

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KÖK HÜCRE ANABİLİM DALI**

**ALLOJENİK KEMİK İLİĞİ NAKLİ YAPILAN
HASTALARDA KİMERİZM, GVHD VE SAĞKALIM İLE
MİYELOİD KÖKENLİ BASKILAYICI HÜCRELER
(MDSC) ARASINDAKİ İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Hazırlayan
Burçin ERDEM KINAŞ**

**Danışman
Prof. Dr. Mustafa ÇETİN**

Yüksek Lisans Tezi

**Ağustos 2019
KAYSERİ**

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KÖK HÜCRE ANABİLİM DALI**

**ALLOJENİK KEMİK İLİĞİ NAKLİ YAPILAN
HASTALARDA KİMERİZM, GVHD VE SAĞKALIM İLE
MİYELOİD KÖKENLİ BASKILAYICI HÜCRELER
(MDSC) ARASINDAKİ İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI**

(Yüksek Lisans Tezi)

**Hazırlayan
Burçin ERDEM KINAŞ**

**Danışman
Prof. Dr. Mustafa ÇETİN**

**Bu çalışma; Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
Tarafından TYL-2017-7831 nolu proje ile desteklenmiştir.**

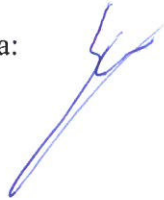
**Ağustos 2019
KAYSERİ**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığım ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Burçin ERDEM KINAŞ

İmza:



YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

“Allojenik Kemik İliğı Nakli Yapılan Hastalarda Kimerizm, GVHD ve Sağkalım ile Miyeloid Kökenli Baskılayıcı Hücreler (MDSC) Arasındaki İlişkinin Araştırılması” adlı Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan

Burçin ERDEM KINAŞ



Danışman

Prof. Dr. Mustafa ÇETİN



Anabilim Dalı Başkanı

Prof. Dr. Yusuf ÖZKUL

KABUL VE ONAY

Prof. Dr. Mustafa ÇETİN danışmanlığında Burçin ERDEM KINAŞ tarafından hazırlanan “Allojenik Kemik İliği Nakli Yapılan Hastalarda Kimerizm, GVHD ve Sağkalım ile Miyeloid Kökenli Baskılayıcı Hücreler (MDSC) Arasındaki İlişkinin Araştırılması” konulu bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kök Hücre Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

05./07/2019

JÜRİ**İmza**

Danışman : Prof. Dr. Mustafa ÇETİN
(Hematoloji Anabilim Dalı)
Üye : Prof. Dr. Yusuf ÖZKUL
(Kök Hücre Anabilim Dalı)
Üye : Dr. Öğr. Üyesi Hatice TERZİ
(Hematoloji Anabilim Dalı)

**ONAY**

Bu tezin kabulü Enstitü yönetim Kurulunun/...../..... tarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

...../...../.....

Prof. Dr. Bilal AKYÜZ**Enstitü Müdürü**

TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesi ve çalışmamın bütün aşamalarında bilgi, tecrübe, destek ve yardımlarını esirgemeyen, danışmanlığımı yapan, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Mustafa ÇETİN hocama en içten teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Tez yazım süresince katkı ve önerileri için Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi İmmünoloji Anabilim Dalı Başkanı Pof. Dr. Mustafa Yavuz KÖKER hocama teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Yüksek Lisans öğrenimim süresince bilgilerinden faydalandığım Erciyes Üniversitesi Kök Hücre Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr.Yusuf ÖZKUL hocama ve diğer Genom ve Kök hücre merkezindeki hocalarıma, sevgili Ceren PINARBAŞI başta olmak üzere Genom ve Kök hücre merkezi çalışanlarına teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım süresince, tezin her aşamasında yardımları ile destek olan, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Anabilim Dalı Flow Stometri Laboratuvarında çalışma arkadaşlarım Sinan KÜTÜK, Esra AKPINAR, Huriye ÇELİKZENCİR'e, tez çalışmam ve hastalarımın takip sürecinde bana her türlü desteği veren ve kalitenin tesadüf olmadığını çalışmaları, disiplinleri ve bilgileriyle gösteren Erciyes Üniversitesi İlik Nakli ve Hücresel Tedavi merkezi servis ve poliklinik hemşirelerine ve aynı birimde çalışan sevgili Dr. F.Esen KARAKUŞ ve Dr. Nermin KENİ BEĞENDİ'ye, öngörülerıyla ve bilgisiyle bana hep yol gösteren sevgili arkadaşım Dr. Fatma DOĞRUEL'e, istatistik çalışmalarımda yardımcı olan Funda İPEKTEN'e, manevi desteklerini hiçbir zaman benden esirgemeyen ve hep yanımda olduklarını hissettiren Memorial Kayseri Laboratuvarı çalışma arkadaşlarıma ve çok sevdiğim aileme teşekkürlerimi sunarım.

Burçin ERDEM KINAŞ

Kayseri, Ağustos 2019

**ALLOJENİK KEMİK İLİĞİ NAKLİ YAPILAN HASTALARDA KİMERİZM,
GVHD VE SAĞKALIM İLE MİYELOİD KÖKENLİ BASKILAYICI
HÜCRELER (MDSC) ARASINDAKİ İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI**

Burçin ERDEM KINAŞ

Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Kök Hücre Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi, Ağustos 2019

Danışman: Prof. Dr. Mustafa ÇETİN

KISA ÖZET

Miyeloid kökenli baskılayıcı hücreler (MDSC), myeloid hücrelerin tam olarak tanımlanmış bir alt grubu olmaktan ziyade matür hücrelere farklılaşmaları engellenmiş aktive immatür hücrelerin oluşturduğu, monosit ve granülosit alt kümeleri içeren heterojen bir topluluktur. Miyeloid türevli baskılayıcı hücreler (MDSC), efektör T hücresi tepkilerini baskılayabilen ve düzenleyici T hücrelerinin (Treg) gelişimini teşvik edebilen düzenleyici hücre popülasyonlarıdır.

Nakil sonrası miyeloid hücrelerin hızlı genişlemesi göz önüne alındığında, doğuştan gelen bağışıklık sisteminin bu üyelerinin, nakil sonrası erken bağışıklık ortamına önemli katkıları olabileceği düşünülmüştür. Bu çalışmada, Allojenik kemik iliği nakli yapılan hastalarda donör kaynaklı kök hücre yapılanma (kimerizm) oranı, GVHD ve sağkalım ile miyeloid kökenli baskılayıcı hücreleri arasındaki ilişkinin araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmaya Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Hematoloji Bilim Dalı Kemik İliği Nakil Ünitesinde Aralık 2017- Eylül 2018 tarihleri arasında Allojenik kemik iliği nakli (AKHN) yapılan 15 hasta dahil edilmiştir. Çalışmamızda 15 hastanın engrafman (e) sonrası e0., e30., e60., ve e90. günlerinde alınan kanlarından akım sitometri cihazı ile CD11b, HLA-DR, CD14, CD66b, CD15, CD33, CD45 antikorları kullanılarak PMN-MDSC ve M-MDSC hücrelerin analizi fenotipik olarak yapılmıştır.

Çalışmamızda 100 günlük sağkalımı tamamlayan hastalarda, M-MDSC değişkeninde engrafmanın e30. gün ölçümünün ortanca değeri engrafmanın gerçekleştiği e0. gün ölçümünün ortanca değerinden anlamlı düzeyde yüksek olduğu gözlenmiştir ($p<0.005$).

Aynı zamanda Lenfosit değişkeninde e60. gün ölçümünün ortanca değerinin e0. gün ölçümünün ortanca değerinden anlamlı düzeyde yüksek olduğu gözlenmiştir. Ayrıca M-MDSC ve lenfosit parametresinde GVHD gelişmeyen grupta e0.gün ölçümünün ortanca değerinin, GVHD gelişen grupta e0.gün ölçümünün ortanca değerinden anlamlı düzeyde yüksek olduğu gözlenmiştir. Kimerizm sonuçlarına göre değişkenler arasında fark saptanmamıştır. Örneklem büyüklüğünün yetersizliğine bağlı olarak sağ kalım değişkenine göre istatistiki olarak anlamlı bir fark bulunmamasına karşılık, yapılan tanımlayıcı istatistik tablosuna göre sağ kalım grubunda M-MDSC ve G-MDSC değerlerinin 0.,30. ve 60. günlerde artma eğilimde olduğu, ölen grupta ise 30. günden sonra belirgin azalma olduğu gözlenmiştir.

Çalışmamıza göre özellikle nakil sonrası e0., e30. ve e60. Günler arasında daha sık aralıklarla bakılmak üzere MDSC hücreleri analizinin başlangıçta fenotipik olmak üzere, baskılayıcı aktivitelere ve biyokimyasal analizlerine göre yapılması önerilmektedir. Sonuç olarak MDSC hücrelerinin, nakil sonrası düzenleyici hücre popülasyonuna katkıları ve özellikle GVHD gelişimini öngörebildiği zamanın ve zamanlar arası oranların belirlenebilmesi için daha büyük örneklem grubunda çalışılması gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: Allojenik kemik iliği nakli, Kimerizm, Graft Versus Host Hastalığı (GVHD), Miyeloid kökenli baskılayıcı hücreler (MDSC)

**INVESTIGATION OF RELATIONSHIP BETWEEN CHIMERISM, GVHD AND
SURVIVAL AND MYELOID DERIVED SUPPRESSOR CELLS (MDSC) IN
PATIENTS WITH ALLOGENIC BONE MARROW TRANSPLANTATION**

Burçin ERDEM KINAŞ

Erciyes University, Graduate School of Health Sciences

Department of Stem Cells

Master of Science Thesis, August 2019

Supervisor: Prof. Dr. Mustafa ÇETİN

ABSTRACT

Myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) are a heterogeneous collection of monocyte and granulocyte subsets of activated immature cells that are prevented from differentiating into mature cells rather than a fully defined subset of myeloid cells. Myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) are regulatory cell populations capable of suppressing effector T cell responses and promoting the development of regulatory T cells (Tregs).

Taken into account the rapid expansion of myeloid cells after transplantation, it was thought that these members of the innate immune system could have important contributions to the early immune setting after transplantation. The aim of this study was to investigate the relationship between donor stem cell structure (chimerism) rate, GVHD and myeloid suppressor cells with survival in patients with allogeneic bone marrow transplantation.

Fifteen patients who had allogeneic bone marrow transplantation between December 2017 and September 2018 in the Department of Hematology Bone Marrow Transplant Unit of Erciyes University Faculty of Medicine were included in the study. In our study, taken 15 patients' blood in the days of e0., e30., e60., and e90 after engraftment (e) by using the flow cytometric device ,PMN-MDSC and M-MDSC cells were analyzed phenotypically using CD11b, HLA-DR, CD14, CD66b, CD15, CD33, CD45 antibodies.

In our study, in patients completing a 100-day survival, in M-MDSC variable engraftment e30. the median value of the day measurement e0 at which the engraftment day measurement was observed to be significantly higher than the median

value.($p<0.05$) At the same time in the lymphocyte variable e60. the median value of the day measurement e0. day measurement was significantly higher than the median value. In addition, in the M-MDSC and lymphocyte parameters, the median value of day e0 in the group without GVHD was significantly higher than the median value of day e0 in the group with GVHD. There was no difference between the variables according to kimerizm results. Although there was no statistically significant difference for survival variable depending on the sample size, according to the descriptive statistics table, M-MDSC and G-MDSC values of survival group tend to increase 0.,30. and on the 60th day, there was a significant decrease in the group that died after the 30th day.

According to our study, it is suggested that MDSC cells analysis should be performed at baseline phenotypic, suppressive activities and biochemical analyzes, especially at the more frequent intervals between days 0, 30 and 60 after transplantation. In conclusion, in order to determine the contribution of MDSC cells to the post-transplant regulatory cell population and the time and intertemporal rates in which it can estimate the development of GVHD, it should be studied in a larger sample group.

Keywords: Allogenic bone marrow, Graft versus host disease (GVHD), Myeloid derived suppressor cell (MDSC)

İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK	i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK.....	ii
YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI	iii
KABUL VE ONAY	iv
TEŞEKKÜR.....	v
KISA ÖZET	vi
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	x
KISALTMALAR	xiii
TABLolar LİSTESİ.....	xvii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xviii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1 Kök Hücre Fizyolojisi ve Hematopoez	4
2.1.1 Hematopoetik Kök Hücre ve Niş	6
2.1.2 Hematopoetik Büyüme Faktörleri	10
2.2 Hematopoetik Kök Hücre Nakil Özellikleri	12
2.3 Hematopoetik Kök Hücre Nakil Çeşitleri	14
2.3.1 Otolog Hematopoetik Kök Hücre Nakli	14
2.3.2 Singeneik Hematopoetik Kök Hücre Nakli	15
2.3.3 Allojenik Hematopoetik Kök Hücre Nakli	15
2.4 Hematopoetik Kök hücre Nakil Kaynakları	16
2.4.1 Kemik İliği	16
2.4.2 Göbek Kordonu Kanı	17
2.4.3 Periferik Kan	17
2.5 Hematopoetik Kök Hücre Nakil Süreci.....	18
2.6 Hematopoetik Kök Hücre Naklinden Sonra İzlem	20
2.6.1 Engafman ve Hematopoetik İyileşme	20
2.6.2 Graft Versus Host Hastalığı	21

2.6.2.1 Akut Graft Versus Host Hastalığı Evreleme	22
2.6.3 Kimerizm	24
2.6.3.1 Kimerizm Tipleri:	24
2.6.3.2 Kimerizm Yöntemleri	25
2.6.3.3 Kimerizm takibinde örnek seçilmesi ve ölçümlerin sıklığı	27
2.7 Hematopoetik Kök Hücre Naklinden Sonra İmmun Yeniden Yapılanma ve Hematopoetik Düzeltme	28
2.7.1 Doğal İmmünite	28
2.7.2 Kazanılmış İmmünite	29
2.8 Myeloid Kökenli Baskılayıcı Hücreler (MDSC'ler)	31
2.8.1 MDSC Tanımı	31
2.8.2 İnsanlarda MDSC Alt tipleri	34
2.8.3 MDSC yi tanımlamak için fenotipik belirteçler	35
2.8.4 MDSC'lerin biyokimyasal ve moleküler özellikleri	38
2.8.5 MDSC'yi tanımlamak için fonksiyonel analizler	41
2.8.6 MDSC'lerin Gelişimleri ve Aktivasyonları	43
2.8.7 MDSC Raporlanması için Algoritma	45
2.9 Hemaotopoetik Kök Hücre Naklinden Sonra MDSC Hücreleri	46
2.10 Akım sitometrinin İmmun Fenotiplerede kullanımı	49
3. GEREÇ VE YÖNTEM	55
3.1 Araç ve Gereçler	55
3.1.1 Alet ve Ekipman	55
3.1.2 Kullanılan Solüsyonlar ve Kitler	56
3.2 Yöntemler	56
3.2.1 Akım Sitometri İşlem ve Analiz Basamakları	57
3.2.2 Kimerizm analiz basamakları	57
3.3 İstatistiksel Analiz	58
4. BULGULAR	59
4.1 Hastaların Temel Özellikleri	59

5. TARTIşMA VE SONUÇ.....	75
----------------------------------	-----------

6. KAYNAKLAR	83
---------------------------	-----------

EKLER

ÖZGEÇMİş



KISALTMALAR

Ab	:Antikor
AKHN	: Allojenik Kök Hücre Nakli
ALL	: Akut Lenfoblastik Lösemi
ALP	: Alkalen Fosfataz
ALT	: Alanin Aminotransferaz
AML	: Akut Miyeloid Lösemi
AML-M3	: Akut Promiyelositik Lösemi
APC	: Antijen Sunan Hücre
ASC	: Alanin-Serin-Sistein
ASH	: Antijen Sunucu Hücre
AST	: Aspartat Aminotransferaz
Ca	: Kalsiyum
CD	: Hücre yüzey belirteçleri
CFU-C	: Koloni Oluşturan Birim Hücre
CMP	: Ortak Miyeloid Progenitör
DAMP	: Hasarla ilişkili moleküler yapılar
ECOG	: Eastren Cooperative Oncology Group
EDTA	: Etilendiamintetraasetikasit
FITC	: Fluorescein isothiocyanate
FL1	: Fluorescence Line 1
FS	: Forward Scatter (İleri Işık Saçılımı) Dedektörü
G-CSF	: Granülosit Koloni Uyarıcı Faktör
GİS	: Gastrointestinal Sistem
GM-CSF	: Granülosit-Makrofaj Koloni Uyarıcı Faktör

G-MDSC	: Granülosit Benzeri Miyeloid Türevli Baskılayıcı Hücreler
G-PBSC	: Granülosit Koloni Uyarıcı Faktör Mobilize Periferik Kan Kök Hücreleri
GPI	: Glikozil Fosfatidilinositol
GranB	: Granzyme B
GVHD	: Graft Versus Host Hastalığı
GVL	: GraftVersus Lösemi
H2O2	: Hidrojen peroksit
HCC	:Hepatoselüler karsinom
HKH	: Hematopoetik Kök Hücre
HKHN	: Hematopoetik Kök Hücre Nakli
HL	: Hodgkin Lenfoma
HLA	: İnsan Lökosit Antijeni
IBMTR	: Uluslar arası Kan ve Kemik İliği Nakli Araştırmaları Merkezi
IDO	: İndolamin 2,3 dioksijenaz
IFN- γ	: Interferon Gama
IL	: İnterlökin
ITP	: Immun Trombositopenik Purpura
JAK	: Janus Kinaz
KC	: Karaciğer
kDA	: Kilodalton
KKH	: Kemik İliği Kök Hücresi
KLL	: Kronik Lenfositik Lösemi
KML	: Kronik Miyeloid Lösemi
KMML	: Kronik Miyelomonositer Lösemi
kÖ-HKH	: Kısa Ömürlü Hematopoetik Kök Hücre
KrO	: Krom Orange

LBP	: Lps Baęlayan Protein
LPS	: Lipopolisakkarit
MDS	: Miyelodisplastik Sendrom
MDSC	: Miyeloid Kökenli Baskılayıcı Hücreler
ME	: Myeloid-Eritroid nclleri
MFI	: Ortalama Floresan Yoğunluğu
MKH	: Mezenkimal Kök Hücre
MM	: Multiple Myelom
M-MDSC	: Monosit Benzeri Miyeloid Türevli Baskılayıcı Hücreler
MH	: Multipotent nc Hücreler
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NHL	: Non-Hodgkin Lenfoma
NK	: Natural Killer
NO	: Nitrik Oksit
NOS2	: Nitrik Oksit Sentaz 2
NOX2	: NADPH Oksidaz 2
OL	: Ortak Lenfoid nclleri
OM	: Orta Myeloid nclleri
OONO ⁻	: Peroksinitrit anyonu
PB	: Pacific Blue
PBMC	: Periferik Kan Mononükleer Hücre
PC5	: Phycoerytrin-Cyanin 5
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PE	: Phycoeritrin
PKHN	: Periferik Kök Hücre Nakli
PMN	: Polimorfonükleer

PMT	: Photomultiplier Tube (Foto-çoğaltıcı tüp)
PNT	: Peroksinitrit
PS	: Performans Durumu
ROS	: Reaktif Oksijen Ürünleri
SCF	: Kök Hücre Faktör
STAT	: Sinyal İletici ve Transkripsiyon Aktive Edici
STR	: Kısa ardışık tekrar bölgeleri
TBI	: Tüm vücut ışınlaması
TCR	: T Hücre Reseptörü
Teff	: Efektör T hücresi
TGF- β	: Transforming Growth Faktör Beta
TLR	: Toll-like receptör
TNF- α	: Tümör nekrozis faktör alfa
TRAIL	: TNF ile ilişkili apoptoz indükleyici ligand
Treg	: T regülatuar
uÖ-HKH	: Uzun Ömürlü Hematopoetik Kök Hücre
VNTR	: Değişken sayıda ardışık tekrar bölgeleri
VYA	: Vücut Yüzey Ağırlığı

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2.1	Erişkin Hematopoetik Kök Hücre Nakli Endikasyonları	13
Tablo 2.2	Akut GVHD Başlangıcı - Üç Adımlı Model	22
Tablo 2.3	Akut GVHD Organ Tutulumuna Göre Evreleme	23
Tablo 2.4	Akut GVHD Evrelemesi ve Derecelendirilmesi	23
Tablo 2.5	MDSC Hücrelerini Tanımlamak İçin Gerekli Fenotipik Özellikler	36
Tablo 4.1	Hastaların demografik ve nakil verileri için tanımlayıcı istatistikler	59
Tablo 4.2	Hastaların WBC, Nötrofil, Monosit, Lenfosit, Trombosit Değerleri	64
Tablo 4.3	Hastaların 0,30,60,90. Günlerindeki CD14 MFI, CD15 MFI, PMN-MDSC MFI, M- MDSC MFI Değerleri	66
Tablo 4.4	Sağ Kalanlardan CD14 MFI, CD15 MFI, PMN-MDSC MFI, M- MDSC MFI, WBC, Nötrofil, Monosit, Lenfosit, Trombosit, Kimerizm Parametrelerinin Zamana Göre Karşılaştırma Sonuçları	68
Tablo 4.5	GVHD Değişkenine Göre Belirlenen Parametrelerin Zamana Göre Karşılaştırma Sonuçları	69
Tablo 4.6	Sağkalım Değişkenine Göre Belirlenen Parametrelerin Tanımlayıcı İstatistikleri	72

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1.	Elde Edildikleri Kaynaklara Göre Kök Hücre Sınıflaması.....	5
Şekil 2.2	Hematopoetik Kök Hücrenin Özellikleri.....	6
Şekil 2.3	İnsanda Hematopoezin Hiyerarşik Hücre Düzeni	8
Şekil 2.4	Hematopoetik Öncüllerin Yapımını veya Farklılaşmasını Düzenleyen Moleküller.....	11
Şekil 2.5	STR tabanlı kimerizm analizi	26
Şekil 2.6	Kimerizm Analiz Basamakları.....	27
Şekil 2.7	Sağlıklı Donörlerin (HD) ve Melanom Hastalarının Periferik Kanında MDSC Alt Gruplarının Belirlenmesi İçin Kapılama Stratejileri.	37
Şekil 2.8	MDSC Hüvrelerinin İmmünsüpresif Mekanizmalarına ve Kök Hücre Nakli Sırasında Genişlemeye Genel Bakış.	44
Şekil 2.9	Nakil Sürecinde Donör ve Alıcı Kanlarında Gerçekleşen İmmunolojik Mekanizmalar.....	47
Şekil 2.10.	Akım Sitometri Cihazı Hücre Akış Prensibi.....	50
Şekil 2.11.	Akım Sitometri Cihazı Çalışma Prensibi	52
Şekil 4.1	Hasta 9 (H9)'un Akım Sitometri Örneği.	63
Şekil 4.2	CD14 MFI değişkeninin Sağ kalan hastalar için herbir zaman noktasındaki dağılımı.	73
Şekil 4.3	CD15 MFI değişkeninin Sağ kalan hastalar için herbir zaman noktasındaki dağılımı.	73
Şekil 4.4	M-MDSC MFI değişkeninin Sağ kalan hastalar için herbir zaman noktasındaki dağılımı	74
Şekil 4.5	PMN-MDSC MFI değişkeninin Sağ kalan hastalar için herbir zaman noktasındaki dağılımı	74

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Allojenik kök hücre nakli (AKHN), başta lösemi olmak üzere çeşitli hematolojik malignitilerin tedavisinde verici kaynaklı hematopoetik kök hücrelerin kullanıldığı tedavi yöntemidir. Nakil sürecinde belirli aralıklarla yapılan kimerizm ölçümü ve gerekli olduğu durumda kemik iliği incelemesiyle verici hücrelerin alıcıda yapılanması ve nakil başarısı değerlendirilir.

AKHN’de hazırlık rejimini izleyen aplazi sonrası donör lenfohematopoetik hücrelerinin alıcıda yerleşmesi ve yeni kan hücrelerinin oluşması ‘engrafman’ (yamanma) olarak isimlendirilir. Nakil sonrası erken dönemde greftin yapılanması engrafmanın sağlanmasında önemlidir. Nötrofil sayısının ardışık 3 gün boyunca $\geq 500/\mu\text{L}$ olması, trombosit sayısının ise ardışık 3 gün boyunca $\geq 20000/\mu\text{L}$ veya tek seferde $50000/\mu\text{L}$ görülmesi engrafman tanımı için yeterlidir. Engrafman süresi nakil sonrası 2-3 hafta arasında değişir. 21 günü aştığında ‘engrafman gecikmesi’ 40 günü aştığında ise ‘engrafman başarısızlığı’ söz konusudur. Nakil sonrası engrafman sağlandıktan sonra greftin kaybedilmesi geç greft yetersizliği (greft reddi) olarak isimlendirilir. Konakçıda kendine ait olmayan hücrelerin yerleşmesine ‘kimerizm’ denir. AKHN’de donör kaynaklı kök hücre yapılanmasının belirleyicisi olup, nakil sonrası birinci ayda başlanarak aylık intervallerle greftin yerleşmesinin ya da reddinin takibinde kullanılmaktadır.

AKHN yapılan hastaların takiplerinde %10-30 oranında graft versus host hastalığı (GVHD) gelişme riski mevcuttur. GVHD, verici kaynaklı T hücrelerinin hastanın dokularında oluşturduğu immun aracılı hasar ve ağır inflamatuvar olaylar serisi olarak bilinir. Hematopoetik kök hücre naklinin ölümcül bir komplikasyondur. Günümüzde steroid başta olmak üzere çeşitli immunsupresif ilaçlar, mezenkimal kök hücreler GVHD tedavisinde kullanılmakta ve başarılı sonuçlar elde edilmektedir. GVHD alıcıda

immün parametreleri değiştirmek suretiyle primer ve sekonder greft yetmezliğine yol açabilen yıkıcı bir hastalıktır.

Miyeloid kökenli baskılayıcı hücreler (MDSC), myeloid hücrelerin tam olarak tanımlanmış bir alt grubu olmaktan ziyade matür hücelere farklılaşmaları engellenmiş aktive immatür hücrelerin oluşturduğu heterojen bir topluluktur (Vladimirovna ve ark., 2016). Pek çok tümör modelinde ve insan kanserlerinde MDSC popülasyonunda artış gözlenirken MDSC'lerin ortadan kaldırılması hastalık ilerlemesinde dramatik bir iyileşme ve bazen direk anti-tümör etki ile sonuçlanmaktadır. MDSC'ler aynı zamanda anjiyogenez, tümör hücresi invazyonu ve metastazlardaki artışlara da katkıda bulunurlar.

Miyeloid kökenli baskılayıcı hücreler, salgıladıkları sitokinler aracılığıyla immunsupresyon ve anti-inflamatuar etki gösterirler. Periferik kanda saptanamayacak kadar az olan bu hücreler G-CSF (Granülosit Koloni Uyarıcı Faktör) uyarısı ile titre edilen düzeylere çıkarılabilir. Bu hücrelerin invitro ortamlarda üretilmeleri de mümkündür. İmmatür formdaki bu hücrelerin biyolojisi aydınlatılarak işlevsellikleri ve terapötik kullanım alanları tespit edilebilir. MDSC'lerin T hücre proliferasyonu ve aktivasyonunu baskılamada kullandıkları iki farklı mekanizma gösterilmiştir. Antijen özgül baskılamada, H_2O_2 (Hidrojen peroksit) ve nitrik oksit (NO) ile her ikisinin varlığında ortaya çıkan ($OONO^-$) peroksinitritin, TCR (T hücre reseptörü) yapısında oluşturduğu oksidatif hasar rol oynar. Antijen özgül olmayan baskılamada ise IL-10 ve TGF- β aracılı Treg (T regülatuar) fenotiplerine dönüşüm ve aminoasit tüketimi ile metabolik yetersizlik rol oynar.

MDSC ile yapılan çalışmalara yoğun bir ilgi olmasına karşılık, mevcut çalışmalardaki fenotipik tiplendirmelerde farklılıklar olduğu görülmüştür. Bu farklılıkları ortadan kaldırmak için 2016 yılında 23 laboratuvarın ortak katılımıyla MDSC'leri her biri kendi içinde birden çok popülasyon barındıran, üç ana gruba ayırmışlardır. Bu üç ana grubun içerisinde alt grupların belirteçleri belirlenerek toplam 10 MDSC alt grubu tanımlanmıştır. Bu alt gruplardan M-MDSC, monosit morfolojisini paylaşır ve CD14 yüzey belirtecini eksprese etmesine karşılık CD15 yüzey belirtecinin olmamasıyla belirgindir. G-MDSC, granülosite benzeyen hücre popülasyonu içerir ve fenotipik olarak CD15 yüzey belirtecini eksprese ederken CD14'ü içermemesiyle ayırt edilir (Vladimirovna ve ark.,2016; Mandruzzato ve ark., 2016).

Yapılan çalışmalarda, MDSC'lerin AKHN sonrası erken dönemde kanda düzeylerinin arttığı ve Treg gelişimine katkıda bulundukları tespit edilmiştir. AKHN yapılan 26 hastada nakil sonrası ilk 3 ayda, fonksiyonel MDSClerin erken dönemde kanda ölçülebilir düzeyde tespit edilebildiği ve bu hücrelerin Th1 lenfositlerin diferansiyasyonunu inhibe ettiği, Treg hücrelerinin ise uyarılmasına katkıda bulunduğu gözlenmiştir (Guan ve ark., 2015).

AKHN sonrası erken dönemde (2-4 hafta içinde) ön planda monositik alt tipi (M-MDSC) olmak üzere MDSC düzeylerinin arttığı görülmüş olup, M-MDSC miktarı ile akut GVHD sıklığı arasında negatif korelasyon gözlenmiştir. MDSC'lerin akut GVHD üzerine etkileri net bilinmemektedir. Bu olgularda MDSC'lerin kandaki düzeyleri ile IL-10 gibi anti-inflamatuvar sitokinlerin ve Treg düzeylerinin arttığı görülmüştür. G-CSF uyarısıyla, alıcının kemik iliği ortamında ve vericinin periferik kanında öncelikli olarak M-MDSC'nin arttığı görülmüş olup, akut GVHD'yi önleyici gerekli M-MDSC kan düzeyi saptanamamıştır (Maeda ve ark., 2015; Vendramin ve ark., 2015).

Donör kaynaklı kök hücrelerin kimerik yapılanması alıcı kaynaklı T hücrelerin yuvalanma (homing) döneminde ağır immünosüpresyonla baskılanmasına bağlıdır. Alıcı immün sistemi yeterince baskılanmadığı durumda primer greft yetmezliği durumu ortaya çıkmaktadır. Bazen greft elde edildikten sonra ortaya çıkan sekonder (geç) greft yetmezliği çoğunlukla ilk aylarda ortaya çıkmakta ve alıcı immün mekanizmaları etkileyen ilaçlar ve virüsler önemli rol oynamaktadır. Üstelik tam veya kısmi donör yapılanması ile alıcı immün sistemi regülatuar hücrelerinin (T reg) önemli rol oynadığı bilinmektedir.

AKHN sonrası MDSC'lerin immün yapılanmaya katkıda bulundukları bilinmekte olup MDSC düzeylerinin kimerizm başarısının takibinde kullanılabileceği öngörülebilir. Bu çalışmada Allojenik kemik iliği nakli yapılan hastalarda donör kaynaklı kök hücre yapılanması (kimerizm) oranı ile alıcı regülatuar immün sistem paterninde rol oynayan miyeloid kökenli baskılayıcı hücreler (MDSC) arasındaki ilişkinin araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmamızda, 15 allojenik kök hücre nakli yapılan hastada MDSC'lerin nakil sonrası süreçteki etkileşimlerini irdelemeyi, pozitif kazanımlarını ve olumsuz etkilerini tespit etmeyi ve kimerizm ile ilişkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

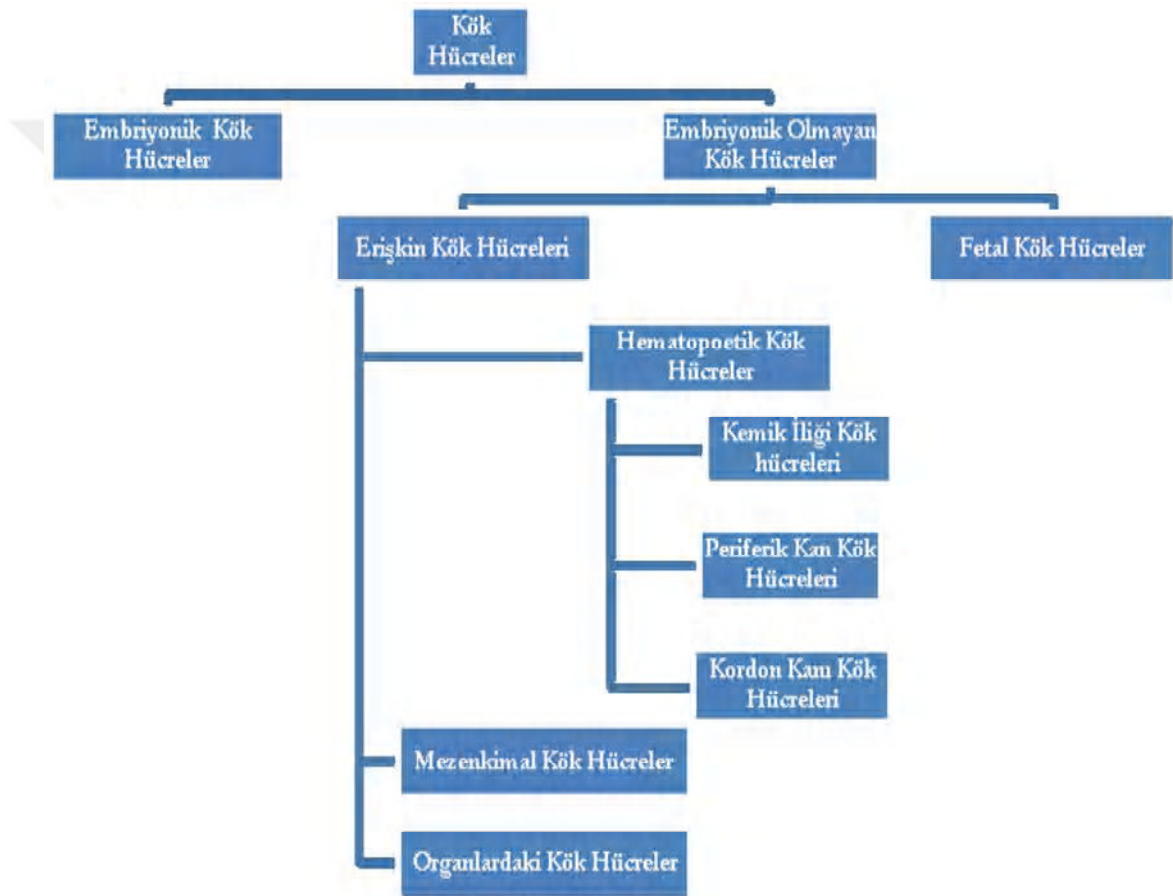
2. GENEL BİLGİLER

2.1 Kök Hücre Fizyolojisi ve Hematopoez

Kök hücre, vücudumuzda bütün doku ve organları oluşturan ana hücrelerdir. Henüz farklılaşmamış olan bu hücreler sınırsız bölünebilme, kendini yenileme, organ ve dokulara dönüşebilme yeteneğine sahiptir.

Kök hücreler farklılaşma özelliklerine göre totipotent, pluripotent, multipotent, oligopotent ve unipotent olmak üzere gelişim basamaklarına ayrılmaktadır. Zigot tek başına tüm organizmayı meydana getirebilecek genetik bilgiye ve güce sahiptir. Bu hücrelere her şeyi yapabilme anlamına gelen totipotent hücre denir. Döllenmeden sonra ilk 4 gün içinde oluşan hücrelerin her biri totipotent hücredir ve her bir hücre ayrı bir organizmayı oluşturabilecek güce sahiptir. Totipotent özelliği bilinen tek kök hücre tipi fertilize yumurta hücresidir. Döllenmeden sonraki 5. günden itibaren hücreler blastosit denilen küresel bir şekil alır. Bu kürenin içindeki hücreler vücuttaki tüm hücrelere dönüşebilecek potansiyele sahip olmalarına rağmen tek başlarına tüm organizmayı oluşturacak güce sahip değildir (pluripotent hücre). Pluripotent kök hücreler, mezodermal, ektodermal ve endodermal kökenli olmak üzere, vücuttaki farklılaşmış tüm hücre tiplerini oluşturabilme potansiyeline sahip hücrelerdir. Embriyonik kök hücreler farklılaşarak birçok farklı hücre tipine dönüştüğü zaman farklılaşma kabiliyetini kaybederken küçük bir kısmı bu özelliklerini korurlar ki bu hücrelere multipotent hücre denir. Multipotent hücreler erişkin bireylerin dokularında var olan hücrelerdir. Oligopotent kök hücreler, özel bir doku veya organda iki veya daha fazla hücre hattına farklılaşabilen kendini yenileme özelliğine sahip kök hücrelerdir. Miyeloid ve lenfoid hücrelere dönüşebilen miyeloid ve lenfoid öncül (progenitör) hücreler oligopotent kök hücrelere örnektir. Unipotent kök hücreler, yalnız tek bir hücre serisine dönüşebilen kendini yenileme özelliğine sahip en az potent kök hücrelerdir (Avcılar ve ark., 2018).

Kök hücreler gelişimsel olarak ve elde edildikleri kaynağa göre ise embriyonel, fetal ve erişkin kök hücreler olarak ayrılırlar. (Şekil 2.1) Blastosit adı verilen hücre kümesinden alınan hücrelerin her biri embriyonel kök hücredir. Erişkin kök hücreler, farklılaşmış dokularda bulunan ancak farklılaşmamış hücrelerdir. İhtiyaç duyulduğunda bulundukları dokudaki değişik hücre türlerine dönüşürler. Hayat boyu kendi kopyalarını üreterek çoğalırlar. Bulundukları dokularda eskijen, hastalanan veya ölen hücrelerin yerine yenilerini üreten kaynaklardır.



