

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**

**YENİ TANI MULTİPL MİYELOM HASTALARINDA KEMİK İLİĞİNDE
CD4⁺CD25⁺ FoxP3⁺ PD-1⁺ REGÜLATÖR T HÜCRELERİN DÜZEYİNİN VE
PD-1, PD-L1 mRNA İFADESİNİN ARAŞTIRILMASI**

Deniz EKİNCİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

OCAK 2020

ANTALYA

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YENİ TANI MULTİPL MİYELOM HASTALARINDA KEMİK İLİĞİNDE
CD4⁺CD25⁺ FoxP3⁺ PD-1⁺ REGÜLATÖR T HÜCRELERİN DÜZEYİNİN VE
PD-1, PD-L1 mRNA İFADESİNİN ARAŞTIRILMASI**

Deniz EKİNCİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

**Bu Çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi
Tarafından (Proje No: FDK-2017-2382) Desteklenmiştir.**

OCAK 2020

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**YENİ TANI MULTİPL MİYELOM HASTALARINDA KEMİK İLİĞİNDE
CD4⁺CD25⁺ FoxP3⁺ PD-1⁺ REGÜLATÖR T HÜCRELERİN DÜZEYİNİN VE
PD-1, PD-L1 mRNA İFADESİNİN ARAŞTIRILMASI**

Deniz EKİNCİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

Bu tez 4/7/2020 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Oybirliği / ~~oyçokluğu~~ ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Aysun ÖZKAN (Danışmanı)



Prof. Dr. Kayahan FIŞKIN



Prof. Dr. Ayşe Gül MUTLU GÜLMEMİŞ



Doç. Dr. Mehmet Akif KILIÇ



Dr. Öğr. Üyesi Dilara AKÇORA YILDIZ



ÖZET

YENİ TANI MULTIPL MİYELOM HASTALARINDA KEMİK İLİĞİNDE CD4⁺CD25⁺ FoxP3⁺ PD-1⁺ REGÜLATÖR T HÜCRELERİN DÜZEYİNİN VE PD-1, PD-L1 mRNA İFADESİNİN ARAŞTIRILMASI

Deniz EKİNCİ

Doktora Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Aysun ÖZKAN

Ocak 2020; 91 Sayfa

Multipl miyelom (MM) habis bir plazma hücre kanseridir. Yeni tedavi seçenekleri ve kök hücre nakline rağmen hemen hemen her zaman hastalarda nüks gelişir. Gerek yeni tanı MM gerekse tedavi almış MM hastalarında regülatör T hücre (Treg) artışı kötü klinik seyir ile ilişkilendirilir. Tregler immün yanıtı baskılayan bir T hücre alt popülasyonudur. Programlanmış hücre ölümü proteini 1 (PD-1) sinyal yolağı Treg gelişimi ve fonksiyonunda önemli rol oynar. PD-1 bir immün kontrol noktası olarak kabul edilir ve hem antijene spesifik T hücrelerinde apoptoz indüklenmesi hem de Treg hücrelerinde apoptozu inhibe etme yoluyla otoimmün tepkilere karşı korur. MM'da PD-1 ve ligandı PD-L1'e yönelik inhibitör ilaçların kullanıldığı klinik çalışmaların sayısı hızla artmaktadır. MM'da bu klinik çalışmaların varlığına karşın kemik iliği mikroçevresinde Treg hücrelerinin dağılımı konusunda bilgiler yetersizdir. Çalışmada MM hastalarında kemik iliğindeki PD1⁺ Treg hücre dağılımları ve PD1/PD-L1 genleri ifade seviyelerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Çalışmada yeni tanılı 20 MM olgusu ve kontrol grubu olarak idyopatik trombositopenik purpura (İTP) ile takip edilen 9 olgu değerlendirilmiştir. Kemik iliği örneklerinden fikol ayrıştırma yöntemiyle elde edilen mononükleer hücrelerde CD4, CD25, Foxp3 ve PD1(CD279) proteinlerinin ifadesi akış sitometri yöntemiyle incelenmiştir. PD1 (PDCD1) ve PD-L1 (CD274) genleri mRNA ifadelerinin belirlenmesi amacıyla kemik iliği örneklerinden silika kolon yöntemi ile total RNA elde edilmiştir. Reverse transkriptaz PCR ile mRNA'dan cDNA sentezlenmiş ve kantitatif PCR yöntemi kullanılarak hedef genlerin göreceli ifade seviyeleri belirlenmiştir.

Çalışmada MM hastalarında PD-1 ve PD-L1 mRNA ifade seviyeleri daha yüksek düzeyde bulunmuştur. MM hastalarında CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺PD-1⁺ Treg hücreleri (%) ölçümleri daha yüksek düzeyde tespit edilmiştir. Hastaların evrelerine göre CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺PD-1⁺ Treg hücreleri (%) ve PD-1 mRNA ölçümlerinin farklı düzeylerde olmadığı görülmektedir. Hastaların evrelerine göre PD-L1 mRNA ölçümlerinin farklı düzeylerde olduğu ve farkın evre I olan hastaların PD-L1 mRNA

ölçümlerinin Evre II ve III hastalarına göre daha yüksek düzeylerde olmasından kaynaklandığı görülmüştür.

Bu çalışma yalnızca hasta tedavisinde terapötik seçeneklere kılavuzluk ettiği için değil aynı zamanda da bu ilaçlarla tedavi edilen hastalarda alınan yanıtı güçlendirme stratejilerini bulmak açısından da önemlidir.

ANAHTAR KELİMELEER: Multipl miyelom, PD-1, PD-L1, Treg

JÜRİ: Prof. Dr. Aysun ÖZKAN

Prof. Dr. Kayahan FİŞKIN

Prof. Dr. Ayşe Gül MUTLU GÜLMEMİŞ

Doç. Dr. Mehmet Akif KILIÇ

Dr. Öğr. Üyesi Dilara AKÇORA YILDIZ

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE LEVEL OF CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ PD-1⁺ REGULATOR T CELLS AND PD-1, PD-L1 mRNA EXPRESSION IN BONE MARROW IN NEW DIAGNOSIS MULTIPLE MYELOMA

Deniz EKİNCİ

PhD Thesis in Biology

Supervisor: Prof. Dr. Aysun ÖZKAN

January 2020; 91 Pages

Multiple myeloma (MM) is a cancer that plasma cells. In almost all patients may be develop relaps although new treatment options and stem cell transplantation. Increased regulatory T cell (Treg) has been associated with poor clinical outcome in which both newly diagnosed and treated MM patients. Treg cells are a T cell subgroup that suppressing immune response. Programmed cell death protein 1 (PD-1) signalling pathway play essential role in Treg function and development. PD-1 is accepted as an immune check point which protects against autoimmune responses by both inducing apoptosis in antigen-specific T cells and inhibiting apoptosis in Treg cells. In literature knowledge is insufficient about Treg cell distribution in the bone marrow microenvironment despite the presence of these clinical studies in MM. In this study, we aimed to investigate PD1⁺ Treg cell distribution and PD1/PD-L1 gene expression levels in MM patients bone marrow.

In the study, twenty patients newly diagnosed MM cases and as control group nine patients with Idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP) were included. Mononuclear cells were isolated from bone marrow by using density gradient centrifugation method. CD4, CD25, Foxp3 and PD1(CD279) protein expressions were evaluated flow cytometry on mononuclear cells. In order to determine mRNA expression of PD1 (PDCD1) and PD-L1 (CD274) genes, total RNA was obtained from bone marrow samples by silica column method. cDNA has been synthesized from mRNA through reverse transcriptase PCR. The relative expression levels of target genes were determined using the quantitative PCR method.

The study, PD-1 and PD-L1 mRNA expressions were higher in MM patients. CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺PD-1⁺Treg cells (%) measurements were found to be higher in MM patients. CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺PD-1⁺ Treg cell (%) and PD-1 mRNA levels were not being show difference according to stage of patients. PD-L1 mRNA expressions were different according to the stage of the patients and the difference was due to the higher levels of PD-L1 mRNA expression of the stage I patients compared to Stage II and III patients.

This study is important not only because it guides therapeutic options in patient treatment, but also in finding strategies to enhance response in patients treated with these drugs.

KEYWORDS : Multiple myeloma, PD-1, PD-L1, Treg

COMMITTEE : Prof. Dr. Aysun ÖZKAN

Prof. Dr. Kayahan FIŞKIN

Prof. Dr. Ayşe Gül MUTLU GÜLMEMİŞ

Assoc. Prof. Dr. Mehmet Akif KILIÇ

Asst. Prof. Dr. Dilara AKÇORA YILDIZ

ÖNSÖZ

Multipl miyelom (MM) hematolojik kanserlerin yaklaşık % 10'unu oluşturan, tüm kanserlerin yaklaşık % 1'ini temsil eden genetik olarak heterojen malign bir plazma hücresi hastalığıdır. Lenfomadan sonra en yaygın ikinci hematolojik malignitedir. Periferik kandaki CD4⁺ hücrelerin % 5-10 kadarı regülatör T hücreleridir. Kısaca Treg hücreleri olarak adlandırılır. Treg hücreleri immün homeostazinin sağlanmasında kanserde dahil inflamasyonda ve otoimmün hastalıklarda önemli rol oynar. Yapılan pek çok araştırmada MM'da Treg hücrelerinin artışı söz konusudur. PD-1 yolağı yardımcı T hücre popülasyonunu Treg hücre gelişimi yönünde uyarmaktadır. Özellikle Treg hücreleri PD-1, CTLA-4 ve LAG3 gibi kontrol noktası moleküllerinin çoğunu eksprese eder ve bu nedenle doğrudan immün kontrol noktası inhibitörlerinin immünoterapi hedefini temsil eder. Solid tümörlerden sonra Mayıs 2016'da FDA Hodgkin lenfomada nivolumab'ı (PD-1 inhibitörü) onaylamıştır. MM'da PD-1 ve ligandı PD-L1'e yönelik inhibitörlerin kullanıldığı klinik çalışmaların sayısı hızla artmaktadır. Buna paralel olarak hastalarda kemik iliği mikroçevresinde hem Treglerin hem de bu hücrelerin etkin kullandığı PD-1/PD-L1 mRNA ekspresyonuna yönelik araştırma alanındaki büyük eksiklik bizleri bu çalışmaya itmiştir.

Bu bağlamda planlanan tez çalışmamın sonuçlarının MM tedavisine katkıları olması dileğiyle başta öğrencisi olmaktan onur duyduğum, doktora eğitimim ve tez çalışmam süresince bilgi birikimi ve fikirleri ile her zaman yanımda olan danışmanım ve değerli hocam Sayın Prof.Dr. Aysun Özkan'a, doktora eğitimim ve tez çalışmam süresince göstermiş olduğu yakın ilgisi, desteği ve yol göstericiliği için Prof.Dr. Levent Ünder'a, Doç.Dr.Ozan Salim'e, tez deneylerimde tüm içtenlikleri ile destek veren değerli hocam Dr.Öğr. Üyesi Aslı Toylu'ya ve ekibine, değerli arkadaşım Biyolog Melike Ulubahşi'ye, yol arkadaşım, hayat paylaşanım, sevgili eşim Nurten Sayın Ekinci'ye, çocuklarım Tuna ve Batu Ekinci'ye, eğitimim süresince varlıkları için akıl hocam babam Murtaza Ekinci ve annem Sevil Ekinci'ye en içten teşekkürlerimi sunarım. Bu tezi FDK-2017-2382 nolu proje ile destekleyen Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimine de teşekkür ederim.

AKADEMİK BEYAN

Doktora Tezi olarak sunduğum ‘Yeni Tanı Multipl Miyelom Hastalarında Kemik İliğinde CD4⁺CD25⁺ FoxP3⁺ PD-1⁺ Regülatör T Hücrelerin Düzeyinin ve PD-1, PD-L1 mRNA İfadesinin Araştırılması’ adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

14.01/2020

Deniz EKİNCİ

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	iii
ÖNSÖZ	v
AKADEMİK BEYAN	vi
KISALTMALAR	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK TARAMASI	3
2.1. Multipl Miyelom	3
2.1.1. Multipl miyelom tanı kriterleri	3
2.1.2. Multipl miyelomda immünofenotipik özellikler	5
2.1.3. Multipl miyelomda saptanan genetik anormallikler	6
2.1.4. Multipl miyelomda kemik iliği mikro çevresi	6
2.1.5. Multipl miyelomda evreleme.....	7
2.1.6. Multipl miyelomda tedavi.....	9
2.2. İdyopatik Trombositopenik Purpura	10
2.3. Regülatör T Hücreler	10
2.3.1. Regülatör T hücrelerin etki mekanizması	13
2.4. PD-1 / PD-L1 Yolağı.....	16
3. MATERYAL VE METOD	19
3.1. Hasta ve Kontrol Gruplarının Tanımlanması	19
3.2. Multipl Miyelom Hastalarının Evrelendirilmesi	19
3.3. Kemik İliği Hücrelerinin Değerlendirilmesi	19
3.4. Akım (Flow) Sitometri Yöntemi	19
3.5. Gerçek Zamanlı (Real-Time) Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	21
3.5.1. RNA izolasyonu.....	21
3.5.2. cDNA sentezi.....	23
3.5.3. Kantitatif PCR	23
3.6. İstatistiksel Analiz	23
4. BULGULAR.....	25
4.1. Hasta ve Kontrol Grubunun Genel Özellikleri	25

4.2. Hasta ve Kontrol Grubunun Yaş ve Biyokimyasal Parametreler Dağılımı.....	27
4.3. Hasta ve Kontrol Gruplarında Treg Hücreleri (%) Düzeyleri	30
4.4. Hasta ve Kontrol Gruplarında Görelî PD-1 mRNA ve PD-L1 mRNA İfade Seviyelerinin Değerlendirilmesi	31
4.5. Hasta ve Kontrol Gruplarında Treg Hücreleri ve mRNA İlişkilerinin Değerlendirilmesi	33
4.6. Hastaların Evrelerine Göre Treg hücreleri (%) ve PD-1, PD-L1 mRNA İfade Seviyeleri.....	40
5. TARTIŞMA	44
6. SONUÇLAR	50
7. KAYNAKLAR	52
8. EKLER.....	62
ÖZGEÇMİŞ	

KISALTMALAR

AP-1	: Aktivatör protein 1
APC	: Antijen sunan hücreler
B-ALL	: B hücreli akut lenfoblastik lösemi
BATF	: Bazik lörin fermuar transkripsiyon faktörü benzeri
Blimp-1	: B lymphocyte-induced maturation protein-1
CTLA-4	: Cytotoxic T lymphocyte associated 4
DLBCL	: Diffüz büyük B hücreli lenfoma
FDA	: ABD gıda ve ilaç idaresi
FoxP3	: Forkhead winged helix P3
GITR	: Glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor family-related gene
HCC	: Hepatoselüler karsinom
HNSCC	: Baş ve boyun skuamöz hücreli karsinomu
ICAM-1	: Intercellular adhesion molecule 1
ICOS	: İndüklenebilir T hücre costimülatörü
IDO	: İndoleamine
IFN	: İnterferon
IGF	: İnsülin growth faktör
IL-10	: İnterlökin-10
IL-1 β	: İnterlökin-1 β
IL-2	: İnterlökin-2
IL-35	: İnterlökin-35
IL-6	: İnterlökin-6
ISS	: Uluslararası evreleme sistemi
ITP	: İdyopatik veya immün trombositopenik purpura
ITSM	: İmmüno-reseptör tirozine bazlı anahtar motifi
iTreg	: İndüklenmiş Treg hücreleri
KHDAK	: Küçük hücreli dışı akciğer kanseri
KLL	: Kronik lenfositik lösemi
KML	: Kronik miyeloid lösemi
LFA-1	: Lymphocyte function-associated antigen 1

MGUS	: Monoclonal gammopathy of undetermined significance
MHC	: Majör histokompatibilite molekülü
MIP1 α	: Makrofaj inflamatuvar protein 1 α
MM	: Multipl miyelom
NF- κ B	: Nükleer faktör-kB
nTreg	: Natural Treg hücreleri
PI3K	: Fosfoinositid 3-kinaz
pMHC I	: Peptid-MHC sınıf I kompleksi
RCC	: Renal hücreli karsinom
SCCHN	: Metastatik bir skuamöz hücreli karsinom formundan köken alan karsinom
SMM	: Smoldering multipl miyelom
SWOG	: Southwest oncology group
TCR	: T hücre reseptörü
Tfh	: Folliküler T hücreleri
TFs	: Transkripsiyon faktörleri
TGF- β	: Transforme edici büyüme faktörü- β
Th	: Yardımcı T
TNF- α	: Tümör nekrozis faktör α
Treg	: Regülatör T hücreleri
TSLP	: Timik stromal lenfoprotein
VEGF	: Vasküler endotelial growth faktör
VLA 4-5	: Very late antijen 4-5

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. İmmünglobulin molekülünün yapısı	5
Şekil 2.2. Miyelom mikro çevre ilişkisi	7
Şekil 2.3. Yardımcı T hücrelerin alt gruplara farklılaşması	12
Şekil 2.4. Treg hücreleri ile antijen sunan hücreler (APC) arasındaki etkileşim.....	14
Şekil 2.5. Regülatör T hücrelerin kanser hücreleri üzerine etki mekanizması.	16
Şekil 2.6. FDA onaylı PD-1/PD-L1 inhibitörleri için 2017 yılına kadar yapılan klinik çalışma sayısı.	17
Şekil 2.7. PD-1 sinyalizasyonu ve bağlanan partnerlerin çeşitliliği	18
Şekil 4.1. Hasta ve kontrol gruplarında Treg hücreleri (%) düzeyleri.....	31
Şekil 4.2. Hasta ve kontrol gruplarında görel PD-1 mRNA ve PD-L1 mRNA ifade seviyeleri	32
Şekil 4.3. Hasta ve kontrol gruplarında Treg hücreleri ve mRNA ilişkilerinin incelenmesi.....	34
Şekil 4.4. Hasta grubunda Treg hücreleri ve mRNA ilişkilerinin incelenmesi	36
Şekil 4.5. Kontrol grubundaTreg hücreleri ve mRNA ilişkilerinin incelenmesi	38
Şekil 4.6. Evrelere göre Treg hücreleri (%) ve PD-1, PD-L1 mRNA ifade seviyeleri...	41
Şekil 8.1. 1.Hasta K. Ç.'nin akış sitometri analiz görüntüsü	62
Şekil 8.2. 2.Hasta H.D.'nin akış sitometri analiz görüntüsü.....	63
Şekil 8.3. 3.Hasta N.K.'nın akış sitometri analiz görüntüsü.....	64
Şekil 8.4. 4.Hasta İ.Ü.'nün akış sitometri analiz görüntüsü	65
Şekil 8.5. 5.Hasta V.Ü.'nün akış sitometri analiz görüntüsü	66
Şekil 8.6. 6.Hasta F.Ü.'nün akış sitometri analiz görüntüsü.....	67
Şekil 8.7. 7.Hasta E.S.'nin akış sitometri analiz görüntüsü	68
Şekil 8.8. 8.Hasta Z.K.'nın akış sitometri analiz görüntüsü	69

Şekil 8.9. 9.Hasta S.A.'nin akış sitometri analiz görüntüsü	70
Şekil 8.10. 10.Hasta D.Ö.'nün akış sitometri analiz görüntüsü	71
Şekil 8.11. 11.Hasta S.G.'nin akış sitometri analiz görüntüsü	72
Şekil 8.12. 12.Hasta M.S.'nin akış sitometri analiz görüntüsü	73
Şekil 8.13. 13.Hasta A.T.'nin akış sitometri analiz görüntüsü	74
Şekil 8.14. 14.Hasta B.K.'nin akış sitometri analiz görüntüsü	75
Şekil 8.15. 15.Hasta F.L.'nin akış sitometri analiz görüntüsü	76
Şekil 8.16. 16.Hasta S.K.'nin akış sitometri analiz görüntüsü	77
Şekil 8.17. 17.Hasta E.K.'nin akış sitometri analiz görüntüsü	78
Şekil 8.18. 18.Hasta L.C.'nin akış sitometri analiz görüntüsü	79
Şekil 8.19. 19.Hasta C.K.'nin akış sitometri analiz görüntüsü	80
Şekil 8.20. 20.Hasta G.Y.'nin akış sitometri analiz görüntüsü	81
Şekil 8.21. 1.Hasta H.Ö.'nün akış sitometri analiz görüntüsü	82
Şekil 8.22. 2.Hasta Ş.Ç.'nin akış sitometri analiz görüntüsü	83
Şekil 8.23. 3.Hasta R.U.'nun akış sitometri analiz görüntüsü	84
Şekil 8.24. 4.Hasta K.K.'nin akış sitometri analiz görüntüsü	85
Şekil 8.25. 5.Hasta F.Ç.'nin akış sitometri analiz görüntüsü	86
Şekil 8.26. 6.Hasta M.Ç.'nin akış sitometri analiz görüntüsü	87
Şekil 8.27. 7.Hasta A.G.'nin akış sitometri analiz görüntüsü	88
Şekil 8.28. 8.Hasta S.B.'nin akış sitometri analiz görüntüsü	89
Şekil 8.29. 9.Hasta S.D.'nin akış sitometri analiz görüntüsü	90
Şekil 8.30. 10.Hasta S.F.'nin akış sitometri analiz görüntüsü	91

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Miyelomu MGUS ve SMM'den ayıran özellikler.....	3
Çizelge 2.2. Uluslararası miyelom çalışma grubunun (International Myeloma Working Group/IMWG) tedavi gerektiren multipl miyelom tanı kriterleri.....	4
Çizelge 2.3. Durie-Salmom evreleme sistemi	8
Çizelge 2.4. 'Southwest Oncology Group' (SWOG) evreleme sistemi.....	8
Çizelge 2.5. Miyelom için uluslararası evreleme sistemi (ISS).....	9
Çizelge 4.1. Hasta ve kontrol grubunun genel özellikleri.....	25
Çizelge 4.2. Hasta grubundaki (MM) alt tipler ve evreler	26
Çizelge 4.3. Hasta ve kontrol grubunun cinsiyet dağılımı	26
Çizelge 4.4. Hasta ve kontrol gruplarında yaş ve biyokimyasal parametreler.....	27
Çizelge 4.5. Hasta ve kontrol grupları arasında yaş ve biyokimyasal parametrelerin karşılaştırması	28
Çizelge 4.6. Hasta ve kontrol gruplarında Treg hücreleri (%) düzeyleri.....	30
Çizelge 4.7. Hasta ve kontrol gruplarında görelî PD-1 mRNA ve PD-L1 mRNA ifade seviyeleri	31
Çizelge 4.8. Hasta ve kontrol gruplarında Treg hücreleri ve mRNA ilişkilerinin incelenmesi.....	33
Çizelge 4.9. Hasta grubunda Treg hücreleri ve mRNA ilişkilerinin incelenmesi	35
Çizelge 4.10. Kontrol grubunda Treg hücreleri ve mRNA ilişkilerinin incelenmesi	37
Çizelge 4.11. Hasta grubu Treg hücreleri (%) ve mRNA ifade seviyelerinin MM biyokimyasal parametreleri ile ilişkisinin karşılaştırılması.....	39
Çizelge 4.12. Evrelere göre Treg hücreleri (%) ve PD-1, PD-L1 mRNA ifade seviyeleri	40
Çizelge 4.13. Multipl miyelom hastalarının biyokimyasal parametrelerle, Treg hücreleri (%) ve PD-1, PD-L1 mRNA ifade seviyelerine ait sonuçlar	42

Çizelge 4.14. Kontrol grubu (ITP) biyokimyasal parametrelerle, Treg hücreleri (%) ve PD-1, PD-L1 mRNA ifade seviyelerine ait sonuçlar	43
---	----

1. GİRİŞ

Multipl miyelom (MM) sitogenetik olarak heterojen bir klonal plazma hücresi proliferatif bozukluğudur. Hemen hemen her zaman "belirlenemeyen monoklonal gamopati" "(Monoclonal gammopathy of undetermined significance)" (MGUS) olarak adlandırılan klonal plazma hücre çoğalmasının asemptomatik premalign aşamasından gelişir. Klinik olarak heterojen bir hastalık olan MM genellikle tedavi gerektirmeyen premalign bir evre olan "asemptomatik (smoldering) multipl miyelom" (SMM) olarak adlandırılan ve tedavi gerektiren aktif MM olmak üzere sınıflandırılabilir (Rajkumar vd. 2014).

Periferik kandaki CD4⁺ hücrelerin %5-10 kadarı regülatör T hücreleridir. Kısaca Treg hücreleri olarak adlandırılır. Treg hücrelerinin primer işlevi başlangıçta kendi kendine toleransı koruyarak otoimmün hastalıkların önlenmesi olarak tanımlanmıştır. Treg hücrelerinin bağışıklık sisteminde gerçekte ne yaptığının sorusunun cevabı önemlidir. Treg fonksiyonlarını aşağıdaki gibi özetleyebiliriz;

1. İmmünolojik kendi kendine toleransı kurarak ve koruyarak otoimmün hastalıkların önlenmesi.
2. Alerji ve astımın baskılanması.
3. Diyet antijenlerine karşı toleransın indüksiyonu, yani oral tolerans.
4. Fetusa maternal tolerans indüksiyonu.
5. Patojen kaynaklı immünopatolojinin baskılanması.
6. İmmün cevabın efektör sınıfının düzenlenmesi.
7. Zayıf uyaranlarla tetiklenen T hücre aktivasyonunun baskılanması.
8. Bağışıklık tepkisi büyüklüğünün efektör T hücreleri tarafından geri bildirim kontrolü.
9. Kommensal bakterilerin bağışıklık sistemi tarafından elimine edilmesine karşı koruma.

Diğer taraftan patojenik durumlarda Treglerin azlığı otoimmün rahatsızlıklara neden olurken artışı kanser gelişimine veya var olan kanserin ilerlemesine neden olduğu düşünülmektedir (Corthay 2009).

Tregler immün yanıtları dendritik hücre (DC) fonksiyonunun veya olgunlaşmasının modülasyonu, inhibe edici sitokin salınımı, sitoliz ve metabolik bozulma ile baskılar (Kawai vd. 2018).

Programlanmış hücre ölümü proteini 1 (PD-1) 288 amino asit uzunluğunda tip 1 transmembran proteindir. T ve B lenfositler, dendritik hücreler, monositler ve makrofajlar da dâhil olmak üzere çeşitli immün hücrelerde ifade edilen CD28 ailesinden bir inhibitör reseptördür. T hücrelerinin aktivitesini baskılayarak ve Treglerin

farklılaşmasını teşvik ederek immün tepkilerin azaltılmasında ve kendi kendine toleransı arttırmada önemli bir rol oynar. PD-1 bir immün kontrol noktası olarak kabul edilir ve hem antijene spesifik T hücrelerinde apoptoz indüklenmesi hem de Treglerde apoptozu inhibe etme yoluyla otoimmün tepkilere karşı korur. PD-1 monoklonal antikollarını ve ayrıca diğer immün kontrol noktası blokajlarını uygulayan çeşitli klinik çalışmalar tümör immünoterapisinde çok iyi sonuçlar doğurmuş ve yeni ufuklar açmıştır (Ishida vd. 1992). PD-1'in ligandı PD-L1 (CD274, B7-H1) ve PD-L2 (CD273, B7-DC) antijen sunan hücreler üzerinde (makrofajlar ve dendritik hücreler), aktive edilmiş B hücrelerin bir alt kümesinde ve mikrovasküler endotelial hücrelerde ifade edilir. Ayrıca, PD-L1 çeşitli dokuların hücrelerinde (örneğin kalp, akciğer, karaciğer, pankreatik adacık hücreleri, astrositler) ifade edilir (Jelinek vd. 2017).

PD-1 ve PD-L1 inhibitörlerinin hematolojik kanserlerde klinik çalışma sayılarının artması MM Treg ilişkisinin daha da sorgulanmasını ve yeni araştırma stratejileri ve yeni parametrelerin geliştirilmesini gerektirmiştir. Literatürde MM hastalarında kemik iliğinde Treglerde PD-1 oranını gösteren sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. PD-L1 ekspresyonunun daha fazla analiz edilmesi MM'da PD-1 tedavisine tepkiyi değerlendirmekte faydalı olabilir. MM'da PD-1 ve PD-L1 inhibitörlerinin hızla artan klinik çalışmaları ile birlikte PD-1⁺ Treglerin aynı çalışmalara paralel olarak dâhil edilmesinin bu çalışmalardan faydalananak hastalara ışık tutabileceğini düşünüyoruz. Bir hastanın bu tedavilere yanıt verip vermeyeceğini hangi faktörlerin belirlediğini anlamak bu tedavilerin kullanımını geliştirmek için atılacak hayati öneme sahip bir sonraki adımdır. Mevcut çalışmalar ve gelecekteki çalışmalar bu göstergeleri ve onların göreceli önemini ele alacaktır. Bu çalışma yalnızca hasta tedavisinde terapötik seçeneklere kılavuzluk ettiği için değil aynı zamanda da bu ilaçlarla tedavi edilen hastalarda alınan yanıtı güçlendirme stratejilerini bulmak açısından da önemlidir.

2. KAYNAK TARAMASI

2.1. Multipl Miyelom

"Multipl miyelom (MM), plazma hücrelerinin malign bir hastalığıdır. Göreceli nadir bir hastalıktır. Tüm kanserlerin %1'ini ve hematolojik malign hastalıkların %10'unu oluşturur. Tanı anında ortalama yaş 66'dır. Hastaların yalnızca %2'sine 40 yaş altında tanı konulmaktadır. Genellikle klonal plazma hücre artışının asemptomatik premalign aşamasından (MGUS) gelişir. MGUS 50 yaşın üzerindeki nüfusun %3'ünden fazlasında bulunur ve miyeloma veya ilgili maligniteye yılda %1 oranında ilerleme kaydeder. Bazı hastalarda semptomatik olmayan ancak daha ileri premalign bir evre olan "asemptomatik (smoldering) multipl miyelom" (SMM) olarak adlandırılan klinik bulgular bilinmektedir (Kyle ve Rajkumar 2008). Yıllık olarak 2000 ABD nüfusuna göre ayarlanan miyelom insidansı 100000'de 4.3' tür. Miyelom ve MGUS, beyazlara göre siyahlarda iki kat daha fazla, erkeklerde ise kadınlardan iki kat daha fazladır (Kyle vd. 2006)".

2.1.1. Multipl miyelom tanı kriterleri

"Miyelom tanısı için serum ve/veya idrarda monoklonal protein, kemik iliğinde %10'un üzerinde atipik klonal plazma hücresi ve/veya klonal plazmositom olmalıdır. Bunların yanında hastalarda gözlemlenen kemik lezyonu, anemi, böbrek yetersizliği, hiperkalsemi gibi organ hasarını gösteren bulgulardan herhangi birinin varlığı yeterlidir. Çizelge 2.1'de miyelomu MGUS ve SMM'den ayıran özellikler özetlenmiştir. Çizelge 2.2'de uluslararası miyelom çalışma grubunun (International Myeloma Working Group/IMWG) tedavi gerektiren multipl miyelom tanı kriterleri özetlenmiştir (Durie vd. 2006)".

Çizelge 2.1. Miyelomu MGUS ve SMM'den ayıran özellikler (Durie vd. 2006)

Tanı Kriteri	MUGUS	SMM	MM
Serum M-protein	≤3 gr	>3 gr	var
İdrar M-protein	<1 gr/24 saat	+/-	+/-
Kemik iliği plazma hücresi	< % 10	>%10	>%10
Kemik lezyonu			
Anemi			
Böbrek yetersizliği	Yok	yok	var
Hiperkalsemi			

Çizelge 2.2. Uluslararası miyelom çalışma grubunun (International Myeloma Working Group/IMWG) tedavi gerektiren multipl miyelom tanı kriterleri (Durie vd. 2006)

Serum ve/veya idrarda M protein ve ilikte klonal plazma hücreleri ve /veya dökümanite edilmiş plazmositom ve aşağıdakilerden bir ya da fazlası

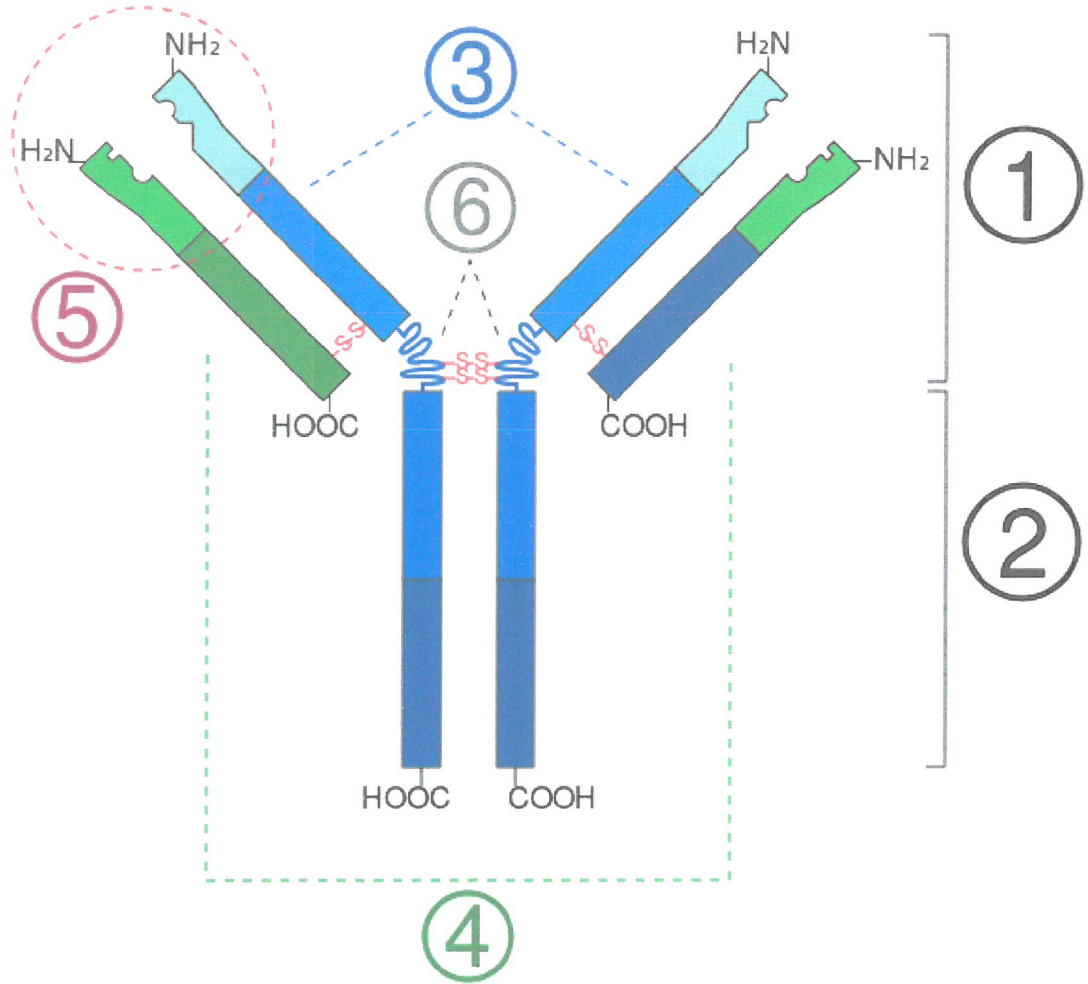
Hiperkalsemi (>11.5 mg/dl - >2.65 mmol/L)

Renal yetersizlik (kreatinin > 2 mg/dl - > 177 mmol/L)

Anemi (<10 gr/dl ya da normalden 2 gr/dl düşük)

Kemik hastalığı (litik lezyonlar ya da osteopeni)

Miyelom hastalarının karakteristik özelliği monoklonal proteinin üretilmesi ve bunun kan ve/veya idrara salınmasıdır. Monoklonal protein ya bir immünglobulindir ya da bir immünglobulin parçasıdır. Miyelom hücrelerinde immünglobulin üretiminden sorumlu genlerde bir ya da daha fazla mutasyon meydana gelmektedir. Bir immünglobulinin molekül yapısı şekil 2.1.'de gösterildiği gibidir. Miyelomda meydana gelen mutasyonlara ayrıca değinilecektir. Hatalı üretilen immünglobulin hafif zincirleri Bence Jones proteinleri olarak adlandırılır. Bence Jones proteinleri çapraz bağlar yaparak böbrek, sinirler veya kalp dokusu gibi çeşitli dokularda depolanır ve miyelom hastalarında amiloidoz olarak isimlendirilen hastalık durumu ortaya çıkar. Miyelom hücreleri tarafından üretilen monoklonal protein miktarı hastalara göre oldukça değişkenlik göstermektedir. Monoklonal protein miktarı ile kemik iliğindeki miyelom tümör yükünü anlamak mümkün olmaktadır. Monoklonal proteinin varlığı serum ve idrar protein elektroforezi yöntemi ile ortaya çıkarılır (Kyle 1975; Kyle vd. 2003).



Şekil 2.1. İmmünglobulin molekülünün yapısı

1. Fab bölgesi, 2. Fc bölgesi, 3. Bir değişken (V H) alanına sahip ağır zincir (mavi), ardından bir sabit alan (C H 1), bir menteşe bölgesi ve iki daha sabit (C H 2 ve C H 3) alanlar, 4. Bir değişken (V L) ve bir sabit (C L) alanlı hafif zincir (yeşil), 5. Antijen bağlanma yeri (paratop), 6. Menteşe bölgeleri.

(https://en.wikipedia.org/wiki/Antibody#/media/File:Immunoglobulin_basic_unit.svg)

2.1.2. Multipl miyelomda immünfenotipik özellikler

İmmünfenotipik değerlendirme miyelomda tanı için çok değerli veri sağlamaktadır. İmmünohistokimya ve akış sitometri metodları değerlendirme amaçlı kullanılmaktadır. Fakat rutinde daha çok akış sitometri metodu kullanılmaktadır. Multipl miyelomda akış sitometri ile değerlendirmede CD38, CD138 antikorlarının pozitifliği, CD19 negatifliği ve CD56 aberran pozitifliği görülür. CD56 negatifliği lösemik transformasyon ihtimalinin daha yüksek görülmesi nedeniyle olumsuz

prognostik faktördür. Miyelom hücrelerinde seyrek olarak CD10, CD28 ve c-kit pozitifliği görülebilir (Supkanichant vd. 1994).

2.1.3. Multipl miyelomda saptanan genetik anormallikler

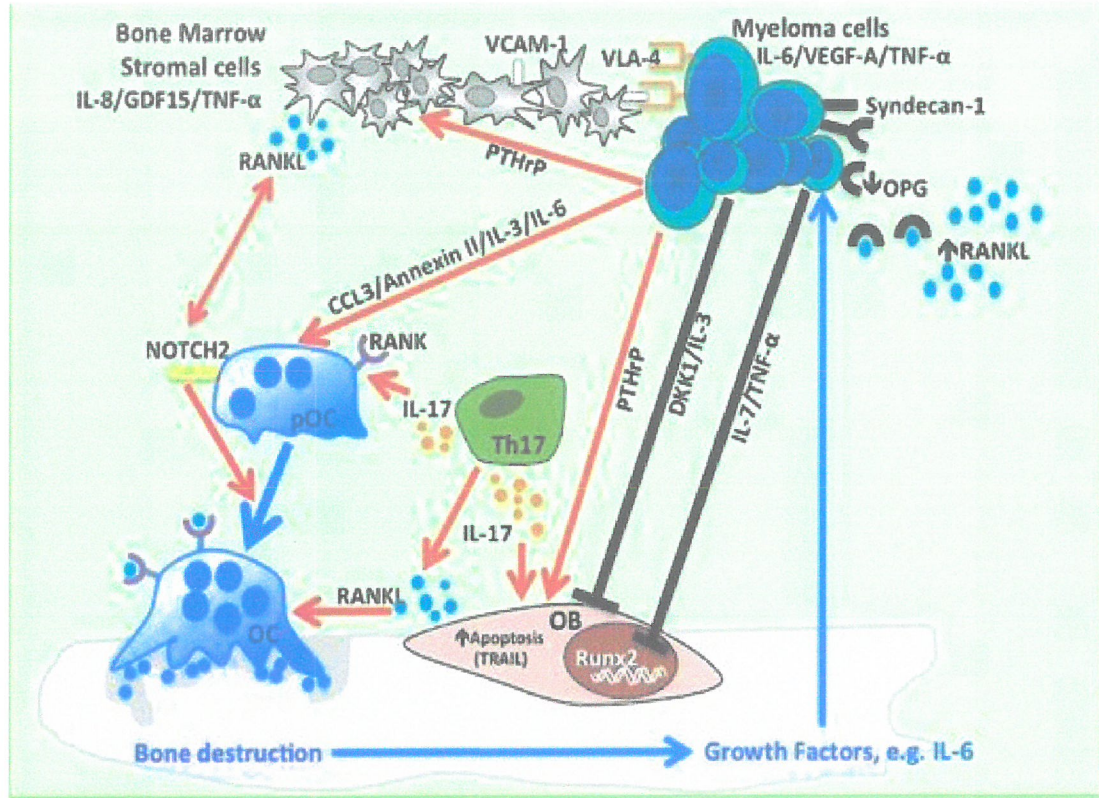
B hücre kökenli malignitelerde olduğu gibi miyelom plazma hücreleri de germinal merkez veya post germinal merkez kaynaklı hücrelerdir. Miyelom patogenezinde cyclin-d ifadesinde artış, P 16 ve P 15 hipermutasyonu, ras mutasyonu, c-myc aşırı ifadesi gibi hücre döngüsünü ilgilendiren genlerde değişiklikler görülür. Miyelomda saptanan genetik anormalliklerin başlıcaları 1., 13., 14. ve 17. kromozomlarda gözlemlenmektedir. Hastaların yarısından fazlasında Ig ağır zincir lokusunu ilgilendiren kromozomda (14q32) translokasyonlar görülmektedir. P 53 geninde (17p13) meydana gelen mutasyonlar da hastalarda görülen genetik anormallikler arasındadır. Del 13q ve t(4:14) tüm tedavi seçenekleri ile kötü prognoz gösterir. P 53 gen kaybı da kötü prognostik anomalidir (Avet vd. 2002; Bergsagel ve Kuehl 2005).

