

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**PEDİATRİK B HÜCRELİ AKUT LENFOBLASTİK
LÖSEMİ OLGULARINDA KEMİK İLİĞİ HÜMORAL
BİLEŞENLERİNİN DOĞAL ÖLDÜRÜCÜ HÜCRELER
ÜZERİNE ETKİSİ**

İLHAN TAHRALI

**DANIŞMAN
PROF. DR. GÜNNUR DENİZ**

**İMMÜNOLOJİ ANABİLİM DALI
İMMÜNOLOJİ PROGRAMI**

İSTANBUL-2022

İTHAF

Kıymetli aileme ithaf ediyorum...

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim süresince danışmanlığımı üstlenerek destek ve yardımlarını esirgemeyen kıymetli hocam Prof. Dr. Günnur Deniz'e,

Doktora tez konusunun geliştirilmesindeki öneri ve desteklerinden ötürü Prof. Dr. İhsan Gürsel ve Dr. Öğr. Üyesi Tolga Sütü'ye,

Tez çalışmasında ihtiyaç duyulan hasta ve kontrol grubu numunelerinin temin edilerek klinik verilerin sağlanmasındaki katkılarından ötürü Prof. Dr. Ayşegül Ünüvar, Prof. Dr. Ali Ayçiçek, Doç. Dr. Esra Yücel ve Uzm. Dr. Emine Türkkân'a,

Akademik çalışma hayatım süresince daima büyük katkılarda bulunan ve metodolojik beceri kazanmamda önemli destekleri olan Doç. Dr. Umut Can Küçüksezer ve Doç. Dr. Vuslat Yılmaz'a,

Çalışmalarında sağladıkları akademik destek ve yol göstericiliklerinden ötürü Prof. Dr. Suzan Çınar, Prof. Dr. Esin Çetin ve Dr. Öğr. Üyesi Metin Yusuf Gelmez'e,

Laboratuvar çalışmalarında sağladıkları teknik desteklerden ötürü Recep Ergün, Abdullah Yılmaz, Kutluhan Ünal ve Selim Kürşat Kargı'ya,

Tez çalışmalarım boyunca manevi destekleriyle yanımda olan çalışma arkadaşlarım MSc. Ayşe Engin, MSc. Farhad Kohansal, Mol. Biyolog Altuğ Özkoşar ve Mol. Biyolog Fatih Akboğa'ya,

Eğitim-öğretim hayatım boyunca manevi destekleri ile daima yanımda olduklarını hissettiren ve çalışmalarımda karşılaştığım zorlukların üstesinden gelmemde bana manevi güç veren çok kıymetli aileme sonsuz teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 29554

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN	İİİ
İTHAF	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ	İX
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	X
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xİ
ÖZET.....	XİV
ABSTRACT.....	XV
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Lenfositlerin Gelişimi	3
2.1.1. T Lenfositlerinin Gelişimi	4
2.1.2. B Lenfositlerinin Gelişimi.....	4
2.1.3. Kemik İliği Mikroçevresi	6
2.2. Akut Lenfoblastik Lösemi.....	8
2.2.1. Tanım ve Sınıflandırma	8
2.2.2. Epidemiyoloji	8
2.2.3. Etiyoloji	9
2.2.4. Belirtiler.....	11
2.2.5. Tanı	11
2.2.5.1. Morfolojik Değerlendirme	11
2.2.5.2. Sitogenetik Değerlendirme	11
2.2.5.3. RT-PCR testi.....	12
2.2.5.4. Akan Hücre Ölçer ile İmmünofenotipleme	12
2.3. B Hücreli Akut Lenfoblastik Lösemi.....	14
2.3.1. B-ALL Patofizyolojisi.....	15
2.3.2. B-ALL Sınıflandırması	17
2.4. Minimal Kalıntı Hastalık	18

2.4.1. MRD'ye Dayalı Risk Hesaplaması	20
2.5. B-ALL'de Tedavi Yaklaşımları	21
2.5.1. Klasik Tedavi.....	21
2.5.2. B-ALL Tedavisinde İmmünoterapi Uygulamaları.....	23
2.5.2.1. Monoklonal Antikorlar	23
2.5.2.2. CAR-T Hücre Tedavisi.....	24
2.6. NK Hücrelerinin ALL ile İlişkisi	26
2.6.1. Adoptif NK Hücre Terapisi	27
2.6.2. CAR-NK Hücre Terapisi.....	28
2.6.3. Mikroçevrenin NK Hücreleri ile İlişkisi	30
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	32
3.1. Çalışma Tasarımı ve Katılımcılar	32
3.2. Kemik İliği İmmünofenotiplemesi	33
3.3. Kemik İliği Plazma Örneklerinin Ayrıştırılması	34
3.4. Sağlıklı Periferik Kan İmmünofenotiplemesi	34
3.5. Sağlıklı Periferik Kan Mononükleer Hücre İzolasyonu	35
3.5.1. RPMI-1640 Kültür Medyumunun Hazırlanması	36
3.6. Kemik İliği Plazma Örneklerinin Sağlıklı PBMC'ler ile Kültürü.....	36
3.6.1. NK Hücre Alt Gruplarında Hücre İçi Sitokin Tayini.....	37
3.6.2. NK Hücre Proliferatif Yanıtlarının Ölçülmesi	38
3.7. Kemik İliği Plazmalarında Sitokin Seviyelerinin Belirlenmesi	40
3.8. İstatistiksel Değerlendirme.....	40
3.9. Deneylerde Kullanılan Kimyasal Malzemeler	41
3.10. Çalışmalarda Kullanılan Makine / Teçhizat.....	42
4. BULGULAR.....	43
4.1. Kemik İliği Örneklerinin İmmünofenotipik Olarak Değerlendirilmesi.....	43
4.2. Sağlıklı Periferik Kan İmmünofenotipleri	48
4.3. Kültür Sonrası NK Hücre Alt Grupları ve PD-1 Betimleme Seviyeleri.....	48
4.4. Kültür Sonrası NK Hücre Alt Gruplarının Sitokin Seviyeleri	50
4.5. Kültür Şartlarının NK Hücre Proliferatif Yanıtları Üzerine Etkileri	52
4.6. Kemik İliği Plazma Örneklerinde Sitokin Seviyeleri	54
5. TARTIŞMA	55
KAYNAKLAR	62

ETİK KURUL KARARI	83
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI	84
ÖZGEÇMİŞ	85



TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Lösemi duyarlılık bozuklukları.....	10
Tablo 2-2: Akut lösemi sınıflandırmasında kullanılan belirteçler	14
Tablo 2-3: AIEOP-BFM ALL 2009 protokolünün akan hücre ölçer tabanlı MRD hesaplamasına göre ALL risk sınıflandırması	20
Tablo 2-4: B-ALL tedavisi için CD19, CD20 ve CD22'yi hedef alan, kullanımdaki veya üzerinde çalışılmakta olan monoklonal antikorlar ¹³⁶	24
Tablo 3-1: Akan hücre ölçer ile kemik iliği immüfenotiplemesinde kullanılan monoklonal antikorlar	33
Tablo 3-2: Periferik kan immüfenotiplemesinde kullanılan monoklonal antikorlar	35
Tablo 3-3: Kültür sonrası hücre yüzey ve hücre içi boyamada kullanılan monoklonal antikorlar.....	38
Tablo 3-4: NK hücre proliferatif yanıtlarının ölçümünde kullanılan monoklonal antikorlar.....	39
Tablo 3-5: Deneylerde kullanılan kimyasal malzemeler.....	41
Tablo 3-6: Deneylerde kullanılan makine ve teçhizat.....	42
Tablo 4-1: Hasta gruplarına ait demografik veriler.....	43
Tablo 4-2: Yeni tanı (0. gün) kemik iliği örneklerinde kan sayım değerleri	44
Tablo 4-3: Sağlıklı periferik kan immüfenotip değerleri.....	48

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Kemik iliğinde B hücrelerinin olgunlaşma aşamaları	5
Şekil 2-2: B hücre olgunlaşma aşamalarının akan hücre ölçer ile gösterimi ³⁸	6
Şekil 2-3: Türkiye'de en sık görülen ilk 10 kanser türü insidansının uluslararası karşılaştırması (100.000 nüfusta, dünya standart nüfusu), 2020 ⁵⁶	9
Şekil 2-4: Akan hücre ölçer ile kemik iliği örneğinde blast popülasyonu kapılama stratejisi.....	13
Şekil 2-5: B-ALL alt tiplerinin immünofenotipik özellikleri	18
Şekil 3-1: Çalışmanın deneysel tasarımı	32
Şekil 3-2: Hücre kültürü deneylerinde plak tasarımı	37
Şekil 4-1: Yeni tanı (0. gün) kemik iliği örneklerinde kan sayım değerlerinin istatistiksel karşılaştırması	44
Şekil 4-2: Kemik iliği örneklerinde blast popülasyonlarının kapılama stratejisi.....	45
Şekil 4-3: Yeni tanı (0. gün) B-ALL hastasına ait kemik iliği örneğinde akan hücre ölçer ile tanı paneli analizi.....	46
Şekil 4-4: Yeni tanı (0. gün) B-ALL immünofenotipleme	47
Şekil 4-5: NK hücre alt gruplarının akan hücre ölçerde kapılama stratejisi.....	49
Şekil 4-6: 24 saat hücre kültürü sonrası CD16 ⁺ CD56 ^{soluk} ve CD16 ⁻ CD56 ^{parlak} NK hücre oranlarındaki değişim	49
Şekil 4-7: Farklı koşullarda 24 saat kültür sonrası NK hücre alt gruplarının PD-1 betimleme seviyeleri.....	50
Şekil 4-8: Farklı kültür koşullarında IL-12 uyarımına yanıt olarak sağlıklı NK hücre alt gruplarının hücre içi sitokin seviyeleri.....	51
Şekil 4-9: PHA uyarımı varlığında farklı koşullarda 72 saat kültür sonrası NK hücre alt grup oranları.....	52
Şekil 4-10: 72 saat kültür sonrası NK hücre alt gruplarında NKG2D seviyeleri.....	53
Şekil 4-11: 72 saat kültür sonrası NK hücre proliferatif kapasitelerindeki değişim	53
Şekil 4-12: Hasta gruplarının kemik iliği plazma örneklerinde sitokin seviyelerinin karşılaştırılması	54

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

ALL	Akut Lenfoblastik Lösemi
α	Alfa
AIEOP	Associazione Italiana Ematologia Oncologia Pediatrica
AML	Akut Miyeloid Lösemi
B-ALL	B Hücreli Akut Lenfoblastik Lösemi
β	Beta
bFGF	Basic Fibroblast Growth Factor (Temel Fibroblast Büyüme Faktörü)
BFM	Berlin-Frankfurt-Münster
BHR	B Hücre Reseptörü
c-B-ALL	Ortak (common) - B Hücreli Akut Lenfoblastik Lösemi
CAR	Chimeric Antigen Receptor (Kimerik Antijen Reseptörü)
CD	Cluster of Differentiation (Farklılaşma Kümesi)
CFSE	CarboxyFluorescein Succinimidyl Ester (Karboksiflorescein Süksinimidil Ester)
CLP	Common Lymphoid Progenitor
CMP	Common Myeloid Progenitor
DNAM-1	DNAX Aksesuar Molekülü-1
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
EBV	Ebstein Barr Virus
FBS	Fetal Bovine Serum (Fetal Sığır Serumu)
FITC	Fluoresein İzosiyanat
FISH	Floresan <i>In Situ</i> Hibridizasyon
FHR	Flow High Risk (akan hücre ölçer - yüksek risk)

FLR	Flow Low Risk (akan hücre ölçer - düşük risk)
FMR	Flow Medium Risk (akan hücre ölçer - orta risk)
G-CSF	Granulocyte Colony-Stimulating Factor (Granülosit Koloni Stimüle Edici Faktör)
γ	Gama
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulation Factor (Granülosit-Makrofaj Koloni Stimüle Edici Faktör)
GvHD	Graft versus Host Disease (Graft versus Host Hastalığı)
HIV	Human Immunodeficiency Virus (İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü)
HLA	Human Leukocyte Antigen (İnsan Lökosit Antijeni)
HSC	Hematopoietic Stem Cell (Hematopoetik Kök Hücre)
IFN- γ	İnterferon-gama
IGF	Insulin Growth Factor (İnsülin Büyüme Faktörü)
IGFR	Insulin Growth Factor Receptor (İnsülin Büyüme Faktörü Reseptörü)
IL-	İnterlökin-
Ig	İmmünoglobülin
iPSC	Induced Pluripotent Stem Cell (Uyarılmış Pluripotent Kök Hücre)
KIR	Killer-cell Immunoglobulin-like Receptor (Öldürücü Hücre İmmünoglobulin-benzeri Reseptör)
LIF	Leukemia Inhibitory Factor (Lösemi İnhibitör Faktörü)
μ	Mü
μ l	Mikrolitre
MHC	Major Histocompatibility Complex (Majör Doku Uyumluluk Kompleksi)
ml	Mililitre
mg	Miligram

mM	Milimolar
MPO	Miyeloperoksidaz
MSS	Merkezi Sinir Sistemi
ng	Nanogram
NK	Natural Killer (Doğal Öldürücü)
NKG2D	Natural Killer Group (Doğal Öldürücü Grup) 2D
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell (Periferik Kan Mononükleer Hücre)
PBS	Phosphate Buffered Saline (Fosfat Tamponlu Salin)
PD-1	Programmed Cell Death Protein (Programlanmış Hücre Ölümü Proteini)-1
Ph-	Philadelphia-
q-PCR	quantitative-Polymerase Chain Reaction (kantitatif-Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
PHA	Phytohaemagglutinin (Fitohemagglutinin)
RAG	Recombination-Activating Gene (Rekombinasyonu Aktive Edici Gen)
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute-1640
RT-PCR	Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (Ters Transkriptaz-Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
SCF	Stem Cell Factor (Kök Hücre Faktörü)
T-ALL	T Hücreli Akut Lenfoblastik Lösemi
TdT	Terminal Deoksinükleotidil Transferaz
TGF- β	Tumor Growth Factor (Tümör Büyüme Faktörü)-beta
TNF- α	Tümör Nekroz Faktörü-alfa
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule (Vasküler Hücre Adezyon Molekülü)-1

ÖZET

Tahralı İ. Pediatrik B Hücreli Akut Lenfoblastik Lösemi Olgularında Kemik İliği Hüümorale Bileşenlerinin Doğal Öldürücü Hücreler Üzerine Etkisi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İmmünoloji A.D. Doktora Tezi. İstanbul. 2022.

Akut lenfoblastik lösemi (ALL), kemik iliğindeki lenfoid öncül hücrelerin anormal ve kontrolsüz çoğalmasıyla meydana gelen bir hematolojik malign hastalıktır. Çoğunlukla çocuklarda meydana gelen ALL, çocukluk çağı kanserleri arasında en sık görülenidir. B lenfoid öncül hücrelerden gelişen B-ALL hastalığın en yaygın formudur. Klasik kemoterapi ajanlarıyla tedavi sonucu hastalarda sağkalım oranı yüksek olmakla birlikte, tedavinin ciddi yan etkilerinin olması ve tedaviye direnç gösteren hastaların varlığı nedeniyle tedavide immünoterapi önem kazanmaktadır. Son yıllarda, kansere karşı immün yanıtlarda önemli rol oynayan doğal öldürücü (natural killer - NK) hücrelerin immünoterapide kullanımı üzerine çalışmalar yoğunluk kazanmıştır; ancak tedaviden alınan sonuçlar beklenenin altında olup, bu durumun ardında B-ALL hastalarının kemik iliği ve kan dolaşımındaki immün-baskılayıcı ortamın olması mümkündür. Bu düşünceyle gerçekleştirdiğimiz çalışmada, B-ALL hastalarının kemik iliği plazma örneklerinin sağlıklı NK hücreleri ile birlikte 24 ve 72 saat kültürü sonrası NK hücrelerinin alt grup oranları, PD-1 betimlemeleri, proliferatif yanıtları ve hücre içi IFN-g, IL-10 ve TNF-a seviyeleri ölçülmüştür. Değerlendirmeler akut lösemi açısından patoloji saptanmayan hastaların kemik iliği plazmaları ve fetal sıgır serumu eklenen koşullar ile karşılaştırmalı olarak yapılmıştır. Elde edilen sonuçlarla kemik iliği plazma örneklerindeki hüümorale bileşenlerden olan sitokinler arasındaki ilişkinin incelenmesi amacıyla plazma IL-1b, IL-6, IL-10, IL-18, IFN-a2, IFN-b, IFN-g, TNF-a ve GM-CSF seviyeleri ölçülmüştür. B-ALL plazması eklenen koşullarda NK hücre alt grup oranları ve proliferasyonu kontrol gruplarına göre düşerken, PD-1 ile hücre içi IL-10 ve TNF-a seviyelerinin yükseldiği görülmüştür. B-ALL plazma örneklerinde yüksek IL-10 düzeylerine karşılık IL-18 ve IFN-g seviyelerinde düşüş saptanmıştır. Bu bulgular, B-ALL hastalarının kemik iliğindeki hüümorale bileşenlerin, NK hücreleri üzerinde baskılayıcı etki gösterdiğine işaret etmektedir.

Anahtar Kelimeler: Hematoloji, İmmünoterapi, Lösemi, Doğal Öldürücü Hücreler, Sitokinler

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 29554

ABSTRACT

Tahralı İ. The Effect of Bone Marrow Humoral Components in Pediatric B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia Cases on Natural Killer Cells. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Immunology. Doctoral Thesis. İstanbul. 2022.

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is a hematological malignant disease of abnormal lymphoid precursor cells with uncontrolled proliferation in bone marrow. Mostly occurring in children, ALL is the most common childhood cancer. B-ALL, generating from B lymphoid progenitor cells, is the most common form of the disease. Although the survival rate is high in patients treated with chemotherapeutic agents, side effects and resistance may occur. Thus, immunotherapy gains importance as a treatment option. Due to their importance in anti-cancer immunity, studies on natural killer (NK) cells in immunotherapy have increased. However, the efficiency of this treatment is lower than expected, which may be due to the immunosuppressive environment in bone marrow and circulation of B-ALL patients. Therefore, in our study, bone marrow plasmas of B-ALL patients were co-cultured for 24-72 hours with healthy cells. The subgroups, PD-1 expression, proliferation and IFN-g, IL-10 and TNF-a levels of NK cells were investigated. Experiments were compared to conditions with fetal bovine serum and bone marrow plasmas of patients without leukemia. Plasma IL-1b, IL-6, IL-10, IL-18, IFN-a2, IFN-b, IFN-g, TNF-a and GM-CSF levels were also measured. In the conditions with B-ALL plasmas, the ratios and proliferative capacities of NK cell subgroups were found to be decreased compared to the control groups, while PD-1 and intracellular IL-10 and TNF-a levels were increased. High IL-10 versus low IL-18 and IFN-g levels were detected in B-ALL plasmas. These findings indicate that humoral components in the bone marrow of B-ALL patients exert a suppressive effect on NK cells.

Key Words: Hematology, Immunotherapy, Leukemia, Natural Killer Cells, Cytokines

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No. 29554

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Akut lenfoblastik lösemi (ALL); kemik iliği, kan ve ekstrasmedullar bölgelerdeki lenfoid öncül hücrelerin olgunlaşmaksızın kontrolsüz proliferasyonu sonucu meydana gelen hematolojik bir malignitedir¹. ALL hastalarının % 80'i çocuk hastalardan oluşmaktadır ve ağırlıklı olarak 2-5 yaş arası çocuklarda görülmektedir². Çocukluk çağında en sık görülen kanser tipi olan ALL³, 15 yaş altı çocuklarda meydana gelen kanserlerin % 25'ini oluşturmaktadır⁴. ALL genellikle B veya T lenfosit öncül hücrelerinin malign transformasyonu ile meydana gelmekte olup, Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) sınıflandırmasına göre B- ve T-ALL olmak üzere iki temel gruba ayrılmaktadır⁵. ALL'nin en sık görülen tipi olan B-ALL, tüm ALL olgularının % 80'inden fazlasını oluşturmaktadır⁶.

ALL etiyolojisindeki etkenler net olarak bilinmemekle birlikte, genetik yatkınlık, bazı viral enfeksiyonlar ile radyasyon ve çeşitli kimyasal maddelere maruziyetin, hastalığın ortaya çıkmasında etkili olduğu düşünülmektedir⁷. Diğer çocukluk çağı kanserleriyle kıyaslandığında ALL tedavisi uzun süren bir kemoterapi uygulaması ile, gerekli durumlarda radyasyon tedavisi ve kemik iliği naklini kapsamaktadır^{8, 9}. Uygun tedavi sonucunda özellikle pediatrik vakaların 5 yıllık sağkalım oranı % 90 civarında seyretmekle birlikte, tedaviye olumlu yanıt veren hastaların dahi bir kısmında hastalık nüks etmekte ve enfeksiyöz hastalıklarda artış söz konusu olabilmektedir⁹⁻¹¹. Diğer taraftan, önemli yan etkileri ile kemoterapi uygulaması hastaların yaşam kalitesini büyük oranda düşürmekte^{12, 13}, ALL geçirmiş çocukların ilerleyen yıllarda dahi diğer çocuklara kıyasla yüksek oranda morbidite ve mortaliteye sahip oldukları bilinmektedir¹⁴.

Yukarıda belirtilen riskleri ve kemoterapi uygulamasının yan etkilerini azaltmak amacıyla farklı tedavi metotları üzerinde çalışmalar yapılmaktadır. Bunlar arasında monoklonal antikorlar, antikor-ilaç konjugatları ve kimerik antijen reseptörü (chimeric antigen receptor - CAR) - T hücre uygulaması gibi immünoterapi uygulamaları vardır¹⁵. Ancak, bu yöntemlerin normal hücreler üzerinde yan etkilerinin olması nedeniyle, farklı tedavi seçenekleri üzerine arayışlar devam etmektedir. Bu seçeneklerden biri adoptif doğal öldürücü (natural killer - NK) hücre terapisi. NK hücreleri, temel olarak kemik iliğindeki hematopoetik öncül hücrelerden gelişen, büyük granüllü hücrelerdir¹⁶. NK

hücreleri, granüllerindeki sitotoksik moleküller sayesinde virüsle enfekte veya malign yapıdaki hücreler üzerinde öldürücü etkiye sahiptir¹⁷. Bununla birlikte, farklı lösemi tiplerindeki hastaların NK hücre fonksiyonlarında bozukluk olduğu ve bu durumun hastalık şiddeti ve ilerlemesinde rol oynadığı bilinmektedir^{18, 19}. Ayrıca, pediatrik ALL hastalarının kemik iliği NK hücre oranlarının, kemoterapiye olumlu yanıt verilmesinde ve iyi prognozla ilişkili olduğu görülmüştür²⁰.

NK hücre aracılı immünoterapiye yönelik yaklaşımlardan biri, NK hücrelerinin allojenik lenfoid kök hücrelerden *in vitro* koşullarda farklılaştırılıp çoğaltılarak hastalara transfer edilmesidir²¹. Hedef dışı hücrelere zarar vermeksizin kullanılabilme potansiyelinden ötürü NK hücre terapisi umut vaat eden bir tedavi metodudur. Ancak, allojenik NK hücre tedavisi akut miyeloid lösemi (AML) hastaları üzerinde denendiğinde herhangi bir yan etki oluşturmamakla birlikte, tedavi etkinliğinin düşük olduğu görülmüş ve bu durumun immün-baskılayıcı mikroçevre ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür^{22, 23}. Benzer bir patolojinin, ALL hastaları için de geçerli olması kuvvetli bir ihtimal olarak görünmektedir.

ALL hastalarında NK hücre fonksiyonlarındaki bozulmaya karşılık prognoz ve tedavi için olumlu etkileri düşünüldüğünde, NK hücre terapi başarısını etkileyen faktörleri tanımlamak önem kazanmaktadır. Literatürde yer alan bilgiler doğrultusunda planlanan bu tez çalışmasında, pediatrik B-ALL hastalarının kemik iliği hümmoral bileşenlerinin sağlıklı NK hücre fonksiyonları üzerine etkisi incelenerek, söz konusu bileşenlerin NK hücreleri üzerine muhtemel immün-baskılayıcı etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Lenfositlerin Gelişimi

Edinsel immünitinin başrol oyuncularını olan B ve T lenfositleri, yaşam boyunca hematopoetik kök hücrelerden (hematopoietic stem cell – HSC) “hematopoez” adı verilen bir süreç sonucunda gelişmekte ve kemik iliği veya timusta kademeli olarak olgunlaşmaktadır²⁴. Kandaki hücresel bileşenlerin oluşum sürecini ifade eden hematopoez, esas olarak embriyonik gelişim sırasında meydana gelmekte ve yetişkinlik süresince de devam etmektedir²⁵. Bu süreç ile fetal ve neonatal dönemde büyük miktarlarda lenfosit üretilmekte, ergenlikten sonra ise bu üretim önemli ölçüde azalmaktadır²⁶.

Yolk kesesinde başlayan hematopoez, kemik iliğinin henüz gelişmediği fetal dönemde karaciğerde devam ederek, sonunda B hücreleri için kemik iliği ve T hücreleri için timusta karar kılmaktadır²⁵. Yetişkin dönemde, timusta yeni T hücrelerinin gelişimi yavaşlarken, olgun T hücrelerinin merkezi lenfoid organların dışında bölünmesiyle T hücre sayıları dengede tutulmaktadır. Yeni B hücrelerinin üretimi ise yetişkin dönemde de kemik iliğinde sürekli olarak devam etmektedir²⁷.

Fetal dönemde gerçekleşen hematopoezin ilk aşamasında embriyal dokuların oksijenlenmesini kolaylaştırmak amacıyla kırmızı kan hücreleri üretilmekte²⁸, ardından multipotent nitelikte olan ve tüm kan soy hücrelerinin kökenlendiği HSC'ler gelişmektedir²⁹. HSC'ler temel olarak; lenfoid öncül (common lymphoid progenitor - CLP) ve miyeloid öncül (common myeloid progenitor - CMP) olmak üzere iki soy hücre grubuna farklılaşmaktadır. Lenfoid soydan B ve T lenfositleri ve doğal öldürücü (NK) hücreler meydana gelirken, miyeloid soydan eritrositler, megakaryositler, granülositler ve monosit/makrofajlar gelişmektedir.

Farklılaşma sinyalleri alan kök hücreler ilk olarak kendini yenileme yeteneğini kademeli olarak kaybetmekte ve bir sonraki öncül hücreleri oluşturmaktadır³⁰. Lenfoid öncül hücrelere farklılaşmada transkripsiyon faktörlerinin yanı sıra sitokinler, kemokinler ve büyüme faktörleri gibi moleküller kritik öneme sahiptir. Kök hücrelerin lenfoid öncül hücrelere farklılaşmasında görev alan temel sitokinler arasında interleükin (IL)-1, IL-2, IL-3, IL-6 ve IL-7 bulunur. Farklılaşma sonucu oluşan ortak lenfoid öncül hücreler aldıkları uyarıya bağlı olarak tüm lenfosit tiplerine farklılaşabilmektedir³¹.

Lenfoid öncül hücrelerden T ve B lenfositlerinin gelişim aşamaları, bu tez çalışmasının odağında bulunan B hücreleri ağırlıklı olmak üzere aşağıda ele alınmıştır.

2.1.1. T Lenfositlerinin Gelişimi

T lenfositlerinin gelişimi, lenfoid öncül hücrelerin aldığı uyarıma bağlı olarak kemik iliğinde başlamaktadır. Kemik iliğindeki stromal hücreler ve timustaki epitel hücreleri tarafından üretilen IL-7, lenfoid öncül hücrelerin sağkalımını sağlamanın yanında T hücre gelişiminde ve proliferasyonunda da rol oynar³². T hücrelerinin antijen reseptör repertuarının üretilmesini sağlamak üzere gen yeniden düzenlenmesinin gerçekleşmesi, T lenfosit gelişimi sürecindeki kritik bir basamaktır. Gen yeniden düzenlenmesi ve rekombinasyon mekanizması ile her biri eşsiz bir T hücre reseptörü taşıyan yaklaşık 10^7 farklı T lenfosit klonu ortaya çıkmakta, ancak bunların bir kısmı timustaki seçim sırasında ortadan kalkmaktadır³³.

B lenfositlerinden farklı olarak, T lenfosit öncül hücreleri gelişimini tamamlamadan kemik iliğinden ayrılarak timusa göç etmektedir. Timosit olarak da adlandırılan timustaki T lenfosit öncül hücreleri, olgunlaşmalarını timusta tamamlamakta ve pozitif/negatif seçim süreçlerinden geçerek dolaşıma katılmaktadır. Timustaki T hücre olgunlaşma süreci kritik öneme sahip olup, kemik iliğinde oluşan lenfosit reseptör repertuarının büyük kısmı bu aşamada ortadan kalkmakta ve pozitif/negatif seçim sürecinde timositlerin sadece % 1-3'ü elemeden geçerek dolaşıma geçmektedir³⁴.

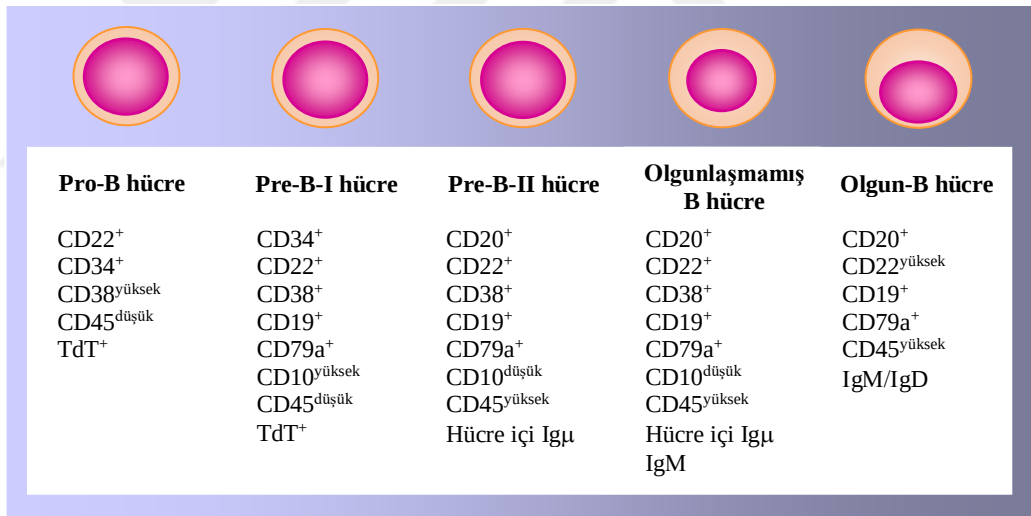
2.1.2. B Lenfositlerinin Gelişimi

Kemik iliğindeki öncül hücrelerden B lenfositlerinin gelişimi, spesifik sitokinlerle uyarım ve uygun mikroçevre ile temas sonucunda meydana gelmektedir³⁵. B hücrelerinin lenfoid öncül hücreden farklılaşmasında E2A, Ebf1, Ikaros, Pax5, FOXO1 ve C-X-C motif kemokin (C-X-C motif chemokine – CXCL)12 gibi çeşitli faktörler rol oynamaktadır. Bu faktörler, IL-7'nin B hücreleri üzerinde bulunan IL-7 reseptörü alfa (IL-7R α) ile etkileşimi sonucu ortaya çıkmakta ve stromal hücrelerin de desteğiyle hepsi birlikte B hücrelerine farklılaşma sürecini başlatmaktadır³⁶.

Lenfoid öncül hücrelerden B hücrelerine farklılaşmanın ilk fazı “pro-B hücre” aşamasıdır. Bu fazdaki hücreler, yüzeylerinde “farklılaşma kümesi” (cluster of differentiation - CD)22, CD34, yüksek CD38, düşük CD45 ve hücre içi terminal

deoksiniukleotidil transferaz (TdT) betimlemeleriyle karakterize edilmektedir³⁷. Pax5 transkripsiyon faktörünün etkisiyle, hücre yüzeyinde en erken faz B lenfosit antijenlerinden biri olan CD19 molekülü betimlenmektedir. Bir sonraki aşamada yüksek CD10 ile birlikte CD34, CD38, CD79a ve hücre içi TdT betimleyen hücreler “pre-B-I” hücreleri olarak adlandırılmaktadır. Bu fazda rekombinasyonu aktive edici gen (recombination-activating gene - RAG)1 ve RAG2 proteinlerinin katılımıyla immünoglobulin (Ig) ağır zincir lokusunda gen rekombinasyonu gerçekleşir.

Gen yeniden düzenlenmesi devam ederken IgM molekülünü oluşturacak olan μ zincirinin hücre içinde ortaya çıkmasıyla “pre-B-II” fazına geçilmiş olur. Bu aşamada, hücre yüzeyinde CD20 molekülü betimlenirken CD34 ve hücre içi TdT ortadan kalkar³⁸. Pre-B-II fazındaki hücre, membran yüzeyinde CD79a ve CD79b molekülleri ile Ig μ tarafından oluşturulan pre-B hücre reseptör (pre-BHR) kompleksini ifade eder³⁹. B hücre olgunlaşma aşamaları Şekil 2.1’de görülmektedir.