Şekil 2.1. Elde Edildikleri Kaynaklara Göre Kök Hücre Sınıflaması

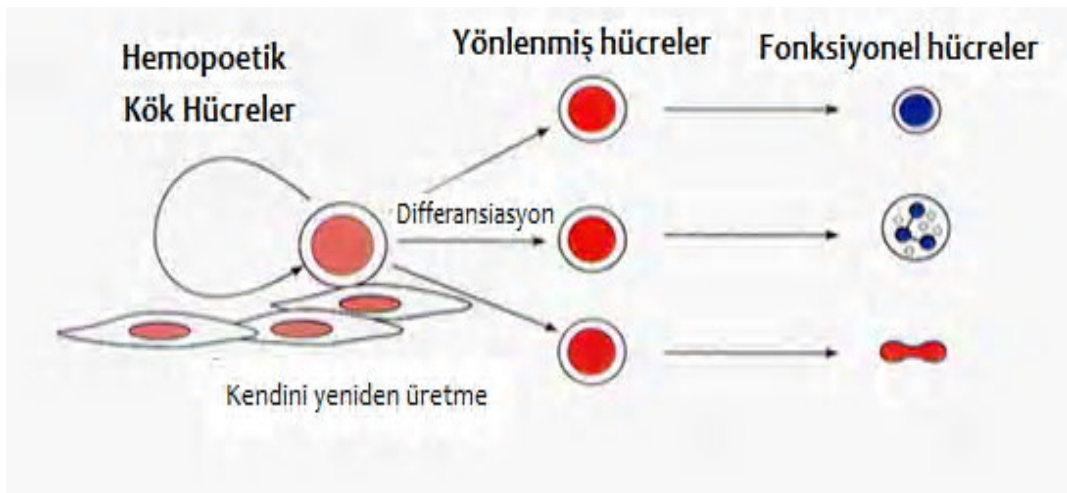
Hematopoez, kan yapımına verilen addır. Kan, yetişkin insanda her gün yaklaşık 1 trilyon (10^{12}) üretilen (hematopoetik homeostaz), oldukça yüksek derecede yenilenen dokularından birisidir. Hematopoez, embriyogenezin ilk ayı içinde yolk kesesinde başlar ve daha sonra karaciğer ve dalağa geçer. İkinci trimesterde hematopoezisten sorumlu primer odak karaciğerdir. Kemik iliği 7. aydan sonra hematopoez görevini üstlenir. Doğumda artık kan üretimi neredeyse tamamen kemik iliğinde gerçekleşmektedir (intramedüller hematopoez). Ancak doğumdan sonra kemik iliğinde

fibroz gelişmesi durumunda karaciğer ve dalak kan üretim işini yeniden üstlenebilirler (extramedullar hematopoez) (Kansu, 2011). 1909 yılında Alexander Maximow, hematopoezin ortak bir öncü (prokürsor) hücreden geliştiğini, yani bir hücreyel hiyerarşi olduğunu ileri sürmüştür. Hematopoez üzerindeki çalışmalar J.E. Till ve E.A. McCulloch' nın 1960'lı yılların başında yapmış olduğu çalışmalarda kan üretimi için hematopoetik kök hücrenin (HKH) yaşam boyu mutlak gerekli olduğu ve uzun süre kendilerini yenileme yeteneklerini koruduğu ortaya konmuş, bu hücrelerden farklılaşan öncü hücrelerin kan hücresi yapımının sağladığına ilişkin önemli bilgiler gün ışığına çıkarılmıştır.

Hematopoetik kök hücre, kemik iliği mikroçevresi (niş) ve hematopoetik büyüme faktörleri (koloni stime edici faktörler, sitokinler, interlökinler, büyüme faktörleri) hematopoez için gerekli bileşenlerdir.

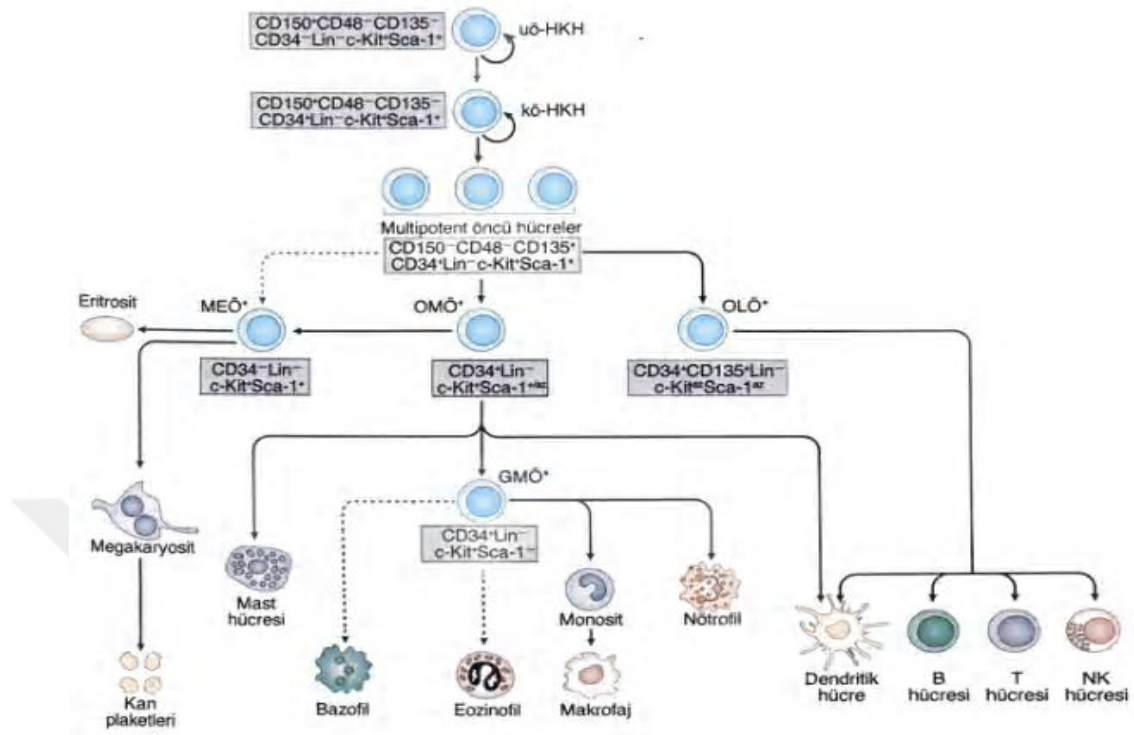
2.1.1 Hematopoetik Kök Hücre ve Niş:

Tüm kan hücreleri hematopoetik kök hücre adını verdiğimiz ana hücreden gelişir. Hematopoetik kök hücrelerin bölünerek kendini yeniden üretme özelliği (self-renewal), farklılaşarak olgun kan hücrelerine dönüşebilme özelliği (differansiasyon) ve farklılaşmaya başlayan, yönlendirilmiş fonksiyonel hücreye (eritrosit-lökosit-trombosit) dönüşebilme özelliğine sahiptir (<https://avesis.erciyes.edu.tr/mcetin/dosya.../775c9ccf-cd2f-4805-a14b-855ec41864c0>, Erişim tarihi:26 Haziran 2019).



Şekil 2.2 Hematopoetik Kök Hücrenin Özellikleri

Till ve McCulloch'ın ilk çalışmalarından yaklaşık 30 yıl sonra, 1988 yılında Weissmann ve grubu farede HKH'yı tanımlayan ilk grup olmuştur. Kemik iliği aspiratlarında Sca-1⁺, Lin⁻, c-Kit⁺ profili gösteren hücreler HKH olarak kabul edilmiştir. Ancak gelişen hücre ayırıştırma ve işaretleme teknikleri sayesinde son 20 yıl içinde HKH tanımı oldukça değişikliğe uğramıştır. Klonalite, farklılaşma ve kendini yenileme özellikleri açısından birbirinden farklı HKH tanımlanmaktadır. Hematopoetik (myeloretiküler) dokular yenilenme ve farklılaşma özellikleri açısından uzun ömürlü ve kısa ömürlü olmak üzere iki farklı tür HKH, bunların yanı sıra kararlanmış multipotent, oligopotent ve unipotent öncü hücreleri içerirler. Nakledildikten uzun süre sonra (>12-16 hafta) çoğalma gösteren ve dolaşımdaki myeloid ve lenfoid hücrelerin %1'den fazlasını oluşturan HKH, Uzun ömürlü HKH (uö-HKH) olarak bilinir. Bu hücreler görece sessiz olan ve farklılaşan HKH'nin yerine yeni HKH'yi oluşturan, yani kendi kendini yenileyen hücre grubudur. Ancak ağır kemik iliği kayıplarında etkinlik kazanarak kısa ömürlü kök hücre özelliği kazanabilirler. Buna karşın nakilden sonra tüm seri hücrelere köken verebilen ve fakat geçici bir yamanma (engrafman) gösteren hücreler kısa ömürlü HKH (kö-HKH) olarak adlandırılır. Bu hücreler günlük kan hücresi yapımından sorumludur. uö-HKH kemik iliğinin yerleşik hücreleri olup kök hücre havuzunu korumak için belli aralıklarla kendini yenileme özelliklerine sahiptir; bunun yanı sıra kö-HKH'ye ve kısıtlı farklılaşma yetisi olan multipotent öncü hücrelere (MÖH) farklılaşır. MÖH giderek farklılaşma yetkinliğini yitirerek oligopotent olan myeloid-eritroid öncüllerine (MEÖ), orta myeloid öncüllerine (OMÖ) ve ortak lenfoid öncüllerine (OLÖ) farklılaşır (Şekil 2. 3) (Can, 2014).



Şekil 2.3 İnsanda Hematopoezin Hiyerarşik Hücre Düzeni İzlenmektedir.

Yetişkin organizmada HKH'nin temel kaynağı kemik iliğidir. Kan yapımının ağırlık kazandığı kemikler ise femurlar, kalça kemikleri, kaburgalar ve sternum'un medulla bölgesidir. Çok az sayıda HKH periferik kan dolaşımında bulunur (1/100.000) Fetusteki göbek kordonu içinden geçen kan da HKH'nin bulunduğu bir dokudur. Dışarıdan verilen uyarıyla HKH'nin periferik kana geçebildiği ve sonra da periferik kandan aferez yöntemi ile toplanabildiği gösterildikten sonra periferik kan ikinci bir HKH kaynağı olarak kullanılır olmuştur. Bu hücreler uzun yıllardan beri dünyada ve ülkemizde lösemi ve aplastik anemi gibi refrakter kan hastalıklarının tedavisinde başarı ile kullanılmaktadır (Kansu, 2011). HKH, miyeloid seri (monosit, makrofaj, nötrofil, bazofil, eozinofil, eritrosit, megakaryosit, trombosit ve dendritik hücreler) ve lenfoid seri (T hücreleri, B hücreleri ve doğal öldürücü) hücrelerin ve bunların öncüsü olan multipotent hücrelerin kökenidir. Öncü hücreler morfolojik olarak lenfosit benzerler. Küre biçimli hücreler oldukları için kültür kaplarının zeminine yapışmazlar. Oldukça yuvarlak çekirdekleri ve dar sitoplazmalarıyla tipik bir kök hücre özelliği gösterirler. Ancak bu özelliklerine rağmen mikroskop altından tanımlanabilmeleri için özgün bir yapı özellikleri yoktur; o nedenle ayrıştırılmaları için bir takım yüzey belirteçleri ve işlevsel analizler kullanılır. HKH öncelikle kan hücre serilerinin belirteçlerini (Lin, lineage kelimesinden gelir) barındırmazlar. Bu belirteçler İnsanda CD3 (T lenfosit),

CD13 ve CD33 (myeloid), CD14 (monosit), CD16 (NK ve granülositler), CD19 (B lenfosit), CD20 (B lenfosit) ve CD56 (NK hücresi), CD71 (eritroid) ve CD61 (megakaryosit)'dir. Pratikte insan HKH 'nin ve MÖH'ün CD34 ifade ettiği varsayılır ve çoğunlukla bu belirtiye göre ayırım yapılır. CD34, 90-120 kDA ağırlığında bir integral hücre zarı proteini olup kemik iliği ve benzeri dokularda stroma hücrelerinin hematopoetik hücrelere yapışmasında görev alır. Bazı yayınlarda CD34 ifade etmeyen HKH'nin olabileceğini ($CD34^{-}, CD38^{-}, Lin^{-}$) ve bu hücrelerin $CD38^{+}$ ifade eden hücrelere dönüşebileceği ileri sürülmüştür. Yakın zamanda daha ilkel HKH ayrıştırmak için CD49f belirteci kullanılmıştır. CD34 'e karşı antikorlar hematopoetik kök hücrelerin araştırma ya da kemik iliği transplantasyonu için saflaştırmak ve nicelendirmek için yaygın olarak kullanılmaktadır (Can, 2014).

HKH'nin sayıca son derece az olmasına rağmen tüm kan hücrelerini üretebiliyor olması, kendini yenileme yetenekleriyle açıklanır. Kemik iliği nakillerinden sonra alıcıya nakledilen az sayıdaki HKH'nin önce simetrik bölünmelerle belli bir sayıya ulaşması ve eş zamanlı olarak bunlardan bazılarının da multipotent öncü hücre (MÖH) olarak farklılaşmaya devam etmesi öngörülür. HKH'nin kendini yenilemesi kemik iliği mikro çevresindeki HKH nişinde meydana gelir. Niş, kök hücre işlevlerini hem mekân hem zaman bakımından uyumlu sinyallerle destekleyen bir mikroçevre olarak tanımlanmaktadır. Dolayısıyla HKH kendini yenilemeyle ilgili tüm çevre sinyallerini niş bölgesinde kazanmaktadır. Niş kelimesinin sözlük anlamı, girinti-oyuk demektir. Kök hücreler kemik iliğinde uygun bir yuva içinde (niş) bulunurlar. Kök hücre nişi, kök hücrelerin doku hasarında harekete geçmesini ve onarımında yer almasını, sayılarının korunmasını, doğrudan veya dolaylı olarak kontrol eden bir dizi karmaşık mekanizmanın yer aldığı doku bölgesi olarak kabul edilir. Mikroçevre arasındaki etkileşim, hücre yenilenmesi ve farklılaşması mekanizmalarında anahtar role sahiptir. Mikroçevre içinde yerleşmiş olan kök hücreler çoğalma sinyali almadığı sürece sessiz formdadır. Nişin temel işlevi kök hücreleri farklılaşmamış düzeyde tutmaktır (Can, 2014). Niş bölgesi normal koşullar altında kök hücrelerin sayılarının azalmasını engellerken bir yandan da onların aşırı artmasını baskı altında tutar. Hematopoetik niş bölgesi için geçerli olan varsayımlardan birisi bu bölgenin oldukça korunaklı olduğudur. Öyle ki, buradaki kök hücre sayısı sabit tutularak doku homeostazı ile kanser arasındaki denge sağlanır. Kemik iliği stroma hücreleri salgıladıkları sitokinler ve hücre-hücre adezyonuyla başlatılan hücrelerarası sinyallerle HKH'lerin kendilerini yenileme ve

farklılaşmasını düzenlerler. Mezenkimal kök hücrenin bir türevi olan osteoblastlar ve kemik iliğinin damarları gibi iyi tanımlanmış niş bölgelerine ek olarak son zamanlarda osteoblast öncülerinin, adipositlerin, mezenkimal kök hücrelerin ve sinüzoid kılcal damarların etrafındaki Schwann hücrelerinin de HKH davranışlarını etkilediği gösterilmiştir. Kemik iliği stroma hücreleri, mezenkimal kök hücrelerden köken alan osteoblast, endotel hücreleri, fibroblastlar ve yağ hücrelerinden oluşur. Bu hücreler arasında osteoblastlar ve endotel hücreleri sırasıyla endosteal ve vasküler nişi oluşturarak HKH'nin devamı ve fonksiyon görebilmesi için gerekli mikroçevreyi oluştururlar. Endosteal niş: HKH'nin osteoblast, osteoklast ve stroma fibroblastlarından zengin olan endosteum bölgesine (endosteal niş) yakın olduklarında daha sessiz oldukları gösterilmektedir. Kemik yüzeyinde lokalize olup istirahatte (G0) olan HKH'ler burada bulunur. Vasküler niş: Kemik iliği sinüzoidleri yöresinde lokalize olup proliferasyon, farklılaşma ve HKH'nin göçünden sorumludur. Daha etkin olan HKH ler, kemik iliğinin merkezinde yer alan ve perivasküler MKH, sinüzoid endotel hücreleri, damar duvarı düz kas hücreleri ve nöron uzantılarından oluşan vasküler niş daha yakın olma eğilimindedir.

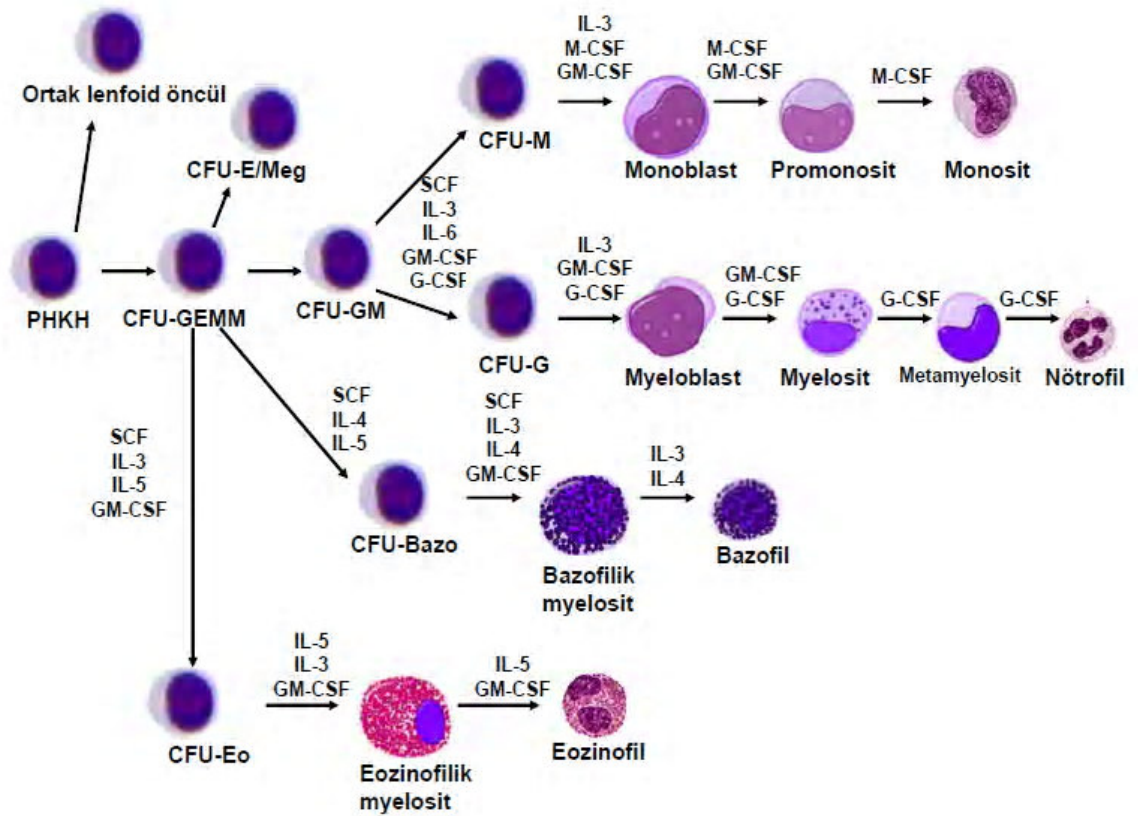
Hematopoetik kök hücrenin kemik iliği nişinde yaptığı moleküler ilişkilerin bir bölümü çevredeki hücrelerle, bir bölümü de matriksteki eriyik potensinlerle olur. Tüm bu moleküller yoğunluk farkına göre etki gösterirler, yani nişin farklı bölgelerinde bu moleküllerin sayısı ve dolayısıyla HKH üzerindeki etkisi değişir. Sonuçta HKH bu yapıların kurulmasına ve yıkılmasına bağlı olarak yapışma-tutunma, mobilizasyon-göç, yerleşme veya kendini yenileme özellikleri kazanır (Can, 2014).

HKH'ler kemoterapi ve /veya radyoterapi ile miyeloablasyon sağlanan hastalara verildiğinde adezyon molekülleri sayesinde kemik iliğinde yerleşir ve yeni kan hücrelerini oluşturur, yani engrafman özelliği gösterir. Tüm bu işlemler homing (yerleşme, yerini bulma) olarak adlandırılır. Moleküler seviyede, bu basamakların her birisine hücre yüzeyinde sitoadazyon molekülleri ile vasküler endotel ile kemik iliği mikroçevresinde bulunan ligandları arasındaki etkileşim aracılık eder (Can, 2014).

2.1.2 Hematopoetik Büyüme Faktörleri:

Hematopoetik öncüllerin yapımını veya farklılaşmasını düzenleyen protein veya glikoprotein yapısında moleküllerdir. Hematopoetik hücreler üzerinde bulunan spesifik reseptörler üzerinden etkilerini gösterirler. Hücrelerin farklılaşmasını veya

proliferasyonunu inhibe veya stimüle edebilirler. Koloni stime edici faktörler, sitokinler, interlökinler de içinde bulunduğu çeşitli hematopoetik faktörler tanımlanmıştır. Hematopoetik büyüme faktörlerine, in vitro şartlarda progenitör hücreleri stimüle ederek tanınabilir matür hücrelerden oluşan koloniler ortaya çıkarmaları nedeniyle günümüzde Koloni-Stimüle Edici Faktörler (Colony Stimulating Factor-CSF) adı verilmektedir (Kansu, 2011). Bu moleküller, olgun hücrelere olduğu kadar öncüllerin proliferasyonu ve olgunlaşmasına da etkir. Örneğin granülosit koloni stimüle edici faktör (G-CSF) olgun nötrofilleri aktive ederken granülosit – makrofaj koloni stimulan faktör (GM-CSF) hem granülositleri hem de makrofajları aktive eder. Bazılarının etkisi sadece bir diziye özgüdür; örneğin eritropoetin sadece eritroid öncülleri üzerine etkilidir (Şekil 2.4).



Şekil 2.4 Hematopoetik Öncüllerin Yapımını veya Farklılaşmasını Düzenleyen Moleküller.

2.2 Hematopoetik Kök Hücre Nakil Özellikleri

Hematopoetik kök hücre nakli (HKHN) birçok malign ve malign olmayan hastalıkta potansiyel kür etkisi olan tedavi modelitesidir (Tablo 2.1). Kök hücre, kendini yenileme yeteneğine sahip olan, aynı zamanda kaynaklandığı dokuya veya başka dokulara ait özel hücre tiplerine dönüşebilen bir hücredir (Ogawa, 1993). Hematopoetik kök hücre nakli (HKHN), hematopoetik öncül hücrelerin, hematopoezi yeniden oluşturmak üzere damar yoluyla verilmesidir. Nakledilen kanın sağlayıcısına ‘donör’ ve kanı alan kişiye ‘alıcı’ veya ‘konak’adı verilir.

İlk kayıtlı insan kemik iliği nakli deneyimi 1939 yılında aplazisi olan hastaya, aynı kan grubuna sahip erkek kardeşinden yapıldı. Transplantasyon başarılı olmadı ve hasta beş gün sonra kaybedildi (Osgood ve ark., 1939). Hematolojik malignansilerde ilk tedavi amaçlı hematopoetik kök hücre nakli deneyimi, 1957 yılında Thomas ve ark. tarafından uygulandı. Hematopoetik kök hücre transplantasyonunu geliştiren Dr.Thomas’a bu başarılarının takdiri için 1990 yılında tıp alanında Nobel ödülü verilmiştir. Bu tedavi yaklaşımında ikinci dünya savaşında radyasyona bağlı gelişen kemik iliği harabiyeti gözlemlerinin ve deneysel olarak, radyoterapi ile kemik iliği aplazisi geliştirilen hayvanlara başka bir hayvandan kemik iliği nakli yapılması ile aplazinin düzeldiğinin gösterilmesi önemli rol oynadı. Sonrasında HLA (İnsan lökosit antijenleri) doku gruplarının tanınmasıyla alıcı ve donör arasındaki uygunluğun sağlanması mümkün oldu (Aschan, 2006). İlk dökümente edilmiş başarılı allojenik kemik iliği nakli, 1965 yılında bir akut lenfoblastik lösemi hastasına radyasyon tedavisi ve kemoterapiyi takiben kardeşinden yapılmıştır. Hasta kemik iliği transplantasyonundan 20 ay sonra relaps ALL nedeniyle kaybedilmiştir (Manthe ve ark., 1965).

Tablo 2.1 Erişkin Hematopoetik Kök Hücre Nakli Endikasyonları

HEMATOPOETİK KÖK HÜCRE ERİŞKİN ENDİKASYON LİSTESİ	HASTALIK TANISI
MALİGN HEMATOLOJİK HASTALIKLAR	Akut Miyeloid Lösemi (AML), Akut Promiyelositik Lösemi (AML-M3), Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL), Kronik Miyeloid Lösemi(KML), Miyelofibrozis, Miyelodisplastik Sendrom(MDS), Kronik Miyelomonositer Lösemi(KMML), Kronik Lenfositik Lösemi (KLL), Yaygın Non-Hodgkin Lenfoma (NHL), Folliküler NHL, Diffüz Büyük B-hücreli Lenfoma, Mantle Hücreli Lenfoma, Burkitt Tümörü, Periferik T hücreli Lenfoma, Hodgkin Lenfoma, Multiple Miyelom, Plazma hücreli lösemi, Waldenström Makroglobulinemisi
MALİGN OLMAYAN HEMATOLOJİK HASTALIKLAR	Talasemi major, Orak hücre anemisi, Ağır plastik anemi, Paroksizmal nokturnal hemoglobinüri, Yapısal(Kalıtsal) Ağır Aplastik Anemi Fankoni anemisi veya Diskeratozis Konjenita
SOLİD TÜMÖRLER	Germ hücreli tümörler (Testis-Over malign neoplazmi, Ewing sarkomu, Wilms tümörü, Nöroblastom, Retinoblastom, Beyin tümörleri (Medullablastom)
OTOİMMÜN HASTALIKLAR	SLE (Sistemik Lupus Eritematozus), RA (Romatoid Artrit),Evans Sendromu, Immün Trombositopenik Purpura (ITP), Otoimmün hemolitik anemi, Crohn Hastalığı, Multiple Sklerozis, Sistemik Sklerozis

Hematopoetik kök hücre nakli birçok ciddi hastalık için kür şansı sağlayan tek tedavi yöntemi olmasına karşın önemli oranda mortalite ve morbiditeyi de beraberinde taşımaktadır. Transplantasyon teknolojisindeki gelişmeler, önleyici ve destek tedavilerde ilerlemeler, transplantasyonun erken ve geç dönem sonuçlarında olumlu gelişmelere yol açmıştır. Transplantasyona karar verirken hastanın sağlık durumu, performans durumu, eşlik eden hastalıkları, hastalık risk ve kontrolü (remisyon durumu, tedaviye yanıtı), kök hücre kaynağı seçimi, donör faktörleri dikkate alınmaktadır (Majhail ve ark., 2015).

Transplantasyonda greft ömrü HLA (İnsan Lökosit Antijenleri) uyumu ile yakından ilgilidir. Organizma kendinden olan ve olmayanı HLA yardımı ile tanır ve cevap verir. Transplantasyonun başarılı olması bu cevabın önlenebilmesine bağlıdır. HLA antijenlerini kodlayan genlerin yer aldığı HLA kompleksi insanda 6. Kromozom kısa

kolunda yer alır. Bu kompleks 3 bölgeye ayrılır. Bu bölgelerde Klas-1, Klas-2, Klas-3 antijenlerini kodlayan genler bulunur.

Klas-1 bölgesinde HLA-A, HLA-B, HLA-C lokuslarında olmak üzere yer alan 3 gen ve nonklasik Klas-1 molekülleri (HLA-E, HLA-F, HLA-G, HLA-H) kodlayan genler bulunur. Klas-1 HLA antijenleri vücuttaki tüm çekirdekli hücrelerde, T ve B lenfositleriyle plateletlerin yüzeyinde bulunur.

Klas-2 bölgesinde HLA-DP, HLA-DQ, HLA-DR olmak üzere 3 gen yer alır Klas-2 HLA antijenleri makrofajlar, dentritik hücreler, B lenfositleri, aktive olmuş T lenfositleri üzerinde bulunur. Enfekte olmuş hücrenin yüzeyinde Klas-2 antijenleri ile birlikte sunulan antijenler CD4 pozitif helper T lenfositlerince (Th) tanınır.

Klas-3 bölgesinde ise kompleman komponentleri, TNF- α (tümör nekroz faktör), 21-Hidroksilaz genleri yer alır (14). Klas-3 bölgesinin genlerinin kodladığı proteinlerse, enflamasyonun oluşumu, çeşitli hücre ve mikroorganizmalara karşı antikorla ilişkili yanıtın düzenlenmesi ile görevlidirler. HLA antijenlerinin adlandırılmasında kullanılan harfler lokusları, onları izleyen ilk iki rakam da hangi allel olduğunu belirtir. Bazen eklenebilen beşinci bir rakam da hangi allel olduğunu belirtir. Bir insan da her lokus için 2 allel vardır. Eğer bir lokusta iki farklı antijen varsa kişi o lokus için heterozigot, iki aynı antijen varsa homozigottur. Kromozom üzerinde yer alan HLA lokuslarındaki antijenlerin oluşturduğu takıma haplotip denir. Her insan biri annesinden diğeri babasından gelen 2 HLA haplotipine sahiptir. Dolayısıyla iki kardeşin birbirinin aynı haplotipe sahip olma şansları %25, iki kardeşin birbirinden tamamen farklı haplotipe sahip olma şansları %25, bir haplotip uyumlu olma şansları %50 dir (Yılmaz, 2013).

2.3 Hematopoetik Kök Hücre Nakil Çeşitleri

Kök hücre kaynağının elde edildiği kişiye göre HKHN gruplandırılmaktadır. İmmünolojik olarak üç tipe ayrılır.

2.3.1 Otolog Hematopoetik Kök Hücre Nakli:

Hastanın kendisinden toplanan HKH'lerin hazırlık rejimi sonrasında tekrar hastaya verilmesi işlemidir. Vericiye gereksinim olmaması, GVHD gelişmemesi avantajlarıdır. Buna karşın; daha önce hasar görmüş olan kök hücrelerinin yeterli sayıda toplanması zor olabilir veya miyelodisplazi riskine sebep olabilir.

2.3.2 Singeneik Hematopoetik Kök Hücre Nakli:

Genetik yapısı aynı olan ikiz kardeşten yapılan nakil tipidir. Otolog HKHN'den üstünlüğü sağlıklı olduğu bilinen kök hücre kaynağından elde edilmesidir (Deeg ve ark., 1992). GVHD gelişmez fakat Graft Versus Lösemi (GVL) etkisi de görülmez.

2.3.3 Allojenik Hematopoetik Kök Hücre Nakli:

Kök hücre kaynağı sağlıklı bir vericiye aittir. Bu verici HLA doku grubu uyumlu akraba (kardeş / kardeş dışı) ya da akraba dışı bir kişi olabilir. Sağlıklı verici ile alıcının HLA tam uyumlu olması transplant başarısını artırır. Vericiler HLA tam uyumlu kardeş veya diğer aile donörleri ve akraba dışı vericiler olarak kategorize edilebilirler. İyi uyumlu akraba dışı verici, yüksek çözünürlükte sınıf 1 (HLA-A,B,C) ve sınıf 2 (HLA-DRB1,DQB1) antijen değerlendirmesinde 10/10 veya 8/8 uyum olmasını gerektirir. HLA A,B,C veya DR'de antijen veya allel düzeyinde en az 1 uyumsuzluk olması durumunda uyumsuz akraba dışı vericiden bahsedilir. Haplo-özdeş verici ise aile üyeleri içinde en az 1 haplotipin genetik olarak hasta ile aynı olması şeklinde tanımlanır (Sureda ve ark., 2015).

Ülkemizde TC Sağlık Bakanlığı'nın verici tanımlamaları aşağıdaki şekilde yapılmıştır (Arat, 2018).

Tam Uyumlu Aile İçi Verici:

-Tam uyumlu kardeş: Düşük çözünürlüklü moleküler veya serolojik yöntemlerle yapılan doku tiplendirme incelemesinde HLA A, B lokusları, ve düşük çözünürlükte moleküler yöntemle HLA-DRB1 lokuslar tam uyumlu (6/6) olan kardeş

- Tam uyumlu kardeş dışı akraba: Düşük veya yüksek çözünürlükte yapılan moleküler yöntemle HLA- A, B, C, DRB1 ve DQB1 lokusları 10/10 uyumlu olan kardeş dışı akraba verici.

Tam veya İyi Uyumlu Aile Dışı veya İyi Uygun Aile İçi Verici:

-Tam uyumlu aile dışı verici: Yüksek çözünürlükte moleküler yöntemle HLA A,B,C,DRB1, DQB1 lokusları 10/10 uyumlu olan aile dışı verici.

-İyi uyumlu aile dışı verici: Yüksek çözünürlükte moleküler yöntemle HLA A,B,C,DRB1, DQB1 lokusları 1 antijen veya allel uyumsuz olan (9/10) aile dışı verici,

-İyi uyumlu aile içi verici: Yüksek çözünürlükte moleküler yöntemle HLA A,B,C,DRB1, DQB1 lokusları 1 antijen veya allel uyumsuz (9/10) olan aile içi verici.

Alternatif Verici:

-Haplotip uygun aile içi verici: düşük çözünürlükte moleküler yöntemle HLA A, B, C, DRB1, DQB1 lokuslarında tek bir haplotipi uyumlu (5-8/10) olan anne, baba, kardeş veya çocuk verici

Kısmen uyumlu aile dışı verici : Yüksek çözünürlükte moleküler yöntemle HLA A, B, C, DRB1, DQB1 lokusları 2 antijen veya allel uyumsuz (8/10) aile dışı verici olarak sınıflandırılmıştır.

Allojenik kök hücre naklinin GVL etkisi sağlaması, hastanın yeterli kemik iliğine sahip olmasını gerektirmemesi, kök hücrelerin sağlıklı olması, hazırlama rejiminde daha az yoğun sitotoksik ajanların kullanılmasına imkan vermesi avantajlarıdır. Dezavantajları ise; uygun vericinin zor bulunması, GVHD gelişebilmesi ve rejeksiyon riskidir.

2.4 Hematopoetik Kök Hücre Nakil Kaynakları:

HKHN için üç kök hücre kaynağı kullanılmıştır. Geçmişte, kemik iliği en sık kullanılan kaynak olmasına rağmen son 20 yıl içinde, periferik kandan alınan hücreler, kemik iliğinden alınan hücrelerin yerini almıştır. Günümüzde, allojenik HKHN vakalarının çoğunda ve otolog HKHN vakalarının % 90' ından fazlasında PKHN kullanılmaktadır. Üçüncü kaynak olan göbek kordonu kanı, özellikle çocuklarda, akraba olmayan verici allojenik HKHN için giderek popüler olmaktadır (McLeod ve ark., 2010).

2.4.1 Kemik İliği

Kemik iliği, olgun hematopoetik ve kök hücreleri gibi olgunlaşmamış hematopoetik öncülerin bir karışımını içerir. Hematopoetik kök hücreleri, farklılaşma (differansiyon) olmaksızın kendi kendine yenilenme kapasitesi ve bütün hematopoetik soylara farklılaşabilme becerisi ile karakterizedir. CD34, Thy-1 ve c-kit belirteçleri taşırlar ve diğer belirteçler açısından negatiftirler (soy negatif). Kemik iliği hücrelerinin yaklaşık olarak % 1-3 ü CD34+'dür ve CD34+ hücrelerinin sadece küçük bir bölümü, daha primitif olan fenotipe sahiptir. Ancak, CD34+ hücre fraksiyonu kök hücre olmayan

birçok hücre içermesine ve kök hücreler sadece küçük bir bölümü oluşturmalarına rağmen, CD34+ hücrelerinin sayısı hızlı bir şekilde ölçülebilir ve çok sayıda çalışma bunun hematopoetik gücün güvenilir bir ölçüsü olduğunu saptamıştır.

Kemik iliği hücreleri, genel anestesi altında posterior iliak krestlerden multipl iğne aspirasyonu ile toplanır ve hedef olarak alıcı vücut ağırlığı başına $2-5 \times 10^8$ lökosit sayısı elde etmek üzere 10-20 mL/ kg 'lık bir hacim alınır. Örneğin ve uygulamanın kalitesine göre bu materyalin %20-75 'i kontamine olmuş periferik kandır. Çıkarılan kemik iliği hacmi, toplam kemik iliği hacminin sadece %1-5 'ini temsil eder; kemik iliği toplanması lökosit ve/ veya trombosit sayılarında sadece geçici değişikliklerle sonuçlanır ve bilinen uzun vadeli hematopoetik sonuçları yoktur. Kemik iliği alınmasına bağlı ciddi komplikasyonlar nadir görülür. (bütün uygulamaların %1,5 ' inden azında) Daha hafif olan kemik iliği alım bölgesinde ağrı, genel anestezi uygulamak için kullanılan entübasyona bağlı boğaz ağrısı ve anestezi sonrası baş ağrısı görülür.

2.4.2 Göbek Kordonu Kanı

Önemli derecede olgun olmayan kök hücre içeriğine, miyeloablatif hazırlama sonrasında devamlı çok hücre hatlı engrafman sağlayabildiğinin gösterilmesine ve vericiden iki HLA antijeni farklılık gösteren alıcılarda engrafman kabiliyetine (daha az GVHD ile birlikte) dayalı olarak göbek kordonu kanı, akraba olmayan uygun allojenik HKHN için giderek artan bir şekilde kullanılmaktadır. Dünya genelinde artan sayıda göbek kordonu bankası, verici olarak uygun bir aile üyesi olmadığı zaman allojenik HKHN için hızla temin edilebilir olabilen bir greft seçeneği sunmaktadır. Anne veya bebekte risk oluşturmaksızın toplanabilir. Enfeksiyöz patojenlerin bulaşma riski daha azdır. Hemen kullanılabilir, lenfoid hücreler immünolojik olarak naiftir. Engrafman açısından çocukların çoğu için yeterli sayıda kök hücresi sağlarken, erişkinlerin çoğu için yetersiz sayıda olabilir.

2.4.3 Periferik Kan

Kök hücreleri dolaşımda nadir bulunurlar. Kök hücrelerin kemik iliğinden periferik kana dökülmesi mobilizasyon olarak isimlendirilir. Farklı mobilizasyon tipleri vardır. Mobilizasyon amacıyla kullanılan sitokinlerden granülosit koloni stimüle edici faktör (G-CSF) nötrofil proliferasyonu ve proteaz salınmasına yol açar. Proteazların hem

kemik iliği kök hücrelerinin (KKH) kemik iliğinde tutunduğu proteinleri parçalaması hem de proteazdan bağımsız mekanizma ile KKH kana dökülür.

Kemoterapi, büyüme faktörleri veya her ikisinin kombinasyonu kullanılarak sağlanan mobilizasyondan sonra periferik kanda yeterli sayıda CD34+ hücrelerinin toplanabileceğinin gösterilmesi aferez vasıtası ile toplanmak üzere kök hücrelerinin kemik iliğinden dolaşıma mobilize edilmesi şeklinde gerçekleştirilen modern uygulamayı başlatmıştır. Otolog nakillerde en sık kullanılan mobilizasyon rejimi kemoterapi/G-CSF kombinasyonu iken, allojenik nakillerde sadece G-CSF'dir. Mobilizasyon yöntemine göre değişen zamanlarda (tek başına sitokin kullanılması halinde sitokin uygulanmasının 4. ve 5.günü ya da kemoterapi içeren mobilizasyonu takiben lökosit sayısının yükselmeye başlamasıyla birlikte) çevre kanından alınan örnek akım sitometri cihazı ile incelenir. CD34 pozitif hücre oranı ml'deki lökosit sayısı ile çarpılır. CD34 pozitif hücrenin >20000/ml olması halinde yetecek miktarda kök hücre toplanması imkanı vardır (To ve ark., 1997).

