

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

**ALL-TRANS RETİNOİK ASİT (ATRA) VE
1 α ,25-DİHİDROKSİVİTAMİN D3 (VİTAMİN D3) İLE UYARILAN
AKUT MİYELOİD LÖSEMİ HÜCRELERİNİN
T HÜCRE YANITLARI ÜZERİNE ETKİSİ**

Uzm. Biol. Diğdem YÖYEN ERMİŞ

**Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ANKARA
2014**

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

**ALL-TRANS RETİNOİK ASİT (ATRA) VE
1 α ,25-DİHİDROKSİVİTAMİN D3 (VİTAMİN D3) İLE UYARILAN
AKUT MİYELOİD LÖSEMİ HÜCRELERİNİN
T HÜCRE YANITLARI ÜZERİNE ETKİSİ**

Uzm. Biol. Diğdem YÖYEN ERMİŞ

**Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Doç Dr. Güneş ESENDAĞLI**

**ANKARA
2014**

Anabilim Dalı : Temel Onkoloji
 Program : Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi
 Tez başlığı : All-trans retinoik asit (ATRA) ve 1 α ,25-dihidroksivitamin D3 (vitamin D3) ile uyarılan akut miyeloid lösemi hücrelerinin T hücre yanıtları üzerine etkisi.
 Öğrenci Adı-Soyadı : Diğdem Yöyen-ERMIŞ
 Savunma Sınavı Tarihi : 08.07.2014

Bu çalışma jürimiz tarafından yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Ayşe Lale DOĞAN
 Hacettepe Üniversitesi



Tez danışmanı: Doç. Dr. Güneş ESENDAĞLI
 Hacettepe Üniversitesi



Üye: Prof. Dr. Emin KANSU
 Hacettepe Üniversitesi



Üye: Prof. Dr. Dicle GÜÇ
 Hacettepe Üniversitesi



Üye: Yrd. Doç. Dr. Barış Emre DAYANÇ
 İnönü Üniversitesi



ONAY

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisans Üstü Eğitim Öğretim ve sınav yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Ersin FADILLIOĞLU

Müdür y.

TEŞEKKÜR

Eğitimim sırasında deneyimlerini, bilimsel bilgi birikimini ve desteğini hiçbir zaman benden esirgemeyen, her konuda beni aydınlatan ve yol gösteren, öğrencisi olmaktan büyük onur duyduğum danışmanım Sayın Doç. Dr. Güneş Esendağlı'ya sonsuz teşekkür ve minnetlerimi sunmayı bir borç bilirim. Sayın Prof. Dr. Emin Kansu, Prof. Dr. A. Lale Doğan, Prof. Dr. Dicle Güç, Yard. Doç. Dr. Füsun Özmen ve Öğr. Gör. Dr. Hande Canpınar'a benimle paylaşmış oldukları bilimsel bilgi birikimleri, her konuda gösterdikleri yardımseverlikleri ve güler yüzlü yaklaşımları için sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Sevgili çalışma arkadaşlarım Pınar Karaşar, Didem Özkazanç, Gürcan Tunalı, M. Emre Gedik, Burcu Şirin, Parisa Sarmadi, G.Övgü Erdem ve Hale Ainesaz'a güzel arkadaşlıkları ve laboratuvar çalışmalarımnda yapmış oldukları tüm yardımlar için en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamda yer alan hücre morfoloji görüntülerinin boyanma aşamasındaki yardımlarından dolayı Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalında görevli Sayın Ömer Ünal'a teşekkürü borç bilirim.

Beni tüm sevgileri ile yetiştiren, hayatta her zaman desteklerini hissettiğim ve bana olan güvenlerinden dolayı canım annem ve anneanneme sonsuz ve en içten teşekkürlerimi sunarım.

Hayatıma girdiği andan itibaren tüm sevgisini ve desteğini yanımda hissettiğim, tüm iyi ve kötü zamanlarımda yanımda olan biricik eşim Erkan Ermiş'e sonsuz teşekkür ederim.

ÖZET

Yöyen-Ermiş D. All-trans retinoik asit (ATRA) ve 1 α ,25-dihidroksivitamin D3 (vitamin D3) ile uyarılan akut miyeloid lösemi hücrelerinin T hücre yanıtları üzerine etkisi. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi Yüksek Lisans Programı, Ankara, 2014. ATRA ve D3, sırasıyla, A ve D vitaminlerinin en aktif metabolitleridir. Bu çalışmada ATRA, D3, LPS ve IFN- γ ajanlarından faydalanılarak HL-60 miyeloid lösemi hücreleri farklı olgunlaşma basamaklarına ilerletildi. Monositik ve/veya granülositik serileri veya fonksiyonel farklarının ayırt edilmesini sağlayan yüzey belirteçleri, hücre morfolojisi, hücresel yoğunluk, çoğalma, reaktif oksijen türleri (ROS) ve nitrik oksit (NO) üretme kapasiteleri değerlendirildi. Farklı olgunlaşma aşamalarında bulunan AML hücrelerinin sahip oldukları ko-stimülatör ve ko-inhibitör moleküllerin düzeyleri ve T hücrelerin proliferasyon yanıtları üzerine etkilerinin belirlenmesi amaçlandı. Promiyelositik/miyeloblastik kontrol HL-60 hücrelerinin ATRA ile uyarımı sonrasında metamiyelositik morfolojinin baskın olduğu görüldü. D3 uyarımı ile bu hücrelerde promonosit-benzeri karakterler gözlemlendi. ATRA, CD11b ve CD11c; D3 ise bu belirteçlere ek olarak CD14⁺ hücre oranlarını belirgin düzeyde artırdı. Bu belirteçlerin, özellikle CD11b düzeyi hücresel yoğunluk artışı ile ilişkilendirildi. CD11b ekspresyon düzeyi ile hücre çoğalması ters korelasyon göstermekteydi. Bu hücrelerde LPS'e karşı belirgin bir yanıt görülmezken, IFN- γ uyarımı B7-H1 ve B7-DC ko-inhibitör moleküllerinin ekspresyonunu artırdı, B7-H2 ko-aktivatör molekülünde düşüşe neden oldu. Ayrıca, CD11b⁺ hücrelerin CD86, B7-H1 ve B7-DC moleküllerini yaygın olarak taşıyan alt-popülasyon olduğu saptandı. IFN- γ , tüm HL-60 farklılaşma gruplarında CD14 ve HLA-DR; ATRA ile uyarılmış hücrelerde ise TLR4 artışına da neden oldu. T hücre ko-kültür deneylerinde ATRA veya D3 inkübasyonu ile miyeloid olgunlaşma/farklılaşma basamaklarına ilerletilen CD11b⁺ HL-60 hücrelerinin immün uyarıcılığının devam ettiği gösterildi. IFN- γ varlığında geliştirilen CD11b⁺ hücrelerinin (özellikle D3 ile uyarılan grubun) ise, CD8⁺ ve CD4⁺ T hücreleri sınırlı düzeyde uyardığı ve/veya baskılayabildiği belirlendi.

Anahtar kelimeler: Akut miyeloid lösemi, ATRA, D3, ko-stimülasyon

ABSTRACT

Yöyen-Ermiş D. All trans retinoic acid (ATRA) and 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 (vitamin D3) stimulated acute myeloid leukemia cells effect on T cell responses. Hacettepe University Institute of Health Sciences, Tumor Biology and Immunology Master of Science Program, Ankara, 2014. ATRA and D3 are the active metabolites of vitamin A and D, respectively. In this study, HL-60 myeloid leukemia cells were progressed through different maturation stages with ATRA, D3, LPS, and IFN- γ . For the determination of monocytic and/or granulocytic differentiation and their functional differences, cell surface markers, cell morphology, cellular density, proliferation, and capacities of reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide (NO) production were assessed. The aim of the study was to determine the expression of co-stimulatory and co-inhibitory molecules expressed by AML cells and their effects on T cell proliferation. Upon treatment with ATRA the promyelocytic/myeloblastic control HL-60 cells gained metamyelocytic morphology whereas promonocyte-like cells were abundant with D3 stimulation. CD11b and CD11c expression was significantly increased with ATRA stimulation; in addition to those markers CD14 was also induced with D3. These markers, especially CD11b, was associated with high cellular density. There was an inverse correlation between CD11b levels and cell proliferation. No prominent response to LPS was observed with these cells however stimulation with IFN- γ increased co-inhibitory B7-H1 and B7-DC, and decreased co-stimulatory B7-H2 molecules' expression. In addition, CD11b⁺ cells were identified to be the sub-population carrying CD86, B7-H1, and B7-DC molecules. In all differentiation groups, IFN- γ induced the expression of CD14 and HLA-DR, and especially of TLR4 in ATRA-stimulated HL-60 cells. In the co-cultures with T cells, the immune stimulatory capacity of CD11b⁺ HL-60 cells that were proceeded through different myeloid maturation/differentiation stages with ATRA or D3 was sustained. On the other hand, when CD11b⁺ cells (especially that of the D3-stimulated group) were developed in the presence of IFN- γ , CD4⁺ or CD8⁺ T cell stimulation were limited and/or suppressed.

Key words: Acute myeloid leukemia, ATRA, D3, co-stimulation

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR	x
ŞEKİLLER	xiv
TABLolar	xxi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Hematopoez	3
2.1.1. Miyelopoezde Morfolojik Değişimler	5
2.1.2. Miyelopoezin Moleküler Biyolojisi	10
2.2. Akut Miyeloid Lösemi	12
2.2.1. AML'de Genetik Değişimler	13
2.2.2. AML Sınıflaması	16
2.3. D Vitamini	22
2.3.1. D Vitamininin İmmün Sistem Üzerine Etkileri	24
2.3.2. AML ve D Vitamini	26
2.4. A Vitamini	29
2.4.1. A Vitamininin İmmün Sistem Üzerine Etkileri	31
2.4.2. AML ve A Vitamini	33
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	36
3.1. Çalışmada Kullanılan Maddeler	36
3.2. Hazırlanan Tamponlar ve Çözeltiler	36
3.3. Hücre Kültürü	38
3.3.1. Hücre Sayımı	38
3.3.2. HL-60 Hücrelerinin ATRA, D3, LPS veya IFN-γ ile Uyarımı	39
3.4. Akım Sitometri	40

3.5. Floresan-aktif Hücre Ayrımlanması (<i>fluorescence-activated cell sorting</i> , FACS)	43
3.5.1. Periferik Kan Mononükleer Hücre (PKMH) İzolasyonu	43
3.5.2. Periferik Kan Mononükleer Hücrelerinden CD4 ⁺ ve CD8 ⁺ T Lenfositlerin Saflaştırılması	43
3.5.3. ATRA veya D3, ATRA ve IFN-�, D3 ve IFN-� ile Uyarılan HL-60 Hücrelerinin Alt-gruplara Ayrımlanması	46
3.6. Ko-kültür Deneyleri	51
3.6.1. Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester (CFSE) ile CD4 ⁺ ve CD8 ⁺ T Hücrelerin İşaretlenmesi	51
3.6.2. Saflaştırılmış HL-60 alt-grupları ile CD4 ⁺ T veya CD8 ⁺ T Hücrelerin Ko-kültürü	51
3.7. ATRA veya D3 ve IFN-� veya LPS ile Farklılaştırılan HL-60 Hücrelerinin Proliferasyon Kapasitelerinin Değerlendirilmesi	54
3.8. Nitrik Oksit (NO) Analizleri	57
3.9. Reaktif Oksijen Türlerinin (<i>Reactive Oxygen Species</i> , ROS) Analizleri	59
3.10. Percoll <i>Gradient</i> Santrifüj Yöntemi ile HL-60 Hücrelerinin Yoğunluk Ayrımlanması	60
3.11. Farklılaştırılan HL-60 Hücrelerinde Morfolojik Analizler	61
3.12. İstatistiksel Analiz	61
4. BULGULAR	62
4.1. HL-60 Miyeloid Lösemi Hücre Hattının All-trans Retinoik Asit (ATRA) veya 1�,25-dihidroksivitamin D3 (D3) ile Farklılaştırılması	62
4.1.1. ATRA veya D3 ile Uyarılan HL-60 Hücrelerinde Diğer İmmünofenotipik Farklılıklarının Araştırılması	66
4.1.2. ATRA veya D3 ile Olgunlaştırılan HL-60 Hücrelerinin Yoğunluk Farklarının Araştırılması	69
4.2. ATRA veya D3 ile Farklılaştırılan HL-60 Hücrelerinin LPS veya IFN-� Varlığında Kazandıkları Karakterler	72
4.2.1. Canlılık Analizi	73

4.2.2. Morfolojik Analiz	74
4.2.3. LPS veya IFN- γ Varlığında Farklılaştırılan Kontrol HL-60, A-HL-60 ve D-HL 60 Hücrelerin İmmünojenotip Analizi	76
4.2.4. LPS veya IFN- γ Varlığında Farklılaştırılan Kontrol HL-60, A-HL-60 ve D-HL-60 Hücrelerinde Ko-stimülatör Moleküllerin Ekspresyonu	80
4.2.5. LPS veya IFN- γ Varlığında Farklılaştırılan Kontrol HL-60, A-HL-60 ve D-HL-60 Hücrelerinin Proliferasyon Kapasitesi ve CD11b Düzeyi ile İlişkisi	85
4.2.6. LPS veya IFN- γ Varlığında Farklılaştırılan Kontrol HL-60, A-HL-60 ve D-HL-60 Hücrelerinde Reaktif Oksijen Türlerinin (ROS) üretimi	94
4.2.7. LPS veya IFN- γ Varlığında Farklılaştırılan Kontrol HL-60, A-HL-60 ve D-HL-60 Hücrelerinde Nitrik Oksit (NO) Üretimi	96
4.3. Farklılaştırılan HL-60 Hücrelerinin T Hücre Yanıtları Üzerine Etkileri	96
4.3.1. CD11b ve CD14 Varlığına Göre Ayrımlanan A-HL-60 ve D-HL-60 Hücrelerinin CD4 ⁺ T Hücre Proliferasyonuna Etkisi	96
4.3.2. IFN- γ Varlığında Farklılaştırılan A-HL-60 ve D-HL-60 Hücrelerinin CD4 ⁺ ve CD8 ⁺ T Hücre Proliferasyonuna Etkisi	100
5. TARTIŞMA	102
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	115
KAYNAKLAR	118
EKLER	
Ek 1. Etik Kurul İzni	

SİMGELER ve KISALTMALAR

25(OH)VD3	25-dihidroksivitamin D3
7-DHC	7-dehidrokolesterol
ADH	Alkol dehidrojenaz
AF4	<i>ALL1-Fused gene from chromosome 4 protein</i>
A-HL-60	1 µM ATRA ile 96 saat inkübe edilen HL-60 hücreleri
ALL	Akut lenfoblastik lösemi
ALP	Alkalen fosfataz
AML	Akut miyeloid lösemi
AML1	Akut miyeloid lösemi 1 protein
ANAE	Alfa naftol asetat esteraz
APL	Akut promiyelositik lösemi
ATCC	<i>American Tissue Culture Collection</i>
ATRA	All-trans retinoik asit
BGLAP	Osteokalsin
C/EBP	CCAAT/enhancer bağlanma proteini
CAE	Kloroasetat esteraz
CBF	Kor bağlayıcı faktör
CFSE	Karboksifloresan süksinimidil ester
CLP	Ortak lenfoid öncül
CMP	Ortak miyeloid öncül
cMPO	Sitoplazmik miyeloperoksidaz
CRABP	Hücrel retinoik asit-bağlayıcı protein
CYP27A1 ve CYP27B1	Sitokrom P450 protein
D3	1α,25-dihidroksivitamin D3
D-HL-60	100nM D3 ile 96 saat inkübe edilen HL-60 hücreleri
DMSO	Dimetil sülfoksit
ETO	8-21-eşbaskılayıcı
FAB	<i>French-American-British</i>
FABP5	Yağ asidi-bağlayıcı protein 5
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FBS	Fötal Buzağı Serum

FLT-3	FMS-benzeri tirozin kinaz-3
FSC-A	<i>Forward scatter-area</i>
GALT	Bağırsak ile ilişkili lenfoid dokular
GATA3	GATA-bağlayıcı protein 3
G-CSF	Granülosit koloni uyarıcı faktör
GFI1	Büyüme faktöründen bağımsız 1 transkripsiyon baskılayıcısı
GM-CSF	Granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör
GM-CSF-R α	Granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör reseptör alfa
GMP	Granülosit-makrofaj öncül hücre
H ₂ DCFDA	<i>Dichlorofluorescein diacetate</i>
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
HDAC	Histon deasetilaz
HIT3a	Anti-CD3 monoklonal antikoru
HOX ve CDX	Homeotik genler
HSC	Hematopoetik kök hücre
Hsp90	Isı şok proteini 90
IFN- γ	İnterferon gamma
Ig	İmmünoglobülin
IL	İnterlökin
IRF	İnterferon-düzenleyici faktör
ISG15	İnterferon tarafından uyarılmış protein 15 kDa
iNOS	Uyarılabilir nitrik oksit sentaz
JNK	c-Jun N-terminal kinaz
KO	Yoksun
LPS	Lipopolisakkarit
LT-HSC	Uzun ömürlü hematopoetik kök hücreler
MAF	Makrofaj aktive edici faktör
M-CSF	Makrofaj koloni uyarıcı faktör
MDS	Myelodisplastik sendrom
MDSC	Miyeloid-kökenli baskılayıcı hücreler
MEP	Megakaryosit-eritrosit öncül

MFI	Ortalama floresan yoğunluğu
MLL	Mixed-lineage lösemi
MPO	Miyeloperoksidaz
MPP	Multipotent öncül hücreler
MSE	Monosit spesifik esteraz
MYH11	Miyozin ağır zincir 11
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NaNO ₂	Sodyum nitrit
NAP	Nötrofil alkali fosfataz
NASA	Naftol AS asetat esteraz
NASDA	Naftol AS-D asetat esteraz
NKT	Doğal öldürücü T hücreler
NO	Nitrik oksit
NPM	Nükleofosmin
NSE	Spesifik-olmayan esteraz
O ₂	Süperoksit
p42 ERK	p42 ekstraselüler düzenleyici kinaz
PAS	Periyodik asit schiff
PBMC	Periferik kan mononükleer hücreleri
PBS	Fosfat tamponlanmış tuz çözeltisi
PGE ₂	Prostoglandin E ₂
P-gp	P-glikoprotein
PI	Propidyum iyodür
PKC	Protein kinaz C
PLZF	Promiyelositik lösemi çinko parmak
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate
PML	Promiyelositik lösemi
PPAR	Peroksizom proliferatör ile aktive reseptör
pre-VD ₃	Öncül vitamin D ₃
RALDH	Retinal dehidrojenaz
RARE	Retinoik asit yanıt element
RAR- α	Retinoik asit reseptör alfa

RBP	Retinol-bağlayıcı protein
Retinol	A vitamini
ROS	Reaktif oksijen türleri
RUNX1	Runt-iliskili transkripsiyon faktörü 1
RXR	Retinoik X reseptör
Sca-1	Kök hücre antijeni-1
SCL	Lösemi kök-hücre faktörü
SDR	Kısa zincirli dehidrojenaz/redüktaz
SSC-A	<i>Side scatter-area</i>
ST-HSC	Kısa ömürlü hematopoetik kök hücreler
Tgase-II	Transglutaminaz-II
Th	T yardımcı hücre
Th1	Tip-1 yardımcı T lenfosit
TLR	Toll benzeri reseptör
TNF- α	Tümör nekroz faktörü- α
Treg	T düzenleyici hücre
TTR	Transtiretin
VD3	Vitamin D3
VDR	Vitamin D reseptör
VDRE	D3 yanıt bölgeleri
vitamin D2	Ergokalsiferol
vitamin D3	Kolekalsiferol
WHO	<i>World Health Organization</i>
ZF	Çinko parmak
β -karoten	Pro-vitamin A karatinoidleri

ŞEKİLLER

Sayfa

2.1.	Kemik iliğinde fizyolojik koşullardaki nötrofil olgunlaşma basamaklarının (sırası ile miyeloblast, promiyelosit, miyelosit, metamiyelosit, band hücresi ve nötrofil) yüzey belirteçleri ile ilişkisi,.	4
2.2.	Kemik iliğinde fizyolojik koşullarda monosit olgunlaşma basamaklarının (sırasıyla monoblast, promonosit ve monosit) yüzey belirteçleri ile ilişkisi,.	5
2.3.	Fizyolojik koşullardaki miyelopoezde, granülositik seri (A-H) ve monositik seri (I-K) olgunlaşma aşamalarında kazandıkları morfolojik karakterler..	7
2.4.	Miyeloid farklılaşma sırasında transkripsiyon faktörlerinin değişimi	11
2.5.	D vitamini sentezi ve oluşan ara metabolitler	23
2.6.	A ve D vitaminlerinin sırasıyla, en aktif metabolitleri olan all-trans retinoik asit (ATRA) ve 1 α ,25-dihidroksivitamin D3 (D3)'ün nükleer reseptörleri	24
2.7.	Vitamin D'nin en aktif metaboliti olan 1 α ,25-dihidroksivitamin D3 (D3)'ün doğal ve edinselel immün hücreler üzerine olan etkileri	26
2.8.	A vitamini ve metabolitlerinin sentezi	30
2.9.	ATRA'nın bağırsak ilişkili lenfoid dokularda tolerans ve inflamasyon süreçlerine etkileri	32
3.1.	HL-60 hücrelerinin ATRA, D3, LPS, IFN- γ veya bu ajanların kombinasyonları ile uyarma şemaları.	40
3.2.	Fluorescence-activated cell sorting (FACS) (FACS Aria II, BD Biosciences, ABD) yöntemiyle CD4-pozitif veya CD8-pozitif T hücrelerin ayrılması.	45
3.3.	96 saat boyunca A) ATRA (1 μ M) ile uyarılmış HL-60 hücrelerinin anti-CD11b antikoru ile işaretlenerek CD11b eksprese eden (Q4) ve etmeyen popülasyonlarının (Q3) ve	

- B) D3 (100 nM) ile uyarılmış HL-60 hücrelerinin anti-CD11b ve anti-CD14 antikoru ile işaretlenerek CD11b⁻CD14⁻ (Q3), CD11b⁻CD14⁺ (Q1), CD11b⁺CD14⁻ (Q4), CD11b⁺CD14⁺ (Q2) popülasyonlarının belirlenerek FACS yöntemi ile ayırılma stratejisi ve sort-saflık başarısı 48
- 3.4. ATRA (1 µM) veya D3 (100nM) ve IFN-γ (200 U/ml) ile 96 saat inkübe edilen HL-60 hücreleri granülite (SSC-A) ve boyutlarına (FSC-A) göre P2 bölgesinden seçilerek, bu alanda bulunan hücreler CD11b yüzey belirtecini yüksek düzeylerde eksprese eden popülasyonların bulunduğu P8 bölgesinden seçilmiştir. FACS ile ayrılma stratejisinin temsili histogramları ve sort-saflık başarısı 50
- 3.5. A) ATRA (1 µM) veya D3 (100nM) ile 96 saat inkübe edilen HL-60 hücrelerinden CD14 ve CD11b yüzey belirteçlerini farklı şekillerde eksprese etmelerine göre FACS ile ayrılmış popülasyonların CD4⁺ T hücrelerle ve B) ATRA (1 µM) veya D3 (100nM) ve IFN-γ (200 U/ml) ile 96 saat inkübe edilen HL-60 hücrelerinden CD11b yüzey belirtecini yüksek düzeylerde eksprese eden popülasyonlar ile CD4⁺ T veya CD8⁺ T hücrelerle U-tabanlı 96 kuyucuklu kültür kaplarında ko-kültür koşulları 53
- 3.6. HL-60 hücrelerinin Cell proliferation Dye eFlour 670 (RedCFSE) ile işaretlenmesinin ardından, ATRA veya D3 ve LPS veya IFN-γ ile farklılaştırılmasının ardından proliferasyon kapasitelerinin belirlenmesini gösteren deney tasarımı. 54
- 3.7. ATRA veya D3 ve LPS veya IFN-γ ile 96 saat boyunca farklılaştırılmış HL-60 hücreleri inkubasyon sonunda uyarım ajanları ortamdaki kaldırılarak Cell proliferation Dye eFlour 670 (RedCFSE) ile işaretlendi. İkinci bir 96 saat daha kültürü devam ettirilen bu hücrelerin proliferasyon

kapasitelerinin belirlemek için tasarlanan deney tasarımı gösterilmiştir.	55
3.8. Farklılaştırılan HL-60 hücrelerinin proliferasyon kapasitelerini belirlemek için CD11b düzeyine göre RedCFSE dilüsyonlarının akım sitometrik analizi	56
3.9. Total NO konsantrasyonlarını hesaplayabilmek için "kuadratik model'e" uygun olarak belirlenen standart eğri	58
3.10. A) ATRA veya D3 ile uyarılmış HL-60 hücrelerinin percoll gradiyent santrifüj yöntemi ile ayrılma koşulları ve yaklaşık %40 ve %50 percoll yoğunluklarında toplanan hücrelerin temsili gösterimi.	61
4.1. Farklı iki konsantrasyonda uygulanan ATRA uyarımı sonucunda HL-60 hücrelerinde CD11b, CD11c, CD14 ve CD15 yüzey belirteçlerinin zamana bağlı değişimleri gösterilmiştir.	63
4.2. D3 uyarımı sonrasında HL-60 hücrelerinde CD11b, CD11c, CD14 ve CD15 yüzey belirteçlerinin zamana bağlı değişimleri.	65
4.3. HL-60 hücrelerinde 96 saat 1 μ M ATRA veya 100 nM D3 uyarımı sonucunda CD11b, CD11c, CD14 veya CD15 belirteçlerini taşıyan hücre yüzdelerinin gruplar arasındaki farklılıkları	66
4.4. HL-60 hücrelerinde 96 saat ATRA veya D3 uyarımı sonucunda A) miyeloid fonksiyonda etkili moleküllerin ve B) B7 ko-stimülatör moleküllerinin ekspresyon düzeyini gösteren temsili akım sitometri histogramları	67
4.5. HL-60 hücrelerinde 96 saat ATRA veya D3 uyarımı sonucunda kontrol HL-60 hücrelerine göre ekspresyon varlığı belirlenen B7-H1, B7-H2, B7-DC, CD86, CD62L veya TLR4 yüzey belirteçlerini taşıyan hücre düzeylerinin gruplar arasındaki yüzde değişimleri..	68

- 4.6. A) ATRA veya B) D3 ile uyarılmış HL-60 hücrelerinin Percoll *gradient* yöntemi ile ayırılması sonucunda oluşan yaklaşık %40 ve %50 fazlarından toplanan hücrelerin CD11b, CD11c ve CD14 ekspresyonlarına ait temsili akım sitometri histogramları. 70
- 4.7. D3 ile uyarılmış HL-60 hücrelerinde Percoll *gradient* ayırılması sonucunda oluşan ~%40 ve ~%50 fazlarında bulunan hücrelerde CD11b ve CD11c yüzey belirteçlerinin CD14 ile ko-ekspresyon analizi. 71
- 4.8. A) ATRA veya B) D3 ile 96 saat uyarılmış HL-60 hücrelerinde Percoll *gradient* ayırılması sonucunda oluşan yaklaşık ~%40 ve ~%50 fazlarında toplanan hücrelerin CD11b, CD11c veya CD14 yüzey belirteçlerini taşıma yüzdeleri gösterilmiştir. 72
- 4.9. ATRA veya D3 ve LPS veya IFN- γ varlığında farklılaştırılan HL-60 hücrelerinin 96 saat sonraki canlılık durumu akım sitometrik propidyum iyodür (PI) analizi ile değerlendirildi. Temsili histogramlar gösterilmektedir. 74
- 4.10. Kontrol HL-60, A-HL-60, D-HL-60 ve bu hücrelerin LPS veya IFN- γ varlığında gösterdikleri morfolojik değişimler May-Grünwald Giemsa boyaması ile incelendi. Temsili mikrograflar gösterilmektedir, (1000x). 75
- 4.11. LPS varlığında farklılaştırılan HL-60, A-HL-60 ve D-HL-60 hücrelerinde A) miyeloid olgunlaşma/farklılaşma ve B) fonksiyonel karakter belirteçlerinin ekspresyonu. 77
- 4.12. IFN- γ varlığında farklılaştırılan HL-60, A-HL-60 ve D-HL-60 hücrelerinde A) miyeloid olgunlaşma/farklılaşma ve B) fonksiyonel karakter belirteçlerinin ekspresyonu. 78
- 4.13. LPS veya IFN- γ varlığında farklılaştırılan HL-60, A-HL-60 ve D-HL-60 hücrelerinde değişim gösteren A) CD11b, B) CD11c, C) CD14, D) CD15, E) TLR4, F) CD62L, G) HLA-DR yüzey belirteçlerini taşıyan hücrelerin yüzde grafikleri 79

- 4.14. Kontrol HL-60, A-HL-60 ve D-HL-60 hücrelerinin 48 saat A) LPS B) IFN- γ varlığında farklılaştırılmaları sonrasında B7-H1, B7-DC, B7-H2, CD80, CD86 ve CD70 ko-stimülatör molekülündeki ekspresyon değişimleri temsili akım sitometri histogramları ile gösterilmiştir. 81
- 4.15. LPS veya IFN- γ varlığında farklılaştırılan HL-60, A-HL-60 ve D-HL-60 hücrelerinde değişim gösteren A) CD86, B) B7-H2, C) B7-H1, D) B7-DC ko-stimülatör moleküllerini taşıyan hücrelerin yüzde grafikleri. 82
4. 16. IFN- γ veya LPS ile uyarılan HL-60, A-HL-60 ve D-HL-60 hücrelerinde A) CD86, B) B7-H1 ve C)B7-DC ko-stimülatör molekülünün CD11b ile eş zamanlı varlığı temsili akım sitometri nokta saçılım grafikleri ile gösterilmiştir. 84
- 4.17. HL-60 hücrelerinin A) kontrol, ATRA veya D3 varlığında ilk 96 saatlik inkübasyonu, B) 96 saatlik ilk inkübasyon sonrasında ortamdan ajanların yıkanarak uzaklaştırılmasını takiben ikinci 96 saatlik inkübasyon süresince çoğalma kapasitesi ve CD11b ekspresyonu 87
- 4.18. HL-60, A-HL-60 ve D-HL-60 hücrelerinin ilk ve ikinci 96 saatlerde CD11b-pozitif ve CD11b-negatif popülasyonlarında proliferasyon düzeylerinde meydana gelen farklılıkların gösterimi. 88
- 4.19. LPS varlığında farklılaştırılan, HL-60, A-HL-60 ve D-HL-60 hücrelerinin A) kontrol, ATRA veya D3 varlığında ilk 96 saatlik inkübasyonu, B) 96 saatlik ilk inkübasyon sonrasında ortamdan ajanların yıkanarak uzaklaştırılmasını takiben ikinci 96 saat süresince çoğalma kapasitesi ve CD11b ekspresyonu. 89
- 4.20. IFN- γ varlığında farklılaştırılan, HL-60, A-HL-60 ve D-HL-60 hücrelerinin A) kontrol, ATRA veya D3 varlığında ilk 96 saatlik inkübasyonu, B) 96 saatlik ilk inkübasyon sonrasında ortamdan ajanların yıkanarak uzaklaştırılmasını takiben

ikinci 96 saat süresince çoğalma kapasitesi ve CD11b ekspresyonu	91
4.21. LPS veya IFN- γ varlığında farklılaştırılan, HL-60, A-HL-60 ve D-HL-60 hücrelerinin ilk ve ikinci 96 saatler (Red CFSE dilüsyonları) süresince gösterdikleri proliferasyon ve CD11b pozitifliği ile ilişkisi	92
4.22. LPS veya IFN- γ varlığında farklılaştırılan, HL-60, A-HL-60 ve D-HL-60 CD11b-pozitif ve CD11b-negatif alt-popülasyonlarının proliferasyon kapasitesinin kıyaslanması. ilk ve ikinci 96 saat deneyleri süresince proliferasyon düzeylerindeki farklılıklar gösterilmiştir.	93
4.23. LPS veya IFN- γ varlığında farklılaştırılan, A-HL-60 ve D-HL-60 hücrelerinin ilk ve ikinci 96 saatlik inkübasyon sonrasında, CD11b düzeylerine göre; negatif (Neg), çok düşük (ÇD), düşük (D), orta (O) ve yüksek (Y) ekspresyonlara sahip hücre alt-popülasyonlarının bu ajanların etkisi sonucu proliferasyon düzeylerinde meydana gelen farklılıklar.	94
4.24. Kontrol HL-60, A-HL-60, D-HL-60 ve bu hücrelerin LPS ve IFN- γ varlığında farklılaştırılmaları sonucunda ROS üretim kapasitelerinin uyarımsız veya PMA ile uyarılmış koşullar altındaki akım sitometrik analizleri	95
4. 25. Kontrol HL-60, A-HL-60, D-HL-60 ve bu hücrelerin LPS ve IFN- γ varlığında farklılaştırılmaları sonucunda NO üretim kapasiteleri	96
4.26. Miyeloid hücre:CD4 ⁺ T hücre 96 saat 0.5:1 oranında ko-kültür sonucunda elde edilen akım sitometrik CFSE histogramları.	98
4.27. Miyeloid hücre:CD4 ⁺ T hücre 96 saat 0.5:1 oranında ko-kültür sonucunda proliferen olan CD4 ⁺ T hücrelerin yüzdeleri.	99
4.28. CD11 yüzey belirtecini yüksek düzeylerde eksprese eden (CD11b ^{hi}) miyeloid hücre:T hücre 96 saat 0.25:1 oranında	

ko-kültür sonucunda proliferere olan A) CD4⁺ T hücre ve B)
CD8⁺ T hücrelerin temsili akım sitometri histogramları.

