

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MULTİPL MİYELOMDA T REGULATOR
HÜCRELERİN (TREG) TEDAVİYE
ETKİSİNİN EX VİVO ARAŞTIRILMASI**

AYŞE PINAR ERÇETİN

**TEMEL ONKOLOJİ DOKTORA PROGRAMI
DOKTORA TEZİ**

İZMİR-2014

TEZ KODU: DEU.HSI.-PhD-2009970217

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MULTİPL MİYELOMDA T REGULATUAR
HÜCRELERİN (TREG) TEDAVİYE
ETKİSİNİN EX VİVO ARAŞTIRILMASI**

TEMEL ONKOLOJİ DOKTORA PROGRAMI

DOKTORA TEZİ

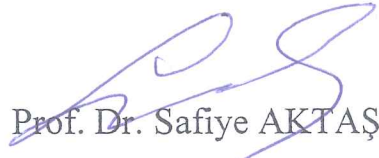
AYŞE PINAR ERÇETİN

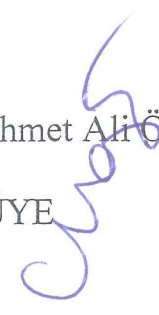
Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. Safiye AKTAŞ

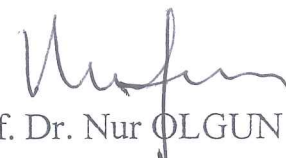
(Bu araştırma DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından 2011.
KB. SAG. 023 sayı ile desteklenmiştir.)

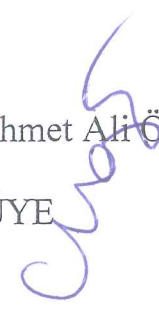
TEZ KODU: DEU.HSI.-PhD-2009970217

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Onkoloji Anabilim Dalı,
Temel Onkoloji Doktora programı öğrencisi Ayşe Pınar Erçetin 'MULTİPL
MİYELOMDA T REGULATOR HÜCRELERİN (TREG) TEDAVİYE
ETKİSİNİN EX VİVO ARAŞTIRILMASI' konulu Doktora tezini
28.08.2014 tarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.


Prof. Dr. Safiye AKTAŞ
BAŞKAN


Prof. Dr. Mehmet Ali ÖZCAN
ÜYE


Prof. Dr. Nur ÖLGÜN
ÜYE


Prof. Dr. Bülent ÜNDAR
ÜYE


Doç. Dr. Aydan Çelebiler
ÜYE


Doç. Dr. Zekiye ALTUN
YEDEK ÜYE


Prof. Dr. Ragıp ORTAÇ
YEDEK ÜYE

İÇİNDEKİLER

1. TABLO- ŞEKİL ve KISALTMA DİZİNİ	iv
1.1. Tablo Dizini	iv
1.2. Şekil Dizini	iv
1.3. Grafik Dizini	v
1.4. Kısaltma Dizini	v
TEŞEKKÜR	ix
2. ÖZET	1
3. YABANCI DİLDE ÖZET	3
4. GİRİŞ VE AMAÇ	5
4.1. Giriş	5
4.2. Amaç	6
5. GENEL BİLGİLER	7
5.1. Multipl Miyelom	7
5.1.1. Multipl Miyelom Etiyolojisi	7
5.1.2. Multipl Miyelomda İmmünglobülinler	8
5.1.3. Multipl Miyelomun Klinik Belirtileri	9
5.1.4. Multipl Miyelomun Evreleri	10
5.1.5. Multipl Miyelomda Prognostik Faktörler	11
5.1.6. Multipl Miyelomun Gelişim Basamakları	13
5.1.7. Multipl Miyelomun Genetik Özellikleri	16
5.1.8. Multipl Miyelom ve Mikroçevre İlişkisi	19
5.1.9. Multipl Miyelom Tedavisi	20
5.2. İmmünregulasyon	26
5.3. Düzenleyici T Hücreler (T _{reg})	27
5.3.1. T _{reg} Hücrelerinin Sınıflandırılması	28
5.3.2. T _{reg} Hücrelerinin Etki Mekanizması	29
5.3.3. T _{reg} Hücrelerinin Karakterizasyonu	32
5.3.4. T _{reg} Hücreleri ve Kansere İlişkisi	33
5.4. Bortezomib	34
5.4.1. Bortezomibin İmmün Sisteme Etkisi.....	36
6. GEREÇ VE YÖNTEM	38
6.1. Araştırmanın Tipi	38

6.2.	Araştırmanın Yeri ve Zamanı	38
6.3.	Araştırmanın Evreni ve Örneklemi	38
6.4.	Araştırmanın Materyali.....	38
6.5.	Araştırmanın Değişkenleri	39
6.6.	Veri Toplama Araçları.....	39
6.6.1.	Araç ve Gereçler	39
6.6.1.1.	Tez Çalışmasında Kullanılan Gereçler	39
6.6.1.2.	Kullanılan Kimyasal Madde ve Solüsyonlar	41
6.6.1.3.	Kullanılan Sarf Malzemeler	41
6.7.	Yöntemler	41
6.7.1.	Periferik Kan Mononükleer Hücrelerin (PBMC) ve Kemik İliği Mononükleer Hücrelerinin (BMMC) Dansite Gradient Santrifügasyon Yöntemi ile İzolasyonu	41
6.7.1.1.	Genel İlke	41
6.7.1.2.	Uygulama Basamakları	42
6.7.2.	Bortezomib LD50 Doz Deneyleri	44
6.7.3.	WST-1 Hücre canlılık analizi	45
6.7.3.1.	Genel İlke	45
6.7.3.2.	Uygulama Basamakları	46
6.7.4.	Manyetik Yolla CD4+ CD25+ Foxp3+ Treg hücrelerin PBMC 'lerinden İzolasyonu	46
6.7.4.1.	Genel İlke	46
6.7.4.2.	Ön Hazırlık	47
6.7.4.3.	Uygulama Basamakları	47
6.7.5.	Akım Sitometri ile CD4+ CD25+ Foxp3+ Treg Hücrelerin Seviyelerinin Tespiti	49
6.7.5.1.	Genel İlke	49
6.7.5.2.	Uygulama Basamakları	50
6.7.6.	Primer Kemik İliği Kültürü Hücre Deneyleri	51
6.7.6.1.	Uygulama Basamakları	51
6.7.7.	Akım Sitometri İle CD138+ Malign Plazma Hücrelerinin (MM Hücrelerinin) Seviyelerinin Tespiti	52
6.7.7.1.	Uygulama Basamakları	52

6.7.8.	Tripan Mavisi Ve WST-1 İle Total Hücre Canlılık Ve Ölümünün Değerlendirilmesi	53
6.7.8.1.	Genel İlke	53
6.7.8.2.	Uygulama Basamakları	53
6.7.9.	CD138+ Malign Plazma Hücrelerinin (MM Hücrelerinin) Bortezomib Ve CD4+CD25+ Treg Hücreler İle İnkübasyonu Sonunda Canlılığının Değerlendirilmesi	54
6.8.	Araştırma Planı ve Takvimi.....	54
6.9.	Verilerin Değerlendirilmesi	55
6.9.1.	Akım Sitometri Bulgularının Değerlendirilmesi.....	55
6.9.2.	İstatistiksel Verilerin Değerlendirilmesi	56
6.10.	Etik Kurul Onayı	56
7.	BULGULAR	56
7.1.	Olgulara Genel Bakış	56
7.2.	İn vitro Bortezomib LD50 Doz Bulguları.....	60
7.3.	Manyetik Olarak İzole Edilen CD4+CD25+ Treg Hücrelerin Saflığının Akım Sitometrik Konfirmasyon Bulguları.....	61
7.4.	Primer BMMC kültüründe Bortezomib, Treg ve Bortezomib+Treg kombinasyonunun CD138+ miyelom hücre canlılığına etkisinin akım sitometrik ve WST-1 bulguları	62
7.5.	Treg hücrelerinin bortezomibin malign miyelom hücreleri üzerine öldürücü etkinliğine olan etkisi	67
7.6.	In vivo bortezomib direnci olan/ olmayan hastaların in vitro Treg ekspansiyonunun bortezomib kombinasyonu ile malign plazma hücre canlılığına etkisi	69
7.7.	İstatistik Analiz Bulguları	69
8.	TARTIŞMA	73
9.	SONUÇ VE ÖNERİLER	79
10.	KAYNAKLAR	80
11.	EKLER	87
11.1.	ETİK KURUL RAPORU	87
11.2.	ÖZGEÇMİŞ	88

1. TABLO, ŞEKİL VE KISALTMA DİZİNİ

1.1. Tablo Dizini

1. Multipl Miyelom 'da Evreleme Sistemleri
2. Multipl Miyelom 'da Hastalık Seyrinin Üç Dönemi
3. Miyelomda Tanı Kriterleri
4. Multipl Miyelom 'da Sık Kullanılan Tedavi Seçenekleri
5. Multipl Miyelom Tedavisinde Kullanılan İlaç Kombinasyonları
6. Yeni/ Klinik Çalışmaları Devam Eden Tedavi Seçenekleri
7. Kan ve Kemik İliği Nakli Tedavi Yanıt Kriterleri
8. Treg Hücrelerin Genel Sınıflaması
9. Tüm Olgulara Ait Yeni Tanı Anındaki Klinik Parametreler
10. Olguların Takibinde Relaps Gelişimi ve Sağ Kalım Bilgileri
11. Tüm Olguların Periferik Kan Mononükleer Hücrelerinden İzole Edilen Treg Hücrelerin Saflık Yüzdeleri
12. Tüm Olguların Kemik iliği Mononükleer Hücre Primer Kültürlerinde Her Grup İçin Tespit Edilen CD138+ Hücre Yüzdeleri
13. Tüm Olguların Kemik iliği Mononükleer Hücre Primer Kültürlerinde Her Grup İçin Tespit Edilen Hücre Canlılık Yüzdeleri
14. Tüm Olguların Kemik iliği Mononükleer Hücre Primer Kültürlerinde Her Grup İçin Tespit Edilen Canlı CD138+ Malign Miyelom Hücre Yüzdeleri
15. Tüm Olgularda Her Gruptaki Primer Kemik iliği Mononükleer Hücre Hücre Sayılarına Göre Relatif Olarak Tekrar Hesaplanarak Tespit Edilen Canlı CD138+ Malign Miyelom Hücre Yüzdeleri

1.2. Şekil Dizini

1. Kemik İliği Mikroçevresinin Multipl Miyelom Patogenezindeki Rolü
2. Treg Hücrelerin Etki Mekanizmaları
3. Treg Hücrelerin Hücre- Hücre Teması ve Sitokinlerle Genel Etki Mekanizması
4. Bortezomibin Multipl Miyelom Tedavisinde Miyelom Hücresine ve Mikroçevreye Olan Etkisi

5. Bortezomib Doz Deneme Şeması
6. WST-1 Yönteminin Çalışma Mekanizması
7. CD4+CD25+ Treg Hücrelerin Manyetik İzolasyon Adımları
8. Primer Kemik İliği Kültürü Grupları
9. CD138+ Hücrelerin Canlılık Değerlendirilme Formülü

1.3. Grafik Dizini

1. Olguların Cinsiyete Göre Uluslararası Evreleme Sistemi (ISS) Evre Dağılımı
2. Tüm olgularda ve cinsiyete göre in vivo bortezomib direnç dağılımı
3. Treg Hücrelerinin CD138+ Malign Miyelom Hücre Canlılığına Etkisi
4. Treg varlığında bortezomibin CD138+ hücrelere öldürücü etkisindeki değişimler
5. Treg hücrelerin ex vivo ekspansiyonunun bortezomib anti-tumor etkinliğine olan etkisinin klinikteki bortezomib direnci durumuna göre dağılımı
6. Bortezomib direnci ve sağkalım ilişkisi analizi
7. Bortezomib direnci ile hastalıksız sağkalım ilişkisi analizi
8. Treg ekspansiyonun CD138+ malign miyelom hücre canlılığına etkinliği ile sağkalım ilişkisi
9. Treg ekspansiyonun CD138+ malign miyelom hücre canlılığına etkinliği ile hastalıksız sağkalım ilişkisi

1.4. Kısaltma Dizini

MM: Multipl Miyelom

T_{reg}: T düzenleyici hücre

OKİT (ABMT): Otolog kemik iliği transplantasyonu

BMMC: Kemik iliği mononükleer hücreleri

PBMC: Periferik kan mononükleer hücreleri

SPSS: “Statistical package for the social sciences”

Ig: İmmünglobülin

IgG: İmmünglobülin gama
IgA: İmmünglobülin alfa
IgD: İmmünglobülin delta
IgE: İmmünglobülin epsilon
M protein: Monoklonal protein
MRI: Manyetik rezonans görüntüleme
CT: Bilgisayar tomografisi
ISS: Uluslar arası evreleme sistemi
B2M: Beta-2 mikroglobülin
LDH: Laktat dehidrogenaz enzimi
CRP: C reaktif protein
IL: İnterlökin
FISH: Floresans in sitü hibridizasyon
PCLI: Plazma hücresi etiketleme indeksi
MGUS: Sebebi bilinmeyen monoklonal gammopati
SMM: İntramedüller/ asemptomatik miyelom
PET: Pozitron emisyon tomografisi
GC: Germinal merkez
IgH: İmmünglobülin ağır zincir lokusu
Maf: “Musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog”
MMSET: Multipl miyelom SET yapısı
FGFR3: Fibroblast büyüme faktörü reseptörü 3
Rb: Retinoblastom
Myc: “Myelocytomatosis viral oncogene homolog”
CD: “Cluster of differentiation”
MAPK: Mitojen aracılı protein kinaz
BMSC: Kemik iliği stroma hücreleri

ERK: “Extracellular signal regulated kinase”

JAK2: Janus kinaz 2

STAT3: “Signal transducer and activator of transcription 3”

NFκB: Nükleer faktör kapa B

IGF1: İnsülin benzeri büyüme faktörü

VEGF: Vasküler endotelyal büyüme faktörü

IAP: Apoptoz inhibitörü proteinleri

MCL1: Miyeloid hücre lösemi sekansı 1

ICAM: İnterselüler adhezyon molekülü

VCAM: Vasküler hücre adhezyon molekülü

bFGF: Basic fibroblast büyüme faktörü

HGF: Hepatosit büyüme faktörü

MIP1α: Makrofaj inflamatuvar protein 1α

RANKL: NFκB reseptörü aktivator ligandı

OPG: Osteoprotegerin

DKK1: Dickkopf1

MP: Melfalan prednizolon kombinasyonu

VAD: Vinkristin, adriamisin, deksametazon kombinasyonu

CR: Tam remisyon

PR: Parsiyel remisyon

SD: Stabil hastalık

TNFα: Tumor necrosis factor α

DVT: Derin toplardamar trombozu

Th3: Yardımcı T hücre 3

Tr1: Tip 1 düzenleyici hücre

Foxp3: Forkhead box 3

CTLA4: Cytotoxic T lymphocyte antigen 4

TGF β : Transforming growth factor β
iT_{reg}: İndüklenmiş T_{reg} hücre
Ts: T süpresör hücre
IFN: İnterferon
TCR: T hücre reseptörü
DC: Dendritik hücre
IDO: Indoleamin- 2,3- deoksigenaz
MHC: Major histocompatibility complex
ILT: İmmünglobülin benzeri transkript
GITR: “Glicocorticoid induced tumor necrosis factor”
APC: Antijen sunan hücre
NFAT: “Nuclear factor of activated T cells”
GVHD: “Graft versus host disease”
IgSF: İmmünglobülin süper ailesi
CSC: Kanser kök hücresi
CLL: Kronik lenfositik lösemi
ATL: Yetişkin T hücreli lösemi/ lenfoma
MoAb: Monoklonal antikör
ITIM: Tirozin bazlı inhibitör motifi
NK: Doğal öldürücü hücreler
FITC: “Fluorescein isothiocyanate”
PE: “Phycoerythrin”
PBS: Fosfat tamponu tuz solusyonu
PFA: Paraformaldehit

TEŞEKKÜR

2010 yılında Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Temel Onkoloji yüksek lisansından mezun olduktan sonra uzun emek, özveri ve sabır isteyen doktora eğitimime başladım. Sıkı bir çalışma temposu, ekip çalışması ve bir aile gibi her işe birlikte sarılarak tam dört yılı geride bıraktım. Bu süreç boyunca bana diğer projelerin yanında tez çalışmamın planlanması, yürütülmesi ve değerlendirilmesi aşamalarında öncelikle hem ailem gibi hem de hocam olarak ilgi, destek ve bilimsel katkılarını esirgemeyen sevgili ve çok saygıdeğer danışmanım Prof. Dr. Safiye Aktaş 'a, tez konumu seçmemde, benimsememde ve bu doğrultuda kendimi geliştirmem hususunda her anlamda destek veren sayın hocam Prof. Dr. Mehmet Ali Özcan 'a, iş etiği, akademisyen ruhu ve ekip olmanın önemini her zaman sevgiyle aşıl原因an çok saygıdeğer hocam Prof. Dr. Nur Olgun 'a, poliklinikte yoğun çalışma tempolarına rağmen materyal ve bilgi temininde her zaman bana destek olan sevgili Uzm. Dr. Ömür Gökmen Sevindik, Uzm. Dr. Şerife Medeni Solmaz ve Uzm. Dr. Abdullah Katğı 'ya, deneyler sırasında yoğun rutin çalışmaları arasında bana her zaman vaktini ayırıp yardımcı olan Uzm. Faize Yüksel 'e, ayrıca tezimle ilgili tüm çalışmalarım boyunca her zaman ilgi ve desteklerini esirgemeyen sayın hocam Prof. Dr. Bülent Ündar 'a, sevgili ekip arkadaşlarıma, Dokuz Eylül Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü ve Hematoloji Ana Bilim Dalı çalışanlarına, doktora eğitimim boyunca burs desteği olan TÜBİTAK kurumuna ve tüm bu süreçte kimi zaman stresimi kimi zaman tatlı telaşlarımı hoş görü ile karşılayıp bana sabırla ama en çok da sevgiyle destek veren değerli aileme çok teşekkür ederim.

Ayşe Pınar Erçetin

İzmir, Eylül 2014

2. ÖZET

MULTİPL MİYELOMDA T REGULATUAR HÜCRELERİN (TREG) TEDAVİYE ETKİNLİĞİNE ETKİSİNİN EX VIVO ARAŞTIRILMASI

Msc. Ayşe Pınar Erçetin

Yazışma Adresi: Dokuz Eylül Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü, Temel Onkoloji
Anabilim Dalı, İZMİR

Multipl miyelom (MM) plazma hücrelerinin ve öncülerinin malign proliferasyonu ile karakterize olan hematolojik bir kanser türüdür. MM hücreleri konak T hücreleri tarafından tanınabilecek antijenler eksprese etmesine rağmen immün sistem tarafından nadiren yok edilebilmekte olup bu durum tümör mikroçevresi tarafından gerçekleştirilen immünsüpresyon ile ilişkilendirilmektedir. Otoimmün kontrolde, T-hücre homeostazinde, tüm immün yanıtının immünmodulasyonunda önemli rolü olan immünsüpresif CD4+CD25+Foxp3+ fenotipindeki düzenleyici T hücrelerin (Treg) MM hastalarının periferik kanında yüksek düzeylerde olduğu ilgili literatürde tespit edilmiştir. Bu bilgiler ışığında bu projenin amacı, CD4+CD25+Foxp3+ Treg hücrelerinin birinci basamak tedavide ve relaps hastalarının tedavisinde hedefe yönelik tedavi seçeneği olarak kullanılan bir proteozom inhibitörü olan bortezomibin malign miyelom hücreleri üzerindeki öldürücü etkinliğine olan etkisinin ex vivo değerlendirilmesidir.

Yeni tanı almış olan 20 MM olgusundan periferik kan ve kemik iliği örnekleri topladıktan sonra CD4+CD25+ Treg hücrelerini periferik kan mononükleer hücrelerinden (PBMC) manyetik yolla izole edilip, saflığı akım sitometrik analiz ile konfirme edilmiştir. Olguların kemik iliği aspirasyon örneklerinden ficoll dansite gradient santrifüjü yoluyla izole edilen kemik iliği mononükleer hücreleri (BMMC) 72 saat boyunca RPMI ortamında 37°C 'de %5 CO₂ 'lik etüvde inkübe edilmiştir. Daha sonra her hasta için ayrı ayrı tespit edilen LD50 dozundaki bortezomib, izole edilen Treg hücreleri ve kombinasyonu ayrı kuyucuklara ilave edilmiştir. 24 saatlik inkübasyon ardından CD138+ miyelom hücrelerinin canlılığı alt gruplarda kontrolleri ile kıyaslayarak ve her gruptaki total hücre sayıları göz önünde

bulundurulup uygun hesaplamalarla her hasta için değerlendirilmiştir. Bulgular SPSS 15.0 programı ile Mann Whitney U non-parametrik testi ve ki-kare testleri ile istatistiksel olarak analiz edilmiştir. Sağ kalım analizleri Kaplan-Meier testi ile gerçekleştirilmiştir. $P < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Bu çalışmada Treg hücreler %90 üzerinde saflıkla izole edilebilmiştir ve MM temsil eden primer kültür yapılabilmiştir. Klinik bortezomibe direnç göstermeyen 2 olguda in vitro bortezomib duyarlılığı düşük çıkmıştır. İn vitro hastadan elde edilen malign miyelom hücrelerine aynı hastanın Treg hücreleri verildiğinde çok geniş bir hücre ölüm yanıt dağılımı saptanmıştır. Treglere in vitro hücre ölümü şeklinde yanıt veren MM olgularımızda bortezomib direnci olmaması ile istatistiksel anlamlı ilişki saptanmıştır ($p=0,024$). Klinikte bortezomib direnci olmayan hastalarda ex vivo Treg ekspansiyonunun malign miyelom hücrelerine bortezomible verildiğinde bortezomibin öldürücü etkisini arttırmasının korele olduğu görülmüştür ($p=0,022$).

MM ex vivo hasta örneklerini içeren bu çalışmaya göre, hastaların periferik kanından elde edilen Treg hücrelerin klinikte bortezomibe yanıt veren olgularda bortezomibin in vitro anti-tumor etkisini arttırdığı ve yanıt vermeyen olgularda azalttığı saptanmıştır. Bu durum bortezomib yanıtında Treglerin etkisi olduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Multipl Miyelom, CD4+CD25+Foxp3+ Treg hücreleri, Bortezomib

3. YABANCI DİLDE ÖZET

EX VIVO EVALUATION OF THE EFFECT OF REGULATORY T CELLS (TREG) ON MULTIPLE MYELOMA THERAPY

Msc. Ayşe Pınar Erçetin

Corresponding Address: Dokuz Eylul University Institute of Oncology,
Department of Basic Oncology, IZMİR

Multiple myeloma (MM) is a hematological cancer which is characterized by malign proliferation of plasma cells and their precursors. Although MM cells express antigens which can be recognized by host T cells they can be rarely eradicated by the immune system because of the immunosuppression by tumor microenvironment. It is determined in the literature that the immunosuppressive regulatory T cells (Treg) with CD4+CD25+Foxp3+ fenotype are increased in peripheral blood of MM patients which have key roles on oto-immune control, T-cell homeostasis, immunmodulation of all the immune response. According to this knowledge, we aimed to evaluate the ex vivo effect of CD4+CD25+Foxp3+ Treg cells on the cytotoxic effect of proteosome inhibitor bortezomib on malign myeloma cells which is being used for the first-line therapy and also for relaps patients as a targeted therapy.

We collected peripheral blood and bone marrow samples from newly diagnosied 20 MM cases and isolated CD4+CD25+Foxp3+ Treg cells from peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and the purity of the isolation was confirmed by flowcytometric analysis. The bone marrow mononuclear cells (BMMC) were isolated from the bone marrow aspiration samples of each patient by ficoll density gradient centrifugation and incubated in RPMI under 37 °C 5% CO₂ conditions for 72 hours. The LD50 dose of bortezomib which is detected for each patient, isolated Treg cells and their combinations were added seperate wells for each patient. After 24 hours of incubation we evaluted the viability of CD138+ myeloma cells in subgroups, compared to their controls in primary bone marrow

cultures of each patient. We performed Mann-Whitney U non-parametric test and chi-square test for statistical analysis of the results by SPSS 15.0. We also performed survival analysis by Kaplan-Meier test. P values <0.05 were considered as statistically significant.

In this study Treg cells were isolated with more than 90% purity and we also could achieve to demonstrate a primary cell culture representing MM. In 2 cases which did not show bortezomib resistance clinically, were significantly sensitive to bortezomib in vitro. When we expanded Treg cells of each patient isolated from their own peripheral blood samples, the malign myeloma cell death responses were found to be in a wide range. In MM cases without in vivo bortezomib resistance responded to Treg cell expansion by in vitro cell death and this relationship was found to be statistically significant ($p=0.024$). In MM cases without in vivo bortezomib resistance, the Treg cell expansion enhanced the anti-tumor effect of bortezomib on malign myeloma cells when applied in combination which was found to be statistically correlated ($p=0.022$).

This study including ex vivo MM patient samples showed that the Treg cells obtained from peripheral blood samples of each patient enhanced the in vitro anti-tumor effect of bortezomib in cases responding bortezomib in vivo and reduced in cases not responding bortezomib in vivo. These results were suggesting that Treg cells might be effective on bortezomib resistance.

Key Words: Multiple Myeloma, CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg cells, Bortezomib

4. GİRİŞ VE AMAÇ

4.1. Giriş

Multipl miyelom (MM), plazma hücrelerinin ve plazma hücresi öncülerinin malign proliferasyonu ile karakterize olan ve tüm yetişkin malignitelerin %1'ini, hematolojik malignitelerin ise %13'ünü oluşturan bir hematolojik kanserdir (1, 2). MM tedaviye tam yanıt veren hastalar da dahil olmak üzere regresyon ve remisyonu takiben residüel miyelom hücrelerinden kaynaklanan birçok relaps gösteren bir paterne sahip olan henüz tam tedavisi olmayan bir hastalıktır. Talidomid, lenalidomid ve bortezomib gibi yeni anti-miyelom ajanları tümör redüksiyonu ve süpresyonuna yol açarak miyelom tedavisini önemli ölçüde etkilemektedir. (6, 19, 24). Kontrolsüz çoğalan klonal plazma hücrelerinin neden olduğu en sık görülen klinik semptomlar; osteolitik kemik lezyonları, anemi, hiperkalsemi, aşırı kemik hassasiyeti, kemik ağrıları ve renal yetmezliktir (4, 10, 18).

MM oluşumunda ilk gerçekleşen adım, bir plazma hücresinin klon oluşturmak üzere ölümsüz hale geldiği durgun bir fazdır. İlgili uç organ hasarı veya herhangi bir semptom meydana gelmez ancak hastalarda zamanla çoğunlukla MM gelişir. Plazma hücreleri kemik iliğinde biriktikçe miyelom transformasyonu başlayarak, ilgili uç organ hasarı ile sonuçlanır. İntramedüller miyelom olarak adlandırılan bu hastalık genellikle kemosenstiftir. Son olarak, miyelomun ilaç ve apoptoz direnci geliştirdiği, büyüme faktörleri ve kemik iliği mikroçevresinden bağımsız hale geldiği ekstramedüller miyelom oluşur (10, 17, 18).

MM' da baskılanmış immunoglobülin ekspresyonları ve fonksiyon göstermeyen T-hücre yanıtları söz konusudur (13). Düzenleyici T hücreleri ($T_{düz}$, T regulatory cells, Treg) immunsupresyon ile oto-immun kontrolde, T-hücre homeostazisinde, transplantlara ve tümör hücrelerine karşı tüm immun yanıtın modülasyonunda önemlidir (5, 22). Bu negatif düzenleyici aktivite farklı gerçekleşerek tümörlere karşı normalde olması gereken immun yanıtı baskılayabilir. Treg hücreleri immunsupresif etkisini hücre-hücre kontağıyla ve sitokinler aracılığıyla [interlökin-10 (IL-10) ve "transforming growth factor- β " (TGF- β)] olmak üzere iki yolla gerçekleştirir. Bu özelliklere göre CD4+ ve CD8+ Treg

hücreler olarak iki ana sınıfta toplanırlar. CD4+ Treg hücreleri CD4+CD25+FOXP3+ fenotipte olup, in vitro CTLA-4 yüzey antijeni üzerinden hücre-hücre kontağıyla ve sitokinlerle immunsupresif etkiye sahiptirler. Bizim çalışmamızda değerlendirdiğimiz CD4+CD25+FOXP3+ Treg hücreleri toplam periferik CD4+ T hücrelerinin %5-10 unu oluşturup son zamanlarda en çok çalışılan Treg hücre tipidir (1, 5, 13).

Tümörlerin konak T hücreleri tarafından tanınabilen antijenler eksprese etmesine karşın immün sistem tarafından ortadan kaldırılmaları nadir olup bu durum tümör mikroçevresi tarafından immün yanıtın baskılanmasından kaynaklanır. Ayrıca miyelom hücrelerinin ekstraselüler matrikse ve kemik iliği stromal hücrelere adhezyon göstermesi sonucunda bu hücrelerin yaşam sürelerinin uzaması ve proliferasyon göstermelerine ek olarak kazandıkları antiapoptotik özellik ile de konvansiyonel kemoterapiye karşı da dayanıklılık geliştirirler (72).

4.2. Amaç

Bu bilgilerden yola çıkarak bu çalışmada multipl miyelom hastalarının periferik kan mononükleer hücrelerinden izole edilen CD4+CD25+ Treg hücrelerin aynı hastaların primer kemik iliği kültüründeki CD138+ malign miyelom hücreleri üzerine etkilerinin Bortezomib kombinasyonu ile beraber incelenmesi amaçlanmıştır.

5. GENEL BİLGİLER

5.1. Multipl Miyelom

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

5.1.1. Multipl Miyelom Etiyolojisi:

MM 'un ortaya çıkış sebebi tam olarak bilinmemekle beraber genetik yatkınlık, çevresel ve mesleki faktörlerin etken olabileceği düşünülmektedir (9, 10). MM 'lu akrabası olan bireylerde görülme riski dört kat artarken çoğu hastanın aile öyküsünde MM hastası olmadığı gözlenmiştir. Diğer plazma hücresi diskrazilerine sahip hastalarda MM gelişme riski oldukça yüksektir. İyonize radyasyon maruziyeti MM için en geçerli risk faktörü olarak görülür. Atom bombası ile yüksek doz radyasyona maruz kalanlarda uzun zaman sonra MM ortaya çıkmıştır. MM tanısı koyulana dek on - on beş yıl kadar radyasyona maruz kalanlarda daha yüksek

mortalite hızı saptanmıştır (2). Ayrıca egzoz dumanına, tarım ilaçlarına (özellikle pestisitlere) ve ağır metal kullanımına maruz kalan çalışanlarda da MM riskinin arttığı saptanmıştır. Metabolitleri kemik iliği toksinleri olarak bilinen benzen MM 'ın en olası etiyolojik ajanıdır. Propoksifen, fenitoin, fenobarbital, diazepam, propanolol, ibuprofen, diyet ilaçları, uyarıcılar ve müshil gibi ilaçların MM gelişimine katkıda bulunduğu belirlenmiştir. Alkol ve sigara kullanımının MM ile güçlü bir ilişkisi henüz bulunmamıştır (5).

