⁻ ve yüksek IL-10 fenotipine sahip olup immünsüpresif etkisini hücre- hücre kontağı ve IL-10 eksprese ederek sitokin aracılı olarak gerçekleştirirler. Th3 hücreleri CD4⁺ CD25[±] Foxp3⁻ ve yüksek TGF-β fenotipine sahip olup immünsüpresif etkisini sadece TGF-β eksprese ederek sitokin aracılı olarak gerçekleştirirler. Son olarak TGF-β/ IL-10 çift pozitif CD4⁺ T_{reg} hücreler ise TGF-β/ IL-10 çift pozitif ve CD4⁺ CD25⁻ Foxp3⁻ fenotipe sahip olup immünsüpresif etkisini sadece IL-10 ve TGF-β eksprese ederek sitokin aracılı olarak gerçekleştirirler. CD8⁺ T_{reg} hücreleri T süpresör hücreler (Ts) ve IL-10 üreten CD8⁺ T hücreleri olmak üzere iki grupta incelenir. Ts hücreler CD8⁺ CD28⁻ fenotipe sahip olup immünsüpresif etkisini CTLA4 aracılı hücre-hücre kontağı yoluyla gerçekleştirirler. IL-10 üreten CD8⁺ T hücreleri ise CD8⁺ IL-10⁺ fenotipe sahip olup immünsüpresif etkisini IL-10 eksprese ederek sitokin aracılı olarak gerçekleştirirler (35, 37, 38, 39). T_{reg} hücrelerin genel sınıflaması Tablo 7 'de belirtilmektedir.

Tablo 7. T_{reg} Hücrelerin Genel Sınıflaması

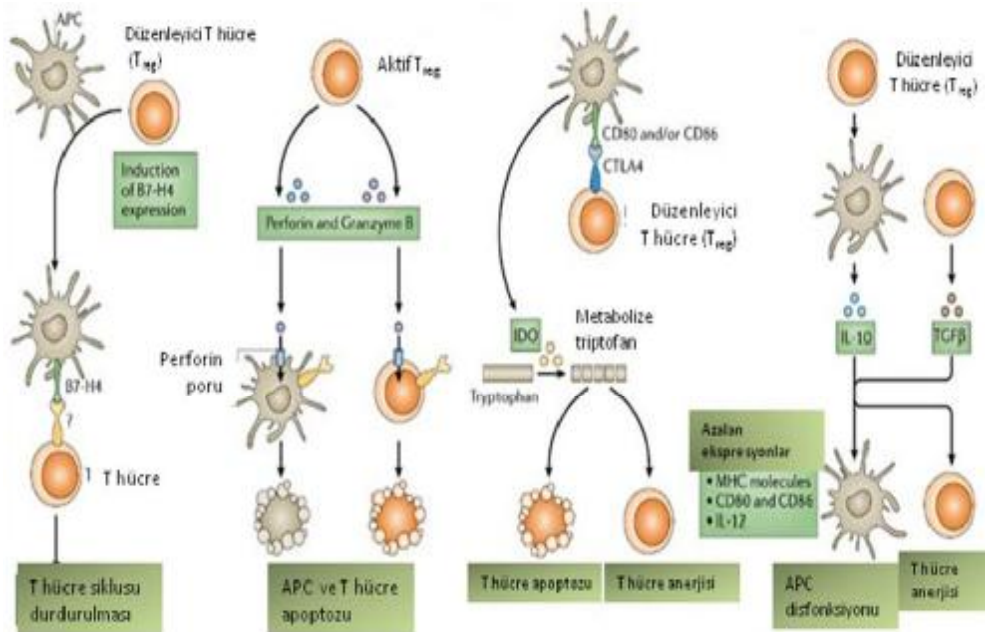
T _{reg} Alt Sınıfı	Regülör mekanizma	Eksprese edilen transkripsiyon faktörü	Fonksiyon
CD4 ⁺ CD25 ⁺ T _{reg} hücreleri	- Hücre- hücre kontağı - Sitokinler (IL-10)	Foxp3	- Çoğaltım süpresyon - Yabancı antijenlerin rejeksiyonunun inhibe edilmesi - Bakteriyel enfeksiyonlara karşı yanıtın inhibe edilmesi - UV- aracılı süpresyon

Tr1 hücreleri	IL-10	Foxp3 (?)	• Ctoimmün süpresyon
Th3 hücreleri	TGF- β		• Ctoimmün süpresyon
NK T _{reg} hücreleri	IL-4, IL-10, TGF- β sitotoksiste		• Tümörlerin ve viral antijenlerin eliminasyonu • Ctoimmün süpresyon • UV ile indüklenen tümörlere karşı korumaya yönelik immün sistemin modülasyonu

5.3.2. T_{reg} Hücrelerinin Etki Mekanizması: Tüm timus kökenli doğal bulunan ve indüklenmiş T_{reg} hücrelerinin süpresif fonksiyonlarını göstermesi için bir T hücre reseptörü (TCR) tetiklemesine ihtiyacı vardır. T_{reg} hücrelerin efektör T hücre aktivasyonunu baskılaması ve fonksiyonu üzerine mekanizması kesin ve net olarak aydınlatılamamıştır (31, 35). Ancak genel anlamda T_{reg} hücrelerin süpresif etki mekanizmasını sınıflandırmada da görüldüğü üzere hücre-hücre kontağı ve sitokin aracılı olmak üzere iki yolla gerçekleştiği belirlenmiştir. CD4⁺ CD25⁺ T_{reg} hücreler efektör T hücre proliferasyonunu ve interferon gama (IFN γ) üretimini direk bu hücrelerle temas ederek gerçekleştirebilmektedir. Efektör T hücre üzerindeki CD80/ CD86 'nın süpresör hücre yüzeyindeki (CD4⁺ CD25⁺ T_{reg} hücre) CTLA-4 ile ligasyonu sonucunda baskılayıcı etkili sinyal iletilerek efektör T hücrenin fonksiyonu inhibe edilmiş olur. T_{reg} hücrelerin efektör T hücrelerin fonksiyonunu etkilemesinde bir başka mekanizma dendritik hücre (DC) modülasyonu aracılığıyla DC üzerindeki CD80/ CD86 'nın süpresör hücre üzerindeki CTLA-4 ile ligasyonu sonucunda indoleamin-2,3-dioksigenaz (IDO) ekspresyonu ve aktivasyonu artar. IDO triptofan aminoasidi degradasyonunda yer alan katabolik bir enzimdir. Bu nedenle triptofanın azalması sonucunda T hücrelerin delesyonuna ya da aktivite kaybına yol açmaktadır (35, 37,38). Şekil 2 'de bu mekanizmalar şematize edilmiştir. Bu bilinen mekanizmalar dışında T_{reg} hücrelerin hücre-hücre kontağı yoluyla nasıl süpresif etki gösterdiği hala araştırılmaktadır. Hücre- hücre kontağı bağımlı sitokin bağımsız mekanizmaya karşılık in vitro çalışmalara göre Tr1 hücreleri ve Th3 hücreleri süpresif aktivitelerini IL-10 ve TGF- β

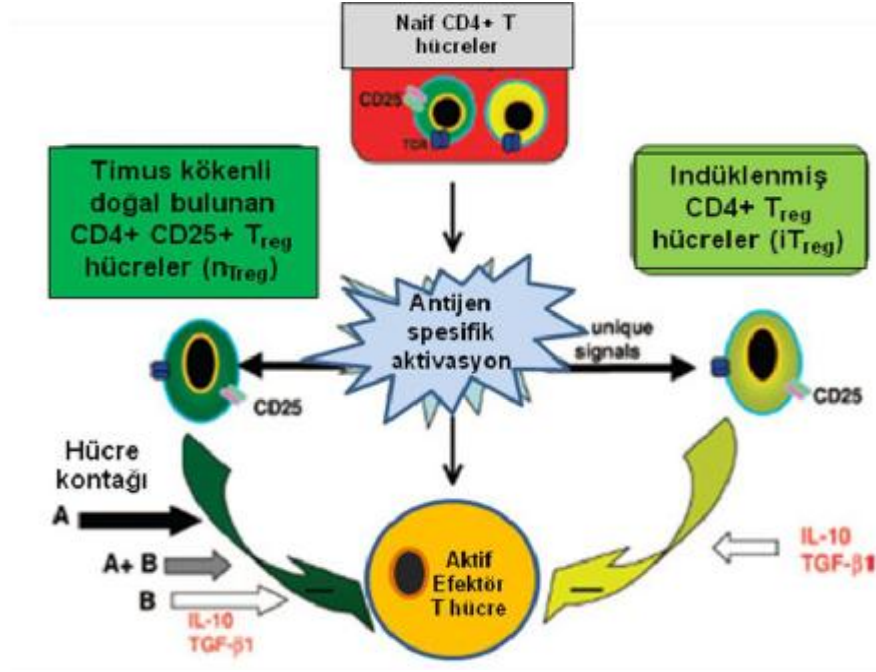
immünsüpresif sitokinlerini üreterek göstermektedirler. Şekil 3 'de T_{reg} hücrelerin etki mekanizması gösterilmektedir. T_{reg} aktivitesinde immünsüpresif sitokinlerin katkısı hedef organın doğası, inflamasyonun derecesi gibi birçok fizyolojik faktör ile etkilenebilir. IL-10 hasarı sonucu *colitis*, TGF- β bağımlı diyabet oluşumu gibi bazı otoimmün hastalıklar da ortaya çıkabilir. $CD4^+$ $CD25^+$ T_{reg} hücreler *granzyme A* eksprese edebilirler. Böylece $CD4^+$ ve $CD8^+$ T hücreleri perforin bağımlı mekanizma üzerinden öldürebilirler. Bunlara ek olarak T_{reg} hücreler DC olgunlaşmasını ve aktivasyonunu sitokin salınımıyla önlemektedirler. Bunun için IL-10 DC üzerindeki *major histocompatibility complex* (MHC) sınıf 2 'yi ve $CD80/CD86$ ko-stimule edici moleküllerin uyarıya yanıt vermesini baskılayarak DC 'nin antijen sunma kapasitesine zarar verir. TGF- β da MHC sınıf 2'nin ekspresyonunu bozup ko-stimule edici moleküllerin de etkinliğini önler. Ayrıca $CD8^+$ T_{reg} hücreler de ko-stimule edici moleküllerin de etkinliğini önlemektedir. Buna ek olarak DC tarafından Ig benzeri transkript 3 ve 4 (ILT3 ve ILT4) ekspresyonunu artırırlar. ILT molekülleri Ig benzeri inhibitör reseptör ailesindendir. Fonksiyon olarak ise öldürücü hücre inhibitör reseptörleri ile ilişkilidirler. ILT nin antijen-sunan hücrelerde ligasyonu Ca^{2+} mobilizasyonunu ve tirozin fosforilasyonunu engeller. Ayrıca böyle ILT eksprese eden DC hücreleri $CD4^+$ T hücrelerini immünsüpresif fonksiyona sahip Treg hücrelerine dönüştürebilmektedir (32, 35, 41, 42, 43).

Şekil 2. T_{reg} Hücrelerin Etki Mekanizmaları



Zou W. Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. Nat Rev Immunol. 2006; 6:295-307

Şekil 3. T_{reg} Hücrelerin Hücre KONTAĞI ve Sitokinlerle Genel Etki Mekanizmaları



Toda A, Piccirillo CA. Development and function of naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells. J Leukoc Biol, 2006; 80:458-470

5.3.3. T_{reg} Hücrelerinin Karakterizasyonu: Timus kökenli doğal bulunan CD4+ CD25+ T_{reg} hücreler total periferel CD4+ T hücrelerin %5-10'unu oluşturan immünsüpresif etkili T hücre popülasyonudur. CD25 ekspresyonunun yanısıra bazı belirteçleri de eksprese ederler. Bunlar, *glicocorticoid induced tumor necrosis factor* (TNF) reseptör ilişkili protein (GITR), TNF superailesi üyelerinden OX40 (CD134), lökositler üzerinde bulunan bir hücre adezyon molekülü olan L-selektin (CD62 ve ligandı CD62L) ve CTLA-4 (CD152) olarak adlandırılır (42, 43). Ancak bu belirteçlerin hiçbirisi spesifik bir şekilde T_{reg} hücreleri tanımlamaz. Bu belirteçler belli derecelerde aktif T hücre alt gruplarında ve bazı antijen sunan hücreler (APC) üzerinde de eksprese edilmektedirler. Yakın zamandaki çalışmalar Foxp3 transkripsiyon faktörünün T_{reg} hücreleri tanımlayıcı özel bir belirteç olduğunu ortaya koymuştur. CD4+ CD25+ T_{reg} hücrelerin gelişimi ve fonksiyonu için Foxp3 oldukça önemli bir transkripsiyon faktörüdür. Foxp3'ün fonksiyonunu

kaybetmesi sonucunda gelişen mutasyonlar T_{reg} hücrelerin eksikliğine ve bundan kaynaklanan ciddi bazı otoimmün bozukluklara yol açmaktadır. T hücrelerde Foxp3 'ün ektopik ekspresyonu bu hücrelerin regülatör fenotip ve süpresif fonksiyon kazanmasına neden olmaktadır. Ayrıca Foxp3 bir Rel ailesi transkripsiyon faktörü olan *nuclear factor of activated T-cells* (NFAT) ve aktif B hücrelerinin NFkB hafif zincirlerinin hedef genlerini indüklemeye özelliklerini engellemektedir (35, 43, 44, 46, 47, 48). Bunun sonucunda IL-2 ve diğer sitokin genlerinin (IFN γ , IL-4 gibi) transkripsiyonel bir baskılayıcısı özelliğini kazanır. Tüm bunlara ek olarak Foxp3 devam etmekte olan immün yanıtların kontrolü için aktif T hücrelerine negatif geri besleme yoluyla etki etmektedir (44, 46).