TABLolar

	Sayfa
2.1. Fizyolojik koşullarda gerçekleşen miyelopoez sonucunda farklılaşan granülositik ve monositik seri hücrelerinin başlıca şekilsel özellikleri.	9
2.2. AML'de FAB sınıflamasına göre yüzey antijenlerinin ekspresyon düzeyleri..	21
3.1. Akım sitometride kullanılan antikorlar ve özellikleri.	42

1. GİRİŞ

Hematopoez, kök hücrelerin farklı mikroçevrelerden gelen sinyaller doğrultusunda öncül hücrelere farklılaşmasıyla devam eder. Bu öncül hücreler giderek proliferasyon ve kendini yenileme kapasitesini yitirerek farklılaşacağı hücreye doğru olgunlaşır (1,2) . Lösemi, farklı gelişim basamaklarında bulunan hematopoetik öncül hücrelerin malign dönüşümü sonucunda meydana gelir ve bu hücreler farklılaşmaya uğrayamaz, apoptoz yeteneğinden yoksundur ve kontrolsüzce çoğalır. Bu hücreler köken aldıkları hücre serisine göre lenfoid veya miyeloid; sağkalım ve olgunlaşma özelliklerine göre de akut veya kronik olarak sınıflandırılırlar. Akut lösemiler, akut miyeloid lösemi (AML) ve akut lenfoblastik lösemi (ALL) olmak üzere iki ana kategoriye ayrılır. Akut lösemi hücreleri kemik iliği, kan ve diğer dokulara infiltre olabilir (3,4) . AML, kemik iliği ve periferik kanda çok sayıda anormal olgunlaşmamış miyeloid hücre birikmesiyle karakterizedir (4) . AML heterojen bir hastalıktır. Bu hastalığın biyolojisinin anlaşılabilmesi ve tedavisi için sınıflandırılması büyük önem taşır. AML, Fransız, Amerikan ve İngiliz bir grup hematolog (*French-American-British*, FAB) (5) ve Dünya Sağlık Örgütü (*World Health Organization*, WHO) tarafından sınıflandırılmıştır (6) . Ayrıca bu hastalığın davranışını anlayabilmek için miyeloid lösemi hücre hatlarından faydalanılmaktadır. HL-60 miyeloid lösemi hücre hattı, immatür karakterini kolayca yitirerek farklı miyeloid hücre serilerine farklılaşma kapasitesine sahiptir. Bu nedenle, *in vitro* miyeloid olgunlaşma ve farklılaşma çalışmalarında sıklıkla tercih edilir (7) . All-trans retinoik asit (ATRA) HL-60 hücrelerini granülositik yönde farklılaştırırken, 1 α ,25-dihidroksivitamin D3 (D3) bu hücrelerde monositik farklılaşmayı destekler (8,9) . Farklı olgunlaşma basamaklarında bulunan miyeloid lösemi hücreleri hastalığın prognozu ile doğrudan ilişkilidir (10) . Lösemi hücrelerinin farklılaşma ve olgunlaşma düzeyi ile CD4⁺ ve CD8⁺ T hücre yanıtları arasındaki ilişki net olarak bilinmemektedir.

Bu çalışmada, ATRA, D3, LPS veya IFN- γ ajanlarından faydalanılarak HL-60 hücrelerini farklı olgunlaşma basamaklarına ilerletmek amaçlanmıştır. Bu farklılaşma sonrasında hücrelerin hangi olgunlaşma basamağına

ilerletildiğini anlayabilmek için, monositik ve/veya granülositik olgunlaşma veya fonksiyonel farkların ayırt edilmesini sağlayan belirteçler, hücre morfolojisi, hücrelerin çoğalma kapasitesi, ROS ve/veya NO üretme kapasiteleri değerlendirilmiştir. Farklı olgunlaşma aşamalarında bulunan bu hücrelerin CD4⁺ ve CD8⁺ T hücrelerin immün gözetiminden saklanmak için hangi stratejiyi kullandıklarını anlayabilmek için sahip oldukları ko-stimülatör molekülünün düzeyleri ve T hücrelerin proliferasyon yanıtları üzerine etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

ATRA ile uyarılan HL-60 hücrelerinde CD11b ve CD11c pozitifliği görülürken, D3 uyarımı ile bu belirteçlere ek olarak CD14 belirtecinin ekspresyonu da görüldü ve bu belirteçler olgunlaşma belirteçleri olarak belirlendi. Her iki uyarımda da HL-60 hücrelerinde CD11b-pozitif alt-popülasyonun daha olgun bir karaktere sahip olduğu belirlendi. Ayrıca ATRA ve D3 HL-60 hücrelerinde, CD62L'nin artışına neden olurken, B7-H2 molekülünde azalış görüldü. ATRA uyarımı, CD86 ekspresyonunda da artışa neden oldu. Hücre olgunlaşmasına paralel olarak, ATRA ve D3 hücre yoğunluğunun artışını da sağladı. Kontrol hücrelerinde dahil IFN- γ uyarımı B7-H1 ve B7-DC ko-inhibitör molekülünün ekspresyonu artarken, B7-H2 ko-aktivatör molekülünde düşüşe neden oldu. Yine, IFN- γ uyarımı ile tüm hücre gruplarında (kontrol HL-60, A-HL-60, D-HL-60) CD14 ve HLA-DR; ATRA ile uyarılmış grupta TLR4 artışına neden oldu. CD11b ekspresyonunun artmasına korele olarak CD86, B7-H1 veya B7-DC molekülünün, CD11b ile ko-ekspresyon saptandı. HL-60 hücrelerinin hem D3, hem de D3 ve IFN- γ uyarımı sonrasında, CD11b'yi yüksek düzeylerde eksprese eden alt-popülasyonlarının CD4⁺ ve CD8⁺ T hücre proliferasyonlarını daha az uyarıcı yönde etkilediği belirlendi. Nitrik oksit (*nitric oxide*, NO) üretim kapasitesinde gruplar arasında bir fark görülmez iken, A-HL-60 ve LPS ile uyarılmış D-HL-60 hücrelerinde reaktif oksijen türlerinin (*reactive oxygen species*, ROS) üretim kapasitesinde bir değişiklik görülmedi.

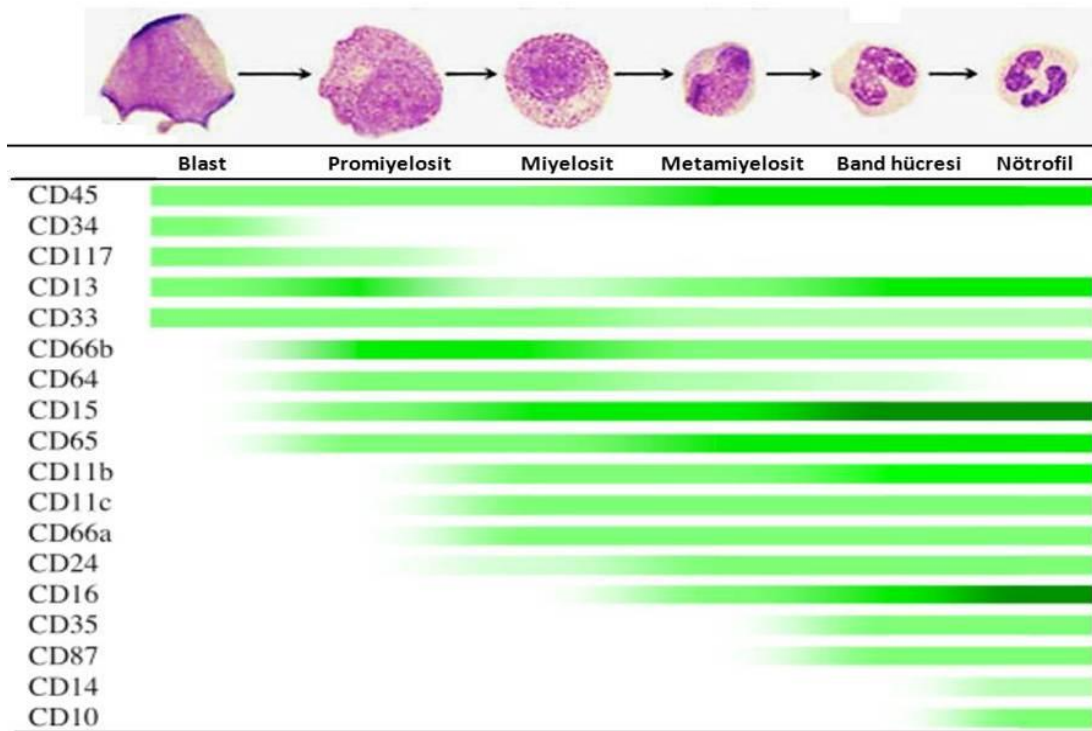
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Hematopoez

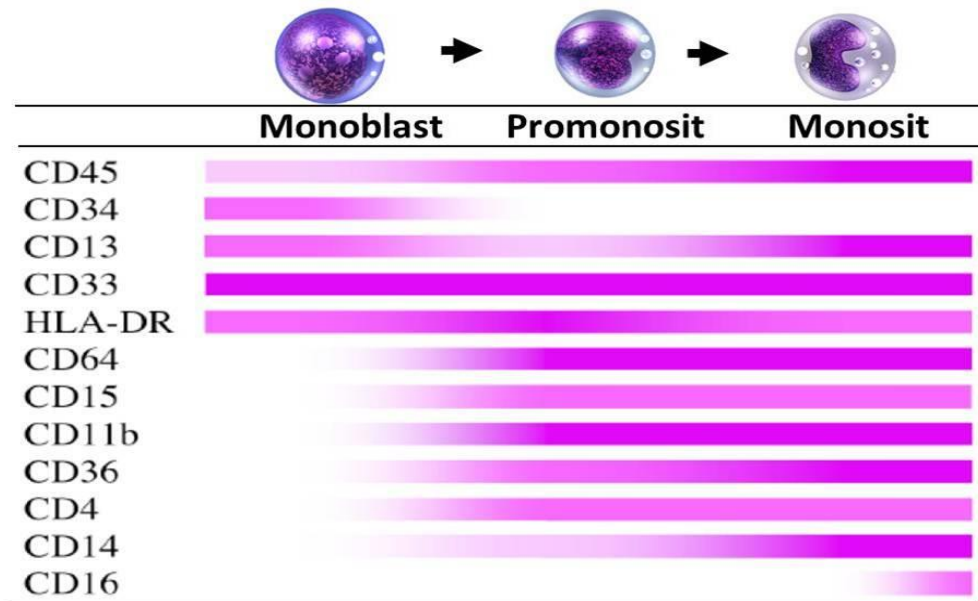
Hematopoetik kök hücre kendini yenileyebilir ve bir çok farklı hücreye dönüşebilir (pluripotensi). Bu hücreler farklılaşma belirteçlerini taşımazlar. Sahip oldukları CD34 ve kök hücre antijeni-1 (Sca-1) ile ayırt edilirler (11) . Hematopoez, kök hücrelerin farklı mikroçevrelerden gelen sinyaller doğrultusunda öncül hücrelere farklılaşmasıyla devam eder. Bu öncül hücreler giderek proliferasyon ve kendini yenileme kapasitesini yitirerek farklılaşacağı hücreye doğru olgunlaşır (1,2) . Hematopoetik öncül hücrelerin gelişimi ve farklılaşması için hücre-hücre teması ve salgılanan faktörler gereklidir (12,13) . Stromal hücrelerle etkileşen kök ve öncül miyeloid hücreler kemik iliğinde olgunlaşma süreci tamamlanana dek tutulur. Hematopoetik hücreler kemik iliğinde iki farklı nişte bulunur. Osteoblastik niş, kendini yenileyebilme özelliklerini korur; vasküler niş ise, proliferasyon, farklılaşma ve mobilizasyon için önemlidir. Bu iki nişin beraber çalışması hematopoezin sağlıklı bir şekilde gerçekleşmesini sağlar (14) .

Weissman modeline göre hematopoez sırasında öncelikle uzun ömürlü hematopoetik kök hücreler gelişir (*long-term hematopoietic stem cells*, LT-HSC) (LIN⁻IL-7R α ⁻SCA1⁺KIT⁺FLT3⁻Thy1^{düşük}CD34⁻). Bu hücre popülasyonu kemik iliğinde az sayıda bulunur, bütün hücrelere farklılaşma yeteneğine sahiptir ve kendini yenileme kapasitesi hayat boyu devam eder. Kısa ömürlü hematopoetik kök hücreler (*short-term hematopoietic stem cells*, ST-HSC) (LIN⁻IL-7R α ⁻SCA1⁺KIT⁺FLT3^{düşük}Thy1^{düşük}CD34⁺) LT-HSC'lerden farklılaşır ve kendini yenileme kapasitesi bu hücrelere nazaran daha düşüktür. ST-HSC'lerden multipotent öncül hücreler farklılaşır (*multipotent progenitor*, MPP) (LIN⁻IL-7R α ⁻SCA1⁺KIT⁺FLT3^{düşük}-yüksekThy1⁻CD34⁺). Bu aşamadan sonra lenfoid-miyeloid serilerin ayrımı olur ve ortak lenfoid öncül (*common lymphoid progenitor*, CLP) (LIN⁻IL-7R α ⁺SCA1^{düşük}KIT^{düşük}) ile ortak miyeloid öncül (*common myeloid progenitor*, CMP) (LIN⁻SCA1⁻KIT⁺CD34⁺Fc γ RII⁻Fc γ RIII⁻) gelişir (15) .

Miyelopoez, ortak miyeloid öncül hücrelerin kemik iliğinden gelen sinyaller doğrultusunda granülosit-makrofaj öncül hücrelerine (*granulocyte-macrophage progenitor*, GMP) ($\text{LIN}^- \text{SCA1}^- \text{KIT}^+ \text{CD34}^+ \text{Fc}\gamma\text{RII}^+ \text{Fc}\gamma\text{RIII}^+$), megakaryosit-eritrosit öncüllere (*megakaryocyte/erythroid progenitor*, MEP) ($\text{LIN}^- \text{SCA1}^- \text{KIT}^+ \text{CD34}^- \text{Fc}\gamma\text{RII}^- \text{Fc}\gamma\text{RIII}^-$), bazofil ve mast hücrelerine farklılaşması ile devam eder (15) . GMP'ler, CD34, HLA-DR ve CD64 antijenleri taşıması ile de ayırt edilir (16,17) . Miyelopoez sırasında farklı düzeylerde ifade edilen çeşitli yüzey antijenleri kullanılarak miyeloid hücrelerin gelişim basamakları ve olgunlaşma/farklılaşma düzeyleri belirlenebilir, (Şekil 2.1 ve Şekil 2.2) (18) .



Şekil 2.1. Kemik iliğinde fizyolojik koşullardaki nötrofil olgunlaşma basamaklarının (sırası ile miyeloblast, promiyelosit, miyelosit, metamiyelosit, band hücresi ve nötrofil) yüzey belirteçleri ile ilişkisi, (Wood, B.L., 2007'den uyarlanmıştır) (18) .



Şekil 2.2. Kemik iliğinde fizyolojik koşullarda monosit olgunlaşma basamaklarının (sırasıyla monoblast, promonosit ve monosit) yüzey belirteçleri ile ilişkisi, (Wood, B.L., 2007'den uyarlanmıştır) (18) .

2.1.1. Miyelopoezde Morfolojik Değişimler

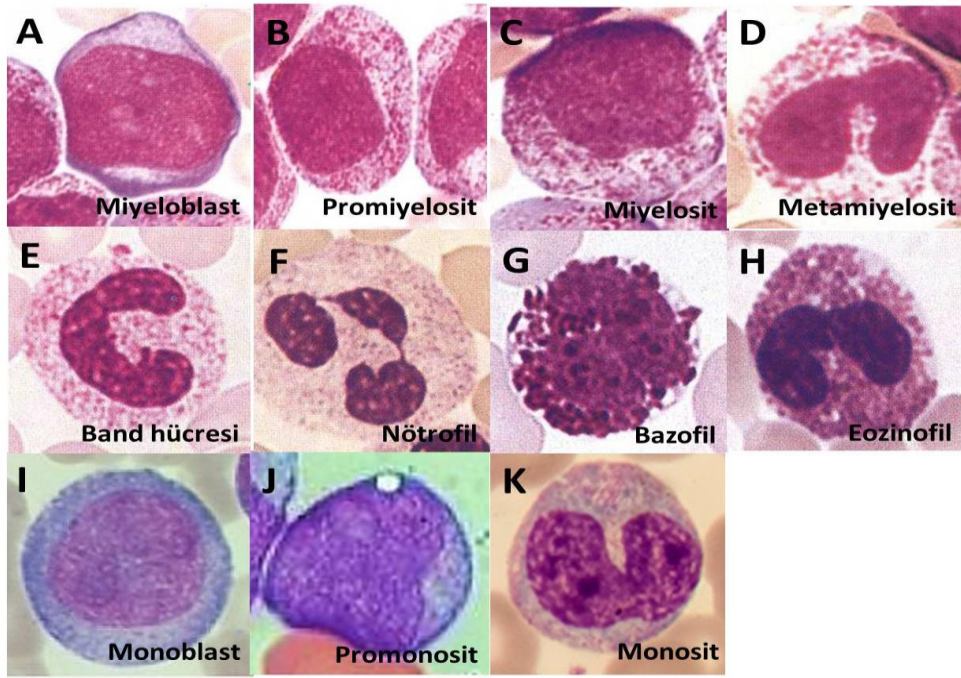
Farklılaşmanın çok erken basamaklarında blastların morfolojik değerlendirme ile miyeloblast, monoblast, lenfoblast veya eritroid seriyeye ait öncül hücre olan pronormoblast olarak ayırt edilmesi mümkün olmayıp, immünofenotiplendirilmesi ve peroksidaz, esteraz boyamaları yapılması gerekirken, miyelopoezdeki hücre basamakları genel olarak sitolojik değişimler ile ayırt edilir (19,20) .

Miyeloblastik hücreler 10-20 mikron büyüklüğündedir ve kümeleşme göstermeyen ince kromatinler bulunduran oldukça büyük bir nükleusa sahiptir. İnce kromatinler nedeni ile nükleus elek-benzeri veya ince granüler yapıda görünür. Nükleus 2-5 arası nükleolus içerir. Nükleus membranı oldukça incedir. Lenfoblastlar ise nükleus membranına yakın kümeleşmiş kromatinlere ve az sayıda nükleolusa sahiptir. Miyeloblast ve lenfoblastların ayırt edilmesinde nükleustaki bu farklılıklar büyük önem taşır. Sitoplazma bazofiliktir fakat lenfoblast ve normoblastlardan daha az bazofili görülür. Miyeloblastlarda granüller bulunmaz. Granül taşıyan miyeloblastların varlığı

patolojik değişimlere (örneğin, lösemi) işaret eder. Miyeloblastlardaki farklılaşma aşamalarının granül değişim ile belirlendiği üç tip hücre vardır. Tip-I miyeloblastlarda, granül bulunmazken, Tip-II miyeloblastlar, 20'den daha az granül içerir. Bazen auer cisimcikleri görülür. Tip-III miyeloblastlarda ise, 20'den fazla granül bulunur ve golgi cisimciği görülmez. Miyeloblastlar, normal kemik iliğinde nükleuslu hücrelerin %1-2'sini oluşturur, (Şekil 2.3A ve Tablo 2.1) (19,20) .

Promiyelositler, miyeloblastlardan kısmen daha büyüktür, (15-25 mikron). Miyeloid serinin en büyük hücresidir. Nükleusun da irileştiği görülür. İnce kromatinler ve nükleolusa sahiptir. İlerleyen aşamalarda nükleer membran boyunca kromatin yoğunlaşması görülür. Sitoplazması bazofiliktir ve belirgin miyeloperoksidaz (MPO) enzimi içeren azürofilik granüller göze çarpar. Endoplazmik granül belirgin olup genişlemiş vezikül şeklindedir. Hücreler hare görünümlü perinükleer golgi cisimciğine sahiptir. Nötrofil, bazofil, eozinofil granüositlerini promiyelosit aşamasında ışık mikroskobu ile ayırt etmek mümkün değildir. Lösemik promiyelositler normal olanlardan hipergranüler (auer cisimcikleri dahil) veya hipogranüler (bilobüle veya katlanmış nükleus bulunabilir) olmalarıyla ayırt edilir. Normal kemik iliğinde nükleuslu hücrelerin %5'ni oluştururlar ve fizyolojik koşullarda periferik kanda bulunmazlar, (Şekil 2.3B ve Tablo 2.1) (19,20) .

Miyelositler 16-24 mikron büyüklüğündedir ve bu hücrelerde nükleus genellikle yuvarlak olmakla beraber, bazen oval formda görülebilir. İnce kromatin ve nükleolus bulundurmazlar. Sitoplazmaları sekonder granüller nedeni ile pembemsi-gri renkte boyanır. Sekonder granüller bu aşamada oluşmaya başlar fakat çok küçük boyutlarda oldukları için görülmezler. Bu granüller, alkalen fosfataz (ALP), asit hidrolaz, lizozim ve diğer proteinleri içerirken, MPO enzimi taşımazlar. Miyelositler mitozun görüldüğü son aşamadır. Daha ileri farklılaşma aşamalarındaki hücrelerin mitotik aktiviteleri bulunmaz. Normal kemik iliğinde nükleuslu hücrelerin %20'sini oluştururlar, (Şekil 2.3C ve Tablo 2.1) (19,20) .



Şekil 2.3. Fizyolojik koşullardaki miyelopoezde, granülositik seri (A-H) ve monositik seri (I-K) olgunlaşma aşamalarında kazandıkları morfolojik karakterler. Hücreler wright-giemsma boyası ile boyanmıştır (19) .

Miyelositler, metamiyelosit aşamasına ilerlerken nükleus belirgin şekilde oval görünüm alır. Bu farklılaşma aşamasında DNA sentezi görülmez. Hücreler yaklaşık 15 mikron büyüklüğündedir. Normal kemik iliğinde nükleuslu hücrelerin %30'unu oluştururlar. Sadece bazı stres durumlarında periferik kanda bulunabilirler, (Şekil 2.3D ve Tablo 2.1) (19,20) .

Miyelositik farklılaşmanın bir ileri aşamasında hücreler band şeklindeki karakteristik nükleusları ile ayırt edildiği için "band hücresi" ismini alırlar. Tam olgunlaşmış ve farklılaşmış nötrofillerden önceki son farklılaşma basamağıdır. Periferik kan hücrelerinin yaklaşık %20'sini oluştururlar, (Şekil 2.3E ve Tablo 2.1). İlerleyen olgunlaşma aşamalarında nükleus segmentli bir hal alır. Segmentler ince lifler ile birbirine bağlıdır. Nötrofillerin nükleusu genellikle 2-5 segmentli bir yapı gösterirken, (Şekil 2.3F ve Tablo 2.1), eozinofillerde 2 segment görülür, (Şekil 2.3H ve Tablo 2.1). Bazofillerdeki nükleer bölünme 2-3 segmentli olup, yoğun granüllü sitoplazma nedeni ile gizlenmiştir, (Şekil 2.3G ve Tablo 2.1) (19,20) .

Monoblastların morfolojik olarak miyeloblastlardan ayırt edilmesi zordur; ancak immünofenotiplendirme veya diğer ileri teknikler ile ayırt edilebilirler. Bu hücreler yaklaşık 20 mikron büyüklüğündedir. Nükleus hücrenin büyük çoğunluğunu işgal eder. Düz kromatin ve 1-3 arası sayıda değişen nükleolus bulunur. Herhangi bir vakuol ve granül tipi bulundurmamayan dar sitoplazmaları Wright-Giemsa ile açık mavi boyanır, (Şekil 2.3I ve Tablo 2.1) (19,20) .

Promonositler, promiyelositler ile şekil, büyüklük, kromatin yapısı ve sitoplazmaları ile oldukça benzerdir. Promiyelositler kırmızı boyanan primer granüllere sahipken, bu granüller promonositlerde bulunmaz. Bu hücrelerde nükleolus da bulunmaz, (Şekil 2.3J ve Tablo 2.1) (19,20) .

Monositler, 12-22 mikron büyüklüğündedir. Nükleus yuvarlak, at-nalı veya lobüle olmak üzere çeşitli formlarda görülür. Kromatin katlanmış yapıda gözlenir. Sitoplazmik projeksiyonlar ve vakuoller görülür. Sitoplazma düzensiz bir şekle sahiptir, grimsi-soluk mavi renkte boyanır ve ince granüllere sahiptir. Monositler periferik kan hücrelerinin %2-10'unu oluşturur, (Şekil 2.3K ve Tablo 2.1) (19,20) .

Tablo 2.1. Fizyolojik koşullarda gerçekleşen miyelopoez sonucunda farklılaşan granülositik ve monositik seri hücrelerinin başlıca şekilsel özellikleri.

Hücre	Büyüklik	Nükleus	Sitoplazma
Miyeloblast	12-20 μm	Yuvarlak nükleus, ince kromatin, nükleolus	Genellikle bazofilik boyanma, bazen azürofilik granül bulunur
Promiyelosit	15-25 μm	Hafif girintili eksentrik yerleşimli nükleus, nispeten kalın kromatin, nükleolus	Bazofilik boyanan sitoplazma, çok sayıda azürofilik granül
Miyelosit	10-20 μm	Yuvarlak veya oval nükleus, kalın kromatin, nükleolus bulunmaz	Hücre olgunlaşması ile kaybolan bazofili, sekonder granüller
Metamiyelosit	12-18 μm	Oval nükleus, kalın, girintili ve kümeleşmiş nükleus	Pembe veya soluk mor boyanma gösteren sekonder granüller
Band hücresi	10-12 μm	Band formunda ve bazen katlanmış şekilde bulunan nükleus	Pembe veya soluk mor boyanma gösteren sekonder granüller
Nötrofil	9-15 μm	2-5 adet lob, kalın kromatin	Bol sitoplazmik yapı
Eozinofil	9-15 μm	2 adet lob, kalın kromatin	Kırmızı-turuncu renkte granül bulunduran bol sitoplazma
Bazofil	10-16 μm	Bilobüle veya 2-3 adet lob	Koyu mor ve/veya mavi-siyah boyanan granüller nedeni ile nükleus ayırt edilmez
Monoblast	12-20 μm	Hücrenin büyük kısmını kaplar, 1-3 nükleolus	Granül ve/veya vakuol bulunmaz, açık mavi boyanma
Promonosit	14-18 μm	Hafif girintili ve büyük ,nükleolus bulunmaz	Dar sitoplazma
Monosit	12-22 μm	Yuvarlak, at-nalı veya lobüle	Sitoplazmik projeksiyon, vakuol, grimsi-soluk mavi boyanma

2.1.2. Miyelopoezin Moleküler Biyolojisi

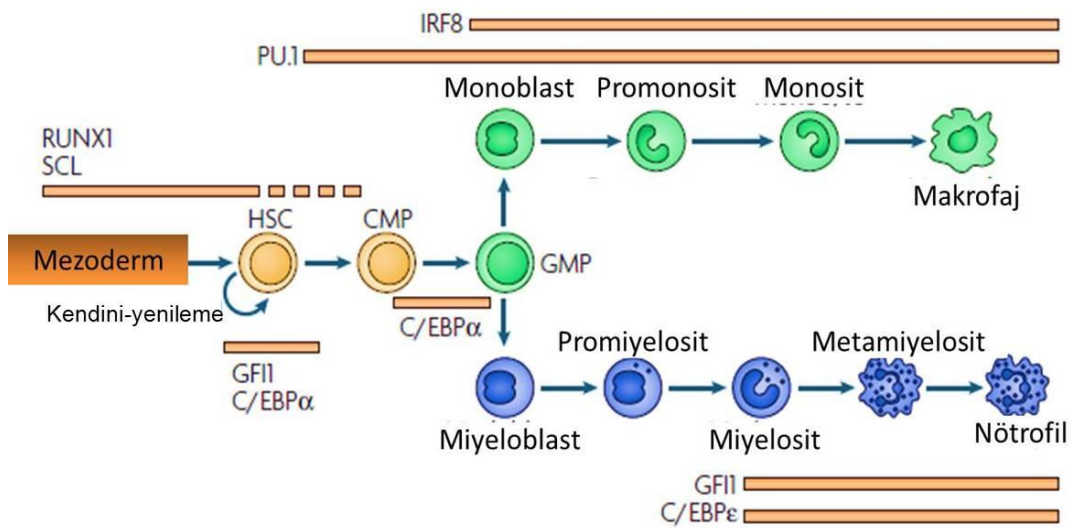
Miyeloid öncül hücrelerin (CMP), granülosit-makrofaj öncül hücrelere (GMP) farklılaşabilmesi için c-kit ligand, interlökin (IL)-3, IL-6, Flt3 ligand, granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*, GM-CSF), granülosit koloni uyarıcı faktör (*granulocyte colony-stimulating factor*, G-CSF) ve makrofaj koloni uyarıcı faktör (*macrophage colony-stimulating factor*, M-CSF) gereklidir (21) . Fizyolojik koşullarda, yaklaşık olarak bir saat içinde 10^8 - 10^9 granülosit ve makrofaj üretilirken, enfeksiyon veya inflamasyon durumlarında bu hücrelerin kemik iliğindeki üretimi artar. Dalağın marjinal bölgesinde ve kemik iliğinde depolanan miyeloid hücreler enfeksiyon alanına hızla göç ederler (22) . GM-CSF, granülosit göçünü engelleyerek hücrelerin olgunlaşması için gereken sinyalleri almasına izin verir (23) . Ayrıca, süperoksit üretimini destekleyerek bu hücreleri aktivasyona hazırlar (24) .

Miyeloid hücre farklılaşması, bu hücrelere özgü genleri içeren kromatinlerin yapılandırılması ve metilasyon gibi epigenetik değişikliklerin kademeli olarak gerçekleşmesi ile kontrol edilir. Örneğin, öncül hücrelerde lizozomal genler inaktif durumda iken, olgun makrofajlarda bu genler en yüksek ekspresyon düzeylerine ulaşır (25,26) . Miyelopoezin düzenlenmesinde transkripsiyon faktörlerinin ekspresyon düzeyleri önemlidir, (Şekil 2.4). Akut miyeloid lösemi 1 protein (*acute myeloid leukemia 1 protein*, AML1) olarak da bilinen runt-ilişkili transkripsiyon faktörü 1 (*runt-related transcription factor 1*, RUNX1) HSC'lerde eksprese olmasına karşılık miyelopoezi baskılayıcı fonksiyona sahiptir.

Ets ailesine ait bir transkripsiyon faktörü olan PU.1 (Spi-1), farklı hematopoietik hücrelerde farklı seviyelerde ifade olur. Hematopoetik kök hücreler ve ortak miyeloid veya lenfoid öncüllerde benzer düzeyde eksprese edilirken, makrofajlarda PU.1 ekspresyon düzeyi artar. Düşük düzeylerdeki PU.1 ise, granülositik gelişimi destekler, (Şekil 2.4). CD11b, makrofaj koloni uyarıcı faktör (*macrophage colony-stimulating factor*, M-CSF), GM-CSF reseptör alfa (GM-CSF-R α), granülosit koloni uyarıcı faktör (*granulocyte*

colony-stimulating factor, G-CSF) reseptörü (G-CSF-R) ve immünoglobülin (Ig) hafif zincirini kodlayan genlerin transkripsiyonunu düzenler (15,27-30) .

CCAAT/*enhancer* bağlanma proteini (CCAAT-*enhancer-binding protein*, C/EBP) ailesi transkripsiyon faktörleri hepatosit, adiposit ve miyeloid hücrelerin farklılaşmasının düzenlenmesinde etkilidir ve terminal farklılaşmaya yönelen hücrelerde düzeyleri artar, (Şekil2.4) (31) .



Şekil 2.4. Miyeloid farklılaşma sırasında transkripsiyon faktörlerinin değişimi. HSC, hematopoetik kök hücre (*hematopoietic stem cell*); CMP, ortak miyeloid öncül hücre (*common myeloid progenitor*); GMP, granülosit-makrofaj öncül hücre (*granulocyte-macrophage progenitor*); RUNX1, runt-ilgili transkripsiyon faktörü 1 (*runt-related transcription factor 1*); SCL, lösemi kök-hücre faktörü (*stem-cell leukaemia factor*); IRF8, interferon-düzenleyici faktör 8 (*interferon-regulatory factor 8*); GFI1, büyüme faktöründen bağımsız 1 transkripsiyon baskılayıcısı (*growth factor independent 1 transcription repressor*); C/EBP, CCAAT/*enhancer* bağlanma proteini (CCAAT-*enhancer-binding protein*), (Rosenbauer, F. ve D.G. Tenen, 2007'den uyarlanmıştır).

CMP hücrelerinden GMP'lerin farklılaşması sırasında C/EBP ailesi üyelerinden C/EBP-α gereklidir. Bu transkripsiyon faktörü HSC'ler, miyeloid öncüller ve granülositlerde eksprese olurken, makrofajlarda saptanmamıştır. C/EBP-α-yoksun (*knock-out*, KO) farelerde CMP'lerin oluşumu gözlenirken,

GMP hücreleri ve granülositik seriler oluşmamıştır (15) . Miyeloid öncül hücrelerin granülositlere farklılaşması sırasında C/EBP- β ve C/EBP- ϵ ekspresyon düzeylerinde artış, C/EBP- Δ düzeylerinde kısmi artış ve C/EBP- α ekspresyonunda azalma saptanmıştır (32,33) . Ayrıca, bu farklılaşmada büyüme faktöründen bağımsız 1 transkripsiyon baskılayıcısının (*growth factor independent 1 transcription repressor*, GFI1) ekspresyonu da artar. Bu faktörden yoksun farelerde lenfosit öncüllerinde farklılaşma bozuklukları ve nötrofillerin promiyelositik aşamada kalarak olgunlaşmadığı görülmüştür, (Şekil 2.4) (15) .

İnterferon-düzenleyici faktör 8 (*interferon-regulatory factor 8*, IRF8) öncül hücreler ve makrofajlar tarafından eksprese edilebilirken, granülositlerde ekspresyonu görülmez. IFN- γ bu ekspresyonu güçlendirirken, IFN tarafından uyarılmış protein 15 kDa (*IFN-stimulated protein of 15 kDa*, ISG15) gibi bir çok IFN yanıt geni bu faktörün ekspresyonunu negatif yönde düzenler, (Şekil 2.4) (15) .

2.2. Akut Miyeloid Lösemi

Lösemi, farklı gelişim basamaklarında bulunan hematopoetik öncül hücrelerin malign dönüşümü sonucunda meydana gelir. Bu hücreler, farklılaşmaya uğrayamaz, apoptoz yeteneğinden yoksundur ve kontrolsüzce çoğalır (3,4) . Köken aldıkları hücre serisine göre lenfoid veya miyeloid; sağkalım ve olgunlaşma özelliklerine göre de akut veya kronik olarak sınıflandırılırlar. Akut lösemiler, akut miyeloid lösemi (AML) ve akut lenfoblastik lösemi (ALL) olmak üzere iki ana kategoriye ayrılır. Akut lösemi hücreleri kemik iliği, kan ve diğer dokulara infiltre olabilir.

Farklılaşmanın erken basamaklarında hematopoetik hücre öncüllerinde meydana genetik değişiklikler sonucunda normal hematopoez sekteye uğrar. AML, kemik iliği ve periferik kanda çok sayıda anormal olgunlaşmamış miyeloid hücre birikmesiyle karakterizedir. Lökomogenez hemopoetik öncül hücrelerin farklılaşma kapasitelerini etkileyen çok basamaklı bir süreçtir (4) .