5.1.2. Multipl Miyelomda İmmünglobülinler:

İmmünglobülinler (Ig), antikor aktivitesi gösteren ve kendilerinin oluşmasına neden olan antijenlerle özgül olarak bağlanabilen, immün reaksiyonlara yol açabilen total plazma proteinlerinin %20 'sini oluşturan glikoprotein yapıda moleküllerdir. Normal koşullarda vücuda bakteri gibi yabancı bir madde (antijen) girmesi halinde bağışıklık sisteminde yer alan plazma hücreleri B lenfosit hücreleri tarafından oluşturulur. Plazma hücreleri bu yabancı maddelere karşı spesifik bir yanıt olarak ayrı tipte Ig üretmekle sorumludur. Bu nedenle vücutta çok çeşit Ig bulunur. Ig 'ler ağır zincir olarak adlandırılan iki uzun protein zinciri ve hafif zincir olarak adlandırılan iki kısa protein zincirinden oluşurlar. Beş ana çeşit Ig vardır. Bunlar ağır zincirlerinin tiplerine göre immünglobülin gama (IgG), immünglobülin alfa (IgA), IgM, immünglobülin epsilon (IgE), immünglobülin delta (IgD) olarak adlandırılır (1,11). Normal bir plazma hücresi her biri vücutta farklı işleve sahip olan Ig 'lerden yalnızca birini oluşturur. Ancak normal bir B hücresinin malign bir plazma hücresine dönüşmesi çoklu genetik anomalileri de içeren çok adımlı bir süreçtir. Malign plazma hücreleri tam olarak aydınlatılamayan sebeplerden ötürü bağışıklık sistemi hücrelerinin sinyallerine yanıt verme özelliklerini yitirerek kontrolsüz şekilde proliferasyon gösterir. Prolifere olan malign plazma hücreleri aşırı miktarda monoklonal protein (M proteini) olarak adlandırılan monoklonal immünglobülin veya hafif zincir üretir. M proteini genellikle IgG 'dir (>%60) ancak IgA (%20) veya immünglobülin hafif zinciri olabilir. IgD ile IgE nadirdir ve IgM üreten plazma hücreleri başka bir plazma hücresi neoplazisi olan Waldenström makroglobülinemisinin özelliğidir. Miyelom çeşitleri malign plazma hücresi tarafından immünglobülin ya da hafif zincir tipine göre belirlenir. Buna göre

en sık karşılaşılan miyelom tipleri IgG (>%60) ve IgA (%20) 'dir. IgD ve IgE tiplerine çok nadir rastlanır (10-12).

5.1.3. Multipl Miyelomun Klinik Belirtileri:

Hastalığın başlarında herhangi bir şikayet olmasa da MM geliştikçe birçok belirti ortaya çıkmaya başlar. Özellikle sırt, kaburga ve bazen de kollarda oluşan kemik ağrıları miyelom hücrelerinin kemikte harabiyete sebep olacak kadar fazla biriktiğine işarettir (4). Normalde kemik iliğinde %5 'in altında bulunan plazma hücreleri, MMda $\geq$ %10 gibi bir değerde klonal kemik iliği plazma hücresi olarak ortaya çıkar. Kemik iliğinde aşırı monoklonal plazma hücre birikimi hematopoez işleyişini bozarak anemiye yol açar. Hastada normal hemoglobin miktarına sahip normal boyalı eritrositi ifade eden normokromik veya hemoglobin değeri > 2 g/dL olan normositer (normal eritrosit) veya hemoglobin değeri < 10 g/dL olan anemi durumları gözlenebilir (13). Malign plazma hücreleri tarafından salınan sitokinler (interlökin) nedeniyle kemik yıkımını sağlayan osteoklastların miktarındaki artış sonucunda ciddi osteopeni veya patolojik kırıkların eşlik ettiği osteolitik kemik lezyonları meydana gelir. Manyetik rezonans görüntüleme (MRI) veya bilgisayar tomografisi (CT) ile bu lezyonlar görülebilir. Aşırı monoklonal protein üretimi nedeniyle diğer Ig tiplerinde meydana gelen azalma enfeksiyon duyarlılığını arttırarak hastada on iki ayda 2 'den fazla olmak üzere sık sık enfeksiyonlara yakalanma şikayeti ile kendini gösterir. Ayrıca serum ve/veya idrarda monoklonal protein varlığı serum elektroforez paterninde belirgin bir pik ile gözlenir. En sık karşılaşılan belirtilerden biri de böbrek yetmezliğidir. Bunun miyelom böbrek yapısı ve hiperkalsemi olmak üzere iki önemli nedeni vardır. İmmünglobülinler yapı olarak bir bütün halindeyken böbreklerdeki glomerüler filtreden geçemeyecek kadar büyüktürler ancak IgG ve IgA miyelomlarının üçte ikisinde idrara geçebilecek kadar küçük monoklonal serbest hafif zincirler de üretilir. Bunlara Bence- Jones proteinleri denir. Bu proteinler renal tübüllerden geçerken çökerler ve etrafını çok çekirdekli dev hücreler sararak miyelom böbrek yapısına dönüşür. Böylece renal tübüllerde genleşme ve atrofi meydana gelerek tüm nefron fonksiyon gösteremez hale gelir (11, 13). Kemik yıkımındaki artışın yol açtığı $\geq 11,5$ mg/dL değerindeki yüksek serum kalsiyum düzeyi (hiperkalsemi) olması ciddi böbrek hasarına yol

açar. Bunlardan başka özellikle burun ve dişetlerinde kanamaya eğilim artar çünkü M proteini trombosit fonksiyonlarını ve koagülasyon faktörlerini etkileyebilir ve ilerlemiş hastalıkta trombositopeni meydana gelir. Buna ek olarak çoğu kez kanamayla ilişkilendirilen hiperviskozite ile özellikle IgM miyelom vakalarında karşılaşılır. MM hastalarının %10 'undan daha azında görülen bu durum serum viskozitesi ölçülerek anlaşılabilir. Tüm bu belirtilerden başka hasta vücutta kolayca meydana gelen çürükler, halsizlik, zihin bulanıklığı, ciltte genel bir hissizlik, tat alma duyu kaybı gibi yakınmalarla doktora başvurabilir (4, 11, 13).

5.1.4. Multipl Miyelomun Evreleri:

MM için iki çeşit evreleme sistemi mevcuttur. 1975 'ten beri ilk olarak kullanılan "Durie-Salmon Evreleme Sistemi" dir. 2005 yılında "Uluslararası Evreleme Sistemi (ISS)" geliştirilmiştir (14,15). Durie-Salmon evreleme sistemi ISS 'e göre hastalığın tümör yükü ve biyolojik evresiyle daha fazla uyum gösterir. Ancak karmaşık oluşu ve kemik bulgularına öznel yaklaşım gerektirmesi dezavantajlarıdır. Durie-Salmon evreleme sistemine göre evre 1 olan hasta şu özelliklerin tümünü taşımalıdır: 0 ya da 1 kemik lezyonu, hemoglobin değeri > 10g/dL, normal kalsiyum ve düşük M protein üretimi. Düşük M protein üretimi IgG < 5 g/dL, IgA < 3 g/dL, idrarda M piki >4000 mg/24 saat olan değerleri ifade eder. Evre 2, evre 1 ya da evre 3 'deki değerlere uymayan hasta grubunu ifade eder. Evre 3 olan hasta şu özelliklerden bir ya da daha fazlasını taşımalıdır: ilerlemiş kemik lezyonları, hemoglobin değeri > 8.5 g/dL, artmış kalsiyum ya da yüksek M protein üretimi. Yüksek M protein üretimi IgG > 7 g/dL, IgA > 5 g/dL, idrar M piki > 12000 mg/24 saat olan değerleri ifade eder. Alt sınıflaması ise şu şekildedir: A alt sınıfı hastaların serum kreatinin değeri < 20 mg/dL, B alt sınıfı hastaların serum kreatinin değeri < 2.0 mg/dL olmalıdır (14). ISS 'e göre evre 1 olan hastanın serum beta-2-mikroglobülin (β 2M) düzeyi < 3.5 mg/L ve serum albümin düzeyi $\geq$ 3.5 g/dL olmalıdır. Evre 2, evre 1 ya da evre 3 'deki değerlere uymayan hasta grubunu ifade eder. Evre 3 olan hastanın serum β 2M düzeyi $\geq$ 5.5 mg/L olmalıdır (15) Durie- Salmon ve ISS evreleme sistemi kriterleri Tablo 1 'de görülmektedir.

Tablo 1. Multipl Miyelomda Evreleme Sistemleri

Evre	Durie-Salmon Evrelendirme Sistemi	Uluslararası Evrelendirme Sistemi
I	Aşağıdakilerin tümü: - Hemoglobin değeri >10.5 g/dL - Serum kalsiyum değeri normal veya ≤ 12 mg/dL - Kemik x-ray, normal kemik yapısı (skala 0) - Düşük M-bileşeni üretim hızı- IgG değeri <5 g/dL; IgA değeri <3 g/dL - Bence Jones protein <4 g/24 saat	Beta-2- mikroglobülin <3.5 mg/L ve albumin ≥ 3.5 g/dL
II	Ne evre I ne de evre II - A= Renal yetmezlik yok (kreatinin ≤ 2 mg/dL) - B= Renal yetmezlik (kreatinin >2 mg/dL)	Beta-2- mikroglobülin <3.5 mg/L ve albumin <3.5 g/dL veya beta-2-mikroglobülin 3.5 - 5.5 mg/L
III	- Yüksek M bileşeni üretim hızı - IgG değeri >7 g/dL; IgA değeri >5 g/dL - Bence Jones protein >10g/ 24 saat	

5.1.5. Multipl Miyelomda Prognostik Faktörler:

Hastalığın evresi belirlendikten sonra birkaç bağımsız prognostik faktör ile miyelomun akıbeti öngörülebilir. Ana prognostik faktörler hastanın performans durumu, ISS ve Durie- Salmon evrelemeleri, 13. kromozom delesyonları veya hipodiploidi varlığı, t (4;14) veya t (14;16) translokasyonları,

kromozom 17p delesyonu, DNA indeksi, laktat dehidrogenaz enzimi (LDH) düzeyi, plazmablastik morfoloji, kemik iliğindeki plazma hücresi etiketleme indeksi (PCLI) olarak sıralanabilir. Bunlara ek prognostik faktörler ise yaş, C reaktif protein (CRP) ve serum kreatinin düzeyleri, platelet sayısı ve plazma hücre yüzeyinde bulunup serumda değerleri ölçülebilen CD138 antijeni (*syndecan-1*) 'dir (3, 7, 10). Bu prognostik faktörler üç kategoriye ayrılmaktadır. Birinci grupta yaş, performans durumu, renal fonksiyon gibi hastanın kemoterapiyi tolere edebilirliğini yansıtan konakçıya ait faktörler yer alır. Konakçıya ait parametrelerden en iyi aydınlatılan yaştır. Altmış ile yetmiş beş yaş aralığının altındaki hastalar daha uzun sağkalım gösterir. Kırk yaş altındaki hastalar ise normal renal fonksiyon ve düşük β 2M düzeyi ile ortalama 8 yılın üzerinde sağkalım gösterir. Seksen yaş üstü gibi çok ileri yaş ise kötü prognozla ilişkilendirilir. İkinci grupta sitogenetik, moleküler profil, tümör hücresinin proliferatif aktivitesi gibi malign klonun iç faktörler bulunur. Üçüncü grupta ise β 2M, albümin, CRP gibi tümör yükü ve hastalığa ait komplikasyonları yansıtan biyokimyasal belirteçler yer alır. Normalde böbrekler tarafından salınan β 2M 'nin serumdaki düzeyi özellikle tümör yükü, renal fonksiyon ve ISS için miyelomdaki en önemli prognostik belirteçlerden birisidir (3, 12, 13). CRP 'nin serum konsantrasyonu interlekin-6 'nın (IL-6) bir belirteci olup β 2M 'den bağımsız bir prognostik belirteçtir. IL-6 hem proinflamatuvar hem de antiinflamatuvar etkisiyle sistemik inflamatuvar cevabın göstergesi olarak nitelendirilebilen bir sitokindir. Hasta standart tedavi aldığı zaman CRP ve β 2M düzeylerinin kombinasyonuna göre prognostik açıdan üç sınıfta değerlendirilebilir. Serum CRP ve β 2M düzeyi < 6.0 mg/L olanlar düşük riskli grup, serum CRP ve β 2M düzeyi $\geq$ 6.0 mg/L olanlar yüksek riskli grup, ikisinin arasındaki serum CRP ve β 2M düzeyine sahip olanlar orta riskli gruptur. Buna göre düşük riskli grup ortalama 54 ay, orta riskli grup ortalama 27 ay ve yüksek riskli grup ise ortalama 6 ay sağkalım gösterirler (10, 12, 13). Konvansiyonel sitogenetik analizlerine göre kromozom 13 delesyonu (monozomi) ve/veya hipodiploidi, flüoresans in sitü hibridizasyon (FISH) analizlerine göre t (4;14), t (14;16) veya 17p delesyonu, PCLI çalışmalarına göre PCLI $\geq$ %3, serum CD138 değeri $\geq$ 1170 U/ml parametrelerine sahip hastalar yüksek risk grubu hastalardır. Yaklaşık olarak 20–24 aylık sağkalım gösterir (16).

Tablo 2 'de MM'nin farklı fazlarında ortaya çıkan onkogenler ve fenotipik değişiklikler özetlenmektedir.

Tablo 2. MM 'de hastalık seyrinin üç dönemi

Değişken	Başlangıç fazı	Meduller relaps	Ekstramedullar relaps
Miyelom hücre birikimi veya proliferasyon yeri	Kemik iliği	Kemik iliği	Kan, pleural effüzyon, cilt ve diğer
Genetik veya onkogenik olaylar	c-myc deregülasyonu	N-ras ve K-ras nokta mutasyonları	P53 nokta mutasyonu
Fenotipik değişiklikler	CD19 kaybı, CD56 aşırı ekspresyonu	CD28 ekspresyonu, LFA-1 ve VLA-5 kaybı	CD28 ekspresyonu ve CD56 kaybı
Dolaşan malign plazma hücreleri	<%1	Artmış	Artmış
Kİ 'de proliferen olan atipik hücre oranı (büyüme fraksiyonu)	<%1	> veya =1 (%1-95)	> veya =1 (%1-95)

(Ratip S, Çetiner M. Multiple Myeloma Patogenezinde Yeni Gelişmeler. İç hastalıkları dergisi)

5.1.6. Multipl Miyelomun Gelişim Basamakları:

MM gelişimi, benign bir halden oldukça malign bir duruma geçişi kapsayan çok adımlı bir transformasyon süreci olup her hastada bu süreç fark edilemeyebilir. İlk gerçekleşen adım, bir plazma hücresinin klon oluşturmak üzere ölümsüz hale geldiği durgun bir fazdır. Bu aşamada hiperkalsemi, anemi, kemik lezyonları gibi herhangi bir ilgili uç organ hasarı veya belirti meydana gelmez. Miyelom hücrelerinin gelişim ve ölüm hızları yaklaşık olarak aynıdır (17, 18). Sebebi bilinmeyen monoklonal gammopati (MGUS) zamanla MM 'a ilerleyebilecek bir pre-malign durumdur. ABD'de elli yaş ve üstü bireylerin yaklaşık %3.2 'sinde, yetmiş yaş ve üstü bireylerin yaklaşık %5.3 'ünde görülerek MM 'a göre yaklaşık

yüz kat daha sık karşılaşılır. Ancak MGUS olan bir bireyin bir yıl içinde MM 'a ilerleme ihtimali %1 olduğundan tüm MGUS hastalarının yaklaşık dörtte üçü 20 yıldan fazla değişim göstermeden yaşamını sürdürebilir. MM 'da karşılaşılan sitogenetik anomalilerin (translokasyonların ve delesyonların) benzer şekilde MGUS 'da da görülür. Ancak bu kromozom anomalileriyle uyumlu belirgin klinik veya biyolojik yansımalar yoktur. MGUS vakalarında serum M proteini <3 g/dL, klonal kemik iliği plazma hücreleri <%10 olarak saptanır (12, 13, 16). İkinci aşamada plazma hücrelerinin kemik iliğinde birikmesiyle miyelom hücre transformasyonu gerçekleşir. Dolayısıyla bu aşamada belirgin bir şekilde monoklonal protein artışı ve ilgili uç organ hasarı gözlenmeye başlar. Serum M proteini (IgG veya IgA) ≥ 3 g/dL ve/veya klonal kemik iliği plazma hücreleri $\geq$ %10 olarak saptanır. İntramedüller veya asemptomatik miyelom (SMM) olarak adlandırılan bu hastalık genellikle kemosenstiftir (16). Hastalık sağkalımı ve gelişimi için tamamen kemik iliği destek dokusuna bağlıdır. Saldırgan bir şekilde gerçekleşen son aşamada, miyelom hücreleri kemik iliği destek dokusundan bağımsız hale gelir. PCLI 'nin %1 'in üzerine çıkması ve LDH düzeyindeki artış ile kendini belli eden bir proliferasyon artışı söz konusudur. Kemik iliği morfolojisi plazmablast görüntüleriyle oldukça saldırgan gözükür. Konvansiyonel sitogenetik ile ekstramedüller veya semptomatik miyelom bulgularını göstermeye başlayan hastaların kromozom anomalileri saptanabilir. Pozitron emisyon tomografisi (PET) bu tip ekstramedüller hastalık varlığını ortaya koymakta sıklıkla başvurulmuş bir yöntemdir. Bu aşamada miyelomun kemoterapi ve apoptoz direnci geliştirdiği görülür. Alkilleyici ve hücre döngüsüne spesifik ajanların kombinasyonları ile kemoterapi uygulayarak geçici bir süre için hastalık kontrol altına alınsa da bu yanıtlar kısa sürelidir. Yüksek doz kemoterapi ve transplantasyonlara rağmen sağkalım oldukça kısadır (17, 18).

Bir antijen nedeniyle oluşan üretici sinyaller ile B lenfosit hücrelerinden iki tip plazma hücresi oluşturulur. Pre-germinal merkez (GC) B hücrelerinden farklılaşan plazma hücreleri immünglobülin M (IgM) salgılayabilir ya da immünglobülin ağır zincir lokusu (IgH) rekombinasyonlarına uğrayarak farklı bir Ig izotipi salgılayabilirler. Somatik olarak hipermutant Ig genlere sahip değildirler. Bu

plazma hücreleri genellikle yaklaşık 3 günlük kısa bir yaşam süresine sahiptirler. Bunun aksine, post-germinal merkez (post-GC) B hücreleri plazma hücresine farklılaşmadan önce tekrarlanan somatik hipermutasyonlara, antijen seçimlerine ve IgH rekombinasyonlarına uğrayarak plazmablast üretirler. Plazmablastlar MM 'da olduğu gibi kemik iliği mikroçevresine yerleşerek uzun ömürlü plazma hücrelerine dönüşebilirler (1, 5, 13). MMun her aşaması için tanı kriterleri Tablo 3 'de belirtilmektedir.

Tablo 3. Miyelomda Tanı Kriterleri

• Multipl Miyelom Tanı Kriterleri (üçü de bulunmalıdır)
1. Kemik iliğinde $\geq\%10$ plazma hücresi (monoklonal) ve/veya plazmasitoma 2. Monoklonal protein (serum ve/ veya idrarda)* 3. Miyelom ilişkili organ disfonksiyonu (en az biri olmalıdır) ** • [K]alsiyum yüksekliği (serum Ca >10.5 mg/l ya da normalin üst sınırında) • [R]enal yetmezlik (serum kreatinin >2mg/dl) • [A]nemi (Hb<10 gr ya da normalin 2 gr altında) • [K]emik lezyonları (litik) ya da osteoporozis (***) * Monoklonal protein saptanmazsa (nonsekretuar miyelom) kemik iliğinde $\geq\%30$ plazma hücresi (monoklonal) ve/veya plazmasitom (biyopsi ile kanıtlanmış) olmalıdır. ** İngilizce akronim CRAB (calsiyum,renal,anemia,bone). Bunların dışında olup miyelom ile ilişkili olduğuna kuşku olmayan diğer organ disfonksiyonları da bu kapsamda değerlendirilir. ***Soliter plazmasitoma ya da osteoporozis (kırık olmaksızın) dışında bulgu yoksa kemik iliği plazma hücre oranı $\geq\%30$ olmalıdır.
• MGUS tanı kriterleri (üçü de bulunmalıdır)
1. Serum ve/veya idrarda düşük düzeyde monoklonal protein (*) 2. Kemik iliğinde monoklonal plazma hücre miktarı $<\%10$ 3. Serum kalsiyum, kreatinin ve hemoglobin düzeyleri normal, kemik lezyonu yok (direkt grafi ve/ veya diğer görüntüleme teknikleri ile) Amiloidoz veya hafif zincir birikim hastalığına asit klinik ve laboratuvar bulgular yok * Serum IgG<3 g/dl, IgA<2g/dl, idrar monoklonal kappa veya lambda <1 g/24 h
• 'Smoldering' veya 'Indolent' Miyelom Tanı Kriterleri (üçü de bulunmalıdır) (*)
1. Serum ve/veya idrarda monoklonal protein

2. Kemik iliğinde ve/veya doku biyopsi örneğinde monoklonal plazma hücreleri
3. MGUS, miyelom ya da soliter plazmasitoma kriterlerine uymama

* Bu kriterler Durie-Salmon Evre IA miyelomu tanımlamaktadır.

• **Soliter Kemik Plazmasitoma Tanı Kriterleri (üçü de bulunmalıdır)**

1. Biyopsi ile kanıtlanmış monoklonal kemik plazmasitoma tek bir kemikte (diğer alanlar için yapılan direkt grafi, ve eğer yapıldıysa manyetik rezonans (MRI) ve/veya pozitron emisyon tomografi (PET) negatif)
IgG < 3.5 g/dl
IgG < 2 g/dl
İdrar monoklonal hafif zincir < 1 g/24 h
2. Kemik iliği monoklonal plazma hücre oranı < %10
3. Miyelom ile ilişkili organ disfonksiyonu yok

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

5.1.7. Multipl Miyelomun Genetik Özellikleri:

Sitogenetik anormallikler de MM gelişiminde önemli rol oynamaktadır. Hastalıkta sitogenetik çalışmalar belirgin zorluk göstermekle beraber kromozomal bozukluklar olguların %30-50'sında gösterilebilmektedir. Bu sıklık erken devre MM olgularında az olmakla beraber hastalığın ileri devrelerinde artmakta ve evre III olguların %80-90'ında bu genetik bozuklukları göstermek mümkün olabilmektedir. MM'de gösterilmiş tipik tek bir kromozomal anormallik yoktur. Olguların büyük bölümünde birden çok sayıda anormallik saptanabilmektedir. Kısacası, MM 'lu hastalarda en önemli prognostik parametreler arasında sitogenetik anomaliler sayılmasına rağmen olguların %50–70 'inde normal karyotipler gözlenmektedir. Sayısal ve/veya yapısal kromozom anomalileri sitogenetik analizler ile olguların ancak %20–50 'sinde gösterilebilmektedir (19). MM 'da kromozom aberasyonlarının sıklıkları hastalık patogenezinde önemli bir etkindir. Yapılan çalışmalar genetik faktörlerin belirlenmesinin, hastalığın tanısı, etiopatolojisinin belirlenmesi, prognoz ve tedavi protokollerinin düzenlenmesinde çok önemli olduğunu göstermiştir. En önemli kromozom anomalileri, hipo ve hiperdiploid

karyotipler, kromozom 1 anomalileri, kromozom 13 anomalileri ve kromozom 14q32 'deki IgH yeniden düzenlenmeleridir. 13q delesyonu ve hipodiploidi en önemli kısa sağkalım belirteçleridir (20-22). MM olgularında kemik iliğinden yeterli sayı ve kalitede kromozom elde etmek her zaman mümkün olmadığından anomaliye spesifik FISH analizi tanı yöntemi olarak kullanılmaktadır. Kromozom 14 'deki IgH lokusunu (14q32) içeren translokasyonlar MM ve MGUS 'un her ikisinde de ortak görülür. Bu nedenle erken patojenik olaylar olarak yorumlanmaktadır. Bu translokasyonlar IgH ekspresyonunu arttırıcı genler ile bir proto-onkogeni birleştirerek oluşan yeni yapıya normalde var olmayan bir özellik kazandırır. Bu özellik aslında büyüme ve yaşam sinyal yollarını aktifleyici ve apoptotik sinyalleri bozucu sonuçlara yol açan genetik bir lezyon olmasıdır (1, 17, 20, 21, 22). MM tümörlerinin yaklaşık %40 'ında bulunan IgH translokasyonlarında sıklıkla etkilenen yedi tane kromozomal partner ve onkogen bulunur. Bunlar, siklin D ilişkili olarak görülme oranlarıyla 11q13 (siklin D1) %15, 12p13 (siklin D2) < %1, 6p21 (siklin D3) %2 şeklindedir. *Musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog* (Maf) ilişkili olarak görülme oranlarıyla 16q23 (c-maf) %5, 21q12 (mafb) %2 ve 8q24.3 (mafa) <%1 şeklindedir. Son olarak da MM SET yapısı (MMSET)/ Fibroblast büyüme faktörü reseptörü 3, (FGFR3) ilişkili olarak görülme oranıyla 4p16 (MMSET ve genellikle FGFR3) %15 şeklindedir. Tümü birlikte değerlendirildiğinde IgH translokasyonlarının prevalansı medüller MM vakalarının %50 'sinden fazladır. MM tümörlerinin yaklaşık %50 'sinde ve MGUS vakalarının %40–50 'sinde 13 . kromozom kaybı (13q14, Δ 13) vardır. Çoğu vakada Δ 13 tüm kromozomun monozomisini ifade eder. Retinoblastom (Rb) geni kromozom 13 üzerinde yer aldığı için monozomi 13 durumuyla paralel olarak Rb delesyonları da kötü prognozu ifade eder. 13q delesyonu dışında 11q kazanımının da kötü prognoz ilişkili olduğu bulunmuştur (5, 15, 16, 19, 20, 21, 22). Miyelom oluşumunda diğer sık gerçekleşen genetik olaylar N- ve K- ras onkogenlerinin mutasyonlarıdır. K-ras mutasyonlu hastalar mutasyonu taşımayanlara göre daha kısa sağkalım (2– 3,7 yıl) gösterirler. Ras mutasyonları MM hastalarının %35–50 'sinde görülürken MGUS vakalarında nadirdir. Bu durum bu mutasyonların sekonder bir genetik olay olduğunu ya da MGUS 'dan MM 'a geçişte etken olabileceğini düşündürmektedir (16, 17). Bunun aksine, onkogenik yolların

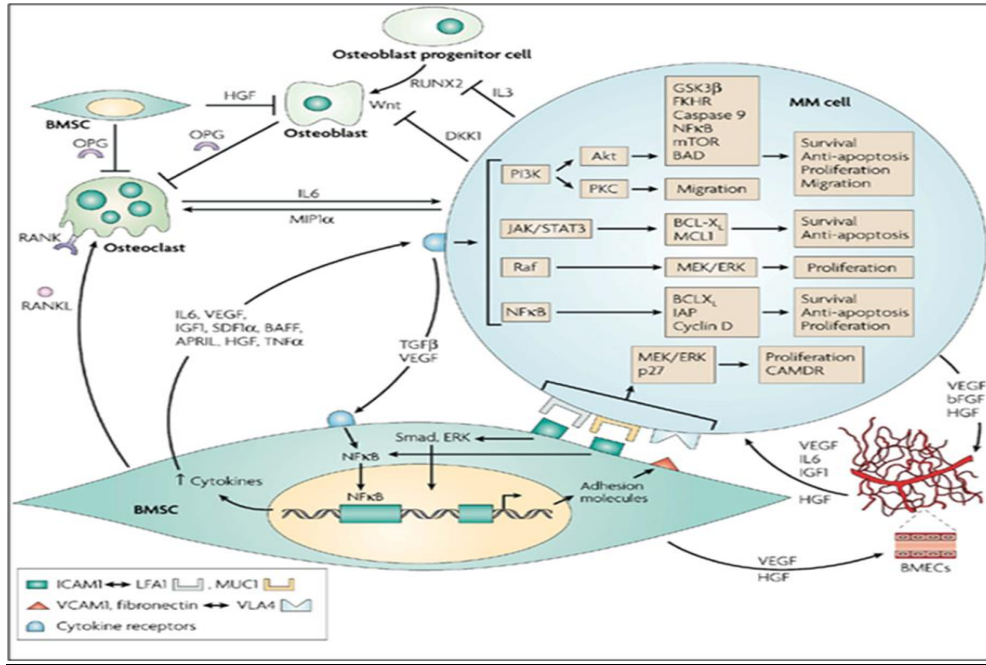
aktivasyonu ve p53 gibi tümör baskılayıcı genlerin mutasyonu MM 'da nadir görülür. Bu olaylar çoğunlukla ilerlemiş hastalık ya da ekstramedüller bir belirtiyile ilişkilendirilir (18). *Myelocytomatosis viral oncogene homolog* (Myc) genini kapsayan translokasyonlar MGUS 'ta çok nadir iken MM tümörlerinin %15 'inde görülür. Bu yeniden düzenlemelerin çoğu c-myc iken primer tümörlerin %2 'si n-myc eksprese ettiğinden bazı vakalarında n-myc translokasyonları da görülür. Biallelik c-myc ekspresyonunun interlökin 6 (IL-6) ve diğer sitokinler tarafından tümörjenezin erken safhalarında uyarılmasına rağmen myc translokasyonları MM tümörlerinin daha az destek doku bağımlı ve daha proliferatif halde olduğu hastalığın ilerlediği bir süreçte ortaya çıkar (17, 21). MM 'daki ortak genetik değişikliklerin asıl sonuçları hücre döngüsü regülasyonun bozulması ve apoptoz direnci kazanımıdır. Örneğin, t(4;14) translokasyonu FGFR3 'ün aşırı ekspresyonuna dolayısıyla Ras/ mitojen aracılı protein kinaz (Ras/ MAPK) yolağının uyarılmasına yol açar. Ras/ MAPK yolağının aktivasyonu hücre döngüsünün ilerlemesine ve hücresel yaşamın devamına neden olur. t (11;14) translokasyonu siklin D1 'in aşırı ekspresyonuna bu da miyelom hücreleri düşük bir proliferasyon indeksine sahip olmasına rağmen regülasyonu bozulmuş bir hücre döngüsünün ilerlemesine sebep olur. Sonuç olarak düşük sağkalım ile ilişkilendirilmiş genetik anomalileri özetleyecek olursak bunlar, t (4;14), t(14;16), 17p13 ve13q14 delesyonu, 1q21 kazanımı durumlarıdır. DNA indeksi >1 olan vakalarda DNA indeksi ≤1 olanlara göre belirgin şekilde daha uzun sağkalım görülür (16, 17, 19, 20).

Spesifik biyolojik özellikler, kromozomal aberasyonlar ve klinik bulgularla uyum gösteren farklı gen ekspresyon profillerine göre MM hastaları MM1, MM2, MM3 ve MM4 olmak üzere dört moleküler alt tiptedir. Bu sınıflamaya göre MM1 en iyi prognoz gösterirken MM4 en kötüsüdür. Alternatif bir sınıflama ise kromozomal translokasyonlar ile siklin D ekspresyonlarının kombinasyonundan oluşan ve MM hastalarını beş gruba ayıran TC sınıflamasıdır. T translokasyonu C ise siklin D 'yi ifade eder. Bu sınıflamanın prognozla ilişkisi tam aydınlatılamamıştır (1, 13, 23).