2.1.4. Multipl miyelomda kemik iliği mikro çevresi

Miyelom plazma hücreleri için en önemli büyüme faktörü interlökin-6 (IL-6) dır. IL-6'nın en önemli kaynağı mikro çevre stromal hücreleridir. Miyelom hücrelerinden salınan başlıca faktörler interlökin-1 β (IL-1 β), makrofaj inflamatuvar protein 1 α (MIP1 α), vasküler endotelial growth faktör (VEGF), insülin growth faktör (IGF), tümör nekrosis faktör α (TNF- α) ve IL-6'dır. Bu sitokinlerin tamamı stromal hücreleri IL-6 yapımı için uyarır. Miyelom hücrelerinden salınan VEGF anjiyogeneze neden olur. Ayrıca adezyon molekülleri CD56, very late antijen 4-5 (VLA 4-5) ve β 1 integrin ile hem kendilerine hem de stromal hücrelere tutunurlar. Adezyon moleküllerinden β 1 integrin, MIP1 α ve IL-1 β ile osteoklast aktivitesini artırır ve kemik lezyonlarına neden olur. Miyelom mikro çevre ilişkisi Şekil 2.2' de özetlenmiştir (Bingham vd. 2017).

Kemik iliğindeki uzun ömürlü plazma hücreleri enfeksiyon veya aşılama sonras kritik bir antikör kaynağıdır. Sistemik enfeksiyonun kemik iliğini değiştirdiğini, plazma hücreleri ve kemik iliğinde bağışıklığa katkıda bulunan bir popülasyon olan Treg hücrelerini büyük ölçüde azalttığı gösterilmiştir (Zaretsky vd. 2017).

Raja ve arkadaşları malign öncesi ve malign miyelom hastalarında periferik kan ve kemik iliği örneklerini çalışmışlar ve de artmış Treg ifadesinin kötü klinik seyrin ve progresyon tahmininde kullanılabileceğini göstermişlerdir (Raja vd. 2012). Braga ve arkadaşları Tregleri miyelom hastalarında kemik iliğinde incelemiştir. Kontrollere göre MM hastalarında FoxP3 ifadesi 6 kat yüksek bulunmuştur (Braga vd. 2014). Bu durum MM'da Treglerin kemik iliğinde lokal birikimini desteklemektedir.



Şekil 2.2. Miyelom mikro çevre ilişkisi (Bingham vd. 2017)

2.1.5. Multipl miyelomda evreleme

Multipl miyelomda prognoz hastalığın tanı sırasındaki evresiyle tanımlanır. Hastalığın evrelendirilmesi tedavi stratejisi geliştirmeye olanak sağlar. Hastalık evresi belirlemede amaç basittir. Hekimler tarafından kullanım kolaylığı olan, tedavi yaklaşımını yönlendirecek ortak dil oluşturmaktır. Multipl miyelomda bu nedenle en sık kullanılan evreleme sistemi 1975 yılında Durie ve Salmom tarafından ortaya konulan Durie-Salmom evrelendirme sistemidir. Durie-Salmom evreleme sistemi Çizelge 2.3’de özetlenmiştir (Durie ve Salmon 1975). 2003 yılında ‘Southwest Oncology Group’ (SWOG) evreleme sistemi ortaya konmuştur. Daha önce tedavi almamış 1555 miyelom hastası çalışmaya dahil edilmiştir. SWOG evreleme sistemi Çizelge 2.4’de özetlenmiştir (Jacobson vd. 2003). Son olarak uluslararası miyelom çalışma grubu 10750 hastayı analiz ederek 2005 yılında bir evreleme çalışması yapmıştır. Miyelom için uluslararası evreleme sistemi Çizelge 2.5.’te özetlenmiştir (Greipp vd. 2005).

Çizelge 2.3. Durie-Salmom evreleme sistemi (Durie ve Salmon 1975)

Evre	Kriterler
Evre I	Hemoglobin >10 g/dL Serum kalsiyum düzeyi normal sınırlarda Kemik taramasında osteoporoz dahil normal sınırlarda M-Protein düzeyi düşük (IgG <5 g/dL, IgA <3 g/dl, idrar hafif zinciri <4g/gün)
Evre II	Evre 1 ve Evre 2'ye uymayanlar
Evre III	Hemoglobin <8,5 g/dL Serum kalsiyum düzeyi artmış Yaygın iskelet hasarı (3'ten fazla litik lezyon) ve majör kırık M-protein düzeyi yüksek (IgG >7 g/dL, IgA >5 g/dl, idrar hafif zinciri >12g/gün)

A: Serum kreatinin düzeyi < 2 mg/dL, B: Serum kreatinin düzeyi > 2mg/dL

Çizelge 2.4. 'Southwest Oncology Group' (SWOG) evreleme sistemi (Jacobson vd. 2003)

Evre	Hastaların oranı	Kriter	Sağkalım (ay)
1	%14	Sβ2M < 2,5 mg/l	55
2	%43	2,5 ≤ Sβ2M < 5,5 mg/L	40
3	%32	Sβ2M ≥ 5,5 mg/l ve albumin ≥ 3,0 g/dl	24
4	%11	Sβ2M ≥ 5,5 mg/l ve albumin < 3,0 g/dl	16

Sβ2M: Serum β2 mikroglobulin

Çizelge 2.5. Miyelom için uluslararası evreleme sistemi (ISS) (Greipp vd. 2005)

Evre	Hastaların oranı	Kriter	Sağkalım (ay)
1	%28,5	Sβ2M<3,5 mg/l ve albumin ≥3,5 g/dl	62
2	%37,5	Sβ2M<3,5 mg/l ve albumin <3,5 g/dl veya serum albuminine bakılmaksızın Sβ2M 3,5 - < 5,5 mg/l	44
3	%33,6	Sβ2M ≥5,5 mg/l	29

2.1.6. Multipl miyelomda tedavi

Multipl miyelomda kemoterapi kombinasyonları ve yüksek doz melfalan tedavisi hastaların sağ kalım oranlarını arttırmıştır. Ancak neredeyse tüm hastalarda tam yanıt elde edilenlerde dahil hastalık nüksü kaçınılmazdır. Henüz küratif bir tedavi geliştirilememiştir. Otolog kök hücre nakli öncesinde kullanılacak tedavi rejimleri; bortezomib ve deksametazon kombinasyonu (VD), bortezomib, siklofosfamid ve deksametazon kombinasyonu (VCD), bortezomib, doksorubisin ve deksametazon kombinasyonu (PAD), bortezomib, talidomid ve deksametazon kombinasyonu (VTD), siklofosfamid, talidomid ve deksametazon kombinasyonu (CTD), talidomid, doksorubisin ve deksametazon kombinasyonu (TAD) ve vinkristin, doksorubisin ve deksametazon kombinasyonu (VAD) olarak özetlenebilir (Ludwig vd. 2012 ; Garderet vd. 2012). Lenalidomid miyelom tedavisinde immunomodülatör ilaçlar grubundan tedavide kullanılmaya başlanan ikinci ilaçtır. Bağışıklık sistemindeki hücreleri aktive etme kapasitesi talidomidten çok daha fazladır. Bunun yanında nöropati ve sedasyon gibi yan etkileri çok daha azdır. Lenalidomid nüks etmiş hastaların tedavisinde deksametazon ile beraber kullanılır (Rd kombinasyonu). Lenalidomid ve deksametazona klasik kemoterapi ilaçları eklenip remisyon oranı daha da arttırılabilir (Knop vd. 2009). Pomalidomid immünmodülatuvar etkili yeni kullanıma girmiş bir diğer ajandır. Etki mekanizması kaspaz aktivasyonu, siklus aresti, tümör hücre apoptozu, stromal hücrelerin sağladığı desteğin azalması, T ve NK hücrelerinin aktivasyonunu içerir. Pomalidomid, lenalidomid ve bortezomib dahil en az iki tedavi almış ve son tedavisinde hastalık progresyonu göstermiş, relaps ve refrakter multipl miyelomda deksametazon ile kombine edilerek kullanılır (Lacy ve McCurdy 2013; Miguel vd. 2013).

Multipl miyelomda yüksek doz kemoterapi ve otolog kök hücre nakli standart tedavi olarak uygulanmaktadır. Multipl miyelom en yaygın kök hücre nakli yapılan hastalıktır. Nakil öncesi tümör yükünü azaltmak için yaklaşık dört kür indüksiyon tedavisi uygulanır. Hematopoietik rejenerasyonun gerçekleşmesi için nakil başına 2 x

10^6 CD34+ / kg otolog kök hücre gereklidir. Kök hücre toplandıktan sonra yüksek doz kemoterapi 200 mg/ m² melfalan olarak verilir (Baldomero vd. 2011).

Multipl miyelomda anemi önemli bir sorundur. Aneminin düzeltilmesinde transfüzyon, eritropoetin, demir, vitamin B12 ve folik asit kullanılır. Enfeksiyon riskine karşı ise mutlaka grip, influenza, pnömokok, menengokok aşılarını yapmak ve sık enfeksiyon geçiren hastalarda intravenöz immünglobulin (0.4 gr/kg/ay) uygulamak gerekir. Hiperviskozite sendromunda plazmaferez yapılabilir (Rajkumar ve Kyle 2005; Harousseau vd. 2004). Kemik lezyonlarının tedavisi osteoklast inhibitörleri bifosfanatlar, radyoterapi, analjezikler ve kifoplasti operasyonları ile yapılır. Klodronat, zoledronat ve pamidronat miyelomda kullanılan bifosfanatlardır. Yan etkileri renal toksisite, hipokalsemi ve mandibüler osteonekrozdur (Yeh ve Berenson 2006).

2.2. İdyopatik Trombositopenik Purpura

"İdyopatik veya immün trombositopenik purpura (ITP) immün sistemin trombositleri yabancı olarak görüp işaretlemesi ve imha etmesi sonucu oluşan bir hastalıktır. ITP düşük trombosit sayılarıyla karakterize (periferik kan trombosit $<100 \times 10^9 / L$) kompleks bir otoimmün hastalıktır. Antikor aracılı ve / veya T hücre aracılı trombosit yıkımının anahtar süreç olmasına rağmen, ITP patogenezi belirsizliğini korumaktadır. Buna ek olarak, T hücrelerinde dengesizlik, sitokin dengesizlikleri ve kemik iliği nişinin katkısı artık önemli olarak kabul edilmiştir. Hem yetişkinlerde hem de çocuklarda görülebilir. Her iki cinsiyet de etkilenir. Bununla birlikte, pediatrik ITP'nin yetişkin ITP'ye kıyasla altında yatan mekanizmaları farklı olabilir. Başka bir hastalık bulunamayan bir kişide kanda trombosit oranı düşük olduğu halde, kemik iliğinde anormal hücreler görülmemesi ve megakaryositlerin bulunması ile ITP tanısı konur. Trombosit sayısı 50.000/mm³ altına düşmedikçe genellikle klinik bir belirti vermez. Bu değerin altında olduğunda darbelerden sonra çabuk morarma meydana gelebilir. Trombosit sayısı 30.000/mm³ altına indiğinde kendiliğinden diş eti, burun kanamaları ortaya çıkabilir. Kadın hastalarda uzamış adet kanamaları görülebilir. Trombosit 10.000/mm³ ve altında olduğunda kendiliğinden ciltte nokta şeklinde veya geniş morartılar şeklinde kanamalar görülebilir. Başka hastalıkların seyrinde de (sistemik lupus eritematozus-SLE, lenfoma, hepatit ve HIV virüsü ile oluşan enfeksiyonlar gibi) ortaya çıkabilir. Tedavide kortikosteroid ilaçlar (kortizon), intravenöz immünglobulin, Anti-D kullanılır. İlaçlarla kalıcı bir etki elde edilemezse ve uzun süreli, sık, ciddi kanaması olan olgularda bazı özel şartlar altında, trombositlerin başlıca parçalandığı yer olan dalağın çıkartılması gerekebilir (Liu ve Hou 2016)".

2.3. Regülatör T Hücreler

Regülatör T hücreleri (Treg), immün yanıtı baskılayan, böylece homeostazi ve kendi kendine toleransı koruyan özel bir T hücre alt popülasyonudur. Treglerin T hücresi proliferasyonunu ve sitokin üretimini inhibe edebildiği ve otoimmüniteyi önlemede kritik bir rol oynadığı gösterilmiştir. (Joshua vd. 2008 ; Belkaid 2007). Treg hücreleri ilk kez 1970 yılında baskılayıcı hücreler olarak tanımlanmıştır. 1995 yılında Sakaguchi'nin interlökin-2 (IL-2) reseptörü α zincirinin CD4⁺ Treg hücreler için fenotipik bir belirteç olduğunu bulmasıyla birlikte Tregler üzerine olan çalışmalar hızla artmıştır. Treg hücreleri esas olarak FoxP3 "(forkhead winged helix P3)" + CD4⁺CD25⁺ fenotipi sergileyen bir T hücre alt grubudur. Bununla birlikte FoxP3 ekspresyonu yapan

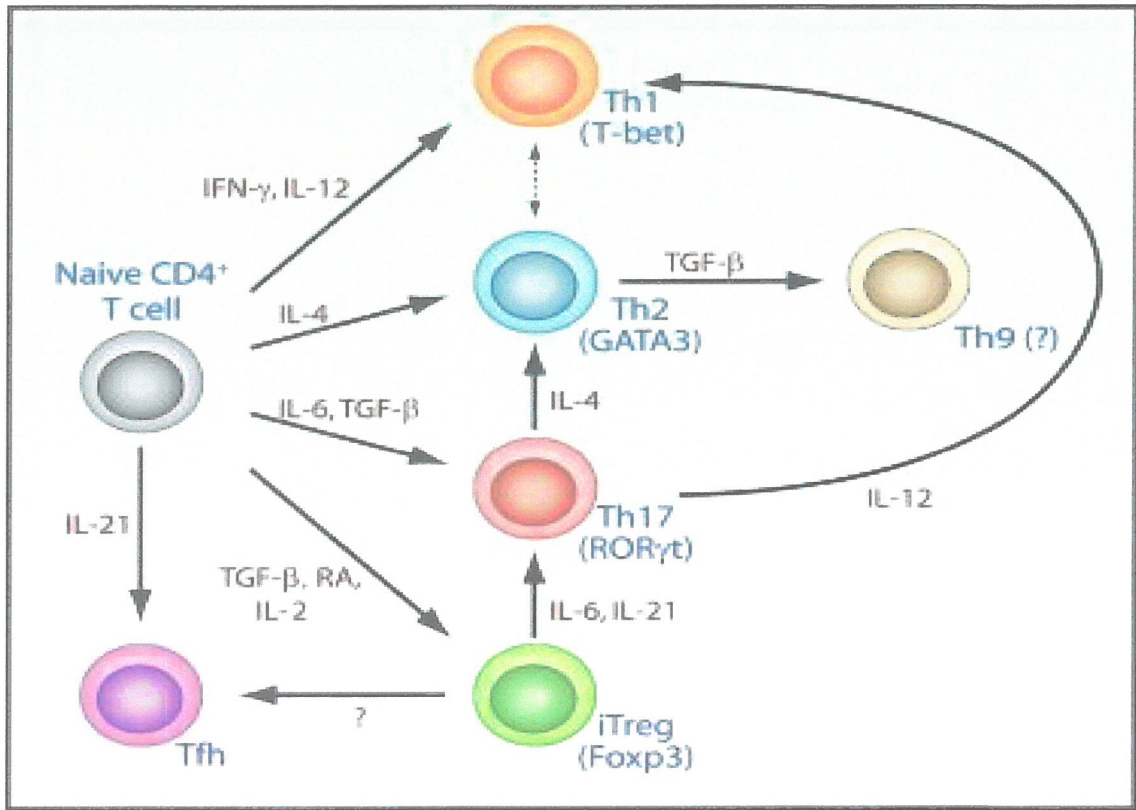
CD8⁺ ve doğal öldürücü (NK) Treg fonksiyonu gösteren hücreler mevcuttur. Bu hücrelerin temel görevi bireyin kendisine ait olan öz antijenlerine immün cevap oluşturmaması ve immün homeostazisin sağlanarak idame edilmesinde rol almasıdır (Hori vd. 2003).

İki majör Treg popülasyonu vardır. Natural Treg hücreleri (nTreg) timusta gelişir ve özellikle self antijenlere karşı periferal toleransın aktif mekanizmalarının kritik kolunu oluşturur. Timustaki medullar ve kortikal dentritik hücrelerinin oluşturduğu mikro çevre Tregler için önemli rol oynamaktadır. Tregler bağışıklık sistemini baskılayarak self toleransın devam etmesine yardımcı olmaktadır. Bu hücreler birçok açıdan klasik $\alpha\beta$ CD4⁺ T hücrelerine benzemektedir, fakat içerdikleri FoxP3 ve konstitütif CD25 molekülü ile ayrılmaktadır. Treg hücresinin gelişimi diğer $\alpha\beta$ T lenfositlerinin gelişiminden farklıdır. Bunların gelişimi göreceli olarak geç ve negatif seçim olaylarından etkilenmemektedir (Fontenot ve Gawin 2003). Hassal cisimcikleri spesifik mikro çevre oluşturarak Treglerin gelişiminde katkı sağlamaktadır. Hassal cisimciklerinde bulunan bir grup özelleşmiş epitelyal hücreler interleukin-7 benzeri sitokin olan timik stromal lenfoprotein (TSLP) üreterek, medullar dendritik hücrelerin fonksiyonlarını düzenlemektedirler. TSLP ile uyarılan dendritik hücrelerde yüksek miktarda yardımcı ligand olan CD80 ve CD86 yüzey reseptörü bulunmaktadır. Bu hücreler MHC'ye bağımlı CD4⁺CD8⁻CD25⁻ timositleri, FoxP3⁺CD4⁺CD25⁺ Treg hücrelere dönüştürmektedirler.

Bunlara ek olarak normal timusun bölümleri incelendiğinde Treg hücre fenotipine sahip olan hücrelerin TLSP içeren hassal cisimciklerine yakın olduğu bildirilmiştir (Leonard 2002). FoxP3⁺ Treg hücrelerinin timik gelişimde CD28, CD40L ve "lymphocyte function-associated antigen 1"'in (LFA-1) (CD11a-CD18) yanı sıra ilgili etkileşim partnerleri timik stromal hücreleri üzerinde CD80 ve CD86, CD40 ve intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) (CD54) Treg hücre gelişimini etkiler. Nitekim CD28, CD40, CD11a, CD18, CD80 ve CD86 eksikliği timüsdeki Treg hücrelerinin sayısının azalmasına neden olur (Sakaguchi 2005). Natural Treg hücreleri başlıca CD25 (interlökin-2 reseptörü), "Glucocorticoid-Induced Tumor Necrosis Factor Receptor Family-Related Gene" (GITR), "Cytotoxic T Lymphocyte Associated 4" (CTLA-4) ve FoxP3 moleküllerini ifade ederler. FoxP3, CD4⁺CD25⁺ natural Treg hücrelerinin gelişimi ve işlevi için çok önemli bir role sahiptir. FoxP3, Treglerin aktivasyonunu düzenleyen bir transkripsiyon faktörüdür. Treg biyolojisinde FoxP3 geninin öneminin keşfi ile birlikte natural Tregler hakkındaki bilgilerimiz daha da artmıştır. Farelerde hem timus hem de periferdeki CD4⁺CD25⁺ T hücre popülasyonunda yüksek şekilde ifade edilir ve ifadesi T hücre aktivasyonundan bağımsızdır. FoxP3, periferik CD4⁺CD25⁺ T hücreler ve CD4⁺CD25⁺CD8⁻ timositler tarafından ifade edilir. İnsanlarda ve farelerde CD8⁺ T hücrelerin ve CD25⁻ T hücrelerin çok küçük kısmının FoxP3 ifade ettiği gösterilmiştir (Lianjun ve Yong 2007 ; Mantel vd. 2006 ; Ziegler ve Buckner 2009). İnterlökin-2 baskılama fonksiyonu için gereklidir. Bu durum CD25'in bu hücrelerde fonksiyonel bir rolü olduğunu işaret eder (Mays ve Chen 2007).

İkincisi indüklenmiş Treglerdir (iTreg). Bu hücreler konvansiyonel CD4⁺ T hücrelerinden kökenlenir. Periferik lenfoid organlarda CD25 öncüllerinden ortamdaki uyarım sonrası CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ fenotipi kazanan naif T hücreleridir. IL-2 ve TGF- β ile indüklenen iTreg hücreleri, nTreg hücrelerinden farklı olarak, naif CD4⁺ T hücrelerden oluşurlar ve bellek belirteçlerini geliştirebilmek için ek uyarılara

gereksinim duyarlar. iTreg hücreleri bir kez uyarıldığında FoxP3, CTLA-4, TGF- β ve IL-10 ifade ederler. IL-2 ve TGF- β , iTreg hücrelerinin indüklenmesi için ortamda mutlak bulunmalıdır. Geleneksel T hücrelerine benzer şekilde, lenfoid organlarda Treg hücrelerinin çoğunluğu CD62L ve kemokin CC reseptörü (CCR) 7'yi ifade eder ve bu durum Treg hücrelerinin lenfoid dokular yoluyla tekrar dolaşıma girmesine izin verir. CD44'ü orta düzeyde eksprese etmelerine rağmen, bu hücrelerin bir çoğunluğu saf timus türevli Treg hücreleri gibi görünmektedir. Buna ek olarak lenfoid organlarda Treg hücrelerinin bir kısmı ve lenfoid olmayan organlardaki Treg hücrelerinin çoğu CD62L, CD44, indüklenbilir T hücre costimulatörü (ICOS), GITR ve FoxP3 ifadesini muhafaza ederken bir efektör fenotipi ile tutarlı biçimde CD69, CD103 ve CD38 gibi belirteçlerin değişen ifadesini gösterir. Yakın zamanda efektör Treg (eTreg) hücreleri olarak adlandırılan bu hücrelerin büyük bir bölümünün "B lymphocyte-induced maturation protein-1" (Blimp-1) transkripsiyon faktörünü ve anti-inflamatuvar sitokin interlökin (IL) -10'u ifade ettiği gösterilmiştir (Cretney vd. 2013). Yardımcı T hücrelerin alt gruplara farklılaşması Şekil 2.3' de özetlenmiştir (Liang vd. 2009).



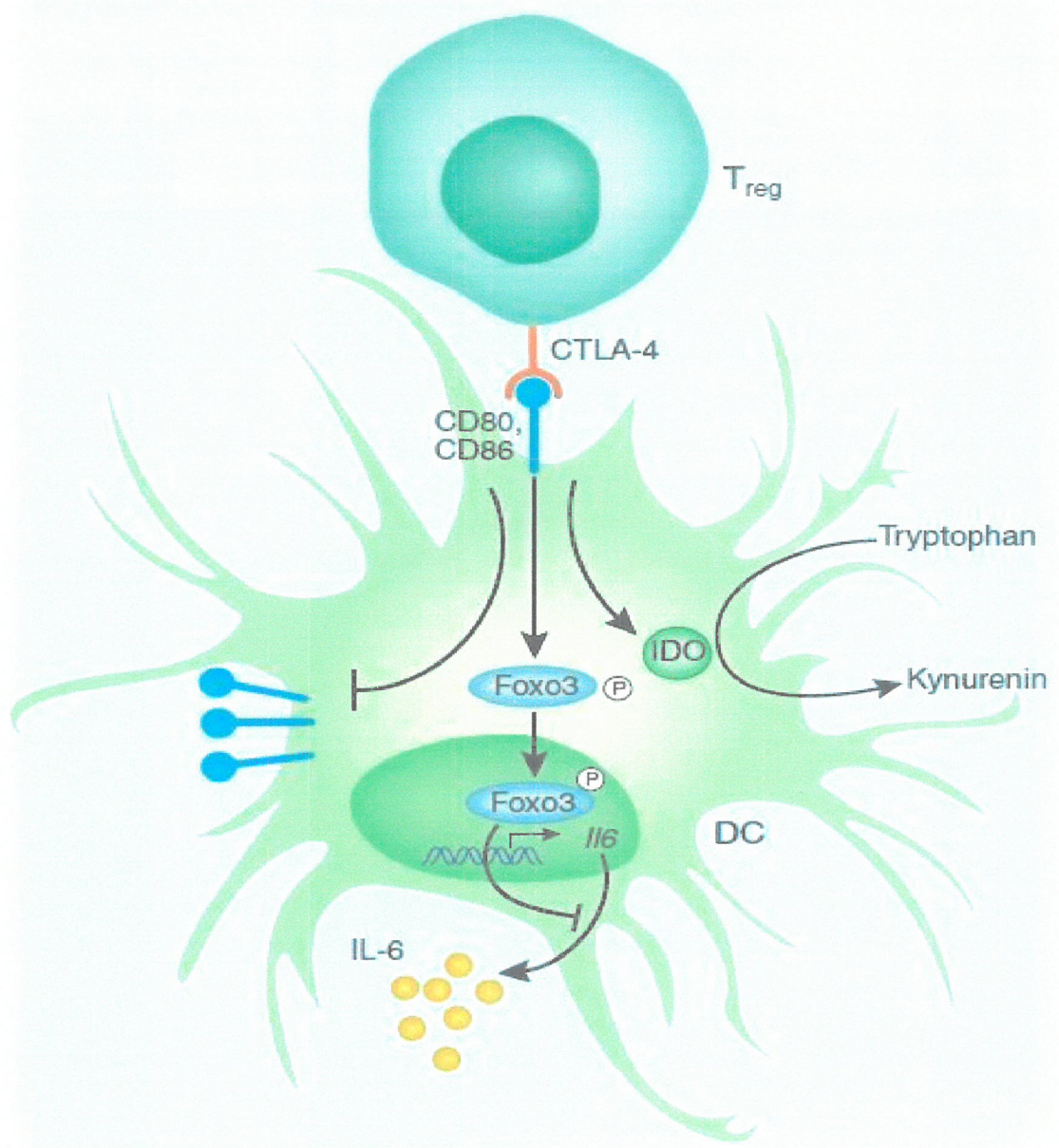
Şekil 2.3. Yardımcı T hücrelerin alt gruplara farklılaşması (Liang vd. 2009)

Sitokin ortamının CD4⁺ yardımcı T (Th) hücre farklılaşması üzerindeki etkisi iyi bilinmektedir. İnterferon (IFN)- γ ve IL-12, hücre içi patojenlere karşı konakçı savunmada önemli olan naif CD4⁺ T hücrelerinin Th1 hücrelerine farklılaşmasını uyarır. IL-4, hücre dışı parazitlerin yok edilmesi için önemli olan Th2 hücre farklılaşmasını teşvik eder ve IL-6 ve TGF- β maya, mantarlara ve hücre dışı bakterilere karşı savunmada önemli rol oynayan Th17 hücrelerinin farklılaşmasını yönlendirir. Folliküler T hücreleri (Tfh), B hücrelerine germinal merkez yanıtı ve etkili plazma

hücre farklılaşması için yardım sağlar. Treg hücreleri aynı düzenleyici ortamı veya doku nişini kaplayan konvansiyonel T hücrelerinin farklılaşma durumuyla yakından paralellik gösteren kapsamlı fenotipik ve fonksiyonel çeşitlilik sergiler (Feuerer vd. 2009 ; Zheng vd. 2009). IL-6, nTreg hücrelerini Th17 hücrelerine dönüştürebilirse de iTreg hücreleri bu sitokine karşı dirençlidir. Bu nedenle iTreg hücreleri inflamasyon alanlarında baskılayıcı fonksiyonunu yerine getirmeye devam edebilir. nTreg ile iTreg hücreleri arasındaki bu farkın iTreg hücrelerinin nTreg hücrelerine oranla belirgin derecede azalmış IL-6 reseptörü (CD126) ifadesi göstermesinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Hori vd. 2003).

2.3.1. Regülatör T hücrelerin etki mekanizması

Treglerin etki mekanizması üzerine başlıca iki görüş vardır. Treglerin baskılayıcı fonksiyonlarını göstermek için hücre-hücre teması yaptıkları ya da IL-10 veya transforming growth faktör gibi sitokinleri salgılayarak uzaktaki hücreleri dahi etkileyebildiği düşünülmektedir. PD-1 ve CTLA-4'ün T hücreleri inhibe edici etkisi bilinmektedir. Bununla birlikte IL-10 ve TGF- β , Th1 tip sitokinlerden IL-2 ve IL-12'nin ifadesini baskılamaktadır. Diğer mekanizmalar ise natural Treglerin indoleamine 2,3 (IDO) veya siklik AMP ile T hücre aktivasyonunu inhibe ettikleri ve T hücre apoptozunu uyarmaları ile ortaya çıkan etkidir (Miyaral ve Sakaguchi 2007). Hücre-hücre temasında Treglerin, CD39, CD73 ve LAG-3 vasıtasıyla, antijen sunan hücreleri veya yanıt veren T hücreleri granzim ve perforin kullanarak öldürdükleri gösterilmiştir. Bununla birlikte çözünebilir faktörlerin aracılık ettiği IL-10, TGF- β , IL-35 ve galektin-1 gibi sitokinler veya IL-2 yoksunluğu Treglerin etki mekanizmalarındandır (Shevach 2009; Tang ve Bluestone 2008). Bu nedenle birkaç mekanizma sinerjik bir şekilde çalışabilir. İnsanlarda yüksek CTLA-4 ifade eden FoxP3^{hi}CD25^{hi}CD4⁺ Tregler *in vitro* yüksek supresif kapasiteye sahiptir (Miyara vd. 2009). Bu verilerin ışığında CTLA-4 aracılı supresyonun temel mekanizma olabileceği düşünülmektedir. FoxP3 diğer transkripsiyon faktörleri ile birlikte ctla4 geninin promotör bölgesine bağlanarak CTLA-4 ifadesini Treglerde artırır. Üstelik özellikle Treg hücrelerinde CTLA-4'ten yoksun olan fareler lenfoproliferasyon, çeşitli otoimmün hastalıklar gösterirler ve FoxP3 eksik farelerle benzer şekilde IgE aşırı üretilir. Bu farelerden hazırlanan Treg hücreleri ciddi şekilde bozulmuş baskılayıcı özellikler göstermektedir (Wing vd. 2008). CTLA-4'ün CD80 ve CD86'ya ligasyonu dendritik hücrelerde indoleamine 2,3 (IDO) deoksijenaz yolağını aktive eder. Ayrıca immunsupresif kynurenin üretimine öncülük eder veya Foxo3 transkripsiyon faktörünü aktive eder. Bu da dendritik hücrelerde sitokin üretiminin baskılanmasına neden olur (Grohmann vd. 2002 ; Dejean vd. 2009). Treg hücreleri ile antijen sunan hücreler arasındaki bu etkileşim Şekil 2.4' de özetlenmiştir (Kajsa ve Sakaguchi 2010).



Şekil 2.4. Treg hücreleri ile antijen sunan hücreler (APC) arasındaki etkileşim (Kajsa ve Sakaguchi 2010)

Treg hücrelerinin biyolojik çevreye verdiği tepkiler de farklılıklar gösterir. Örneğin, IL-10 üreten FoxP3⁺ Treg hücreleri dalakta nadirdir fakat bağırsağın lamina propriasında bol miktarda bulunur. Treg hücrelerine özgü IL-10 eksikliği bağırsak mukozal yüzeyinde ve akciğerde immünopatolojiye neden olur (Maynard vd. 2007 ; Rubtsov vd. 2008). Perforin veya granzim ifade eden FoxP3⁺ Treg hücreleri dalakta nadir de olsa tümör ortamında bol miktarda bulunur (Cao vd. 2007). Benzer şekilde FoxP3⁺ Treg hücreleri fonksiyonel olarak TH1, TH2 veya TH-17 bağışıklık tepkilerini spesifik olarak kontrol etme yeteneğini TH serisine özgü transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonlarını değiştirerek (örneğin; T-bet, IRF-4 ve RORγt) gösterir. Bu transkripsiyon faktörleri örneğin, kemokin reseptörü ekspresyon modelleri ile Treg hücrelerinin belirli bir iltihap bölgesine göçünü kolaylaştırır (Koch vd. 2009 ; Zhou vd.

2008). Treg fonksiyonuna birincil derecede katkıda bulunan sitokinlere ayrıca değinmek gerekir;

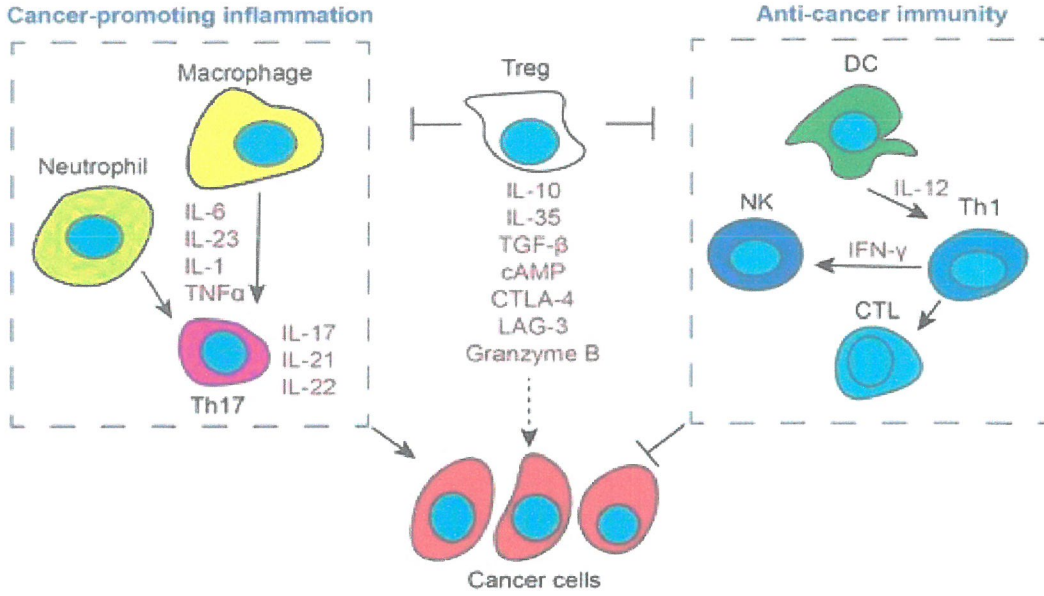
İnterlökin-10 (IL-10): İlk kez 1988 yılında tanımlanmış, 260 aminoasitten oluşan bir sitokindir (Burmester ve Pezzutto 2003). IL-10, Th2 hücrelerine ek olarak, makrofajlar, dendritik hücreler, B hücreleri, keratinositler, mast hücreleri, Tregler ve Th17 hücreleri de içeren T hücresi alt grupları tarafından üretilir. Tregler IL-10'u birçok immünsupresif aktivitelerinden biri olarak serbest bırakırlar. IL-10, supresif aktivitelerinin çoğunu APC'ler üzerindeki etkiler yoluyla dolaylı olarak uygular. IL-10, majör histokompatibilite molekülünü (MHC) ve B7 ile birlikte uyarıcı molekül ekspresyonunu indirger ve APC'lerde inhibitör B7-H1 ekspresyonunu ilerletir. Bu durum APC proinflamatuvar sitokin ve kemokin ifadesini sınırlandırır. Fakat aynı zamanda doğrudan CD4⁺ hücrelerin aktivasyon, proliferasyon ve sitokin üretimini sınırlar (Wilke vd. 2011).

Transforme edici büyüme faktörü- β (TGF- β): TGF- β sistemi, morfogenez, embriyonik gelişme, yetişkin kök hücre farklılaşması, immün regülasyon, yara iyileşmesi ve iltihap dahil olmak üzere biyolojik süreçleri düzenlemek için protein kinaz reseptörleri ve Smad aracıları yoluyla sinyal verir. Buna ek olarak, TGF- β sinyal yolunun spesifik komponentlerindeki değişiklikler, kanser, kardiyovasküler patoloji, fibroz ve konjenital hastalıklar gibi geniş bir patoloji alanına katkıda bulunabilir. TGF- β , homodimerik yapıda, 112 aminoasitten oluşan bir sitokindir. TGF- β 'lar arasında yalnızca değişken TGF- β 1, TGF- β 2 ve TGF- β 3 izoformları memelilerde eksprese edilmekte ve insan genlerinde sırasıyla 14q24, 19q13, 1q41 kromozomları üzerinde yer alırken değişken homologluk derecesine sahip altı farklı izoform keşfedilmiştir (Santibañez vd. 2011). İmmün sistem hücreleri başlıca TGF- β 1 sentezler. İmmün sistemdeki temel etkisi; lenfositlerin ve diğer lökositlerin aktivasyonunu ve çoğalmasını inhibe etmektir. TGF- β , endotel hücrelerini ve nötrofilleri de etkileyerek proinflamatuvar sitokinlerin etkilerine büyük ölçüde karşı koyar. TGF- β 'nın T hücrelerinin in vitro antijen uyarımı ile FoxP3 ekspresyonu ve Treg hücre farklılaşmasını uyardığı gösterilmiştir (Li vd. 2007).

İnterlökin-35 (IL-35): IL-35, IL-12 sitokin ailesinin nispeten yeni keşfedilmiş bir üyesidir ve iki alt birim tarafından oluşturulan bir dimer olması bakımından eşsizdir. IL-35, diğer IL-12 pro-inflamatuvar sitokinlerin aksine benzersiz şekilde anti-inflamatuvar sitokindir. IL-35, Treg hücreleri tarafından özel olarak üretilebilen yeni bir önleyici sitokindir. Treg'in azami baskılayıcı aktivitesi için gereklidir. Buna ek olarak IL-35, hücre bölünmesinin G1 fazında erken T hücre dinlenmesini sınırlandırarak Th1 ve Th17 hücrelerinin proliferasyonunu bloke edebilir. IL-35, Th1 çoğalmasını inhibe edebilmesine rağmen Th1'den IFN γ ile Ebi3 ve p35 transkripsiyonunun güçlü bir şekilde inhibe edilmesine bağlı olarak Treg dönüşümüne dirençlidir. Üstelik IL-35, GATA3 ve IL-4 ekspresyonunu bastırarak ve Th2 çoğalmasını sınırlandırarak Th2 gelişimini engeller. IL-35, Th2 hücrelerinin Treg'e dönüşümüne aracılık edebilir ancak IFN- γ tarafından bloke edilebilir (Huang vd. 2017).

Tregler kanserde iki ucu keskin bir kılıç görevi görür. Tümörü teşvik eden makrofajlar ve nötrofiller IL-6, IL-23, IL-1 ve TNF α üretir ve IL-17, IL-21 ve IL-22 üretimi için Th17 lenfositleri aktive eder. Bu sitokinler çoğalma ve hayatta kalmaları için kanser hücrelerine etki eder. Öte yandan dendritik hücreler IL-12 üretimi ve antijen

sunumu ile kansere karşı T hücresi aracılı immüniteyi kolaylaştırır. Th1 hücreleri ayrıca IFN- γ salgılayarak doğal öldürücü (NK) hücreleri ve CTL'leri aktive eder. NK hücreleri ve CTL'ler imha için kanser hücrelerini hedefler. Tregler temasa bağlı ve bağımsız mekanizmalarla hem pro- hem de anti-kanser bağışıklığını inhibe eder. Regülatör T hücrelerin kanser hücreleri üzerine etki mekanizması Şekil 2.5' de özetlenmiştir (Wang ve Vella 2016).



Şekil 2.5. Regülatör T hücrelerin kanser hücreleri üzerine etki mekanizması (Wang ve Vella 2016)

2.4. PD-1 / PD-L1 Yolağı

PD-1 (CD279, programlanmış ölüm-1) 288 amino asit uzunluğunda tip 1 transmembran proteindir. T ve B lenfositler, dendritik hücreler, monositler ve makrofajlar da dâhil olmak üzere çeşitli immün hücrelerde ifade edilen CD28 ailesinden bir inhibitör reseptördür (Ishida vd. 1992). PD-1 reseptörü B7 ailesinden iki liganda bağlanır. PD-L1 (CD274, B7-H1) ve PD-L2 (CD273, B7-DC) antijen sunan hücreler üzerinde (makrofajlar ve dendritik hücreler), aktive edilmiş B hücrelerin bir alt kümesinde ve mikrovasküler endotelial hücrelerde ifade edilir. Ayrıca, PD-L1 çeşitli dokuların hücrelerinde (örneğin kalp, akciğer, karaciğer, pankreatik adacık hücreleri, astrositler) ifade edilir. PD-L1 ifadesi T lenfosit aktivasyonundan sonra interferon-gama tarafından düzenlenir. Fizyolojik koşullar altında PD-1 / PD-L1 sinyal yolağı aktive T hücre reseptörü sinyallerini inhibe eder, self toleransta anahtar rol oynar. T hücrelerinin aşırı etkinleşmesini ve enfeksiyon sırasında doku hasarını önler (Jelinek vd. 2017).