AML, her yaş grubunda görülebilir; ancak, insidansı yaşla birlikte artar (34) . Erişkin çağı lösemilerinin %85'i, çocukluk çağı lösemilerinin ise %15'i AML'dir. Neonatal dönemde ve ergenlik döneminde AML insidansında ALL'ye göre artış görülmektedir. Hastalığın sıklığı Amerika Birleşik Devletlerinde, yılda 3-5/100.000 düzeylerinde seyretmektedir. Hastanın yaşı yanında lösemik klonun sitogenetik ve moleküler özellikleri prognozu belirleyen en önemli parametrelerdir (35) .

AML hastalarında enfeksiyon riskini arttıran en önemli faktör nötropenidir. Ancak, sadece sayısal azalma değil, olgun nötrofillerde de yapısal bozukluklar belirlenmiştir. Örneğin, AML hastalarında azalmış fagositoz ve miyeloperoksidaz aktivitesi ile enfeksiyon komplikasyonları arasındaki ilişki gösterilmiştir (36) . Ayrıca, AML'de hematopoetik kök hücrelerin sayısının azalmadığı belirlenmiş ve bu hücrelerden köken alan öncül hücrelerin sayısındaki düşüş nedeniyle sitopeni geliştiği gösterilmiştir (37) .

2.2.1. AML'de Genetik Değişimler

Akut lösemili hastalarda çok sayıda somatik mutasyon belirlenmiştir. Bu mutasyonlar sayesinde AML hücreleri çoğalabilme ve yaşama avantajı kazanır. DNA'da meydana gelen çift taraflı kırılmalar, genomik delesyonlar, nokta mutasyonları ve kromozom translokasyonlarına AML hücrelerinde sık rastlanır (38-40) . AML'de en sık rastlanan kromozomal anomaliler; t(8;21), t(15;17), inv(16), t(9;11) ve t(16;16)'dır. Bu kromozomal bozukluklara AML olguların yaklaşık %40'ında rastlanır. Tanımlanmış olan diğer kromozomal bozukluklar ise olguların %10'undan azında görülmektedir. Geri kalan %50 olguda normal karyotip saptanmakta veya kromozomal anomali gözlenmemektedir (41) .

Kor bağlayıcı faktör (*core binding factor*, CBF) mutasyonu bulunduran AML'ler, t(8;21) inv(16)/t(16;16) kromozomal bozuklukları içerir. CBF gurubundaki genler bir çok dokunun farklılaşmasında rol oynayan çeşitli hedef genlerle heterodimer kompleksi oluşturarak işlev görür. CBF genleri RUNX1 ve CBFβ genlerini içerir. Bu genlerden RUNX1 hematopoezin

gerçekleşmesini düzenlerken, CBFB bu kompleksin proteolizini engeller. Kromozomal bozukluklar sonucunda oluşan kimerik proteinler normal CBF aktivitesini engelleyerek fonksiyon bozukluklarına neden olur 16. kromozomun inversiyonu (i(16)) sonucu CBF genlerinden CBF- β 'da da fonksiyon bozuklukları meydana gelir ve inv(16)/t(16;16) sonucu CBFB ve miyozin ağır zincir 11 (*myosin heavy chain 11*, MYH11) füzyonu (CBFB-MYH11) oluşur. Bu füzyonun görüldüğü AML'ler genellikle iyi prognoza sahip akut miyelomonositik lösemilerdir. Ayrıca anormal tipte eozinofiller de gözlenir.

Akut miyeloid lösemi-1 transkripsiyon faktör (*acute myeloid leukemia-1 transcription factor*, AML1) ve 8-21-eşbaskılayıcı (*8-21 corepressor*, ETO) translokasyonu sonucu t(8;21) AML1-ETO1 füzyonu oluşur. Buradaki AML-1, CBF'nin α -1 alt-gurubu üyesidir ve DNA'ya bağlanarak transkripsiyonu başlatma özelliğine sahiptir. Bu translokasyonu taşıyan hastalar iyi prognoz gösterir (10) .

t(15;17) ve t(11;17) translokasyonu sonucu 17. kromozomda bulunan retinoik asit reseptör alfa (*retinoic acid receptor alpha*, RAR- α) ile 15. kromozomda bulunan promiyelositik lösemi (PML) geni yada 11. kromozomda bulunan promiyelositik lösemi çinko parmak (*promyelocytic leukemia zinc finger* PLZF) geni füzyon oluşturur. Her iki durumda da miyelopoez promiyelositik aşamada durdurur ve farklılaşma engellenir. Bu kimerik proteinleri taşıyan hastalar all-trans retinoik asit (ATRA) ile tedavi edilebilir. ATRA, PML-RAR- α füzyon proteinine bağlanır ve bu füzyon proteininin degradasyonuna neden olur; böylelikle hücrelerin farklılaşmaya yönelmelerini sağlar. t(15;17) translokasyonu M3 AML alt-tipine özgündür ve olguların %95'inde tanı sırasında görülür. Bu kimerik protein çocukluk çağı AML'lerin %8-%15'ini, yetişkin AML'lerin ise %5-%12'sini oluşturur (10) .

Mixed-lineage lösemi (MLL) geninin 11q23 bölgesini içeren translokasyonlar AML yanında ALL'de de görülür. Erken dönem çocukluk çağı lösemilerinde en sık görülen genetik bozukluktur. Tedaviye bağlı gelişen sekonder AML vakalarında da sık rastlanır. MLL ile ilişkili lösemilerin fenotipik benzerlikleri ve özellikle M1-M2 alt-tipinde olmaları transformasyona yol açan

mekanizmanın MLL'nin partnerlerinden çok kendisi olduğunu düşündürmektedir. Translokasyon t(9;11) sonucu oluşan MLLT3-MLL füzyon proteini görülen vakalarda hücreler monoblast ve/veya promiyelositik karakterdedir. t(4;11) translokasyonunun sonucu oluşan *ALL1-Fused Gene From Chromosome 4 Protein* (AF4) ve MLL füzyonu tüm akut lösemiler için kötü prognoza işaret ettiği kabul görmektedir (10) .

Homeotik genler (HOX ve CDX ailesi), omurga gelişiminde ve fizyolojik koşullardaki hematopoezin gerçekleşmesinde büyük öneme sahiptir. HOX genlerinin ekspresyon dinamiği özellikle hematopoezde çok sıkı olarak kontrol edilmektedir. AML'de bu genlerin farklı formları MLL geni ile translokasyon yapar ve böylece normal hematopoezi düzenleyici fonksiyonlarını kaybederler. Bu translokasyonlar hematopoetik öncüllerin normal fonksiyonlarını kısmen engeller ancak, lösemi gelişimine neden olabilmeleri için ilave mutasyonlara ihtiyaç vardır (10) .

FLT3, c-kit, RAS, AML-1, GATA-1 ve C/EBP- α mutasyonlarının tümü AML olgularının yaklaşık yarısında görülmektedir. AML olgularının bir bölümünde AML1 mutasyonları, GATA-1 ve C/EBP- α geni fonksiyon kaybına neden olan mutasyonlara da rastlanmaktadır (10) .

Genetik yatkınlığın yanı sıra, genotoksik ilaçlar ve çevresel ajanlara (radyasyon, benzen, sigara, petrol ürünleri, etilen dioksit, herbisit ve pestisit) maruz kalma ve mesleki faktörlerin lökomojenik etkisi olduğu öne sürülmektedir. Kemoterapötik ajanların kullanımı akut lösemi riskini artırır. Sekonder (tedavi sonucu meydana gelen) AML, alkilleyici ajanlar ve topoizomera-2 inhibitörlerinin kullanımını takiben ortalama 3-5 yıl sonra gelişebilmektedir. Bu olgularda, AML öncesinde miyelodisplastik bozukluklar görülür. Otolog kök hücre nakli öncesinde yüksek doz kemoterapi ve hemopoetik büyüme faktörü desteği, myelodisplastik sendrom (MDS) ve AML riskini arttırabilir. Ayrıca, primer MDS tanısı almış hastaların %30'unda AML gelişme riski vardır (42-46) . Down sendromu, Bloom's sendromu, ataksi telenjektazi, Fanconi anemisi gibi kalıtsal hastalıklarda da AML gelişme oranının arttığı belirlenmiştir (47,48) .

2.2.2. AML Sınıflaması

AML heterojen bir hastalıktır. Bu hastalığın biyolojisinin anlaşılabilmesi ve tedavisi için sınıflandırılması büyük önem taşır. 1976 yılında Fransız, Amerikan ve İngiliz bir grup hematolog tarafından akut lösemi (*French-American-British*, FAB) sınıflaması oluşturulmuştur. FAB sınıflamasında akut lösemiler, hücrelerin morfolojik ve sitokimyasal boyanma (örneğin Wright-Giemsa, May-Grünwald Giemsa) özelliklerine göre gruplandırılmıştır. FAB, elektron mikroskopisi, sitogenetik, moleküler biyoloji yöntemlerini ve nadir lösemi tiplerini içermeyen bir sınıflamadır (5) . Akut lösemide sitogenetik ve moleküler genetik bozuklukların hastalığın seyrine etki etmesi nedeni ile, yeni bir sınıflamaya ihtiyaç duyulmuştur. 2001 yılında Dünya Sağlık Örgütü (*World Health Organization*, WHO) tarafından akut lösemiler de dahil olmak üzere hematopoetik ve lenfoid kanserleri içeren ve güncel tanı yöntemleri ile alınan sonuçları dahil eden yeni bir sınıflama yapılmıştır (6) .

AML tanısında hücre yüzey antijenlerinin varlığı veya düzeyi hastalık alt-grupların belirlenmesinde ve sınıflandırılmasında ayırt edicilik sağlar (49) . CD34, CD117, CD33, CD13, CD15, CD4, CD11b, HLA-DR ve sitoplazmik miyeloperoksidaz (cMPO) bu belirteçler arasında yer alır. CD117, CD13 ve CD33 myeloid seriye ait en erken gösterilebilen antijenlerdir. Daha immatür hücrelerin göstergesi olan CD34 ile birlikte de gözlenebilirler. MPO, lizozim ve triptaz miyeloid hücrelerin en önemli belirteçlerinden biri olarak kabul edilmektedir. MPO granülositik seriye ait, triptaz ise mast ve bazofil hücrelerine farklılaşmanın bir göstergesidir. CD15, olgun nötrofiller; CD14 olgun monositler tarafından eksprese edilir. Bununla birlikte, ortak öncüllerde CD14 ve CD15'in birlikteliği bu belirteçlerin kullanımını zorlaştırır. Megakaryositik lösemi tanısında kullanılan CD61, CD41 ve CD42 ise bu seriye ait özgül belirteçlerdir, (Tablo 2.2) (50,51) .

Farklılaşma göstermeyen (*undifferentiated*) AML-M0: M0-AML blastları M1 miyeloblast veya L2 lenfoblastlara benzerlik gösterir. Çok az vakada ise M5 monoblastlara benzediği rapor edilmiştir. Granülositik seriye özgü

bazofilik granüllere sahiptir. Sıklıkla CD13,CD15 veya CD33 ve MPO ekspresyonu bulunur. M5-AML'den spesifik-olmayan esteraz (*non-specific esterase*, NSE) aktivitesi göstermemesi ile ayırt edilir, (Tablo 2.2) (10,52,53) .

Minimal Farklılaşma gösteren AML-M1: M1 blastlar genellikle orta veya büyük boyutlarda, farklı nükleositoplazmik oranlarda, oval veya yuvarlak nükleuslu, bir veya daha fazla nükleolusa sahip, sitoplazmasında *Auer* cisimcikleri, az miktarda granül ve vakuol bulundurmaları ile karakterizedir. *Auer* cisimcikleri sitoplazmik inklüzyonlarda veya sitoplazmik vakuollerde görülebilir. M2 AML vakalarından kemik iliğinde %10'dan fazla eritroid-olmayan hücre bulunması ve granülositik yapılara sahip promiyelosit/nötrofil arasındaki olgunlaşma basamaklarında yer alan hücrelerin bulunması ile ayırt edilir. Sıklıkla CD13, CD14, CD15, CD33 ve CD34 belirteçlerinin pozitifliği görülür, (Tablo 2.2) (10,52,53) .

Farklılaşma gösteren AML-M2: M2 ve M3 AML'de promiyelositten miyelosite kadar farklılaşma basamaklarında yer alan granülositik karakterde hücreler (promiyelosit, miyelosit, metamiyelosit ve granülosit) görülür. Bu gruptaki promiyelositler, normal promiyelositlerden yoğun granüllü olmaları ile ayrılır. Bu hücrelerde *Auer* cisimcikleri de görülebilir. Bu nedenle, M1 AML'nin tersine, blastlar tip-2 (20'den az sayıda granül ve bazen *Auer* cisimcikleri görülür) karakterdedir. Granülositler, hiper veya hipogranüledir ve nükleusta şekil bozuklukları dikkat çeker. M4 AML'den kemik iliğinde %20'den az monositik hücre bulunması ve miyeloid farklılaşma karakteristiklerini göstermemesi ile ayırt edilir. Az sayıda vakada bazofilik (M2Baso) ve nötrofilik (M2Eo) farklılaşma görülmüştür.

Bu karakterdeki hücreler M2 alt-tipi AML vakalarının %30'unu oluşturur. M1 AML'den ise daha yüksek miyeloperoksidaz (MPO) aktivitesine sahip olması ile ayırt edilir. PAS ve NSE negatiftir. NAP skoru bu alt-tipte düşüktür. Sıklıkla CD13 ve CD15 pozitifliği görülür, (Tablo 2.2) (10,52,53) .

Akut hipergranüler promiyelositik lösemi, AML-M3: Olguların çoğunda kemik iliğindeki blastik hücreler %30'dan daha azdır. Baskın hücre tipi anormal karakterdeki promiyelosittir. Sitoplazmaları yoğun paketlenmiş, iri taneli kırmızı veya mor granüllüdür. Nükleus zor ayırt edilir. Diffüz kromatin paterne sahip nükleus görülür. Nükleus sitoplazmaya göre daha yavaş olgunlaşır. Bu durum nükleer-sitoplazmik asenkroni olarak tanımlanır. Bir veya daha fazla nükleolus bulunabilir. Nükleus böbrek biçiminde katlanmış veya loblar arasında dar bir bağlantı bulunan bilobüler karakterdedir. M3 vakalarda Auer cisimcikleri yaygın olabilir. Yine de, hücre popülasyonunun bir kısmı agranüler olabilir veya az granüllü ve soluk kırmızı, pas rengi boyanan granüllere sahip olabilir. Granül bulunmayan hücrelerin sitoplazmasında hematoksilin-eozin ile pembe boyanan hiyalin materyal bulunur. M3 AML'de bazofilik ve nötrofilik farklılaşma görülebilirken, eritroid ve megakaryositik serilerde displastik değişimler görülmez. M3 AML'deki baskın promiyelositik karakter all-trans retinoik asit (*all-trans retinoic acid*, ATRA) ile olgunlaşmaya yönettirebilir. Ancak, olgunlaştırılan bu hücreler yine de sitolojik olarak anormaldir. Genellikle nötrofil sayısında, bazı vakalarda ise bazofillerde artış görülür. Metamiyelositlerde ve nötrofillerde Auer cisimciklerine rastlanır.

M3 alt-tipi, AML vakalarının %5-10'unda rastlanır. Hipergranüler promiyelositler MPO bakımından kuvvetli pozitifdir. Periyodik asit schiff (*periodic acid schiff*, PAS) reaksiyonu ile sitoplazma toz görünümlü kırmızı renkte boyanır. Reaksiyon M1 veya M2 AML'den daha kuvvetlidir. PAS-pozitif eritroblastlar gözlenmez. Asit fosfataz reaksiyonu kuvvetli pozitifdir. Bazofilik farklılaşma gösteren vakalar toluidin mavisi ile metakromatik boyanırlar. Translokasyon t(15;17) bulunduran vakalarda CD2 ve CD19 pozitifliği bulunurken, sıklıkla HLA-DR ve CD34 negatiftir, (Tablo 2.2) (10,52,53) .

Akut miyelomonositik lösemi, AML-M4: M4 AML tanısı için granülositik ve monositik farklılaşma beraber olmalıdır. Promonositlerin granülleri genellikle yoğundur ve bu durum promiyelositlerden (M2-AML) ayrımlarını zorlaştırır. Sitokimya ile bu ayırım yapılabilir. FAB kriterlerine göre monositik farklılaşma

için, naftol AS asetat esteraz (NASA), naftol AS-D asetat esteraz (NASDA) aktivitesi veya alfa naftol asetat esteraz (ANAE) aktivitesi gereklidir. Kemik iliği incelemelerinde M2 AML'den ayırt edilemiyorsa, periferik kan incelenmesi M4 AML tanısı için önemlidir.

M4 AML'deki granülositik farklılaşma genelde nötrofilik; bazı vakalarda ise, eozinofilik (M4Eo), bazofilik (M4Baso) veya ikisi birden de olabilir. M4 alt-tipi AML vakalarının %15-20'sinde görülür. Sitokimyasal incelemelerde bazı hücreler tipik nötrofil, eozinofil ve bazofilik seri özelliklerini gösterirken; diğerleri tipik monositik seri karakteristiklerine sahiptir. Nötrofil ve monosit serilerini ayırt etmek için kullanılan kloroasetat esteraz (CAE) (nötrofil için) ve ANAE (monosit için) ikili boyamaları da AML-M4 farklılaşma ve olgunlaşma basamaklarını gösterir. Sıklıkla CD13, CD33, CD11b ve CD14 belirteçlerini taşırlar, (Tablo 2.2) (10,52,53) .

Akut monositik/monoblastik lösemi, M5-AML: Deri ve diş etlerinde görülen infiltrasyonlar M5 AML'yi düşündürülebilir. Bu alt-tip kemik iliğindeki monositik bileşenlerin en az %80'inin monoblast olması ile, M5a (akut monoblastik lösemi) ve M5b (akut monositik lösemi) olmak üzere iki gruba ayrılır. Monoblastlar bol sitoplazmalı, bazen vakuol içeren, bazofilik ve dağınık azürofilik granüller bulunduran büyük hücrelerdir. Auer cisimcikleri yaygın değildir. Nükleus, ince kromatin paternlere sahip, bir veya daha çok belirgin büyüklükte nükleoluslu, yuvarlaktan (en ilkel monoblast) kıvrımlı şekle kadar çeşitlilik gösterir. Promonositlerde, azürofilik granüller dikkat çeker ve monoblastlardan daha bazofiliktir. Monositler, daha az nükleositoplazmik orana, loblu nükleusa ve daha az bazofilik karaktere sahiptir. Bazen vakuollü sitoplazma görülür. Periferik kandaki lösemi hücreleri kemik iliğindekiyle kıyasla daha matüredir. Bazı akut monositik lösemi olgularında hücreler makrofaj veya histiyosit karakterindedir.

M5 alt-tipi, AML vakalarının %15'ini oluşturur. M5 AML'de (granülositik matürasyon gösteren diğer AML tiplerinde düşük olan) nötrofil alkali fosfataz (NAP) aktivitesi genellikle normal veya yüksektir. Sıklıkla CD11b ve CD14 pozitifliği görülür, (Tablo 2.2) (10,52,53) .

Akut eritroid lösemi, M6-AML ve Akut megakaryoblastik lösemi, M7-AML: M6 alt-tipi MDS'nin lösemik dönüşümünü gösterir. Üç seride (miyeloid, lenfoid, eritroid) meydana gelmiş bozukluk karakteristiktir ve hastalığın seyri kötüdür. FAB kriterlerine göre M6 AML tanısı için, kemik iliğinde eritroblast sayısının %50'den fazla ve eritroid olmayan hücrelerin de %30'dan fazlasının blastik karakterde olması gereklidir. Bu alt-tip, AML vakalarının %3-4'ünü oluşturur. Sıklıkla CD13, CD33, CD34, HLA-DR ve MPO pozitifliği gösterirler, (Tablo 2.2) (10,52,53) .

AML-M7 kategorisinde değerlendirilen lösemik megakaryoblastlar oldukça pleomorfiktir. Bazı vakalarda blastlar miyeloblastlardan ayırt edilemez veya lenfoblastik karakterdedir. Klinik tablo genellikle akut miyelofibrosis ile karakterizedir. Sıklıkla CD41, CD42 ve CD61 belirteçlerini taşırlar, (Tablo 2.2) (10,52,53) .

Tablo 2.2. AML’de FAB sınıflamasına göre yüzey antijenlerinin ekspresyon düzeyleri. FAB sınıflamaları ve yüzey belirteçlerini bulundurma yüzdeleri araştırıldığında, kırmızı >%80; mavi, %30-%75 arası; yeşil, %10-%30 arası ve gri, <%10 ekspresyon göstermektedir (54) .

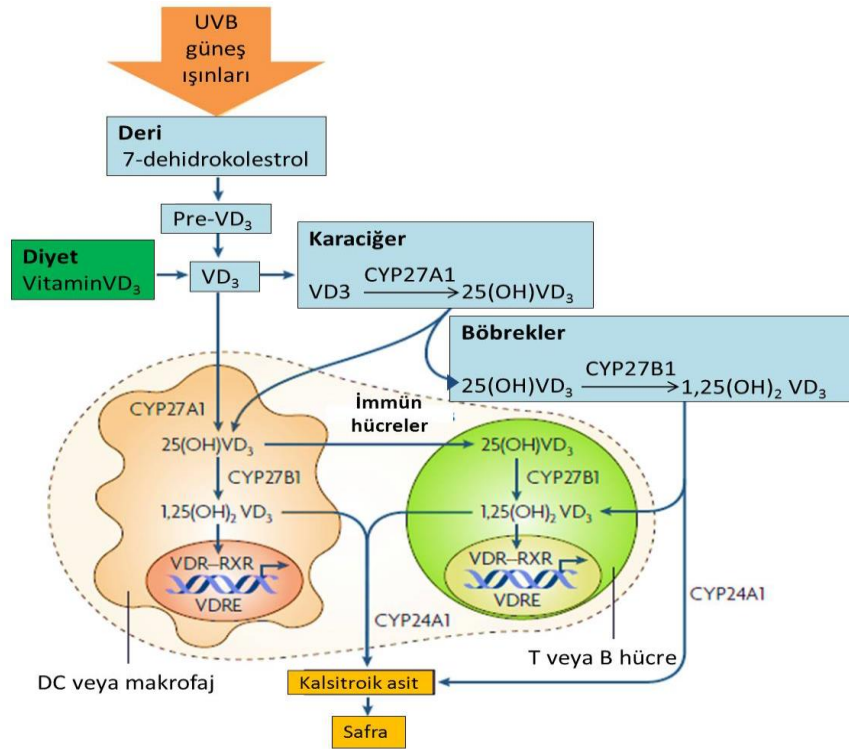
FAB alt-tipi	İsim	immunofenotip
M0	Undiferansiye akut miyeloblastik lösemi	CD34, CD38, CD117, MPO, HLA-DR, CD13, CD33, CD45, CD15, CD65
M1	Minimal farklılaşma gösteren akut miyeloblastik lösemi	CD34, CD117, MPO, HLA-DR, CD13, CD33, CD15, CD65
M2	Farklılaşma gösteren akut miyeloblastik lösemi	CD34, CD117, MPO, HLA-DR, CD13, CD33, CD15, CD65
M3	Akut promiyelositik lösemi (APL)	CD34, CD117, MPO, HLA-DR, CD13, CD33, CD15, CD65
M4	Akut miyelomonositik lösemi	CD34, CD117, MPO, HLA-DR, CD13, CD33, CD15, CD65, CD14, CD36
M4 eos	Eozinofili ile seyreden akut miyelomonositik lösemi	CD13, CD33, CD15, CD65, CD14, CD36
M5	Akut monositik lösemi	CD34, CD117, MPO, HLA-DR, CD13, CD33, CD15, CD65, CD14, CD36
M6	Akut eritroid lösemi	CD34, CD117, MPO, HLA-DR, CD13, CD33, CD15, CD65, GPA, CD36
M7	Akut megakaryoblastik lösemi	CD34, CD117, HLA-DR, CD13, CD33, CD15, CD65, GPA, CD36, CD41a, CD61, CD42

■ > %80
■ %30-75
■ %10-30
■ < %10

2.3. D Vitamini

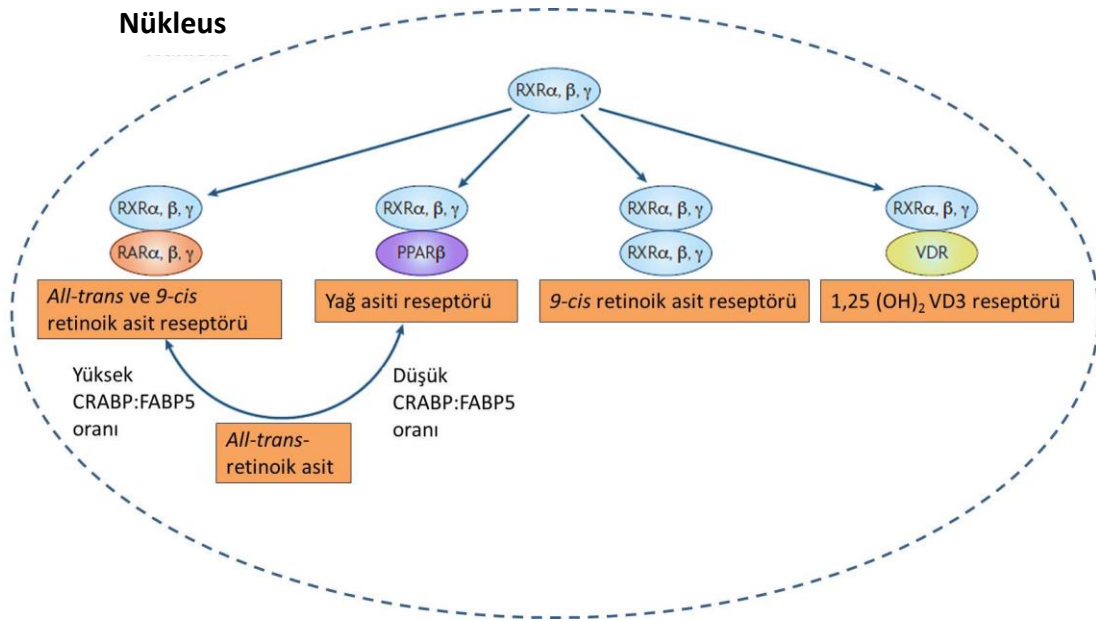
D vitamini, ilk kez raşitizm hastalığında kalsiyum ve fosfat metabolizmasında görevli bir vitamin olarak tanımlanmıştır. İlerleyen yıllarda bu vitaminin steroid hormon benzeri bir etkiyle vücut homeostazının (immün sistem, kas-iskelet sistemi, kardiyovasküler sistem, embriyonik gelişim, tiroid fonksiyonları) sağlanmasında ve bazı hastalıklarda büyük öneme sahip olduğu keşfedilmiştir (55) .

Vitamin D, besin kaynaklarından temin edilebilirken, vücutta da sentezlenebilir. Besinlerden vitamin D2 (ergokalsiferol) ve vitamin D3 (kolekalsiferol) olmak üzere iki formda alınabilir. Vitamin D, deride ultraviyole güneş ışınlarının etkisiyle ilk olarak 7-dehidrokolestrolden (7-DHC) öncül vitamin D3 (pre-VD3) formuna sentezlenir. Diyetle alınan veya deride sentezlenen vitamin D3 (VD3), karaciğerde sitokrom P450 protein (CYP27A1) ile dolaşımda bulunan 25-dihidroksivitamin D3'e (25(OH)VD3) hidrolize olur. Böbreklerde sitokrom P450 protein (CYP27B1) ile en aktif hali olan 1 α -,25-dihidroksivitamin D3 (D3) metabolitine dönüşür. D3, CYP24A1 enzimi ile inaktif formu olan kalsitroik aside dönüşür ve safra ile atılır (56-58) . D3 sentezi karaciğer ve böbreklerde gerçekleştiği gibi, bu dönüşüm bazı immün sistem hücreleri tarafından da metabolize edilebilir. Aktive T ve B hücreler vitamin D3 sentezinin son basamağını (1 α -,25-dihidroksivitamin D3'e dönüşümü) gerçekleştirebilirken; makrofajlar, monosit-kökenli dendritik hücreler ve dermal dendritik hücreler, diğer sentez basamaklarını da gerçekleştirebilecek enzimlere sahiptir, (Şekil 2.5) (56,58-60) .



Şekil 2.5. D vitamini sentezi ve oluşan ara metabolitler. VD₃, vitamin D₃; CYP27A1 ve CYP27B1, sitokrom P450 protein; 25(OH)VD₃, 25-dihidroksivitamin D₃; 1,25(OH)₂ VD₃, 1 α ,25-dihidroksivitamin D₃, (Mora., 2008'den uyarlanmıştır) (58) .

D₃, biyolojik aktivitesini nükleusta bulunan vitamin D reseptörüne (VDR) bağlanarak gerçekleştirir. Bu reseptöre bağlanmasının ardından, VDR retinoik X reseptör (RXR α , β , γ) ailesi ile heterodimer oluşturur. Bu transkripsiyon faktörleri hedef genlerin promoter bölgelerinde yer alan D₃ yanıt bölgelerine (*vitamin D response element*, VDRE) bağlanır ve transkripsiyonel düzenlenme gerçekleşir, (Şekil 2.6) (58,61) . VDR ekspresyonu lenfosit, monosit ve dendritik hücrelerde belirlenmiştir (62,63) .



Şekil 2.6. A ve D vitaminlerinin sırasıyla, en aktif metabolitleri olan all-trans retinoik asit (ATRA) ve 1 α ,25-dihidroksivitamin D3 (D3)'ün nükleer reseptörleri. RXR α , β , γ , retinoik X reseptör; RAR- α , β , γ , retinoik asit reseptör (*retinoic acid receptor*); PPAR, peroksizom proliferatör ile aktive reseptör (*peroxisome proliferator-activated receptor*); VDR, vitamin D reseptör; CRABP, hücresel retinoik asit-bağlayıcı protein (*cellular retinoic acid-binding protein*); FABP5, yağ asidi-bağlayıcı protein 5 (*fatty acid-binding protein 5*), (Mora., 2008'den uyarlanmıştır) (58) .

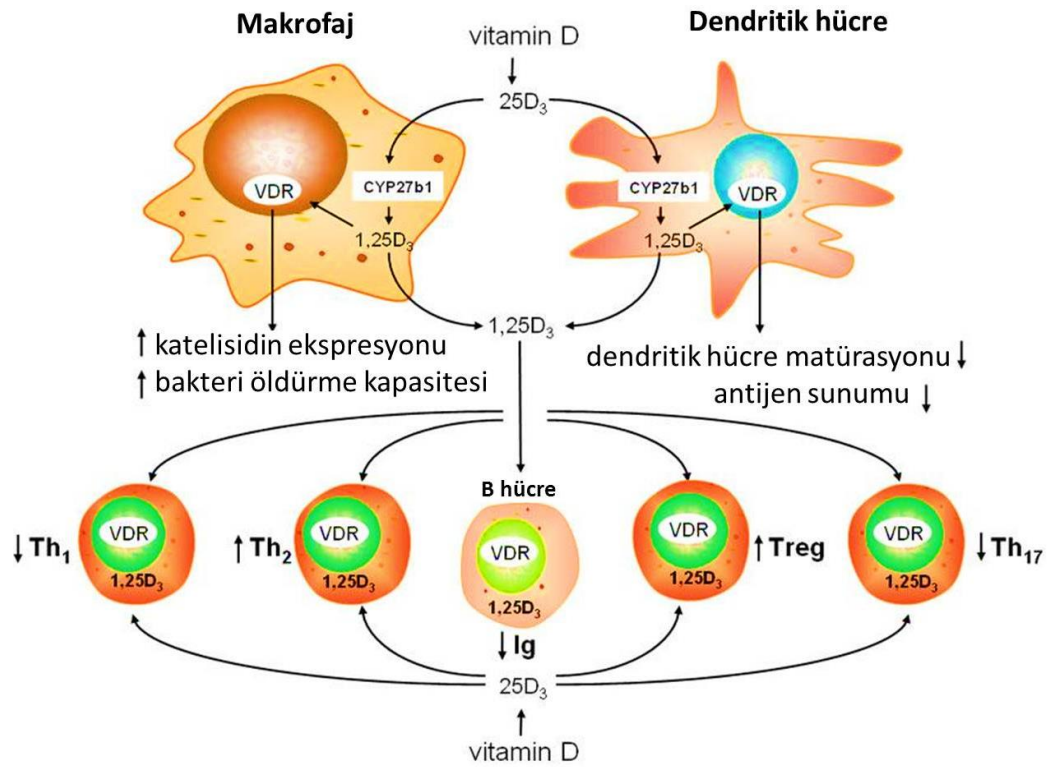
2.3.1. D Vitamininin İmmün Sistem Üzerine Etkileri

D vitamini, en aktif metaboliti olan 1 α ,25-dihidroksivitamin D3 (D3) ile doğal ve edinsel immüniteyi özelleşmiş mekanizmalarla etkiler (58) . T hücre proliferasyonunu (64,65) , IFN- γ üretimini, (65,66) , IL-2 ekspresyonunu (67,68) ve CD8⁺ T hücre aracılı sitotoksiteyi (69) baskıladığı bildirilmiştir. CD4⁺ hücrelerde bulunan VDR düzeyi bu hücrelerin aktivasyonu ile artar (70) .

D3 ve IFN- γ etkileşimi sonucunda STAT-1 transkripsiyon faktörü ve VDR'nin nükleer birikimi gerçekleşir. Böylece, farklılaşmış makrofajlar artık D3'e karşı duyarsız hale gelir. Protein kinaz C (PKC) sinyal yolağı D3 tarafından da desteklenir ve monositik farklılaşma güçlenir (71) . D3, IL-4 üretimini güçlendirerek tip-1 yardımcı T lenfosit (*type-1 helper T cell*, Th1)

yanıtlarını baskılarken, Th2 yanıtlarını destekler (72) . Bu vitamin IL-2, IL-12, tümör nekroz faktörü- α (*tumor necrosis factor- α* , TNF- α) ve IFN- γ üretimini baskılarken; IL-5, IL-4 ve IL-10 üretimini destekler (70,72,73) . Bunun yanı sıra, IL-6 ve IL-23 ekspresyonunu inhibe ederek Th17 farklılaşmasını engeller (74,75) . B hücrelerin çoğalmasını, plazma hücrelerine farklılaşmasını ve immünogloblin (Ig) G salgılamalarını azaltır, (Şekil 2.7) (60,64) .