5.1.8. Multipl Miyelom ve Mikroçevre İlişkisi:

MM hücrelerinin kemik iliği stroma hücrelerine (BMSC) adhezyonu sonucu sitokin aracılı tümör hücresi gelişimi, sağkalım, ilaç direnci ve migrasyon olaylarını tetikler. MM hücrelerinin BMSC 'lerine bağlanması ile BMSC 'lerden ve tümör hücrelerinden sitokin sekresyonu artmaktadır. Bu sitokinler majör sinyal yollarını aktive ederler. Bu yollar *extracellular signal-regulated kinase* (ERK); Janus kinaz 2 (JAK2)–*signal transducer and activator of transcription* 3 (STAT3); fostatidilinositol 3-kinaz (PI3K)–Akt; ve/ veya nükleer faktör κ B (NF κ B) 'dir. Bu yolların sonunda yer alan hedefler interlökin 6 (IL-6), insülin benzeri büyüme faktörü 1 (IGF1) ve vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) gibi sitokinler, Bcl-X_L gibi antiapoptotik proteinler, apoptoz inhibitörü proteinleri (IAP), miyeloid hücre lösemi sekansı 1 (MCL1) ve hücre-hücre modülatörleridir (siklin D) (5, 18, 24, 25). Malign plazma hücreleri yavaş proliferasyon hızına ve düşük hücre indeksine sahip olmaları nedeni ile uzun yaşam süresine sahiptirler (26). Miyelom hücrelerinin uzun dönem yaşamalarını sağlayan tanımlanmış en önemli faktör IL-6 'dir. IL-6 'nın öncelikle miyeloma kemik iliği başta olmak üzere makrofaj, fibroblast, osteoblast, osteoklast ve monositlerden salındığı gösterilmiştir ve antiapoptotik özelliğe sahiptir. MM olgularının çoğunda miyelom hücrelerinin IL-6 salgıladığı ve yüzeylerinde IL-6 reseptörleri taşımaları nedeniyle otokrin etki gösterdiği belirlenmiştir. NF κ B 'nin adhezyon aracılı aktivasyonu sonucunda interselüler adhezyon molekülü 1 (ICAM1) ve vasküler hücre adhezyon molekülü 1 (VCAM1) gibi adhezyon moleküllerinin ekspresyonları hem miyelom hücrelerinde hem de BMSC 'lerde artar. Böylece miyelom hücrelerinin BMSC 'lere bağlanması da artmaktadır. VEGF, *basic* fibroblast büyüme faktörü (bFGF) ve hepatosit büyüme faktörü (HGF) gibi anjiyogenik faktörlerin MM hücreleri ve BMSC 'lerden salınması ise neo-anjiyogenezi uyarır. VEGF otokrin etki sonucu miyelom hücrelerinin proliferasyonuna neden olmaktadır. Kemik iliği mikroçevresi ile miyelom hücreleri arasında sinerjistik bir etkileşim vardır. Bu etkileşim sonucu stromal hücrelerden salınan IL-6, miyelom hücrelerinden IL-1 β , VEGF ve makrofaj inflamatuvar protein-1 α (MIP1 α) salınımına neden olarak osteoklast aktivasyonu ile sonlanır. BMSC 'ler tarafından üretilen NF κ B reseptör aktivatörü ligandı (RANKL) ve MM hücreleri tarafından üretilen MIP1 α osteoklastogenezi uyarır. Bunun aksine osteoblastlar ve

BMSC 'ler tarafından üretilen osteoprotegerin (OPG) osteoklastogenezi inhibe eder. Osteoblastogenez ise MM hücreleri tarafından salınan IL3 ve *Dickkopf1* (DKK1) ile BMSC 'lerden salınan HGF ile inhibe edilir. Osteoklastogenez uyarılması ve osteoblastogenezin inhibe edilmesi sonucu osteolizis gelişir. Miyelom hücrelerinin ekstraselüler matrikse ve BMSC 'lere adhezyon göstermesi sonucunda bu hücrelerin yaşam sürelerinin uzaması ve proliferasyon göstermelerine ek olarak kazandıkları antiapoptotik özellik ile de konvansiyonel kemoterapiye karşı da dayanıklılık geliştirdiği belirlenmiştir (1, 5, 8, 18, 24, 25). Kemik iliği mikroçevresinin MM patogenezindeki rolü Şekil 1 'de gösterilmektedir.



Şekil 1. Kemik İliği Mikroçevresinin Multipl Miyelom Patogenezindeki Rolü

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

5.1.9. Multipl Miyelom Tedavisi:

MM tedavisi hastaya göre planlanmalıdır. Evre 1 olan asemptomatik hastaların kemoterapi almadan düzenli bir şekilde takip edilmeleri önerilir. Evre 2 ve 3 olan MM hastalarında ise sıklıkla kemoterapi uygulanır. MM tedavisi uzun

zamandır alkilatörler, antrasiklinler ve kortikosteroidler ile yapılmaktaydı. Ancak kemoterapi seçeneklerinden melfalan ve prednizolon kombinasyonu (MP) son kırk yılın altın standartlarından biri haline gelmiştir. Yapılan çalışmalarda melfalana kümülatif maruziyet sonucunda artan ilik toksisitesi ve bozuk kök hücre üretimi özellikle otolog kök hücre nakli adayı yüksek doz kemoterapi alacak hastalar için önemle göz önünde bulundurulması gereken bir durum yaratır. Bu nedenle son yıllarda bu tip yüksek doz kemoterapide melfalan alacak hastalarda sitoredüksiyonda melfalan yerine ilk tedavilerin vinkristin, adriamisin ve deksametazon kombinasyonu (VAD) olarak verilmesi yaygın bir şekilde uygulanmaya başlanmıştır. Bu sayede başarılı bir periferik kök hücre aferezi yapılabilmektedir. MP tedavisi ise yüksek doz kemoterapi almayan ve hematopoetik kök hücre nakli olmayan hastalarda primer tedavi şekli olup hastaların %50 'sinde remisyona ulaşılmaktadır. Bu tedavinin yaşam süresini 1 veya 2 yıl kadar uzatabildiği kabul edilmektedir (1, 3, 11, 19). Konvansiyonel terapi gören hastaların yaklaşık % 5'inde tam remisyona (CR) ulaşılmaktadır. Relaps ya da refrakter hastalık durumunda ilk olarak VAD protokolü uygulanmalıdır. En aktif ajanı deksametazon olan bu kombinasyon tedavisinde relaps hastalarda %30-40, primer refrakter hastalarda ise %30 yanıt alınır. Ancak gerek yüksek enfeksiyon oranları gerekse uygulama biçimindeki zorluklar ile VAD tedavisi de olumsuz yönlere sahiptir (19). Yapılan tüm çalışmaların ışığında altmış beş yaş altı hastalarda otolog hematopoetik kök hücre transplantasyonu ile beraber uygulanan yüksek doz tedavi standart kabul edilmektedir. Allojenik hematopoetik kök hücre transplantasyonu yüksek toksik ölüm riski içermekte olmasına karşın genç hastalarda otolog hematopoetik kök hücre transplantasyonuna kıyasla kür temin edebilecek tek tedavi seçeneğidir. Otolog hematopoetik kök hücre transplantasyonu ise küratif değildir ancak hastanın hastanede kalma süresi ve destek tedavi ihtiyacı daha azdır. Bu tedavilere ek olarak belirli kemiklerde tutulum görülen ve bu nedenle şiddetli kemik ağrısı çeken hastalara ise radyoterapi uygulanmaktadır. Bu şekilde var olan kemik lezyonları tedavi edilebilmektedir (3, 5, 11).

MM standart tedavilerinin ilerleyen süreçlerinde özellikle melfalana direnç gelişmektedir. Bu nedenle son zamanlara sıklıkla tercih edilen talidomid, bortezomib, lenalidomid gibi yeni tedavi seçenekleri değerlendirilmektedir (1, 6, 11). Son yıllarda hematolojik malignitelerde kemik iliğinde anjiyogenez artışının saptanması ile birlikte talidomid antianjiyogenik etki mekanizması ile önem kazanmıştır. Talidomid 'in diğer etkileri ise immün modülasyon sağlaması ve *tumor necrosis factor* (TNF- α) inhibisyonudur. Serbest radikaller aracılığıyla DNA hasarını indükleyerek direk sitotoksositeye yol açar. Talidomid altmış beş yaş altı hastalara günlük 50-200 mg, daha yaşlı hastalara ise daha iyi tolere edilebilecek şekilde 50-100 mg olarak verilir. Periferik nöropati, konstipasyon, bitkinlik gibi yan etkilerin yanı sıra deksametazon ile kombine edildiğinde oldukça sık olarak (% 5-21) derin toplardamar trombozuna (DVT) neden olmaktadır. MM için bir diğer yeni tedavi prensibi ise proteozom inhibisyonu yoluyla etki gösteren bortezomibdir. Proteozom hücrenin en önemli lizozomal olmayan proteazı olup hücre döngüsü, posttranskripsiyonel modifikasyonlar ve apoptoz gibi kritik mekanizmalarda rol alan hücresel proteinlerin yıkımından sorumludurlar. Bortezomib hücrelerdeki ubiquitin-proteozom katalitik yolağında 26S proteozom kompleksini direkt olarak bağlayarak inhibe eder. Bunun sonucunda hücresel proteinler bu çok alt birimli yapı tarafından yıkıma uğratılamaz. Bu durum MM tarafından aktive edilen transkripsiyon faktörleri NF κ B inhibitörünün konsantrasyonlarını arttırmaktadır. Böylece proteozom inhibisyonunun anti-tümör etkinliği gerçekleşerek tümör hücresinde büyüme baskılanarak apoptoz meydana gelmektedir. Bortezomib hastalara her 21 günde 1., 4., 8. ve 11. günlerinde 1,3 mg/m² olacak şekilde intravenöz yolla uygulanmaktadır. Görülen yan etkiler ise gastrointestinal, geçici sitopeni, yorgunluk, bitkinlik ve periferik nöropati olarak sıralanabilir. Daha düşük toksisiteye sahip bir talidomid analogu olan lenalidomid ise MM tedavi yaklaşımlarından bir başka örnektir. Etki mekanizmasını immün modülasyon ve antianjiyogenik yolla göstermektedir. Hastalara her yirmi sekiz günde 1. günden 21. güne kadar günde 25 mg oral yolla verilmektedir (1, 3, 6, 10, 11, 19). Tüm bunlara ek destek tedavi olarak bifosfonatlar kullanılmaktadır. MM hastalarında şiddetli ağrıların eşlik ettiği patolojik kemik lezyonları meydana gelmektedir. Bifosfonat kullanımı ile bu lezyonların insidansında azalma gerçekleşerek ağrı palyasyonu ve hiperkalsemi

de kontrol altına alınabilmektedir. Hiperkalsemiyi normalize etmek için uygulanacak bir diğer tedavi ise altmış ile doksan mg arası tek doz pamidronat intravenöz yolla yaklaşık 2-4 saat kadar hastaya uygulanmasıdır. Bunun yanı sıra on beş dakika 4 mg zoledronik asitin intravenöz yolla uygulanması da serum kalsiyum değerlerini yirmi dört ila yetmiş iki saat içinde normalize etmektedir (1, 4, 10). Nonsteroid antiinflamatuvar ajanlar dehidrasyon ve enfeksiyonun da eşlik ettiği böbrek hasarına yol açmaktadır. Demir, folat ve B12 eksikliğinden kaynaklanan anemi durumunda haftada 40000 U eritropoietinin subkutan uygulanması ya da 2 haftada bir 200 µg darbepoietinin subkutan yolla uygulanmasıyla tedavi sağlanabilmektedir. Ancak yüksek riskte DVT oluşumu nedeniyle bu tedaviler talidomid ya da lenalidomid kombinasyonlarında sınırlandırılmalıdır. Enfeksiyon riskine karşılık ise mutlaka pnömokok veya gribe karşı aşılama yapılmalıdır (3, 10). MM tedavisi için sık kullanılan seçenekler Tablo 4 'de, MM tedavisinde kullanılan tedavi kombinasyonları Tablo 5'de, yeni ve hala klinik çalışmaları devam eden tedavi seçenekleri Tablo 6 'da belirtilmektedir. Avrupa grubuna göre kan ve kemik iliği nakli cevap kategorileri Tablo 7'de belirtilmektedir.

Tablo 4. MM 'da Sık Kullanılan Tedavi Seçenekleri

Tedavi kombinasyonu	Avantajlar	Dezavantajlar
VAD - Vinkristin - Adriyamisin - Deksametazon	%70 hastada cevap - Kök hücrelere zarar vermez - Kök hücre nakli için temel oluşturur	- Yarı kalıcı kateter gerektiren i.v. uygulama - Vinkristin sinir hasarı yapabilir
c-VAD - Siklofosfamid - Vinkristin - Adriyamisin - Deksametazon	Aktif hastalık semptomları daha iyi kontrol edilebilir ve ilk remisyon kalitesi daha iyi olabilir	
c-VAMP Siklofosfamid		

• Vinkristin • Adriamisin • Metilprednizolon		
Tek başına Deksametazon	• Oral uygulama • VAD kombinasyonunun sağladığı faydanın önemli bir yüzdesini sağladığı düşünülmektedir.	• Yoğun uygulamada iyi tolere edilmeyebilir
MP • Melfalan • Prednizolon	• Oral uygulama • İyi tolere edilebilir • %50 vakada cevap alınır • Protokolü iyi bilinmektedir	• Kök hasarına yol açar, bu yüzden ardından yüksek dozterapi planlanıyorsa kök hücre toplama şansını azaltır.
Haftalık C • Siklofosfamid	• Oral uygulama • Kök hücre hasarı yapmaz	
ABCM • Adriamisin • BCNU • Siklofosfamid • Melfalan	• Oral ve i.v. kombinasyonu	• Kök hücre hasarı olabilir

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

Tablo 5. MM tedavisinde kullanılan yeni ilaç kombinasyonları

Miyelom Tedavisinde Kullanılan Yeni İlaç Kombinasyonları
• Lenalidomid + Deksametazon • Lenalidomid + Melfalan + Prednizolon • Lenalidomid + Deksametazon + Bortezomib • Lenalidomid + Bortezomib • Talidomid + Deksametazon • Talidomid + Deksametazon + Melfalan + Bortezomib • Talidomid + Melfalan + Prednizolon • Talidomid + Bortezomib • Bortezomib + Lipozomal doksorubisin
* Klinik çalışmalarda bu ilaç kombinasyonlarının bazıları üzerinde çalışmalar yapılmaktadır.

Tablo 6. Yeni/ Klinik Araştırmaları Devam Eden Tedavi Seçenekleri

Klinik Çalışmalarda Üzerinde Çalışılan Bazı Yeni İlaçlar	
Kemoterapi Bendamustin	Histon deasetilaz inhibitörleri Vorinostat
Proteazom inhibitörleri NPI-0052	LBH589
Karfilzomib	Isı şok protein 90 inhibitörü Tanespimycin
İmmunmodulator ilaç Pomalidomid (CC-4047)	Akt inhibitör Perifosine
Monoklonal antikorlar BB-10901	Aurora kinaz inhibitörü AZD1152
TKI258	Telomeraz inhibitörü GRN163L
CNTO328	

(http://kanhastaliklari.net/icerik.php?id=338&alt_id=335)

Tablo 7. Kan ve Kemik İliği Nakli Tedavi Yanıt Kriterleri

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

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

5.2. İmmünregulasyon

İmmün sistemin ana fonksiyonu patojen ve mikroorganizmalardan enfekte olmuş hücreleri yok etmek ve bu sırada da çevre doku hasarını en az düzeyde tutmaktır. Antijen sunan hücre tarafından başlatılan immün yanıt hümmoral ve hüccresel bağışıklık, hücre- mediyatör etkileşimleri ve immün sistemi düzenleyici sinyal iletici fonksiyona sahip bir polipeptit olan lenfokin üretimi ile aktive edilmektedir. Bunun sonucunda sitotoksik efektör T hücreleri oluşarak antijene özgül yanıt oluşturacak antikorlar salınır. İmmün sistemin vücudun kendi antijenlerini tanıyarak zarar vermeden sadece patojen türevli enfekte molekülleri yani yabancı antijenleri yok etmesi oldukça hassas bir denge gerektirmektedir. Oluşan bu dengeli sisteme immün tolerans denir. İmmün toleransın bozulması halinde organizmanın kendi antijenlerine immün yanıt oluşturması durumunda

ortaya çıkan hastalığa otoimmün hastalık denir. Bunun yanı sıra immün yanıtın azalması halinde immün sistem çökebilir veya immün yanıtta dengesizlikler alerjiye sebep olabilir (27, 28). Bu durumların ortaya çıkmasını kontrol ederek immünregulasyonu sağlayacak bazı sistemler mevcuttur. İmmün tolerans klonal delesyon yoluyla gerçekleşen merkezi tolerans ve periferal tolerans mekanizmalarına sahiptir. Merkezi toleransta T hücrelerinin timustaki gelişme sürecinde vücudun kendi antijenlerine karşı reseptör taşıyan hücreler yıkıma uğramaktadır. Böylece daha lenfositlerin olgunlaşma sürecinde negatif seleksiyon gerçekleşerek klonal bir delesyon meydana gelmektedir (29, 30). Periferal toleransta antijen sunan hücrelerin antijen sunumu sırasında ikinci bir sinyal iletmesi bozularak klonal anergi adı verilen durum oluşturulur. Klonal anerjide sıklıkla görev yapan B7 ailesi moleküllerinin etkileşimi önem taşır. Olgunlaşmış bir dendritik hücre veya antijen sunan hücre üzerindeki B7 reseptörü ile aktif haldeki bir T hücrenin üzerindeki CD28 'in ya da *cytotoxic T-lymphocyte antigen 4* (CTLA4) 'ün etkileşimi sonucunda ikincil sinyal iletimi engellenebilmektedir (31-33). Periferal toleransın en önemli parçası olan bir diğer sistem ise düzenleyici T hücreleridir (Treg). Düzenleyici T hücreler immün sistemi baskılayıcı yönde etki ederek otoimmüniteyi ve graft rejeksiyonu önlemekte olup azalan Treg fonksiyon aktivitesi ise otoimmün hastalıklara duyarlılığı arttırmaktadır. Ancak Treg hücrelerinin infeksiyöz ajanlara ve tümör hücrelerine karşı tüm immün cevapları module ederken anormal immünsüpresif fonksiyon göstermesi sonucunda infeksiyon veya malign durumlar da ortaya çıkabilmektedir. Monoklonal immünglobülin üretimi ile karakterize olan MMda baskılanmış diğer immünglobülin ekspresyonlarıyla birlikte fonksiyon göstermeyen T hücre yanıtları da mevcuttur. Bu immün fonksiyon bozukluğunun temelindeki sebeplerden birinin Treg hücrelerinin anormal aktivitesi olduğu bilinmektedir (30, 32, 34, 35).

5.3. Düzenleyici T Hücreleri (Treg)

Düzenleyici T hücreler ilk kez 1970 yılında süpresör hücreler olarak tanımlanmıştır. 1980 'lerde ise izolasyon ve tanımlanmasının zorluğundan dolayı çalışmalar bırakılmıştır. 1995 yılında Sakaguchi 'nin interleokin-2 (IL-2) reseptörü α zincirinin (*cluster of differentiation 25*, CD25) CD4+ Treg hücreler için fenotipik bir

belirteç olduğunu bulmasıyla birlikte Treg hücreleri üzerine çalışmalar tekrar hız kazanmıştır (36).

5.3.1. Treg Hücrelerinin Sınıflandırılması:

Treg hücreleri oluşum şekillerine göre ikiye ayrılır. Direkt olarak timus kökenli olanlara doğal Treg hücreleri denirken CD4+ veya CD8+ hücrelerden bir antijene temas sonucu oluşanlara ise uyarı kökenli ya da indüklenmiş Treg hücreler (iTreg) denir. Treg hücreleri hücre tipine göre ise CD4+ ve CD8+ olmak üzere iki ana sınıfa ayrılmaktadır. CD4+ Treg hücreleri beş grupta incelenir. Timus kökenli doğal bulunan Treg hücreler, periferal yolla indüklenmiş Treg hücreler, tip 1 regülâtör (Tr1) ve T yardımcı 3 (Th3) hücreler ile *transforming growth factor-β* (TGF-β) / IL-10 çift pozitif CD4+ Treg hücreler olarak adlandırılmakta olup farklı fenotiplere ve farklı immünsüpresif mekanizmalara sahiptirler. Ayrıca CD4+ iTreg hücreler CD4+ T hücrelerin in vivo veya ex vivo yolla aktif hale gelmesi sonucunda süpresif etkilerini gösterebilmektedirler. Timus kökenli doğal bulunan Treg hücreler ve periferal yolla indüklenmiş Treg hücreler CD4+ CD25+ *forkhead box p3* (Foxp3+) fenotipine sahiptirler. İmmünsüpresif etkilerini invitro (CTLA4) aracılı hücre-hücre kontağı ve in vivo hücre-hücre kontağı ile IL-10 ve TGF-β eksprese ederek sitokin aracılı olarak gerçekleştirirler. Tr1 hücreler CD4+ CD25± Foxp3- ve yüksek IL-10 fenotipine sahip olup immünsüpresif etkisini hücre- hücre kontağı ve IL-10 eksprese ederek sitokin aracılı olarak gerçekleştirirler. Th3 hücreleri CD4+ CD25± Foxp3- ve yüksek TGF-β fenotipine sahip olup immünsüpresif etkisini sadece TGF-β eksprese ederek sitokin aracılı olarak gerçekleştirirler. Son olarak TGF-β/ IL-10 çift pozitif CD4+ Treg hücreler ise TGF-β/ IL-10 çift pozitif ve CD4+ CD25- Foxp3- fenotipe sahip olup immünsüpresif etkisini sadece IL-10 ve TGF-β eksprese ederek sitokin aracılı olarak gerçekleştirirler. CD8+ Treg hücreleri T süpresör hücreler (Ts) ve IL-10 üreten CD8+ T hücreleri olmak üzere iki grupta incelenir. Ts hücreler CD8+ CD28- fenotipe sahip olup immünsüpresif etkisini CTLA4 aracılı hücre-hücre kontağı yoluyla gerçekleştirirler. IL-10 üreten CD8+ T hücreleri ise CD8+ IL-10+ fenotipe sahip olup immünsüpresif etkisini IL-10 eksprese ederek sitokin aracılı olarak gerçekleştirirler (36, 38- 40). Treg hücrelerin genel sınıflaması Tablo 8'de belirtilmektedir.

Tablo 8. Treg Hücrelerin Genel Sınıflaması

T_{reg}	Alt Sınıfı	Regülatör mekanizma	Eksprese edilen transkripsiyon faktörü	Fonksiyon
CD4+	CD25+ Treg hücreleri	• Hücre-hücre kontağı • Sitokinler (IL-10)	Foxp3	• Otoimmün süpresyon • Yabancı antijenlerin rejeksiyonunun inhibe edilmesi • Bakteriyel infeksiyonlara karşı yanıtın inhibe edilmesi • UV- aracılı süpresyon
Tr1 hücreleri		IL-10	Foxp3 (?)	• Otoimmün süpresyon
Th3 hücreleri		TGF- β		• Otoimmün süpresyon
NK hücreleri	Treg	IL-4, IL-10, TGF- β sitotoksiste		• Tümörlerin ve viral antijenlerin eliminasyonu • Otoimmün süpresyon • UV ile indüklenen tümörlere karşı korumaya yönelik immün sistemin modüasyonu

5.3.2. Treg Hücrelerinin Etki Mekanizması:

Tüm timus kökenli doğal bulunan ve indüklenmiş Treg hücrelerinin süpresif fonksiyonlarını göstermesi için bir T hücre reseptörü (TCR) tetiklemesine ihtiyacı vardır. Treg hücrelerin efektör T hücre aktivasyonunu baskılaması ve fonksiyonu üzerine mekanizması kesin ve net olarak aydınlatılamamıştır (32, 36). Ancak genel anlamda Treg hücrelerin süpresif etki mekanizmasını sınıflandırmada da görüldüğü üzere hücre-hücre kontağı ve sitokin aracılı olmak üzere iki yolla

gerçekleştirdiği belirlenmiştir. CD4⁺ CD25⁺ Treg hücreler efektör T hücre proliferasyonunu ve interferon gama (IFN γ) üretimini direk bu hücrelerle temas ederek gerçekleştirebilmektedir. Efektör T hücre üzerindeki CD80/ CD86 'nın süpresör hücre yüzeyindeki (CD4⁺ CD25⁺ Treg hücre) CTLA-4 ile ligasyonu sonucunda baskılayıcı etkili sinyal iletilerek efektör T hücrenin fonksiyonu inhibe edilmiş olur. Treg hücrelerin efektör T hücrelerin fonksiyonunu etkilemesinde bir başka mekanizma dendritik hücre (DC) modülasyonu aracılığıyla DC üzerindeki CD80/ CD86 'nın süpresör hücre üzerindeki CTLA-4 ile ligasyonu sonucunda indoleamin-2,3-dioksigenaz (IDO) ekspresyonu ve aktivasyonu artar. IDO triptofan aminoasidi degradasyonunda yer alan katabolik bir enzimdir. Bu nedenle triptofanın azalması sonucunda T hücrelerin delesyonuna ya da aktivite kaybına yol açmaktadır (36, 38, 39). Şekil 2 'de bu mekanizmalar şematize edilmiştir. Bu bilinen mekanizmalar dışında Treg hücrelerin hücre-hücre kontağı yoluyla nasıl süpresif etki gösterdiği hala araştırılmaktadır. Hücre- hücre kontağı bağımlı sitokin bağımsız mekanizmaya karşılık in vitro çalışmalara göre Tr1 hücreleri ve Th3 hücreleri süpresif aktivitelerini IL-10 ve TGF- β immünsüpresif sitokinlerini üreterek göstermektedirler. Şekil 3 'de Treg hücrelerin etki mekanizması gösterilmektedir. Treg aktivitesinde immünsüpresif sitokinlerin katkısı hedef organın doğası, inflamasyonun derecesi gibi birçok fizyolojik faktör ile etkilenebilir. IL-10 hasarı sonucu *colitis*, TGF- β bağımlı diyabet oluşumu gibi bazı otoimmün hastalıklar da ortaya çıkabilir. CD4⁺ CD25⁺ Treg hücreler *granzyme A* eksprese edebilirler. Böylece CD4⁺ ve CD8⁺ T hücreleri perforin bağımlı mekanizma üzerinden öldürebilirler. Bunlara ek olarak Treg hücreler DC olgunlaşmasını ve aktivasyonunu sitokin salınımıyla önlemektedirler. Bunun için IL-10 DC üzerindeki *major histocompatibility complex* (MHC) sınıf 2 'yi ve CD80/ CD86 ko-stimule edici moleküllerin uyarıya yanıt vermesini baskılayarak DC 'nin antijen sunma kapasitesine zarar verir. TGF- β da MHC sınıf 2'nin ekspresyonunu bozup ko-stimule edici moleküllerin de etkinliğini önler. Ayrıca CD8⁺ Treg hücreler de ko-stimule edici moleküllerin de etkinliğini önlemektedir. Buna ek olarak DC tarafından Ig benzeri transkript 3 ve 4 (ILT3 ve ILT4) ekspresyonunu arttırırlar. ILT molekülleri Ig benzeri inhibitör reseptör ailesindendir. Fonksiyon olarak ise öldürücü hücre inhibitör reseptörleri ile ilişkilidirler. ILT nin antijen-sunan

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

5.3.3. Treg Hücrelerinin Karakterizasyonu:

Timus kökenli doğal bulunan CD4+ CD25+ Treg hücreler total periferel CD4+ T hücrelerin %5-10 'unu oluşturan immünsüpresif etkili T hücre popülasyonudur. CD25 ekspresyonunun yanısıra bazı belirteçleri de eksprese ederler. Bunlar, *glicocorticoid induced tumor necrosis factor* (TNF) reseptör ilişkili protein (GITR), TNF süperailisi üyelerinden OX40 (CD134), lökositler üzerinde bulunan bir hücre adezyon molekülü olan L-selektin (CD62 ve ligandı CD62L) ve CTLA-4 (CD152) olarak adlandırılır (43, 44). Ancak bu belirteçlerin hiçbiri spesifik bir şekilde Treg hücreleri tanımlamaz. Bu belirteçler belli derecelerde aktif T hücre alt gruplarında ve bazı antijen sunan hücreler (APC) üzerinde de eksprese edilmektedirler. Yakın zamandaki çalışmalar Foxp3 transkripsiyon faktörünün Treg hücreleri tanımlayıcı özel bir belirteç olduğunu ortaya koymuştur. CD4+ CD25+ Treg hücrelerin gelişimi ve fonksiyonu için Foxp3 oldukça önemli bir transkripsiyon faktörüdür. Foxp3 'ün fonksiyonunu kaybetmesi sonucunda gelişen mutasyonlar Treg hücrelerin eksikliğine ve bundan kaynaklanan ciddi bazı otoimmün bozukluklara yol açmaktadır. T hücrelerde Foxp3 'ün ektopik ekspresyonu bu hücrelerin regülatör fenotip ve süpresif fonksiyon kazanmasına neden olmaktadır. Ayrıca Foxp3 bir Rel ailesi transkripsiyon faktörü olan *nuclear factor of activated T-cells* (NFAT) ve aktif B hücrelerinin NFkB hafif zincirlerinin hedef genlerini indüklemeye özelliklerini engellemektedir (36, 44, 45, 47- 49). Bunun sonucunda IL-2 ve diğer sitokin genlerinin (IFN γ , IL-4 gibi) transkripsiyonel bir baskılayıcısı özelliğini kazanır. Tüm bunlara ek olarak Foxp3 devam etmekte olan immün yanıtların kontrolü için aktif T hücrelerine negatif geri besleme yoluyla etki etmektedir (45, 47).

5.3.4. Treg Hücreleri ve Kanseri İlişkisi:

Treg hücreleri konakçıyı kendi antijenlerine karşı reaktif hücreleri baskılayarak otoimmün hastalıklara karşı korur. Burdan yola çıkarak güncel

araştırma konuları çoğunlukla otoimmün hastalıklarda Treg hücre defektlerinin karakterizasyonu ile Treg hücrelerinin bulaşıcı hastalıklar ve allojenik kemik iliği transplantasyonu sonrası toleranstaki rolü üzerinedir. Treg hücre biyolojisi üzerine araştırmalar yoğunlaşıyor olsa da, insan tümörlerinde Treg hücrelerin özellikle timustan mı ilk olarak ortaya çıktığı yoksa antijen spesifik bir stimülasyon nedeniyle periferde mi oluştuğu hala belirsizdir. Treg hücrelerinin, immün sistemin kendi hücrelerine karşı tepki vermemesi için var olan dengenin gerçekleşmesinde merkezi bir fonksiyonu olmasına rağmen bu negatif yöndeki düzenleyici aktivite ters etkili gerçekleşerek tümörlere ve viral enfeksiyonlara karşı normalde olması gereken immün cevabı baskılayabilir. Yani Treg hücreleri kanser hastalarında anti-tümör immün cevabı bozmaktadır (32, 35, 36, 40, 41). Yapılan çeşitli çalışmalar da bu durumu desteklemektedir. Akciğer, pankreas, göğüs, karaciğer, deri vb. kanserlerde periferik kanda ve tümörün iç-dış çevresinde yüksek seviyelerde CD4⁺ CD25⁺ Treg hücreleri saptanmıştır (50, 51). Akciğer kanseri hastalarından alınan tümör dokusundan izole edilen Treg hücrelerinde, in vitro anti-CD3/ anti-CD28 ile uyarılmış T hücrelerinin güçlü immünsupresif etkisi gösterilmiştir (52). Doğal olarak bulunan CD4⁺ CD25⁺ Treg hücrelerine ek olarak IL-10 üreten Tr1 hücrelerinin de kanser hastalarında etkisiz anti-tümör yanıtı sebep olduğu saptanmıştır. Buna örnek bir çalışma olarak, insan over tümörlerinde plazmasitoid dendritik hücrelerin IL-10 salgılayan CD8⁺ Treg hücrelerinin anti-tümör immün cevabı IL-10 ile baskılama aktivitesini indüklediği bulunmuştur (53). Viehl CT ve arkadaşları, CD4⁺ CD25⁺ Treg hücrelerinin azaltılmasının farelerde pankreas kanserinde immün yanıtı ilerlettiğini ortaya koymuştur (54). Heier ve arkadaşları, CD4⁺ CD25⁺ Treg hücrelerinin azaltılmasının farelerde B hücreli lenfoma modelinde lokal tümör gelişimini inhibe ettiğini göstermişlerdir (55). Yokokawa ve arkadaşları, periferik kandaki CD4⁺ CD25^{high} Foxp3⁺ Treg hücrelerinin prostat kanseri hastalarında fonksiyonunun arttırdığını göstermişlerdir. Treg hücrelerinin kanser hastalarında artan miktarlarda görülmesi yüksek mortalite ve azalan hastalıktan bağımsız sağkalım süresi ile ilişkilendirilmektedir (56).