Pro-B hücre	Pre-B-I hücre	Pre-B-II hücre	Olgunlaşmamış B hücre	Olgun-B hücre
CD22 ⁺	CD34 ⁺	CD20 ⁺	CD20 ⁺	CD20 ⁺
CD34 ⁺	CD22 ⁺	CD22 ⁺	CD22 ⁺	CD22 ^{yüksek}
CD38 ^{yüksek}	CD38 ⁺	CD38 ⁺	CD38 ⁺	CD19 ⁺
CD45 ^{düşük}	CD19 ⁺	CD19 ⁺	CD19 ⁺	CD79a ⁺
TdT ⁺	CD79a ⁺	CD79a ⁺	CD79a ⁺	CD45 ^{yüksek}
	CD10 ^{yüksek}	CD10 ^{düşük}	CD10 ^{düşük}	IgM/IgD
	CD45 ^{düşük}	CD45 ^{yüksek}	CD45 ^{yüksek}	
	TdT ⁺	Hücre içi Ig μ	Hücre içi Ig μ	
			IgM	

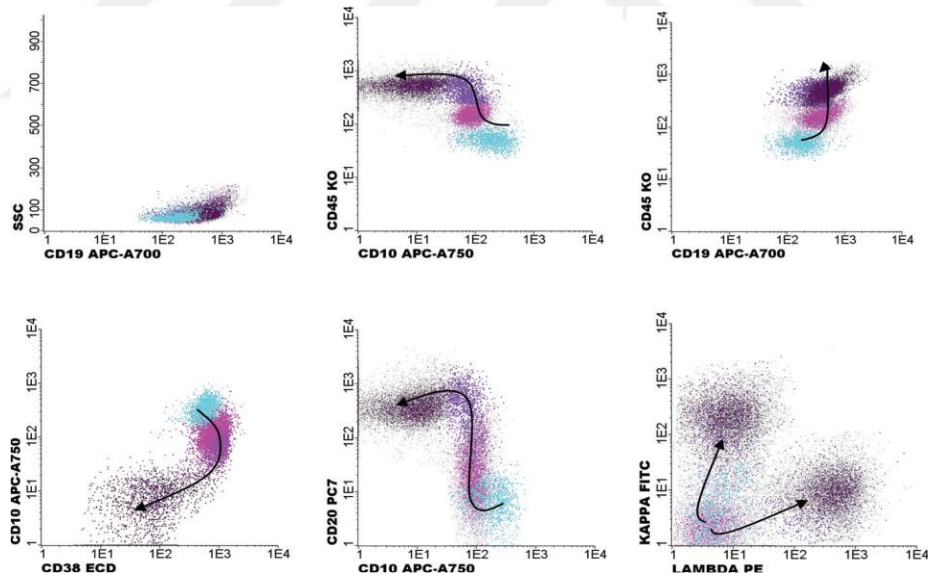
Şekil 2-1: Kemik iliğinde B hücrelerinin olgunlaşma aşamaları

Pre-BHR’nin kemik iliği mikroçevresinde bulunan öz antijenleri bağlaması durumunda, aldığı sinyaller sonucunda pre-B fazındaki hücre apoptozdan kurtularak pozitif seçilime uğrar. Pozitif seçim ile hücrenin taşıdığı Ig μ zincirinin işlevsel olduğu doğrulanırken, işlevsel olmaması durumunda ise hücre ortadan kaldırılır³⁸. Pre-BHR’dan alınan pozitif sinyallerle hücre aynı zamanda bir sonraki faza geçiş için farklılaşıp çoğalırken, diğer taraftan ağır zincir rekombinasyonu durarak hafif zincir rekombinasyonu uyarılır⁴⁰. Sonuçta, oluşumu tamamlanan IgM molekülü membran yüzeyinde betimlenir. Hücre yüzeyinde IgM betimleyen bu hücre “olgunlaşmamış B

hücresi” olarak tanımlanmaktadır. Membran yüzeyinde CD5, CD20, düşük CD10 ve CD21, yüksek CD38 ve yüksek CD81 ile CD45 molekülü betimleyen olgunlaşmamış B hücre fazındaki hücreler pozitif/negatif seçimden geçmektedir⁴¹.

Pozitif seçimde, gen yeniden düzenlenme işleminin başarılı olduğu hücreler seçilirken, aldıkları sağkalım sinyalleri ile olgunlaşma sürecine devam ederler⁴². B lenfositinin öz antijenleri tanınması durumunda, BHR kompleksinde tekrar bir “yeniden düzenleme” meydana gelerek B hücresinin kendi kendine reaktif olmayan bir BHR geliştirmesi sağlanır⁴³. Bu yeniden düzenlenmenin başarısız olması negatif seçimle sonuçlanarak hücrenin apoptozuna yol açmaktadır. Pozitif olarak seçilen hücrelerse kemik iliğinden ayrılarak, olgunlaşmalarını tamamlamak üzere sekonder lenfoid organlara geçmektedir. Olgun B lenfositleri, membran yüzeylerinde IgD ve IgM taşıırken, olgunlaşma sürecinde CD10 ve CD38 betimlemelerini kaybederler.

Kemik iliğinde B hücre olgunlaşma aşamaları akan hücre ölçer ile immünofenotipleme yöntemiyle analiz edilebilmektedir (Şekil 2.2.).



Şekil 2-2: B hücre olgunlaşma aşamalarının akan hücre ölçer ile gösterimi³⁸

2.1.3. Kemik İliği Mikroçevresi

Kemik iliğindeki hematopoetik hücreler, çeşitli stromal hücrelerden ve kollajenler, fibronektin ve proteoglikanlar açısından zengin bir hücre dışı matristen oluşan, organize ve benzersiz bir mikroçevrede bulunur. Bu ortam, kök hücrelerin ve multipotent öncül hücrelerin kendilerini yenilemelerini teşvik etmek ve her soyun

farklılaşmasını düzenlemek gibi işlevlerin yanı sıra, dokuya yapısal destek ve mekânsal organizasyon da sağlamaktadır. Kemik iliğinin farklı bölgelerindeki özelleşmiş mikroçevreler, hematopoezi organize etmekte ve öncül hücreleri, hücre tiplerini ve hücre soylarını düzenlemektedir⁴⁴.

Hematopoez, hematopoetik kök hücrelerin kopyalandığı ve aynı zamanda belirli soyları verecek öncül hücrelere farklılaştığı karmaşık bir süreçtir. Bu belirlenmiş soy hücrelerin çoğalıp olgun kan elemanlarına farklılaşmaları süreci kemik iliği mikroçevresi ile yakın ilişki içerisinde gerçekleşir. Kemik iliği stromal hücreleri tarafından üretilen hümorale bileşenler, hematopoetik hücrelerin farklılaşmasını uyarmakta ve soy öncül hücrelerin korunmasına katkı sağlamaktadır⁴⁵. Stromal hücrelerin betimlediği E-selektin, P-selektin ve vasküler hücre adezyon molekülü (vascular cell adhesion molecule - VCAM)-1 gibi adezyon molekülleri, üzerindeki reseptörleri aracılığıyla HSC'lerin sürekliliğini ve işlevlerini kontrol etmektedir⁴⁶.

Bu nedenle, hematopoetik kök hücrelerle yapılan *in vitro* çalışmalarda destek hücre tabakası olarak stromal hücreler kullanılmaktadır. Kültür ortamında hematopoetik öncül hücrelerin farklılaşma ve çoğalmasını destekleyen sitokinlerin üretiminin sağlanması açısından stromal hücre kullanımının önemli bir işlevi vardır⁴⁷. Stromal tabakanın yokluğunda ise tanımlanmış sitokinler tekrarlı olarak eklenmek suretiyle hematopoetik öncül hücrelerin uzun vadeli kültürleri oluşturulabilmektedir⁴⁸. Bu sitokinler arasında granülosit koloni stimüle edici faktör (granulocyte colony-stimulating factor - G-CSF), IL-1, IL-3, IL-6, lösemi-inhibitör faktör (leukemia inhibitory factor - LIF), kök hücre faktörü (stem cell factor - SCF) ve temel fibroblast büyüme faktörü (basic fibroblast growth factor - bFGF) bulunmaktadır⁴⁹.

Kemik iliğinde gerçekleşen hematopoezde sitokinler ve büyüme faktörlerinin yanı sıra kemokinler ve kemokin reseptörleri de rol oynar. Bu kemokinler ve reseptörleri proliferasyonu düzenlerken, hematopoetik öncül hücrelerin sağkalımını ve muhafaza edilmesini de sağlar. Özellikle CXCL12 ile C-X-C motif kemokin reseptörü (C-X-C motif chemokine receptor - CXCR)4'ün etkileşimi HSC'lerin homeostazı için temel teşkil etmektedir⁵⁰.

Ağırlıklı olarak fetal ve neonatal dönemde gerçekleşen bu işlemlerle HSC'lerin kısa sürede immün sistemi donanımlı hâle getirmek için çok sayıda lenfosit üretmesi, kemik iliğindeki lenfosit öncüllerinin anormal proliferasyonu ile karakterize bir hastalık

olan akut lenfoblastik löseminin çocukluk çağında daha sık görülmesinin altında yatan nedenlerden biri olarak kabul edilmektedir⁵¹.

2.2. Akut Lenfoblastik Lösemi

2.2.1. Tanım ve Sınıflandırma

Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL), kemik iliğindeki olgunlaşmamış lenfositlerin ve lenfosit öncül hücrelerin kontrolsüz proliferasyonu ile karakterize olan hematolojik bir malign hastalıktır¹. Kemik iliğinde anormal olarak gelişen hematopoetik hücreler, normal olgunlaşma yolağının lenfoblast aşamasında takılı kalarak olgunlaşmasını tamamlayamamakta ve periferik kandaki olgun lenfosit, eritrosit ve trombosit sayısının azalmasına neden olmaktadır. ALL’de görülen klinik semptomlar da anemi, trombositopeni, nötropeni veya lösemi hücrelerinin dokulara infiltrasyonu ile ilişkili olarak ortaya çıkmaktadır⁷.

Hastalık pek çok organı etkilemekle birlikte, ekstremiteler bölgelerinin tutulumuna sık rastlanmakta olup, lösemi hücreleri periferik kana geçtikten sonra başlıca lenf düğümleri, dalak, karaciğer ve cilt dokusuna infiltre olmaktadır. Tanı anında hastaların % 5-8’inde merkezi sinir sistemi (MSS) tutulumu tespit edilmektedir⁵².

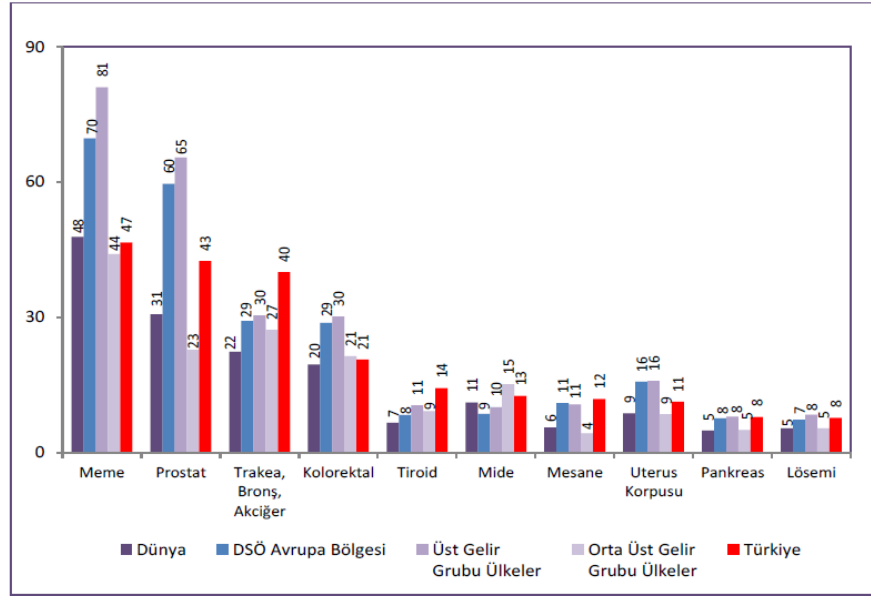
ALL’nin klinik semptomları arasında ateş, kilo kaybı, gece terlemeleri, yorgunluk, nefes darlığı, kolay kanama veya morarma ve enfeksiyonlar yaygın olarak görülmektedir⁵³. Klinik tabloda benzerlikler olmakla birlikte ALL, farklı biyolojik ve prognostik gruplamalara sahip heterojen bir hastalıktır. ALL’nin sınıflandırılmasında önceleri hücrelerin morfolojik değerlendirilmesi dikkate alınırken, DSÖ’nün yaptığı ve son olarak 2016 yılında güncellenen immünolojik sınıflandırmaya göre ALL’ler kökenlendiği lenfosit öncül hücre tipine bağlı olarak T- veya B-ALL olmak üzere iki temel grupta incelenmektedir⁵.

Bu tez çalışmasında ALL’nin görülme sıklığı, etiyolojisi, belirtileri ve tanı yöntemlerinden sonra, çalışmanın odak noktası olan B-ALL’nin patofizyolojisi, akan hücre ölçeği ile değerlendirilmesi ve hastalığın uygulamadaki veya araştırma altındaki tedavi seçenekleri detaylı olarak ele alınmıştır.

2.2.2. Epidemiyoloji

Lösemi, tüm dünyada görülen yaygın malign hastalıklardan biri olmakla birlikte, gelişmiş ülkelerde daha sık ortaya çıkmaktadır. İçlerinde ülkemizin de bulunduğu 185

ülkenin katılımıyla gerçekleştirilen küresel kanser istatistikleri çalışmasına göre, 2018 yılında dünya üzerinde 437.033 lösemi vakası ve 309.006 lösemiye bağlı ölüm tespit edilmiştir⁵⁴. DSÖ'nün 2020 yılında yayınlamış olduğu verilere göre Türkiye'deki lösemi insidansı, dünya ortalamasının üzerindedir⁵⁵ (Şekil 2.3).



Şekil 2-3: Türkiye'de en sık görülen ilk 10 kanser türü insidansının uluslararası karşılaştırması (100.000 nüfusta, dünya standart nüfusu), 2020⁵⁶

Tüm lösemi vakaları ve tüm çocukluk çağı maligniteleri arasında en sık görüleni ALL olup³, 15 yaş altı çocuklarda meydana gelen kanserlerin % 25'ini oluşturmaktadır⁴. ALL yetişkinlerde de görülmekle birlikte, yaklaşık % 80 oranında çocuklarda ve özellikle 2-5 yaş arasında ortaya çıkmaktadır².

2.2.3. Etiyoloji

ALL'nin oluşumuna neden olan etkenler net olarak bilinmemekle birlikte, hastalığın çok faktörlü olduğu düşünülmektedir. Genetik ve çevresel etmenlerin hastalığın ortaya çıkmasında etkili olduğuna dair bulgular mevcuttur. Çevresel etmenler arasında bulunan ışınlanmış radyasyon, pestisitler ve bazı kimyasal çözücülere ilâveten, viral enfeksiyonların da hastalığın gelişiminde etkisi olduğuna dair bulgular mevcuttur^{7, 57-59}. Genetik etmenler ise tek bir mutasyondan ziyade birbirini takip eden birden çok mutasyonu içermekte olup, bu mutasyonlara çevresel faktörlerin de katkıda bulunması neticesinde hastalığın ortaya çıktığı görüşü hâkimdir. Bu görüşü ilk olarak 1971 yılında ifade eden Knudson'un "iki vuruş teorisi" üzerinde sıklıkla durulmaktadır⁶⁰.

İki vuruş teorisi, fetal dönemde gelişen bir mutasyonun ardından doğum sonrasında maruz kalınan çevresel faktörlerin etkisiyle diğer bir mutasyonun geliştiği fikrine dayanmaktadır⁶¹. Bu mutasyonlar, tümör baskılayıcı genlerin fonksiyonlarında bozukluk ve proto-onkogenlerin işlev kazanmasıyla sonuçlanmaktadır. Neticede lenfosit öncül hücreler farklılaşma niteliklerini kaybederken apoptoza direnç kazanmakta ve kontrolsüz şekilde çoğalan lösemi hücreleri gelişmektedir⁷.

Tek başına ALL oluşumuna neden olmamakla birlikte, hastalığın gelişimine yatkınlık oluşturan genetik faktörler arasında ALL için ayırt edici olan bazı kromozomal anomaliler de mevcuttur⁶². Ayrıca bazı genetik sendromların ALL'ye duyarlılık ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Bu sendromlar DNA onarımı, hematopoetik transkripsiyon faktörleri, tümör baskılayıcılar ve diğer kritik hücrel süreçlerde patojenik varyantların oluşumu sonucunda ortaya çıkmaktadır. ALL ile ilişkili sendromlara örnekler ve ilişkili oldukları genler Tablo 2.1'de gösterilmiştir⁶³.

Tablo 2-1: Lösemi duyarlılık bozuklukları

Altta yatan biyolojik neden	Hastalık / sendrom	Gen(ler)	Lösemi alt tipi	Diğer klinik görünüm
DNA onarımı	Nijmegen kırık sendromu	<i>NBN</i>	ALL	Mikrosefali, mikrogeni, kuş-benzeri yüzler
	Ataksi telenjektazi	<i>ATM</i>	ALL	Serebellar ataksi, konjonktival telenjektaziler koreoatetoz, okülomotor apraksi
	Bloom sendromu	<i>BLM (RECQL3)</i>	ALL veya AML	Büyüme geriliği, güneş hassasiyeti, reflü, insülin direnci
	CMMRDS (Turcot sendromu)	<i>MSH1, MSH2, MSH6, PMS2, EP CAM</i>	ALL veya AML	Lynch sendromu (heterozigot formunda)
Hematopoetik transkripsiyon faktörleri	Trombositopeni, tip 5	<i>ETV6</i>	ALL, nadiren AML	
	ALL-3'e duyarlılık	<i>PAX5</i>	ALL	
Tümör baskılayıcılar	Li-Fraumeni sendromu	<i>TP53</i>	AML veya ALL	Diğer kanserler (beyin tümörleri, sarkomlar, meme ve adrenokortikal karsinomlar)
Diğer hücrel süreçler	Germline SH2B3 mutasyonlu ailesel ALL	<i>SH2B3</i>	ALL	
Kromozomal anöploidiler	Down sendromu	Trizomi 21	ALL veya AMKL	Konjenital kalp kusurları, zihinsel engellilik, karakteristik yüzler, gastrointestinal sistem malformasyonları, iştme kaybı

2.2.4. Belirtiler

Hastalığın klinik belirtileri değişken olup akut ve şiddetli semptomlarla ortaya çıkabileceği gibi, sessiz ve hastalığa spesifik olmayan semptomlarla baş gösterebilmekte ve rastlantısal olarak da saptanabilmektedir. Bu durum, kemik iliği tutulumu ve ekstremiteler bölgelere yayılma derecesiyle ilişkilidir. Sık rastlanan belirtiler arasında ise başta ateş olmak üzere, halsizlik, soluk renk, iştah kaybı, kemik ve eklem ağrıları bulunmaktadır. Bu belirtilerle kliniğe başvuran hastaların, periferik yayma preparatlarında blast hücrelerinin görülmesinin yanı sıra kan sayım sonuçları değerlendirildiğinde vakaların çoğunda trombositopeni tespit edilmekte ve lökopeni veya lökositoz görülebilmektedir⁶⁴.

2.2.5. Tanı

Klinik semptomları destekleyici kan sayımı ve periferik yaymadan elde edilen laboratuvar bulguları ile ALL ön tanısı koyulan hastalarda, kesin tanı için kemik iliği morfolojik değerlendirmesi, sitogenetik tanı, ters transkriptaz-polimeraz zincir reaksiyonu (reverse transcriptase-polymerase chain reaction - RT-PCR) testi, akan hücre ölçer ile immünofenotipleme gibi metotlar kullanılmaktadır.

2.2.5.1. Morfolojik Değerlendirme

ALL şüphesi ile yapılan periferik yaymada blast görülmesi önemli bir bulgu olmakla birlikte, ALL esas olarak kemik iliği tutulumu ile baş gösteren bir hastalık olduğundan kesin tanı için ilk basamak kemik iliği morfolojik değerlendirmesidir ve ALL'yi AML'den ayırt etmede yol göstericidir. Bununla birlikte, morfolojik değerlendirme ALL'nin alt tiplerini belirlemek için yetersizdir⁶⁵. Bu noktada B veya T lenfoid öncülleri olmak üzere hücre soyunun tiplendirilerek ALL alt sınıfının tanımlanması için günümüzde akan hücre ölçer analizi tanısal altın standart olarak kullanılmaktadır.

2.2.5.2. Sitogenetik Değerlendirme

Pediyatrik ALL'de kemik iliği blastlarının sitogenetik analizi, önemli sayısal ve yapısal kromozomal anormalliklerin tanımlanması için 1970'lerden günümüze standart teknik olarak kullanılmakta olup, ALL tanısı ve sınıflandırmasının ayrılmaz bir parçasını oluşturmaktadır⁶⁶. Prognoz için öneme sahip olan sitogenetik profilin, bazı ilaç tedavilerine yanıt ile ilişkili olduğu görülmüştür⁶⁷.

Klasik karyotipleme sayesinde tekrarlayan translokasyonların belirlenmesi mümkün olabilmektedir⁶⁸. Sitogenetiğin klinik uygulamada yerleşmiş olması ve tüm genomun etraflıca görüntülenebilmesi avantaj sağlarken, çözünürlüğünün düşük olması ve bazı vakalarda lösemik hücrelerin metafaza girememesi nedeniyle bu aşamada görülebilecek anormalliklerin görüntülenmesinde oluşan sınırlılıklar bu yöntem için dezavantaj oluşturmaktadır⁶⁶. Floresan *in situ* hibridizasyon (FISH) yöntemi ise yaklaşık % 99 duyarlılığa sahip bir yöntem olup, ALL'de araştırılan hemen hemen tüm kromozomal anormalliklerin saptanmasını sağlamaktadır. ALL'de saptanan sayısal ve yapısal karyotipik değişiklikler prognostik açıdan büyük öneme sahiptir⁶⁹.

2.2.5.3. RT-PCR testi

Genetik testlerin temelinde sitogenetik çalışmalar olmakla birlikte, hastalığı tanımlayan genetik lezyonların tespit edilmesinde moleküler teknolojilerin bazı avantajları bulunmaktadır. Moleküler seviyede değerlendirildiğinde, RT-PCR tekniğinin birçok lösemi translokasyonunu tespit etmede hızlı ve güvenilir bir yöntem olmasının yanı sıra, hücrelerin bölünmesine gerek olmaması ve klasik sitogenetik çalışmalarda gözden kaçabilecek translokasyonları hassas bir şekilde tespit edebilmesi, bu yöntemin avantajlarından biridir. Ayrıca, RT-PCR testi minimal kalıntı hastalık (minimal residual disease - MRD)'nin tespiti için de hassas bir yöntem olarak kullanılmaktadır⁷⁰.

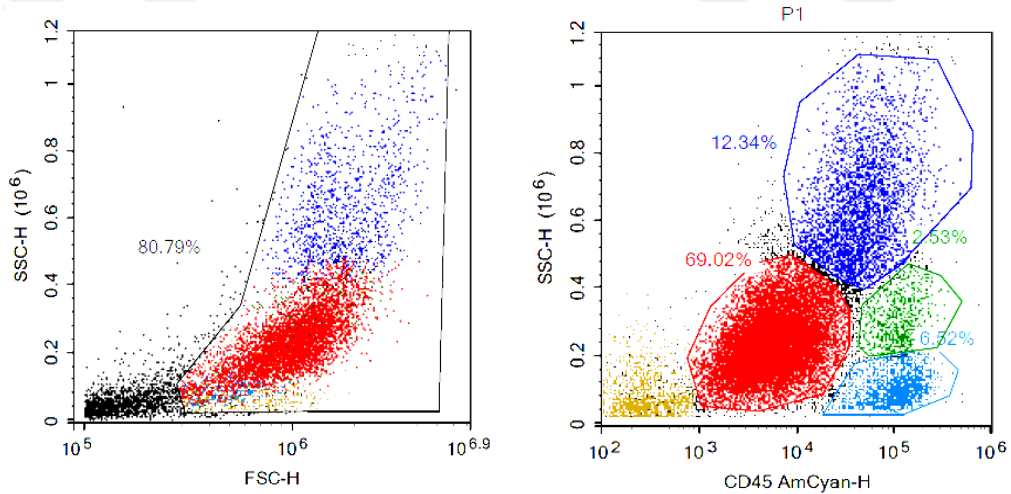
2.2.5.4. Akan Hücre Ölçer ile İmmünofenotipleme

Akan hücre ölçer ile immünofenotipleme, günümüzde ALL tanısı ve alt sınıflandırması için kullanılan temel metottur. Klinik değerlendirme ve laboratuvar bulguları neticesinde ALL ön tanısı ile hastadan alınan kemik iliği örneğinde akan hücre ölçer ile immünofenotipleme yapılmakta ve ALL/AML ayrımı net olarak belirlenerek kesin tanı koyulabilmektedir. İmmünofenotipleme ile hastalık alt tipinin B- veya T-ALL olduğu belirlenebildiği gibi, blast popülasyonunun immünofenotipik özelliklerine bağlı olarak alt sınıflandırma da yapılabilmektedir. Ayrıca bu yöntem ile hızlı ve güvenilir şekilde MRD'nin tespit edilmesi ve takibinin yapılması da mümkün olmaktadır⁷¹.

Lösemi immünofenotiplemesinde veri analizinin hedefi, anormal hücre gruplarını normal hücrelerden ayırt ederek bu anormal hücrelerin antijen betimleme profillerini karakterize etmektir. Lösemi hücreleri normal hücrelerde bulunmayan belirteçleri ifade edebileceği gibi, normalde betimlenen belirteçlerden yoksun olabilmekte ve/veya normal hücresel belirteçleri düşük veya yüksek şekilde de ifade edebilmektedir⁷². Bu

prensibe göre akan hücre ölçer ile ilk olarak lösemi blast hücreleri tespit edilerek bu hücrelerin fenotipik özelliklerine göre ALL tanı ve tiplendirmesi yapılmaktadır. İmmüno-fenotipin lösemi tanısı açısından değerlendirilmesi için, DSÖ'ye göre kemik iliği örneğindeki blast oranının en az % 20 olması gereklidir. CD3, CD79a, miyeloperoksidaz (MPO) ve TdT betimlemelerinin değerlendirilmesinde ise % 10'luk blast popülasyonunun varlığı yeterli olmaktadır^{73, 74}.

Lenfoid öncül hücrelerin CD45 betimlemesi genellikle olgun lenfositlere göre daha düşük seviyelerdedir. Bu nedenle, akan hücre ölçer ile kemik iliği örneğindeki blast popülasyonunun belirlenmesinde, olgun eritrositler hariç tüm olgun hematopoetik hücrelerin yüzeyinde betimlenen CD45 molekülü ana belirteç olarak kullanılmakta ve CD45 molekülü betimlemeyen veya CD45 betimlemesi düşük olan hücreler blast hücreleri olarak kabul edilmektedir^{75, 76}. Bu şekilde tespit edilen lenfoblastların görünümü tipik olarak küçük ve agranülerdir. Akan hücre ölçerde kemik iliği hücrelerinin CD45 betimlemesine bağlı olarak blast popülasyonunun kapılma stratejisi Şekil 2.4'te gösterilmiştir. ALL'de hücreler olgunlaşma gerçekleştiremediği için, lenfosit ve granülosit popülasyonlarının küçük olduğu gözle çarpmaktadır.



Şekil 2-4: Akan hücre ölçer ile kemik iliği örneğinde blast popülasyonu kapılma stratejisi.

Olgun lenfositler CD45^{parlak} iken, lösemi blastlarının CD45^{soluk/-} olduğu görülmektedir (Örnek, yeni tanı B-ALL olgusuna aittir).

CD45^{soluk/-} hücre grubunun kapılanmasıyla seçilen blast popülasyonu içinde, B- ve T-ALL'ye özgü ve ayırt edici belirteçlerin seviyeleri değerlendirilmek suretiyle ALL açısından kesin tanı koyulmaktadır. T-ALL'de genellikle CD45 ifadesi B-

ALL'dekinden daha parlaktır ve olgun lenfositlere yakın olabilmektedir. Diğer taraftan, CD45 ile ek olarak CD34 ve TdT'nin varlığı blast tanımlamasında kullanışlı belirteçler olmakla birlikte, T veya B lenfoid soya özgü moleküller değildir⁷⁷. B veya T hücre soyunu mutlak özgüllükle tanımlayan tek bir antijen bulunmadığından, T ve B lenfoid soyun ifade ettiği belirteçleri içeren bir monoklonal antikor paneli oluşturulmalıdır. Tanı aşamasında AML, B-ALL ve T-ALL blast fenotiplemesinde kullanılabilecek belirteçler Tablo 2.2'de gösterilmiştir.

Tablo 2-2: Akut lösemi sınıflandırmasında kullanılan belirteçler

	AML	B-ALL	T-ALL
Hücre içi	Myeloperoksidaz (MPO)	IgM	CD3
Hücre yüzey	CD13, CD11b, CD15, CD33, CD117	CD10, CD19, CD20, CD22, CD79a	CD1a, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8

T-ALL paneli için kullanılabilecek belirteçler arasında, başta CD2, hücre yüzey ve hücre içi CD3 ile CD7 molekülleri olmak üzere CD1a, CD4, CD5 ve CD8 molekülleri bulunmaktadır. Bazı vakalarda B-ALL'de sıklıkla betimlenen CD10 ile diğer bazı vakalarda kök hücre belirteci CD34 ve miyeloid antijenleri olan CD13 ve/veya CD33 de saptanabilmektedir. Kesin T-ALL tanısında yüzey/sitoplazmik CD3 ifade seviyelerinin değerlendirilmesi önemlidir^{77,78}.

B-ALL'de tanı, ayırıcı tanı ve alt sınıflandırma için en önemli belirteçler CD10, CD19, CD20, CD22, CD24, CD38 ve CD79a'dır. CD34 ve TdT betimlemeleri de B-ALL'nin farklı evrelerinde yüksek seviyede tespit edilebilmektedir. B hücre soyuna özgü sayılabilecek sitoplazmik CD22 molekülü, tanıyı desteklemek için kullanılabilen belirteçlerdendir. Kesin B-ALL tanısı için CD19, CD79a veya hücre içi CD22 molekül betimlemelerinden en az ikisinin mevcut olmasına karşılık, T veya miyeloid hücre antijenlerinin bulunmaması gerekmektedir^{79,80}.

2.3. B Hücreli Akut Lenfoblastik Lösemi

Tüm ALL vakalarının % 80-85 ile en sık rastlanan tipi olan B-ALL, kemik iliğinde malign B öncül hücrelerinin anormal çoğalması ile meydana gelmektedir³. B-ALL, çocukluk çağı malign hastalıkları arasında en sık görüleni olup, çocuklarda ve

genç erişkinlerde kansere bağlı ölümlerin başlıca nedenidir⁸¹. Mevcut tedavi protokolleri ile çocuk hastaların 5 yıllık sağkalım oranı % 90 civarında seyretmekle birlikte, hastaların % 15-20'sinde nüks meydana gelmesi söz konusu olup, nüks gelişiminden itibaren 5 yıllık sağkalım oranı % 50'lere kadar düşmektedir. Diğer taraftan, hastalığı atlatan çocuklarda dahi uygulanan tedavinin yıkıcı yan etkileri görülmektedir^{82, 83}.

B-ALL patogeneğinde hücre döngüsünde düzensizliğe neden olan bazı gen mutasyonları, anormal protein etkileşimleri, durdurulamayan hücre döngüsü ve otofajide artış gibi moleküler düzeydeki anormalliklerin rol oynadığı bilinmektedir. Hastalık oluşumuna zemin hazırlayan risk faktörleri arasında ise viral enfeksiyonlar, yüksek ağırlıklı doğum, radyasyon ve çeşitli kimyasalları içeren çevresel toksinlere mâruziyet gibi etkenlerin bulunduğu bilinmektedir^{6, 84}. Çevresel toksinlerden biri olan ve sigara dumanı veya boyalarda bulunan benzen kanserojen bir madde olup, hamilelik sırasında benzene mâruziyetin, kemik iliğinde sitotoksikite ve DNA hasarına yol açarak ALL riskini arttırdığı bilinmektedir⁵⁸.

Hastalık gelişimi için diğer bir risk faktörü hızlı fetal büyüme olup, fetal büyümenin ana düzenleyicileri olan insülin büyüme faktörü (insulin growth factor - IGF)1 ve IGF2 ile reseptörleri olan IGF1R ve IGF2R gen betimlemeleri de doğal olarak hastalık gelişimiyle yakından ilgilidir⁸⁵. IGF genindeki anormal betimleme fetal dönemde veya doğum sonrası lenfoid kök hücreler henüz olgunlaşmadan önce meydana gelebilmekte ve lösemi için risk oluşturabilmektedir⁸⁶.