D3, doğal immün sistem hücrelerini ve T hücre yanıtları baskılama yönünde etkiler. Dendritik hücrelerin CD40, CD80, CD86 ve sınıf II MHC moleküllerini inhibe ederek farklılaşma, olgunlaşma ve immün uyarıcılık kapasitesini azaltır (72,74,76,77) . D3'ün, IL-2 salgılanmasını baskılaması ve ko-stimülatör moleküllerden CD40, CD80 ve CD86 ekspresyonunu azaltması VDR-bağımsız mekanizmalarla gerçekleşebilir. Bu şekilde hematopoetik öncül hücrelerin farklılaşması engellenir (78) . Yüksek düzey D3'ün kemik iliğinde dendritik hücre gelişimini inhibe etmediği, yalnızca bu hücre tiplerinin olgunlaşmasını yavaşlattığı gösterilmiştir (79) . D3, monositlerde CD14 antijeninin ekspresyonunu destekler (80) . Makrofajlarda fagositoz ve anti-bakteriyal savunma mekanizmalarını desteklerken, bu hücrelerin antijen sunma kapasitelerini azaltır (77) . Ayrıca, monosit ve makrofajlar tarafından üretilen IL-1 ve bakterisidal peptit katelisinidin üretimini artırır ve monositlerin çoğalmasını uyarır, (Şekil 2.7) (56,68) .



Şekil 2.7. Vitamin D'nin en aktif metaboliti olan 1 α ,25-dihidroksivitamin D₃ (D₃)'ün doğal ve edinsel immün hücreler üzerine olan etkileri. CYP27B1, sitokrom P450 protein; 25D₃, 25-dihidroksivitamin D₃; 1,25D₃, 1 α ,25-dihidroksivitamin D₃; VDR, vitamin D reseptör; Th, T yardımcı hücre (*helper T cell*); Treg, T düzenleyici hücre (*T regulatory cell*); Ig, immünoglobülin (81) .

2.3.2. AML ve D Vitamini

AML ve D₃ arasındaki korelasyon klinik gözlemler ile farkedilmiştir. Finlandiya'da yapılan bir çalışmada AML insidansının kış aylarında artış gösterdiği rapor edilmiştir (82) . Birleşik Arap Emirlikleri'nde ise, erkek birey nüfusunun daha fazla olmasına rağmen, kadınlarda AML görülme sıklığının daha yüksek olduğu ve bunun da kadınların giydikleri kıyafetler ile güneş ışığından mahrum kalmaları sonucu gerçekleşebileceği düşünülmüştür (83,84) . Yaş ortalamaları yaklaşık 60 olan ve farklı tedaviler gören 97 AML hastasında serum 25(OH) vitamin D₃ seviyelerinin araştırıldığı bir çalışmada normal aralık, 32-100 ng/ml; yetersizlik, 20-31.9 ng/ml ve eksiklik aralığı ise <20 ng/ml olarak belirlenmiştir. AML hastalarının %35'inde normal, %35'inde

yetersiz ve %30'unda ise 25(OH) vitamin D3 eksikliği olduğu görülmüştür. Sağlıklı kişilerin %29'u normal, %40'ı yetersiz düzeyde ve %31'inde ise eksik 25(OH) vitamin D3 düzeyi belirlendi. 25(OH) vitamin D3 yetersizliği veya eksikliği kötü prognoz ile ilişkilendirildi. Ancak, bu çalışmada 25(OH) vitamin D3 seviyesindeki düşüklük veya VDR'deki değişimler ile FAB alt-sınıfları ile korelasyon bulunamamıştır (84) .

Düşük D3 seviyelerine sahip farelerde lösemik blastların kemik iliğinde biriktiği ve kemoterapiden kaçışta bu mekanizmanın etkili olduğu düşünülmektedir (53) . Yapılan bu gözlemler ve 1980'lerden beri bilinen D3'ün miyeloid hücre çoğalmasını engelleyici ve farklılaşmayı destekleyici etkilerine dayanılarak, bu ajan MDS ve AML hastalarında tedavi amaçlı kullanılmıştır. Ancak, anti-proliferatif etkinin görülebilmesi için gereken dozların hastalarda hiperkalsemiye neden olabildiği görülmüştür. Bu nedenle, tedavide D3 agonistleri kullanılmaktadır (85-87) . AML'ye özgü PLZF-RAR α , PML-RAR α ve AML-ETO1 füzyon proteinleri VDR'nin fonksiyonel aktivitesini engelleyebildiği de bilinmektedir (88) .

D3, *in vitro* (89) ve *ex vivo* (90) koşullarda miyeloid lösemi blastlarının proliferasyonunu engeller ve monositik farklılaşmaya yönlendirir. Bu etki genel olarak VDR-bağımlı mekanizmalar ile gerçekleştirir. D3 ile aktive olan VDR, RXR ile heterodimer oluşturarak hücre döngüsünde ve farklılaşmada etkili genlerin (CYP24A1, osteokalsin (BGLAP), CDKN1A, PKC izoformları, p42 ekstraselüler düzenleyici kinaz (*p42 extracellular regulated kinase*, p42 ERK), p38-ERK, c-Jun N-terminal kinaz (JNK), mitojen aktive protein kinazlar (MAPKs) promotor bölgesinde bulunan VDRE'lere bağlanır. p21, p27 ve C/EBP α genlerinin ekspresyonunu artırır ve hücre döngüsünü G0/G1 aşamasında durdurarak anti-proliferatif ve farklılaştırıcı etkisini gösterir (87) .

D3, fagositik aktivitenin ve monosit spesifik esteraz (MSE) düzeyinin artmasına ve ROS üretiminin ise azalışına neden olur. CD14, CD11b ve CD11c ekspresyonlarını artırır (87) . D3 ve analogları AML hücrelerinde Fas ligand ekspresyonunu artırır, MDM2 seviyelerini azaltır ve kaspaz-2,-3,-6 ve -9'u aktive ederek apoptozu destekler (91) . 7. Kromozom delesyonu bulunan AML hücreleri D3 ve analoglarına iyi yanıt verirken, FMS-benzeri tirozin

kinaz-3 (*FMS-like tyrosine kinase 3*, FLT-3) mutasyonu taşıyan hücrelerde bu yanıt görülmez (87) . AML hastalarında D3 analogları ile yapılan tedavinin hücre olgunlaşmasını etkilediği fakat tek başına terminal farklılaşmayı destekleyemediği bildirilmiştir. İnterferonlar, DNA metilaz inhibitörleri veya karsonik asit gibi ajanlarla kombinasyonun tedavide etkili olacağı düşünülmektedir (85) .

D3, AML hücre hatlarında (HL-60, U937 ve ML-1) hücre döngüsünü G0/G1 aşamasında durdurarak proliferasyonu azaltır. Monositik belirteçlerin düzeyini arttırarak farklılaşmayı destekler (85,86) . Bu yanıt KG-1 hücre hattında daha az görülür ama CD11b artışı söz konusudur (86) . HL-60 hücrelerinde D3 ile VDR bağlanması hızlı şekilde gerçekleşir; bu sayede, VDR'nin yıkımı yavaşlar. HL-60'ın farklılaşması için ısı şok proteini 90 (*heat shock protein 90*, Hsp90) ve VDR'nin etkileşimi önemlidir. CYP24A1 enzimi D3'ü inaktif formu olan kalsitroik aside dönüştürür. CYP24A1 seviyesi yavaşça artan D3 ile uyarılmış HL-60 hücrelerinde farklılaşmanın erken safhalarında C/EBP α artarken, ileri safhalarda C/EBP β artışı gözlenir. C/EBP β izoformlarının artışı CD11b, CD11c ve CD14 belirteçleri ile korelidir (53,87) . HL-60 hücrelerinin D3 ile monositik matürasyona yönlendiği fakat normal monositlere veya aktive makrofajlara ait tüm genleri eksprese etmediği gösterilmiştir (92) . D3, HL-60 hücrelerini monositik farklılaşmaya ilerletirken farklı cevaplar oluşturur. CD14, CD35, CD87, CD31, CD11b, CD53, CD32, TLR2 yüzey antijenlerinin ekspresyonu arttırırken; CD33, CD71, CD92, CD15 ve CD65 ekspresyonlarını azaltır (86,93-95) . D3 analoglarının p27 ve PTEN'i uyararak veya Bcl-2 ve Bcl-x moleküllerinin düzeyini azaltarak apoptozu indüklediği, TGF- β reseptör tip-1 ve tip-2'nin artışına neden olarak HL-60 proliferasyonunu durduğu gösterilmiştir (58) . D3 uyarımından sonra HL-60 hücrelerinin nükleusları hafif girintili bir şekil alır. Nükleus HL-60 hücrelerindeki gibi büyüktür. Bazen reniform şeklinde görülür. Sitoplazma grimsi-mavi renkte boyanır ve az sayıda granüle sahiptir. Hücrelerin monositik/metamiyelositik benzeri karaktere sahip olduğu bildirilmiştir (96) . Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (*nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*, NADPH) oksidazın aktivasyonu ROS üretiminin

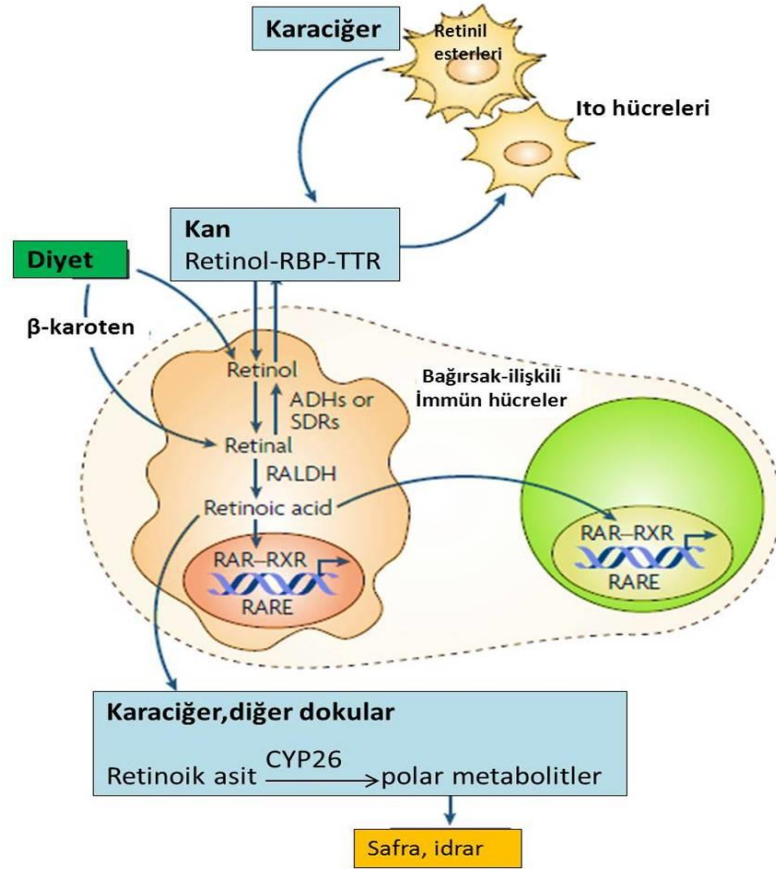
gerçekleşmesinde önemlidir. D3 uyarımı ile *Gp91phox* geni NADPH aktivasyonunu sağlayarak, HL-60 hücrelerinde bu ROS üretimini destekler (97) . D3, uyarılabilir nitrik oksit sentaz (*inducible nitric oxide synthase*, iNOS) üzerinden NO üretimini artırır. PMA etkisi ile D3'ün farklılaştırıcı etkisi daha da artarak uyarılmış HL-60 hücrelerinde IL-1 α , IL-6, TNF- α , prostoglandin E2 (PGE2) veya NO üretimi gözlenir (98) .

2.4. A Vitamini

A vitamininin doğal ve sentetik şekilleri genel olarak retinoidler olarak isimlendirilir. Epitelyal yüzeylerin bütünlüğü, immün sistemin düzenlenmesi, embriyonik gelişim, hücre çoğalması ve farklılaşması, apoptoz, üreme sistemi ve görme fonksiyonlarında önemli fonksiyonlara sahiptirler (99-102) . Deney hayvanlarının diyetine retinoidlerden zengin morina balığı karaciğer yağı veya bileşenlerinin eklenmesi ile bu hayvanların enfeksiyondan daha iyi korunduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca, A vitamininden yoksun beslenen çocuklarda gece körlüğü gelişmesi, bu vitaminin biyolojik süreçlerdeki önemini vurgulamaktadır (103) . Yapılan diğer çalışmalarda A vitamini alınımadaki eksikliğin çocuk ve yetişkinlerde mortalite ve morbiditeyi etkilediği, bu durumun A vitamininin epitelyal bütünlük ve immün sistem üzerine etkileri ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür (104) .

A vitamini (retinol) besinlerden retinil esterler (kırmızı et ürünlerinde), pro-vitamin A karatinoidleri (β -karoten) (bitkisel kaynaklar) veya all-trans-retinol şeklinde alınır. All-trans-retinol, retinil esterlerine dönüştürülür ve karaciğerde bulunan özelleşmiş Ito hücrelerinde depolanır. All-trans-retinol ve β -karoten dokularda alkol dehidrojenaz veya kısa zincirli dehidrojenaz redüktaz enzimlerinin aktivitesi ile all-trans-retinal'a oksitlenir. All-trans-retinal ise retinal dehidrojenazlar (RALDH) aracılığı ile all-trans-retinoik asit (ATRA)'ya oksitlenir (100,105) . RALDH erişkin memelilerde bağırsak ile ilişkili hücrelerde bulunur ve İnsanlarda RALDH-1 ve RALDH-2 olmak üzere iki formu belirlenmiş bir enzimdir. RALDH-1 enzimi, Peyer plaklarındaki dendritik hücreler ve intestinal epitelyal hücrelerde; RALDH-2 ise, mezenterik

lenf düğümlerinde yerleşmiş dendritik hücrelerde bulunur, (Şekil 2.8) (106-109) .



Şekil 2.8. A vitamini ve metabolitlerinin sentezi. RBP, retinol-bağlayıcı protein (*retinol-binding protein*); TTR, transtiretin (*transthyretin*); ADH, alkol dehidrojenaz (*alcohol dehydrogenase*); SDR, kısa zincirli dehidrojenaz/redüktaz (*short chain dehydrogenase/reductase*); RARE, retinoik asit yanıt element (*retinoic acid response element*); RALDH, retinal dehidrojenaz (*retinal dehydrogenase*); CYP26, sitokrom P450 protein, (Mora., 2008'den uyarlanmıştır) (58) .

ATRA, α , β ve γ olmak üzere 3 izoformu bulunan retinoik asit reseptör (RAR) ailesi üyelerine nükleusta bağlanır ve RXR ile heterodimer oluşturur. Bu heterodimer çinko parmak (*zinc finger*, ZF) motifi içeren korunmuş DNA bağlanma birimleri aracılığıyla ilgili genlerin promotor bölgesinde bulunan

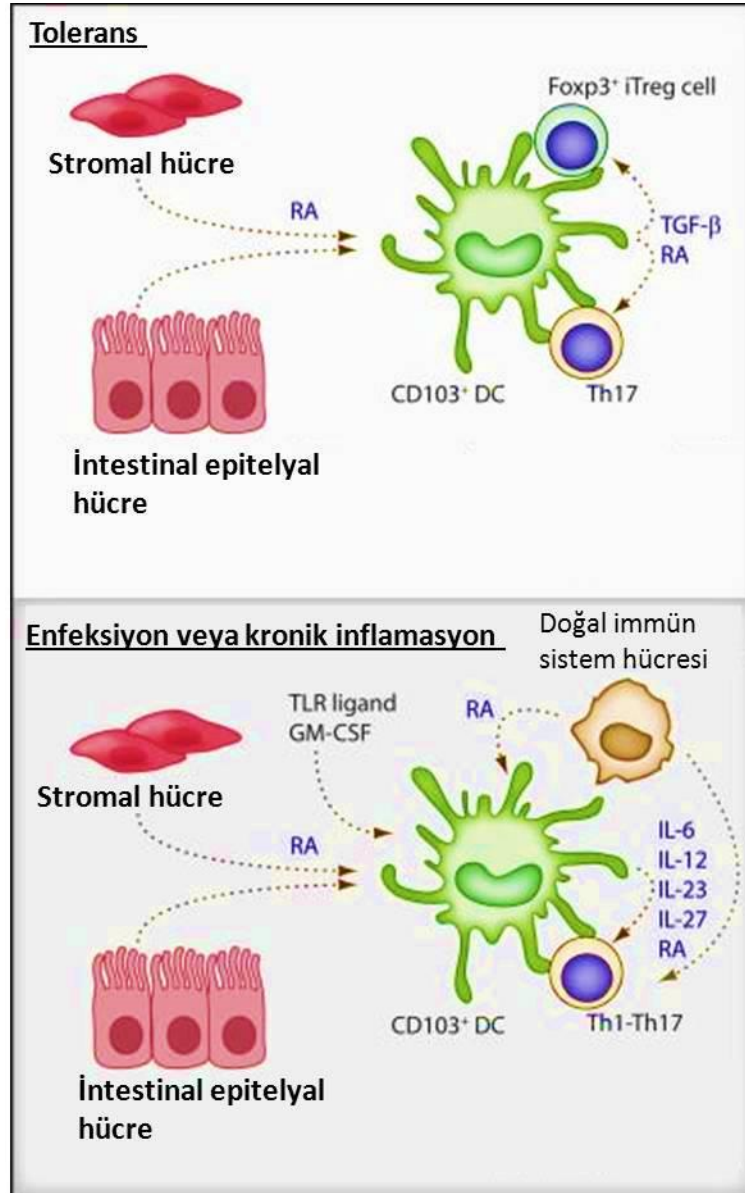
retinoik asit yanıt element (*retinoic acid response element*, RARE) ile etkileşerek transkripsiyonun düzenlenmesini sağlar, (Şekil 2.6) (110) . RXR proteini tiroid hormon reseptörü, peroksizom proliferatör ile aktive reseptör (*peroxisome proliferator-activated receptor*, PPAR) ve karaciğer X reseptör ile de heterodimer oluşturabilir. RAR proteininin ekspresyonu da ATRA uygulanması ile artar (58) .

ATRA, doğrudan PPAR ile bağlanarak da RXR heterodimerizasyonu ile sinyal oluşturabilir. Hücrel retinoik asit-bağlayıcı protein (*cellular retinoic acid-binding protein*, CRABP)'nin yağ asidi-bağlayıcı protein 5 (*fatty acid-binding protein 5*, FABP5)'e oranının yüksek oluşu ATRA'nın RAR'a bağlanmasını destekler. Bu sinyal sonucunda hücrelerde büyüme inhibisyonu ve apoptoz gerçekleşir. Düşük CRABP: FABP5 oranı ise ATRA-PPAR etkileşimini destekler ve canlılık korunur, (Şekil 2.6) (58,100,111) .

2.4.1. A Vitamininin İmmün Sistem Üzerine Etkileri

ATRA'nın T hücreler üzerinde proliferasyonu destekleyici ve IL-2 salgılanmasını kuvvetlendirici etkileri bulunur (112) . Dendritik hücrelerde antijen sunumunu doğrudan uyarak özgül T hücre yanıtlarını dolaylı olarak da destekler. TNF- α gibi inflamasyon uyaranlarının varlığında dendritik hücrelerin olgunlaşmasını ve antijen sunma kapasitelerini artırır (113) . ATRA, Th1 ve Th2 yanıtlarının düzenlenmesinde de rol oynar. GATA-bağlayıcı protein 3 (GATA3), makrofaj aktive edici faktör (MAF) ve STAT6'ya pozitif yönde etki ederek IL-4 gen ekspresyonu ve Th2 farklılaşmasını destekler (114) . Ek olarak, Th1 yanıtlarında temel düzenleyici göreve sahip T-bet transkripsiyon faktörünü inhibe eder (115,116) . Bağırsak ile ilişkili lenfoid dokular (*gut-associated lymphoid tissue*, GALT) ATRA bakımından zengindir. Bu bölgelerde immün toleransın ve patojenlere yanıtların düzenlenmesinde ATRA önemli etkilere sahiptir. Buralarda bulunan dendritik hücreler veya ince bağırsağın lamina propria tabakası ATRA-bağımlı mekanizmalar ile düzenleyici T hücre (*regulatory T cell*, Treg) farklılaşmasını destekler. Ayrıca, intestinal epitelyal hücreler, stromal hücreler ve CD103⁺

dendritik hücreler de ATRA sentezleyerek bu vitaminin lokal düzeyini artırır, (Şekil 2.9) (58,117-119) .



Şekil 2.9. ATRA'nın bağırsak ilişkili lenfoid dokularda tolerans ve inflamasyon süreçlerine etkileri. DC, dendritik hücre; RA, all-trans retinoik asit (ATRA); TLR, toll benzeri reseptör (*toll like receptor*), GM-CSF, granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*); Th, T yardımcı hücre (*helper T cell*); Treg, düzenleyici T hücre (*regulatory T cell*), (Hall., 2011'den uyarlanmıştır) (120) .

ATRA, TGF β ile beraber, bu bölgedeki Foxp3⁺ Treg ve Th17 hücrelerini destekler. Böylece, kommensal bakteri florasına karşı gelişebilecek gereksiz immün yanıtlar engellenir ve immün tolerans sağlanır (58,121-124) . GALT mukozasında ATRA düzeyleri inflamasyon ile doğru orantılı olarak artar. ATRA, IgA salgılayan B hücrelerinin gelişimini de etkileyerek, patojenik bakterilere karşı gelişen inflamasyonu destekler (58,122) . Mukozal bölgelerde bakteri ve mantar enfeksiyonlarının ortadan kaldırılmasını, Th17 hücrelerinin proliferasyonunu ve IL-17A, IL-17F, IL-21 ve IL-22 sitokinlerini üretmesini destekleyerek katkıda bulunur. Bu şekilde mukozanın korunmasında etkin görev alır (125) .

ATRA'nın miyeloid farklılaşmada, özellikle granülositik farklılaşma için, önemli bir düzenleyici olduğu gösterilmiştir. Kemik iliğindeki nötrofil olgunlaşması sırasında, ATRA'nın GM-CSF ile etkileşimi önemlidir (126) . *In vitro* çalışmalar, ATRA uygulanan hematopoetik kök hücrelerin granülositik öncüllere farklılaştığını göstermiştir. Vitamin A'dan yoksun farelerde kemik iliğindeki hematopoetik farklılaşmada bozukluk gözlemlenmiştir. Bu hayvanlarda özellikle miyeloid öncüllerin artışı ve farklılaşmış nötrofillerin apoptoza uğradığı rapor edilmiştir (127) . Ayrıca, farelerde dominant negatif RAR α ekspresyonu ile kemik iliğinde granülositik gelişim promiyelositik aşamada duraksamış ve bu hücreler nötrofillere değil bazofil ve/veya mast hücrelerine farklılaşmıştır (128) .

2.4.2. AML ve A Vitamini

Deneysel modellerde ve AML hastalarının plazmalarında bulunan yüksek ATRA konsantrasyonu ile periferik kandaki lösemik blast miktarının ters orantılı olduğu gözlemlenmiştir (129-131) . ATRA, AML tedavisinde blastların farklılaşmasını ve apoptozunu uyarmak için kullanılır. 17. kromozomda bulunan RAR α geni, PML, PLZF, nükleofosmin (NPM) veya STAT5b ile füzyon oluşturabilir. Bu translokasyonlar sıklıkla APL (AML-M3) alt-tipinde görülür. En yaygın translokasyonlar PML-RAR α füzyon reseptör proteinini içeren t(15,17) (q22,q21) translokasyonları ve PLZF-RAR α füzyon reseptör proteinini içeren t(11,17)(q23,q21) translokasyonlarıdır. ATRA, PML-

RAR α füzyon genini içeren APL alt-tipinde kullanılır. PML geninin fonksiyonel kaybında apoptoza direnç, hücre çoğalması ve hayatta kalım artar. Bu genin yüksek düzeyde ekspresyonu ise apoptoza neden olur (132,133) . PLZF-RAR α füzyon proteini bulunan APL hücreleri ise ATRA tedavisine yanıt vermez (134-137) . ATRA uygulaması ile RAR α 'nın ve farklılaşma ile ilişkili genlerin mRNA düzeylerinin arttığı gösterilmiştir (138) . Sitotoksik kemoterapötiklerin tersine, ATRA, APL'li hastalarda kemik iliği hipoplazisi oluşumunu veya sık oluşan ölümcül hemorajik sendromların alevlenmesini önleyerek, seçici bir şekilde lösemi hücrelerinin normal granüositlere farklılaşmasını uyarır (139) . Miyeloid hücre farklılaşması üzerine olan bu etkisini p21^{WAF1/Cip1} siklin-bağımlı kinaz inhibitörü (140) , C/EBP- γ,β,ϵ (141) ve IRF-1 (142) artışına neden olarak sağlar. Ayrıca, PML-RAR α füzyon proteininin degradasyonunu sağlayarak, RAR α 'nın mRNA ve protein seviyelerinin artışına neden olur (143) . Buna rağmen, sadece ATRA tedavisi ile sağlanan remisyonlar geçicidir ve çoğunlukla hastalar tedaviye direnç kazanırlar. Bu nedenle, ATRA'nın tek ajan olarak kullanımı tercih edilmez ve kemoterapi ile kombine edilerek kullanılır. Bu rejim sadece kemoterapi ile karşılaştırıldığında, hastaların yaklaşık %70'ini iyileştirerek, hasta sağkalımı önemli ölçüde arttırmaktadır. Buna rağmen, APL hastalarının halen %30'unda hastalık nüks etmekte ve 5 yıl içerisinde ölüm gerçekleşmektedir (144,145) .

Kronik ATRA alımı mikrozomal sitokrom P450 enzim sistemini aktifleştirerek ATRA'nın inaktif formları olan 4-hidroksi-RA ve 4-oxo-RA'e oksidasyonuna neden olarak direnç gelişmesini sağlar (146) . Transglutaminaz-II (Tgase-II), kalsiyum-bağımlı mekanizmalar ile aminlerin birleştirilmesini ve proteinlerin çapraz bağlanmalarını katalizleyen bir enzimdir. ATRA dirençli AML hücre alt-gruplarında Tgase-II farklılaşmayı uyaramaz (147) Histon deasetilazın (*histone deacetylase*, HDAC) APL hücrelerinde ATRA sinyalini bloke ederek farklılaşmayı engellediği gösterilmiştir. Bu enzime özgü inhibitörler kullanılarak hücrelerin ATRA yanıtına duyarlı gelmesi sağlanmaktadır (148) .

HL-60 miyeloid lösemi hücre hattında ATRA ve $RAR\alpha$ ile farklılaşma desteklenirken, 9-cis-RA bu hücrelerde apoptozu uyarır (149,150) . CYP26, ATRA'nın inaktif formları olan 4-hidroksi-RA ve 4-oxo-RA'e oksidasyonuna neden olarak bu hücrelerde geri dönüşümlü ATRA direncine neden olur (151) . Normal HL-60 hücrelerinde ve yeni APL tanısı almış hastalarda P-glikoprotein (P-gp) düzeyi düşük iken, ATRA-dirençli HL-60 hücrelerinde ve ATRA tedavisi sonrasında direnç geliştirmiş hastalarda yüksek düzeyde bulunur (152) . P-gp agonistleri kullanılarak, ATRA-dirençli HL-60 hücrelerinin, ATRA'ya duyarlı hale gelmesi sağlanmıştır (147,153) .

ATRA, HL-60 hücrelerinde PI3-K ve bu yolda yer alan lipid molekülleri destekleyerek de granülositik farklılaşmayı uyarır (154) . HL-60 hücreleri nötrofil benzeri farklılaşmaya yönelirken, CD38, CD11b, CD11c, CD45RO, CD36, CD54, CD65 ekspresyonu artar, CD13, CD17, CD49e, CD63, CD71, CD87 yüzey moleküllerinin ekspresyonu azalır. ATRA uyarımı ile HL-60 hücrelerinde bakteriyal savunmada etkili katepsin D ve defensin proteinlerinde artış görülür (155) . ATRA ile uyarılmış HL-60 hücrelerinde Wright-Giemsa boyaması ile, miyelosit, metamiyelosit, band hücresi veya segmentli nükleusa sahip nötrofil aşamalarında hücreler görülebilir (156) . ATRA ile uyarımdan 96 saat sonra promiyelosit sayısında azalma görülürken, baskın hücre metamiyelositik karakterdedir. Band hücresi ve segmentli nükleusa sahip nötrofiller de az sayıda görülebilir (157) . ATRA ile farklılaştırılmış HL-60 hücreleri normal nötrofillerde bulunan tüm karakteristik sekonder granüllere sahip değildir (158) . Bu uyarım sonucunda azurofilik granüller görülür. Nükleusta küçülme ve kıvrılma dikkat çeker (157) .

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışma Temmuz 2013 – Mayıs 2014 tarihleri arasında Hacettepe Üniversitesi Kanseri Enstitüsü, Temel Onkoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

3.1. Çalışmada Kullanılan Maddeler

Çalışmada kullanılan kimyasal ve biyolojik malzemeler firmalarına göre aşağıda sıralanmıştır. Fosfat tamponlanmış tuz çözeltisi (PBS) (ICN Biomedicals, ABD); Penisilin-Streptomisin, RPMI 1640 (Lonza, Belçika); Fötal Buzağı Serum (FBS) (Biological Industries, İsrail); Ficoll 1.077 g/ml (Biochrome, Almanya); Karboksifloresan süksinimidil ester (CFSE) (Invitrogen, ABD); IFN- γ (R&D, ABD); FACS Flow, Cell Wash (BD, ABD); Anti-insan CD3 monoklonal antikor, Cell proliferation Dye eFlour 670 (RedCFSE) (eBioscience, ABD); Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (Cell Signaling, ABD); All-Trans Retinoik Asit (ATRA), 1 α ,25-Dihidroksivitamin D3 (D3), Percoll, Lipopolisakkarit (LPS), Tripan mavisi, (Sigma, ABD); Karboksi-Dichlorofluorescein diacetate (DCFDA) (Anaspec, ABD), Nitric oxide (total) detection kit (Enzo life sciences, Türkiye); HL-60 (ATCC, ABD); Etanol (AppliChem, Almanya); Dimetil sülfoksit (DMSO) (OriGen Biomedical AB, İsveç).

3.2. Hazırlanan Tamponlar ve Çözeltiler

PBS Çözeltisi (1x): 100 ml başına bir tablet PBS distile suya eklenerek karıştırıldı ve otoklavlanarak sterilize edildi. Oda sıcaklığında (25°C) muhafaza edildi.

Tam RPMI Hücre Kültürü Ortamı: L-glutamin içeren RPMI 1640 üzerine son konsantrasyonu %10 olacak şekilde FBS (ısı-inaktif), %1 olacak şekilde penisilin/streptomisin eklendi ve 4°C'de saklandı.

Anti-insan CD3 Monoklonal Antikor (Klon: HIT3a) Çözeltisi: Stok konsantrasyonu 1 mg/ml olan anti-CD3 mAb'u son konsantrasyonu 2 μ g/ml

olacak şekilde serum içermeyen RPMI 1640 besi yeri içerisinde steril olarak seyreltildi. Alikotlanarak -20°C'de saklandı.

All-trans retinoik asit (ATRA) Çözeltisi: Toz şeklinde alınmış 100 mg ATRA, üzerine 10 ml DMSO eklenerek konsantrasyonu 33,25 mM olan stok çözelti oluşturuldu. Bu stok çözeltiden 6µl alınıp DMSO ile 1 ml'ye tamamlanması ile 200 µM konsantrasyonunda ara stok oluşturuldu. Stok ve ara stok çözeltiler alikotlanarak -70°C'de saklandı.

1α,25-dihidroksivitamin D3 (D3) Çözeltisi: Toz şeklinde alınmış 10 µg D3, üzerine 1,2 ml saf etanol eklenerek konsantrasyonu 20 µM olan stok çözelti oluşturuldu ve alikotlanarak -70°C'de saklandı.

LPS Çözeltisi: LPS steril şartlarda tartılarak, stok solüsyon 1mg/ml konsantrasyonda olacak şekilde RPMI 1640 ile çözüldü ve alikotlandı. Stok çözeltiden 100 µl alınıp 1 ml'ye tamamlanarak ile 100 µg/ml konsantrasyonunda ara stok oluşturuldu. Stok ve ara stoklar -20°C'de saklandı.

IFN-γ Çözeltisi: Liyofilize olarak alınmış 100 µg IFN-γ üzerine 500 µl dH₂O eklenerek 0,2 µg/ml konsantrasyonunda çözelti elde edildi. Bu stok çözeltiden 22 µl alınıp, 200 µl'ye serumsuz RPMI 1640 ile tamamlanarak 20 µg konsantrasyonunda ara stok oluşturuldu. Stok ve ara stokların tümü alikotlanarak -70°C'de saklandı.

Karboksifloresan Süksinimidil Ester (CFSE) Çözeltisi: Ticari olarak alınmış olan 50 µg CFSE üzerine 18 µl DMSO eklenerek çözüldü ve -70°C'de saklandı.

Cell proliferation Dye eFlour 670 (RedCFSE) Çözeltisi: Liyofilize olarak alınmış Cell proliferation Dye eFlour 670 (cat no: 65-0840) DMSO eklenerek 1 mM konsantrasyonda çözelti elde edildi ve -70°C'de saklandı.

Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) Çözeltisi: Ticari olarak alınmış 1 mg PMA 1 ml DMSO eklenerek 1,6 mM konsantrasyonda stok çözelti elde edildi. RPMI kullanılarak stok solüsyondan 80 µM (0.5 ng/ml) ara stok elde edildi. Stok ve ara stokların tümü alikotlanarak -20°C'de saklandı.

Karboksi-dichlorofluorescein Diacetate (DCFDA): Ticari olarak alınmış 100 mg DMSO eklenerek 100 mM konsantrasyonda çözelti elde edildi. Alikotlanarak -70°C'de saklandı.

3.3. Hücre Kültürü

Sıvı azot tankından alınan HL-60 hücreleri 37°C dH₂O bulunan behere alındı. Hücreler 37°C tam RPMI kültür ortamıyla pastör pipeti yardımı ile yıkanarak vialden hızlı bir şekilde alındı ve santrifüj edildikten sonra yeni RPMI 1640 hücre ortamında süspanse edildi. Hücreler öncelikle 25 cm²'lik hücre kültür kabına aktarıldı. Kültür kabını doldurdukları zaman besiyeri ile beraber 75 cm²'lik kültür kaplarına alınarak RPMI 1640 kültür ortamında büyütüldü. Hücreler istenilen yoğunluğa ulaştığında (~1x10⁶ hücre/ml) pasajlanarak ilgili deneylerde kullanıldı. Pipetaj yapılarak hücrelerin homojen olarak dağılması sağlandı. Kültür ortamının yarısı atıldı ve yeni tam RPMI kültür ortamı eklenerek pasajlama gerçekleştirildi. Pasajlama haftada iki kez gerçekleşti ve hücre kültürünün devamlılığı sağlandı. Hücrelerin pasaj sayısı 7-10 defadan fazla devam ettirilmedi. Bu pasaj sayısına ulaşan hücreler atılarak her defasında yeni bir HL-60 hücresi açıldı. Hücreler 37°C'de nemli ve %5 CO₂ içeren inkübatörde (Thermo Scientific, Hera Cell 150i, ABD) muhafaza edildi.