5.3.4. T_{reg} Hücreleri ve Kanseri İlişkisi: T_{reg} hücreleri konakçıyı kendi antijenlerine karşı reaktif hücreleri baskılayarak otoimmün hastalıklara karşı korur. Burdan yola çıkarak güncel araştırma konuları çoğunlukla otoimmün hastalıklarda T_{reg} hücre defektlerinin karakterizasyonu ile T_{reg} hücrelerinin bulaşıcı hastalıklar ve allojenik kemik iliği transplantasyonu sonrası toleranstaki rolü üzerinedir. T_{reg} hücre biyolojisi üzerine araştırmalar yoğunlaşıyor olsa da, insan tümörlerinde T_{reg} hücrelerin özellikle timustan mı ilk olarak ortaya çıktığı yoksa antijen spesifik bir stimülasyon nedeniyle periferde mi oluştuğu hala belirsizdir. T_{reg} hücrelerinin, immün sistemin kendi hücrelerine karşı tepki vermemesi için var olan dengenin gerçekleşmesinde merkezi bir fonksiyonu olmasına rağmen bu negatif yöndeki düzenleyici aktivite ters etkili gerçekleşerek tümörlere ve viral enfeksiyonlara karşı normalde olması gereken immün cevabı baskılayabilir. Yani T_{reg} hücreleri kanser hastalarında anti-tümör immün cevabı bozmaktadır (31, 34, 35, 39, 40). Yapılan çeşitli çalışmalar da bu durumu desteklemektedir. Akciğer, pankreas, göğüs, karaciğer, deri vb. kanserlerde periferik kanda ve tümörün iç-dış çevresinde yüksek seviyelerde CD4+ CD25+ T_{reg} hücreleri saptanmıştır (49, 50). Akciğer kanseri hastalarından alınan tümör dokusundan izole edilen T_{reg} hücrelerinde, in vitro anti-CD3/ anti-CD28 ile uyarılmış T hücrelerinin güçlü immünsüpresif etkisi gösterilmiştir (51). Doğal olarak bulunan CD4+ CD25+ T_{reg} hücrelerine ek olarak IL-10 üreten Tr1 hücrelerinin de kanser hastalarında etkisiz anti-tümör yanıtı sebep olduğu saptanmıştır. Buna örnek bir çalışma olarak, insan over tümörlerinde

plazmasitoid dendritik hücrelerin IL-10 salgılayan CD8+ T_{reg} hücrelerinin anti-tümör immün cevabı IL-10 ile baskılama aktivitesini indüklediği bulunmuştur (52). Viehl CT ve arkadaşları, CD4+ CD25+ T_{reg} hücrelerinin azaltılmasının farelerde pankreas kanserinde immün yanıtı ilerlettiğini ortaya koymuştur (53). Heier ve arkadaşları, CD4+ CD25+ T_{reg} hücrelerinin azaltılmasının farelerde B hücreli lenfoma modelinde lokal tümör gelişimini inhibe ettiğini göstermişlerdir (54). Yokokawa ve arkadaşları, periferik kandaki CD4+ CD25+^{high} Foxp3+ T_{reg} hücrelerinin prostat kanseri hastalarında fonksiyonunun arttırdığını göstermişlerdir. T_{reg} hücrelerinin kanser hastalarında artan miktarlarda görülmesi yüksek mortalite ve azalan hastalıktan bağımsız sağkalım süresi ile ilişkilendirilmektedir (55).

Prabhala ve arkadaşları, normal immün yanıtın düzenlenmesinde önemli role sahip olan T_{reg} hücrelerinin MMda ve MGUS 'da anormal aktivitesini fenotipik karakterizasyon ve Foxp3 ekspresyonları ile tespit etmiştir (56). Atanackovic ve arkadaşları, CD4+ CD25+ Foxp3+ T_{reg} hücrelerinin MM hastalarında allojenik kök hücre transplantasyonu işlemi sonrasında kemik iliğinde yeniden kurulup çoğaldığını böylelikle graft karşıtı konakçı hastalığının (*graft versus host disease*, GVHD) ortaya çıkışını immünsüpresif etkiyle önlediklerini göstermişlerdir (57). Banerjee ve arkadaşları, miyelom hastalarında Foxp3 yüksek T_{reg} hücrelerinin insan dendritik hücreleri tarafından ve sitokin enjeksiyonu sonrası olgunlaşan dendritik hücreler tarafından in vitro ekspansiyonunu göstermiştir (39). Sonmez ve arkadaşları, MM hastalarında interferon- α -2a 'nın (IFN- α -2a) Th3 hücrelerinin sitokin yanıtındaki etkilerine bakarak IFN- α -2a 'nın Th3 dışı sitokin yanıtını arttırdığını göstermişlerdir (58). Condomines ve arkadaşları, fonksiyonel düzenleyici T hücrelerinin kök hücre otograflarında yüksek doz siklofosfamid ve granülosit koloni uyandırıcı faktör ile mobilizasyonu sonucunda toplandığını göstermiştir (59).

5.4. CD200 (OX2)

Yeni tanı MM hastalarının büyük çoğunluğunda malign plazma hücrelerinde ekspresyonu gerçekleşen CD200 monoklonal antikoru yeni bir prognostik faktör olarak önem taşımaktadır. CD200 tip 1 transmembran glikoproteini olup kostimülatör B7 reseptör ailesiyle ilişkilidir. İki ekstraselüler

immüoglobülin süper ailesi (IgSF) birimi, bir transmembran bölgesi ve sinyal motifi bilinmeyen kısa sitoplazmik kuyruğa sahiptir (60-62).

5.4.1. CD200 Etki Mekanizması: T hücre proliferasyonunu kostimüle eden CD200 çeşitli dokularda miyeloid hücre aktivitesini regüle edebilmektedir. Kuvvetli bir immünsupresif etkinliği olan CD200 'ün ekspresyonu özellikle hematopoietik kökenli hücreler olan makrofajlar, dendritik hücreler, mast hücreleri ve nötrofillerin yanı sıra timositler, T ve B lenfositler, bazı dendritik hücreler, nöronlar ve endotel hücreler üzerinde gerçekleşmektedir (34, 60). CD200 immün düzenleyici sinyalleri kendi reseptörü olan CD200R ile etkileşimi üzerinden bildirerek T hücre aracılı immün yanıtın baskılanmasına yol açar. CD200R, iki IgSF birimi ve bir intraselüler bölgesi ile yapısal olarak CD200 'e benzerlik gösterir. Ancak CD200 'den daha uzun olan ve üç tirozin artığı içeren sitoplazmik kuyruğuyla farklılık gösterir. Ayrıca CD200 'ün tümör spesifik efektör T hücresi immün yanıtlarını baskılayan T_{reg} hücrelerini indüklediği düşünülmektedir. CD200 ve CD200R miyeloid hücre fonksyonları için düzenleyici bir rol oynar. T hücre kostimülatör molekülleri CD80 ve CD86 ile yapısal olarak ilişkili olan CD200 genetik olarak da insan kromozomu 3 ve fare kromozomu 16 üzerinde bu moleküllere bağlıdır. CD200 delesyonu miyeloid hücre regülasyon bozukluğuna ve otoimmün inflamasyonlara artan duyarlılıkla sonuçlanır (63-67).

5.4.2. CD200 ve Kanseri İlişkisi: CD200 ile ilgili yapılan bir çalışma sonucunda CD200 ekspresyonunun malign melanom hastalarında diğer insan solid tümörlerine kıyasla çok daha fazla olduğu ortaya konulmuştur. Yüksek CD200 ekspresyonları melanom hücrelerinin dendritik hücreler üzerinden T hücrelerinin anti-tümör immün yanıt oluşturmalarını baskılamasını sağlayıcı önemli bir fonksiyonu vardır. Ayrıca malign melanom hastalarının yaklaşık %80 'inde anormal şekilde aktivite gösteren N-RAS/ B-RAF/ MEK/ERK MAP kinaz sinyal yollarının CD200 'ü regüle ettiği ortaya konmuştur (62). Weiguo Cui ve arkadaşları, CD200 delesyonunun osteoklast diferansiyasyonunu azaltarak kemik yoğunluğunu arttırıcı etkisi olduğunu göstermişlerdir (67). Kawasaki ve arkadaşları, CD200 'ün kanser kök hücreleri (CSC) üzerinde ekspresyonunu ve bundan yola çıkarak CSC için potansiyel bir

belirteç olduğunu göstermiştir. Ayrıca tümörün CD200 eksprese eden CSC üzerinden immün sistemden kaçabildiğini önermişlerdir (68). McWhirter ve arkadaşları, immünsupresif bir protein olan CD200 'ün regulasyonunun etkinliğini artırıcı yönde gerçekleşmesinin kronik lenfositik lösemi (CLL) tümörlerinin immün sistemden kaçtığı bir mekanizma olduğunu ve CD200 ile CD200R etkileşiminin bloke edilmesinin terapötik açıdan yararlı olabileceğini göstermişlerdir (61). Gorczynski ve arkadaşları, anti- CD200R monoklonal antikorlarının (MoAb) dendritik hücre gelişimini ilerlettiğini, T_{reg} hücrelerini indüklemeye kapasitesine sahip olduğunu ve T_{reg} hücrelerin timusta üretimini direk etkiyle arttırdığını göstermişlerdir (69). Moreaux ve arkadaşları, renal karsinom, baş-boyun karsinomu, testis kanseri, malign mezotelyom, kolon karsinomu, MGUS/ semptomatik miyelom ve CLL 'de normal hücrelerine kıyasla CD200 'ün aşırı miktarda ekspresyonu olduğunu ve bu nedenle de kanser için önemli bir terapötik hedef olduğunu göstermişlerdir (70).

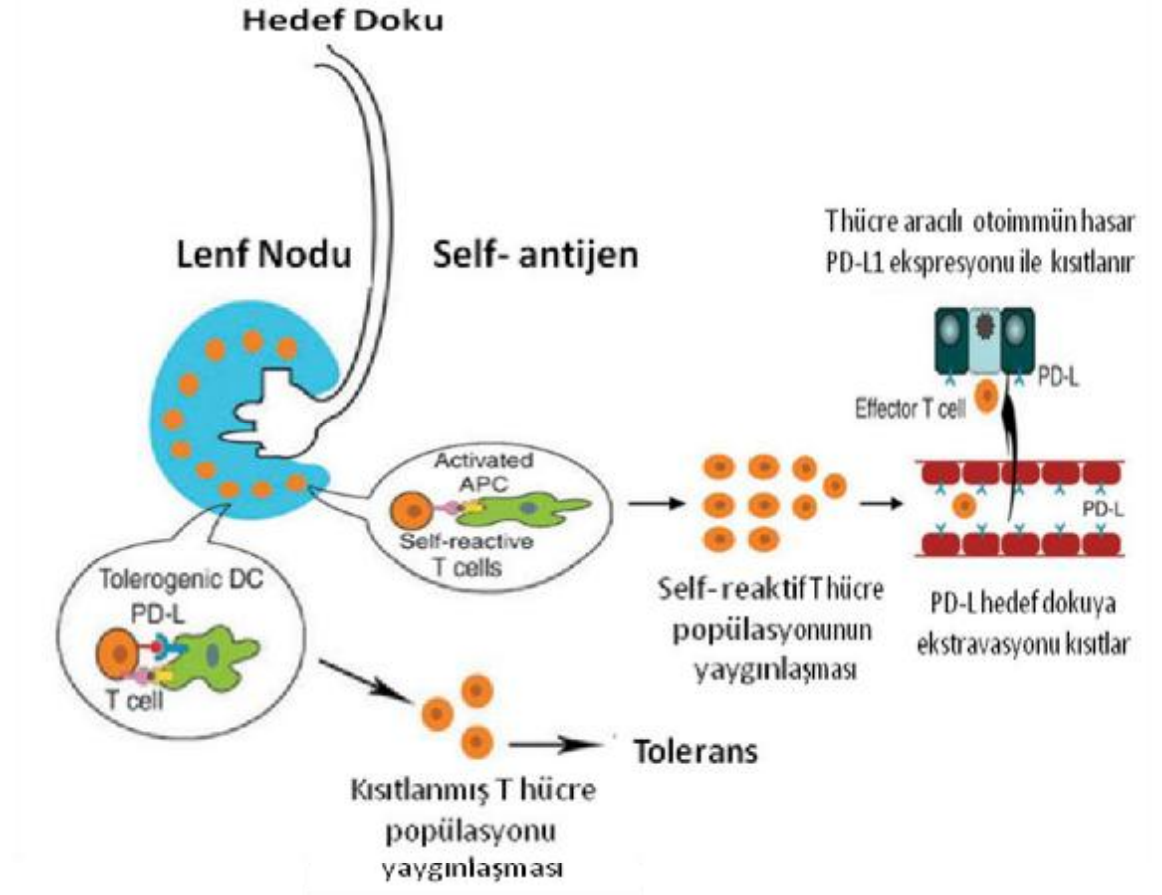
5.5 Programlı Ölüm-1-1 (PD-1)

Tümörlerin konak T hücreleri tarafından tanınabilen antijenler eksprese etmesine karşın immün sistem tarafından ortadan kaldırılmaları oldukça nadir görülür. Bunun nedeni, tümör mikroçevresi tarafından immün yanıtın baskılanmasıdır. PD-1 ve çoğu tümör tarafından ekspresyonu gerçekleşen ligandları programlı ölüm-1 ligand-1 ve programlı ölüm-1 ligand-2 (PD-L1 ve PD-L2) T hücre aktivasyonu, toleransı, immün patolojisi arasında denge oluşturmak üzere inhibitör sinyaller vererek bu supresif etkinin bir parçası olup diğer immünsupresif sinyallerle uyum içinde işlev görmektedir. Hücrenin yabancı ve kendisine ait antijenlerine immün yanıt oluşturarak patojenlerden ve tümörlerden arındırması için bu dengenin korunması büyük önem taşır. Tirozin bazlı inhibitör motifine (ITIM) sahip PD-1 reseptörü T hücrelerin aktivasyonu üzerine eksprese edilen bir immün reseptördür (71-74).

5.5.1. İmmünregulasyonda PD-1 'in Etkisi: PD-1 negatif olan hayvanlarda otoimmün hastalıkların görülmesi PD-1 'in immün yanıt oluşumunda inhibe edici bir etkisi olduğunu göstermektedir. PD-L1 ekspresyonu PD-L2 'den daha fazladır ve meme, akciğer, kolon, over, melanom, karaciğer, mide, epitelial gibi pek çok solid tümörde mevcuttur. PD-L1 konstitütif olarak

eksprese edilir ve inflamasyon halinde ekspresyonu artar ancak PD-L2 ise özellikle aktif dendritik hücreler, makrofajlar ve mast hücrelerinde eksprese olur. Interferon α , β ve γ APC, endotelial hücreler ve epitelyal hücreler üzerinde PD-L1 ekspresyonunu artırır (72-75). Buna ek olarak bu ligandların reseptörü olan PD-1 ekspresyonu tümör infiltrate etmede rolü olan aktif T hücreler (CD4+ ve CD8+), B- hücreler, doğal öldürücü hücreler (*natural killer cells, NK*) ve DC 'ler üzerinde gerçekleşir (32, 74, 76). Hücreler tolerans ve tüm diğer immün yanıtlar için kritik bir düzenleyici role sahip bir inhibitör reseptör olan PD-1 'in tümör infiltrate eden lenfositler üzerinde ekspresyonunun artması tümör immünsupresiyonuna katkıda bulunur (30, 32, 77). PD-1 'in T hücrelerinin regülasyonunda negatif etkisi aydınlatılmış olmasına rağmen PD-L 'ların T hücre aktivasyonundaki rolü yeni anlaşılmalıya başlanmıştır. Ancak çoğu çalışma ile PD-L 'ların T hücre proliferasyonunu ve sitokin üretimini inhibe ettiği, T hücre aktivasyonunu ise geliştirdiği gösterilmiştir. Bu çelişen sonuçların nedenleri tam olarak bilinmemektedir ancak PD-L1 ve/ veya PD-L2 'nin iki yönlü sinyalizasyon etkisi olabileceği düşünülmektedir. PD-1 ve PD-L1 düzenleyici T hücreler üzerinde eksprese olarak bu hücrelerin efektör T hücreleri üzerine supresif etkilerini kontrol edebilirler. Ayrıca PD-1 ve PD-L1 'in her ikisi de CD4+ CD25+ T_{reg} hücrelerde eksprese olurlar ancak bu hücrelerin fonksiyonlarını nasıl etkiledikleri tam olarak aydınlatılamamıştır. Ancak PD-L1 'in bloke edilmesinin T_{reg} hücrelerin immünsupresif fonksiyonunun in vitro inhibisyonu ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (32, 78, 79, 80). PD-1/ PD-L yolağının otoimmün sistemi regülasyondaki etkinliği Şekil 4 'de gösterilmektedir.