Aferez ürünü aferez cihazı tipine göre 50-300 ml arasında olur. Elde edilen ürün kök hücre içeriği açısından incelenir. Hedef miktar hasta vücut ağırlığı ile ilişkilidir. Kan sistemini yeniden sağlayabilecek aferez ürünü CD34+ içeriği en az $>2-5 \times 10^6$ /hasta kg olmalıdır. Ürün sağlıklı vericiden alınmış ise genellikle bekletilmeden infüze edilir.

PKHN'nin, daha hızlı engrafman olması ve potansiyel olarak kök hücre toplamaya karşı daha iyi toleranslı olunması kemik iliği kök hücre nakline karşı potansiyel üstünlüklerindendir. Çünkü genel anestezi gereksinimi yoktur. Kök hücre kaynağı olarak periferik kök hücre kullanıldığında , daha fazla CD34+ hücre elde edilebilmekte, bununla beraber daha çok CD3+ hücre hastaya verilmektedir. Engrafman daha hızlı geliştiği için sitopeni süresi kısalır, trombosit ihtiyacı azalır ve hastanedeki yatış süresi kısalır. Fakat periferik kan kaynaklı allojenik HKHN de kronik GVHD daha sık görülmesine ve uzun süre tedavi gerektirmesine yol açar.

2.5 Hematopoetik Kök Hücre Nakil Süreci:

Transplantasyon süreci; hazırlama rejimi, kök hücre infüzyonu ve destekleyici bakım önlemleri gibi süreçlere ayrılır. Allojenik kök hücre naklinde, hazırlama rejimi verilmesindeki temel amaç, altta yatan hastalığı tümüyle ortadan kaldırmak ve donör

hücrelerinin kemik iliğine yerleşmesi için yeterli immun baskılanmanın sağlanmasıdır. Hazırlık rejimi seçimi hastaya göre değişkenlik göstermektedir. Alkilleyici kemotörapotik ajanların kullanıldığı sadece kemoterapi içeren hazırlama rejimleri ve tüm beden ışınlaması (TBI) hazırlama rejimleri vardır. Verilen hazırlama rejimi ile toksik etki görülmemesi istenir fakat hazırlama rejimi daha iyi eradikasyon sağlarken , işleme bağlı mortalite riskini de arttırmakta , daha hafif olan hazırlama rejimlerinde ise toksisite azalırken, hastalık relapsı önemli bir sorun olabilmektedir.

AKHN yapılan hastalarda hazırlama rejimleri doza göre iki grupta toplanabilir.

- **Miyeloablatif hazırlama rejimleri:** Miyeloablatif rejimlerle yüksek doz sitotoksik kemoterapi ve/veya radyoterapi ile kemik iliğinin ortadan kaldırılması (miyeloablasyon) ve sonrasında, immün sistemi baskılanmış alıcıya HLA uyumlu vericiden alınan HKH'lerin verilmesi amaçlanmaktadır.
- **Yoğunluğu azaltılmış dozda hazırlama rejimi (Non-miyeloablatif rejim):** Yoğun hazırlama rejimleri ile transplanta bağlı mortalitenin artması ve donör hücrelerinin tümöre karşı daha iyi immun etkinliğinin olduğunun anlaşılması, azaltılmış yoğunlukta hazırlama rejimlerinin kullanımını gündeme getirmiştir. Bu rejimde amaç, sadece engrafman için yeterli immun baskılanmayı sağlamaktır. Yoğunluğu azaltılmış dozda hazırlama rejimi ile yapılan AKHN'de amaç tümör hücrelerini, vericinin T-lenfositleri ile öldürmektir. Bu rejim ile tümörün eradikasyonu sağlanmazken genel olarak Graft Versus Tumor (GVT) etkisinin sağlanması ön plandadır (Şahin, 2010).

Destekleyici bakım, AKHN'de geçici hematopoetik yetersizliği kompanse etmeyi hedefleyen önlemleri içerir. Ciddi kanamayı ve sonuçta ciddi anemiyi önlemek üzere trombosit ve eritrosit transfüzyonları yapılır. Engrafmanı kolaylaştırmak ve GVHD yi önlemek için immunsupresif ilaçlar uygulanır. Genel olarak GVHD oluşmadığı ve daha uzun süreli immunsupresif tedavi gerektirmediği sürece immunsupresyon dozu azaltılarak kesilir. AKHN'de transplant sürecinde en önemli sorunlardan biri infeksiyonlardır. Bu sebeple odaların infeksiyon kaynaklarına karşı izolasyonlarının daha iyi olması için, laminar hava akımı ve, pozitif basınç gibi yöntemlerle korunması,

bakteriyel, viral ve fungal infeksiyonlar için profilaktik tedavi uygulanması gibi önlemler alınmaktadır. Erken engraftman için G-CSF ve GM-CSF kullanımı nötropenik dönemi kısaltmaktadır. Destek tedavisindeki gelişmeler, yeni immunsupresif rejimlerde artan ilerlemeler, tedavi ekibinin tecrübesi ile tedaviye bağlı mortalite riski belirgin olarak azalmaktadır (Göker ve Aksu, 2008).

2.6 Hematopoetik Kök Hücre Naklinden Sonra İzlem

2.6.1 Engraftman ve Hematopoetik İyileşme

‘Engraftman’ allojenik hematopoetik kök hücre transplantasyonu alan hastanın hazırlığa bağlı advers reaksiyonların giderilmesiyle ilk olarak ulaşması gereken aşamadır. Hematopoetik kök hücrelerin engraftmanı, alıcının kemik iliğinde infüze edilen hematopoetik kök hücreler tarafından hematopoezin yeniden sağlanması anlamına gelir. Nötrofil sayısının ardışık 3 gün boyunca $\geq 500/\mu\text{L}$ olması, 7 gün trombosit desteği olmadan trombosit sayısının ise ardışık 3 gün boyunca $\geq 20000 /\mu\text{L}$ veya tek seferde $50000 /\mu\text{L}$ görülmesi engraftman tanımı için yeterlidir. Engraftman süresi nakil sonrası 2-3 hafta arasında değişir. 21 günü aştığında ‘engraftman gecikmesi’, 40 günü aştığında ise ‘engraftman başarısızlığı’ söz konusudur. Nakil sonrası engraftman sağlandıktan sonra greftin kaybedilmesi geç greft yetersizliği (greft reddi) olarak isimlendirilir (Sargın, 2012).

Erken greft fonksiyonuna (engraftman) etki eden faktörler hazırlık rejimi, kök hücre kaynağı, greftteki kök hücre sayısının hastanın kilosuna göre yeterli olmaması, Graft versus host hastalığı ve profilaksisinde kullanılan ilaçlar etki eden faktörler olarak sayılabilir (Sargın, 2012). Akut GVHD’de sağlıklı donör T hücreleri, alıcı (hasta)’nın antijenlerini ‘yabancı’olarak tanımakta, alıcının hücre ve dokularına karşı hücresel bir immun cevap başlatmaktadır. Yapılan çalışmada GVHD’nin hematopoetik öncül hücreleri etkilemediği, ancak engraftmanı destekleyen kemik iliği mikroçevresinde değişiklikler oluşturduğu ileri sürülmüştür (Bensinger ve ark., 2001). Bu çalışmada GVHD ile ilişkili hematopoezdeki duraklamanın Alloreaktif CD4+ T hücrelerine kemik iliğindeki osteoblastik hücre kompartmanlarına (nişlerine) saldırısı ile olduğu gösterilmiştir. AKHN’dan sonra gelişen geç sitopeniler ciddi komplikasyonlardır. Sekonder greft reaksiyonunda miyelotoksik ajanlar, virus enfeksiyonları, hazırlayıcı rejim, kök hücre kaynağı ve sayısı gibi faktörler etkilidir.

2.6.2 Graft Versus Host Hastalığı:

Graft versus host hastalığı (GVHD) allojenik hematopoetik kök hücre naklinin en sık görülen komplikasyonlarından biridir. GVHD, bir epitel hastalığı olarak düşünülmüş ve sıklıkla nakilden sonra erken dönemde gelişen akut fazı ve daha geç dönemde gelişen kronik fazı olmak üzere iki fazlı tek bir hastalık olarak değerlendirilmiştir. Ancak ortaya çıkış zamanına göre yapılan bu gruplama özellikle azaltılmış yoğunluklu hazırlayıcı rejim kullanılan veya donör lenfosit infüzyonu yapılan olgularda nakilden aylar sonra akut GVHD'nın geliştiğinin görülmesi, kronik fazın özelliklerine sahip GVHD'nın nakilden 50-60 gün gibi kısa süre sonrasında gelişebildiğinin gözlenmesiyle yeni bir sınıflama önerilmiştir. Yeni sınıflamada, persistan, tekrarlayıcı ve geç başlangıçlı akut GVHD ve akut ve kronik formun özelliklerini birarada gösteren 'overlap sendromu'na yer verilmiştir. GVHD'nin başlangıç zamanı alıcı ve verici HLA uygunluğu, infuze edilen T hücre sayısı, hazırlayıcı rejim ve GVHD profilaksi ile ilişkilidir ve konvansiyonel profilaksi alan hastalarda median başlangıç zamanı 15-30 gündür. Greftin immunfenotipik özellikleri de GVHD riskini etkilemektedir. Regulator T hücre içeriği (Treg) artırılmış greftin akut GVHD riskini azalttığını gösterilmiştir. Akut GVHD başlıca cilt, karaciğer ve gastrointestinal sistemin etkilendiği klinik bir sendromdur (Shono ve ark., 2010). Akut GVHD başlangıcı için üç adımlı bir başlama mekanizması önerilmiştir (Tezcan Karasu, 2018; <https://avesis.erciyes.edu.tr/mcetin/dosya.../775c9ccf-cd2f-4805-a14b-855ec41864c0>, Erişim tarihi:26 Haziran 2019).

Tablo 2.2 Akut GVHD Başlangıcı - Üç Adımlı Model

Adım 1: Konak antijen sunucu hücrelerin aktivasyonu
Hazırlık sırasında oluşan doku hasarı
İnflamatuvar sitokinlerde artış, gastrointestinal (Gİ) mukozadaki hasar nedeniyle endotoksinlerin sistemik dolaşıma girişi
Konak antijen sunucu hücrelerin aktivasyonu (temelde dendritik hücreler)
Donörün T lenfositleri tarafından konak kökenli antijenlerin daha iyi tanınması
Adım 2: Donör T hücrelerin aktivasyonu
Konak antijen sunucu hücrelerin aktivasyonu Sitotoksik T hücrelerde artış ve makrofajların aktivasyonu, baskılayıcı T hücrelerde artış (Treg)
Adım 3: Doku hasarı
T hücreler, monositler ve granülositlerin aktivasyonu ve inflamatuvar kemokinlerdeki artış nedeniyle dokulara migrasyonları
Makrofajlar, sitotoksik T hücreler ve inflamatuvar sitokinlerin neden olduğu doku hasarı.

2.6.2.1 Akut Graft Versus Host Hastalığı Evreleme

Akut GVHD evrelemesi ilk olarak 1974 yılında Glucksberg tarafından yapılmış ve hedef organ olarak bilinen cilt, karaciğer ve GİS tutulum derecelerine göre 0 ile 4 arasında derecelendirilmiştir (Glucksberg ve ark., 1974) (Tablo 2.3). Bu objektif derecelendirmeye ek olarak, hastaların performans durumları da subjektif olarak değerlendirilmiş ve hepsi hesaplanarak GVHD evresi belirlenmiştir. 1994 yılında bir konsensus çalışmayı düzenlenmiş ve Glucksberg sisteminin objektif organ evreleme kriterlerini koruyan ancak klinik performans değerlendirmesi yapmayan modifiye bir derecelendirme sistemi önerilmiştir. Sonrasında Uluslararası kemik iliği nakil kayıtlarında 'IBMTR severity index' olarak yayınlanmıştır (Tablo 2.4). Glucksberg ve IBMTR skora sisteminin prospektif olarak karşılaştırıldığı çalışmada, evreleme

açısından birinin diğerine üstünlüğü gösterilememiştir ve her ikisi de klinik pratikte kullanılmaktadır (Tezcan Karasu, 2018).

Tablo 2.3 Akut GVHD Organ Tutulumuna Göre Evreleme

Organ	Evre 1	Evre 2	Evre 3	Evre 4
CİLT	Döküntü <%25 VYA	Döküntü %25-%50 VYA	Döküntü >%50 veya yaygın eritrodermi	Bül oluşumu ile birlikte yaygın eritrodermi, deskuamasyon
GİS	İshal >10-19.9 ml/kg/gün 500-999 ml/gün	İshal >20-30 ml/kg/gün 1000-1500 ml/gün	İshal >30 ml/kg/gün >1500 ml/gün	Ciddi karın ağrısı +- ileus, kanama veya melena
KARACİĞER	Bilirubin 2.1-3 mg/dL	Bilirubin 3.1-6 mg/dL	Bilirubin 6.1-15 mg/dL	Bilirubin >15 mg/dL

Tablo 2.4 Akut GVHD Evrelemesi ve Derecelendirilmesi

Glucksberg derecelendirilmesi
I-Evre 1-2 cilt tutulumu; KC ve GİS tutulumu yok; ECOG PS 0
I-Evre 1-3 cilt tutulumu; Evre1 KC veya GİS tutulumu; ECOG PS 1
I-Evre 2-3 cilt, KC veya GİS tutulumu; ECOG PS 2
I-Evre 1-4 cilt tutulumu; Evre 2-4 KC veya GİS tutulumu; ECOG PS 3
IBMTR Severity Index
Evre1 cilt tutulumu; KC ve GİS tutulumu yok
B- Evre 2 cilt tutulumu; Evre 1-2 KC veya GİS tutulumu
C- Evre 3 cilt, KC veya GİS tutulumu
D- Evre 4 cilt, KC veya GİS tutulumu

2.6.3 Kimerizm

Kimerizm genetik olarak farklı olan iki hücre serisinin aynı organizmada bulunması durumunu ifade eder (McCann ve Lawler, 1993). AKHN'den sonra donör kaynaklı lenfohematopoetik hücrelerin alıcıda bulunması şeklinde tanımlanır. AKHN sonra izlemin esas amacı, hastalık nüksü, greft reddi ve GVHD gibi, uygun tedavi ile müdahale edilebilecek, olumsuz olayları önceden saptayabilmektir.

Kimerizm analizi, AKHN sonrası sonucu değerlendirmede önemli bir yöntemdir. Kan ve kemik iliği örneklerinde alıcı ve verici hücre dengesinin analizi, donör hücrelerinin engraftmanı ve altta yatan hastalık relapsının riski hakkında önemli bilgiler verir.

Kimerizm sözcüğü Yunan mitolojisinde yer alan ve Likya'da terör estiren, aslan başlı, keçi gövdeli, şeytan kuyruklu, ağzından ateş saçan kimera 'Chimera' adlı bir canavardan köken almıştır (Rose, 1989). Tıp literatüründe Kimera ilk kez 1951'de Anderson ve ark. tarafından 2 farklı zigot serisinden köken alan bir organizmayı tanımlamak için kullanılmıştır (Anderson ve ark., 1951). Transplantasyonda ise ilk kez 1956'da Ford ve arkadaşları tarafından tüm vücut ışınlanmasından sonra hematopoetik kök hücre transplantasyon yapılan bir hayvanın taşıdığı yabancı hematopoetik sistemi tanımlamak için kullanılmıştır (Hamerton ve Harnes, 1956). Son yıllarda giderek artan oranlarda hastanın ve hastalığın durumu, hastanın yaşı gibi birçok faktör dahilinde azaltılmış yoğunlukta hazırlama rejimleri ile nakiller tercih edilmektedir. Bu durumda kimerizm takipleri daha da artan öneme sahip olmuştur. Dolayısıyla günümüzde kimerizm takibi AKHN'lerin başarı ve başarısızlığını belirlemede en önemli yol gösterici yöntemlerden biri olarak kabul edilmektedir (Khan ve ark., 2004).

2.6.3.1 Kimerizm Tipleri

Kimerizm analizinde alıcıda verici hücrelerin oranı hesaplanır. Kimerizm oranı %0-100 arasında değişir. AKHN sonrası herhangi bir zamanda, alıcının hematopoetik dokularında verici kaynaklı hücrelerin >%95 bulunması TK (Tam Kimerizm-Full Chimerism) olarak isimlendirilir.

HKHN sonrası herhangi bir zamanda, alıcıda verici kaynaklı hücrelerin % 5-95 arasında bulunması KK (Karma Kimerizm- Mix Chimerism) olarak isimlendirilir. Nakil sonrası gelişen kimerizm dinamik bir olaydır, naklin erken döneminde tam kimerik tespit edilen bir olgu zamanla karma kimerik olabilir. Karma kimerizmde alıcıya ait hücrelerin

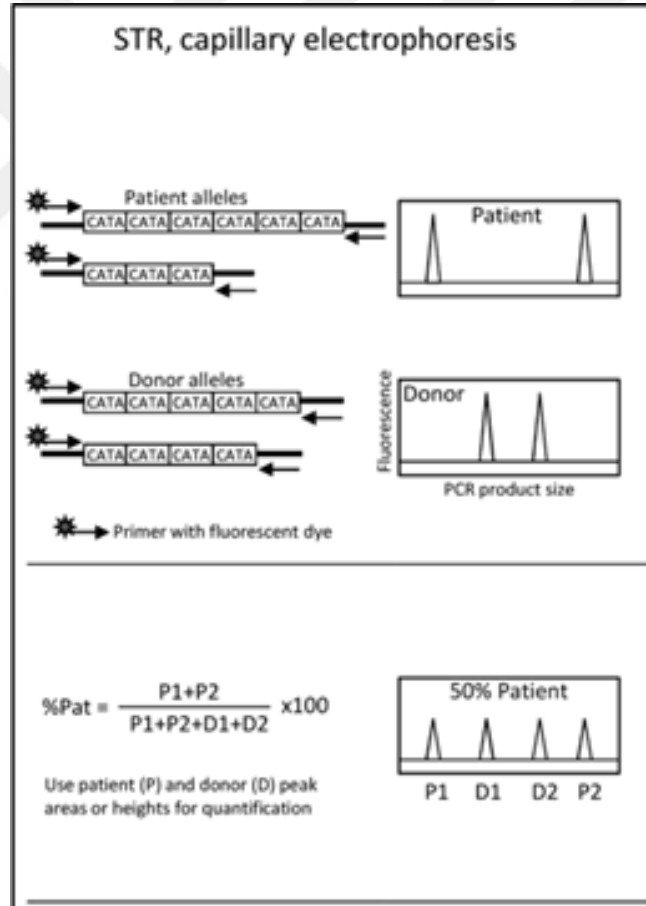
giderek azaldığı ve verici kaynaklı hücrelerin giderek arttığı durumlara azalan karışık kimerizm, alıcıya ait hücrelerin giderek arttığı ve verici kaynaklı hücrelerin giderek azaldığı durumlara artan veya ilerleyici karışık kimerizm denir. Konakçı hücrelerinin ve verici tip hücrelerin sabit kalmasına stabil (persistant) kimerizm olarak adlandırılır (Bader ve ark., 1998; McCann ve Lawler, 1993). İncelemede diziye ait hücre kimerizminin (örn: T lenfosit ve granülosit) birbirlerinden farklı derecede olması durumu split (ayrık) kimerizm olarak ve incelemede vericiye ait kan sistemi hücrelerinin %0,1 - %0,3 oranında görülmesi durumu mikrokimerizm olarak isimlendirilir (Osmanbaşoğlu, 2013). Genellikle solid organ transplantasyonları sonrasında gözlenir. Karışık kimerizm durumunda alıcıya ait olarak saptanmış kan hücreleri, sağlıklı veya hasta kan hücreleri olabilir. Nakil sonrasında lösemi hücrelerinin varlığı miyeloablatif dozda hazırlama rejimine rağmen olasıdır. Nakil sonrası alıcıya ait kalıntı lösemi hücrelerinin nükse yol açma ihtimali vardır. Hastaya ait az sayıdaki bu habis hücrelerin varlığı kalıntı hastalık ile ilişkilidir (Antin ve ark., 2001).

2.6.3.2 Kimerizm Yöntemleri:

Kimerizmi belirlemede birçok farklı yöntem kullanılmıştır. Bütün yöntemler bireyler arasında var olan polimorfik genetik belirteçler ve onların ürünlerindeki farklılıkların belirlenmesi üzerine kurulmuştur. Çeşitli yöntemler uygulanır. Günümüzde, kimerizm analizinde en çok tercih edilen yöntemler PCR ile insan genomunda bulunan kısa ardışık tekrar bölgeleri ‘short tandem repeats-STR’ gibi polimorfik DNA dizileri veya değişen sayıda tekrar bölgelerinin ‘variable number of tandem repeats-VNTR’ çoğaltılması, tek nükleotid polimorfizmleri (SNP) ve insersiyon/delesyon belirteçlerinin kullanılmasıdır (Gineikiene ve ark., 2009; Choi ve ark., 2000). Nakil sonrası kimerizm takibi alıcı verici arasında bu lokuslarda var olan allelik farklılıkların takip edilmesi ile gerçekleşir. Kimerizm durumunu belirlemede rutin olarak kullanılan diğer yöntemler arasında, sitogenetik yöntemler, eritrosit fenotiplendirmesi ve Sınırlı Parçacık Uzunluk Polimorfizmi (Restriction Fragment Length Polimorphism) sayılabilir (Schaap ve ark., 2000).

Short tandem repeats (STR) ve Variable number of tandem repeats (Kısa Dizi Tekrarları ve Değişik sayıda Dizi Tekrarları) sistemlerinin PCR tabanlı çoğaltılması

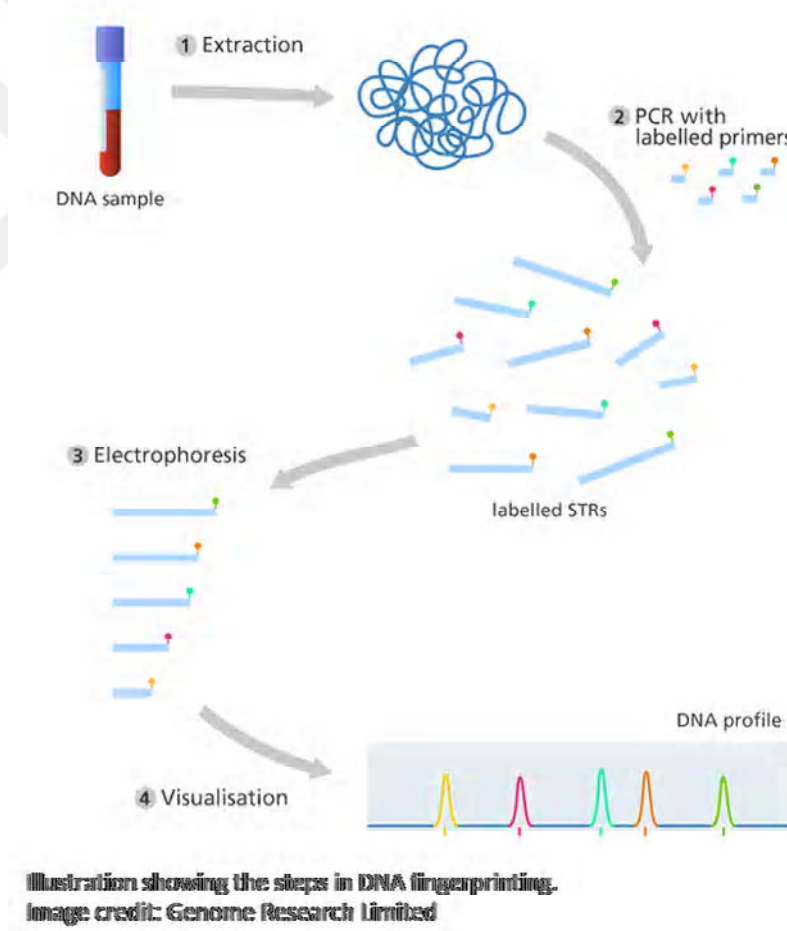
Klinik kimerik değerlendirme için floresan tabanlı PCR en yaygın kullanılan tekniktir. STR 'ler bir birimin genellikle 2 ila 5 nükleotit arasında değiştiği, tekrarlayan DNA birimleridir, mikrosatellit de denir. VNTR veya minisatellit de ise tekrarlayıcı dizi 15-50 nükleotit uzunluğundadır. Belirli bir STR lokusundaki tekrar sayısı bireyler arasında değişebilir ve bunun sonucu olarak STR allelinin uzunluğu da değişebilir. Bu uzunluk farkı STR bölgesini çevreleyen primerler, PCR amplifikasyonu ve elektroforez ile analiz edilebilir. Bütün lokuslar her bir örnek için PCR da çoğaltılır ve çoğaltılan ürün fragman analizi için kapiller elektroforez cihazında yürütme işlemi yapılır ve analiz programı ile analizi yapılır. Kimerik örneklerinin ölçümü alıcı ve donör tepe noktalarının yüksekliği/alanı ile karşılaştırılarak yapılır (Şekil 2.6) (Uzunel ve Hauzenberger, 2012).



Şekil 2.5 STR tabanlı kimerizm analizi

2.6.3.3 Kimerizm Takibinde Örnek Seçilmesi ve Ölçümlerin Sıklığı

Kimerizm takiplerinden periferik kan veya kemik iliği örnekleri kullanılabilir. Genellikle önerilen periferik kan kullanımıdır (Hajiyev, 2018) (Şekil 7). Kimerizm çalışması için hastadan nakil öncesi alınmış, vericiden ise herhangi bir zamanda alınan kan örneği gereklidir. Kimerizm zamanı olarak ilk örnekleme zamanı transplantasyonun 3.haftası olarak önerilmektedir (Dubovsky ve ark., 1999; O'Reilly ve ark., 1993). Hastalık relapslarının (lösemi ve myelodisplastik sendrom) ilk bir yılda en sık görüldüğü göz önünde bulundurulduğunda bu periyottaki kimerizm takipleri sık olmalıdır. Ayrıca hazırlama rejimine göre kimerizm takibi sıklığı değişkenlik gösterebilmektedir (Osmanbaşoğlu, 2013).



Şekil 2.6 Kimerizm Analiz Basamakları

2.7 Hematopoetik Kök Hücre Naklinden Sonra İmmün Yeniden Yapılanma ve Hematopoetik Düzeltme

Allojenik Hematopoetik Kök Hücre naklinde, kemoterapi ya da radyoterapi ile alıcı myeloid ve immün sistem hücrelerinin ortadan kaldırılması sonrası, vericiden elde edilen kök hücrelerin kemik iliğine yerleşmesi sağlanır. Bu süreç myeloid hücre toparlanmasını ve immün sistemin yeniden toparlanmasını kapsar.

İmmün sistemin temel görevi kendisinden olan “self” ile olmayana “non-self” ayırmaktır. Bu görevini immün efektör hücreler aracılığı ile yapmaktadır. İmmün efektör hücreler pluripotent hematopoetik kök hücreden köken alırlar. Sitokinler ve hücrel büyüme faktörleri aracılığıyla pluripotent kök hücre, myeloid ve lenfoid hücre dizilerine farklılaşır. Miyeloid kökenli hücreler, immün yanıtın devreye girmesinde ve artmasında kritik rol oynarlar. Mikro ortamlarındaki değişikliklere oldukça hassas olan miyeloid hücreler doğal bağışıklık sistemindeki ilk savunma hattını oluşturur, bunun sonrasında kazanılmış/uyarılabilen immün cevabı şekillendirir (Brent ve Bruce, 2017).

Hazırlama rejiminde kullanılan kemoterapi ve radyoterapi proliferatif hücreleri etkiler.

Sonuç olarak immün sistemin ve bütün hematopoetik hücrelerin ciddi depresyonu gelişir. Bu baskılanma özellikle lenfositlerde gelişir. Doğal immünitinin iyileşmesi genellikle ilk birkaç ayda meydana gelir. Kazanılmış bağışıklık sisteminin yapılanması 1-2 yıllık zaman alır. Miyeloid türevli baskılayıcı hücreler (MDSC'ler), AKHN'den sonraki ilk hematopoez dalgasında bulunur. MDSC'ler Th1 farklılaşmasını engelleyebilir ve Treg gelişimini teşvik edebilir (Maeda ve ark., 2015).

2.7.1 Doğal İmmünite

Doğumda mevcut olan, öğrenilmemiş, adapte olabilen, mikroorganizmalara maruziyet sonrası geçici olarak artabilen immün cevaptır. Hematopoetik ve non-hematopoetik kısımdan oluşur. Non-hematopoetik kısmı cilt ve mukozal yüzeyler gibi fiziksel bariyerler oluştururken hematopoetik hücreleri nötrofiller, makrofajlar, natural killer (NK) hücreler oluşturur. Non-hematopoetik kısımda hazırlama rejiminden etkilenebilir, ancak nakil sonrası dönemde çok hızlı bir şekilde iyileşir. Eğer GVHD gelişmişse cilt ve mukozal yüzeylerin iyileşmesi gecikebilir.

Hematopoetik kısımda nötrofiller 2-4 hafta içinde normale dönerler (Nötrofil engraftmanı). Kemotaksis, fagositoz ve öldürme potansiyelleri gibi nötrofil

fonksiyonlarının normale gelmesi 2-4 ay kadar sürer. Benzer şekilde iyileşme monositlerde de olur. Makrofajlar ise nispeten radyo/kemorezistanstırlar. Önemli derecede baskılanmazlar ve tedrici olarak nakil sonrası ilk birkaç ay içinde donör kaynaklı makrofajlar ile yer değiştirirler. AKHN'den sonra eritropoetik düzelme için retikülosit sayımı kullanılırken trombopoetik düzelme için yüksek düzeyde yanıt veren bir indeks yoktur. İmmatür trombosit fraksiyonu (IPF) olarak adlandırılan retiküle trombositlerin trombopoetik düzelmenin bir indeksi olarak kullanılabileceği öne sürülmüştür. RNA bakımından zengin sitoplazmaya sahip trombositler (immatür trombositler) olarak adlandırılır. Retiküle trombosit sayımı kemik iliğindeki megakaryosit sayımı ile korelasyon içindedir ve kemik iliğinin trombosit üretme kapasitesini yansıtır (Takami ve ark., 2007).

Naturel killer hücreler, nakil sonrası ilk düzelen hücrelerdendir. NK hücreleri CD56 ve CD16 ekspresyonunun yoğunluğuna bağlı olarak fonksiyonel olarak iki alt gruba ayrılmaktadır. CD16^{parlak}CD56^{soluk} fenotipindeki NK hücrelerinin daha yüksek oranda sitotoksik aktivite gösterdiği, CD16^{soluk}CD56^{parlak} NK hücre alt grubunun ise esas olarak doğal immün yanıtta sitokin üretiminden sorumlu immüno-regülatör hücreler olduğu gösterilmiştir. Nakil sonrası, sayı olarak ilk birkaç hafta içinde subnormaldir. İlk artan NK hücreler, sitokin üreten CD56 parlak immunregülatör NK hücre alt grubudur (Auletta ve Lazarus, 2005; Tomblyn ve ark., 2009). Daha fazla IFN- γ üretirler, daha az sitotoksiktirler, immatür formları olduğu düşünülür. IL-15, nakil sonrası NK hücre maturasyonunda önemli rol oynar.

2.7.2 Kazanılmış İmmünite

Hücrel immünite ve humoral immünite olarak ayrılır. Hücrel immünite antijen sunan hücreler tarafından başlatılır ve fonksiyonel T hücrelerinin aktivasyonu gerekir. Antijen sunan hücreler antijenleri yakalayıp lenfositlere sunan, lenfositlerin farklılaşması ve proliferasyonu için sinyal sağlayan hücre popülasyonudur. Antijen sunan hücrelerin T hücre yanıtını başlatan esas hücresi dentritik hücrelerdir. B lenfosit ve makrofajlar da farklı tip immün yanıtlarda T lenfositlerine antijen sunmaktadır. T lenfositler kemik iliğinde üretilir ve timus bezinde olgunlaşır. Daha sonra ise sekonder lenfoid organlara yerleşir ve orada aktifleşir. Timustaki gelişimlerinde, T lenfositlerinin antijen tanımasını sağlayan T hücre reseptörü (TCR) kazanılır ve her olgun T lenfosit timusu terk ederken TCR ve CD4 veya CD8 eksprese eder. T lenfositleri yüzey

reseptörlerine göre sitotoksik T lenfosit (CD8+) ve yardımcı T lenfosit (CD4+) olarak ayrılır. Th hücreler de salgıladıkları sitokinlere göre gruplara (Th1, Th2, Th17 ve Treg) ayrılır. Th1 hücreleri proinflamatuvar özelliktedir ve IFN- γ salgılar. Treg hücreleri düzenleyici işleve sahip T hücre alt grubu olarak tanımlanmıştır ve regülatör T hücreleri olarak isimlendirilmiştir. Düzenleyici T hücreleri, diğer T hücrelerinin aktivasyonlarını düzenleyen, aynı zamanda da öz antijenlere karşı periferik toleransın devam ettirilebilmesi için gerekli olan hücrelerdir. Bu hücreler CD4+CD25+ fenotipi göstermektedir ve transforme edici büyüme faktörü- α (TGF- α) ile IL-10 sekrete ettikleri düşünülmektedir. Bu iki sitokinde immün sistem üzerinde baskılayıcı etki göstermektedir. Humoral immünite ise antikorlar tarafından yürütülür ve fonksiyonel B ve T hücreleri gereklidir.

Kazanılmış immün sistem nakil sırasında naif (henüz uyararla karşılaşmamış) T hücrelerinin kaybı ve mevcut T hücrelerinin fonksiyonun azalması nedeni ile büyük oranda bozulur. CD4 düşük, normal CD8 seviyesi vardır. CD4/CD8 oranı tersine döner. Nakli takiben donör kaynaklı T ve B lenfositler hücrel ve humoral immün sistemi yeniden oluştururlar. CD8 + hücreler, T hücreler içinde ilk artan gruptur. 2 aydan sonra artmaya başlar ve 6-8 aydan sonra normal değerlerinin üstüne çıkabilir. B hücreler nakil sonrası 2-3. aylarda artmaya başlar. T hücre bağımlıdır. Yeni B hücreleri naif hücrelerdir, çok az sayıda memory B hücreleri vardır. B hücre Ab repertuarı önemli derecede azalmıştır ve düzelmesi uzun sürer, antikorlar büyük ölçüde alıcı orjinlidir. CD4+ T hücreler, geç düzelirler, 3-4. aydan itibaren artmaya başlarlar ve 18-24. aylarda normal değerine ancak ulaşırlar. T hücre immünitesinin iyileşmesi iki bağımsız yol ile olur. Timus bağımlı yolda infüze edilen donör hematopoetik progenitörlerin timusa yerleşmesi ve takiben farklı naif T hücre reseptör repertuarının oluşması gerçekleşirken, timus bağımsız yolda ise infuze edilen donör memory T hücrelerinin periferik çoğalması gerçekleşir (Karakürkçü, 2014).

İmmün yeniden yapılanmayı konak faktörler (yaş, hazırlama rejimi, GVHD patolojisi ve başlangıçtaki patoloji), genetik farklılıklar (HLA uyumu), hematopoetik kök hücre kaynağı, nakil sonrası gelişen olaylar (akut GVHD, kronik GVHD, infeksiyöz komplikasyonlar, biyoterapilerin etkisi) etkiler.

Hazırlama rejiminin yoğunluğu alıcıda myeloablasyonun derinliğini etkiler ancak lenfodepleksiyonun derecesi ablatif ve ablatif olmayan nakillerde benzerdir. Bu nedenle

doz yoğunluğundan bağımsız olarak alıcıda yama reddini önlemek için etkili bir immüsupresyon yapmak gerekir. Bazı rejimler alıcı lenfositlerini tamamen yok ederken, bazı hazırlama rejimleri, transplantasyon sonrası dönemde verici lenfosit infüzyonları (DLI) ile tedrici olarak alıcı lenfositlerinde azalma sağlar (Tomblyn ve ark., 2009). Her iki yöntem sonrasında da alıcı lenfositlerinde tam ablasyon olur. Alıcıda, vericiden gelen üründeki lenfositler ve lenfoid öncüller aracılığıyla yeniden immün yapılanma başlar.

Periferik kan kök hücre kaynakları, kemik iliği kaynaklı kök hücreler ile karşılaştırıldığında daha fazla T hücre içerir, bu durum kronik GVHD riskinde artışa sebep olur. Periferik kanda multipotent progenitörlerin sayısı daha fazladır, daha hızlı nötrofil ve platelet engraftmanı olur. T hücre deplesyonu GVHD önlenmesinde etkili iken, T hücrelerinin uzaklaştırılması engraftman yetmezlik riskinde artış ve immün yapılanmanın gecikmesine sebep olur. Enfeksiyon görülme oranları artar. Greftteki yüksek sayıdaki Treg hücrelerinin iyileşmiş immün yapılanma ve azalmış GVHD ile birlikte olduğu gösterilmiştir (Yüksel Kurt, 2018).

2.8 Myeloid Kökenli Baskılayıcı Hücreler (MDSC)

2.8.1 MDSC Tanımı

Ortak öncüllerin, dolaşımdaki lökositlerin spesifik belirteçlerini ve işlevlerini edindiği ve bunu yaparken kendini yenileme yeteneğini kaybettiği yapısal sürece miyelopoezis denir. Olgun lökositlerin yenilenmesi her gün yenilenen ve üretilen milyonlarca hücre ile birlikte değiştirilir. Anormal hücre büyümesi, enfeksiyöz ajanlar ya da doku hasarı gibi çeşitli patolojik durumlarda lökositlerin sürekliliği bozulabilir ve bunun sonucu acil miyelopoezis ile sonuçlanır ki bu durum anormal hücresel ya da potansiyel tehditleri ortamdaki kaldırmak için hücrelerin sağlanmasına hizmet eder. Bu koşullar hızlı çözülürse, miyeloid hücrelerin dengesi hasta için negatif sonuçlar olmaksızın geri kazanılır. Ancak, çeşitli kronik enflamasyon türleriyle ilişkili durumlar, otoimmün hastalıklar ve kanser gibi durumlarda standart farklılaşma yolundan sapan anormal, sürekli olgunlaşmamış miyeloid hücrelerin birikmesi miyelopoeziste devam ettirilir. Bu hücreler olgun, terminal olarak farklılaşmış miyeloid hücrelerden (dendritik hücreler veya nötrofiller) farklıdır ve olgun miyeloid hücrelerden farklı olan bir aktivasyon programına (patolojik aktivasyon) sahiptir (Bronte ve ark., 2016). Miyeloid türevli baskılayıcı hücreler (MDSC), in vivo ve in vitro bağışıklık cevaplarını baskılayan

miyeloid progenitör hücreler, dentritik hücreler ve olgunlaşmamış miyeloid hücrelerin morfolojik ve fonksiyonel olarak heterojen bir popülasyonunu içeren bir gruptur (Young ve ark., 1987).