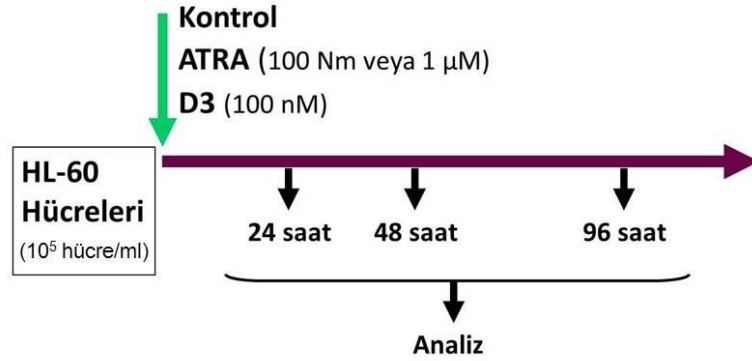
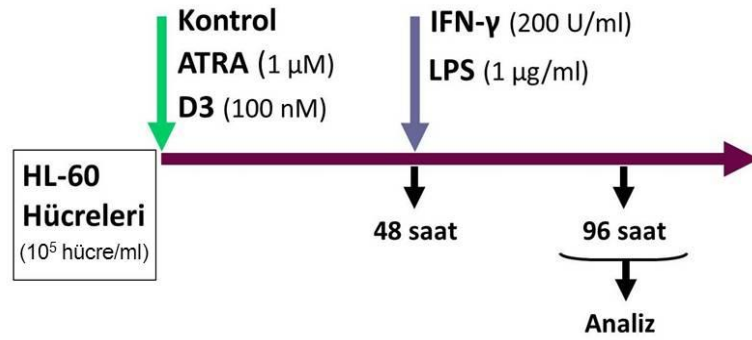
3.3.1. Hücre Sayımı

Tam kültür oramı içindeki hücreler pipetaj yapılarak süspanse hale getirildi. Süspansiyondan 10 µl alınarak 10 µl tripan mavisini ile karıştırıldı. Bu karışımı Fuchs-Rosenthal lamı üzerinde yayılarak hücre sayımı yapıldı. Her sayım için Fuchs-Rosenthal lamı üzerinden 4 alan seçildi ve bu bölgelere düşen hücreler sayılarak aritmetik ortalaması alındı. Kullanılan Fuchs-

Rosenthal lamının ölçüleri 0.1 mm x 0.1 mm olup lam ile lamel arasındaki uzaklık da 0.1 mm'dir. Bu nedenle hücrelerin sayıldığı her alan 0.001 mm³'e (0.1 µl'ye) karşılık geldiğinden sayılan hücrelerin aritmetik ortalaması 10 ile çarpıldı. Elde edilen değer, hücre süspansiyonu tripan mavisi ile boyandığında 1:1 oranında seyreltiğinden, 2 ile çarpılarak ml başına düşen hücre sayısı hesaplandı.

3.3.2. HL-60 Hücrelerinin ATRA, D3, LPS veya IFN-γ ile Uyarımı

HL-60 hücreleri sayılarak 10⁵ hücre/ml olacak şekilde 25 cm²'lik flasklara ekildi. Final konsantrasyonları ATRA için 1µM veya 100nM, D3 için ise 100nM olacak şekilde bu ajanlar kültür ortamına eklendi. İnkübasyon 24, 48 veya 96 saat boyunca devam ettirildi. IFN-γ veya LPS eklenen koşullarda, veya sadece bu ajanlarla uyarılan HL-60 (kontrol) hücrelerinin üzerine inkübasyonun 48. saatinde IFN-γ (200 U/ml) veya LPS (1µg/ml) olacak şekilde kültüre eklendi ve inkübasyon 48 saat daha (toplamda 96 saat) devam ettirildi. Deney planları Şekil 3.1'de gösterilmektedir. İnkübasyonun 0, 24, 48 ve çoğu deneyde 96. saatlerinde hücrelerden örnekler alınarak analizleri gerçekleştirildi.

A**B**

Şekil 3.1. HL-60 hücrelerinin ATRA, D3, LPS, IFN-γ veya bu ajanların kombinasyonları ile uyarım şemaları. A) HL-60 hücrelerinin ATRA (100nM veya 1µM) veya D3 (100nM) ile uyarımı. B) ATRA (100nM veya 1µM) veya D3 (100nM) ile uyarımları gerçekleştirilmiş HL-60 hücrelerinin veya kontrol HL-60 hücrelerinin LPS veya IFN-γ ile uyarılmasını içeren deneylerin tasarımı.

3.4. Akım Sitometri

ATRA, D3, LPS, IFN-γ veya bu ajanların kombinasyonu ile uyarılmış HL-60 hücreleri 0, 24, 48 ve 96. saat sonunda santrifüj (Thermo Scientific, Heraeus Megafuge 40R, ABD) (5 dk, 1800 rpm, 4°C) edilerek 1xPBS içerisinde süspansiyon edildi. Akım sitometri tüplerine 100'er µl dağıtılarak

üzerlerine anti-B7-H1, anti-B7-H2, anti-B7-DC, anti-CD11b, anti-CD11c, anti-CD14, anti-CD15, anti-CD16, anti-CD66b, anti-CD80, anti-CD86, anti-CD40, anti-CD70, anti-CD62L, anti-HLA-DR, anti-TRAIL, anti-TLR-4 yüzey belirteçlerine karşı monoklonal antikorlar ve izotipik kontrol antikorları (IgG1/G1 ve IgG2b) uygun konsantrasyonlarda eklendi, (Tablo 3.1). Vortekslenen tüpler 40 dakika boyunca 4°C’de inkübe edildi. İnkübasyon süresinin sonunda 1,5 ml Cell Wash (BD Biosciences, ABD) çözeltisi eklenerek tüpler santrifüj (5 dk, 1800 rpm, 4°C) edildi. Böylece, süpernatant atılarak bağlanmayan antikorlar uzaklaştırıldı. Tüplere 150 µl Cell Wash eklendi, vortekslendi ve hücreler FACS Aria II akım sitometri cihazında değerlendirildi

Tablo 3.1. Akım sitometride kullanılan antikorlar ve özellikleri.

Antikor (Fare Anti-insan)	Klon	Firma	Fluorokrom	Eklenen miktar /100µl
CD11b	ICRF44 ICRF44 ICRF44	BD, ABD BD, ABD BioLegend, ABD	PE FITC FITC	9 µl 4,5 µl 4,5 µl
CD11c	S-HCL3	BD, ABD	PE	9 µl
CD14	M5E2 M5E2	BD, ABD BD, ABD	FITC PE	9 µl 9 µl
CD15	H198	BD, ABD	FITC	9 µl
CD16	3G8	BD, ABD	FITC	9 µl
CD66b	G10F5	BD, ABD	FITC	9 µl
CD80	L307.4	BD, ABD	PE	9 µl
CD86	IT2.2	BD, ABD	PE	9 µl
CD70	Ki-24	BD, ABD	PE	9 µl
CD40	5C3	BD, ABD	PE	9 µl
CD62L	DREG-56	BD, ABD	APC	9 µl
HLA-DR	G46-6	BD, ABD	FITC	9 µl
TLR-4	HTA-125	eBioscience, ABD	PE	10 µl
TRAIL	RIK-2	eBioscience, ABD	PE	9 µl
B7-H1	29E.2A3 MIH1	BioLegend, ABD eBioscience, ABD	PE	4,5 µl 4,5 µl
B7-H2	MIH12	eBioscience, ABD	PE	4,5 µl
B7-DC	24F.10C12	BioLegend, ABD	PE	4,5 µl
CD13	L138	BD, ABD	PE	2 µl
CD3/16/56	SK7/B73.1/MY31	BD, ABD	FITC/PE/PE	2 µl
CD8	RPA-T8	BD, ABD	APC	1,5 µl
CD4/CD8	SK3/SK1	BD, ABD	FITC/PE	2 µl
İzotipik kontrol IgG1/G1	X40/X40	BD, ABD	FITC/PE	9 µl
İzotipik kontrol IgG2b	27-35	BD, ABD	PE	9 µl

3.5. Floresan-aktif Hücre Ayrılması (*fluorescence-activated cell sorting, FACS*)

3.5.1. Periferik Kan Mononükleer Hücre (PKMH) İzolasyonu

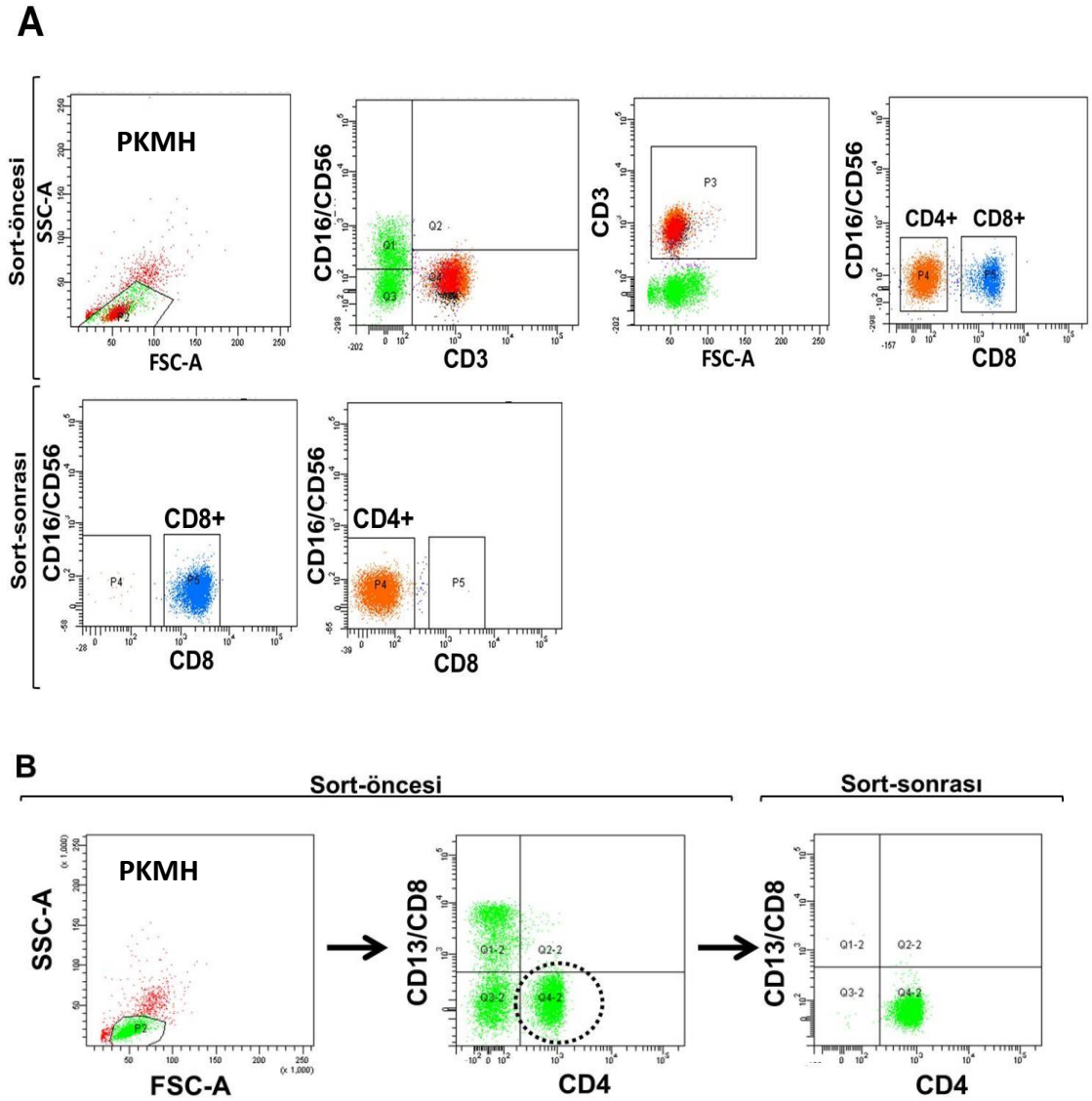
Sağlıklı bireylerden toplanan kan 1:1 oranında RPMI 1640 ile seyreltilir. 15 ml'lik tüplerin dibine 2 ml ficoll (1.077 g/ml) koyuldu. Üzerine sabit hızda ve ficoll'e karışmamasına dikkat ederek seyreltilmiş kan eklendi. Yayılan kan, santrifüj (20°C, 400xg'de 25 dakika) yapıldı. Santrifüjden sonra ficoll ile plazma arasında kalan mononükleer hücreler pastör pipeti yardımıyla tüp duvarından da hafifçe kazınarak yeni bir tüp içerisine toplandı. Hücreler toplanırken eritrositlerin alınmamasına dikkat edildi. Toplanan hücreler 50 ml'lik tüplere alınarak bol miktarda PBS ile yıkandı. Süpernatant atılarak hücreler 1 ml PBS içinde süspansiyon edildi.

3.5.2. Periferik Kan Mononükleer Hücrelerinden CD4⁺ ve CD8⁺ T Lenfositlerin Saflaştırılması

Elde edilen PKMH süspansiyonuna 20 µl FITC/PE/PE-işaretli anti-CD3/CD16/CD56 ve 15 µl APC-işaretli anti-CD8 monoklonal antikorları, (Tablo 3.1) eklendi. Vorteks ile kısaca karıştırılarak 15-20 dakika oda ısısında karanlıkta bekletildi. Sadece CD4⁺ T hücrelerin kullanılacağı deneyler için yapılan ayırmada ise, PKMH'ler yine ficoll ile ayrılıp gereken işlemler uygulandıktan sonra 20 µl FITC/ PE-işaretli anti-CD4/CD8 ve 20 µl PE-işaretli anti-CD13 monoklonal antikorları eklenerek kısa bir vorteksin ardından 15-20 dakika oda ısısında karanlıkta inkübe edildi.

Antikor inkübasyonu sonunda işaretlenen mononükleer hücrelerin üzerine 2 ml tam RPMI hücre kültürü ortamı eklendi. Ayrılacak olan CD4⁺ ve CD8⁺ T hücrelerin toplanacağı 15 ml'lik yeni tüplere 3'er ml tam RPMI eklendi. FACS Aria II cihazının ayarı yapıldıktan sonra öncelikle lenfoid hücre alanı seçildi ve buradan CD16/CD56-negatif, CD3-pozitif hücreler kapı alındı. CD8-pozitif hücreler CD8⁺ T; CD8-negatif hücreler CD4⁺ T hücreler olarak seçilerek ayırımı yapıldı, (Şekil 3.2A).

Sadece CD4⁺ T hücreler ile yapılacak deneyler için CD8 ve CD13-negatif hücreler kapı alınarak miyeloid hücreler dışarıda tutulmuş oldu. CD4-pozitif hücreler seçilip ayrımlandı, (Şekil 3.2B). Ayrılan CD4⁺ ve CD8⁺ T hücreler santrifüj (1800 rpm'de, 5 dakika) yapıldı ve süpernatant atıldı. Ayrımlanan hücreler carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) ile işaretleneceğinden dolayı, (Kısım 3.6.1) santrifüjün ardından pellet üzerine 1x10⁶ hücre/ml olacak şekilde serumsuz RPMI eklenerek süspanse edildi. İzole edilen T lenfositler yeniden akım sitometri cihazında okutuldu. Kontrol edildiğinde %98'in üzerinde saflıkla ayırlama yapıldığı görüldü.

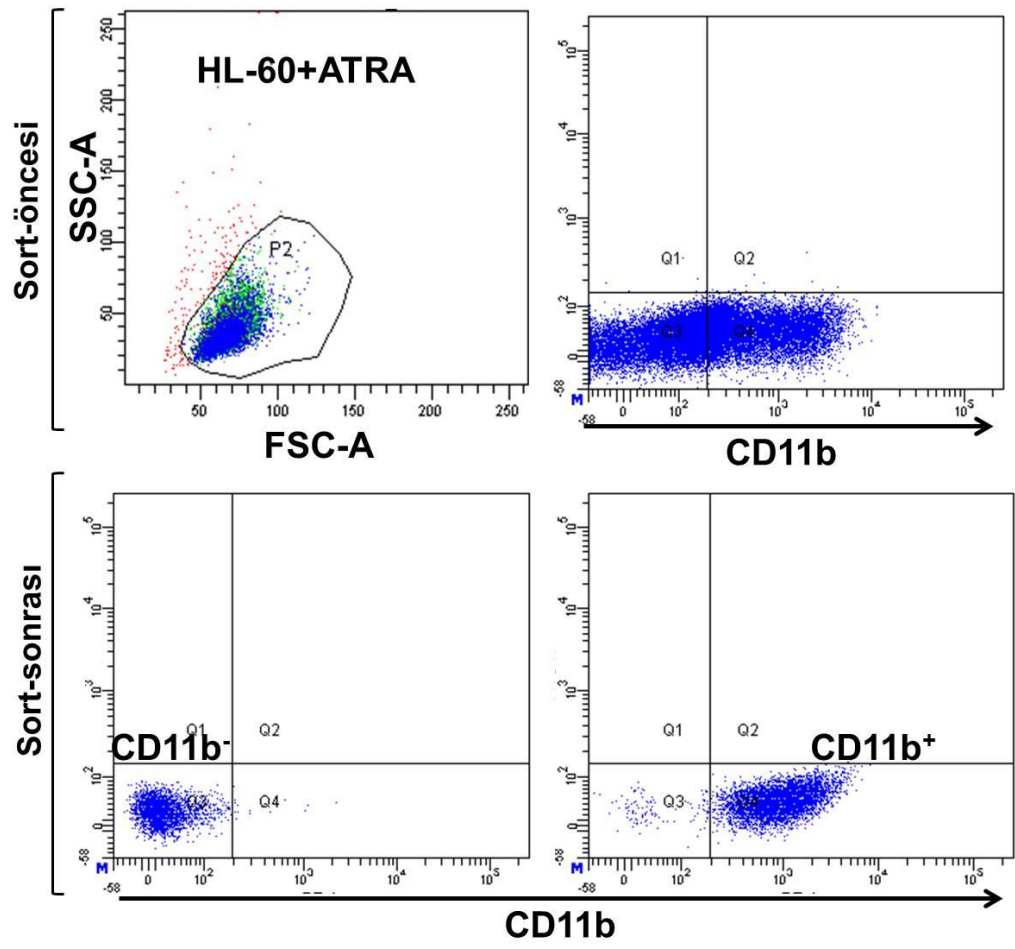


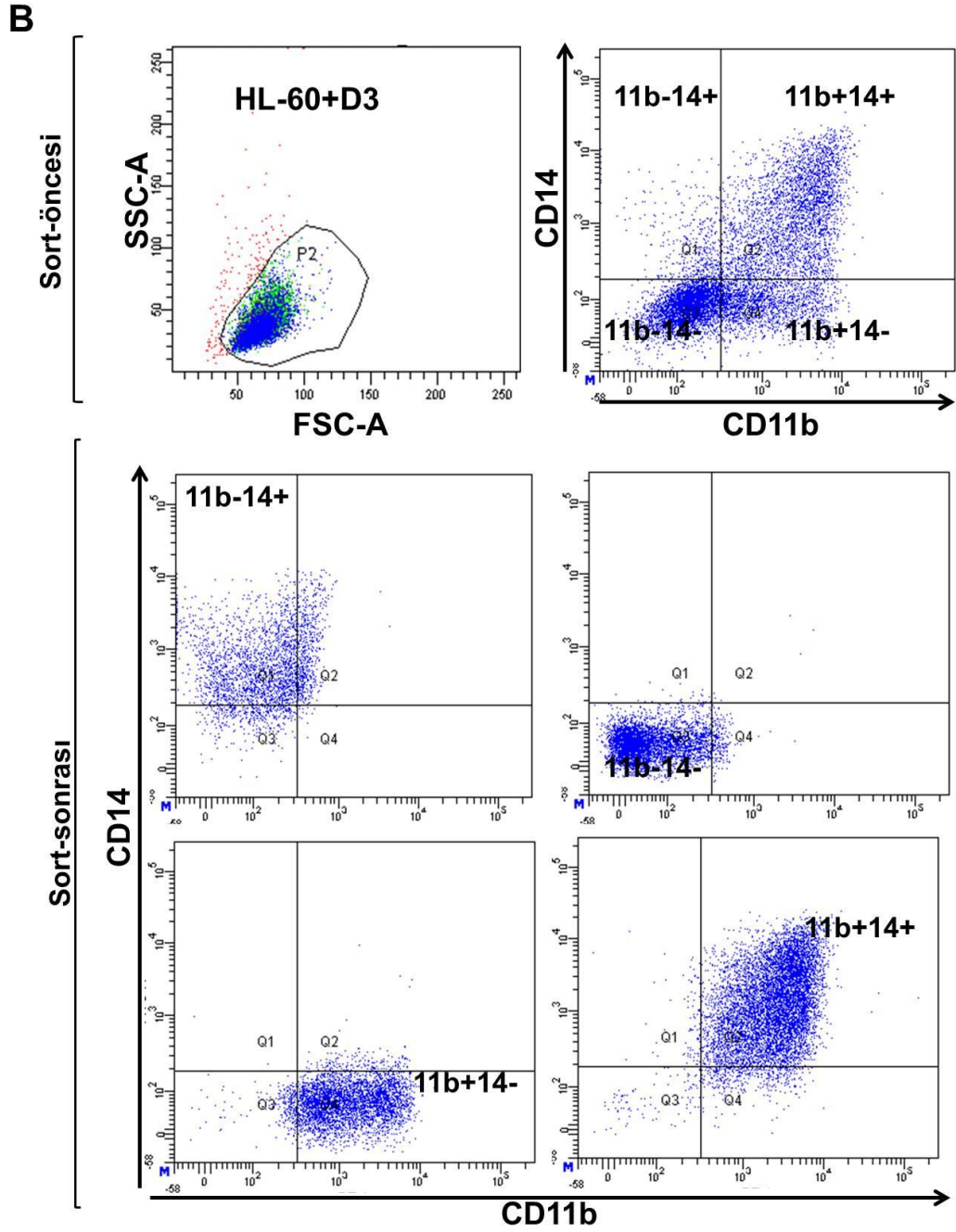
Şekil 3.2. Fluorescence-activated cell sorting (FACS) (FACS Aria II, BD Biosciences, ABD) yöntemiyle CD4-pozitif veya CD8-pozitif T hücrelerin ayrılması. A) İlk önce PBMC hücrelerinden granülite (SSC-A) ve boyutlar (FSC-A) göz önünde bulundurularak P2'den lenfoid hücre alanı seçildi. Bu hücrelerden Q4 alanında bulunan CD3-pozitif, CD16/CD56 negatif hücreler seçilerek doğal öldürücü T hücreler (*natural killer* T, NKT) deney dışı turuldu. P4 alanında CD8-negatif hücreler CD4⁺ T hücre ve P5 alanından CD8-pozitif hücreler CD8⁺ T hücreler olarak belirlendi ve ayrıldı. Bu hücreler ayrıldıktan sonra saflaştırılma başarıları kontrol edildi. B) Yine PBMC hücrelerinden granülite ve boyutlar göz önünde bulundurularak P2'den lenfoid hücre alanı seçildi. Bu hücrelerden Q4-2 alanında bulunan, CD13 ve

CD8-negatif CD4-pozitif hücreler kapı alınarak CD4⁺ T hücreler seçilerek ayrımlandı. Bu hücreler ayrımlandıktan sonra saflaştırılma başarıları kontrol edildi. PBMC; periferik kan mononükleer hücreleri (*peripheral blood mononuclear cells*), SSC-A, *side scatter-area*, FSC-A, *forward scatter-area*.

3.5.3. ATRA veya D3, ATRA ve IFN- γ , D3 ve IFN- γ ile Uyarılan HL-60 Hücrelerinin Alt-gruplara Ayrımlanması

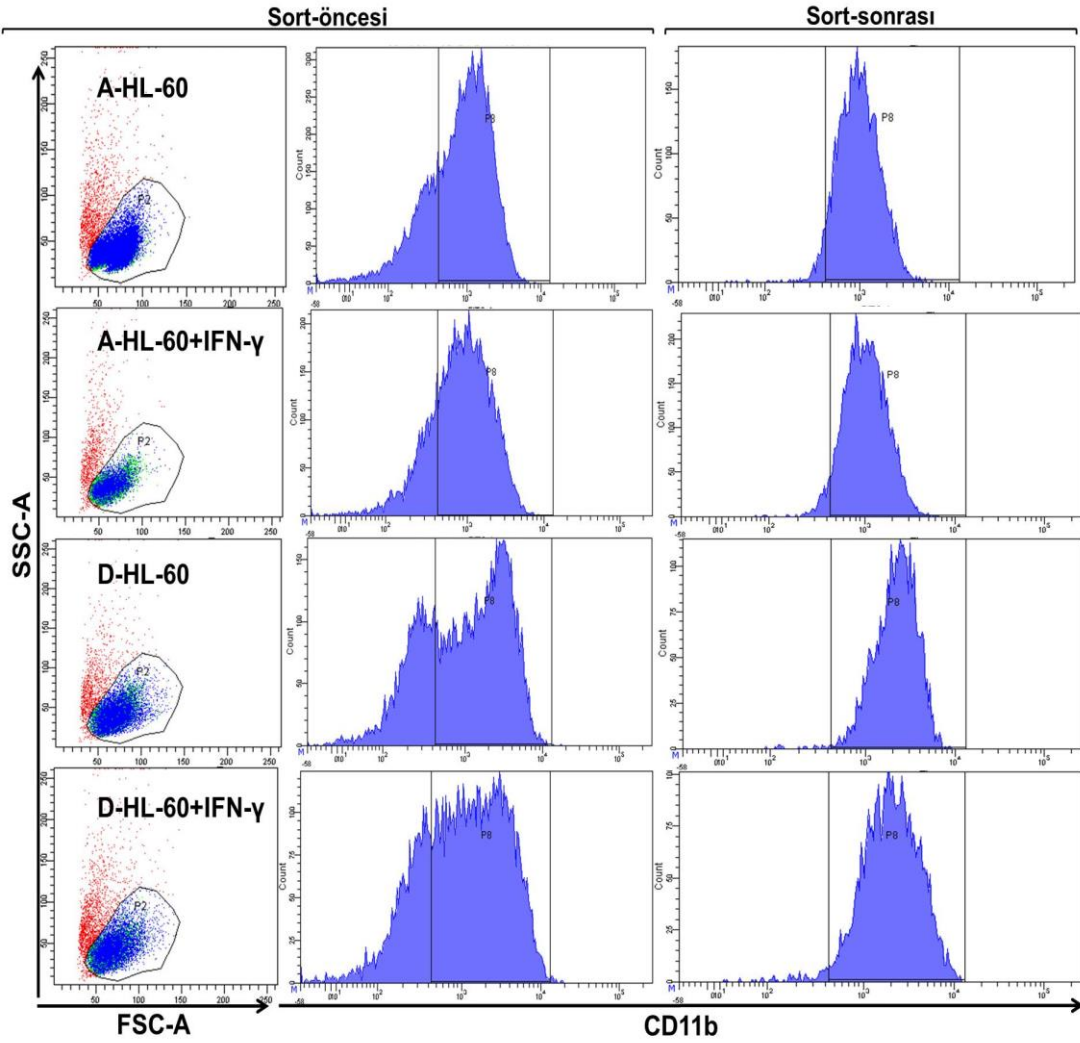
Şekil 3.1A'da gösterilen şekilde ATRA (1 μ M) veya D3 (100nM) ile 96 saat boyunca uyarılmış HL-60 hücreleri inkübasyonun sonunda santrifüj (5 dk, 1800 rpm, 4°C) edilerek 1 ml PBS içerisinde süspanse edildi. ATRA grubu 20 μ l anti-CD11b, ve D3 grubundaki hücreler ise 20'şer μ l anti-CD14 ve anti-CD11b monoklonal antikorları ile ikili işaretleme yapılarak kısa vorteksin ardından 15-20 dakika oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübe edildi. Antikor inkübasyonu sonunda işaretlenen HL-60 hücrelerinin üzerine 2 ml, ayrılacak olan alt-popülasyonların toplanacağı steril flow tüplerine de 1'er ml tam RPMI eklendi. CD14 ve CD11b belirteçlerini farklı şekillerde eksprese eden hücre popülasyonları, (Şekil 3.3A ve Şekil 3.3B) FACS (FACS Aria II, BD Biosciences, ABD) ile ayrıldı.

A



Şekil 3.3. 96 saat boyunca A) ATRA (1 μ M) ile uyarılmış HL-60 hücrelerinin anti-CD11b antikoru ile işaretlenerek CD11b eksprese eden (Q4) ve etmeyen popülasyonlarının (Q3) ve B) D3 (100 nM) ile uyarılmış HL-60 hücrelerinin anti-CD11b ve anti-CD14 antikoru ile işaretlenerek CD11b⁻CD14⁻ (Q3), CD11b⁻CD14⁺ (Q1), CD11b⁺CD14⁻ (Q4), CD11b⁺CD14⁺ (Q2) popülasyonlarının belirlenerek FACS yöntemi ile ayrılma stratejisi ve sort-saflık başarısı. SSC-A, *side scatter-area*; FSC-A, *forward scatter-area*.

HL-60 hücrelerinin ATRA (1 μ M), D3 (100nM) ve IFN- γ (200 U/ml) ile Şekil 3.1B'de gösterilen şekilde 96 saat inkubasyonun sonunda hücreler santrifüj (5 dk, 1800 rpm, 4°C) edilerek 1 ml PBS ile süspanse edildi ve 10 μ l anti-CD11b antikoru ile işaretlenerek 15-20 dk oda sıcaklığı (25°C) ve karanlıkta inkübe edildi. İnkübasyon sonunda santrifüj (5 dk, 1800 rpm, 4°C) edilerek 1,5 ml tam RPMI ile süspanse edildi. Hücrelerin ayrılacağı 15 ml'lik tüplere yine 2'şer ml tam RPMI eklendi. CD11b yüzey belirtecini yüksek düzeylerde eksprese eden hücre popülasyonları belirlenerek fluorescence-activated cell sorting (FACS) (FACS Aria II, BD Biosciences, ABD) ile ayrıldı, (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. ATRA (1 μ M) veya D3 (100nM) ve IFN- γ (200 U/ml) ile 96 saat inkübe edilen HL-60 hücreleri granülite (SSC-A) ve boyutlarına (FSC-A) göre P2 bölgesinden seçilerek, bu alanda bulunan hücreler CD11b yüzey belirtecini yüksek düzeylerde eksprese eden popülasyonların bulunduğu P8 bölgesinden seçilmiştir. FACS ile ayrılma stratejisinin temsili histogramları ve sort-saflık başarısı. SSC-A, *side scatter-area*, FSC-A, *forward scatter-area*, A-HL-60, 1 μ M ATRA ile 96 saat boyunca farklılaştırılmış HL-60 hücreleri; D-HL-60, 100 nM D3 ile 96 saat boyunca farklılaştırılmış HL-60 hücreleri.

3.6. Ko-kültür Deneyleri

3.6.1. Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester (CFSE) ile CD4⁺ ve CD8⁺ T Hücrelerin İşaretlenmesi

Ayırımı yapılan ve 1×10^6 hücre/ml olacak şekilde serumsuz RPMI eklenerek süspanse edilmiş olan CD4⁺ ve CD8⁺ T hücrelere kısa bir inkübasyonun (37°C, 5 dk) ardından, son konsantrasyonu 5 μ M (1 μ l CFSE/ml) olacak şekilde CFSE eklendi. Dikkatli ve yavaşça karıştırıldıktan sonra, 15 dakika 37°C'de su banyosunda inkübasyona bırakıldı. Yıkama için bol miktarda ve soğuk %10 FBS içeren kültür ortamı eklendi ve beş dakika boyunca buz içerisine gömülerek inkübe edildi. Bu sayede hücrelere bağlanmamış CFSE'nin inaktivasyonu sağlandı. Santrifüj (4°C, 1800 rpm'de 5 dakika) yapıldı ve yıkama işlemi bir kez daha tekrarlandı. Süpernatant atıldıktan sonra 25×10^4 hücre/ml olacak şekilde tam RPMI kültür ortamı eklenerek hücreler süspanse edildi. CFSE işaretleme sırasında tüm işlemler karanlıkta gerçekleştirildi.

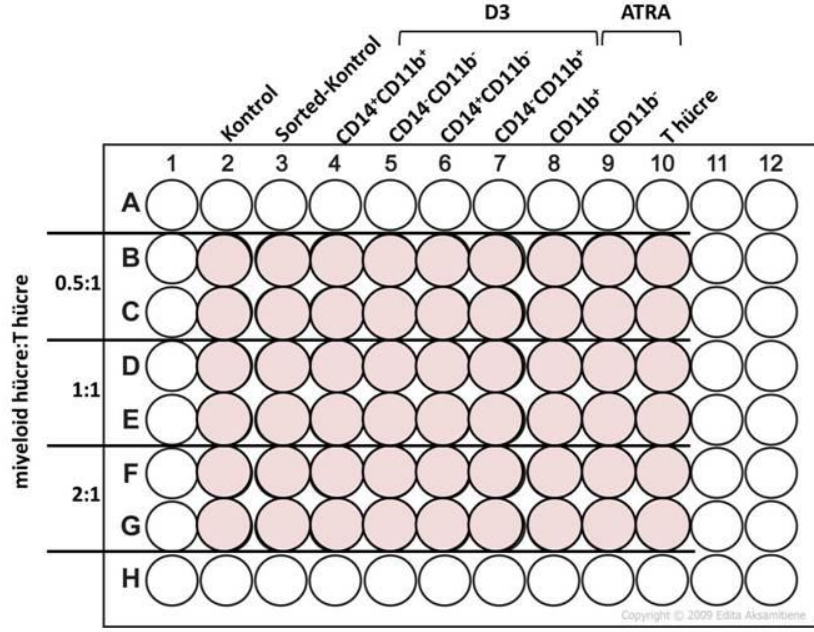
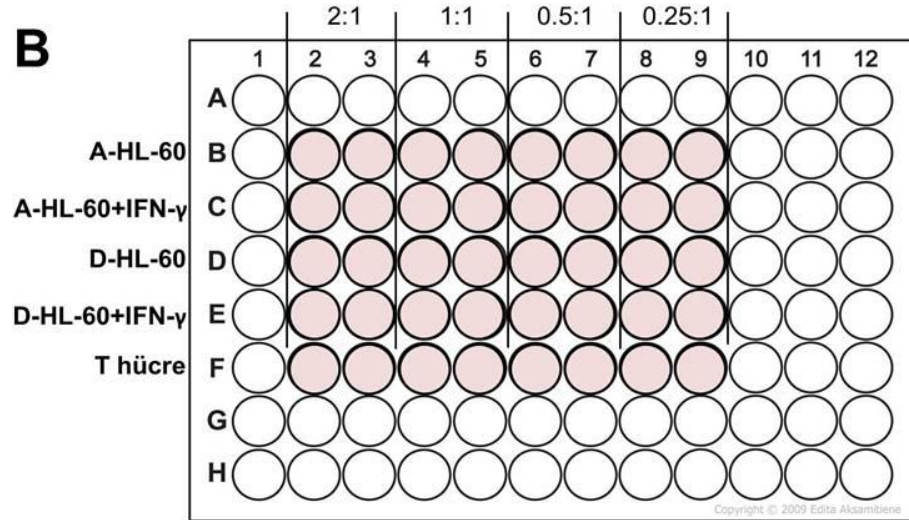
3.6.2. Saflaştırılmış HL-60 alt-grupları ile CD4⁺ T veya CD8⁺ T Hücrelerin Ko-kültürü

FACS ile ayrılmış ATRA veya D3 ile uyarılmış HL-60 hücreleri sayılarak tam RPMI içinde süspanse edildi ve 0.5, 1 ve 2 ($1=25 \times 10^3$ hücre) oranlarını karşılayacak şekilde U-tabanlı 96 kuyucuklu kültür kabına ekildi. CFSE ile işaretlenmiş CD4⁺ T hücreler, son konsantrasyonu 12,5 ng/ml veya 25 ng/ml olacak şekilde anti-CD3 mAb (HIT3a) antikor eklenerek tam RPMI içinde süspanse edildi. CD4⁺ T hücreler 1 oranında ($1=25 \times 10^3$) miyeloid hücrelerin bulunduğu kuyucuklara veya kontrol T hücre olarak boş kuyucuklara eklendi. Her oran için 2 kuyuya ekim (duplike) yapıldı. Kontrol grubu olarak sadece T hücre ekimi yapıldı, (Şekil 3.5A).