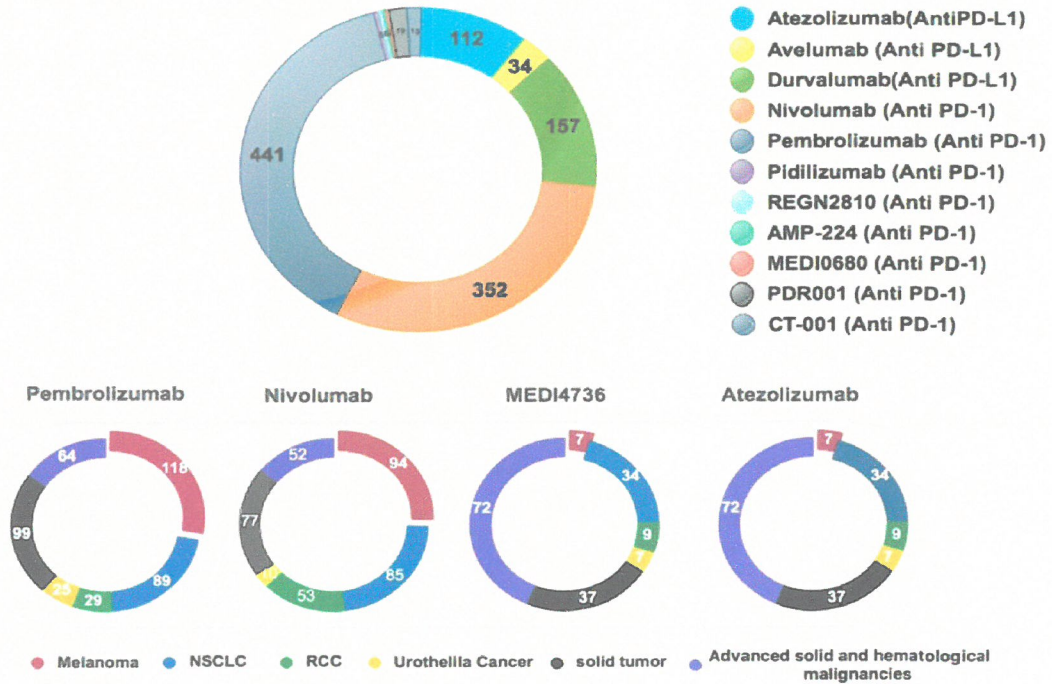
Çeşitli tümörler ve kronik viral enfeksiyonlar (hepatit B, C veya HIV) bu yolu kötüye kullanarak bağışıklıktan kaçınır. Bu kaskadın yüksek aktivitesi sitokin üretiminin ve sitotoksitenin azalması ile T hücre tükenmesine öncülük eder, apoptoz duyarlılığını artırır. Son zamanlarda sadece T hücreleri değil, aynı zamanda tümör ilişkili makrofajların da PD-1 / PD-L1 yolağını kullandığı bulunmuştur. Bağışıklık fonksiyonu ve bu bağışıklık kaçınma mekanizmasının anlaşılmasındaki dereceli olarak

artan bilgi immün kontrol noktası inhibitörleri denilen terapötik mAb'lerin geliştirilmesine öncülük etmiştir (Jelinek vd. 2017).

PD-1 / PD-L1 eksenini hedefleyen monoklonal antikorlar mantıksal olarak iki gruba ayrılmıştır: (i) PD-1 reseptörüne karşı ve (ii) ligandlara karşı (PD-L1 / PD-L2). Anti-PD-1 mAb'leri ağırlıklı olarak nivolumab (OPDIVO, MDX1106, BMS-936558; Bristol-Myers Squibb, New York City, NY, USA) tamamen insan IgG4 mAb, pembrolizumab (KEYTRUDA, MK-3475, Merck, Kenilworth, NJ, ABD) oldukça özgü bir hümanize IgG4 mAb ve pidilizumab (MDV9300, CT-011; Medivasyon / Pfizer, New York City, NY, ABD) bir IgG1 mAb'dur. Anti-PD-L1 mAbs, en umut verici olan durvalumab (Celgene, Summit, NJ, ABD) ve atezolizumab (Roche, Basel, İsviçre) henüz erken faz klinik testler devam etmektedir (Jelinek ve Hajek 2016).

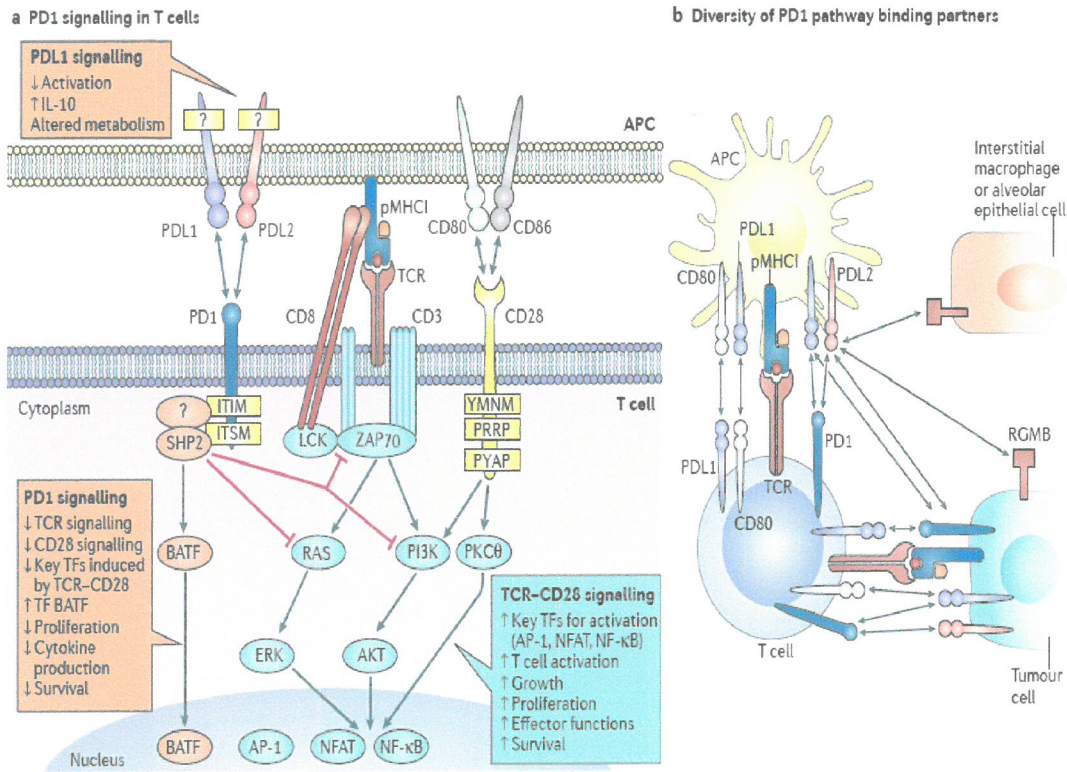
Günümüzde bu monoklonal antikorlardaki klinik başarı ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) onaylarını beraberinde getirmiştir ve de melanom, küçük hücreli dış akciğer kanseri, baş ve boyun skuamöz hücreli karsinomu, böbrek hücre karsinomu, hodgkin lenfoma, mesane kanseri, merkel hücre karsinomu ve mikrosatellit tamir mekanizması bozulmuş yetişkin ve pediatrik solid tümörlerde kullanılmaktadır (Sharpe ve Pauken 2017). FDA onaylı PD-1 / PD-L1 inhibitörleri için 2017 yılına kadar yapılan klinik çalışma sayısı Şekil 2.6'da verilmiştir (Alsaab vd. 2017).

Number of Clinical Trials of Checkpoint Inhibitors (PD-1/PDL-1)



Şekil 2.6. FDA onaylı PD-1 / PD-L1 inhibitörleri için 2017 yılına kadar yapılan klinik çalışma sayısı (Alsaab vd. 2017)

T hücreleri için PD-1'in inhibitör bir sinyal oluşturması için peptid-MHC sınıf I kompleksi (pMHCI) aynı hücrede ifade edilen PD-1 ligandları tarafından sunulmalıdır. PD-1, T hücre işlevlerini PD-1 kuyruğunda SHP2 de dahil olmak üzere fosfatazları immüno-reseptör tirozine bazlı sinyal motifine (ITSM) dahil ederek engelleyebilir. Bu fosfatazlar, T hücre reseptörü (TCR) tarafından tetiklenen olumlu sinyal olaylarına karşı (pMHCI ile etkileşen) ve (CD28 (CD80 ve / veya CD86 ile etkileşen)) koyabilir. Örneğin; ZAP70'i ve fosfoinositid 3-kinaz (PI3K)-AKT ve RAS sinyal yollarını inhibe eder. Toplu halde bu durum transkripsiyon faktörlerinin (TFs) aktivasyonlarının azalmasıyla sonuçlanır. Örneğin; aktivatör protein 1 (AP-1), aktive T hücrelerinin nükleer faktörü (NFAT) ve nükleer faktör-kB (NF-κB) aktivasyonları azalır. Bu transkripsiyon faktörleri T hücresi aktivasyonu, proliferasyonu, efektör fonksiyonları ve sağkalım için önemlidir. Buna ek olarak PD-1 bazik lösin fermuar transkripsiyon faktörü ATF- benzeri (BATF) gibi transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonunu artırarak T hücre fonksiyonlarını inhibe edebilir. BATF efektör kopyalama programlarına daha da karşı koyabilir. Bazı kanıtlar önermektedir ki PD-1 ligandlarının PD-1 ile olan ilgisini takiben sinyale yol açılabilir, ancak ilgili sinyal motifleri ve mekanizmaları henüz tam olarak bilinmemektedir. Şekil 2.6'da sarı kutuda anahtar transkripsiyon faktörleri ve anahtar proteinleri gösterilmiştir. Alternatif olarak PD-L1 CD80'e de bağlanabilir ve PD-L2, RGM ailesinin üyesi B'ye (RGMB) bağlanabilir. Ortaya çıkabilecek pek çok olası etkileşim vardır. PD-1 sinyalizasyonu ve bağlanan partnerlerin çeşitliliği Şekil 2.7'de verilmiştir. (Sharpe ve Pauken 2017).



Şekil 2.7. PD-1 sinyalizasyonu ve bağlanan partnerlerin çeşitliliği (Sharpe ve Pauken 2017)

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Hasta ve Kontrol Gruplarının Tanımlanması

Çalışmamız için Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 16/12/2016 tarihinde etik kurul onayı alınmıştır. Bu çalışmaya Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Polikliniğine başvuran 30 kişi dahil edilmiştir. Çalışmaya katılan gönüllü hasta ve kontrol grubundan aydınlatılmış onam alınmıştır. Multipl miyelom şüphesi ile kemik iliği aspirasyon ve biyopsisi yapılan hastalardan akım sitometri ve kemik iliği yayması değerlendirilmesi sonucunda yeni tanı alan yirmi multipl miyelom hastasının (12 kadın, 8 erkek, 43-75 yaş aralığında hastalar) iliak krestinden tanı amaçlı EDTA tüpe toplanan (yaklaşık 2-3 ml) örnekler multipl miyelom tanısının hemen akabinde çalışmamız için kullanılmıştır. Dolayısı ile çalışmaya dahil ettiğimiz multipl miyelom hastaları yeni tanı almış ve de daha önce tedavi almamış hastalardan oluşmaktadır. Aynı zamanda böyle bir çalışma dizaynı ile hali hazırdaki zaten tanı amaçlı alınan kemik iliği numuneleri kullanılacağı için kemik iliği hücrelerinin toplanması aşamasında çalışmamız için hastalar maduriyet yaşamamıştır. Benzer şekilde İTP ön tanısı nedeniyle kemik iliği aspirasyon ve biyopsisi yapılan on hastada (7 kadın, 3 erkek, 40-81 yaş aralığında hastalar) kontrol grubu oluşturmak için çalışmamıza dahil edilmiştir.

3.2. Multipl Miyelom Hastalarının Evrelendirilmesi

Çalışmaya dâhil edilen multipl miyelom hastalarının National Comprehensive Cancer Network (NCCN) kılavuzuna göre ISS (International Staging System) evresi belirlenmiş ve gruplandırılmıştır. Multipl miyelom hastaları arasında miyelom alt grupları (ör; IgA Lambda, IgG Kappa) ayrıca gruplandırılmıştır. Ayrıca miyelom hastalarında çalışma için anlamlı gördüğümüz tanı anındaki laboratuvar bulguları da (Hb (gr/dl), lökosit (sayı/mm³), nötrofil (sayı/mm³), lenfosit (sayı/mm³), trombosit (sayı/mm³), LDH, total protein, albumin, kreatin, kalsiyum, beta 2 mikroglobulin, IgG, IgA, IgM, IgE, IgD, s. kappa, s. lambda) çalışma sonunda sunulmuş ve de çalışmanın sonuçları ile ilişkilendirilmiştir.

3.3. Kemik İliği Hücrelerinin Değerlendirilmesi

Treg hücrelerinin kemik iliği hücreleri arasındaki düzeyinin belirlenmesi için her iki hasta grubunda da akım sitometrisi kullanılarak immünofenotipleme yapılmıştır. Aynı EDTA tüpte geriye kalan kemik iliği numunesi real time PCR (real-time-polymerase chain reaction (RT-PCR)) metodu için kullanılmıştır.

3.4. Akım (Flow) Sitometri Yöntemi

Hastalardan sodyum-heparin içeren tüplere alınan 2-3 ml kemik iliği örneğinden ficoll histopaque-1077 (Sigma-Aldrich) uygulamasıyla mononükleer hücreler ayrıldı. Floresan işaretli antikorlar kullanılarak CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺PD-1⁺ hücreler akım sitometri yöntemiyle incelendi.

Mononükleer hücre ayrılması aşamaları;

1. Sodyum-heparin içeren tüplere 2-3 ml kemik iliği alınır.
2. Alınan kemik iliği 30 dakika oda ısısında bekletildikten sonra üzerine aynı oranda PBS eklenir.
3. Falcon tüplerine 3,5 ml ficoll histopaque-1077 (Sigma-Aldrich) koyulduktan sonra PBS ile sulandırılmış kemik iliği oranı 1:2 olacak şekilde üzerine yavaşça eklenir.
4. 2000 rpm (800g), 30 dk, 20⁰ C de santrifüj (Beckman-Coulter santrifüj cihazı kullanıldı) edilir.
5. Mononükleer hücreler pipet yardımıyla alındı ve üzerine PBS eklendi. Alt-üst edildikten sonra 2000 rpm (800g), 10 dk. 8⁰ C de santrifüj edilir.
6. Süpernatantlar atıldıktan sonra üzerine PBS eklenir.
7. 2000 rpm (800g), 10 dk. 8⁰ C de santrifüj edilir.
8. Süpernatantlar atıldıktan sonra üzerine PBS eklenir.
9. Elde edilen hücre miktarı sayılır.
10. 2000 rpm (800g), 10 dk. 8⁰ C de santrifüj edilir. Elde edilen hücreler Becton Dickinson (BD) Pharmingen Stain Buffer ile (FBS) ml'de 10 milyon hücre olacak şekilde sulandırılır.

Floresan işaretli antikorlar; CD45 (APC-H7-560178), CD25 (PE-555432), CD4 (FITC-555346), CD279 (PD1) (V-450-562516), foxP3 (APC-560045) ve izotipleri (IGGI); APC-H7-560167, PE-555749, FITC-555748, V-450-562438, APC-560045 olarak seçildi (BD Biosciences, San Jose, CA.)

Antikorlar için hücre hazırlık ve boyama prosedürleri;

1. Human FoxP3 Buffer Set'inin hazırlanması:
 - FoxP3 Buffer A (10X konsantre)' yı 1:10 oranında oda sıcaklığındaki distile su ile sulandırılır.
 - Çalışma solusyonu Buffer C'yi yapmak için FoxP3 Buffer B sulandırılmış 1X Buffer A içinde 1:50 oranında sulandırılır (Buffer B:Buffer A).

Her çalışma için Human FoxP3 Buffer A ve C solusyonları taze olarak hazırlanmalıdır.

2. Boyama Prosedürü:
 - Hazırlanmış bufferlar oda sıcaklığına getirilir.
 - İnsan kemik iliği mononükleer hücreleri hazırlanır. Elde edilen hücreler, BD Pharmingen Stain Buffer ile (FBS) ml'de 10 milyon hücre olacak şekilde sulandırılır.

- Uygun miktardaki yüzey antikorları (CD4 ve CD25 (20 µl), CD279 (PD1) (5 µl), CD45 (3 µL)) ve izotipleri 12x75mm'lik tüpe pipetlenir.
- Her tüpe 100 µl hücre eklenir, vortekslenir, 20 dakika oda ısısında, karanlıkta inkübe edilir.
- 2ml wash buffer (Stain Buffer (FBS)) eklenir. 250xg hızda, 10 dakika santrifüj edilir, süpernatant uzaklaştırılır.
- Hücreleri fiks etmek için, tüpte kalan hücre pelleti nazikçe kaldırılır ve üzerine 2ml 1xHuman Foxp3 Buffer A eklenir. Vortekslenir ve 10 dakika oda ısısında, karanlıkta inkübe edilir.
- Inkübasyon sonunda hücreler 500xg'de 5 dakika santrifüj edilir ve fiksatif uzaklaştırılır. İşlem sırasında pelletin kalkmamasına özen gösterilir.
- Hücreleri yıkamak için, tüplere 2 ml BD Pharmingen Stain Buffer (FBS) eklenir ve pellet nazikçe kaldırılır. 5 dakika süresince 500xg'de santrifüj edilen tüplerden süpernatant uzaklaştırılır.
- Hücreleri geçirgen hale getirmek için tüpte kalan hücre pelleti nazikçe kaldırılır ve üzerine 0.5ml 1x working solution Human Foxp3 Buffer C eklenir. Vortekslenir, 30 dakika oda ısısında karanlıkta inkübe edilir.
- Hücreleri yıkamak için tüplere 2 ml BD Pharmingen Stain Buffer (FBS) eklenir, 5 dakika 500xg'de oda ısısında santrifüj edilir. Buffer (süpernatant) uzaklaştırıldıktan sonra yıkama işlemi tekrarlanır ve buffer uzaklaştırılır.
- Tüplere FoxP3 antikoru (20 µL) eklenir, nazikçe vortekslenir ve 30 dakika oda ısısında karanlıkta inkübe edilir.
- BD Pharmingen Stain Buffer ile yıkama işlemi tekrarlanır.
- Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra tüplerde kalan hücre pelleti wash buffer ile kaldırılır ve en kısa sürede analize geçilir.

Opsiyonel olarak hücreler, 300 µL %1' lik formaldehit içeren PBS ilave edilerek +4°C'de saklanabilir. Bu hücreler 24 saat içinde analiz edilmelidir. Okuma esnasında en az 15.000-25.000 CD4 pozitif lenfosit miktarına ulaşılması önerilmektedir.

Örnekler akım sitometrisi (FACSCanto II, Becton Dickinson, San Jose, CA.) ile değerlendirildi ve FACS Diva yazılımı ile analiz edildi (Braga vd. 2014 ; Raja vd. 2012).

3.5. Gerçek Zamanlı (Real-Time) Polimeraz Zincir Reaksiyonu

3.5.1. RNA izolasyonu

Kemik iliği örnekleri santrifüj edilerek çöktürüldü. Eritrositler, parçalama (lysis) tamponu solüsyonu kullanarak uzaklaştırıldı ve kalan çekirdekli hücrelerden silika kolon yöntemi ile total RNA eldesi gerçekleştirildi (NucleoSpin® RNA Blood (MN-740200.50, Germany)). RNA kalitesi ve miktarı nanodrop spektrofotometre (Nano) ile spektrofotometrik olarak ölçüldü. RNA örnekleri cDNA sentezi için -20°C'de saklandı.

RNA izolasyonu aşamaları;

1. Edtalı tüpe 2-3 ml kemik iliği alınır.
2. 15 ml'lik falkon tüpe aktarılır ve üzerine 2 katı eritrosit lizis buffer koyularak 10 dk. inkübasyon için oda ısısında bekletilir.
3. 4000 rpm 10 dk. santrifüj edilir.
4. Süpernatant dökülür.
5. İkinci bir yıkama için üzerine 1 ml eritrosit lizis buffer koyularak pipetaj yapılır ve 1,5 ml'lik eppendorf tüpüne aktarılır.
6. 8000 rpm 3 dk. santrifüj edilir.
7. Süpernatant dökülür. Üzerine 150 µl PBS + 200µL DL Liziz Buffer koyularak -20°C'de saklanır.
8. Üzerine 200 µL DL Liziz Buffer eklenir ve pipetaj yapılır.
9. Üzerine 5 µL Sıvı Proteinaz K eklenir ve kapağı kapatılır. Oda sıcaklığında 3-15 dk. tüp çalkalayıcı üzerinde inkübasyona bırakılır (18-25°C).
10. Tüpe mevcut hacmin yarısı kadar %70 ethanol eklenir ve güçlü bir şekilde karıştırılır.
11. 400 µL NucleoSpin® RNA Blood Column içine aktarılır. 11,000 x g'de 30sn santifüjlenir.
12. Kalan hacim için işlem tekrarlanır.
13. 350 µL MDB (Membranı tuzdan arındırma) buffer çözeltisi kolona eklenir ve 11,000 x g'de 30 sn santrifüjlenir.
14. Kolona 95 µL rDNase eklenir. Oda sıcaklığında 15 dk. beklenir.
15. 200 µL RB2 buffer çözeltisi NucleoSpin® RNA Blood Column'a eklenir. 11,000 x g'de 30sn santrifüjlenir. Sıvı kısmı içeren tüpü sıvıyla birlikte atılır ve filtreli kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirilir.
16. 600 µL RB3 buffer çözeltisi NucleoSpin® RNA Blood Column'a eklenir. 11,000 x g'de 30sn santrifüjlenir. Sıvı kısmı içeren tüpü sıvıyla birlikte atılır ve filtreli kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirilir.
17. 250 µL RB3 buffer çözeltisi NucleoSpin® RNA Blood Column'a eklenir. 11,000 x g'de 2 dk. santrifüjlenir. Sıvı kısmı içeren tüpü sıvıyla birlikte atılır ve filtreli kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirilir.

18. 50µL RNase-içermeyen H₂O kolona eklenir ve 11,000 x g'de 30 sn santrifüjlenir. RNA 1.5 mL toplama tüpüne ayrılmış olacaktır.
19. İşlem tekrarlanır ve aynı örnekten 2. bir elüsyon elde edilir. -20°C'de saklanır (Braga vd. 2014 ; Raja vd. 2012).

3.5.2. cDNA sentezi

cDNA sentezine başlamadan önce tüm RNA örnekleri 100 ng/µL olacak şekilde ayarlandı. cDNA sentezi için 'EasyScript PlusTM cDNA Synthesis Kit' (ABM-G236, Canada) kiti kullanıldı. -20°C'de muhafaza ettiğimiz total RNA örnekleri oda ısısında eritildi. Kullanılacak tüm solüsyonlar oda ısısında eritilip vortekslendikten sonra buz üzerine alındı. Ependorf tüplerine 5 µL total RNA, 1 µL random primer, 1 µL dNTP, 7,5 µL 'nuclease-free H₂O' ilave edildi. Tekrar kısa bir spinden sonra 65°C'de 5 dakika thermal cyclerda inkübe edildi. Sonrasında 5 dakika +4°C'de bekletildi. Üzerine 4 µL 5X RT tamponu, 0,5 µL 'RNase OFF Ribonuclease Inhibitor', 1 µL 'EasyScript PlusTM RTase' ilave edildi. Pipetaj ile karıştırıldı ve kit prosedürüne uygun olarak sırası ile thermal cyclerda 25°C'de 10 dakika, 40°C'de 50 dakika, 85°C'de 5 dakika inkübe edildi. Elde edilen cDNA örnekleri -20°C'de saklandı.

3.5.3. Kantitatif PCR

Kantitatif PCR için 'EvaGreen 2X qPCR MasterMix' (ABM-MasterMix-S, Canada) kiti kullanıldı. Kullanılacak tüm solüsyonlar eritilip vortekslendikten sonra buz üzerine alındı. Ependorf tüplerine 10 µL EvaGreen 2X qPCR MasterMix, 0,5 µL forward primer, 0,5 µL reverse primer, 6 µL 'nuclease-free H₂O', 3 µL cDNA ilave edildi. Pipetaj ile karıştırıldı ve kit prosedürüne uygun olarak sırası ile thermal cyclerda (LightCycler® 480 (Roche)) 95°C'de 10 dakika (denatürasyon), uzama için 95°C'de 10 saniye, 60°C'de 15 saniye, 72°C'de 20 saniye bir döngü olacak biçimde 45 döngü yapıldı ve erime eğrisi LightCycler® 480 Software release 1.5.0 programında analiz edildi. Hedef ve referans genlerine ait siklus değerleri REST© programı kullanılarak normalize edildi. RPL13A geni referans olarak kullanılmıştır. Tüm hasta ve kontrol PCR'ları iki kez tekrar edilmiştir. Primerlerin sentezi Sentegen Biyoteknoloji (Türkiye) firmasına yaptırılmıştır. Kullanılan primerler PD-1 geni için; FW: CCCTGGTGGTTGGTGTCGT, R: GCCTGGCTCCTATTGTCCCTC, PD-L1 (CD274) geni için; FW: GGTGCCGACTACAAGCGAAT, R: ATGGTCACTGCTTGTCAGATG şeklinde dizayn edilmiştir (Wang vd. 2017).

3.6. İstatistiksel Analiz

Verilerin analizi konusunda tanımlayıcı istatistikler frekans, yüzde, ortalama, standart sapma değerleri ile sunulmuştur. Çalışmadaki gruplarının cinsiyet durumuna göre farklı olup olmadığını tespit etmek amacı ile Ki-kare analizi yapılmıştır (Güngör 2008). Hasta ve kontrol gruplarının Treg ve mRNA ölçümlerinin incelenmesi amacı ile Mann. Whitney U testi kullanılmıştır (Ruxton 2006). Hastaların evre düzeylerine Treg ve mRNA ölçümlerinin farklılığının incelenmesi için Kruskal Wallis testi uygulanmıştır (Breslow 1970). Treg ve mRNA hücre ölçümlerinin hem kendi arasında hem de diğer kan ölçümleri ile olan ilişkilerinin incelenmesi için korelasyon analizi

yapılmıştır (Orhunbilge 2017) . Çalışmada 0,05'den küçük p değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Analizler SPSS 22.0 paket programı ile yapılmıştır.

4. BULGULAR

Akdeniz Üniversitesi Hastanesi Erişkin Hematoloji Polikliniğine gelen yeni tanı MM ve İTP ön tanısı olan hastaların kemik iliğinde $CD4^+CD25^+FoxP3^+PD1^+Treg$ hücrelerinin ve toplam PD-1 ve PD-L1 mRNA ifadesi düzeyini belirlendi. Aşağıda bu hastalara ait demografik, laboratuvar, akış sitometri ve kantitatif PCR analiz sonuçları verilmiştir. Çalışmada kontrol grubunda seçilen hastalardan (n=10) biri çalışma esnasında kontrol grubu özelliklerini sağlamadığından (çalışmamızdan beş ay sonra hasta myelodisplastik sendrom tanısı almıştır) dolayı çalışmadan çıkartılmıştır. Bu hasta için tüm veriler tez içinde verilmiştir. Kontrol grubu n=9 hasta ve hasta grubu n=20 hasta üzerinden analizlere tabi tutulmuştur.

4.1. Hasta ve Kontrol Grubunun Genel Özellikleri

Çalışmaya dâhil olan hastaların %69'u hasta grubu ve %31'i kontrol grubunda yer almıştır. Hastaların %38'nin erkek ve %62'sinin kadın olduğu tespit edilmiştir. Hasta ve kontrol grubunun genel özellikleri (cinsiyet, evre vs) Çizelge 4.1, 4.2 ve 4.3'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Hasta ve kontrol grubunun genel özellikleri

Grup	n	%
Hasta	20	69
Kontrol	9	31
Cinsiyet	N	%
Erkek	11	38
Kadın	18	62

Hasta grubunda hastalık alt tipleri %15 ile IgA K (Kappa), %10 ile IgA L (Lambda), %25 ile IgG K, %35 ile IgG L, %10 ile K ve %5 il L tipte olduğu görülmüştür. Hastaların hastalık evre düzeyleri %25 ile Evre I, %15 ile Evre II ve %60 ile Evre III olduğu görülmüştür. Hasta grubunda alt tip ve evre Çizelge 4.2'de özetlenmiştir.

Çizelge 4.2. Hasta grubundaki (MM) alt tipler ve evreler

ALT TİPİ	n	%
IgA K	3	15%
IgA L	2	10%
IgG K	5	25%
IgG L	7	35%
K	2	10%
L	1	5%
Evre	N	%
I	5	25%
II	3	15%
III	12	60%

Hasta ve kontrol grubunda kadın ve erkek oranının benzer düzeylerde olduğu, cinsiyet bakımından çalışma gruplarının homojen olduğu görülmüştür ($p=0,53, p>0,05$).

Çizelge 4.3. Hasta ve kontrol grubunun cinsiyet dağılımı

Grup		Cinsiyet		p
		Erkek (n=11)	Kadın (n=18)	
Hasta (n=20)	n	8	12	0,53
	%	40,0%	60,0%	
Kontrol (n=9)	n	3	6	
	%	33,3%	66,7%	

*Ki-kare testi yapılmıştır.

Çalışmaya dâhil olan tüm bireylerin yaş ortalamasının $60,59 \pm 8,62$ olduğu görülmüştür. Hastaların Hb (Gr/Dl) ölçümlerinin $10,52 \pm 2,72$, lökosit (sayı/mm³) ölçümlerinin $7,0 \pm 3,46$, nötrofil ölçümlerinin $5,0 \pm 3,06$, lenfosit (sayı/mm³) ölçümlerinin $1,77 \pm 0,94$, trombosit (sayı/mm³) ölçümlerinin $154,69 \pm 107,09$ olduğu görülmüştür. Hasta ve kontrol gruplarında yaş ve biyokimyasal parametreler Çizelge 4.4'de özetlenmiştir.

4.2. Hasta ve Kontrol Grubunun Yaş ve Biyokimyasal Parametreler Dağılımı

Çizelge 4.4. Hasta ve kontrol gruplarında yaş ve biyokimyasal parametreler

Ölçüm	n	X	s.s.	Min	Max
Yaş	29	60,59	8,62	40,00	81,00
Hb (Gr/Dl)	29	10,52	2,72	6,20	16,40
Lökosit (sayı/mm ³)	29	7,00	3,56	1,61	16,55
Nötrofil (sayı/mm ³)	29	5,00	3,06	0,41	14,53
Lenfosit (sayı/mm ³)	29	1,77	0,94	0,50	4,28
Trombosit (sayı/mm ³)	29	154,69	107,09	2,00	377,00
Beta 2 Mikroglobulin	20	7,88	6,11	1,09	25,30
IgG	20	2325,40	1997,18	198,0	7500,0
IgA	20	495,52	1102,78	25,80	4140,0
IgM	20	47,15	55,65	18,0	218,0
S. Kappa	20	7,23	15,69	0,10	70,12
S. Lambda	20	12,28	15,86	0,37	51,62

Çalışmaya dâhil olan tüm bireylerin Beta 2 Mikroglobulin (evreleme için) ortalama ölçümlerinin $7,88 \pm 6,11$ olduğu görülmüştür. IgG ölçümlerinin $2325,40 \pm 1997,18$ olduğu, IgA ölçümlerinin $495,52 \pm 1102,78$ olduğu, IgM ölçümlerinin $47,15 \pm 55,65$ olduğu görülmüştür. S. Kappa ölçümlerinin $7,23 \pm 15,69$ ve S. Lambda ölçümlerinin $12,28 \pm 15,86$ olduğu görülmüştür. Gruplara göre ölçümlerin incelenmesi Çizelge 4.5’de verilmiştir.

Çalışmaya dâhil olan tüm bireyler arasında yaş ve biyokimyasal parametreler bakımından benzerlik vardır. Bu bakımdan hasta ve kontrol grubunda elde ettiğimiz Treg ve PD-1/PD-L1 değerlerini karşılaştırmayı mümkün kılmaktadır.

Çizelge 4.5. Hasta ve kontrol grupları arasında yaş ve biyokimyasal parametrelerin karşılaştırması

Ölçüm	Grup	N	X	s.s.	p
Yaş	Hasta	20	60,45	7,72	0,90
	Kontrol	9	60,89	10,87	
Hb (Gr/Dl)	Hasta	20	9,96	2,48	0,09
	Kontrol	9	11,79	2,95	
Lökosit (Sayı/Mm3)	Hasta	20	5,91	2,82	0,01*
	Kontrol	9	9,42	3,98	
Nötrofil (Sayı/Mm3)	Hasta	20	4,10	1,96	0,01*
	Kontrol	9	7,00	4,13	
Lenfosit (Sayı/Mm3)	Hasta	20	1,78	0,91	0,95
	Kontrol	9	1,75	1,07	
Trombosit (Sayı/Mm3)	Hasta	20	210,80	76,74	0,01*
	Kontrol	9	30,00	28,12	
LDH	Hasta	20	214,15	85,86	0,13
	Kontrol	9	264,67	65,19	
Total Protein	Hasta	20	8,52	1,76	0,16
	Kontrol	9	7,63	0,81	
Albumin	Hasta	20	3,79	0,61	0,14
	Kontrol	9	4,13	0,44	
Kreatin	Hasta	20	1,56	1,38	0,14
	Kontrol	9	0,85	0,21	
Kalsiyum	Hasta	20	10,01	1,64	0,13
	Kontrol	9	9,14	0,53	

**Mann Whitnet U Testi Uygulanmıştır. * Anlamlı Düzeyde İlişkiyi Gösterir

Çalışmada lökosit (Sayı/Mm³) ölçümlerinin kontrol grubu hastalarda daha yüksek düzeylerde olduğu tespit edilmiştir (p=0,01). Çalışmada nötrofil (Sayı/Mm³) ölçümlerinin kontrol grubu hastalarda daha yüksek düzeylerde olduğu tespit edilmiştir (p=0,01). Çalışmada trombosit (Sayı/Mm³) ölçümlerinin hasta grubunda daha yüksek düzeylerde olduğu tespit edilmiştir (p=0,01). Hastaların yaş ortalamalarının kontrol ve hasta gruplarında farklı düzeylerde olmadığı görülmüştür (p=0,90, p>0,05). Hastaların Hb (Gr/Dl) düzeylerinin kontrol ve hasta gruplarında farklı düzeylerde olmadığı görülmüştür (p=0,09, p>0,05). Hastaların lenfosit (Sayı/Mm³) düzeylerinin kontrol ve hasta gruplarında farklı düzeylerde olmadığı görülmüştür (p=0,95, p>0,05). Hastaların LDH düzeylerinin kontrol ve hasta gruplarında farklı düzeylerde olmadığı görülmüştür (p=0,13, p>0,05). Hastaların total protein ölçümlerinin kontrol ve hasta gruplarında farklı düzeylerde olmadığı görülmüştür (p=0,16, p>0,05). Hastaların albumin ölçümlerinin kontrol ve hasta gruplarında farklı düzeylerde olmadığı görülmüştür (p=0,14, p>0,05). Hastaların kreatin ölçümlerinin kontrol ve hasta gruplarında farklı düzeylerde olmadığı görülmüştür (p=0,14, p>0,05). Hastaların kalsiyum ölçümlerinin kontrol ve hasta gruplarında farklı düzeylerde olmadığı görülmüştür (p=0,13, p>0,05). Hasta ve kontrol gruplarında Treg Hücreleri (%) ölçümlerinin incelenmesi Çizelge 4.6'da verilmiştir.

Kontrol grubu olarak belirlediğimiz ITP hastalığının doğası gereği trombosit değerleri ITP hastalarında anlamlı düşüktür. Fakat ITP hastalarında akış sitometri ile kemik ilikleri değerlendirildiğinde sağlıklı insanlardaki gibi bir hücresel dağılım görülmektedir. Bu nedenle trombosit düşüklüğü Treg ve PD-1/PD-L1 değerlerini karşılaştırmayı mümkün kılmaktadır.

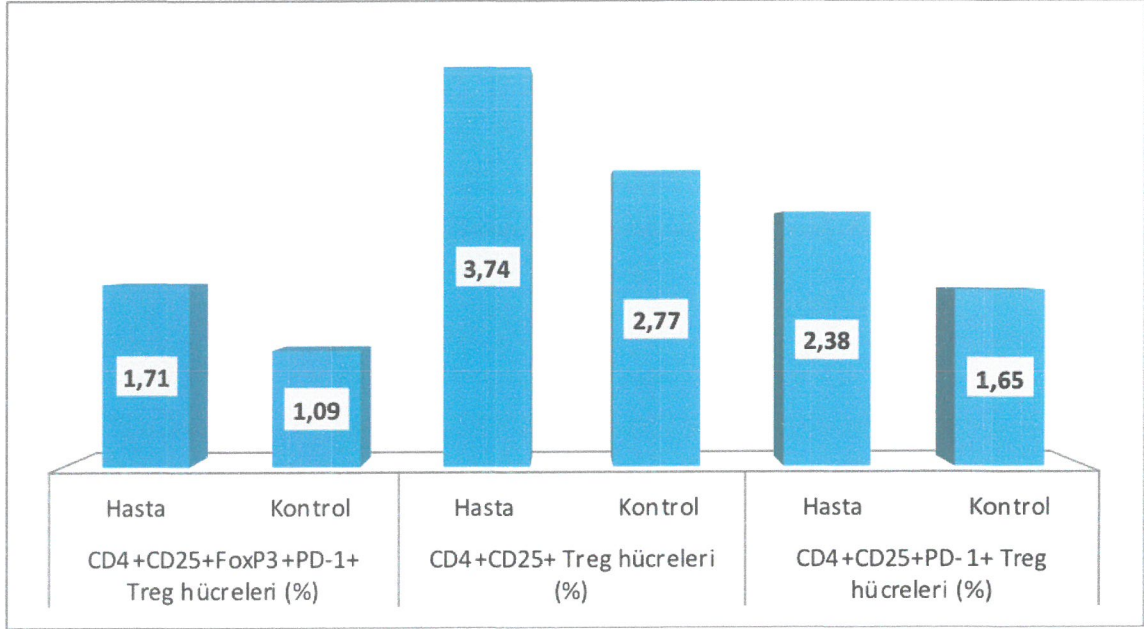
4.3. Hasta ve Kontrol Gruplarında Treg Hücreleri (%) Düzeyleri

Çizelge 4.6. Hasta ve kontrol gruplarında Treg hücreleri (%) düzeyleri

Treg hücreleri (%) düzeyleri	Grup	n	X	s.s.	p
CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ PD-1 ⁺ Treg hücreleri (%)	Hasta	20	1,71	0,83	0,04*
	Kontrol	9	1,09	0,30	
CD4 ⁺ CD25 ⁺ Treg hücreleri (%)	Hasta	20	3,74	2,52	0,32
	Kontrol	9	2,77	2,11	
CD4 ⁺ CD25 ⁺ PD-1 ⁺ Treg hücreleri (%)	Hasta	20	2,38	1,43	0,22
	Kontrol	9	1,65	1,46	

****Mann Whitnet U Testi Uygulanmıştır. * Anlamlı Düzeyde İlişkiyi Gösterir**

Çalışmada hasta ve kontrol gruplarında CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺PD-1⁺ Treg hücreleri (%) düzeyleri gruplara göre farklıdır. Hasta grubu CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺PD-1⁺ Treg hücreleri (%) kontrol grubuna göre daha yüksek düzeylerde (p=0,01). Çalışmada hasta ve kontrol gruplarının CD4⁺CD25⁺ Treg hücreleri (%) benzer düzeylerde (p=0,32). Çalışmada hasta ve kontrol gruplarının CD4⁺CD25⁺PD-1⁺ Treg hücreleri (%) benzer düzeylerde (p=0,32). Treg hücreleri (%) düzeyleri Şekil 4.1’de verilmiştir.



Şekil 4.1. Hasta ve kontrol gruplarında Treg hücreleri (%) düzeyleri

Her ne kadar $CD4^+CD25^+FoxP3^+PD-1^+$ Treg hücreleri (%) düzeyleri hastalarda istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunmuş ise de $CD4^+CD25^+$ ve $CD4^+CD25^+PD-1^+$ Treg hücreleri (%) düzeylerinin hastalarda yüksek olduğu açıkça görülmektedir. Bu durum hastalarda kemik iliğinde Treg hücrelerinin lokal birikimini desteklemektedir.

4.4. Hasta ve Kontrol Gruplarında Görelî PD-1 mRNA ve PD-L1 mRNA İfade Seviyelerinin Değerlendirilmesi

Hasta ve kontrol gruplarında görelî PD-1 mRNA ve PD-L1 mRNA ifade seviyeleri Çizelge 4.7. ve Şekil 4.2.'de verilmiştir.

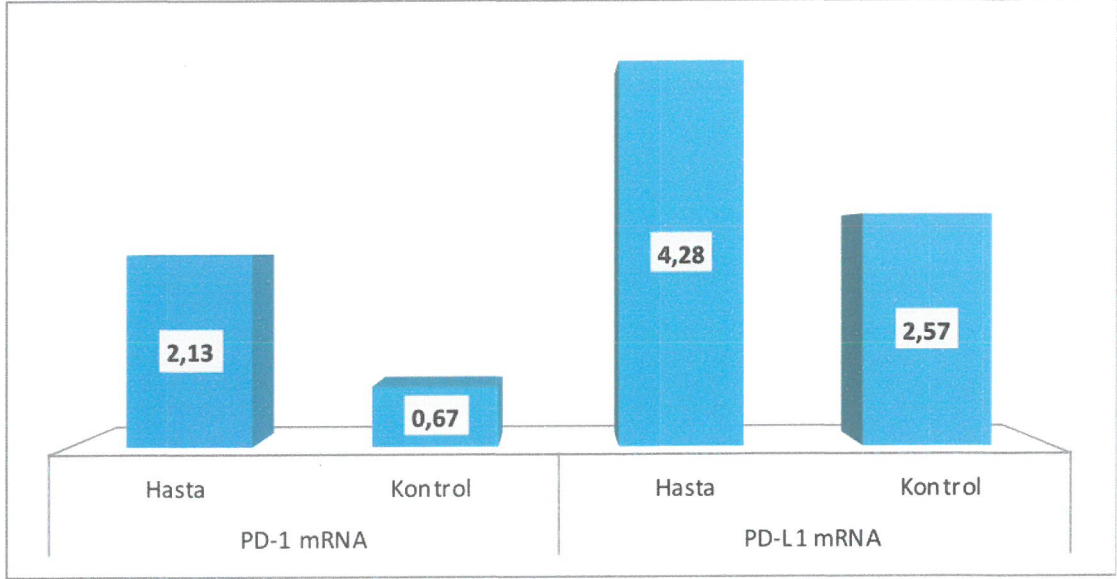
Çizelge 4.7. Hasta ve kontrol gruplarında görelî PD-1 mRNA ve PD-L1 mRNA ifade seviyeleri

Ölçüm	Grup	n	X	s.s.	p
PD-1 mRNA	Hasta	20	2,13	2,28	0,01*
	Kontrol	9	0,67	0,64	
PD-L1 mRNA	Hasta	20	4,28	1,48	0,02*
	Kontrol	9	2,57	3,64	

****Mann Whitnet U Testi Uygulanmıştır. * Anlamlı Düzeyde İlişkiyi Gösterir**

Çalışmada hasta ve kontrol gruplarında görelî PD-1 mRNA ifade seviyelerinin gruplara göre farklı düzeylerde olduğu tespit edilmiştir. Hasta grubu PD-1 mRNA ifade seviyeleri kontrol grubuna göre daha yüksektir (p=0,01).