Prabhala ve arkadaşları, normal immün yanıtın düzenlenmesinde önemli role sahip olan Treg hücrelerinin MMda ve MGUS 'da anormal aktivitesini fenotipik

karakterizasyon ve Foxp3 ekspresyonları ile tespit etmiştir (57). Atanackovic ve arkadaşları, CD4+ CD25+ Foxp3+ Treg hücrelerinin MM hastalarında allojenik kök hücre transplantasyonu işlemi sonrasında kemik iliğinde yeniden kurulup çoğaldığını böylelikle graft karşıtı konakçı hastalığının (*graft versus host disease*, GVHD) ortaya çıkışını immünsüpresif etkiyle önlediklerini göstermişlerdir (58). Banerjee ve arkadaşları, miyelom hastalarında Foxp3 yüksek Treg hücrelerinin insan dendritik hücreleri tarafından ve sitokin enjeksiyonu sonrası olgunlaşan dendritik hücreler tarafından in vitro ekspansiyonunu göstermiştir (40). Sonmez ve arkadaşları, MM hastalarında interferon- α -2a 'nın (IFN- α -2a) Th3 hücrelerinin sitokin yanıtındaki etkilerine bakarak IFN- α -2a 'nın Th3 dışı sitokin yanıtını arttırdığını göstermişlerdir (59). Condomines ve arkadaşları, fonksiyonel düzenleyici T hücrelerinin kök hücre otograftlarında yüksek doz siklofosamid ve granülosit koloni uyarıcı faktör ile mobilizasyonu sonucunda toplandığını göstermiştir (60). Daha önce yayınlanmış çalışmamızla, 28 MM olgusunda otolog kemik iliği transplantasyonu alan olgularda almayan gruba göre periferik kanlarında artan düzeyde CD4+ CD25+ Foxp3+ Treg hücreleri tespit edilmiştir (61).

5.4. Bortezomib

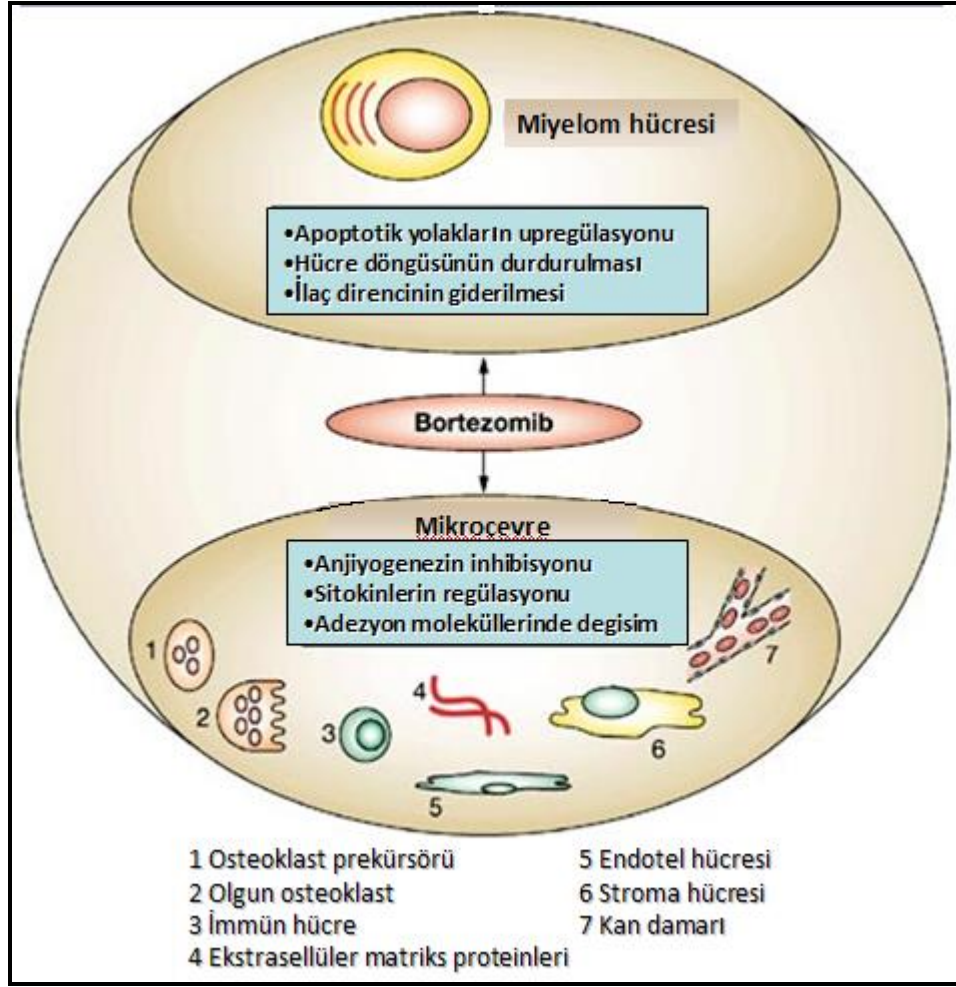
Bortezomib proteozom inhibitörleri adı verilen yeni bir ilaç sınıfının ilk üyesidir. Haziran 2008 'de Bortezomib ilk basamak tedavide kullanılmak üzere onay almıştır. Bortezomib, daha önce uygulanan tedavilere karşı dirençli hale gelmiş olan ya da daha önce uygulanan tedaviler sırasında relaps meydana gelmiş olan hastalar için de önemli bir tedavi seçeneğidir (4, 6).

Bortezomib, proteozom enzim kompleksini inhibe ederek etkisini gösterir. Hem normal hücreler hem de kanser hücreleri proteozom içermektedir ve bu enzim kompleksleri hasar görmüş ve istenmeyen proteinlerin degradasyonunu gerçekleştirir. Proteozomlar aynı zamanda, hücre içinde hasar görmemiş proteinlerin düzenli yıkımını da sağlar ve bu, kritik öneme sahip birçok hücre fonksiyonunun kontrolü açısından gerekli bir işlemdir. Bu daha küçük bileşenler daha sonra hücre tarafından gereksinim duyulan yeni proteinler oluşturulması için kullanılır. Proteozom hücredeki protein geri dönüşümü açısından kritik öneme sahip öğeler olarak düşünülebilir. Proteozomlar hücre siklusu düzenlenmesi,

apoptozisin önlenmesi, kanser hücresi gelişimi gibi önemli mekanizmalardaki farklı bir çok proteinin yıkımında önemli rol oynarlar (4, 8).

Proteozomlar tüm hücrelerde bulunan ve hem sağlıklı hem de kanserli hücrelerde hücre içi proteinleri düzenli şekilde parçalayan enzim kompleksleridir. Kanser hücrelerinin çoğalması, yayılması ve canlılığını sürdürmesi proteozom tarafından regüle edilen proteinlere bağlıdır. Proteozomun Bortezomib tarafından inhibe edilmesi hücre içi proteinlerin yıkımını önler ve bu yolla hücrelerdeki birden fazla sinyal kaskadını etkiler. Kanser hücrelerindeki sinyal kaskadlarında meydana gelen bu bozulma hücre ölümüne ve tümör büyümesinin inhibisyonuna neden olabilir (12).

Bortezomib proteozomları inhibe ettiğinden hücrenin içindeki normal dengede bozulma meydana gelir. Bu bozulma hücre içinde literatürde sıklıkla araştırma konusu olan etkilere yol açar. In vitro çalışmalarda proteozom inhibisyonunun kanser hücre proliferasyonunu durdurduğu görülmektedir. Ayrıca kanser hücrelerinde, diğer kanser hücrelerini uyaran kimyasalların üretimi de durmaktadır. Böylece proteozom inhibisyonu kanser hücrelerinin ölümüne yol açmaktadır. Kanser hücreleri bu etkilere karşı, normal hücrelere kıyasla daha duyarlı gibi görünmektedir ve dolayısıyla kanser hücreleri ölürken normal hücreler düzelebilmektedir. Şekil 4 'de Bortezomibin multipl miyelom tedavisinde miyelom hücresine ve mikroçevreye olan etkileri görülmektedir. Klinik çalışmalarda Bortezomib tedavisinin hem relaps/ direnç hem de ilk basamak tedavi ortamındaki hastalar üzerindeki etkileri araştırılmaktadır. Daha önce yayınlanmış olan APEX çalışmasına ait sonuçları güncelleyen bir çalışmada genel medyan sağkalımın tek ajan olarak bortezomib alan hastalarda 30 ay, yüksek dozlu deksametazon alan hastalarda ise 24 ay olduğunu ortaya koymuştur (4, 6, 8, 12, 19).



Şekil 4. Bortezomibin Multipl Miyelom Tedavisinde Miyelom Hücresine ve Mikroçevreye Olan Etkisi

(Caravita T1, de Fabritiis P, Palumbo A, et al. Bortezomib: efficacy comparisons in solid tumors and hematologic malignancies. Nat Clin Pract Oncol. 2006 Jul;3(7):374-87.)

5.4.1. Bortezomibin İmmün Sisteme Etkisi:

Bortezomibin immün sistem üzerine olan etkilerine dair çalışmalar incelendiğinde, bortezomibin aktif haldeki T hücrelerinde apoptozu indüklerken dinlenme (inaktif) haldeki T hücrelerinin canlılığını koruduğu ortaya koyulmuştur. Bu özellik GVHD 'e karşı potansiyel bir terapötik ajan olabileceğini düşündürmektedir. GVHD 'in kontrolünde doğal bulunan Treg hücrelerin öneminden ötürü bortezomib aktifleştirilmiş T hücrelerinin bulunduğu in vitro

ortama eklendiğinde CD4+ Treg hücrelere zarar vermediği ve hatta bu hücre grubunun süpresif özelliğini desteklediği görülmüştür (62, 63). Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) MM 'da oldukça aktif haldedir. Miyelom hücrelerinin STAT3 inhibitörü JSI-124 ve bortezomib ile ön maruziyet sonrasında dendritik hücrelerle karşılaşması sonucunda MM 'da fonksiyon bozukluğu gösteren dendritik hücrelerin HSP90 'ın pozitif yönde ve p-STAT3 'un negatif yönde düzenlenmesi sonucu etkin hale döndüğü, bunun sonucunda da miyelom spesifik sitotoksik T lenfosit güçlü bir şekilde oluşturduğu gösterilmiştir (64). Bortezomib ve IL-12 immün terapisinin kombinasyon terapisinde bu ajanların tek başına gösterdiğinden daha fazla anti-tümör etkinlik elde edilebilir hipotezinden yola çıkılarak yapılan bir ksenograft MM fare modelinde, NK hücrelerinin hücre-öldürücü kapasitesinin arttığı ortaya koyulmuştur. Bortezomib ya da IL-12 monoterapilerine göre kombine tedavideki bu etkinlik artışı NK hücreleri üzerinde sinerjistik etkiye sebep olduğunu düşündürmektedir (65). Literatürde yer alan bir çok çalışmada bortezomibin yüksek dozlarının sitotoksik T hücre aktivitesini ve proliferasyonunu baskılayarak immünsüpresif etki gösterdiğini ortaya koymuştur. Ancak bortezomibin düşük dozlarında (10^{-10} ile 10^{-8} M arasında) ise konağın sitotoksik T hücre aracılı anti-tümör yanıtını desteklediği gösterilmiştir (66- 68).

6. GEREÇ VE YÖNTEM

6.1. Araştırmanın Tipi

Bu çalışma yarı deneysel olarak gerçekleştirilmiştir.

6.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Bu çalışma deney ve analizleri, Dokuz Eylül Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji laboratuvarında 07.09.2011 ile 20.01.2014 tarihleri arasında gerçekleştirilmiştir.

6.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi

Bu çalışmaya 2011-2013 yılları arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Hematoloji polikliniğine gelen MM ön tanılı hastalardan MM tanısı kesinleşen hastalar dahil edilmiştir. Buna göre çalışmaya yaşları 50 ile 81 arasında değişen 5'i kadın 15'i erkek olmak üzere toplam 20 yeni tanı MM olgusu dahil edilmiştir. Olgular Dokuz Eylül Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Hematoloji servisi ve polikliniğince izlenmektedir. Olgular MM için ISS ve Durie-Salmon Evreleme Sistemine göre evrelenmiştir. Olguların yeni tanı olarak seçilmesi daha önce multipl miyeloma yönelik hiçbir tedavi almamış olmaları gerektiğinden önem taşımaktadır.

6.4. Araştırmanın Materyali

Bu çalışmada Dokuz Eylül Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Hematoloji polikliniğine gelen MM ön tanılı hastalara gönüllü bilgilendirme formları (ek 1) verilip imzalatıldıktan sonra steril EDTA 'lı tüplere yaklaşık 3 ml kan ve 3 ml kemik iliği alındıktan sonra taze örneklerden PBMC 'ler ve BMMC 'leri *Ficoll-paque* (d. 1,077 g/ml) ayırma solusyonu ile yoğunluk gradient santrifügasyonu yöntemiyle izole edilmiştir. İzole edilen PBMC 'ler ve BMMC 'ler sıvı azotta saklanmıştır. Daha sonra olgulara ait arşiv dosyaları incelenerek MM tanısı alıp almadıkları kontrol edilmiştir.

6.5.Araştırmanın Değişkenleri

Yeni tanı MM olguları için bağımsız değişkenler; ISS, Durie-Salmon evreleri, Ig tipleri, serum albumin ve β 2M düzeyleri, serum kalsiyum, hemoglobin değerleri, kan sedimantasyon durumu, santral miyelomatoza varlığı ve ek hastalık durumudur.

Çalışmanın bağımlı değişkenleri; Çalışmaya dahil edilen yeni tanı MM olgularının PBMC 'lerinden izole edilen ve akım sitometri ile konfirme edilen CD4+CD25+ Treg hücre yüzdesi, CD4+CD25+Foxp3+ Treg hücre yüzdesi, primer BMMC hücrelerinde uygulanarak tespit edilen Bortezomib LD50 dozu, deney gruplarında akım sitometri ile tespit edilen CD138+ hücre yüzdesi ve WST-1 analizi ile tespit edilen total hücre canlılığı yüzdeleri, tripan mavisi ile boyanarak tespit edilen hücre sayıları ve canlı – ölü hücre yüzdeleridir.

6.6. Veri Toplama Araçları

6.6.1. Araç ve Gereçler

6.6.1.1. Tez Çalışmasında Kullanılan Gereçler

- Laminar Akışlı Biyogüvenlik sınıf II Kabinet.....Nüve
- Karbondioksitli inkübatörNüve
- Soğutmalı Santrifüj Cihazı Beckman J6-MI Centrifuge
- Akım Sitometri CihazıBeckman Coulter Epics XL. MCL
- +4 °C buzdolabı Beko 9610 NM
- -20 °C derin dondurucu Beko 9610 NM
- -196 °C sıvı azot tankıHeraus
- Otomatik pipet 0.5-10 μ l Isolab
- Otomatik pipet 20-200 μ l Isolab
- Otomatik pipet 100-1000 μ l Isolab
- Inverted Mikroskop Olympus CKX41
- MagnetInvitrogen
- Vorteks MS2 IKA minishake
- ÇalkalayıcıIKA HS 260 basic

6.6.1.2. Kullanılan Kimyasal Madde ve Solüsyonlar

- İnsan kökenli Düzenleyici T Hücreleri Boyama Kiti (FITC anti-human CD4, PE anti-human CD25, PE-Cy5 anti-human Foxp3)
 - Akım Sitometri Boyama Tamponu, 200 ml (E-Bioscience)
 - Fiksasyon/ Permeabilizasyon Dilüenti, 100 ml (E-Bioscience)
 - 10x Permeabilizasyon Tamponu, 100 ml (E-Bioscience)
 - Fiksasyon/ Permeabilizasyon Konsantre Solüsyonu, 30 ml (E-Bioscience)
 - PE-Cy5 Konjüge Rat kökenli IgG2a İso tipik Kontrolü Klon eBR2a, 0.2 mg/ml, 0.125 ml (E-Bioscience)
 - PE-Cy5 Konjüge Anti-human Foxp3 Klon: PCH101, 0.5 ml, 20 µl/ test (E-Bioscience)
 - Normal Rat Serum, 0.1 ml (E-Bioscience)
 - FITC & PE Kokteyli Fare kökenli IgG1 İso tipik Kontrolü, 0.2 ml 10 testlik (E-Bioscience)
 - FITC- CD4, PE-CD25, CD4/ CD25 Kokteyl Kiti, Klon: RPA-T4 & BC96, 0.5 ml (E-Bioscience)
- PE Konjüge Fare kökenli IgG1k İso tipik Kontrolü, 2 ml 100 testlik (BD Pharmingen)
- FITC Konjüge Fare kökenli IgG1k İso tipik Kontrolü, 2 ml 100 testlik (BD Pharmingen)
- *Ficoll-paque* Ayırma Solüsyonu d. 1.077 g/ml, 500 ml (Invitrogen)
- İso ton II Solüsyonu (*Isoton Sheath Fluid*), 1000 ml (Beckman Coulter)
- 10x Permeabilizasyon Solüsyonu, 30 ml (BD Bioscience)
- *Dynabeads Regulatory CD4+CD25+ T Cell Kit* (Invitrogen)
- Hücre proliferasyon reaktifi, WST-1 (Roche)
- Bortezomib (VELCADE)
- Fosfat Tamponlu Tuz Solüsyonu (PBS)
 - 150 mM NaCl + 10 mM Na- Fosfat, pH: 7,4 hazırlanıp +4°C saklandı
- 1x Permeabilizasyon Solüsyonu

- 10x Permeabilizasyon solüsyonundan (BD Bioscience) 1ml alıp 9 ml distile su ile seyreltilerek elde edildi ve 4°C saklandı
- Paraformaldehit (PFA) Fiksatif Solüsyonu
 - 10 g PFA 250 ml izoton II solüsyonu inde çözülerek hazırlanıp +4°C saklandı
- *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI-1640) ortamı (Sigma)
- *Fetal Bovin Serum* (FBS) (Biochrom)
- L-Glutamin (Biochrom)
- Penisilin/ Streptomisin (Gibco)
- Dimetil sülfoksit (DMSO)

6.6.1.3. Kullanılan Sarf Malzemeler

- EDTA 'lı hemogram tüpü Tıp Kim San
- Dibi konik falkon tüp, steril (15 ml) Greiner
- Steril Pastör Pipeti Greiner
- Plastik pipet ucu sarı ve mavi birer paketEpendorf
- Plastik beyaz pipet ucu bir kutu Ependorf
- 6 kuyucuklu plate.....Greiner
- 96 kuyucuklu plateGreiner

6.7. YÖNTEMLER

6.7.1. Periferik Kan Mononükleer Hücrelerin (PBMC) ve Kemik İliği Mononükleer Hücrelerinin (BMMC) Dansite Gradient Santrifügasyon Yöntemi ile İzolasyonu

6.7.1.1. Genel İlke:

Aynı yoğunluğa sahip olan tanecikler şekil veya boyut olarak farklılaşabilir. Örnek sükröz veya benzeri viskoz bir ortamın gradienti üzerine yerleştirildiğinde taneciklerin yoğunluğunun sıvının yoğunluğundan fazla olması nedeniyle

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

6.7.1.2. Uygulama Basamakları

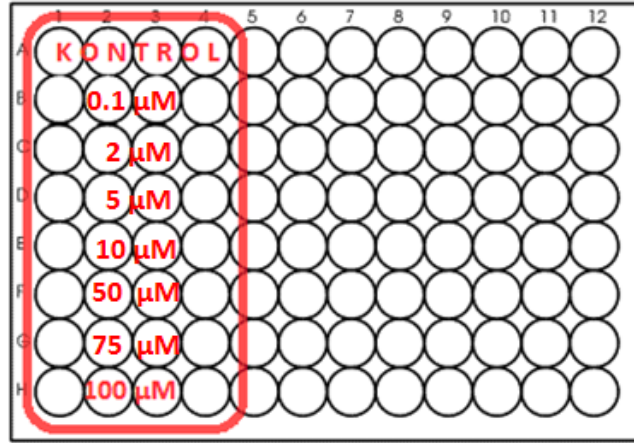
- Olgulardan steril EDTA 'lı hemogram tüplerine alınan yaklaşık 3 ml taze kan ve 3 ml kemik iliği fosfat tamponlu tuz solüsyonu (PBS) ile 1:1 oranında seyreltilir.
- 15 ml dibi konik boş falkon tüplere önce 4 'er ml *Ficoll-paque* ayırma solüsyonu eklendi.
- Üzerine tüpü 45 derecelik açı ile tutarak tüpün ağzının kenarında yavaşça pastör pipetiyle seyreltilmiş kan ve kemik iliği örnekleri ilave edildi.
- Bu işlem sonunda falkon tüpünde altta şeffaf *Ficoll-paque* solüsyonu ile üzerinde kan ve kemik iliği örnekleri olmak üzerine ayrı iki faz gözlemlendi. Fazların birbirine karıştırılmamasına dikkat edildi.
- Tüpün karşısına salınlı rotor üzerinde aynı ağırlıkta bir tüp koyulup denge sağlanarak +4°C 'de 1650 rpm 'de 20 dk santrifüj edildi.

- Santrifüj sonunda tüpün dibinde kırmızı eritrosit ve granülosit tabakası, biraz üzerinde ortada beyaz flu halde lenfosit tabakası ve onun da üzerinde sarımtırak halde trombositler ve monositlerin bulunduğu 3 ayrı tabaka gözlemlendi.
- İzole edilmek istenen ortadaki flu PBMC ve BMMC tabakası temiz bir pastör pipet ile dikkatlice toplanıp başka bir dibi konik boş 15 ml 'lik falkon tüpe aktarıldı.
- Elde edilen PBMC 'lerden ve BMMC 'lerden istenmeyen artıkların uzaklaştırılması için yıkama işlemi yapıldı.
- Yıkama için PBMC 'lerin ve BMMC 'lerin üzerine yaklaşık 8 ml PBS eklendi.
- Tüpün karşısına salınımlı rotor üzerinde aynı ağırlıkta bir tüp koyulup denge sağlanarak +4°C 'de 1200 rpm 'de 5 dk santrifüj edildi.
- PBMC 'ler ve BMMC 'ler tüpün konik dibinde beyaz bir pellet olarak gözlemlendi.
- İstenmeyen artıklar uzaklaştırılmak üzere süpernatant atıldı.
- Pelletlerin üzerine tekrar yaklaşık 8 ml PBS eklendi.
- Tüpün karşısına salınımlı rotor üzerinde aynı ağırlıkta bir tüp koyulup denge sağlanarak +4°C 'de 1200 rpm 'de 5 dk santrifüj edildi.
- PBMC 'ler ve BMMC 'ler tüpün konik dibinde beyaz bir pellet olarak gözlemlendi.
- İstenmeyen artıklar uzaklaştırılmak üzere süpernatant atıldı.
- Dipte kalan hücre pelleti üzerine 500 ml izoton solüsyonu eklenerek resüspanse edildi.
- Böylece PBMC 'ler akım sitometrik analiz için gerekli işlemlerde kullanılmak üzere 500 µl 'lik hücre süspansiyonu halinde elde edilmiş oldu.

- BMMC 'leri de Bortezomib doz denemeleri için 96 kuyucuklu platede kontrol dahil 8 grup 4 tekrarlı olacak şekilde ekildi.
- Daha önce planlanan multipl myelom hücrelerinin izolasyonu ile primer kemik iliği kültürü paralel çalışması ilk 5 olguda yapılan deneyler sonucu sadece multipl myelom hücreleri ile çalışmanın tümör mikroçevresinin etkisini yansıtmayacağı göz önünde bulundurularak çalışma planının dışında bırakılmıştır.

6.7.2. Bortezomib LD₅₀ Doz Deneyleri

- Primer kemik iliği kültüründe kontrol, Bortezomib verilen grup, CD4+CD25+ Treg verilen grup ve Bortezomib ile CD4+CD25+ Treg hücrelerinin kombinasyonunun verildiği grup olmak üzere dört grup çalışıldı.
- Bu gruplarda uygulanan Bortezomib dozu her hasta için ön doz denemesi yapılarak tespit edildi.
- Bortezomib ana stoğundan dilüsyonlar yapılarak 0,01µM, 0,1 µM, 2 µM, 5 µM, 10 µM, 50 µM ve 100 µM lık dozları hazırlandı.
- 96 kuyucuklu plate içinde kontrol grubu dahil aynı hasta için sekiz gruba bu şekilde son hacim kuyucuk başına 100 µl olacak şekilde uygulandı.
- %5 CO₂ ve 37°C etüvde 16 saatlik inkübasyona bırakıldı.
- Ancak 50 µM ve 100 µM lik dozlar arasındaki canlılık yüzdelerindeki büyük farklılık nedeniyle ve 0,017 µM lik dozun düşük etkisi nedeniyle doz planı değiştirilerek şekil 5 de görüldüğü üzere 0,1 µM, 2 µM, 5 µM, 10 µM, 50 µM, 75 µM ve 100 µM olarak çalışmaya devam edildi.

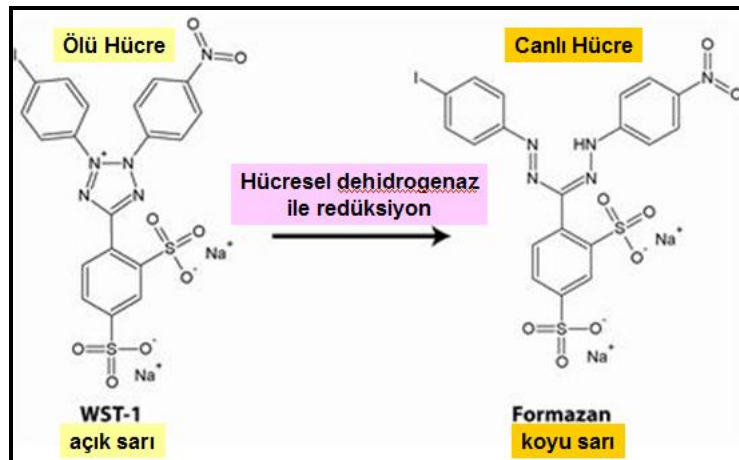


Şekil 5. Bortezomib doz deneme şeması

6.7.3. WST-1 Hücre canlılık analizi

6.7.3.1. Genel İlke:

Bu kitin temel prensibi, pembe renkli tetrazolyum tuzunun (WST-1), mitokondriyal solunum zincirinde yer alan ve sadece canlı hücrelerde aktif olan süksinat-tetrazolyum redüktaz enzimi aracılığıyla koyu kırmızı renkli formazan boyaya dönüşmesine dayanmaktadır. Mitokondriyal dehidrogenaz enzim aktivitesi, canlı hücrelerin sayısı arttıkça artmaktadır. Bu nedenle, enzim aktivitesi arttıkça formazan boyanın üretimi de artmaktadır. Formazan boyanın kantitesi, direkt olarak medyumda metabolik olarak aktif olan hücre sayısı ile ilişkilidir. ELISA okuyucusu ile ölçülen formazan boyanın absorbanansı, canlı hücre sayısı ile direkt olarak orantılı olmaktadır. Yöntemin moleküler mekanizması Şekil 6 'da yer aldığı gibidir.



Şekil 6. WST-1 yönteminin moleküler mekanizması

(<http://www.gbiosciences.com/ResearchProducts/CytoScanWST1-desc.aspx>)

6.7.3.2. Uygulama Basamakları:

- Bortezomibin farklı dozları ile şekil 5 'te görüldüğü edilen hücreler 10000 hücre/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu platelere ekili 16 saat 37°C %5 CO₂ lik etüvde inkübe edildi.
- 100 µl/kuyucuk hücre için her kuyucuğa 10 µl/kuyucuk WST1 hücre proliferasyon reaktifi eklendi (1:10 dilüsyon).
- Hücreler 37°C %5 CO₂ lik etüvde 2 saat inkübasyona bırakıldı
- Plate çalkalayıcıda 1 dk çalkalandıktan sonra ELISA okuyucuda 420- 480 nm de okutuldu. Referans dalga boyu olarak 600 nm den fazlası (630 nm) seçildi.
- Canlılık yüzdeleri hesaplanırken kontrol grubu absorbans ortalaması %100 canlılık değeri olarak kabul edilerek relatif olarak diğer grupların absorbansları % canlılık olarak hesaplandı.

6.7.4. Manyetik Yolla CD4+ CD25+ Foxp3+ Treg hücrelerin PBMC 'lerinden İzolasyonu

6.7.4.1. Genel İlke:

Hücrelerin yer aldığı tüm sistemlerde hücre izolasyonu ve kültürü çalışmaları yapılmaktadır. Hücre izolasyonunda laboratuvarlarda kullanılan klasik ve bilimsel olarak kabul edilmiş çeşitli metodlar vardır. Bilimsel sorumuz ve hipotezimiz sonrasında kurduğumuz deneysel yaklaşım planında, kültür ortamının ve hücrelerin çok iyi seçilmiş olması gerekmektedir. Genel immünolojik çalışmalarda venöz kandan periferik kan mononükleer hücreleri izole edilmekte ve çeşitli uyarılarla kültürleri yapılmaktadır. T veya B hücre düzeyinde kültür çalışmaları ise daha ileri izolasyon tekniği gerektirmektedir. Son yıllarda allerji ve immünoloji alanında yayınlanan makalelerin deneysel kısmında tek hücre düzeyinde izolasyon çalışmaları göze çarpmaktadır. İmmünoloji alanındaki

teknolojik gelişmeler sayesinde hücrelerin çeşitli yüzey reseptörleri manyetik boncuklarla işaretlenmekte ve istenilen hücreler izole edilmektedir. Bu şekilde farklı boncuklar kullanılarak insan, fare, sıçan ve maymunlardan çeşitli immünolojik hücreler (T-hücresi ve alt kümeleri, dendritik hücre, B hücresi ve alt kümeleri, monositler, antijen-sunan hücreler), kök hücreler, sitokin salgılayan hücreler izole edilebilmektedir.