FACS ile ayrılmış ATRA veya D3 ve IFN- γ ile uyarılmış HL-60 hücreleri sayılarak tam RPMI içinde süspanse edildi ve 0.25, 0.5, 1 ve 2 ($1=25 \times 10^3$ hücre) oranlarını karşılayacak şekilde U-tabanlı 96 kuyucuklu

kültür kabına ekildi. CFSE ile işaretlenmiş CD4⁺ T veya CD8⁺ T hücreler, son konsantrasyonu 12,5 ng/ml olacak şekilde anti-CD3 mAb (HIT3a) antikoru eklenerek tam RPMI içinde süspanse edildi. CD4⁺ T veya CD8⁺ T hücreler, 1 oranında ($1=25 \times 10^3$) miyeloid hücrelerin bulunduğu kuyucuklara veya kontrol T hücre olarak boş kuyucuklara eklendi. Her oran için 2 kuyuya ekim (duplike) yapıldı. Kontrol grubu olarak sadece T hücre ekimi yapıldı ve hücreler 1 oranında ($1=25 \times 10^3$) miyeloid hücrelerin bulunduğu kuyucuklara veya kontrol T hücre olarak boş kuyucuklara eklendi. Her oran için 2 kuyuya ekim (duplike) yapıldı. Kontrol grubu olarak sadece T hücre ekimi yapıldı, (Şekil 3.5B).

Tüm ko-kültürler 96 saat boyunca devam ettirildi ve inkübasyon sonunda T hücrelerin proliferasyonu akım sitometri cihazı ile değerlendirildi.

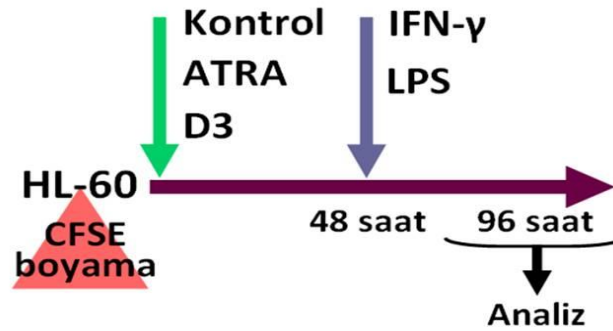
A**B**

Şekil 3.5. A) ATRA (1 μ M) veya D3 (100nM) ile 96 saat inkübe edilen HL-60 hücrelerinden CD14 ve CD11b yüzey belirteçlerini farklı şekillerde eksprese etmelerine göre FACS ile ayrılmış popülasyonların CD4⁺ T hücrelerle ve B) ATRA (1 μ M) veya D3 (100nM) ve IFN- γ (200 U/ml) ile 96 saat inkübe edilen HL-60 hücrelerinden CD11b yüzey belirtecini yüksek düzeylerde eksprese eden popülasyonlar ile CD4⁺ T veya CD8⁺ T hücrelerle U-tabanlı 96 kuyucuklu kültür kaplarında ko-kültür koşulları (1 = 25x10³ hücre). A-HL-60, 1 μ M ATRA ile 96 saat inkübe edilen HL-60 hücreleri; D-HL-60, 100nM D3 ile 96 saat inkübe edilen HL-60 hücreleri.

3.7. ATRA veya D3 ve IFN- γ veya LPS ile Farklılaştırılan HL-60 Hücrelerinin Proliferasyon Kapasitelerinin Değerlendirilmesi

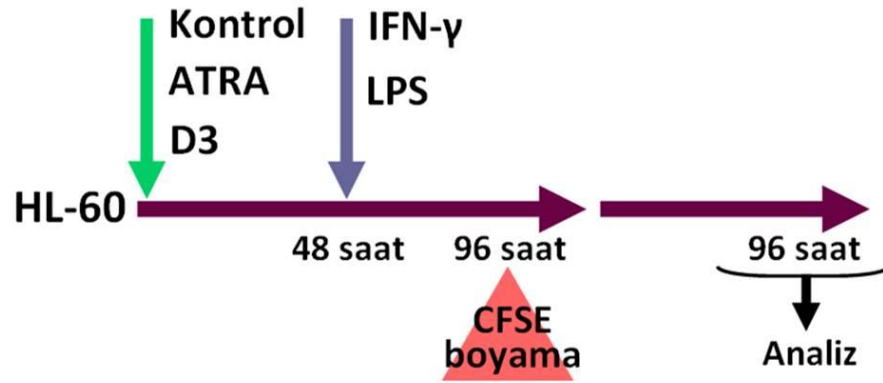
Bu analiz için iki farklı strateji kullanıldı.

- I- Kontrol HL-60 hücreleri, inkübasyon sonunda iki kez PBS ile yıkanarak serum ve ajanlar ortamdan iyice uzaklaştırıldı. Hücreler sayıldı ve 5×10^6 hücre/ml olacak şekilde serumsuz RPMI 1640 ile süspanse edildi. Son konsantrasyon 5 μ M olacak şekilde Cell proliferation Dye eFlour 670 (RedCFSE) ortama eklendi. Yavaşça karıştırılarak oda ısısı ve karanlıkta 10 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonunda hücrelerin üzerine 4-5 ml soğuk tam besiyeri eklenip 5 dakika buz üzerinde bekletilerek hücrelere bağlanmayan CFSE'nin inaktivasyonu gerçekleştirildi. Tam besiyeri ile üç kez daha hücreler yıkanarak 2×10^5 hücre/ml olacak şekilde kültür kaplarına ekildi. ATRA veya D3 ve LPS veya IFN- γ ile HL-60 hücreleri inkübe edildi (Bölüm 3.3.2). 96 saatlik inkübasyon sonunda akım sitometri ile analiz gerçekleştirildi, (Şekil 3.6).



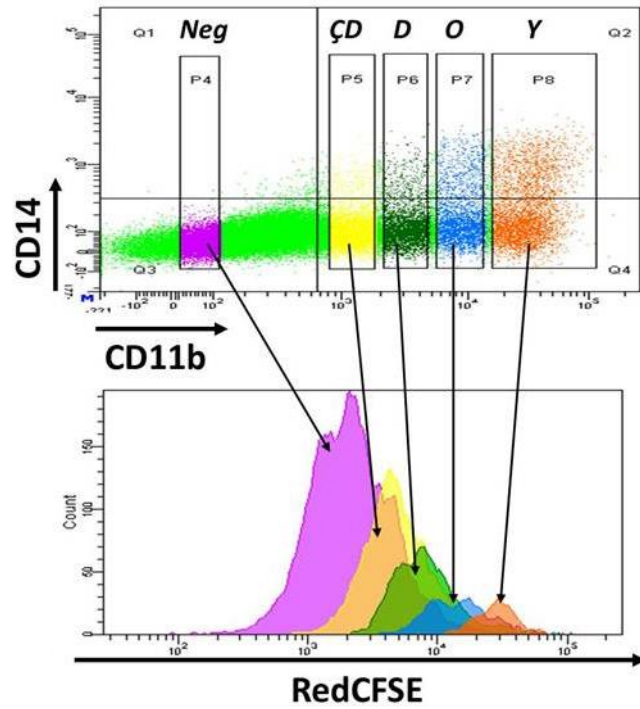
Şekil 3.6. HL-60 hücrelerinin Cell proliferation Dye eFlour 670 (RedCFSE) ile işaretlenmesinin ardından, ATRA veya D3 ve LPS veya IFN- γ ile farklılaştırılmasının ardından proliferasyon kapasitelerinin belirlenmesini gösteren deney tasarımı.

II- ATRA veya D3 ve LPS veya IFN- γ ile, (Bölüm 3.3.2) farklılaştırılmış HL-60 hücreleri, 96 saatlik inkübasyonun sonunda iki kez PBS ile yıkanarak serum ve ajanlar ortamdan iyice uzaklaştırıldı. HL-60 hücreleri sayılarak I numaralı stratejide anlatıldığı gibi Cell proliferation Dye eFlour 670 (RedCFSE) ile işaretlendi ve 5×10^4 hücre/200 μ l olacak şekilde (duplike) 96 kuyucuklu kültür kabına ekildi. 96 saat sonra inkübasyon sonlandırıldı ve hücreler akım sitometri ile analiz edildi, (Şekil 3.7.)



Şekil 3.7. ATRA veya D3 ve LPS veya IFN- γ ile 96 saat boyunca farklılaştırılmış HL-60 hücreleri inkübasyon sonunda uyarım ajanları ortamdan kaldırılarak Cell proliferation Dye eFlour 670 (RedCFSE) ile işaretlendi. İkinci bir 96 saat daha kültürü devam ettirilen bu hücrelerin proliferasyon kapasitelerinin belirlemek için tasarlanan deney tasarımı gösterilmiştir.

Cell proliferation Dye eFlour 670 (RedCFSE) işaretlenen HL-60 hücreleri, inkübasyonun sonunda anti-CD11b ve anti-CD14 antikorları ile işaretlenerek akım sitometri analizi gerçekleştirildi. CD11b yüzey belirtecinin ekspresyon düzeylerine göre, negatif, çok düşük, düşük, orta ve yüksek olarak sınıflandırılan bu hücrelerin proliferasyon farklılıkları araştırılmıştır, (Şekil 3.8).



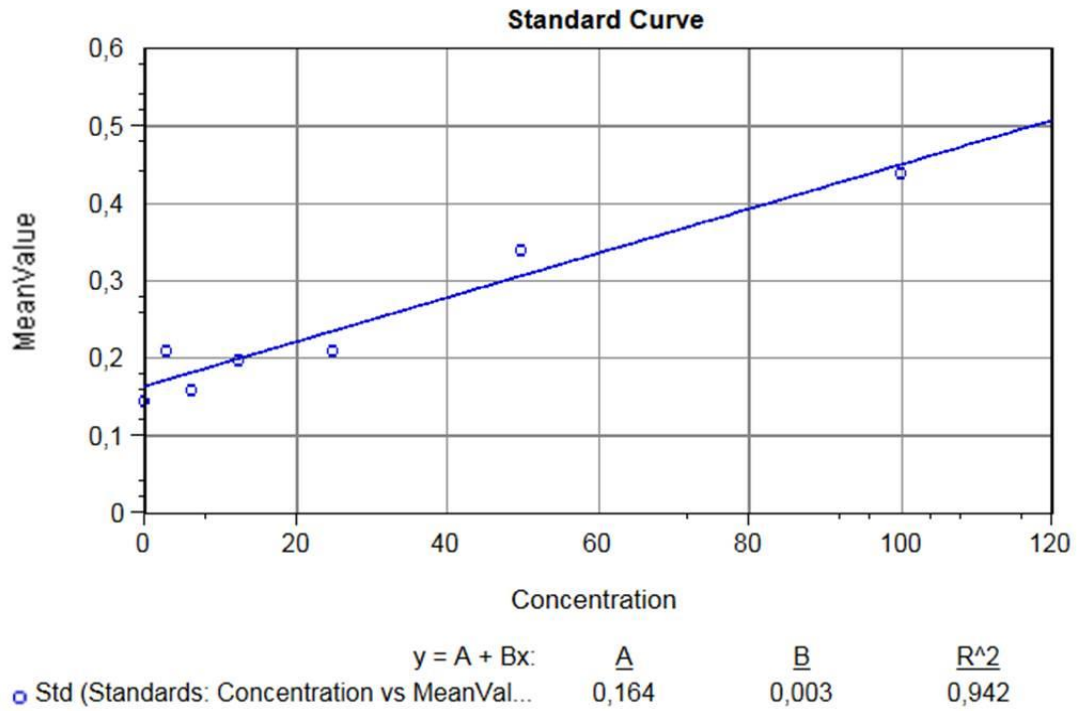
Şekil 3.8. Farklılaştırılan HL-60 hücrelerinin proliferasyon kapasitelerini belirlemek için CD11b düzeyine göre RedCFSE dilüsyonlarının akım sitometrik analizi. CD11b belirtecini farklı düzeylerde eksprese eden hücrelerin proliferasyon durumu RedCFSE ile araştırılmıştır. CD11b belirtecini eksprese etmelerine göre hücreler, P4 bölgesinde negatif (Neg), P5 bölgesinde çok düşük (ÇD), P6 bölgesinde düşük (D), P7 bölgesinde orta (O) ve P8 bölgesinde yüksek (Y) olarak sınıflandırılmıştır.

Hücrelerin proliferasyon farklarını belirleyebilmek için CFSE dilüsyon oranları hesaplandı. Bunun için başlangıç CFSE ortalama floresan yoğunluğu (*mean fluorescence intensity*, MFI) değerleri, inkübasyon sonrası CFSE MFI değerlerine oranlandı, (Formül 3.1).

$$\text{CFSE dilüsyon} = \frac{\text{Başlangıç CFSE MFI}}{\text{İnkübasyon sonrası CFSE MFI}} \quad (3.1)$$

3.8. Nitrik Oksit (NO) Analizleri

Griess yöntemi: ATRA veya D3 ve LPS veya IFN- γ ile farklılaştırılan HL-60 hücreleri 96 saat inkübasyonun sonunda santrüfj edilerek (13000rpm, 5 dakika, +4°C) ajanlar ortamdan uzaklaştırıldı. Hücreler sayılarak 1×10^6 hücre/200 μ l olacak şekilde tam RPMI'da süspanse edildi ve 96 kuyucuklu kültür kaplarında 2 kuyuya (duplike) ekildi. 24 saat inkübasyonun ardından iki kuyucuk birleştirilerek santrifj (13000rpm, 5 dakika, +4°C) yapıldı ve süpernatantlar +4°C'de toplanarak nitrit düzeyleri açısından Griess reaksiyonu ile değerlendirildi. Bu amaçla 100 μ l süpernatant ve 100 μ l Griess ajanı (%5 fosforik asit ve %0.1 N-1-Nnaphthylethylenediamin dihidroklorit dH₂O içerisinde %1 sülfanilamid) ile 96 kuyucuklu kültür kaplarında karıştırılmıştır. Griess ajanı, Griess A ve Griess B ajanları eşit hacimde karıştırılarak oluşturulmuştur. Nitrit konsantrasyonlarını hesaplayabilmek için "kuadratik model'e" uygun bir standart eğri temel alınmıştır, (Şekil 3.9). Bunun için, stok konsantrasyonu 10 mM standart sodyum nitrit, (NaNO₂) çözeltisi tam RPMI ile 100 μ M konsantrasyona indirildi. İçerisinde 100 μ l tam RPMI bulunan standart kuyucuklardan ilkin 100 μ l eklenip, seri dilüsyonları yapıldı (50 μ M, 25 μ M, 12.5 μ M, 6.25 μ M, 3.125 μ M, 1562.5 nM ve 781.25 nM). Tüm standart kuyucuklarına da 100 μ l Griess ajanı eklendi. İnkübasyon çalkalayıcı üzerinde karanlıkta, 30 dakika ve oda sıcaklığında gerçekleştirildi. Plak 535 nm dalga boyunda (SpectraMax Plus, Molecular Devices, CA, ABD) okundu. Analizler Softmaxpro 2.6.1 yazılımı (Molecular Devices, ABD) ile gerçekleştirildi. Seyreltilen (1:1) örneklerin analiz sonrasındaki değerleri gerçek konsantrasyonu yansıtmaları amacıyla iki ile çarpılmıştır.



Şekil 3.9. Total NO konsantrasyonlarını hesaplayabilmek için “kuadratik model’e” uygun olarak belirlenen standart eğri. Standart çözeltisi (sodyum nitrit, NaNO₂,) kullanılarak 100 µM, 50 µM, 25 µM, 12.5 µM, 6.25 µM, 3.125 µM konsantrasyonlarda standartlar kullanılmıştır. R²: 0.942.

Nitric oxide (total) detection kit (Enzo, Türkiye): kullanılarak da süpernatantlardaki nitrat düzeyleri araştırılmıştır. Bu ölçüm için blank kuyularına 200 µl reaksiyon buffer; 50 µl standart çözeltisi (100 µM, 50 µM, 25 µM, 12.5 µM, 6.25 µM, 3.125 µM, konsantrasyonda standart solüsyonu hazırlanmıştır) standart kuyularına; 50 µl reaksiyon buffer zero standart kuyularına; 50 µl hücre süpernatantları da örnek kuyularına eklenmiştir. Blank kuyuları hariç tüm kuyulara 25 µl nikotinamid adenin dinükleotid (*nicotinamide adenine dinucleotide*, NADH) ve 25 µl nitrat redüktaz enzimi eklenmiştir. Karanlıkta ve 30 dakika 37°C’de inkübasyonun ardından blank kuyuları hariç tüm kuyulara 50 µl Griess ajanı-I ve 50 µl Griess ajanı-II sırasıyla eklenip, 10 dakika oda sıcaklığında ve karanlıkta çalkalayıcıda inkübasyona koyulmuştur. Plak 550 nm dalga boyunda (SpectraMax Plus,

Molecular Devices, ABD) okunmuştur. Analizler Softmaxpro 2.6.1 yazılımı (Molecular Devices, ABD) ile gerçekleştirilmiştir.

Griess reaksiyonu veya nitric oxide (total) detection kit (ENZO) kullanılarak yapılan tüm deneyler 20 dakika PMA (0.8 µM) ile uyarım koşullarında da gerçekleştirilmiştir. Bu sayede PMA ile uyarılmış hücrelerin MFI değerleri, uyarımsız koşula oranlanarak NO indeksi hesaplanmıştır ve sonuçlar bu değerler üzerinden yorumlanmıştır, (Formül 3.2).

$$\text{NO indeks} = \frac{\text{PMA-uyarım OD}_{535\text{nm}}}{\text{Kontrol OD}_{535\text{nm}}} \quad (3.2)$$

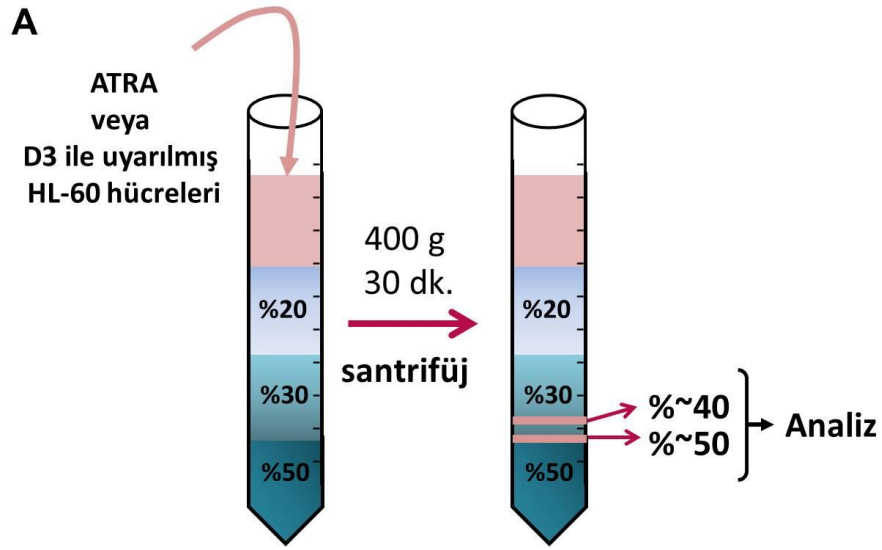
3.9. Reaktif Oksijen Türlerinin (*Reactive Oxygen Species*, ROS) Analizleri

Çeşitli koşullarda farklılaştırılan veya kontrol HL-60 hücreleri sayılarak, $5 \times 10^5/500$ µl olacak şekilde 5 ml'lik 2 tüpe (duplike) alındı. Bir gruba 5 µl phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (0.8 µM) eklenerek 20 dakika 37°C de inkübasyona bırakıldı. PMA'sız gruplar santrifüj (1800rpm, 5 dakika, +4°C) edilerek 500 µl PBS'de süspansiyon edildi. İnkübasyon sonunda PMA'lı gruplar da santrifüj (1800rpm, 5 dakika, +4°C) edilerek 500 µl PBS'de süspansiyon edildi. Tüm gruplara, 5 µl Karboksi-H₂-DCF-DA (Anaspec, ABD) (1mM) eklenerek 20 dakika 37°C de inkübasyona bırakıldı. Tüpler inkübasyon sonrasında santrifüj edilerek (1800rpm, 5 dakika, +4°C) 200 µl tam RPMI ile süspansiyon edildi ve buz üzerine alındı. Analizler akım sitometri cihazında gerçekleştirildi. Tüm deney aşamaları karanlıkta gerçekleştirildi. Sonuçların yorumlanabilmesi için deney gruplarının ROS indeksi hesaplandı. Bunun için PMA ile uyarım sonucunda elde edilen MFI değerleri, uyarımsız MFI değerine oranlanmıştır, (Formül 3.3).

$$\text{ROS indeksi} = \frac{\text{PMA-uyarım MFI}}{\text{Kontrol MFI}} \quad (3.3)$$

3.10. Percoll *Gradient* Santrifüj Yöntemi ile HL-60 Hücrelerinin Yoğunluk Ayrılması

ATRA veya D3 ile 96 saat boyunca inkübe edilen HL-60 hücreleri 15 ml'lik tüplere alınarak santrifüj (1800rpm, 5 dakika, +4°C) edildi ve 4 ml PBS eklenerek süspanse edildi. %100 percoll, PBS kullanılarak %75, %70, %65, %60, %55, %50, %30 ve %20 yoğunluklarına seyreltilti. %75'lik percoll yoğunluğundan başlanıp %50'lik percoll yoğunluğuna kadar azalan yoğunluklarda 2'şer ml percoll 15'lik falcona üst üste yayıldı. En üste ise 2 ml ATRA veya D3 ile uyarılmış HL-60 veya kontrol hücreleri eklendi. Hücreler santrifüj (400xg, 40 dakika, +4°C, Hızlanma: 8 ve Yavaşlama: 0) edildikten sonra oluşan fazlar toplandı. Tüm gruplarda hücrelerin özellikle ~%50 yoğunlukta toplandığı gözlemlendi ve daha az yoğunlukta hücrelerin belirlenebilmesi için %50, %30 ve %20 percoll yoğunlukları kullanılarak deneylere devam edildi. Percoll yöntemiyle farklı yoğunluk fazlarında (~%50 ve ~%40) ayrımlanan HL-60 hücreleri, (Şekil 3.10) toplanarak PBS ile yıkandı. Hücreler anti-CD14, anti-CD11b ve anti-CD11c antikorları ile işaretlendi. Analizler akım sitometri cihazında gerçekleştirildi.



Şekil 3.10. A) ATRA veya D3 ile uyarılmış HL-60 hücrelerinin percoll gradiyent santrifüj yöntemi ile ayrılma koşulları ve yaklaşık %40 ve %50 percoll yoğunluklarında toplanan hücrelerin temsili gösterimi.

3.11. Farklılaştırılan HL-60 Hücrelerinde Morfolojik Analizler

ATRA veya D3 ve LPS veya IFN- γ uyarılan, veya kontrol HL-60 hücreleri 96 saat inkübasyonun sonunda pipetlenerek homojen olarak dağıtıldı. Her koşuldan 1'er ml alındıktan sonra hücreler cytopspin yapılarak May-Grünwald Giemsa ile boyandı ve ışık mikroskobu (Olympus, BX50, Japonya) ile sitolojik analizleri gerçekleştirildi. Sitolojik boyamalar Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalında gerçekleştirilmiştir.

3.12. İstatistiksel Analiz

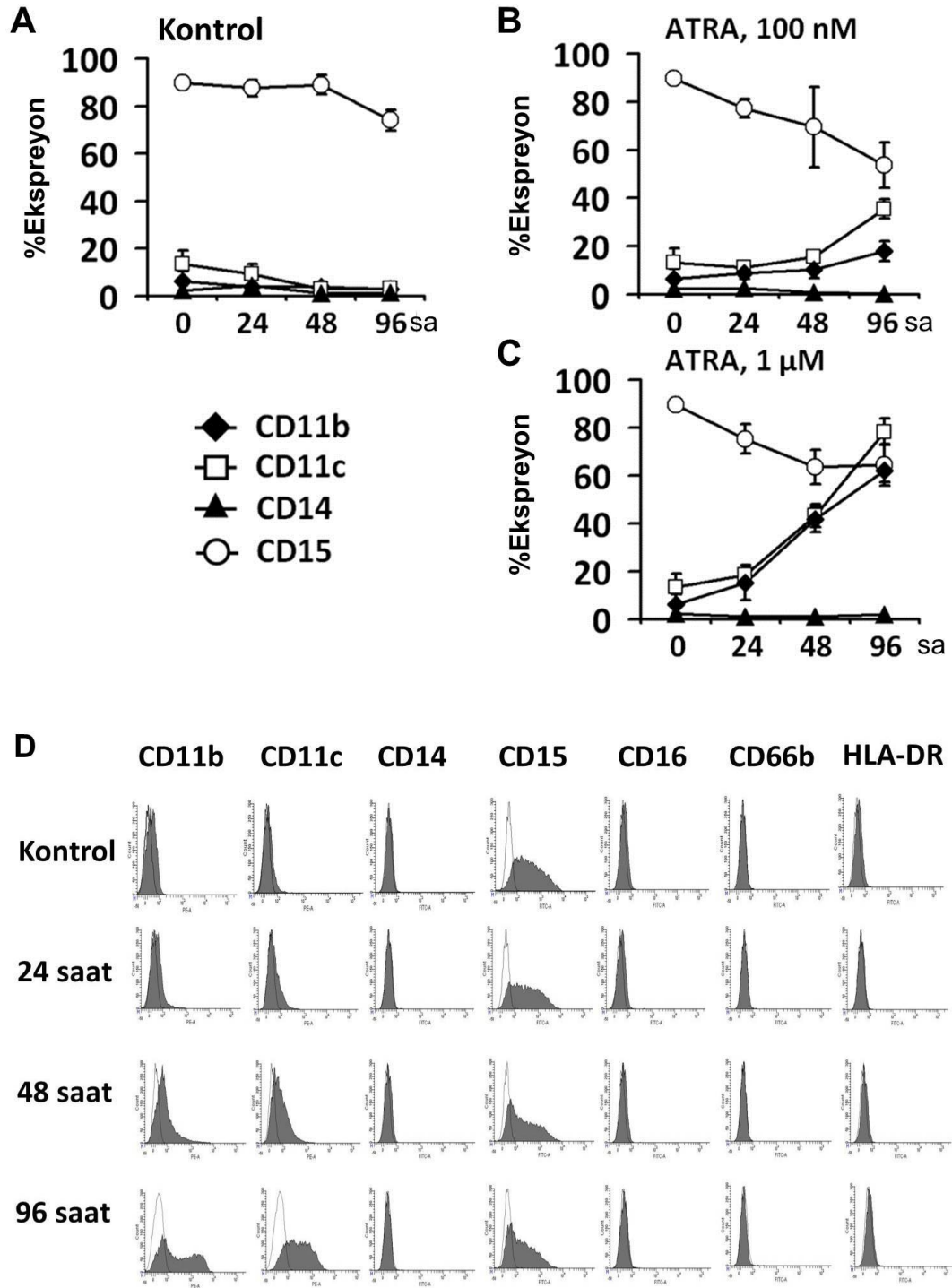
Veriler, en az 3 bağımsız deney yapılarak elde edilmiştir. ANOVA ve Student's t-testi kullanılarak analiz yapılmıştır. Analiz sonucunda $P < 0.05$ olarak hesaplanan sonuçlar, istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. HL-60 Miyeloid Lösemi Hücre Hattının All-trans Retinoik Asit (ATRA) veya 1 α ,25-dihidroksivitamin D3 (D3) ile Farklılaştırılması

HL-60 lösemi hücreleri farklı miyeloid hücre serilerine dönüşme kapasitesi nedeniyle farklılaşma çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır (159) . Buradan hareketle, ATRA veya D3 ajanları ile yapılacak uyarımlarda, daha önce yapılmış çalışmalarda bildirilen son konsantrasyon ve inkübasyon süreleri göz önünde bulunduruldu (160,161) . Ayrıca, miyeloid hücre farklılaşması sırasında en belirgin değişimi gösteren hücre yüzey belirteçleri (CD11b, CD11c, CD14, CD15, CD16, CD66b ve HLA-DR) değerlendirilerek, ilk etapta çalışma için uygun uyarım koşulları belirlendi.

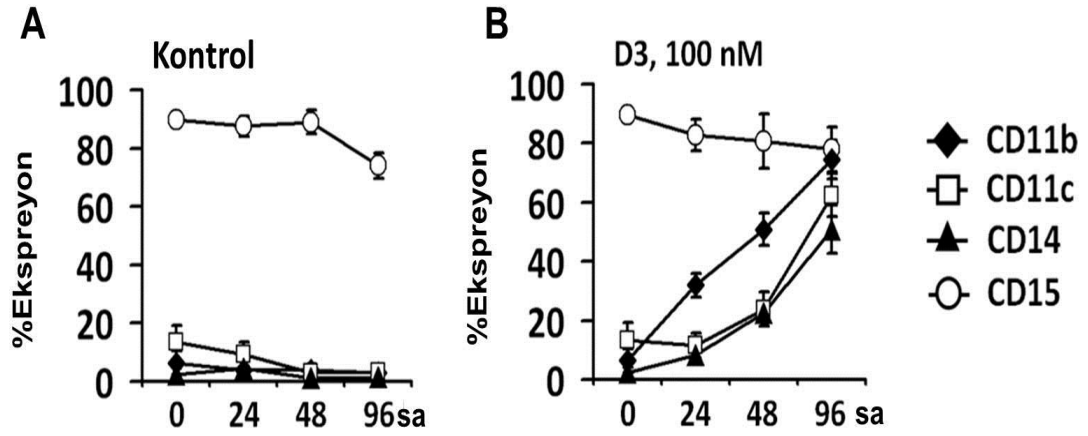
HL-60 hücrelerinin ATRA ile 24, 48 ve 96 saat uyarımına 100 nM konsantrasyon ile başlandı. Fakat 96 saatlik inkübasyon sonunda CD11b ve CD11c belirteçlerinde kontrol HL-60 hücrelerine göre sınırlı düzeyde artış gözlemlendi, (Şekil 4.1A ve 4.1B). ATRA konsantrasyonu 1 μ M'a yükseltildiğinde ise HL-60 hücrelerinin büyük çoğunluğunda (>%65) CD11b (kontrol, %5 $\pm$ 3.3; ATRA 1 μ M; %70.7 $\pm$ 11.7) ve CD11c (kontrol, %9.8 $\pm$ 3.6; ATRA 1 μ M, %80.6 $\pm$ 6.6) belirteçleri 96. saatte belirlendi, (Şekil 4.1C). Gerek kontrol, gerekse 100 nM ve 1 μ M ATRA ile uyarılan hücrelerin CD15 düzeyinde zamana bağlı bir azalma gözlenirken; CD14, CD16, CD66b ve HLA-DR ekspresyonunun ATRA ile uyarılmadığı belirlendi, (Şekil 4.1D). 48 saatlik uyarımda ise, bu hücrelerin farklılaşma yoluna girdiğine dair gözlemler yapıldı. Bu sonuçlar doğrultusunda 96 saat ve 1 μ M ATRA ile uyarımın HL-60 farklılaşması için uygun olduğu görüldü. İleride yapılacak deneyler bu koşullarda gerçekleştirildi.