Nakil sonrası miyeloid hücrelerin hızlı genişlemesi göz önüne alındığında, doğuştan gelen bağışıklık sisteminin bu üyelerinin, nakil sonrası erken bağışıklık ortamına önemli katkıları olabileceği düşünülmüştür. Seksenli yılların sonlarında kronik graft versus host hastalığı (cGVHD) ve tümörlü farelerde kemik iliği ve dalakta artan sayılarda granüllü hücrelere rastlanmış ve farklı lenfoid cevapları baskıladıkları için bu hücreler doğal baskılayıcı hücreler olarak tanımlanmıştır (Young ve ark., 1987; Holda ve ark., 1985). Doğal baskılayıcı hücrelerin baskılama fonksiyonlarını nitrik oksit (NO) ve TGF- β aracılığı ile yaptıkları ve gelişimlerinde tümörden salgılanan Granülosit-Makrofaj koloni stimüle edici hormonun (GM-CSF) rol oynadığı tespit edilmiştir (Angulo ve ark., 1995; Young ve ark., 1997). Doğal baskılayıcı hücreler (MDSC'nin ilk adı), uzun zaman önce kanserli hastalarda tanımlanmıştır (Young ve ark., 1987), ancak 1998'de bu hücrelere olan ilgi, Bronte ve arkadaşlarının (Bronte ve ark., 2016) fare çalışmalarına dayanarak yeniden canlanmıştır. Kanser hastalarındaki dendritik hücre sayılarının ve antijen sunma yeteneklerindeki azalmanın kanlarındaki immatür myeloid hücre birikimi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bilim adamlarının ilgisi nedeniyle baskılayıcı myeloid hücrelerle ilgili yayın sayısı artınca araştırmacıların ortaklaşa aldığı bir kararla bu hücreler myeloid kaynaklı baskılayıcı hücreler 'Myeloid-Derived Suppressor Cells' (MDSC) olarak adlandırılmışlardır (Gabrilovich ve ark., 2007). Miyeloid türevli baskılayıcı hücreler (MDSC'ler), kanser hastalarında sıklıkla genişleyen ve bağışıklık tepkilerini baskılayabilen heterojen bir miyeloid hücre popülasyonu olarak tanımlanmıştır (Gabrilovich ve ark., 2012). MDSC düzeyleri, kanser hastalarında prognoz ve genel sağkalım ile negatif korelasyon gösterir ve bu popülasyonun birikmesi, tümör ilerlemesini artırır (Huang ve ark., 2013; Wang ve ark., 2013). Pek çok tümör modelinde ve insan kanserlerinde MDSC popülasyonunda artış gözlenirken MDSC'lerin ortadan kaldırılması hastalık ilerlemesinde dramatik bir iyileşme ve bazen direk anti-tümör etki ile sonuçlanmıştır. MDSC'lerin aynı zamanda anjiyogenez, tümör hücresi invazyonu ve metastazlardaki artışlara da katkıda bulunduğu da gözlenmiştir (Youn ve Gabrilovich, 2010). Ayrıca otoimmün hastalıklarda (Cripps ve Gorham, 2011), solid organ transplantasyonunda (Chou ve ark., 2011; Ochando ve Chen, 2012) ve alerjik astımda MDSC sayılarının arttığı ve immün düzenleyici hücreler olarak işlev

gördüğü belirtilmiştir. (Deshane ve ark., 2011). MDSC'ler, orijinal olarak farelerde CD11b ve Gr-1⁺ 'in birlikte ekspresyonu temelinde tarif edilmiştir. Normal fare kemik iliğinin %20-%30'u bu hücrelerden oluşurken sağlıklı fare dalağında %2-4 oranında bulunurlar ve lenf nodlarında tespit edilmemişlerdir. Tümörlü farelerde ise dalakta ve kanda %50'lerin üzerine çıkan birikimleri bildirilmiştir (Gabrilovich ve Nagaraj, 2009). Bununla birlikte, daha sonraki çalışmalar, CD11b⁺ ve Gr-1⁺ hücrelerinin homojen bir hücre popülasyonu değil, daha farklı olarak bastırma kabiliyetine sahip heterojen bir miyeloid hücre grubu olduğunu ortaya koymuştur. Tümör taşıyan farelerde, Gr-1 antijeninin (Ly6c/Ly6G) ve hücre morfolojisinin ifadesi, iki ana MDSC popülasyonunu karakterize etmek için kullanılmıştır: CD11b⁺Ly6G⁺Ly6C⁻ CD115⁻ ifade eden granülositik MDSC ve CD11b⁺Ly6G⁻Ly6C⁺CD115⁺ ifade eden monositik MDSC (M-MDSC) olarak tanımlanmıştır (Youn ve ark., 2008; Movahedi ve ark., 2008). İnsan MDSC'lerinin fenotiplemesi, Gr-1'in insan lökositleri üzerinde eksprese edilmemesi gerçeğiyle karmaşılaşır. Bu nedenle, son 20 yıl içinde farklı fenotiplere sahip çoklu insan MDSC alt grupları birkaç tümör tipinde belgelenmiştir (Solito ve ark., 2014). Bildirilen tüm fenotipler, miyeloid markerların bir kombinasyonu temelinde tanımlanır ve spesifik bir marker olmaması bir sorundur. Her ne kadar tümör immünolojisi için MDSC'lere artan bir ilgisi olsa da, insan MDSC'lerinin uniform bir şekilde kullanılan ve yaygın olarak kabul edilen bir sınıflandırma eksikliği vardır. MDSC'lerin heterojenitesi fazla bir hücre grubu oluşu, önümüzdeki yıllarda farklı baskılayıcı fenotiplere sahip alt grupların belirleneceğinin göstergesidir. Bu yüzden temel olarak laboratuvar içi ve laboratuvarlar arası varyansı değerlendirmek ve dolaşımdaki MDSC'lerin fenotipik tanımlaması için sağlam bir marker kombinasyonunu tanımlamak için tasarlanan çalışmalar yapılmaktadır (Mandrizzato ve ark., 2016).

MDSC hakkında çeşitli kavramlarda değişiklik yapılması gerekmiştir. Birincisi, MDSC hücre yapısı daha iyi tanımlanmıştır ve bunların fenotipik ve morfolojik özelliklere dayalı iki ana alt kümelerini içerir: Polimorfonükleer (PMN) ve Monositik MDSC ve bu bulguları yansıtmak için PMN-MDSC ve M-MDSC ortaya çıkarılmıştır (Bronte ve ark., 2016; Yang ve ark., 2004). Önceleri, PMN-MDSC hücrelerini açıklamak için granülositik MDSC terimi kullanılırken PMN-MDSC teriminin bu MDSC alt kümesini daha iyi tanımladığı düşünülmektedir. Çünkü kararlı durum nötrofillerinden olan PMN-MDSC'nin fenotipik olarak farklı olduğu göz önünde bulundurulmuştur. (daha az granül içermesi, azalmış CD16, CD62L ve artan arginaz 1, peroksinitrit, CD11b ve

CD66b) (Solito ve ark., 2011; Lees ve ark., 2011). PMN-MDSC ve M-MDSC hücreleri sadece fenotipik ve morfolojik olarak farklı değil aynı zamanda çeşitli patolojik koşullar altında farklı rolleri olan fonksiyonel ve biyokimyasal özelliklere de sahiptir. Bu nedenle, bilimsel raporlarda MDSC tanımının MDSCs spesifik alt kümesini içermesi gerektiğine karar verilmiştir (Mandruzzato ve ark., 2016).

2.8.2 İnsanlarda MDSC Alt tipleri

İnsan MDSC fenotipi daha az tanımlanmıştır. Hem granülositik hem de monositik insan MDSC'leri CD33, CD11b ve değişken CD15 (PMN-MDSC) ve CD14 (M-MDSC) ekspresyonu ile düşük/negatif HLA-DR seviyelerini ifade eder.

M-MDSC'ler, monositlerin morfolojisini paylaşır ve CD14'ün ekspresyonu ve CD15 eksikliği ile ve karakterize edilir (Filipazzi ve ark., 2007; Mandruzzato ve ark., 2009).

PMN-MDSC'ler ise granülositlere benzeyen bir hücre popülasyonu içerir ve fenotipik olarak CD15 ve CD66b ekspresyonu ve CD14'ün yokluğu ile karakterize edilir (Mandruzzato ve ark., 2009; Rodriguez ve ark., 2009). Olgunlaşmamış MDSC'ler (e-MDSC) esasen soy negatif hücreler olarak tanımlanan olgunlaşmamışlık özelliklerine sahip hücrelerdir (Solito ve ark., 2011; Diaz-Montero ve ark., 2009). İnsanlarda CD34⁺ MDSC hücreleri 1995 yılında baş boyun kanserli hastalarda ilk kez rapor edilmiştir (Pak ve ark., 1995). Baş ve boyun kanseri olan hastalardan alınan periferik kanda bağışıklık baskılayıcı fonksiyonu olan olgunlaşmamış miyeloid hücrelerin Lin⁻ CD33⁺ CD34⁺ CD15⁺ oranının arttığı bildirilmiştir (Schmielau ve Finn, 2001). Diğer çalışmalarda, arginaz-1 eksprese eden MDSC hücreleri, böbrek kanserli hastaların periferik kanında bulunan CD11b⁺ CD14⁺ CD15⁺ HLA-DR⁻ hücreleri olarak tanımlanmıştır (Zea ve ark., 2005). Benzer şekilde, renal kanser hastalarında lin⁻ HLA-DR⁻ CD33⁺ hücre sıklığında bir artış gözlenmiştir (Mirza ve ark., 2006). Hepatoselüler karsinomalı (HCC) hastaların periferik kanındaki CD1c⁺ CD19⁻ CD14⁻ miyeloid dendritik hücrelerin bozulmuş fonksiyonları üstündeki gözlemlere dayanarak (Ormandy ve ark., 2006), HCC hastalarının CD 14+ monositlerinden in vitro üretilmiş dendritik hücrelerin fonksiyonları analiz edilmiştir. Burada, dendritik hücrelerin fonksiyonlarının , sağlıklı kontrollerden in vitro üretilerek elde edilen dendritik hücrelerin aksine bozulduğu gözlemlenmiştir (Hoechst ve ark., 2008). Diğer çalışmalar, CD14⁺ HLA-DR^{düşük} / ^{neg} hücrelerinin, CD8⁺ T hücrelerinin L-arginin bağımlı bir şekilde proliferasyonunu ve sitokin salgılanmasını baskıladığını ve bu hücrelerin in

vitro antijen spesifik T hücresi tepkilerindeki azalmayı göstermiştir. Bu çalışmalara dayanılarak, farklı tümörlere sahip hastalarda insan MDSC'si tanımlanmıştır.

Bununla birlikte, fare modellerinde MDSC ler, bakteriyel (Gabrilovich ve Nagaraj, 2009), viral (Bowen ve Olson, 2009) ve parazitik enfeksiyonlar (Van Ginderachter ve ark., 2010), travmatik stres (Cuenca ve ark., 2010), sepsis (Delano ve ark., 2007), akut inflamasyon (Dugast ve ark., 2008), graft versus host hastalığı (Highfill ve ark., 2010) diyabet (Yin ve ark., 2010), ensefalomyelit (Zhu ve ark., 2007) ve kolit (Haile ve ark., 2008) gibi farklı otoimmün hastalıklar ve birtakım farklı habis olmayan ortamlarda da tarif edilmiştir. Bugüne kadar, tümör olmayan ortamlarda insan MDSC'sinde sadece sınırlı veriler bulunmaktadır. İnflamatuvar barsak hastalıkları olan hastalarda (Schmielau ve Finn, 2001) $CD14^+ HLA-DR^{düşük / negatif}$ MDSC sıklığında bir artış tanımlanmıştır.

2.8.3 MDSC yi Tanımlamak İçin Fenotipik Belirteçler:

Farelerde yapılan çalışmalarda CD11b pozitif myeloid hücre serisinde, Gr-1 antijeninin iki farklı epitopunu tanıyan antikorlar olan Ly6G ve Ly6C bağlanmalarına göre MDSC'lerin morfolojik heterojenitesi daha detaylı belirlenmiştir (Thevenot ve ark., 2014). Buna göre MDSC'ler $CD11b^+LY6G^+LY6C^{low}$ granülositik ve $CD11b^+LY6G^-LY6C^{hi}$ monositik olmak üzere iki tipe ayrılmışlardır (Youn ve ark. 2008). Bu hücre yüzeyi belirteçleri, karakterizasyon için sadece bir başlangıç çerçevesi sağlar (Arpinati ve ark., 2000; Pan ve ark., 1995).

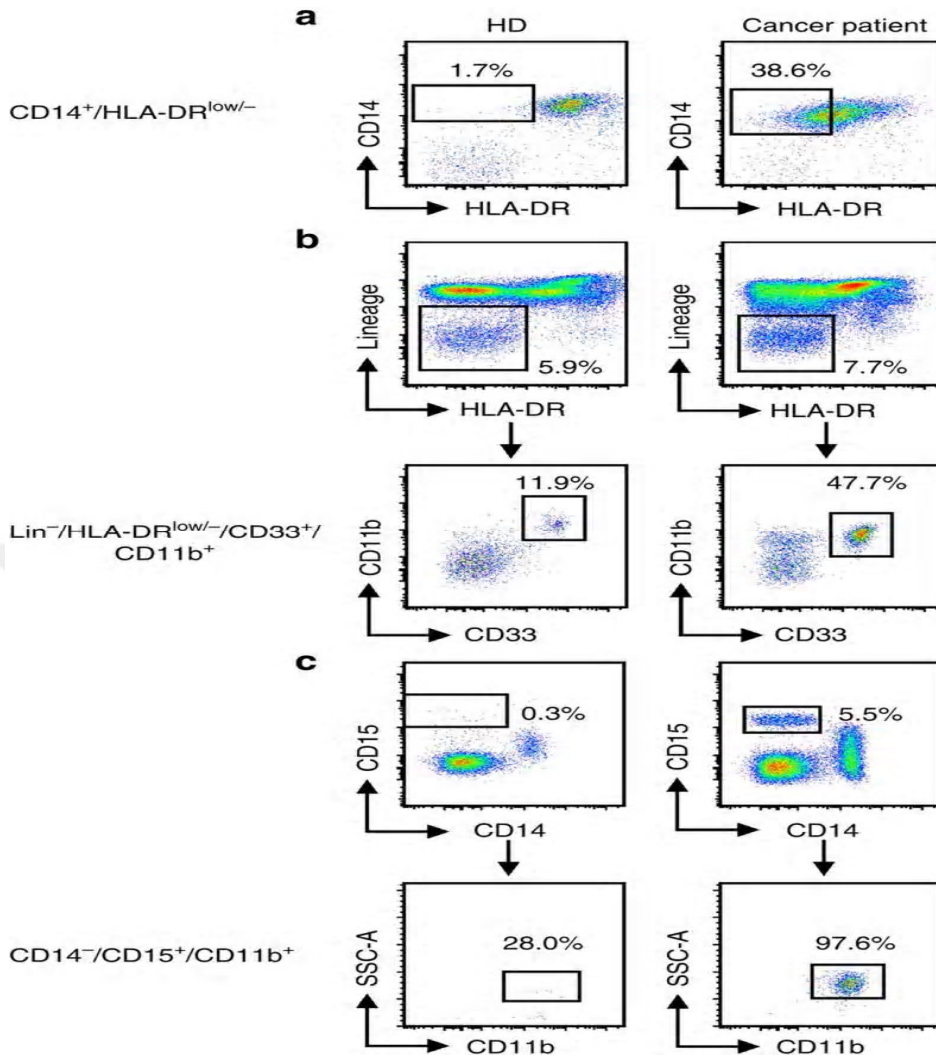
İnsan periferik kan mononükleer hücresinde, PMN-MDSC'ye eşdeğer, $CD11b^+ CD14^- CD15^+$ veya $CD11b^+ CD14^- CD66b^+$ ve M-MDSC'ye eşdeğer ise $CD11b^+ CD14^+ HLA-DR^{-/lo} CD15^-$ olarak tanımlanmıştır. Çok az CD15 hücrelerinde CD11b olduğu için CD11b yerine CD33 miyeloid belirteci kullanılabilir (Zeng ve ark., 1997). Lin^- (CD3, CD14, CD15, CD19, CD56 dahil) $HLA-DR^- CD33^+$ hücreler daha olgunlaşmamış progenitörleri içeren karışık MDSC gruplarını içerir. Bu hücreler olgunlaşmamış MDSC olarak tanımlanmıştır ve fare eşdeğeri henüz tanımlanmamıştır. Bununla birlikte, bazı olgunlaşmamışlıklar tüm MDSC altkümelerinin ortak bir özelliği olduğundan, onları 'erken aşama MDSC' (eMDSC) olarak daha doğru bir şekilde tanımlama önerilmektedir. Bu noktada, herhangi bir MDSC karakteristiğinin, bu hücre popülasyonlarının her birini içermesi gerektiği görülmektedir. Dünya çapında birçok laboratuvar deneyimlerine dayanan son bir

raporda, insan MDSC'sinin flow sitometrisi ile uyumlaştırılmış fenotiplemesi için özel geçit parametreleri önerilmiştir (Sloand ve ark., 2000). Miyeloid hücrelerin çeşitli ek popülasyonları bu analizde tarif edilmiş olmasına rağmen, PMN-MDSC, M-MDSC veya eMDSC'den ve birbirlerinden morfolojik, biyokimyasal veya fonksiyonel farklılıkları henüz net değildir. Her kanser tipinde ve her patolojik durumda (çeşitli frekanslarda) bulunan üç ana popülasyonun aksine, bu hücrelerin bazıları herhangi bir kanser tipinde var olabilirken diğerlerinde yok olabilir. Farklı alt gruplara ait hücreler arasında ciddi bir örtüşme olması muhtemeldir. Bu nedenle, daha iyi karakterizasyon için, MDSC popülasyonlarının daha ayrıntılı analizine ihtiyaç vardır. Bununla birlikte, fenotipik kriterlere göre insan MDSC'lerinin (PMN-MDSC'ler, M-MDSC'ler veya eMDSC'lerin) tanımlanması ve karakterizasyonu için minimum gereklilikler Tablo 2.5 de tanımlanmıştır (Bronte ve ark., 2016). Her ne kadar fenotip, MDSC'yi tanımlamak için ilk gerekli adım olmasına rağmen PMN-MDSC ile nötrofiller ve M-MDSC ile monositler arasındaki ayrım için tek parametre olarak kullanılamaz.

Tablo 2.5 MDSC Hücrelerini Tanımlamak İçin Gerekli Fenotipik Özellikler

FARE	FENOTİP	İNSAN (PKMH fraksiyonu)	FENOTİP
PMN-MDSC	CD11b ⁺ Ly6C ^{lo} Ly6G ⁺	PMN-MDSC	CD14 ⁻ CD11 ⁺ CD15 ⁺ (CD66b ⁺)
M-MDSC	CD11b ⁺ Ly6C ^{hi} Ly6G ⁻	M-MDSC	CD11b ⁺ CD14 ⁺ HLA-DR ^{low/-} CD15 ⁻
eMDSC	Net olarak belirlenememiştir.	e-MDSC	Lin ⁻ (CD3/14/15/19/56)/HLA-DR ⁻ /CD33 ⁺

Boyama örneği, Şekil 2.7 de verilmiştir (Bronte ve ark., 2016). Fare ve insan MDSC fenotiplemesi için özgün kapılama kriterlerinin detaylı çalışmaları da vardır (Crough ve ark., 2004). Bu kapılama kriterleri, monositleri M-MDSC'lerden ve nötrofilleri PMN-MDSC'den net sınırlarla ayırt edemez çünkü şu anda MDSC'ye özgü herhangi bir eşsiz belirteç kombinasyonu mevcut değildir.



Şekil 2.7 Sağlıklı Donörlerin (HD) ve Melanom Hastalarının Periferik Kanında MDSC Alt Gruplarının Belirlenmesi İçin Kapılama Stratejileri. (a) CD14⁺HLA-DR^{low/-} M-MDSC (b) Lin⁻ HLA-DR⁻CD33⁺ eMDSC (c) CD14⁻CD11b⁺CD15⁺ PMN-MDSC

Fenotipik değerlendirmenin, MDSC'nin analizi için bir başlangıç noktası olduğunu vurgulamak önemlidir. Bununla birlikte, miyeloid kompartmanın patolojik koşullar altında genişlemesi, MDSC'nin daha fazla değerlendirilmesine olanak sağlayan kritik bir ilk adımdır. Örneğin, periferik kan mononükleer hücre fraksiyonunda tipik PMN-MDSC fenotipi sağlıklı donör hücrelerde pratik olarak saptanamaz ve M-MDSC fenotipli hücreler, melanom veya kronik enfeksiyon hastalarına göre çok daha az sayılarda bulunur (Hartung, 1998). Farelerde de dalakta benzer bir durum vardır. Splenik MDSC'lerin oranı, sağlıklı farelerde % 1-2'den birçok kanser türünde % 10-15'e ve daha fazlasına yükselir (Bronte ve ark., 2016; MacDonald ve ark., 2005).

2.8.4 MDSC'lerin Biyokimyasal ve Moleküler Özellikleri

MDSC'nin baskılayıcı aktivitesinde birçok mekanizmanın rol oynadığı öne sürülmüş ve tartışılmıştır (Gabrilovich ve Nagaraj, 2009; Perobelli ve ark., 2016). Buna karşılık, insan MDSC hücrelerinin baskılayıcı işlevini nasıl uyguladığı hakkında yalnızca sınırlı bilgi bulunmaktadır. İmmün hücreleri baskılayabilmesi, MDSC'nin önemli bir özelliğidir. Her ne kadar MDSC, NK ve B hücreleri (Perobelli ve ark., 2016; Mielcarek ve ark., 1997; Bensinger ve ark., 2001) gibi immün sistemin farklı hücrelerinin baskılasa da, T hücrelerinin inhibisyonunun değerlendirilmesi, MDSC fonksiyonunun değerlendirilmesi için en önemlisidir. MDSC'ler iki özel mekanizma ile baskılama yaparlar. Antijen özgül baskılamada, hidrojen peroksit (H_2O_2) ve nitrik oksit(NO) ile her ikisinin varlığında ortaya çıkan peroksinitritin TCR yapısında oluşturduğu oksidatif hasar rol oynar. Antijen özgül olmayan baskılamada ise IL-10 ve TGF- β aracılı Treg fenotiplerine dönüşüm ve aminoasit tüketimi ile metabolik yetersizlik rol oynar.

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, periferik kandan gelen MDSC'nin T hücrelerini antijen spesifik bir şekilde baskıladığını, tümör bölgesinden gelen MDSC'nin T hücrelerini spesifik olmayan bir şekilde bastırdığı gösterilmiştir (Reichenbach ve ark., 2015).

Antijene spesifik baskılama: İmmatür myeloid hücrelerin çok miktarda hidrojen peroksit (H_2O_2) ürettiği bildirilmiştir. Hidrojen peroksitin, T hücre cevaplarını baskılamada rol aldığı bilinmektedir. Ayrıca H_2O_2 'in, Ca^{+} bağımlı bir mekanizma ile MDSC'lerin in vitro koşullarda daha uzun immatür halde kalmasına yol açtığı ve GM-CSF aracılı proliferasyonlarına katkı sağladığı gözlenmiştir (Kusmartsev ve Gabrilovich, 2003; Kusmartsev ve ark., 2004). Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) oksidazlar, immün hücrelerde reaktif oksijen ürünlerinin (ROS) kilit kaynaklarından biri olarak tanımlanmıştır. MDSC'lerin, reaktif oksijen ürünlerinin (ROS) üretimi STAT3 transkripsiyon faktörü ile kontrol edilen Nikotinamid adenin dinükleotit (NADPH) oksidaz (NOX2) aktivitesine bağımlıdır (Kusmartsev ve ark., 2004; Corzo ve ark., 2009). Ayrıca ROS üretimi CD11b, CD18 ve CD29 gibi integrinlerin bağlanması, TGF- β , IL-6, IL-10, Platelet kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) ve GM-CSF gibi tümör kaynaklı faktörler ile de artmaktadır (Kusmartsev ve ark., 2004; Sauer ve ark., 2001).

MDSC'lerin yüksek miktarlarda nitrik oksit ürettikleri bilinmektedir. MDSC'lerin nitrik oksit üretimindeki artış başlıca indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) aktivitesine bağlıdır ancak endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) ve diğer türevleri de bu üretime katkıda bulunurlar (Nagaraj ve ark., 2007). Ancak bu bileşiklerin T hücre toleransına olan etki mekanizmaları çok daha sonradan tespit edilebilmiştir. Buna göre, H₂O₂ ile NO etkileşiminden vücutta sentezlenen oksidatif bir ajan olan peroksinitrit ONOO⁻ (PNT) oluşmaktadır. Peroksinitrit güçlü bir oksidandır. Yapılan çalışmalarda peroksinitrit üretiminde en kritik faktörün MDSC'lerde artan ROS üretimi olduğu ve baskılamada da peroksinitritin başrol oynadığı sonucuna varılmıştır (Nagaraj ve ark., 2007). MDSC'lerin genellikle antijen özgül baskılama oluşturdıkları söylenebilir (Gabrilovich ve Nagaraj, 2009).

MDSC'ler tarafından üretilen oksidatif ajanların T hücreleri üzerine temel etki mekanizması T hücre reseptör (TCR) kompleksinin bütünlüğünün bozulması üzerinedir. Peroksinitrit, tirozin rezidüleriyle nitrotirozin oluşturmak üzere etkileşir. Bu bağlantı düşünülerek yapılan çalışmalarda peroksinitrin TCR zincirlerindeki tirozin bölgelerinin kararlı nitrozilasyonu sonucu MHC ile bağlantı kurmasına engel olarak hücre toleransına yol açtığı düşünülmüştür (Nagaraj ve ark., 2007). İlerleyen araştırmalarda MDSC'lerin T hücrelere antijen sunarken Majör histokompatibilite kompleksi (MHC)-TCR sinapsı bölgesinde TCR (T hücre reseptörü) moleküllerinin nitrozilasyonu ile antijen özgül enerjiye neden oldukları gösterilmiştir. Bu durum yeni bir TCR molekülünün sentezlenerek eskisinin yerini almasına kadar geçen sürede etkili bir T hücre cevapsızlığına neden olur ve ek olarak nitrozilasyona uğrayan TCR moleküllerinin de CD3 ve CD8 ile de fiziksel etkileşim kurma kabiliyetlerini yitirmesine sebep olur (Nagaraj ve ark., 2010). MDSC'lerin genellikle MHC sınıf II moleküllerini eksprese etmedikleri ve bu nedenle sadece CD8⁺ T hücreleri baskıladıkları bildirilse de bazı fare meme kanseri modelleri ile yapılan çalışmalarda MDSC'lerin antijen bağımlı olarak CD4⁺ T hücre cevaplarını baskıladıkları da gösterilmiştir (Nagaraj ve ark., 2012; Kodumudi ve ark., 2010).

Antijene Spesifik Olmayan Baskılama: MDSC'ler antijenden bağımsız baskılama fonksiyonlarını öncelikle prostaglandin E₂ (PGE₂) sentezleyerek gerçekleştirirler. PGE₂, T hücre proliferasyonunu doğrudan baskılar. PGE₂, T hücrelerin IL-2 sentezini ve cevabını engelleyerek diğer doğal immünite elamanlarını da IL-10 molekül

sentezleyecek şekilde yönlendirirler (Kalinski, 2012). Ayrıca MDSC hücreleri, membran bağlı TGF- β 'ları ile NK hücrelerinin sitotoksitesini, NKG2D (NK hücresi aktivatör reseptörü) ekspresyonunu ve IFN- γ üretimlerini baskılamaktadırlar (Li ve ark., 2009). MDSC'lerin antijene özgül olmayan baskılamalarında bir diğer özelliği de immün yanıtları kontrol altına alma özelliğindeki düzenleyici T hücrelerin (Treg) gelişimine neden olmalarıdır. Treg gelişimlerinin tümöre özgül T hücrelerin aktivasyonuna gereksinim duyduğu ve IFN- γ , IL-10 ve TGF- β aracılığıyla olduğu düşünülmektedir (Huang ve ark., 2006).

MDSC'lerin antijenden bağımsız baskılayıcılığı PGE2 sentezi yanında genellikle ortamdaki besin maddelerinin tüketilmesi üzerinden işlemektedir. MDSC'ler yüksek Arjinaz 1 aktivitesine sahiptirler ve bu sayede aşırı L-arjinin katabolizmasına yol açarak ortamda bu amino asitin tüketilmesine neden olurlar. Ayrıca L-arjinin iNOS tarafından da katabolize edilmektedir (Bronte ve Zanovello, 2005). L-arjinin eksikliğinde, T hücre proliferasyonunu baskılamaktadır. Ayrıca iNOS ekspresyonları yüksek olan MDSC'ler bu enzimin ürünü olan nitrik oksit aracılığıyla JAK3 ve STAT5 tirozin fosforilasyonunu azaltarak T hücre fonksiyonlarının baskılanmasına yol açmaktadır (Gabrilovich ve Nagaraj, 2009; Bingisser ve ark., 1998; Harari ve Liao, 2004). Ayrıca sistein aminoasiti, memeli hücresinde ya sistatinyonaz enzim aracılığıyla metyonyoninden üretilebilir ya da ortamdaki sistin hücre içine alınıp indirgeyici ortamın etkisiyle sistenine dönüşür. Ancak naiv T hücreler iki mekanizmayıda kullanamayıp sadece alanin-serin-sistein (ASC) taşıyıcıları ile ortamdaki sisteini alabilirler. Bu nedenle T hücrelerin proliferasyonları için ortamdaki sistini alıp, sistene çevirip, kendi ASC taşıyıcıları ile tekrar dışarı veren antijen sunan hücrelere (ASH) ihtiyacı vardır. Bu durum ASH'lerin T hücre yanıtlarını kontrol altında tuttukları bir mekanizma olarak da gösterilmiştir (Edinger ve Thompson, 2002). MDSC'ler ortamdaki sistini alabilirler fakat ASC taşıyıcısı barındırmadıkları için hücre içinde oluşan sisteini T hücrelerin kullanımı için dışarıya veremezler ve böylece ortamdaki sistini tüketerek T hücre proliferasyonunu engellerler (Srivastava ve ark., 2010; Levring ve ark., 2012).

Farklı ortamlarda, MDSC'ler farklı bastırma mekanizmalarını kullanır ve hangisinin daha geçerli olacağını tahmin etmek zordur. MDSC baskılayıcı aktivite için, herhangi bir efektör molekülün hangi üretim seviyesinde yeterli olduğunu belirlemek de zordur.

Örneğin dalaktaki MDSC'ler yüksek seviyelerde ROS içerirken makul düzeylerde NO ve ARG1 sentezlemektedirler ve böylece üretebildikleri PNT ile kontak bağımlı şekilde aktive T hücreleri baskırlar. Tümörde bulunan MDSC'ler ise daha yüksek NO ve Arginaz-1 ekspresyonlarına sahiptirler ve ROS seviyeleri düşüktür böylece hem ortamdaki antijen özgül T hücreleri baskırlarlar hem de non-özgül baskılama yapabilirler (Solito ve ark., 2011).

2.8.5 MDSC'yi Tanımlamak İçin Fonksiyonel Analizler

MDSC biyolojisinin en tartışmalı yönlerinden biri, hücrelerin morfoloji ve fenotiplerinin neden nötrofillere ve monositlere benzer olduğudur ve PMN-MDSC ve M-MDSC olarak belirtilmesi gerektiğidir. Asıl mesele, onları fonksiyonel olarak, monositlerden ve nötrofillerden farklı olarak tanımlanmasının temeli olan MDSC'lerin güçlü immün baskılayıcı aktivitesini yansıtmaktadır.

Nötrofillerin ve monositlerin klasik aktivasyonu, konakçıyı bakterilerden ve virüslerden korumak için gelişir ve bunun yanı sıra dokuların yaralanmadan sonra veya çözülmüş enflamasyondan sonra yeniden şekillenmesine destek sağlamak için gelişir. Bu aktivasyon durumu ile fagositoz, solunum patlaması aktivitesi ve proinflatuar sitokinlerin salınımı sağlanır. Miyeloid aktivasyonu nispeten kısa ömürlüdür ve uyarının durması ile bitirilir.

Buna karşılık, patolojik aktivasyon, miyeloid kompartmanın, tümörlerden veya kronik enflamasyon bölgelerinden gelen nispeten düşük kuvvetli sinyallerle ısrarcı uyarılmasının sonucudur. Bu koşullar altında üretilen miyeloid hücreler zayıf fagositiktir, yüksek seviyelerde reaktif oksijen, azot türleri ve ağırlıklı olarak anti-inflatuar sitokinler üretir (Youn ve ark., 2012). Sonuç olarak, MDSC hücreleri miyeloid hücrelerin normal fonksiyonlarını etkili bir şekilde yerine getirememektedir ve güçlü bir immün baskılayıcı potansiyel kazanmaktadır. MDSC'nin asıl rolü, güçlü immünsupresif karakterlerini yansıtarak konağın çözülmemiş iltihaplanma veya enfeksiyonla ilişkili kontrolsüz immün yanıtın neden olduğu yoğun doku hasarına karşı korunmasıdır. Tümörler, kendilerini bağışıklık sistemi tarafından elimine edilmekten korumak için, bu aktiviteyi ele geçirip büyütebilirler.

MDSC, farklılaşmanın farklı aşamalarındaki hücrelerin bir sürekliliği olduğu için, biyokimyasal ve moleküler MDSC işaretçilerinin belirlenmesi, değiştirilmiş miyelopoezisin farklılaşma aşamalarını yöneten, tam olarak tanımlanmamış işlemlere

bağlı olacaktır ve bu nedenle bazı belirteçler, farklı fenotiplere sahip veya olgunlaşmış ve aktive edilmiş monositler veya nötrofiller hücrelerle paylaşılabilir (Youn ve ark., 2013; Svensson ve ark., 2011).

Çoğu fare çalışmasına dayanarak, dört tip moleküler ve biyokimyasal parametre belirlenmiştir (Vladimirovna ve ark., 2016). Transkripsiyon faktörleri ve apoptoz düzenleyicileri; (Mandrizzato ve ark., 2016) pro ve anti- inflamatuvar sitokinlerin ve sitokin reseptörlerinin belirteçleri; (Guan ve ark., 2015) MDSC alışverişini etkileyen kemoatraktanlar ve ilgili reseptörler; (Maeda ve ark., 2015) MDSC immün düzenleyici fonksiyonlarına katkıda bulunan enzimler ve metabolik yan ürünlerinin belirlenmesidir.

Her ne kadar MDSC biyolojisinde farklı parametreler yer alsın ve MDSC'lerin moleküler bir belirtecini tanımlamaya yardımcı olsa da , ancak bazı parametreler MDSC alanının geliştirilmesi için önemlidir ve bu nedenle MDSC'lerin tanımlanmasına yardımcı olabilir. Gen ve protein ekspresyonundan yararlanan bu biyobelirteçleri ve aynı zamanda çoklu post dönüşümsel değişimleri değerlendirmek için çeşitli analizlerin entegre edilmesi gerekir. Transkripsiyon faktörleri, etkinliklerinin değerlendirilmesini gerektirebilir (DNA bağlanması, fosforilasyon). mRNA çevirisinin saptanmasına dayanan teknolojiler, MDSC fonksiyonunun birkaç aracı epigenetik veya translasyon sonrası düzenlendiği için MDSC'yi sınıflandırmak için yetersiz olabilir. Miyeloid farklılaşmasına bağlı histon modifikasyonu gibi epigenetik değişiklikler yoğun olarak araştırılmış ve umut verici bir araştırma alanıdır (Lavin ve ark., 2014). Bununla birlikte, şu anda belirli MDSC altkümelerini ayırt edebilen epigenetik belirteçler hakkında net bir gösterge yoktur. Benzer bir değerlendirme, mikroRNA'lar için geçerlidir. mikroRNA molekülleri farklı patolojik koşullar (Sonda ve ark., 2013) altında miyeloid hücre altkümelerinin yararlı bir sınıflandırıcısı olabilir.

Çok sayıda sitokin, MDSC özelliklerini etkileyebilir ve / veya bir veya daha fazla MDSC alt grubu tarafından üretilir. Bu sitokinler, sadece MDSC'yi indükleyen kronik enflamasyon sırasında salındıkları için değil aynı zamanda MDSC tarafından salındıkları için MDSC birikimini sürdüren bir otokrin ileri besleme döngüsü oluşturabilirler. Kemokinler ve reseptörleri, genel inflamatuvar durumun değerlendirmesini tamamlayabilir, ancak hiçbir kemokin sadece MDSC'ler için spesifik değildir.

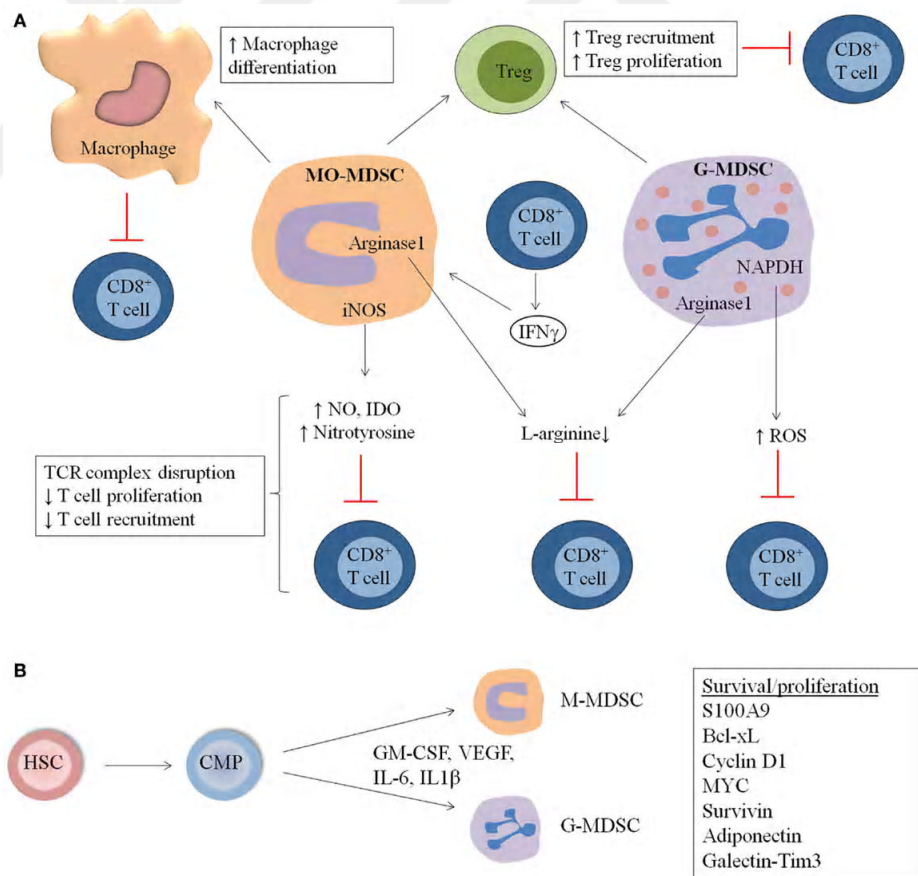
MDSCs'nin immün düzenleyici aktivitesi, L-arginin ve L-triptofan gibi amino asitlerin metabolik tüketimine ve dönüşümüne bağlıdır, bu durum Arginaz-1 (ARG1), nitrik oksit sentaz 2 (NOS2 / iNOS) gibi indüklenebilir enzimlerin aktivitesi ile gerçekleşir. Bu enzimlere yönelik mevcut antikorların çoğu, özgüllük eksikliği ve hedeflerinin yer aldığı hücre içine girme ihtiyacı bulunduğundan, bu enzimlerin tespiti genellikle RT-PCR ile yapılır. Ayrıca metabolitlerin (örneğin NO, kinürenin, ornitin, üre ve poliaminler gibi) biyokimyasal analizleri alternatif bir analiz olabilir. MDSC'ler ayrıca daha önce de belirtildiği gibi yüksek çözünür reaktif tür üreticileridir.