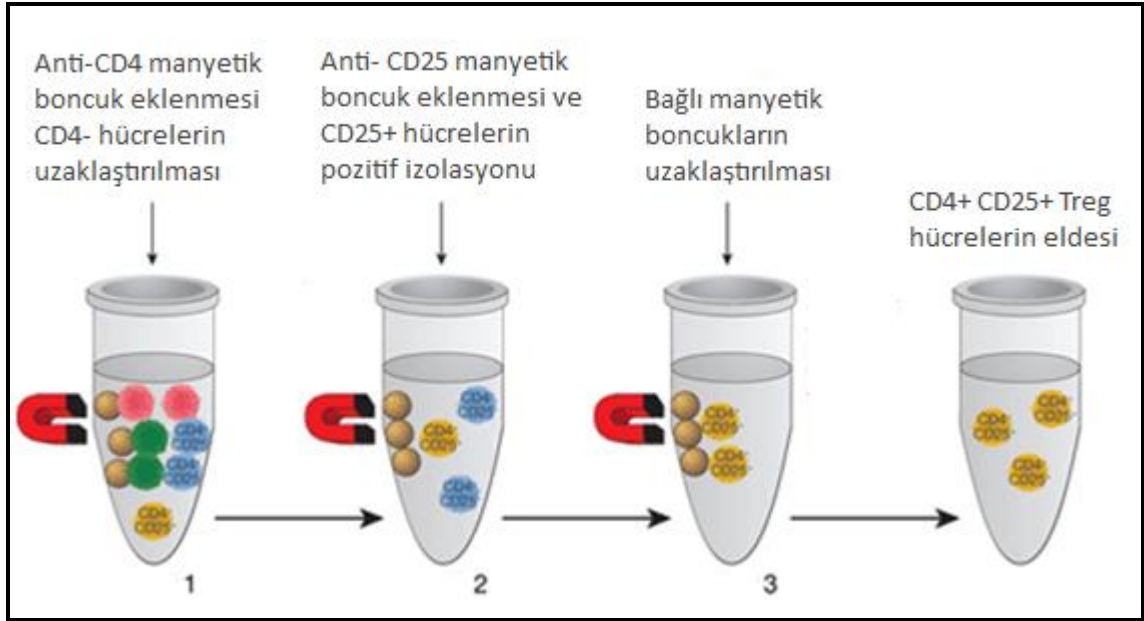
6.7.4.2. Ön Hazırlık:

- İzolasyon tamponu hazırlama: Ca^{2+} ve Mg^{2+} içermeyen PBS de %0.1 FBS (veya BSA) ve 2 mM EDTA solüsyonu hazırlanır. Bunun için 1 litre %0.1 BSA içeren PBS içinde 0,7445 g EDTA çözüldü ve pH:7.2 olarak ayarlandı.
- Tüm örneklerin izolasyonlarında kullanmak amacıyla 495 ml 'lik RPMI 1640 ortamına %1 FBS içermesi için 5 ml FBS eklendi.

6.7.4.3. Uygulama Basamakları:

- PBMC 'leri 500 µl izolasyon tamponunda resüspanse edildi. 200 µl FBS ve 200 µl insan kökenli CD4 antikoru karışımı iyice karıştırılıp eklendi. 20 dk 2-8 °C 'de inkübe edildi.
- Hücreleri yıkamak için 10 ml soğuk izolasyon tamponu eklenerek 8 dk 350xg 'de santrifüj edildi, süpernatant uzaklaştırıldı.
- Pellete 2 ml soğuk izolasyon tamponu eklenerek resüspanse edildi.
- 1 ml *Depletion MyOne Dynabeads* eklenip iyice karıştırılıp 15 dk oda sıcaklığında çalkalamada bırakılarak inkübe edildi.
- 1000 ml'lik pipet ucu ile beş kere pipetaj yapıldı.
- 3 ml izolasyon tamponu eklendi.
- Örneğin bulunduğu tüp magnet içine alındı ve süpernatantta bulunan CD4+ olan boncuksuz hücreler yeni tüpe alındı.
- 3 ml izolasyon tamponu eklenerek tüp magnet içine alındı ve süpernatantta bulunan CD4+ olan boncuksuz hücreler yeni tüpe alındı.
- Hücreler 8 dk 350xg 'de santrifüjlendi ve ml 'de $1,5 \times 10^7$ CD4+ hücre olacak şekilde izolasyon tamponu ile resüspanse edildi.
- 200 µl *Dynabeads* CD25 antikoru eklendi.

- İyice karıştırılarak 25 dk 2-8 °C 'de hafifçe sallayıp çalkanarak bekletildi.
- Tüp magnet içine alınıp min 1 dk beklendi. Manyetik işaretli CD4+CD25+ olduğu düşünülen hücrelerin magnete tutunduğu gözlemlendi. CD4+CD25- (efektör) hücre içeren süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldı.
- Tüp magnetten çıkarıldı ve manyetik boncuk bağlı hücreler dikkatlice 5 ml izolasyon tamponunda resüspanse edildi. Ancak bu işlem sırasında manyetik boncukların uzaklaşmaması için kesinlikle pipetaj yapılmadı.
- Tüp magnete koyularak minimum 1 dk beklendi. Süpernatant uzaklaştırıldı.
- 5 ml izolasyon tamponunda bir kere daha resüspanse edilerek dikkatlice çalkalandı.
- Tüp magnete koyularak minimum 1 dk beklendi. Süpernatant uzaklaştırıldı.
- Boncuk bağlı hücreler 500 µl RPMI 'da (%1 FBS içeren) resüspanse edildi.
- 80 µl *DETACHaBEAD* solüsyonu eklendi ve 45 dk oda sıcaklığında hafifçe çalkalanarak inkübe edildi.
- Tüp magnete koyularak minimum 1 dk beklendi. Manyetik boncuklarından ayrılan ve süpernatantta bulunan CD4+CD25+ hücreler yeni bir tüpe aktarıldı. Bu manyetik izolasyon adımları şekil 7 'da gösterilmektedir.
- Hücreler iki kere %1 FBS içeren RPMI ile yıkandı ve bir önceki basamak tekrar edildi.
- 10 ml RPMI (%1 FBS içeren) eklenip 8 dk 350xg 'de santrifüjlendi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Bu işlem bir kez daha tekrarlandı.
- Bu işlem sonucu elde edilen hücre pelleti 500 µl RPMI içinde resüspanse edildi. 100 µl'si akım sitometri ile konfirmasyon amaçlı deneylerde kullanılırken 400 µl 'si 4x100 µl olacak şekilde ilgili dört kuyucuğa eklendi.



Şekil 7. CD4+CD25+ Treg Hücrelerin Manyetik İzolasyon Adımları

(<http://www.b2b.invitrogen.com>)

6.7.5. Akım Sitometri ile CD4+ CD25+ Foxp3+ Treg hücrelerin seviyelerinin tespiti

6.7.5.1. Genel İlke:

Akım sitometrik ölçümlerde öncelikle hücreler *fluorescein isothiocyanate* (FITC), *phycoerythrin* (PE) gibi fluoressanlanmış moAb ile işaretlenir. İşaretlenmiş bu hücreler sıvı bir ortamda sıra halinde uyarıcı ışıktan (argon lazer) 488nm 'de geçirilirler. Uyarıcı ışık ya hücreler tarafından kırılır ya da florokromla işaretlenmiş mAb 'lerin bağlandığı hücre tarafından emilir ve yayılır. Bu yayılan ışığın şiddetini ve niteliğini algılayan dedektörler bilgisayara aktarılır. Bu verilere göre de hücrenin tipi ve sayısı belirlenir. Akım sitometrinin klinik kullanımı en sık lökosit fenotiplemesinde olmakla birlikte konjenital veya kazanılmış immün yetersizlik tanısı (en sık AIDS), HIV pozitifliğinde prognoz değerlendirilmesi, immün yetersiz hastalarda immünite ya da kemoterapi monitörizasyonu, KİT yapılan hastalarda yeni immün durumun takibi, tümör hücre fenotiplemesi, lösemi ve lenfoma tanı ve sınıflaması, B lenfositlerinde klonal tayini ve lenfoma ve lösemi ayırımı, hücre içi antijenlerin (miyeloperoksidaz miktarı) tayini ile hematopoetik hücrelerin (CD4),

hematopoetik olmayan, tümörler ve hücrelerden ayırt edilmesi gibi alanlarda mevcuttur. Bu çalışmada da FITC ile konjuge edilmiş CD4 (FITC-CD4), PE ile konjuge edilmiş CD25, PE-Cy5 ile konjuge edilmiş Foxp3 (PE-Cy5-Foxp3) ile CD4+ CD25+ Foxp3+ Treg hücrelerin bulunma yüzdeleri analiz edilmiştir.

6.7.5.2. Uygulama Basamakları

PBMC 'lerde yapılan uygulama basamakları şöyledir:

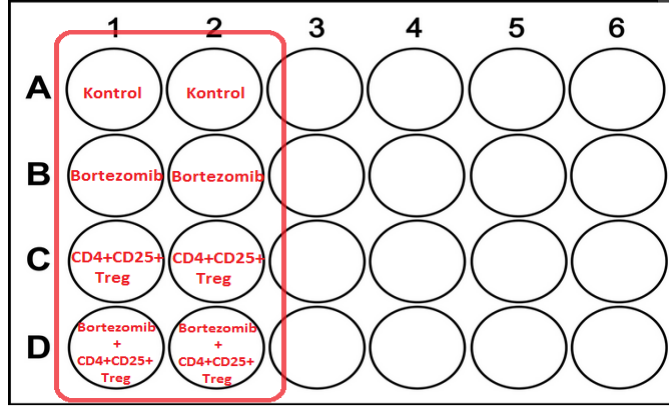
- Hastalardan elde edilen PBMC pelleti 500 µl izoton solüsyonu eklenerek hücre süspansiyonu haline getirildi.
- Hücre süspansiyonundan a ve b olarak alt sınıflandırılmış tüplere 100 'er µl aktarıldı.
- "a" olarak kodlanan tüplere 20 'şer µl FITC & PE kokteyli fare kökenli IgG1 isotipik kontrolü koyuldu.
- "b" olarak kodlanan tüplere 20 'şer µl FITC- CD4, PE-CD25, CD4/ CD25 kokteyl kiti koyuldu.
- Tüpler oda sıcaklığında 20 dk karanlıkta bekletildi.
- Bekleme sonunda tüplere %4 'lük paraformaldehit (PFA) fiksatif solüsyonundan 500 'er µl eklendi.
- Tüpler 4 °C 'de 10 dk bekletildi.
- Tüplere yaklaşık 2-4 ml izoton solüsyonu eklendi.
- 1700 rpm 'de 2 dk santrifüjlendi ve süpernatant atıldı (yıkama işlemi).
- Hücre pelletine 500 µl Permeabilizasyon solüsyonu eklendi.
- 10 dk oda sıcaklığında bekletildi.
- Tüpler bekleme süresi sonunda yıkandı ve süpernatant uzaklaştırıldı.
- Non-spesifik bağlanmaları engellemek amacıyla 2 µl Normal rat serum eklendi.
- 10 dk oda sıcaklığında bekletildi.
- Bekleme süresi bitince intrasitoplazmik boyama için a tüplerine 2,5 µl PE-Cy5 IgG2a isotipik kontrolü, b tüplerine de 20 µl PE-Cy5 konjüge anti-human Foxp3 eklendi.
- Tüpler 20 dk oda sıcaklığında karanlıkta bekletildi.
- Bekleme sonunda yıkama işlemi yapıldı.

- Hücre pelleti kalan solüsyonda resüspanse edilerek üzerine 500 'er µl izoton solüsyonu eklendi.
- Tüpler akım sitometri analizi yapılmak üzere cihaza verildi.
- İzole edilmiş olan CD4+CD25+ Treg hücrelerinin ve CD4+CD25+Foxp3+ Treg hücrelerinin bulunma yüzdesi uygun kapılamalar yapılarak analiz edildi.

6.7.6. Primer Kemik İliği Kültürü Hücre Deneyleri

6.7.6.1. Uygulama Basamakları:

- İzole edilip saklanan ve yeni tanı MM olduğu kesinleşen hastaların BMMC 'leri Bortezomib doz deneyleri ile uygun LD₅₀ dozu bulunduktan sonra şekil 8 'deki düzene göre 24 kuyucuklu platede grup başına iki kuyucuk olacak şekilde ekildi. Eşit hücre sayısında RPMI 1640 ortamı içinde kuyucuk başına 1 ml olacak şekilde (%10 FBS, %1 L-Glutamin ve %1 Penisilin/Streptomisin içeren) ekilen hücreler 37°C 'de %5 CO₂ 'lik inkübatörde 48 saat kültüre edildi.
- Grup başına ikişer kuyucukla çalışılmasının sebebi primer kültürlerde genellikle karşılaşılan enfeksiyon ya da kontaminasyonlara karşı her grup için yedekli çalışılmak istenmesidir.
- Herhangi bir kontaminasyon ve enfeksiyonla karşılaşılmayan bu çalışmada CD138 ve canlılık tayinlerinden önce bu ikişerli kuyucuklar tekrar birleştirilerek çalışılmıştır.
- Önceden tespit edilen dozda bortezomib ve izole edilen CD4+CD25+ Treg hücreler ilgili gruplara son hacim 2 ml olacak şekilde birer ml ortam içinde eklendi ve 37°C 'de %5 CO₂ şartlarında 16 saat inkübasyona bırakıldı.



Şekil 8. Primer kemik iliği kültürü grupları

6.7.7. Akım Sitometri İle CD138+ Malign Plazma Hücrelerinin (MM Hücrelerinin) Seviyelerinin Tespiti

6.7.7.1. Uygulama Basamakları:

- 24 kuyucuklu platede ikili çalışılan her grup 15 ml'lik falkon tüp içerisinde birleştirilerek grup başına total hacim 4 ml olmuştur.
- Falkon tüplere 6'şar ml daha RPMI 1640 eklenerek yıkama için 1300 rpm de 5 dk santrifüjlendi.
- Pelletler 420 µl RPMI 1640 ortamında resüspanse edildi. Bu hücre süspansiyonunun 20 µl'si 5 kat seyreltilerek tripan mavisini ile boyanıp ölü hücre miktarı THOMA lamında sayıldı.
- Hücre süspansiyonunun 300 µl 'si WST-1 ile canlılık analizi için 96 kuyucuklu platelere grup başına 100 µl den 3 er kuyucuk olacak şekilde ekildi.
- Kalan 100 µl'si ise CD138+ hücrelerin akım sitometrik tespiti için akım sitometri tüpüne aktarıldı (izotipik kontrol ve CD138 pozitifliğinin tespiti için)
- Örnekler 20 'şer µl FITC- konjuge anti-CD138 monoklonal antikoru eklendi.
- Ayrıca izotipik kontrol için de 20 µl IgG1-FITC eklendi.
- Tüpler oda sıcaklığında karanlık ortamda 20 dk inkübe edildi.

- İnkübasyon sonunda tüplere 3'er ml izoton solüsyonu eklenip 1200 rpm 'de 5 dk santrifüjlenerek yıkanıp süpernatant uzaklaştırıldı.
- Pelletler 500 µl izoton solüsyonu içinde resüspanse edilerek akım sitometri analizi için cihaza verildi.

6.7.8. Tripan Mavisi Ve WST-1 İle Total Hücre Canlılık Ve Ölümünün Değerlendirilmesi

6.7.8.1. Genel İlke:

Hücreler ile çalışma yaparken hücrelerin canlılığını belirlemek çok önemlidir. Bu amaçla tripan mavisi adı verilen bir boya kullanılmaktadır. Bu boya negatif yüklüdür. Eğer hücre membranı zarar görmemiş ve canlı bir hücre ise, boya hücre içine girmez. Ancak canlı olmayan hücreler boyayı absorbe eder ve mikroskop altında mavi görünürler. Tripan mavisi ile çalışırken dikkat edilmesi gereken nokta, hücreler tripan mavisi boyasında belirtilen süreden daha uzun kalırsa canlı hücreler de maviye boyanır.

6.7.8.2. Uygulama Basamakları:

- 24 kuyucuklu platede ikili çalışılan her grup 15 ml'lik falkon tüp içerisinde birleştirilerek grup başına total hacim 4 ml olmuştur.
- Falkon tüplere 6'şar ml daha RPMI 1640 eklenerek yıkama için 1300 rpm de 5 dk santrifüjlendi.
- Pelletler 420 µl RPMI 1640 ortamında resüspanse edildi. Bu hücre süspansiyonunun 20 µl'si 5 kat seyreltilerek tripan mavisi ile boyanıp ölü hücre miktarı THOMA lamında sayıldı. Mavi boyanan hücreler ölü hücreler olup ölü hücre yüzdesi değerlendirildi.
- Hücre süspansiyonunun 300 µl 'si ise WST-1 ile canlılık analizi için 96 kuyucuklu platelere grup başına 100 µl den 3 er kuyucuk olacak şekilde ekildi. Kuyucuk başına 10 µl WST-1 reaktifi eklenerek 2 saat inkübe edildikten sonra ELISA okuyucuda 420- 480 nm de okutuldu. Referans dalga boyu olarak 600 nm den fazlası (630 nm) seçildi.

- Canlılık yüzdeleri hesaplanırken kontrol absorbans ortalaması %100 canlılık değeri olarak kabul edilerek relatif olarak diğer grupların absorbansları % canlılık olarak hesaplandı.

6.7.9. CD138+ Malign Plazma Hücrelerinin (MM Hücrelerinin) Bortezomib Ve CD4+CD25+ Treg Hücreler İle İnkübasyonu Sonunda Canlılığının Değerlendirilmesi

Akım sitometri analizi ile elde edilen yüzde verileri CD138+ hücrelerinin total hücre popülasyonundaki bulunma yüzdesini vermesinden ötürü canlılık değerlendirilmesinde tek başına yeterli değildir. Bu nedenle total hücredeki CD138+ yüzdeleri ile WST-1 canlılık yüzdeleri arasında yapılan hesaplamalar sonucu CD138+ hücre canlılığındaki değişiklikler değerlendirildi. Hesaplama şekil 9 'deki gibidir.

$$\frac{(\text{gruptaki\%CD138+}) \times (\%\text{canlılık})}{(\text{Kontrol\%CD138+}) \times (\%100 \text{ canlılık})}$$

Şekil 9. CD138+ Hücrelerin Canlılık Değerlendirilme Formülü

Hesaplanan bu yüzde değerleri, tripan mavisi ile bulunan total hücre sayısı üzerinden relatif yüzdelere tekrar hesaplanmıştır.

6.8. Araştırma Planı ve Takvimi

Dr. Behçet Uz Çocuk Hastalıkları ve Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesinden 2010 yılında İzmir 4 no'lu Klinik Araştırmalar Etik Kurulundan B-10-4-ISM-4-35-65-72 sayılı etik kurul onayı alınması



2011 KB. SAĞ. 023 kodlu projenin Bilimsel Araştırma Projeleri Destekleme Biriminden kabulü, malzeme siparişleri ve temini (2010-2011)



Dokuz Eylül Üniversitesi Hematoloji Polikliniğine Multipl Miyelom ön tanısı ile gelen hastalara Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formunu okutulup imzalatılması ve bu hastalardan rutin prosedürler sırasında uzman doktor tarafından EDTA lı iki tüpe toplam 4 ml olacak şekilde kemik iliği ve mor kapaklı EDTA lı bir tüpe 2 ml periferik kan alımı (11.04.2011-18.03.2013 arası)



Örnek alımından hemen sonra ficoll dansite gradienti santrifüjü yolu ile izole edilen PBMC ve BMMC ile Treg izolasyonu, canlılık testleri, primer kültür deneyleri ve akım sitometri deneylerinin gerçekleştirilmesi (11.04.2011- 23.03.2013 arası)



Her hastanın tüm grupları için uygun pencereleme stratejileri ile Treg ve CD138+ hücre popülasyonlarının yüzdelerinin tespit edilmesi ve bulunan CD138+ hücre yüzdesi ve canlılık yüzdesi ile total hücre sayımlarına göre hesaplamaların yapılması (2011-2013 arası)



Verilerin Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analiz (2013-2014)



Tez veri kayıt defterine tüm verilerin günlük olarak işlenmesi ve deney sonuçlandığında kayıtların kontrolü (11.04.2011 – 31.05.2013)



Literatür güncellenmesi, derlenmesi ve tezin yazılması (01.10.2013 – 31.03.2014)



Tezin yayına dönüştürülmesi ve dergiye gönderilmesi

6.9. Verilerin Değerlendirilmesi

6.9.1. Akım Sitometri Bulgularının Değerlendirilmesi

Akım sitometri analizleri için pencereleme stratejileri oldukça önemlidir. Her olgu için antikor eklenmemiş olan hücreler cihazda okutularak boyanmamış olan hücrelerin akım sitometri nokta dağılım diyagramındaki yerleşimi tespit edildi. Bu yerleşime göre alınan pencereye göre hedeflenen hücre yüzdeleri kaydedildi. Bu yüzdelere göre her olgu ve gruptaki hücre sayılarına göre hesaplanarak tekrar yüzde

değerleri hesaplandı. Buna göre Treg ile bortezomib kombinasyonundaki CD138+ malign miyelom hücre canlılığı yüzdesinden bortezomibin tek başına verildiği gruptaki CD138+ malign miyelom hücre canlılığı yüzdesi çıkarıldığında %5 den fazla artış varsa, Treg hücrelerin bortezomib etkisini azalttığı, %5 den fazla azalma varsa, Treg hücrelerin bortezomib etkisini arttırdığı, %5 den az değişiklik varsa bortezomib etkisini değiştirmede şeklinde yorumlanmıştır.

6.9.2. İstatistiksel Verilerin Değerlendirilmesi

Bulgular SPSS 15.0 programı ile Mann Whitney U non-parametrik testi ve ki-kare testleri ile istatistiksel olarak analiz edilmiştir. Sağ kalım analizleri Kaplan-Meier testi ile gerçekleştirilmiştir. $P < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

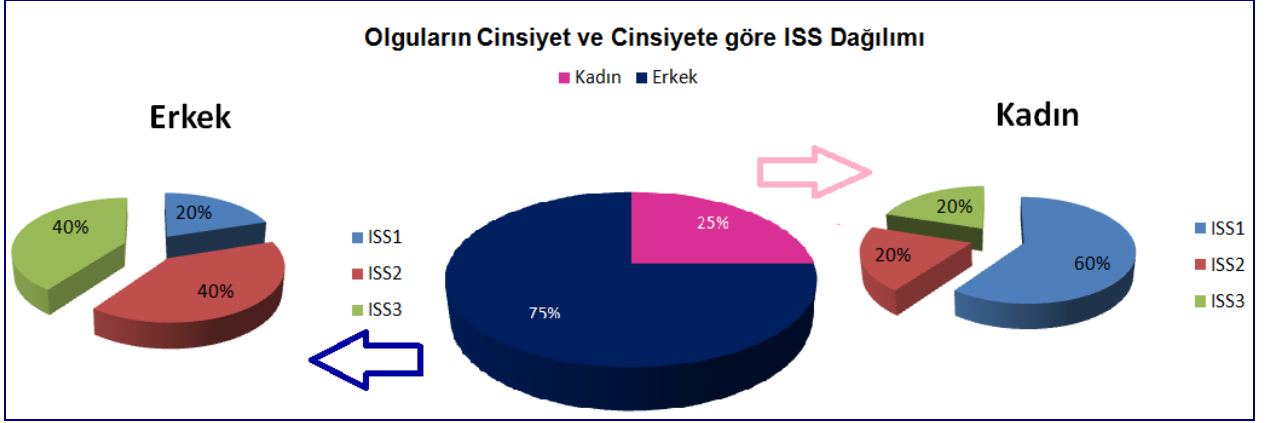
6.10. Etik Kurul Onayı

Dr. Behçet Uz Çocuk Hastalıkları ve Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi İzmir 4 no'lu Klinik Araştırmalar Etik Kurulundan B-10-4-ISM-4-35-65-72 sayılı etik kurul onayı alınmıştır. (Ek 2)

7. BULGULAR

7.1. Olgulara Genel Bakış

Tüm hastalar daha önce tedavi almamış yeni tanı MM'dur. Yaş ortalaması $60,95 \pm 9,064$ (49-81) olup 5 tanesi kadın (%25) 15 tanesi erkektir (%75). Yeni tanı anında ISS, Durie-Salmon evreleri, Ig tipleri, serum albumin ve $\beta 2M$ düzeyleri, serum kalsiyum, hemoglobin değerleri, kan sedimantasyon durumu, santral miyelomatoza varlığı ve ek hastalık durumu gibi klinik parametreleri kaydedilmiştir. 20 olgudan 6 'sı ISS 1 (%30), 7 'si ISS 2 (%35), 7 'si ISS 3 (%35) evrededir. Olguların cinsiyetlere göre ISS evre dağılımı grafik 1 'de gösterilmiştir.



Grafik 1. Olguların Cinsiyete Göre ISS Evre Dağılımı

Durie Salmon evreleme sistemine göre 20 olgudan 4 'ü evre 1 (%23,5), 1 ' i evre 2 (%5,9), 12 olgu evre 3 'dür (%70,6). Verilerine ulaşılan 16 olgunun 2 'si IgA (%12,5) 7 'i IgG ağır zincir (%43,8), 4 'ü IgM (%25), 2 'si L hafif zincir (%12,5) ve 1 'i plazmasitom (%6,3) özelliktedir. Serum albumin değerlerine bakıldığında verisine ulaşılan 19 olgunun 13 'ünde >3,5 g/dL (%68,4) ve 6 'sında <3,5 g/dL (%31,6) değerindedir. Verisine ulaşılan 18 olgunun 6 'sının β 2M düzeyi <3,5 mg/L (%33,3), 6 'sının 3,5 – 5,5 mg/L (%33,3) arasında ve 6 'sının ise >3,5 mg/L (%33,3) düzeyindedir. Verilerine ulaşılan 19 olgunun tümünde kan sedimantasyonunda artış vardır. Tüm olguların serum kalsiyum değerlerine bakıldığında 18 olgunun <12 mg/dL (%90) , 2 olgunun >12 mg/dL (%10) olduğu görülmüştür.

Ayrıca tüm olguların 8'i >10 g/dL (%40), 10 'u 8-10 g/dL (%50) ve 2 'si <8 g/dL (%10) Hb miktarına sahiptir. Verisine ulaşılan 15 olgunun 11'inde ek hastalık yoktur (%73,3), 1 'inde Hepatit B (%6,7), 1 'inde amiloidoz (%6,7), 1 'inde Diabetes Mellitus (%6,7) ve 1 'inde mesane kanseri (%6,7) ek hastalıkları mevcuttur. Tüm olgulara ait klinik parametreler tablo 9 'da belirtilmektedir.

Tablo 9. Tüm Olgulara Ait Yeni Tanı Anındaki Klinik Parametreler

Olgu no	E/K	Yaş	ISS	Durie-Salmon	Kemik Lez.	Serum Ca	Hb	Serum Alb.	$\beta 2M$	Ig Tipi	Ek Hastalık	Sant. Miy.
1	E	70	2	1	Yok	<12	>10	<3,5	3,5-5,5	IgG	Hepatit	yok
2	E	57	1	1	Yok	<12	8-10	>3,5	<3,5	IgM	Yok	yok
3	K	57	1	3	Var	<12	8-10	>3,5	<3,5	IgM	Yok	yok
4	E	52	3	3	Yok	<12	8-10	>3,5	>5,5	IgM	Diabetes Mellitus	yok
5	E	52	3	3	Yok	<12	>10	<3,5	>5,5	IgG	Yok	yok
6	E	51	1	3	Var	<12	>10	>3,5	3,5-5,5	Plazmasitom	Yok	var
7	E	55	2	2	2	<12	<8	<3,5	3,5-5,5	IgG	Yok	var
8	K	57	3	3	Var	>12	8-10	>3,5	>5,5	IgA	Yok	yok
9	E	56	3	3	Var	<12	>10	>3,5	>5,5	IgA	Yok	yok
10	K	63	2	3	Var	<12	<8	>3,5	<3,5	IgG	Yok	yok
11	E	74	2	3	Var	<12	8-10	>3,5	3,5-5,5	Hafif zincir	Yok	yok
12	E	70	3	1	Yok	<12	>10	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
13	E	62	1	N/A	Var	<12	8-10	>3,5	<3,5	IgM	Mesane Ca	yok
14	E	70	3	N/A	Yok	<12	8-10	<3,5	>5,5	IgG	Yok	yok
15	E	61	3	3	Var	>12	>10	>3,5	>5,5	Hafif zincir	KOAH	yok
16	E	81	2	N/A	Var	<12	8-10	<3,5	3,5-5,5	IgG	Lenfoma	yok
17	E	55	2	3	Var	<12	>10	<3,5	N/A	IgG	KOAH	yok
18	K	54	1	3	Yok	<12	8-10	>3,5	<3,5	IgG	Yok	yok
19	K	73	1	3	Yok	<12	8-10	>3,5	N/A	IgG	Yok	yok
20	E	49	2	1	Yok	<12	>10	>3,5	3,5-5,5	Hafif zincir	Yok	yok

Cinsiyet: E/K (E:Erkek, K:Kadın), Yaş, ISS evresi, Durie-Salmon evresi, Kemik Lez. (Kemik lezyonu varlığı), Serum Ca. (Serum kalsiyum düzeyi, mg/dL), Hb. (Hemoglobin miktarı, g/dL), Serum Alb. (Serum albumin değeri, g/dL), $\beta 2M$ (beta-2-mikroglobulin düzeyi, mg/L), Ig Tipi, Ek hastalık varlığı, Sant. Miy. (Santral miyelomatoz varlığı).

Bu klinik parametrelere ek olarak örnek alımından itibaren olgular Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Hematoloji Polikliniği tarafından takip edildiğinde çalışmanın sonlandırıldığı sürece kadar olguların relaps gelişimi ve sağ kalımları ile ilgili olarak bilgiler edinilmiştir. Buna göre bilgisine ulaşılan 18 olgudan 10 olguda relaps gözlenmediği (%55,6) ve 8 olguda (%44,4) relaps geliştiği

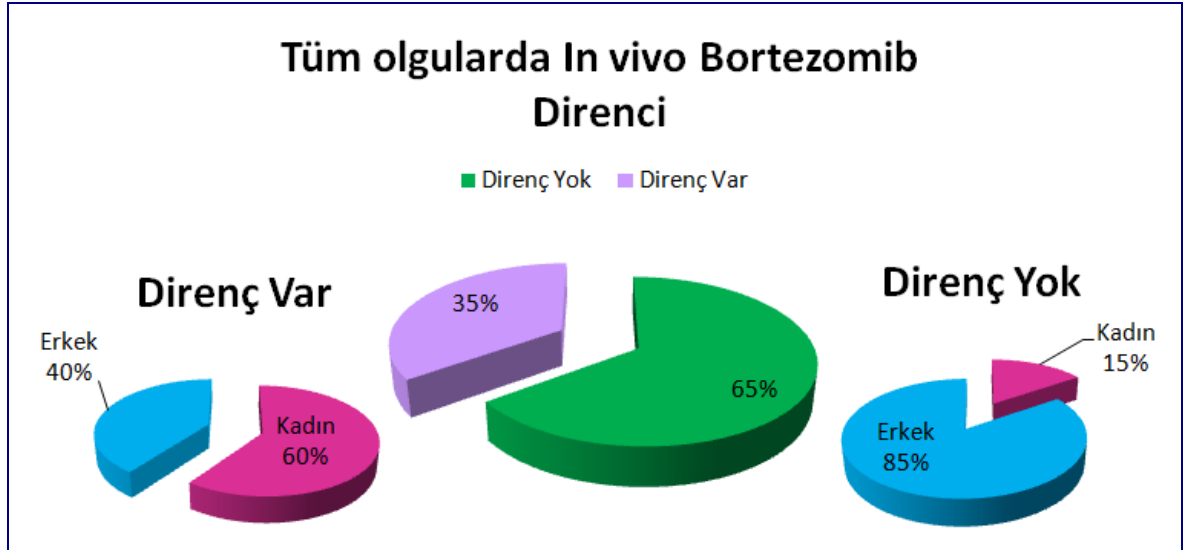
görülmüştür. Olguların sağ kalımları değerlendirildiğinde 15 olgunun sağ olduğu (%75), 5 olgunun ex olduğu (%25) görülmüştür. Her olgu için bu veriler tablo 10 'da yer almaktadır.