Çalışmada hasta ve kontrol gruplarında görelî PD-L1 mRNA ifade seviyelerinin gruplara göre farklı düzeylerde olduğu tespit edilmiştir. Hasta grubu PD-L1 mRNA ifade seviyeleri kontrol grubuna göre daha yüksektir ($p=0,02$).



Şekil 4.2. Hasta ve kontrol gruplarında görelî PD-1 mRNA ve PD-L1 mRNA ifade seviyeleri

4.5. Hasta ve Kontrol Gruplarında Treg Hücreleri ve mRNA İlişkilerinin Değerlendirilmesi

Hasta ve kontrol gruplarında Treg hücreleri ve mRNA ilişkilerinin analizi Çizelge 4.8. ve Şekil 4.3.'de özetlenmiştir.

Çizelge 4.8. Hasta ve kontrol gruplarında Treg hücreleri ve mRNA ilişkilerinin incelenmesi

Ölçüm (n=29)		CD4 ⁺ CD25 ⁺ Fox P3 ⁺ PD-1 ⁺ Treg hücreleri (%)	CD4 ⁺ CD25 ⁺ Treg hücreleri (%)	CD4 ⁺ CD2 5 ⁺ PD-1 ⁺ Treg hücreleri (%)	PD-1 mRNA	PD-L1 mRNA
CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ D-1 ⁺ Treg hücreleri (%)	r	1				
	p					
CD4 ⁺ CD25 ⁺ Treg hücreleri (%)	r	0,62**	1			
	p	0,01				
CD4 ⁺ CD25 ⁺ PD-1 ⁺ Treg hücreleri (%)	r	0,76**	0,88*	1		
	p	0,01	0,01			
PD-1 mRNA	r	0,23	0,12	0,17	1	
	p	0,22	0,52	0,37		
PD-L1 mRNA	r	0,23	0,09	0,14	0,67**	1
	p	0,22	0,63	0,47	0,01	

*Korelasyon Analizi uygulanmıştır. ** anlamlı düzeyde ilişkiyi göstermektedir.

Bireylerin CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺PD-1⁺ Treg hücreleri (%) düzeyleri ile CD4⁺CD25⁺ Treg hücreleri (%) düzeyleri arasında pozitif düzeyde ve yüksek düzeyde pozitif yönde anlamlı ilişki olduğu görülmüştür (r=0,62,p=0,01,p<0,05).

Bireylerin CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺PD-1⁺ Treg hücreleri (%) düzeyleri ile CD4⁺CD25⁺PD-1⁺ Treg hücreleri (%) düzeyleri arasında pozitif düzeyde ve yüksek düzeyde pozitif yönde anlamlı ilişki olduğu görülmüştür (r=0,76,p=0,01,p<0,05).

Bireylerin CD4⁺CD25⁺PD-1⁺ Treg hücreleri (%) düzeyleri ile CD4⁺CD25⁺PD-1⁺ Treg hücreleri (%) düzeyleri arasında pozitif düzeyde ve çok yüksek düzeyde pozitif yönde anlamlı ilişki olduğu görülmüştür (r=0,88,p=0,01,p<0,05).

Bireylerin $CD4^+CD25^+FoxP3^+PD-1^+$ Treg hücreleri (%) düzeyleri ile PD-1 mRNA ifade seviyesi arasında anlamlı düzeyde ilişki olmadığı görülmüştür ($r=0,23, p=0,22, p>0,05$).

Bireylerin $CD4^+CD25^+FoxP3^+PD-1^+$ Treg hücreleri (%) düzeyleri ile PD-L1 mRNA ifade seviyesi arasında anlamlı düzeyde ilişki olmadığı görülmüştür ($r=0,23, p=0,22, p>0,05$).

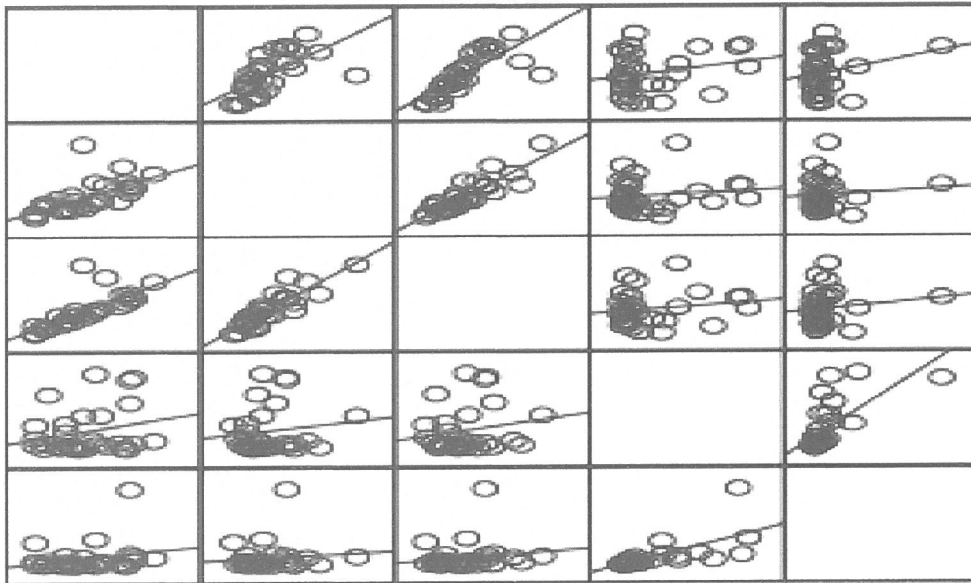
Bireylerin $CD4^+CD25^+$ Treg hücreleri (%) düzeyleri ile PD-1 mRNA ifade seviyesi arasında anlamlı düzeyde ilişki olmadığı görülmüştür ($r=0,12, p=0,53, p>0,05$).

Bireylerin $CD4^+CD25^+$ Treg hücreleri (%) düzeyleri ile PD-L1 mRNA ifade seviyesi arasında anlamlı düzeyde ilişki olmadığı görülmüştür ($r=0,09, p=0,63, p>0,05$).

Bireylerin $CD4^+CD25^+PD-1^+$ Treg hücreleri (%) düzeyleri ile PD-1 mRNA ifade seviyesi arasında anlamlı düzeyde ilişki olmadığı görülmüştür ($r=0,14, p=0,53, p>0,05$).

Bireylerin $CD4^+CD25^+PD-1^+$ Treg hücreleri (%) düzeyleri ile PD-L1 mRNA ifade seviyesi arasında anlamlı düzeyde ilişki olmadığı görülmüştür ($r=0,14, p=0,47, p>0,05$).

Bireylerin PD-L1 mRNA ile PD-1 mRNA ifade seviyesi arasında pozitif düzeyde ve yüksek düzeyde pozitif yönde anlamlı ilişki olduğu görülmüştür ($r=0,67, p=0,01, p<0,05$).



Şekil 4.3. Hasta ve kontrol gruplarında Treg hücreleri ve mRNA ilişkilerinin incelenmesi

Hasta grubunda Treg hücreleri ve mRNA ilişkilerinin incelenmesi Çizelge 4.9 ve Şekil 4.4’de özetlenmiştir.

Çizelge 4.9. Hasta grubunda Treg hücreleri ve mRNA ilişkilerinin incelenmesi

Grup		CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ P D-1 ⁺ Treg hücreleri (%)	CD4 ⁺ CD25 ⁺ + Treg hücreleri (%)	CD4 ⁺ CD25 ⁺ P D-1 ⁺ Treg hücreleri (%)	PD-1 mRN A	PD- L1 mRN A
CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ P D-1 ⁺ Treg hücreleri (%)	r	1				
	p					
CD4 ⁺ CD25 ⁺ Treg hücreleri (%)	r	0,47**	1			
	p	0,04				
CD4 ⁺ CD25 ⁺ PD-1 ⁺ Treg hücreleri (%)	r	0,61**	0,85**	1		
	p	0,01	0,01			
PD-1 mRNA	r	0,25	0,11	0,16	1	
	p	0,28	0,65	0,51		
PD-L1 mRNA	r	0,33	0,12	0,17	0,66**	1
	p	0,15	0,61	0,47	0,01	

*Korelasyon Analizi uygulanmıştır. ** Anlamlı düzeyde ilişkiyi göstermektedir.

Hasta grubunda CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺PD-1⁺ Treg hücreleri (%) düzeyleri ile CD4⁺CD25⁺ Treg hücreleri (%) düzeyleri arasında pozitif düzeyde ve orta düzeyde güçlü, pozitif yönde anlamlı ilişki olduğu görülmüştür (r=0,47,p=0,04,p<0,05).

Hasta grubunda CD4⁺CD25⁺PD-1⁺ Treg hücreleri (%) düzeyleri ile CD4⁺CD25⁺PD-1⁺ Treg hücreleri (%) düzeyleri arasında pozitif düzeyde ve çok yüksek düzeyde pozitif yönde anlamlı ilişki olduğu görülmüştür (r=0,85,p=0,01,p<0,05).

Hasta grubunda CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺PD-1⁺ Treg hücreleri (%) düzeyleri ile CD4⁺CD25⁺PD-1⁺ Treg hücreleri (%) düzeyleri arasında pozitif düzeyde ve yüksek düzeyde pozitif yönde anlamlı ilişki olduğu görülmüştür (r=0,61,p=0,01,p<0,05).

Hasta grubunda CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺PD-1⁺ Treg hücreleri (%) düzeyleri ile PD-1 mRNA ifade seviyesi arasında anlamlı düzeyde ilişki olmadığı görülmüştür (r=0,25,p=0,28,p>0,05).

Hasta grubunda CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺PD-1⁺ Treg hücreleri (%) düzeyleri ile PD-L1 mRNA ifade seviyesi arasında anlamlı düzeyde ilişki olmadığı görülmüştür (r=0,33,p=0,15,p>0,05).

Hasta grubunda CD4⁺CD25⁺ Treg hücreleri (%) düzeyleri ile PD-1 mRNA ifade seviyesi arasında anlamlı düzeyde ilişki olmadığı görülmüştür (r=0,25,p=0,28,p>0,05).

Hasta grubunda $CD4^+CD25^+$ Treg hücreleri (%) düzeyleri ile PD-1 mRNA ifade seviyesi arasında anlamlı düzeyde ilişki olmadığı görülmüştür ($r=0,11, p=0,65, p>0,05$).

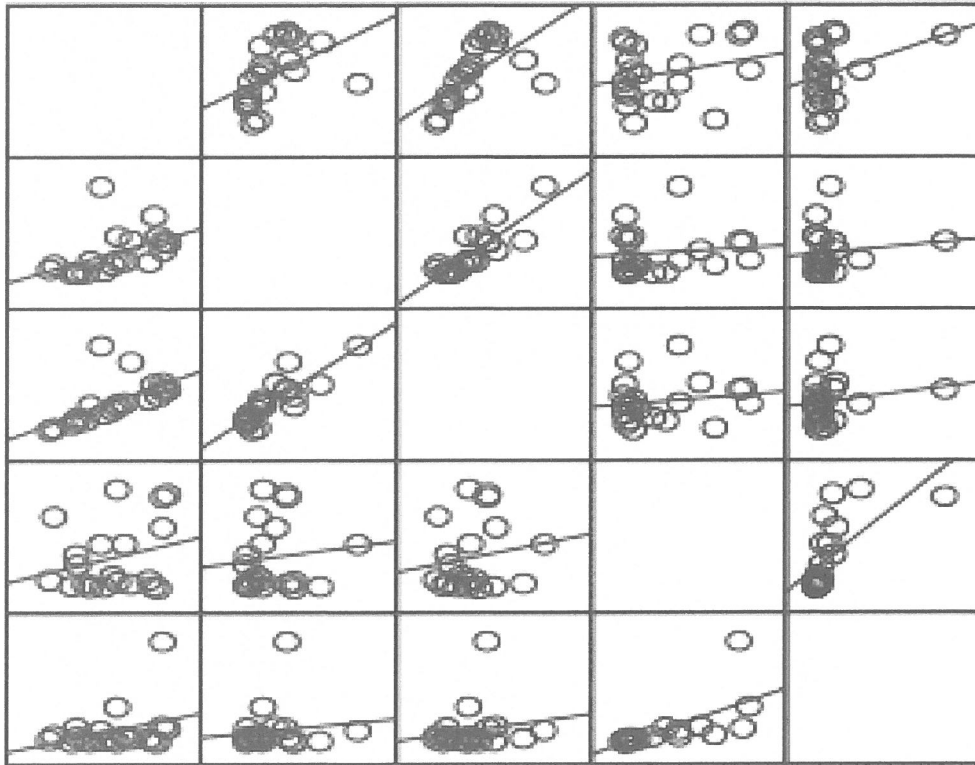
Hasta grubunda $CD4^+CD25^+$ Treg hücreleri (%) düzeyleri ile PD-L1 mRNA ifade seviyesi arasında anlamlı düzeyde ilişki olmadığı görülmüştür ($r=0,12, p=0,61, p>0,05$).

Hasta grubunda $CD4^+CD25^+PD-1^+$ Treg hücreleri (%) düzeyleri ile PD-1 mRNA ifade seviyesi arasında anlamlı düzeyde ilişki olmadığı görülmüştür ($r=0,16, p=0,51, p>0,05$).

Hasta grubunda $CD4^+CD25^+PD-1^+$ Treg hücreleri (%) düzeyleri ile PD-L1 mRNA ifade seviyesi arasında anlamlı düzeyde ilişki olmadığı görülmüştür ($r=0,17, p=0,51, p>0,05$).

Hasta grubunda PD-L1 mRNA ile PD-1 mRNA ifade seviyesi arasında pozitif düzeyde ve yüksek düzeyde pozitif yönde anlamlı ilişki olduğu görülmüştür ($r=0,66, p=0,01, p<0,05$).

Grup: Hasta



Şekil 4.4. Hasta grubunda Treg hücreleri ve mRNA ilişkilerinin incelenmesi

Kontrol grubunda Treg hücreleri ve mRNA ilişkilerinin incelenmesi Çizelge 4.10 ve Şekil 4.5’de özetlenmiştir.

Çizelge 4.10. Kontrol grubunda Treg hücreleri ve mRNA ilişkilerinin incelenmesi

Grup		CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ P D-1 ⁺ Treg hücreleri (%)	CD4 ⁺ CD25 ⁺ + Treg hücreleri (%)	CD4 ⁺ CD25 ⁺ P D-1 ⁺ Treg hücreleri (%)	PD-1 mRN A	PD- L1 mRN A
CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ P D-1 ⁺ Treg hücreleri (%)	r	1				
	p					
CD4 ⁺ CD25 ⁺ Treg hücreleri (%)	r	0,92 ^{**}	1			
	p	0,01				
CD4 ⁺ CD25 ⁺ PD-1 ⁺ Treg hücreleri (%)	r	0,97 ^{**}	0,95 ^{**}	1		
	p	0,01	0,01			
PD-1 mRNA	r	-0,19	-0,34	-0,28	1	
	p	0,63	0,37	0,46		
PD-L1 mRNA	r	-0,06	-0,22	-0,13	0,91 ^{**}	1
	p	0,89	0,57	0,74	0,01	

*Korelasyon Analizi uygulanmıştır. ** anlamlı düzeyde ilişkiyi göstermektedir.

Kontrol grubunda CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺PD-1⁺ Treg hücreleri (%) düzeyleri ile CD4⁺CD25⁺ Treg hücreleri (%) düzeyleri arasında pozitif düzeyde ve çok yüksek düzeyde güçlü, pozitif yönde anlamlı ilişki olduğu görülmüştür (r=0,492,p=0,01,p<0,05).

Kontrol grubunda CD4⁺CD25⁺PD-1⁺ Treg hücreleri (%) düzeyleri ile CD4⁺CD25⁺PD-1⁺ Treg hücreleri (%) düzeyleri arasında pozitif düzeyde ve çok yüksek düzeyde pozitif yönde anlamlı ilişki olduğu görülmüştür (r=0,97,p=0,01,p<0,05).

Kontrol grubunda CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺PD-1⁺ Treg hücreleri (%) düzeyleri ile CD4⁺CD25⁺PD-1⁺ Treg hücreleri (%) düzeyleri arasında pozitif düzeyde ve çok yüksek düzeyde pozitif yönde anlamlı ilişki olduğu görülmüştür (r=0,95,p=0,01,p<0,05).

Kontrol grubunda CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺PD-1⁺ Treg hücreleri (%) düzeyleri ile PD-1 mRNA ifade seviyesi arasında anlamlı düzeyde ilişki olmadığı görülmüştür (r=-0,19,p=0,63,p>0,05).

Kontrol grubunda CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺PD-1⁺ Treg hücreleri (%) düzeyleri ile PD-L1 mRNA ifade seviyesi arasında anlamlı düzeyde ilişki olmadığı görülmüştür (r=-0,06,p=0,89,p>0,05).

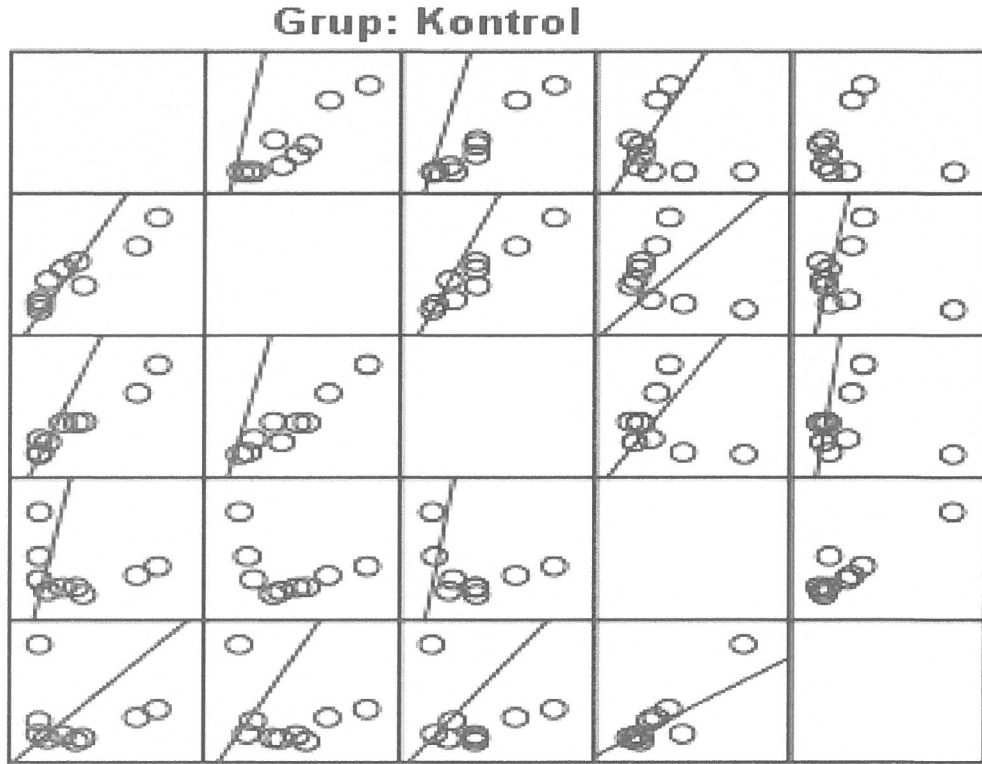
Kontrol grubunda $CD4^+CD25^+$ Treg hücreleri (%) düzeyleri ile PD-1 mRNA ifade seviyesi arasında anlamlı düzeyde ilişki olmadığı görülmüştür ($r=-0,34, p=0,37, p>0,05$).

Kontrol grubunda $CD4^+CD25^+$ Treg hücreleri (%) düzeyleri ile PD-1 mRNA ifade seviyesi arasında anlamlı düzeyde ilişki olmadığı görülmüştür ($r=-0,22, p=0,57, p>0,05$).

Kontrol grubunda $CD4^+CD25^+$ Treg hücreleri (%) düzeyleri ile PD-L1 mRNA ifade seviyesi arasında anlamlı düzeyde ilişki olmadığı görülmüştür ($r=-0,28, p=0,46, p>0,05$).

Kontrol grubunda $CD4^+CD25^+PD-1^+$ Treg hücreleri (%) düzeyleri ile PD-1 mRNA ifade seviyesi arasında anlamlı düzeyde ilişki olmadığı görülmüştür ($r=-0,13, p=0,74, p>0,05$).

Kontrol grubunda PD-L1 mRNA ile PD-1 mRNA ifade seviyesi arasında pozitif düzeyde ve çok yüksek düzeyde pozitif yönde anlamlı ilişki olduğu görülmüştür ($r=0,91, p=0,01, p<0,05$).



Şekil 4.5. Kontrol grubunda Treg hücreleri ve mRNA ilişkilerinin incelenmesi

Hasta grubu Treg hücreleri (%) ve mRNA ifade seviyelerinin MM biyokimyasal parametreleri ile ilişkisinin karşılaştırılması Çizelge 4.11’de verilmiştir.

Çizelge 4.11. Hasta grubu Treg hücreleri (%) ve mRNA ifade seviyelerinin MM biyokimyasal parametreleri ile ilişkisinin karşılaştırılması

Grup	Treg/PD-1, PD-L1		Beta 2 Mikrogl obulin	IgG	IgA	IgM	S. Kapp a	S. Lamb da
Hasta (n=20)	CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ PD-1 ⁺ Treg hücreleri (%)	r	-0,15	0,29	-0,30	-0,17	0,29	0,12
		p	0,52	0,22	0,19	0,46	0,22	0,61
	CD4 ⁺ CD25 ⁺ Treg hücreleri (%)	r	-0,36	0,33	-0,31	0,17	0,02	-0,13
		p	0,12	0,15	0,19	0,47	0,95	0,59
	CD4 ⁺ CD25 ⁺ PD-1 ⁺ Treg hücreleri (%)	r	-0,16	0,44	-0,31	-0,14	0,16	-0,13
		p	0,51	0,05	0,19	0,55	0,50	0,60
	PD-1 mRNA	r	-0,36	0,22	-0,16	-0,27	0,09	-0,08
		p	0,12	0,35	0,50	0,24	0,69	0,75
	PD-L1 mRNA	r	-0,28	0,17	-0,11	-0,21	-0,03	0,01
		p	0,24	0,47	0,65	0,38	0,90	0,98

**Korelasyon Analizi uygulanmıştır.*

Hasta gurubunda CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺PD-1⁺ Treg hücreleri (%) düzeyleri ile Beta 2 Mikroglobulin, IgG, IgA, IgM, S. Kappa ve S. Lambda ölçümleri arasında anlamlı düzeylerde ilişki olmadığı tespit edilmiştir (p>0,05).

Hasta gurubunda CD4⁺CD25⁺ Treg hücreleri (%) düzeyleri ile Beta 2 Mikroglobulin, IgG, IgA, IgM, S. Kappa ve S. Lambda ölçümleri arasında anlamlı düzeylerde ilişki olmadığı tespit edilmiştir (p>0,05)

Hasta gurubunda CD4⁺CD25⁺PD-1⁺Treg hücreleri (%) düzeyleri ile Beta 2 Mikroglobulin, IgG, IgA, IgM, S. Kappa ve S. Lambda ölçümleri arasında anlamlı düzeylerde ilişki olmadığı tespit edilmiştir (p>0,05)

Hasta gurubunda CD4⁺CD25⁺PD-1⁺Treg hücreleri (%) düzeyleri ile Beta 2 Mikroglobulin, IgG, IgA, IgM, S. Kappa ve S. Lambda ölçümleri arasında anlamlı düzeylerde ilişki olmadığı tespit edilmiştir (p>0,05)

Hasta gurubunda PD-1 mRNA ifade seviyesi ile Beta 2 Mikroglobulin, Igg, Iga, Igm, S. Kappa ve S. Lambda ölçümleri arasında anlamlı düzeylerde ilişki olmadığı tespit edilmiştir (p>0,05)

Hasta grubunda PD-L1 mRNA ifade seviyesi ile Beta 2 Mikroglobulin, IgG, IgA, IgM, S. Kappa ve S. Lambda ölçümleri arasında anlamlı düzeylerde ilişki olmadığı tespit edilmiştir ($p>0,05$).

4.6. Hastaların Evrelerine Göre Treg hücreleri (%) ve PD-1, PD-L1 mRNA İfade Seviyeleri

Hastaların evrelerine göre Treg hücreleri (%) ve PD-1, PD-L1 mRNA ifade seviyeleri Çizelge 4.12. ve Şekil 4.6.' da verilmiştir.

Çizelge 4.12. Evrelere göre Treg hücreleri (%) ve PD-1, PD-L1 mRNA ifade seviyeleri

Treg/PD-1, PD-L1	Evre						p
	I (n=5)		II (n=3)		III (n=12)		
	X	s.s	X	s.s	X	s.s	
CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ PD-1 ⁺ Treg hücreleri (%)	1,53	1,20	1,52	0,55	1,84	0,78	0,36
CD4 ⁺ CD25 ⁺ Treg hücreleri (%)	5,22	1,71	2,23	0,67	3,30	2,03	0,01*
CD4 ⁺ CD25 ⁺ PD-1 ⁺ Treg hücreleri (%)	2,62	2,27	1,75	0,61	2,46	1,26	0,32
PD-1 mRNA	2,94	2,59	2,08	1,06	1,92	2,52	0,24
PD-L1 mRNA	9,19	6,06	2,82	2,27	2,82	3,95	0,04*

****Kruskal Wallis Testi Uygulanmıştır. * Anlamlı Düzeyde Farkı Gösterir**

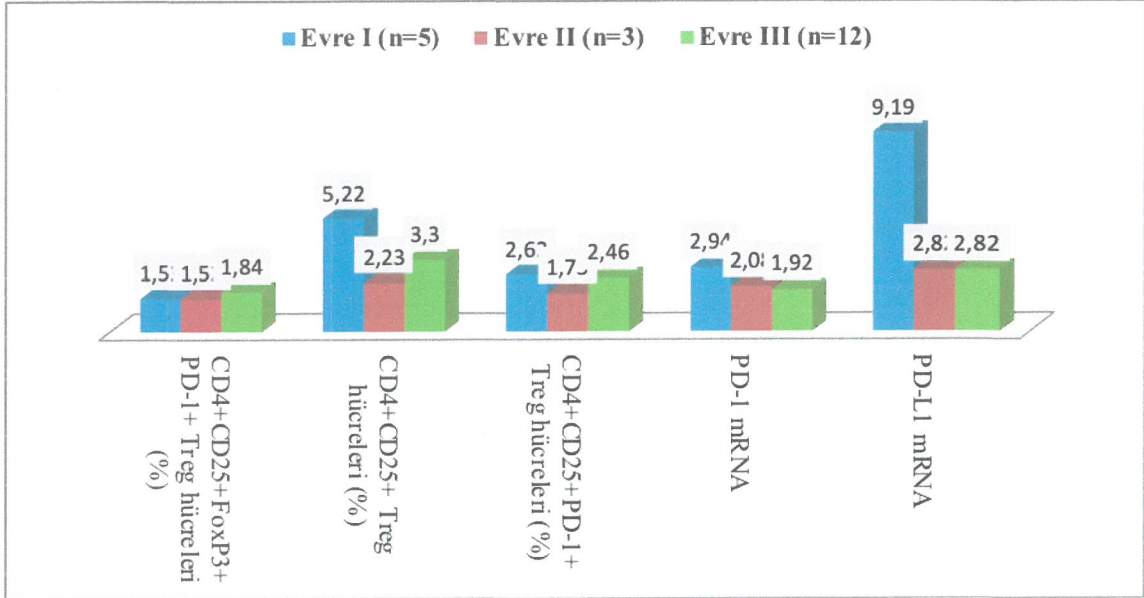
Hastaların evrelerine göre CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺PD-1⁺ Treg hücreleri (%) farklı düzeylerde değildir ($p=0,36, p>0,05$).

Hastaların evrelerine göre CD4⁺CD25⁺ Treg hücreleri (%) farklı düzeylerdedir. Evre I olan hastaların CD4⁺CD25⁺ Treg hücreleri (%) Evre II ve III hastalarına göre daha yüksek düzeylerdedir ($p=0,01, p<0,05$).

Hastaların evrelerine göre CD4⁺CD25⁺PD-1⁺ Treg hücrelerinin (%) farklı düzeylerde olmadığı görülmektedir ($p=0,32, p>0,05$).

Hastaların evrelerine göre PD-1 mRNA ifadesinin farklı düzeylerde olmadığı görülmektedir ($p=0,24, p>0,05$).

Hastaların evrelerine göre PD-L1 mRNA ifadesi farklı düzeylerdedir. Evre I hastaların PD-L1 mRNA ifadesi Evre II ve III hastalarına göre daha yüksek düzeylerdedir ($p=0,04, p<0,05$).



Şekil 4.6. Evrelere göre Treg hücreleri (%) ve PD-1, PD-L1 mRNA ifade seviyeleri

Hastaların minimum düzeyde PD-L1 immün kontrol noktası sağlayıp sağlamadığının test edilmesi stratejisi bu tedavilerden faydalanabilecek hasta sayısını azaltmasına rağmen, başarı oranını artırabilir. Aynı zamanda immünsupresif Treglerin eliminasyonu için bir strateji olabilir. Her iki durumun tek bir inhibitör stratejisi ile gerçekleştirilebilmesi hasta tedavilerinde yeni anlayışlar geliştirmemize katkıda bulunabilir.

Bu çalışmada yeni tanı MM hastalarında ve kontrollerde kemik iliğinde hem Tregler düzeyinde PD-1 ifadesini hem de mRNA düzeyinde PD-1 ve PD-L1 ifadesini değerlendirdik. Üstelik hastalık evrelerine göre de değerlendirdik. MM hastalarında PD-1⁺ Treg hücrelerinin ve PD-1, PD-L1 ifadesinin bu çalışmada birlikte ele alınması literatürdeki ilk veridir. Ayrıca PD-1 ve PD-L1 inhibitörleri ile devam eden klinik kombinasyon çalışmaları ile eş zamanlı bu çalışmanın sonuçlarının elde edilmesi devam eden bu çalışmalar için yeni stratejiler geliştirilmesine katkıda bulunacaktır.

Aşağıda hastalara ait demografik, laboratuvar, akış sitometri ve kantitatif PCR analiz sonuçları verilmiştir.

Çizelge 4.13. Multipl miyelom hastalarının biyokimyasal parametrelerle, Treg hücreleri (%) ve PD-1, PD-L1 mRNA ifade seviyelerine ait sonuçlar

Cinsiyet	Yaş	Exre	Akt Tipi	Hb (g/dl)	İkosit (say/mm ³)	nörofil (say/mm ³)	lenosit (say/mm ³)	trombosit (say/mm ³)	LDH	total protein	albumin	kreatin	kalsiyum	beta 2 mikroglobulin	IgG	IgA	IgM	s. kayna	s. lambda	CD4 ⁺ CD25 ⁺ FOXP3 ⁺ PD-1 ⁺ Treg hücreleri (%)	CD4 ⁺ CD25 ⁺ PD-1 ⁺ Treg hücreleri (%)	CD4 ⁺ CD25 ⁺ PD-1 ⁺ Treg hücreleri (%)	PD-1 mRNA	PD-L1 mRNA
K	55	I	IGA K	13,6	4,22	2,44	1,41	246	151	7,83	4,64	0,57	10,31	1,09	952	618	170	2,29	1,46	0,3	1,9	0,51	0,650126 ₇	1,053439 ₁
E	75	II	IGG L	9,2	2,14	1,11	0,85	247	156	9,59	3,62	0,9	8,9	4,5	4850	25,8	18,1	0,88	44,21	1,7	2,4	1,84	0,921593 ₈	0,911738 ₉
K	55	I	IGG L	10,4	7,3	5,18	1,35	309	368	9,4	4,51	0,59	9,42	1,66	2950	47	30,9	0,58	9,54	0,4	2,4	0,63	4,832	2,6755
E	66	III	IGG K	8,9	5,57	4,09	0,86	226	280	6,98	4,05	4,39	9,6	15,9	1330	137	26,1	18,1	4,42	0,8	1,4	0,9	0,282634 ₃	0,159141 ₈
E	67	I	IGG K	12,1	4,75	2,32	1,43	203	226	8,5	4,2	0,89	9,71	2,94	2830	130	62,3	2,2	1,46	1,43	11,2	6,07	2,988	4,2735
K	73	II	IGG L	9,6	7,89	5,01	2,18	377	130	8,9	3,38	0,8	9,94	3,89	4110	25,8	37,2	0,82	1,88	0,9	1,5	1,1	2,3155	5,3355
K	51	III	IGG K	8,2	5,56	3,7	1,16	94	235	10,37	3,75	0,76	9,95	7,8	5050	30,2	<18	5,28	0,57	2,9	4,9	3,2	6,303	5,063
K	65	III	IGG L	9,7	10,37	6,22	2,91	258	237	10,97	2,52	1,52	7,79	11,7	7500	<26	<18	1,54	3,96	2,1	5,1	5	0,403505 ₄	1,316308 ₄
E	53	III	K	7,6	7,46	4,87	1,32	108	178	6,04	4,12	2,71	14,34	25,3	332	<26	<18	13,51	0,51	1,5	1,7	1,6	0,218373 ₃	0,524172 ₃
K	60	III	IGG K	8,9	1,93	0,41	1,42	115	230	7,99	4,16	0,74	9,01	6,96	2310	52	21,7	70,12	1,05	2,8	4	3,6	4,088927 ₆	5,898036 ₁
E	45	III	K	6,3	10,21	6,29	2,88	185	323	5,95	4,84	2,94	14,46	14,5	513	47	19,4	1,93	3,85	1,2	2,8	2,15	0,187408 ₉	0,206381 ₉
K	50	III	IGA K	6,6	3,27	1,83	1	162	106	11,01	2,77	1,19	10,4	11,7	503	4140	31,5	5,45	0,63	1,1	1,5	1,15	0,424075 ₅	1,219988 ₂
K	62	I	IGA L	12,8	11,15	7,5	2,54	265	209	6,86	4,12	0,88	9,49	2,24	894	630	112	1,99	14,86	2,7	5,6	2,75	0,109180 ₇	0,166054 ₇
E	67	III	IGG K	9,4	1,61	5,27	4,28	221	119	9,4	3,6	0,96	8,98	5,56	3660	<26	<18	14,45	0,89	2,6	7,9	3,5	0,217772 ₁	0,287823 ₃
K	58		IGG L	13,2	5,39	3,12	1,63	241	201	7,21	4,2	0,63	9,06		1570	77,6	218	0,1	32,8	1,8	5,6	2,1	0,533079 ₄	0,135213 ₈
E	65	III	L	10,6	7,39	5,09	1,3	180	165	5,48	3,7	4,49	9,27	7,21	198	<26	<18	1,28	23,93	2,5	2,7	2,5	0,665029 ₂	1,231353 ₈
K	66	III	IGA L	6,2	3,93	3,16	0,5	77	420	10,36	2,9	4,25	10,74	14,2	436	3090	<18	0,42	27,43	0,92	1,4	1,3	1,646878 ₃	1,911924 ₆
K	57	I	IGG L	10,6	4,19	7,02	1,94	200	157	9,3	3,8	0,73	9,35	2,12	3760	<26	<18	0,59	20,07	2,8	5	3,14	6,105493 ₅	37,77885 ₂
E	60	III	IGA K	9,9	5,2	2,57	1,92	192	114	10,9	3,4	0,89	10,25	7,87	490	704	<18	2,37	0,37	1,8	2,9	2,2	6,627648 ₆	13,18939 ₇
K	59	II	IGG L	15,3	8,67	4,79	2,7	310	278	7,42	3,52	0,36	9,32	3,43	2270	<26	51,8	0,78	51,62	1,96	2,8	2,3	3,012574 ₃	2,211793 ₇

Hb: Hemoglobin, LDH: laktat dehidrogenaz (U/L)

Çizelge 4.14. Kontrol grubu (ITP) biyokimyasal parametrelerle, Treg hücreleri (%) ve PD-1, PD-L1 mRNA ifade seviyelerine ait sonuçlar

Cinsiyet	Yaş	Evrak	AL tip	Hb (gr/dl)	İkosit (say/mm ³)	nötrofil (say/mm ³)	lenfosit (say/mm ³)	trombosit (say/mm ³)	LDH	total protein	albumin	kreatinin	kalsiyum	beta 2 mikroglobulin	IgG	IgA	IgM	s. kappa	s. lambda	CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ D-1 ⁺ Treg hücreleri (%)	CD4 ⁺ CD25 ⁺ Treg hücreleri (%)	CD4 ⁺ CD25 ⁺ PD-1 ⁺ Treg hücreleri (%)	PD-L1 mRNA A	PD-L1 mRNA A
K	55	I	IG AK	13,60	4,22	2,44	1,41	246	151	7,83	4,64	0,57	10,31	1,09	952,00	618,00	170,00	2,29	1,46	0,30	1,90	0,51	0,65	1,05
E	75	II	IG GL	9,20	2,14	1,11	0,85	247	156	9,59	3,62	0,90	8,90	4,50	4850,00	25,80	18,10	0,88	44,21	1,70	2,40	1,84	0,92	0,91
K	55	I	IG GL	10,40	7,30	5,18	1,35	309	368	9,40	4,51	0,59	9,42	1,66	2950,00	47,00	30,90	0,58	9,54	0,40	2,40	0,63	4,83	2,68
E	66	III	IG GK	8,90	5,57	4,09	0,86	226	280	6,98	4,05	4,39	9,60	15,90	1330,00	137,00	26,10	18,10	4,42	0,80	1,40	0,90	0,28	0,16
E	67	I	IG GK	12,10	4,75	2,32	1,43	203	226	8,50	4,20	0,89	9,71	2,94	2810,00	130,00	62,30	2,20	1,46	1,43	11,20	6,07	2,99	4,27
K	73	II	IG GL	9,60	7,89	5,01	2,18	377	130	8,90	3,38	0,80	9,94	3,89	4110,00	25,80	37,20	0,82	1,88	0,90	1,50	1,10	2,32	5,34
K	51	III	IG GK	8,20	5,56	3,70	1,16	94	235	10,37	3,75	0,76	9,95	7,80	5050,00	30,20	<18	5,28	0,57	2,90	4,90	3,20	6,30	5,06
K	65	III	IG GL	9,70	10,37	6,22	2,91	258	237	10,97	2,52	1,52	7,79	11,70	7500,00	<26	<18	1,54	3,96	2,10	5,10	5,00	0,40	1,32
E	53	III	K	7,60	7,46	4,87	1,32	108	178	6,04	4,12	2,71	14,34	25,30	332,00	<26	<18	13,51	0,51	1,50	1,70	1,60	0,22	0,52
K	60	III	IG GK	8,90	1,93	0,41	1,42	115	230	7,99	4,16	0,74	9,01	6,96	2310,00	52,00	21,70	70,12	1,05	2,80	4,00	3,60	4,09	5,90
E	45	III	K	6,30	10,21	6,29	2,88	185	323	5,95	4,84	2,94	14,46	14,50	513,00	47,00	19,40	1,93	3,85	1,20	2,80	2,15	0,19	0,21
K	50	III	IG AK	6,60	3,27	1,83	1,00	162	106	11,01	2,77	1,19	10,40	11,70	503,00	4140,00	31,50	5,45	0,63	1,10	1,50	1,15	0,42	1,22
K	62	I	IG AL	12,80	11,15	7,50	2,54	265	209	6,86	4,12	0,88	9,49	2,24	894,00	630,00	112,00	1,99	14,86	2,70	5,60	2,75	0,11	0,17
E	67	III	IG GK	9,40	1,61	5,27	4,28	221	119	9,40	3,60	0,96	8,98	5,56	3660,00	<26	<18	14,45	0,89	2,60	7,90	3,50	0,22	0,29
K	58		IG GL	13,20	5,39	3,12	1,63	241	201	7,21	4,20	0,63	9,06		1570,00	77,60	216,00	0,10	32,80	1,80	5,60	2,10	0,53	0,14
E	65	III	I	10,60	7,39	5,09	1,30	180	165	5,48	3,70	4,49	9,27	7,21	198,00	<26	<18	1,28	23,93	2,50	2,70	2,50	0,67	1,23
K	66	III	IG AL	6,20	3,93	3,16	0,50	77	420	10,36	2,90	4,25	10,74	14,20	436,00	3090,00	<18	0,42	27,43	0,92	1,40	1,30	1,65	1,91
K	57	I	IG GL	10,60	4,19	7,02	1,94	200	157	9,30	3,80	0,73	9,35	2,12	3760,00	<26	<18	0,59	20,07	2,80	5,00	3,14	6,11	37,78
E	60	III	IG AK	9,90	5,20	2,57	1,92	192	114	10,90	3,40	0,89	10,25	7,87	490,00	704,00	<18	2,37	0,37	1,80	2,90	2,20	6,63	13,19
K	59	II	IG GL	15,30	8,67	4,79	2,70	310	278	7,42	3,52	0,36	9,32	3,43	2270,00	<26	51,80	0,78	51,62	1,96	2,80	2,30	3,01	2,21

Hb: Hemoglobin, LDH: laktat dehidrogenaz (U/L)

5. TARTIŞMA

Bu çalışma yeni tanı MM hastalarında kemik iliğinde $CD4^+CD25^+FoxP3^+PD-1^+$ Treg, $CD4^+CD25^+PD-1^+$ Treg, $CD4^+CD25^+$ Treg hücrelerinin hem de PD-1 mRNA ve PD-L1 mRNA ifadesinin birlikte değerlendirildiği ve aralarında ilişkinin olup olmadığını gösteren literatürdeki ilk çalışmadır. $CD4^+CD25^+FoxP3^+PD-1^+$ Treg düzeyi kontrol grubuna göre yüksek bulunmuş olup $CD4^+CD25^+PD-1^+$ Treg ve $CD4^+CD25^+$ Treg düzeyleri benzer olarak bulunmuştur. PD-1 mRNA ve PD-L1 mRNA ifadeleri ise kontrol grubuna göre yüksek bulunmuştur. Hasta grubunda Treg hücrelerinin ifadeleri ile PD-1 mRNA ve PD-L1 mRNA ifadeleri arasında ise herhangi bir korelasyon bulunmamıştır.