Şekil 4. PD-1/PD-L Yolağının Otoimmün Sistemi Regülasyondaki Etkinliği



Sharpe AH, Wherry JE, Ahmed R, Freeman GJ. PD-1/PD-L pathway controls autoimmunity. Nat Immunol. 2007; 8:239-245

5.5.2. PD-1 'in Treg Hücrelerle İlişkisi: Kitazama ve arkadaşları, PD-1/ PD-L1 ilişkisinin bloklanması ile T_{reg} hücreleri aracılı immünregülasyonun ortadan kalktığını dolayısıyla PD1/ PD-L1 yolunun CD4+ CD25- T hücrelerin reaktif yanıtlarının T_{reg} hücreler tarafından baskılanması için gerekli olduğunu göstermişlerdir (81). Raimondi ve arkadaşları, normal fare dalak ve lenf nodlarından izole edilen Foxp3+ T_{reg} hücrelerin %90 'ının yüzeylerinde önemli düzeyde inhibitör reseptör PD-1 eksprese etmediğini ancak intraselüler PD-1 içerdiğini ve benzer fenotipin periferik kandan izole edilen CD4+ CD25^{high} T hücrelerde de görüldüğünü belirtmişlerdir. Bunun aksine aktif T hücrelerinin yüzeyinde yüksek seviyede PD-1 eksprese etmesiyle CD4+ CD25+ PD1- T hücrelerin izolasyonuna olanak verdiğini göstermişlerdir (82).

5.5.3. PD-1 ve Kanser İlişkisi: Hematolojik malignitelerden B hücre malignitelerinde PD-1 ve PD-L1 nadiren eksprese olurken MM hücrelerinde bol miktarda eksprese olurlar ve normal plazma hücrelerinde ekspresyonları görülmez (74, 75). Zhang ve arkadaşları, kemopreventif ajanların meme kanseri hücre yüzeylerinde PD-1 ekspresyonunu indüklerken, PD-L1 aracılı T hücre apoptozunu ilerlettiğini göstermiştir (83). Wong ve arkadaşları, PD-1 bloke edilmesinin insan melanom antijen spesifik CD8+ hücrelerinin yayılımını ve fonksiyonel kapasitesini artırdığını göstermişlerdir (84). Shimachu ve arkadaşları, yetişkin T hücreli lösemi/ lenfoma (ATL) hastalarında asıl PD-1 ekspresyonunun CD8+ değil CD4+ T hücreleri tarafından gerçekleştirildiğini ve bu ekspresyonun hem neoplastik hem de neoplastik olmayan CD4+ T hücrelerinde meydana geldiğini göstermiştir (85). Thompson ve arkadaşları, yüksek riskli renal hücreli karsinom hastalarında PD-1 eksprese eden immün sistem hücrelerinin seviyelerinin arttığını göstermiştir (86). Hamanishi ve arkadaşları, yüksek PD-L1 ekspresyonlu over kanserli hastaların düşük ekspresyonlulara göre daha kötü prognoza sahip olduğunu, ayrıca PD-L1 ekspresyonunun tümör infiltrate eden intraepitelyal CD8+ T hücrelerini doğrudan baskıladığını göstermişlerdir (87). Nakanishi ve arkadaşları, üretelyal kanserde PD-L1 'in agresif tümör varlığı ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Ayrıca antitümör immünitede PD-L1 ekspresyonunun düzenleyici fonksiyonu olduğunu dolayısıyla immüterapi için bir hedef olabileceğini belirtmişlerdir (88). Sun ve arkadaşları, gastrik karsinomda PD-L1 'in prognoz değerlendirirken etkili bir faktör olabileceğini ve insan anti- PD-L1 monoklonal antikorunun tümör ilişkili PD-L1 ile indüklenmiş T hücre apoptozunu inhibe ettiğini göstermişlerdir (89). Dorfman ve arkadaşları, PD-1 'in germinal merkez ilişkili T hücreler ve anjiyoimmünoblastik T hücreli lenfoma için bir belirteç olduğunu göstermişlerdir (90).

6.GEREÇ VE YÖNTEM

6.1. Olgular ve Kan Örnekleri

Bu çalışmaya 2001-2009 yılları arasında tanı almış, tedavi edilmiş ve izlenmekte olan yaşları 41-78 arasında değişen 10 kadın 18 erkek olmak üzere toplam 28 otolog kemik iliği transplantasyonu almış, otolog kemik iliği transplantasyonu almamış MM ve yeni tanı MM olgusu dahil edilmiştir. Olguların 11 'i otolog kemik iliği transplantasyonu almıştır. Olgular Dokuz Eylül Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Hematoloji servisi ve polikliniğince izlenmektedir. Olgular MM için Durie- Salmon Evreleme Sistemine göre evrelenmiştir. Olgulara ait arşiv dosyaları yeniden incelenmiş, tanı doğrulanmıştır. Dokuz Eylül Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Hematoloji polikliniğine gelen ve servisinde yatan hastalara gönüllü bilgilendirme formları verilip imzalatıldıktan sonra steril EDTA 'lı hemogram tüplerine yaklaşık 3 ml kan alındıktan sonra taze örneklerden PBMC ' Biocoll ayırma solusyonu ile yoğunluk gradient santrifügasyonu yöntemiyle izole edilmiştir. İzole edilen PBMC 'ler hemen gerekli monoklonal antikorlarla inkübe edilip hazırlanarak akım sitometrik analize tabi tutulmuşlardır.

6.2. Kullanılan Solüsyonlar, Kimyasal Maddeler, Gereçler

6.2.1 Kullanılan Solüsyonlar

- Fosfat Tamponlu Tuz Solüsyonu (PBS)
 - 150 mM NaCl + 10 nM Na- Fosfat, pH: 7,4 hazırlanıp +4°C saklandı
- Fiksasyon/ Permeabilizasyon Solüsyonu
 - 1:3 oranında Fiksasyon/ Permeabilizasyon konsantresi ile Fiksasyon/ Permeabilizasyon dilüenti karıştırılarak elde edildi ve 4°C saklandı
- 1x Permeabilizasyon Solüsyonu
 - 10x Permeabilizasyon solüsyonundan (BD Bioscience) 1ml alıp 9 ml distile su ile seyreltilerek elde edildi ve 4°C saklandı
- Paraformaldehit (PFA) Fiksatif Solüsyonu
 - 10 g PFA 250 ml izoton II solüsyonu inde çözülerek hazırlanıp +4°C saklandı

6.2.2. Kimyasal Maddeler

- İnsan kökenli Düzenleyici T Hücreleri Boyama Kiti (FITC anti-human CD4, PE anti-human CD25, PE-Cy5 anti-human Foxp3)
 - Akım Sitometri Boyama Tamponu, 200 ml (E-Bioscience)
 - Fiksasyon/ Permeabilizasyon Dilüenti, 100 ml (E-Bioscience)
 - 10x Permeabilizasyon Tamponu, 100 ml (E-Bioscience)
 - Fiksasyon/ Permeabilizasyon Konsantre Solüsyonu, 30 ml (E-Bioscience)
 - PE-Cy5 Konjüge Rat kökenli IgG2a İzotipik Kontrolü Klon eBR2a, 0.2 mg/ml, 0.125 ml (E-Bioscience)
 - PE-Cy5 Konjüge Anti-human Foxp3 Klon: PCH101, 0.5 ml, 20 µl/ test (E-Bioscience)
 - Normal Rat Serum, 0.1 ml (E-Bioscience)
 - FITC & PE Kokteyli Fare kökenli IgG1 İzotipik Kontrolü, 0.2 ml 10 testlik (E-Bioscience)
 - FITC- CD4, PE-CD25, CD4/ CD25 Kokteyl Kiti, Klon: RPA-T4 & BC96, 0.5 ml (E-Bioscience)
- PE Konjüge Fare kökenli IgG1k İzotipik Kontrolü, 2 ml 100 testlik (BD Pharmingen)
- PE Konjüge Fare kökenli anti- human CD200, 2 ml 100 testlik (BD Pharmingen)
- FITC Konjüge Fare kökenli anti- human PD-1 Klon: MIH4, 0.1 mg (BD Pharmingen)
- FITC Konjüge Fare kökenli IgG1k İzotipik Kontrolü, 2 ml 100 testlik (BD Pharmingen)
- Biocoll – Ficoll Ayırma Solüsyonu d. 1.077 g/ml, 500 ml (Biochrom)
- İzoton II Solüsyonu (*Isoton Shealth Fluid*), 1000 ml (Beckman Coulter)
- 10x Permeabilizasyon Solüsyonu, 30 ml (BD Bioscience)

6.2.3. Kullanılan Gereçler

- Santrifüj Cihazı Soğutmalı Beckman J6-MI Centrifuge
- Akım Sitometri Cihazı Beckman Coulter Epics XL. MCL
- EDTA 'lı hemogram tüpü Tıp Kim San

- Dibi konik falkon tüp, steril (15 ml) Greiner
- Steril Pastör Pipeti Greiner
- +4 °C buzdolabı Beko 9610 NM
- -20 °C derin dondurucu Beko 9610 NM
- Otomatik pipet 0.5-10 µl Isolab
- Otomatik pipet 20-200 µl Isolab
- Otomatik pipet 100-1000 µl Isolab
- Plastik pipet ucu sarı ve mavi birer paket Ependorf
- Plastik beyaz pipet ucu bir kutu Ependorf

6.3. Periferik Kan Mononükleer Hücrelerin (PBMC) Dansite Gradient Santrifügasyon Yöntemi ile İzolasyonu

6.3.1. Genel İlke:

Aynı yoğunluğa sahip olan tanecikler şekil veya boyut olarak farklılaşabilir. Ömek sükröz veya benzeri viskoz bir ortamın gradienti üzerine yerleştirildiğinde taneciklerin yoğunluğunun sıvının yoğunluğundan fazla olması nedeniyle tanecikler santrifügasyona bağlı olarak çöker. Bu durum dansite gradient santrifüjünün temel prensibini oluşturur. Ancak bütün taneciklerin çökmemesi için santrifügasyonun durdurulması gerekmektedir. Sallanan veya zonal rotor kullanılabilir. Bu çalışmada Biocoll gradientli ortamı içinde PBMC 'ler dansite gradient santrifüjü uygulanarak izole edilmiştir. Biocoll ayırma solüsyonu Ficoll 400® (Polisükröz 400) içeren yaklaşık 400000 Dalton moleküler ağırlıkta bir polimerdir. Yoğunluğu 1.1 g/ml üzerindeki yapılar bu hidrofilik polimer kullanılarak elde edilebilir. Biyoloji laboratuvarlarında bu solüsyon ile kan farklı hücre kompartımanlarına ayrılır. 1.077 g/ml ve 1.090 g/ml yoğunluklarda iki formu olan Biocoll ayırma solüsyonları ile farklı hücre tipleri birbirinden ayrılır. Bu çalışmada PBMC 'leri izole edebilmek için 1.077 g/ml 'lik Biocoll solüsyonu kullanılmıştır. 1.077 g/ml 'lik Biocoll ile yapılan dansite gradient santrifügasyonu sonunda en altta dansiteleri 1.077 g/ml'den fazla olan eritrositler ve granülositler kırmızı tabaka halinde toplanır. Orta tabakada dansiteleri yaklaşık 1.077 g/ml olan lenfositler flu bir tabaka halinde yoğunlaşırken en üstte ise sarımtırak bir tabaka olarak trombositler ve monositler yer alır.

6.3.2. Uygulama Basamakları

- Olgulardan steril EDTA 'lı hemogram tüplerine alınan yaklaşık 3 ml taze kan fosfat tamponlu tuz solüsyonu (PBS) ile 1:1 oranında seyreltildi.
- 15 ml dibi konik boş falkon tüpe 4 ml Biocoll ayırma solüsyonu eklendi.
- Üzerine tüpü 45 derecelik açı ile tutarak tüpün ağzının kenarında yavaşça pastör pipetiyle seyreltilmiş kan örneği ilave edildi.
- Bu işlem sonunda falkon tüpünde altta şeffaf Biocoll solüsyonu ile üzerinde kan örneği olmak üzere ayrı iki faz gözlemlendi. Fazların birbirine karıştırılmamasına dikkat edildi.
- Tüpün karşısına salınlı rotor üzerinde aynı ağırlıkta bir tüp koyulup denge sağlanarak +4°C 'de 1650 rpm 'de 20 dk santrifüj edildi.
- Santrifüj sonunda tüpün dibinde kırmızı eritrosit ve granülosit tabakası, biraz üzerinde ortada beyaz flu halde lenfosit tabakası ve onun da üzerinde sarımtırak halde trombositler ve monositlerin bulunduğu 3 ayrı tabaka gözlemlendi.
- İzole edilmek istenen ortadaki flu PBMC tabakası temiz bir pastör pipet ile dikkatlice toplanıp başka bir dibi konik boş 15 ml 'lik falkon tüpe aktarıldı.
- Elde edilen PBMC 'lerden istenmeyen artıkların uzaklaştırılması için yıkama işlemi yapıldı.
- Yıkama için PBMC 'ler üzerine yaklaşık 8 ml PBS eklendi.
- Tüpün karşısına salınlı rotor üzerinde aynı ağırlıkta bir tüp koyulup denge sağlanarak +4°C 'de 1200 rpm 'de 5 dk santrifüj edildi.
- PBMC 'ler tüpün konik dibinde beyaz bir pellet olarak gözlemlendi.
- İstenmeyen artıklar uzaklaştırılmak üzere süpernatant atıldı.
- Pellet üzerinde tekrar yaklaşık 8 ml PBS eklendi.

- Tüpün karşısına salınımlı rotor üzerinde aynı ağırlıkta bir tüp koyulup denge sağlanarak +4°C 'de 1200 rpm 'de 5 dk santrifüj edildi.
- PBMC 'ler tüpün konik dibinde beyaz bir pellet olarak gözlemlendi.
- İstenmeyen artıklar uzaklaştırılmak üzere süpernatant atıldı.
- Dipte kalan hücre pelleti üzerine 500 ml izoton solüsyonu eklenerek resüspanse edildi.
- Böylece PBMC 'ler akım sitometrik analiz için gerekli işlemlerde kullanılmak üzere 500 ml 'lik hücre süspansiyonu halinde elde edilmiş oldu.