Tablo 10. Olguların takibinde relaps gelişimi ve sağ kalım bilgileri

Olgu No.	Sağ veya Ex durumu	Relaps gelişimi
1	sağ	yok
2	sağ	yok
3	sağ	var
4	sağ	N/A
5	ex	var
6	ex	var
7	ex	var
8	ex	var
9	sağ	yok
10	sağ	var
11	sağ	yok
12	sağ	yok
13	sağ	yok
14	sağ	yok
15	ex	var
16	sağ	var
17	sağ	yok
18	sağ	yok
19	sağ	yok
20	sağ	yok

Çalışma başlangıcında hiçbir tedavi almamış olan bu olgular örnek alımı ardındaki süreçte klinikte uygun görülen rutin tedavilerini almışlardır. Buna göre çalışma sonunda hastaların in vivo bortezomib direnci geliştirip geliştirmediği klinik değerlendirmelere göre incelenmiştir. Hastaların bortezomibe dirençli olup olmadığı Uluslararası Miyelom Çalışma Grubu tarafından tanımlanmış olan tedavi

yanıt kriterlerine göre değerlendirilmektedir. Buna göre hastaların rutin preosedürler sırasında takip edilen serum ve idrar elektroforezi ile immün fiksasyon testleri sonucu M protein miktarındaki değişimler, normal/ serbest hafif zincir oranı, kemik iliğinde klonal hücre varlığı/ yokluğu, anemi durumu değerlendirilmektedir. Bu kriterlere göre hastaların klinik bortezomib tedavi yanıtları incelendiğinde 13 olguda bortezomib direnci görülmediği yani tedaviye yanıt verdiği (%65), 7 olguda ise bortezomib direnci geliştiği yani bortezomib tedavisine yanıt vermediği (%35) görülmüştür. Tüm olgularda ve cinsiyete göre in vivo bortezomib direnç dağılımı Grafik 2 'de yer almaktadır.



Grafik 2. Tüm olgularda ve cinsiyete göre in vivo bortezomib direnç dağılımı

7.2. İn vitro Bortezomib LD50 Doz Bulguları

Yeni tanı MM tanılı olgularının BMMC 'leri 96 kuyucuklu plate içine kuyucuk başına 10000 hücre olacak şekilde kontrol grubu dahil 8 grup 4 kuyucuk tekrarlı olacak şekilde ekilerek farklı bortezomib dozları denenerek her hasta için LD50 dozu tespit edildi. Bortezomib ana stoğundan dilüsyonlar yapılarak 0,01µM, 0,1 µM, 2 µM, 5 µM, 10 µM, 50 µM ve 100 µM olarak uygulandığında, bazı hastalarda 50 µM ve 100 µM lik dozlar arasındaki canlılık yüzdelerindeki büyük farklılık nedeniyle ve 0,01 µM lik dozun düşük etkisi nedeniyle doz planı değiştirilerek şekil 5 de görüldüğü üzere 0,1 µM, 2 µM, 5 µM, 10 µM, 50 µM, 75 µM ve 100 µM olarak çalışmaya devam edildi. Bunun sonucuna göre tüm olgularda bortezomib LD50

doz dağılımı: 3 olgu için 0,01 µM (%15), 3 olgu için 5 µM (%15), 6 olgu için 50 µM (%50), 4 olgu için 75 µM (%20) ve 4 olgu için 100 µM (%20) olarak tespit edildi. Her hasta için ayrı ayrı tespit edilen bu dozlar primer BMMC 'lerindeki deneylerde uygulandı.

7.3. Manyetik olarak izole edilen CD4+CD25+ Treg hücrelerin saflığının akım sitometrik konfirmasyon bulguları

Her olgunun kendi PBMC 'lerinden manyetik yolla CD4+CD25+ Treg hücreleri izole edildiğinde THOMA lamı ile sayıldı ve tüm olgular için ortalama 2×10^4 hücre tespit edildi. İzole edilen Treg hücrelerinin saflığı akım sitometrik analizle kontrol edildiğinde CD4+ CD25+ Treg hücrelerin %92 - %100 arasında, ortalama CD4+CD25+ Treg hücre yüzdesinin %97,04 ($\pm 1,887$) olduğu saptandı. İmmüsupresif Treg hücrelerin belirteci olan transkripyon faktörü Foxp3 ekspresyonunun olduğu CD4+ CD25+ Foxp3+ fenotipindeki Treg hücreleri %91- %100 arasında, ortalama %97,98 ($\pm 2,759$) olarak saptandı. Her hastanın PBMC 'lerinden izole edilen bu Treg hücreleri primer BMMC 'lerindeki deneylerde uygulandı. 20 olguya ait CD4+CD25+ ve CD4+CD25+Foxp3+ Treg hücre saflık yüzdeleri tablo 11 'de gösterilmektedir.

Tablo 11. Tüm Olguların PBMC'lerinden izole edilen Treg hücrelerin saflık yüzdeleri

Olgu No.	CD4+CD25+ Treg yüzdesi	CD4+CD25+Foxp3+ Treg yüzdesi
1	98	97
2	99	98
3	98	97
4	96	91
5	97	98
6	98	99
7	97	99
8	97	99
9	97	95
10	96	94

11	94	98
12	92	98
13	99	98
14	95	100
15	98	92
16	94	91
17	98	99
18	100	100
19	100	100
20	98	100

7.4. Primer BMMC kültüründe Bortezomib, Treg ve Bortezomib+Treg kombinasyonunun CD138+ miyelom hücre canlılığına etkisinin akım sitometrik ve WST-1 bulguları

Ortalama $4,5 \times 10^4$ hücre ekilen primer BMMC 'leri şekil 8 'deki plana göre kontrol, bortezomib, hastanın kendi PBMC 'lerinden izole edilen Treg hücreleri ve bortezomib, Treg kombinasyonu uygulanan gruplarda 16 saat inkübasyon sonunda hücre canlılıkları WST-1 ile tespit edildi. Her grup için CD138+ hücre yüzdeleri akım sitometrik olarak tespit edildi. Kontrol gruplarında CD138+ miyelom hücreleri %65 - %98 arasında, ortalama %81,95 ($\pm 8,12$), bortezomib verilen gruplarda CD138+ miyelom hücreleri %60 - %98 arasında, ortalama %80,09 ($\pm 9,02$), Treg verilen grupta CD138+ miyelom hücreleri %58 - %99 arasında, ortalama %81,14 ($\pm 9,76$) ve bortezomib+Treg kombinasyonunun verildiği grupta CD138+ miyelom hücreleri %61 - %99 arasında, ortalama %79,50 ($\pm 9,86$) olarak tespit edildi. 20 olgunun her grupta tespit edilen CD138+ Miyelom hücre yüzdeleri tablo 12 'de gösterilmektedir.

Tablo 12. Tüm olguların BMMC primer kültürlerinde her grup için tespit edilen CD138+ hücre yüzdeleri

Olgu No.	Kontrol grubu	Bortezomib verilen grup	Treg verilen grup	Bortezomib+ Treg verilen grup
1	65	77	72	73
2	86	86	82	80
3	75	75	74	71
4	74	60	58	61
5	91	88	87	89
6	92	87	92	77
7	81	81	80	79
8	76	74	75	76
9	89	89	89	89
10	88	90	88	91
11	88	83	95	92
12	85	86	86	87
13	75	72	73	74
14	79	76	78	77
15	85	81	84	83
16	85	85	84	83
17	98	98	99	99
18	80	78	84	77
19	76	70	73	71
20	71	65	70	62

Her olgu için tüm gruplarda WST-1 ile total hücre canlılıkları kontrol grubunun absorbans ortalamasına göre canlılığı %100 kabul edilerek diğer grupların relatif canlılık yüzdeleri değerlendirildi. Buna göre, bortezomib verilen gruplarda total canlılık %21 - %105 arasında, ortalama %62,94 ($\pm 18,51$), Treg

verilen grupta total canlılık %23 - %97 arasında, ortalama %71,99 ($\pm 18,93$), bortezomib + Treg kombinasyonunun verildiği grupta total canlılık %19 - %87 arasında, ortalama %57,02 ($\pm 18,72$) olarak tespit edildi. 20 olgu için WST-1 analizine göre her gruptaki total canlılık yüzdeleri tablo 13 'de gösterilmektedir.

Tablo 13. Tüm olguların BMMC primer kültürlerinde her grup için tespit edilen total hücre canlılık yüzdeleri

Olgu No.	Kontrol grubu	Bortezomib verilen grup	Treg verilen grup	Bortezomib+ Treg verilen grup
1	65	68	68	69
2	86	65	68	36
3	75	63	51	40
4	74	66	76	55
5	91	59	57	33
6	92	68	92	56
7	81	76	90	84
8	76	42	81	63
9	89	47	74	66
10	88	43	60	35
11	88	74	71	45
12	85	55	80	58
13	75	21	23	19
14	79	53	46	60
15	85	64	85	77
16	85	85	91	85
17	98	104	95	88
18	80	56	70	48
19	76	62	82	60
20	71	50	62	37

Şekil 7 'de belirtilen hesaplama göre her grup için canlı CD138+ hücre yüzdeleri, kontrol grubunda %65 - %98 arasında, ortalama %81,95 ($\pm 8,12$),

bortezomib verilen grupta %21 - %104 arasında, ortalama %60,93 ($\pm 17,43$), Treg verilen grupta %23 - %95 arasında, ortalama %71,03 ($\pm 17,84$) ve bortezomib + Treg kombinasyonunun verildiği grupta %19 - %88 arasında, ortalama %55,65 ($\pm 19,18$) olarak tespit edildi. 20 olgunun şekil 7 'deki hesaplama göre her gruptaki canlı CD138+ malign miyelom hücre yüzdeleri tablo 14 'de gösterilmektedir.

Tablo 14. Tüm olguların BMMC primer kültürlerinde her grup için tespit edilen canlı CD138+ malign miyelom hücre yüzdeleri

Olgu No.	Kontrol grubu	Bortezomib verilen grup	Treg verilen grup	Bortezomib+ Treg verilen grup
1	65	68	68	69
2	86	65	68	36
3	75	63	51	40
4	74	66	76	55
5	91	59	57	33
6	92	68	92	56
7	81	76	90	84
8	76	42	81	63
9	89	47	74	66
10	88	43	60	35
11	88	74	71	45
12	85	55	80	58
13	75	21	23	19
14	79	53	46	60
15	85	64	85	77
16	85	85	91	85
17	98	104	95	88
18	80	56	70	48

19	76	62	82	60
20	71	50	62	37

Her hasta için primer kültüre edilen BMMC sayısı eşit olmadığından yukarıda tespit edilen yüzde değerlerinin karşılaştırılması hatalı bir değerlendirme olacaktır. Bu nedenle her hasta ve her grup için WST-1 analizi ile eş zamanlı olarak yapılan Tripan mavisi boyanması ile yapılan THOMA lamı sayımına göre bulunan total hücre sayısı üzerinden relatif yüzdeler tekrar hesaplandı. Buna göre bortezomib verilen grupta canlı CD138+ hücre yüzdesi %16,3- %114,4 arasında, ortalama %67,65 ($\pm 25,45$), Treg verilen grupta canlı CD138+ hücre yüzdesi %16,8 - %115,1 arasında, ortalama %80,17 ($\pm 26,49$) ve bortezomib + Treg kombinasyonunun verildiği grupta canlı CD138+ hücre yüzdesi %7 - %106,5 arasında, ortalama %60,16 ($\pm 26,43$) olarak tespit edildi. 20 olgunun her grubundaki primer BMMC hücre sayılarına göre relatif olarak tekrar hesaplanan canlı CD138+ malign miyelom hücre yüzdeleri tablo 15 'de gösterilmektedir.

Tablo 15. Tüm olgularda her gruptaki primer BMMC hücre sayılarına göre relatif olarak tekrar hesaplanarak tespit edilen canlı CD138+ malign miyelom hücre yüzdeleri

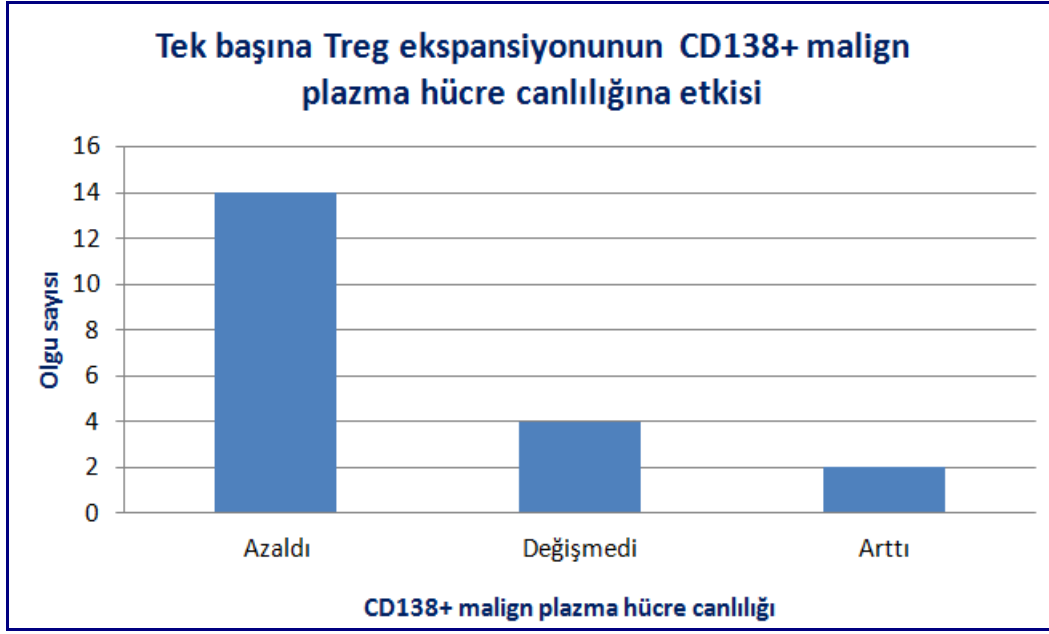
Olgu No.	Kontrol grubu	Bortezomib verilen grup	Treg verilen grup	Bortezomib+ Treg verilen grup
1	100	105,6	104,6	106,5
2	100	74,9	78,4	41,8
3	100	83,0	67,5	52,9
4	100	88,9	103,4	74,4
5	100	38,0	38,9	25,0
6	100	68,0	83,5	62,3
7	100	95,7	115,1	92,7
8	100	40,8	91,3	67,5

9	100	36,5	66,0	65,6
10	100	39,1	60,3	29,7
11	100	73,0	53,6	33,0
12	100	67,7	90,1	62,2
13	100	16,3	16,8	7,0
14	100	50,5	46,1	41,0
15	100	53,4	87,0	57,0
16	100	87,7	104,8	93,9
17	100	114,4	103,6	98,6
18	100	65,6	92,2	58,0
19	100	80,8	111,5	83,8
20	100	73,1	88,7	50,2

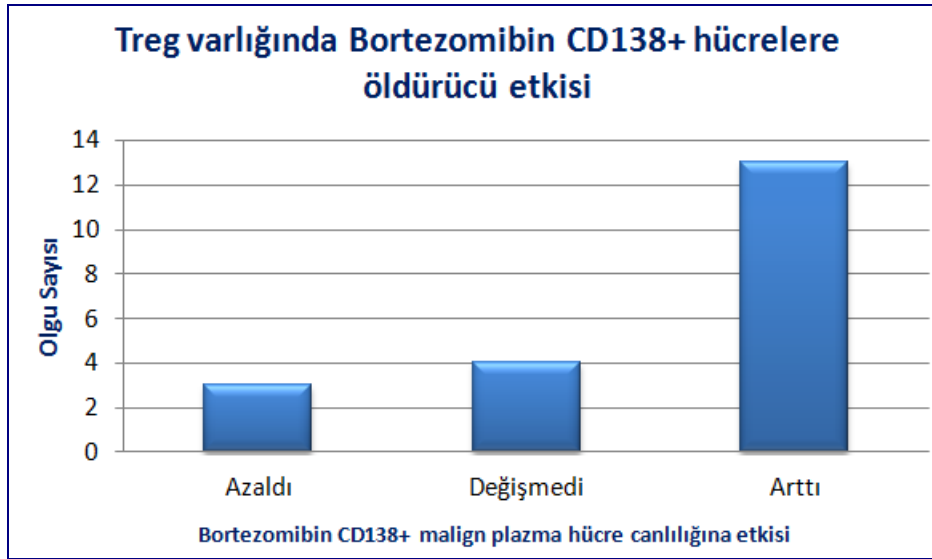
7.5. Treg hücrelerinin bortezomibin malign miyelom hücreleri üzerine öldürücü etkinliğine olan etkisi

Primer BMMC 'lerine tek başına bortezomib verildiğinde 20 olgunun 2 'sinde CD138+ malign miyelom hücrelerini öldürmediği (%10) görülmüştür. Bu durum ilaç direnci olabileceğini düşündürmüştür. Treg hücrelerinin tek başına uygulanması sonucunda CD138+ malign miyelom hücre canlılığına etkisi değerlendirildiğinde CD4+CD25+ Treg hücrelerin 14 olguda canlılığı azalttığı (%70), 4 olguda değiştirmedeği (%20) ve 2 olguda canlılığı arttırdığı (%10) görülmüştür (Grafik 3).

Treg hücrelerinin bortezomib ile birlikte primer BMMC 'ne uygulanması sonucunda 20 olgunun 3'ünde bortezomibin öldürücü etkisini azalttığı (%15), 4 olguda bortezomibin öldürücü etkisini değiştirmedeği (%20) ve 13 olguda bortezomibin öldürücü etkisini arttırdığı (%65) görülmektedir (Grafik 4).



Grafik 3. Treg hücrelerinin CD138+ malign miyelom hücre canlılığına etkisi



Grafik 4. Treg varlığında bortezomibin CD138+ hücelere öldürücü etkisindeki değişimler

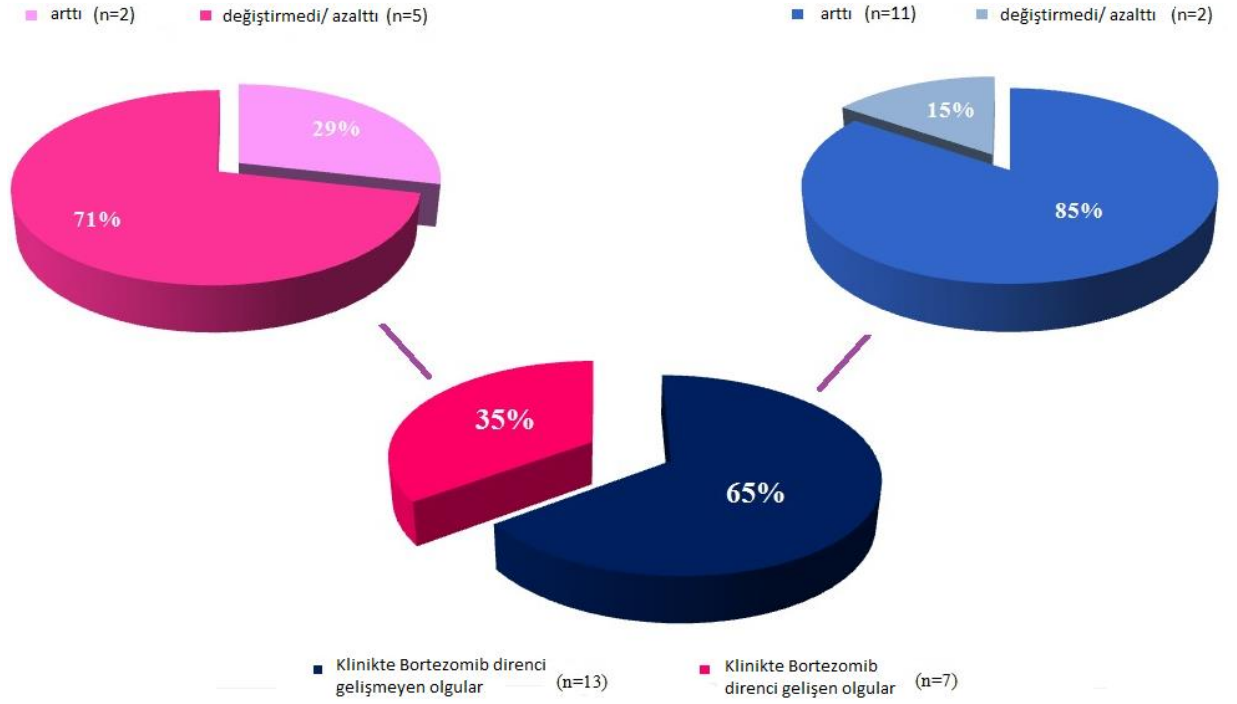
7.6. In vivo bortezomib direnci olan/ olmayan hastaların in vitro Treg ekspansiyonunun bortezomib kombinasyonu ile malign plazma hücre canlılığına etkisi

Tüm hastaların dosyalarını incelenerek klinikte in vivo bortezomib direnci geliştirip geliştirmedeği değerlendirilmiştir. Bu bilgiler ile in vitro bortezomib yanıtları değerlendirildiğinde in vitro bortezomin testinde duyarlı olmasına karşın klinik direnç gösteren iki olgumuzda in vitro olarak Treg + Bortezomib verildiğinde hücre ölümünün tek başına bortezomib verilmesine göre azaldığı (%26,7) görülmüştür. Klinik olarak bortezomibe direnç göstermeyen iki olguda in vitro bortezomib duyarlılığı düşük çıkmıştır.

7.7. İstatistik Analiz Bulguları

İn vitro olarak hastalardan elde edilen malign miyelom hücrelerine aynı hastaların periferik kanlarından izole edilen Treg hücreler verilerek ekspansiyonu sağlandığında çok geniş bir hücre ölüm yanıt dağılımı saptanmıştır. Tregler olguların çoğunda hiçbir öldürücü etki yapmamış ya da çok düşük etki yapmıştır. Treglere in vitro hücre ölümü şeklinde yanıt veren MM olgularımıza baktığımızda bortezomin direnci olmaması ile istatistiksel anlam saptanmıştır ($p=0,024$).

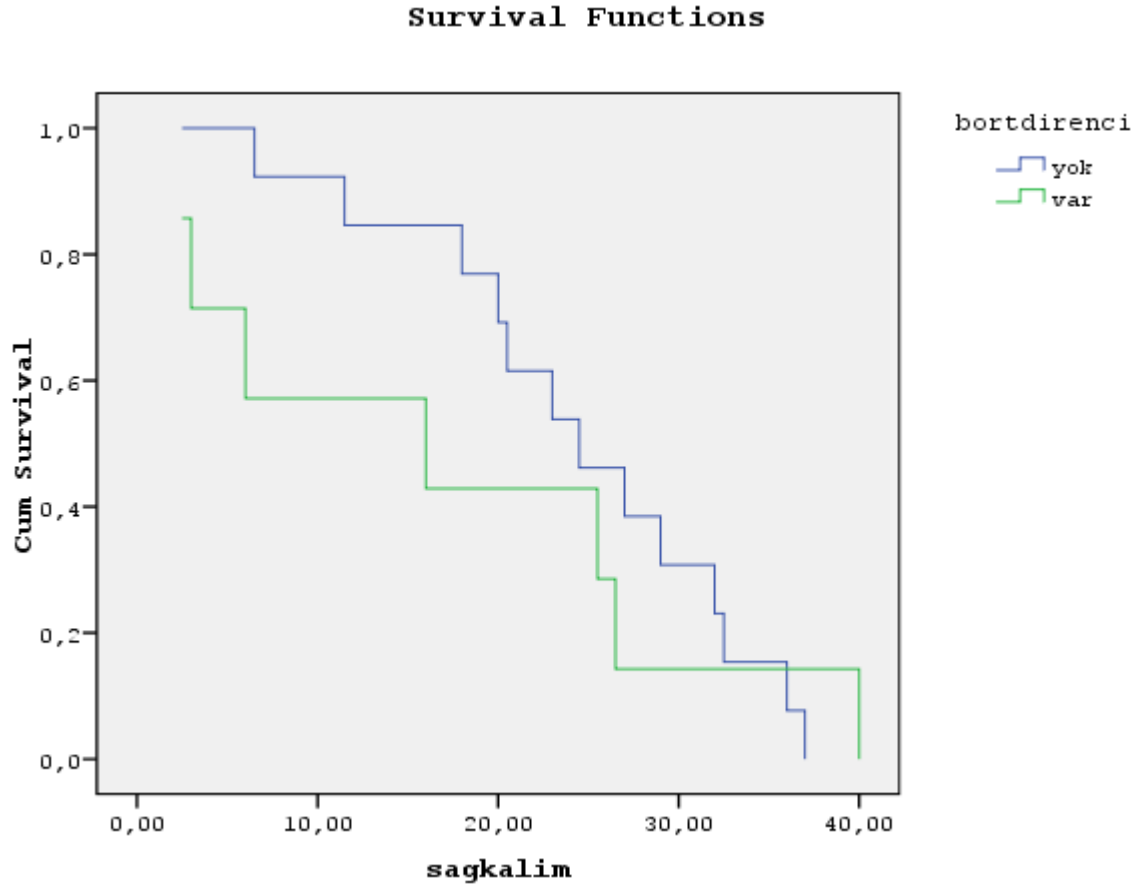
Klinikte bortezomib direnci olmayan hastalarda ex vivo ekspanse edilen Treg hücreleri malign plazma hücrelerine bortezomib ile birlikte verildiğinde bortezomibin öldürücü etkisini arttırdığı olguların klinikte bortezomib direnci göstermemesi aralarında istatistiksel anlamlı bir korelasyon olduğunu ortaya koymuştur ($p=0,022$). Treg hücrelerin ex vivo ekspansiyonunun bortezomib anit-tumor etkinliğine olan etkisinin klinikteki bortezomib direnci durumuna göre dağılımı grafik 5 de gösterilmektedir.



Grafik 5. Treg hücrelerin ex vivo ekspansiyonunun bortezomib anit-tumor etkinliğine olan etkisinin klinikteki bortezomib direnci durumuna göre dağılımı

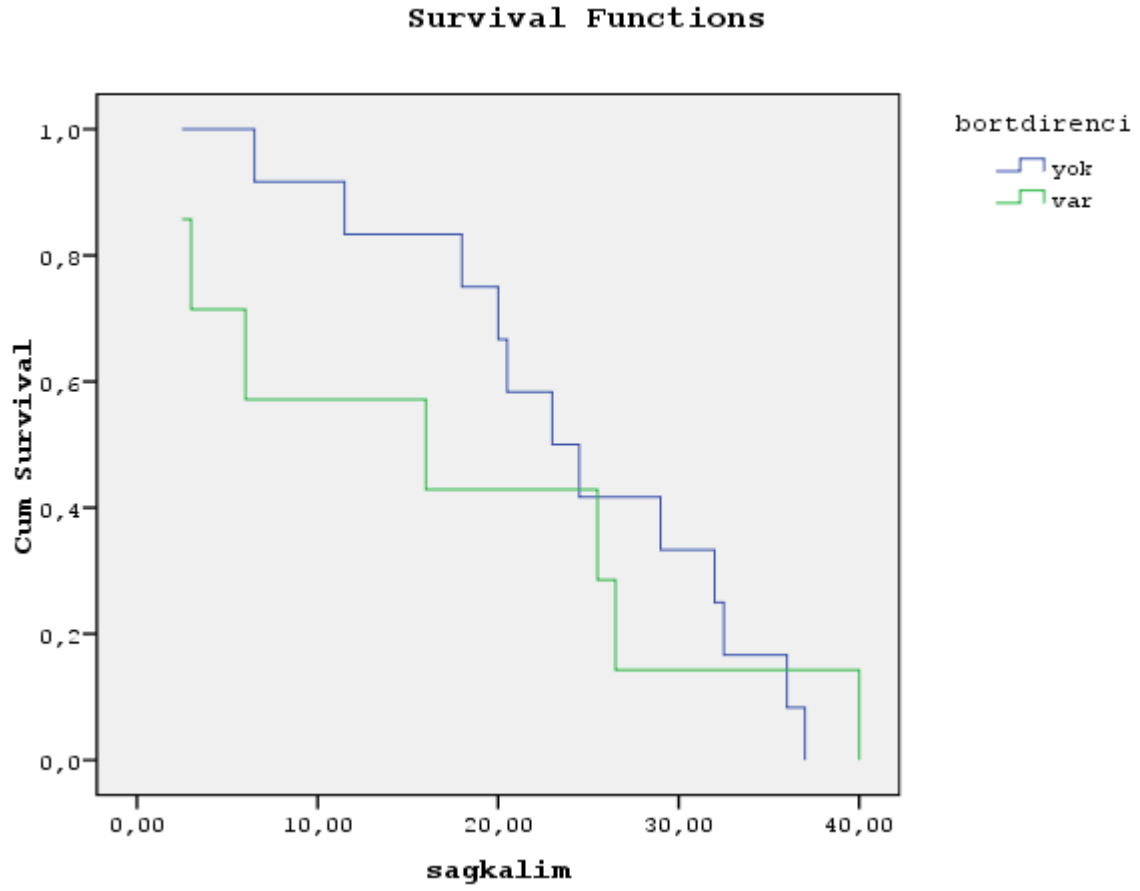
Treg hücrelerin Bortezomibin CD138+ malign plazma hücreleri üzerine olan öldürücü etkinliğine olan etkisini ISS 1 ve 2 erken, ISS 3 geç evre olarak gruplandırılarak değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamamıştır ($p>0,05$). Benzer şekilde bu ilişki cinsiyet, albumin, hemoglobin, okit varlığı ve kemik lezyonu parametreleriyle ilişkisi değerlendirildiğinde yine istatistiksel anlamlı bir ilişki saptanamamıştır ($p>0,05$).

16- 41 aylık ortalama 29 ay ve ortanca 24 ay izlenmiş olan olgular için sağkalım ve relaps durumlarına göre Kaplan- Meier testine göre bortezomib direnci ile sağkalım arasında ilişki bulunmamıştır ($p=0,652$) (grafik 6).



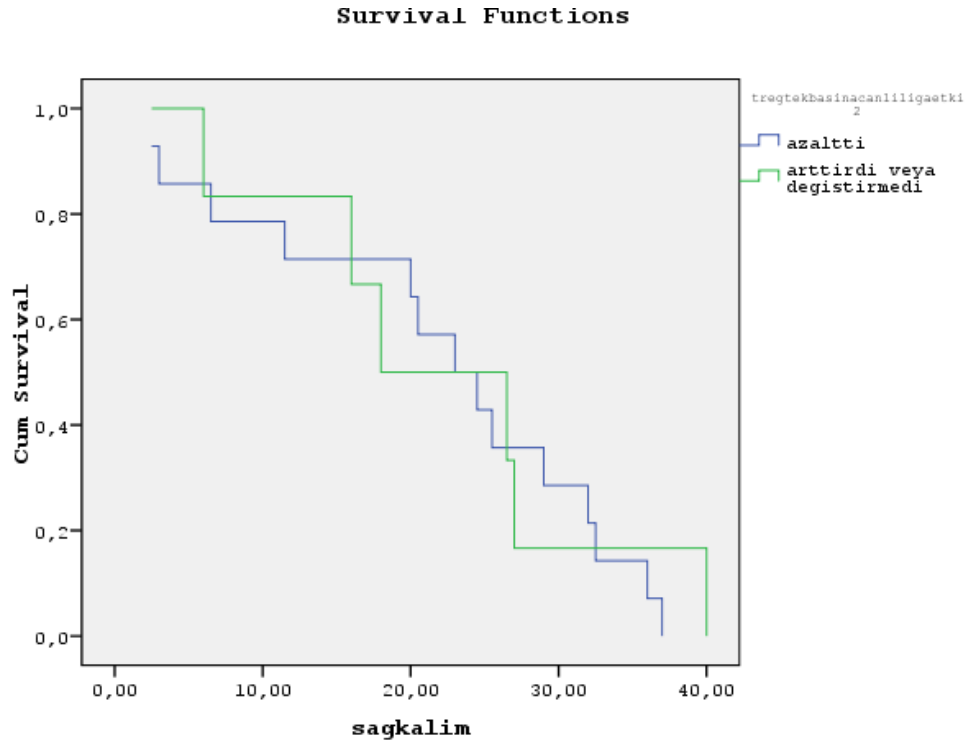
Grafik 6. Bortezomib direnci ve sağkalım ilişkisi analizi

Aynı zamanda relaps gelişimi göz önünde bulundurularak bortezomib direnci ile hastalıksız sağkalım Kaplan-Meier testi ile değerlendirildiğinde Log Rank analizine göre istatistiksel anlamlı bir sonuç bulunamamıştır ($p=0,712$) (grafik 7).