Yapılan pek çok araştırmada Treg kanser ilişkisi açıkça tanımlanmıştır. İmmünoşüpresyon kanserin ilerlemesine katkıda bulunabilir. Bir çalışmada erken evre küçük hücreli dışı akciğer kanseri ve geç evre over kanseri olan hastalardan elde edilen tümör örneklerinden T hücrelerinin yapısal ve fonksiyonel durumu değerlendirilmiştir. Her ne kadar bazı gruplar diğer maligniteleri olan hastalarda TCR'de (T hücre reseptörü) yapısal değişiklikleri tanımlamış olsalar da, bu çalışmada tümörle ilişkili T hücrelerinde CD3 zeta alt ünitesinin ekspresyonunda azalma gözlemlenmiştir. Bununla birlikte küçük hücreli dışı akciğer kanseri tümörü ve over kanseri ile ilişkili lenfositlerde artmış $CD4^+CD25^+$ T hücrelerinin yüzdesi gözlemlenmiştir. Ayrıca bu $CD4^+CD25^+$ T hücrelerinin Treg hücrelerinin fenotipiyle tutarlı bir TGF- β salgıladığı bulunmuştur (Woo vd. 2001). Benzer biçimde 'C-X-C Motif Chemokine Receptor 3' (CXCR3)⁺ Tregler seçici olarak tip1 bağışıklığını sınırlamak için insan over karsinomlarında birikir (Redjimi vd. 2012). İntraepitelyal $CD8^+$ tümör infiltrat lenfositleri ve yüksek $CD8^+$ / Treg hücre oranı over kanserinde olumlu prognoz ile ilişkilidir (Sato vd. 2005). Bir diğer çalışmada sağlıklı donörler, kronik hepatit B virüsü ve hepatit C virüsü enfeksiyonu ve viral olmayan karaciğer sirozu bulunan hastalar dahil olmak üzere hepatoselüler karsinomlu (HCC) 84 hastadan ve 74 kontrolden oluşan gruplarda Treg hücreleri üzerinde çalışılmıştır. HCC'li hastalarda periferik kanlarında yüksek seviyelerde HLA-DR (Human Leukocyte Antigen – DR isotype), GITR (Glucocorticoid-Induced Tumor Necrosis Factor Receptor Family-Related Gene) ve düşük veya CD45RA ifade etmeyen $CD4^+CD25^+$ Treg hücrelerinin sayısında artış gözlemlenmiştir (Ormandy' ye vd. 2005). Mizukami ve arkadaşlarının 2008'de yaptığı bir diğer çalışmada CCL17 ve CCL22 kemokinlerinin erken evre mide kanserinde meydana gelen Treg popülasyonundaki artış ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Mizukami vd. 2008). Benzer biçimde hipoksik intraperitoneal tümörlerin mukoza ile ilişkili epitel kemokini olarak bilinen CCL28'in indüksiyonu yoluyla $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ Tregleri tümör alanına topladığı bildirilmiştir (Facciabene vd. 2011). Curiel ve arkadaşları 2004'de 104 over karsinomlu hastada tümör hücreleri ve mikro çevresel makrofajların ürettiği CCL22 kemokini ile tümör mikroçevresinde Treg artışını ve de neticesinde hastalık sağkalımında düşüş ile ilişkili olduğunu bulmuşlardır (Curiel vd. 2004). Jordanova ve arkadaşları 2008'de düşük $CD8^+$ T-hücre / Treg oranının 115 servikal

kanser vakasında daha kötü sağkalım ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Bu çalışmada $CD8^+$ T-hücre / Treg oranının çok değişkenli istatistiksel analizle tek değişkenli bağımsız prognostik faktör olduğu gösterilmiştir (Jordanova vd. 2008). Plitas ve arkadaşları 2016'da tedavi edilmemiş insan meme karsinomlarındaki, normal meme bezindeki ve periferik kandaki Treg hücrelerinin özelliklerini analiz etmişler ve de çoğu sitokin ve kemokin reseptörü genlerinin özellikle CCR8'in tümöre yerleşik Treg hücrelerinde normal dokuda olanlara kıyasla artmış olduğunu gözlemlemişlerdir (Plitas vd. 2016). Baş-boyun skuamöz hücreli karsinomlu hastalarda da Treg artışı söz konusudur (Schaefer vd. 2005). Treg prevalansı pankreas ve meme adenokarsinomlu hastaların periferik kanında ve tümör mikroçevresinde de artmıştır (Liyanage vd. 2002). Treg prevalansı premalign evreden yerleşik kansere kadar pankreas duktal karsinomuna karşı immün yanıtın kontrolünde rol oynar. Pankreas duktal karsinomunda yüksek Treg prevalansı kötü prognozun bir belirteci olarak görünmektedir (Hiraoka vd. 2006). Bir diğer çalışmada mide ve özofagus kanserli hastalarda periferik kanda Treglerin ve tümör infiltrate lenfositlerin sıklığı değerlendirilmiştir. Gastrik ve özofagus kanserli hastalarda periferik kandaki $CD4^+ CD25^+$ Tregler ve tümör infiltrate lenfositlerin popülasyonları sağlıklı donörlere veya normal mukozaya kıyasla anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. (Ichihara vd. 2003). Gastrointestinal maligniteleri olan hastalarda yapılan bir diğer çalışmada Treglerin hastalığın ilerlemesine katkı sağladığını düşündüren bulgular elde edilmiştir (Sasada vd. 2003). Kolon kanserinde de durum benzerdir. Düşük bir intraepitelyal $CD3^+ / FoxP3^+$ hücre oranı ve azalmış $CD3^+$ T hücresi sayısı hastanın sağkalım süresinin kısalmasıyla ilişkilidir. Bu durum kolon kanseri prognozunda efektör Treg hücre oranının önemini gösterir (Sinicrope vd. 2009). Saito ve arkadaşları 2016'da kolorektal kanserlerde Treg hücrelerinin prognozu belirgin bir şekilde kontrol ettiğini bildirmişlerdir (Saito vd. 2016). Melanom kanserinde de Treg hücrelerinin etkileri araştırılmıştır. Benzer sonuçlar melanom kanserinde de vardır (Hodi vd. 2010 ; Robert vd. 2011). Yukarıda sıraladığımız çalışmalardan da anlaşılacağı üzere solid tümörler ile Tregler arasında bir ilişki söz konusudur. Treg artışı solid tümörler kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir.

Hematolojik malignitelerde de benzer Treg ilişkisi yapılan araştırmalar ile ortaya konmuştur. Diffüz büyük B hücreli lenfoma (DLBCL) hastalarında serum Tregleri sağlıklı gönüllülere kıyasla anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Kandaki yüksek Treg hücrelerinin düzeyleri DLBCL hastalarında kötü prognostik faktördür (Chang vd. 2015). Foliküler lenfoma (FL) hastalarında azalmış Treg hücreleri ile sağkalım arasında korelasyon olduğu gösterilmiştir (Farinha vd. 2010). Dahası tümör infiltrate $FoxP3^+$ Treg hücrelerinin sayısı foliküler lenfomada genel sağkalım ile ilişkilidir (Carreras vd. 2006). Aynı araştırmacıların bir başka çalışmasında da $PD-1^+$ Treg hücrelerinin sayısının foliküler lenfomada genel sağkalım ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Carreras vd. 2009). Diğer bir çalışma grubu benzer biçimde DLBCL hastalarında $FoxP3$ ve $PD-1$ ifadesinin prognoz ile ilişkili olduğunu göstermektedir (Ahearne vd. 2014). Tzankov ve arkadaşları 2008'de DLBCL, FL ve de klasik hodgkin lenfoma hastalarında $FoxP3^+$

Treg hücrelerinin sayısı ile sağkalım arasındaki korelasyonu göstermişlerdir (Tzankov vd. 2008). Bir diğer çalışmada FoxP3⁺ Treg hücrelerinin granzim B⁺ sitotoksik T / NK hücrelerine oranının klasik hodgkin lenfomada prognozu öngörmede ve bcl-2 ve MAL ifadesinden bağımsız kullanılabileceği gösterilmiştir (Kelley vd. 2007). Dahası klasik hodgkin lenfomada artmış PD-1⁺ tümör infiltre lenfositleri genel sağkalımı azaltmaktadır (Muenst vd. 2009). Alvaro ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada da hodgkin lenfomada eşlik eden sitotoksik ve Treg hücrelerinin varlığından hastalık prognozunun tahmin edilebileceği gösterilmiştir (Alvaro vd. 2005). Kronik Lenfositik Lösemide de (KLL) Treg hücrelerinin artışı söz konusudur (D'Arena vd. 2013). Treglerin akut miyeloid ve lenfoid lösemilerdeki rolüyle ilgili az sayıda çalışma yayınlanmıştır. Bhattacharya ve arkadaşlarının 2013'de yaptığı bir çalışmada B Hücreli Akut Lenfoblastik Lösemili (B-ALL) hastalarda artmış sayıda Treg bulunmuş ve hastalık progresyonu ile korelasyonu vurgulanmıştır (Bhattacharya vd. 2013). Kronik Mieloid Lösemi (KML) hastalarında da Treglerin periferik kanda kontrollere kıyasla arttığı gösterilmiştir (Zahran vd. 2014).

Multipl miyelom (MM), tüm hematolojik kanserlerin yaklaşık % 10'unu oluşturan malign bir plazma hücresi hastalığıdır. Yukarıda da ifade ettiğimiz üzere MM'da da diğer hematolojik kanserlerde olduğu gibi Treg kanser ilişkisi sorgulanmış ve de araştırma alanı olmuştur. Son yıllarda PD-1 ve PD-L1 inhibitörlerinin hematolojik kanserlerde klinik faz çalışmalarının artışı da MM Treg ilişkisinin daha fazla sorgulanmasına ve de yeni araştırma stratejilerinin, yeni parametrelerin geliştirilmesine ihtiyaç doğmuştur. Bir çalışmada Treg hücreleri CD3⁺ CD4⁺ CD25⁺ CD127^{low} hücreleri olarak tanımlanmış, hastalar yaşları eşleştirilmiş kontrollere veya diğer monoklonal gamopatilere kıyasla Treg / Th17 oranında anlamlı bir dengesizliğe sahip bulunmuştur. Üstelik bu durumun önemli ölçüde daha kötü bir sağkalım ile ilişkili olduğu da gösterilmiştir (Favaloro vd. 2014). Benzer bir çalışmada da MM tanılı hastalarda yüksek Treg oranları saptanmıştır (Feyler vd. 2009). Raja ve arkadaşları 2012'de malign öncesi ve malign MM'lu 207 hastanın periferik kan ve kemik iliği örneklerini çalışmışlar ve de artmış Treg ifadesinin kötü klinik seyrin ve progresyon tahmininde kullanılabileceğini göstermişlerdir (Raja vd. 2012). Raja ve arkadaşlarının 2011'de bir diğer çalışmasında da MM'da sağlıklı kontrollere göre Treg artışı gösterilmiştir. Periferik kan Treg ifadesi hastalarda ortalama %5.22 (%0.89 -%12.90) iken kontrol grubunda %3.96 (%1.47 -%5.90) bulunmuştur (Raja vd. 2011). Giannopoulos ve arkadaşlarının 2012'de yapmış oldukları çalışmada Treg artışının MM hastalarının sağkalımını belirlemede işlevsel olduğunu öne sürmüşlerdir ve de MM'da immün durumun detaylı karakterizasyonunu yapmışlardır (Giannopoulos vd. 2012). Walter ve arkadaşları 2014'de Tregleri lokal immün çevrede potansiyel belirteç/terapötik hedef ve prognostik etkisi bakımından MM hastalarında kemik iliğinde incelemiştir. Kontrollere göre MM hastalarında FoxP3 ifadesi 6 kat yüksek bulunmuştur (Braga vd. 2014). Bu durum MM'da Treglerin kemik iliğinde lokal birikimini desteklemektedir. Diğer taraftan 2009'da Galustian ve arkadaşları anti-kanser

ajanları lenalidomid ve pomalidomidin Treg hücrelerin proliferasyonunu ve fonksiyonunu inhibe ettiğini göstermişlerdir (Galustian vd. 2009). Bir diğer çalışmada MM'da Th1/Th2/Th17/Treg hücrelerinin değişimi ve klinik önemi değerlendirilmiştir. 33 MM hastasında kontrollere göre Th1 ve Th17 hücreleri artarken Tregler azalmış, Th2 hücreleri aynı miktarda gözlemlenmiştir. γ IFN, IL-6 ve IL-17A sitokinleri artarken, IL-2, IL-4 değişmemiş, IL-10 ve TGF β azalmıştır (Feng vd. 2015). D'Arena ve arkadaşlarının 2016'da yapmış oldukları bir diğer çalışmada tedavi edilmemiş MM'lu 39 hastanın ve monoklonal gamopatili 44 hastanın (MGUS) dolaşımdaki Treglerinin (CD4⁺ CD25^{high} CD127^{low}) yüzdesi ve mutlak sayısı test edilmiş ve karşılaştırılmıştır. Kontrol grubu olarak 20 sağlıklı birey test edilmiştir. MM'lu hastalarda ortalama dolaşımdaki Treg yüzdesi 2.1 ± 1.0 (%0.75-6.1); MGUS'ta 2.1 ± 0.9 (%0.3-4.4); ve kontrollerde 1.5 ± 0.4 (%0.9-2.1) bulunmuştur (D'Arena vd. 2016). Yapmış olduğumuz bu çalışmada MM hasta ve kontrol gruplarında CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺PD-1⁺ Treg hücreleri (%) ölçümlerinin gruplara göre farklı düzeylerde olduğu tespit edilmiştir. Farkın hasta grubu CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺PD-1⁺ Treg hücreleri (%) yüzde ölçümlerinin kontrol grubuna göre daha yüksek düzeylerde olmasından kaynaklandığı tespit edilmiştir (p=0,01). Bununla birlikte Treg sayıları ve fonksiyonları ile ilgili MM'da başlangıçta literatürde önemli bir anlaşmazlık vardır. Prabhala ve arkadaşları Treg hücre sayılarını kontrol grubuna göre düşük bulmuşlardır (Prabhala vd. 2006). Tersine Beyer ve arkadaşları yüksek Treg sayıları ile MGUS ve MM'da güçlü inhibitör fonksiyonun varlığını göstermişlerdir (Beyer vd. 2006). Bu çalışmalardaki Treg fonksiyonu ve sayılarındaki farklılık purifikasyon teknikleri ve değerlendirmedeki farklılıklardan kaynaklanabilir. Örneğin Prabhala ve arkadaşları stimülasyon deneyleri için periferik kan mononükleer hücreleri kullanmışlarken Beyer ve arkadaşları saf CD4⁺ hücreleri kullanmışlardır. Bizim çalışmamızda ise CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺PD-1⁺ Treg hücreleri kontrol grubuna göre yüksek bulunmakla beraber CD4⁺CD25⁺PD-1⁺ ve CD4⁺CD25⁺ Treg hücreleri kontrol grubu ile benzer düzeyde tespit edilmiştir.

Ülkemizde de MM Treg ilişkisi ile ilgili çalışmalar yapılmıştır (Ekinci ve Özkan 2017). Treglerin MM'da otolog kök hücre nakli sonrası arttığı 11 hastada gösterilmiş ve otolog nakil, Treg ve galektin 1 ifadesi arasındaki ilişki 19 hastada sorgulanmıştır (Erçetin vd. 2011a ; Erçetin vd. 2011b).

MM ve diğer malignitelerde PD-1 ve PD-L1'in önemini belirten çalışmalar literatürde son zamanlarda dikkat çekmektedir. Fizyolojik olarak PD-1 / PD-L1 yolu normal dokuyu hasardan korumak için antijeni ifade eden yerlerde inflamasyon derecesini kontrol etme ihtiyacının bir sonucu olarak ortaya çıkmıştır. Tüm aktif T hücrelerinin yüzeyinde PD-1 proteininin belirgin bir ifadesi vardır. Bir T hücresi hedef hücrede MHC kompleksi tarafından eksprese edilen antijeni tanıdığı anda enflamatuvar işlemi başlatarak enflamatuvar sitokinler üretilir. Bu sitokinler dokuda PD-L1 ekspresyonu ile sonuçlanır. Bazı tümörlerde, en belirgin şekilde melanomlarda bu koruyucu mekanizma PD-L1'in aşırı ekspresyonu yoluyla saptırılır. Sonuç olarak

tümöre karşı bir bağışıklık tepkisi oluşumunu engeller (Alsaab vd. 2017). 22 Aralık 2014'de FDA (U.S. Food and Drug Administration) Nivolumab'ı (OPDIVO®, Bristol-Myers Squibb) (PD-1 inhibitörü) metastatik melanomda onaylamıştır (Hazarika vd. 2017). Baş ve boyun skuamöz hücreli karsinomun (HNSCC) tedavisinde Nivolumab FDA tarafından 10 Kasım 2016 tarihinde tekrarlayan veya metastatik bir skuamöz hücreli karsinom formundan (SCCHN) köken alan nüks hastalar için FDA tarafından onaylandı (Alsaab vd. 2017). NSCLC tedavisinde 4 Mart 2015 tarihinde FDA platin bazlı kemoterapi üzerinde veya sonrasında nüks olan ileri (metastatik) yassı küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) olan hastaların tedavisinde Opdivo®'nun onayına yönelik bir genelge yayımladı. Çalışma, 135'i Opdivo ve 137'si docetaxel tedavisi alan 272 katılımcıdan oluşan randomize bir çalışmada gerçekleştirildi. Sonuçları analiz ettikten sonra Opdivo'daki hastalar, docetaxeldekinden 3,2 ay daha uzun bir yaşam süresine sahipti. Renal hücreli karsinom tedavisinde 23 Kasım 2015'de FDA ileri derecede metastatik renal hücreli karsinomalı (RCC) ve önceden anti-anjiyogenik kanser tedavisi alan hastaların tedavisi için Opdivo'yu onayladı. 5 Ağustos 2016'da FDA pembrolizumab (Keytruda enjeksiyonu, Merck Sharp & Dohme Corp.) (PD-1 inhibitörü) için tekrar HNSCC'de platin içeren veya sonrasında hastalık progresyonu olan hastaların tedavisi için onay verdi. NSCLC tedavisinde 18 Ekim 2016'da FDA Atezolizumab'ı onayladı (PD-L1 inhibitörü). Ürotelyal karsinom tedavisinde FDA 18 Mayıs 2016'da Atezolizumab'ın kullanılmasını onayladı (Alsaab vd. 2017). Hematolojik malignitelerde de PD-1 ve PD-L1 inhibitörlerine yönelik klinik çalışmalar yapılan araştırmalar ile ortaya konmuştur. Bugüne kadar PD-1 / PD-L1 ekseninin blokajının ümit verici sonuçlarının ancak klasik hodgkin lenfomada (cHL) olduğu sonucuna varabiliriz. Şimdi eğilim cHL hastalarının ilk nüksünde nivolumab ve pembrolizumab kullanımına doğru ilerlemektedir. Mayıs 2016'da FDA hodgkin lenfomada nivolumab'ı onaylamıştır. İmmün kontrol noktası inhibitörleri non-hodgkin lenfoma tiplerinin tedavisinde de kısmen etkili olmuştur. KLL ve MM hastalarında PD-1 / PD-L1 inhibitörleriyle yapılan monoterapi sonuçları tatmin edici görünmemektedir. MM'da PD-1 / PD-L1 inhibitörlerinin sonuçlarını iyileştirmek için bir kombinasyon yaklaşımı gerektiği düşünülmektedir (Jelinek vd. 2017). İmmünomodülatör ilaçlarla (lenalidomid, pomalidomid) kombinasyon yaklaşımı umut vericidir. Bu kombinasyonlar şu anda faz 3 denemelerinde test edilmektedir (Mateos vd. 2016; Wilson vd. 2016). AML ve MDS hastalarında da azasitidin kombinasyon yaklaşımı umut vericidir (Ørskov vd. 2015). Eylül 2017'de Badros ve arkadaşlarının relaps / refrakter MM'da pembrolizumab, pomalidomid ve düşük doz deksametazon kombinasyon çalışmalarının sonuçları yayımlanmıştır. Pembrolizumab lenfositlerde bulunan PD-1'e bağlanan ve bloke eden terapötik bir antikordur. Bu tek merkezli faz 2 çalışmasında relaps / refrakter MM (RRMM) olan 48 hastaya 28 günlük pembrolizumab döngüsü her 2 haftada bir 200 mg, 21 gün boyunca günde 4 mg pomalidomid ve haftada 40 mg deksametazon uygulanmıştır. Objektif yanıt oranı % 60 bulunmuştur. Sadece 2 hastada progresyon görülmüştür. Bu çalışmada 29 hastada kemik iliği biyopsilerinden immünohistokimyasal boyama ile PD-L1 ifadesi pozitif veya negatif olarak

değerlendirilmiş ve de tedaviye yanıt ile korelasyon gösterdiği tespit edilmiştir (Badros vd. 2017). Benzer biçimde Valentini ve arkadaşları 2018’de PD-L1 ifadesini kolorektal kanser hastalarında immünohistokimyasal boyama ile değerlendirmiştir (Valentini vd. 2018). Bertucci ve arkadaşları 2015’de PD-L1 mRNA ifadesini gastrointestinal stromal tümörlerli hastalarda analiz etmiştir (Bertucci vd. 2015). Bir diğer çalışmalarında 306 meme kanseri örneğinde PD-L1 mRNA ifadesini analiz etmişler ve kemoterapiye patolojik yanıtı öngörmeye etkin olarak kullanılabileceğini öne sürmüşlerdir. Bu çalışmada enflamatuvar meme kanseri örneklerinde PD-L1 mRNA ifadesi daha yüksek bulunmuştur (Bertucci vd. 2015). Eylül 2019’da Usmani ve arkadaşlarının çok merkezli yeni tanı MM’da pembrolizumab, lenalidomid ve deksametazon kombinasyon çalışmalarının sonuçları yayımlanmıştır (Usmani vd. 2019). Mateos ve arkadaşlarının 2019’da çok merkezli relaps veya refrakter MM’da pembrolizumab, lenalidomid ve deksametazon kombinasyon çalışmalarının sonuçları yayımlanmıştır. FDA tarafından talep edilen bu geçici analizden elde edilen sonuçlar pembrolizumab, pomalidomid ve deksametazonun yarar riski profilinin relaps veya refrakter MM hastaları için elverişsiz olduğunu göstermiştir (Mateos vd. 2019). Bu çalışmada MM hastalarında ve kontrollerde hem Tregler düzeyinde PD-1 ifadesi hem de mRNA düzeyinde PD-1 ve PD-L1 ifadesi değerlendirildi. Aynı zamanda hastalık evrelerine göre de değerlendirildi. Bu çalışmada hasta ve kontrol gruplarında PD-1 ve PD-L1 mRNA ifade seviyelerinin gruplara göre yüksek düzeylerde olduğu tespit edilmiştir ($p=0,01$). Hastaların evrelerine göre PD-L1 mRNA ifade seviyelerinin farklı düzeylerde olduğu ve farkın evre I olan hastaların PD-L1 mRNA ifade seviyelerinin Evre II ve III hastalarına göre daha yüksek düzeylerde olduğu görülmüştür ($p=0,04$, $p<0,05$).

Treg hücrelerinin ifadeleri ile PD-1 mRNA ve PD-L1 düzeylerinin birlikte çalışıldığı çalışma sayısı literatürde sınırlıdır. Malign hastalarda çalışıldığı sadece 3 çalışma mevcut olup MM hastalarında ise çalışılmamıştır. DiDomenico ve arkadaşları glioblastoma multiforme hastalarında yapmış oldukları çalışmada periferik PD-L1 mRNA artmış ekspresyonunun Treg hücre düzeyi ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir (DiDomenico vd. 2018). Du ve arkadaşları ise anaplastik menenjiom hastalarında PD-L1 ekspresyonunun ve Treg hücrelerin birlikte arttığını ve bu artışların hastalık agresifliği ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir (Du vd. 2015). Laginestra ve arkadaşları ise foliküler dentritik hücreli sarkomlarda PD-L1 ve Treg hücrelerinin birlikte arttığını göstermişlerdir (Laginestra vd. 2017). Bizim çalışmamızda ise Treg hücre ifadesi ile PD-L1 ve PD-1 mRNA düzeyleri arasında pozitif veya negatif yönde herhangi bir ilişki bulunmamıştır.

6. SONUÇLAR

Bu çalışmada Akdeniz Üniversitesi Hastanesi Erişkin Hematoloji Polikliniğine gelen yeni tanı multipl miyelom hastalarından tanı amaçlı alınan kemik iliğindeki $CD4^+CD25^+FoxP3^+PD1^+$ Treg hücrelerinin düzeyi ve kemik iliğindeki PD-1 ve PD-L1 mRNA ifadesi düzeyi kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır. Malign olmayan bir hematolojik hastalık olan İTP ön tanısı alan hastalar kontrol grubu olarak seçilmiştir.

Çalışmada hasta grubunun PD-1 mRNA ifade seviyeleri kontrol grubuna göre daha yüksek düzeylerdeydi. Hasta grubu PD-L1 mRNA ifade seviyeleri de kontrol grubuna göre daha yüksek bulunmuştur. Bireylerin PD-L1 mRNA ile PD-1 mRNA ifade seviyelerinin arasında anlamlı ilişki vardır. Hasta grubunda PD-L1 mRNA ile PD-1 mRNA ifade seviyelerinin arasında anlamlı ilişki vardır. Kontrol grubunda PD-L1 mRNA seviyesi ile PD-1 mRNA ifade seviyelerinin arasında anlamlı ilişki vardır. Hasta grubu $CD4^+CD25^+FoxP3^+PD-1^+$ Treg hücreleri (%) kontrol grubuna göre daha yüksek düzeylerdeydi. Hasta grubunda $CD4^+CD25^+FoxP3^+PD-1^+$ Treg hücreleri (%) ile PD-1 mRNA ifade seviyelerinin arasında anlamlı ilişki olmadığı görülmüştür. Hasta grubunda $CD4^+CD25^+FoxP3^+PD-1^+$ Treg hücreleri (%) ile PD-L1 mRNA ifade seviyelerinin arasında anlamlı ilişki olmadığı görülmüştür. Kontrol grubunda $CD4^+CD25^+FoxP3^+PD-1^+$ Treg hücreleri (%) ile PD-1 mRNA ifade seviyelerinin arasında anlamlı ilişki olmadığı görülmüştür. Kontrol grubunda $CD4^+CD25^+FoxP3^+PD-1^+$ Treg hücreleri (%) ile PD-L1 mRNA ifade seviyelerinin arasında anlamlı ilişki olmadığı görülmüştür. Hastaların evrelerine göre $CD4^+CD25^+FoxP3^+PD-1^+$ Treg hücrelerinin (%) farklı düzeylerde olmadığı görülmektedir. Hastaların evrelerine göre PD-1 mRNA ifade seviyelerinin farklı düzeylerde olmadığı görülmektedir. Evre I hastaların PD-L1 mRNA ifade seviyeleri Evre II ve III hastalara göre daha yüksek düzeylerdeydi.

Son yıllarda PD-1 ve PD-L1 inhibitörlerinin hematolojik kanserlerde klinik çalışma sayılarının artması MM Treg ilişkisinin daha çok sorgulanmasını ve yeni araştırma stratejileri ve yeni parametrelerin geliştirilmesini gerektirmiştir. Literatürde MM hastalarında kemik iliğinde Treglerde PD-1 oranını gösteren sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. PD-L1 ekspresyonunun daha fazla analiz edilmesi MM'da PD-1 tedavisine yanıtı değerlendirmekte faydalı olabilir. MM'da PD-1 ve PD-L1 inhibitörlerinin hızla artan klinik çalışmaları ile birlikte PD-1⁺ Treglerin aynı çalışmalara paralel olarak dâhil edilmesinin bu çalışmalardan faydalananacak hastalara ışık tutabileceğini düşünüyoruz. Bir hastanın bu tedavilere yanıt verip vermeyeceğini hangi faktörlerin belirlediğini anlamak bu tedavileri geliştirmek için atılması gereken bir sonraki adımdır. Bu çalışma yalnızca hasta tedavisinde terapötik seçeneklere kılavuzluk ettiği için değil aynı zamanda da bu ilaçlarla tedavi edilen hastalardan alınan yanıtı güçlendirme stratejilerini bulmak açısından da önemlidir. MM olgularında gerek periferik kan gerekse kemik iliğindeki farklı hücre gruplarında PD1/PD-L1 proteinlerine ait verilerin artışı ile gelecekte bu proteinleri hedefleyen tedavi uygulamalarının daha etkin olarak kullanımı mümkün olabilecektir.

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar PD-1 ve PD-L1 inhibitörlerinin MM tedavisinde kemik iliğinde yüksek PD-1⁺ Treg hücreleri ve PD-1 ve PD-L1 mRNA ifadesine sahip hastalarda klinik fayda sağlayabileceğini düşündürmektedir. Özellikle yeni tanı evre I hastaların PD-L1 mRNA ifade seviyelerinin kontrol grubuna göre yüksek ifadesi tedavi stratejisi açısından değerli olabilir. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar yeni tanı MM hastalarında kemik iliğinde hem PD-1⁺ Treg hücrelerinin hem de PD-1 ve PD-L1 mRNA ifadesinin birlikte değerlendirildiği ilk çalışmadır. İlerleyen yıllarda bu tedavi stratejisinden yarar görecektir hastaların tanımlanması için çalışmamız çok daha fazla sayıda hasta ile yapılacak diğer çalışmalar ile de desteklenmelidir.

7. KAYNAKLAR

- Ahearne, M.J., Bhuller, K., et al. 2014. Expression of PD-1 (CD279) and FoxP3 in diffuse large B-cell lymphoma. *Virchows Arch*, 465(3): 351-8.
- Alsaab, H.O., Sau, S., et al. 2017. PD-1 and PD-L1 Checkpoint Signaling Inhibition for Cancer Immunotherapy: Mechanism, Combinations, and Clinical Outcome. *Front Pharmacol*, 23;8: 561.
- Alvaro, T., Lejeune, M., et al. 2005. Outcome in Hodgkin's lymphoma can be predicted from the presence of accompanying cytotoxic and regulatory T cells. *Clin Cancer Res*, 15;11(4): 1467-73.
- Avet-Loiseau, H., Facon, T., et al. 2002. Oncogenesis of multiple myeloma: 14q32 and 13q chromosomal abnormalities are not randomly distributed, but correlate with natural history, immunological features, and clinical presentation. *Blood*, 15;99(6): 2185-91.
- Badros, A., Hyjek, E., et al. 2017. Pembrolizumab, pomalidomide, and low-dose dexamethasone for relapsed/refractory multiple myeloma. *Blood*, 7;130(10): 1189-1197.
- Baldomero, H., Gratwohl, M., et al. 2011. European Group for Blood and Marrow Transplantation EBMT. The EBMT activity survey 2009: trends over the past 5 years. *Bone Marrow Transplant*, 46(4): 485-501.
- Belkaid, Y. 2007. Regulatory T cells and infections: a dangerous necessity. *Nature Reviews Immunology*, 7: 875-88.
- Bergsagel, P.L. and Kuehl, W.M. 2005. Molecular pathogenesis and a consequent classification of multiple myeloma. *J Clin Oncol*, 10;23(26): 6333-8.
- Bertucci, F., Finetti, P., et al. 2015. PDL1 expression in inflammatory breast cancer is frequent and predicts for the pathological response to chemotherapy. *Oncotarget*, 30;6(15): 13506-19.
- Bertucci, F., Finetti, P., et al. 2015. PDL1 expression is an independent prognostic factor in localized GIST. *Oncoimmunology*, 3;4(5): e1002729.
- Beyer, M., Kochanek, M., et al. 2006. In vivo peripheral expansion of naive CD4+CD25 high FoxP3+ regulatory T cells in patients with multiple myeloma. *Blood*, 107:3940-9.
- Bhattacharya, K., Chandra, S., et al. 2013. Critical stoichiometric ratio of CD4+ CD25+ FoxP3+ regulatory T cells and CD4+ CD25- responder T cells influence immunosuppression in patients with B-cell acute lymphoblastic leukaemia. *Immunology*, 142: 124-139.
- Bingham, N., Reale, A., et al. 2017. An Evidence-Based Approach to Myeloma Bone Disease. *Curr Hematol Malig Rep*, 12(2): 109-118.

- Braga, Wmt., Silva, Br., et al. 2014. Foxp3 and Ctla4 overexpression in multiple myeloma bone marrow as a sign of accumulation of CD4+ T regulatory cells. *Cancer Immunol Immunother*, 63: 1189-97.
- Breslow, N.A. 1970. Generalized Kruskal-Wallis test for comparing K samples subject to unequal patterns of censorship. *Biometrika*, 57.3: 579-594.
- Burmester, G.R. and Pezzutto, A. 2003. *Color Atlas Of Immunology*, Stuttgart Thieme Medical Publishers, 271-84.
- Cao, X., Cai, S.F., et al. 2007. Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance. *Immunity*, 27(4): 635-46.
- Carreras, J., Lopez-Guillermo, A., et al. 2006. High numbers of tumor-infiltrating FOXP3-positive regulatory T cells are associated with improved overall survival in follicular lymphoma. *Blood*, 1;108(9): 2957-64.
- Carreras, J., Lopez-Guillermo, A., et al. 2009. High numbers of tumor-infiltrating programmed cell death 1-positive regulatory lymphocytes are associated with improved overall survival in follicular lymphoma. *J Clin Oncol*, 20;27(9): 1470-6.
- Chang, C., Wu, S.Y., et al. 2015. High levels of regulatory T cells in blood are a poor prognostic factor in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Clin Pathol*, 144: 935-944.
- Corthay, B. 2009. How do Regulatory T Cells Work?. *Scand J Immunol*, 70(4): 326-336.
- Cretney, E., Kallies, A., et al. 2013. Differentiation and function of Foxp3(+) effector regulatory T cells. *Trends Immunol*, 34(2): 74-80.
- Curiel, T.J., Coukos, G., et al. 2004. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med*, 10(9): 942-9.
- D'arena, G., Simeon, V., et al. 2013. Regulatory T-cells in chronic lymphocytic leukemia: actor or innocent bystander? *American Journal of Blood Research*, 3(1): 52-57.
- D'arena, G., Rossi, G., et al. 2016. Circulating Regulatory T-Cells in Monoclonal Gammopathies of Uncertain Significance and Multiple Myeloma: In Search of a Role. *J Immunol Res*, 2016: 9271469.
- Dejean, A.S., Beisner, D.R., et al. 2009. Foxo3 controls the magnitude of T cell immune responses by modulating dendritic cell function. *Nat Immunol*, 10(5): 504-513.
- DiDomenico, J., Lamanò J.B., et al. 2018. The immune checkpoint protein PD-L1 induces and maintains regulatory T cells in glioblastoma. *Oncoimmunology*, 25;7(7):e1448329.

- Du, Z., Abedalthagafi, M., et al. 2015. Increased expression of the immune modulatory molecule PD-L1 (CD274) in anaplastic meningioma. *Oncotarget*, 10;6(7):4704-16.
- Durie, B.G. M., Harousseau, J. L., et al. 2006. International uniform response criteria for multiple myeloma. *Leukemia*, 20: 1467-1473.
- Durie, B.G. and Salmon, S.E. 1975. A clinical staging system for multiple myeloma. Correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival. *Cancer*, 36(3): 842-54.
- Ekinci, D. ve Özkan, A. 2017. Multipl miyelom'da CD4+ regülatör T hücrelerin rolü. *Cukurova Med J*, 42(3): 546-551.
- Erçetin, A.P., Aktaş, S., ve ark. 2011. Multipl miyelomda Galektin-1 ekspresyonunun düzenleyici T hücreler ve olog kemik iliği transplantasyonu ile ilişkisi. *Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 25: 137-43.
- Erçetin, A.P., Aktaş, S., ve ark. 2011. Multipl miyelomda T düzenleyici hücreleri ile olog çevre kanı kök hücre nakli arasındaki korelasyonun araştırılması. *Türk J Haematol*, 28: 107-14.
- Facciabene, A., Peng, X., et al. 2011. Tumour hypoxia promotes tolerance and angiogenesis via CCL28 and Treg cells. *Nature*, 475(7355): 226–230.
- Farinha, P., Al-Tourah, A., et al. 2010. The architectural pattern of FOXP3-positive T cells in follicular lymphoma is an independent predictor of survival and histologic transformation. *Blood*, 14;1152: 289-95.
- Favaloro, J., Brown, R., et al. 2014. Myeloma skews regulatory T and pro-inflammatory T helper 17 cell balance in favor of a suppressive state. *Leukemia & Lymphoma*, 55(5): 1090-1098.
- Feng, P., Yan, R., et al. 2015. The alteration and clinical significance of Th1/Th2/Th17/Treg cells in patients with multiple myeloma. *Inflammation*, 38: 705-9.
- Feuerer, M., Herrero, L., et al. 2009. Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters. *Nature Medicine*, 15(8): 930-939.
- Feyler, S., Von Lilienfeld-Toal, M., et al. 2009. CD4(+)CD25(+)FoxP3(+) regulatory T cells are increased whilst CD3(+)CD4(-)CD8(-)alpha-betaTCR(+) Double Negative T cells are decreased in the peripheral blood of patients with multiple myeloma which correlates with disease burden. *Br J Haematol*, 144(5): 686-95.
- Fontenot, J.D., Gawin, M.A., et al. 2003. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat. Immunol*, 4: 330–336.

- Galustian, C., Meyer, B., et al. 2009. The anti-cancer agents lenalidomide and pomalidomide inhibit the proliferation and function of T regulatory cells. *Cancer Immunol Immunother*, 58(7): 1033-45.
- Garderet, L., Iacobelli, S., et al. 2012. Superiority of the triple combination of bortezomib-thalidomide-dexamethasone over the dual combination of thalidomide-dexamethasone in patients with multiple myeloma progressing or relapsing after autologous transplantation: the MMVAR/IFM 2005-04 Randomized Phase III Trial from the Chronic Leukemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *J Clin Oncol*, 30(20): 2475-82.
- Giannopoulos, K., Kaminska, W., et al. 2012. The frequency of T regulatory cells modulates the survival of multiple myeloma patients: detailed characterisation of immune status in multiple myeloma. *Br J Cancer*, 106(3): 546–552.
- Greipp, P. R., Miguel, J. S., et al. 2005. International staging system for multiple myeloma. *J Clin Oncol*, 23(15): 3412-20.
- Grohmann, U., Orabona, C., et al. 2002. CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. *Nat Immunol*, 3(11): 1097-101.
- Güngör, M. 2008. Ki-kare testi üzerine. *Fırat Üniversitesi Doğu Araştırmaları Dergisi*, 7.1: 84-89.
- Harousseau, J.L., Shaughnessy, J., et al. 2004. Multiple myeloma: ASH Education Book, 237-256.
- Hazarika, M., Chuk, M. K., et al. 2017. U.S. FDA approval summary: nivolumab for treatment of unresectable or metastatic melanoma following progression on ipilimumab. *Clin. Cancer Res*, 23: 3484–3488.
- Hiraoka, N., Onozato, K., et al. 2006. Prevalence of FOXP3+ regulatory T cells increases during the progression of pancreatic ductal adenocarcinoma and its premalignant lesions. *Clin Cancer Res*, 12(18):5423-34.
- Hodi, F.S., O'day, S.J., et al. 2010. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med*, 363(8): 711-23.
- Hori, S., Nomura, T., SAKAQUCHI, S. 2003. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*, 301(5609): 1057-61.
- “https://en.wikipedia.org/wiki/Antibody#/media/File:Immunoglobulin_basic_unit.svg”
- Huang, A., Cheng, L., et al. 2017. Interleukin-35 on B cell and T cell induction and regulation. *J Inflamm (Lond)*, 14(16): 1-7.
- Ichihara, F., Kono, K., et al. 2003. Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood and tumor-infiltrating lymphocytes in patients with gastric and esophageal cancers. *Clin Cancer Res*, 9(12): 4404-8.

- Ishida, Y., Agata, Y., et al. 1992. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J.*, 11: 3887-95.
- Jacobson, J. L., Hussein, M. A., et al. 2003. A new staging system for multiple myeloma patients based on the Southwest Oncology Group (SWOG) experience. *Br J Haematol*, 122(3): 441-450.
- Jelinek, T. and Hajek, R. 2016. PD-1/PD-L1 inhibitors in multiple myeloma: the present and the future. *Onco Immunology*, 8;5(12): e1254856.
- Jelinek, T., Mihalyova, J., et al. 2017. PD-1/PD-L1 inhibitors in haematological malignancies: update 2017. *Immunology*, 152(3): 357-371.
- Jordanova, E.S., Gorter, A., et al. 2008. Human leukocyte antigen class I, MHC class I chain-related molecule A, and CD8+/regulatory T-cell ratio: Which variable determines survival of cervical cancer patients? *Clin Cancer Res*, 14(7): 2028–2035.
- Joshua, D.E., Brown, R.D., et al. 2008. Regulatory T Cells and Multiple Myeloma. *Clinical Lymphoma & Myeloma*, 8(5): 283-286.
- Kawai, K., Uchiyama, M., et al. 2018. Regulatory T cells for tolerance. *Hum Immunol*, 79(5): 294-303.
- Kelley, T.W., Pohlman, B., et al. 2007. The ratio of FOXP3+ regulatory T cells to granzyme B+ cytotoxic T/NK cells predicts prognosis in classical Hodgkin lymphoma and is independent of bcl-2 and MAL expression. *Am J Clin Pathol*, 128(6): 958-65.
- Knop, S., Gerecke, C., et al. 2009. Lenalidomide, adriamycin, and dexamethasone (RAD) in patients with relapsed and refractory multiple myeloma: a report from the German Myeloma Study Group DSMM (Deutsche Studiengruppe Multiples Myelom Blood, 30;113(18): 4137-43.
- Koch, M.A., Tucker-Heard, G., et al. 2009. The transcription factor T-bet controls regulatory T cell homeostasis and function during type 1 inflammation. *Nat Immunol*, 10(6): 595-602.
- Kyle, A. R. and Rajkumar, S. V. 2008. Multiple myeloma. *Blood*, 111(6): 2962–2972.
- Kyle, A. R. 1975. Multiple myeloma: review of 869 cases. *Mayo Clinic Proc*, 50(1): 29-40.
- Kyle, A. R., Gertz, M. A., et al. 2003. Review of 1027 patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Mayo Clinic Proc*, 78(1): 21-33.
- Kyle, A. R., Therneau, T. M., et al. 2006. Prevalence of monoclonal gammopathy of undetermined significance. *N Engl J Med*, 354(13): 1362–1369.