6.4. Akım Sitometri ile CD4+ CD25+ Foxp3+ T_{reg} hücrelerin ve PD-1+ T hücreler ile CD200+ T hücrelerin seviyelerinin tespiti

6.4.1. Genel İlke:

Akım sitometrik ölçümlerde öncelikle hücreler *fluorescein isothiocyanate* (FITC), *phycoerythrin* (PE) gibi floresanlanmış moAb ile işaretlenir. İşaretlenmiş bu hücreler sıvı bir ortamda sıra halinde uyarıcı ışıktan (argon lazer) 488nm 'de geçirilirler. Uyarıcı ışık ya hücreler tarafından kınılır ya da florokromla işaretlenmiş mAb 'lerin bağlandığı hücre tarafından emilir ve yayılır. Bu yayılan ışığın şiddetini ve niteliğini algılayan dedektörler bilgisayara aktarılır. Bu verilere göre de hücrenin tipi ve sayısı belirlenir. Akım sitometrinin klinik kullanımı en sık lökosit fenotiplemesinde olmakla birlikte konjenital veya kazanılmış immün yetersizlik tanısı (en sık AIDS), HIV pozitifliğinde prognoz değerlendirilmesi, immün yetersiz hastalarda immünite ya da kemoterapi monitörizasyonu, KİT yapılan hastalarda yeni immün durumun takibi, tümör hücre fenotiplemesi, lösemi ve lenfoma tanı ve sınıflaması, B lenfositlerinde klonal tayini ve lenfoma ve lösemi ayırımı, hücre içi antijenlerin (mieloperoksidaz miktarı) tayini ile hematopoetik hücrelerin (CD4), hematopoetik olmayan, tümörler ve hücrelerden ayırt edilmesi gibi alanlarda mevcuttur. Bu çalışmada da aynı örnekten iki ayrı tüpte farklı hücre grupları için akım sitometrik analiz yapılmıştır. FITC ile konjuge edilmiş CD4 (FITC-CD4), PE ile konjuge edilmiş CD25, PE-Cy5 ile

konjuge edilmiş Foxp3 (PE-Cy5-Foxp3) ile CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ T_{reg} hücreler belirlenirken bir diğer tüpte de PE ile konjuge edilmiş CD200 (PE-CD200) ve FITC ile konjuge edilmiş PD-1 (FITC-PD1) eksprese eden lenfositler analiz edilmiştir.

6.4.2. Uygulama Basamakları

- 1, 2, 3 ve 4 no 'lu hastalardan izole edilen PBMC 'ler a, b, c ve d olarak alt sınıflandırılmış tüplere 100 'er µl aktarıldı.
- 1a, 2a, 3a ve 4a no 'lu tüplere 20 'şer µl FITC & PE kokteyli fare kökenli IgG1 isotipik kontrolü koyuldu.
- 1b, 2b, 3b ve 4b no 'lu tüplere 20 'şer µl FITC- CD4, PE-CD25, CD4/CD25 kokteyl kiti koyuldu.
- 1c, 2c, 3c ve 4c no 'lu tüplere 2 µl FITC konjüge fare kökenli IgG1k isotipik kontrolü ve 20 µl PE konjüge fare kökenli IgG1k isotipik kontrolü koyuldu.
- 1d, 2d, 3d ve 4d no 'lu tüplere 20 µl PE konjüge fare kökenli anti-human CD200 ve 2 µl FITC konjüge fare kökenli anti- human PD-1 koyuldu.
- Tüpler 4 °C' de 30 dk karanlıkta bekletildi.
- Bekleme sonunda 1a, 2a, 3a, 4a, 1b, 2b, 3b ve 4b no 'lu tüplere yaklaşık 1,5 ml akım sitometri boyama tamponu eklendi.
- 1c, 2c 3c, 4c, 1d, 2d, 3d ve 4d no 'lu tüplere de 1,5 ml izoton solüsyonu eklendi
- Tüm tüpler 1700 rpm 'de 2 dk santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı (yıkama işlemi).
- Kalan hücre pelleti kalan solüsyonda resüspanse edildi.
- 1a, 2a, 3a, 4a, 1b, 2b, 3b ve 4b no 'lu tüplere 1 'er ml Fiksasyon/ Permeabilizasyon solüsyonu eklendi.
- Kısa bir vorteks yapıp 4 °C 'de 30 dk bekletildi.
- a ve b tüpleri buzdolabında bekletilirken 1c, 2c, 3c, 4c, 1d, 2d, 3d ve 4d tüplerine de 500 'er µl izoton solüsyonu eklendi.
- c ve d tüpleri akım sitometrik analize hazır hale geldi.

- Bekleme süresi bitince a ve b tüplerine 2 ml 1x Permeabilizasyon solüsyonu eklendi.
- 1700 rpm 'de 2 dk santrifüjlendi ve süpernatant atıldı (yıkama işlemi).
- Yıkama işlemi tekrarlandı.
- a tüplerine 2,5 µl PE-Cy5 konjüge rat kökenli IgG2a isotipik kontrolü ve b tüplerine 20 µl PE-Cy5 konjüge anti-human Foxp3 eklendi.
- Tüpler 4 °C 'de karanlıkta 30 dk bekletildi.
- Süre sonunda tüplere 2 'şer ml 1x Permeabilizasyon solüsyonu eklendi.
- 1700 rpm de 2 dk santrifüjlendi ve süpernatant atıldı (yıkama işlemi).
- Yıkama işlemi tekrarlandı.
- Hücre pelleti kalan solüsyonda resüspanse edilerek üzerine 500 'er µl izoton solüsyonu eklendi.
- a, b, c ve d tüplerinin hepsi akım sitometri analizi yapılmak üzere cihaza verildi.

Yukarıdaki işlemler PBMC 'ler üzerinde uygulanmıştır. Yapılan literatür taramaları sonucu kit prospektüsünde yer alan uzun süreli işlemlerin ve yüksek devirde santrifüjlerin hücre kaybına yol açtığı görülmüştür. Bu nedenle PBMC 'ler üzerine yapılan işlemler modifiye edilmiştir. Buna ek olarak daha verimli sonuç alınıp alınamayacağını araştırmak üzere 5, 6 ve 7 no'lu hastalarda tam kanda da çalışılmıştır. PBMC sonuçları ve tam kan sonuçları karşılaştırılmıştır.

PBMC 'lerde yapılan uygulama basamakları şöyledir:

- 5 no 'lu hastada Biocoll ayırımı sonucunda homojen bir karışım elde edildiğinden belirgin bir mononükleer hücre tabakası elde edilemedi. Bu nedenle bu hasta için analize tam kanda devam edildi.
- 6 ve 7 no 'lu hastalardan elde edilen PBMC pelleti 500 µl izoton solüsyonu eklenerek hücre süspansiyonu haline getirildi.
- Hücre süspansiyonundan a, b, c ve d olarak alt sınıflandırılmış tüplere 100 'er µl aktarıldı.
- 6a ve 7a no 'lu tüplere 20 'şer µl FITC & PE kokteyli fare kökenli IgG1 isotipik kontrolü koyuldu.

- 6b ve 7b no 'lu tüplere 20 'şer µl FITC- CD4, PE-CD25, CD4/ CD25 kokteyl kiti koyuldu.
- 6c ve 7c no 'lu tüplere 2 µl FITC konjüge fare kökenli IgG1k isotipik kontrolü ve 20 µl PE konjüge fare kökenli IgG1k isotipik kontrolü koyuldu.
- 6d ve 7d no 'lu tüplere 20 µl PE konjüge fare kökenli anti- human CD200 ve 2 µl FITC konjüge fare kökenli anti- human PD-1 koyuldu.
- Tüpler oda sıcaklığında 20 dk karanlıkta bekletildi.
- Bekleme sonunda 6a, 7a no 'lu tüplere %4 'lük paraformaldehit (PFA) fiksatif solüsyonundan 500 'er µl eklendi.
- Tüpler 4 °C 'de 10 dk bekletildi.
- 6c, 7c, 6d ve 7d no 'lu tüplere ise yaklaşık 2-4 ml izoton solüsyonu eklendi.
- c ve d tüpleri 1200 rpm 'de 5 dk santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı (yıkama işlemi).
- Kalan hücre pelletine 500 µl izoton solüsyonu eklenerek resüspanse edildi. Akım sitometri analizine hazır hale getirildi. Analiz yapıłana dek tüpler 4 °C 'de bekletildi.
- 6a, 7a, 6b ve 7b no 'lu tüplere yaklaşık 2-4 ml izoton solüsyonu eklendi.
- Yıkama işlemi gerçekleştirildi.
- Hücre pelletine 500 µl Permeabilizasyon solüsyonu eklendi.
- 10 dk oda sıcaklığında bekletildi.
- a ve b tüpleri bekleme süresi sonunda yıkandı ve süpernatant uzaklaştırıldı.
- Non-spesifik bağlanmaları engellemek amacıyla 2 µl Normal rat serum eklendi.
- 10 dk oda sıcaklığında bekletildi.
- Bekleme süresi bitince intrasitoplazmik boyama için a tüplerine 2,5 µl PE-Cy5 IgG2a isotipik kontrolü, b tüplerine de 20 µl PE-Cy5 konjüge anti-human Foxp3 eklendi.
- Tüpler 20 dk oda sıcaklığında karanlıkta bekletildi.
- Bekleme sonunda yıkama işlemi yapıldı.

- Hücre pelleti kalan solüsyonda resüspanse edilerek üzerine 500 'er µl izoton solüsyonu eklendi.
- a, b, c ve d tüplerinin hepsi akım sitometri analizi yapılmak üzere cihaza verildi.

Tam kan ile çalışılarak yapılan akım sitometrik analiz için uygulama basamakları ise şöyledir:

- 5, 6 ve 7 no 'lu hastaların tam kanlarından 100 'er µl a, b, c ve d olarak alt sınıflanan tüplere eklendi.
- 5a, 6a ve 7a no 'lu tüplere 20 'şer µl FITC & PE kokteyli fare kökenli IgG1 isotipik kontrolü koyuldu.
- 5b, 6b ve 7b no 'lu tüplere 20 'şer µl FITC- CD4, PE-CD25, CD4/CD25 kokteyl kiti koyuldu.
- 5c, 6c ve 7c no 'lu tüplere 2 µl FITC konjüge fare kökenli IgG1k isotipik kontrolü ve 20 µl PE konjüge fare kökenli IgG1k isotipik kontrolü koyuldu.
- 5d, 6d ve 7d no 'lu tüplere 20 µl PE konjüge fare kökenli anti- human CD200 ve 2 µl FITC konjüge fare kökenli anti- human PD-1 koyuldu.
- Tüpler oda sıcaklığında 20 dk karanlık ortamda bekletildi.
- c ve d tüplerine bekleme sonunda 500 'er µl optilyse lizing solüsyonu eklendi ve 10 dk oda sıcaklığında bekletildi. Böylece kırmızı kan hücreleri lizise uğradı.
- a ve b tüplerine ise 500 µl PFA solüsyonu eklendi ve 4 °C 'de 10 dk bekletildi.
- Bekleme süreleri sonunda tüm tüpler yaklaşık 2-4 ml izoton solüsyonu ile yıkandı. c ve d tüpleri iki defa yıkandı. Süpernatantlar uzaklaştırıldı. Hücre pelletleri kaldırılarak resüspanse edildi.
- c ve d tüplerine 500 'er µl izoton solüsyonu eklendi ve akım sitometri analizi için hazır hale geldi.
- a ve b tüplerindeki hücre süspansiyonu üzerine 500 µl 1x Permeabilizing solüsyonu eklendi ve oda sıcaklığında 10 dk bekletildi.
- Bekleme sonunda a ve b tüpleri yıkandı. Süpermatant uzaklaştırıldı. Hücre pelleti kaldırılarak resüspanse edildi.

- Non-spesifik bağlanmaları önlemek için a ve b tüplerine 2 'şer µl normal rat serum eklendi.
- Oda sıcaklığında 10 dk bekletildi.
- Bekleme süresi bitince intrasitoplazmik boyama için a tüplerine 2,5 µl PE-Cy5 IgG2a isotipik kontrolü, b tüplerine de 20 µl PE-Cy5 konjüge anti-human Foxp3 eklendi.
- Tüpler 20 dk oda sıcaklığında karanlıkta bekletildi.
- Bekleme sonunda yıkama işlemi yapıldı.
- Hücre pelleti kalan solüsyonda resüspanse edilerek üzerine 500 'er µl izoton solüsyonu eklendi.
- a, b, c ve d tüplerinin hepsi akım sitometri analizi yapılmak üzere cihaza verildi.

Bu iki protokolle hazırlanan örneklerin akım sitometrik analizlerinin sonuçlarının değerlendirilmesine göre PBMC ile yapılan uygulama basamakları izlendiğinde daha verimli sonuç alındığı, daha iyi MoAb bağlanmaları gerçekleştiği görülmüştür. Bu nedenle çalışmanın geri kalanındaki tüm örneklerde PBMC izolasyonunu takiben yapılan protokol izlenmiştir.

6.5. Değerlendirme

28 adet MM olgusundaki otolog kemik iliği transplantasyonu olan ve olmayanlarda CD4+ CD25+ Foxp3+ T_{reg} hücreler üçlü floresans boyama uygulanarak akım sitometri cihazında ölçüldü. Bu ölçümler sonrasında Expo 32 Adic XL 4 Color programı kullanılarak uygun pencereleme stratejileri ile hücre yüzdeleri saptandı. Öncelikle izole edilen PBMC 'lerde lenfositler için bir pencereleme yapıp bu alanda CD4+ hücreler tanımlandı. CD4+ hücreler için belirlenen alanda ise üçüncü bir pencereleme daha yapılarak CD25+ ' e karşı Foxp3+ hücrelerin bulunduğu alan tanımlanarak buradaki hücre yüzdesi CD4+ CD25+ Foxp3+ T_{reg} hücrelerin yüzdesi olarak ifade edildi. CD200+ ve PD-1+ hücreler için ise akım sitometri ölçümü ardından öncelikle yine aynı analiz programı kullanılarak izole edilen PBMC 'lerden lenfositler için pencereleme yapıldı. Belirlenen bu alanda CD200+ 'lere karşı PD-1+ hücrelerin yüzdelerinin saptandığı ikinci bir pencereleme yapıldı. Bu alanda

T_{reg} analizindeki gibi sadece ortak alanın yüzdesi değil, ortak alandaki hücre yüzdesi eklenerek ayrı ayrı CD200+ hücrelerin ve PD-1+ hücrelerin bulunma yüzdeleri değerlendirildi.