2.3.1. B-ALL Patofizyolojisi

B hücrelerinin lenfoid öncül hücrelerden farklılaşarak olgunlaşması sürecinde sinyal iletimi, transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu ve pozitif/negatif seçim mekanizmalarının kusursuz şekilde işlemesiyle pro-B ve pre-B fazlarından geçen hücre olgun lenfositlere dönüşerek işlev kazanmaktadır. B öncül hücre malignitesi söz konusu olduğunda ise lenfoid hücre farklılaşması engellenerek, anormal hücre çoğalması ve sağkalımı meydana gelmektedir⁸⁷.

B-ALL'de hücre döngülerinde düzensizlik söz konusu olup, HSC'lerin kontrolsüz proliferasyonu ve olgunlaşmamış lenfoblastik hücreler lösemi gelişimine neden olmaktadır⁸⁸. B-ALL oluşumunun bir dizi gen mutasyonu ile ilişkili olduğu bilinmekte olup, genellikle multipotent kök hücre aşamasında başlamakta ve klonal

genişleme, farklılaşma, hücre proliferasyonu ve düzensiz hücre apoptozu sonucunda normal lenfoid hücrelerin yerini malign hücreler almaktadır⁸⁹. B-ALL patofizyolojisiyle ilişkili olduğu bilinen bazı genler ve moleküler mekanizmalar aşağıda özetlenmiştir:

ETV6-RUNX1: Pediatrik B-ALL'de görülen en yaygın kromozomal anormallik bulgusudur⁹⁰. Bu genetik değişiklik yalnız B-ALL'ye özgü olduğundan önemlidir. Tek başına lösemi gelişimine neden olmamakla birlikte, ETV6-RUNX1 taşıyıcısı olanlarda ek mutasyonların meydana gelmesinin, hastalık tablosunun ortaya çıkmasına neden olduğu bilinmektedir⁹¹.

TEL-AML1: Klinik semptomlar ortaya çıkmadan yıllar önce dahi mevcut olabilen ve genellikle intrauterin dönemin erken aşamalarındaki mutasyon sonucu oluşan bir füzyon genidir⁹². HSC'ler üzerinde etkili olması ve özellikle ek mutasyonlar ve çevresel etkenlerin de eklenmesiyle ALL oluşumuna sebep olan yolak aktive olabilmektedir. Sonuçta hücreler olgunlaşmanın pro-B fazında kalarak hastalık tablosu ortaya çıkmaktadır⁹³. Bu nedenle TEL-AML1 varlığı, ALL için risk oluşturmaktadır.

BCR-ABL1: Bir füzyon geni olan BCR-ABL1, 9. kromozom üzerindeki ABL geninin, 22. kromozomdaki BCR geni ile yer değiştirmesi sonucu meydana gelmektedir. ABL füzyon geninin eklenmesiyle değişen 22. kromozoma "Philadelphia (Ph) kromozomu" adı verilmektedir⁹⁴. Hastalığın en kötü prognozunu Ph pozitifliği ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Bu mutasyonun görülme sıklığı pediatrik B-ALL vakaları arasında yaşla beraber artmaktadır⁹⁵.

PAX-5: B hücre aktivatör proteini olan Pax-5, nükleer transkripsiyon faktörlerini kodlayarak B hücrelerinin pro-B'den olgun faza kadarki gelişim, farklılaşma, migrasyon ve çoğalma gibi fonksiyonlarını düzenlemektedir. Pax-5 betimlemesinin azaldığı durumda pro-B hücrelerinin gelişimi durmaktadır. Pediatrik B-ALL hastalarının yaklaşık % 90'ının Pax-5'i aşırı betimlediği bilinmektedir⁹⁶. Bu durum, Pax-5 ifadesindeki anormalliklerin erken evrede B hücrelerinin lösemiye dönüşümüne neden olabildiğini ortaya koymaktadır.

RAS: Çoğunlukla kemoterapi sırasında RAS geninde meydana gelen mutasyon nüks ile ilişkilidir. RAS geninde mutasyon bulunan HSC'ler kontrolsüz büyüme göstermektedir⁹⁷. Prognozu kötü olan veya nüks gelişen ALL'li hastalarda sıklıkla RAS yollarında mutasyonlar mevcuttur. Aynı zamanda RAS yolağındaki aktivasyonun, medikal tedavi etkinliğini bozduğu görülmüştür⁹⁸.

PI3K: Hücre proliferasyonunda işlevleri bulunan mTOR, Bcl-2, NFκB gibi proteinlerin seviyelerini düzenlemekle görevli bir gen olan PI3K'nın aşırı aktifleştirilmiş yolağı B-ALL'de sıklıkla mevcuttur. PI3K/Akt sinyal yolu, hücre proliferasyonu ve hücre sağkalımı ile ilgili olup, B-ALL gibi çeşitli hematolojik malignitelerde aktive olmaktadır⁹⁹.

Yukarıda örnekleri verilen genlerdeki mutasyonlar ve fonksiyon bozukluklarının yanında, B-ALL'de kemokinler ve sitokinler de dâhil olmak üzere humoral immün bileşenlerin konsantrasyonlarında da dengesizlik olup, bu durumun hücreler üzerinde baskılayıcı bir ortam oluştururken lösemi hücrelerinin hayatta kalmasını ve çoğalmasını desteklediği düşünülmektedir^{100, 101}.

2.3.2. B-ALL Sınıflandırması

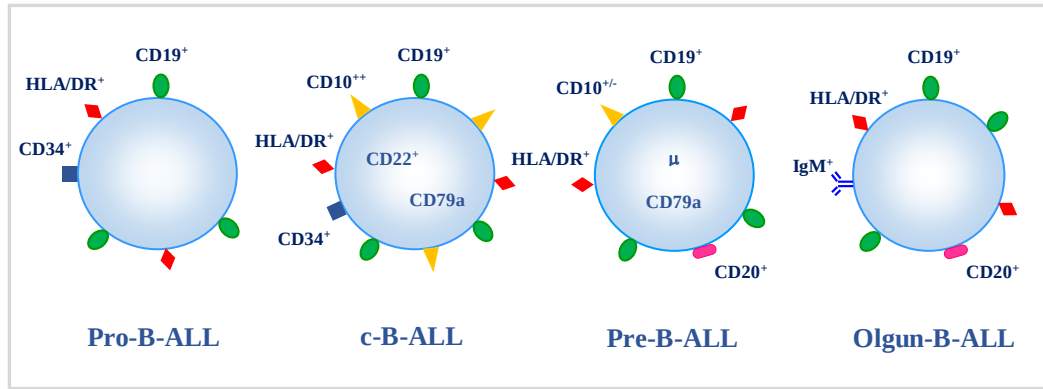
B öncül hücre farklılaşmasının hangi aşamasında geliştiğine bağlı olarak B-ALL'ler; pro-B-ALL, ortak (common - c)-(B)-ALL, pre-B-ALL ve olgun-B-ALL olmak üzere 4 grupta incelenmektedir¹⁰². B-ALL'nin farklı alt tiplerinde lösemi blastlarının immünofenotipleri de farklılık göstermektedir. Akan hücre ölçer ile yapılan immünofenotipleme, B-ALL tanısı koymanın yanı sıra B-ALL'nin bu alt tipler içerisinde hangi gruba dâhil olduğunu da ortaya koyabilmektedir.

Pro-B-ALL: B hücre soyunun en erken faz belirteçleri CD19, CD22 (membran ve sitoplazmada) ve CD79a'dır. Bu üç belirteçten herhangi ikisinin pozitif olması, pro-B-ALL'yi tanımlar¹⁰³.

c-(B)-ALL: Pro-B aşamasından sonra erken dönemdeki B hücreleri, hücre yüzeyinde CD10, CD19, CD34, insan lökosit antijeni (human leukocyte antigen - HLA)-DR ve TdT moleküllerini betimler. CD10 pozitifliğinin olduğu bu evre c-(B)-ALL evresidir⁷¹.

Pre-B-ALL: Kemik iliğinde B öncül hücreleri olgunlaşmaya devam ettikçe kademeli olarak CD20 betimlenirken, CD10 ifadelerini de kademeli şekilde kaybederler. CD10 pozitifliği olsa dahi, ek olarak sitoplazmik μ ağır zincirinin bulunması pre-B-ALL grubunu tanımlar⁷¹.

Olgun-B-ALL: Hücre yüzeyinde IgM molekülünün belirmesiyle birlikte CD34 ve TdT'nin kaybolması, olgun bir B hücresini tanımlamaktadır. Bu evrede CD10 ifadesi görülmez¹⁰⁴. B-ALL alt tiplerinin immünofenotipik özellikleri Şekil 2.5'te görülmektedir.



Şekil 2-5: B-ALL alt tiplerinin immünofenotipik özellikleri

Akan hücre ölçeği ile ALL şüphesi bulunan hastanın kemik iliği örneğinde yapılan immünofenotipleme, B- ve T-ALL tanısı ve alt tiplerini tespit etmenin yanı sıra, tedavinin belirli dönemlerinde yapılacak olan MRD değerlendirmesi için yol göstermesi açısından da büyük önem taşımaktadır. MRD'nin hastalık prognozunu belirlemedeki önemi göz önünde bulundurulduğunda, akan hücre ölçeği çalışmasının ALL tanı ve takibindeki işlevselliği de daha iyi anlaşılabilmektedir.

2.4. Minimal Kalıntı Hastalık

MRD, tedavi sırasında veya tedavi sonrası ALL hastalarının kemik iliğinde ve daha nadir olarak periferik kan dolaşımında lösemi hücrelerinin var olması durumudur. MRD hücreleri, ALL'yi başlatan hücrelerin kalıntıları olabileceği gibi, ikincil olarak gelişmiş ALL'yi de ifade edebilmektedir¹⁰⁵.

MRD takibinin birincil amacı, lösemi blast hücrelerinin temizlenme seviyesine göre nüks açısından riski belirlemek ve tedaviye yanıtı değerlendirmektir. Ayrıca MRD seviyelerine göre, uygulanan kemoterapinin yoğunluğu ve süresi değiştirilebilmekte ve kök hücre nakli gibi ilave tedavi seçenekleri değerlendirilebilmektedir¹⁰⁵.

ALL'de uzun süreli sağkalımın bir ön koşulu olan morfolojik remisyondan söz edebilmek için kemik iliği blast oranı % 5'ten düşük olmalıdır. Uygulanan tedavi protokolleri ile hastaların büyük çoğunluğunda morfolojik remisyon görülmekle birlikte, bu hastaların bir kısmında nüks meydana gelebilmekte ve bu tablo ölümle sonuçlanabilmektedir¹⁰⁶. Morfolojik değerlendirme, sayıları 10^{10} kadar olabilen toplam blast sayısının kalan miktarını ve nüks riskini belirlemede yeterli olmamaktadır¹⁰⁷. Bu

noktada ALL tedavisi süresince belirli zamanlarda yapılan MRD tespiti ve takibi, hastalığın prognozunun belirlenmesinde büyük öneme sahiptir¹⁰⁸.

MRD tayininde kullanılan yöntemler DNA, RNA veya hücre yüzey belirteçleri gibi blast popülasyonuna spesifik bir hedefi tespit etmeye yönelik metotlardır. Bu metotlar arasında akan hücre ölçer ile immünofenotipleme ve kantitatif (quantitative - q)-PCR en sık kullanılan yöntemlerdir. Morfolojik değerlendirmeye göre daha hassas ve kantitatif olan bu ölçümlerle, 1 milyon hücrelik bir popülasyonun içerisindeki bir blastı algılama hassasiyetine sahip MRD değerlendirmesi yapılarak mevcut tümör yükünün seviyesi ayırt edilebilmektedir¹⁰⁹.

Çok renkli akan hücre ölçerde genellikle 4-12 renkli boyamayla yapılan immünofenotipleme, tedavi sırasında arta kalan lösemi hücrelerini tanımlamak suretiyle MRD seviyelerini değerlendirme olanağı tanımaktadır. Belirli dönemlerde yapılan immünofenotipik MRD değerlendirmesi ile, lösemi blast fenotipine uygun hücre oranlarına bağlı olarak hastalığın nüks etme riski hesaplanabilmektedir¹¹⁰. Risk değerlendirmesi sonucu riski yüksek bulunan hastalarda tedavinin güçlendirilmesiyle sağkalım oranının arttığı bilinmektedir¹¹¹.

MRD'nin eşik düzeyi, bir numunedeki tüm kemik iliği mononükleer hücrelerinin % 0,01'i (10^{-4}), yani 10.000 hücrede 1 MRD hücresidir ve bu sınır prognostik değer taşımaktadır. Associazione Italiana Ematologia Oncologia Pediatrica (AIEOP)-Berlin-Frankfurt-Münster (BFM) 2009 protokolüne göre, kemoterapinin 15. ve 33. gün gibi kritik zaman noktalarında alınan kemik iliği örneğindeki MRD seviyelerinin % 0,01'den yüksek olması, düşük olduğu duruma göre nüks riskinin önemli derecede daha yüksek olacağını ifade etmektedir¹¹². Ayrıca, MRD değeri kemoterapinin indüksiyon fazının bitiminde ne kadar yüksek ise nüks riski de o kadar yükselmekte ve sağkalım oranı düşmektedir¹¹³.

MRD değerlendirmesine göre risk sınıflaması yapılmakta olup, bu sınıflandırmanın amacı, remisyon sonrası hastalar için en uygun tedavi şeklini belirlemektir. Çocuk hastalarda belirli zamanlarda yapılan MRD değerlendirmesi, hastalık seyrini tahmin etmede olumlu sonuçlar vermekte ve ilk remisyon döneminde kemoterapi dozunun ayarlanması veya allojenik kök hücre nakli yapılması gibi remisyon sonrası tedavilerin belirlenmesi için kılavuz olarak kullanılmaktadır¹¹⁴.

2.4.1. MRD'ye Dayalı Risk Hesaplaması

MRD tayininde en sık kullanılan metotlar, Ph-negatif B-ALL veya T-ALL'de lösemi immünofenotipini belirlemek için multiparametrelili akan hücre ölçer ve Ig veya T hücre reseptör genlerinin q-PCR ile ölçümüdür. Ph-pozitif olan B-ALL hastaları içinse MRD değerlendirmesinde BCR-ABL1 geninin PCR ile izlenmesi tercih edilmektedir¹⁰⁹. Akan hücre ölçer ile MRD tayini, PCR tabanlı yöntemle göre önemli derecede daha ucuz, kolay ve hızlı bir yöntemdir.

MRD değerlendirmesinin optimal duyarlılıkta olabilmesi için, hastaların periferik kan yerine kemik iliği örnekleri üzerinde yapılması gerekmektedir. Bunun nedeni, özellikle B-ALL'de kandaki MRD düzeylerinin kemik iliğine göre daha düşük olmasıdır. Kemik iliği örneğinde akan hücre ölçer ile yapılan değerlendirmede, blast fenotipinin hastanın tedaviye başlanmadan önce tanı anındaki immünofenotipi ile örtüşmesi MRD değerlendirmesi açısından yol göstericidir¹¹⁵.

AIEOP-BFM çalışma grubunun yaptığı geniş kapsamlı ve çok merkezli çalışma sonucunda, MRD değerlendirmesine göre ALL hastalarının prognostik açıdan 3 risk grubuna ayrılması kabul edilmiştir¹¹⁶. Bu gruplar düşük risk (flow low risk – FLR), orta risk (flow medium risk) ve yüksek risk (flow high risk) olup, MRD oranlarına göre sınıflandırma kriterleri Tablo 2.3'te gösterilmiştir:

Tablo 2-3: AIEOP-BFM ALL 2009 protokolünün akan hücre ölçer tabanlı MRD hesaplamasına göre ALL risk sınıflandırması

Risk Grupları	Düşük Risk (FLR)	Orta Risk (FMR)	Yüksek Risk (FHR)
15. gün % MRD	< % 0,1	% 0,1 - 10	> % 10
33. gün % MRD	Negatif	Negatif/Pozitif	Pozitif

Risk hesaplamasına göre yapılan bu gruplama, uygulanacak tedavinin de dozunu belirlemekte ve düşük riskten yüksek riske doğru, tedavinin dozu az veya daha çok artırılmaktadır¹¹⁷. Bu nedenle MRD değerlendirmesi, nüks açısından tek veya en önemli risk belirteci olduğundan, prognozla çok yüksek ilişkiye sahiptir¹¹⁸. MRD hastalığın kendisini temsil etmekte olup, hastalığın kemoterapiye erken duyarlılığını yansıtmaktadır. Her ne kadar bazı MRD negatif vakalarda nüks meydana gelebilse de,

allojenik kök hücre nakli veya diğer hedefe yönelik tedavi seçenekleri konusunda karar vermek için MRD değerlendirmesi prognostik bilgi sunmaktadır¹¹⁹.

2.5. B-ALL’de Tedavi Yaklaşımları

2.5.1. Klasik Tedavi

ALL için temel tedavi yöntemi kemoterapi olup, bu uygulamayla kemik iliği ve periferik dolaşımdaki lösemi hücrelerini yok etmek hedeflenmektedir. Tanı sırasında MSS tutulumu olduğu tespit edilen vakalarda, kemoterapiye ek olarak radyoterapi de uygulanmaktadır. ALL’de ilk etapta uygulanan kemoterapi yaklaşık 2-3 yıl sürmekte olup; remisyon indüksiyonu, konsolidasyon, intensifikasyon/reindüksiyon ve idame tedavisi olmak üzere 4 aşamadan oluşmaktadır¹²⁰.

Tedavinin ilk aşamasını oluşturan ve 4-6 hafta süren remisyon indüksiyonunun amacı, kemik iliğinde bulunan blast oranının % 5’in altına düşürülerek hastalığın hızla tam remisyon fazına girmesinin sağlanmasıdır. Bu amaçla kullanılan ilaçlar; prednizolon veya deksametazon gibi steroidler, L-asparaginaz, vinkristin ve antrasiklinlerdir¹²¹. Steroidler sitokin üretiminin inhibisyonu, onkogen ekspresyonunun değişmesi, hücre döngüsünün inhibisyonu ve hücrenin apoptozunun sağlanması gibi etkilere sahiptir¹²².

Remisyon sağlandıktan sonra uygulanan tedaviler, hücre büyümesini durdurmaya yönelik sitostatik uygulamalardır. Sitostatik ajanların ana prensibi, hücre döngüsünü bozarak hücre ölümüne neden olmak veya hücrenin büyüme ve bölünmesini engellemektir. Bu ilaçlar arasındaki metotreksat, vinkristin, siklofosfamid, sitarabin ve 6-merkaptopurin en sık kullanılanlardır¹²³.

İndüksiyon tedavisinden sonraki konsolidasyon tedavisi, ilk tedaviden sonra hâlen varlığını sürdüren lösemi hücrelerini ortadan kaldırmayı hedeflemektedir. Bu fazda sitostatik ajanlar metotreksat ile kombine şekilde kullanılmaktadır. Metotreksatın artan dozlarda kullanımı, MSS tutulumunu da içeren nüksleri engellemede ve böylece kraniyal ışın tedavisi gerekliliğini sınırlama veya önlemede kritik öneme sahiptir¹²⁴.

Bir sonraki aşama olan intensifikasyon/reindüksiyon fazında, ilk aşamada uygulanan indüksiyon ajanları ile steroidler, siklofosfamid, 6-merkaptopurin ve sitarabin kombine tedavisi hastalara uygulanmaktadır¹²⁵. İndüksiyon ve reindüksiyon fazlarında uygulanan L-asparaginaz, ALL tedavisine alınan olumlu yanıtta kritik öneme

sahip olmakla birlikte, alerjik reaksiyon, hiperglisemi, pankreatit ve pıhtılaşma bozukluğu gibi şiddetli yan etkilere neden olarak hayati tehlikeye neden olabilmektedir. İlâveten, L-asparaginaza karşı gelişen nötralizan antikorlar ilacın aktivitesini azaltırken, nüks riskini de arttırabilmektedir¹²⁶.

İlk tam remisyonda yüksek riskli olan, ilaca dirençli veya hastalığın nüks ettiği hastalar için hematopoetik kök hücre nakli oldukça etkili bir tedavi seçeneğidir¹²⁷. Transplantasyonda gerçekleşen son gelişmeler sayesinde morbidite ve mortalite azalmıştır. Bununla birlikte, nakilden önce çoğunlukla tüm vücuda uygulanan ışın tedavisi neticesinde infertilite, büyüme geriliği, metabolik hastalıklar ve sekonder maligniteler gibi hastaların erişkin dönemini etkileyen çok büyük komplikasyonların meydana gelmesi, tedavinin olumsuz sonuçlarıdır¹²⁸.

Tedavinin son aşaması idame tedavisi olup, protokole bağlı olarak ortalama 2 yıl sürmektedir. Bu aşamada metotreksat ve 6-merkaptopurine ilâveten bazı vakalarda vinkristin ve steroid tedavisi uygulanmaktadır¹²⁹. İdame tedavisinin meydana getirdiği bazı problemler bulunmaktadır. Enfeksiyondan kaynaklanan ölümlerin % 20'sinin idame tedavisi sırasında meydana geldiğine ve daha uzun süreli uygulanan idame tedavisinin sekonder malignite riskini arttırdığına dair bulgular mevcuttur¹³⁰.

Günümüzde, uygulanan bu tedavi metotlarıyla özellikle gelişmiş ülkelerdeki pediatrik ALL hastalarının sağkalım oranı % 90'ların üzerine çıkmıştır¹¹; ancak hâlen tedaviye rağmen hastalığın nüks ettiği ve/veya ölümlerle sonuçlandığı durumlar azımsanmayacak düzeydedir. İlâveten, hem kemoterapötik ajanların hem de ışın tedavisinin genotoksik potansiyele sahip olduğu ve ikincil olarak gelişen malignitelere neden olabildiği görülmektedir¹³¹. Tedaviyle ALL açısından tam iyileşme görülen hastalarda dahi, kronik sağlık sorunları ve nöro-davranışsal bozukluklar gibi uzun vadeli problemler görülmektedir¹³². Sağkalım oranını yükseltmek amacıyla tedavinin dozunun arttırılması bu nedenle mümkün olmadığı gibi, hastaların yaşam kalitesini yükseltmek ve tedaviye bağlı yaşadıkları ek sağlık sorunlarını ortadan kaldırmak için farklı tedavi stratejileri üzerinde çalışılmaktadır.

Bir sonraki bölümde, klasik tedavi protokollerine alternatif olarak uygulanan veya üzerinde çalışılmakta olan tedavi metotları B-ALL tedavisi özelinde ele alınmıştır.

2.5.2. B-ALL Tedavisinde İmmünoterapi Uygulamaları

B-ALL tedavisinde uygulanan klasik tedavi yaklaşımıyla olumlu sonuç alınamayan ve kemoterapi ilaçlarına karşı direnç gösteren yüksek riskli olgular ve/veya nüks olgularında sağkalım oranını arttırmak ve tedavinin toksik yan etkilerinin doğurduğu, kimi zaman geri dönüşümsüz olabilen yan etkilerin ortadan kaldırılması amacıyla farklı tedavi yaklaşımlarına ihtiyaç bulunmaktadır. Bu yaklaşımlar arasında immünoterapi, özellikle uygun hedef antijenlere sahip olan pediatrik B-ALL vakaları için büyük ilgi görmektedir. B-ALL tedavisine yönelik immünoterapötik yaklaşımlar monoklonal antikorlar ve kimerik antijen reseptör (chimeric antigen receptor - CAR)- hücre uygulamaları olup, bu amaçla geliştirilmiş immünoterapi ilaçlarından bazıları aşağıda verilmiştir.

2.5.2.1. Monoklonal Antikorlar

B-ALL tedavisi için üzerinde çalışılan immünoterapi metotlarının başında belirli antijenlere yönelik monoklonal antikorlarla tedavi gelmektedir. Tedavi amacıyla geliştirilen bu antikorların çoğu, B-ALL blastlarında yüksek düzeyde betimlenen CD19, CD20 ve CD22 moleküllerini hedef almaktadır. B-ALL vakalarının % 30-50'sinde CD20 antijeni betimlenirken, % 90'ından fazlasında CD19 ve CD22 betimlenmesi mevcuttur¹³³. Günümüzde kullanılan veya üzerinde çalışılan CD19, CD20 ve CD22 moleküllerine yönelik geliştirilmiş monoklonal antikorlar Tablo 2.4'te gösterilmiştir.

Bu ilaçlar arasında ilk geliştirileni bir anti-CD20 monoklonal antikoru olan Rituximab'dır¹³³. CD20⁺ B-ALL hastalarında klasik tedavi protokolüne ek olarak Rituximab uygulanmaktadır. İkinci nesil bir anti-CD20 antikoru olan Ofatumumab, Rituximab'dan daha güçlü hücresel sitotoksikite yanıtları sağlamaktadır¹³⁴. Bununla birlikte, uzun vadede daha iyi sonuçlar sağlayıp sağlamayacağı netlik kazanmamıştır.

Epratuzumab ise CD22 molekülünü hedef alan bir ilaç olup, pediatrik hastalarda etkinliği henüz netleşmemiştir¹³³. B-ALL tedavisi için en umut verici immünoterapi ilaçları ise CD22'ye yönelik bir antikor-ilâç konjugatı olan Inotuzumab Ozogamicin ve CD19'u hedefleyen bispesifik bir ilaç olan Blinatumomab'dır. Inotuzumab Ozogamicin CD22'ye bağlanarak, DNA için sitotoksik etkiye sahip kalikeamisin hücre içine girmesini sağlamaktadır¹³⁵.

Tablo 2-4: B-ALL tedavisi için CD19, CD20 ve CD22'yi hedef alan, kullanımdaki veya üzerinde çalışılmakta olan monoklonal antikorlar¹³⁶.

Monoklonal antikor tipi	Hedef molekül		
	CD20	CD19	CD22
<i>Yalın</i>	Rituximab Ofatumumab		Epratuzumab
<i>Konjuge</i>		ADCT-402 (loncastuximab tesirine) SGN-CD19A (denintuzumab mafodotin) SAR3419 (coltuximab ravtansine)	Inotuzumab ozogamicin Moxetumomab pasudotox ADCT-602 (hLL2-Cys-PBD) 90Y-DOTA-Epratuzumab
<i>Bispesifik</i>		Blinatumomab (anti-CD3+CD19)	

CD19 molekülünü hedefleyen bir konjuge ilaç olan Loncastuximab Tesirine, deneysel çalışmalarda CD19⁺ B hücre malignitelerine karşı güçlü bir etki ortaya koymuştur, ancak ilacın etkinliği için ileri değerlendirmelere ihtiyaç duyulmaktadır¹³⁷. Bispesifik bir antikor bazlı ilaç olarak tasarlanmış Blinatumomab ise, hem T hücreleri üzerindeki CD3'ü hem de B hücreleri üzerindeki CD19'u bağlayan değişken bölgeler içermektedir. Bağlanma sonucu CD8⁺ sitotoksik T hücre proliferasyonunu sağlayan Blinutumomab'ın çalışma prensibi, hastanın CD19 betimleyen tümör hücreleri ile T hücrelerinin ilişkisini arttırarak B hücre malignitelerini tedavi etmeye dayanmaktadır¹³⁸.

2.5.2.2. CAR-T Hücre Tedavisi

CAR-T hücreleri bir adoptif immünoterapi şeklidir ve lösemiye karşı immün yanıt oluşturmak için genetik olarak modifiye edilmiş efektör hücrelerin hastaya nakledilmesine dayanmaktadır. CAR-T hücreleri, hastadan alınan T hücrelerinin, hedeflenen hücre üzerindeki antijene spesifik bir monoklonal antikor tanıma bölgesi içerecek şekilde yeniden yapılandırılmasıyla elde edilmektedir. Kültür ortamında yeniden yapılanma ve *ex vivo* çoğaltım sonrası, hücreler yeniden infüzyona hazır hâle getirilmekte ve uygulanmadan önce hastalara kemoterapi uygulanarak lenfodepleksiyon oluşturulmaktadır¹³⁹.

Uygulanan CAR-T hücreler, MSS de dâhil olmak üzere tüm vücuda dağılmaktadır¹⁴⁰. Vücuda alınan CAR-T hücreleri hedef hücreye antijen-antikor ilişkisi ile bağlanarak, aldığı sinyallerle hedef hücreyi öldürmek için sitotoksik işlevini devreye sokmaktadır¹⁴¹. CAR-T hücreleri nakilden sonra kalıcı olma potansiyeline sahip olup, hastalığı uzun süreli kontrol altında tutma imkânı ortaya koymaktadır¹⁴².

CAR-T hücrelerinin B hücreli lenfomalar ve ALL gibi bazı hematolojik kanser hastalarında klinik fayda sağladığı gösterilmiştir. CD19 molekülünü hedefleyen bir CAR-T hücre ürünü olan Tisagenlecleucel, B-ALL için FDA tarafından 2017 yılında onaylanan ilk CAR-T hücre tedavisi ilacıdır. Çocuklarda ve genç erişkinlerdeki yüksek etkinliği sayesinde bu yaş grubundaki dirençli/nüks B-ALL tedavisi için onay almıştır¹⁴³. CAR-T hücre tedavisinde hedeflenen başlıca antijen CD19 olmakla birlikte, CD22'ye yönelik CAR-T hücreleri de geliştirilmiştir¹⁴⁴.

Tüm avantajlarına rağmen, CAR-T hücre tedavisinin bazı yan etkileri bulunmaktadır. Her ne kadar aktivitesini kendi kendine sınırlasa da, CAR-T'lerden kaynaklanan ciddi ve yaşamı tehdit eden toksisiteler bildirilmiştir. Bunlar arasında en yaygın ve en şiddetli olanı, sitokin salınım sendromudur. Bu komplikasyonun görülmeyeceği hastaların tedaviye yanıtı da düşük olduğundan, sendrom gelişiminin hastalık yanıtı ile ilişkili olduğu düşünülmektedir¹⁴⁵.

En yaygın ikinci toksisite, immün efektör hücre ilişkili nörotoksisite sendromudur ve en sık olarak ensefalopati ile karakterize olup, başka nörolojik komplikasyonlar da ortaya çıkabilmektedir. Bununla birlikte, steroidler ve destekleyici bakım ile çoğunlukla nörolojik sekel kalmadan hastalar iyileşmektedir¹⁴⁶. Son olarak, CAR-T hücre tedavisi uygulanan B-ALL hastalarında meydana gelen kronik B hücre aplazisi, bir problem olarak varlığını sürdürmektedir¹⁴⁰.

CAR-T ürünlerinin çoğunda hastaların kendi T hücreleri kullanılmakla birlikte, otolog CAR-T tedavisi iki büyük zorluğu beraberinde getirmektedir. Bunlardan biri, CAR-T hücrelerinin terapötik dozunu oluşturmak için önemli bir süre gerekmesi ve hastalığın hızlı ilerlediği vakalarda bu durumun sınırlayıcı bir etken olmasıdır. Diğer bir problem ise, yoğun bir ilaç tedavisi görmüş ve bu nedenle çoğunlukla lenfopenik olan hastalardan CAR-T hücre üretimi için yeterli miktarda otolog T hücresinin elde edilmesinin zorluğudur¹⁴⁷. İlâveten, CAR-T hücre tedavisinin neden olduğu ensefalopati, nörotoksisite, koagülopati ve hipoksi gibi ciddi yan etkilerin de varlığı

nedeniyle alternatif tedavi yöntemleri üzerindeki arayış devam etmektedir¹⁴⁸. Bunlar arasında tedavide doğal öldürücü (natural killer – NK) hücrelerin adoptif nakli ile CAR-NK hücre terapisi de bulunmaktadır.

2.6. NK Hücrelerinin ALL ile İlişkisi

NK hücreleri, enfeksiyon ve kansere karşı ilk savunma hattını oluşturan doğal immün hücreler olup, hızlı bölünen ve anormal gelişen hücre popülasyonlarını tanıyarak yok etmede kritik rol oynamaktadır. NK hücrelerinin doğal anti-tümöral özelliklerinin yanında, hastalar üzerinde daha az toksik bir potansiyele sahip görünmelerinden ötürü, son yıllarda NK hücrelerinin tedavide kullanımı üzerinde çalışmalar artmıştır.

NK hücreleri, kemik iliğinde HSC'lerden kökenlenmekte ve periferik kan dolaşımındaki lenfositlerin ortalama % 10'unu oluşturmaktadır. Virüsle enfekte olmuş hücreler veya kanser hücrelerinin tanınarak yok edilmesinde kritik fonksiyona sahip olan NK hücrelerinin CD3 betimlemesi olmayıp, CD56 betimleme düzeylerine bağlı olarak $CD3^-CD56^{soluk}CD16^+$ ve $CD3^-CD56^{parlak}CD16^-$ hücreler olmak üzere iki alt grupta incelenebilmektedir. $CD3^-CD56^{parlak}CD16^-$ NK hücreleri farklı uyaranlara cevaben güçlü sitokin üretiminden sorumluyken, $CD3^-CD56^{soluk}CD16^+$ NK hücreleri aktivasyonu takiben hedef hücre üzerine saldıkları perforin ve granzim molekülleri aracılığıyla sitolitik etki göstermektedir¹⁷.