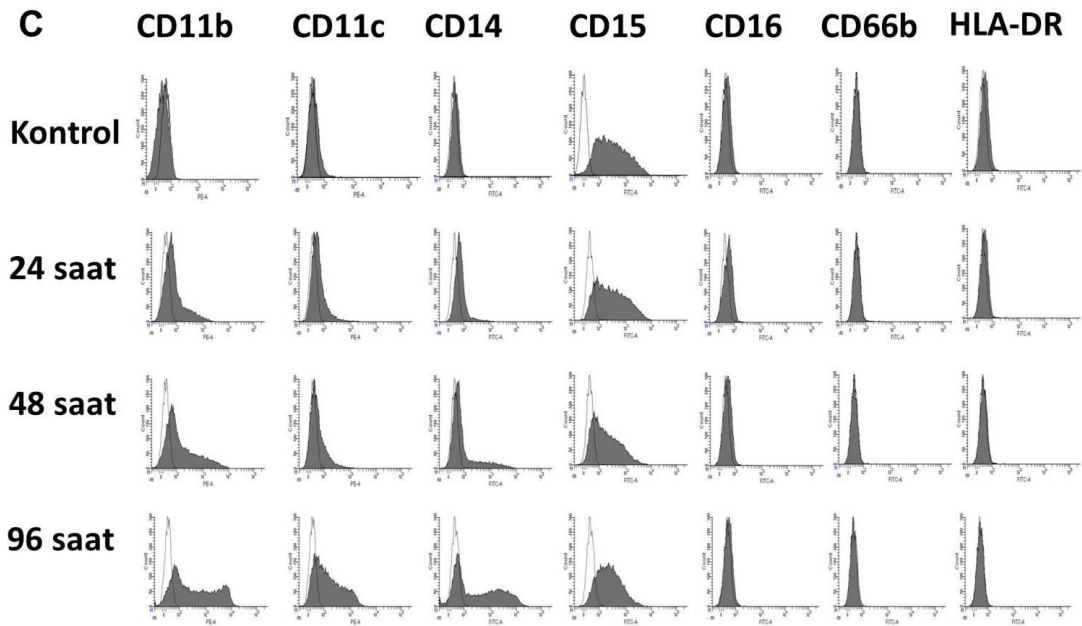


Şekil 4.1. Farklı iki konsantrasyonda uygulanan ATRA uyarımı sonucunda HL-60 hücrelerinde CD11b, CD11c, CD14 ve CD15 yüzey belirteçlerinin zamana bağlı değişimleri gösterilmiştir. A) Kontrol HL-60 hücrelerinde, B) 100nM ATRA konsantrasyonu ile uyarılan HL-60 hücrelerinde, C) 1 µM ATRA konsantrasyonu ile uyarılan HL-60 hücrelerinde CD11b, CD11c, CD14

veya CD15 belirteci taşıyan hücre yüzdelерinin değışimi. D) 1 μ M ATRA konsantrasyonu ile uyarılan HL-60 hücrelerinde CD11b, CD11c, CD14, CD15, CD16, CD66b veya HLA-DR yüzey belirteçlerinin zamana bağılı değışimlerinin gösterildiğı temsili akım sitometri histogramları. Boş histogram, izotipik kontrol; dolu histogram, özgül antikorla boyanma.

HL-60 hücreleri 100 nM D3 ile 24, 48 ve 96 saat sürelerinde inkübe edildi. CD11b (kontrol, 5.2 ± 3.3 ; D3, 74.1 ± 4.5), CD11c (kontrol 9.8 ± 3.6 , D3 69.1 ± 7.5) ve CD14 (kontrol 4.6 ± 3.9 , D3 36.8 ± 1.8) belirteçlerinde kontrole göre en belirgin artış inkübasyonun 96. saatinde görüldü.

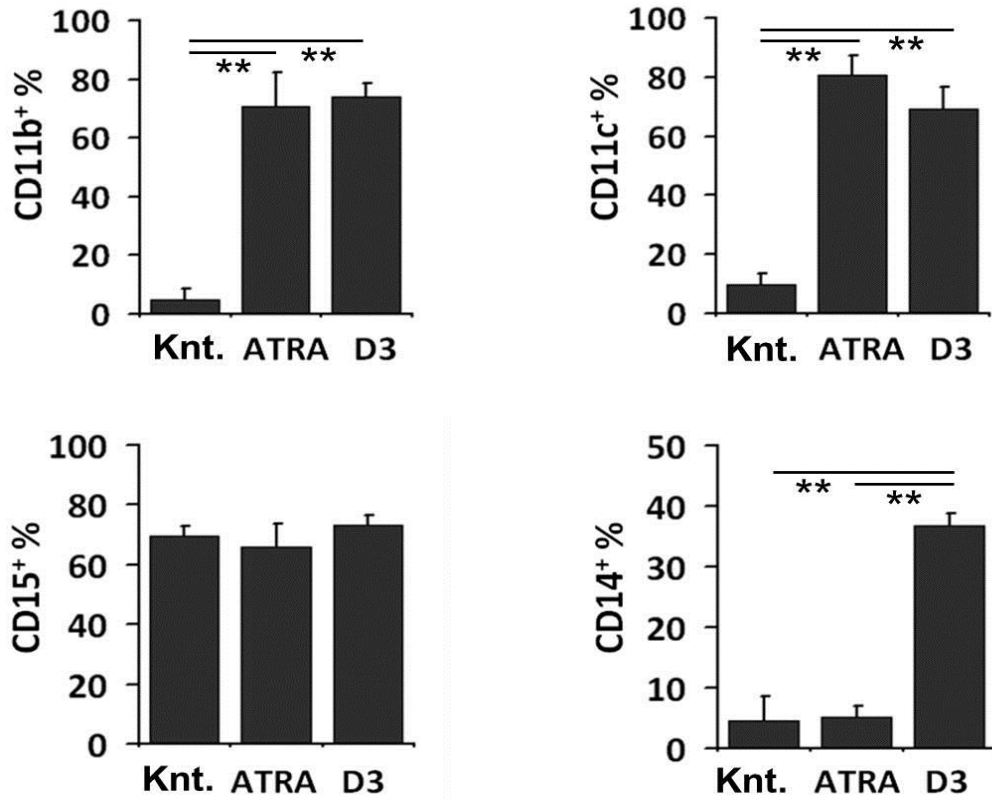




Şekil 4.2. D3 uyarımı sonrasında HL-60 hücrelerinde CD11b, CD11c, CD14 ve CD15 yüzey belirteçlerinin zamana bağlı değişimleri. A) Kontrol HL-60 hücreleri veya B) 100nM D3 konsantrasyonu ile uyarılan HL-60 hücrelerinde CD11b, CD11c, CD14 veya CD15 belirteci taşıyan hücre yüzdelerinin değişimi. C) 100nM D3 konsantrasyonu ile uyarılan HL-60 hücrelerinde CD11b, CD11c, CD14, CD15, CD16, CD66b ve HLA-DR yüzey belirteçlerinin zamana bağlı değişimlerinin gösterildiği temsili akım sitometri histogramları. Boş histogram, izotipik kontrol; dolu histogram, özgül antikorla boyanma.

Yine, CD15 ekspresyonunda zamana bağlı hafif bir düşüş gözlenirken, 100 nM D3 ile uyarımının CD16, CD66b veya HLA-DR ekspresyonlarında kontrol HL-60 hücrelerine göre herhangi bir değişime neden olmadığı görüldü. ATRA ile uyarıma benzer şekilde, D3 uyarımının da 48. saatinde hücrelerin farklılaşma yoluna girdikleri görüldü.

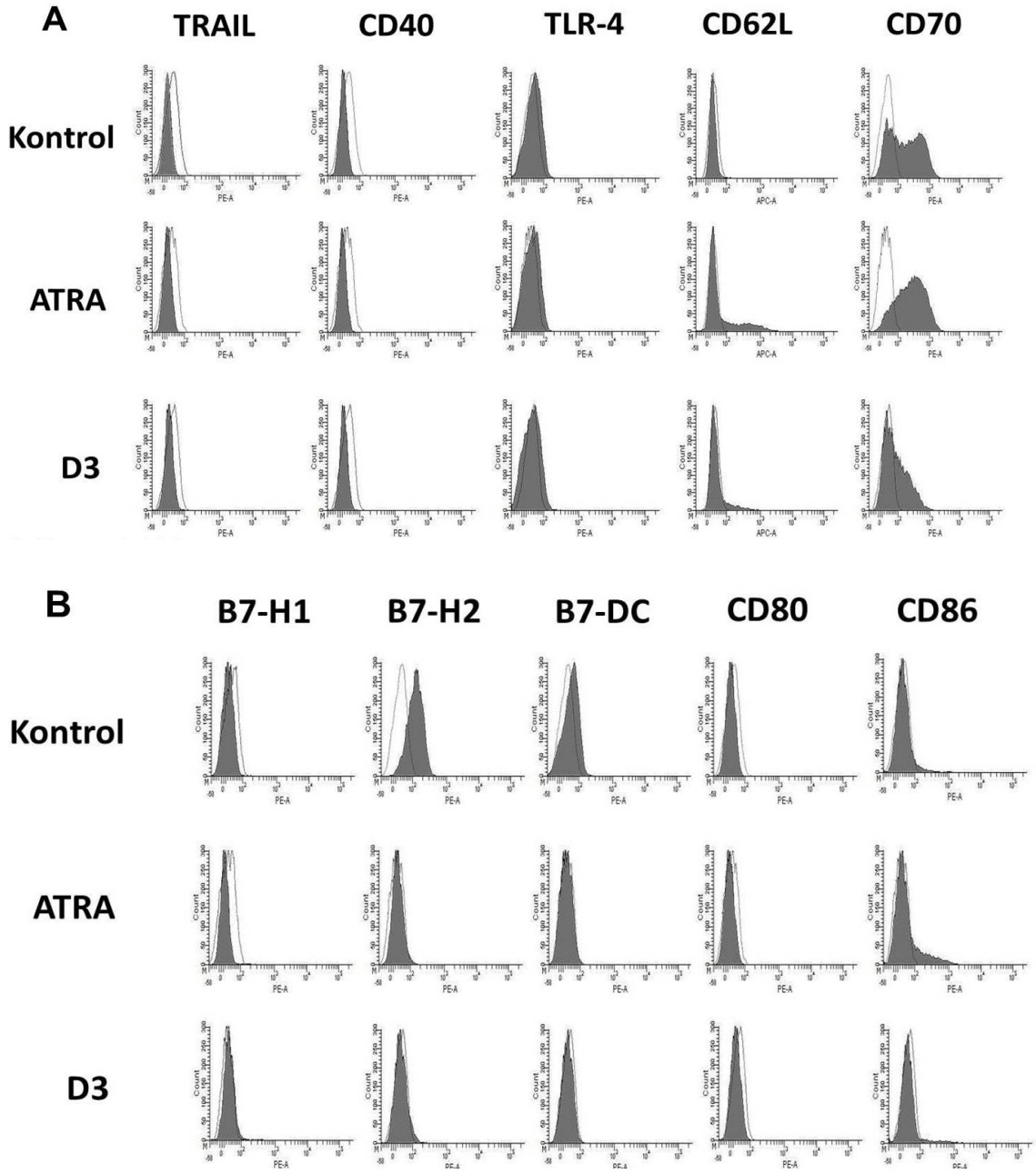
CD11b, CD11c, CD14 ve CD15 yüzey belirteçlerinin 1 μ M ATRA ve 100 nM D3 ile 96 saatlik uyarım sonrasında değişimi kıyaslandığında, (Şekil 4.3) CD14'ün sadece D3 ile anlamlı düzeyde uyarılabildiği görülmüştür. CD11b, CD11c veya CD15 düzeyleri ATRA veya D3 ile uyarılmış gruplarda benzer düzeylerde gözlenmiştir.



Şekil 4.3. HL-60 hücrelerinde 96 saat 1 μ M ATRA veya 100 nM D3 uyarımı sonucunda CD11b, CD11c, CD14 veya CD15 belirteçlerini taşıyan hücre yüzdelерinin gruplar arasındaki farklılıkları, (** $P < 0.01$). Knt., kontrol HL-60 hücreleri.

4.1.1. ATRA veya D3 ile Uyarılan HL-60 Hücrelerinde Diğer İmmünofenotipik Farklılıklarının Araştırılması

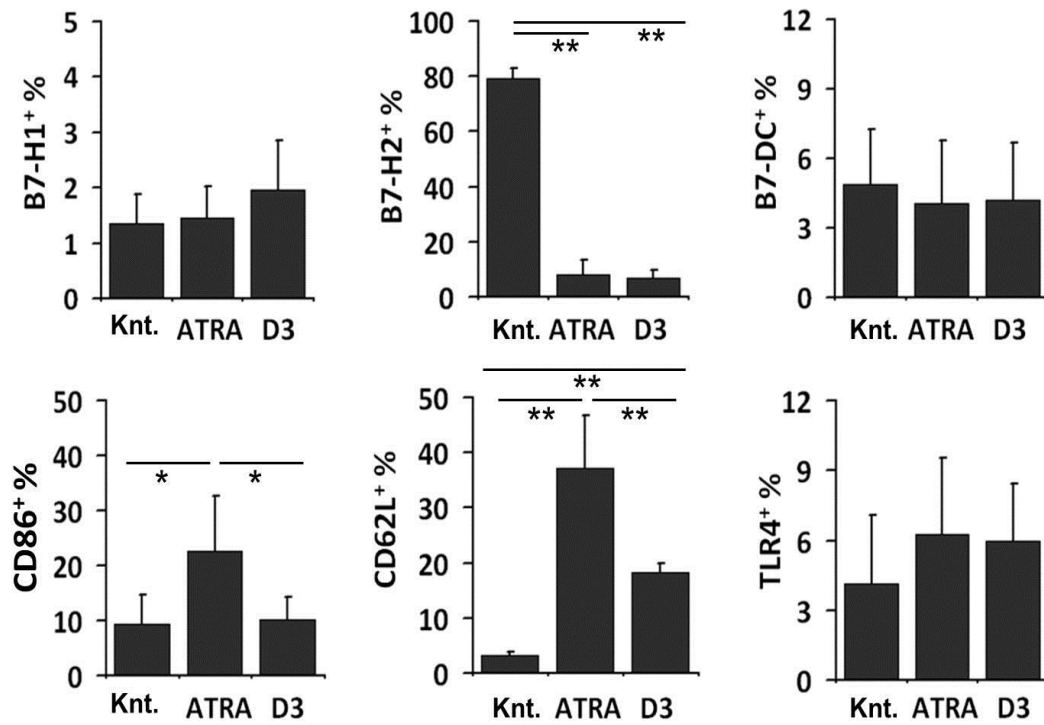
Temel miyeloid farklılaşma belirteçleri arasında yer alan CD11b, CD11c, CD14, CD15, CD16, CD66b, HLA-DR moleküllerine ek olarak; miyeloid hücre fonksiyonel farklılaşması hakkında bilgi verebilecek CD40, TRAIL, TLR4, CD62L ve CD70; ko-stimülasyonda etkili B7-H1, B7-DC, B7-H2, CD80 ve CD86 B7 ailesi belirteçlerinin düzeyi de 96 saat 1 μ M ATRA veya 100nM D3 ile uyarılmış HL-60 hücrelerinde araştırıldı, (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. HL-60 hücrelerinde 96 saat ATRA veya D3 uyarımı sonucunda A) miyeloid fonksiyonda etkili moleküllerin ve B) B7 ko-stimülatör moleküllerinin ekspresyon düzeyini gösteren temsili akım sitometri histogramları. Boş histogram, izotipik kontrol; dolu histogram, özgül antikörle boyanma.

ATRA uyarımı, CD86 (kontrol, 9.4 ± 5.2 ; ATRA, 22.6 ± 9.9) ve CD62L (kontrol, 3.2 ± 0.5 ; ATRA, 37.2 ± 9.4) artışına, B7-H2 pozitif hücrelerin ise (kontrol, 79.4 ± 3.4 ; ATRA, 7.9 ± 5.3) azalmasına neden

olmuştur. D3 uyarımında ise, CD62L (kontrol, 3.2 ± 0.5 ; D3, 18.3 ± 1.6) düzeyinde artış, B7-H2'de (kontrol, 79.4 ± 3.4 ; D3, 7 ± 2.6) azalma görülmüştür. CD70 (kontrol, 67.4 ; ATRA, 87.7 ; D3, 54.6) yüzey ekspresyonunun her iki uyarımdan etkilendiği görülmüş fakat kontrol HL-60 hücrelerine göre pozitif hücre yüzdeleri arasında belirgin bir fark izlenmemiştir. Bar grafikleri çizilirken 3 bağımsız deney sonuçlarının ortalaması dikkate alınmıştır. CD70 antikoru sadece bir defa boyanma için yetmiştir. Bu yüzden CD70'in bar grafiği çizilememiştir. Analiz edilen diğer belirteçlerde ATRA ve D3 uyarımında kontrol HL-60 hücrelerine göre anlamlı fark oluşmamıştır, (Şekil 4.4 ve Şekil 4.5).

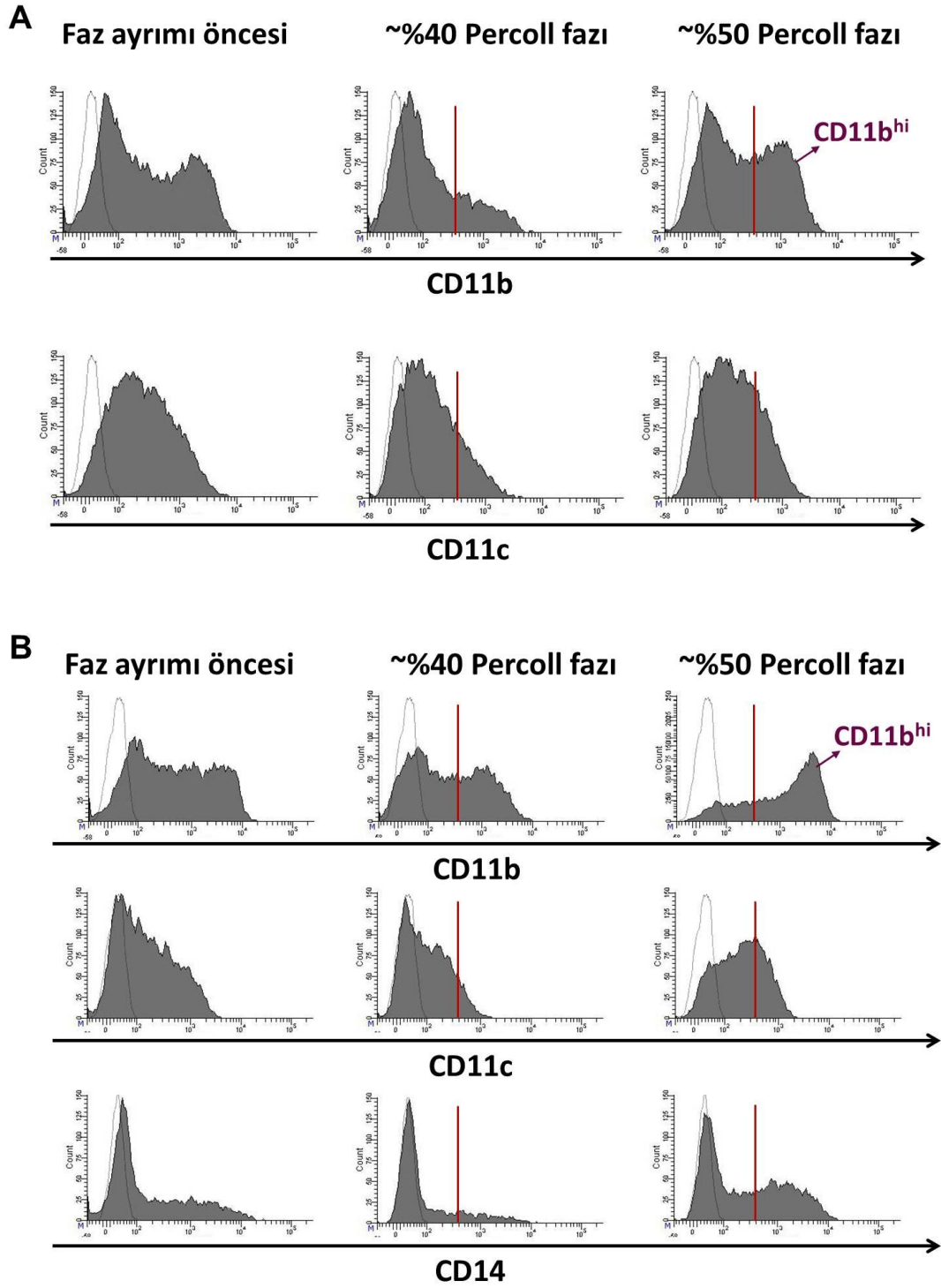


Şekil 4.5. HL-60 hücrelerinde 96 saat ATRA veya D3 uyarımı sonucunda kontrol HL-60 hücrelerine göre ekspresyon varlığı belirlenen B7-H1, B7-H2, B7-DC, CD86, CD62L veya TLR4 yüzey belirteçlerini taşıyan hücre düzeylerinin gruplar arasındaki yüzde değişimleri. Knt; Kontrol HL-60 hücreleri, (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$).

4.1.2. ATRA veya D3 ile Olgunlaştırılan HL-60 Hücrelerinin Yoğunluk Farklarının Araştırılması

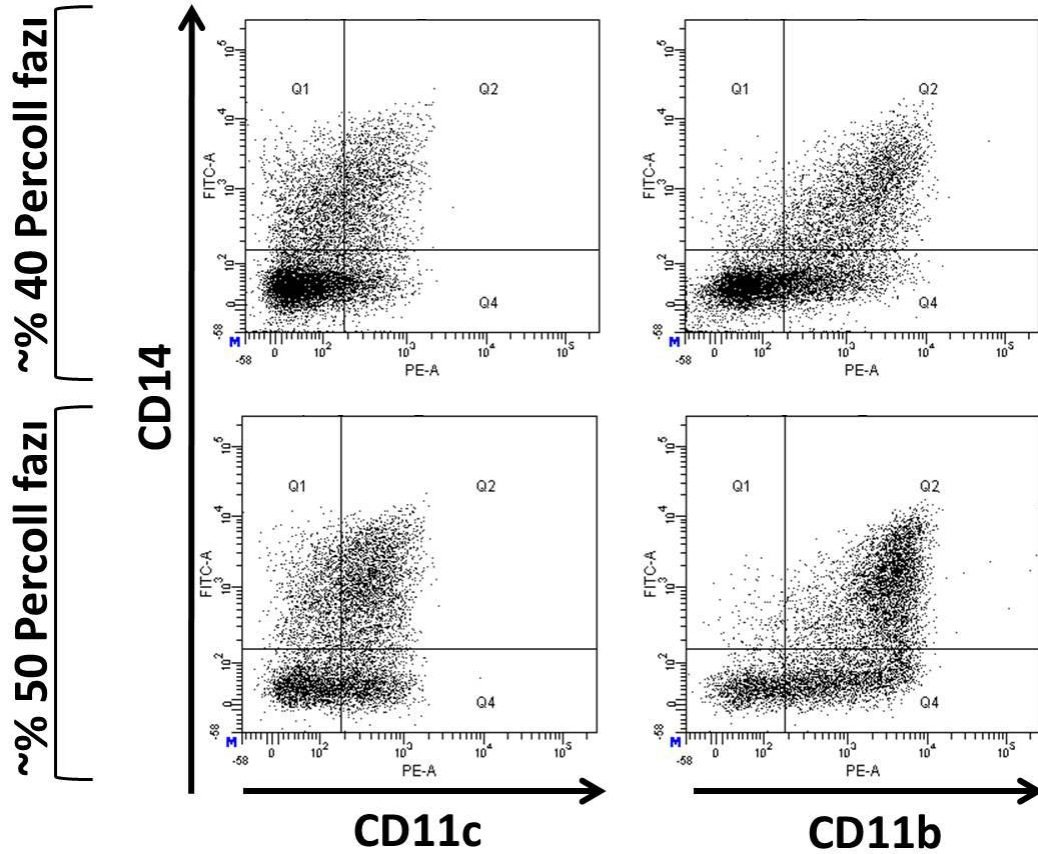
Farklılaşan ve/veya olgunlaşan miyeloid hücrelerin hücresel yoğunluğunda artış gözlenir (162) . ATRA veya D3 ile farklılaştırılan HL-60 hücrelerinin yoğunluğundaki değişimi belirlemek amacıyla %50, %30 ve %20 Percoll *gradient* ayırlama yöntemi kullanıldı. Kontrol HL-60 hücreleri ~%50 Percoll dilüsyonunda tek bir faz olarak toplanırken, 96 saat boyunca ATRA veya D3 ile uyarılmış hücrelerde ~%40 ve ~%50 Percoll yoğunluk bölgesinde iki ayrı fazda toplanmış hücreler gözlemlendi. Bu yoğunluk farkının CD11b, CD11c ve CD14 farklılaşma belirteçleri ile ilişkisini belirlemek amacıyla her iki ayrı fazdaki hücreler toplanarak, immünofenotip analizi gerçekleştirildi.

Genel olarak, ~%40 Percoll bölgesinde yoğunlaşan hücrelerin immünofenotipik olarak ~%50 bölgesindekilere kıyasla farklılaşma belirteçlerini daha düşük düzeylerde taşıdığı görülmüştür. ATRA grubunda ~%50 bölgesinden toplanan hücrelerin pozitiflik oranı; CD11b (%54.7±5.6) ve CD11c (%49.6±3.6) belirteç ekspresyonu ~%40 bölgesindekilerden (CD11b, %28.8±6.8; CD11c, %35.3±12.4) daha yüksek idi, (Şekil 4.6A ve Şekil 4.8A). Benzer şekilde, D3 grubunda da ~%50 Percoll dilüsyonunda toplanan hücrelerin CD11b (%82±5.8), CD11c (%72.4±9.8) ve CD14 (%54.9±3) ekspresyonu ~%40 bölgesindekilere (CD11b, %62.8±4.9; CD11c, %34.9±3; CD14, %35.2±1.9) göre daha yüksek olarak belirlendi, (Şekil 4. 6B ve Şekil 4. 8B). Her iki grupta da ~%50 Percoll dilüsyon bölgesine çöken hücresel yoğunluğu daha fazla olan hücrelerin hem CD11b ekspresyon düzeyi (CD11b^{hi}) hem de CD11b pozitiflik yüzdesi daha anlamlı düzeylerde yüksekti.



Şekil 4.6. A) ATRA veya B) D3 ile uyarılmış HL-60 hücrelerinin Percoll *gradient* yöntemi ile ayırılması sonucunda oluşan yaklaşık %40 ve %50 fazlarından toplanan hücrelerin CD11b, CD11c ve CD14 ekspresyonlarına ait temsili akım sitometri histogramları. CD11b^{hi}, CD11b yüzey antijenini yüksek düzeyde eksprese eden hücreler.

Ayrıca, D3 grubunda ~%50 Percoll fazında toplanan hücrelerin CD11b/CD14 ko-ekspresyon pozitifliği (%53.2±3), CD11c/CD14 pozitifliğine (%42.7±7) göre daha belirgin idi. Percoll ~%40 fazında toplanan D3 ile uyarılmış hücrelerde ise, CD11b/CD14-negatif veya CD11c/CD14-negatif hücrelerin yığıldığı görüldü, (Şekil 4.7).

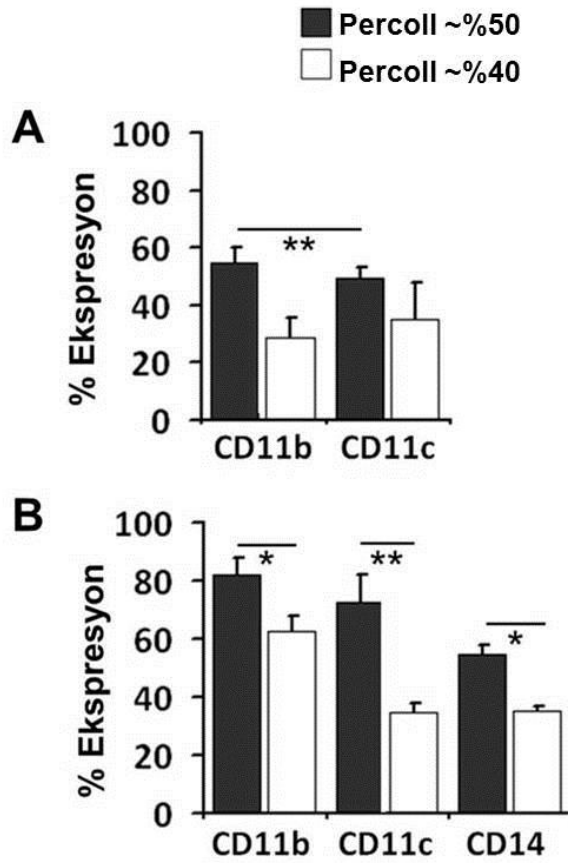


Şekil 4.7. D3 ile uyarılmış HL-60 hücrelerinde Percoll *gradient* ayırlaması sonucunda oluşan ~%40 ve ~%50 fazlarında bulunan hücrelerde CD11b ve CD11c yüzey belirteçlerinin CD14 ile ko-ekspresyon analizi. Temsili akım sitometri nokta saçılım grafikleri gösterilmiştir.

Tüm bu sonuçlar doğrultusunda hem ATRA hem de D3 grubunda daha olgun hücrelerin ~%50 Percoll dilüsyon fazında toplandığı ve özellikle CD11b'yi daha yüksek düzeylerde eksprese ettiği belirlenmiştir, (Şekil 4.8).

İmmünofenotipik ve yoğunluk analizleri sonucunda 96 saat boyunca 1 μ M ATRA veya 100nM D3 ile uyarılan HL-60 hücrelerinin farklı

immünofenotipik karakter ve olgunlaşma dereceleri kazanmaları nedeniyle, ATRA ile farklılaştırılan hücreler A-HL-60; D3 ile farklılaştırılan hücreler ise D-HL-60 olarak isimlendirilmiştir.



Şekil 4.8. A) ATRA veya B) D3 ile 96 saat uyarılmış HL-60 hücrelerinde Percoll *gradient* ayırılması sonucunda oluşan yaklaşık ~%40 ve ~%50 fazlarında toplanan hücrelerin CD11b, CD11c veya CD14 yüzey belirteçlerini taşıma yüzdeleri gösterilmiştir, (* $P<0.05$, ** $P<0.01$).

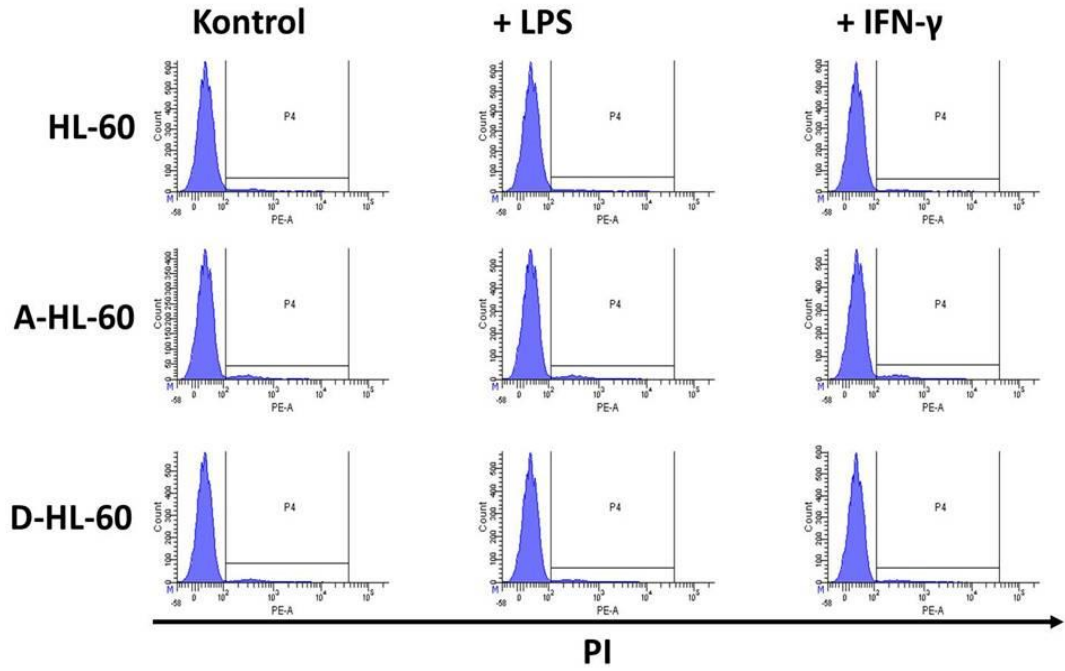
4.2. ATRA veya D3 ile Farklılaştırılan HL-60 Hücrelerinin LPS veya IFN- γ Varlığında Kazandıkları Karakterler

IFN- γ ve LPS immün hücrelerin olgunlaşmasını, farklılaşmasını ve aktivasyonunu yönlendiren sinyal yollarını aktive eder (163-166) . ATRA veya D3 ile 96 saat boyunca farklılaştırılan HL-60 hücrelerinin (sırasıyla, A-HL-60 hücreleri veya D-HL-60 hücreleri) LPS veya IFN- γ 'ya yanıtları

hücrelerin fonksiyonel açıdan karakterlerinin belirlenmesine katkıda bulunacaktır. A-HL-60 ve D-HL-60 hücrelerinin gelişimi sırasında, 48 saat süreyle ATRA veya D3 ile inkübe edilen hücrelerin miyeloid farklılaşma sürecine girdiği yapılan ilk deneylerde belirlenmişti, (Şekil 4.1C ve Şekil 4.2B). Bu nedenle, HL-60 hücrelerinin ATRA veya D3 inkübasyonunun 48. saatinde ortama LPS veya IFN- γ da eklenerek, deneyler 48 saat sonra (ATRA veya D3 inkübasyonu toplam 96 saate tamamlandı) sonlandırıldı. Bu uyarımlar sonrasında hücrelerdeki morfolojik ve immünofenotipik farklılıklar, reaktif oksijen türleri (ROS) ve nitrik oksit (NO) üretimi ve hücrelerin çoğalma kapasiteleri değerlendirilmiştir.

4.2.1. Canlılık Analizi

Hem ATRA veya D3 ve LPS veya IFN- γ uyarımlarının hem de bu ajanların içerisinde çözüldükleri maddelerin 96 saat boyunca hücre canlılığına zarar verici etkileri olabilir. Bu nedenle, propidyum iyodür (PI) boyama ile akım sitometrik canlılık analizi gerçekleştirilmiştir. Bu analizler sonucunda, tüm gruptaki hücrelerin >%97 canlılığa sahip olduğu belirlendi, (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. ATRA veya D3 ve LPS veya IFN- γ varlığında farklılaştırılan HL-60 hücrelerinin 96 saat sonraki canlılık durumu akım sitometrik propidyum iyodür (PI) analizi ile değerlendirildi. Temsili histogramlar gösterilmektedir.