6.6. Etik Kurul Onayı

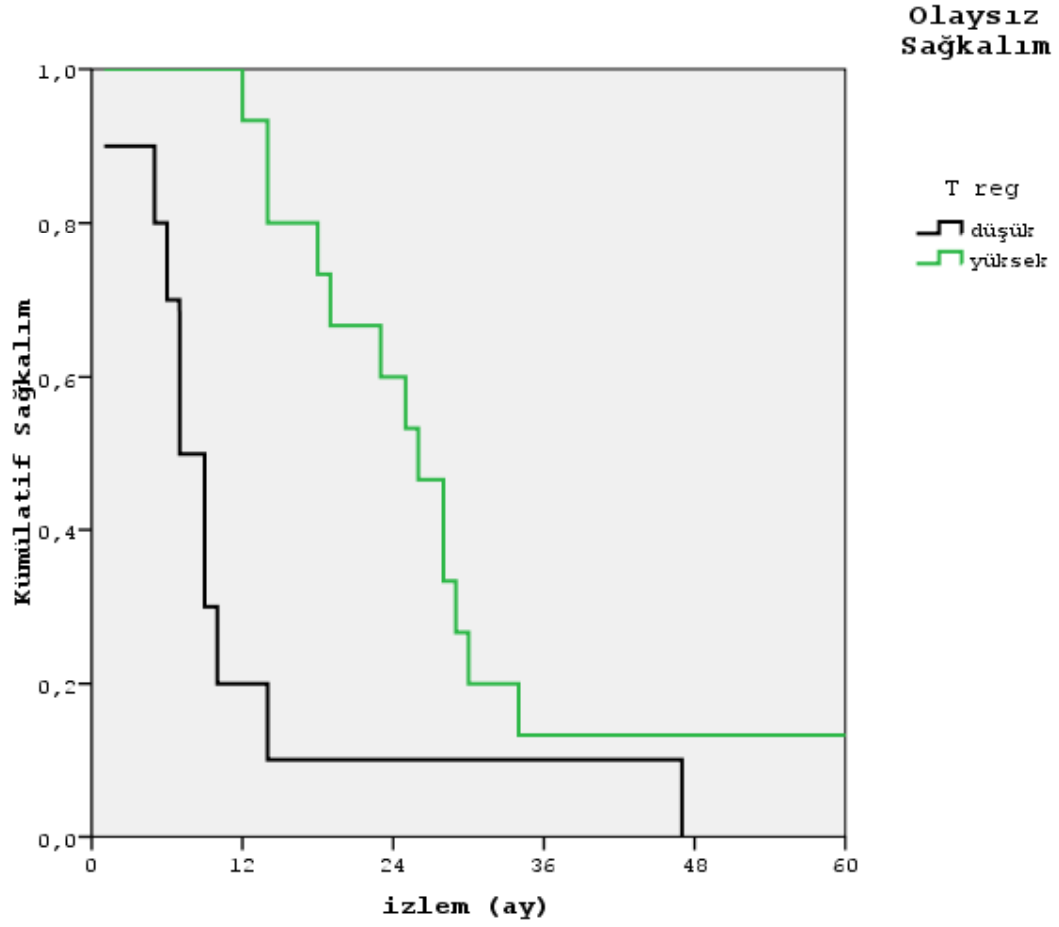
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik ve Laboratuvar Araştırmaları Etik Kurulundan 06.06.2008 tarihinde 233 nolu onay alınmıştır (Ek 1).

7. BULGULAR

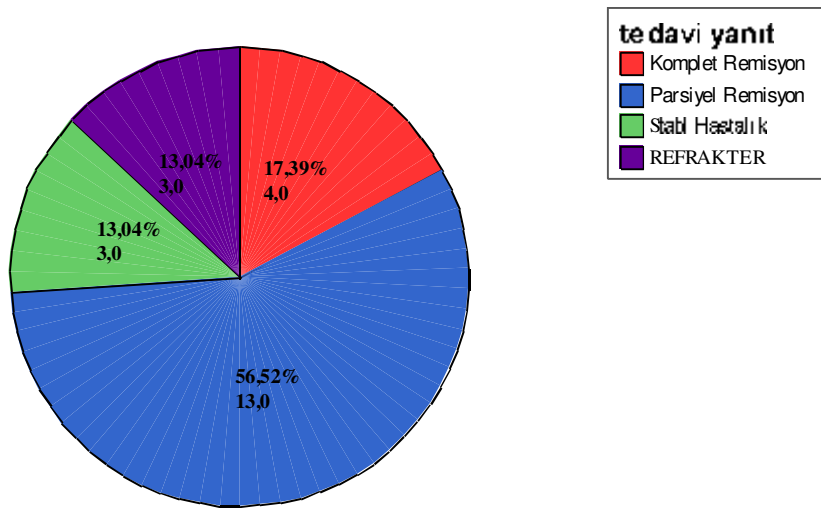
7.1. Olgulara Genel Bakış

Olguların tümü MM 'dur. Olguların yaş ortalaması $59,32 \pm 9,397$ (41-78) yıldır. Olguların 10 tanesi kadın (%35,7) 18 tanesi erkektir (% 64,3). Verilerine ulaşılan 26 olgunun 19 'u K (%67,9) 7 'si L hafif zincir özelliği gösterirken verilerine ulaşılan toplam 24 olgunun 19 'u (% 67,9) IgG ağır zincir 5 'i (%17,9) IgA ağır zincir özelliğindedir. 14 olgu IgG K, 4 olgu IgG L, 3 olgu IgA K, 2 olgu IgA L ve 3 olgu sadece K hafif zincirdir. 25 olguda değerlendirilen albümin ortalaması $3,85 \pm 0,85$ (2,3-5,5) g/dl 'dir. 22 olguda ulaşılabilen $\beta 2M$ değerleri ortalama $4,92 \pm 4,51$ (0,27-20,00) mg/ml 'dir. Verisine ulaşılan 22 olgudan 9 'u ISS 1 (%32,1), 8 'i ISS 2 (%28,6), 5 'i ISS 3 (%17,9) evrededir. Durie Salmon evrelemelerine göre 8 olgu IA (%28,6), 8 olgu IIA (%28,6), 2 olgu IIB (%7,1), 4 olgu IIIA (%14,3), 3 olgu IIIB (%10,7) evrededir. Kemik iliği biyopsilerinde 14 olgu difüz tutulum (%50), 8 olgu nodüler tutulum (%28,6) ve 4 olgu yer yer difüz yer yer nodüler tutulum (%14,3) göstermektedir. 9 olgu ilk tedavi olarak VAD (%32,1), 2 olgu MP (%7,1) ve 12 olgu CYP+DEX (%42,9) ilk tedavilerini almıştır. 5 olgunun ilk tedavisiyle ilgili verisine ulaşamamıştır. Olguların 11 tanesine otolog kemik iliği transplantasyonu yapılmış (%39,3), 17 tanesine otolog kemik iliği transplantasyonu yapılmamıştır (%60,7). Ortalama $22,9 \pm 20,8$ aylık takip sürecindeki (1-96 ay) tedavi yanıtları değerlendirildiğinde 4 olgu CR (%14,3), 13 olgu PR (%46,4), 3 olgu stabil hastalık (SD) (%10,7), 3 olgu refrakter (%10,7) ve 2 olgu ex olarak belirlenmiştir. Tüm olguların sağkalım analizlerine dair grafik Şekil 5 'de ve tüm olguların tedavi yanıtlarını gösteren grafik de Şekil 6 'da görülmektedir. Tüm olgulara ait genel veriler ve akım sitometrik bulgular Tablo 8 'de belirtilmektedir.

Şekil 5. Tüm Olguların Olaysız Sağkalım Analiz Sonuçları



Şekil 6. Tüm Olguların Tedavi Yanıtı Değerlendirmeleri



Tablo 8. Tüm Olguların Genel Veri Tablosu

No.	Yaş	Cinsiyet	Tanı Tarihi	ISS	Durie-Salmon	Mgp	Alb	Beta2	Kibx	İlk Tedavi	OKİT	Tedavi Yanıtı	CD4(+) CD25 (+)FOXP3 (+)	CD200 (+)	PD-1 (+)
1	58	Kacın	4.2009	3	IIIB	NA	3,90	10,01	Nödüller tut.	VAD	+	PR	% 0.5	% 4.2	% 2.2
2	72	Kacın	7.2008	3	IIB	NA	4,40	13,46	Difüz tut.	NA	-	NA	% 11.0	% 0.1	% 0.2
3	49	Erkek	8.2008	1	IA	IgG, K	3,80	2,41	Nödüller tut.	CYP + DEX	-	PR	% 1.1	% 1.2	% 1.4
4	72	Erkek	9.2009	1	IA	IgG, K	4,20	2,32	Difüz tut.	CYP + DEX	-	PR	% 0.0	% 0.5	% 3.0
5	55	Erkek	11.2001	1	IA	IgG, K	4,30	0,27	Diğer	VAD	-	CR	% 1.4	% 0.5	% 0.9
6	56	Erkek	4.2008	2	IIIB	IgA, L	4,80	4,93	Difüz tut.	CYP + DEX	+	PR	% 2.8	% 1.9	% 1.0
7	76	Erkek	12.2008	3	IIB	IgG, K	3,70	20,00	Difüz tut.	NA	-	NA, ex	% 1.9	% 4.6	% 1.0
8	46	Kacın	12.2007	1	IIA	K	5,20	2,19	Difüz tut.	CYP + DEX	+	CR	% 9.0	%0.9	% 0.4
9	69	Erkek	12.2008	3	IA	IgG, L	3,20	8,08	Difüz tut.	CYP + DEX	-	PR, ex	% 0.5	% 0.9	% 0.1
10	41	Erkek	5.2007	1	IA	IgG, K	4,60	1,40	Diğer	MP	-	CR	% 3.9	% 1.3	% 1.6
11	61	Erkek	2.2008	2	IA	IgG, K	4,90	3,48	Nödüller tut.	CYP + DEX	+	Refrakter	% 6.6	% 0.8	% 0.6
12	49	Erkek	7.2007	2	IIIA	IgG, K	3,40	2,25	Difüz tut.	VAD	+	SD	% 1.4	% 1.1	% 0.2
13	63	Kacın	7.2007	1	IIA	IgG, K	4,10	2,52	Diğer	VAD	+	PR	% 4.9	%0.1	% 0.0
14	65	Kacın	6.2003	NA	IIIA	IgG, L	2,30	NA	Nödüller tut.	VAD	+	Refrakter	% 1.4	% 6.7	% 12.1
15	59	Kacın	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	-	NA	% 0.73	% 3.2	% 44.42
16	62	Erkek	5.2008	2	IA	IgA, K	4,60	4,35	Nödüller tut.	CYP + DEX	-	Refrakter	% 2.33	% 0.98	% 5.35
17	44	Erkek	6.2007	NA	NA	NA	NA	NA	Nödüller tut.	NA	+	NA	% 1.8	% 1.54	% 3.83
18	60	Erkek	12.2008	2	IIA	IgG, K	3,00	3,73	Difüz tut.	CYP + DEX	-	Refrakter	% 0.51	% 0.52	% 4.61
19	47	Erkek	2.2009	1	IIA	IgA, K	4,30	3,41	Difüz tut.	CYP + DEX	-	PR	% 0.19	% 2.57	% 16.77
20	55	Erkek	9.2007	2	IIIB	IgA, L	2,40	3,29	Difüz tut.	VAD	+	PR	%1.47	% 6.72	% 4.84
21	61	Kacın	2.2007	NA	IIIA	IgG, K	2,80	NA	Diğer	VAD	-	SD	% 1.69	% 2.11	% 4.57
22	78	Erkek	3.2009	2	IIA	IgA, K	3,30	3,38	Difüz tut.	MP	-	PR	% 0.71	% 2.88	% 26.79
23	59	Erkek	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	-	NA	%0.04	% 1.28	% 2.5
24	66	Kacın	9.2008	2	IIA	IgG, L	2,70	4,63	Nödüller tut.	CYP + DEX	+	PR	% 0.07	% 0.79	% 50.66
25	60	Kacın	3.2009	1	IIA	IgG, K	3,60	2,57	Difüz tut.	CYP + DEX	-	PR	% 0.08	% 7.08	% 53.02
26	58	Erkek	2.2009	1	IIA	IgG, K	3,90	3,09	Difüz tut.	CYP + DEX	-	PR	% 0.08	% 5.05	% 2.64
27	54	Kadın	10.2007	3	IIIA	IgG, L	3,30	6,60	Difüz tut.	VAD	+	SD	% 3.53	% 6.62	% 4.63
28	66	Kacın	5.2005	NA	IA	K	5,50	NA	Nödüller tut.	VAD	-	CR	% 0.05	% 1.01	% 6.88

7.1.2. Otolog kemik iliği transplantasyonu Alan Olgulara Genel Bakış:

Otolog kemik iliği transplantasyonu alan 11 olgunun 5 tanesi kadın (%45,5), 6 tanesi erkektir (%55,5). Otolog kemik iliği transplantasyonu alan 11 olgunun 5 'i K (%45,5), 5 'i L (%45,5) hafif zincir taşımakta olup 1 olgunun ilgili verisine ulaşılamamıştır. İmmünglobülin ağır zincir tiplerine göre OKİT alan 11 olgunun 7 'si IgG (%63,6), 2 'si IgA (%18,2) olup 2 olgunun ilgili verisine ulaşılamamıştır. ISS evreleme sistemine göre OKİT alan 11 olgunun 2 'si ISS evre 1 (%18,2), 5 'i ISS evre 2 (%45,5) ve 2 'si ISS evre 3 (%18,2) olup 2 olgunun ilgili verilerine ulaşılamamıştır. Durie-Salmon evreleme sistemine göre ise OKİT alan 11 olgunun 1'i IA (%9,1), 3 'ü IIA (%27,3), 3'ü IIIA (%27,3) ve 3 'ü IIIB (%27,3) olup 1 olgunun ilgili verisine ulaşılamamıştır. OKİT alan 11 olgunun kemik iliği biyopsisi değerlendirmelerine göre 5 'i difüz tutulum (%45,5), 5 'i nodüler tutulum (%45,5) ve 1 'i yer yer difüz yer yer nodüler tutulum (%9,1) göstermektedir. OKİT alan 11 olgunun ilk tedavilerine bakıldığında 6 'sı VAD (%54,5), 4 'ü CYP + DEX (%36,4) olarak belirlenmiş olup 1 olgunun ilgili verilerine ulaşılamamıştır. OKİT alan 11 olgunun tedavi yanıtları değerlendirildiğinde 1 'i CR (%9,1), 6 'sı PR (%54,5), 2 'si stabil hastalık (SD) (%18,2), 1 'i refrakter (%9,1) olarak belirlenmiş olup 1 olgunun ilgili verilerine ulaşılamamıştır. OKİT alan 11 olguda izlem süreci içinde ex olan olgu görülmemiştir. Bu olgulara ait veriler Tablo 9 'da belirtilmektedir.