NK hücre aktivasyonu, hücre yüzeylerinde bulunan aktivatör ve inhibitör reseptörlerden aldıkları net sinyale bağlı olarak gerçekleşmektedir¹⁴⁹. Normal koşullarda NK hücrelerinin sağlıklı bir öz doku veya immün hücre ile karşılaşması durumunda, sahip olduğu inhibitör reseptörlerin ligandları ile etkileşimi neticesinde aktivitesi baskılanmaktadır. Virüsle enfekte bir hücre veya kanser hücresi ile karşılaşma durumunda ise aktivatör reseptörlerine bağlanan ligandlar aracılığıyla NK hücreleri aktive olmakta ve sitolitik aktivite ve/veya sitokin salımı gerçekleşmektedir¹⁵⁰. NK hücrelerinin majör doku uyumluluk kompleksi (major histocompatibility complex - MHC)-I molekülü betimlemeyen hücreleri (eritrositler hariç) inhibitör reseptörleriyle tanınması, NK hücrelerinin sitolitik fonksiyonunun önemli bir tetikleyicisidir¹⁵¹.

Tümör hücreleri ile karşılaşan NK hücreleri, içerdiği perforin ve granzim moleküllerinin degranülasyonu ile hedef hücreyi öldürürken, diğer taraftan da kandaki diğer immün hücreleri uyarmak amacıyla interferon-gama (IFN- γ) ve tümör nekroz

faktörü-alfa (TNF- α) gibi sitokinlerin salımını gerçekleştirerek immün yanıtları düzenlemektedir¹⁵². Tümör gözetimi ile ilişkili olan NK hücre reseptörleri arasında doğal öldürücü grup 2D (natural killer group 2D - NKG2D), DNAX aksesuar molekülü (DNAM)-1, programlanmış hücre ölümü proteini (programmed cell death protein - PD)-1, aktivatör ve inhibitör öldürücü hücre immünoglobulin benzeri reseptörler (killer-cell immunoglobulin-like receptor - KIR) ile NKp44, NKp30 ve NKp46 gibi doğal sitotoksikite reseptörleri bulunmakta olup, bu reseptörler NK hücrelerinin lösemi tedavisinde kullanımı için araştırmalara konu olmaktadır⁹.

NK hücrelerinin kanser hücrelerini öldürme kabiliyeti olmasına rağmen, lösemi hastalarının NK hücre fonksiyonlarında bozukluk olduğu da bilinmektedir. NK hücre fonksiyonlarındaki bu yetersizliğin, hastalığın hem şiddetiyle ilişkili olduğu hem de ilerlemesinde rol oynadığı gösterilmiştir¹⁹. Ayrıca, ALL hastalarının kemik iliğinde NK hücre varlığının, sağkalımı önemli ölçüde arttırdığı bilinmektedir²⁰. Bu nedenle, lösemi hastalarında NK hücre işlevlerindeki eksikliğin giderilmesi amacıyla adoptif NK hücrelerinin ve immün kontrol noktası inhibitörlerinin uygulanmasına dayanan NK hücre immünoterapileri, lösemi tedavisi için umut vaat etmektedir¹⁵³.

NK hücrelerinin ALL hastalarının periferik kanlarında bulunan anormal olgunlaşmamış lökositleri doğrudan öldürebildiği bilgisinden yola çıkılarak²⁰, sağlıklı bireylerden hastalara yapılacak olan NK hücre naklinin, hastalığın prognozu açısından fayda sağlayacağı düşünülmekte olup, NK hücrelerinin adoptif nakli ve CAR-NK hücre terapisi üzerine çalışmalar yapılmaktadır.

2.6.1. Adoptif NK Hücre Terapisi

Adoptif NK hücre terapisi, sağlıklı bir vericiden allojenik olarak veya hastanın kendisinden otolog olarak alınan periferik kan, kemik iliği veya kordon kanından izole edilen NK hücrelerinin, belirli işlemlerden geçirilerek hastaya verilmesi işlemidir¹⁵⁴. İzole edilen NK hücreleri genetik olarak modifiye edilebilmekte ve/veya IL-2, IL-15, IL-21 gibi sitokinlerle çoğaltılarak hastalara uygulanmaktadır¹⁵⁵. Otolog uygulama daha kullanışlı iken, allojenik uygulamada HLA uyumsuzluğu meydana gelebilmektedir¹⁵⁶.

Hematolojik malignitelerin tedavisinde adoptif NK hücre tedavisinin etkinliğini ve güvenliğini değerlendiren birçok çalışma bulunmaktadır. Klinik deneyler sonucunda NK hücrelerinin adoptif transferinin, bazı solid tümörlerin yanı sıra hematolojik kanserlerin tedavisi için de etkili olduğu gösterilmiştir¹⁵⁷. T hücre nakilleri hedef dışı

dokularda önemli hasarlara yol açan “graft versus host hastalığı”na (graft versus host disease - GvHD) neden olabilirken, NK hücrelerinin IL-10 salımı yapmak suretiyle ve konağın antijen sunan hücrelerini parçalayarak bu etkileşimi baskılayabildiği görülmüştür¹⁵⁸.

Allojenik NK hücre nakli özellikle AML tedavisi için etkinlik göstermiş olmakla birlikte, hastalığın yaygın şekilde nüks etmesi nedeniyle nakil sonrası farmakolojik tedavi gerekliliği sürmektedir¹⁵⁹. Bununla birlikte, hedef hücre dışındaki hücreler üzerine ciddi bir zararı olmadan tedavi imkânı vaat etmesi nedeniyle NK hücrelerinin immünoterapide kullanımı, üzerinde hâlen çalışılan bir konudur. Diğer taraftan, bir vericiden toplanan periferik kandan elde edilen NK hücreleri, sınırlı çoğalma kapasitesi ve fonksiyonel yeterliliğe sahiptir. Bu sınırlılıkları ortadan kaldırmak üzere ortaya çıkarılan yaklaşımlardan biri CAR-NK hücre terapisi.

2.6.2. CAR-NK Hücre Terapisi

CAR-T ve adoptif NK hücre uygulamalarındaki sınırlılıklar nedeniyle alternatif bir tedavi seçeneği olarak CAR-NK hücreleri ortaya çıkmıştır. CAR-NK hücrelerinin lösemi tedavisinde kullanımı üzerine deneysel çalışmalar hâlen devam etmekle birlikte, şimdiye kadar düşük yan etkiler ile olumlu sonuçlar elde edilmiştir¹⁶⁰.

CAR-T hücrelerine kıyasla CAR-NK hücre tedavisi; üretim süresinin daha kısa olması, GvHD riski olmadan allojenik NK'ların sınırsız miktarda uygulanabilmesi, NK hücre serileri ile kullanıma hazır ürün üretilmesi ve NK hücre doğal reseptörlerinin CAR'dan bağımsız şekilde tümör hücrelerini tanıyarak öldürmesi gibi bazı avantajlara sahiptir¹⁶¹. CAR-NK hücreleri de CAR-T hücreleri gibi, hedef hücrelerde spesifik olarak veya yüksek miktarda bulunan bir antijeni tanıyan CAR'ları betimlemeleri için NK hücrelerinin genetik olarak değiştirilmeleriyle üretilmektedir.

B-ALL için CAR-NK hücrelerinin ana hedef antijeni CD19'dur. PD-1, TIM-3 ve TIGIT gibi immün kontrol noktası molekülleri ile NKG2D, DNAM-1 ve 2B4 gibi uyarıcı moleküller de betimleyen NK hücreleri CAR-T hücrelerine benzer efektör fonksiyonlara sahip, fakat düşük toksisiteli ve kullanıma hazır bir alternatif hücre kaynak oluşturmaktadır^{162, 163}.

CAR-NK hücrelerinin geliştirilmesinde periferik kan, kordon kanı, uyarılmış pluripotent kök hücre (induced pluripotent stem cell - iPSC)-kökenli NK hücreleri ve

NK92 hücre serisi dâhil olmak üzere pek çok farklı hücresel kaynak kullanılmıştır¹⁶⁴. Herhangi bir vericiden izole edilen NK hücrelerinin çoğalma ve fonksiyonlarındaki yetersizlikten ötürü, önceleri kolayca çoğaltılıp büyük miktarlarda kullanılabilen CAR-NK92 hücreleri üretilmiştir. Bununla birlikte, NK92 hücrelerinin kanser kökenli olması ve sitogenetik anormalliklerinin bulunması nedeniyle klinik uygulama öncesi ısınlama gerektirmesi, CAR-NK92'lerin fonksiyonlarında kayba ve kısa ömürlü olmalarına neden olmaktadır¹⁶¹. Periferik kandan NK hücrelerinin elde edilmesi kolaydır, ancak transfekte edilmeleri diğerlerine göre daha zordur ve uzun süre dondurularak saklandıklarında fonksiyonel kayıplara uğramaktadır¹⁶⁵. Periferik kan kökenli NK hücrelerine kıyasla kordon kanı ve iPSC kökenli NK hücrelerinin fonksiyonel açıdan daha kullanışlı görünmektedir¹⁶⁶.

Optimal fonksiyon sergileyebilmeleri için CAR-NK hücrelerinin uygulama öncesinde IL-2 veya IL-15 gibi sitokinlerle çoğaltılıp aktive edilmesi gerekmektedir. Aksi takdirde, dinlenme durumundaki NK hücrelerinin öldürme fonksiyonlarının düşük olduğu gösterilmiştir¹⁶⁷. NK hücrelerinin aktive edilmiş veya çoğaltılmış olması, kullanılan uyarıcı sitokinlerin seçimi ve destekleyici hücrelerin tipi gibi faktörler, NK hücrelerinin fenotipik ve fonksiyonel olarak farklılık göstermelerine neden olmaktadır¹⁶⁸. Ayrıca, donma-çözülme aşamasında canlılığını ve/veya aktivitesini kaybetme ve *in vivo* ortamda kalıcılığının olmaması gibi NK hücrelerine özgü bazı zorluklar bulunmaktadır.

ALL tedavisi için CAR-NK hücre uygulaması monoklonal antikor tedavisi ile kıyaslandığında, CAR-NK hücre terapisinin daha yüksek bir sitolitik etki ortaya koyarak tümör hücrelerini daha etkin şekilde ortadan kaldırdığı görülmüştür¹⁶⁹. Diğer taraftan, NK hücrelerinin klinik uygulama yapılabilecek miktarda çoğaltılması ve hangi kaynaktan elde edileceği konusundaki çelişkiler, fonksiyonel özellikleri korunmuş NK hücre terapisinin geliştirilmesinde aşılması gereken problemlerdir.

NK hücre terapisinde hücrelerin *in vivo* ortamdaki kalıcılığı ve fonksiyonel kabiliyetlerinin düşük olmasında, NK hücrelerinin elde ediliş, üretim ve saklanma yöntemlerinin yanı sıra hastaların periferik kan dolaşımı ve tümör mikroçevresindeki immün-baskılayıcı ortamın da etkisinin olduğu şüphesizdir. Mikroçevrenin NK hücreleri üzerindeki etkisi ile ilgili bilgiler aşağıda sunulmuştur.

2.6.3. Mikroçevrenin NK Hücreleri ile İlişkisi

Normal koşullar altında vücuttaki öz hücreler tarafından ifade edilen MHC-I molekülleri, NK hücreleri için inhibitör ligand işlevi görerek NK hücre aktivasyonunu baskılamaktadır¹⁵¹. Tümör hücrelerinin NK hücreleri tarafından hedeflenerek yok edilmesi ise, tümör hücre membranında betimlenen ligandların NK hücre aktivatör reseptörlerine bağlanması veya sitotoksik T hücrelerinin hedefinden kaçmak için MHC-I betimlemesini durdurması sonucu NK hücrelerinin aktivasyon sinyali olarak harekete geçmesi ile gerçekleşmektedir¹⁷⁰.

Tümör hücre membranlarında betimlenen ligandlara ek olarak, tümör-kökenli çözünür ligandların da NKG2D ve NKp44 aracılığıyla NK hücrelerini aktive ettiği gösterilmiştir¹⁷¹. Bununla birlikte NK hücrelerinin MHC-I taşımayan veya NKG2D betimlemesi yüksek olan tümör hücrelerini öldürmede başarısız olması¹⁷², tümör mikroçevresindeki immün-baskılayıcı faktörlerin varlığını düşündürmektedir.

Normal şartlarda NK hücreleri, esas olarak kemik iliğindeki lenfoid öncül hücrelerden gelişip olgunlaşarak periferik kan ve diğer dokulara geçmektedir¹⁷³. Ancak bu sürecin tümör oluşumu durumunda bozulmasıyla kemik iliğinde NK hücre olgunlaşmasının baskılandığına dair bulgular mevcuttur^{174, 175}. Bu baskılanmaya neden olan faktörler arasında, kemik iliği mikroçevresindeki humoral bileşenlerin olduğuna dair bulgular mevcuttur. NK hücrelerinin çoğalma ve sitotoksik fonksiyonlarını baskılayan ve NKG2D ifadelerini kısıtlayan TGF- β , tümör mikroçevresinde üretilen humoral bileşenlere örnektir¹⁷⁶. Ayrıca, kemik iliği mikroçevresinde NK hücre olgunlaşması için gerekli olan tip I IFN sinyallerinin de baskılandığı görülmüştür¹⁷⁷.

Solid tümörlerin yanı sıra, lösemi mikroçevresinin de NK hücre aktivasyon ve fonksiyonlarını etkilediğine dair bulgular mevcut olup, mikroçevrenin lösemi prognozunda önemli etkileri olduğu bilinmektedir¹⁷⁸. Lösemi mikroçevresi; stromal hücreler ile lenfositler ve NK hücreleri gibi immün hücreler, hücre dışı matris ve sitokinler gibi humoral bileşenlerden meydana gelmektedir¹⁷⁹. AML'de mikroçevre içeriği tanımlanmış olup, humoral bileşenler arasında IL-1 β , TNF- α ve IL-6 gibi pro-enflamatuvar sitokinler ile IL-10, TGF- β ve IL-35 gibi inhibitör sitokinler bulunmaktadır. Bu sitokinlerin yüksek miktarda bulunmaları, regülatör T hücrelerinde artışa neden olarak T hücrelerinin lösemi blastlarına karşı toleransını arttırmakta ve sitotoksik T hücreleri ile NK hücrelerinin işlevlerini baskılamaktadır¹⁸⁰.

Diğer kanser hücreleri gibi lösemi hücreleri de immün hücrelerin fenotip ve fonksiyonlarını değiştirmek suretiyle immün-gözetimden kaçmaktadır. ALL'nin immün gözetiminde NK hücrelerinin rol oynadığına bulgular mevcut olmakla birlikte¹⁸¹, özellikle tedaviye dirençli veya nüks gelişen lösemi olgularında, immün bileşenlerin anti-lösemi fonksiyonları bozulmakta, lösemi hücrelerinin kemik iliği mikroçevresinde değişikliğe neden olması kendilerinin hayatta kalmasını ve ilaca karşı korunmalarını sağlamaktadır¹⁸².

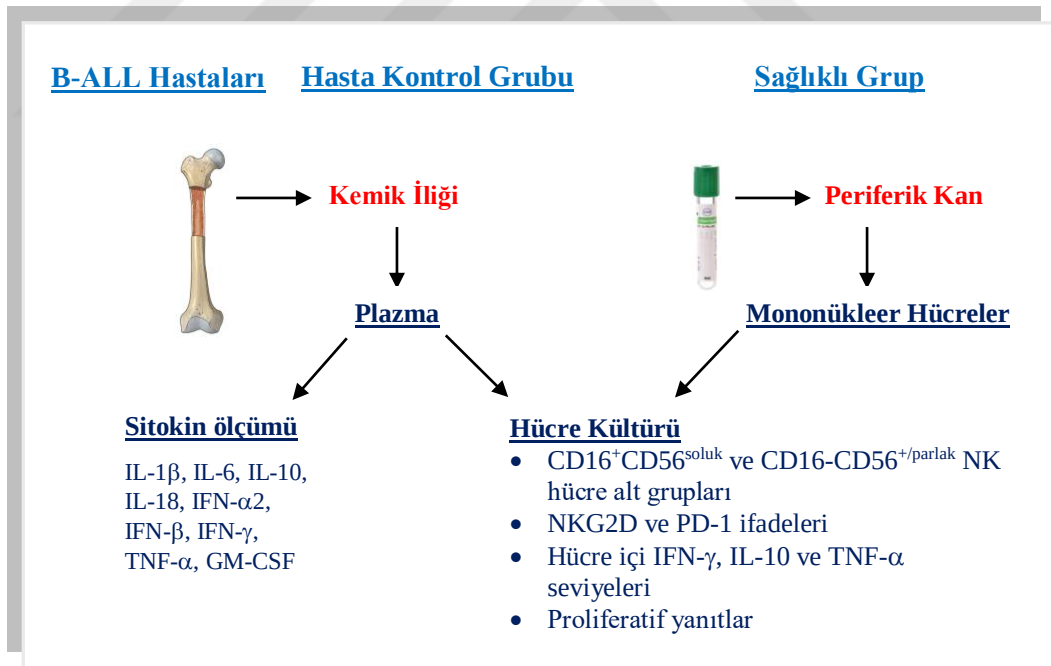
NK hücrelerinin *in vitro* koşullarda ALL blast hücrelerini öldürmede yetersiz olduğu gösterilmiş olup, ilerlemekte olan löseminin, NK hücre olgunlaşması üzerinde olumsuz etkileri olduğu düşünülmektedir. ALL'de NK hücrelerinin sayısal, fenotipik ve fonksiyonel farklılıklara sahip olduğu bilinmektedir¹⁸³. B-ALL hastalarında yapılan bir çalışmada, NK hücre fonksiyonlarının bozulmasında blast hücrelerinden salınan TGF- β 'nın rolü olduğu gösterilmiştir¹⁸⁴.

Literatürdeki çalışmalardan elde edilen tüm bulgular neticesinde, lösemi olgularında kemik iliği mikroçevresindeki değişimlerin NK hücre olgunlaşması, fenotipi ve fonksiyonlarında baskılayıcı etkiler gösterdiği ve bu durumun, NK hücrelerinin anti-lösemi fonksiyonlarını negatif yönde etkilediği sonucuna varılmaktadır. Bununla birlikte, özellikle B-ALL hastalarında lösemi mikroçevresinin NK hücre fenotipi ve işlevsel özellikleri üzerine etkileri net olarak bilinmemektedir. Bu tez çalışmasında, pediatrik B-ALL hastalarının kemik iliği mikroçevresinin, hüморal bileşenler ekseninde NK hücre fenotip ve fonksiyonları üzerine etkileri ve bu etkilerin hüморal bileşenlerden olan sitokinlerle ilişkisi incelenmiştir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışma Tasarımı ve Katılımcılar

Çalışmada, pediatrik B-ALL hastalığında kemik iliğindeki hümmoral bileşenlerin sağlıklı NK hücreleri üzerine etkilerinin incelenmesi amacıyla, hastalardan alınan kemik iliği plazma örnekleri ile immünolojik açıdan sağlıklı çocukların periferik kanlarından elde edilen mononükleer hücreler birlikte kültüre edilerek, kültür sonrası immün yanıtlar değerlendirilmiştir. Bu amaçla, yeni tanı almış ve tedavisine henüz başlanmamış pediatrik B-ALL hastaları (n=22, 13 erkek - 9 kız) ile herhangi bir sağlık problemi ve ilaç kullanımı olmayan, puberte öncesi çocuklar (n=10, 6 erkek - 4 kız) ele alınmıştır. ALL şüphesi ile laboratuvarımıza gönderilen ve ALL veya AML yönünden patoloji saptanmayan pediatrik hastalar (n=19, 11 erkek - 8 kız), hasta kontrol grubu olarak çalışmaya dâhil edilmiştir. Çalışmanın deneysel tasarımı özet olarak Şekil 3.1’de gösterilmiştir.



Şekil 3-1: Çalışmanın deneysel tasarımı

Her iki hasta grubuna ait kemik iliği örnekleri İstanbul Prof. Dr. Cemil Taşçıoğlu Şehir Hastanesi, Başakşehir Çam ve Sakura Şehir Hastanesi ve İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Hastanesi Çocuk Hematoloji ve Onkoloji polikliniklerine başvuran hastalardan, hücre kültürü çalışmalarında kullanılan sağlıklı

periferik kan örnekleri ise İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı'nda kontrol amaçlı muayene edilen çocuklardan temin edilmiştir. Tüm katılımcıların velileri tarafından Bilgilendirilmiş Gönüllü Onam Formu imzalanmış olup, çalışmanın etik kurul onayı İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan alınmıştır.

3.2. Kemik İliği İmmüfenotiplemesi

Hasta gruplarına ait kemik iliği örneklerinin, EDTA'lı tüp içerisinde ve oda sıcaklığında İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü İmmünoloji Anabilim Dalı laboratuvarına ulaştırılmasının ardından akan hücre ölçer ile immüfenotipleme gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, laboratuvarımızda rutin olarak uygulanmakta olan ALL tanı ve B-ALL tiplendirmesine yönelik paneller kullanılmıştır. Panellerde kullanılan floresan boya ile işaretli monoklonal antikorlar Tablo 3.1'de gösterilmiştir.

Tablo 3-1: Akan hücre ölçer ile kemik iliği immüfenotiplemesinde kullanılan monoklonal antikorlar

	Monoklonal antikor (anti-human)	Klon	Floresan Boya	Marka
Tanı Paneli	CD7	M-T701	PE	BD Pharmingen
	CD10	HI10a	PE/Cy7	BD
	CD19	SJ25C1	APC	BD
	CD33	WM53	BV421	BD Horizon
	CD34	8G12	FITC	BD
	CD45	HI30	BV510	BD Horizon
B-ALL Paneli	CD10	HI10a	PE/Cy7	BD
	CD11a	HI111	BV650	BD Horizon
	CD19	SJ25C1	APC	BD
	CD20	L27	APC/Cy7	BD
	CD34	8G12	PE	BD
	CD38	HIT2	AlexaFluor 700	BD Pharmingen
	CD45	HI30	BV510	BD Horizon
	CD58	1C3	FITC	BD Pharmingen

Boyamadan önce kemik iliği örneklerinde otomatik kan sayım cihazı (Rayto, RT-7600) ile kan sayımı gerçekleştirilmiştir. Tanı ve tiplendirme panelleri için iki ayrı tüp içerisine monoklonal antikorlar pipetlendikten sonra, üzerine en az 2×10^6 beyaz kan hücresi (white blood cell - WBC) içeren hacimde kemik iliği örneği eklenmiştir. Vorteksle karıştırılan örneklerin karanlıkta ve oda sıcaklığında 20 dakika inkübasyonunun ardından eritrositleri patlatmak için tüplere FACS Lysing solüsyonu (BD Biosciences, San Jose, ABD) eklenerek karıştırılmış, 15 dakika karanlıkta ve oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Yıkama için Fosfat Tamponlu Salin (Phosphate Buffered Saline - PBS) eklenen tüpler 1600 rpm'de 10 dakika 2 kez santrifüj edilmiş, üst sıvılar uzaklaştırıldıktan sonra boyalı hücreler 300 µl PBS ile resüspanse edilmiştir. Hücrelerin akan hücre ölçer ile değerlendirilmesinden hemen önce, B-ALL tiplendirmesi için hazırlanan tüp içerisine, çekirdekli hücreleri işaretlemek amacıyla floresan bir boya olan Syto 41 (ThermoFisher Scientific, ABD) eklenmiş ve örnekler NovoCyte (ACEA Biosciences, ABD) akan hücre ölçer cihazında NovoExpress yazılımı ile değerlendirilmiştir.

3.3. Kemik İliği Plazma Örneklerinin Ayrıştırılması

B-ALL ve hasta kontrol gruplarına ait kemik iliği plazmalarının elde edilmesi için ilk olarak kemik iliği örnekleri 3000 rpm devirde 5 dakika santrifüj edilerek hücreler çöktürülmüştür. Pellet üzerinde bulunan plazma örnekleri ayrı tüpler içerisine toplanarak 3500 rpm devirde 10 dakika 2 kez santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası toplanan plazma örnekleri Eppendorf tüpler içerisinde kullanılıncaya kadar -20°C 'de dondurularak saklanmıştır. Plazma örneklerinin ayrıştırılma aşamasında tüm işlemler steril koşullarda gerçekleştirilmiştir.

3.4. Sağlıklı Periferik Kan İmmünofenotiplemesi

Hücre kültürü deneylerinde kullanılan sağlıklı mononükleer hücrelerin elde edilmesi için, puberte öncesi sağlıklı çocuklardan periferik kan örnekleri alınmıştır. Mononükleer hücre izolasyonundan önce, oda sıcaklığında ve heparinli tüp içerisinde laboratuvarımıza ulaştırılan periferik kan örneklerinde (9 ml) hücre sayımı yapılarak, akan hücre ölçer immünofenotiplemesi ile tam kandaki T, B, NK ve NKT hücre seviyeleri tespit edilmiştir. İmmünofenotipleme için BD Multitest (BD Biosciences, San Jose, ABD) 4 renkli monoklonal antikor kokteylleri kullanılmış olup, içerikteki her bir antikorun klonu ve işaretli olduğu floresan boyalar Tablo 3.2'de gösterilmiştir.

Tablo 3-2: Periferik kan immünofenotiplenmesinde kullanılan monoklonal antikorlar

	Monoklonal antikor (anti-human)	Klon	Floresan Boya	Marka
T Hücre Kokteyli	CD3	SK7	FITC	BD Multitest / BD Biosciences
	CD4	SK3	APC	
	CD8	SK1	PE	
	CD45	2D1	PerCP	
B / NK Hücre Kokteyli	CD3	SK7	FITC	BD Multitest / BD Biosciences
	CD16/CD56	B73.1/NCAM 16.1	PE	
	CD19	SJ25C1	APC	
	CD45	2D1	PerCP	

Tam kan örneklerinde immünofenotiplenme için, iki ayrı tüp içerisine 4 renkli monoklonal antikor karışımları ve üzerine en az 1×10^6 hücre içeren hacimde periferik kan örneği eklenerek karıştırılmış ve 20 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası eritrositleri patlatmak için tüplere FACS Lysing solüsyonu eklenmiş ve vorteks ile karıştırılarak 15 dakika inkübe edilmiştir. Tüm inkübasyonlar karanlıkta ve oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Son aşamada, tüplerin üzeri PBS ile tamamlanmış ve 1800 rpm devirde 2 kez santrifüj edilerek yıkama yapılmıştır. Santrifüj sonrası üst sıvılar uzaklaştırılarak pellet üzerine 300 µl FACSFlow Sheat sıvısı (BD Biosciences, San Jose, ABD) eklenmiştir. Örnekler FACSCalibur (BD, San Jose, ABD) akan hücre ölçer cihazında okutularak CellQuest yazılımı ile analiz edilmiştir.

3.5. Sağlıklı Periferik Kan Mononükleer Hücre İzolasyonu

Sağlıklı periferik kan örneklerinden periferik kan mononükleer hücreler (peripheral blood mononuclear cell - PBMC) gradyan santrifüj yöntemi ile izole edilmiştir. Bu doğrultuda, heparinli tüp içerisindeki periferik kan örnekleri (9 ml) 1:1 oranında PBS ile sulandırılarak, kan ile eşit hacimdeki Lenfosit Seperasyon Medyumu (yoğunluk: 1,077 gr/ml) (Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Almanya) üzerine iki ayrı faz oluşturacak şekilde yayılmıştır. Falcon tüp içerisindeki örnekler 2000 rpm devirde 20 dakika santrifüj edildikten sonra interfaz tabakası toplanarak 15 ml'lik Falcon tüpe aktarılmış ve üzeri PBS ile tamamlanarak 2000 rpm devirde 10 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası üst sıvılar uzaklaştırılarak PBS ile 1250 rpm devirde 10 dakika ikinci kez yıkama yapılmıştır. Üst sıvılar uzaklaştırıldıktan sonra

hücreler fetal sığır serumu (fetal bovine serum - FBS) içermeyen, 1 ml zenginleştirilmiş RPMI-1640 medyumunda (Gibco, Paisley, İngiltere) resüspanse edilmiş ve hücre sayımı yapılmıştır. RPMI-1640 zenginleştirilmesinde % 1 antibiyotik karışımı (penisilin-streptomisin), % 1 L-glutamin, esansiyel olmayan amino asitler, sodyum pirüvat ve minimum esansiyel medyum (MEM) vitaminleri kullanılmıştır. Tüm aşamalar steril ortam ve ekipman kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.5.1. RPMI-1640 Kültür Medyumunun Hazırlanması

Kültür deneylerinde hücreler için besi yeri olarak kullanılan RPMI-1640 medyumunun hazırlanmasında aşağıdaki malzemeler belirtilen oranlarda kullanılmıştır:

500 ml RPMI-1640 içerisine;

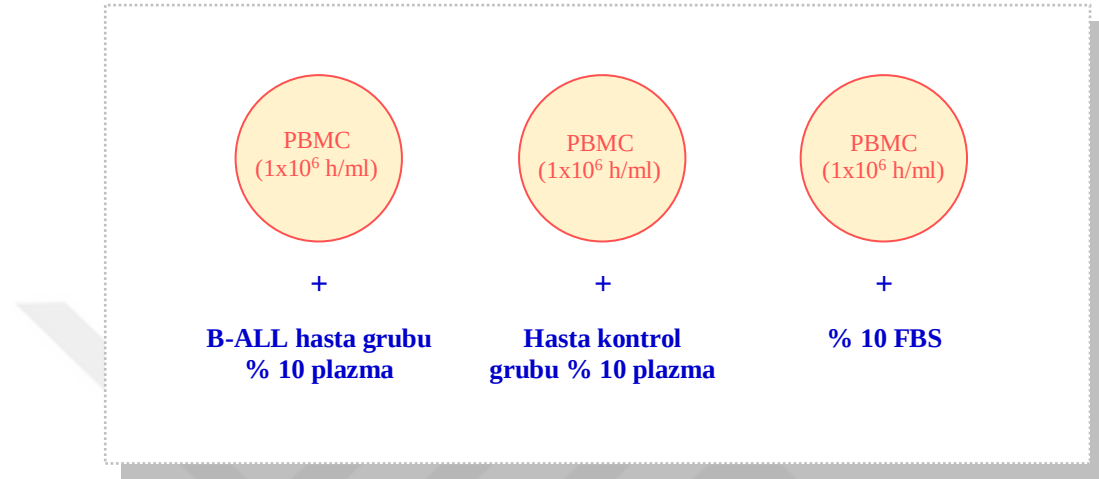
- % 1 Penisilin / Streptomisin
- % 1 Kanamisin
- % 1 MEM vitaminler
- % 1 L Glutamin

Standart in vitro deneylerde kullanılan RPMI-1640 medyumuna içerisine % 10 (50 ml) FBS eklenmekle birlikte, bu tez çalışmasına özel olarak FBS eklenmemiş olup, gereken durumlarda dışarıdan %10 oranında kültür ortamına ilâve edilmiştir.

3.6. Kemik İliği Plazma Örneklerinin Sağlıklı PBMC'ler ile Kültürü

B-ALL ve hasta kontrol grubuna ait kemik iliği plazma içeriğinin sağlıklı NK hücreleri üzerine etkilerini saptamak amacıyla, hastalardan alınıp dondurulan plazma örnekleri ile sağlıklı periferik kan örneklerinden elde edilen mononükleer hücreler birlikte kültüre edilmiştir. Bu amaçla plazma örnekleri +4°C'de çözündürülmüş ve herhangi bir hücresel kalıntı içermemeleri için 0,22 µm steril enjektör filtresi kullanılarak filtre edilmiştir. Sağlıklı PBMC'ler FBS içermeyen RPMI-1640 medyumuna içerisinde 1×10^6 hücre/ml konsantrasyonda olacak şekilde kültür plaklarına ekilmiş ve üzerine toplam hacmin % 10'u olacak hacimde B-ALL ve hasta kontrol grubu plazma örnekleri eklenmiştir. Ayrıca, standart hücre kültürü ortamı ile karşılaştırmak amacıyla diğer bir koşul olarak plazma ilavesi olmaksızın hücrelerin üzerine % 10 FBS eklenmek suretiyle toplam 3 kuyucuk oluşturularak hücre kültürü yapılmıştır.

Tüm kültür deneyleri steril koşullar altında gerçekleştirilmiş olup, plazma örneklerinin sağlıklı NK hücre alt grupları, immünofenotipleri ve fonksiyonları üzerine etkisini incelemek için 24 ve 72 saat süreyle iki farklı kültür düzeneği oluşturulmuştur. Kültür deneylerinde uygulanan plak tasarımı Şekil 3.2’de gösterilmiştir.



Şekil 3-2: Hücre kültürü deneylerinde plak tasarımı

3.6.1. NK Hücre Alt Gruplarında Hücre İçi Sitokin Tayini

RPMI-1640 medyumunda içerisinde resüspanse edilmiş sağlıklı PBMC’ler (1x10⁶ hücre) 24 kuyucuklu kültür plaklarında ekildikten sonra, üzerine toplam hacmin % 10’u hacimde (100 µl), B-ALL ve hasta kontrol grubuna ait filtrelenmiş kemik iliği plazmaları ve kontrol olarak % 10 FBS (100 µl) eklenmiştir. Kuyucukların üzerine toplam hacim 1 ml olacak şekilde FBS içermeyen RPMI-1640 medyumuna eklenerek toplam 3 koşul oluşturulmuştur. Her bir kuyucuğa, hücre içi sitokin üretimini uyarmak amacıyla rekombinant IL-12(p70) sitokini (15 ng/ml) (Biolegend, San Diego, ABD) eklendikten sonra pipetaj yapılarak homojen bir şekilde karışması sağlanmış ve 37°C’de % 5 CO₂ içeren etüvde 24 saat kültüre edilmiştir. Hücre kültürünün 20. saatinde kültür plaklarına Brefeldin A (2,5 mg/ml) (Biolegend, San Diego, ABD) ilâve edilerek sitokinlerin hücre içinde tutulması sağlanmıştır.