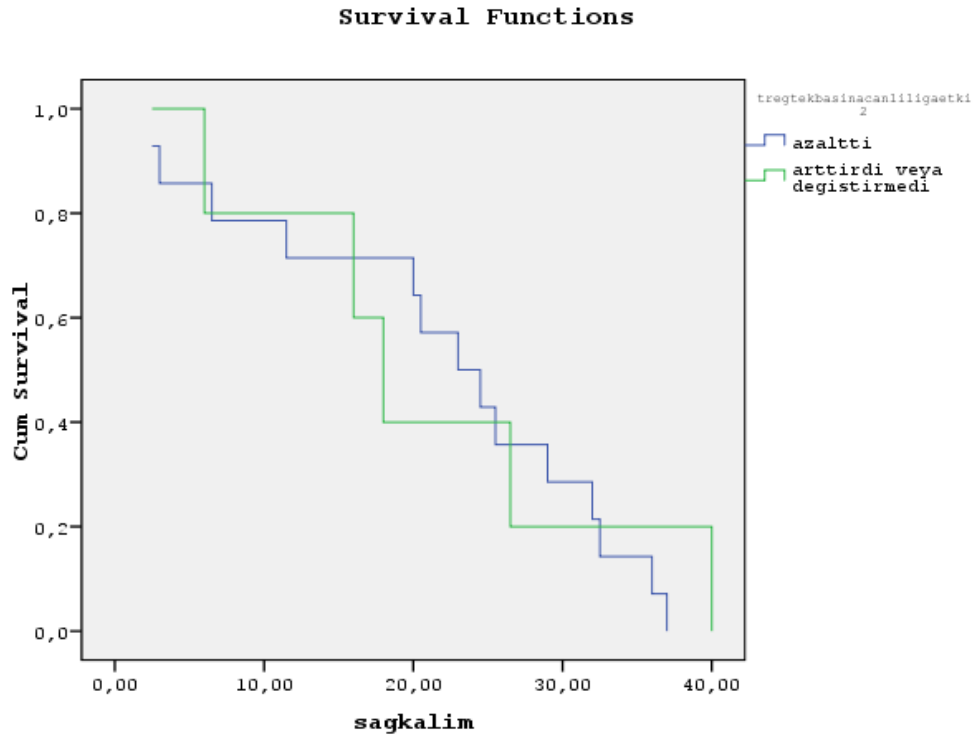


Grafik 7. Bortezomib direnci ile hastalıksız sağkalım ilişkisi analizi

Tek başına Treg hücre ekspansiyonunun 24 saatlik inkübasyon sonunda CD138+ malign miyelom hücre canlılığına azaltan veya değiştirmeyen/ arttıran etkinliği ile sağkalım Kaplan-Meier testi ile değerlendirildiğinde Log Rank analizine göre istatistiksel anlamlı bir sonuç bulunamamıştır ($p=0,733$) (grafik 8). Aynı şekilde Treg hücre ekspansiyonunun bu etkinliği ile hastalıksız sağkalım arasında da istatistiksel anlamlı ilişki bulunmamıştır ($p=0,732$) (grafik 9).



Grafik 8. Treg ekspansiyonun CD138+ malign miyelom hücre canlılığına etkinliği ile sağkalım ilişkisi



Grafik 9. Treg ekspansiyonun CD138+ malign miyelom hücre canlılığına etkinliği ile hastalıksız sağkalım ilişkisi

8. TARTIŞMA

Bu çalışmada plazma hücre diskrazilerinin büyük bir çoğunluğunu oluşturan MM 'da düzenleyici T (Treg) hücrelerinin bortezomib etkinliği ile ilişkisi yeni tanı MM hastalarının primer BMMC 'lerinde ex vivo olarak incelenmiştir. Yeni tanı MM hastalarının bilgilendirilmiş gönüllü olur formlarıyla imzası alınarak rutin işlemler sırasında kemik iliği ve periferik kan örnekleri toplanmıştır. Primer BMMC kültürlerinde primer PBMC 'lerinden manyetik boncuk yoluyla izole edilen CD4+CD25+ Treg hücrelerinin etkisi kontrol, bortezomib verilen, Treg verilen ve bortezomib+Treg kombinasyonunun uygulandığı gruplarda canlı CD138+ malign miyelom hücrelerinin akım sitometrik ve hücre proliferasyon testi ile değerlendirilmiştir. Olguların klinik özellikleri ile araştırdığımız bu moleküler özellikleri ve klinikte rutin olarak araştırılan laboratuvar özellikleri istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. Düzenleyici T hücreler güncel bir çalışma konusu olup tümör hücreleri ile ilişkisi birçok tümörde araştırılmış ya da araştırılmaktadır. Buna ek olarak daha önce tedavi almış MM hastalarının yanı sıra birinci sıra tedavi olarak da kullanımı araştırılan bortezomibin Treg hücrelerle olan ilişkisi henüz literatürde aydınlatılmamıştır.

MM 'da Treg hücrelerini PBMC' lerden izole etmemizin nedeni bu hücrelerin dolaşımda yer almasıdır. Literatürde de PBMC ile çalışılması örnek seçimini desteklemektedir. İzolasyon yöntemi olarak CD4 ve CD25 manyetik boncuklar ile pozitif izolasyon tercih edilmiştir, çünkü FACS ile izolasyon yapıldığında non-steril koşullarda izolasyon yapılmaktadır ancak bu çalışmada Treg hücreler izole edildikten sonra hücre kültürü deneylerinde kullanılacağı için kontaminasyon riskini önlemek amacıyla laminar akışlı kabinet içerisinde manyetik boncuk ile izolasyon yapılmıştır. İzole edilen bu hücrelerin saflığını teyit etmek için yöntem olarak akım sitometri tercih edilmiştir. Bunun nedeni izole etmek için kullanılan manyetik boncuklar CD4 ve CD25 yüzey antijenlerine karşı geliştirilmiş olan manyetik özellikli monoklonal antikorlardır, yani CD4+CD25+ Treg hücrelerinin izolasyonuna imkan tanımaktadır. Literatürde immunsupresif olarak yer alan Treg hücreleri CD4+CD25+ liğine ek olarak bir transkripsiyon faktörü olan intrasellüler Foxp3 pozitifliği ile tanımlanmıştır. CD4+ CD25+ Foxp3+ Treg üçlü kombinasyonu güncel literatürde en önemli Treg hücre tipini tanımlayıcı olarak yer almaktadır. Akım

sitometri immunsupresif CD4+ CD25+ Foxp3+ Treg hücreleri eş zamanlı tanımlayabilme olarak sağlayan hızlı ve spesifik bir yöntemdir. Bu çalışmada araştırılan bir diğer konu bortezomib hedef tedavi ajanıdır. Bortezomibin bu çalışma için seçilmesinin nedeni birinci sınıf bir proteozom inhibitörü olarak MM 'da en önemli standart tedavi şekillerinden biri haline almış olmasıdır. Bu ajan anti-miyelom etki mekanizmasını NF-kB üzerinden gerçekleştirirken p44/24 mitojen aktive protein kinaz yolağı ve IL-6, TNF- α , VEGF inhibisyonu üzerinden de gerçekleştirmektedir. Dolayısıyla bu işleyiş sırasında immün ve inflamatuvar sistemler de etkilenmektedir. Literatürde Treg hücreler ile bortezomib arasındaki etkileşimin bortezomibin malign CD138+ miyelom hücreler üzerine öldürücü etkisine olan yansıması daha önce ele alınmamış bir konudur.

20 adet yeni tanı MM olgusu yer aldığı çalışmada kadın erkek dağılımı ve . 50- 81 yaş arasındaki dağılım literatürle uyumludur. Evre dağılımı da ISS evrelemesine göre I ile III arası olup literatürle uyumlu ve homojendir. Bu özelliklerle olgu sayısı az olsa da deney modeli yeni tanı MM popülasyonunu temsil edici özelliktedir. Çalışmaya dahil edilen olgular daha önce hiçbir tedavi almamıştır ancak çalışma bitimine dek olguların klinik verileri takip edilmiştir. Buna göre çalışmada ilk olgu için 50 aylık son olgu için 12 aylık bir takip süresi bulunmaktadır. Buna göre ortalama takip süresi 31 ay olup sağkalım analizi için kısa bir süredir. Olgular arasında rutin işlemler sırasında örnek alımından sonra bortezomib tedavisi alanlarda bu süreç boyunca direnç gelişimi olup olmadığı takip edilmiştir.

İzole edilen CD4+ CD25+ Treg hücrelerin ve immünsüpresif Treg hücre fenotipi olarak literatürde yer alan CD4+ CD25+ Foxp3+ Treg hücre popülasyonunun teyidi ile primer BMMC deneylerinde CD138+ malign miyelom hücre yüzdesinin belirlenmesi için akım sitometri yöntemi tercih edilmiştir. Akım sitometri periferik kan, kemik iliğı veya solid dokulardan hazırlanan süspansiyonlarda hücre sitoplazmik ya da nükleer reseptörlerine göre hücre tiplerini belirlemede hızlı kolay güvenilir ve rutinde de kullanılan önemli bir testtir. Başarılı bir laboratuvar uygulamasının yanı sıra akım sitometride en önemli özellik uygun pencereleme stratejilerinin geliştirilmesidir. Antikor bağılı örneklerde pencerelemeler yapılmadan önce her hastanın kontrol grubu hücrelerinin bir kısmı

hiçbir floresans işaretli antikor bağlanmadan “işaretsiz” haliyle cihazda okutulmuştur. Bunun nedeni hücrelerin düştüğü alanı doğru seçmektir. Tüm akım sitometri pencerelemeleri yapılırken CD4+CD25+ ve CD4+ CD25 + Foxp3+ Treg hücrelerin tespitinde PBMC 'lerden birinci adımda debris olan kısım haricinde tüm alanı pencere olarak alınıp sonra CD4+ lenfositleri tanımlayan alan pencerelenmiş olup daha sonra bu alanda CD25+ Foxp3+ T hücrelerin bakıldığı üçüncü pencereleme yapılmıştır. CD138+ malign miyelom hücrelerin akım sitometrik analizleri sırasında da BMMC 'lerde de birinci adımda lenfositleri tanımlayan alan pencere olarak alınıp daha sonra bu pencerede CD138+ 'liği FITC ışması veren popülasyon yüzdesi değerlendirilmiştir. Bu çalışmada kullanılan bir diğer yöntem, WST-1 ile hücre proliferasyonu değerlendirilmesidir. Literatüre göre XTT, MTT, WST-1 gibi tetrazolyum türlerini karşılaştırıldığında en iyi alternatif WST1 gibi görünmektedir, çünkü diğer tuzlara göre daha verimli tüketilmekte ve daha çabuk renk değişimi göstermektedir (69).

Ex vivo Latince kökenli bir kelime olup canlı dışında meydana gelen, gerçekleştirilen anlamına gelmektedir. Bu çalışmada olduğu gibi bilimsel araştırmalarda, *ex vivo*, yapılan deneyin veya ölçümün organizma dışında, doğal koşullara mümkün olduğunca benzer bir ortamda gerçekleştirildiğini tarif etmek için kullanılır (70). Yani bu tip kanser çalışmaları için örnek verilecek olursa organ, doku veya hücrenin canlıdan ayrılarak, canlı ortamını taklit eden yapay laboratuvar koşullarında yapılan çalışmayı tarif eder. Hastanın primer periferik kan ve kemik iliği aspirasyon materyallerinden elde edilen PBMC 'lerinden CD4+CD25+ Treg hücreleri izole edilip aynı hastanın kültüre edilmiş olan primer BMMC 'lerinin ilgili gruplarına eklenmiştir. Yani canlıya, hastaya ait olan primer biyolojik materyal kültür koşullarında çalışılarak çeşitli parametreler değerlendirilmiştir. *In vitro* çalışmalarda tümör mikroçevresi ve *in vivo* koşullar sağlanamadığı için *ex vivo* çalışmalar özellikle karsinogenez gibi karmaşık süreçleri daha iyi yansıtmaktadır. Bu yönüyle mikroçevre ve malign plazma hücrelerinin çok önemli olduğu MM 'da uygun bir modelleme yapılmıştır.

Favaloro ve arkadaşları 20 MM olgusunda 28 kontrolle kıyaslandığında CD4+CD25+ Treg hücreler ile Th17 hücreleri oranında dengesizlik tespit etmiş ve bu durumu düşük sağkalım ile ilişkilendirmişlerdir. Ayrıca olguların kemik iliğinde

CD4+ CD25+ Treg hücreler periferik kandan daha fazla miktar bulunduğunu ancak bu fenotipteki Treg hücrelerin immunsupresif fonksiyonunu gösteren Foxp3 pozitifliğinin periferik kandaki Treglerde çok daha yüksek olduğunu göstermektedir (71). Literatürle uyumlu olarak fonksiyonel Treg hücreler hedef alındığı için periferik kandan CD4+ CD25+ Treg hücre izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen bu hücrelerin akım sitometri ile konfirmasyonunda Foxp3 pozitifliğinin %91- %100 olması da literatür ile uyumlu hücre popülasyonunu izole ettiğimizi göstermektedir. Olguların BMMC 'lerinin primer kültüründe kemik iliğinde doğal olarak bulunan Treg popülasyonu bu fonksiyonel Treg hücrelerin eklenmesi ile artırılmıştır.

Muthu ve arkadaşları, 64 yeni tanı MM olgularında periferik kanda CD8+ CD25+ Treg hücrelerini değerlendirdiği çalışmada immünsüpresif Foxp3+ bu hücre grubunun sağlıklı bireylerle karşılaştırıldığında artış gösterdiğini tespit etmişlerdir ve bu durumu hastalığın ilerleyişi ve kötü prognozla ilişkilendirmişlerdir (72). Zhu ve arkadaşları, MM tedavisinde kullanılan talidomide, lenalidomide ve pomalidomide immunmodulator ajanların MM 'da düşük sağkalım ve kötü prognozla ilişkili olan tümör hücrelerine immün yanıtı baskılayan Treg hücrelerin artan miktarlarına karşı inhibe edici etkisi olduğunu ortaya koymuşlardır (73). Bu çalışmada benzer şekilde bortezomib ile Treg ilişkisi, artan miktarlardaki immünsüpresif Treg hücrelerinin bortezomibin malign miyelom hücrelerine olan etkinliği üzerine etkisi değerlendirilmiştir. Klinikte sıklıkla kullanılan bortezomib tedavisine olan yanıtta, MM 'daki artan Treg hücrelerinin nasıl bir etkisi olduğunun ex vivo değerlendirilmesi bortezomib kullanımı sırasında Treg hücrelerini hedefleyecek ek bir yaklaşım gerekiyor olabilir mi sorusuna açıklık getirmektedir. Buna göre bortezomib ve Treg kombinasyonunun verildiği grupta bortezomibin tek başına verildiği gruba göre canlılığın daha da azaldığı görülmüştür. Ancak bu durum in vivo bortezomib direnci görülmeyen olgularda istatistiksel anlamlı korelasyon gösterirken ($p=0,022$) diğer klinik parametrelerle istatistiksel anlamlı ilişki göstermemiştir.

Kim ve arkadaşlarının primat çalışmasında bortezomibin daha önceden ortamda bulunan CD4+ CD25+ Foxp3+ Treg hücreleri yok etmediği ve fonksiyonlarını engellemediği ancak CD4+ Foxp3- T hücreleri öldürdüğünü göstermişlerdir (74). Bu çalışmayla benzer şekilde bizim çalışmamızda bortezomib

ve Treg kombinasyonunun verildiği grupta tek başına bortezomib ve tek başına Treg verilen gruplara göre CD138+ malign miyelom hücrelerinde canlılığın azalması Treg hücrelerin ex vivo ortamda da yok olmayıp etkinlik gösterdiğini düşündürmektedir.

Her hasta için bortezomib LD50 dozu hücre proliferasyon analizi yapılarak tespit edilmiş ve primer BMMC kültür deneylerine bu doz üzerinden devam edilmiştir. Ancak bu yöntemle değerlendirilen LD50 dozu total BMMC 'lerindeki LD50 dozudur. Bazı olgularda bortezomibin LD50 doz tespiti deneylerinde bu grupta total hücre canlılığında belirgin azalma görülürken deneyin ilerleyen safhalarında bu grupta CD138+ hücrelerin canlılığında değişikliğe neden olmadığı gözlenmiştir. Bu durum bu olgularda bortezomib direnci olabilirliğini akla getirmiştir. Klinikte de bortezomib tedavisi alan olgular bu bakış açısıyla takip edildiğinde in vitro bortezomibin testinde duyarlı olmasına karşın klinik direnç gösteren iki olgumuzda in vitro olarak Treg + Bortezomib verildiğinde hücre ölümünün tek başına bortezomib verilmesine göre azaldığı (%26,7) görülmüştür. Klinik olarak bortezomibe direnç göstermeyen iki olguda in vitro bortezomib duyarlılığı düşük çıkmıştır. Ayrıca tek başına in vitro Treg ekspansiyonu gerçekleştirildiğinde hücre ölümü şeklinde yanıt veren olguların klinikte bortezomib dirençli olmaması istatistiksel anlamlı saptanmış ($p=0,024$) ve olguların klinikte bortezomib direnci göstermemesi ile in vitro Treg ekspansiyonu - bortezomib kombinasyon uygulamasında bortezomib öldürücü etkinliğinin tek başına bortezomib uygulamasına göre belirgin artışı istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon göstermektedir ($p=0,022$). Tüm bu sonuçlar bortezomib direnci varlığı ile CD4+CD25+ Treg hücrelerin bir ilişkisi olabilir mi sorusunu düşündürmüştür. Literatür ışığında bu durum ele alındığında direk ilişkili sonuçlar henüz yer almamasına karşın dolaylı yoldan ilişki olabilirliğine dair çalışmalar yer almaktadır. Wang Z ve arkadaşları kemik iliği stroma hücrelerinin MM hücrelerinde indüklediği proliferasyon, migrasyon, sağkalım ve ilaç direnc gelişiminde eksozom aracılı iletişimin de yer aldığını göstermişlerdir (75). Eksozomlar hücrelerden salgılanan 30-100 nm arasında büyüklüklere sahip keseciklere olup. hücreler arası iletişim-madde alışverişinde büyük rol oynar. İmmün hücrelerle ilişkisine bakıldığında B lenfositlerden salgılanan eksozomların T lenfositleri aktive ettiği düşünülmektedir.

İmmün hücreler tarafından salgılanan eksozomlar CD9 ve LAMP-1 pozitifliği ile tanımlanmaktadır (76). Hu X ve arkadaşları, CD9 ekspresyonunun metilasyon ile down-regülasyonu MM' da bortezomib duyarlılığını azalttığını göstermişlerdir. Ayrıca hematopoietik ve epitel hücreler tarafından gerçekleşen CD9 ekspresyonu apoptozu indükleyerek bortezomib duyarlılığını arttırdığı görülmüştür (77). Treg hücreleri ve ilaç direnci ilişkisine dair literatür incelendiğinde kanserde aydınlatılmış direk bir ilişki görülmemektedir. Ancak farklı hastalıklarda bu ilişki çalışılmış olup örneğin, CD4+ CD25+ Foxp3+ Treg hücrelerin eksikliğinde Kawasaki hastalığında immünterapiye direnci geliştiği (78), pulmoner tüberkülozda Foxp3+ Treg hücrelerin ekspansiyonunun çoklu ilaç direncine neden olduğu (79) ortaya konmuştur. Bu çalışmada tespit edilmiş olan bortezomib direnci ve Treg hücre ilişkisinin benzer mekanizma üzerinden mi yoksa Treg ekspansiyonu nedeniyle kemik iliği stroma hücrelerinde sitokin vb. aracılı değişiklikler oluşarak mı gerçekleştiği bir sonraki çalışmalarda incelenmesi planlanmaktadır. Bortezomib ile immün sistem ilişkisine bakıldığında bortezomibin önemli immunmodulator etkilere yol açtığı gösterilmiştir. Bunlar arasında başlıca, dendritik hücrelerin apoptozunu indüklemek, T hücre kostimüle edici moleküllerde ve inflamatuvar sitokin üretimini azaltmak, aktif haldeki efektör T hücrelerin seçici apoptozu ve NF- κ B inhibisyonu yer almaktadır ancak Treg hücrelerine olan etkisi henüz bilinmemektedir (80). Treg hücrelerin otoimmün hastalıklarda ve graft karşıtı konak hastalığında (GVHD) tedaviye yönelik kullanımı kliniğe geçmiş bulunmaktadır. Melanomda immünterapi dahilinde oldukça sık incelenen bu hücrelerin relaps/refrakter miyelomda başarılı tedavi yanıtı veren bortezomibin yeni kullanılmaya başlandığı yeni tanı hastalarda direnç gelişimine ve/veya tedavi yanıtını arttırmaya yönelik bir ilişkisinin aydınlatılması oldukça önemli bir ilerleme olacaktır.

Hastalardan alınan kemik iliği örneklerinde başlangıçtaki CD138+ miyelom hücre miktarı bakılmadan bortezomib LD50 dozunun tespit edilmiş olması bu dozun total KİMH 'indeki etkinliğini yansıtmaktadır. Ancak bu eksiklik başlangıçta elde edilen hücre miktarının az olması ve CD138+ miyelom hücre tespiti için ek bir test sonucunda primer kültür için yeterli hücre kalmayacağından kaynaklanmaktadır. Bu durumlar başlıca karşılaşılan zorluklar ve eksiklikleri oluşturmaktadır.

9. SONUÇ VE ÖNERİLER

Multipl miyelom yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesi gerektiği ancak bilimdeki ilerlemelere karşın tam kürün elde edilemediği bir hematolojik malignitedir. Tümör immünolojisi ile tümör mikroçevre ilişkisini anlamak üzere ve yeni tedavi stratejileri (hücre sel tedaviler) geliştirmede kanserde üzerinde çalışılan güncel bir konudur. Treg hücreler CD4+CD25+Foxp3+ fenotipe sahip T hücre alt-popülasyonudur ve tümör hücreleriyle ilişkisi güncel literatürde sıklıkla değerlendirilen bir hücre grubudur.

Bu çalışmada MM 'da ilk basamak tedavide veya relaps olgularda güncel tedavi aracı olan bortezomibin Treg hücreler ile etkileşimi ex vivo olarak araştırılmıştır. Treg hücrelerin bortezomib etkisini arttırıcı, azaltıcı, değiştirmeyen şekillerde değişik etkileri olduğu gözlenmiştir. Gruplar arasında total ve CD138+ malign miyelom hücreleri arasında canlılık yüzdelerinde farklılıkların gözlenmesi Foxp3+ Treg hücrelerinin bortezomib tarafından öldürülmediğini düşündürmektedir. İstatistiksel anlamlı varılan önemli bir sonuç ise Treg hücrelerin klinikte bortezomib direnci geliştirmeyen olgularda bortezomibin in vitro anti-tumor etkisini arttırdığı ve dirençli hastalarda azalttığının saptanmasıdır. Bu durum bortezomib direncinde Treglerin etkisi olduğunu göstermektedir. Bu ilişkinin hayvan deneylerini de kapsayacak şekilde incelenmesi ve ortaya konması gelecekteki çalışmalarımız için planlanmaktadır.

10. KAYNAKLAR

- 1- Barille-Nion S, Barlogie B, Bataille R, Bergsagel PL ve ark. Advances in biology and therapy of multiple myeloma. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2003;;248–278
- 2- Schwartz GG. Multiple Myeloma: Clusters, Clues and Dixoins. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 1997; 6:49–56
- 3- Rajkumar SV, Kyle RA. Multiple myeloma: diagnosis and treatment. Mayo Clin Proc 2005;80:1371-1382
- 4- Yeh HS, Berenson JR. Myeloma bone disease and treatment options. Eur J Cancer, 2006; 42:1554–1563
- 5- Anderson KC, Shaughnessy JD Jr, Barlogie B, Harousseau JL ve ark. Multiple Myeloma. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2002;;214–240
- 6- Ciolli S. Effects on bone metabolism of new therapeutic strategies with standard chemotherapy and biologic drugs. Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism 2013; 10(3): 183-186
- 7- Schwartz RN, Vozniak M. Current and emerging treatments for multiple myeloma. J Manag Care Pharm, 2008; 14:12-19
- 8- Roodman GD. New potential targets for treating myeloma bone disease. Clin Cancer Res, 2006;12:6270-6273
- 9- Schütt P, Brandhorst D, Stellberg W, Poser M ve ark. Immune parameters in multiple myeloma patients: influence of treatment and correlation with opportunistic infections. Leuk Lymphoma, 2006; 47:1570-1582
- 10-Harousseau JL, Shaughnessy J, Richardson P. Multiple Myeloma. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2004;;237–256
- 11-Katzel JA, Hari P, Vesole DH. Multiple myeloma: charging toward a bright future. CA Cancer J Clin, 2007;57:301-318
- 12-Mollee P. Current trends in the diagnosis, therapy and monitoring of the monoclonal gammopathies. Clin Biochem Rev, 2009; 30:93-103
- 13-San Miguel JF, Gracia-Sanz R. Prognostic features of multiple myeloma. Best Pract Res Clin Haematol, 2005; 18:569–583

- 14-Durie BG, Salmon SE. A clinical staging system for multiple myeloma. *Cancer*, 1975; 36:842–854
- 15-Greipp PR, San Miguel JF, Durie BG. International Staging System for multiple myeloma. *J Clin Oncol*, 2005; 23:3412–3420
- 16-Chng WJ, Glebov O, Bergsagel PL, Kuehl WM. Genetic events in the pathogenesis of multiple myeloma. *Best Pract Res Clin Haematol*, 2007; 20: 571–596
- 17-Pratt G. Molecular aspects of multiple myeloma. *Mol Pathol*, 2002; 55:273–283
- 18-Bommert K, Bargou RC, Stuhmer T. Signalling and survival pathways in multiple myeloma. *Eur J Cancer*, 2006; 42:1574–1580
- 19-Catley L, Tai Y, Chauhan D, Anderson KC. Perspectives for combination therapy to overcome drug resistant multiple myeloma. *Drug Resist Updat*, 2005; 8:205–218
- 20-Chng WJ, Fonseca R. Centrosomes and myeloma; aneuploidy and proliferation. *Environ Mol Mutagen*, 2009; 50:697-707
- 21-Bergsagel PL, Kuehl WM. Chromosome translocations in multiple myeloma. *Oncogene*, 2001; 20:5611-5622
- 22-Higgins MJ, Fonseca R. Genetics of multiple myeloma. *Best Pract Res Clin Haematol*, 2005; 18:525–536
- 23-Zhan F, Huang Y, Colla S, Stewart JP ve ark. The molecular classification of multiple myeloma. *Blood*, 2006;108:2020-2028
- 24-Ander KC. Targeted therapy of multiple myeloma based upon tumor microenvironmental interactions. *Exp Hematol*, 2007; 35:155–162
- 25-Sakuma M, Hatsushika K, Koyama K, Katoh R ve ark. Transforming growth factor- β receptor I kinase inhibitor down-regulates cytokine secretion and multiple myeloma cell growth in the bone marrow microenvironment. *Int Immunol*, 2007; 19:117-126
- 26-Nadav L, Katz BZ, Baron S, Cohen N ve ark. The generation and regulation of functional diversity of malignant plasma cells. *Cancer Res*, 2006; 66:8608-8616

- 27-Akdis CA. New insights into mechanisms of immunoregulation in 2007. *J Allergy Clin Immunol*, 2008; 122:700-709
- 28-Larche M. Immunoregulation by targeting T cells in the treatment of allergy and asthma. *Curr Opin Immunol*, 2006; 18:745-750
- 29-McCaughy TM, Baldwin TA, Wilken MS, Hogquist KA. Clonal deletion of thymocytes can occur in the cortex with no involvement of the medulla. *J Exp Med*, 2008; 205:2575-2584
- 30-Saurer L, Mueller C. T cell-mediated immunoregulation in the gastrointestinal tract. *Allergy*, 2009; 64:505-19
- 31-Liu X, Alexiou M, Martin-Orozco N, Chung Y ve ark. Cutting edge: A critical role of B and T lymphocyte attenuator in peripheral T cell tolerance induction. *J Immunol*, 2009; 182:4516-4520
- 32-Lehner T. Special regulatory T cell review: The resurgence of the concept of contrasuppression in immunoregulation. *Immunology*, 2008; 123:40-44
- 33-Seliger B, Marincola FM, Ferrone S, Abken H. The complex role of B7 molecules in tumor immunology. *Trends Mol Med*, 2008; 14:550-559
- 34-Ozer H, Han T, Henderson ES, Nussbaum A, Sheedy D. Immunoregulatory T cell function in multiple myeloma. *J Clin Invest*, 1981; 67:779-789
- 35-Rosenblatt J, Avigan D. Cellular immunotherapy for multiple myeloma. *Best Pract Res Clin Haematol*, 2008; 21:559-577
- 36-Cools N, Ponsaerts P, Van Tendeloo VF, Berneman ZN. Regulatory T cells and human disease. *Clin Dev Immunol*, 2007; 2007:89195
- 37-Gallimore A, Godkin A. Regulatory T cells and tumour immunity-observations in mice and men. *Immunology*, 2008; 123:157–163
- 38-Sorensen RB, Berge-Hansen L, Junker N, Hansen CA ve ark. The immune system strikes back: cellular immune responses against indoleamine 2,3-dioxygenase. *Plos One*, 2009; 4:e6910
- 39-Mansfield AS, Heikkila PS, Vaara AT, von Smitten KA ve ark. Simultaneous Foxp3 and IDO expression is associated with sentinel lymph node metastases in breast cancer. *BMC Cancer*, 2009; 9:231.
- 40-Banerjee DK, Dhodapkar MV, Matayeva E, Steinman RM ve ark. Expansion of FOXP3^{high} regulatory T cells by human dendritic cells (DCs) in vitro and

- after injection of cytokine matured DCs in myeloma patients. *Blood*, 2006; 108:2655–2661
- 41-Mottet C, Golshayan D. CD4+CD25+FOXP3+ Regulatory T cells: from basic research to potential therapeutic use. *Swiss Med Wkly*, 2007; 137:625–634
- 42-Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*, 2003; 299:1057-1061
- 43-Toda A, Piccirillo CA. Development and function of naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Leukoc Biol*, 2006; 80:458-470
- 44-Sakaguchi S, Powrie F. Emerging challenges in regulatory T cell function and biology. *Science*, 2007; 317:627-629
- 45-Qin FX. Dynamic Behavior and Function of Foxp3+ Regulatory T Cells in Tumor Bearing Host. *Cell Mol Immunol*, 2009; 6:3-13
- 46-Schreiber TH. The use of Foxp3 as a biomarker and prognostic factor for malignant human tumors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2007; 16:1931-1934
- 47-Popmihajlov Z, Smith KA. Negative Feedback Regulation of T cells via Interleukin-2 and FOXP3 Reciprocity. *Plos One*, 2008; 3:e1581
- 48-Friedline RH, Brown DS, Nguyen H, Kornfeld H ve ark. CD4+ regulatory T cells require CTLA-4 for the maintenance of systemic tolerance.
- 49-Wang R, Wan Q, Kozhava L, Fujii H ve ark. Identification of a regulatory T cell specific cell surface molecule that mediates suppressive signals and induces Foxp3 expression. *Plos One*, 2008; 3:e2705
- 50-Ormandy IA, Hillemann T, Wedemeyer H, Manns MP ve ark. Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood of patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*, 2005; 65:2457–2464
- 51-Woo EY, Chu CS, Goletz TJ, et al. Regulatory CD4+CD25+ T cells in tumors from patients with early stage non-small cell lung cancer and late stage ovarian cancer. *Cancer*, 2001; 61:4766–4772
- 52-Woo EY, Yeh H, Chu CS, et al. Cutting edge: regulatory T cells from lung cancer patients directly inhibit autologous T cell proliferation. *J Immunol*, 2002; 168:4272–4276

- 53-Wei S, Kryczek I, Zou L, et al. Plasmacytoid dendritic cells induce CD8+ regulatory T cells in human ovarian carcinoma. *Cancer Res*, 2005; 65:5020–5026
- 54-Viehl CT, Moore TT, Liyanage UK, Frey DM ve ark. Depletion of CD4+CD25+ regulatory T cells promotes a tumor specific immune response in pancreas cancer bearing mice. *Ann Surg Oncol*, 2006; 13:1252–1258
- 55-Heier I, Hofgaard PO, Brandtzaeg P, Jahnsen FL ve ark. Depletion of CD4+CD25+ regulatory T cells inhibits local tumour growth in a mouse model of B cell lymphoma. *Clin Exp Immunol*, 2008; 152:381–387
- 56-Yokokawa J, Cereda V, Remondo C, Gulley JL ve ark. Enhanced Functionality of CD4+CD25high FOXP3+ regulatory T cells in the peripheral blood of patients with prostate cancer. *Clin Cancer Res*, 2008; 14:1032–1040
- 57-Prabhala RH, Neri P, Bae JE, Tassane P ve ark. Dysfunctional T regulatory cells in multiple myeloma. *Blood*, 2006; 107:301–304
- 58-Atanackovic D, Cao Y, Luetkens T, Panse J ve ark. CD4+CD35+FOXP3+ T regulatory cells reconstitute and accumulate in the bone marrow of patients with multiple myeloma following allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica*, 2008; 93:423–430
- 59-Sonmez M, Sonmez B, Eren N, Yilmaz M ve ark. Effects of interferon-alpha-2a on Th3 cytokine responses in multiple myeloma patients. *Tumori*, 2004; 90:387–389
- 60-Condomines M, Quittet P, Lu ZY, Nadal L ve ark. Functional regulatory T cells are collected in stem cell autografts by mobilization with high dose cyclophosphamide and granulocyte colony stimulating factor. *J Immunol*, 2006; 176:6631–6639
- 61- Ercetin AP, Aktas S, Piskin O, et al. The correlation between T regulatory cells and autologous peripheral blood stem cell transplantation in multiple myeloma. *Turk J Hematol* 2011; 28: 107-114.
- 62- Blanco B, Perez-Simon JA, Sanchez- Abarca LI, et al. Bortezomib induces selective depletion of alloreactive T lymphocytes and decreases the production of Th1 cytokines. *Blood* 2006;107:3575-83.