- Lacy, M.Q. and Mccurdy A.R. 2013. Pomalidomide. *Blood*, 122(14): 2305-2309.
- Laginestra, M.A., Tripodo, C., et al. 2017. Distinctive Histogenesis and Immunological Microenvironment Based on Transcriptional Profiles of Follicular Dendritic Cell Sarcomas. *Mol Cancer Res*, 15(5):541-552.
- Leonard, W.J. 2002. TSLP: finally in the limelight. *Nat. Immunol*, 3: 605–607.
- Lianjun, Z. and Yong, Z. 2007. The regulation of FoxP3 Expression in Regulatory CD4+CD25+ T Cells: Multiple Pathways On The Road. *J. Cell. Physiol*, 211: 590-597.
- Li, M.O., Wan, Y.Y., et al. 2007. T cell-produced transforming growth factorbeta1 controls T cell tolerance and regulates Th1- and Th17-cell differentiation. *Immunity*, 26): 579-91.
- Liang, Z., Mark, M.V., et al. 2009. Plasticity of CD4+ T Cell Lineage Differentiation. *Immunity*, 30(5): 646-655.
- Liu, X.G. and Hou, M. 2016. Pathogenesis-oriented approaches for the management of corticosteroid-resistant or relapsed primary immune thrombocytopenia. *Open Med (Wars)*, 18;11(1): 97-100.
- Liyanage, U.K., Moore, T.T., et al. 2002. Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. *J Immunol*, 1;169(5): 2756-61.
- Ludwig, H., Durie, B. G., et al. 2012. IMWG consensus on maintenance therapy in multiple myeloma. *Blood*, 119(13): 3003-15.
- Mantel, P.Y., Ouaked, N., et al. 2006. Molecular Mechanisms Underlying FOXP3 Induction in Human T Cells. *J Immunol*, 176: 3593-3602.
- Mateos, Mv., Blacklock, H., et al. 2019. Pembrolizumab plus pomalidomide and dexamethasone for patients with relapsed or refractory multiple myeloma (KEYNOTE-183): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Haematol*, 6(9): e459-e469.
- Mateos, Mv., Orlowski, R.Z., et al. 2016. Pembrolizumab in combination with lenalidomide and low dose dexamethasone for relapsed/refractory multiple myeloma (RRMM): Final efficacy and safety analysis. In: *Journal of Clinical Oncology* [Internet]. Chicago; P. J Clin Oncol 34, (suppl; abstr 8010).
- Maynard, C.L., Harrington, L.E., et al. 2007. Regulatory T cells expressing interleukin 10 develop from Foxp3+ and Foxp3- precursor cells in the absence of interleukin 10. *Nat Immunol*, 8(9): 931-41.
- Mays, L.E. and Chen, Y.H. 2007. Maintaining immunological tolerance with FoxP3. *Cell Research*, 17: 904-918.

- Miguel, J.S., Weisel, K., et al. 2013. Pomalidomide plus low-dose dexamethasone versus high-dose dexamethasone alone for patients with relapsed and refractory multiple myeloma (MM-003): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol*, 14(11): 1055-66.
- Miyara, M., Yoshioka, Y., et al. 2009. Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4⁺ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity*, 19;30(6): 899-911.
- Miyaral, M. and Sakaguchi, S. 2007. Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression. *TRENDS in Molecular Medicine*, 13(3): 108-15.
- Mizukami, Y., Kono, K., et al. 2008. CCL17 and CCL22 chemokines within tumor microenvironment are related to accumulation of Foxp3⁺ regulatory T cells in gastric cancer. *Int J Cancer*, 15;122(10): 2286-93.
- Muenst, S., Hoeller, S., et al. 2009. Increased programmed death-1⁺ tumor-infiltrating lymphocytes in classical Hodgkin lymphoma substantiate reduced overall survival. *Hum Pathol*, 40(12): 1715-22.
- Orhunbilge, N. 2017. Uygulamalı Regresyon ve Korelasyon analizi. Nobel Akademik Yayıncılık: 1737, Ders Kitabı, Ankara, 394 s.
- Ormandy, L.A., Hillemann, T., et al. 2005. Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood of patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*, 15;65(6): 2457-64.
- Ørskov, A.D., Treppendahl, M.B., et al. 2015. Hypomethylation and up regulation of PD-1 in T cells by azacytidine in MDS/AML patients: a rationale for combined targeting of PD-1 and DNA methylation. *Oncotarget*, 6: 9612–26.
- Plitas, G., Konopacki, C., et al. 2016. Regulatory T Cells Exhibit Distinct Features in Human Breast Cancer. *Immunity*, 45(5): 1122-1134.
- Prabhala, R.H., Neri, P., et al. 2006. Dysfunctional T regulatory cells in multiple myeloma. *Blood*, 107:301-4.
- Raja, Krm., Kovárová, L., et al. 2011. Flow cytometric phenotyping and analysis of T regulatory cells in multiple myeloma patients. *Klin Onkol*, 24: S30-3.
- Raja, Krm., Rihova, L., et al. 2012. Increased T Regulatory Cells Are Associated with Adverse Clinical Features and Predict Progression in Multiple Myeloma. *PLoS One*, 7(10): e47077.
- Rajkumar, S. V. and Kyle, A. R. 2005. Multiple myeloma: diagnosis and treatment. *Mayo Clin Proc*, 80: 1371-1382.
- Rajkumar, S.V., Dimopoulos, M.A., et al. 2014. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol*, 15(12): e538-48.

- Redjimi, N., Raffin, C., et al. 2012. CXCR3+ T regulatory cells selectively accumulate in human ovarian carcinomas to limit type I immunity. *Cancer Res*, 1;72(17): 4351-60.
- Robert, C., Thomas, L., et al. 2011. Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma. *N Engl J Med*, 30;364(26): 2517-26.
- Rubtsov, Y.P., Rasmussen, J.P., et al. 2008. Regulatory T cell-derived interleukin-10 limits inflammation at environmental interfaces. *Immunity*, 28(4): 546-58.
- Ruxton, Graeme D. 2006. The unequal variance t-test is an underused alternative to Student's t-test and the Mann-Whitney U test. *Behavioral Ecology*, 17.4: 688-690.
- Saito, T., Nishikawa, H., et al. 2016. Two FOXP3(+)CD4(+) T cell subpopulations distinctly control the prognosis of colorectal cancers. *Nat Med*, 22(6): 679-84.
- Sakaguchi, S. 2005. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat. Immunol*, 6: 345-352.
- Santibañez, J.F., Quintanilla, M., et al. 2011. TGF- β /TGF- β receptor system and its role in physiological and pathological conditions. *Clin Sci (Lond)*, 121(6): 233-251.
- Sasada, T., Kimura, M., et al. 2003. CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with gastrointestinal malignancies: possible involvement of regulatory T cells in disease progression. *Cancer*, 1;98(5): 1089-99.
- Sato, E., Olson, S.H., et al. 2005. Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 20;102(51): 18538-43.
- Schaefer, C., Kim, G.G., et al. 2005. Characteristics of CD4+CD25+ regulatory T cells in the peripheral circulation of patients with head and neck cancer. *Br J Cancer*, 92 (5): 913-20.
- Sharpe, A.H., and Pauken, K.E. 2017. The diverse functions of the PD1 inhibitory pathway. *Nat Rev Immunol*, 18(3): 153-167.
- Shevach, E.M. 2009. Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity*, 30: 636-645.
- Sinicrope, F.A., Rego, R.L., et al. 2009. Intraepithelial effector (CD3+)/regulatory (FoxP3+) T-cell ratio predicts a clinical outcome of human colon carcinoma. *Gastroenterology*, 137(4): 1270-9.
- Sukpanichnant, S., Cousar, J.B., et al. 1994. Diagnostic criteria and histologic grading in multiple myeloma: histologic and immunohistologic analysis of 176 cases with clinical correlation. *Hum Pathol*, 25(3): 308-18.

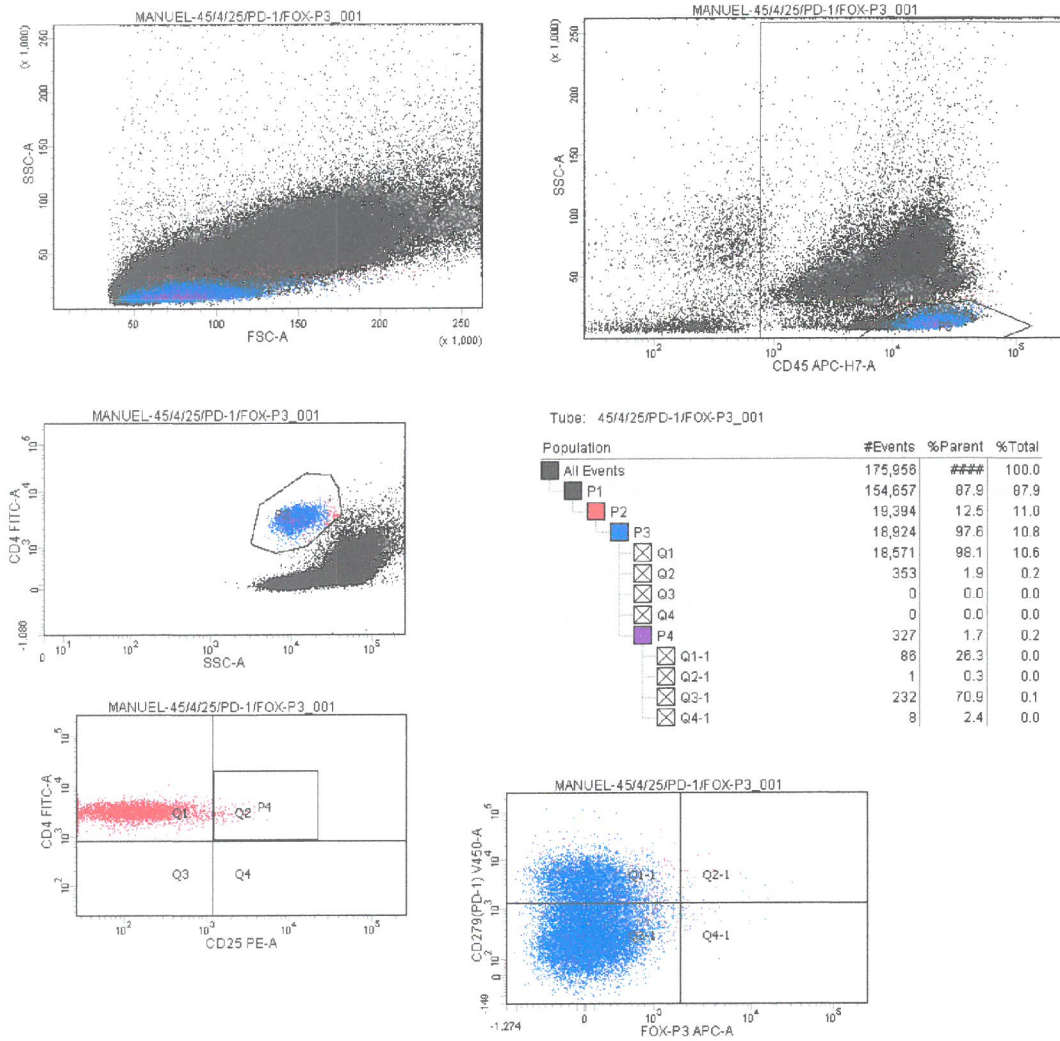
- Tang, Q. and Bluestone, J 2008. The Foxp3⁺ regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation. *Nat. Immunol*, 9: 239–244.
- Tzankov, A., Meier, C., et al. 2008. Correlation of high numbers of intratumoral FOXP3⁺ regulatory T cells with improved survival in germinal center-like diffuse large B-cell lymphoma, follicular lymphoma and classical Hodgkin's lymphoma. *Haematologica*, 93(2): 193-200.
- Usmani, S., Schjesvold, F., et al. 2019. Pembrolizumab plus lenalidomide and dexamethasone for patients with treatment-naïve multiple myeloma (KEYNOTE-185): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Haematol*, 6(9): e448-e458.
- Valentini, A.M., Pinto, F.D., et al. 2018. PD-L1 expression in colorectal cancer defines three subsets of tumor immune microenvironments. *Oncotarget*, 2;9(9): 8584-8596.
- Wang, K. and Vella, A.T. 2016. Regulatory T Cells and Cancer: A Two-Sided Story. *Immunological Investigations*, 45 (8): 797-812.
- Wang, W., Shen, G., et al. 2017. PD-1 mRNA expression in peripheral blood cells and its modulation characteristics in cancer patients. *Oncotarget*, 8(31): 50782-50791.
- Wilke, C.M., Wei, S., et al. 2011. Dual biological effects of the cytokines interleukin-10 and interferon- γ . *Cancer Immunol Immunother*, (60): 1529-1541.
- Wilson, L., Cohen, A.D., et al. 2016. Pembrolizumab in combination with pomalidomide and dexamethasone (PEMBRO/POM/DEX) for pomalidomide exposed relapsed or refractory multiple myeloma. *Blood*, 128: 2119.
- Wing, K. and Sakaguchi, S. 2010. Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity. *Nat Immunol*, 11(1): 7-13.
- Wing, K., Onishi, Y., et al. . 2008. CTLA-4 control over Foxp3⁺ regulatory T cell function. *Science*, 10;322(5899): 271-275.
- Woo, E.Y., Chu, C.S., et al. 2001. Regulatory CD4(+)CD25(+) T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer. *Cancer Res*, 15;61(12): 4766-72.
- Yeh, H.S. and Berenson, J.R. 2006. Myeloma bone disease and treatment options. *Eur J Cancer*, 42: 1554-1563.
- Zahran, A. M., Badrawy, H., et al. 2014. Prognostic value of regulatory T cells in newly diagnosed chronic myeloid leukemia patients. *International Journal of Clinical Oncology*, 19(4): 753-760.
- Zaretsky, A.G., Konradt, C., et al. 2017. T Regulatory Cells Support Plasma Cell Populations in the Bone Marrow. *Celi Rep*, 21;18 (8): 1906-1916.

- Zheng, Y., Chaudhry, A., et al. 2009. Regulatory T-cell suppressor program co-opts transcription factor IRF4 to control TH2 responses. *Nature*, 458(7236): 351-356.
- Zhou, L., Lopes, J.E., et al. 2008. TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing RORgamma function. *Nature*, 453(7192): 236-40.
- Ziegler, S.F. and Buckner, J.H. 2009. FOXP3 and the regulation of Treg/Th17 differentiation. *Microbes and Infection*, 11: 594-598.

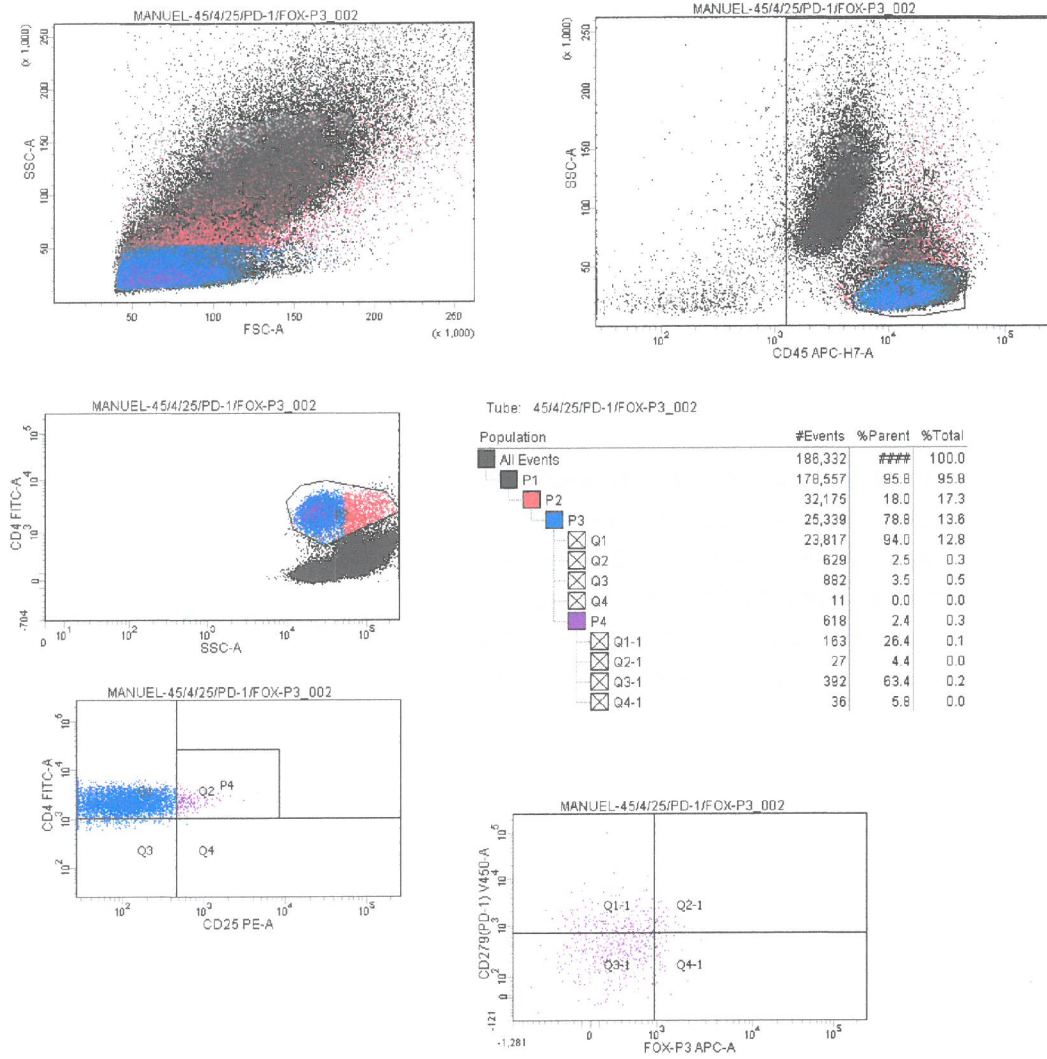
8. EKLER

Aşağıda hastalara ait akış sitometri analiz görüntüleri verilmiştir.

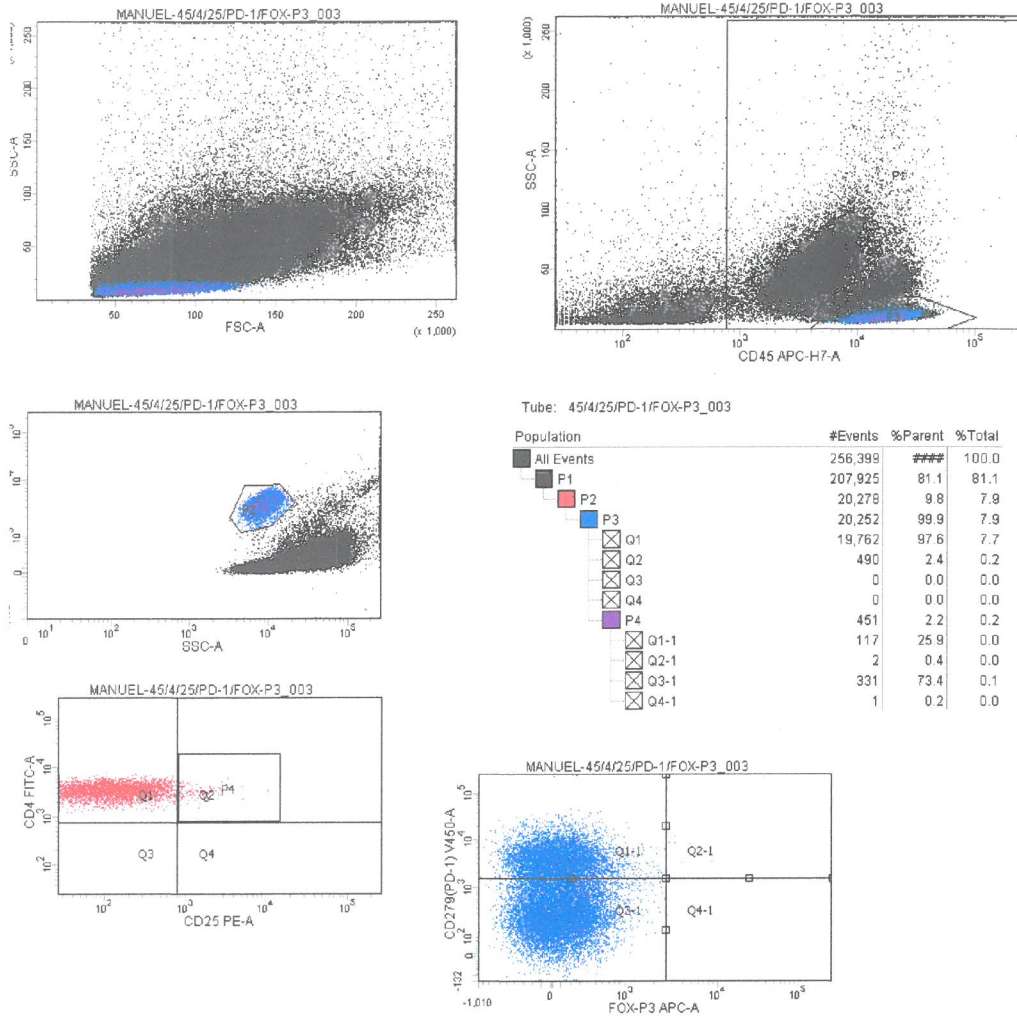
Multipl miyelom hastaları;



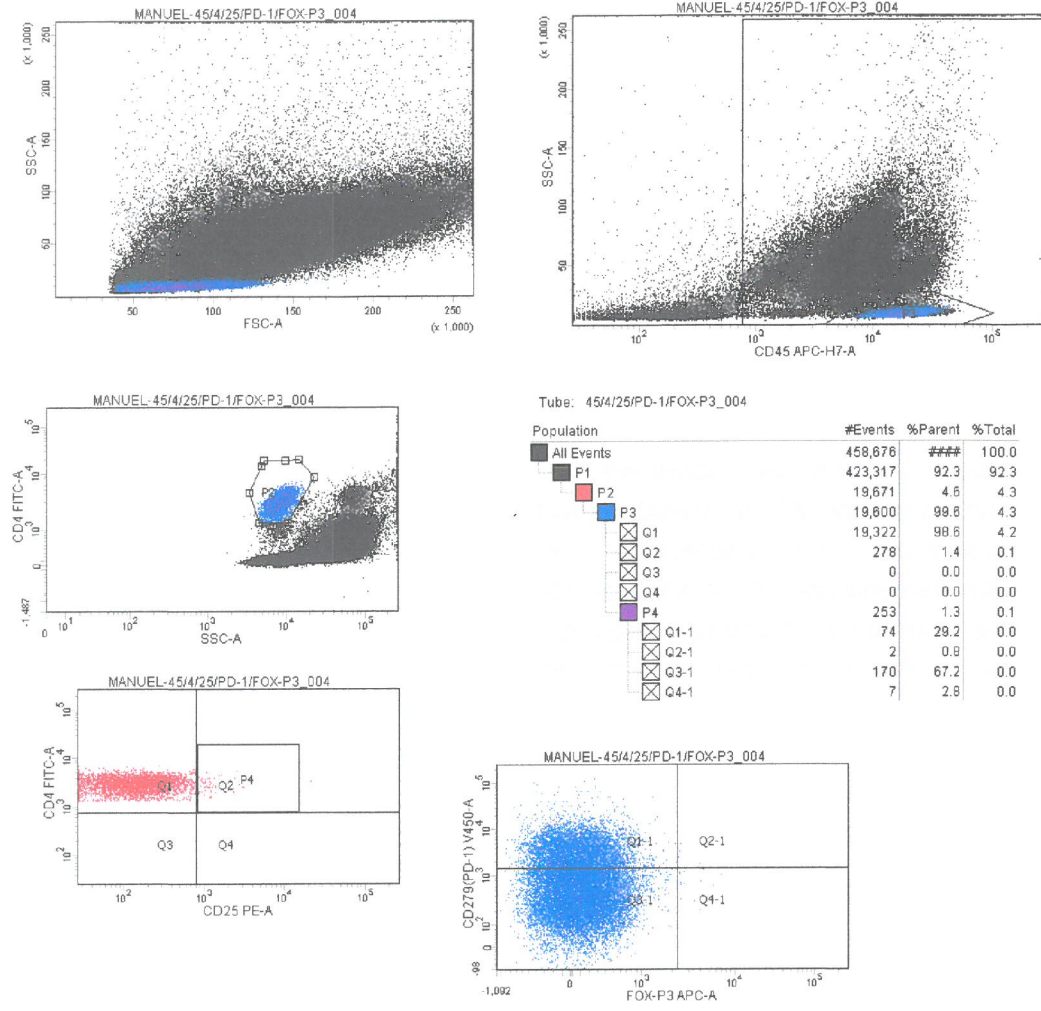
Şekil 8.1. 1.Hasta K. Ç.'nin akış sitometri analiz görüntüsü



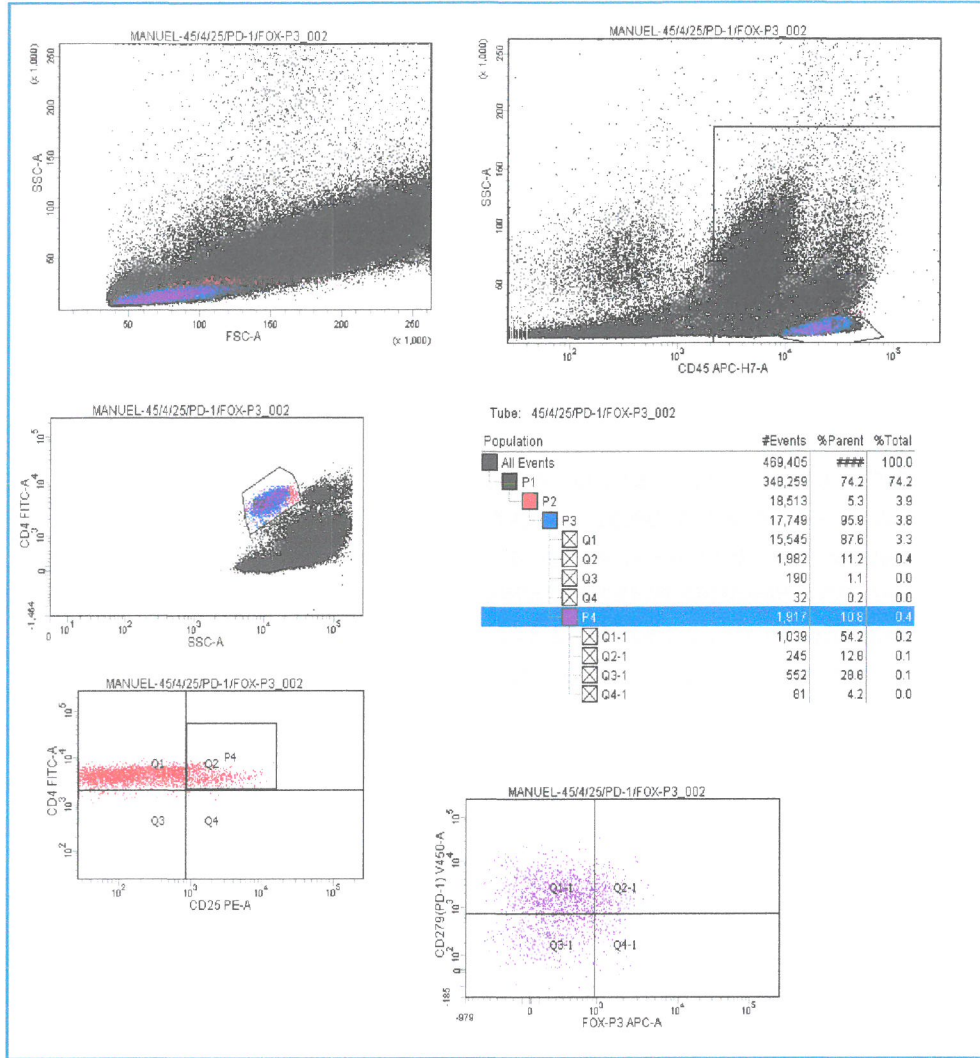
Şekil 8.2. 2.Hasta H.D.'nin akış sitometri analiz görüntüsü



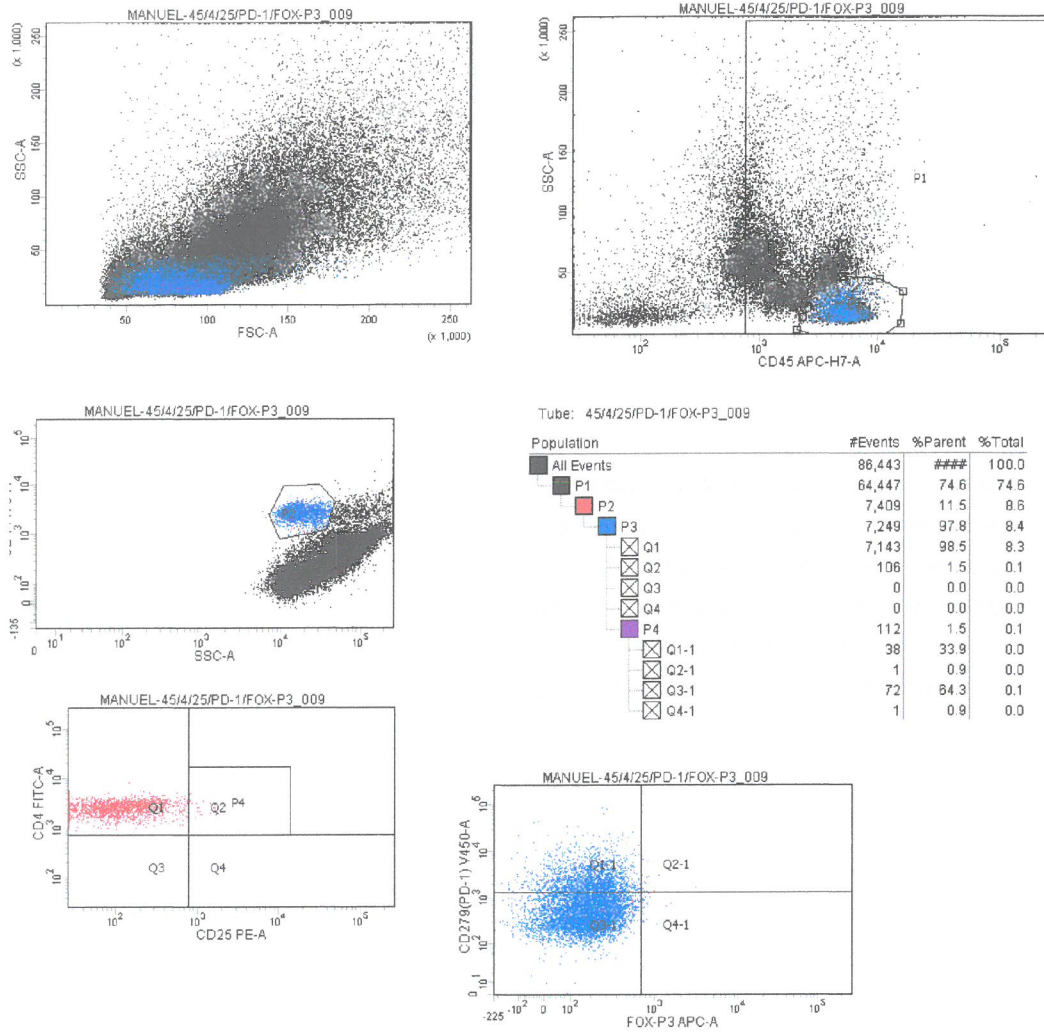
Şekil 8.3. 3.Hasta N.K.'nın akış sitometri analiz görüntüsü



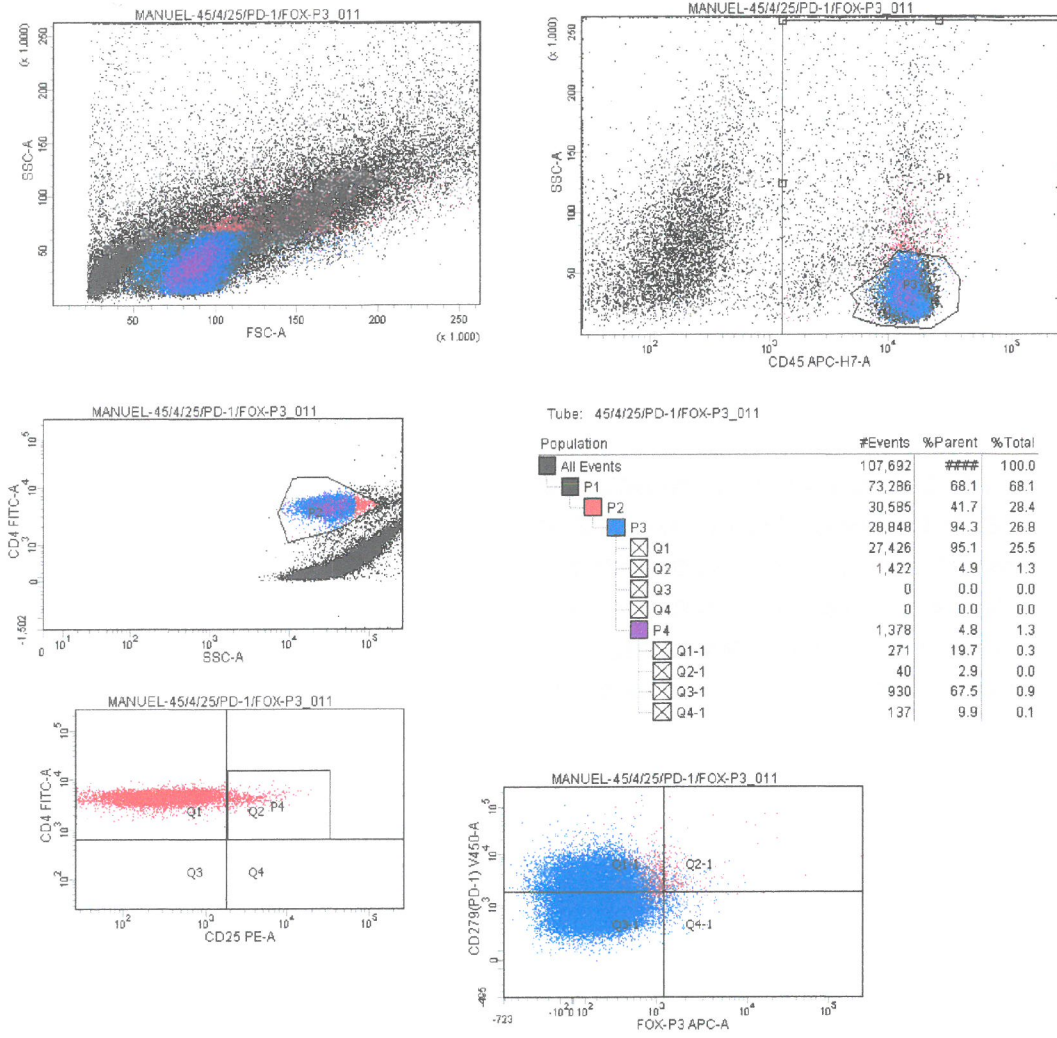
Şekil 8.4. 4.Hasta İ.Ü.'nün akış sitometri analiz görüntüsü



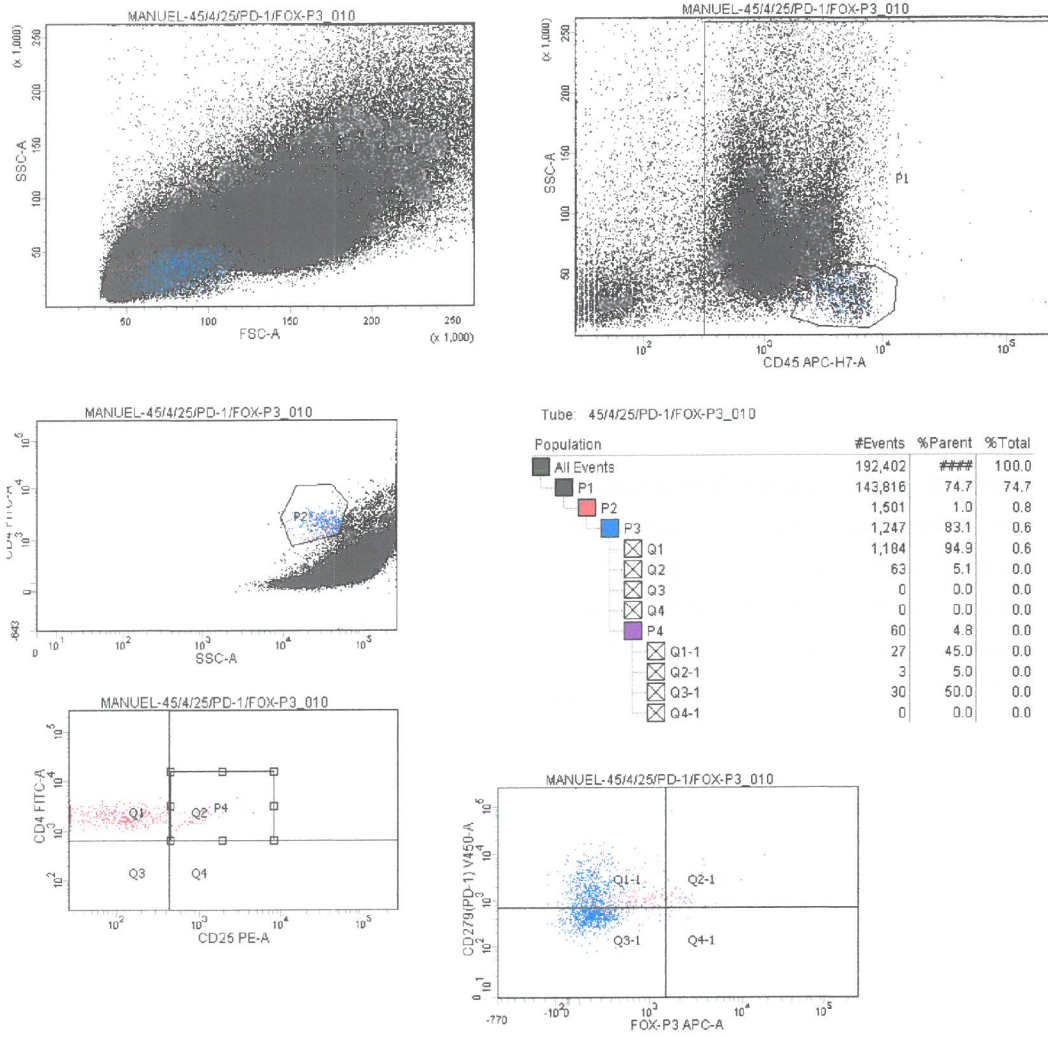
Şekil 8.5. 5.Hasta V.Ü.'nün akış sitometri analiz görüntüsü



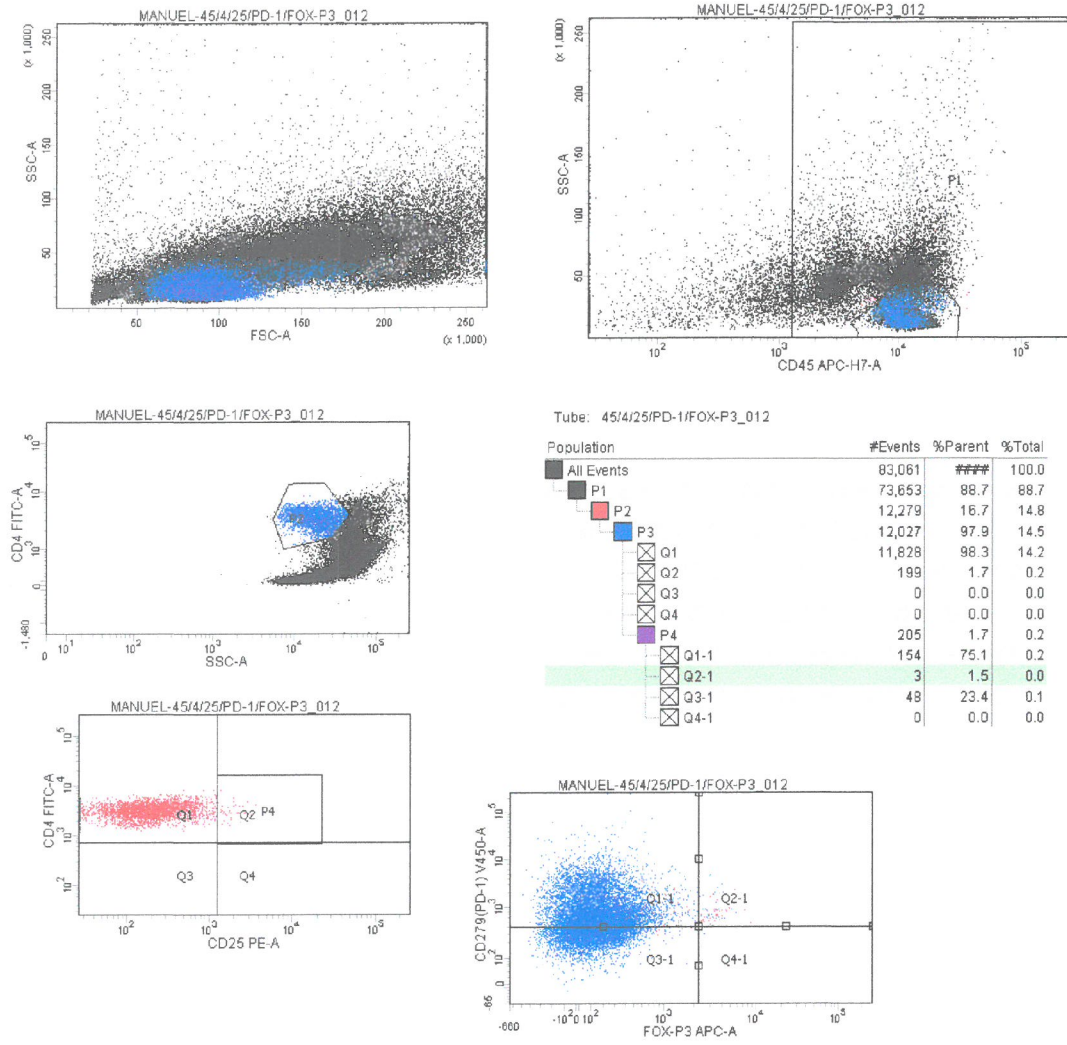
Şekil 8.6. 6.Hasta F.Ü.'nün akış sitometri analiz görüntüsü