Kültür sonrası toplanan hücreler PBS ile 1800 rpm devirde 10 dakika yıkandıktan sonra üst sıvılar uzaklaştırılmış ve NK hücrelerini tespit etmek için ilk olarak hücre yüzey boyaması gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, üzerine CD3, CD16, CD56 ve PD-1 moleküllerine özgü floresan boya ile işaretli monoklonal antikorlar

eklenen hücreler 20 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyonu takiben PBS ile 1800 rpm’de 10 dakika yıkama yapılmış ve üst sıvılar uzaklaştırıldıktan sonra, hücre içi boyama aşamasına geçilmiştir. Hücre yüzey ve hücre içi boyamada kullanılan monoklonal antikorlar Tablo 3.3’te listelenmiştir.

Tablo 3-3: Kültür sonrası hücre yüzey ve hücre içi boyamada kullanılan monoklonal antikorlar

Kullanım Yeri	Monoklonal antikor (anti-human)	Klon	Floresan Boya	Marka
Hücre Yüzey	CD3	OKT3	BV785	Biolegend
	CD16	3G8	PE	Biolegend
	CD56	B159	PE/CF594	BD Biosciences
	PD-1	EH12.2H7	Alexa Fluor 700	Biolegend
Hücre İçi	IFN- γ	B27	PE/Cy7	Biolegend
	IL-10	JES3-9D7	BV421	Biolegend
	TNF- α	MAB11	APC/Cy7	Biolegend

Hücre içi sitokin seviyelerini tespit etmek amacıyla Fiksasyon/Permeabilizasyon kiti (Abcam, Cambridge, İngiltere) üretici firmanın protokolüne uygun olarak kullanılmıştır. Bu protokole göre hücrelerin üzerine öncelikle fiksasyon solüsyonu eklenerek 15 dakika inkübasyon gerçekleştirilmiş ve PBS ile 1800 rpm devirde yapılan santrifüj sonrası üst sıvılar uzaklaştırılmıştır. Ardından hücre yüzeyinde porlar açılması amacıyla permeabilizasyon solüsyonu eklenen hücrelerin üzerine, eş zamanlı olarak hücre içinde tespit edilmek istenen IFN- γ , IL-10 ve TNF- α sitokinlerine yönelik monoklonal antikorlar (Tablo 3.3) ilave edilmiş ve 15 dakika inkübe edilmiştir. Hücre yüzey ve hücre içi boyamanın tüm aşamaları karanlıkta ve oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. PBS ile 1800 rpm devirde yapılan yıkamanın ardından üst sıvılar uzaklaştırılmış ve pelletin üzerine 300 μ l PBS eklenmiştir. Örnekler Cytek Aurora (Cytek Biosciences, Kaliforniya, ABD) spektral akan hücre ölçer cihazında SpectroFlo programı ile değerlendirilmiştir.

3.6.2. NK Hücre Proliferatif Yanıtlarının Ölçülmesi

Kemik iliği hümmoral bileşenlerinin sağlıklı NK hücre proliferasyon kapasitesi üzerine etkilerini belirlemek için, floresan bir boya olan Karboksifloresin Süksinimidil

Ester (Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester - CFSE) ile boyamaya dayalı hücresel proliferasyon deneyi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla FBS içermeyen RPMI-1640 medyumunu içerisindeki PBMC süspansiyonu üzerine CellTrace CFSE Proliferasyon Kit (ThermoFisher Scientific, ABD) ile hazırlanmış 1 µl CFSE (5 mM) eklenerek +4°C'de 6 dk inkübe edilmiştir. PBS ile 1800 rpm'de yapılan yıkamanın ardından üst sıvıları uzaklaştırılan hücreler FBS içermeyen RPMI-1640 medyumunu (1 ml) ile resüspanse edilmiş ve hücre sayımı yapılmıştır.

CFSE ile boyalı PBMC'ler (5×10^5) 48'lik kültür plaklarına ekildikten sonra, toplamın % 10'u hacimde (50 µl) filtrelenmiş B-ALL ve hasta kontrol grubu plazma örnekleri ile kontrol olarak FBS (50 µl) ilavesi yapılmıştır. Her bir kuyucuğun üzeri toplam 500 µl olacak şekilde FBS içermeyen RPMI-1640 medyumunu ile tamamlanarak toplam 3 ayrı koşulda hücre kültürü gerçekleştirilmiştir. Her kuyucuğa proliferasyonu uyarmak için 5 µl/ml konsantrasyonda fitohemagglutinin (phytohaemagglutinin - PHA) (ThermoFisher Scientific, ABD) eklendikten sonra pipetaj yapılarak karıştırılmış ve % 5 CO₂ içeren 37°C etüvde 72 saat süreyle kültüre edilmiştir. Tüm aşamalar steril koşullarda gerçekleştirilmiştir.

Kültür sonrası her bir kuyucuktan alınan 300 µl hücre süspansiyonu 3 ayrı tüpe toplanmış ve üzerlerine NK hücrelerini işaretlemek amacıyla CD3, CD16 ve CD56 ile bir NK hücre aktivatör reseptörü olan NKG2D moleküllerine yönelik floresan boya ile işaretli monoklonal antikorlar eklenmiştir. Kullanılan monoklonal antikorlara ait bilgiler Tablo 3.4'te verilmiştir.

Tablo 3-4: NK hücre proliferatif yanıtlarının ölçümünde kullanılan monoklonal antikorlar

Monoklonal antikor (anti-human)	Klon	Floresan Boya	Marka
CD3	UCHT1	PE/Cy5	BD Biosciences
CD16	MAb11	PE/Cy7	Biolegend
CD56	B159	PE/CF594	BD Biosciences
NKG2D	1D11	PE	Bio-Rad

Monoklonal antikorlarla 20 dakika karanlıkta ve oda sıcaklığında inkübe edilen hücrelerin proliferatif yanıtları Cytek Aurora (Cytek Biosciences, Kaliforniya, ABD) akan hücre ölçer cihazında SpectroFlo yazılımı ile ölçülerek değerlendirilmiştir.

3.7. Kemik İliği Plazmalarında Sitokin Seviyelerinin Belirlenmesi

B-ALL hastalarının kemik iliği plazma içeriğinin sağlıklı NK hücreleri üzerine etkilerinin incelenmesini takiben, tespit edilen etkilerin kemik iliğindeki sitokin seviyeleriyle ilişkisi araştırılmıştır. Bu amaçla, çözünür molekül düzeylerini boncuk-bazlı immünolojik bir metot ile saptayan multipleks yöntemi ile kemik iliği plazma örneklerindeki IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-18, IFN- α 2, IFN- β , IFN- γ , GM-CSF ve TNF- α seviyeleri ölçülmüştür. Ölçüm için LEGENDplex kit (Biolegend, San Diego, ABD) kullanılmış olup, örneklerin boyama aşamaları kit içerisindeki protokole uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Özetle, çalışma öncesinde çözdürülen plazma örnekleri ve çalışmada kullanılacak kit içerisindeki solüsyonlar oda sıcaklığına getirilmiştir. 96 kuyucuklu konik tabanlı mikropak içerisinde, azalan konsantrasyonlardaki standartlar (25 μ l) ve plazma örnekleri (25 μ l) tekrarlı olarak pipetlenmiştir. Ölçümü yapılacak sitokinlere yönelik olarak kit içerisinde bulunan mikro-boncuklardan bir karışım hazırlanarak her bir kuyucuğa 25 μ l boncuk karışımı eklenmiştir. Mikropaklar 2 saat süreyle karanlıkta ve oda sıcaklığında, çalkalayıcı üzerinde inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından plaklar 1050 rpm devirde 5 dakika 2 kez santrifüj edilerek yıkama yapılmış, üst sıvılar uzaklaştırıldıktan sonra her kuyucuğa tespit edici antikor (25 μ l) eklenmiştir. Mikropaklar 1 saat karanlıkta ve oda sıcaklığında çalkalanarak inkübe edildikten sonra floresan boya ile konjuge bir madde olan SA-PE (25 μ l) sıvısı eklenerek, karanlıkta ve oda sıcaklığında 30 dakika çalkalanarak inkübe edilmiştir. Süre bitiminde 1050 rpm devirde 5 dakika 2 kez yıkanan plaklara üst sıvıların uzaklaştırılmasının ardından 150 μ l yıkama solüsyonu eklenmiştir. Mikropaklardaki örnekler tüplere aktarıldıktan sonra NovoCyte akan hücre ölçer cihazında okutulmuş ve LEGENDplex Veri Analizi Yazılımı ile sitokin seviyeleri değerlendirilmiştir.

3.8. İstatistiksel Değerlendirme

Verilerin istatistiksel hesaplamaları IBM SPSS 17.0 istatistik programı ile yapılmıştır. Grupların normal dağılıma uygunluklarının belirlenmesinde Kolmogorov-Smirnov testi kullanılmıştır. Normal dağılıma uyan (parametrik) üçlü gruplar arası karşılaştırmalar için ANOVA ve post-hoc analiz için Tukey testi uygulanmıştır. Parametrik olmayan değerler için ANOVA testi ve post-hoc Dunnett testi kullanılmıştır. Parametrik dağılıma sahip ikili grupların karşılaştırılması ise Bağımsız Örneklem T testi

ile yapılmıştır. İstatistiksel anlamlılık sınırı ($p<0,05$) kabul edilmiştir. Verilerin grafiksel çizimleri için GraphPad 7.0 programı kullanılmıştır.

3.9. Deneylerde Kullanılan Kimyasal Malzemeler

Çalışmalarda kullanılan kimyasal malzemeler, Tablo 3.5'te listelenmiştir.

Tablo 3-5: Deneylerde kullanılan kimyasal malzemeler

Kimyasal Adı	Kullanım Amacı	Marka
FACS Lysing	Akan hücre ölçer çalışmalarında tam kan boyama sonrası eritrositlerin patlatılması amacıyla kullanılır.	BD Biosciences / San Jose, ABD
PBS	Kan ile izotonik bir çözelti (pH=7,4) olup, hücre süspansiyonu hazırlama ve santrifüj ile hücrelerin yıkanmasında kullanılır.	Sigma-Aldrich / Missouri, ABD
RPMI-1640	Hücre kültüründe besi yeri olarak kullanılır. Kullanılmadan önce antibiyotikler ve zenginleştirme maddeleri eklenerek hazır hâle getirilir.	Gibco / Paisley, İngiltere
Penisilin/Streptomisin, Kanamisin	Hücre kültür medyumunu zenginleştirmede antibiyotik olarak kullanılır.	Gibco / Paisley, İngiltere
L-Glutamin	Hücre kültürü besi yerini zenginleştirmek için kullanılır.	Gibco / Paisley, İngiltere
MEM Vitamin solüsyonu	Hücre kültürü besi yerini zenginleştirmede kullanılır.	Gibco / Paisley, İngiltere
FBS (ısı ile inaktive edilmiş fetal sıgır serumu)	Hücre kültüründe RPMI-1640 kültür medyumunu zenginleştirmede (%10 oranında) kullanılan protein çözeltisidir.	Gibco / Paisley, İngiltere
Fiksasyon / Permeabilizasyon kiti	Akan hücre ölçer ile hücre yüzey boyamasını takiben hücre içi moleküllerin tespit edilmesi için kullanılır. Fiksasyon solüsyonu hücrelerin membran bütünlüğünü korumada kullanılır. Ardından uygulanan permeabilizasyon solüsyonu ile hücre membranında porlar açılması sağlanır.	Abcam / Cambridge, İngiltere
Lenfosit Seperasyon Medyum (1,077 gr/ml)	Kan örneklerinden gradyan santrifüj yöntemi ile mononükleer hücrelerin ayrıştırılmasında kullanılır.	Capricorn Scientific / Ebsdorfergrund, Almanya
FACSFlow Sheat	Akan hücre ölçer cihazında kullanılan, hücre süspansiyonları ile izotonik özellikte bir sıvıdır.	BD Biosciences / San Jose, ABD

3.10. Çalışmalarda Kullanılan Makine / Teçhizat

Deneylerde kullanılan makine ve teçhizata dair bilgiler Tablo 3.6'da listelenmiştir.

Tablo 3-6: Deneylerde kullanılan makine ve teçhizat

Makine / Teçhizat	Kullanım Amacı	Marka/Model
Otomatik kan sayım cihazı	Kemik iliği, periferik kan ve diğer süspansiyon formundaki hücrelerin sayımı	Rayto / RT-7600
Otomatik pipetler (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Küçük hacimli sıvıların aktarımı	Axypet, Pipetmen
Laminar akım kabini	Kültür için hücrelerin hazırlık aşamalarında steril ortam oluşturulması	Nüve LN 120
Etüv	37°C ve % 5 CO ₂ içeren, nemlendirilmiş, steril ortamda hücrelerin kültüre edilmesi	ThermoScientific
Vorteks	Tüp içerisindeki hücre süspansiyonlarının karıştırılması	DigitMex
Santrifüj	Hücrelerin yıkanması ve çöktürülmesi	Nüve NF 800R
FACSCalibur	Akan hücre ölçer cihazı (4 renk)	BD Biosciences
NovoCyte	Akan hücre ölçer cihazı (13 renk)	ACEA Biosciences
Cytek Aurora	Spektral akan hücre ölçer cihazı (25 renk)	Cytek Biosciences

4. BULGULAR

4.1. Kemik İliği Örneklerinin İmmünofenotipik Olarak Değerlendirilmesi

ALL şüphesi bulunan ve kesin tanı istemi ile laboratuvarımıza gönderilen kemik iliği örnekleri, akan hücre ölçer ile immünofenotipik olarak değerlendirilmiş ve ALL veya AML açısından patoloji saptanmayan örnekler hasta kontrol grubuna dâhil edilirken, B-ALL tanısı koyulan örneklerde blast fenotipini belirlemek amacıyla B-ALL paneli çalışılmıştır. Ayrıca, çalışmaya dâhil olan sağlık kurumları tarafından yeni tanı koyulan, tedavi öncesi (0. gün) B-ALL hastalarına ait örnekler de çalışma kapsamında değerlendirilmiştir. Hastalara ait demografik veriler Tablo 4.1’de sunulmuştur.

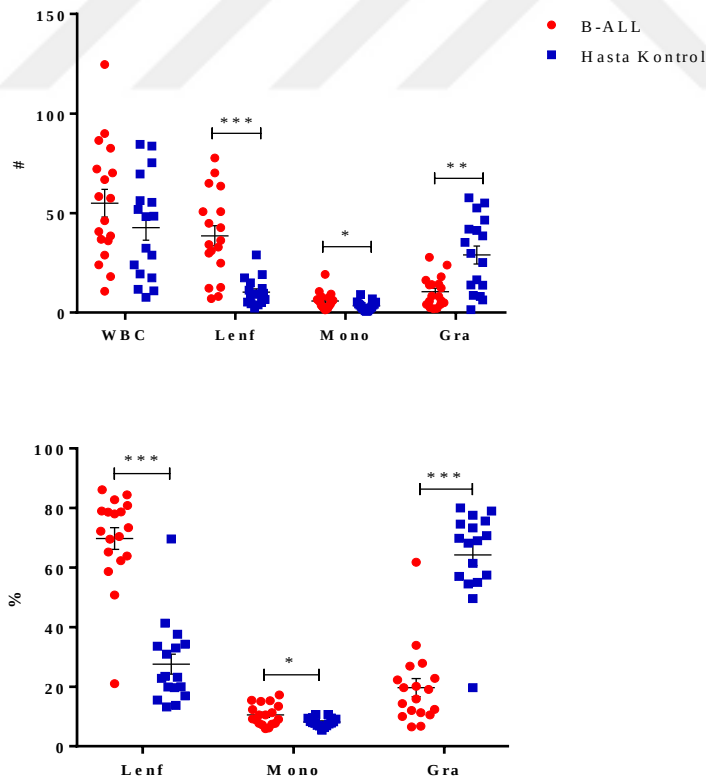
Tablo 4-1: Hasta gruplarına ait demografik veriler

	B-ALL (n=22)	Hasta Kontrol Grubu (n=19)
Cinsiyet	13 erkek - 9 kız	11 erkek - 8 kız
Yaş Ort. (minimum-maksimum)	4,3 (1-13)	7,7 (1-17)
Tanı	B-ALL (Blast fenotipi CD10 ⁺ CD19 ⁺)	Otoimmün hepatit, Evans sendromu Viral enfeksiyon Otoimmün hemolitik anemi İmmün trombositopenik purpura Trombositopeni Bisitopeni
MSS tutulumu	Yok	-
Ölüm	Yok	1/19

İmmünofenotipleme öncesinde kemik iliği örneklerinde kan sayımı yapılmış ve kullanılacak örnek miktarı WBC sayısı dikkate alınarak belirlenmiştir. Çalışmaya dâhil edilen B-ALL ve kontrol grubu hastalara ait kan sayım değerleri Tablo 4.2’de verilmiştir. Hastaların kan sayım değerleri istatistiksel olarak karşılaştırıldığında; B-ALL hastalarına ait kemik iliği örneklerindeki lenfosit ve monosit sayılarının kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek ($p=0,0001$, $p=0,045$, sırasıyla), granülosit sayılarının ise düşük olduğu tespit edilmiştir ($p=0,001$) (Şekil 4.1). Benzer şekilde, B-ALL hastalarının lenfosit ve monosit oranları kontrol grubu hastalarla kıyaslandığında anlamlı derecede yüksek ($p=0,0001$, $p=0,014$, sırasıyla), granülosit oranlarının ise düşük olduğu görülmüştür ($p=0,0001$) (Şekil 4.1).

Tablo 4-2: Yeni tanı (0. gün) kemik iliği örneklerinde kan sayım değerleri

	B-ALL	Hasta Kontrol
	Ortalama değer (x10 ³ /μl) (minimum-maksimum)	Ortalama değer (x10 ³ /μl) (minimum-maksimum)
# WBC	54,91 (10,67-124,66)	42,67 (7,63-84,52)
# Lenfosit	38,57 (6,96-77,71)	10,27 (2,18-28,98)
# Monosit	5,86 (1,41-19,16)	3,45 (0,59-9,08)
# Granülosit	10,46 (1,87-27,81)	28,95 (1,51-57,69)
% Lenfosit	69,77 (21,01-86,1)	27,57 (13,2-69,6)
% Monosit	10,56 (5,9-17,2)	8,16 (5,4-10,7)
% Granülosit	19,68 (6,5-61,8)	64,27 (19,7-80,01)

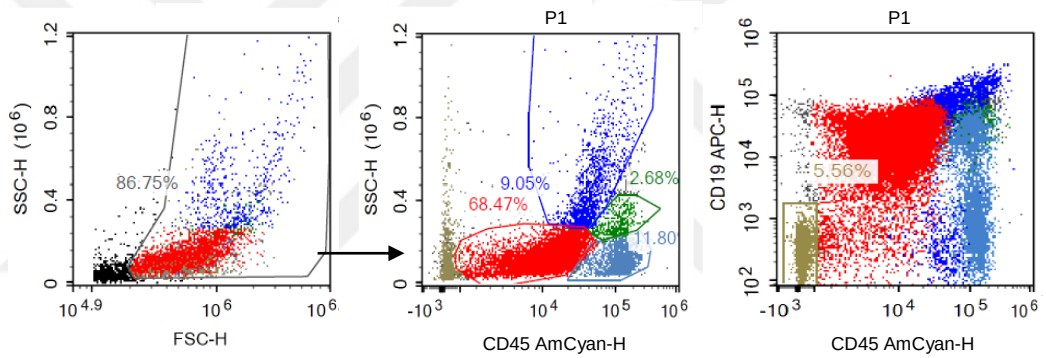


Şekil 4-1: Yeni tanı (0. gün) kemik iliği örneklerinde kan sayım değerlerinin istatistiksel karşılaştırması

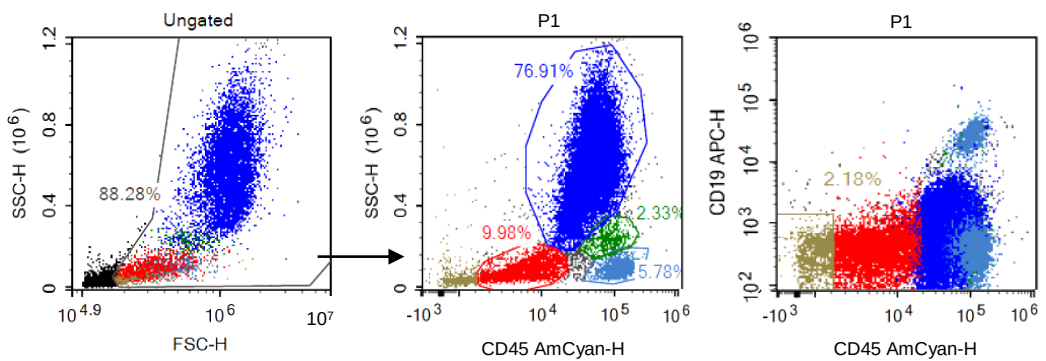
*p<0,05, ***p<0,001

Kan sayımının ardından akan hücre ölçer ile yapılan tanı paneli değerlendirmesinde, ilk olarak önden saçılım (forward scatter – FSC) ve yandan saçılım (side scatter – SSC) grafiği oluşturulmuş ve hücre debris dışlanmak suretiyle tüm hücreler kapılanarak (P1) en az 2×10^5 hücre okutulmuştur. Kapı içinde SSC/CD45 grafiği oluşturularak CD45 betimlemesine göre blast popülasyonu incelenmiştir. CD45 ifadesi yüksek olan hücreler olgun lenfositleri tanımlarken, CD45 ifadesi soluk olan hücreler blast hücreleri olarak kapılanmıştır. Blast kapısı içinde CD7, CD10, CD19, CD33 ve CD34 betimleme seviyeleri incelenerek ALL ve AML patolojisi açısından değerlendirme yapılmıştır. Blast hücrelerinin kapılanma stratejisi, B-ALL ve kontrol grubu hasta örneğinde karşılaştırmalı olarak Şekil 4.2’de gösterilmiştir.

B-ALL



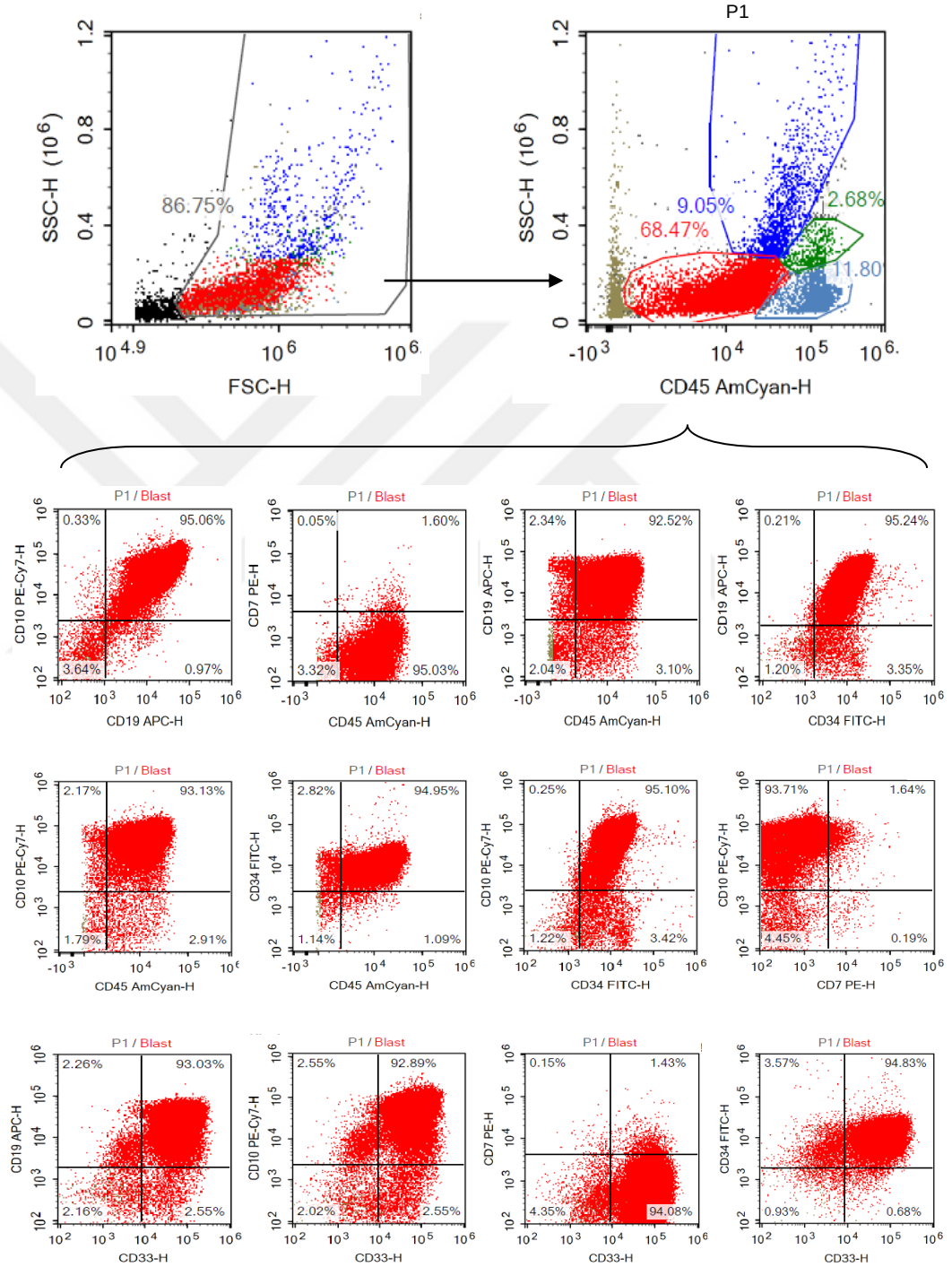
Hasta Kontrol



Şekil 4-2: Kemik iliği örneklerinde blast popülasyonlarının kapılanma stratejisi

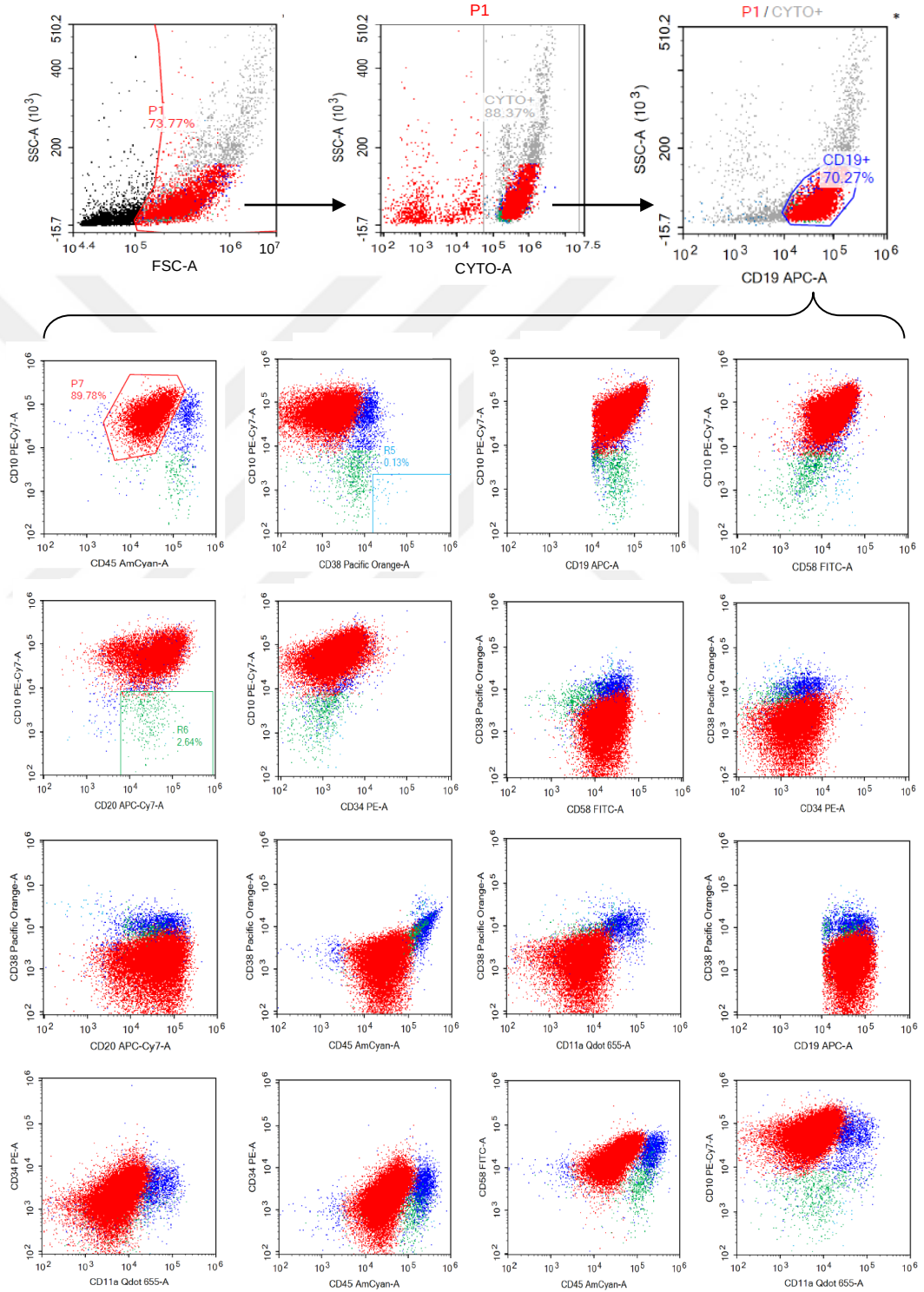
Blast oranı % 20’nin altında olan ve B-/T-ALL veya AML’ye yönelik belirteçlerin (CD19, CD7 ve CD33) düşük seviyede olduğu örnekler hasta kontrol grubu olarak değerlendirilmiştir. Blast oranı % 20’nin üstünde olan örneklerde T-ALL veya

AML'ye yönelik belirteçler negatif iken, yüksek CD10 ve CD19 pozitifliği olan örnekler B-ALL hasta grubu olarak çalışmaya dâhil edilmiştir. Şekil 4.3'te bir B-ALL hastasına ait kemik iliği tanı analizi görülmektedir.



Şekil 4-3: Yeni tanı (0. gün) B-ALL hastasına ait kemik iliği örneğinde akan hücre ölçer ile tanı paneli analizi

Tanı paneli analizini takiben B-ALL tanısı koyulan hastalarda blast fenotipini belirlemeye yönelik olarak B-ALL paneli çalışılmış ve CD10, CD11a, CD19, CD20, CD34, CD38, CD45 ve CD58 betimleme özelliklerine göre blast popülasyonunun tanı anındaki (0. gün) immünofenotipi belirlenmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4-4: Yeni tanı (0. gün) B-ALL immünofenotipleme

Tanı panelinden farklı olarak akan hücre ölçer ile B-ALL immünofenotipleme paneli değerlendirmesinden hemen önce örnekler Syto 41 ile boyanmıştır. Floresan bir boya olan Syto 41 hücre içine kolayca girerek nükleik asitleri boyama özelliğine sahip olup, Syto 41⁺ hücreler kapılanmak suretiyle çekirdekli hücrelerin eritrositlerden ve hücre debrisinden ayırt edilmesi mümkün olmaktadır. Bu özelliğinden faydalanılarak Syto 41 ile boyanan örneklerde hücre debrisini dışlanarak kapılama yapılmış ve Syto 41⁺ olan hücreler seçilmiştir. Syto 41⁺ hücre (en az 2x10⁵ hücre) kapısı içinde SSC/CD19 grafiği oluşturulmuş ve diğer tüm belirteçler CD19⁺ hücre popülasyonu içerisinde değerlendirilmiştir. CD19⁺ hücrelerin CD10, CD11a, CD34, CD38 ve CD58 moleküllerini betimlemelerine bağlı olarak blast fenotipi belirlenmiştir.

4.2. Sağlıklı Periferik Kan İmmünofenotipleri

Hücre kültürü çalışmalarında kullanmak için PBMC izolasyonu yapılmadan önce, sağlıklı periferik kan örneklerinde tam kan boyaması gerçekleştirilerek akan hücre ölçer ile CD3⁺, CD4⁺ ve CD8⁺ T hücre alt grupları ile CD19⁺ B, CD3⁺CD16⁺CD56⁺ NK ve CD3⁺CD16⁺CD56⁺ NKT hücre seviyeleri belirlenmiştir. Yapılan değerlendirme sonucunda, NK hücreleri başta olmak üzere immün hücre seviyelerinde yetersizlik olmadığı tespit edilen tüm sağlıklı çocuk vericiler çalışmaya dâhil edilmiştir. Sağlıklı çocuk katılımcılara ait immün parametre değerleri Tablo 4.3'te gösterilmiştir.