- 63-Blanco B, Pérez-Simón JA, Sánchez-Abarca LI, et al. Treatment with bortezomib of human CD4+ T cells preserves natural regulatory T cells and allows the emergence of a distinct suppressor T-cell population. *Haematologica*. 2009 Jul;94(7):975-83.
- 64- Jung SH, Lee YK, Lee HJ. Dendritic cells loaded with myeloma cells pretreated with a combination of JSI-124 and bortezomib generate potent myeloma-specific cytotoxic T lymphocytes in vitro. *Exp Hematol*. 2014.
- 65- Wang X1, Feng X, Wang J, et al. Bortezomib and IL-12 produce synergetic anti-multiple myeloma effects with reduced toxicity to natural killer cells. *Anticancer Drugs*. 2014;25(3):282-8.
- 66- Lundqvist, A., S. Su, S. Rao, and R. Childs. 2010. Cutting edge: bortezomib treated tumors sensitized to NK cell apoptosis paradoxically acquire resistance to antigen-specific T cells. *J. Immunol*. 184: 1139–1142.
- 67-Sun, K., L. A. Welniak, A. Panoskaltsis-Mortari, M. J. O'Shaughnessy, et al. Inhibition of acute graft-versus-host disease with retention of graft-versus-tumor effects by the proteasome inhibitor bortezomib. 2004. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 8120–8125.
- 68- Chang CL1, Hsu YT, Wu CC, et al. Immune mechanism of the antitumor effects generated by bortezomib. *J Immunol*. 2012;189(6):3209-20.
- 69-Terzioglu G, Keskin AÜ, Demirel G. Measurement Methods of Cell Proliferation and a Comparison of Various Commercial Proliferation Kits. *Turk J Immunol* 2013;1(3):74-89.
- 70- <http://biology.stackexchange.com/questions/10664/what-is-an-ex-vivo-experiment>
- 71- Favaloro J, Brown R, Aklilu E, et al. Myeloma skews regulatory T and pro-inflammatory T helper 17 cell balance in favor of a suppressive state. *Leuk Lymphoma*. 2013 Aug 28.
- 72- Muthu Raja KR, Kubiczкова L, Rihova L, et al. Functionally suppressive CD8 T regulatory cells are increased in patients with multiple myeloma: a cause for immune impairment. *PLoS One*. 2012;7(11):e49446.

- 73- Zhu YX, Kortuem KM, Stewart AK. Molecular mechanism of action of immune-modulatory drugs thalidomide, lenalidomide and pomalidomide in multiple myeloma. *Leuk Lymphoma*. 2013;54(4):683-7.
- 74-Kim JS, Lee JI, Shin JY, et al. Bortezomib can suppress activation of rapamycin-resistant memory T cells without affecting regulatory T-cell viability in non-human primates. *Transplantation*. 2009;88:1349-59.
- 75-Wang Z, Hendrix A, Hernot , et al. Bone marrow stromal cell-derived exosomes as communicators in drug resistance in multiple myeloma cells. *Blood*. 2014 Jun 13. pii: blood-2014-03-562439. [Epub ahead of print]
- 76-Xie Y1, Zhang X, Zhao T, Li W, Xiang J. Natural CD8⁺25⁺ regulatory T cell-secreted exosomes capable of suppressing cytotoxic T lymphocyte-mediated immunity against B16 melanoma. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013;438(1):152-5.
- 77-Hu X, Xuan H, Du H, Jiang H, Huang J. Down-regulation of CD9 by methylation decreased bortezomib sensitivity in multiple myeloma. *PLoS One*. 2014;9(5):e95765.
- 78- Hirabayashi Y, Takahashi Y, Xu Y, et al. Lack of CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ regulatory T cells is associated with resistance to intravenous immunoglobulin therapy in patients with Kawasaki disease. *Eur J Pediatr*. 2013 ;172(6):833-7.
- 79-Churina EG, Urazova OI, Novitskiy VV. The role of foxp3-expressing regulatory T cells and T helpers in immunopathogenesis of multidrug resistant pulmonary tuberculosis. *Tuberc Res Treat*. 2012;2012:931291.
- 80- Mohty M1, Brissot E, Savani BN, Gaugler B. Effects of bortezomib on the immune system: a focus on immune regulation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2013;19(10):1416-20.



T.C.
SAĞLIK BAKANLIĞI
Dr. Behçet Uz Çocuk Hastalıkları ve Cerrahisi
Eğitim ve Araştırma Hastanesi

İzmir 4 No'lu Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

SAYI : B-10-4-ISM-4-35-65-72/Etik Kurul
TARİH :
KONU : Etik Kurul Başvuruları

Sayın Doç. Dr. Safiye AKTAŞ,
“Multipl Miyelomda T Regülatuar Hücrelerin (T_{reg}) Tedaviye Etkisinin Ex Vivo Araştırılması” isimli araştırmanız 04.12.2009 tarihinde İzmir 4 No'lu Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'na incelenmiş, ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, gerçekleştirilmesinde etik sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üyelerinin oy birliği ile karar verilmiştir.

Çalışmanızın durumunu yılda bir “Klinik Araştırma İçin Bakanlığa ve Etik Kurula Yapılan Yıllık Bildirim Formu” ile bildirmeniz, fakat çalışmanızın erken bitmesi ya da bir yıl dolmadan bitmesi durumunda araştırmanızın özeti ile beraber “Klinik Araştırmanın Sona Erdiğine İlişkin Bakanlığa ve Etik Kurula Yapılan Bildirim Formu” nu doldurarak İzmir 4 No'lu Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'na bildirmenizi rica ederim.

İzmir 4 No'lu Klinik Araştırmalar
Etik Kurul Başkanı
Uz. Dr. Aysel ÖZTÜRK

ETİK KURULUN ADI	İZMİR 4 NO'LU KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
AÇIK ADRES	Dr. Behçet Uz Çocuk Hastalıkları ve Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi 1374 SOKAK No: 11 Alsancak / İZMİR
TELEFON	0232 4418207 / 0232 4895656-2222
FAKS	0232 4418207
E-POSTA	behcetuzetik@myinet.com

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Multipl Miyelomda T Regülatuar Hücrelerin (T _{reg}) Tedaviye Etkisinin Ex Vivo Araştırılması			
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜNÜN KODU				
	EUDRACT NUMARASI				
	SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Doç. Dr. Safiye AKTAŞ			
	SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Patoloji, Temel Onkoloji Doktoru			
	KOORDİNATÖRÜN UNVANI/ADI/SOYADI				
	KOORDİNATÖRÜN UZMANLIK ALANI				
	ARAŞTIRMA MERKEZİ	Dokuz Eylül Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji Anabilim Dalı			
	ARAŞTIRMA MERKEZİNİN AÇIK ADRESİ	Dokuz Eylül Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji Anabilim Dalı			
	BAŞVURULAN ETİK KURULUN ADI	4 No'lu Klinik Araştırmalar Etik Kurulu			
	DESTEKLEYİCİ VE AÇIK ADRESİ				
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ VE ADRESİ				
	UZMANLIK TEZİ/AKADEMİK AMAÇLI	UZMANLIK TEZİ ☐	AKADEMİK AMAÇLI ☒		
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1	☐		
		FAZ 2	☐		
FAZ 3		☐			
FAZ 4		☐			
BE/BY		☐			
DiĞER		☐	Diğ er ise belirtiniz:		
İLAÇ DIŞI ARAŞTIRMA		☒	Belirtiniz:		
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒	ÇOK MERKEZLİ ☐	ULUSAL ☐	ULUSLARARASI ☐	

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili		
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	04.12.2009		Türkçe ☒	İngilizce ☐	Diğ er ☐
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe ☐	İngilizce ☐	Diğ er ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	04.12.2009		Türkçe ☒	İngilizce ☐	Diğ er ☐
	OLGU RAPOR FORMU	04.12.2009		Türkçe ☒	İngilizce ☐	Diğ er ☐

Belge Adı		Açıklama
ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☒	
SİGORTA	☐	
HASTA KARTI/GÜNLÜKLERİ	☐	

ILAN	☐	
YILLIK BILDIRIM	☐	
SONUÇ RAPORU	☐	
GÜVENLİLİK BILDIRIMLARI	☐	
DİĞER	☐	

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:1	Tarih:04.12.2009
Doç. Dr. Safiye Aktaş sorumluluğunda yapılması tasarlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen klinik araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, gerçekleştirilmesinde etik sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üyelerinin oy çokluğu ile karar verilmiştir.		

ETİK KURUL BİLGİLERİ	
ÇALIŞMA ESASI	Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik , İy Klinik Uygulamaları Kılavuzu, ve Etik Kurul SOP
ETİK KURUL BAŞKANI UNVANI/ADI/SOYADI: Uz. Dr. Ayşel ÖZTÜRK	
ETİK KURUL ÜYELERİ	

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		İlişki *		Katılım **		İmza
Uz. Dr. Ayşel ÖZTÜRK	Çocuk Hast. , Çocuk Nörolojisi	Dr.Behçet Uz Çoc. Hast. ve Cer. E.A.H.	E ☐	K X	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Uz. Dr. Aycan ÜNALP	Çocuk Hast. , Çocuk Nörolojisi	Dr.Behçet Uz Çoc. Hast. ve Cer. E.A.H.	E ☐	K X	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Doç. Dr. Münevver HOŞGÖR	Çocuk Cerrahisi	Dr.Behçet Uz Çoc. Hast. ve Cer. E.A.H.	E ☐	K X	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Uz. Dr. Murat SONGU	Kulak Burun Boğaz Hastalıkları	Dr.Behçet Uz Çoc. Hast. ve Cer. E.A.H.	E X	K ☐	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	
Doç. Dr. Safiye AKTAŞ	Patoloji, Temel Onkoloji Doktoru	Dokuz Eylül Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü	E ☐	K X	E ☒	H ☐	E ☐	H ☒	
Doç. Dr. Cenk CAN	Farmakoloji	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi	K X	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Uz. Dr. Filiz DEMİRİZ	Biyokimya	Dr.Behçet Uz Çoc. Hast. ve Cer. E.A.H.	E ☐	K X	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Yrd. Doç. Dr. İbrahim Eren AKÇİÇEK	Deontoloji, İç Hastalıkları, Gastroenteroloji	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi	E X	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof. Dr. Mukadder YASA	Eczacılık	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☐	K X	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	
Yrd. Doç. Dr. Ahmet AKAY	Biyofizik	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi	E X	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Yrd.Doç. Dr. Timur KÖSE	Biyoistatistik	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi	E X	K ☐	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	
Dr. Behiye EKER KAZANCI	Hukukçu	Dokuz Eylül Üniversitesi Hukuk Fakültesi	E ☐	K X	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	
Baki OKAN	Avukat	Serbest	E X	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	

* :Araştırma ile İlişki
** :Toplantıda Bulunma

ÖZGEÇMİŞ
Araştırma
Görevlisi AYŞE
PINAR ERÇETİN

TC Kimlik No / Pasaport No:	56356059100
Doğum Yılı:	1985
Yazışma Adresi :	Cengiz Topel Cad. Atakent Mah. No:48 Da:64 Bostanlı 35550 İzmir/Türkiye
Telefon :	232-3306603
e-posta :	pinarercetin@gmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Ülke	Üniversite	Fakülte/Enstitü	Öğrenim Alanı	Derece	Mezuniyet Yılı
Türkiye	Dokuz Eylül Üniversitesi	Sağlık Bilimleri Enstitüsü	TEMEL ONKOLOJİ	Yüksek Lisans	2010
Türkiye	Ege Üniversitesi	FEN FAKÜLTESİ	BİYOKİMYA	Lisans	2007

AKADEMİK/MESLEKTE DENEYİM

Kurum/Kuruluş	Ülke	Şehir	Bölüm/Birim	Görev Türü	Görev Dönemi
Dokuz Eylül Üniversitesi	Türkiye	İzmir	TEMEL TIP BİLİMLERİ	Araştırma Görevlisi	2012-
İ.E. Ulagay İlaç Sanayi Türk A.Ş.	Türkiye	İzmir	Tıbbi Satış Mümessili		2009-2009

UZMANLIK ALANLARI

Uzmanlık Alanları
Multipl Miyelom, Onkoloji, Düzenleyici T Hücreler, CD200, PD-1

DİĞER AKADEMİK FAALİYETLER

Son Bir Yılda Uluslararası İndekslere Kayıtlı Makale/Derleme İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı	
Son Bir Yılda Projeler İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı	
Yayınlara Alınan Toplam Atıf Sayısı	
	Deyam

Danışmanlık Yapılan Öğrenci Sayısı		Tamamlanan	Eden
	Yüksek Lisans		
	Doktora		
	Uzmanlık		
Diğer Faaliyetler (Eser/görev/faaliyet/sorumluluk/olay/üyelik vb.)			

ÖDÜLLER

Ödülün Adı	Alındığı Kuruluş	Yılı
Poster Birincilik Ödülü	Türk Pediatrik Onkoloji Grubu (TPOG)	2014
Poster İkincilik Ödülü	İmmuno onkoloji Derneği	2014
Özgün Araştırma Ödülü	Türk Pediatrik Onkoloji Grubu (TPOG)	2014
Onkoloji Araştırma İkincilik Ödülü	Türk Kanser Araştırma ve Savaş Derneği	2013
Proje Ödülü	Türk Pediatrik Onkoloji Grubu (TPOG)	2013
En iyi Poster Bildiri ödülü	Türk Pediatrik Onkoloji Grubu (TPOG)	2012
Pediatric Onkoloji Araştırma Sözel Bildiri Ödülü	Türk Kanser Araştırma ve Savaş Kurumu Derneği	2012

YAYINLARI

SCI, SSCI, AHCI indekslerine giren dergilerde yayınlanan makaleler

Altun, Z.; Olgun, Y.; Ercetin, P.; Aktas, S.; Kirkim, G.; Serbetcioglu, B.; Olgun, N.; Guneri, E. A., Protective effect of acetyl-L-carnitine against cisplatin ototoxicity: role of apoptosis-related genes and pro-inflammatory cytokines, 2014, CELL PROLIFERATION
Ercetin, Ayse Pinar; Aktas, Safiye; Piskin, Ozden; Ates, Halil; Zadeoghulari, Zeynep Filiz; Turgut, Nur Hilal; Ozcan, Mehmet Ali, The correlation between T regulatory cells and autologous peripheral blood stem cell transplantation in multiple myeloma, 2011, TURKISH JOURNAL OF HEMATOLOGY
Aktas, Safiye; Zadeoghulari, Zeynep; Ercetin, Pinar; Olgun, Nur, The Effect of Differentiating and Apoptotic Agents on Notch Signalling Pathway in Hepatoblastoma, 2010, HEPATO-GASTROENTEROLOGY
Olgun, Yuksel; Altun, Zekiye; Aktas, Safiye; Ercetin, Pinar; Kirkim, Gunay; Kiray, Muge; Bagriyanik, Alper; Ozogul, Candan; Serbetcioglu, Bulent; Guneri, Enis Alpin, Molecular Mechanisms of Protective Effect of Resveratrol Against Cisplatinium Induced Ototoxicity, 2013, JOURNAL OF INTERNATIONAL ADVANCED OTOLOGY

Diğer dergilerde yayınlanan makaleler

Erçetin, Ayşe Pinar; Aktaş, Safiye; Olgun, Hatice Nur, The Relationship of Galectin-1 and Neuroblastoma

Stem Cells, 2013, Journal of Pediatric Oncology
Erçetin, Ayşe Pınar; Aktaş, Safiye; Pişkin, Özden, Özcan, Mehmet Ali, Multipl Miyelomda Galektin-1 Ekspresyonunun Düzenleyici T Hücreler ve Otolog Kemik İliği Transplantasyonu ile İlişkisi, 2011, DEÜ Tıp Fakültesi Dergisi
Aktaş, Safiye; Erçetin, Ayşe Pınar; Çelebiler, Aydan; Diniz, Gülden, Methylation Profile of the Promoter CpG Islands of Death Associated Protein-kinase in Nephroblastoma, 2013, Journal of Pediatric Oncology
Dursun, Duygu; Aktaş, Safiye; Erçetin, Pınar; Altun, Zekiye; Mutafoğlu, Kamer; Olgun, Nur, Nörofibromatozis Tip 1 Olgularında DNA Tamir Genlerinin Ekspresyonunun Klinik Önemi, 2013, DEÜ Tıp Fakültesi Dergisi

Hakemli konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayınlar

Hepatopankreatobilier Tümörlerde Düzenleyici T Lenfositler Ve Prognostik Önemi, Nadir Tümörler Sempozyumu, 2014
Asco/Cap 2007 Ve 2013 Meme Kanseri Her2 Değerlendirme Önerilerine Göre İmmünohistokimyasal Değerlendirme Sonuçlarının Karşılaştırılması, Nadir Tümörler Sempozyumu, 2014
Meme Kanseri Tümörde Ve Tümör Mikroçevresinde Galektin-1 Ekspresyonu, Nadir Tümörler Sempozyumu, 2014
Apoptosis related gene expression profile in breast cancer stem cells, 2nd EACR Conference on Cell Death in Cancer, 2014
The effect of Korean red ginseng on apoptotic gene expressions in human neuroblastoma cells, 2nd EACR Conference on Cell Death in Cancer, 2014
The effect of rapamycin on apoptosis and apoptotic gene expressions in breast cancer cells, 2nd EACR Conference on Cell Death in Cancer, 2014
Is there a gender related susceptibility for cisplatin ototoxicity, 29th Politzer Society Meeting, 2013
The Effects Of Silmarin On Pro-Inflammatory Cytokines in Neuroblastoma Cells. Silmarinin Nöroblastom Hücreleri Üzerinde Pro İnflamatuar Sitokinler Üzerine Etkileri, 25th National Biochemistry Congress, 2013
Silmarin Nöroblastom Hücreleri Üzerinde Potansiyel Anti-Tumoral Ajan mı?, 20. Ulusal Kanseri Kongresi, 2013
Ekstrahepatik Bilir Kanserde Lenfosit ile Nötrofillerin Dağılımı ve CD25(+) Düzenleyici T Lenfositlerin Konakçı İmmün Yanıtındaki Yeri, 20. Ulusal Kanseri Kongresi, 2013
Nörofibromatozis Tip I ve Kanseri İlişkisine Yaklaşım, 20. Ulusal Kanseri Kongresi, 2013
Meme kanseri Kök Hücrelerinin Gen Ekspresyon Profili, 20. Ulusal Kanseri Kongresi, 2013
Ex Vivo Evaluation of the Effect of Regulatory T Cells (TREG) on Bortezomib in Multipl Myeloma, 14th international myeloma workshop, 2013
Nörofibromatozis Tip I Kanseri İlişkisine Moleküler Yaklaşım, IV. Multidisipliner Kanseri Araştırma Kongresi, 2012
Kore Kırmızı Ginsenginin (Krg) Meme Kanseri Hücreleri Üzerine Etkisi, IV. Multidisipliner Kanseri

Araştırma Kongresi, 2012
Rapamisin'in Meme Kanseri Hücrelerinde Gen Ekspresyon Profiline Etkisi, IV. Multidisipliner Kanser Araştırma Kongresi, 2012
Asetil-LKarnitinHEI-OC1 Koklea Hücre Dizisinde Sisplatin Ototoksitesine Karşı Koruyucu mu?, XVII. TPOG Ulusal Pediatrik Kanser Kongresi, 2012
Eikozopentaenoik Asidin Pediatrik KanserHücreleri Üzerine Etkisi, XVII. TPOG Ulusal Pediatrik Kanser Kongresi, 2012
Protective Effect ofResveratrol Against Cisplatin Induced Ototoxicity, 9th Annual Middle East Update in OtolaryngologyConference and Exhibition Head and Neck Surgery, 2012
Tumor metastasis genes in neuroblastoma stem cells, 43rd Congress of the International Society of Pediatric Oncology, 2011
Galectin-1 Nöroblastom Kök Hücrelişkisi, IV. Multidisipliner Kanser Araştırma Kongresi, 2012
Meme Karsinomlarında Her2/neudurumunu değerlendirmede alternatif yöntem: RT-PCR, 22. Ulusal Patoloji Kongresi, 2012
The effects of Sanguirine on apoptotic gene expressions in human neuroblastoma cells, 44th Congress of the International Society of Paediatric Oncology, 2012
Neuroblastoma Stem Cells From Different Cell Lines HaveDifferent Metastatic Potential in Invitro Models, Tumor Models, 2013
Eritropoetin'in siplatin ototoksitesine üzerine koruyucuetkisi, 35. Türk Ulusal Kulak Burun Boğaz ve Baş Boyun Cerrahisi Kongresi, 2013
Multipl MiyelomdaDüzenleyici T Hücrelerin Bortezomib Etkinliğine Etkisinin Ex Vivo Değerlendirilmesi, Uluslararası Katılımlı 1. Hücre Ölümü Araştırma Kongresi, 2013
MedullablastomHücrelerinde Koruyucu Ajanların Sisplatin ve Radyoterapi ile İndüklenmiş Hücre Ölümüne Etkisi, 1stCell Death Research Congress with International Participation, 2013
EVALUATION OF GENE EXPRESSION PROFILES FOR THE DIFFERENTIALDIAGNOSIS OF LUNG ADENOCARCINOMA AND MALIGNANT PLEURAL MESOTHELIOMA, IASLC 15th WORLD CONFERENCE ON LUNG CANCER, 2013
In vitro Effect of Korean Red Ginseng on Cisplatin Induced Ototoxicity, 20th International Federation of Otorhino Laryngological Societies (IFOS) World Congress, 2013
Is Acetyl-L Carnitine Protective on Cisplatin-induced ototoxicity in HEI-OCI cell line?, 44th Congress of the International Society of Paediatric Oncology, 2012
Üçlü Negatif MemeKanseriinde Tacrolimusun İn vitro ve İn vivo Değerlendirilmesi, IX. Aydın Onkoloji Günleri- KlinikOnkolojide Güncel Tedaviler Sempozyumu, 2014
Silmarinin Sisplatin Kombinasyonu ile Nöroblastom Hücrelerine Etkisi, XVIII. Ulusal PediatrikKanser Kongresi, 2014
NöroblastomFare Modelinde Asetil-L-Karnitin'in Sisplatin Toksisitesi ve Tümör Biyolojisi Üzerine EtkilerininAraştırılması, XVIII. Ulusal Pediatrik Kanser Kongresi, 2014
Nöroblastomda İn Vitro Tacrolimus Etkisi, XVIII. Ulusal Pediatrik Kanser Kongresi, 2014
Sanguinarin Ajanının Nöroblastom Üzerine İn Vivo Etkisi, XVIII. Ulusal Pediatrik Kanser Kongresi, 2014

Chaperonin (HSP60) and annexin 2 are candidate biomarkers for early diagnosis of nonsmall cell lung carcinoma, EACR-Sponsored 2nd Anticancer Agents Congress:Targeting Cancer Stem Cells, 2014
Chemotherapy and Targeted Therapy Sensitivity Testing in Malignant Pleural Effusions, EACR-Sponsored 2nd Anticancer Agents Congress:Targeting Cancer Stem Cells, 2014
Studying Effect of Bortezomib on Ex Vivo Multiple Myeloma Tumor Model Obtained From Bone Marrow Of Patients, EACR-Sponsored 2nd Anticancer Agents Congress:Targeting Cancer Stem Cells, 2014
Sanguinarine has in vitro less ototoxic effect than cisplatin, EACR-Sponsored 2nd Anticancer Agents Congress:Targeting Cancer Stem Cells, 2014
Silmarinin Sisplatin Kombinasyonu İle Nöroblastom Hücrelerine Etkisi, 5. Multidisipliner Kanser Araştırma Kongresi, 2014
Meme Kanseri Rapamisinin Kanser Kök Hücre İlişkili Gen Ekspresyonuna Etkisi, 4. Ulusal Hücresel Tedavi ve Rejeneratif Tıp Kongresi, 2014
Neuroblastoma Tumor Mice Model, Tumor Models, 2013
Studying Effect of Bortezomib on Ex Vivo Multiple Myeloma Tumor Model Obtained from Bone Marrow of Patients, Tumor Models, 2013
The Effects of Protective agents against Cisplatin and Radiotherapy Induced Cell Death, 3rd Congress of the Mediterranean Multidisciplinary Oncology Forum, 2013
Clinical Significance of DNA Repair Genes Expressions in Neurofibromatosis Type I Cases, 45th Congress of The International Society of Pediatric Oncology (SIOP) 2013, 2013
Effect of Eicopentaenoic Acid on Pediatric Cancer Cells, 44th Congress of the International Society of Paediatric Oncology, 2012
TPOG 2009 Nöroblastom Protokolü Doku Moleküler İnceleme İşleyiş Analizi (TPOG Nöroblastom Grubu Adına), 20. Ulusal Kanser Kongresi, 2013
Çevresel karsinojenlerin etkileri (in vitro hücre kültürü çalışması), V. Özel Çalışma Modülü (ÖÇM) Sempozyumu, 2011
Kanserde erken tanı ve korunma, V. Özel Çalışma Modülü (ÖÇM) Sempozyumu, 2011
Basic oncology doctoral degree program of Dokuz Eylül University, 6th ORPHEUS Conference-PhD Quality Indicators for Biomedicine and Health Sciences, 2011
Nöroblastom kök hücrelerinde tümör metastaz genleri, XIX. Ulusal Kanser Kongresi, 2011
The Effect of Chemotherapeutic and Demethylating Agents on Notch Signalling Pathway in Hepatoblastoma, The Fifth APOCP General Assembly Conference, 2010
Medullablastom Hücrelerinde Koruyucu Ajanların Sisplatin ve Radyoterapi ile İndüklenmiş Hücre Ölümüne Etkisi, XVIII. Ulusal Pediatrik Kanser Kongresi, 2014
Clinical Significance of DNA Repair Genes Expressions in Neurofibromatosis Type 1 Cases, 15th European NF Meeting, 2012
Resveratrolün sisplatin ototoksitesine karşı koruyucu etkisi, 2. Ulusal Otoloji ve Nörootoloji Kongresi, 2012

Nöroblastom Fare Tümör ModeliÖnÇalışma, XVII. TPOG Ulusal Pediatrik Kanser Kongresi, 2012
İnsan Neuroblastoma HücrelerindeSanguinarinein Apoptotik Gen Ekspresyonları Üzerine Etkisi, XVII. TPOG Ulusal Pediatrik Kanser Kongresi, 2012
Her-2 pozitif meme kanserinin transtuzumabla tedavisinde p95/611-CTF'nin (Her-2'nin karboksiterminal fragmanı) rolü, 23. Ulusal Patoloji Kongresi, 2013
Pankreatik Adenokarsinom Olgularında, Foxp3 + Düzenleyici T Hücrelerin Dağılımı Ve PrognostikParametrelerle Karşılaştırılması", 23. Ulusal Patoloji Kongresi, 2013
Kolon Kanseri Dokusundan Tümör İnfiltrate Eden Lenfositİzolasyonu: Ex Vivo Yöntem Optimizasyonu, 1. Immuno-Onkoloji ve Hedefe Yönelik KanserTedavileri Kongresi, 2014
Nöroblastomdaİmmun Düzenleyici Hücrelerin Rolü, 1. Immuno-Onkoloji ve Hedefe Yönelik Kanser TedavileriKongresi, 2014
Hepatopankreatobilier Tümörlerde Düzenleyici T Lenfositler ve Prognostik Önemi, 1.Immuno-Onkoloji ve Hedefe Yönelik Kanser Tedavileri Kongresi, 2014
Multipl Miyelomda T Regulatuar Hücrelerin (Treg) Tedaviye Etkisinin Ex Vivo Araştırılması, 1.Immuno-Onkoloji ve Hedefe Yönelik Kanser Tedavileri Kongresi, 2014
Türkiye'de Nöroblastom Moleküler Profili (TürkPediatrik Onkoloji Grubu Adına), XVIII. Ulusal Pediatrik Kanser Kongresi, 2014
Nöroblastomda Demetile Edici Ajan ve Kemoterapötik Ajanların Notch Sinyal Yolağı Ekspresyon Ve Metilasyonuna Etkisi III. Multidisipliner Kanser Araştırma Sempozyumu. 14-17 Mart, Uludağ
Nöroblastomun Sisplatin İle İndüklenen Sitotoksiste Modelinde Glutamilsisteinil Etil Esterinin İn Vitro Potansiyel Sitoprotektan Etkisi.TPOG Ulusal Pediatrik Kanser Kongresi. Mayıs 2008, İzmir
Evaluation Of T Regulatory Cells In Multiple Myeloma In Correlation With Autologous Bone Marrow Transplantation4th EORTC Pathobiology Group Annual Meeting 1th International Multidisciplinary Cancer Research Congress, May 2009
Methylation Profile Of The Promoter CpG Islands Of Death Associated Protein-kinase In Nephroblastoma4th EORTC Pathobiology Group Annual Meeting & 1st International Multidisciplinary Cancer Research Congress, May 2009
Hepatoblastomda Diferansiye Edici ve Apoptotik Ajanların Notch Ekspresyonunu Üzerine EtkisiXVIII. Ulusal Kanser Kongresi 21-26 Nisan 2009, Antalya

Diğer yayınlar

Düzenleme Tarihi :18/07/2014