Süperoksit anyonu (O_2^-) ve peroksit hidrojeni (H_2O_2) ile örneklenen reaktif oksijen türleri, miyeloid hücrelerde NOX2 in aktif olduğu NADPH oksidaz (NOX) aktivitesi ile oluşturulur. Serbest radikal peroksinitrit ($ONOO^-$) gibi reaktif azot türleri iNOS, Arginaz-1 ve NOX'in birleşik aktivitesinin yan ürünleridir ve proksimal proteinlerin seçilmiş aromatik amino asitlerinde enzim bağımsız nitrasyon / nitrozilasyon ile bazı saptanabilir kovalent değişikliklere neden olabilirler. 'Nitrome' adlı peroksinitrit tarafından indüklenen transasyon sonrası modifikasyonların karmaşıklığı henüz tam olarak anlaşılmamıştır, ancak nitrotirozin ve nitrotriptofan'ın tespiti, gelecekte daha etkili / spesifik antikorlar geliştirmek koşuluyla biyolojik numunelerde genel reaktif azot türlerinin üretimini değerlendirmek için uygun olabilir. Son olarak, insan kanserlerinin tedavisi için ve greft redlerinde yeni bir kontrol noktası-blokaj inhibitörlerinin klinik kullanımı, MDSCs içindeki PD-L1 (Programmed death ligand) gibi ligandların değerlendirilmesini destekler. Kontrol noktası inhibitörlerinin miyeloid hücrelerinde daha geniş bir ekspresyon olduğu ortaya konmuştur. Bu nedenle, insan MDSC-T hücre etkileşimlerinde kontrol noktası moleküllerinin ekspresyonu ve işlevselliği araştırılabilir. Bunların ekspresyonu inflamatuvar sitokinler veya hipoksi gibi lokal çevresel faktörlerden etkilenir (Dölen, 2013; Spranger ve ark., 2013).

2.8.6 MDSC'lerin Gelişimleri ve Aktivasyonları

Siklooksijenaz 2 (COX2), prostaglandinler, kök hücre faktörü (SCF), Makrofaj koloni stimüle edici faktör (M-CSF), interlökin-6 (IL-6), GM-CSF, ve vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) MDSC gelişimine neden olmaktadır. Bu faktörlerin pek çoğunun ortak noktası ise Janus Kinaz (JAK) protein ailesi ile sinyal iletilişi ve transkripsiyon aktive edici-3 (STAT3) yolağını kullanmalarıdır (Delano ve ark., 2007). Hematopoetik progenitörler, tümör hücre kültürlerinden elde edilen süpernatantlarla

kültüre edildiklerinde, JAK2 ve STAT3 aktivasyonu sonucunda MDSC gelişimi gözlenmiştir (Nefedova ve ark., 2004). Aynı zamanda STAT3 seçici inhibitörleri kullanılan ya da şartlı STAT3 knockout tümörlü farelerde MDSC gelişimi önemli ölçüde azalmış ve T hücre cevapları artmıştır (Nefedova ve ark., 2005). MDSC'lerin baskılama yapabilmeleri için aktive olmaları gerekmektedir (Gabrilovich ve Nagaraj, 2009). Buna tümör hücre ölümü ve aktive olan T hücrelerden salınan IFN- γ , TLR ligandları, interlökin-4 (IL-4), interlökin-13 (IL-13) ve TGF- β gibi moleküller neden olmaktadır. Burada sinyal iletilişi ve transkripsiyon aktive edici-1 (STAT1) ve sinyal iletilişi ve transkripsiyon aktive edici-6 (STAT6) yolları başrol üstlenmektedirler (Gabrilovich ve Nagaraj, 2009). Tümör kaynaklı TGF- β da MDSC birikimi ve nötrofil polarizasyonunu düzenler (Gabrilovich ve Nagaraj, 2009). MDSC'lerde sitokin ve büyüme hormonları aracılığı ile aktive olan yollar ve baskılama mekanizmaları şekil 9'da özetlenmiştir.



Şekil 2.8 MDSC Hücrelerinin İmmünsüpresif Mekanizmalarına ve Kök Hücre Nakli Sırasında Genişlemeye Genel Bakış.

(A) MDSC hücreleri, bağışıklık sisteminde makrofaj farklılaşmasını ve Treg çoğalmasını artırır. MDSC, T hücrelerini artan NO, nitrotirozin, IDO ve ROS salgılanması ve azalmış L-arjinin üretimi gibi farklı mekanizmalar ile baskılar.

(B) MDSC, hematopoetik kök hücrelerden (HKH) ortaya çıkan yaygın miyeloid progenitörlerinden (CMP) kaynaklanır. M-MDSC ve G-MDSC; GM-CSF, IL-6, VEGF ve IL-1 β gibi farklı faktörlerin varlığında oluşturulur ve çoğalır. MDSC'nin çoğalması ve hayatta kalmasıyla ilgili faktörler S100A9, Cyclin D1, Bcl-xL, Myc ve Survivin'dir.

2.8.7 MDSC Raporlanması İçin Algoritma

İmmün baskılayıcı aktivite, uzun zamandır MDSC'lerin ana özelliği olarak kabul edilmiştir ve benzersiz fenotipik belirteçlerin eksikliği, daha önce immün baskılayıcı aktivite tespit edilmediyse, bu hücrelerin MDSC'ler olarak karakterize edilmesini imkansız kılmıştır. Bu hücreler tümörle ilişkili nötrofil veya monosit (Turnquist ve ark., 2011; Zhao ve ark., 2012) olarak adlandırılmıştır ancak son zamanlarda bu belirleme rafine edilmiştir. Daha sofistike biyokimyasal ve gen ekspresyonu profillemesi, bu hücrelerin, kararlı durumda bulunan miyeloid hücrelerden farklı, patolojik olarak aktive edilmiş olgunlaşmamış miyeloid hücreleri olarak karakterize edilmesine olanak sağlamıştır. İmmün baskılayıcı aktivite, MDSC'nin kritik derecede önemli bir niteliği olmasına rağmen, her zaman tümör taşıyan konaklarda veya kronik enflamasyon koşullarındaki mevcut hücrelerle ilişkili değildir.

Örneğin, kanserin erken evrelerinde veya kronik enflamasyonun ilk aşamalarında, MDSC'nin fenotipik ve biyokimyasal özelliklerine sahip hücrelerin birikmesi ile ilişkili olabilir ancak güçlü bir baskılayıcı aktiviteden yoksundur. Ayrıca, ileri evre kanserde bile MDSC fenotipine sahip hücrelerin hepsinin immün baskılayıcı aktiviteye sahip olmaması mümkündür. Her ne kadar MDSC'nin immün baskılayıcı fenotipinin edinilmesinden sorumlu faktörlerin doğası tamamen açık olmasa da, baskılayıcı olmayan MDSC'ler yine de tümörün başlangıcı ve ilerlemesinin çeşitli yönlerini düzenleyebilirler (Talmadge ve Gabrilovich, 2013; Mielcarek ve ark., 1998; Cohen ve ark., 2002). Aslında son çalışmalar, MDSC fenotipli kronik enflamasyon hücrelerinin belirlenmesi, ancak baskılayıcı aktivitenin bulunmaması, tümör inflamasyonunun erken evrelerine katkıda bulunduğunu göstermiştir (Joo ve ark., 2009; Thevenot ve ark., 2014). 'MDSC' terimi bastırıcı aktiviteyi varsaydığından, bu terim bu işlevi olmayan

hücreleri tanımlamak için kullanılmamalıdır. Bu nedenle, bu hücreleri tarif ederken MDSC benzeri hücreler (MDSC-LC) terimini önerilmektedir.

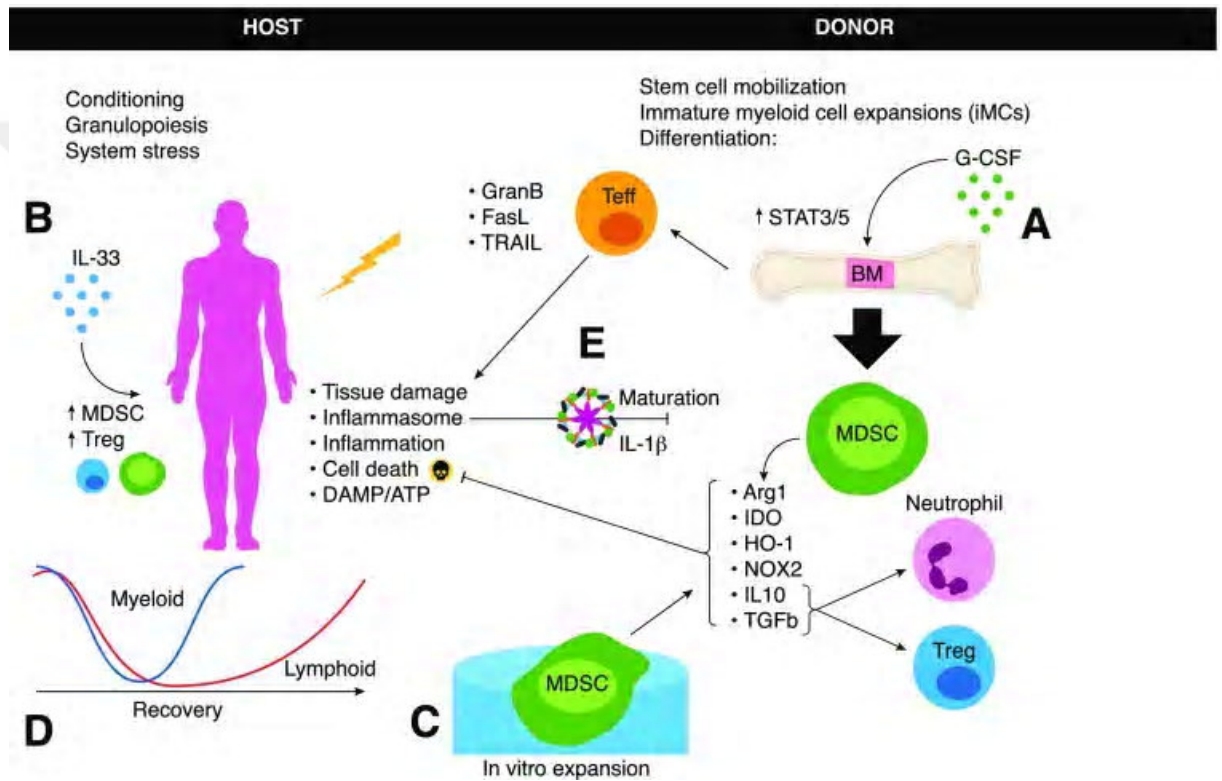
Farelerde ve insanlarda MDSC popülasyonlarını tanımlamak için, öncelikle hücrelerin fenotipik karakterizasyonuna odaklanan algoritmik bir yaklaşım önerilmektedir. Hücreler bu kriterleri karşılıyorsa, baskılayıcı aktivite belirlenmelidir. Baskılayıcı aktivitenin varlığı, bu hücreleri MDSC olarak tanımlar. Bununla birlikte, eğer hücreler baskılayıcı aktiviteye sahip değilse, bu hücrelerin başlıca biyokimyasal özellikleri değerlendirilmelidir. Mevcut verilere dayanarak, baskılayıcı aktivite yokluğunda MDSC-LC'yi tanımlamaya yardımcı olabilecek kriterler önerilmektedir (Bronte ve ark., 2016).

2.9 Hemaotopoetik Kök Hücre Naklinden Sonra MDSC Hücreleri:

Miyeloid türevli baskılayıcı hücreler (MDSC'ler), efektör T hücresi tepkilerini baskılayabilen ve düzenleyici T hücrelerinin (Treg'ler) gelişimini teşvik edebilen düzenleyici hücre popülasyonlarıdır. Bunlar monositik ve granülositik altkümeleri içeren olgunlaşmamış miyeloid progenitörlerin heterojen bir popülasyonudur. Nakil sonrası miyeloid hücrelerin hızlı genişlemesi göz önüne alındığında, doğuştan gelen bağışıklık sisteminin bu üyelerinin, nakil sonrası erken bağışıklık ortamına önemli katkıları olabileceğini düşünülmüştür. Allojenik hematopoetik kök hücre nakli (AKHN) sonrası MDSC'lerin iyileşme ve işlevinin kinetiğini değerlendirmek için çalışmalar yapılmıştır (Bronte ve ark., 2016). Her iki MDSC alt grubunun, T ve B lenfositlerin iyileşmesinden çok önce, 2 ila 4 hafta arasında iyileştiği gösterilmiştir. Sonuç olarak, fonksiyonel MDSC, AKHN'den sonra erken dönemde mevcuttur ve muhtemelen nakil sonrası düzenleyici hücre popülasyonuna katkıda bulunur. MDSC'ler, doğrudan hücre teması, artan arginaz 1 (Arg-1), indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS), indoleamin 2,3-dioksijenaz (IDO) ve reaktif oksijen türlerinin üretilmesi ve düzenleyici T hücrelerinin (Treg) indüklenmesi yoluyla T hücrelerinin güçlü baskılayıcılarıdır (Gabrilovich ve Nagaraj, 2009; Bronte, 2009).

Allojenik kök hücre transplantasyonu, hem granülosit koloni stimüle edici faktör (G-CSF) mobilize edilmiş hematopoetik kök hücre koleksiyonuna sahip donörde hem de transplantın erken alıcılarında, miyeloid hücre bölmesinin genişlemesiyle ilişkilidir. Hem G-CSF hem de granülosit-makrofaj GM-CSF'nin MDSC'leri genişlettiği gösterilmiştir (Marigo ve ark., 2010). Tümör nekroz faktörü (TNF α), IFN- γ ve IL-6

gibi transplant sonrası erken dönemde belirgin olan sitokinlerin, immün sistemin birçok yönünün güçlü baskılayıcıları haline gelmesi için MDSC'leri aktive ettiği veya yetkilendirdiği bilinmektedir (Condamine ve Gabrilovich, 2011). Küçük seri çalışmalarda, MDSC'lerin AKHN'den sonra erken bir zaman içinde greft ve alıcılarda bulunduğu gösterilmiştir (Mougiakakos ve ark., 2013; Vendramin ve ark., 2014; Luyckx ve ark., 2012). Şekil 2.10 da yapılan çalışmalar ve sonuçları anlatılmıştır.



Şekil 2.9 Nakil Sürecinde Donör ve Alıcı Kanlarında Gerçekleşen İmmunolojik Mekanizmalar (Brent ve ark., 2017).

- (A) Donörde, G-CSF kök hücre mobilizasyonunu teşvik etmek için kullanılmıştır fakat aynı zamanda çeşitli bastırıcı fonksiyonlar vasıtasıyla GVHD'nin iyileştirilmesinde hasta için faydalı olabilecek MDSC'lerin genişlemesi de dahil olmak üzere anti-inflamatuvar etkilerin artırılması için kullanılmıştır. Çalışmalar insan donörlerindeki G-CSF kök hücre mobilizasyonu sırasında kandaki PMN-MDSC lerin ve M-MDSC lerin arttığını göstermiştir.

- (B) Alternatif olarak, hastanın IL-33 ile yüklenmesi ile, GVHD patolojisini de sınırlandırabilen endojen düzenleyici hücreleri desteklediği (MDSC leri ve Treg leri uyardığı) gösterilmiştir.
- (C) MDSC ile ilişkili terapötik faydalar için ilave seçenekler arasında, istenen altkümeler veya gerektiği gibi etki mekanizması için uyarlanabilen MDSC'nin in vitro genişlemesini içerir.
- (D) Hazırlık rejiminden sonra, miyeloid hücre geri kazanımının, lenfoid geri kazanımını geçtiği bilinmektedir; Bununla birlikte, baskılayıcı fenotip miyeloid hücrelerin, GVHD amplikasyonunda rol oynayan, erken evrelerde hasta kaynaklı APC(Antijen sunan hücreler) aktivasyonunun büyük olasılıkla üstesinden gelememektedir.
- (E) Hazırlık rejimleri ayrıca hücre ölümüne sebep olur ve inflamazom-aktifleştirici sinyallerin de arasında olduğu tehlikeli sinyallerin salınımına neden olur ve artmış inflamasyon etkisini destekler.

MDSC'lerin genişlemesi ve aktivasyonu genellikle 2 sinyal gerektirir. G-CSF ve GM-CSF gibi büyüme faktörlerinin sağladığı ilk sinyal, MDSC'lerin miyeloid progenitörlerinden farklılaşmasını ve genişlemesini teşvik eder (Bronte, 2009; Condamine ve ark., 2011). IFN- γ , IL-6 ve TNF- α gibi proinflamatuvar sitokinler tarafından sağlanan ikinci sinyal, Arg-1 ve iNOS gibi çözünebilir mediatörlerin üst regülasyonu dahil olmak üzere immün düzenleyici fonksiyonunun aktivasyonuna veya yetkinliğine yol açar (Gabrilovich ve Nagaraj,2009; Bronte, 2009; Condamine ve ark., 2011). TNF- α , IL-1 veya IL-6 ile GM-CSF varlığında sağlıklı donörlerden gelen PBMC'ler CD33⁺ MDSC benzeri hücrelere dönüştürülebilir (Lechner ve ark. 2010). GM-CSF ve IL-6 veya GM-CSF ve G-CSF kombinasyonu, MDSC'nin insan ve farelerde kemik iliği hücrelerinden farklılaşmasını ve aktivasyonunu indükleyebilir (Marigo ve ark., 2010).

İlginç bir şekilde, bu büyüme faktörlerinin ve farklılaşmaya neden olan ve MDSC'yi aktive edebilen proinflamatuvar sitokinlerin de GVHD patogeneğinde önemli olduğu bulunmuştur (Blazar ve ark., 2012; Visentainer ve ark., 2003). AKHN'den sonraki ilk 2 ila 3 haftada IFN- γ , TNF- α ve IL-6'nın serum seviyeleri artmıştır (Visentainer ve ark., 2003; Min ve ark., 2001) ve transplantasyon sonrası hastalarda G-CSF de artmıştır (Mougiakakos ve ark., 2013).

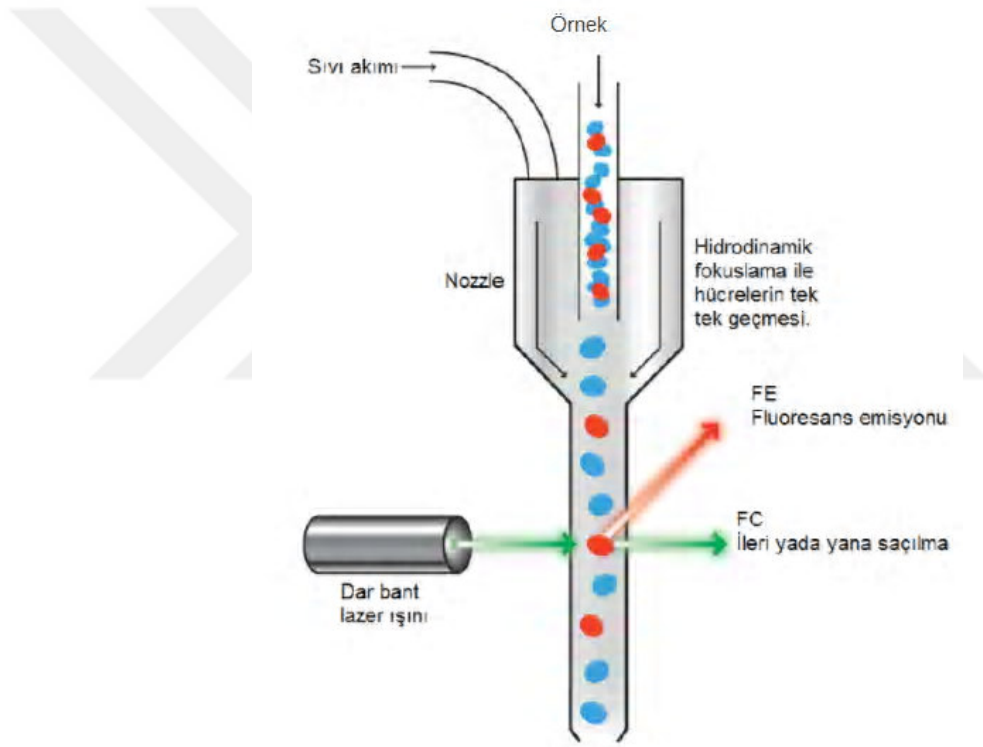
Verilerin sonucunda, her iki MDSC alt grubunun da nakil sonrası 1 ay içinde iyileştiği gösterilmiştir. Transplant sonrası erken bağışıklık ortamının, MDSC'leri genişletmek ve aktive etmek için gerekli elementlere sahip olduğunu ve transplant sonrası hastalarda MDSC geri kazanımının ve fonksiyonunun, transplant sonrası büyüme faktörüne ve proinflatuar sitokinlere bağlı olduğu varsayılmaktadır.

Yapılan bir çalışmada, AKHN sonrası hastalarda M-MDSC'lerin yüzdesinin G-CSF, IL-6 ve IL-10 serum seviyeleri ile korele olduğunu göstermiştir (Mougiakakos ve ark., 2013). Klinik olarak, büyüme faktörleri, nötrofil iyileşmesini hızlandırmak için nakil sonrası değişken olarak kullanılır. Farklı büyüme faktörleri ve / veya sitokinler tarafından indüklenen MDSC'ler farklı baskılayıcı fonksiyonlara sahip olabilir (Marigo ve ark., 2010). Bu nedenle, transplant sonrası büyüme faktörü uygulamasına göre klinik uygulamadaki farklılıklar, transplant sonrası ortamdaki MDSC'nin hem sayısını hem de fonksiyonunu etkileyebilir ve hematopoetik büyüme faktörü kullanımı ile GVHD'deki farklılıklar için bir açıklama olabilir. Seçici olarak nakil sonrası MDSC aktivitesinin artırılması - sitokin uygulaması veya hücre sel infüzyon yoluyla - GVL (Graft versus lösemi) etkisini korurken GVHD'nin önlenmesi / tedavisi için bir taktik olabilir. GVL etkisi, donör T hücrelerinin hastanın normal dokularında olduğu gibi kanser hücreleri üzerinde de tahribat yapması ve hastalığın eradike edilmesi durumudur. Birlikte ele alındığında, hem M-MDSC hem de PMN-MDSC alt gruplarının AKHN'den sonra, adaptif immün CD3⁺T ve CD19⁺B hücrelerinin hemen öncesinde iyileşme gösterdiği görülmüştür. G-MDSC / M-MDSC'lerin pozitif olarak iyileşmesi, AKHN 'den sonra farklı zamanlarda diğer immün hücrelerle korelasyon göstermiştir; ve hastalardaki önkoşullama zamanındaki G-MDSC'lerin 27 ila 29. günlerdeki referans değeri üzerindeki oranı, akut GVHD'nin gelişimini öngörebildiği görülmüştür(3). Bu erken AKHN sonrası MDSC altkümeleri işlevseldir; T hücrelerinin çoğalmasını ve Th1 farklılaşmasını bastırırken, Treg'lerin gelişimini destekler. Bu, MDSC'lerin GVHD ve GVL patofizyolojisinde önemli bir rol oynayabileceğini ve potansiyel olarak terapötik manipülasyon için bir hedef olduğunu göstermektedir (Guan ve ark., 2015).

2.10 Akım Sitometrinin İmmün Fenotiplemede Kullanımı

Akan hücre ölçer immün sistemin hücrelerinin fonksiyon ve analizlerinde kullanılmakta ve çok sayıda hücre üzerinden birden çok parametrenin analizine olanak sağlamaktadır. İmmünfenotipleme hücre yüzeyinde eksprese edilen antijenlerin antikor kullanılarak

tanımlanmasıdır. Bu antijenik yapılar hücre etkileşimi, adezyon, metabolizma ve hücre etkileşiminde rol oynayan fonksiyonel membran proteinleridir. Antikorlar bu antijenlerin yüzeylerindeki epitoplara bağlanmaktadır. Hücre yüzeyindeki antijenik yapılar günümüzde CD (Cluster of Differentiation) molekülleri olarak adlandırılmakta ve farklı immünolojik fonksiyonlara sahip hücrelerin tanımlanmasında kullanılmaktadır. Hücre popülasyonları A'+ veya A'-' sembolleri kullanılarak tanımlanmakta ve bu semboller belli bir hücre fraksiyonunun CD molekülünü eksprese edip etmediğini göstermektedir (Deniz ve Demirel Yanıkkaya, 2014).



Şekil 2.10. Akım Sitometri Cihazı Hücre Akış Prensibi

Akan hücre ölçer tek hücre süspansiyonu halindeki hücrelerin bir akış kanalı boyunca tek hücre seviyesinde lazer önünden geçerken yansıyan foton enerjisinin ölçümüne bağlı olarak hücrelerin büyüklük (0.2-150 μm), granülarite ve floresans özelliklerine göre hücre popülasyonlarını, organelleri veya benzer ölçüde partikülleri kantitatif olarak araştırma imkanı sağlayan bir cihazdır. Akan hücre ölçer, süspansiyon halindeki hücrelerde yüzey antijenlerinin belirlenmesi, B ve T hücre alt gruplarının tayini, lösemi ve lenfoma tiplmesi, DNA analizi, nötrofil fonksiyonları (fagositoz, solunumsal

patlama ve kemotaksi), hücrelerin fonksiyonel özelliklerinin belirlenmesi (hücre proliferasyonu), hücre içi sitokin tayini ve kromozom analizi gibi çok geniş bir alanda kullanılmaktadır.

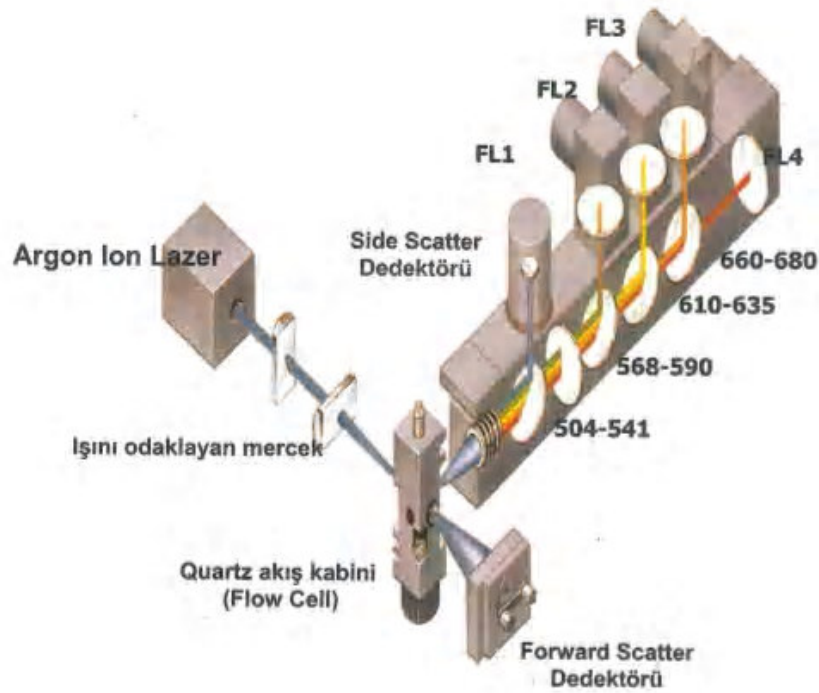
Akan hücre ölçer sistemi 3 ana sistemden oluşmaktadır.

Hidrolik sistem: Bir akış sistemidir, partiküllerin lazer önünden geçişi için taşıyıcı sistem olarak görev almaktadır.

Optik sistem: Lazer önünden geçen hücrelerden açığa çıkan saçılımın çapraz ve silindirik filtreler ile toplanarak düzgün bir şekilde fotodedektöre aktarılmasında görev almaktadır.

Elektronik sistem: Elde edilen optik sinyalin 'Photo Multiplier Tubes'(PMT) ile amplifiye edilerek elektrik sinyaline çeviriminden ve analiz için bilgisayara aktarımından sorumludur.

Süspansiyon halinde hazırlanan hücreler analiz için floresan işaretli (FITC, PE, Rhodamine vs.) monoklonal antikorlar ile direkt/indirekt yoldan işaretlenir. Sistem floresan yoğunluğu ölçümü prensibine dayalı olduğundan işaretli hücrelerden floresanı açığa çıkaracak güç kaynağı olarak 'Lazer' kullanılmaktadır. Bu kaynak; argon, kripton, helium, kadmium, helium-neon veya daha yüksek yoğunluktaki ışık kaynakları olabilir. Masa üstü sistemlerde, genellikle kaynak olarak argon iyonu kullanılır ve FITC, PE gibi floresan boyalarla 488 nm'de aktive olarak hücre yüzeyinde ve/veya hücre içinde floresan yoğunluğunun ölçümüne olanak sağlanır. Akan hücre ölçer süspansiyon halindeki hücrelerin büyüklük, floresan yoğunluğuna bağlı olarak granülaritesine göre tek hücre seviyesinde kantitatif ölçüm yapan bir sistemdir. Süspansiyon halindeki hücreler hava basıncı ile sıvı içinden geçirilir. Sıvının çok hızlı akışı yüksek bir hidrostatik basınç oluşturur ve bu basınçla hücreler cam veya quartzdan yapılmış (flow cell) akış kabinine gelirler. Bu kabinin geometrik şekli ve sıvının laminar akışı hücrelerin tek bir sıra halinde lazer kaynağı önünden geçişini sağlar. Tek hücre olarak lazer kaynağının önünden geçen floresan işaretli hücrelerin analizi için sistemde; Forward scatter (FS), Side Scatter (SS) ve Floresan (FL-1,FL-2,FL-3,FL-4 vs) dedektöleri bulunmaktadır. FS hücre yüzey alanı veya büyüklüğü hakkında bilgi verirken, SS granülarite veya hücre içi yapısı hakkında bilgi verir.



Şekil 2.11. Akım Sitometri Cihazı Çalışma Prensibi (Sözer, 2009)

Süspansiyon hücre popülasyonları büyüklük ve granülarite özelliklerine göre ayrıldıktan sonra bu farklı hücre popülasyonları içinden bilgi edinilmek istenen hücre/hücre gruplarının grafik bir çerçeve ile belirlenmesi işlemine ‘gating/kapılama’ işlemi adı verilmektedir. Bu işlemden sonra, sistem verilen komutlara uygun olarak sadece kapı içindeki hücreler hakkında bilgi vermektedir.

Veri analizi ise kapılanan hücrelerin floresan yoğunluklarının önce optik sinyale daha sonra PMTs ile amplifiye edilerek elektrik sinyaline çevrilerek bilgisayara kaydedilmesi ve bu kayıtlı veriler üzerinde ölçümlerin yapılması işlemidir. Ölçüm parametrenin tekli veya çoklu oluşuna göre, elde edilen veriler bilgisayarın kullandığı yazılım programına bağlı olarak farklı grafiklerle gösterilebilir (Norman, 1980; Riley ve ark., 1993; Fuller, 1980).

Çalışmamızda, MDSC fenotiplemesinde kullandığımız CD yüzey belirteçleri özellikleri aşağıda anlatılmıştır.

(CD11b, CD15, CD33, HLA-DR, CD66b, CD 14, CD45)

- **HLA-DR:** 63 kDA molekül ağırlığında olan, doku uyumu kompleksi (MHC) sınıf 2 antijenlerindendir. α ve β olarak tanımlanan ve her ikisinde membrana bağlı

olan, iki glikoprotein zincirden oluşmaktadır (Alan,2011). HLA-DR molekülünün temel görevi antijen sunumudur. HLA-DR molekülleri, antijen sunan hücrelerde (APC), yani dentritik hücrelerde, B lenfositlerinde, monositlerde, makrofajlarda, Langerhans hücrelerinde ve timik epitel hücrelerinde bulunur. Ayrıca aktif T hücrelerinde de ifade edilir. Ancak granüositlerde, trombositlerde ve kırmızı kan hücrelerinde ifade edilmez. Makrofaj dendritik hücre gibi antijen sunucu hücrelerin yüzeyinde yoğun şekilde bulunarak bağladığı peptidleri T hücre reseptörüne sunar ve bu peptid antijene karşı T hücre yanıtını başlatır. Hücre yüzeyindeki HLA-DR antijeninin stimülasyonuna cevaben yoğunlaşması nedeniyle önemli bir aktivasyon belirteçidir (Deniz ve Demirel Yanıkkaya, 2014). HLA-DR ayrıca, farklı farklılaşma aşamalarında bazı hematopoetik progenitör hücrelerde eksprese edilir.

- **CD14:** Makrofajlar, nötrofiller ve dendritik hücreler gibi miyeloid kökenli hücrelerde bulunan hücre yüzey molekülü olduğu belirtilmiş ve özellikle bakteriyel enfeksiyonlarda rolü olabileceği bildirilmiştir. 55 kDa molekül ağırlığına sahip bir glikosil-fosfatidilinositol bağlı tek zincirli yüzey membran glikoproteinir. Lipopolisakkarit (LPS) ve LPS-Binding Protein (LBP) kompleksi için yüksek afiniteli bir reseptör olarak işlev görür. Miyelomonositik soy hücrelerinde bulunur. CD14 monositik farklılaşma için bir belirteç olarak kullanılmaktadır (Alan, 2011). CD14 antijeni monositler, makrofajlar ve zayıf olarak nötrofiller üzerinde eksprese edilir. Aynı zamanda B lenfositleri üzerinde zayıf bir şekilde eksprese edilir, ancak T lenfositleri, NK hücreleri, kırmızı kan hücreleri ve trombositlerden yoksundur.
- **CD15:** CD15 antijeni (LewisX veya Lex) 185-260 kDa moleküler ağırlığında fukosentaz III molekülüdür. Bu karbonhidrat epitopu, hücre zarında ifade edilen hem glikolipitler hem de glikoproteinler tarafından taşınır. CD15 antijeni promyelositler ve matür granüositler arasındaki hücrelerde pozitif boyanır. CD15 antijeni nötrofiller, eozinofiller, monositler, makrofajlar, mast hücreleri ve

normal miyeloid prekürsör hücreler tarafından kuvvetli bir şekilde eksprese edilir. Normal eritrositler, trombositler veya lenfositlerde ifade edilmez.

- **CD 11b:** $\beta 2$ integrinlerin αM zinciri; kompleman reseptör-3(CR3); iC3b reseptör; Mac-1 olarak da isimlendirilir. 170 kDA moleküler ağırlığında bir tip I transmembran glikoproteinidir. Granülositler, monositler, makrofajlar, dentritik hücreler ve NK hücrelerinde eksprese edilir. CD11b, CD18 ile biraraya gelerek iC3b ile opsonize partiküllerin fagositozu ve/veya kemotaksisini sağlar (Alan, 2011).
- **CD33:** CD 33 antijeni, hücre-hücre adezyonuna aracılık ettiği düşünülen bir siyaloadhezindir. 67 kDa moleküler ağırlığındadır. Mieloid farklılaşmanın en erken belirteçlerinden biridir. Mielomonositik dizin hücrelerinde bulunur , pluripotent kök hücrelerde bulunmaz (Alan, 2011). Periferik kandaki monositlerde eksprese edilir.
- **CD66b:** CD66b 95-100 kDa ağırlığında glikosilfosfatidilinositol (GPI)'a bağlı bir glikoproteindir. CD66b, CD66'nın GPI eklentili izoformlarından biridir. Myelositler, metamiyelositler, nötrofiller ve eozinofiller tarafından eksprese edilen yüksek oranda glikozillenmiş bir proteindir. CD66b promyelositler tarafından zayıf şekilde ifade edilir. Serum CD66b nin in vivo ortamda aktif granülosit aktiviteleri için biyolojik bir belirteç olabilir (Alan, 2011).
- **CD45:** Ortak lökosit antijeni olarak da isimlendirilir. 180-220 kD ağırlığındadır. Tüm lökosit ve hematopoetik hücrelerde bulunur. CD45 sinyal iletimini yüzey antijen reseptörü ile düzenleyen bir tirozin fosfatazdır. T hücreler, B hücreler ve diğer lökositlerin antijen-reseptör aracılığı ile oluşan aktivasyonunda kritik önemi vardır (Alan, 2011).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, TYL-2017-7831 numaralı proje olarak Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Birimi tarafından desteklenmiş ve Erciyes Üniversitesi Etik kurulundan 2016/527 no ile 29.09.2017 tarihinde onay alınmıştır.

Çalışmaya Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Hematoloji Bilim Dalı (BD) Kemik İliği Nakil Ünitesinde çeşitli hematolojik hastalıklar nedeni ile Aralık 2017- Eylül 2018 tarihleri arasında Allojenik kemik iliği nakli (AKHN) yapılan 15 hasta dâhil edilmiştir. Her hastaya çalışma hakkında bilgi verildikten sonra bilgilendirilmiş gönüllü onam formları imzalanmıştır. Hastaların nakil sonrası takiplerinde nötrofil engrafmanının (e) ilk gününden başlayarak e0., e30., ve e60., ve e90. günlerde EDTA' lı tüpe 3 cc kan alınmıştır. Alınan bu örneklerden MDSC belirteci olarak kullanılan antikorlardan CD 11b, HLA-DR, CD14, CD 66b, CD15, CD33, CD45 akım sitometri cihazı ile değerlendirilmiştir. Akım sitometri cihazında okuma yapıp ilgili yazılım kullanılarak hücre yüzey antijeni ekspresyon düzeyleri değerlendirilerek karakterizasyonu yapılmıştır. Kimerizm analizi, Erciyes Üniversitesi Genetik Biriminde hematoloji nakli hastalarından rutin olarak çalışılan, hastaların çalışmamız için kanlarının alındığı periyotlarda çalışılan kimerizm sonuçları üzerinden değerlendirilmiştir.

3.1 Araç ve Gereçler

3.1.1 Alet ve Ekipman

- Bekman coulter (BC) NAVİOS, 3 LAZER / 10 RENK akım Sitometre Cihazı, (BC, USA)
- Vorteks Cihazı (Dragon Labs .MX-S ve HEİDOLPH)
- 10-100µl ve 100-1000µl otomatik pipet (Gilson, ABD)ve pipet uçları

- Süre ölçer
- Buzdolabı 2-8C⁰ (Profilo, Türkiye)
- Nüve NF800 model santrifüj cihazı
- 12x75-mm test tüpü (FalconTMpolistiren test tüpleri, BeckmanCoulter, USA)

3.1.2 Kullanılan Solüsyonlar ve Kitler

- Fosfat tamponlu su (PBS) veya eşdeğeri
- Hücre yıkama işlemlerinde kullanılan İsoflow (BC, 41116015)
- Disodyum EDTA 0,38 g/L
- Potastumklorid.....0,40g/L
- Monosodyum fosfat 0,19g/L
- Disodyumposfat 1,95g/L
- Sodyum filorid 0,30g/L
- Akım sitometre cihazının günlük yıkama işlemlerinde kullanılan Clenz (BC,8448222)
- 10X Stem Cell Lysing Solüsyonu (BD Bioscience)
- CD45 (KrO), CD15 (FITC), CD11b (PE), CD14(PC5), CD33(PE), HLA-DR(PB), CD66b(FITC) Markerları (BeckmanCoulter, USA)

3.2 Yöntemler

Çalışmamızda, akım sitometri laboratuvarında örnek hazırlamak için tam kan lizis yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntem, antikoagülan içeren tam kan örneklerimizin antikor ile inkübasyonu sonrası eritrosit lizisine dayanan bir yöntemdir. MDSC belirteçlerinden CD 11b, HLA-DR, CD14, CD 66b, CD15, CD33, CD45 ölçümü akım sitometri cihazı ile değerlendirilmiştir. Gönderilen kandan süspanse hücreler oluşturulmuştur. Hücre süspanسیونuna epitop spesifik florokrom konjuge antikor ilave edilerek, inkübasyonun ardından yıkama ve fiksasyon aşamasını takiben akım sitometri cihazında analiz yapılmıştır.