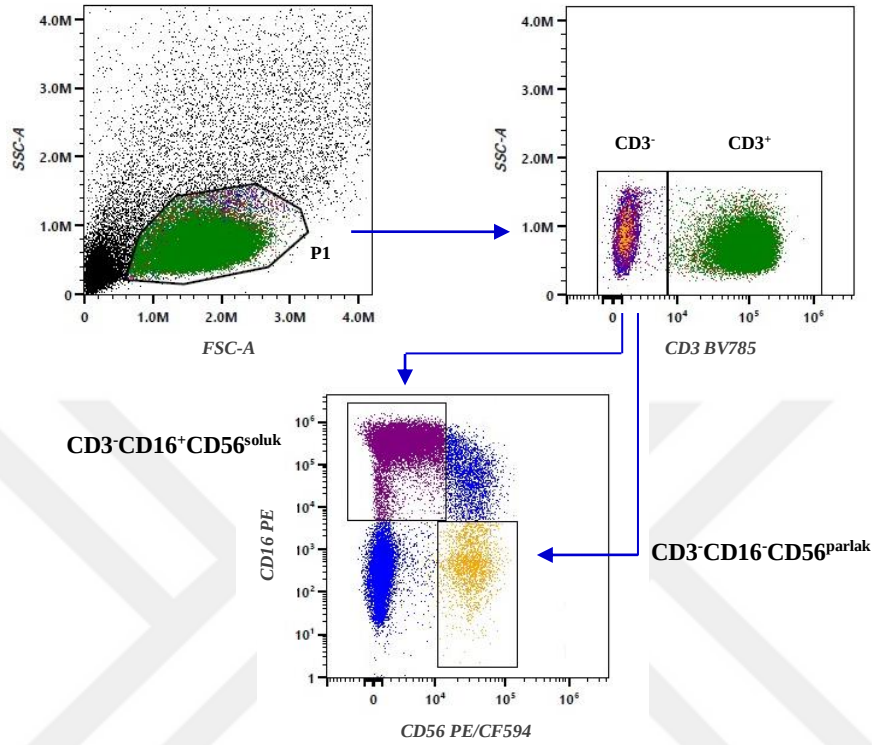
Tablo 4-3: Sağlıklı periferik kan immünofenotip değerleri

Lenfosit kapısı içinde	Ortalama Değer (%)	Standart Sapma
CD3	78,84	6,44
CD4	38,02	7,13
CD8	28,71	5,22
CD19	13,64	3,91
CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺	11,05	7,74
CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺	7,25	5,19

4.3. Kültür Sonrası NK Hücre Alt Grupları ve PD-1 Betimleme Seviyeleri

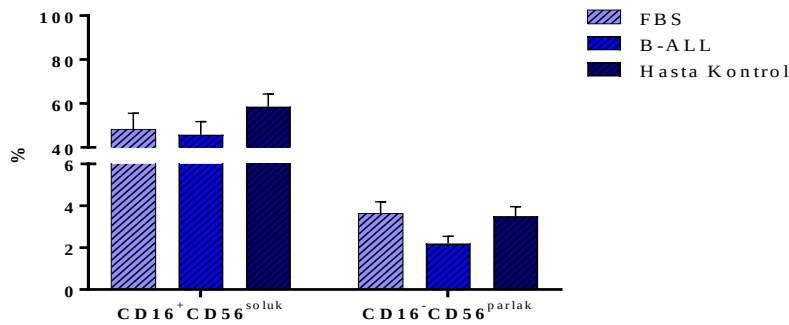
Hasta gruplarına ait kemik iliği plazma örnekleri, sağlıklı PBMC'ler üzerine % 10 hacimde eklendikten sonra hücreler rekombinant IL-12 sitokini ile uyarılmış ve 24 saat hücre kültürü gerçekleştirilmiştir. Kültür sonrası CD3, CD16 ve CD56 monoklonal antikorlarıyla hücre yüzey boyaması yapılarak NK hücre alt grupları işaretlenmiş ve bu

alt grupların PD-1 ifade seviyeleri ölçülmüştür. Şekil 4.5'te NK hücre alt gruplarının kapılanma stratejisi FBS ile kültüre edilen kontrol örneği üzerinde gösterilmiştir.



Şekil 4-5: NK hücre alt gruplarının akan hücre ölçerinde kapılanma stratejisi

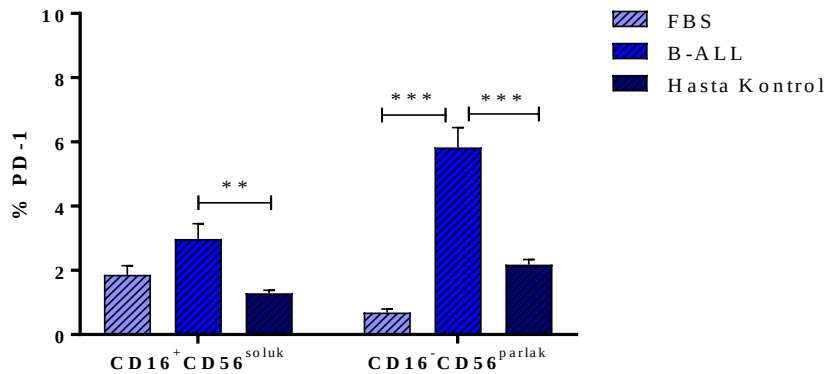
Yukarıda görüldüğü gibi, FSC/SSC grafiğinde çizilen lenfosit kapısı (P1) içinde CD3⁺ ve CD3⁻ hücreler ayrı ayrı kapılanmış ve NK hücrelerini tespit etmek için CD3⁻ hücre popülasyonu içerisinde CD16/CD56 grafiği oluşturulmuştur. NK hücreleri CD3⁻ CD16⁺CD56^{soluk} ve CD3⁻CD16⁻CD56^{parlak} hücreler olmak üzere iki ayrı alt grup olarak tespit edilmiş ve her iki NK hücre alt grubu içerisinde PD-1 seviyeleri ölçülmüştür.



Şekil 4-6: 24 saat hücre kültürü sonrası CD16⁺CD56^{soluk} ve CD16⁻CD56^{parlak} NK hücre oranlarındaki değişim

İstatistiksel olarak analiz edildiğinde, B-ALL ve hasta kontrol grubu plazmaları varlığında 24 saat kültüre edilen sağlıklı hücrelerin CD3⁺CD16⁺CD56^{soluk} NK hücre alt grup oranları ile FBS içeren koşuldakiler arasında anlamlı fark olmadığı görülmüştür. CD3⁺CD16⁺CD56^{parlak} NK hücre alt grubu seviyelerinin ise B-ALL plazması eklendiği durumda FBS ve hasta kontrol grubuna göre düştüğü gözlemlenmekle birlikte, istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0,05$). FBS, B-ALL ve kontrol grubu hasta plazmaları eklenen kültür koşulları altında sağlıklı CD3⁺CD16⁺CD56^{soluk} ve CD3⁺CD16⁺CD56^{parlak} NK hücre alt grup oranlarındaki değişimler Şekil 4.6'da gösterilmiştir.

Diğer taraftan, B-ALL plazması eklenen koşuldaki CD3⁺CD16⁺CD56^{soluk} NK hücre PD-1 ifade düzeyinin kontrol grubu hasta plazması eklenen koşula kıyasla anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edilmiştir ($p=0,003$) (Şekil 4.7). Benzer şekilde, CD3⁺CD16⁺CD56^{parlak} NK hücrelerinin PD-1 seviyeleri de B-ALL plazması varlığında artış göstermiş olup, FBS ve hasta kontrol grubu plazması varlığındaki koşullara göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p=0,0001$, $p=0,0001$, sırasıyla). Hasta kontrol grubu ile FBS eklenen koşullar birbiri ile kıyaslandığında ise, her iki NK hücre alt grubu oranlarının ve PD-1 ifade seviyelerinin benzer olduğu görülmüştür ($p>0,05$).



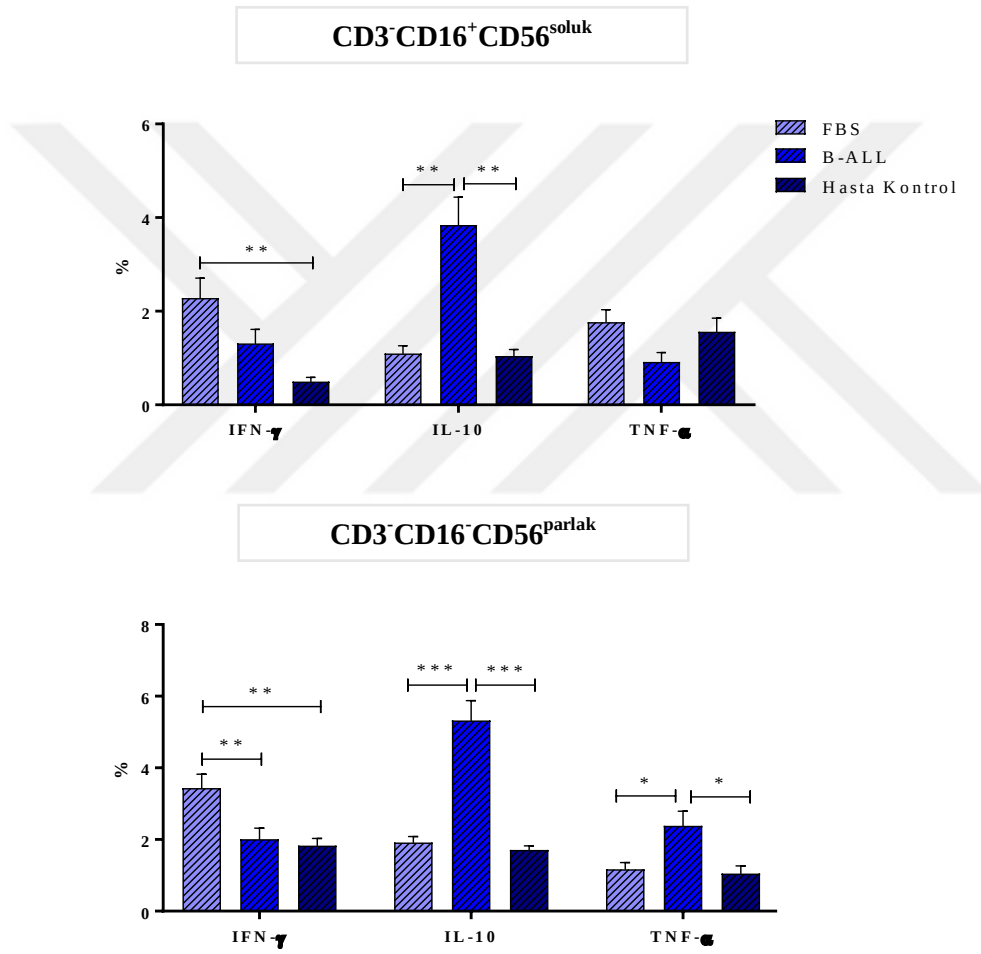
Şekil 4-7: Farklı koşullarda 24 saat kültür sonrası NK hücre alt gruplarının PD-1 betimleme seviyeleri

** $p<0,01$, *** $p<0,001$

4.4. Kültür Sonrası NK Hücre Alt Gruplarının Sitokin Seviyeleri

Sağlıklı NK hücre alt grupları ve PD-1 seviyelerinin ölçümünü takiben 24 saat hücre kültüründe IL-12 uyarımına cevaben NK hücre alt gruplarındaki sitokin seviyeleri incelenmiştir. B-ALL plazmalarının eklendiği koşullarda CD3⁺CD16⁺CD56^{soluk} NK

hücre IFN- γ seviyeleri FBS uyarımlı koşula göre düşük olmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı fark görülmemiştir ($p>0,05$) (Şekil 4.8). Kontrol grubu hasta plazması eklenen koşulda IFN- γ^+ CD3 $^+$ CD16 $^+$ CD56 $^{\text{soluk}}$ NK hücre oranlarının FBS ilâve edilen koşuldakilere kıyasla anlamlı derecede düşük olduğu tespit edilmiştir ($p=0,001$). CD3 $^+$ CD16 $^+$ CD56 $^{\text{parlak}}$ NK hücre IFN- γ düzeylerinin ise, hem B-ALL hem de kontrol grubu hasta plazmaları eklenen şartlarda FBS içeren koşula göre anlamlı derecede düşük olduğu görülmüştür ($p=0,009$, $p=0,003$, sırasıyla) (Şekil 4.8).



Şekil 4-8: Farklı kültür koşullarında IL-12 uyarımına yanıt olarak sağlıklı NK hücre alt gruplarının hücre içi sitokin seviyeleri

* $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$

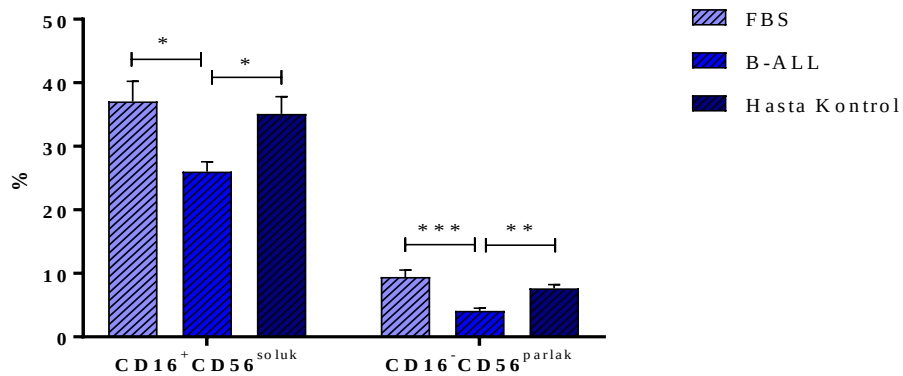
B-ALL plazma ilâvesinin IFN- γ seviyeleri üzerindeki etkisinden farklı olarak, CD3 $^+$ CD16 $^+$ CD56 $^{\text{soluk}}$ NK hücrelerindeki IL-10 seviyelerini hem FBS hem de hasta kontrol grubu plazması eklenen koşullara kıyasla anlamlı derecede yükselttiği tespit edilmiştir ($p=0,003$, $p=0,003$, sırasıyla) (Şekil 4.8). Hasta kontrol grubu plazması ile

FBS eklenen koşullardaki IL-10 seviyeleri ise benzer bulunmuştur. CD3⁻CD16⁺CD56^{soluk} hücreler gibi CD3⁻CD16⁻CD56^{parlak} NK hücrelerinin IL-10 düzeylerinin de, B-ALL plazması eklenen durumda hem FBS hem de kontrol grubu hasta plazmaları eklenen koşullara göre anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edilmiştir (p=0,0001, p=0,0001, sırasıyla).

Her iki NK hücre alt grubundaki TNF- α seviyeleri incelendiğinde, B-ALL plazma ilâvesinin farklı sonuçlara yol açtığı gözlemlenmiştir. CD3⁻CD16⁺CD56^{soluk} NK hücre TNF- α düzeylerinin B-ALL plazması bulunan koşulda FBS veya hasta kontrol grubu plazması eklenen şartlarla kıyaslandığında düşme eğiliminde olmakla birlikte gruplar arasında anlamlı fark görülmemiştir (p>0,05). CD3⁻CD16⁻CD56^{parlak} NK hücrelerinin TNF- α seviyeleri ise B-ALL plazması eklenen şartlarda FBS veya kontrol grubu hasta plazması eklenen koşullara göre anlamlı derecede artış göstermiştir (p=0,047, p=0,010, sırasıyla) (Şekil 4.8).

4.5. Kültür Şartlarının NK Hücre Proliferatif Yanıtları Üzerine Etkileri

FBS ve hasta gruplarına ait plazma örnekleri varlığında, PHA uyarımı ile gerçekleştirilen 72 saat hücre kültürü sonrası CD3⁻CD16⁺CD56^{soluk} ve CD3⁻CD16⁻CD56^{parlak} NK hücre alt grup oranları ve NKG2D betimleme seviyeleri ölçülmüştür. B-ALL hastalarının kemik iliği plazma örneklerinin eklendiği koşuldaki CD3⁻CD16⁺CD56^{soluk} NK hücre düzeylerinin, FBS ve kontrol grubu hasta plazması eklenen koşullarla kıyaslandığında anlamlı derecede düşük olduğu belirlenmiştir (p=0,017, p=0,024, sırasıyla) (Şekil 4.9).

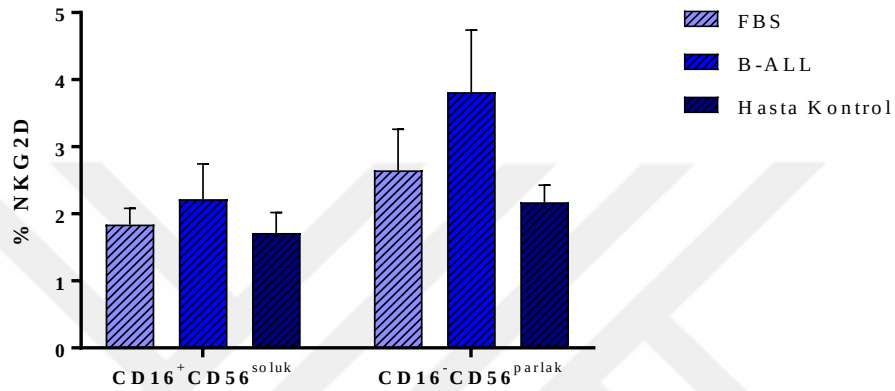


Şekil 4-9: PHA uyarımı varlığında farklı koşullarda 72 saat kültür sonrası NK hücre alt grup oranları

*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001

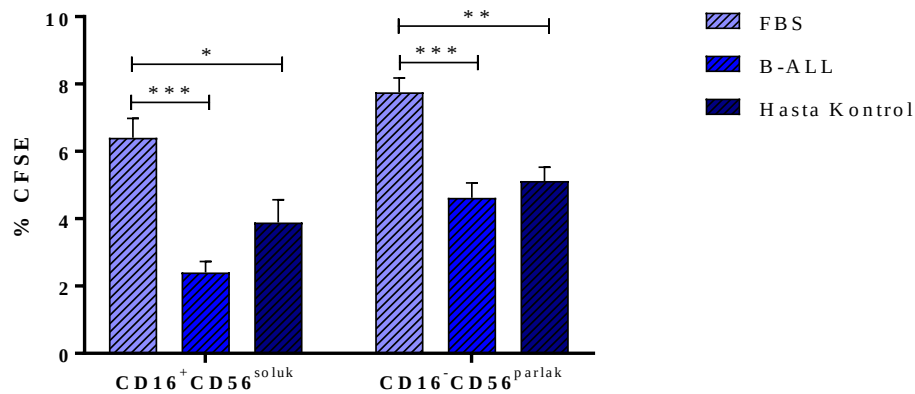
Benzer şekilde, B-ALL plazması varlığında $CD3^-CD16^-CD56^{parlak}$ NK hücre oranlarının da FBS ve kontrol grubu hasta plazması bulunan şartlara göre anlamlı olarak düştüğü tespit edilmiştir ($p=0,000$, $p=0,001$, sırasıyla) (Şekil 4.9).

Her iki NK hücre alt grubunun NKG2D betimleme seviyeleri analiz edildiğinde, B-ALL plazma ilâvesinin NKG2D seviyelerini artırma eğiliminde olduğu görülmüş, ancak gruplar arasında anlamlı fark saptanmamıştır (Şekil 4.10).



Şekil 4-10: 72 saat kültür sonrası NK hücre alt gruplarında NKG2D seviyeleri

NK hücre alt gruplarının farklı kültür koşullarında PHA uyarımına verdiği proliferatif yanıtlar akan hücre ölçerde CFSE boyama yöntemi ile tespit edilmiştir. $CD3^-CD16^+CD56^{soluk}$ NK hücre alt grubunun proliferatif kapasitesinin B-ALL ve hasta kontrol grubu plazması varlığında, FBS eklenen koşula göre anlamlı derecede düşük olduğu tespit edilmiştir ($p=0,0001$, $p=0,016$, sırasıyla) (Şekil 4.11).



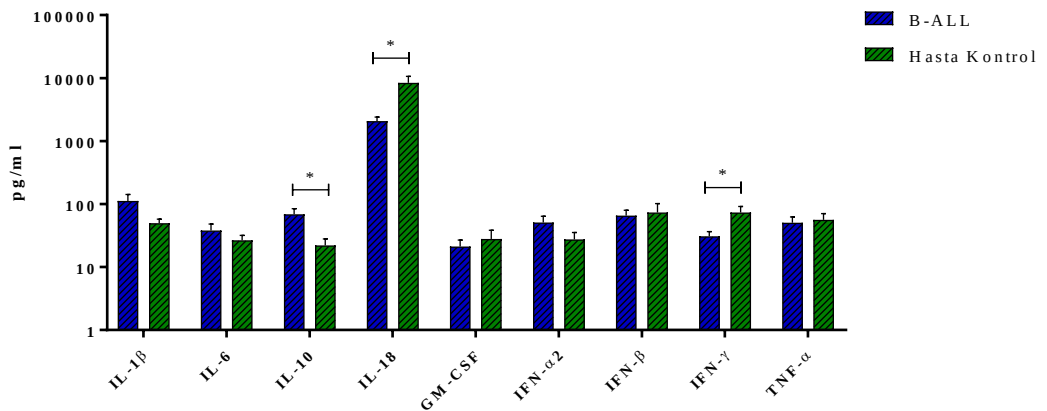
Şekil 4-11: 72 saat kültür sonrası NK hücre proliferatif kapasitelerindeki değişim

* $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$

Benzer bir sonuç $CD3^+CD16^+CD56^{parlak}$ NK hücrelerinde görülmüş olup, FBS ilâve edilen koşula göre B-ALL ve hasta kontrol grubu plazması eklenen koşullarda PHA uyarımına cevaben $CD3^+CD16^+CD56^{parlak}$ NK proliferasyonunun anlamlı derecede düştüğü belirlenmiştir ($p=0,000$, $p=0,02$) (Şekil 4.11).

4.6. Kemik İliği Plazma Örneklerinde Sitokin Seviyeleri

B-ALL ve kontrol grubu hastaların kemik iliği plazmalarıyla gerçekleştirilen in vitro deneyleri takiben, multipleks yöntemi ile plazma örneklerindeki IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-18, IFN- α 2, IFN- β , IFN- γ , GM-CSF ve TNF- α seviyeleri ölçülmüştür. Yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda, B-ALL hastalarının kemik iliği plazmalarındaki IL-10 seviyelerinin hasta kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede yüksek, IL-18 ve IFN- γ düzeylerinin ise düşük olduğu tespit edilmiştir ($p=0,045$, $p=0,015$, $p=0,023$, sırasıyla) (Şekil 4.12). IFN- β seviyeleri B-ALL hastalarının % 50'sinde (11/22), kontrol grubu hastaların ise % 68'inde (13/19) tespit edilebilir düzeyin altında bulunmuştur. Ölçülebilir IFN- β düzeyi olan hastalar ise istatistiksel olarak karşılaştırıldığında, B-ALL ve kontrol grubu hastalar arasında anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0,05$). Kontrol grubu hastalarının % 26'sına (5/19) karşılık B-ALL hastaları arasında yalnızca 1 olguda TNF- α düzeyleri saptanabilir düzeyin altında olup, diğer hastalar B-ALL hasta grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı fark görülmemiştir. Diğer bir dikkat çekici sonuç, B-ALL hastalarının % 36'sının (8/22), kontrol grubu hastaların ise % 47'sinin (9/19) GM-CSF düzeylerinin tespit edilebilir seviyenin altında olmasıdır. GM-CSF seviyeleri tespit edilebilen hastalar karşılaştırıldığında ise anlamlı bir fark tespit edilmemiştir ($p>0,05$).



Şekil 4-12: Hasta gruplarının kemik iliği plazma örneklerinde sitokin seviyelerinin karşılaştırılması

* $p<0,05$

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda B-ALL hastalarının kemik iliği mikroçevresinde bulunan hümmoral bileşenlerin NK hücre fenotip ve fonksiyonları üzerine etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, yeni tanı almış ve herhangi bir tedaviye başlanmamış B-ALL hastalarının kemik iliği numunelerinden plazmalar ayrıştırılarak, sağlıklı çocukların periferik kan örneklerinden izole edilmiş PBMC'ler ile birlikte kültür deneyleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçların B-ALL hastalarına özgü olup olmadığının belirlenebilmesi için hasta kontrol grubu olarak ALL ve AML açısından patolojisi bulunmayan hastalar da çalışmaya dâhil edilmiş ve her iki gruba ait kemik iliği numuneleriyle uygulanan deneylerden elde edilen sonuçlar karşılaştırmalı olarak analiz edilmiştir. Ayrıca *in vitro* deneylerden alınan sonuçların kemik iliği hümmoral bileşenleri arasındaki sitokinlerle ilişkisi hakkında fikir edinebilmek amacıyla, hasta gruplarına ait plazma örneklerinde sitokin seviyeleri ölçülmüştür.

Çalışmanın deneysel aşamalarına geçmeden önce, ALL şüphesi bulunan ve kesin tanı amacı ile laboratuvarımıza gönderilen kemik iliği örneklerinde kan sayımı ve ardından akan hücre ölçer ile immüfenotipik tanı ve tiplendirme gerçekleştirilmiştir. Ayrıca çalışmaya dâhil olan diğer kurumlar tarafından gönderilen ve tedavisine başlanmamış 0. gün B-ALL hastalarının kemik iliği örnekleri de kan sayımı yapıldıktan sonra çalışmalarda kullanılmıştır. B-ALL örneklerinde yapılan kan sayımlarının sonuçları kontrol grubu hastaların kemik iliği örnekleri ile kıyaslandığında, B-ALL hastalarının lenfosit ve monosit sayı ve oranlarının anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edilmiştir. Tersî şekilde granülosit sayı ve oranları ise B-ALL hastalarında daha düşük seviyelerde bulunmuştur. B-ALL'nin olgunlaşmamış lenfoid blastların lösemik gelişimi ile ortaya çıkan bir malignite olduğu düşünöldüğünde, kemik iliği immün hücre oranlarının lenfositler yönüne ağırlık kazanması beklenen bir sonuçtur.

Diğer taraftan, kemik iliğinde baskın hücre grubu lenfoid blastlar iken, B-ALL hastalarının kemik iliğinde monositlerin yüksek miktarda bulunması çelişkili bir sonuç gibi görünmektedir. Bununla birlikte, bazı kanser türlerinde tümör mikroçevresinde bulunan CD14⁺HLA/DR^{düşük/-} fenotipteki monosit popölasyonunun IL-10 salımı yapmak veya regölator T hücrelerini uyarmak suretiyle immün-baskılayıcı rol oynadıkları gösterilmiştir¹⁸⁵. Çalışmamızın odağında bulunmaması nedeniyle kemik iliği

örneklerinde yüksek miktar ve oranda saptanan monositlerin fenotipik özellikleri incelenmemiş olmakla birlikte, bu hücrelerin immün-baskılayıcı fonksiyonlara sahip olmaları mümkün görünmektedir. Bu nedenle sonraki çalışmalarda bu hücre grubunun immünfenotipik ve işlevsel özelliklerinin incelenmesi faydalı olacaktır. Ayrıca, B-ALL hastaları ile akut lösemiler açısından patolojisi olmayan hastaların immün hücre değerlerindeki farklılıklar, ALL tanısı koyulması açısından öngörülebilir sonuçlara işaret etmektedir.

Çalışmanın deneysel aşamalarında, her iki hasta grubuna ait kemik iliği örneklerinden ayrıştırılan plazma örnekleri kullanılmıştır. Sağlıklı çocuk vericilerin periferik kan örneklerinden izole edilen PBMC'ler üzerine B-ALL ve kontrol grubu hasta plazmaları ile kontrol amaçlı FBS eklenmek suretiyle 3 ayrı koşulda kültür gerçekleştirilmiştir. Bu aşamada, herhangi bir allo-reaksiyon meydana gelmemesi için, hücre kalıntıların tamamen uzaklaştırılması amacıyla plazma örnekleri 0,22 µm şırınga filtresinden geçirildikten sonra sağlıklı hücrelerin üzerine eklenmiştir. FBS ve hasta plazmaları eklenen ve IL-12 ile uyarılan hücrelerde 24 saat kültürün sonunda ilk olarak $CD3^+CD16^+CD56^{soluk}$ ve $CD3^+CD16^+CD56^{parlak}$ NK hücre alt grupları tanımlanmış, FBS bulunan koşul referans alındığında hem B-ALL hem de kontrol grubu hasta plazmalarının NK hücre alt grup oranları üzerinde anlamlı değişime neden olmadığı görülmüştür.

NK hücre alt grup oranlarından sonra, her iki grubun işlevsel özelliklerini incelemek amacıyla hücre yüzey PD-1 betimlemeleri ile hücre içi IFN-γ, IL-10 ve TNF-α seviyeleri ölçülmüştür. Bir immün-kontrol noktası molekülü olan PD-1'in işlevleri ilk olarak T lenfositlerinde karakterize edilmiş olup, aşırı immün yanıtların sınırlandırılması ve immün-aracılı hasarın önlenmesinden sorumlu bir immün regülatör molekül olarak tanımlanmıştır. T hücrelerindeki PD-1 betimlemesi, T hücre reseptörlerinin aktivasyonu ile indüklenmekte ve bazı sitokinler aracılığıyla PD-1 seviyeleri yükselmektedir¹⁸⁶. Öte yandan kronik olarak T hücre reseptörlerinin aktive olması ve PD-1'in uyarılması T hücre fonksiyonlarının bozulmasına neden olmaktadır. Tümöre infiltre olan T hücrelerinin tümör antijenlerine ve immün baskılayıcı mikroçevreye uzun süre maruz kalması sonucunda PD-1 seviyelerindeki yükselmenin, hücre fonksiyonlarda tükenişe neden olduğu bilinmektedir¹⁸⁷. PD-1'in ligandları hematopoetik olan veya olmayan birçok hücre tipi tarafından betimlenmekte ve ligandlarının bağlanmasını takiben PD-1

taşıyan hücrelerde proliferatif ve sitolitik aktiviteler baskılanmaktadır. PD-1 ligandlarının pek çok kanser hücresi ve tümör mikroçevresi tarafından betimlendiği ve mikroçevrede bulunan çeşitli enflamatuvar uyaranlar tarafından seviyelerinin arttırıldığı bilinmektedir¹⁸⁸. Bu ilişkiyi göz önünde bulundurarak, tümör immünoterapisinde PD-1'in ligandları ile etkileşimini engelleyen ilaçların kullanılabileceği düşünülmüştür¹⁸⁹. Her ne kadar NK hücrelerinin PD-1 betimlemesi çok düşük olsa da, sağlıklı bireylerde CD16⁺CD56^{soluk} fenotipteki olgun NK hücrelerinin PD-1 betimlediği tespit edilmiş olup, bazı kanser türlerinde PD-1⁺ NK hücre oranlarının arttığı gösterilmiştir¹⁸⁸.

Bu bilgilere paralel olarak, çalışmamızda farklı kültür koşulları altında NK hücre alt gruplarındaki PD-1 betimleme seviyeleri ölçülmüştür. CD3⁻CD16⁻CD56^{parlak} NK hücrelerinin PD-1 seviyeleri FBS içeren koşulda oldukça düşük seviyelerde bulunurken, B-ALL plazması eklenen koşulda hem FBS hem de hasta kontrol grubu plazması ilâve edilen koşullara kıyasla anlamlı derecede yükseldiği tespit edilmiştir. CD3⁻CD16⁺CD56^{soluk} NK hücrelerinin PD-1 seviyeleri de benzer şekilde B-ALL plazması eklenmesini takiben artış göstermiş ve hasta kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Bu sonuçlar B-ALL plazmasının NK hücrelerinde PD-1 betimlemesini tetikleyecek hümmoral bileşenleri içerdiğini göstermekte olup, bu suretle NK hücre fonksiyonlarını baskılayabileceğine dair ilk bulguları ortaya koymaktadır.

NK hücre fenotiplerini belirlemenin ardından, IL-12 uyarımına yanıt olarak hücre içi IFN- γ , IL-10 ve TNF- α seviyeleri ölçülmüştür. IFN- γ çok yönlü etkileri olan bir pro-inflamatuvar sitokindir ve anti-viral, anti-tümöral ve immünmodülatör işlevleri ile doğal ve edinsel immünitede önemli rolleri bulunmaktadır¹⁹⁰. Ana üretim kaynağı NK hücreleri olan IFN- γ 'nın, granzim B ve perforin molekülleriyle birlikte sitotoksik fonksiyon sergileyerek tümör hücrelerinde apoptozu tetiklediği bilinmektedir¹⁹¹. NK hücrelerinin IFN- γ üretimini uyaran başlıca sitokinler IL-12 ve IL-18 olup, salındığı hücre üzerindeki otokrin etkilerinin yanı sıra tümör mikroçevresindeki makrofajlar, baskılayıcı özellikteki miyeloid hücreler ve B hücreleri gibi stromal hücreler üzerine de etkilerinin bulunduğu bilinmektedir¹⁹².