Tablo 9. OKİT alan olguların genel verileri

Cinsiyet	11	Kadın:	5	%45,5
		Erkek:	6	%54,5
Hafif Zincir Tipi	10	Kappa (K):	5	%45,5
		Lamda (L):	5	%45,5
İmmünglobülin Ağır Zincir Tipi	9	IgG:	7	%63,6
		IgA:	2	%18,2
ISS Evresi	9	ISS evre 1:	2	%18,2
		ISS evre 2:	5	%45,5
		ISS evre 3:	2	%18,2
Durie-Salmon Evresi	10	IA:	1	%9,1
		IIA:	3	%27,3
		IIIA:	3	%27,3
		IIIB:	3	%27,3
Kemik İliği Biyopsisi	11	Difüz tutulum:	5	%45,5
		Nodüler tutulum:	5	%45,5
		Difüz ve Nodüler tutulum:	1	%9,1
İlk Tedavi Şekli	10	VAD:	6	%54,5
		CYP + DEX:	4	%36,4
Tedavi Yanıtı	10	CR:	1	%9,1
		PR:	6	%54,5
		SD:	2	%18,2
		Refrakter:	1	%9,1

7.1.3. Otolog Kemik İliği Transplantasyonu Almayan Olgulara

Genel Bakış: OKİT almayan 17 olgunun 5 tanesi kadın (%29,4) ve 12 tanesi erkektir (%70,6). OKİT almayan 17 olgunun 14 'ü K (%82,4), 2 'si L hafif zincir (%11,8) taşımakta olup 1 olgunun ilgili verisine ulaşamamıştır. İmmünglobülin ağır zincir tiplerine göre OKİT almayan 17 olgunun 12 'si IgG (%70,6) 3 'ü IgA (%17,6) olup 2 olgunun ilgili verisine ulaşamamıştır. ISS evreleme sistemine göre OKİT almayan 17 olgunun 7 'si ISS evre 1 (%41,2), 3 'ü ISS evre 2 (%17,6) ve 3 'ü ISS evre 3 (%17,6) olup 4 olgunun ilgili verilerine ulaşamamıştır. Durie-Salmon evreleme sistemine göre ise OKİT almayan 17 olgunun 7 'si IA (%41,2), 5 'i IIA (%29,4), 2 'si IIB (%11,8) ve 1 'i IIIA (%5,9) olup 2 olgunun ilgili verilerine ulaşamamıştır. OKİT almayan 17 olgunun kemik iliği biyopsisi değerlendirmelerine göre ise 9 'u difüz tutulum (%52,9), 3 'ü nodüler tutulum (%17,6) ve 3 'ü yer yer difüz yer yer nodüler tutulum (%17,6) göstermekte olup 2 olgunun ilgili verilerine ulaşamamıştır. OKİT almayan 17 olgunun ilk tedavilerine bakıldığında 3 'ü VAD (%17,6), 2 'si MP (%11,8), 8'i CYP + DEX (%47,1) olarak belirlenmiş olup 4 olgunun ilgili verilerine ulaşamamıştır. OKİT almayan 17 olgunun tedavi yanıtlarından 3 'ü CR (%17,6), 7 'si (%41,2), 1 'i SD (%5,9), 2 'si refrakter (%11,8) olarak belirlenmiş olup 4 olgunun ilgili verilerine ulaşamamıştır. OKİT almayan 17 olgunun 2 'sinde ex (%11,8) görülmüştür. Bu olgulara ait veriler Tablo 10 'da belirtilmektedir.

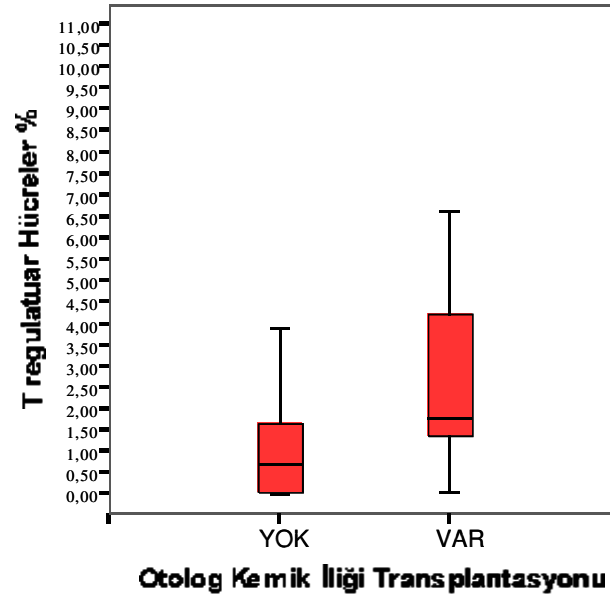
Tablo 10. OKİT almayan olguların genel verileri

Cinsiyet	17	Kadın:	5	%29,4
		Erkek:	12	%70,6
Hafif Zincir Tipi	16	Kappa (K):	14	%82,4
		Lamda (L):	2	%11,8
İmmünglobülin Ağır Zincir Tipi	15	IgG:	12	%70,6
		IgA:	3	%17,6
ISS Evresi	13	ISS evre 1:	7	%41,2
		ISS evre 2:	3	%17,6
		ISS evre 3:	3	%17,6
Durie-Salmon Evresi	15	IA:	7	%41,2
		IIA:	5	%29,4
		IIB:	2	%11,8
		IIIA:	1	%5,9
Kemik İliği Biyopsisi	15	Difüz tutulum:	9	%52,9
		Nödüler tutulum:	3	%17,6
		Difüz ve Nödüler tutulum:	3	%17,6
İlk Tedavi Şekli	13	VAD:	3	%17,6
		CYP + DEX:	8	%47,1
		MP:	2	%11,8
Tedavi Yanıtı	13	CR:	3	%17,6
		PR:	7	%41,2
		SD:	1	%5,9
		Refrakter:	2	%11,8

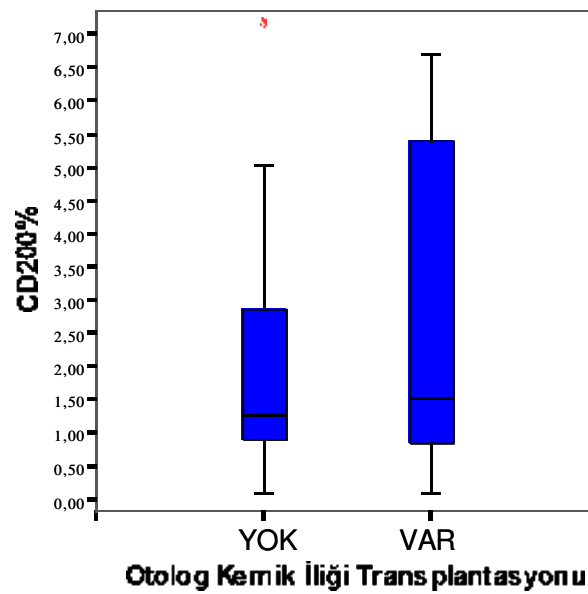
7.2. Akım Sitometri Bulguları

Akım sitometri analizleri ile uygun pencereleme stratejileri sonucunda olguların periferik kan mononükleer hücrelerinde CD4+ CD25+ Foxp3+ T_{reg} hücreler, CD200+ T hücreler ve PD-1+ T hücreler saptanmıştır. Buna göre olguların tümünde CD4+ CD25+ Foxp3+ T_{reg} hücreler %0 ile %11 arasında değişkenlik gösterirken, OKİT almış olgularda %0,07 ile %9 arasında ve OKİT almamış olgularda %0 ile %11 arasında değişkenlik gösterirler (Şekil 7). CD200+ hücrelere bakıldığında ise olguların tümünde %0,1 ile %7,08 arasında değişkenlik gösterir. OKİT almış olgularda bu rakam %0,1 ile %6,72 arasında değişkenlik gösterirken OKİT almamış olgularda ise %0,1 ile %7,08 arasında değişkenlik gösterir (Şekil 8). Olguların tümündeki PD-1+ T hücreler %0 ile %53,02 arasında değişkenlik gösterirken bu rakam OKİT almış olgularda %0 ile %50,66 arasında, OKİT almamış olgularda ise %0,1 ile %53,02 arasında değişkenlik göstermektedir (Şekil 9). OKİT alan olgulardaki OKİT almayan olgulara kıyasla daha yüksek CD4+ CD25+ Foxp3+ T_{reg} hücrelerin varlığına dair bir örnek Şekil 10 'daki akım sitometri sonucunda gösterilmektedir. Şekilde de görüldüğü gibi CD4+ T hücre değerleri de OKİT alan hastalarda daha fazladır. CD4+ hücrelerin seçildiği pencereden tanımlanan CD25+ Foxp3+ hücrelerin bakıldığı alanda da OKİT alan olguda daha yüksek oran görülmektedir.

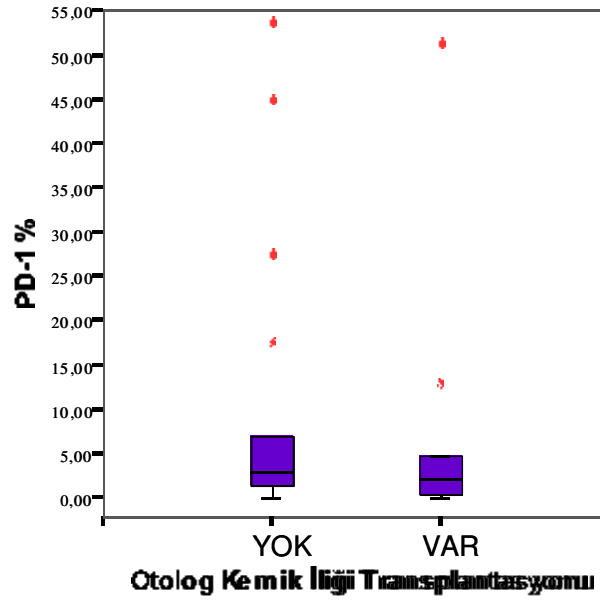
Şekil 7. OKİT Alan ve Almayan Olgularda CD4+ CD25+ Foxp3+ Treg Hücrelerin Bulunma Yüzdeleri



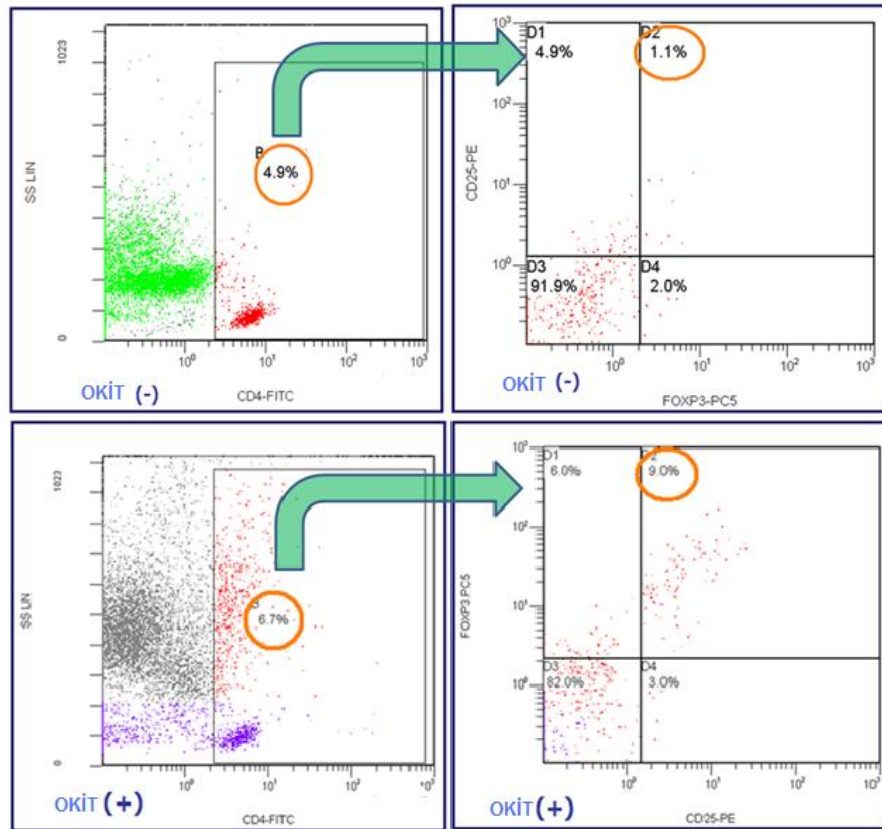
Şekil 8. OKİT Alan ve Almayan Olgularda CD200+ Hücrelerin Bulunma Yüzdeleri



Şekil 9. OKİT Alan ve Almayan Olgularda PD-1+ Hücrelerin Bulunma Yüzdeleri



Şekil 10. CD4+CD25+Foxp3+ Treg hücrelerin OKİT alan ve almayan olgularda akım sitometri analizinde karşılaştırma örneği



7.3. İstatistik Bulgular

Mann Whitney U nonparametrik testinde tüm seride CD4+ CD25+ Foxp3+ T_{reg} hücrelerin seviyeleri ortalama $2,11 \pm 2,76$ (0,00- 11,00) olarak saptanmıştır. OKİT alan grup ve almayan grup arasında ise CD4+ CD25+ Foxp3+ T_{reg} hücrelerin seviyelerinde istatistiksel anlamlı fark saptanmıştır ($p=0,041$). Bu fark OKİT alan grup lehinedir. OKİT yapılan grupta ortalama CD4+ CD25+ Foxp3+ T_{reg} hücreler $3,04$ iken ($0,07-9,00 \pm 2,77$), OKİT almayan grupta ortalama $1,51$ 'dir ($0,00-11,00 \pm 2,67$).

Mann Whitney U nonparametrik testinde tüm seride CD200+ T hücrelerin seviyeleri ortalama $2,40 \pm 2,23$ (0,10- 7,08) olarak saptanmıştır. OKİT alan ve almayan grup arasında ise CD200+ T hücrelerin seviyelerinde istatistiksel anlamlı fark saptanmamıştır ($p=0,689$). OKİT alan grupta ortalama CD200+ T hücreler $2,85 \pm 2,67$ (0,10- 6,72) iken OKİT almayan grupta ortalama $7,10 \pm 1,93$ (0,10- 7,08) dir.

Mann Whitney U nonparametrik testinde tüm seride PD-1+ T hücrelerin seviyeleri ortalama $9,15 \pm 15,35$ (0,00- 53,02) olarak saptanmıştır. OKİT alan ve almayan grup arasında ise PD-1+ T hücrelerin seviyelerinde istatistiksel anlamlı fark saptanmamıştır ($p=0,384$). OKİT alan grupta ortalama PD-1+ T hücreler $7,31 \pm 14,80$ (0,00- 50,66) iken OKİT almayan grupta ortalama $10,34 \pm 16,03$ (0,10- 53,02) dir.

Pearson korelasyon analizinde OKİT almayan grupta CD4+ CD25+ Foxp3+ T_{reg} hücreler CD200+ ve PD-1+ T hücreler ile korelasyon göstermemiştir ($p>0,05$). Ancak CD200+ ve PD-1+ T hücreler arasında korelasyon görülmüştür ($p=0,005$). OKİT alan grupta ve tüm seride ise her üç parametre arasında korelasyon saptanmamıştır ($p>0,05$).

8. TARTIŞMA

Bu çalışmada plazma hücre diskrazilerinin büyük bir çoğunluğunu oluşturan MMda düzenleyici T (T_{reg}) hücrelerin periferik kandaki yüzdeleri akım sitometri ile değerlendirilmiş ve CD200+ hücreler ve PD-1+ hücreler ile ilişkisi araştırılmıştır. Olguların klinik özellikleri ile araştırdığımız bu moleküler özellikleri ve klinikte rutin olarak araştırılan laboratuvar özellikleri istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. Düzenleyici T hücreler güncel bir çalışma konusu olup tümör hücreleri ile ilişkisi birçok tümörde araştırılmış ya da araştırılmaktadır. MM 'da da bu konuda var olan az sayıda çalışma ile çalışmamızın bulguları ilişkilendirilmiştir. MM 'da T_{reg} hücreleri PBMC' lerde incelememizin nedeni bu hücrelerin dolaşımda yer almasıdır. Literatürde de var olan çalışmalarda PBMC ile çalışılması bizim metodolojimizi desteklemektedir. İnceleme yöntemi olarak akım sitometriyi seçmemizin nedeni CD4+ CD25+ Foxp3+ T_{reg} hücreleri eş zamanlı tanıyabilme olanağı vermesidir. Bu üçlü kombinasyon güncel literatürde en önemli T_{reg} hücre tipini tanımlayıcı olarak yer almaktadır. CD200 yeni tanımlanan bir biyolojik belirteç olup T hücre proliferasyonunu kostimüle ettiği bilinmektedir. Miyeloid hücre aktivitesini regüle edici etkisinin bulunması hematopoetik kökenli birçok hücrede ekspresyon göstermesi ve MMda yeni bir prognostik faktör olarak tanımlanması bu çalışmada T_{reg} hücrelerle ilişkisini araştırmamızda rol oynamıştır. PD-1 ise T hücre aktivasyonu toleransı, immün patolojisi arasında denge sağlamak üzere inhibitör sinyaller oluşturmakta olduğu bilinmektedir. MM 'da çalışılmamış olması ve T_{reg} hücrelerin aktivasyonunu baskıladığı yönünde bulgular içeren literatür bulunmaktadır (81).