3.2.1 Akım Sitometri İşlem ve Analiz Basamakları

- Her bir hastadan alınan 100 µL kan örneği ayrı flow tüplerine eklendi.
- Her bir örnek için 2 flow tüpü kullanıldı. 1. Tüpe; CD11b(PE), HLA-DR(PB), CD-45(KrO), CD66b(FITC) markerları 5 ‘er µL eklendi. 2.Tüpe ise; CD15 (FITC), CD33 (PE), CD14(PC5), HLA-DR(PB), CD45(KO) markerları 5 ‘er µL eklendi. Her bir örnek sayısı kadar flow tüpünde hazırlandı. Solüsyonun tam karışabilmesi için iyice vortekslendi. 20 dk inkübasyon işlemi uygulandı.
- Her bir örnekten alınan 100 µL kan örneği üzerine 10 kat dilüe lizis solüsyonundan 2 mL eklendi ve elde edilen karışım karanlıkta 10 dakika inkübasyona bırakıldı.
- Süre sonunda tüm örneklerle 2 mL hücre yıkama solüsyonu eklenerek oda sıcaklığında 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.
- Üst faz uzaklaştırıldı. Aynı işlem üç kez tekrarlandı. Daha sonra hücreler bekletilmeden doğrudan akım sitometrede analiz yapıldı.
- Kullanılan tüpteki örnekler analiz edilirken uygun dedektör ve kompanzasyon ayarları yapılarak 100.000 hücre saydırıldı.
- Analiz, Beckman Coulter Navios model akım sitometre cihazı ve Kaluza yazılımı programı kullanılarak yapıldı.
- Akım sitometrik analiz sonrasında nötrofil ve monositler seçilerek G-MDSC ve M-MDSC olarak düşünülen hücrelerin ortalama floresan yoğunluğu, “Mean Fluorescent Intensity” (MFI), değerleri elde edildi.

3.2.2 Kimerizm Analiz Basamakları

İnsan genomlarında bulunan kısa tekrar bölgeleri gibi (STR) polimorfik DNA dizi belirteçleri yardımıyla gerçekleşir. Alıcı ve vericide yer alan STR lokuslarındaki allel farklılıklarına göre nakil sonrası kimerizm takibi yapılmaktadır. D8S1179, D21S11, D7S820, CSF1PO, D3S1358, TH01, D13S317, D16S539, D2S1338, D19S433, Vwa, TPOX, D18S51, Amologenin, D5S818, FGA STR (kısa tekrar) bölgeleri için dizayn edilmiş özel primerler ile PCR işlemi gerçekleştirilir. PCR işleminin ardından fragman analizi için 3500 GENETİC ANALYZER cihazında yürütme işlemi gerçekleştirilir. GENE MAPPER GENERİC analiz programı ile analiz edilir. Kimerizm analizi, Erciyes

Üniversitesi Genetik Biriminde hematoloji ilik nakli hastalarında rutin olarak çalışılmıştır.

3.3 İstatistiksel Analiz

Verilerin normal dağılıma uygunluğu histogram, q-q grafikleri ve Shapiro-Wilk testi ile değerlendirildi. İkili gruplar arası karşılaştırmalarda nicel değişkenler için Mann-Whitney U Testi uygulandı. İki den fazla ölçümler arası karşılaştırmalarda Friedman Testi kullanıldı. Verilerin analizi TURCOSACloud (TurcosaLtdCo, www.turcosa.com.tr) istatistik yazılımında gerçekleştirildi. Anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1 Hastaların Temel Özellikleri:

Çalışmaya Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Hematoloji Bilim Dalı (BD) Kemik İliği Nakil Ünitesinde çeşitli hematolojik hastalıklar nedeni ile Aralık 2017- Eylül 2018 tarihleri arasında Allojenik kemik iliği nakli (AKHN) yapılan 15 hasta dahil edilmiştir. Kemik iliği nakil ünitesinde çeşitli hematolojik hastalıklar nedeni ile allojenik nakil yapılmış olması, 18-65 yaş arası olması, ECOG performansın ≤ 1 olması, Normal parankimal organ fonksiyonu delili olarak; total bilirubin $\leq 2x$ normal değer, AST/ALT/ALP $\leq 5x$ normal değer, kreatin $\leq 2x$ normal değer ve kreatin klerensi > 35 mL/min. olması hastaların araştırmaya dahil edilme kriterleri olarak belirlendi.

Hastaların demografik bulguları ve nakil verileri Tablo 4.1 de sunulmuştur.

Tablo 4.1 Hastaların demografik ve nakil verileri için tanımlayıcı istatistikler (n=15)

CİNSİYET (Kadın/Erkek)	7(47)/8(53)
HASTALIK	
AML	6(40)
AA	3(20)
MDS	3(20)
HL	1(6,7)
MM	1(6,7)
ALL	1(6,7)
ORTALAMA NAKİL YAŞI (Aralık)	39.13±16.23
DONÖR KAYNAĞI (PBSC)	
Tam Uyumlu	12(80)
Haploidentik	3(20)
HAZIRLIK PROTOKOLÜ	
Miyeloablatif	12(80)
Nonmiyeloablatif	3(20)
AKUT GVHD	
GVHD Evre 0-1-2	10(67)
GVHD Evre 3-4	5(33)
SAĞ KALIM (ilk 100 gün)	
Sağ	12(80)
Ölü	3(20)

Veriler ortalama±standart sapma ve n(%) olarak ifade edilmiştir.

Tablo 4.1’de hastaların ortalama yaşı 39 yıl olduğu gözlenmiştir. Hastaların 7 si kadın, 8 i erkekti. Transplant endikasyonu hastalık açısından değerlendirildiğinde başta AML (%40), olmak üzere akut lösemilerin en sık endikasyonu oluşturduğu ikinci sıklıkta AA (%20) ve MDS’nin (%20) yer aldığı belirlendi. Hastaların tamamına donörlerin periferik kanından alınan kök hücre nakli yapıldı. Donörlerin 12 tanesi kardeş / tam uyumlu, 3 tanesi aile içi / (5/10) haploidentikti. Hazırlık protokolü olarak 12 tanesinde miyeloablatif, 3 tanesi non-miyeloablatif rejim kullanıldı.

Hasta bilgilerinden elde edilen verilere göre hastalara GVHD profilaksisi olarak MTX-Siklosporin verildiği gözlemlendi. Hastaların engraftman sürelerinin ortalaması 16 gündü.

Hastaların 100 günlük takiplerinde 5 hastada (H4, H6, H13, H14, H15) evre 3-4 GVHD gelişti. Bu hastalardan 3 (H13, H14, H15) tanesi ilk 100 gün içerisinde GVHD sebebiyle kaybedildi. 12 hasta 100 günlük sağkalım süresini tamamladı. Kaybedilen 3 hastaya gelince; H13 e33. gün kanı alındıktan 28 gün sonra, H14 e30. gün kanı alındıktan 29 gün sonra, H15 e60. gün kanı alındıktan 13 gün sonra GVHD sebebiyle kaybedilmiştir. H12, e60 dan sonra takiplerine gelmediği için e90 kanı alınamamıştır fakat yaşıyor olduğu öğrenilmiştir. Bir hasta dışında tamamının aylık kimerizm bulguları %95-100 aralığındaydı. H6 ‘da son kimerizm bulgusu %61,2 idi, hastanın e90. gün kanı alındıktan 7 ay sonra MDS tanılı primer hastalık nüksü nedeniyle kaybedildiği öğrenildi. Diğer GVHD gelişen H4 ise, e90 kanları tamamlandıktan 3 ay sonra GVHD sebebiyle kaybedildi. H5 in ise 10 ay sonra MDS tanılı primer hastalık nüksü nedeniyle hayatını kaybettiği öğrenildi.

Çalışmamızda 15 hastanın engraftman sonrası e0., e30., ve e60., ve e90. günlerinde alınan kanlarında akım sitometri cihazı ile CD 11b, HLA-DR, CD14, CD 66b, CD15, CD33, CD45 antikörleri kullanılarak analizi yapılmıştır. İstenilen hücreler grafik bir çerçeve ile belirlenmiştir. Bu işleme kapılama veya kapı alma (gating) işlemi denmektedir. Akım sitometrik analiz sonrasında nötrofil ve monositler seçilerek G-MDSC ve M-MDSC olarak düşünülen hücrelerin ortalama floresan yoğunluğu, “Mean Fluorescent Intensity” (MFI), değerleri elde edildi. Nötrofil ve Monositlerden ayrı bir şekilde MFI değeri alındı. Nötrofillerde CD15 MFI, monositlerde CD14 MFI değeri alındı.

PMN-MDSC için; CD45 pozitif hücrelerden CD14 negatif hücreler alındı. CD14 negatif hücreler içerisindeki CD11b pozitif hücreler alındı. CD11b pozitif hücreler

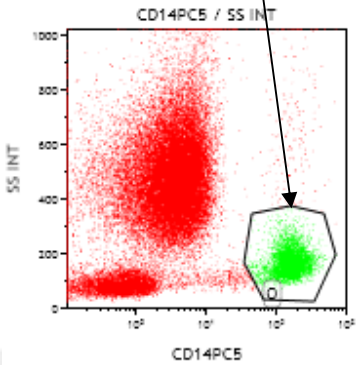
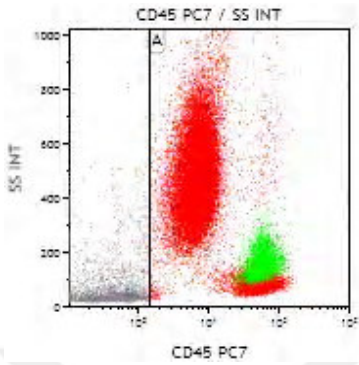
içerisinden de CD66b pozitif hücrelerin MFI değeri alınarak bu hücreler PMN-MDSC hücreleri olarak değerlendirilmiştir.

M-MDSC'ler için; CD45 pozitif hücrelerden CD11b pozitif hücreler,CD15 negatif hücreler seçilmiştir. CD33 pozitif hücrelerin içerisinden de CD14 pozitif hücreleri seçilmiş ve HLA-DR negatifler M-MDSC olarak değerlendirildi.

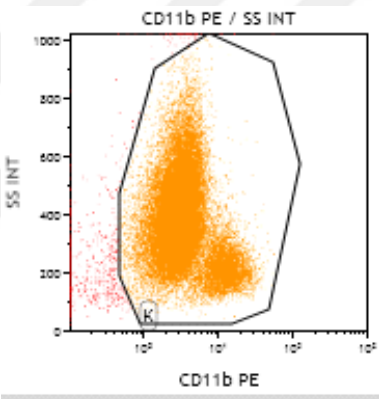
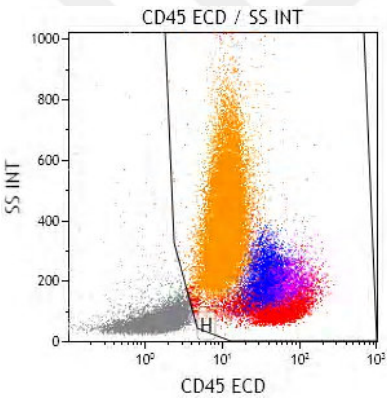


M-MDSC

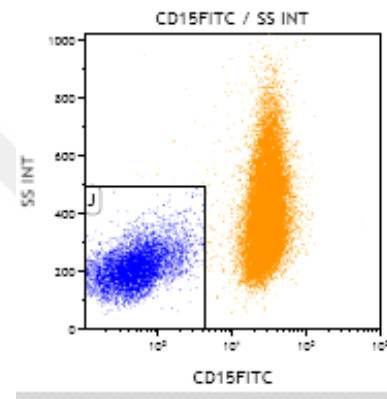
MONOSİT



Gate X-GMean	
All	3.23
O	157.22



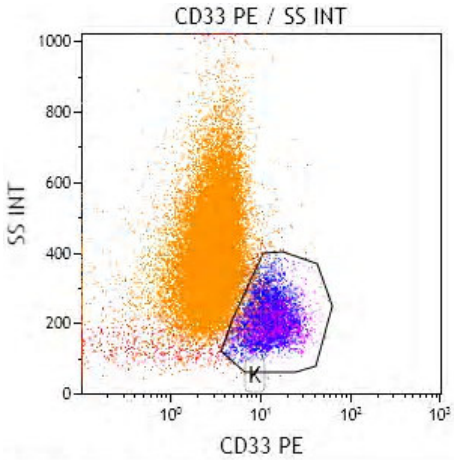
Gate X-GMean	
All	2.00
K	3.52



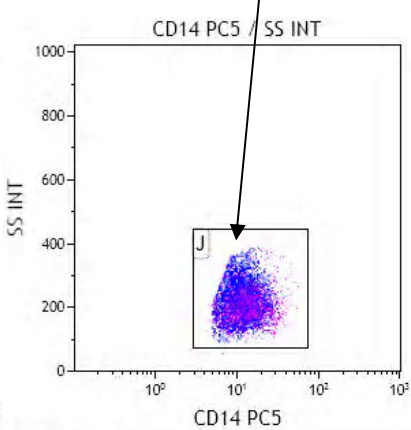
Gate X-GMean	
All	16.20
J	0.45

MONOSİT

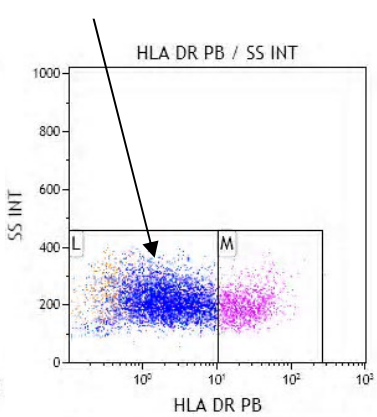
M-MDSC



Gate X-GMean	
All	2.00
K	11.92



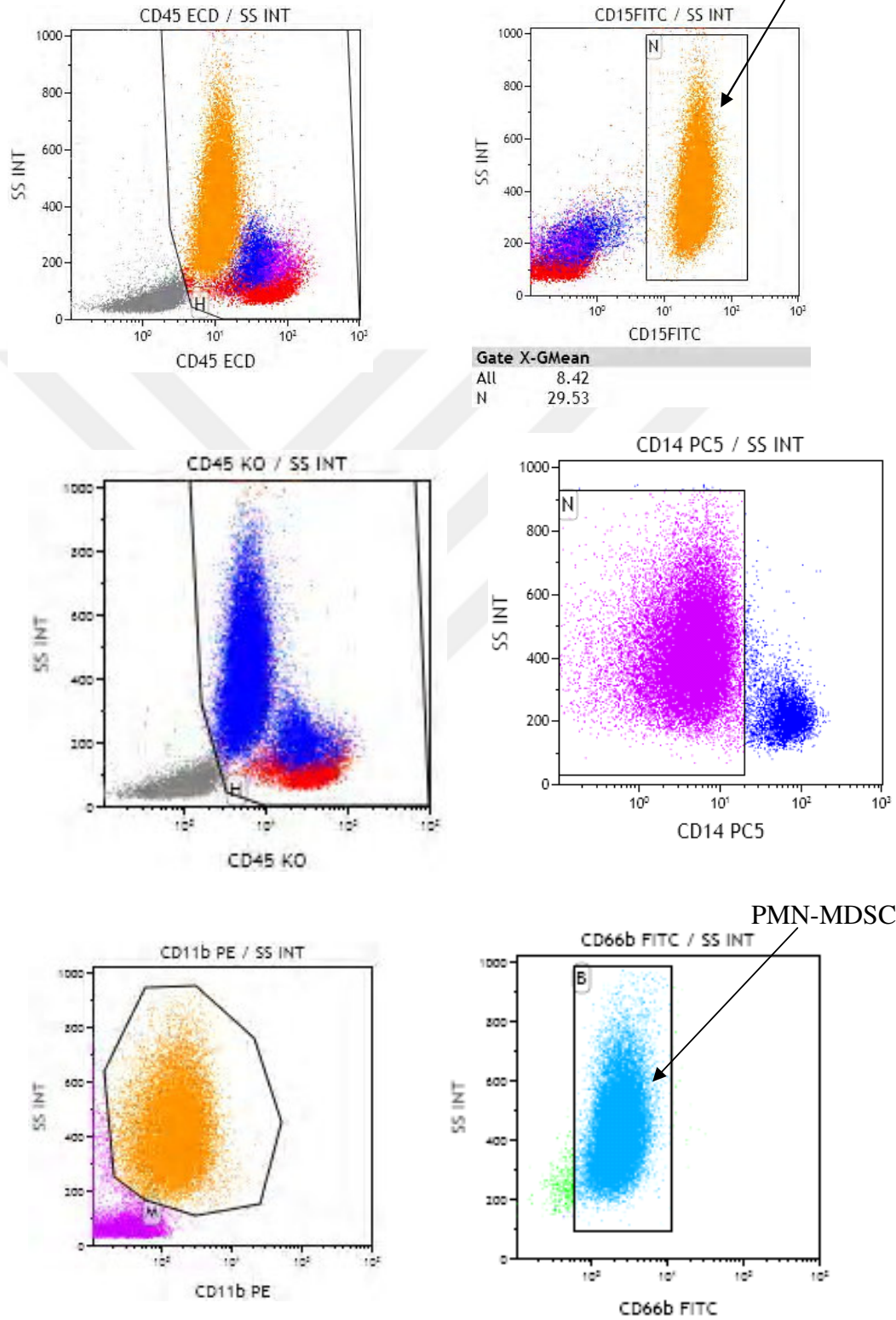
Gate X-GMean	
All	12.06
J	12.06



Gate X-GMean	
All	2.72
L	1.69
M	23.85

PMN -MDSC

NÖTROFİL



Şekil 4.1 Hasta9 (H9)un Akım Sitometri Örneği

Hastalardan aynı zamanda alınan kansayım sonuçları da değerlendirilmiştir.

Tablo 4.2 Hastaların WBC, Nötrofil, Monosit, Lenfosit, Trombosit Değerleri

HASTALAR		WBC (10 ³ /μl)	NÖTROFİL (10 ³ /μl)	MONOSİT (10 ³ /μl)	LENFOSİT (10 ³ /μl)	TROMBOSİT (10 ³ /μl)
H1	0. GÜN	6,20	4,63	1,03	0,51	113
	30. GÜN	3,91	2,57	0,47	0,78	87
	60. GÜN	3,20	1,53	0,40	1,23	93
	90. GÜN	3,15	1,89	0,26	0,95	125
H2	0. GÜN	2,77	1,85	0,59	0,32	15
	30. GÜN	2,94	1,85	0,45	0,60	121
	60. GÜN	4,98	3,40	0,66	0,86	165
	90. GÜN	5,77	4,52	0,54	0,69	110
H3	0. GÜN	7,71	4,84	0,79	1,99	161
	30. GÜN	6,35	4,28	0,48	1,45	296
	60. GÜN	8,88	6,81	0,59	1,46	230
	90. GÜN	5,28	3,49	0,54	1,23	248
H4	0. GÜN	4,93	3,18	1,26	0,41	237
	30. GÜN	5,85	4,17	0,44	1,13	149
	60. GÜN	5,84	4,01	0,63	1,12	143
	90. GÜN	3,35	2,47	0,35	0,53	155
H5	0. GÜN	3,26	1,85	0,63	0,77	42
	30. GÜN	4,60	3,20	0,42	0,89	114
	60. GÜN	3,35	1,67	0,13	1,44	123
	90. GÜN	3,75	1,38	0,30	2,00	23
H6	0. GÜN	4,06	2,27	1,08	0,71	156
	30. GÜN	3,94	1,74	0,50	1,62	111
	60. GÜN	2,71	1,21	0,21	1,24	121
	90. GÜN	5,34	3,59	0,78	0,96	131
H7	0. GÜN	1,85	0,97	0,36	0,49	241
	30. GÜN	3,25	1,83	0,53	0,38	200
	60. GÜN	3,62	1,21	0,42	1,67	186
	90. GÜN	3,20	1,17	0,35	1,48	177
H8	0. GÜN	3,47	1,38	1,62	0,46	66
	30. GÜN	3,57	3,07	0,25	0,25	68
	60. GÜN	2,67	1,62	0,38	0,66	76
	90. GÜN	5,69	3,73	1,10	0,84	190

H9	0. GÜN	1,40	0,90	0,25	0,25	73
	30. GÜN	3,49	2,13	0,64	0,64	159
	60. GÜN	2,79	1,30	0,34	1,09	122
	90. GÜN	3,38	1,80	0,33	0,94	154
H10	0. GÜN	1,79	1,10	0,50	0,19	16
	30. GÜN	4,79	3,37	0,57	0,78	151
	60. GÜN	2,87	1,84	0,33	0,62	143
	90. GÜN	5,28	3,72	0,66	0,83	115
H11	0. GÜN	1,99	1,31	0,54	0,30	97
	30. GÜN	4,88	3,02	1,16	0,52	126
	60. GÜN	6,42	4,46	0,64	1,15	237
	90. GÜN	11,74	10,85	0,59	0,20	159
H12	0. GÜN	5,99	3,30	1,98	0,64	52
	30. GÜN	6,36	3,68	0,67	1,68	83
	60. GÜN	7,19	4,37	0,84	1,76	127
	90. GÜN	-	-	-	-	-
H13	0. GÜN	7,13	5,27	1,82	0,03	24
	30. GÜN	8,3	6,95	0,88	0,43	48
	60. GÜN	-	-	-	-	-
	90. GÜN	-	-	-	-	-
H14	0. GÜN	11,14	7,91	2,61	0,60	20
	30. GÜN	4,33	2,42	0,86	0,84	35
	60. GÜN	-	-	-	-	-
	90. GÜN	-	-	-	-	-
H15	0. GÜN	3,66	2,5	0,59	0,57	10
	30. GÜN	7,55	6,07	0,55	0,91	22
	60. GÜN	1,73	1,19	0,17	0,37	10
	90. GÜN	-	-	-	-	-

Tablo 4.3 Hastaların 0,30,60,90. Günlerindeki CD14 MFI, CD15 MFI, PMN-MDSC MFI, M- MDSC MFI Değerleri

HASTALAR		CD14	CD15	PMN-MDSC	M-MDSC
H1	0. GÜN	14,78	29,93	5,29	1,77
	30. GÜN	18,97	37,44	163,24	1,97
	60. GÜN	24,09	61,26	259,16	2,66
	90. GÜN	257,83	13,76	377,19	2,70
H2	0. GÜN	10,75	23,42	23,45	1,11
	30. GÜN	35,34	180,63	151,62	1,76
	60. GÜN	24,76	86,27	226,00	1,19
	90. GÜN	156,24	23,82	191,44	0,74
H3	0. GÜN	13,29	25,99	12,35	0,11
	30. GÜN	24,46	95,38	201,61	1,11
	60. GÜN	18,18	30,30	163,87	0,66
	90. GÜN	142,29	111,39	190,68	0,84
H4	0. GÜN	18,31	79,44	355,00	0,77
	30. GÜN	36,81	37,97	446,00	1,19
	60. GÜN	15,53	66,18	242,00	1,08
	90. GÜN	141,88	95,18	35,41	0,76
H5	0. GÜN	18,83	74,81	297,00	1,41
	30. GÜN	16,93	46,91	352,00	2,00
	60. GÜN	200,13	93,28	374,00	1,97
	90. GÜN	142,98	85,02	316,00	1,74
H6	0. GÜN	11,42	15,32	169,79	0,87
	30. GÜN	21,74	107,65	421,60	2,62
	60. GÜN	119,86	87,44	216,80	2,32
	90. GÜN	74,46	43,55	226,00	1,27
H7	0. GÜN	14,08	85,06	147,37	1,09
	30. GÜN	15,71	78,06	239,84	2,64
	60. GÜN	71,27	64,97	189,24	2,14
	90. GÜN	104,90	88,87	173,43	2,93
H8	0. GÜN	90,55	71,72	132,44	2,69
	30. GÜN	80,46	99,92	101,76	1,82
	60. GÜN	27,58	56,08	82,56	2,16
	90. GÜN	62,64	18,93	40,70	1,87
H9	0. GÜN	159,89	30,37	134,74	1,58
	30. GÜN	7,22	21,49	147,85	2,87

	60. GÜN	30,47	23,05	142,60	3,33
	90. GÜN	24,22	45,40	293,85	2,95
H10	0. GÜN	159,52	56,69	206,77	1,61
	30. GÜN	14,97	9,53	180,03	2,15
	60. GÜN	13,36	13,36	145,00	2,13
	90. GÜN	34,20	24,68	280,00	2,96
H11	0. GÜN	6,29	16,17	250,00	1,97
	30. GÜN	36,55	28,33	293,00	2,07
	60. GÜN	24,97	36,51	164,00	1,74
	90. GÜN	14,21	12,13	101,00	0,93
H12	0. GÜN	22,54	14,70	193,80	1,67
	30. GÜN	27,75	10,47	160,00	1,91
	60. GÜN	21,15	18,48	246,47	2,41
	90. GÜN	-	-	-	-
H13	0. GÜN	46,95	48,15	93,02	0,61
	30. GÜN	21,23	28,69	218,40	0,72
	60. GÜN	-	-	-	-
	90. GÜN	-	-	-	-
H14	0. GÜN	21,36	72,10	173,10	0,50
	30. GÜN	132,50	79,50	249,40	1,13
	60. GÜN	-	-	-	-
	90. GÜN	-	-	-	-
H15	0. GÜN	35,40	24,35	157,00	1,22
	30. GÜN	49,11	9,81	170,00	2,45
	60. GÜN	18,11	16,06	30,19	0,55
	90. GÜN	-	-	-	-

Tablo 4.4 Sağ Kalanlardan CD14 MFI, CD15 MFI, PMN-MDSC MFI, M- MDSC MFI, WBC, Nötrofil, Monosit, Lenfosit, Trombosit, Kimerizm Parametrelerinin Zamana Göre Karşılaştırma Sonuçları

DEĞİŞKEN	ZAMAN				<i>p</i>
	0 (n=11)	30 (n=11)	60 (n=11)	90 (n=11)	
CD14/MFI	14.8(11.4-90.5)	21.7(15.7-36.5)	25.0(18.2-71.3)	104.9(34.2-143.0)	0.183
CD15/MFI	30.4(23.4-74.8)	46.9(28.3-99.9)	61.3(30.3-86.3)	43.5(18.9-88.9)	0.896
PMN-MDSC/MFI	147.3(23.4-250.0)	201.6(151.6-352.0)	189.2(145.0-242.0)	191.4(173.4-293.8)	0.071
M-MDSC/MFI	1.4(0.9-1.8) ^a	2.0(1.8-2.6) ^b	2.1(1.2-2.3) ^{ab}	1.7(0.8-2.9) ^{ab}	0.039
WBC(10³/μl)	3.3(1.8-4.9)	3.9(3.5-4.9)	3.3(2.8-5.8)	5.3(3.3-5.7)	0.183
NÖTROFİL (10³/μl)	1.8(1.1-3.2)	3.0(1.8-3.4)	1.7(1.3-4.0)	3.5(1.8-3.7)	0.281
MONOSİT (10³/μl)	0.6(0.5-1.1)	0.5(0.4-0.6)	0.4(0.3-0.6)	0.5(0.3-0.7)	0.409
LENFOSİT (10³/μl)	0.5(0.3-0.7) ^a	0.8(0.5-1.1) ^{ab}	1.1(0.9-1.4) ^b	0.9(0.7-1.2) ^{ab}	0.010
TROMBOSİT (10³/μl)	97.0(42.0-161.0)	126.0(111.0-159.0)	143.0(121.0-186.0)	154.0(115.0-177.0)	0.689
KİMERİZM(%)	99.8(94.0-100.0)	100.0(100.0-100.0)	100.0(100.0-100.0)	100.0(99.2-100.0)	0.060

Veriler ortanca (1. çeyrek – 3. çeyrek) olarak ifade edilmiştir. Aynı satırda yer alan aynı harfler zamanlar arası benzerliği, farklı harfler zamanlar arası farklılığı ifade etmektedir.

CD14/MFI, CDF15/MFI, G-MDSC, WBC, nötrofil, monosit, trombosit ve kimerizm değişkenlerinin 0, 30, 60 ve 90. gün ölçüm değerleri zamana göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$). M-MDSC ve lenfosit değişkenlerinin 0, 30, 60 ve 90. gün ölçüm değerleri zamana göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). M-MDSC değişkeninde 30. gün ölçümünün ortanca değeri 0. gün ölçümünün ortanca değerinden anlamlı düzeyde yüksek olduğu gözlenmiştir. Lenfosit değişkeninde 60. gün ölçümünün ortanca değeri 0. gün ölçümünün ortanca değerinden anlamlı düzeyde yüksek olduğu gözlenmiştir. Kimerizm değişkeninde 0.,30.,60. ve 90. Günlerin ait ortanca değeri 100 olarak bulunmuştur.

Tablo 4.5 GVHD Değişkenine Göre Belirlenen Parametrelerin Zamana Göre Karşılaştırma Sonuçları

DEĞİŞKENLER	GVHD		P*
	Gelişen	Gelişmeyen	
CD14/MFI			
0	21.7(11.4-46.9)	16.8(6.3-159.9)	0.859
30	36.8(21.2-132.5)	21.7(7.2-80.5)	0.129
60	18.1(15.5-119.9)	24.9(13.7-200.1)	0.573
90	108.2(74.5-141.9)	104.9(14.2-257.8)	0.999
p	0.494	0.392	
CD15/MFI			
0	48.1(15.3-79.4)	30.1(14.7-85.1)	0.859
30	38.0(9.8-107.6)	42.2(9.5-108.6)	0.953
60	66.2(16.1-87.4)	46.3(13.4-93.3)	0.692
90	69.4(43.5-95.2)	24.7(12.1-111.4)	0.436
p	0.896	0.954	
PMN-MDSC/MFI			
0	169.8(93.0-355.0)	141.0(5.3-297.0)	0.513
30	249.4(170.0-446.0)	171.6(101.8-352.0)	0.075
60	216.8(30.2-242.0)	177.0(82.6-374.0)	0.811
90	130.7(35.4-226.0)	191.4(101.0-377.2)	0.436
p	0.308	0.115	
M-MDSC/MFI			
0	0.8(0.5-1.2)	1.6(0.1-2.7)	0.028
30	1.2(0.7-2.6)	2.0(1.1-2.9)	0.440
60	1.1(0.5-2.3)	2.1(0.7-3.3)	0.287
90	1.0(0.8-1.3)	1.9(0.7-3.0)	0.327
p	0.145	0.145	
WBC(10³/μl)			
0	4.9(3.7-11.1)	3.0(1.4-7.7)	0.075
30	5.8(3.9-8.3)	4.2(2.9-6.7)	0.129
60	2.7(1.7-5.8)	3.5(2.7-8.9)	0.287

90	4.3(3.3-5.3)	5.3(3.5-11.7)	0.999
p	0.896	0.145	
NÖTROFİL(10³/μl)			
0	3.2(2.3-7.9)	1.6(0.9-4.8)	0.055
30	4.2(1.7-6.9)	3.0(1.8-4.3)	0.440
60	1.2(1.2-4.0)	1.7(1.2-6.8)	0.217
90	3.0(2.5-3.6)	3.5(1.2-10.8)	0.999
p	0.896	0.268	
MONOSİT(10³/μl)			
0	1.3(0.6-2.6)	0.6(0.2-2.0)	0.075
30	0.5(0.4-0.9)	0.5(0.2-1.2)	0.513
60	0.2(0.2-0.6)	0.4(0.1-0.8)	0.371
90	0.6(0.3-0.8)	0.5(0.3-1.1)	0.582
p	0.308	0.706	
LENFOSİT(10³/μl)			
0	0.6(0.0-0.7)	0.5(0.2-2.0) ^a	0.953
30	0.9(0.4-1.6)	0.7(0.2-1.7) ^{ab}	0.310
60	1.1(0.4-1.2)	1.2(0.6-1.8) ^b	0.469
90	0.7(0.5-1.0)	0.9(0.2-2.0) ^{ab}	0.727
p	0.112	0.013	
TROMBOSİT(10³/μl)			
0	24.0(10.0-237.0)	69.5(15.0-241.0)	0.679
30	48.0(22.0-149.0)	123.5(68.0-296.0)	0.055
60	121.0(10.0-143.0)	135.0(76.0-237.0)	0.217
90	143.0(131.0-155.0)	154.0(23.0-248.0)	0.999
p	0.145	0.145	

Veriler, Ortanca (1. Çeyrek-3.çeyrek) olarak ifade edilmiştir.

p^{*} , gruplar arasındaki anlamlılığı ifade etmektedir.

p , zamanlar arasındaki anlamlılığı ifade etmektedir.

Aynı sütunda yer alan aynı harfler zamanlar arası benzerliği, farklı harfler zamanlar arası farklılığı ifade eder.

CD14 MFI, CD15 MFI, PMN-MDSC, WBC, Nötrofil, Monosit, Trombosit değişkenlerinin GVHD gelişen ve gelişmeyen gruplarda 0, 30, 60 ve 90. gün ölçüm değerleri zamana (0.gün, 30.gün, 60.gün ve 90.gün) göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$). CD14 MFI, CD15 MFI, PMN-MDSC, WBC, Nötrofil, Monosit, Trombosit değişkeninin 0, 30, 60 ve 90. gün ölçümlerinin ortanca değerleri GVHD değişkeninin alt grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$).

M-Mdsc değişkeninin 0, 30, 60 ve 90. gün ölçümlerinin ortanca değerleri GVHD değişkeninin alt grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur($p<0.05$). GVHD gelişmeyen grupta 0.gün ölçümünün ortanca değeri, GVHD gelişen grupta 0.gün ölçümünün ortanca değerinden anlamlı düzeyde yüksek olduğu gözlenmiştir.

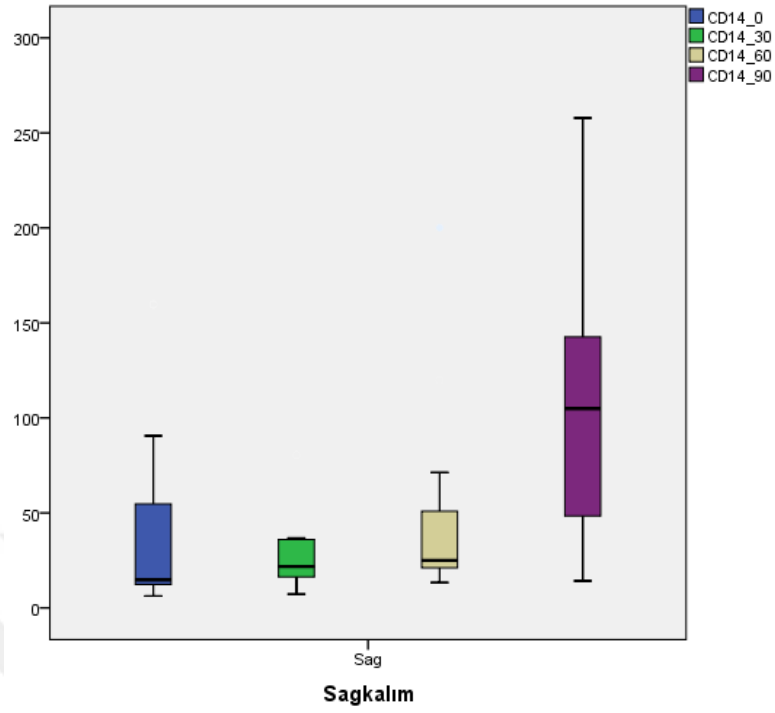
Lenfosit değişkeninin GVHD gelişmeyen grupta 0. 30,60 ve 90. Gün ölçüm değerleri zamana (0.gün, 30.gün, 60.gün ve 90.gün) göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0.05$). GVHD gelişmeyen grupta 60.gün ölçümünün ortanca değeri, GVHD gelişmeyen grupta 0.gün ölçümünün ortanca değerinden anlamlı düzeyde yüksek olduğu gözlenmiştir.

Tablo 4.6 Sağkalım Değişkenine Göre Belirlenen Parametrelerin Tanımlayıcı İstatistikleri

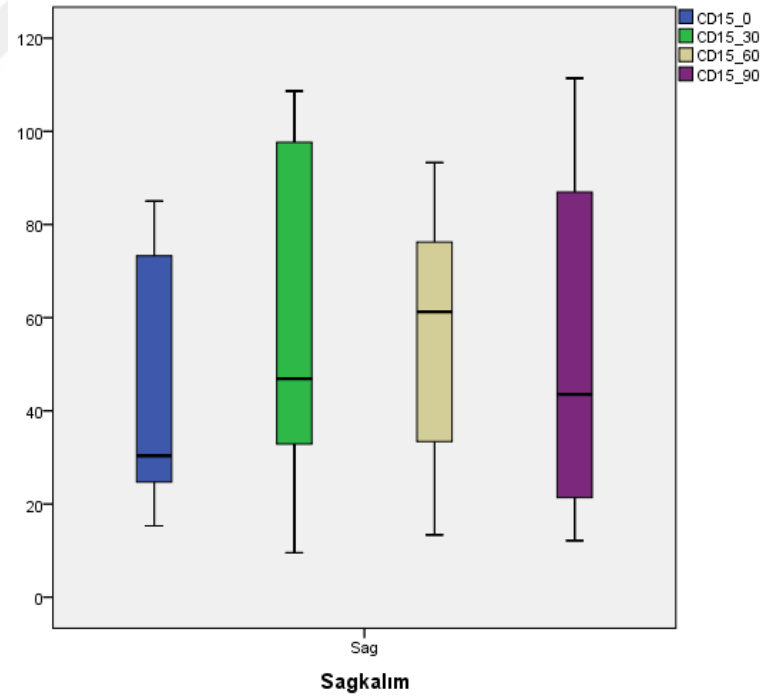
DEĞİŞKENLER	SAĞKALIM	
	Ölü	Sağ
CD14/MFI		
0	35.4(21.4-47.0)	16.5(6.3-159.9)
30	49.1(21.2-132.5)	23.1(7.2-80.5)
60	18.1(18.1-18.1)	24.9(13.4-200.1)
90	-	104.9(14.2-257.8)
CD15/MFI		
0	48.1(24.3-72.1)	30.1(14.7-85.1)
30	28.7(9.8-79.5)	42.4(9.5-108.6)
60	16.1(16.1-16.1)	58.7(13.4-93.3)
90	-	43.5(12.1-111.4)
PMN-MDSC/MFI		
0	157.0(93.0-173.1)	158.6(5.3-355.0)
30	218.4(170.0-249.4)	190.8(101.8-446.0)
60	30.19(30.19-30.19)	203.0(82.6-374.0)
90	-	191.4(35.4-377.2)
M-MDSC/MFI		
0	0.6(0.5-1.2)	1.5(0.1-2.7)
30	1.1(0.7-2.4)	2.0(1.1-2.9)
60	0.5(0.5-0.5)	2.1(0.7-3.3)
90	-	1.7(0.7-3.0)

Veriler, Ortanca (Max-Min) olarak ifade edilmiştir.