Tümör immünitesindeki önemli işlevlerinden yola çıkılarak, çalışmamızda NK hücre alt gruplarının IFN- γ üretimleri üzerine B-ALL hastalarının kemik iliği plazma örneklerinin etkileri incelenmiştir. B-ALL plazması eklenen koşuldaki CD3⁻CD16⁺CD56^{soluk} NK hücre IFN- γ seviyelerinin FBS ilâve edilen gruba göre düşme

eğiliminde olduğu görülmekle birlikte, istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır. CD3⁺CD16⁺CD56^{parlak} NK hücre IFN- γ düzeylerinin ise FBS eklenen koşula kıyasla anlamlı derecede düşük olduğu görülmüştür. Bununla birlikte, kontrol grubu hasta plazmalarının eklendiği koşullarda da her iki NK hücre alt grubundaki IFN- γ düzeylerinin FBS içeren gruptan anlamlı derecede düşük ve B-ALL plazması içeren gruba benzer düzeylerde olması, kemik iliği plazma içeriğinin IFN- γ seviyelerini baskılayıcı özelliğinin B-ALL hastalarına özgü olmadığını göstermektedir.

Diğer taraftan, B-ALL plazması eklenen koşulda her iki NK hücre alt grubundaki IL-10 seviyelerinin hem FBS hem de kontrol grubu hasta plazması ilâve edilen koşullarla kıyaslandığında anlamlı derecede arttığı dikkat çekmektedir. Anti-inflamatuvar bir sitokin olan IL-10, ilk olarak tip 2 CD4⁺ T hücreleri tarafından üretilen ve başta IFN- γ olmak üzere tip 1 CD4⁺ T hücrelerinin (pro-inflamatuvar) sitokin üretimini ve proliferasyonunu baskılayan bir sitokin olarak tanımlanmıştır. Takip eden çalışmalar sonucu çok çeşitli hücre gruplarından salındığı gösterilen IL-10'un çift yönlü etkilere sahip olmakla birlikte regülatör T hücre homeostazını sağlamada ve pro-inflamatuvar IL-17 sitokini salan Th17 hücrelerini baskılamada önemli rol oynadığı bilinmektedir¹⁹³. IL-10'un kanser gelişimi ve kanser hücrelerinin immün sistemden kaçınmasında rol oynadığı gösterilmiş olup, çeşitli kanserlerde tespit edilen yüksek seviyelerinden ötürü prognostik bir belirteç olarak kullanılabileceği de düşünülmüştür. Solid tümörlerin yanı sıra, hematolojik kanserlerde de dolaşımdaki IL-10 seviyeleri sağlıklı bireylere göre yüksek bulunmuştur¹⁹⁴.

Literatürde yer alan bu bulgulara paralel olarak çalışmamızda saptanan her iki NK hücre alt grubundaki artmış IL-10 düzeyleri sadece B-ALL plazmalarının eklendiği koşula mahsus olup, FBS eklenen koşulla karşılaştırıldığında hasta kontrol grubu plazmalarının IL-10 seviyelerinde böyle bir yükselmeye neden olmadığı görülmüştür. Bu durum, B-ALL kemik iliği plazmalarında IL-10 salımını teşvik eden çözünür bileşenlerin varlığına işaret etmektedir. IFN- γ düşüklüğü ile birlikte düşünüldüğünde IL-10 seviyelerini yükseltici etkisi, B-ALL kemik iliği mikroçevresinin anti-inflamatuvar sitokinlerin üretimini teşvik ettiğini akla getirmektedir. Diğer taraftan, PD-1 aktivasyonunun IL-10 salımına neden olduğu bilgisi¹⁹⁵, çalışmamızda B-ALL plazmasının eklendiği koşullarda hem PD-1 ifadesi hem de hücre içi IL-10 seviyelerinin artmasının birbiri ile ilişkili iki sonuç olabileceğini düşündürmektedir.

Kanserde oynadığı bilinen kritik rollerden ötürü çalışmamızda üçüncü bir sitokin olarak NK hücre alt gruplarındaki TNF- α seviyeleri ölçülmüştür. TNF- α multi-fonksiyonel özelliklere sahip bir pro-inflamatuvar sitokindir ve hücre sağkalımı, proliferasyonu, farklılaşması veya apoptozu uyarmak gibi farklı hücresel işlevleri bulunmaktadır. Kanserde çift yönlü etkileri olmakla birlikte TNF- α 'nın tümör hücre büyüme ve çoğalması, invazyonu, metastazı ve tümör anjiyogenezini uyarma gibi etkilerinin de olduğu bilinmektedir¹⁹⁶. Farklı kanserlerde yapılan çalışmalarda, hastaların serum TNF- α düzeylerinin yüksek olduğu gösterilmiş olup, TNF- α 'nın kanser riski, tedaviye yanıt ve prognozun bir belirleyicisi olarak kullanılabileceği düşünülmüştür¹⁹⁷.

Çalışmamızda B-ALL hastalarının kemik iliği plazma örnekleri ile kültür sonrası yapılan ölçümde, CD3⁺CD16⁺CD56^{soluk} NK hücrelerindeki TNF- α seviyelerinin FBS ve kontrol grubu hasta plazmaları eklenen koşullardaki düzeylere benzer olduğu görülmüştür. CD3⁺CD16⁺CD56^{parlak} NK hücrelerindeki TNF- α seviyelerinin ise hem FBS hem de hasta kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede yüksek olduğu saptanmıştır. Kanser hücrelerinin büyüme ve proliferasyonu yönündeki uyarıcı etkileri göz önüne alındığında, B-ALL plazması eklenen koşula özgü olarak NK hücre TNF- α düzeylerinin yüksek oluşu, TNF- α 'nın kemik iliği mikroçevresinde blast büyüme ve çoğalmasını uyarıcı ortama katkısı olabileceğini düşündürmektedir.

Hücre içi sitokinlerin yanı sıra çalışmamızda B-ALL kemik iliği hümmoral bileşenlerinin NK hücre proliferatif kapasiteleri üzerine etkileri de incelenmiştir. PHA uyarımına cevaben 72 saatlik kültür sonrası B-ALL plazması eklenen koşulda her iki NK hücre alt grubunun da kontrol gruplarına göre anlamlı derecede düşük oranlarda seyrettiği görülmüştür. Bir NK hücre aktivatör reseptörü olan NKG2D'nin NK hücre alt gruplarındaki seviyelerinin ise her üç koşulda da benzer olduğu görülmüştür. Diğer taraftan, NK hücre alt grup oranlarındaki düşüşe paralel olarak B-ALL plazması ile kültüre edilen koşulda hem CD3⁺CD16⁺CD56^{soluk} hem de CD3⁺CD16⁺CD56^{parlak} NK hücre proliferatif yanıtlarının FBS ve kontrol grubu hasta plazmaları eklenen koşullara kıyasla anlamlı derecede düşük olduğu tespit edilmiştir. B-ALL plazmaları ile 72 saat kültür sonrası NK hücre alt grup seviyeleri anlamlı derecede düşerken 24 saatlik kültür sonucu değişim gözlenmemesinin, 24 saatlik deneyde NK hücre proliferasyonunu tetikleyecek uyarının ve yeterli sürenin olmayışından kaynaklanması mümkündür.

Tüm *in vitro* deney sonuçları birlikte değerlendirildiğinde, B-ALL kemik iliği plazmalarının NK hücre alt grup düzeyleri ve proliferasyonu üzerinde baskılayıcı etki gösterdiği bulgusu göze çarpmaktadır. NK hücre PD-1 betimleme seviyelerindeki artış, bu bulguyu kuvvetlendirmektedir. Ek olarak, her iki NK hücre alt grubunda yüksek seviyede hücre içi IL-10 saptanması ve CD3⁺CD16⁺CD56^{parlak} NK hücre TNF- α seviyelerinin de yüksek bulunması, B-ALL hastalarının kemik iliği mikroçevresinde anti-lösemi immünitesini baskılayıcı ortamı teşvik eden hümmoral bileşenlerin varlığına işaret etmektedir.

Çalışmamızda son olarak, *in vitro* deneylerde kullanılan B-ALL ve hasta kontrol grubu plazma örneklerindeki IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-18, IFN- α 2, IFN- β , IFN- γ , TNF- α ve GM-CSF sitokinlerinin seviyeleri ölçülerek karşılaştırılmıştır. Hücre içi boyama ile NK hücre alt gruplarından alınan sonuçlara paralel olarak, B-ALL hastalarının plazma örneklerinde doğrudan ölçülen IL-10 düzeyleri kontrol grubu hastalara kıyasla anlamlı derecede yüksek, IFN- γ seviyeleri ise düşük bulunmuştur. Bu durum, B-ALL kemik iliği mikroçevresinin yalnız NK hücrelerindeki IL-10 ve IFN- γ seviyelerini etkilemekle kalmayıp, muhtemelen kemik iliğindeki diğer hücrelerin de üretimlerini benzer şekilde etkilediğini ve kemik iliği mikroçevresinde immün-baskılayıcı bir ortam gelişmesine neden olduğunu akla getirmektedir.

İlâveten, B-ALL kemik iliği plazmalarında IL-18 seviyeleri de hasta kontrol grubuna nispetle anlamlı derecede düşük bulunmuştur. IL-18, T ve NK hücrelerinin farklılaşmasında ve aktivasyonunda rol oynayan pro-inflamatuvar bir sitokindir. IL-12 ile birlikte IL-18, T ve NK hücrelerinin IFN- γ üretimlerini uyarma özelliğine sahiptir. Ayrıca IL-18'in NK ve CD8⁺ T hücrelerindeki perforin ve Fas-ligand bağımlı sitotoksitesiteyi arttırdığı da bilinmektedir¹⁹⁸. B-ALL hasta plazmaları eklenen koşullarda IL-12 uyarımına rağmen NK hücre IFN- γ seviyelerinin düşük bulunmasına ilâveten B-ALL hasta plazmalarındaki IFN- γ düzeylerinin de hasta kontrol grubuna kıyasla düşük olması, bu tablo üzerinde IL-18 düşüklüğünün de bir etkisinin olabileceği yönünde paralel bir sonuç ortaya çıkarmaktadır.

Kemik iliği plazma örneklerinde ölçümü yapılan diğer sitokinler açısından hasta grupları arasında anlamlı fark bulunmamıştır. Bununla birlikte, kontrol grubu hastaların farklı patolojilere sahip olmasının da muhtemel bir sonucu olarak sitokin düzeyleri oldukça heterojen bulunmuş olup, bu durumun gruplar arasında istatistiksel anlamlılık

saptanmamasına neden olabileceği göz önünde bulundurulmalıdır. Kontrol grubu hasta sayısının arttırılarak, altta yatan patolojiye göre alt sınıflara ayrıldıktan sonra karşılaştırma yapılması ile daha net sonuçlar alınabilmesi mümkün görünmektedir.

Tüm bulgular birlikte değerlendirildiğinde, B-ALL plazma örnekleri varlığında NK hücrelerinin PD-1 betimlemeleri ve benzer doğrultuda IL-10 seviyelerindeki artışa karşılık IFN- γ düzeylerinde ve proliferatif kapasitelerindeki düşüşün, B-ALL hastalarının kemik iliğindeki immün-baskılayıcı ortama işaret ettiği düşünülmektedir. Kemik iliği plazma örneklerinde saptanan yüksek IL-10 düzeyleri ile düşük IL-18 ve IFN- γ seviyeleri, NK hücreleri üzerinde oluşan baskılanmanın nedenleri arasında sayılabilir. Diğer taraftan, bu immün-baskılayıcı ortamın yalnız NK hücreleri üzerinde de değil, kemik iliği mikroçevresinde gelişmekte olan veya gelişimini tamamlayan diğer hücreler üzerinde de etkisinin olacağı açıktır. Bununla birlikte NK hücrelerinin anti-lösemi immünitesindeki önemi göz önünde bulundurularak tasarlanan bu çalışmada, öngörüldüğü gibi B-ALL patolojisi bulunan hastalarda NK hücrelerinin baskılandığı ve bu baskılanmanın arkasında humoral etkenlerin rol oynadığı gösterilmiştir.

Çalışmamızda sitokinler kemik iliği humoral bileşenlerinin bir grubunu oluşturmaları açısından ele alınmış ve ağırlıklı olarak pro-inflamatuvar özellikte olan sitokinler değerlendirilmiştir. İlerleyen çalışmalarda anti-inflamatuvar sitokinler ile kemokinler ve kompleman proteinleri gibi diğer humoral bileşenlerin de incelenerek kemik iliğindeki anti-lösemi immünitesini baskılayan ortamın net olarak tanımlanması mümkün olacaktır. Bu çalışmalardan elde edilecek sonuçlar, B-ALL hastalarına uygulanan veya gelecekte uygulanacak olan immünoterapötik ajanların tedavide başarı şansının yükseltilmesi için önemlidir. İmmünoterapiye dayalı tedavi uygulamalarında başarının arttırılması sonucu tedaviden olumsuz etkilenen hastaların yaşam kalitelerinde iyileşme ve tedaviye dirençli hastaların sağkalımında artış sağlanması, gelecek çalışmaların temelini oluşturacaktır.

KAYNAKLAR

1. Puckett Y and O Chan. *Acute Lymphocytic Leukemia*. Treasure Island (FL). StatPearls Publishing. 2022.
2. Inaba H, M Greaves, and Mullighan CG. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*. 2013. **381**(9881): p. 1943-55.
3. Chang JH, MM Poppe, CH Hua, KJ Marcus, and Esiashvili N. Acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer*. 2021. **68 Suppl 2**: p. e28371.
4. Kakaje A, MM Alhalabi, A Ghareeb, B Karam, B Mansour, B Zahra, and Hamdan O. Rates and trends of childhood acute lymphoblastic leukaemia: an epidemiology study. *Sci Rep*. 2020. **10**(1): p. 6756.
5. Swerdlow SH, E Campo, SA Pileri, NL Harris, H Stein, R Siebert, R Advani, M Ghielmini, GA Salles, AD Zelenetz, and Jaffe ES. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood*. 2016. **127**(20): p. 2375-90.
6. Huang FL, EC Liao, CL Li, CY Yen, and Yu SJ. Pathogenesis of pediatric B-cell acute lymphoblastic leukemia: Molecular pathways and disease treatments. *Oncol Lett*. 2020. **20**(1): p. 448-454.
7. Tebbi CK. Etiology of Acute Leukemia: A Review. *Cancers (Basel)*. 2021. **13**(9).
8. Teachey DT, SP Hunger, and Loh ML. Optimizing therapy in the modern age: differences in length of maintenance therapy in acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2021. **137**(2): p. 168-177.
9. Allison M, J Mathews, T Gilliland, and Mathew SO. Natural Killer Cell-Mediated Immunotherapy for Leukemia. *Cancers (Basel)*. 2022. **14**(3).
10. Advani AS. Novel strategies in the treatment of acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet Haematol*. 2022. **9**(4): p. e240-e241.
11. Pui CH and Evans WE. A 50-year journey to cure childhood acute lymphoblastic leukemia. *Semin Hematol*. 2013. **50**(3): p. 185-96.
12. Sung L, R Yanofsky, RJ Klaassen, D Dix, S Pritchard, N Winick, S Alexander, and Klassen A. Quality of life during active treatment for pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Int J Cancer*. 2011. **128**(5): p. 1213-20.

13. Inaba H and Pui CH. Immunotherapy in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Metastasis Rev.* 2019. **38**(4): p. 595-610.
14. Landier W, R Skinner, WH Wallace, L Hjorth, RL Mulder, FL Wong, Y Yasui, N Bhakta, LS Constine, S Bhatia, LC Kremer, and Hudson MM. Surveillance for Late Effects in Childhood Cancer Survivors. *J Clin Oncol.* 2018. **36**(21): p. 2216-2222.
15. Shang Y and Zhou F. Current Advances in Immunotherapy for Acute Leukemia: An Overview of Antibody, Chimeric Antigen Receptor, Immune Checkpoint, and Natural Killer. *Front Oncol.* 2019. **9**: p. 917.
16. Caligiuri MA. Human natural killer cells. *Blood.* 2008. **112**(3): p. 461-9.
17. Abel AM, C Yang, MS Thakar, and Malarkannan S. Natural Killer Cells: Development, Maturation, and Clinical Utilization. *Front Immunol.* 2018. **9**: p. 1869.
18. Carlsten M and Jaras M. Natural Killer Cells in Myeloid Malignancies: Immune Surveillance, NK Cell Dysfunction, and Pharmacological Opportunities to Bolster the Endogenous NK Cells. *Front Immunol.* 2019. **10**: p. 2357.
19. Arruga F, BB Gyau, A Iannello, N Vitale, T Vaisitti, and Deaglio S. Immune Response Dysfunction in Chronic Lymphocytic Leukemia: Dissecting Molecular Mechanisms and Microenvironmental Conditions. *Int J Mol Sci.* 2020. **21**(5).
20. Mizia-Malarz A and Sobol-Milejska G. NK Cells as Possible Prognostic Factor in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Dis Markers.* 2019. **2019**: p. 3596983.
21. Spanholtz J, M Tordoir, D Eissens, F Preijers, A van der Meer, I Joosten, N Schaap, TM de Witte, and Dolstra H. High log-scale expansion of functional human natural killer cells from umbilical cord blood CD34-positive cells for adoptive cancer immunotherapy. *PLoS One.* 2010. **5**(2): p. e9221.
22. Nguyen R, H Wu, S Pounds, H Inaba, RC Ribeiro, D Cullins, B Rooney, T Bell, NJ Lacayo, K Heym, B Degar, D Schiff, WE Janssen, B Triplett, CH Pui, W Leung, and Rubnitz JE. A phase II clinical trial of adoptive transfer of haploidentical natural killer cells for consolidation therapy of pediatric acute myeloid leukemia. *J Immunother Cancer.* 2019. **7**(1): p. 81.

23. Hong CS, P Sharma, SS Yerneni, P Simms, EK Jackson, TL Whiteside, and Boyiadzis M. Circulating exosomes carrying an immunosuppressive cargo interfere with cellular immunotherapy in acute myeloid leukemia. *Sci Rep*. 2017. **7**(1): p. 14684.
24. Zhang Q, R Iida, T Yokota, and Kincade PW. Early events in lymphopoiesis: an update. *Curr Opin Hematol*. 2013. **20**(4): p. 265-72.
25. Jagannathan-Bogdan M and Zon LI. Hematopoiesis. *Development*. 2013. **140**(12): p. 2463-7.
26. Geiger H, G de Haan, and Florian MC. The ageing haematopoietic stem cell compartment. *Nat Rev Immunol*. 2013. **13**(5): p. 376-89.
27. Charles A. Janeway PT, Walport M, Shlomchik MJ. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. 5 ed. Garland Science. 2001.
28. Orkin SH and Zon LI. Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell*. 2008. **132**(4): p. 631-44.
29. Cumano A and Godin I. Ontogeny of the hematopoietic system. *Annu Rev Immunol*. 2007. **25**: p. 745-85.
30. Lai AY and Kondo M. T and B lymphocyte differentiation from hematopoietic stem cell. *Semin Immunol*. 2008. **20**(4): p. 207-12.
31. Kondo M, DC Scherer, T Miyamoto, AG King, K Akashi, K Sugamura, and Weissman IL. Cell-fate conversion of lymphoid-committed progenitors by instructive actions of cytokines. *Nature*. 2000. **407**(6802): p. 383-6.
32. Barcena A, MO Muench, AH Galy, J Cupp, MG Roncarolo, JH Phillips, and Spits H. Phenotypic and functional analysis of T-cell precursors in the human fetal liver and thymus: CD7 expression in the early stages of T- and myeloid-cell development. *Blood*. 1993. **82**(11): p. 3401-14.
33. Kazen AR and Adams EJ. Evolution of the V, D, and J gene segments used in the primate gammadelta T-cell receptor reveals a dichotomy of conservation and diversity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011. **108**(29): p. E332-40.
34. Goldrath AW and Bevan MJ. Selecting and maintaining a diverse T-cell repertoire. *Nature*. 1999. **402**(6759): p. 255-62.
35. Hentges F. B lymphocyte ontogeny and immunoglobulin production. *Clin Exp Immunol*. 1994. **97 Suppl 1**: p. 3-9.

36. Busslinger M. Transcriptional control of early B cell development. *Annu Rev Immunol*. 2004. **22**: p. 55-79.
37. Perez-Andres M, B Paiva, WG Nieto, A Caraux, A Schmitz, J Almeida, RF Vogt, Jr., GE Marti, AC Rawstron, Zelm MC Van, Dongen JJ Van, Johnsen HE, Klein B, Orfao A; Primary Health Care Group of Salamanca for the Study of MBL. Human peripheral blood B-cell compartments: a crossroad in B-cell traffic. *Cytometry B Clin Cytom*. 2010. **78 Suppl 1**: p. S47-60.
38. Luciana Cavalleiro Marti NSB, Bento LC, Correia RP and Rocha FA. *Lymphoid Hematopoiesis and Lymphocytes Differentiation and Maturation*. in *Lymphocyte Updates - Cancer, Autoimmunity and Infection*. IntechOpen. 2017.
39. Wang LD and Clark MR. B-cell antigen-receptor signalling in lymphocyte development. *Immunology*. 2003. **110**(4): p. 411-20.
40. Kitamura D and Rajewsky K. Targeted disruption of mu chain membrane exon causes loss of heavy-chain allelic exclusion. *Nature*. 1992. **356**(6365): p. 154-6.
41. van Lochem EG, van der Velden VH, Wind HK, te Marvelde JG, Westerdal NA, and van Dongen JJ. Immunophenotypic differentiation patterns of normal hematopoiesis in human bone marrow: reference patterns for age-related changes and disease-induced shifts. *Cytometry B Clin Cytom*. 2004. **60**(1): p. 1-13.
42. Sandel PC and Monroe JG. Negative selection of immature B cells by receptor editing or deletion is determined by site of antigen encounter. *Immunity*. 1999. **10**(3): p. 289-99.
43. Ghia P, ten Boekel E, Rolink AG, and Melchers F. B-cell development: a comparison between mouse and man. *Immunol Today*. 1998. **19**(10): p. 480-5.
44. Wu Q, Zhang J, and Lucas D. Anatomy of Hematopoiesis and Local Microenvironments in the Bone Marrow. Where to? *Front Immunol*. 2021. **12**: p. 768439.
45. Verfaillie CM. Soluble factor(s) produced by human bone marrow stroma increase cytokine-induced proliferation and maturation of primitive hematopoietic progenitors while preventing their terminal differentiation. *Blood*. 1993. **82**(7): p. 2045-53.
46. Manz MG and Boettcher S. Emergency granulopoiesis. *Nat Rev Immunol*. 2014. **14**(5): p. 302-14.

47. Kittler EL, McGrath H, Temeles D, Crittenden RB, Kister VK, and Quesenberry PJ. Biologic significance of constitutive and subliminal growth factor production by bone marrow stroma. *Blood*. 1992. **79**(12): p. 3168-78.
48. Brandt J, Srouf EF, van Besien K, Briddell RA, and Hoffman R. Cytokine-dependent long-term culture of highly enriched precursors of hematopoietic progenitor cells from human bone marrow. *J Clin Invest*. 1990. **86**(3): p. 932-41.
49. Caldwell J, Palsson BO, Locey B, and Emerson SG. Culture perfusion schedules influence the metabolic activity and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor production rates of human bone marrow stromal cells. *J Cell Physiol*. 1991. **147**(2): p. 344-53.
50. Karpova D and Bonig H. Concise Review: CXCR4/CXCL12 Signaling in Immature Hematopoiesis--Lessons From Pharmacological and Genetic Models. *Stem Cells*. 2015. **33**(8): p. 2391-9.
51. Hunger SP, Lu X, Devidas M, Camitta BM, Gaynon PS, Winick NJ, Reaman GH, and Carroll WL. Improved survival for children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia between 1990 and 2005: a report from the children's oncology group. *J Clin Oncol*. 2012. **30**(14): p. 1663-9.
52. Larson RA, Anastasi J. *Acute Lymphoblastic Leukemia: Clinical Presentation, Diagnosis, and Classification*. In: *Hematologic Malignancies*. Springer: Berlin, Heidelberg. p. 109-116. 2008.
53. Alvarnas JC, Brown PA, Aoun P, Ballen KK, Barta SK, Borate U, Boyer MW, Burke PW, Cassaday R, Castro JE, Coccia PF, Coutre SE, Damon LE, DeAngelo DJ, Douer D, Frankfurt O, Greer JP, Johnson RA, Kantarjian HM, Klisovic RB, Kupfer G, Litzow M, Liu A, Rao AV, Shah B, Uy GL, Wang ES, Zelenetz AD, Gregory K, and Smith C. Acute Lymphoblastic Leukemia, Version 2.2015. *J Natl Compr Canc Netw*. 2015. **13**(10): p. 1240-79.
54. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, and Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018. **68**(6): p. 394-424.
55. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, and Bray F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and

- Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021. **71**(3): p. 209-249.
56. Başara BB, Soyutun Ç, Aygün İ, Özdemir A, Kulali TA, Yentür B, Uzun GK, Birge Kayış SB, Pekerçli B, Kara A, Ünal S, *T.C. Sağlık Bakanlığı Sağlık İstatistikleri Yıllığı 2020*. 2022.
 57. Schuz J and Erdmann F. Environmental Exposure and Risk of Childhood Leukemia: An Overview. *Arch Med Res*. 2016. **47**(8): p. 607-614.
 58. Zhou Y, Zhang S, Li Z, Zhu J, Bi Y, Bai Y, and Wang H. Maternal benzene exposure during pregnancy and risk of childhood acute lymphoblastic leukemia: a meta-analysis of epidemiologic studies. *PLoS One*. 2014. **9**(10): p. e110466.
 59. Onyije FM, Olsson A, Baaken D, Erdmann F, Stanulla M, Wollschlager D, and Schuz J. Environmental Risk Factors for Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: An Umbrella Review. *Cancers (Basel)*. 2022. **14**(2).
 60. Knudson AG. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1971. **68**(4): p. 820-3.
 61. Chernoff J. The two-hit theory hits 50. *Mol Biol Cell*. 2021. **32**(22): p. rt1.
 62. Iacobucci I and Mullighan CG. Genetic Basis of Acute Lymphoblastic Leukemia. *J Clin Oncol*. 2017. **35**(9): p. 975-983.
 63. McReynolds LJ and Savage SA. Pediatric leukemia susceptibility disorders: manifestations and management. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2017. **2017**(1): p. 242-250.
 64. Hamid GA. *Acute Leukemia Clinical Presentation*. in *Leukemia*. 2013. IntechOpen. p. 75-97.
 65. Sevilla DW, Colovai AI, Emmons FN, Bhagat G, and Alobeid B. Hematogones: a review and update. *Leuk Lymphoma*. 2010. **51**(1): p. 10-9.
 66. Hakeem A, Shiekh AA, Bhat GM, and Lone AR. Prognostification of ALL by Cytogenetics. *Indian J Hematol Blood Transfus*. 2015. **31**(3): p. 322-31.
 67. Synold TW, Relling MV, Boyett JM, Rivera GK, Sandlund JT, Mahmoud H, Crist WM, Pui CH, and Evans WE. Blast cell methotrexate-polyglutamate accumulation in vivo differs by lineage, ploidy, and methotrexate dose in acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Invest*. 1994. **94**(5): p. 1996-2001.

68. Pui CH, Crist WM, and Look AT. Biology and clinical significance of cytogenetic abnormalities in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1990. **76**(8): p. 1449-63.
69. Kolomietz E, Al-Maghrabi J, Brennan S, Karaskova J, Minkin S, Lipton J, and Squire JA. Primary chromosomal rearrangements of leukemia are frequently accompanied by extensive submicroscopic deletions and may lead to altered prognosis. *Blood*. 2001. **97**(11): p. 3581-8.
70. Hutchings Hoffmann M, Wirenfeldt Klausen T, Hasle H, Schmiegelow K, Brondum-Nielsen K, and Johnsen HE. Multiplex reverse transcription polymerase chain reaction screening in acute myeloid leukemia detects cytogenetically unrevealed abnormalities of prognostic significance. *Haematologica*. 2005. **90**(7): p. 984-6.
71. Chiaretti S, Zini G, and Bassan R. Diagnosis and subclassification of acute lymphoblastic leukemia. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2014. **6**(1): p. e2014073.
72. Proytcheva MA. *Leukemia and lymphoma immunophenotyping and cytogenetics*. in *Handbook of human immunology*. CRC Press. p. 221-251. 2008.
73. Bene MC, Castoldi G, Knapp W, Ludwig WD, Matutes E, Orfao A, and van't Veer MB. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia*. 1995. **9**(10): p. 1783-6.
74. Bene MC, Nebe T, Bettelheim P, Buldini B, Bumbea H, Kern W, Lacombe F, Lemez P, Marinov I, Matutes E, Maynadie M, Oelschlagel U, Orfao A, Schabath R, Solenthaler M, Tschurtschenthaler G, Vladareanu AM, Zini G, Faure GC, and Porwit A. Immunophenotyping of acute leukemia and lymphoproliferative disorders: a consensus proposal of the European LeukemiaNet Work Package 10. *Leukemia*. 2011. **25**(4): p. 567-74.
75. Nakano A, Harada T, Morikawa S, and Kato Y. Expression of leukocyte common antigen (CD45) on various human leukemia/lymphoma cell lines. *Acta Pathol Jpn*. 1990. **40**(2): p. 107-15.
76. Borowitz MJ, Guenther KL, Shults KE, and Stelzer GT. Immunophenotyping of acute leukemia by flow cytometric analysis. Use of CD45 and right-angle light

- scatter to gate on leukemic blasts in three-color analysis. *Am J Clin Pathol*. 1993. **100**(5): p. 534-40.
77. DiGiuseppe JA and Wood BL. Applications of Flow Cytometric Immunophenotyping in the Diagnosis and Posttreatment Monitoring of B and T Lymphoblastic Leukemia/Lymphoma. *Cytometry B Clin Cytom*. 2019. **96**(4): p. 256-265.
 78. Coustan-Smith E, Mullighan CG, Onciu M, Behm FG, Raimondi SC, Pei D, Cheng C, Su X, Rubnitz JE, Basso G, Biondi A, Pui CH, Downing JR, and Campana D. Early T-cell precursor leukaemia: a subtype of very high-risk acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet Oncol*. 2009. **10**(2): p. 147-56.
 79. Pui CH. *Childhood Leukemias*. 2006: Cambridge University Press.
 80. Lanzkowsky P. *Manual of pediatric hematology oncology*. 4 ed. 2005: Elsevier Academic Pres.
 81. Burgler S and Nadal D. Pediatric precursor B acute lymphoblastic leukemia: are T helper cells the missing link in the infectious etiology theory? *Mol Cell Pediatr*. 2017. **4**(1): p. 6.
 82. Bhojwani D and Pui CH. Relapsed childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet Oncol*. 2013. **14**(6): p. e205-17.
 83. Karol SE and Pui CH. Personalized therapy in pediatric high-risk B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Ther Adv Hematol*. 2020. **11**: p. 2040620720927575.
 84. Wang Z, Zhu S, Zhang G, and Liu S. Inhibition of autophagy enhances the anticancer activity of bortezomib in B-cell acute lymphoblastic leukemia cells. *Am J Cancer Res*. 2015. **5**(2): p. 639-50.
 85. Hellstrom A, Ley D, Hansen-Pupp I, Hallberg B, Ramenghi LA, Lofqvist C, Smith LE, and Hard AL. Role of Insulinlike Growth Factor 1 in Fetal Development and in the Early Postnatal Life of Premature Infants. *Am J Perinatol*. 2016. **33**(11): p. 1067-71.
 86. Chokkalingam AP, Metayer C, Scelo G, Chang JS, Schiffman J, Urayama KY, Ma X, Hansen HM, Feusner JH, Barcellos LF, Wiencke JK, Wiemels JL, and Buffler PA. Fetal growth and body size genes and risk of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Causes Control*. 2012. **23**(9): p. 1577-85.
 87. Zuckerman T and Rowe JM. Pathogenesis and prognostication in acute lymphoblastic leukemia. *F1000Prime Rep*. 2014. **6**: p. 59.