Bu çalışmada 28 adet MM olgusu yer almıştır. Kadın erkek dağılımı literatürle uyumludur. Evre dağılımı IA ile IIIA arası olup literatürle uyumlu ve homojendir. 41-76 yaş arasında olan olgularımızın dağılımı literatür ile uyumludur. Bu uyumlar çalışmamızda yer alan olgu sayısı az olsa da MM popülasyonunu temsil edici özellikte düşünülmüştür. Olgulardan 11'i otolog kemik iliği nakli almış olup bu sayı OKİT alan ve almayan olgular arasında karşılaştırma yapma olanağı sağlamıştır. Olgularımızın tedavi yanıtları farklı özelliklerde olup parametrelerimizi tedavi yanıtları ile karşılaştırmada güçlük yaratmaktadır. Ortalama takip süresi 23 ay olup sağ kalım analizleri için kısa bir süredir. Akım sitometri periferik kan, kemik iliği veya solid dokulardan

hazırlanan süspansiyonlarda hücre sitoplazmik ya da nükleer reseptörlerine göre hücre tiplerini belirlemede hızlı kolay güvenilir ve rutinde de kullanılan önemli bir testtir. Başarılı bir laboratuvar uygulamasının yanı sıra akım sitometride en önemli özellik uygun pencereleme stratejilerinin geliştirilmesidir. Çalışmamızda periferik kandan izole edilen mononükleer hücrelerden birinci adımda lenfositleri tanımlayan alan pencere olarak alınmış daha sonra bu alanda CD200+ ve PD-1+ hücrelerin tanımlanacağı ikinci pencerelemeler yapılmıştır. CD4+ CD25 + Foxp3+ T_{reg} hücreler için ise lenfositler birinci pencerelemede tanımlandıktan sonra CD4+ lenfositleri tanımlayan alan pencerelenmiş olup daha sonra bu alanda CD25+ Foxp3+ T hücrelerin bakıldığı üçüncü pencereleme yapılmıştır.

Atanackovic ve arkadaşları, CD4+ CD25+ Foxp3+ T_{reg} hücrelerinin MM hastalarında allojenik kemik iliği transplantasyonu işlemi sonrasında kemik iliğinde yeniden kurulup çoğaldığını böylelikle graft karşıtı konakçı hastalığının (*graft versus host disease*, GVHD) ortaya çıkışını immünsüpresif etkiyle önlediklerini göstermişlerdir (57). Bizim çalışmamızda OKİT almış olgularda CD4+ CD25 + Foxp3+ T_{reg} hücrelerin daha yüksek saptanması OKİT 'nun immüniteyi T_{reg} hücreler lehinde stimüle edici rol oynayabileceğini düşündürmüştür. OKİT alan ve almayan grup arasında CD200 ve PD-1 arasında istatistiksel anlamlı fark saptanmaması OKİT 'in bu parametreler üzerinde bir etkisinin olamayabileceğini gösterirken T_{reg} hücrelerde bu iki parametrenin etki mekanizmasına katılma olasılığını istatistik bulgularımız desteklememiştir.

T_{reg} hücrelerin başlıca bir fonksiyonu, self toleransın sağlanmasında önemli rol üstlenmeleridir. T hücre homeostazı için esastırlar. Otoimmüniteyi önlerler ve allojenik donör graft toleransını sağlarlar. T_{reg} hücrelerin allo-antijenlere yanıtında PD-1 yolağının etkisinin sorgulandığı bir çalışmada, PD-1/PD-L1 yolağının bloklanması T_{reg} aracılı immün düzenlenişi iptal ettiği görülmüştür. Bu bulgunun gösterdiği üzere PD-1/PD-L1 yolağı CD4+ CD25- T hücrelerin alloreaktif yanıtlarının T_{reg} hücreler tarafından baskılanmasında gerekli bulunmuştur (81). PD-1 hücre ölümü ile indüklenmiş T hücre hatlarından subtraktif hibridizasyon ile izole edilen bir kostimüle edici moleküldür. PD-1

CD28 gen ailesinin bir üyesi olup aktif haldeki T, B ve miyeloid hücreler üzerinde eksprese edilmektedirler. PD-1 'in PD-L1 ve PD-L2 olmak üzere her ikisi de B7 süper ailesi üyesi olarak bilinen iki ligandı mevcuttur. PD-L1 T, B, dendritik, endotelyal ve tümör hücreleri gibi pek çok hücre tipinde eksprese edilmektedir. Bunun aksine PD-L2 pek yaygın olmamakla birlikte APC 'ler üzerinde eksprese edilmektedir. PD-1 lenfopeni çevresinden izole edilen homeostatik bir şekilde akut proliferen olan hücrelerin geniş bir alt grubunda eksprese edilmektedir. Bu hücreler oligoklonal yaygınlaşma göstermekle beraber disfonksiyonel bir haldedirler. Apoptoz indikatörü olan Annexin V ile reaksiyon göstererek ortadan kaybolurlar. Bu durum PD-1 varlığının otoreaktif CD8+ T hücrelerin eliminasyonunda rol alarak oto immüniteyi de engellediğini düşündürmektedir.

Meme kanserinde, tümör infiltre edici lenfositlerde FOXP3 ve PD-1 pozitif özellikteki tümör infiltre edici lenfositlerin farklı hücreler olduğu ancak paralel ekspresyon gösterdikleri saptanmıştır. Sinerjistik olarak birlikte yüksek tümör derecesi ile uyumlu bulunmuştur (77). Periferik kanda araştırdığımız bizim çalışmamızda ise T_{reg} hücre sayısı ile PD-1 eksprese eden hücre sayısı paralel ve uyumlu bulunmamıştır. Bunun nedeni PD-1 'in tümör dokusu ile parakrin etkileşmesi ile sayı artışı gösteriyor olması olabilir. T_{reg} ve immünregulator rolü olan T hücre alt gruplarının, periferik kandaki sayılarını, tümör çevresindeki sayılarını prognostik açıdan önemli ve üzerinde çalışılan bir sorudur. Yoksa iki lokalizasyon değerleri paralel mi seyreder, ya da periferik kanda azalması tümör çevresinde artışı mı gösterir sorgulanmaktadır. Solid tümörlerde mikroçevre daha önemli olabilecekken, hematolojik malignitelerde dolaşımdaki sayıların daha önemli olacağı öngörüsü açıktır. Raimondi ve arkadaşları, fare lenf düğümü ve dalağından elde ettikleri hücrelerde bulunan T_{reg} hücrelerin PD-1 eksprese etmediğini göstermişlerdir (82).

CD200 'ün T hücre proliferasyonunu kostimüle ettiğinin bilinmesi, hematopoetik kökenli hücreler üzerinde kuvvetli bir immünsupresif etkinliği bulunduğu bilgisi, kendi reseptörü olan CD200R ile etkileşimi üzerinden T hücre aracılı immün yanıtın baskılanmasına yol açması literatürde tanımlanmış özelliklerdir. Bunun yanı sıra CD200 'ün tümör spesifik efektör T hücresi immün yanıtlarını baskılayan T_{reg} hücrelerini indüklediği düşünülmektedir. Buna karşın

bizim çalışmamızda T_{reg} hücre sayısı ile CD200 pozitif hücre sayısı korelasyon göstermemektedir. Çalışmamızın açığı bu ekspresyonların tümör mikroçevresinin daha iyi yorumlanacağı kemik iliğinde araştırılmamış olmasıdır. Yine de bulgularımız MM 'da CD200 ün artmış ekspresyon göstermesine karşın, T_{reg} hücrelerin sayısını belirleyici olmadığı yönündedir.

Moreaux ve arkadaşları CD200 eksprese etmeyen MM olgularının edenlere göre istatistiksel anlamlı daha fazla olaysız sağkalım gösterdiklerini saptamışlardır. Ancak bizim serimizde CD200 ekspresyonu prognostik açıdan önemli saptanmamıştır. Moreaux ve arkadaşlarının çalışması 112 olguluk iken bizim çalışmamız 28 olgu içermektedir. Kemik iliği kökenli hücrelerde malign plazma hücrelerindeki ekspresyonu araştırılmıştır (70). Ancak bizim çalışmamızda CD200 pozitif T hücreler periferik kanda araştırılmaktadır. Periferik kandaki CD200 eksprese eden T lenfositlerin sayısı ile yine periferik kandaki T_{reg} hücre sayısı korele bulunmamıştır. Miyeloid hücrelerden monosit, makrofaj fonksiyonunda kanıtlanmış rolü ile ön planda olan ve inflamatuvar hastalıkların tedavisinde hedef tedavi adayı olarak gösterilen CD200 (64), bizim çalışmamızda MMda T_{reg} hücreler ile ilişkisiz saptanmıştır.

Bu çalışma süresince hasta materyali ile çalışırken uygulanması gereken bazı önemli prosedürler hakkında deneyim kazanıldı. Örnek alırken hastadan gönüllü bilgilendirme formu imzalatılma sürecinin bazı zorlukları ile karşılaşılırken bu sorunları çözme konusunda da deneyim kazanıldı. Alınan örneklerin veri kaybına neden olmayacak en uygun koşullarda saklanması öğrenildi. Hasta materyali ile çalışılmasından ötürü hastanın kimliğine dair bilgilerin deneylerin her aşamasında titizlikle gizli tutulması gerekliliği anlaşıldı. Pek çok analizde tercih edilebilecek bir yöntem olan akım sitometri uygulaması öğrenildi. Bu analizde uygun pencereleme stratejilerinin önemi ve uygulanma şekilleri anlaşıldı. CD4+ CD25+ Foxp3+ T_{reg} hücre analizi için gerekli olan üçlü boyama kiti ile çalışılırken akım sitometride üç renkli analiz hakkında da deneyim kazanılmış oldu. Üç boyalı analiz için gerekli pencereleme stratejisi ile genelde kullanılan iki boyalı analiz için gerekli pencereleme stratejisinin farkı anlaşıldı. Literatürdeki diğer çalışmalarda da uygulandığı gibi taze hasta materyaliyle çalışılması gerektiği için gerekli inkübasyon süreleri de göz önünde

bulundurularak çok aşamalı bu deney planlamanın en uygun şekilde yapılması öğrenildi. Hastanın örnek alımı sırasındaki yaş, tanı, evre, epikriz vb. bilgilerinin o anda toplanmasının gerekliliğinin önemi anlaşıldı.

9. SONUÇ VE ÖNERİLER

T_{reg} hücrelerinin vücudun kendi antijenlerine karşı gösterilen periferik toleransın indüksiyonunda ve idamesinde oldukça önemli olduğu bilinmektedir. Bunun yanı sıra T_{reg} hücreleri tümör antijenlerine karşı verilen immün yanıtı da baskılayabilmektedir. Çalışmamızda Treg hücreleri OKİT alan hastalarda daha yüksek seviyede tespit edilmiştir. Ancak OKİT olup olmaması veya Treg hücrelerin seviyeleri, CD200 and PD-1 ekspresyonları ile korelasyon göstermemiştir. Bu ekspresyonların prognoz ile ilişkisi daha geniş sayıda örnek serileriyle yapılacak çalışmalar ile aydınlatılabilir. PD-1/PD-L1 yolağının bloklanması ile T_{reg} aracılı immün düzenlenimin iptal olduğunun saptandığı ve bu blokajın CD4⁺, CD25⁺ T hücrelerin alloreaktif yanıtlarının T_{reg} hücreler tarafından baskılanması ile olduğunun saptandığı allojenik araştırmaların aksine otolog transplantasyon olan ve olmayan gruplardaki karşılaştırmada PD-1'in istatistiksel fark göstermemesi PD-1 in immünitedeki rolünün tartışılmasına yeni bir boyut getirmektedir.

Çalışmamız T_{reg} hücrelerin MM 'daki önemini bir kez daha vurgularken, OKİT uygulanmış grupta OKİT uygulanmamış gruba göre artmış saptanması, CD 200 ve PD-1 ile fonksiyonel bir ilişki saptanmaması ile literatüre yeni bilgi eklemektedir. T_{reg} hücreler MM 'da reaktif bir artış mı göstermektedir, yoksa tümör hücrelerine sitotoksik etkisi var mıdır? Sorusunun bir sonraki adımda sorgulanması hedeflenmektedir. Ayrıca T_{reg} hücrelerinin sitotoksik etkisi MM tedavisinde uygulanan kemoterapötik ajanlarla etkileşmekte midir? Sorusunun da araştırılması gerekmektedir.