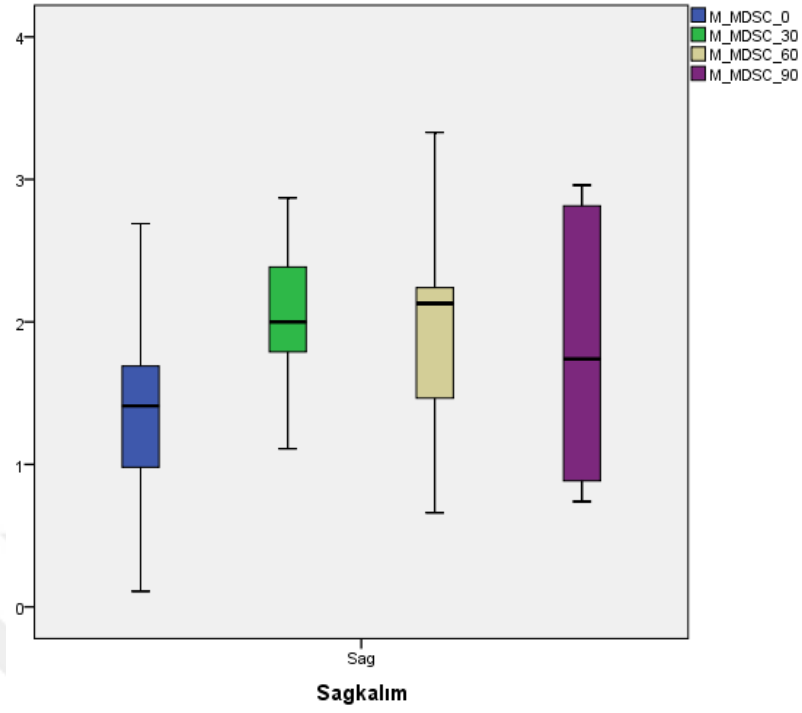
Tablo 4.6’da sağ kalan gelişen grupta CDF14/MFI değişkeninin 0.gün ölçümünün ortanca değeri 16.5, 30.gün ölçümünün ortanca değeri 23.1, 60. gün ölçümünün ortanca değeri 24.9 ve 90. gün ölçümünün ortanca değeri 104.9 olduğu gözlenmiştir. Diğer değişkenler için de ortalama ve standart tanımlayıcı istatistikler Tablo 4.6 da yer almaktadır.



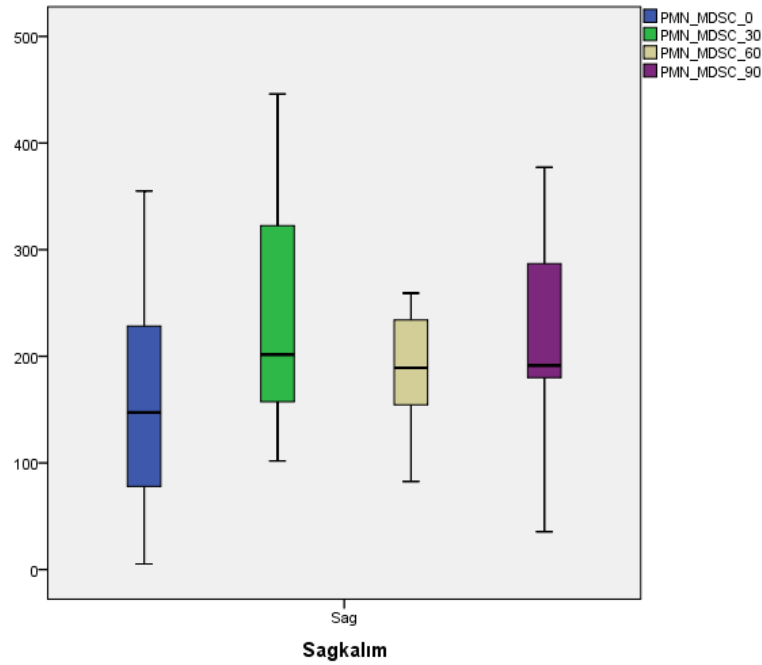
Şekil 4.2 CD14 değişkeninin Sağkalım hastalar için herbir zaman noktasındaki dağılımı



Şekil 4.3 CD15 değişkeninin Sağkalım hastalar için herbir zaman noktasındaki dağılımı



Şekil 4.4 M-MDSC değişkeninin Sağkalan hastalar için herbir zaman noktasındaki dağılımı



Şekil 4.5 PMN-MDSC değişkeninin Sağkalan hastalar için herbir zaman noktasındaki dağılımı

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Allojenik kemik iliği nakli (AKHN), başta lösemi olmak üzere çeşitli hematolojik malignitelerin tedavisinde verici kaynaklı hematopoetik kök hücrelerin kullanıldığı tedavi yöntemidir. Nakil başarısını değerlendirme parametrelerinden birisi de nakil sürecinde belirli aralıklarla yapılan kimerizm ölçümleridir. Çalışmamızda, AKHN yapılan hastalarda donör kaynaklı kök hücre yapılanma (kimerizm) oranı, GVHD ve sağkalım ile miyeloid kökenli baskılayıcı hücreleri arasındaki ilişkinin araştırılması amaçlanmıştır. Çünkü allojenik nakil yapılan hastalarda nakil başarısını güçlendirecek ve kimerizm kayıplarını önleyebilecek yönetilebilir bir parametre yoktur. Hasta grubumuza dahil edilen 15 hastadan engrafmanlarının 0, 30, 60 ve 90.günlerinde takipleri yapılmış ve kanları alınmıştır. $\geq$ % 95 ve üzerinde donör hematopoetik kök hücre kimerizmi başarılı kabul edilmiştir. MDSC hücrelerinin, nakil yapılan hastalarda kimerizm kayıpları oluşmadan MDSC düzeyleri baz alınarak veya takip edilerek erken dönemde bir biyobelirteç olabileceğinden yola çıkarak tasarlanmış bir çalışma olmasına rağmen hastalarımızın kimerizm değişkeninde 0.,30.,60. ve 90. günlerin ait ortanca değeri $\geq$ % 95 ve üzeri olarak bulunduğu için bu hipotezden uzaklaşılarak MDSC hücrelerinin GVHD ve sağkalım üzerine değerlendirilmesi yönünde şekillendirilmiştir. Allojenik hematopoetik kök hücre nakli (AKHN) yapılan hastaların yaklaşık %10-30 kadarında Graft-versus-host hastalığı (GVHD) yıkıcı bir komplikasyon olabilmektedir. Bizim çalışmamızda da Aralık 2017- Eylül 2018 tarihleri arasında belirlediğimiz kriterlere uyan çalışmamıza dahil ettiğimiz AKHN yapılan 15 hastanın 5 tanesinde GVHD gelişmiştir. Graft versus host hastalığında (GVHD) miyeloid hücrelerin artışı gösterilmiştir, ancak miyeloid hücrelerinin düzenleyici rolü veya bu hücrelerin manipüle edilip edilemediği ayrıca bu hücrelerin terapötik olarak uygulanabilip uygulanamadığı henüz tam anlaşılamamıştır. Kanseri, travma ve enfeksiyonun da dahil olduğu immün sistemin baskılandığı durumlarda, miyeloid kökenli baskılayıcı hücreler (MDSCs) kısa sürede artar. Mieloid kökenli baskılayıcı

hücreler (MDSCs) sıklıkla kronik hastalık, inflamasyon ve hatta tümör büyüme artışı (anjyogenez ve metastaz ile ilgili olarak) ile ilişkilendirildiklerinden, bu hücreler kötü sonuçların habercisi (prediktörü) olarak görülebilirler ve varlıkları istenmez. Bu durumun yanı sıra Miyeloid kökenli hücreler, immun yanıtın devreye girmesinde ve artmasında kritik rol oynarlar. Mikro ortamlarındaki değişikliklere oldukça hassas olan miyeloid hücreler doğal bağışıklık sistemindeki ilk savunma hattını oluşturur, bunun sonrasında kazanılmış/uyarılabilen immun cevabı şekillendirir. Buna ilaveten, MDSC hücrelerinin dinamik yanıtı baskılama, bağışıklık patolojisini sınırlama ve böylece içinde bulunduğu konağın sonuçları yıkıcı inflamatuvar hasarı koruma rolü vardır. Sonuç olarak MDSC hücreleri kabaca düzenleyici veya baskılayıcı özellikleri olan birbirlerinden farklı miyeloid kökenli gelişmemiş hücrelerin toplamı olarak tanımlanırlar (Youn ve Gabrilovich, 2010; Murdoch ve ark., 2008). Kemik iliğinden üretilen MDSC'ler başlangıçta lökosit inhibe edici kapasiteye sahip null miyeloid soy hücreleri olarak tanımlanmıştır (Young ve ark., 1997; Seung ve ark., 1995). Çeşitli kanser tipleriyle ilişkili olan MDSC'ler, benzersiz bir mikroçevre ve tümör kaynaklı faktörler nedeniyle yüksek derecede heterojenlik göstermektedir (Talmadge ve Gabrilovich, 2013). MDSC'lerin genişlemesi ve tümör ile ilişkilendirilmesi T hücresi bağışıklığından kaçmayı teşvik etme ve tümör regresyonunu teşvik etmek için klinik olarak hedeflenmiştir (Nagaraj ve ark., 2007; Yang ve ark., 2004). Farelerde, dalak PMN-MDSC lerinin reaktif oksijen türlerinden yüksek miktarda içerdiği ve aktive edilmiş antijen spesifik T hücreleri ile hücre-hücre teması gerektirdiği bulunmuştur, M-MDSC ler ise artan potansiyelde NO ve ARG1 ifade ettiği ve spesifik olmayan şekilde baskıladığı belirtilmiştir. Tümörle etkileşen MDSC'lerin aktif T hücrelerini baskılamak için lokal olarak etki ettiği öne sürülmüştür. Çeşitli ilgili biyokimyasal ve moleküler parametreler anti-inflamatuvar cevaplarını sağlayan hücre yüzeyi antijenlerin ve sitokinlerin yanı sıra, inflamatuvar ve stres-cevap reaksiyonları ile ilişkili transkripsiyon faktörlerin düzenlenmesini içerir (Bronte ve ark., 2016). Transplantasyon tepkileri bağlamında faaliyette bulunan yaygın baskılayıcı mekanizmalar; uyarılabilen NO ve iNOS, HO-1, NOX2, IFN- γ , TGF- β leri içermekle beraber L-arginin ve Sistein (Lees ve ark., 2011) gibi temel amino asitlerin tükenmesini de sağlar ve Treg hücrelerin artışına sebep olur. Miyeloid hücrelerin düzenleyici rolü kansere karşı immun terapi çalışmalarını engellerken bu immün baskılayıcı özellikler, otoimmünite ve AKHN tedavisi için faydalı olabilir (Brent ve ark., 2017).

Nakil sonrası miyeloid hücrelerin hızlı genişlemesi göz önüne alındığında, doğuştan gelen bağışıklık sisteminin bu üyelerinin, nakil sonrası erken bağışıklık ortamına önemli katkıları olabileceği düşünülerek Q Guan ve ark yaptığı bir çalışmada Allojenik hematopoetik kök hücre nakli (AKHN) sonrası MDSC hücrelerin iyileşme ve işlevinin kinetiğini değerlendirmek için, AKHN'den sonraki ilk 3 ayda nakil uygulanan 26 hasta 6 zaman noktasında incelenmiştir (Guan ve ark., 2015). Her iki MDSC alt grubunun, T ve B lenfositlerin iyileşmesinden çok önce, 2-4 hafta arasında iyileştiği görülmüştür. MDSC hücrelerinin Th1 hücrelerini baskıladıkları ve Treg gelişimini teşvik ettiği gösterilmiştir. Sonuç olarak, fonksiyonel MDSC lerin AKHN'den sonra erken dönemde nakil sonrası düzenleyici hücre popülasyonuna katkıda bulunduğu görülmüştür. Başarılı allojenik nakilden sonra, monositler geri kazanılan ilk hücrelerdendir, bunu daha sonra granülositler, trombositler izler. Konjuge immün yeniden yapılandırma ile ilişkili olarak lenfositlerin genişlemesi, AKHN sonrası 100 gün sonrasına kadar büyük ölçüde gerçekleşmez (Storek ve ark., 2001; Storek ve ark., 2008). Yapılan çalışmalarda, hem M-MDSC'lerin hem de PMN-MDSC'lerin, AKHN'den sonraki ilk ayda, M-MDSC'lerin PMN-MDSC'lerden 1-2 hafta önceki iyileşme ile düzeldiği gösterilmiştir. Bu, AKHN sonrası hastalarda monositlerin granülositlerden daha erken iyileşme bilgisi ile tutarlıdır. Her iki MDSC alt grubunun geri kazanılması, miyeloablatif veya nonmiyeloablatif şartlanma rejiminin kullanılmasına bakılmaksızın benzer bulunmuştur. Bu çalışmada özellikle AKHN'de PMN-MDSC'lerin olası önemli rollerine dikkat çekilmiştir. PMN-MDSC'lerin lenfosit proliferasyonunda M-MDSC'lerden daha güçlü baskılayıcı fonksiyonlara sahip olduğunu, PMN-MDSC'lerin yüzdesi ve sayısını, M-MDSC'lerden anlamlı olarak daha yüksek bulmuşlardır. PMN-MDSC'lerin diğer immün hücrelerle daha güçlü pozitif korelasyon gösterdiğini ve PMN-MDSC'ler akut GVHD gelişimini öngörebileceği belirtilmiştir (Storek ve ark., 2008).

Vendramin ve ark.nın yaptığı bir çalışmada hematopoetik kök hücreleri mobilize etmek için kullanılan granülosit koloni uyarıcı faktör (G-CSF) uygulamasının, ilişkisiz 60 donörün periferik kan kök hücre greftlerindeki MDSC'lerin sıklığını etkileyip etkilemediği analiz edilmek istenmiştir (Vendramin ve ark., 2015). Ek olarak, periferik kan kök hücre greftlerindeki donör MDSC içeriğinin, allojenik kök hücre nakli yapılan hastalarda akut GVHD oluşumunu etkileyip etkilemediğini değerlendirilmiştir. G-CSF nin, monositik MDSC'lerin fenotipini gösteren miyeloid hücrelerin genişlemesini

indüklediği, (LinDüşük/negatif HLA-DR - CD11b + CD33 + CD14 +) alloreaktif T hücrelerini in vitro olarak baskılayabildiği ve bu nedenle MDSC tanımını karşıladığı şeklinde yorumlanmıştır. Monositik MDSC lerin, akut GVHD'yi öngören greft parametresi olarak belirlenebileceği tartışılmıştır. Her ne kadar akut GVHD'den koruyan tam monositik MDSC greft dozunu doğrulamak için daha büyük örneklem büyüklüğünü içeren ileriye dönük çalışmalara ihtiyaç duyulduğunu belirtseler de G-CSF modülasyonunun, akut GVHD'nin önlenmesi için monositik MDSC greft hücre dozlarını etkilemek için kullanılabileceği kuvvetle önerilmiştir. Çalışmanın sonuçları, donör M-MDSC'lerin transplant sonrası erken immün baskılanmasında aGVHD'den sorumlu alloreaktif T hücrelerinin düzenlenmesinde rol oynayabileceğini göstermiştir. Ayrıca infüze edilen MDSC sayısının nüks oranını etkilemediği belirtilmiştir.

AKHN'de GVHD gelişen hastalarda,IDO aracılığı ile geliştirilen baskılayıcı fonksiyonları ile CD14⁺ HLA-DR^{-low} M-MDSC'lerin arttığı bildirilmiştir (Mougiakakos ve ark., 2013). An Borim ve arkadaşları, GVHD hastalarındaki M-MDSC'lerin CD1d ve CD226 ifade ettiğini ve CD1d + M- MDSC'nin güçlü bir immün baskılayıcı etkisi olduğunu göstermiştir. (An ve ark., 2018) MDSC alt grupları, AKHN'den 2-4 hafta sonra geri kazanılmıştır; T hücresi proliferasyonunu baskılamıştır ve Treg hücre gelişimini desteklemiştir (Guan ve ark., 2015). G-CSF'nin MDSC indüksiyonunda önemli bir rol oynadığı, M / PMN / e-MDSC'lerin, G-CSF tedavisinden sonra kemik iliği ve donörün periferik kanında arttığı ve M / e-MDSC'lerin, akut GVHD gelişmesinde düşük risk ile ilişkili önemli faktörler olduğu belirtilmiştir (Lv ve ark., 2015). Fare GVHD modellerinde yapılan önceki çalışmalar bu fikri desteklemektedir. Miyeloid hücrelerin GVHD'deki düzenleyici rolünü araştırmak için, fare GVHD modeli oluşturulmuştur (Sprangers ve ark., 2011). Hem M-MDSC hem de PMN-MDSC alt gruplarının, in vitro ve in vivo olarak alloreaktif T hücresi proliferasyonunu baskıladığı gösterilmiştir. Bu sonuçlar toplu olarak, MDSC'lerin GVHD'yi baskılamak için AKHN'de immün düzenleyici roller oynayabileceğini öne sürmüştür (Yang ve ark., 2018).

Greft kaynağı, donör kaynağı, HLA uyumluluğu ve GVHD profilaksisi gibi GVHD insidansını etkileyen çeşitli faktörler vardır (Lu ve ark., 2006; Rubio ve ark., 2016). Her greft kaynağının kendi bileşenleri vardır ve GVHD'nin insidansını ve ciddiyetini etkileyen farklı immünolojik özellikler gösterir (Chaidos ve ark., 2012; Eapen ve ark.,

2010; Eapen ve ark., 2011). Daha önce belirttiğimiz gibi G-CSF, greft içerikleri üzerinde modülasyon dahil olmak üzere çeşitli mekanizmalarla immün toleransı indüklemektedir (Rutella ve ark., 2005; Zeng ve ark., 1997). Geçtiğimiz yirmi yılda, uyarılmamış kemik iliği greftleri nakillerin optimal kaynağı olarak kullanımını yitirdi, çünkü GCF uyarılmış periferik kan greftlerinde hematopoetik rekonstrüksiyon daha hızlı olmaktadır. Bununla birlikte, G-PBSC greftleri uyarılmamış BM greftleriyle karşılaştırıldığında artan GVHD yetersizliğine sahiptir. Son zamanlarda, bazı çalışmalar G-BM greftlerinin hematopoetik rekonstrüksiyona benzer olduğunu ve G-PBSC greftleriyle karşılaştırıldığında daha az cGVHD olduğunu göstermiştir. Serody ve diğ. (Serody ve ark., 2000) ve Morton ve diğ. (Morton ve ark., 2001) G-BM greftlerinin sırasıyla daha az cGVHD ve aGVHD ve G-PBSC greftleriyle karşılaştırılabilir engrafman gösterdiğini bildirmiştir.

MDSC'ler güçlü bir immünosüpresif aktiviteye sahip heterojen bir popülasyondur (Gabrilovich ve Nagaraj, 2009). Son zamanlarda, çeşitli deneysel ve klinik kanıtlar, MDSC'lerin GVHD'de immün düzenleyici bir rol oynayabileceğini göstermiştir. Highfill ve diğ. (Highfill ve ark., 2010), MDSC'lerin benimsenmiş transferinin GVHD'nin ciddiyetini ve mortalitesini inhibe edebileceğini gösterdi. Fan Qian ve arkadaşları farklı primer hematolojik malignitesi olan 101 hastanın dahil edildiği çalışmada, 49'u Kemik iliği kök hücre kaynaklı, 52 si periferik kan kök hücre kaynaklı nakil yapılan hastalarla çalışma planladı (Fan ve ark., 2017). Bu çalışmanın sonuçları Highfill ve ark. (Highfill ve ark., 2010) ve Vendramin ve ark. (Vendramin ve ark., 2015) gibi MDSC infüzyonlarının negatif GVHD insidansı ve ciddiyeti ile korele olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca, G-BM greftlerinin, düşük GVHD'si ile ilişkili olabilecek, belirgin bir şekilde daha yüksek MDSC'ler ile ilişkili olduğunu bulmuşlardır. GVL etkisinin esas olarak T hücre aktivitesine bağlı olduğu bilinmektedir. Bu nedenle, G-BM greftlerindeki yüksek MDSC içeriğinin, muhtemel aşağı regüle edilmiş T hücresi yanıtları nedeniyle lösemi nüks oranını artırıp artırmadığı sorusunu akla getirmektedir. Hayvan modelleri, MDSC'lerin benimsenen transferinin, GVT etkilerinden ödün vermeden GVHD'nin başarılı bir şekilde kontrol edilmesine yol açabileceğini göstermiştir (MacDonald ve ark., 2005). Bu çalışmada, sonuçlar G-BM ve G-PBSC grubunun nüksünde anlamlı bir fark olmadığını ve infüzyon edilen MDSC sayısı ile lösemi nüksü arasında anlamlı bir ilişki olmadığını ortaya koymuştur. Benzer

şekilde, Vendramin ve ark. infüze edilen M-MDSC'lerin sayısının tümör nüksü ile korele olmadığını bildirmiştir. Ek olarak, nakil sonrası ilk 100 gün içindeki enfeksiyonlar da karşılaştırılmıştır, iki grup arasında anlamlı bir fark gösterilememiştir. Bu arada, daha yüksek MDSC içeriğinin enfeksiyon oranını artırmadığını da belirtilmiştir. Bu çalışmanın küçük örneklem büyüklüğü göz önüne alındığında, daha fazla izlemenin yanı sıra daha büyük klinik çalışmaların yapılması gerektiği belirtilmiştir. Ek olarak BM greftleri, çeşitli immün hücreler üzerinde immünomodülatör etki gösteren mezenkimal kök hücreler (MSC) gibi stromal hücreler içerir. G-BM greftlerindeki stromal hücrelerin G-PBSC greftlerine kıyasla daha düşük GVHD ile ilişkili olup olmadığı daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyar. Sonuç olarak; G-BM greftleri, G-PBSC greftlerine kıyasla daha yüksek bir MDSC içeriği ile ilişkili daha az GVHD'ye yol açar ve MDSC'ler GVHD'de immün düzenleyici rolü oynayabilir.

Bizim çalışmamızda 100 günlük sağkalımı tamamlayan hastalarda, M-MDSC değişkeninde engrafmanın e30. gün ölçümünün ortanca değeri engrafmanın gerçekleştiği e0. gün ölçümünün ortanca değerinden anlamlı düzeyde yüksek olduğu gözlenmiştir ($p<0.005$). Aynı zamanda Lenfosit değişkeninde e60. gün ölçümünün ortanca değerinin e0. gün ölçümünün ortanca değerinden anlamlı düzeyde yüksek olduğu gözlenmiştir.

GVHD gelişen ve gelişmeyen grupta parametreler zamana göre karşılaştırıldığında, M-MDSC değişkeninin 0, 30, 60 ve 90. gün ölçümlerinin ortanca değerleri GVHD değişkeninin alt grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0.05$). GVHD gelişmeyen grupta 0.gün ölçümünün ortanca değeri, GVHD gelişen grupta 0.gün ölçümünün ortanca değerinden anlamlı düzeyde yüksek olduğu gözlenmiştir.

Lenfosit değişkeninin GVHD gelişmeyen grupta 0. 30,60 ve 90. Gün ölçüm değerleri zamana (0.gün, 30.gün, 60.gün ve 90.gün) göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0.05$). GVHD gelişmeyen grupta 60.gün ölçümünün ortanca değeri, GVHD gelişmeyen grupta 0.gün ölçümünün ortanca değerinden anlamlı düzeyde yüksek olduğu gözlenmiştir.

PMN-MDSC'nin e30, monosit e0, wbc e0, trombosit e30 değerleri arasında $p<0.05$ e yakın fakat istatistik olarak anlamlı fark çalışmamızda belirleyemedik çünkü GVHD alt

grupları için yeterli örneklem sayısı olmadığından olabileceğini düşünüyoruz. Örneklem sayısını arttırdığımızda anlamsız çıkan sonuçların anlamlıya dönebileceği veya anlamlı dereceye yaklaşabileceği ihtimali göz önünde bulundurulmalıdır.

Transplant sonrası erken bağışıklık ortamının, MDSC'leri genişletmek ve aktive etmek için gerekli elementlere sahip olduğunu ve transplant sonrası hastalarda MDSC geri kazanımının ve fonksiyonunun, transplant sonrası büyüme faktörüne ve proinflamatuvar sitokinlere bağlı olduğunu varsayıyoruz.

Bu nedenle, transplant sonrası büyüme faktörü uygulamasına göre klinik uygulamadaki farklılıklar, transplant sonrası ortamdaki MDSC'nin hem sayısını hem de fonksiyonunu etkileyebilir ve hematopoetik büyüme faktörü kullanımı ile GVHD'deki farklılıklar için bir açıklama olabilir. Seçici olarak nakil sonrası MDSC aktivitesinin arttırılması - sitokin uygulaması veya hücresele infüzyon yoluyla - GVL etkisini korurken GVHD'nin önlenmesi / tedavisi için bir taktik olabilir.

Miyeloid kökenli baskılayıcı hücreler, salgıladıkları sitokinler aracılığıyla immunsupresyon ve anti-inflamatuvar etki gösterirler. Periferik kanda saptanamayacak kadar az olan bu hücreler G-CSF uyarısı ile titre edilen düzeylere çıkarılabilir. Bu hücrelerin invitro ortamlarda üretilmeleri de mümkündür. İmmatür formdaki bu hücrelerin biyolojisi aydınlatılarak işlevsellikleri ve terapötik kullanım alanları tespit edilebilir.

MDSC ile yapılan çalışmalara yoğun bir ilgi olmasına karşılık, mevcut çalışmalardaki fenotipik tiplendirmelerde farklılıklar olduğu görülmüştür. Bu engeli aşmak için , kanser immünoterapi dernek şemsiyesi altında kanser bağışıklık rehber programı, MDSC fenotiplemeyi uyumlulaştırmayı amaçlayan bir yeterlilik paneli programını koordine etmiştir.

Bu farklılıkları ortadan kaldırmak için 2016 yılında 23 laboratuvarın ortak katılımıyla MDSC' leri her biri kendi içinde birden çok popülasyon barındıran, üç ana gruba ayırmışlardır (Mandrizzato ve ark., 2016). Sonuçlar, birden fazla merkezde MDSC fenotiplemesindeki uyumluluk/standardizasyon önlemleri uygulanmadığında yüksek değişkenliği gösterdiğini tespit etmişlerdir. Bu nedenle daha sonraki çalışmalar için laboratuvar içi ve laboratuvarlar arası varyansı değerlendirmek ve dolaşımdaki

MDSC'lerin fenotipik tanımlaması için sağlam bir marker kombinasyonunu ve algoritmanın tanımlanması gerektiğini öneriyoruz.

Sonuç olarak, Akut GVHD'nin tedavisi ve önlenmesinde önemli gelişmeler olsa da, ölüm oranları hala yüksektir; buna ilaveten, kronik GVHD acil dikkat gerektiren başka bir dizi zorluk daha sunmaktadır. GCSF'nin indüklediği kök hücre mobilizasyonunun MDSC alımının genişlemesiyle ilişkili olduğu, MDSC'lerin GVHD'nin iyileştirilmesi için daha fazla geliştirilebilmesi ihtimalini ortaya çıkardı. Takip eden çalışmalar bu yaklaşımı doğrulamıştır ve MDSC'nin patolojiyi sınırlamada kritik bir bağışıklık düzenleyici faktör olarak kurgulanmasına yardımcı oldu. Özellikle miyeloid hücrelerin ve MDSC'nin birçok özelliğinin, şekillendirilebilir niteliklerinin bir sonucu olarak çözilememiş olarak kalmasına rağmen, oynayabilecekleri yol aşıkardır. Böylece kemik iliği nakli yapılan hastalarda sağkalım sürelerine olumlu katkıda bulunulması ve dolaylı olarak da böylesi pahalı tedavinin korunması ile ekonomik kayıpları önleyeceği öngörülmektedir. Hücresel terapi çeşitli şekillerde klinik uygulamalara doğru ilerledikçe, miyeloid hücre tedavisinin vaat ettikleri klinik çalışanların repertuarında önemli bir bileşen olacaktır.

6. KAYNAKLAR

- 66- Movahedi K, Guilliams M, Van den Bossche J. Identification of discrete tumor-induced myeloid-derived suppressor cell subpopulations with distinct T cell-suppressive activity. *Blood*. 2008;111:4233-4244.
- Alan H.B. Wu. *Labaratuvar Testleri Klinik Klavuzu*, Emerk K. Güneş Tıp Kitap Evleri, İstanbul, 2011;1636-1695
- An B., Lim, J. Y. Jeong S. et al., “CD1d is a novel cell-surface marker for human monocytic myeloid-derived sup-pressor cells with T cell suppression activity in peripheral blood after allogeneic hematopoietic stem cell transplanta-tion,” *Biochemical and Biophysical Research Communica-tions*, vol. 495, no. 1, pp. 519–525, 2018
- Anderson D,Billingham RE,Lampkin GH,et al.The use of skin-grafting to distiduish between monzygotic and dizygotic twins in cattle.*Heredity* 1951;5:379.
- Angulo, I., Rodriguez, R., Garcia, B., Medina, M., Navarro, J.,Subiza, J.L. (1995) Involvement of nitric oxide in bone marrow-derived natural suppressor activity. Its dependence on IFN-gamma. *J Immunol*, 155 (1), 15-26.
- Antin JH, Childs R, Filipovich AH, Giralt S, Mackinnon S, Spitzer T, et al. Establishment of complete and mixed donor chimerism after allogeneic lymphohematopoietic transplantation: recommendations from a workshop at the 2001 Tandem Meetings of the International Bone Marrow Transplant Registry and theAmerican Society of Blood and Marrow Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2001;7(9):473-85.
- Arat M. Özçelik T. *Allojenik Hematopoetik Kök Hücre Transplantasyonu Endikasyonları*, *Türkiye Klinikleri Hematology*, 2018;11(1):1-7

- Arpinati, M., Green, C. L., Heimfeld, S., Heuser, J. E., Anasetti, C. (2000) Granulocyte-colony stimulating factor mobilizes T helper 2-inducing dendritic cells. *Blood* 95, 2484–2490.
- Aschan J. Allogeneic haematopoietic stem cell transplantation: current status and future outlook. *British Medical Bulletin* 2006; 77,78:23-36.
- Auletta JJ, Lazarus HM. Immune restoration following hematopoietic stem cell transplantation: an evolving target. *Bone Marrow Transplant* 2005;35(9):835-57.
- Avcılar H. Saraymen B. Özturan O. Ö. Köker M. Y. Embriyonik Kök Hücreler ve İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücreler, derleme *Asthma Allergy Immunol* 2018;16:1-10
- Bader P, Beck J, Frey A et al. Serial and quantitative analysis of mixed hematopoietic chimerism by PCR in patients with acute leukemias allows the prediction of relapse after allogeneic BMT. *Bone Marrow Transplant* 1998; 2: 487–495.
- Bensinger WI, Martin PJ, Storer B, et al. Transplantation of the bone marrow compared with peripheral blood cells from HLA-identical relatives in patients with hematologic cancers. *New Engl. J. Med.* 2001;344:175-181
- Bensinger, W. I., Martin, P. J., Storer, B., Clift, R., Forman, S. J., Negrin, R., Kashyap, A., Flowers, M. E., Lilleby, K., Chauncey, T. R., Storb, R., Appelbaum, F. R. (2001) Transplantation of bone marrow as compared with peripheral-blood cells from HLA-identical relatives in patients with hematologic cancers. *N. Engl. J. Med.* 344, 175–181
- Bingisser, R.M., Tilbrook, P.A., Holt, P.G., Kees, U.R. (1998) Macrophage-derived nitric oxide regulates T cell activation via reversible disruption of the Jak3/STAT5 signaling pathway. *J Immunol*, 160 (12), 5729-5734.
- Blazar BR, Murphy WJ, Abedi M. Advances in graft-versus-host disease biology and therapy. *Nat Rev Immunol.* 2012;12:443-458.

- Bowen JL, Olson JK. Innate immune CD11b+Gr-1+ cells, suppressor cells, affect the immune response during Theiler's virus-induced demyelinating disease. *J Immunol.* 2009; 183:6971–80. [PubMed: 19890055]
- Brent H. Koehn and Bruce R. Blazar. Role of myeloid-derived suppressor cells in allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Journal Leukocyte Biology*, 2017;102.
- Bronte V. Myeloid-derived suppressor cells in inflammation: uncovering cell subsets with enhanced immunosuppressive functions. *Eur J Immunol.* 2009;39:2670-2672.
- Bronte, V., Brandau, S., Chen, S.-H., Colombo, M. P., Frey, A. B., Greten, T. F., Mandruzzato, S., Murray, P. J., Ochoa, A., Ostrand-Rosenberg, S., Rodriguez, P. C., Sica, A., Umansky, V., Vonderheide, R. H., Gabrilovich, D. I. (2016) Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards. *Nat. Commun.* 7, 12150.
- Bronte, V., Zanoello, P. (2005) Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. *Nat Rev Immunol*, 5 (8), 641-654.
- Can A. Kök Hücre Biyolojisi Türleri ve Tedavide Kullanımları, Akademisyen Tıp Kitabevi, Ankara, 2014:338-342
- Chaidos A, Patterson S, Szydlo R, Chaudhry MS, Dazzi F, Kanfer E, McDonald D, Marin D, Milojkovic D, Pavlu J, et al. Graft invariant natural killer T-cell dose predicts risk of acute graft-versus-host disease in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood.* 2012;119(21):5030–6.
- Choi SJ, Lee KH, Lee JH, et al. Prognostic value of hematopoietic chimerism in patients with acute leukemia after allogeneic bone marrow transplantation: a prospective study. *Bone Marrow Transplant*, 2000;26(3):327-32.
- Chou H, Hsieh C, Yang H, et al. Hepatic stellate cells regulate immune response by way of induction of myeloid suppressor cells. *Hepatology.* 2011;53:1007-1019.

- Cohen, J. L., Trenado, A., Vasey, D., Klatzmann, D., Salomon, B. L. (2002) CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: new therapeutics for graft-versus-host disease. *J. Exp. Med.* 196, 401–406.
- Condamine T, Gabrilovich DI. Molecular mechanisms regulating myeloid-derived suppressor cell differentiation and function. *Trends Immunol.* 2011;32:19-25.
- Corzo, C.A., Cotter, M.J., Cheng, P., Cheng, F., Kusmartsev, S., Sotomayor, E. ve diğerleri. (2009) Mechanism regulating reactive oxygen species in tumor-induced myeloid-derived suppressor cells. *J Immunol*, 182 (9), 5693-5701.
- Cripps JG, Gorham JD. MDSC in autoimmunity. *Int Immunopharmacol.* 2011;11:789-793.
- Crough, T., Nieda, M., Nicol, A. J. (2004) Granulocyte colony-stimulating factor modulates alpha-galactosylceramide-responsive human Valpha24+Vbeta11+NKT cells. *J. Immunol.* 173, 4960–4966
- Cuenca AG, Delano MJ, Kelly-Scumpia KM, Moreno C, Scumpia PO, Laface DM, et al. A Paradoxical Role for Myeloid Derived Suppressor Cells in Sepsis and Trauma. *Mol Med.* 2010
- Deeg HJ, Klingemann HG, Phillips GL, A Guide to Bone Marrow Transplantation Springer Verlag, 1992 ppl 31-42.
- Delano MJ, Scumpia PO, Weinstein JS, Coco D, Nagaraj S, Kelly-Scumpia KM, et al. MyD88- dependent expansion of an immature GR-1+CD11b+ population induces T cell suppression and Th2 polarization in sepsis. *J Exp Med.* 2007
- Deniz G. Demirel Yanıkkaya G. Akan Hücre Ölçer, Yelken Ajans Yayıncılık, İstanbul, 2014:32
- Deshane J, Zmijewski JW, Luther R, et al. Free radical-producing myeloid-derived regulatory cells: potent activators and suppressors of lung inflammation and airway hyperresponsiveness. *Mucosal Immunol.* 2011;4:503-518
- Diaz-Montero CM, Salem ML, Nishimura MI, Garrett-Mayer E, Cole DJ, Montero AJ (2009) Increased circulating myeloidderived suppressor cells correlate with clinical cancer stage, metastatic tumor burden, and doxorubicin-

cyclophosphamide chemotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 58(1):49–59. doi:10.1007/s00262-008-0523-4

Dölen Y., Meme Kanseri Modelinde Miyeloid Kökenli Hücrelerin İmmün Kompartmanlardaki Dağılımının Anti-Tümör Yanıtlara Yansıması, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2013:136

Dubovsky J, Daxberger H, Fritsch G, Printz D, Peters C, Matthes S, et al. Kinetics of chimerism during the early post-transplant period in pediatric patients with malignant and non-malignant hematologic disorders: implications for timely detection of engraftment, graft failure and rejection. *Leukemia* 1999;13(12):2059, 60-9.

Dugast AS, Haudebourg T, Coulon F, Heslan M, Haspot F, Poirier N, et al. Myeloid-derived suppressor cells accumulate in kidney allograft tolerance and specifically suppress effector T cell expansion. *J Immunol.* 2008; 180:7898–906. [PubMed: 18523253]

Eapen M, Le Rademacher J, Antin JH, Champlin RE, Carreras J, Fay J, Passweg JR, Tolar J, Horowitz MM, Marsh JC, et al. Effect of stem cell source on outcomes after unrelated donor transplantation in severe aplastic anemia. *Blood.* 2011;118(9):2618–21.

Eapen M, Rocha V, Sanz G, Scaradavou A, Zhang MJ, Arcese W, Sirvent A, Champlin RE, Chao N, Gee AP, et al. Effect of graft source on unrelated donor haemopoietic stem-cell transplantation in adults with acute leukaemia: a retrospective analysis. *Lancet Oncol.* 2010;11(7):653–60.

Edinger, A.L.,Thompson, C.B. (2002) Antigen-presenting cells control T cell proliferation by regulating amino acid availability. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99 (3), 1107-1109.

Fan Q. Liu H. Liang X. Yang T. et al. *Journal of Hematology & Oncology* (2017) 10:135 Superior GVHD-free, relapse-free survival for G-BM to G-PBSC grafts is associated with higher MDSCs content in allografting for patients with acute leukemia

Filipazzi P, Valenti R, Huber V, Pilla L, Canese P, Iero M, Castelli C, Mariani L, Parmiani G, Rivoltini L (2007) Identification of a new subset of myeloid

suppressor cells in peripheral blood of melanoma patients with modulation by a granulocytemacrophage colony-stimulation factor-based antitumor vaccine. *J Clin Oncol* 25(18):2546–2553. doi:10.1200/JCO.2006.08.5829

Fuller TA. The Physics Of Surgeal Laser. *Laser Surg Med*. 1980;1:15

Gabrilovich DI, Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2009; 9:162–174. [PubMed: 19197294]

Gabrilovich DI, Ostrand-Rosenberg S, Bronte V (2012) Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nat Rev Immunol* 12(4):253–268. doi:10.1038/nri3175

Gabrilovich, D.I., Bronte, V., Chen, S.H., Colombo, M.P., Ochoa, A., Ostrand-Rosenberg, S. ve diğerleri. (2007) The terminology issue for myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res*, 67 (1), 425; author reply 426.