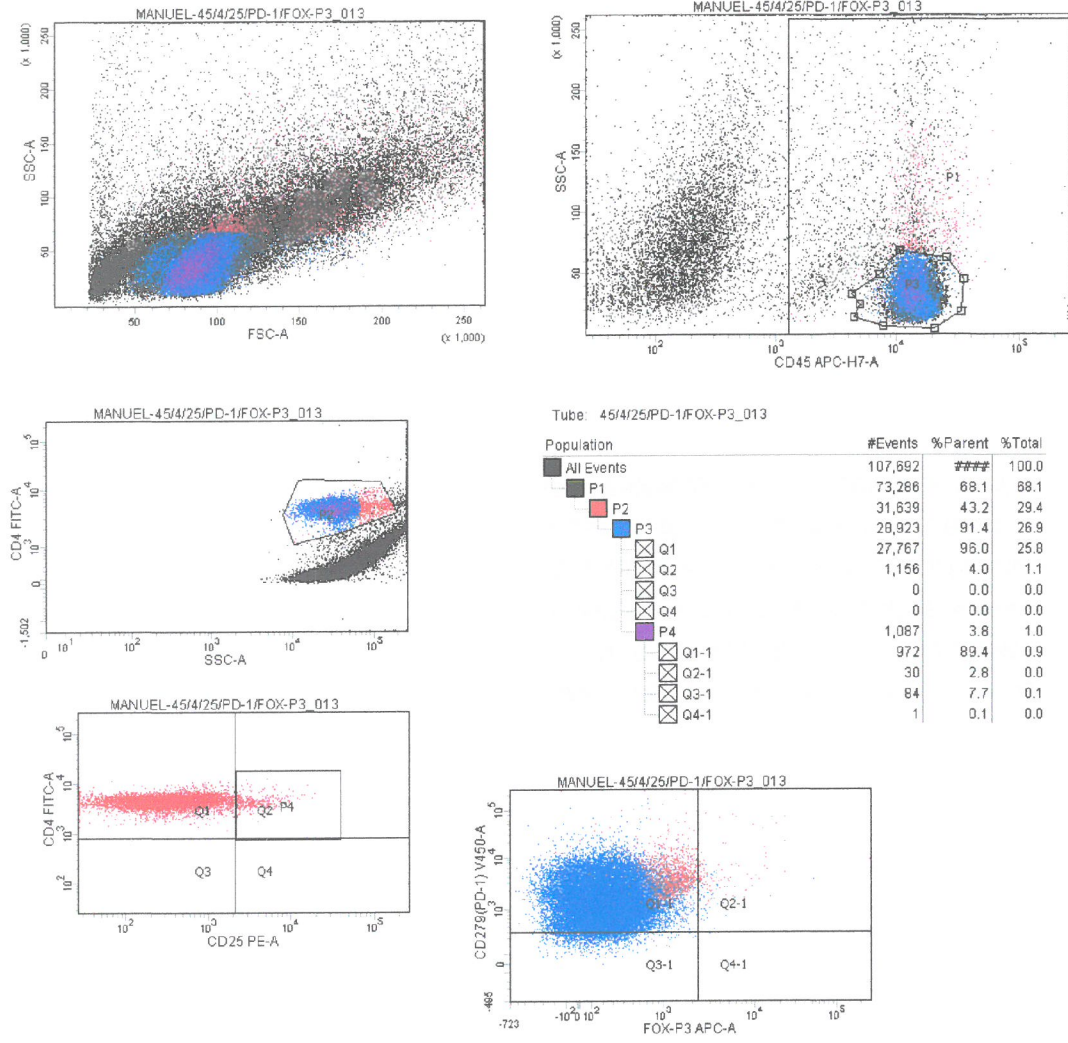
Şekil 8.7. 7.Hasta E.S.'nin akış sitometri analiz görüntüsü



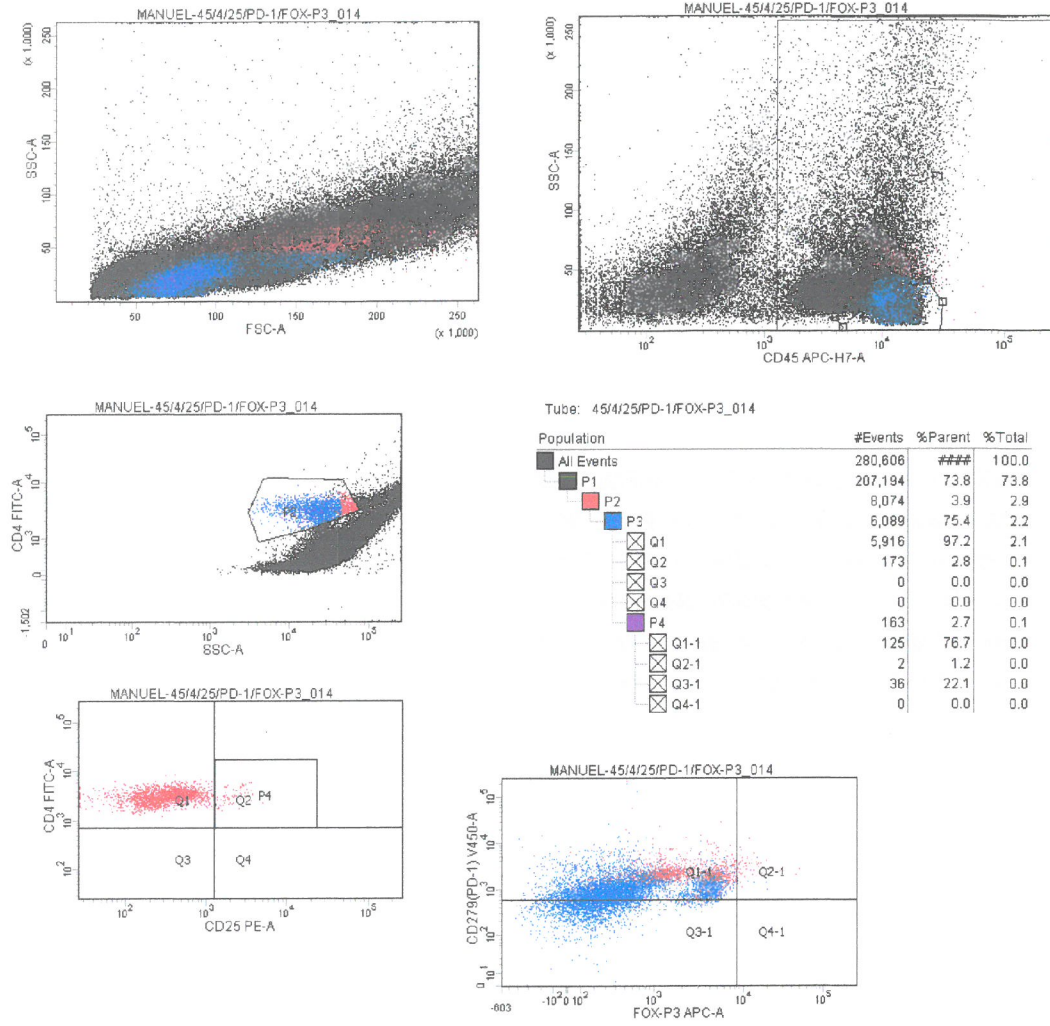
Şekil 8.8. 8.Hasta Z.K.'nın akış sitometri analiz görüntüsü



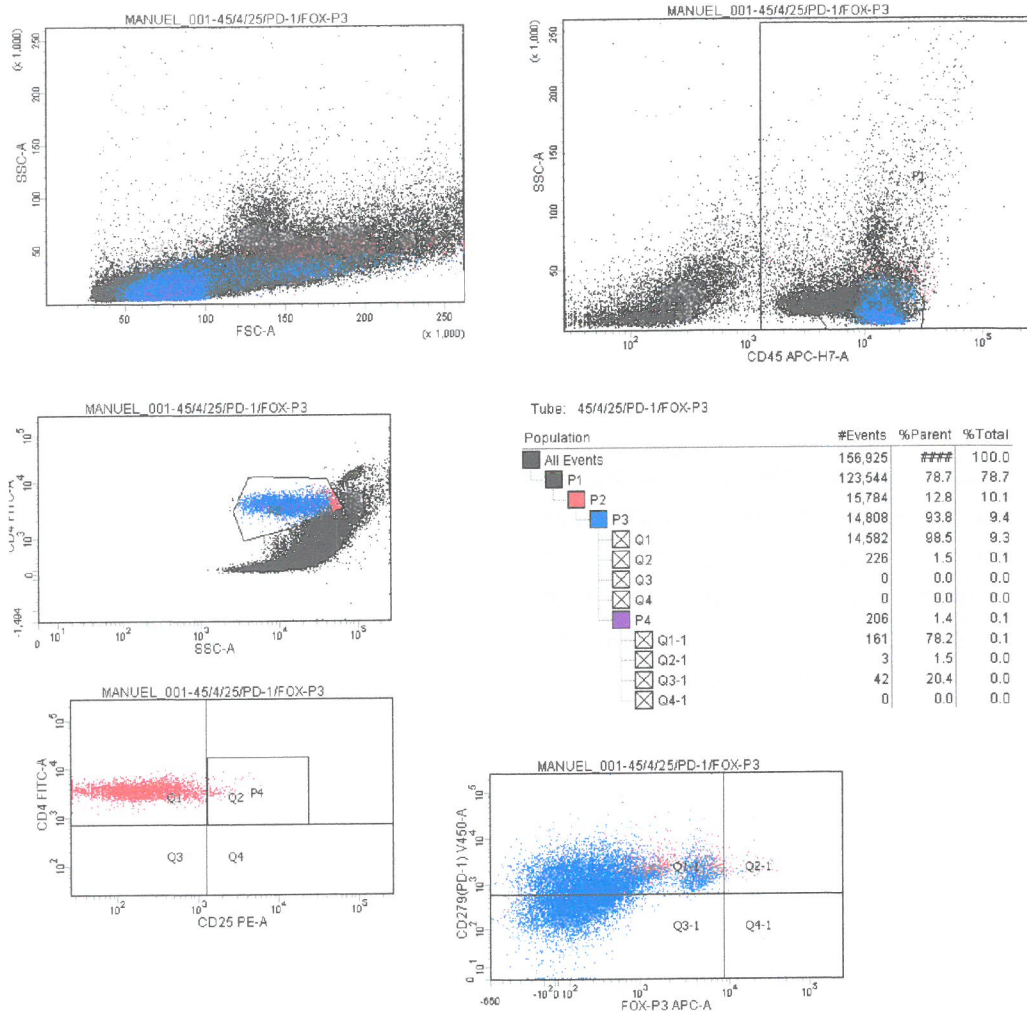
Şekil 8.9. 9.Hasta S.A.'nın akış sitometri analiz görüntüsü



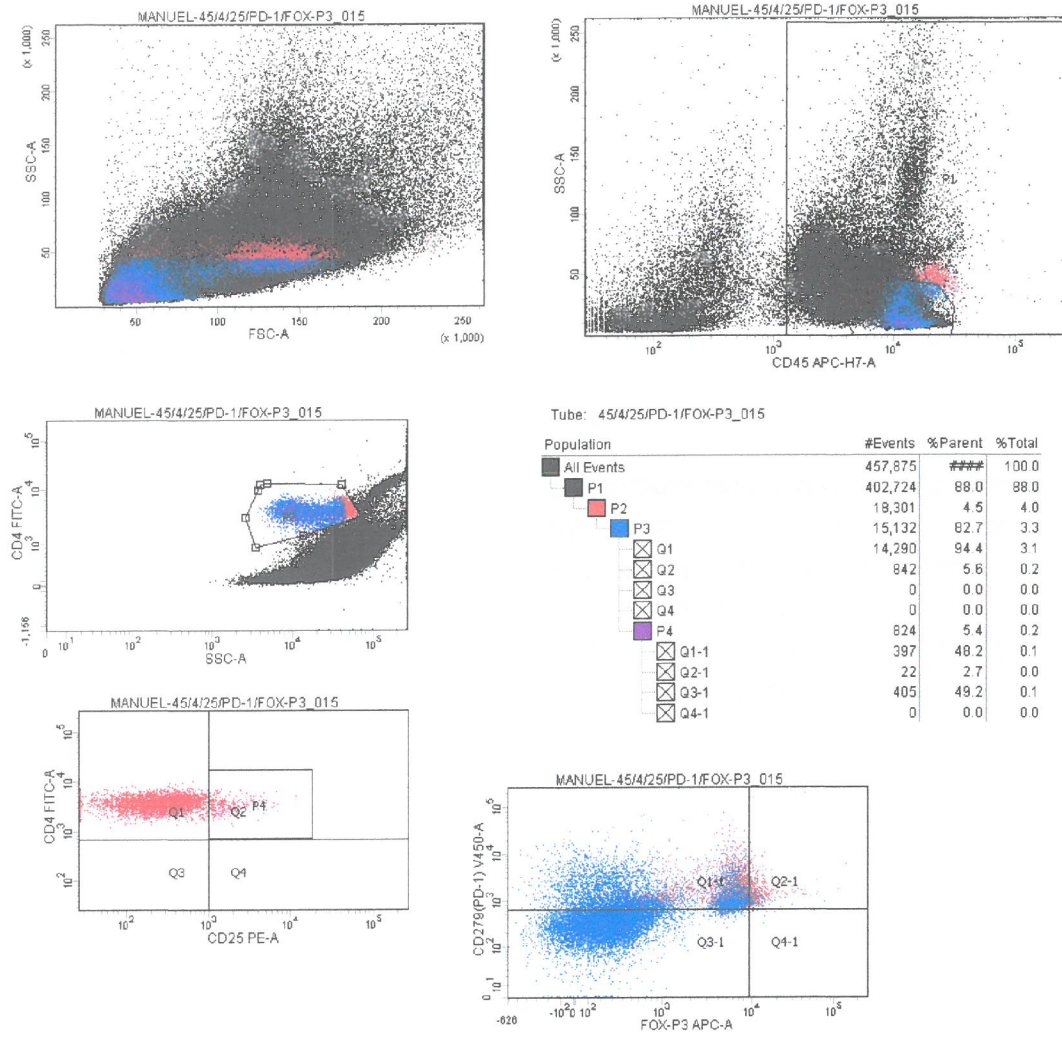
Şekil 8.10. 10.Hasta D.Ö.'nün akış sitometri analiz görüntüsü



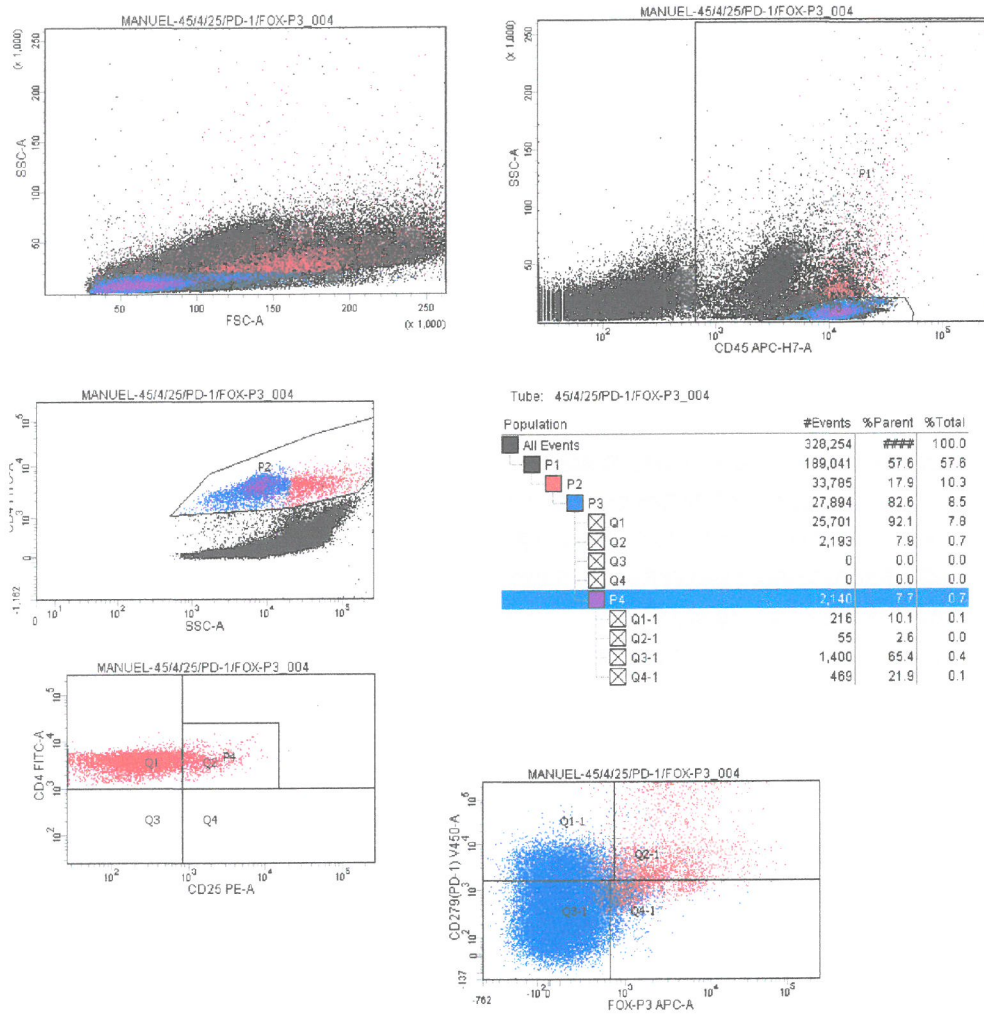
Şekil 8.11. 11.Hasta S.G.'nin akış sitometri analiz görüntüsü



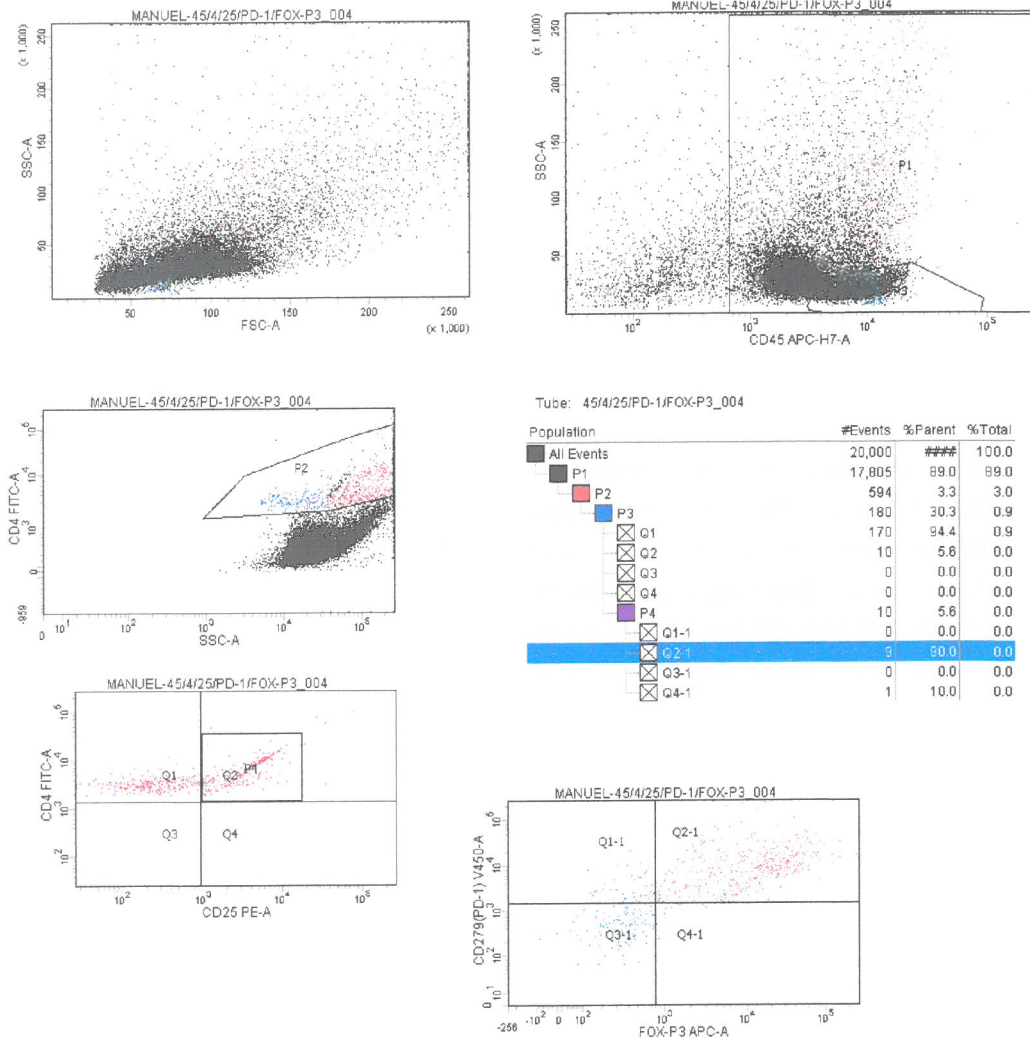
Şekil 8.12. 12.Hasta M.S.'nin akış sitometri analiz görüntüsü



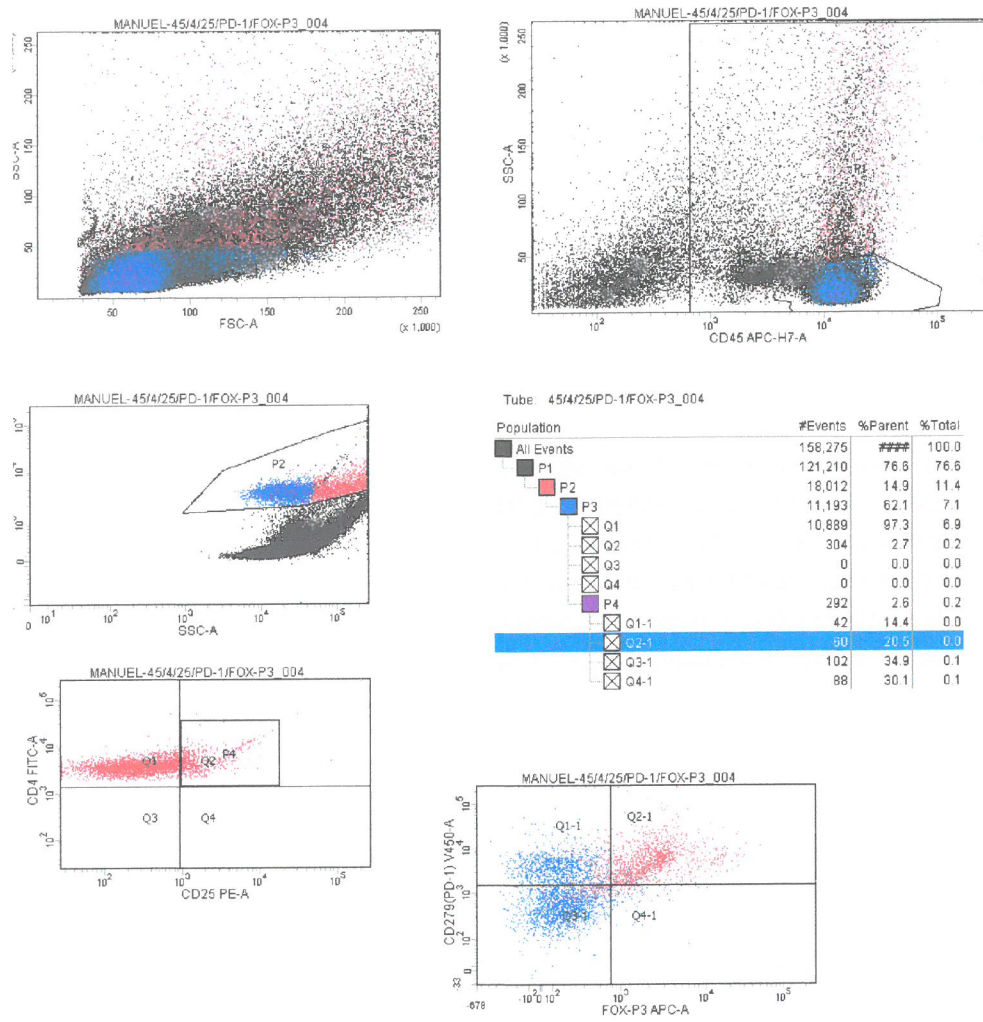
Şekil 8.13. 13.Hasta A.T.'nin akış sitometri analiz görüntüsü



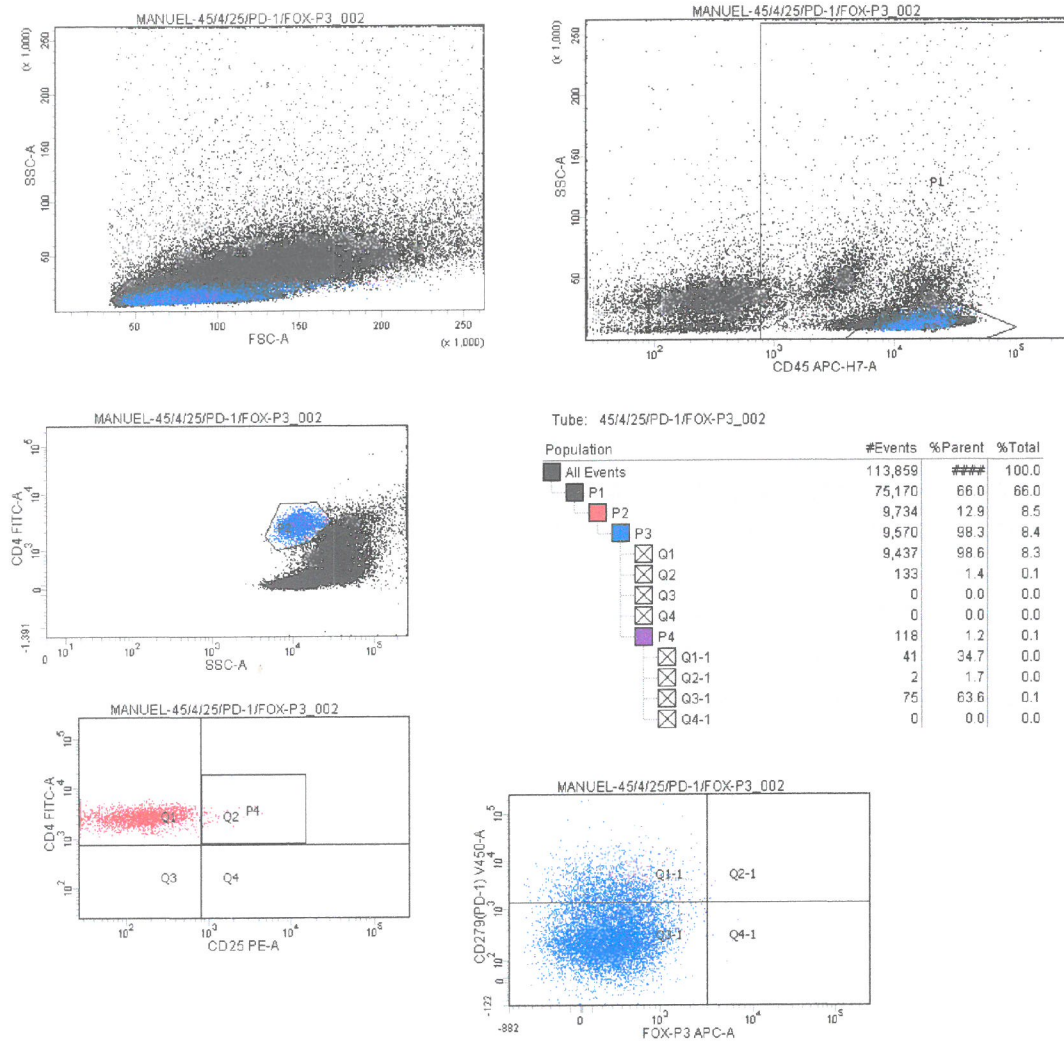
Şekil 8.14. 14.Hasta B.K.'nın akış sitometri analiz görüntüsü



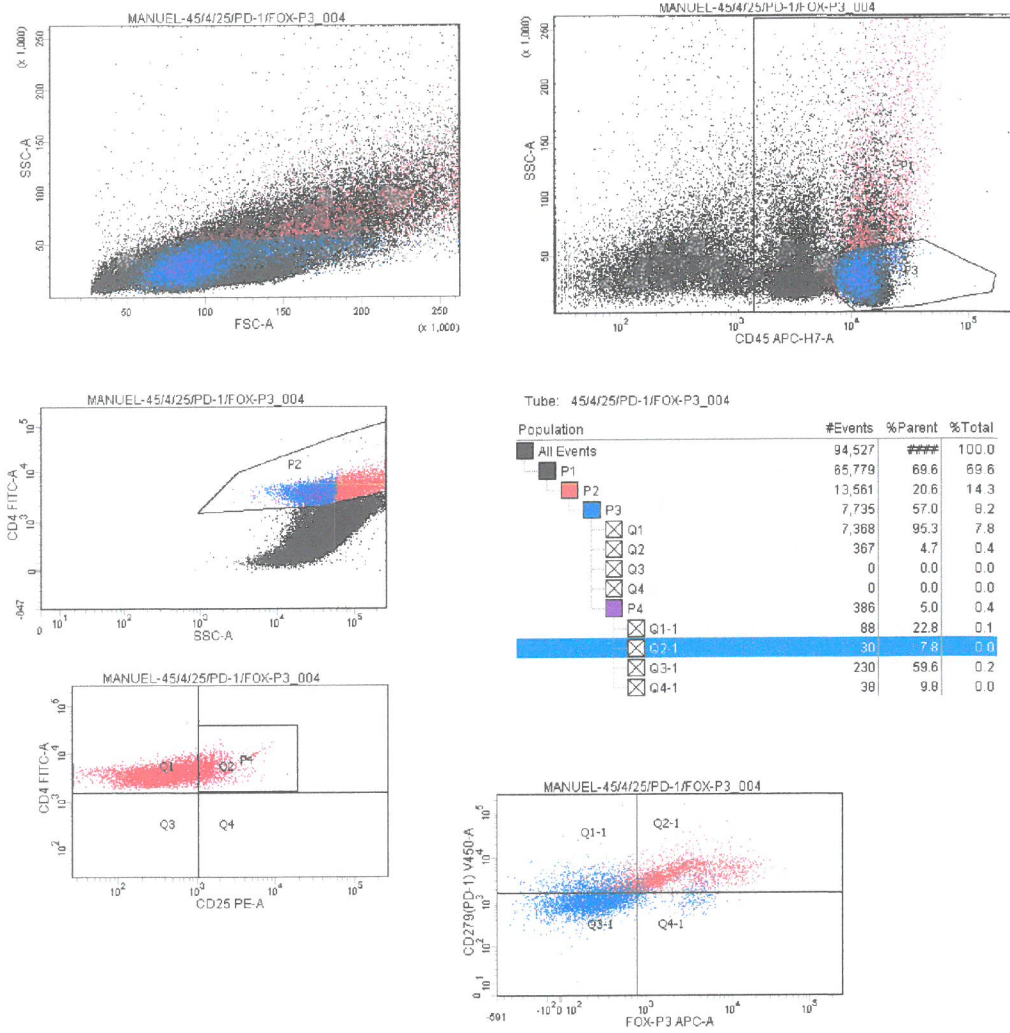
Şekil 8.15. 15.Hasta F.L.'nin akış sitometri analiz görüntüsü



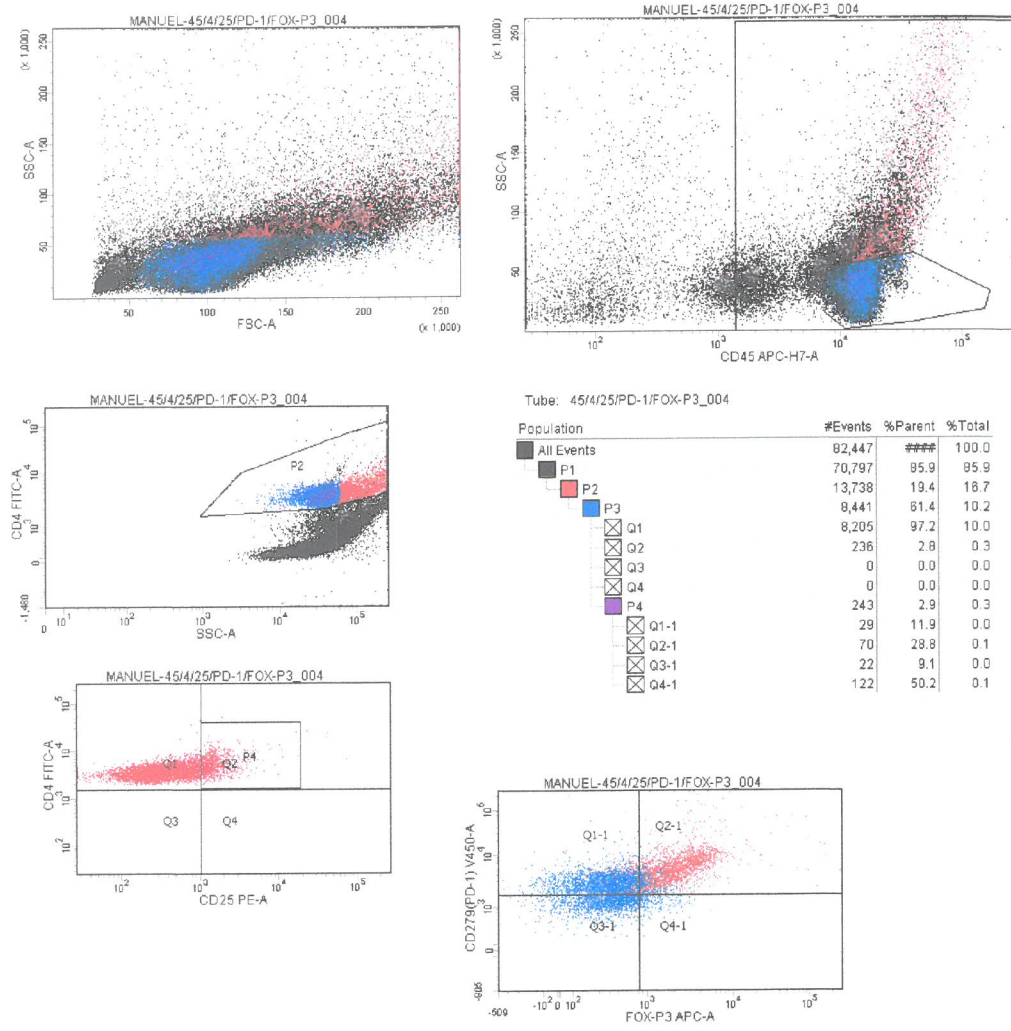
Şekil 8.16. 16.Hasta S.K.'nın akış sitometri analiz görüntüsü



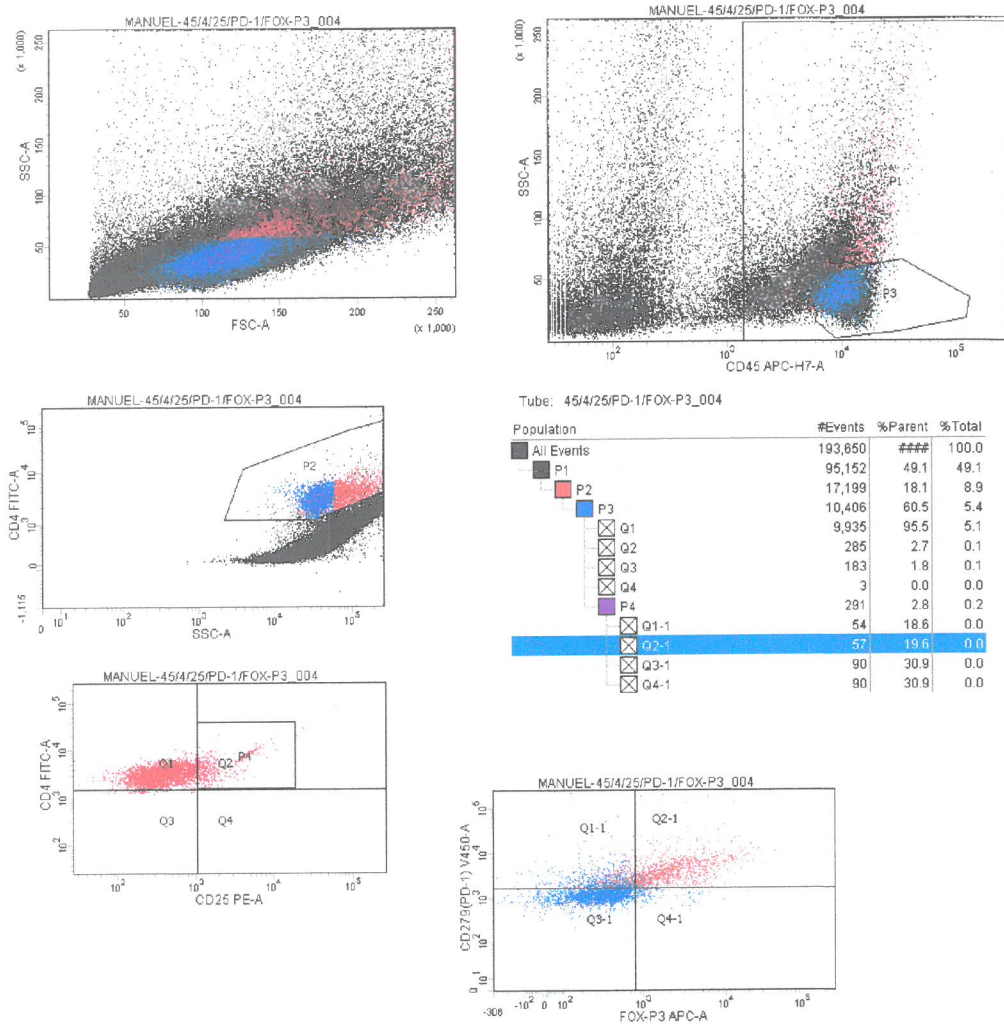
Şekil 8.17. 17.Hasta E.K.'nın akış sitometri analiz görüntüsü