10. KAYNAKLAR

- 1- Barille-Nion S, Barlogie B, Bataille R, Bergsagel PL ve ark. Advances in biology and therapy of multiple myeloma. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2003;;248–278
- 2- Schwartz GG. Multiple Myeloma: Clusters, Clues and Dixoins. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 1997; 6:49–56
- 3- Rajkumar SV, Kyle RA. Multiple myeloma: diagnosis and treatment. Mayo Clin Proc 2005;80:1371-1382
- 4- Yeh HS, Berenson JR. Myeloma bone disease and treatment options. Eur J Cancer, 2006; 42:1554–1563
- 5- Anderson KC, Shaughnessy JD Jr, Barlogie B, Harousseau JL ve ark. Multiple Myeloma. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2002;;214–240
- 6- Schwartz RN, Vozniak M. Current and emerging treatments for multiple myeloma. J Manag Care Pharm, 2008; 14:12-19
- 7- Roodman GD. New potential targets for treating myeloma bone disease. Clin Cancer Res, 2006;12:6270-6273
- 8- Schütt P, Brandhorst D, Stellberg W, Poser M ve ark. Immune parameters in multiple myeloma patients: influence of treatment and correlation with opportunistic infections. Leuk Lymphoma, 2006; 47:1570-1582
- 9- Harousseau JL, Shaughnessy J, Richardson P. Multiple Myeloma. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2004;;237–256
- 10-Katzel JA, Hari P, Vesole DH. Multiple myeloma: charging toward a bright future. CA Cancer J Clin, 2007;57:301-318
- 11-Mollee P. Current trends in the diagnosis, therapy and monitoring of the monoclonal gammopathies. Clin Biochem Rev, 2009; 30:93-103
- 12-San Miguel JF, Gracia-Sanz R. Prognostic features of multiple myeloma. Best Pract Res Clin Haematol, 2005; 18:569–583
- 13-Durie BG, Salmon SE. A clinical staging system for multiple myeloma. Cancer, 1975; 36:842–854
- 14-Greipp PR, San Miguel JF, Durie BG. International Staging System for multiple myeloma. J Clin Oncol, 2005; 23:3412–3420

- 15-Chng WJ, Glebov O, Bergsagel PL, Kuehl WM. Genetic events in the pathogenesis of multiple myeloma. *Best Pract Res Clin Haematol*, 2007; 20: 571–596
- 16-Pratt G. Molecular aspects of multiple myeloma. *Mol Pathol*, 2002; 55:273–283
- 17-Bommert K, Bargou RC, Stuhmer T. Signalling and survival pathways in multiple myeloma. *Eur J Cancer*, 2006; 42:1574–1580
- 18-Catley L, Tai Y, Chauhan D, Anderson KC. Perspectives for combination therapy to overcome drug resistant multiple myeloma. *Drug Resist Updat*, 2005; 8:205–218
- 19-Chng WJ, Fonseca R. Centrosomes and myeloma; aneuploidy and proliferation. *Environ Mol Mutagen*, 2009; 50:697-707
- 20-Bergsagel PL, Kuehl WM. Chromosome translocations in multiple myeloma. *Oncogene*, 2001; 20:5611-5622
- 21-Higgins MJ, Fonseca R. Genetics of multiple myeloma. *Best Pract Res Clin Haematol*, 2005; 18:525–536
- 22-Zhan F, Huang Y, Colla S, Stewart JP ve ark. The molecular classification of multiple myeloma. *Blood*, 2006;108:2020-2028
- 23-Ander KC. Targeted therapy of multiple myeloma based upon tumor microenvironmental interactions. *Exp Hematol*, 2007; 35:155–162
- 24-Sakuma M, Hatsushika K, Koyama K, Katoh R ve ark. Transforming growth factor- β receptor I kinase inhibitor down-regulates cytokine secretion and multiple myeloma cell growth in the bone marrow microenvironment. *Int Immunol*, 2007; 19:117-126
- 25-Nadav L, Katz BZ, Baron S, Cohen N ve ark. The generation and regulation of functional diversity of malignant plasma cells. *Cancer Res*, 2006; 66:8608-8616
- 26-Akdis CA. New insights into mechanisms of immunoregulation in 2007. *J Allergy Clin Immunol*, 2008; 122:700-709
- 27-Larche M. Immunoregulation by targeting T cells in the treatment of allergy and asthma. *Curr Opin Immunol*, 2006; 18:745-750
- 28-McCaughy TM, Baldwin TA, Wilken MS, Hogquist KA. Clonal deletion of thymocytes can occur in the cortex with no involvement of the medulla. *J Exp Med*, 2008; 205:2575-2584

- 29-Saurer L, Mueller C.T cell-mediated immunoregulation in the gastrointestinal tract. *Allergy*, 2009; 64:505-19
- 30-Liu X, Alexiou M, Martin-Orozco N, Chung Y ve ark. Cutting edge: A critical role of B and T lymphocyte attenuator in peripheral T cell tolerance induction. *J Immunol*, 2009; 182:4516-4520
- 31-Lehner T. Special regulatory T cell review: The resurgence of the concept of contrasuppression in immunoregulation. *Immunology*, 2008; 123:40-44
- 32-Seliger B, Marincola FM, Ferrone S, Abken H. The complex role of B7 molecules in tumor immunology. *Trends Mol Med*, 2008; 14:550-559
- 33-Ozer H, Han T, Henderson ES, Nussbaum A, Sheedy D. Immunoregulatory T cell function in multiple myeloma. *J Clin Invest*, 1981; 67:779-789
- 34-Rosenblatt J, Avigan D. Cellular immunotherapy for multiple myeloma. *Best Pract Res Clin Haematol*, 2008; 21:559-577
- 35-Cools N, Ponsaerts P, Van Tendeloo VF, Berneman ZN. Regulatory T cells and human disease. *Clin Dev Immunol*, 2007; 2007:89195
- 36-Gallimore A, Godkin A. Regulatory T cells and tumour immunity-observations in mice and men. *Immunology*, 2008; 123:157–163
- 37-Sorensen RB, Berge-Hansen L, Junker N, Hansen CA ve ark. The immune system strikes back: cellular immune responses against indoleamine 2,3-dioxygenase. *Plos One*, 2009; 4:e6910
- 38-Mansfield AS, Heikkila PS, Vaara AT, von Smitten KA ve ark. Simultaneous Foxp3 and IDO expression is associated with sentinel lymph node metastases in breast cancer. *BMC Cancer*, 2009; 9:231.
- 39-Banerjee DK, Dhodapkar MV, Matayeva E, Steinman RM ve ark. Expansion of FOXP3^{high} regulatory T cells by human dendritic cells (DCs) in vitro and after injection of cytokine matured DCs in myeloma patients. *Blood*, 2006; 108:2655–2661
- 40-Mottet C, Golshayan D. CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ Regulatory T cells: from basic research to potential therapeutic use. *Swiss Med Wkly*, 2007; 137:625–634
- 41-Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*, 2003; 299:1057-1061

- 42-Toda A, Piccirillo CA. Development and function of naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Leukoc Biol*, 2006; 80:458-470
- 43-Sakaguchi S, Powrie F. Emerging challenges in regulatory T cell function and biology. *Science*, 2007; 317:627-629
- 44-Qin FX. Dynamic Behavior and Function of Foxp3+ Regulatory T Cells in Tumor Bearing Host. *Cell Mol Immunol*, 2009; 6:3-13
- 45-Schreiber TH. The use of Foxp3 as a biomarker and prognostic factor for malignant human tumors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2007; 16:1931-1934
- 46-Popmihajlov Z, Smith KA. Negative Feedback Regulation of T cells via Interleukin-2 and FOXP3 Reciprocity. *Plos One*, 2008; 3:e1581
- 47-Friedline RH, Brown DS, Nguyen H, Kornfeld H ve ark. CD4+ regulatory T cells require CTLA-4 for the maintenance of systemic tolerance.
- 48-Wang R, Wan Q, Kozhava L, Fujii H ve ark. Identification of a regulatory T cell specific cell surface molecule that mediates suppressive signals and induces Foxp3 expression. *Plos One*, 2008; 3:e2705
- 49-Ormandy IA, Hillemann T, Wedemeyer H, Manns MP ve ark. Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood of patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*, 2005; 65:2457–2464
- 50-Woo EY, Chu CS, Goletz TJ, et al. Regulatory CD4+CD25+ T cells in tumors from patients with early stage non-small cell lung cancer and late stage ovarian cancer. *Cancer*, 2001; 61:4766–4772
- 51-Woo EY, Yeh H, Chu CS, et al. Cutting edge: regulatory T cells from lung cancer patients directly inhibit autologous T cell proliferation. *J Immunol*, 2002; 168:4272–4276
- 52-Wei S, Kryczek I, Zou L, et al. Plasmacytoid dendritic cells induce CD8+ regulatory T cells in human ovarian carcinoma. *Cancer Res*, 2005; 65:5020–5026
- 53-Viehl CT, Moore TT, Liyanage UK, Frey DM ve ark. Depletion of CD4+CD25+ regulatory T cells promotes a tumor specific immune response in pancreas cancer bearing mice. *Ann Surg Oncol*, 2006; 13:1252–1258

- 54-Heier I, Hofgaard PO, Brandtzaeg P, Jahnsen FL ve ark. Depletion of CD4+CD25+ regulatory T cells inhibits local tumour growth in a mouse model of B cell lymphoma. *Clin Exp Immunol*, 2008; 152:381–387
- 55-Yokokawa J, Cereda V, Remondo C, Gulley JL ve ark. Enhanced Functionality of CD4+CD25high FOXP3+ regulatory T cells in the peripheral blood of patients with prostate cancer. *Clin Cancer Res*, 2008; 14:1032–1040
- 56-Prabhala RH, Neri P, Bae JE, Tassane P ve ark. Dysfunctional T regulatory cells in multiple myeloma. *Blood*, 2006; 107:301–304
- 57-Atanackovic D, Cao Y, Luetkens T, Panse J ve ark. CD4+CD35+FOXP3+ T regulatory cells reconstitute and accumulate in the bone marrow of patients with multiple myeloma following allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica*, 2008; 93:423–430
- 58-Sonmez M, Sonmez B, Eren N, Yilmaz M ve ark. Effects of interferon-alpha-2a on Th3 cytokine responses in multiple myeloma patients. *Tumori*, 2004; 90:387–389
- 59-Condomines M, Quittet P, Lu ZY, Nadal L ve ark. Functional regulatory T cells are collected in stem cell autografts by mobilization with high dose cyclophosphamide and granulocyte colony stimulating factor. *J Immunol*, 2006; 176:6631–6639
- 60-Moreaux J, Hose D, Reme T, Jourdan E ve ark. CD200 is a new prognostic factor in multiple myeloma. *Blood* 2006; 108:4194–4197
- 61-McWhiter JR, Kretz-Rommel A, Saven A, Maruyama T ve ark. Antibodies selected from combinatorial libraries block a tumor antigen that plays a key role in immunomodulation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006; 103:1041-1046
- 62-Petermann KB, Rozenberg GI, Zedek D, Groben P ve ark. CD200 is induced by ERK and is a potential therapeutic target in melanoma. *J Clin Invest*. 2007; 117:3922–3929
- 63-Minas K, Liversidge J. Is the CD200/ CD200 receptor interaction more than just a myeloid cell inhibitory signal. *Crit Rev Immunol*, 2006; 26:213-230

- 64-Jenmalm MC, Cherwinski H, Bowman EP, Phillips JH ve ark. Regulation of myeloid cell function through the CD200 receptor. *J Immunol*, 2006; 176:191-199
- 65-Kretz-Rommel A, Qin F, Dakappagari N, Cofield R ve ark. Blockade of CD200 in the presence or absence of antibody effector function: implications for anti-CD200 therapy. *J Immunol*, 2008;180:699-705
- 66-Clasper S, Royston D, Baban D, Cao Y ve ark. A novel gene expression profile in lymphatics associated with tumor growth and nodal metastasis. *Cancer Res*, 2008; 68:7293-7303
- 67-Cui W, Cuartas E, Ke J, Zhang Q ve ark. CD200 and its receptor, CD200R, modulate bone mass via the differentiation of osteoclasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104:14436–14441
- 68-Kawasaki BT, Mistree T, Hurt EM, Kalathur M ve ark. Co-expression of the toleragenic glycoprotein, CD200, with markers for cancer stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 200; 364:778–782
- 69-Gorczynski RM, Lee L, Boudakov I. Augmented Induction of CD4+CD25+ Treg using monoclonal antibodies to CD200R. *Transplantation* 2005; 79:1180–1183.
- 70-Moreaux J, Veyrune JL, Reme T, De Vos J ve ark. CD200: a putative therapeutic target in cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 366:117–122
- 71-Brown JA, Dorfman DM, Ma FR, Sullivan EL ve ark. Blockade of programmed death–1 ligands on dendritic cells enhances T cell activation and cytokine production. *J Immunol*, 2003; 170:1257–1266
- 72-Fukushima A, Yamaguchi T, Azuma N, Yagita H ve ark. Involvement of programmed death ligand 2 (PD-L2) in the development of experimental allergic conjunctivitis in mice. *Br J Ophthalmol*, 2006; 90:1040–1045
- 73-Wu C, Zhu Y, Jiang J, Zhao J ve ark. Immunohistochemical localization of programmed death-1 ligand-1 (PD-L1) in gastric carcinoma and its clinical significance. *Acta Histochem*, 2006; 108:19–24
- 74-Keir ME, Francisco LM, Sharpe AH. PD–1 and its ligands in T cell immunity. *Immunology*, 2007; 19:309–314
- 75-Liu J, Hamrouni A, Wolowiec D, Coiteux V ve ark. Plasma cells from multiple myeloma patients express B7-H1 (PD-L1) and increase

- expression after stimulation with IFN- γ and TLR ligands via a MyD88, TRAF6 and MEK dependent pathway. *Blood*, 2007; 13:84–88
- 76-Agata Y, Kawasaki A, Nishimura H, Ishida Y ve ark. Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. *Int Immunol*, 1996; 8:765-772
- 77-Ghebeh H, Barhoush E, Tulbah A, Elkum N ve ark. FOXP3+ Tregs and B7-H1+/PD-1+ T lymphocytes co-infiltrate the tumor tissues of high-risk breast cancer patients: Implication for immunotherapy. *BMC Cancer*, 2008; 8:57
- 78-Lin SJ, Peacock CD, Bahl K, Welsh RM. Programmed death-1 (PD-1) defines a transient and dysfunctional oligoclonal T cell population in acute homeostatic proliferation. *J Exp Med*, 2007; 204:2321-2333
- 79-Iwai Y, Ishida M, Tanaka Y, Okazaki T ve ark. Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002; 99:12293-12297
- 80-Franceschini D, Paroli M, Francavilla V, Videtta M ve ark. PD-L1 negatively regulates CD4+CD25+Foxp3+ Tregs by limiting STAT-5 phosphorylation in patients chronically infected with HCV. *J Clin Invest*, 2009; 119:551-564
- 81-Kitazawa Y, Fujino M, Wang Q, Kimura H ve ark. Involvement of the programmed death-1/programmed death-1 ligand pathway in CD4+CD25+ regulatory T-cell activity to suppress alloimmune responses. *Transplantation*, 2007; 83:774–782
- 82-Raimondi G, Shufesky WJ, Tokita D, Morelli AE ve ark. Regulated compartmentalization of programmed cell death-1 discriminates CD4+CD25+ Resting Regulatory T Cells from Activated T Cells. *J Immunol*, 2006; 176:2808-2816
- 83-Zhang P, Su DM, Liang M, Fu J. Chemopreventive agents induce programmed death-1 ligand-1 (PD-L1) surface expression in breast cancer cells and promote PD-L1 mediated T cell apoptosis. *Mol Immunol*, 2008; 45:1470–1476

- 84-Wong RM, Scotland RR, Lau RL, Wang C ve ark. Programmed death-1 blockade enhances expansion and functional capacity of human melanoma antigen specific CTLs. *Int Immunol*, 2007; 19:1223–1234
- 85-Shimauchi T, Kabashima K, Nakashima D, Sugita K ve ark. Augmented expression of programmed death-1 in both neoplastic and non-neoplastic CD4+ T cells in adult T cell leukemia/lymphoma. *Int J Cancer*, 2007; 121:2585–2590
- 86-Thompson RH, Dong H, Lohse CM, Leibovich BC ve ark. PD–1 is expressed by tumor infiltrating immune cells and is associated with poor outcome for patients with renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res*, 2007; 13:1757–1761
- 87-Hamanishi J, Mandai M, Iwasaki M, Okazaki T ve ark. Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007; 104:3360–3365
- 88-Nakanishi J, Wada Y, Matsumoto K, Azuma M ve ark. Overexpression of B7-H1 (PD-L1) significantly associates with tumor grade and postoperative prognosis in human urothelial cancers. *Cancer Immunol Immunother*, 2007; 56:1173–1182
- 89-Sun J, Xu K, Wu C, Wang Y ve ark. PD-L1 expression analysis in gastric carcinoma tissue and blocking of tumor-associated PD-L1 signaling by two functional monoclonal antibodies. *Tissue Antigens*, 2007; 69:19–27
- 90-Dorfman DM, Brown JA, Shahsafaei A, Freeman GJ. Programmed death–1 (PD–1) is a marker of germinal center-associated T cells and angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Am J Surg Pathol*, 2006; 30:802–810