Gabrilovich, D.I., Nagaraj, S. (2009) Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol*, 9 (3), 162-174.

Gineikiene E, Stoskus M, Griskevicius L. Recent advances in quantitative chimerism analysis. *Expert Rev Mol Diagn* 2009;9(8): 817-32.

Glucksberg H, Storb R, Fever A, et al. Clinical manifestations of graft versus host disease in human recipients of marrow from HLA-matched sibling donors. *Transplantation* 1974; 18:295-304

Göker H. Aksu S. Hematopoetik Kök Hücre Uygulamaları, Türkiye Klinikleri Hematology, 2008;1(2):53-6

Guan Q, Blankstein A.R., Anjos K., Synova O., Tulloch M., Giftakis A., Yang B., Lambert P., Peng Z., Cuvelier G.D.E., Wall D.A. “Functional Myeloid-Derived Suppressor Cell Subsets Recover Rapidly after Allogeneic Hematopoietic Stem/Progenitor Cell Transplantation” vol:21, pp:1205-1214, 2015

Haile LA, von Wasielowski R, Gamrekelashvili J, Kruger C, Bachmann O, Westendorf AM, et al. Myeloid-derived suppressor cells in inflammatory bowel disease: a new immunoregulatory pathway. *Gastroenterology*. 2008; 135:871–81. 81, e1–5. [PubMed: 18674538]

- Hajiyev A. Kısa Ardışık Tekrar Bölgelerinin (“short tandem repeats” - STR) Analizi Doku Karışıklığına Çözüm Olabilir mi ve Aynı Hastada Non-neoplastik ve Neoplastik Bölgeler Arası STR Profilinin Karşılaştırılması, Tıpta Uzmanlık Tezi, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, 2018:29
- Hamerton JL, Harnes DWH. Cytological identification of radiation chimeras. *Nature* 1956;177:239-247.
- Harari, O., Liao, J.K. (2004) Inhibition of MHC II gene transcription by nitric oxide and antioxidants. *Curr Pharm Des*, 10 (8), 893-898.
- Hartung, T. (1998) Anti-inflammatory effects of granulocyte colonystimulating factor. *Curr. Opin. Hematol.* 5, 221–225
- Hematopoetik Kök Hücre ve Hematopoez, <https://avesis.erciyes.edu.tr/mcetin/dosya.../775c9ccf-cd2f-4805-a14b-855ec41864c0> (26.06.2019)
- Highfill SL, Rodriguez PC, Zhou Q, Goetz CA, Koehn BH, Veenstra R, et al. Bone marrow myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) inhibit graft-versus-host disease (GVHD) via an arginase-1-dependent mechanism that is up-regulated by interleukin-13. *Blood*. 2010; 116:5738–47. [PubMed: 20807889]
- Hoechst B, Ormandy LA, Ballmaier M, Lehner F, Kruger C, Manns MP, et al. A new population of myeloid-derived suppressor cells in hepatocellular carcinoma patients induces CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) T cells. *Gastroenterology*. 2008; 135:234–43. [PubMed: 18485901]
- Holda, J.H., Maier, T., Claman, H.N. (1985) Murine graft-versus-host disease across minor barriers: immunosuppressive aspects of natural suppressor cells. *Immunol Rev*, 88, 87-105.
- Huang A, Zhang B, Wang B, Zhang F, Fan KX, Guo YJ (2013) Increased CD14(+)HLA-DR (-/low) myeloid-derived suppressor cells correlate with extrathoracic metastasis and poor response to chemotherapy in non-small cell lung cancer patients. *Cancer Immunol Immunother* 62(9):1439–1451. doi:10.1007/s00262-013-1450-6

- Huang, B., Pan, P.Y., Li, Q., Sato, A.I., Levy, D.E., Bromberg, J. ve diğ erleri. (2006) Gr-1+CD115+ immature myeloid suppressor cells mediate the development of tumor-induced T regulatory cells and T-cell anergy in tumor-bearing host. *Cancer Res*, 66 (2), 1123-1131.
- Joo, Y.-D., Lee, S.-M., Lee, S.-W., Lee, W.-S., Lee, S.-M., Park, J.-K., Choi, I.- W., Park, S.-G., Choi, I., Seo, S.-K. (2009) Granulocyte colony-stimulating factor-induced immature myeloid cells inhibit acute graft-versus-host disease lethality through an indoleamine dioxygenase-independent mechanism. *Immunology* 128 (1: Suppl) e632–e640
- Kalinski, P. (2012) Regulation of immune responses by prostaglandin E2. *J Immunol*, 188 (1), 21-28.
- Kansu E. Hematopoez In: İç Hastalıkları Hematoloji, Erol Ç. Yalçın A. Mn Medikal ve Nobel Tıp Kitabevi, Ankara, 2011:408
- Karakürkçü M., Hematopoetik kök hücre nakli sonrası geç yan etkiler, 8. Ulusal Kemik İliğı Transplantasyonu ve Kök Hücre Tedavileri Kongresi Kitabı, 2014:80-86
- Khan F, Agarwal A, Agrawal S. Significance of chimerism in hematopoietic stem celltransplantation: new variations on an old theme. *Bone Marrow Transplant* 2004;34:1-
- Klinikte ve Pratikte Akım Sitometri, Sözer O., Haberal Eğitim Vakfı Yayınları, Ankara, 2009:177
- Kodumudi, K.N., Woan, K., Gilvary, D.L., Sahakian, E., Wei, S.,Djeu, J.Y. (2010) A novel chemoimmunomodulating property of docetaxel: suppression of myeloid-derived suppressor cells in tumor bearers. *Clin Cancer Res*, 16 (18), 4583-4594.
- Kusmartsev, S., Nefedova, Y., Yoder, D.,Gabrilovich, D.I. (2004) Antigen specific inhibition of CD8+ T cell response by immature myeloid cells in cancer is mediated by reactive oxygen species. *J Immunol*, 172 (2), 989-999
- Kusmartsev, S.,Gabrilovich, D.I. (2003) Inhibition of myeloid cell differentiation in cancer: the role of reactive oxygen species. *J Leukoc Biol*, 74 (2), 186-196.

- Lavin, Y. et al. Tissue-resident macrophage enhancer landscapes are shaped by the local microenvironment. *Cell* 159, 1312–1326 (2014).
- Lechner MG, Liebertz DJ, Epstein AL. Characterization of cytokine-induced myeloid-derived suppressor cells from normal human peripheral blood mononuclear cells. *J Immunol.* 2010;185:2273-2284.
- Lees, J. R., Azimzadeh, A. M., Bromberg, J. S. (2011) Myeloid derived suppressor cells in transplantation. *Curr. Opin. Immunol.* 23, 692–697.
- Levring, T.B., Hansen, A.K., Nielsen, B.L., Kongsbak, M., von Essen, M.R., Woetmann, A. ve diğerleri. (2012) Activated human CD4+ T cells Express transporters for both cysteine and cystine. *Sci Rep*, 2, 266.
- Li, H., Han, Y., Guo, Q., Zhang, M., Cao, X. (2009) Cancer-expanded myeloid-derived suppressor cells induce anergy of NK cells through membrane-bound TGFβ1. *J Immunol*, 182 (1), 240-249.
- Lu D-P, Dong L, Wu T, Huang X-J, Zhang M-J, Han W, Chen H, Liu D-H, Gao Z-Y, Chen Y-H. Conditioning including antithymocyte globulin followed by unmanipulated HLA-mismatched/haploidentical blood and marrow transplantation can achieve comparable outcomes with HLA-identical sibling transplantation. *Blood.* 2006;107(8):3065–73.
- Luyckx A, Schouppe E, Rutgeerts O, et al. G-CSF stem cell mobilization in human donors induces polymorphonuclear and mononuclear myeloid-derived suppressor cells. *Clin Immunol.* 2012;143:83-87.
- Lv M, Zhao X, S. Hu Y. et al., “Monocytic and promyelocytic myeloid-derived suppressor cells may contribute to G-CSF-induced immune tolerance in haplo-identical allogeneic hematopoietic stem cell transplantation,” *American Journal of Hematology*, vol. 90, no. 1, pp. E9–E16, 2015.
- MacDonald, K. P. A., Rowe, V., Clouston, A. D., Welply, J. K., Kuns, R. D., Ferrara, J. L. M., Thomas, R., Hill, G. R. (2005) Cytokine expanded myeloid precursors function as regulatory antigen-presenting cells and promote tolerance through IL-10-producing regulatory T cells. *J. Immunol.* 174, 1841–1850

- Maeda A., Sakai R., Eguchi H., Lo P.C., Choi T., Asada M., Yamanaka K., Matsuura R., Nakahata K., Okuyama H., Miyagawa S. "Therapeutic potential of monocytic MDSCs from peripheral blood monocytes in transplant rejection" 2015
- Majhail NS, Farnia SH, Carpenter PA, Champlin RE, Crawford S, Marks DI, et al. Indications for autologous and allogeneic hematopoietic cell transplantation: guidelines from the american society for blood and marrow transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2015;21(11):1863-9.
- Mandruzzato S, Solito S, Falisi E, Francescato S, Chiarion-Sileni V, Mocellin S, Zanon A, Rossi CR, Nitti D, Bronte V, Zanovello P (2009) IL4Ralpha + myeloid-derived suppressor cell expansion in cancer patients. *J Immunol* 182(10):6562–6568. doi:10.4049/jimmunol.0803831
- Mandruzzato S., Brandau S., Britten C.M., Bronte V., Damuzzo V., Gouttefangeas C., Maurer D., Ottensmeier C., Van der Burg S.H., Welters M.J.P., Walter S. "Toward harmonized phenotyping of human myeloid derived suppressor cells by flow cytometry: results from an interim study" vol.65, pp:161-169, 2016
- Manthe G, Amiel JL, Schwarzenberg L, et al. Successful allogeneic bone marrow transplantation in man: chimerism, induced specific tolerance and possible anti leukemic effects. *Blood* 1965;25:179.
- Marigo I, Bosio E, Solito S, et al. Tumor-induced tolerance and immune suppression depend on the C/EBPbeta transcription factor. *Immunity*. 2010;32:790-802.
- McCann SR, Lawler M. Mixed chimerism: detection and significance following BMT. *Bone Marrow Transplant* 1993;11:91-4.
- McCann SR, Lawler M. Mixed chimerism: detection and significance following BMT. *Bone Marrow Transplant* 1993; 11: 91–94
- McLeod B. C., Szczepiorkowski Z.M., Weinstein R., Winters J.L. Aferez İlkeler ve Uygulamalar, İlhan O., Ünal A., Göker H., Altuntaş F., AABB Press, Maryland, 2010: 472

- Mielcarek, M., Graf, L., Johnson, G., Torok-Storb, B. (1998) Production of interleukin-10 by granulocyte colony-stimulating factor-mobilized blood products: a mechanism for monocyte-mediated suppression of Tcell proliferation. *Blood* 92, 215–222.
- Mielcarek, M., Martin, P. J., Torok-Storb, B. (1997) Suppression of alloantigen-induced T-cell proliferation by CD14+ cells derived from granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood mononuclear cells. *Blood* 89, 1629–1634.
- Min CK, Lee WY, Min DJ, et al. The kinetics of circulating cytokines including IL-6, TNF-alpha, IL-8 and IL-10 following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2001;28:935-940.
- Mirza N, Fishman M, Fricke I, Dunn M, Neuger AM, Frost TJ, et al. All-trans-retinoic acid improves differentiation of myeloid cells and immune response in cancer patients. *Cancer Res*. 2006; 66:9299–307. [PubMed: 16982775]
- Morton J, Hutchins C, Durrant S. Granulocyte-colony-stimulating factor (G-CSF)-primed allogeneic bone marrow: significantly less graft-versus-host disease and comparable engraftment to G-CSF-mobilized peripheral blood stem cells. *Blood*. 2001;98(12):3186–91.
- Mougiakakos D, Jitschin R, von Bahr L, et al. Immunosuppressive CD14⁺HLA-DR^{low}/neg IDO⁺ myeloid cells in patients following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Leukemia*. 2013;27:377-388.
- Murdoch, C., Muthana, M., Coffelt, S. B., Lewis, C. E. (2008) The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. *Nat. Rev. Cancer* 8, 618–631
- Nagaraj, S., Gupta, K., Pisarev, V., Kinarsky, L., Sherman, S., Kang, L. Ve diğerleri. (2007) Altered recognition of antigen is a mechanism of CD8+ T cell tolerance in cancer. *Nat Med*, 13 (7), 828-835.
- Nagaraj, S., Nelson, A., Youn, J.I., Cheng, P., Quiceno, D., Gabrilovich, D.I. (2012) Antigen-specific CD4(+) T cells regulate function of myeloid-derived suppressor cells in cancer via retrograde MHC class II signaling. *Cancer Res*, 72 (4), 928-938.

- Nagaraj, S., Schrum, A.G., Cho, H.I., Celis, E.,Gabrilovich, D.I. (2010) Mechanism of T cell tolerance induced by myeloid-derived suppressor cells. *J Immunol*, 184 (6), 3106-3116.
- Nefedova, Y., Huang, M., Kusmartsev, S., Bhattacharya, R., Cheng, P., Salup, R. ve diğ erleri. (2004) Hyperactivation of STAT3 is involved in abnormal differentiation of dendritic cells in cancer. *J Immunol*, 172 (1), 464-474.
- Nefedova, Y., Nagaraj, S., Rosenbauer, A., Muro-Cacho, C., Sebti, S.M.,Gabrilovich, D.I. (2005) Regulation of dendritic cell differentiation and antitumor immune response in cancer by pharmacologic-selective inhibition of the janus-activated kinase 2/signal transducers and activators of transcription 3 pathway. *Cancer Res*, 65 (20), 9525-9535.
- Norman A. Flow Cytometry. *MedPhys*. 1980;7:609
- Ochando JC, Chen SH. Myeloid-derived suppressor cells in transplantation and cancer. *Immunol Res*. 2012;54:275-285
- Ogawa Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells *M. Blood*. 1993 Jun 1;81(11):2844-53.
- O'Reilly J, Meyer B, Stoner M, Erber W, Herrmann R, Davies J. Very early analysis of graft establishment after allogeneic bone marrow transplantation using the polymerase chain reaction. *Br J Haematol* 1993;85(1):169-72.
- Ormandy LA, Farber A, Cantz T, Petrykowska S, Wedemeyer H, Horning M, et al. Direct ex vivo analysis of dendritic cells in patients with hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2006; 12:3275–82. [PubMed: 16718852]
- Osgood EE, Riddle MC, Mathew TJ. Aplstic anemia treated with daily transfusions and in- travenous marrow: Case report. *Ann Intern Med* 1939;13:357.
- Osmanbaşoğlu E, Allogeneik Hematopoetik Kk Hücre Nakli Hastalarında Kimerizm Bulguları ve Klinik Seyire Etkisi, Yan Dal Uzmanlık Tezi, İstanbul Tıp Fakültesi Hematoloji Bilim Dalı, İstanbul, 2013:91
- Pak AS, Wright MA, Matthews JP, Collins SL, Petruzzelli GJ, Young MR. Mechanisms of immune suppression in patients with head and neck cancer: presence of CD34(+) cells which suppress immune functions within cancers

that secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Clin Cancer Res.* 1995; 1:95–103. [PubMed: 9815891]

Pan, L., Delmonte, J., Jr., Jalonon, C. K., Ferrara, J. L. (1995) Pretreatment of donor mice with granulocyte colony-stimulating factor polarizes donor T lymphocytes toward type-2 cytokine production and reduces severity of experimental graft-versus-host disease. *Blood* 86,4422–4429.

Perobelli, S. M., Mercadante, A. C. T., Galvani, R. G., Gonçalves-Silva, T., Alves, A. P. G., Pereira-Neves, A., Benchimol, M., Nóbrega, A., Bonomo, A. (2016) G-CSF-induced suppressor IL-10+ neutrophils promote regulatory T cells that inhibit graft-versus-host disease in a long-lasting and specific way. *J. Immunol.* 197, 3725–3734

Reichenbach, D. K., Schwarze, V., Matta, B. M., Tkachev, V., Lieberknecht, E., Liu, Q., Koehn, B. H., Pfeifer, D., Taylor, P. A., Prinz, G., Dierbach, H., Stickel, N., Beck, Y., Warncke, M., Junt, T., Schmitt-Graeff, A., Nakae, S., Follo, M., Wertheimer, T., Schwab, L., Devlin, J., Watkins, S. C., Duyster, J., Ferrara, J. L. M., Turnquist, H. R., Zeiser, R., Blazar, B. R. (2015) The IL-33/ST2 axis augments effector T-cell responses during acute GVHD. *Blood* 125, 3183–3192.

Riley RS. Mahin EJ. Ross W. Clinical Application Of Flow Cytometry. Chapter.1993;7,325-414

Rodriguez PC, Ernstoff MS, Hernandez C, Atkins M, Zabaleta J, Sierra R, Ochoa AC (2009) Arginase I- producing myeloid-derived suppressor cells in renal cell carcinoma are a subpopulation of activated granulocytes. *Cancer Res* 69(4):1553–1560. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-1921

Rose HJ. *A Handbook of Greek Mythology*. Routledge: London, New York: 1989.

Rubio MT, Savani BN, Labopin M, Polge E, Niederwieser D, Ganser A, Schwerdtfeger R, Ehninger G, Finke J, Renate A, et al. The impact of HLA-matching on reduced intensity conditioning regimen unrelated donor allogeneic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia in patients above 50 years—a report from the EBMT acute leukemia working party. *J Hematol Oncol.* 2016;9(1):65.

- Rutella S, Zavala F, Danese S, Kared H, Leone G. Granulocyte colony-stimulating factor: a novel mediator of T cell tolerance. *J Immunol.* 2005;175(11):7085–91.
- Sargın D. Graft Fonksiyonu ve Kimerizm, 7. Ulusal Kemik İliği Transplantasyonu ve Kök Hücre Tedavileri Kongresi, 7-12, 8-10 Mart 2012 Antalya
- Sauer, H., Wartenberg, M., Hescheler, J. (2001) Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation. *Cell Physiol Biochem*, 11 (4), 173-186.
- Schaap N, Schattenberg A, Bar B et al. Red blood cell phenotyping is a sensitive technique for monitoring chronic myeloid leukaemia patients after T-cell-depleted bone marrow transplantation and after donor leucocyte infusion. *Br J Haematol* 2000; 108: 116– 125.
- Schmielau J, Finn OJ. Activated granulocytes and granulocyte-derived hydrogen peroxide are the underlying mechanism of suppression of t-cell function in advanced cancer patients. *Cancer Res.* 2001; 61:4756–60. [PubMed: 11406548]
- Schmielau J, Finn OJ. Activated granulocytes and granulocyte-derived hydrogen peroxide are the underlying mechanism of suppression of t-cell function in advanced cancer patients. *Cancer Res.* 2001; 61:4756–60. [PubMed: 11406548]
- Serody JS, Sparks SD, Lin Y, Capel EJ, Bigelow SH, Kirby SL, Gabriel DA, Wiley JM, Brecher ME, Schell MJ, et al. Comparison of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF)-mobilized peripheral blood progenitor cells and G-CSF-stimulated bone marrow as a source of stem cells in HLA-matched sibling transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2000;6(4A):434–40.
- Seung, L. P., Rowley, D. A., Dubey, P., Schreiber, H. (1995) Synergy between T-cell immunity and inhibition of paracrine stimulation causes tumor rejection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 6254–6258.
- Shono Y, Ueha S, Wang Y, et al. Bone marrow graft-versus-host disease; early destruction of hematopoietic niche after MHC-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 2010;115(26):5401-5411

- Sloand, E. M., Kim, S., Maciejewski, J. P., Van Rhee, F., Chaudhuri, A., Barrett, J., Young, N. S. (2000) Pharmacologic doses of granulocyte colony-stimulating factor affect cytokine production by lymphocytes in vitro and in vivo. *Blood* 95, 2269–2274.
- Solito S, Falisi E, Diaz-Montero CM, Doni A, Pinton L, Rosato A, Francescato S, Basso G, Zanovello P, Onicescu G, Garrett-Mayer E, Montero AJ, Bronte V, Mandruzzato S (2011) A human promyelocytic- like population is responsible for the immune suppression mediated by myeloid-derived suppressor cells. *Blood* 118(8):2254–2265. doi:10.1182/blood-2010-12-325753
- Solito S, Marigo I, Pinton L, Damuzzo V, Mandruzzato S, Bronte V (2014) Myeloid-derived suppressor cell heterogeneity in human cancers. *Ann N Y Acad Sci* 1319:47–65. doi:10.1111/nyas.12469.
- Solito, S., Bronte, V., Mandruzzato, S. (2011) Antigen specificity of immune suppression by myeloid-derived suppressor cells. *J. Leukoc. Biol.* 90, 31–36.
- Sonda, N. et al. miR-142-3p prevents macrophage differentiation during cancer-induced myelopoiesis. *Immunity* 38, 1236–1249 (2013).
- Spranger, S. et al. Up-regulation of PD-L1, IDO, and T(regs) in the melanoma tumor microenvironment is driven by CD8(+) T cells. *Sci. Transl. Med.* 5, 200ra116 (2013).
- Sprangers B. Wijmeersch B. Luyckx A. et al., “Subclinical GvHD in non-irradiated F1 hybrids: severe lymphoid-tissue GvHD causing prolonged immune dysfunction,” *Bone Marrow Transplantation*, vol. 46, no. 4, pp. 586–596, 2011.
- Srivastava, M.K., Sinha, P., Clements, V.K., Rodriguez, P., Ostrand-Rosenberg, S. (2010) Myeloid-derived suppressor cells inhibit T-cell activation by depleting cystine and cysteine. *Cancer Res*, 70 (1), 68-77.
- Storek J, Dawson MA, Storer B, et al. Immune reconstitution after allogeneic marrow transplantation compared with blood stem cell transplantation. *Blood*. 2001;97:3380-3389.

- Storek J, Geddes M, Khan F, et al. Reconstitution of the immune system after hematopoietic stem cell transplantation in humans. *Semin Immunopathol.* 2008;30:425-437
- Sureda A, Bader P, Cesaro S, Dreger P, Duarte RF, Dufour C, et al. Indications for alloand auto-sct for haematological diseases, solid tumours and im mune disorders: current practice in europe, 2015. *Bone Marrow Transplant* 2015;50(8):1037-56.
- Svensson, R. U. et al. Slow disease progression in a C57BL/6 pten-deficient mouse model of prostate cancer. *Am. J. Pathol.* 179, 502–512 (2011).
- Şahin C. Allojenik Hematopoetik Kök Hücre Nakli Yapılan Hastalarda Sağ Kalım Üzerine Etkisi Olan Faktörlerin Belirlenmesi, Tıpta Uzmanlık Tezi, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kayseri, 2010:86
- Takami A. Shibayama M. Orito M. Et al. Immature Platelet Fraction For Prediction Of Platelet Engraftment After Allogeneic Stem Cell Transplantation, *Bone Marrow Transplant*, 2007;39:501-507
- Talmadge, J. E., Gabrilovich, D. I. (2013) History of myeloid-derived suppressor cells. *Nat. Rev. Cancer* 13, 739–752
- Tezcan Karasu G. Akut GVHH Klinik, Risk Faktörleri ve Evreleme, *Medipol Hematoloji Sempozyumu Kitabı*, s 15-19, 6-7 Ekim 2018, Medipol Üniversitesi, İstanbul
- Thevenot, P. T., Sierra, R. A., Raber, P. L., Al-Khami, A. A., Trillo-Tinoco, J., Zarreii, P., Ochoa, A. C., Cui, Y., Del Valle, L., Rodriguez, P. C. (2014) The stress-response sensor chop regulates the function and accumulation of myeloid-derived suppressor cells in tumors. *Immunity* 41, 389–401.
- To L.B., Haylock D.N., Simmons P.J., and C.A. Juttner The Biology and Clinical Uses of Blood Stem Cells, *Blood* 1997 89: 2233-2258.
- Tomblyn M, Chiller T, Einsele H, Gress R, Sepkowitz K, Storek J, et al. Guidelines for preventing infectious complications among hematopoietic cell transplantation recipients: a global perspective. *Biol Blood Marrow Transplant* 2009;15(10):1143-238.

- Turnquist, H. R., Zhao, Z., Rosborough, B. R., Liu, Q., Castellaneta, A., Isse, K., Wang, Z., Lang, M., Stolz, D. B., Zheng, X. X., Demetris, A. J., Liew, F. Y., Wood, K. J., Thomson, A. W. (2011) IL-33 expands suppressive CD11b⁺ Gr-1(int) and regulatory T cells, including ST2L⁺Foxp3⁺ cells, and mediates regulatory T cell-dependent promotion of cardiac allograft survival. *J. Immunol.* 187, 4598–4610.
- Uzunel M., Hauzenberger D., Allogenic Kök Hücre Transplantasyonu Sonrası Kimerizm Analizi, *Türkiye Klinikleri Hematology*, 2012;5(4):94-99.
- Van Ginderachter JA, Beschin A, De Baetselier P, Raes G. Myeloid-derived suppressor cells in parasitic infections. *Eur J Immunol.* 2010; 40:2976–85. [PubMed: 21061431]
- Vendramin A, Gimondi S, Bermema A, et al. Graft monocytic myeloid-derived suppressor cell content predicts the risk of acute graft-versus-host disease after allogeneic transplantation of granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood stem cells. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2014;20:2049-2055.
- Vendramin A. , Gimondi S. , Bermema A., Longoni P., Rizzitano S., Corradini P., Carniti C. Graft Monocytic Myeloid-Derived Suppressor Cell Content Predicts the Risk of Acute Graft-versus-Host Disease after Allogeneic Transplantation of Granulocyte Colony-Stimulating Factor Mobilized Peripheral Blood Stem Cells.vol:20, pp:2049-2055, 2015
- Visentainer JE, Lieber SR, Persoli LB, et al. Serum cytokine levels and acute graft-versus-host disease after HLA-identical hematopoietic stem cell transplantation. *Exp Hematol.* 2003;31:1044-1050.
- Vladimirovna I.L., Sosunova E., Nikolaev A., and Nenasheva T. “Mesenchymal Stem Cells and Myeloid Derived Suppressor Cells:Common Traits in Immune Regulation” 2016
- Wang L, Chang EW, Wong SC, Ong SM, Chong DQ, Ling KL (2013) Increased myeloid-derived suppressor cells in gastric cancer correlate with cancer stage and plasma S100A8/A9 proinflammatory proteins. *J Immunol* 190(2):794–804. doi:10.4049/jimmunol.1202088

- Yang F. Li Y. Zhang Q. Tan L. Peng L. Zhao Y., The Effect of Immunosuppressive rugs on MDSCs in Transplantation, *Journal Of Immunology Resarch*, vol. pp16, 2018
- Yang, L., DeBusk, L. M., Fukuda, K., Fingleton, B., Green-Jarvis, B., Shyr, Y., Matrisian, L. M., Carbone, D. P., Lin, P. C. (2004) Expansion of myeloid immune suppressor Gr+CD11b+ cells in tumor-bearing host directly promotes tumor angiogenesis. *Cancer Cell* 6, 409–421.
- Yılmaz E. İnsan Lökosit Antijenleri-HLA, Bağışıklık Sistemi Yetersizlikleri Sempozyum Kitabı, s 47-54, 6-7 Mayıs 2013, İstanbul
- Yin B, Ma G, Yen CY, Zhou Z, Wang GX, Divino CM, et al. Myeloid-derived suppressor cells prevent type 1 diabetes in murine models. *J Immunol*. 2010; 185:5828–34. [PubMed: 20956337]
- Youn JI, Nagaraj S, Collazo M, Gabrilovich DI. Subsets of myeloidderived suppressor cells in tumor-bearing mice. *J Immunol*. 2008;181:5791-5802.
- Youn, J. I. et al. Epigenetic silencing of retinoblastoma gene regulates pathologic differentiation of myeloid cells in cancer. *Nat. Immunol*. 14, 211–220 (2013).
- Youn, J. I., Collazo, M., Shalova, I. N., Biswas, S. K. & Gabrilovich, D. I. Characterization of the nature of granulocytic myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *J. Leukoc. Biol*. 91, 167–181 (2012).
- Youn, J.I.,Gabrilovich, D.I. (2010) The biology of myeloid-derived suppressor cells: the blessing and the curse of morphological and functional heterogeneity. *Eur J Immunol*, 40 (11), 2969-2975.
- Young MR, Newby M, Wepsic HT. Hematopoiesis and suppressor bone marrow cells in mice bearing large metastatic Lewis lung carcinoma tumors. *Cancer Res*. 1987; 47:100–552-
- Young, M.R., Wright, M.A.,Pandit, R. (1997) Myeloid differentiation treatment to diminish the presence of immune-suppressive CD34+ cells within human head and neck squamous cell carcinomas. *J Immunol*, 159 (2), 990-996.

- Yüksel Kurt M. Allojenik Hematopoetik Kök Hücre Nakli Sonrası İmmün Sistemin Yeniden Yapılanması, Türkiye Klinikleri Hematology, 2018;11(1):30-5
- Zea AH, Rodriguez PC, Atkins MB, Hernandez C, Signoretti S, Zabaleta J, et al. Arginaseproducing myeloid suppressor cells in renal cell carcinoma patients: a mechanism of tumor evasion. Cancer Res. 2005; 65:3044–8. [PubMed: 15833831]
- Zeng, D., Dejbakhsh-Jones, S., Strober, S. (1997) Granulocyte colonystimulating factor reduces the capacity of blood mononuclear cells to induce graft-versus-host disease: impact on blood progenitor cell transplantation. Blood 90, 453–463
- Zhao, X., Rong, L., Zhao, X., Li, X., Liu, X., Deng, J., Wu, H., Xu, X., Erben, U., Wu, P., Syrbe, U., Sieper, J., Qin, Z. (2012) TNF signaling drives myeloid-derived suppressor cell accumulation. J. Clin. Invest. 122, 4094–4104.
- Zhu B, Bando Y, Xiao S, Yang K, Anderson AC, Kuchroo VK, et al. CD11b+Ly-6Chi suppressive monocytes in experimental autoimmune encephalomyelitis. J Immunol. 2007; 179:5228–37. [PubMed: 17911608]

BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU (BGOF)

Bilgilendirme Bölümü:

Katıldığınız bu çalışma, klinik bilimsel bir araştırmadır. Araştırmanın adı "Allojenik kemik iliği nakli yapılan hastalarda kimerizm ve hastalıksız sağkalım ile miyeloid kökenli baskılayıcı hücreler (MDSC) arasındaki ilişkinin araştırılması"dır.

Bu araştırmanın amacı, öncü immatür bağışıklık hücrelerinin (Miyeloid baskılayıcı hücreler) kemik iliği nakli yapılan hastalardaki etkileşimlerinin araştırılmasıdır. Bu çalışmaya katılmayı kabul ettiğinizde, nakil sonrası takiplerinizdenakilde verilen hücrelerin yerleşmesinin (nötrofilengraftmanı) ilk gününden başlayarak 0., 30., 60. günlerde ve gerekli görülürse 90. Günde 1(bir)'er tüp (3 ml) kanınız alınacaktır. Bu süreçteki takipleriniz Kan alınması sırasında ve sonrasında yüksek oranda komplikasyon/risk beklenmemektedir. Ancak kan alınan bölgede ağrı, şişlik (hematom), morarma (ekimoz) oluşabilir. Bu durumun oluşmasını azaltmak için kan alındıktan sonra kolunuzu kesinlikle bükmemelisiniz. Yine de kolunuzda morarma veya herhangi bir durum geliştiğinde serviste takibe alınacaksınız.

Bu çalışmanın herhangi bir aşamasında sizden elde edilen biyolojik materyalin analizi yurtdışında yapılmayacaktır ve başka şahıslarda veya araştırmalarda kullanılmayacaktır.

Bu araştırmada yer almanız nedeniyle size hiçbir ödeme yapılmayacaktır.

Bu araştırma ile ilgili olarak herhangi bir sorumluluğunuz bulunmamaktadır. Araştırma sırasında sizi ilgilendirebilecek herhangi bir gelişme olduğunda, bu durum size veya yasal temsilcinize derhal bildirilecektir.

Araştırmaya katılmak tamamen sizin isteğinize bağlıdır. Siz istediğiniz zaman bir cezaya veya yaptırıma maruz kalmaksızın ve hiçbir hakkınızı kaybetmeksizin, araştırmaya katılmayı reddedebilir veya araştırmadan istediğiniz zaman ayrılabilirsiniz. Araştırmada yer alması planlanan kişi sayısı 20 (yirmi) olarak tespit edilmiştir.

Size ait tüm tıbbi ve kimlik bilgileriniz gizli tutulacaktır ve araştırma yayımlansa bile kimlik bilgileriniz verilmeyecektir. Ancak araştırmanın izleyicileri, etik kurullar ve resmi makamlar gerektiğinde izninizle tıbbi bilgilerinize ulaşabilir. Siz de istediğinizde kendinize ait tıbbi bilgilere ulaşabilirsiniz. Araştırma süresince 24 saat ulaşılabileceğiniz,

Kişi adı / soyadı: Dr. Burçin ERDEM KINAŞ

Telefonu:

Gönüllü Oluru Bölümü:

Yukarıda yer alan klinik araştırmaya başlanmadan önce "**Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu**" ndaki tüm açıklamaları okudum ve sözlü açıklamalar aşağıda adı belirtilen kişi tarafından yapıldı. Aklıma gelen tüm soruları ilgili araştırmacıya sordum, yazılı ve sözlü olarak bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Araştırmaya gönüllü olarak katıldığımı, istediğim zaman gerekçeli veya gerekçesiz olarak araştırmadan ayrılabileceğimi ve kendi isteğime bakılmaksızın araştırmacı tarafından araştırma dışı bırakılabileceğimi biliyorum. Çalışmaya katılmayı isteyip istemediğime karar vermem için bana yeterli zaman tanıdı. Bu koşullar altında, bana ait tıbbi bilgilerin gözden geçirilmesi ve işlenmesi konusunda araştırma yürütücüsüne yetki veriyor ve söz konusu araştırmaya ilişkin bana yapılan katılım davetini hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın, kendi rızamla katılmayı kabul ediyorum.

Bu formun imzalı bir kopyası bana verilecektir.

Gönüllünün,

Adı-Soyadı:

Adresi:

Tel.-Faks:

Tarih ve İmza:

Açıklamaları yapan araştırmacının,

Adı-Soyadı:

Görevi:

Adresi:

Tel.-Faks:

Tarih ve İmza:

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU (2011 - KAİK-80)

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI		Allojenik kemik iliği nakli yapılan hastalarda kimerizm ve hastalıksız sağkalım ile miyeloid kökenli baskılayıcı hücreler (MDSC) arasındaki ilişkinin araştırılması			
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU					
DEĞERLEN DIRİLEN BELGELER	BELGE ADI	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili	
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe ☐	İngilizce ☐ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe ☐	İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe ☐	İngilizce ☐ Diğer ☐
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe ☐	İngilizce ☐ Diğer ☐
	BELGE ADI	Açıklama			
	SİGORTA				
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ				
	BIYOLOJİK MATERİYEL TRANSFER FORMU				
	İLAN				
	YILLIK BİLDİRİM				
	SONUÇ RAPORU				
KARAR BİLGİLERİ	Karar No : 2017/441	Tarih : 29/09/2017			
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gereke, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmanın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile kararlaştırılmıştır.				

Funda H. ÇİZMECİ
Etik Kurul Sekreteri

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Klavuzu
ETİK KURUL BAŞKANI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof. Dr. Ruhan DÜŞÜNSEL

Unvanı / Adı Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyeti	Araştırma/İle İlişki	Katılım (*)	İmza
Prof. Dr. Ruhan DÜŞÜNSEL	Çocuk Sağ ve Hast.	E.Ü. Tıp Fak.	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. Sami AYDOĞAN	Fizyoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. Ahmet ÖZTÜRK	Halk Sağlığı	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. Kemal DENİZ	Patoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. Musa KARAKÜKÇÜ	Çocuk Sağ. ve Hast.	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç. Dr. Aydın ÜNAL	İç Hastalıkları	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç. Dr. Güven KAHRİMAN	Radyoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç. Dr. Kemal ÖZYURT	Dermatoloji	Kayseri Eğitim Hast.	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç. Dr. Emin Murat CANGER	Ağız, Diş ve Çene Radyolojisi	E.Ü. Diş Hek. Fak.	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç. Dr. Cihangir BİÇER	Anest. ve Rean.	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Yard. Doç. Dr. Zafer SEZER	Farmakoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Yard. Doç. Dr. Gökmen ZARARSIZ	Biyoistatistik	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Av. Serhat ÜSTÜNEL	Avukat	Hukuk Müşaviri	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Ecz. Şükran TERZİ	Eczacı	Serbest Eczacı	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	
Sevtap Koçer	Sivil Üye	Serbest	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	

*: Toplantıda Bulunma

Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Ruhan DÜŞÜNSEL
İmza:

Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır.

ALLOJENİK KEMİK İLİĞİ NAKLİ YAPILAN HASTALARDA KİMERİZM, GVHD VE SAĞKALIM İLE MİYELOİD KÖKENLİ BASKILAYICI HÜCRELER (MDSC) ARASINDAKİ İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI

ORIJINALLIK RAPORU

%**13**

BENZERLİK ENDEKSİ

%**13**

İNTERNET
KAYNAKLARI

%**2**

YAYINLAR

%

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1

www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080

İnternet Kaynağı

%**5**

2

www.ctf.edu.tr

İnternet Kaynağı

%**1**

3

organ.saglik.gov.tr

İnternet Kaynağı

%**1**

4

smartrans.hemosoft.com

İnternet Kaynağı

%**1**

5

thd.org.tr

İnternet Kaynağı

%**1**

6

www.slideserve.com

İnternet Kaynağı

%**1**

7

tphd.org.tr

İnternet Kaynağı

<%**1**

8

bilimveyaratilis.org

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı- Soyadı : Burçin ERDEM KINAŞ

Uyruğu : T.C.

Doğum tarihi ve yeri : 26.06.1981 / KAYSERİ

Medeni hali : Evli

e-mail : burcin.kinas@memorial.com.tr

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Tıpta Uzmanlık	Bezmialem Valide Sultan Vakıf Gureba Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İSTANBUL	2009
Lisans	Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıp Doktoru Eğitimi, Kayseri	2004
Lise	Kayseri Fen Lisesi	1998

İŞ DENEYİMİ

Yıl	Kurum	Görev
2010-2012	Kdz. Ereğli Devlet Hastanesi, Zonguldak	Biyokimya Uzmanı
2012-Halen	Memorial Kayseri Hastanesi, Kayseri	Biyokimya Uzmanı

Yabancı Dil

İngilizce