Şekil 8.18. 18.Hasta L.C.'nin akış sitometri analiz görüntüsü

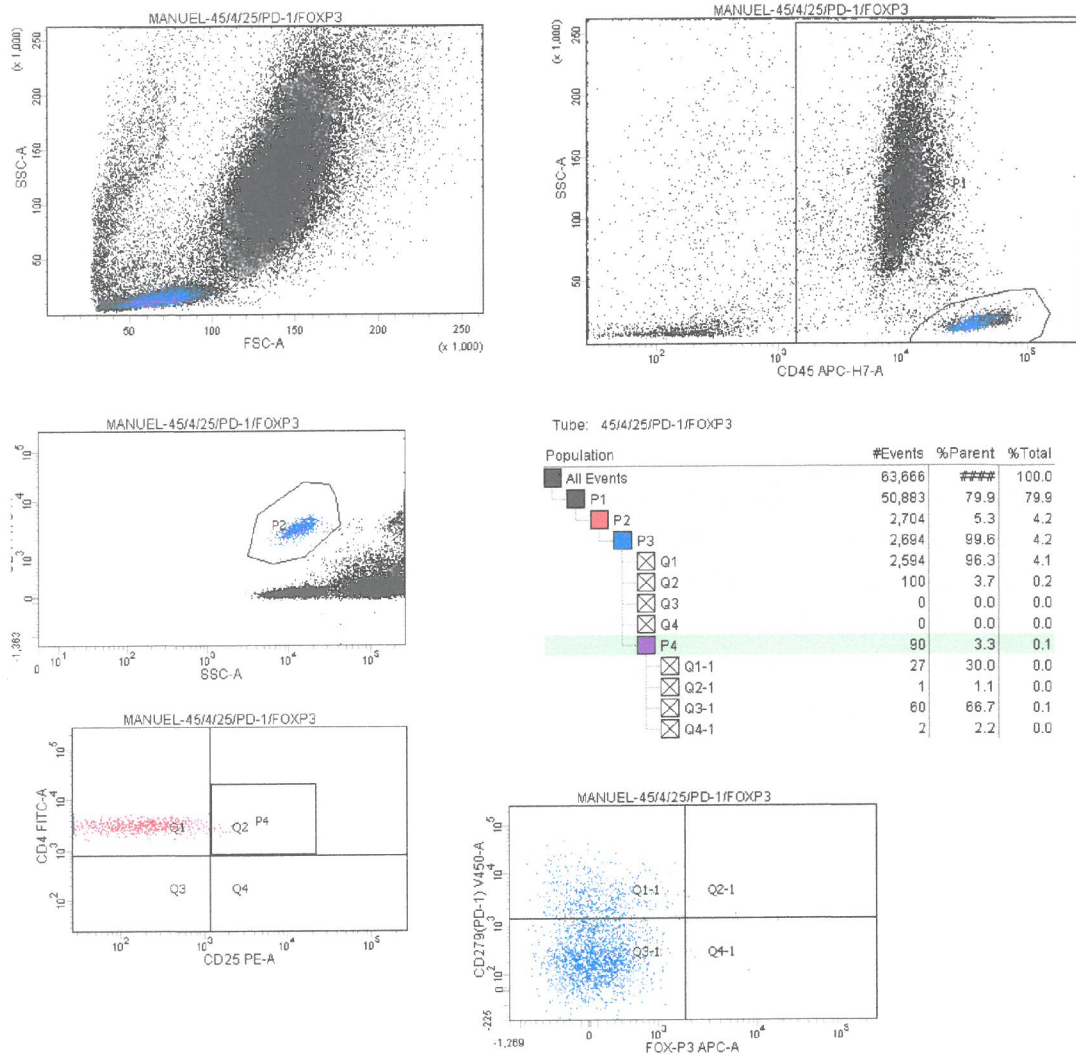


Şekil 8.19. 19.Hasta C.K.'nın akış sitometri analiz görüntüsü

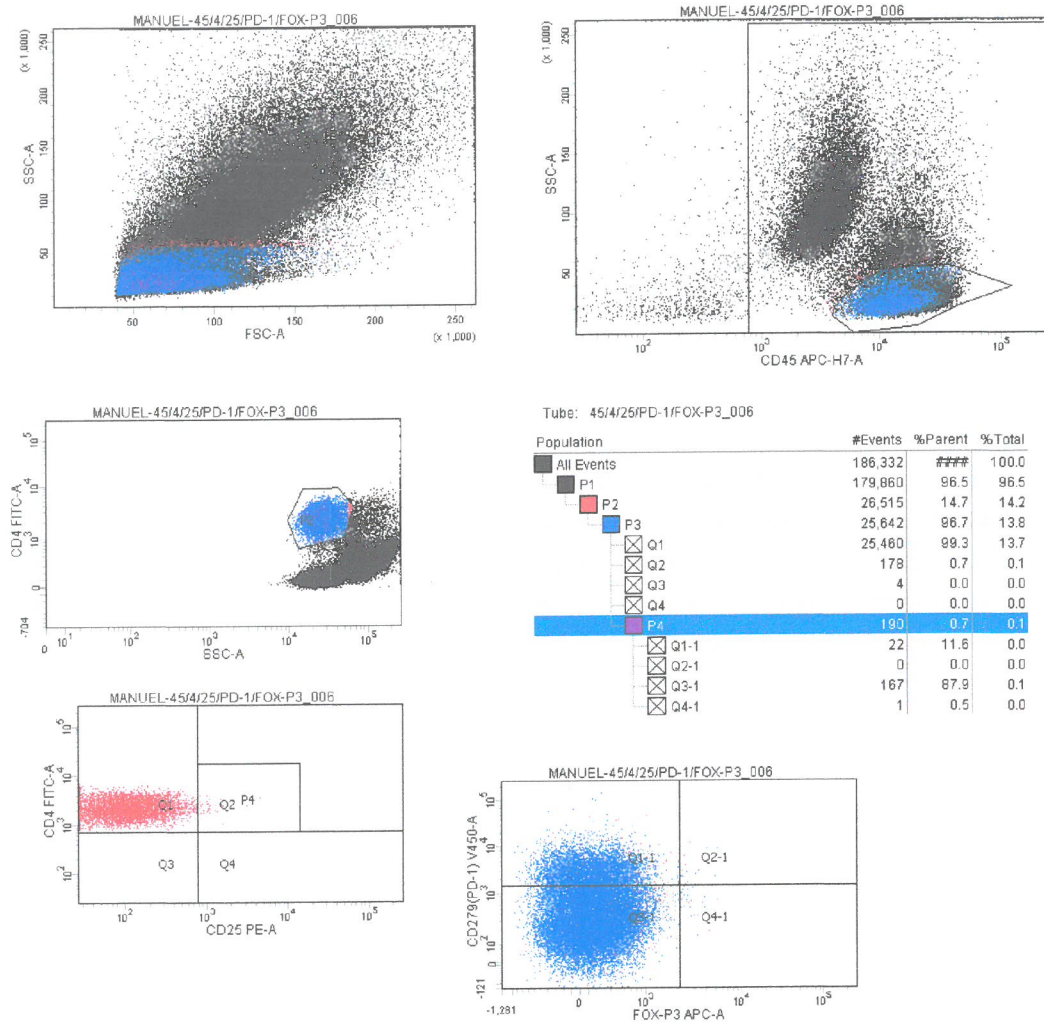


Şekil 8.20. 20.Hasta G.Y.'nin akış sitometri analiz görüntüsü

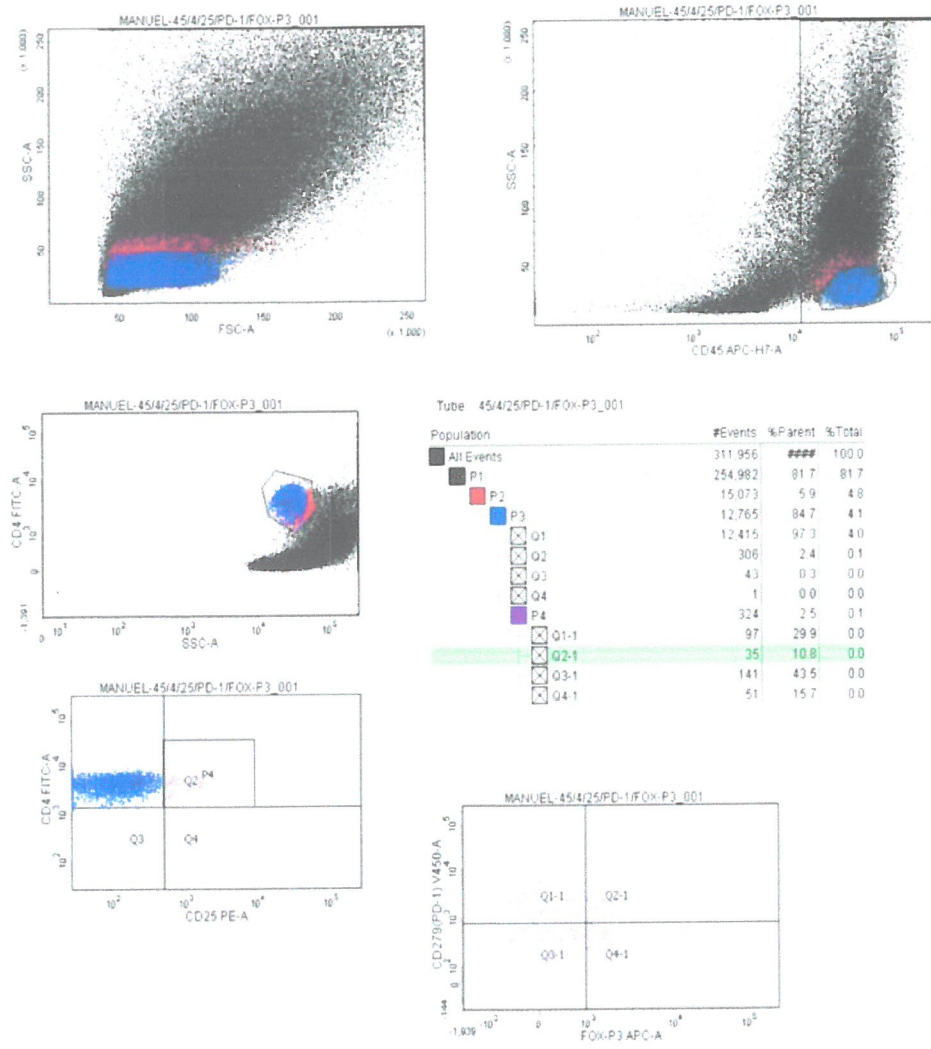
İTP hastaları;



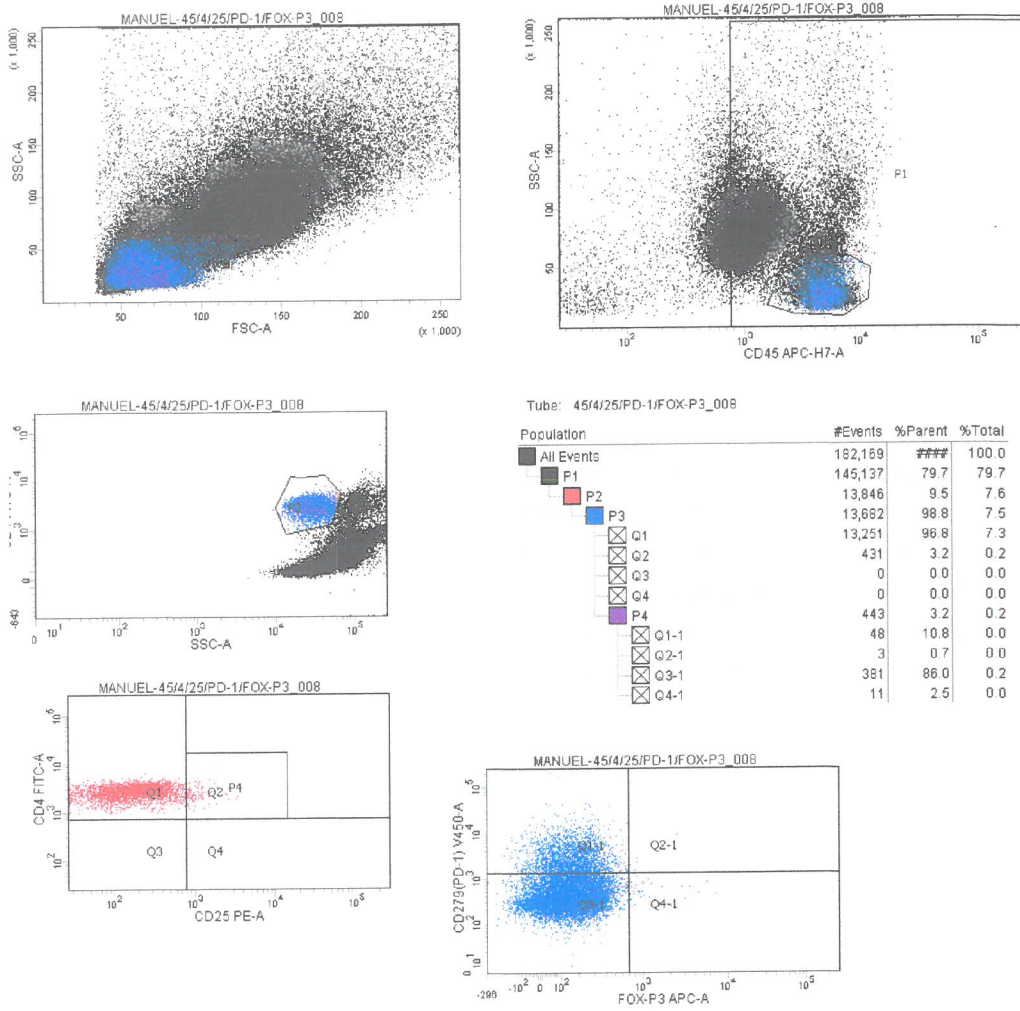
Şekil 8.21. 1.Hasta H.Ö.'nün akış sitometri analiz görüntüsü



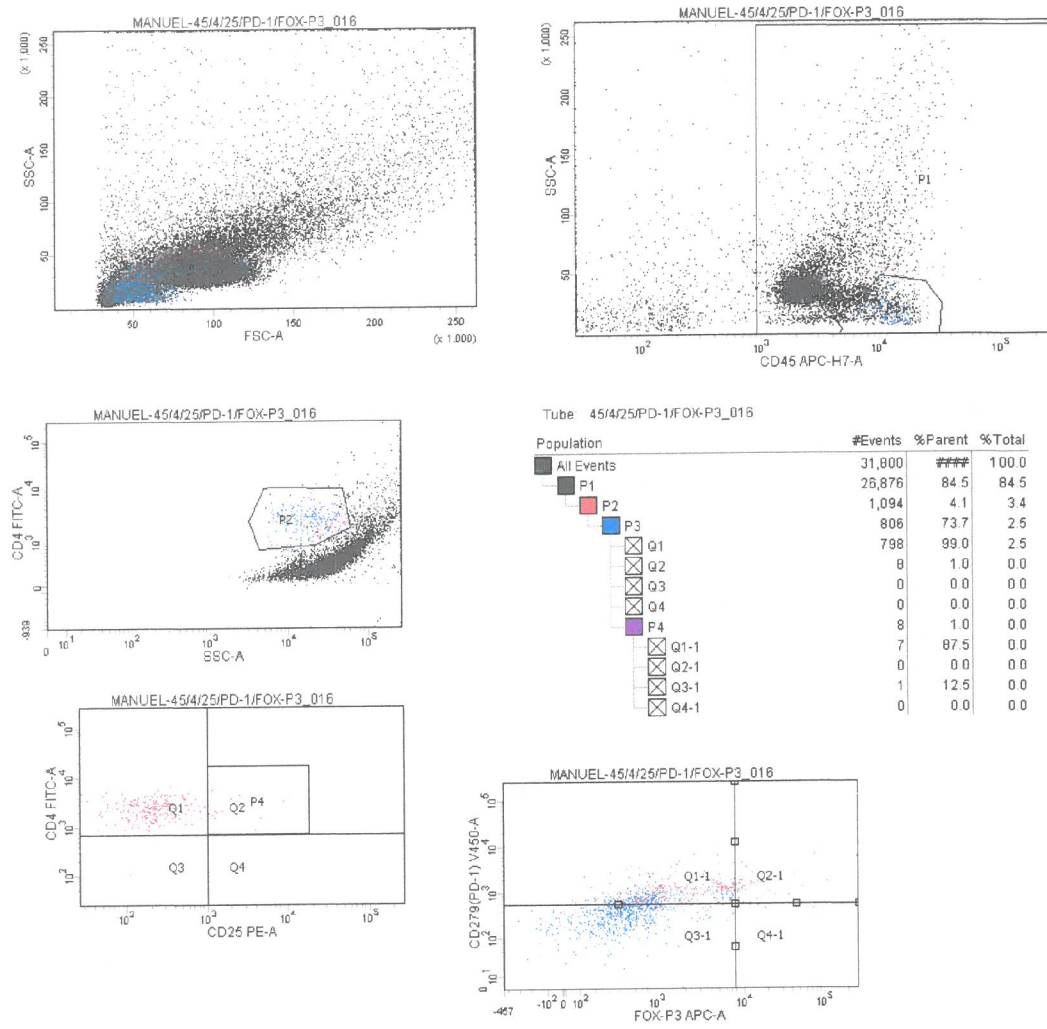
Şekil 8.22. 2.Hasta Ş.Ç.'nin akış sitometri analiz görüntüsü



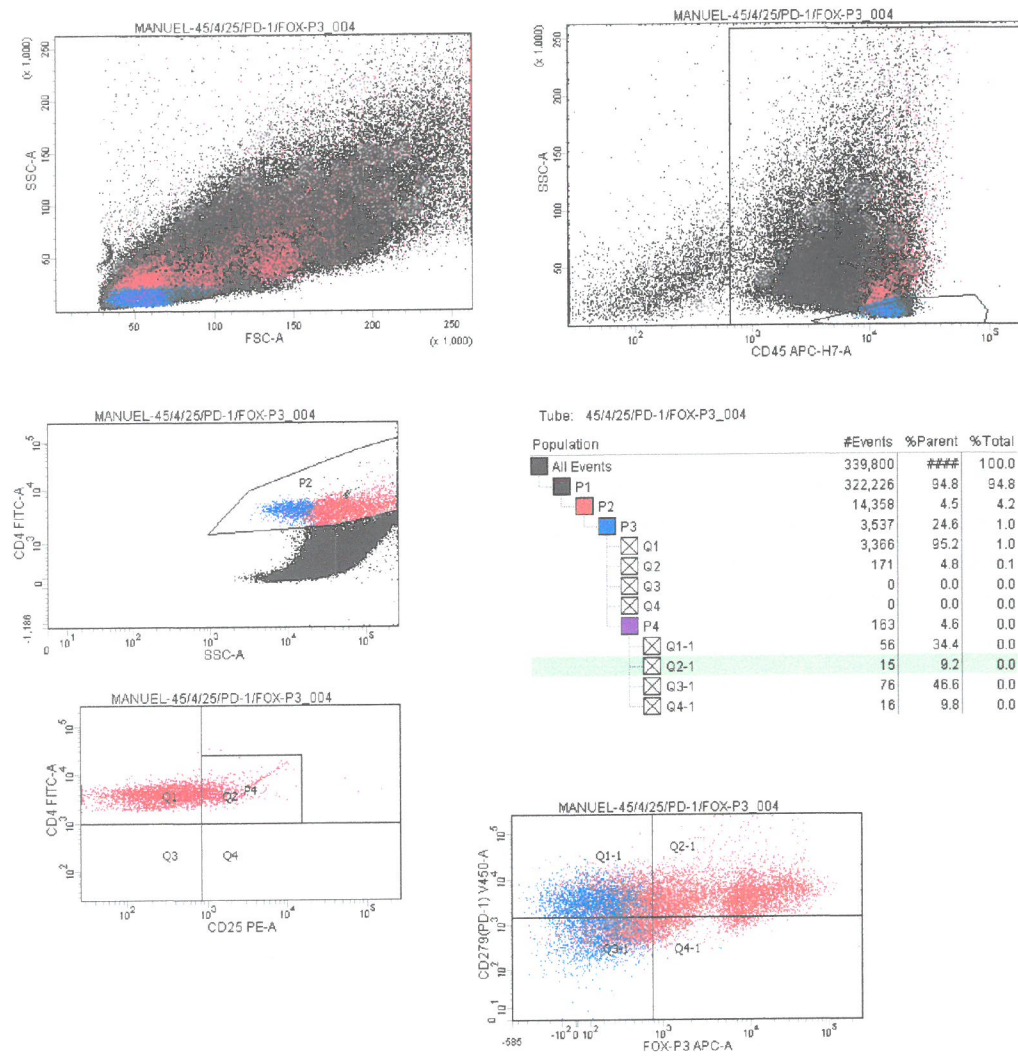
Şekil 8.23. 3.Hasta R.U.'nun akış sitometri analiz görüntüsü



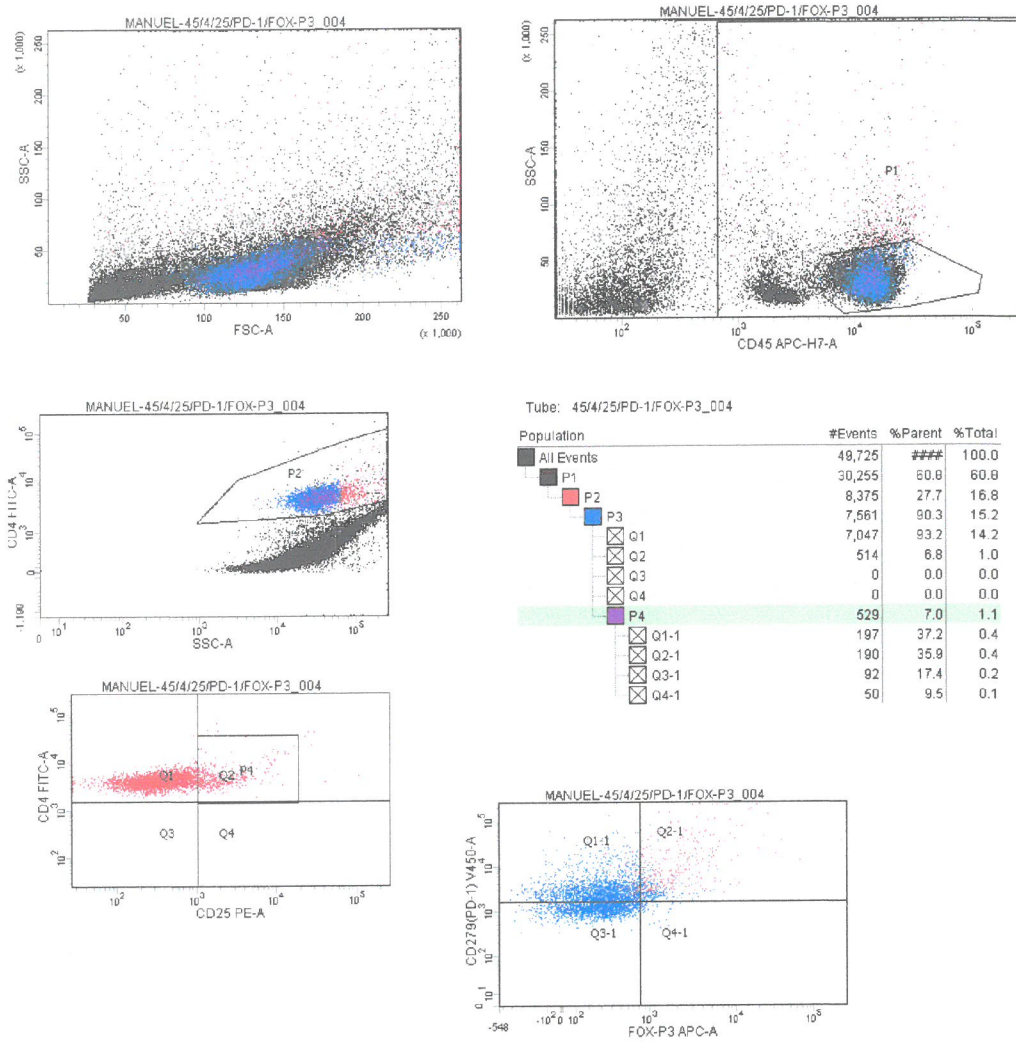
Şekil 8.24. 4.Hasta K.K.'nın akış sitometri analiz görüntüsü



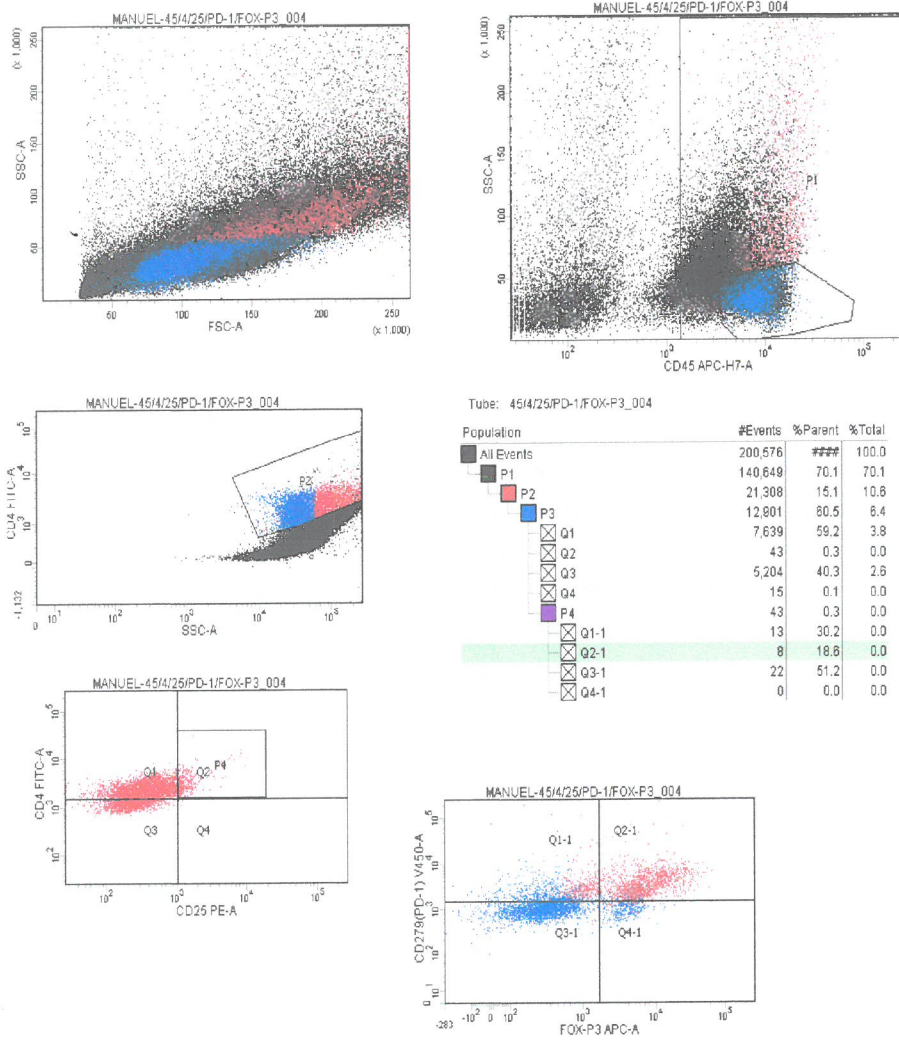
Şekil 8.25. 5.Hasta F.Ç.'nin akış sitometri analiz görüntüsü



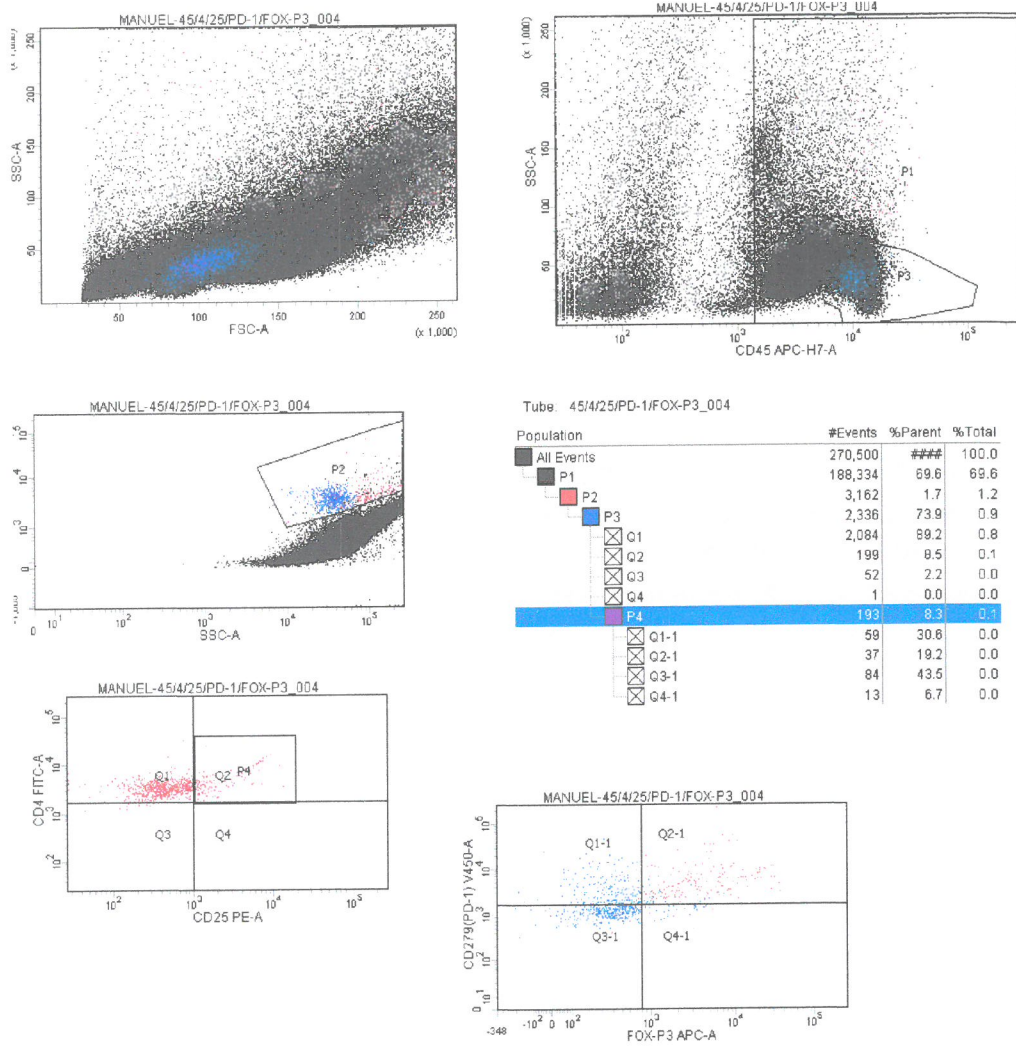
Şekil 8.26. 6.Hasta M.Ç.'nin akış sitometri analiz görüntüsü



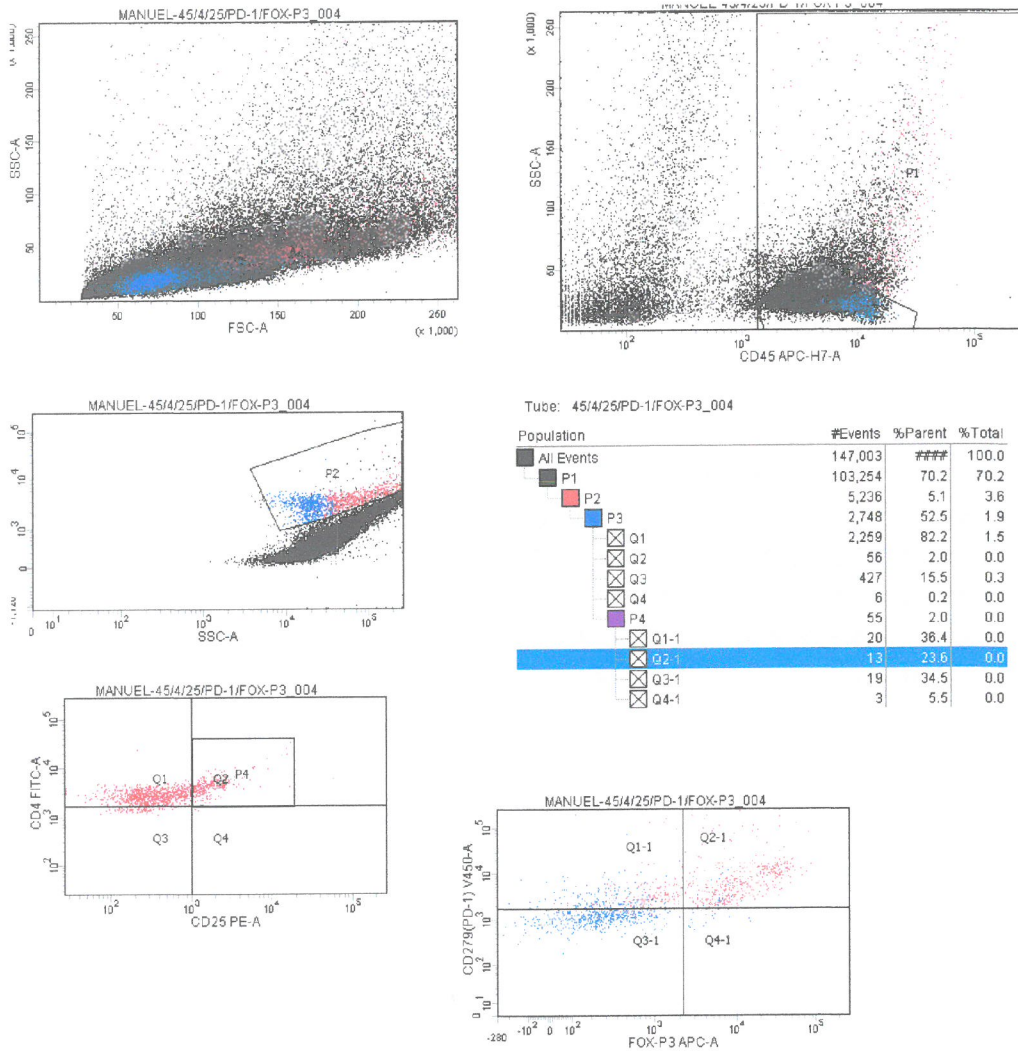
Şekil 8.27. 7.Hasta A.G.'nin akış sitometri analiz görüntüsü



Şekil 8.28. 8.Hasta S.B.'nin akış sitometri analiz görüntüsü



Şekil 8.29. 9.Hasta S.D.'nin akış sitometri analiz görüntüsü



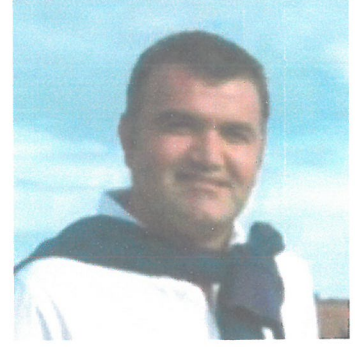
Şekil 8.30. 10.Hasta S.F.'nin akış sitometri analiz görüntüsü

ITP hastası S.D. (9 numaralı hasta) Mayıs 2017'de ITP tanısı almıştır. Ekim 2017'de Myelodisplastik Sendrom (MDS) tanısı almıştır. Ekim 2018'de Paroksizmal Noktürnal Hemoglobinüri (PNH) tanısı almıştır. Bu nedenle çalışmanın başında kontrol grubu kriterlerini taşıdığı halde sonraki süreçte kontrol grubu kriterlerini taşımadığı için istatistiksel değerlendirmenin dışında tutulmuştur.

ÖZGEÇMİŞ

DENİZ EKİNCİ

ekincid@akdeniz.edu.tr



ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Doktora 2014-2020	Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji ABD, Antalya
Y. Lisans 2005-2008	Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İç Hastalıkları ABD, Antalya
Lisans 2001-2004 (Bölüm Birincisi)	Akdeniz Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Antalya

MESLEKİ VE İDARİ GÖREVLER

Kit Koord. 2013-devam ediyor	Akdeniz Üniversitesi Hastanesi İç Hastalıkları AD, Hematoloji BD, Antalya
Araştırma Görevlisi 2005-2008	Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Antalya

ESERLER

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

1. Ozturk OH, Bozcuk H, Burgucu D, Ekinci D, Ozdogan M, Akca S, Yildiz M. 2007. Cisplatin cytotoxicity is enhanced with Zoledronic acid in A549 lung cancer cell line: preliminary results of an in vitro study. Cell Biology International, 31: 9,1069-1071.

2. Bozcuk H, Ozdogan M, Aykurt O, Topcuoglu F, Ozturk OH, Ekinçi D, Karadeniz A, and Burgucu D. 2011. *Urginea maritima* extract induces more cytotoxicity than standart chemotherapeutics in A549 non-small cell lung cancer cell line. *Turkish Journal of Medical Science*, 41: 1,101-108.
3. Bisgin A, Kargi A, Yalcin AD, Aydin C, Ekinçi D, Savas B, Sanlioglu S. 2012. Increased serum sTRAIL levels were correlated with survival in bevacizumab-treated metastatic colon cancer. *BMC Cancer*, 7:12,58.
4. Ekinçi D, Kargi A, Didem Yalcin A, Savas B. 2013. The role of VEGF and other parameters in tracking the clinical course in metronomic chemotherapy. *J BUON*, 18:1,245-52.
5. Ekinçi D, Ozkan A. 2017. Role of CD4+ regulatory T cells in multiple myeloma. *CUKUROVA MEDICAL JOURNAL*, 42:3,546-551.
6. Cigdem Aydin, Turgay Ulas, Ceren Hangul, Orhan Kemal Yucel, Utku Iltar, Ozan Salim, Deniz Ekinçi, Sibel Berker Karauzum. 2019. Conventional Cytogenetics and Interphase Fluorescence In Situ Hybridization Results in Multiple Myeloma: A Turkey Laboratory Analysis of 381 Cases. *Indian J Hematol Blood Transfus*, pp1-8.

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler

1. Ozan Salim, Tayfur Toptas, Deniz Ekinçi, Mesut Gocer, Orhan Kemal Yucel, Derya Kivrak Salim, Levent Undar. THE RELATIONSHIP BETWEEN VIABILITY AND ENGRAFTMENT IN AUTOLOGOUS TRANSPLANTATION OF PERIPHERAL BLOOD STEM CELLS. 40th Annual Meeting of the European Society for Blood and Marrow Transplantation, 30 Mart - 2 Nisan 2014. Milan, Italy. Pp1-1.
2. Aydin, F; Salim O, Yucel, OK, Ekinçi, D, Toptas, T , Gungor, F, Boz, A, Yildiz, A , Akkaya, B , Undar, L. EVALUATION OF BONE MARROW INVOLVEMENT IN PATIENTS WITH LYMPHOMA: F-18 FDG PET/CT VERSUS BONE MARROW BIOPSY. 19th Congress of the European-Hematology-Association, 12-15 Haziran 2014. Milan, ITALY. Pp1-1.

3. Deniz Ekinci, Aysun Özkan, Ozan Salim, Aslı Toylu, Melike Ulubahşi Bağcı, Levent Ündar. YENİ TANI MULTİPL MİYELOM HASTALARINDA KEMİK İLİĞİNDE CD4+CD25+ FOXP3+ PD-1+ REGÜLATÖR T HÜCRELERİN DÜZEYİNİN BELİRLENMESİ. Abstract Book (Oral Presentation). 1st International Health Sciences and Life Congress 02-05 Mayıs 2018. Burdur, TURKEY. Pp169.
4. Deniz Ekinci, Aysun Özkan, Ozan Salim, Aslı Toylu, Melike Ulubahşi Bağcı, Levent Ündar. MULTİPL MİYELOMDA PD1/PDL1 İNHİBİTÖRLERİ. Abstract Book (Poster Presentation). 1st International Health Sciences and Life Congress 02-05 Mayıs 2018. Burdur, TURKEY. Pp312.
5. Aysun Özkan, Deniz Ekinci. REGÜLATÖR T HÜCRE İMMUNİTESİ. Abstract Book (Poster Presentation). 1st International Health Sciences and Life Congress 02-05 Mayıs 2018. Burdur, TURKEY. Pp40-41.
6. Aysun Özkan, Deniz Ekinci, Ozan Salim, Aslı Toylu, Melike Ulubahşi Bağcı, Levent Ündar. Comparison of PD1+ Regulatory T Cells Levels at Bone Marrow in New Diagnosis Multiple Myeloma and Idiopathic Thrombocytopenic Purpura Patients. Abstract Book (Poster Presentation). Fifth International Mediterranean Congress on Natural Sciences, Health Sciences and Engineering (MENSEC V), 10th to 12th September 2019. Budapest, Hungary. . Pp183-184.

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler

1. Bozcuk H, Özdoğan M, Topçuoğlu F, Öztürk OH, Burgucu D, Ekinci D, Karadeniz A. Urgunea maritima ekstresinin küçük hücreli dışı akciğer karsinomu hücrelerindeki sitotoksitesi. XVIII. Ulusal Kanser Kongresi, Antalya, Türkiye, 21-26 Nisan 2009.ss.420.
2. Ekinci D, Savaş B, Kargı A, Artaç M, Özdoğan M, Bozcuk H, Coşkun HŞ, Mutlu H. Metastatik kanserli hastalarda metronomik siklofosfamid-tabanlı kemoterapiler, bevacizumab- tabanlı kemoimmünoterapiler ve serum VEGF seviyeleri. XVIII. Ulusal Kanser Kongresi, Antalya, Türkiye, 21-26 Nisan 2009. ss.426.
3. Demir E., Ekinci D., Kocaoğlu S., Kaya B. Drosophila melanogaster’de Kobalt Klorür ve Potasyum Dikromat’ın Ömür Uzunluğu Üzerine Etkisinin Araştırılması. 18.

Ulusal Biyoloji Kongresi (Uluslararası Katılımlı), Kuşadası / AYDIN, Türkiye, 26-30 Haziran 2006. ss.154.

4. Ozan Salim, Tayfur Toptaş, Deniz Ekinci, Mesut Göçer, Orhan Kemal Yücel, Levent Ündar. Otolog Periferik Hematopoietik Kok Hucre Naklinde Canlı CD34+ Hucre Sayisi ve Engrafman İlişkisi. 39. Ulusal Hematoloji Kongresi, Antalya, Türkiye, 23 -26 Ekim 2013.ss.43.

5. Nurten Sayın Ekinci, Deniz Ekinci, Şule Darbaş, Yahya Kılınç, Mesut Coşkun, Fahri Uçar. BÖBREK NAKİLLİ HASTALARDA PRA POZİTİFLİĞİ İLE SERUM IL-17 DÜZEYİ ARASINDAKİ İLİŞKİ. Uluslararası Katılımlı Türkiye Organ Nakli Kuruluşları Koordinasyon Derneği X. Kongresi “TRANSPLANTASYON 2014”, Muğla, Türkiye, 15-18 Ekim 2014.ss.70.

6. Deniz Ekinci, Aysun Özkan, Ozan Salim, Aslı Toylu, Melike Ulubahşi Bağcı, Levent Ündar. YENİ TANI MULTIPL MİYELOM HASTALARINDA KEMİK İLİĞİNDE PD1+ TREGLERİN DÜZEYİ VE PD1, PDL1 MRNA İFADESİNİN ARAŞTIRILMASI. Abstract Book (Oral Presentation). 45. Ulusal Hematoloji Kongresi, Antalya, Türkiye, 30 Ekim – 2 Kasım 2019.ss.78.

Patent, faydalı model ve tescil belgeleri

1.Topcuoğlu Ş.F, Bozcuk H, Özdoğan M, Aykurt O, Öztürk H, Ekinci D, Karadeniz A, Burgucu D, "Extract from Urginea maritima for use in the treatment of non small cell lung cancer (NSCLC) and other solid tumors", ALMANYA, Patent, 2082746, Aralık 2009.

Ödüller

1. Deniz Ekinci, Aysun Özkan, Ozan Salim, Aslı Toylu, Melike Ulubahşi Bağcı, Levent Ündar. YENİ TANI MULTIPL MİYELOM HASTALARINDA KEMİK İLİĞİNDE CD4+CD25+ FOXP3+ PD-1+ REGÜLATÖR T HÜCRELERİN DÜZEYİNİN BELİRLENMESİ. Abstract Book (Oral Presentation). 1st International Health Sciences and Life Congress 02-05 Mayıs 2018. Burdur, TURKEY. Pp169. 1st Place Winner.