88. Sanchez-Beato M, Sanchez-Aguilera A, and Piris MA. Cell cycle deregulation in B-cell lymphomas. *Blood*. 2003. **101**(4): p. 1220-35.
89. Bowman RL, Busque L, and Levine RL. Clonal Hematopoiesis and Evolution to Hematopoietic Malignancies. *Cell Stem Cell*. 2018. **22**(2): p. 157-170.
90. Pui CH, Nichols KE, and Yang JJ. Somatic and germline genomics in paediatric acute lymphoblastic leukaemia. *Nat Rev Clin Oncol*. 2019. **16**(4): p. 227-240.
91. Lejman M, Chalupnik A, Chilimoniuk Z, and Dobosz M. Genetic Biomarkers and Their Clinical Implications in B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia in Children. *Int J Mol Sci*. 2022. **23**(5).
92. Schindler JW, Van Buren D, Foudi A, Krejci O, Qin J, Orkin SH, and Hock H. TEL-AML1 corrupts hematopoietic stem cells to persist in the bone marrow and initiate leukemia. *Cell Stem Cell*. 2009. **5**(1): p. 43-53.
93. Ford AM, Bennett CA, Price CM, Bruin MC, Van Wering ER, and Greaves M. Fetal origins of the TEL-AML1 fusion gene in identical twins with leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998. **95**(8): p. 4584-8.
94. El Fakih R, Jabbour E, Ravandi F, Hassanein M, Anjum F, Ahmed S, and Kantarjian H. Current paradigms in the management of Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukemia in adults. *Am J Hematol*. 2018. **93**(2): p. 286-295.
95. Forghieri F, Luppi M, and Potenza L. Philadelphia chromosome-positive Acute Lymphoblastic Leukemia. *Hematology*. 2015. **20**(10): p. 618-9.
96. Firtina S, Sayitoglu M, Hatirnaz O, Erbilgin Y, Oztunc C, Cinar S, Yildiz I, Celkan T, Anak S, Unuvar A, Devocioglu O, Timur C, Aydogan G, Akcay A, Atay D, Turkkan E, Karaman S, Orhaner B, Sarper N, Deniz G, and Ozbek U. Evaluation of PAX5 gene in the early stages of leukemic B cells in the childhood B cell acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res*. 2012. **36**(1): p. 87-92.
97. Zhang J, Wang J, Liu Y, Sidik H, Young KH, Lodish HF, and Fleming MD. Oncogenic Kras-induced leukemogenesis: hematopoietic stem cells as the initial target and lineage-specific progenitors as the potential targets for final leukemic transformation. *Blood*. 2009. **113**(6): p. 1304-14.
98. Irving J, Matheson E, Minto L, Blair H, Case M, Halsey C, Swidenbank I, Ponthan F, Kirschner-Schwabe R, Groeneveld-Krentz S, Hof J, Allan J, Harrison C, Vormoor J, von Stackelberg A, and Eckert C. Ras pathway

- mutations are prevalent in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia and confer sensitivity to MEK inhibition. *Blood*. 2014. **124**(23): p. 3420-30.
99. Toosi B, Zaker F, Alikarami F, Kazemi A, and Teremmahi Ardestanii M. VS-5584 as a PI3K/mTOR inhibitor enhances apoptotic effects of subtoxic dose arsenic trioxide via inhibition of NF-kappaB activity in B cell precursor-acute lymphoblastic leukemia. *Biomed Pharmacother*. 2018. **102**: p. 428-437.
 100. Luczynski W, Stasiak-Barmuta A, Krawczuk-Rybak M, and Malinowska I. Assessment of selected co-stimulatory, adhesion and activatory molecules and cytokines of Th(1)/Th(2) balance in acute lymphoblastic leukemia in children. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2005. **53**(4): p. 357-63.
 101. Horacek JM, Kupsa T, Vasatova M, Jebavy L, and Zak P. Evaluation of serum levels of multiple cytokines and adhesion molecules in patients with newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia using biochip array technology. *Exp Oncol*. 2013. **35**(3): p. 229-30.
 102. Ratei R, Schabath R, Karawajew L, Zimmermann M, Moricke A, Schrappe M, and Ludwig WD. Lineage classification of childhood acute lymphoblastic leukemia according to the EGIL recommendations: results of the ALL-BFM 2000 trial. *Klin Padiatr*. 2013. **225 Suppl 1**: p. S34-9.
 103. Coustan-Smith E, Behm FG, Sanchez J, Boyett JM, Hancock ML, Raimondi SC, Rubnitz JE, Rivera GK, Sandlund JT, Pui CH, and Campana D. Immunological detection of minimal residual disease in children with acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*. 1998. **351**(9102): p. 550-4.
 104. Kumar V, Fausto N, Aster JC. *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Diseases*. 8 ed. Saunders. 2010.
 105. Kruse A, Abdel-Azim N, Kim HN, Ruan Y, Phan V, Ogana H, Wang W, Lee R, Gang EJ, Khazal S, and Kim YM. Minimal Residual Disease Detection in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Int J Mol Sci*. 2020. **21**(3).
 106. Farahat N, Morilla A, Owusu-Ankomah K, Morilla R, Pinkerton CR, Treleaven JG, Matutes E, Powles RL, and Catovsky D. Detection of minimal residual disease in B-lineage acute lymphoblastic leukaemia by quantitative flow cytometry. *Br J Haematol*. 1998. **101**(1): p. 158-64.

107. Bartram J, Patel B, and Fielding AK. Monitoring MRD in ALL: Methodologies, technical aspects and optimal time points for measurement. *Semin Hematol*. 2020. **57**(3): p. 142-148.
108. Pfeifer H, Cazzaniga G, van der Velden VHJ, Cayuela JM, Schafer B, Spinelli O, Akiki S, Avigad S, Bendit I, Borg K, Cave H, Elia L, Reshmi SC, Gerrard G, Hayette S, Hermanson M, Juh A, Jurcek T, Chillon MC, Homburg C, Martinelli G, Kairisto V, Lange T, Lion T, Mueller MC, Pane F, Rai L, Damm-Welk C, Sacha T, Schnittger S, Touloumenidou T, Valerhaugen H, Vandenberghe P, Zuna J, Serve H, Herrmann E, Markovic S, Dongen J, and Ottmann OG. Standardisation and consensus guidelines for minimal residual disease assessment in Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia (Ph + ALL) by real-time quantitative reverse transcriptase PCR of e1a2 BCR-ABL1. *Leukemia*. 2019. **33**(8): p. 1910-1922.
109. Short NJ and Jabbour E. Minimal Residual Disease in Acute Lymphoblastic Leukemia: How to Recognize and Treat It. *Curr Oncol Rep*. 2017. **19**(1): p. 6.
110. Contreras Yametti GP, Ostrow TH, Jasinski S, Raetz EA, Carroll WL, and Evensen NA. Minimal Residual Disease in Acute Lymphoblastic Leukemia: Current Practice and Future Directions. *Cancers (Basel)*. 2021. **13**(8).
111. Pui CH, Yang JJ, Hunger SP, Pieters R, Schrappe M, Biondi A, Vora A, Baruchel A, Silverman LB, Schmiegelow K, Escherich G, Horibe K, Benoit YC, Izraeli S, Yeoh AE, Liang DC, Downing JR, Evans WE, Relling MV, and Mullighan CG. Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: Progress Through Collaboration. *J Clin Oncol*. 2015. **33**(27): p. 2938-48.
112. Group AI-B, *ALL IC-BFM 2009: A Randomized Trial of the I-BFM-SG for the Management of Childhood non-B Acute Lymphoblastic Leukemia*. 2009.
113. Borowitz MJ, Wood BL, Devidas M, Loh ML, Raetz EA, Salzer WL, Nachman JB, Carroll AJ, Heerema NA, Gastier-Foster JM, Willman CL, Dai Y, Winick NJ, Hunger SP, Carroll WL, and Larsen E. Prognostic significance of minimal residual disease in high risk B-ALL: a report from Children's Oncology Group study AALL0232. *Blood*. 2015. **126**(8): p. 964-71.
114. Campana D. Minimal residual disease monitoring in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Curr Opin Hematol*. 2012. **19**(4): p. 313-8.

115. van Dongen JJ, van der Velden VH, Bruggemann M, and Orfao A. Minimal residual disease diagnostics in acute lymphoblastic leukemia: need for sensitive, fast, and standardized technologies. *Blood*. 2015. **125**(26): p. 3996-4009.
116. van der Velden VH, Panzer-Grumayer ER, Cazzaniga G, Flohr T, Sutton R, Schrauder A, Basso G, Schrappe M, Wijkhuijs JM, Konrad M, Bartram CR, Masera G, Biondi A, and van Dongen JJ. Optimization of PCR-based minimal residual disease diagnostics for childhood acute lymphoblastic leukemia in a multi-center setting. *Leukemia*. 2007. **21**(4): p. 706-13.
117. van Dongen JJ, Seriu T, Panzer-Grumayer ER, Biondi A, Pongers-Willemse MJ, Corral L, Stolz F, Schrappe M, Masera G, Kamps WA, Gadner H, van Wering ER, Ludwig WD, Basso G, de Bruijn MA, Cazzaniga G, Hettinger K, van der Does-van den Berg A, Hop WC, Riehm H, and Bartram CR. Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia in childhood. *Lancet*. 1998. **352**(9142): p. 1731-8.
118. Berry DA, Zhou S, Higley H, Mukundan L, Fu S, Reaman GH, Wood BL, Kelloff GJ, Jessup JM, and Radich JP. Association of Minimal Residual Disease With Clinical Outcome in Pediatric and Adult Acute Lymphoblastic Leukemia: A Meta-analysis. *JAMA Oncol*. 2017. **3**(7): p. e170580.
119. Carobolante F, Chiaretti S, Skert C, and Bassan R. Practical guidance for the management of acute lymphoblastic leukemia in the adolescent and young adult population. *Ther Adv Hematol*. 2020. **11**: p. 2040620720903531.
120. Akyay A, Olcay L. Early and Late Side Effects of Acute Lymphoblastic Leukemia Therapy in Children. *Turkish Journal of Pediatric Disease*. 2014. **1**: p. 46-54.
121. Smith OP and Hann IM. *Clinical features and therapy of lymphoblastic leukemia*. in *Pediatric Hematology*. Oxford: Blackwell. p. 450-481. 2006.
122. Inaba H and Pui CH. Glucocorticoid use in acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet Oncol*. 2010. **11**(11): p. 1096-106.
123. Malczewska M, Kosmider K, Bednarsz K, Ostapinska K, Lejman M, and Zawitkowska J. Recent Advances in Treatment Options for Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancers (Basel)*. 2022. **14**(8).
124. Pui CH, Campana D, Pei D, Bowman WP, Sandlund JT, Kaste SC, Ribeiro RC, Rubnitz JE, Raimondi SC, Onciu M, Coustan-Smith E, Kun LE, Jeha S, Cheng

- C, Howard SC, Simmons V, Bayles A, Metzger ML, Boyett JM, Leung W, Handgretinger R, Downing JR, Evans WE, and Relling MV. Treating childhood acute lymphoblastic leukemia without cranial irradiation. *N Engl J Med*. 2009. **360**(26): p. 2730-41.
125. Gaynon PS, Trigg ME, Heerema NA, Sensel MG, Sather HN, Hammond GD, and Bleyer WA. Children's Cancer Group trials in childhood acute lymphoblastic leukemia: 1983-1995. *Leukemia*. 2000. **14**(12): p. 2223-33.
 126. Vrooman LM, Stevenson KE, Supko JG, O'Brien J, Dahlberg SE, Asselin BL, Athale UH, Clavell LA, Kelly KM, Kutok JL, Laverdiere C, Lipshultz SE, Michon B, Schorin M, Relling MV, Cohen HJ, Neuberg DS, Sallan SE, and Silverman LB. Postinduction dexamethasone and individualized dosing of Escherichia Coli L-asparaginase each improve outcome of children and adolescents with newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia: results from a randomized study--Dana-Farber Cancer Institute ALL Consortium Protocol 00-01. *J Clin Oncol*. 2013. **31**(9): p. 1202-10.
 127. Fagioli F, Quarello P, Zecca M, Lanino E, Rognoni C, Balduzzi A, Messina C, Favre C, Foa R, Ripaldi M, Rutella S, Basso G, Prete A, and Locatelli F. Hematopoietic stem cell transplantation for children with high-risk acute lymphoblastic leukemia in first complete remission: a report from the AIEOP registry. *Haematologica*. 2013. **98**(8): p. 1273-81.
 128. Kato M and Manabe A. Treatment and biology of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Int*. 2018. **60**(1): p. 4-12.
 129. Moricke A, Zimmermann M, Reiter A, Henze G, Schrauder A, Gadner H, Ludwig WD, Ritter J, Harbott J, Mann G, Klingebiel T, Zintl F, Niemeyer C, Kremens B, Niggli F, Niethammer D, Welte K, Stanulla M, Odenwald E, Riehm H, and Schrappe M. Long-term results of five consecutive trials in childhood acute lymphoblastic leukemia performed by the ALL-BFM study group from 1981 to 2000. *Leukemia*. 2010. **24**(2): p. 265-84.
 130. Schmiegelow K, Levinsen MF, Attarbaschi A, Baruchel A, Devidas M, Escherich G, Gibson B, Heydrich C, Horibe K, Ishida Y, Liang DC, Locatelli F, Michel G, Pieters R, Piette C, Pui CH, Raimondi S, Silverman L, Stanulla M, Stark B, Winick N, and Valsecchi MG. Second malignant neoplasms after

- treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol*. 2013. **31**(19): p. 2469-76.
131. Ishida Y, Maeda M, Urayama KY, Kiyotani C, Aoki Y, Kato Y, Goto S, Sakaguchi S, Sugita K, Tokuyama M, Nakadate N, Ishii E, Tsuchida M, Ohara A, and QOLcoTCsCS Group. Secondary cancers among children with acute lymphoblastic leukaemia treated by the Tokyo Children's Cancer Study Group protocols: a retrospective cohort study. *Br J Haematol*. 2014. **164**(1): p. 101-12.
 132. Essig S, Li Q, Chen Y, Hitzler J, Leisenring W, Greenberg M, Sklar C, Hudson MM, Armstrong GT, Krull KR, Neglia JP, Oeffinger KC, Robison LL, Kuehni CE, Yasui Y, and Nathan PC. Risk of late effects of treatment in children newly diagnosed with standard-risk acute lymphoblastic leukaemia: a report from the Childhood Cancer Survivor Study cohort. *Lancet Oncol*. 2014. **15**(8): p. 841-51.
 133. Raponi S, De Propriis MS, Intoppa S, Milani ML, Vitale A, Elia L, Perbellini O, Pizzolo G, Foa R, and Guarini A. Flow cytometric study of potential target antigens (CD19, CD20, CD22, CD33) for antibody-based immunotherapy in acute lymphoblastic leukemia: analysis of 552 cases. *Leuk Lymphoma*. 2011. **52**(6): p. 1098-107.
 134. Wei Q and Frenette PS. Niches for Hematopoietic Stem Cells and Their Progeny. *Immunity*. 2018. **48**(4): p. 632-648.
 135. de Vries JF, Zwaan CM, De Bie M, Voerman JS, den Boer ML, van Dongen JJ, and van der Velden VH. The novel calicheamicin-conjugated CD22 antibody inotuzumab ozogamicin (CMC-544) effectively kills primary pediatric acute lymphoblastic leukemia cells. *Leukemia*. 2012. **26**(2): p. 255-64.
 136. Guerra VA, Jabbour EJ, Ravandi F, Kantarjian H, and Short NJ. Novel monoclonal antibody-based treatment strategies in adults with acute lymphoblastic leukemia. *Ther Adv Hematol*. 2019. **10**: p. 2040620719849496.
 137. Zammarchi F, Corbett S, Adams L, Tyrer PC, Kiakos K, Janghra N, Marafioti T, Britten CE, Havenith CEG, Chivers S, D'Hooge F, Williams DG, Tiberghien A, Howard PW, Hartley JA, and van Berkel PH. ADCT-402, a PBD dimer-containing antibody drug conjugate targeting CD19-expressing malignancies. *Blood*. 2018. **131**(10): p. 1094-1105.

138. Burt R, Warcel D, and Fielding AK. Blinatumomab, a bispecific B-cell and T-cell engaging antibody, in the treatment of B-cell malignancies. *Hum Vaccin Immunother.* 2019. **15**(3): p. 594-602.
139. Turtle CJ, Hanafi LA, Berger C, Gooley TA, Cherian S, Hudecek M, Sommermeyer D, Melville K, Pender B, Budiarto TM, Robinson E, Steevens NN, Chaney C, Soma L, Chen X, Yeung C, Wood B, Li D, Cao J, Heimfeld S, Jensen MC, Riddell SR, and Maloney DG. CD19 CAR-T cells of defined CD4+:CD8+ composition in adult B cell ALL patients. *J Clin Invest.* 2016. **126**(6): p. 2123-38.
140. Maude SL, Frey N, Shaw PA, Aplenc R, Barrett DM, Bunin NJ, Chew A, Gonzalez VE, Zheng Z, Lacey SF, Mahnke YD, Melenhorst JJ, Rheingold SR, Shen A, Teachey DT, Levine BL, June CH, Porter DL, and Grupp SA. Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia. *N Engl J Med.* 2014. **371**(16): p. 1507-17.
141. Maude SL. Future directions in chimeric antigen receptor T cell therapy. *Curr Opin Pediatr.* 2017. **29**(1): p. 27-33.
142. Mohty M, Gautier J, Malard F, Aljurf M, Bazarbachi A, Chabannon C, Kharfan-Dabaja MA, Savani BN, Huang H, Kenderian S, Nagler A, and Perales MA. CD19 chimeric antigen receptor-T cells in B-cell leukemia and lymphoma: current status and perspectives. *Leukemia.* 2019. **33**(12): p. 2767-2778.
143. Maude SL, Laetsch TW, Buechner J, Rives S, Boyer M, Bittencourt H, Bader P, Verneris MR, Stefanski HE, Myers GD, Qayed M, De Moerloose B, Hiramatsu H, Schlis K, Davis KL, Martin PL, Nemecek ER, Yanik GA, Peters C, Baruchel A, Boissel N, Mechinaud F, Balduzzi A, Krueger J, June CH, Levine BL, Wood P, Taran T, Leung M, Mueller KT, Zhang Y, Sen K, Lebwohl D, Pulsipher MA, and Grupp SA. Tisagenlecleucel in Children and Young Adults with B-Cell Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med.* 2018. **378**(5): p. 439-448.
144. Curran KJ, Margossian SP, Kernan NA, Silverman LB, Williams DA, Shukla N, Kobos R, Forlenza CJ, Steinherz P, Prockop S, Boulad F, Spitzer B, Cancio MI, Boelens JJ, Kung AL, Khakoo Y, Szenes V, Park JH, Sauter CS, Heller G, Wang X, Senechal B, O'Reilly RJ, Riviere I, Sadelain M, and Brentjens RJ. Toxicity and response after CD19-specific CAR T-cell therapy in

- pediatric/young adult relapsed/refractory B-ALL. *Blood*. 2019. **134**(26): p. 2361-2368.
145. Maude SL, Teachey DT, Porter DL, and Grupp SA. CD19-targeted chimeric antigen receptor T-cell therapy for acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2015. **125**(26): p. 4017-23.
 146. Santomasso BD, Park JH, Salloum D, Riviere I, Flynn J, Mead E, Halton E, Wang X, Senechal B, Purdon T, Cross JR, Liu H, Vachha B, Chen X, DeAngelis LM, Li D, Bernal Y, Gonen M, Wendel HG, Sadelain M, and Brentjens RJ. Clinical and Biological Correlates of Neurotoxicity Associated with CAR T-cell Therapy in Patients with B-cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Discov*. 2018. **8**(8): p. 958-971.
 147. Rezvani K, Rouce R, Liu E, and Shpall E. Engineering Natural Killer Cells for Cancer Immunotherapy. *Mol Ther*. 2017. **25**(8): p. 1769-1781.
 148. Sheykhhasan M, Manoochehri H, and Dama P. Use of CAR T-cell for acute lymphoblastic leukemia (ALL) treatment: a review study. *Cancer Gene Ther*. 2022. **29**(8-9): p. 1080-1096.
 149. Biassoni R. Natural killer cell receptors. *Adv Exp Med Biol*. 2008. **640**: p. 35-52.
 150. Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, and Ugolini S. Functions of natural killer cells. *Nat Immunol*. 2008. **9**(5): p. 503-10.
 151. Brodin P, Lakshmikanth T, Johansson S, Karre K, and Hoglund P. The strength of inhibitory input during education quantitatively tunes the functional responsiveness of individual natural killer cells. *Blood*. 2009. **113**(11): p. 2434-41.
 152. Fauriat C, Long EO, Ljunggren HG, and Bryceson YT. Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition. *Blood*. 2010. **115**(11): p. 2167-76.
 153. Ciurea SO, Kongtim P, Soebbing D, Trikha P, Behbehani G, Rondon G, Olson A, Bashir Q, Gulbis AM, Indreshpal K, Rezvani K, Shpall EJ, Bassett R, Cao K, Martin AS, Devine S, Horowitz M, Pasquini M, Lee DA, and Champlin RE. Decrease post-transplant relapse using donor-derived expanded NK-cells. *Leukemia*. 2022. **36**(1): p. 155-164.
 154. Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, Perruccio K, Shlomchik WD, Tosti A, Posati S, Rogaia D, Frassoni F, Aversa F, Martelli MF, and Velardi A. Effectiveness of

- donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science*. 2002. **295**(5562): p. 2097-100.
155. Becker PS, Suck G, Nowakowska P, Ullrich E, Seifried E, Bader P, Tonn T, and Seidl C. Selection and expansion of natural killer cells for NK cell-based immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother*. 2016. **65**(4): p. 477-84.
 156. Handgretinger R, Lang P, and Andre MC. Exploitation of natural killer cells for the treatment of acute leukemia. *Blood*. 2016. **127**(26): p. 3341-9.
 157. Veluchamy JP, Kok N, van der Vliet HJ, Verheul HMW, de Gruijl TD, and Spanholtz J. The Rise of Allogeneic Natural Killer Cells As a Platform for Cancer Immunotherapy: Recent Innovations and Future Developments. *Front Immunol*. 2017. **8**: p. 631.
 158. Chan YLT, Zuo J, Inman C, Croft W, Begum J, Croudace J, Kinsella F, Maggs L, Nagra S, Nunnick J, Abbotts B, Craddock C, Malladi R, and Moss P. NK cells produce high levels of IL-10 early after allogeneic stem cell transplantation and suppress development of acute GVHD. *Eur J Immunol*. 2018. **48**(2): p. 316-329.
 159. Antar AI, Otroek ZK, Abou Dalle I, El-Cheikh J, and Bazarbachi A. Pharmacologic Therapies to Prevent Relapse of Acute Myeloid Leukemia After Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Front Oncol*. 2020. **10**: p. 596134.
 160. Marofi F, Al-Awad AS, Sulaiman Rahman H, Markov A, Abdelbasset WK, Ivanovna Enina Y, Mahmoodi M, Hassanzadeh A, Yazdanifar M, Stanley Chartrand M, and Jarahian M. CAR-NK Cell: A New Paradigm in Tumor Immunotherapy. *Front Oncol*. 2021. **11**: p. 673276.
 161. Liu S, Galat V, Galat Y, Lee YKA, Wainwright D, and Wu J. NK cell-based cancer immunotherapy: from basic biology to clinical development. *J Hematol Oncol*. 2021. **14**(1): p. 7.
 162. Lamb MG, Rangarajan HG, Tullius BP, and Lee DA. Natural killer cell therapy for hematologic malignancies: successes, challenges, and the future. *Stem Cell Res Ther*. 2021. **12**(1): p. 211.
 163. Chang YH, Connolly J, Shimasaki N, Mimura K, Kono K, and Campana D. A chimeric receptor with NKG2D specificity enhances natural killer cell activation and killing of tumor cells. *Cancer Res*. 2013. **73**(6): p. 1777-86.

164. Schmidt P, Raftery MJ, and Pecher G. Engineering NK Cells for CAR Therapy-Recent Advances in Gene Transfer Methodology. *Front Immunol.* 2020. **11**: p. 611163.
165. Heipertz EL, Zynda ER, Stav-Noraas TE, Hungler AD, Boucher SE, Kaur N, and Vemuri MC. Current Perspectives on "Off-The-Shelf" Allogeneic NK and CAR-NK Cell Therapies. *Front Immunol.* 2021. **12**: p. 732135.
166. Goldenson BH, Zhu H, Wang YM, Heragu N, Bernareggi D, Ruiz-Cisneros A, Bahena A, Ask EH, Hoel HJ, Malmberg KJ, and Kaufman DS. Umbilical Cord Blood and iPSC-Derived Natural Killer Cells Demonstrate Key Differences in Cytotoxic Activity and KIR Profiles. *Front Immunol.* 2020. **11**: p. 561553.
167. Bryceson YT, March ME, Ljunggren HG, and Long EO. Synergy among receptors on resting NK cells for the activation of natural cytotoxicity and cytokine secretion. *Blood.* 2006. **107**(1): p. 159-66.
168. Granzin M, Wagner J, Kohl U, Cerwenka A, Huppert V, and Ullrich E. Shaping of Natural Killer Cell Antitumor Activity by Ex Vivo Cultivation. *Front Immunol.* 2017. **8**: p. 458.
169. Boissel L, Betancur-Boissel M, Lu W, Krause DS, Van Etten RA, Wels WS, and Klingemann H. Retargeting NK-92 cells by means of CD19- and CD20-specific chimeric antigen receptors compares favorably with antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Oncoimmunology.* 2013. **2**(10): p. e26527.
170. Freud AG, Mundy-Bosse BL, Yu J, and Caligiuri MA. The Broad Spectrum of Human Natural Killer Cell Diversity. *Immunity.* 2017. **47**(5): p. 820-833.
171. Deng W, Gowen BG, Zhang L, Wang L, Lau S, Iannello A, Xu J, Rovis TL, Xiong N, and Raulet DH. Antitumor immunity. A shed NKG2D ligand that promotes natural killer cell activation and tumor rejection. *Science.* 2015. **348**(6230): p. 136-9.
172. Duan S, Guo W, Xu Z, He Y, Liang C, Mo Y, Wang Y, Xiong F, Guo C, Li Y, Li X, Li G, Zeng Z, Xiong W, and Wang F. Natural killer group 2D receptor and its ligands in cancer immune escape. *Mol Cancer.* 2019. **18**(1): p. 29.
173. Geiger TL and Sun JC. Development and maturation of natural killer cells. *Curr Opin Immunol.* 2016. **39**: p. 82-9.

174. Richards JO, Chang X, Blaser BW, Caligiuri MA, Zheng P, and Liu Y. Tumor growth impedes natural-killer-cell maturation in the bone marrow. *Blood*. 2006. **108**(1): p. 246-52.
175. Krneta T, Gillgrass A, Chew M, and Ashkar AA. The breast tumor microenvironment alters the phenotype and function of natural killer cells. *Cell Mol Immunol*. 2016. **13**(5): p. 628-39.
176. Riggan L, Shah S, and O'Sullivan TE. Arrested development: suppression of NK cell function in the tumor microenvironment. *Clin Transl Immunology*. 2021. **10**(1): p. e1238.
177. Swaminathan S, Hansen AS, Heftdal LD, Dhanasekaran R, Deutzmann A, Fernandez WDM, Liefwalker DF, Horton C, Mosley A, Liebersbach M, Maecker HT, and Felsher DW. MYC functions as a switch for natural killer cell-mediated immune surveillance of lymphoid malignancies. *Nat Commun*. 2020. **11**(1): p. 2860.
178. Ma S, Shi Y, Pang Y, Dong F, Cheng H, Hao S, Xu J, Zhu X, Yuan W, Cheng T, and Zheng G. Notch1-induced T cell leukemia can be potentiated by microenvironmental cues in the spleen. *J Hematol Oncol*. 2014. **7**: p. 71.
179. Casey SC, Amedei A, Aquilano K, Azmi AS, Benencia F, Bhakta D, Bilsland AE, Boosani CS, Chen S, Ciriolo MR, Crawford S, Fujii H, Georgakilas AG, Guha G, Halicka D, Helferich WG, Heneberg P, Honoki K, Keith WN, Kerkar SP, Mohammed SI, Niccolai E, Newsheem S, Vasantha Rupasinghe HP, Samadi A, Singh N, Talib WH, Venkateswaran V, Whelan RL, Yang X, and Felsher DW. Cancer prevention and therapy through the modulation of the tumor microenvironment. *Semin Cancer Biol*. 2015. **35 Suppl**: p. S199-S223.
180. Hino C, Pham B, Park D, Yang C, Nguyen MHK, Kaur S, Reeves ME, Xu Y, Nishino K, Pu L, Kwon SM, Zhong JF, Zhang KK, Xie L, Chong EG, Chen CS, Nguyen V, Castillo DR, and Cao H. Targeting the Tumor Microenvironment in Acute Myeloid Leukemia: The Future of Immunotherapy and Natural Products. *Biomedicines*. 2022. **10**(6).
181. Babor F, Manser AR, Fischer JC, Scherenschlich N, Enczmann J, Chazara O, Moffett A, Borkhardt A, Meisel R, and Uhrberg M. KIR ligand C2 is associated with increased susceptibility to childhood ALL and confers an elevated risk for late relapse. *Blood*. 2014. **124**(14): p. 2248-51.

182. Pastorczak A, Domka K, Fidyt K, Poprzeczko M, and Firczuk M. Mechanisms of Immune Evasion in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancers (Basel)*. 2021. **13**(7).
183. Parrado A, Casares S, and Rodriguez-Fernandez JM. Natural killer cytotoxicity and lymphocyte subpopulations in patients with acute leukemia. *Leuk Res*. 1994. **18**(3): p. 191-7.
184. Rouce RH, Shaim H, Sekine T, Weber G, Ballard B, Ku S, Barese C, Murali V, Wu MF, Liu H, Shpall EJ, Bollard CM, Rabin KR, and Rezvani K. The TGF-beta/SMAD pathway is an important mechanism for NK cell immune evasion in childhood B-acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2016. **30**(4): p. 800-11.
185. Lima DS, Lemes RPG, and Matos DM. Immunosuppressive monocytes (CD14(+)/HLA-DR(low/-)) increase in childhood precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia after induction chemotherapy. *Med Oncol*. 2018. **35**(3): p. 36.
186. Kinter AL, Godbout EJ, McNally JP, Sereti I, Roby GA, O'Shea MA, and Fauci AS. The common gamma-chain cytokines IL-2, IL-7, IL-15, and IL-21 induce the expression of programmed death-1 and its ligands. *J Immunol*. 2008. **181**(10): p. 6738-46.
187. Ahmadzadeh M, Johnson LA, Heemskerk B, Wunderlich JR, Dudley ME, White DE, and Rosenberg SA. Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired. *Blood*. 2009. **114**(8): p. 1537-44.
188. Quatrini L, Mariotti FR, Munari E, Tumino N, Vacca P, and Moretta L. The Immune Checkpoint PD-1 in Natural Killer Cells: Expression, Function and Targeting in Tumour Immunotherapy. *Cancers (Basel)*. 2020. **12**(11).
189. Iwai Y, Ishida M, Tanaka Y, Okazaki T, Honjo T, and Minato N. 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 U S A*. 2002. **99**(19): p. 12293-7.
190. Mendoza JL, Escalante NK, Jude KM, Sotolongo Bellon J, Su L, Horton TM, Tsutsumi N, Berardinelli SJ, Haltiwanger RS, Piehler J, Engleman EG, and Garcia KC. Structure of the IFNgamma receptor complex guides design of biased agonists. *Nature*. 2019. **567**(7746): p. 56-60.

191. Jorgovanovic D, Song M, Wang L, and Zhang Y. Roles of IFN-gamma in tumor progression and regression: a review. *Biomark Res.* 2020. **8**: p. 49.
192. Parker BS, Rautela J, and Hertzog PJ. Antitumour actions of interferons: implications for cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2016. **16**(3): p. 131-44.
193. Oft M. IL-10: master switch from tumor-promoting inflammation to antitumor immunity. *Cancer Immunol Res.* 2014. **2**(3): p. 194-9.
194. Gonzalez-Garza MT, Cruz-Vega DE, Maldonado-Bernal C. *IL-10 as Cancer Biomarker.* in *Translational Research in Cancer.* IntechOpen. p. 1-17. 2020.
195. Said EA, Dupuy FP, Trautmann L, Zhang Y, Shi Y, El-Far M, Hill BJ, Noto A, Ancuta P, Peretz Y, Fonseca SG, Van Grevenynghe J, Boulassel MR, Bruneau J, Shoukry NH, Routy JP, Douek DC, Haddad EK, and Sekaly RP. Programmed death-1-induced interleukin-10 production by monocytes impairs CD4⁺ T cell activation during HIV infection. *Nat Med.* 2010. **16**(4): p. 452-9.
196. Balkwill F. Tumour necrosis factor and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2009. **9**(5): p. 361-71.
197. Wang X and Lin Y. Tumor necrosis factor and cancer, buddies or foes? *Acta Pharmacol Sin.* 2008. **29**(11): p. 1275-88.
198. Kaplanski G. Interleukin-18: Biological properties and role in disease pathogenesis. *Immunol Rev.* 2018. **281**(1): p. 138-153.

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

PEDİATRİK B HÜCRELİ AKUT LENFOBLASTİK LÖSEMİ
OLGULARINDA KEMİK İLİĞİ HÜMORAL BİLEŞENLERİNİN
DOĞAL ÖLDÜRÜCÜ HÜCRELER ÜZERİNE ETKİSİ

ORJİNALLIK RAPORU

% 10	% 9	% 3	% 3
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 4
2	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	% 1
3	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Öğrenci Ödevi	% 1
4	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	<% 1
5	Submitted to Uludag University Öğrenci Ödevi	<% 1
6	thesesups.ups-tlse.fr İnternet Kaynağı	<% 1
7	Submitted to Florida International University Öğrenci Ödevi	<% 1
8	avesis.istanbul.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1