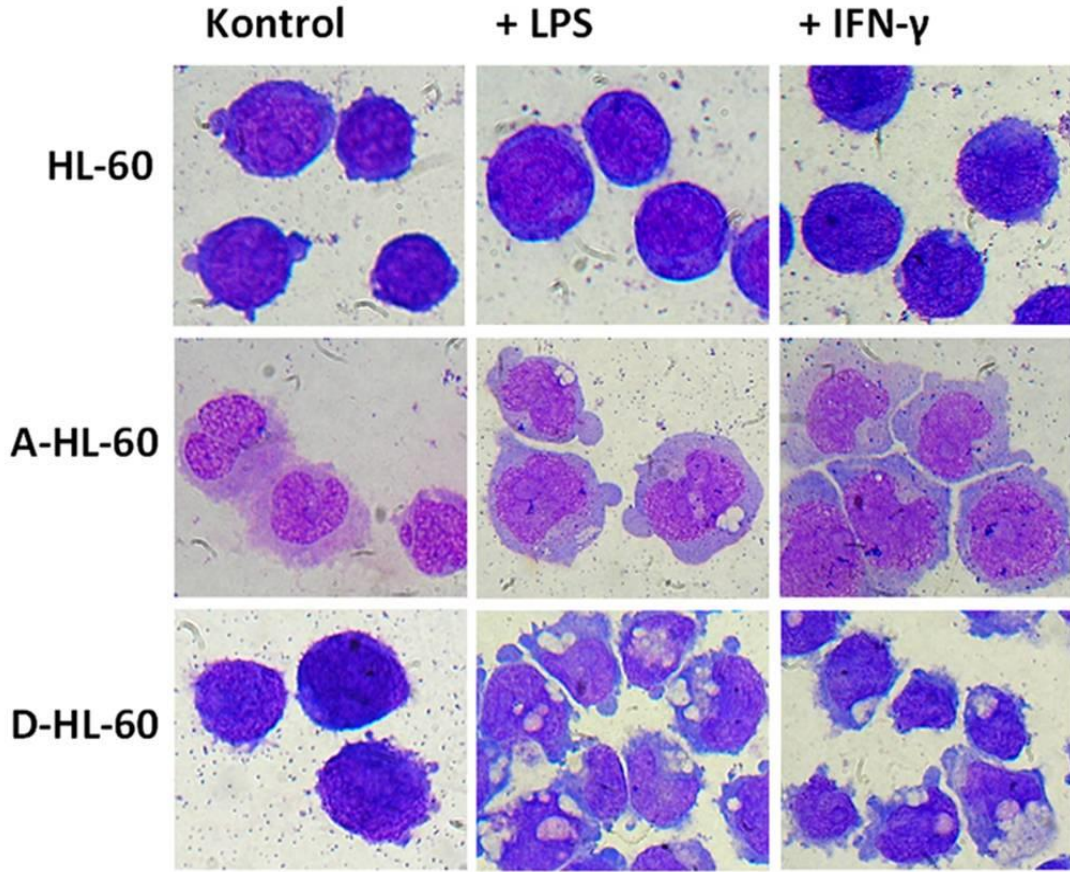
4.2.2. Morfolojik Analiz

ATRA, D3, LPS, IFN- γ veya bu ajanların kombinasyonları ile inkübe edilen HL-60 hücreleri sitolojik değerlendirme için May-Grünwald Giemsa boyası ile boyandı.

Kontrol HL-60 hücreleri blastik karakterde, merkezi yerleşimli sitoplazmayı daraltan yuvarlak nükleusa sahip hücreler olarak izlendi. HL-60 hücrelerinin LPS ve özellikle IFN- γ ile uyarımı sonucunda ise, nükleusun oval şekil kazandığı ve sitoplazmik alanın genişlediği görüldü. IFN- γ ile inkübasyon sonrasında bazı hücrelerin nükleuslarında segmentasyon belirgin hale geldi, (Şekil 4.10).

A-HL-60 hücreleri ince granüllü, genellikle azürofilik boyanan geniş bir sitoplazmaya ve segmentasyonu belirgin hale gelmiş nükleuslara sahipti. Bu hücrelerin LPS ile uyarılması bazı hücrelerde geniş sitoplazmik vakuollerin belirmesine neden oldu. Ayrıca, sitoplazma hacminde belirgin artış izlendi.

IFN- γ ile kültürü gerçekleştirilen A-HL-60 grubunda ise, hücrelerin çoğunda böbrek şekilli ve eksentrik nükleus bulunduğu görüldü. Ayrıca, bu hücrelerde granül artışı da gözlemlendi, (Şekil 4.10).



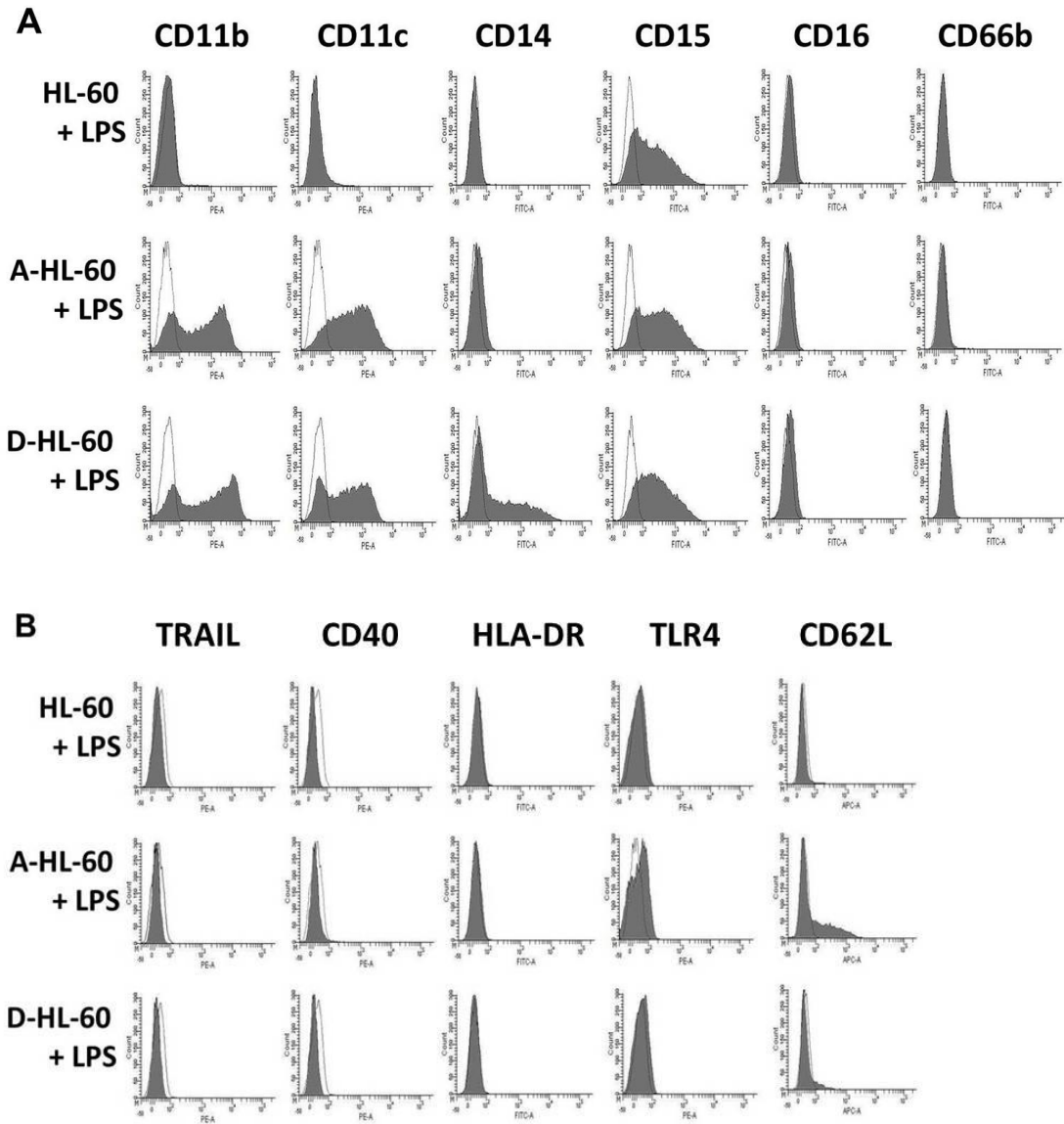
Şekil 4.10. Kontrol HL-60, A-HL-60, D-HL-60 ve bu hücrelerin LPS veya IFN- γ varlığında gösterdikleri morfolojik değişimler May-Grünwald Giemsa boyaması ile incelendi. Temsili mikrograflar gösterilmektedir, (1000x).

D-HL-60 hücreleri morfolojik olarak kontrol HL-60 hücrelerine benzer şekilde gözlemlendi. Ancak, bu hücrelerin LPS varlığında sitoplazmalarında yaygın ve geniş vakuoller içeren, böbrek şeklinde veya pleomorfizm gösteren eksentrik nükleuslu hücrelere dönüştüğü görüldü. Benzer durum, sitoplazmik vakuollerin daha az ve nükleusun daha oval olmasıyla birlikte IFN- γ ile inkübasyonu gerçekleştiren D-HL-60 hücrelerinde de görüldü, (Şekil 4.10).

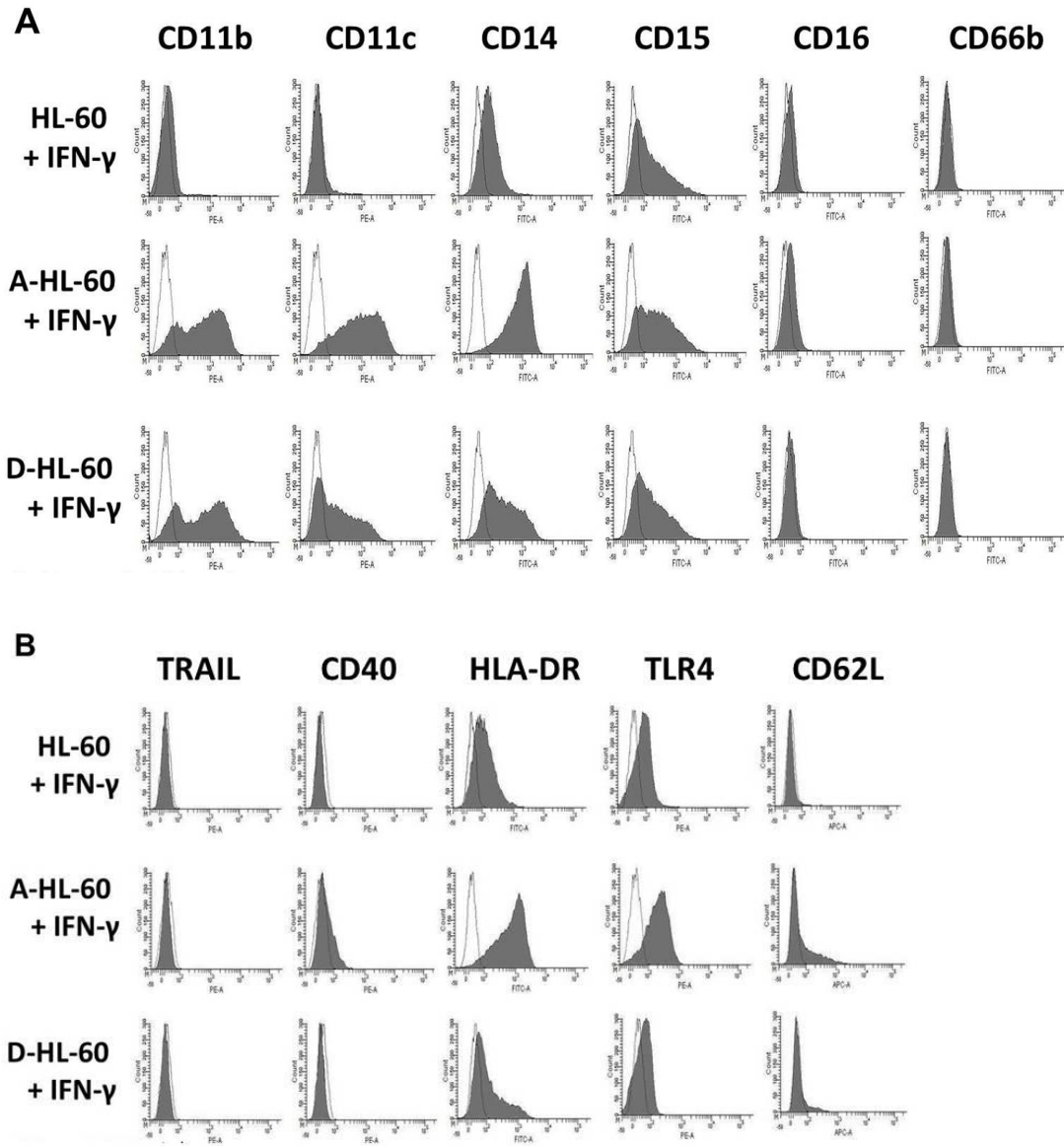
A-HL-60 ve D-HL-60 hücrelerinin LPS veya IFN- γ varlığında farklılaştırılması kısa tomurcuklar şeklinde membran projeksiyonlarının da oluşmasına neden oldu, (Şekil 4.10)

4.2.3. LPS veya IFN- γ Varlığında Farklılaştırılan Kontrol HL-60, A-HL-60 ve D-HL 60 Hücrelerin İmmünofenotip Analizi

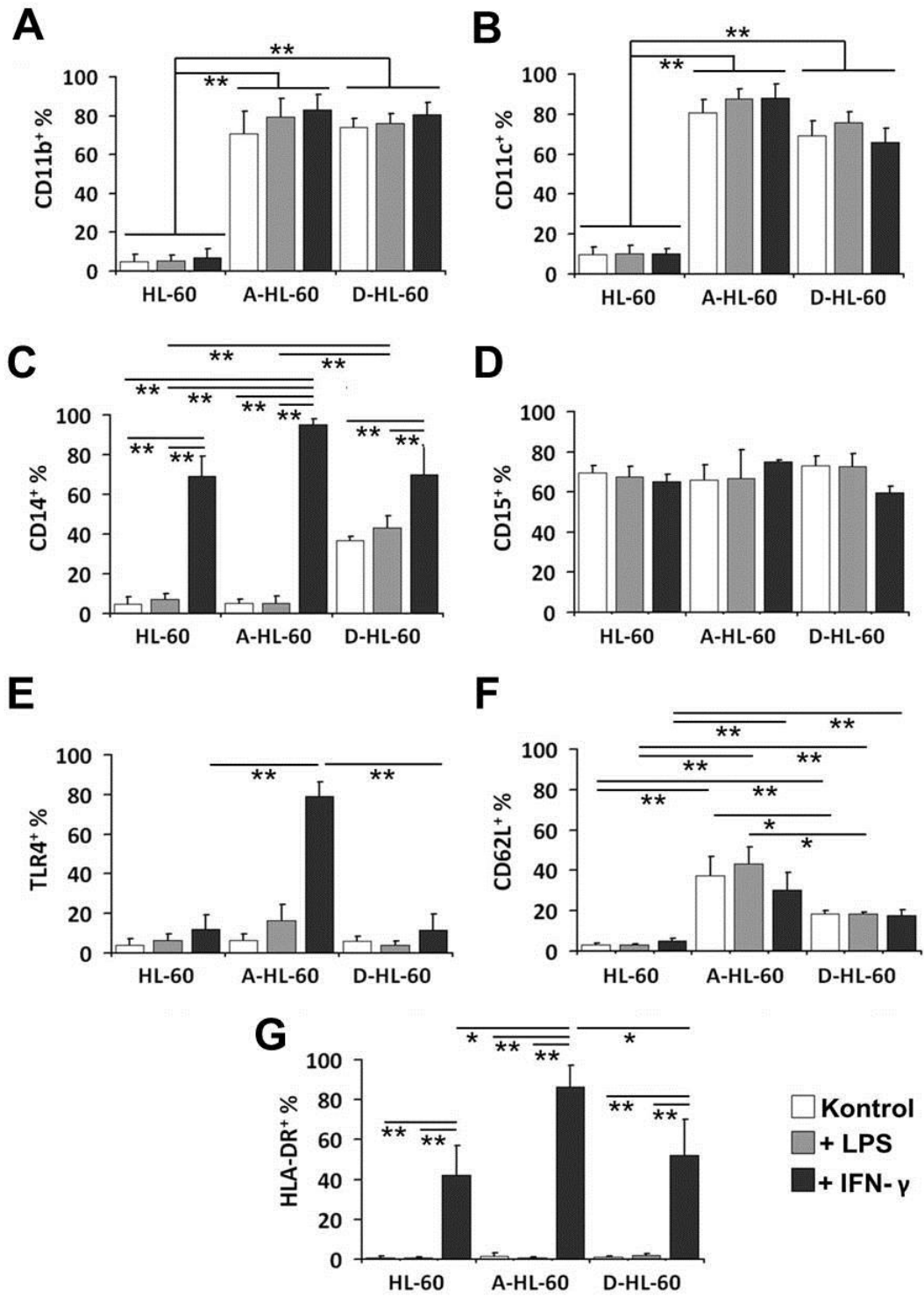
Gerek kontrol HL-60, gerekse A-HL-60 veya D-HL-60 hücrelerinin LPS varlığında 96 saate tamamlanan farklılaşma süreci sonunda araştırılan CD11b, CD11c, CD14, CD15, CD16, CD66b, HLA-DR, TRAIL, CD40, TLR4 ve CD62L yüzey belirteçlerinde anlamlı bir ekspresyon değişimi görülmedi, (Şekil 4.11 ve Şekil 4.13). Diğer taraftan, kontrol hücrelerinin IFN- γ ile uyarılması CD14 (kontrol, 4.6 ± 3.9 ; HL-60+IFN- γ , $\%69 \pm 10.3$) ve HLA-DR (kontrol, $\%0.9 \pm 0.4$; HL-60+IFN- γ , $\%42 \pm 14.8$) yüzey belirteçlerinde belirgin ve anlamlı bir artışa neden oldu. Benzer durum A-HL-60 (CD14⁺ A-HL-60, $\%5.1 \pm 1.9$; A-HL-60+IFN- γ , $\%95 \pm 2.8$) (HLA-DR⁺ A-HL-60, $\%1.5 \pm 1.7$; A-HL-60+IFN- γ , $\%86.3 \pm 10.7$) veya D-HL-60 (CD14⁺ D-HL-60, $\%36.8 \pm 1.8$; D-HL-60+IFN- γ , $\%70.1 \pm 14.5$) (HLA-DR⁺ D-HL-60, $\%1 \pm 0.3$; D-HL-60+IFN- γ , $\%52 \pm 18.2$) hücrelerinde de görüldü, (Şekil 4.12, Şekil 4.13C ve Şekil 4.13G). IFN- γ , TLR4 ekspresyonunu genel olarak pozitif yönde etkilerken, sadece A-HL-60 grubunda TLR4-pozitif hücre yüzdesini anlamlı düzeyde artırdı ($\%79.3 \pm 7$), (Şekil 4.12 ve Şekil 4.13E). IFN- γ varlığında CD14, HLA-DR ve TLR4 dışındaki belirteçleri taşıyan hücrelerin düzeyinde bir farklılık gözlenmedi, (Şekil 4.12 ve Şekil 4.13).



Şekil 4.11. LPS varlığında farklılaştırılan HL-60, A-HL-60 ve D-HL-60 hücrelerinde A) miyeloid olgunlaşma/farklılaşma ve B) fonksiyonel karakter belirteçlerinin ekspresyonu. Temsili akım sitometri histogramları gösterilmiştir. Boş histogram, izotipik kontrol; dolu histogram, özgül antikorla boyanma.



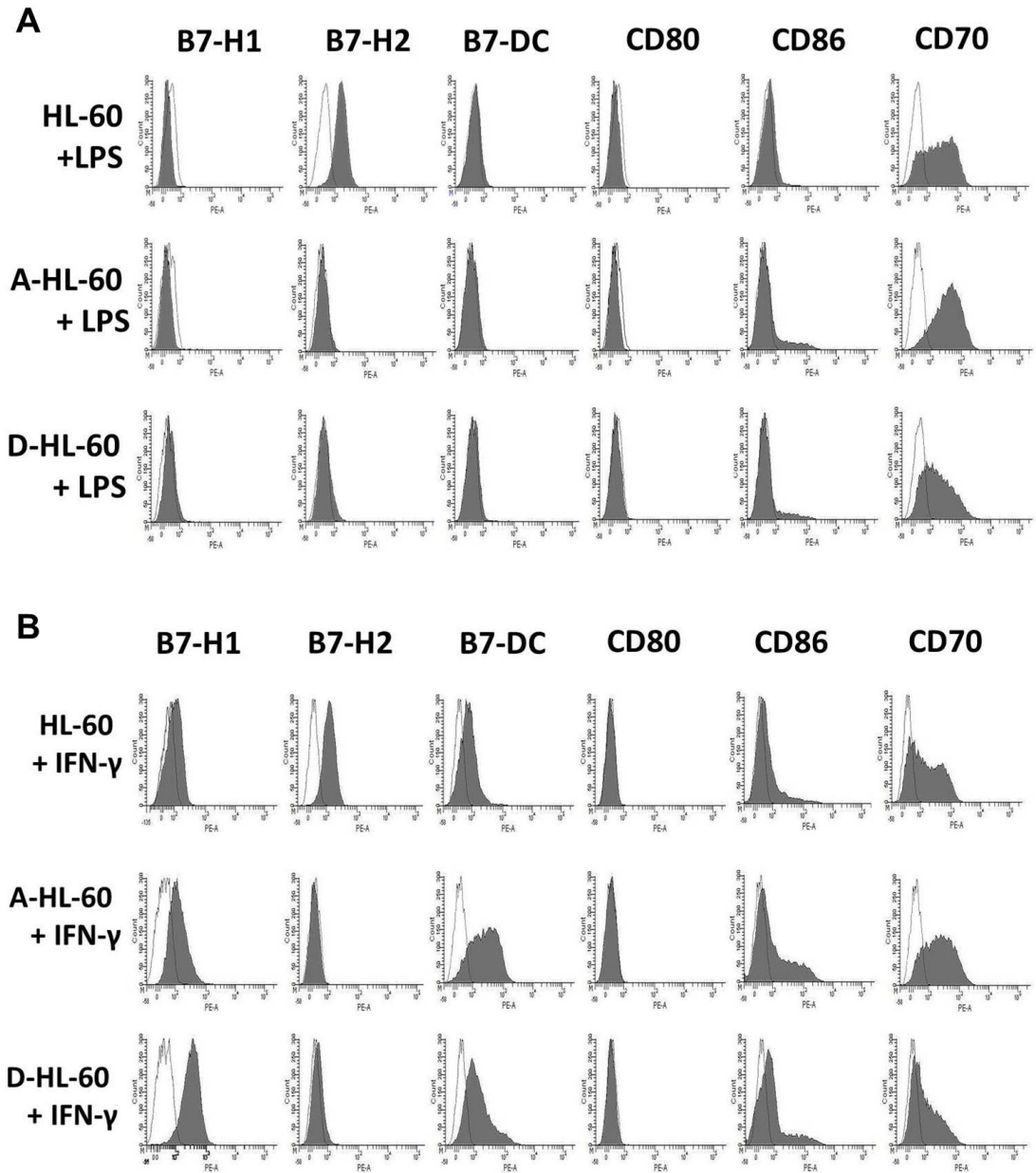
Şekil 4.12. IFN- γ varlığında farklılaştırılan HL-60, A-HL-60 ve D-HL-60 hücrelerinde A) miyeloid olgunlaşma/farklılaşma ve B) fonksiyonel karakter belirteçlerinin ekspresyonu. Temsili akım sitometri histogramları gösterilmiştir. Boş histogram, izotipik kontrol; dolu histogram, özgül antikorla boyanma.



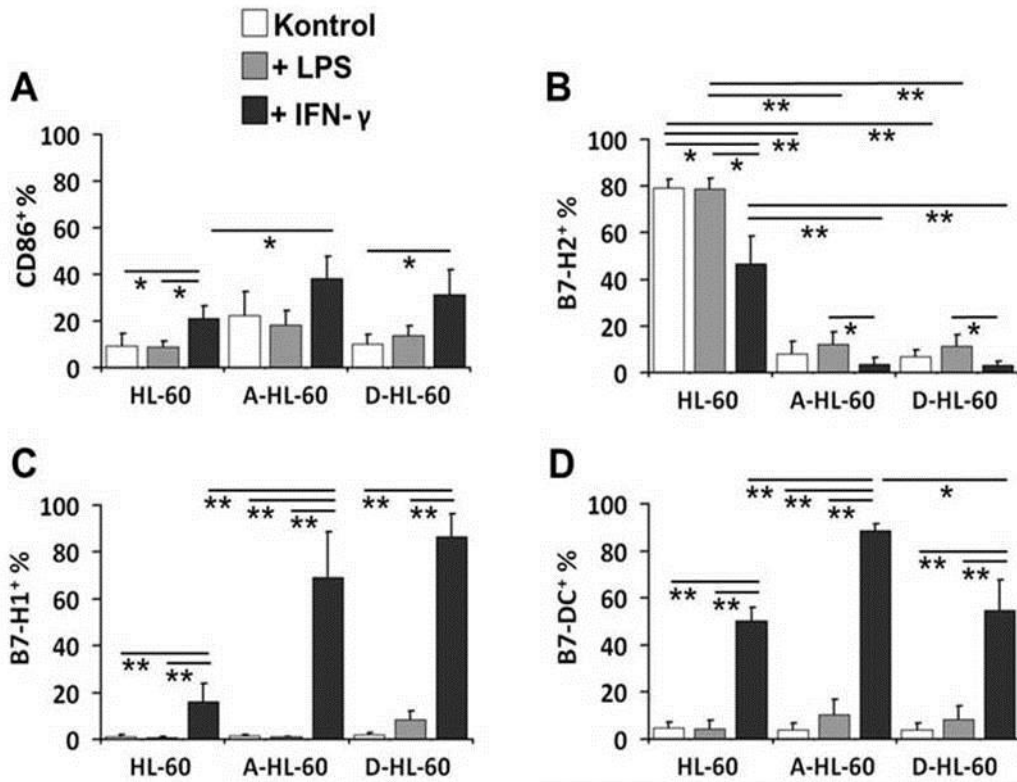
Şekil 4.13. LPS veya IFN- γ varlığında farklılaştırılan HL-60, A-HL-60 ve D-HL-60 hücrelerinde değişim gösteren A) CD11b, B) CD11c, C) CD14, D) CD15, E) TLR4, F) CD62L, G) HLA-DR yüzey belirteçlerini taşıyan hücrelerin yüzde grafikleri, (* $P<0.05$, ** $P<0.01$).

4.2.4. LPS veya IFN- γ Varlığında Farklılaştırılan Kontrol HL-60, A-HL-60 ve D-HL-60 Hücrelerinde Ko-stimülatör Moleküllerin Ekspresyonu

LPS uyarımı (48 saat) ile 96 saate tamamlanan inkübasyon sonrasında, kontrol HL-60, A-HL-60 ve D-HL-60 hücrelerinin B7-H1, B7-DC, B7-H2, CD80 ve CD86 ko-stimülatör moleküllerinde anlamlı bir ekspresyon değişimi görülmedi, (Şekil 4.14A ve Şekil 4.15). Ancak, bu hücrelerde IFN- γ ile uyarım sonrasında CD86 (HL-60+IFN- γ , %21.2 $\pm$ 5.3; A-HL-60+IFN- γ , %38.4 $\pm$ 9.3; D-HL-60+IFN- γ , %31.6 $\pm$ 10.5), B7-H1 (HL-60+IFN- γ , %16.1 $\pm$ 7.5; A-HL-60+IFN- γ , %69.1 $\pm$ 19.6; D-HL-60+IFN- γ , %86.5 $\pm$ 10) ve B7-DC (HL-60+IFN- γ , %50.5 $\pm$ 5.6; A-HL-60+IFN- γ , %88.6 $\pm$ 2.9; D-HL-60+IFN- γ , %54.9 $\pm$ 12.9) moleküllerinin ekspresyonunda belirgin ve anlamlı bir artış görülürken, B7-H2 (HL-60+IFN- γ , %46.7 $\pm$ 11.8; A-HL-60+IFN- γ , %3.7 $\pm$ 2.7; D-HL-60+IFN- γ , %3.3 $\pm$ 1.3) molekülünün ekspresyonunda anlamlı azalış saptanmıştır, (Şekil 4.14B ve Şekil 4.15). IFN- γ uyarımının, A-HL-60 ve D-HL-60 hücrelerinde kontrol HL-60 hücrelerine göre B7-H1 ve B7-DC ekspresyonunu daha fazla artırırken, B7-H2'yi azalttığı görülmüştür, (Şekil 4.15). IFN- γ ile uyarılmış gruplar kıyaslandığında, B7-H1 belirtecindeki artış, D-HL-60 hücrelerinde (%86.5 $\pm$ 10); B7-DC ve CD86'daki artış A-HL-60 (B7-DC, %88.6 $\pm$ 2.9; CD86, %38.4 $\pm$ 9.3) hücrelerinde ve B7-H2'deki azalış ise A-HL-60 (%3.7 $\pm$ 2.7) ve D-HL-60 (%3.3 $\pm$ 1.3) hücrelerinde görülmüştür, (Şekil 4.15).



Şekil 4.14. Kontrol HL-60, A-HL-60 ve D-HL-60 hücrelerinin 48 saat A) LPS B) IFN- γ varlığında farklılaştırılmaları sonrasında B7-H1, B7-DC, B7-H2, CD80, CD86 ve CD70 ko-stimülatör moleküllerindeki ekspresyon değişimleri temsili akım sitometri histogramları ile gösterilmiştir. Boş histogram, izotipik kontrol; dolu histogram, özgül antikorla boyanma.

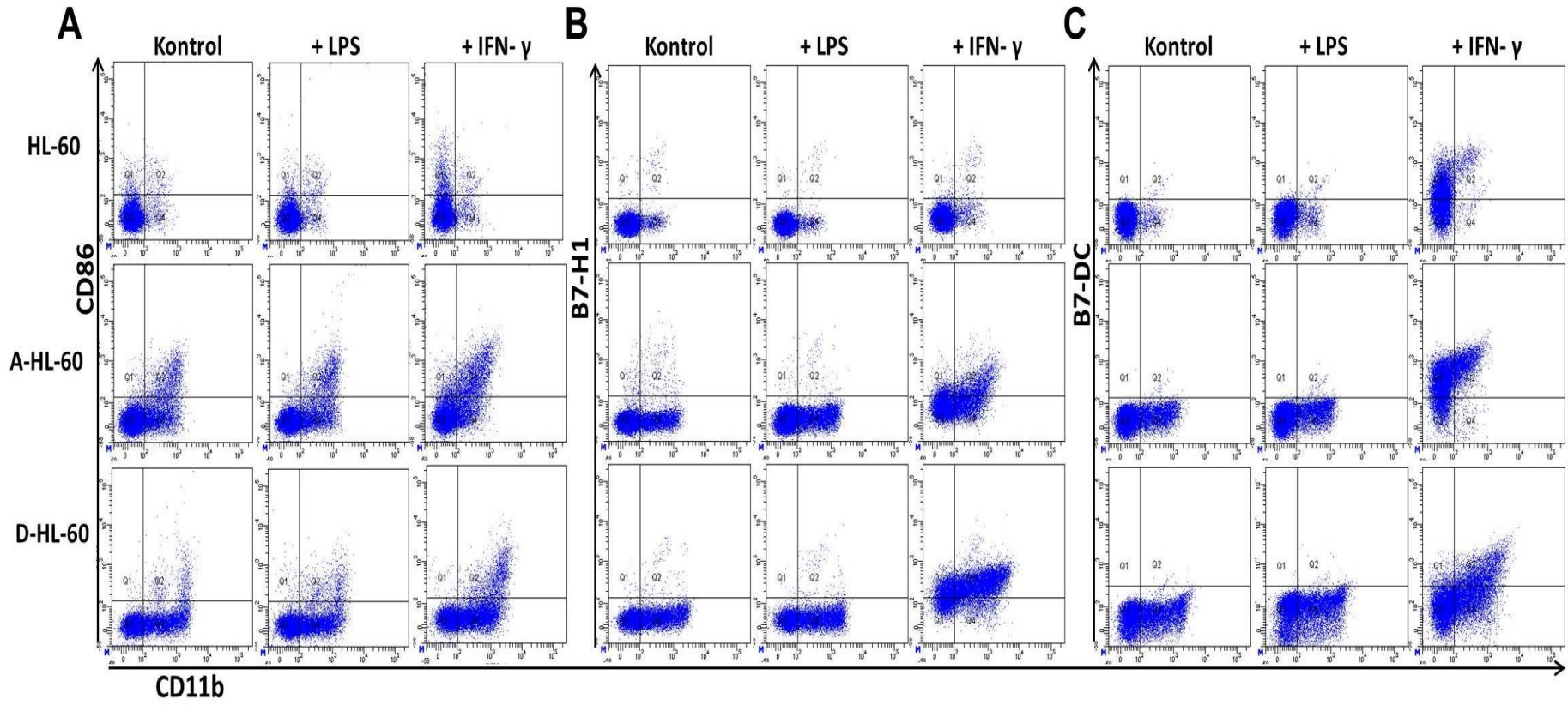


Şekil 4.15. LPS veya IFN- γ varlığında farklılaştırılan HL-60, A-HL-60 ve D-HL-60 hücrelerinde değişim gösteren A) CD86, B) B7-H2, C) B7-H1, D) B7-DC ko-stimülatör moleküllerini taşıyan hücrelerin yüzde grafikleri, (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$).

CD70 belirteci kontrol HL-60 (%67.4) hücreleri ile kıyaslandığında, ATRA uyarımı (%87.7) ile hafif bir artış görülürken, D3 uyarım (%52.8 $\pm$ 2.5) bu belirtecin ekspresyonunun biraz azalmasına neden olmuştur. Bu belirtecin ekspresyonu kontrol HL-60 hücreleri ile kıyaslandığında LPS uyarımı ile artış gösterirken en belirgin fark A-HL-60 hücrelerinde görüldü (kontrol HL-60, %67.4; HL-60+LPS, %81.5 $\pm$ 3.6; A-HL-60+LPS, %94.7 $\pm$ 0.4; D-HL-60+LPS, %70.25 $\pm$ 3). IFN- γ uyarımı ile kontrol HL-60 (%62.4 $\pm$ 2) ve A-HL-60 hücrelerinde (75.8 $\pm$ 1.2) hafif bir artış görülürken, D-HL-60 hücrelerinde (%48 $\pm$ 1.2) azalma belirlendi. CD70 ekspresyonunda bazı değişiklikler görülmesine rağmen 3 bağımsız deney tamamlanamadığı için (n=2) yüzde

değişim grafiği hazırlanamamıştır. Bu yüzden değişim sadece temsili akım sitomerti histogramları ile gösterilmiştir, (Şekil 4.14).

Ayrıca, CD86, B7-H1 ve B7-DC molekülleri miyeloid olgunlaşma ile ilişkili CD11b belirteci ile beraber işaretlendiğinde, bu yüzey belirtecini yüksek düzeylerde eksprese eden hücrelerin büyük oranının CD86, B7-H1 veya B7-DC pozitif olduğu görülmüştür, (Şekil 4.16).



Şekil 4. 16. IFN- γ veya LPS ile uyarılan HL-60, A-HL-60 ve D-HL-60 hücrelerinde A) CD86, B) B7-H1 ve C) B7-DC ko-stimülatör moleküllerinin CD11b ile eş zamanlı varlığı temsili akım sitometri nokta saçılım grafikleri ile gösterilmiştir.

4.2.5. LPS veya IFN- γ Varlığında Farklılaştırılan Kontrol HL-60, A-HL-60 ve D-HL-60 Hücrelerinin Proliferasyon Kapasitesi ve CD11b Düzeyi ile İlişkisi

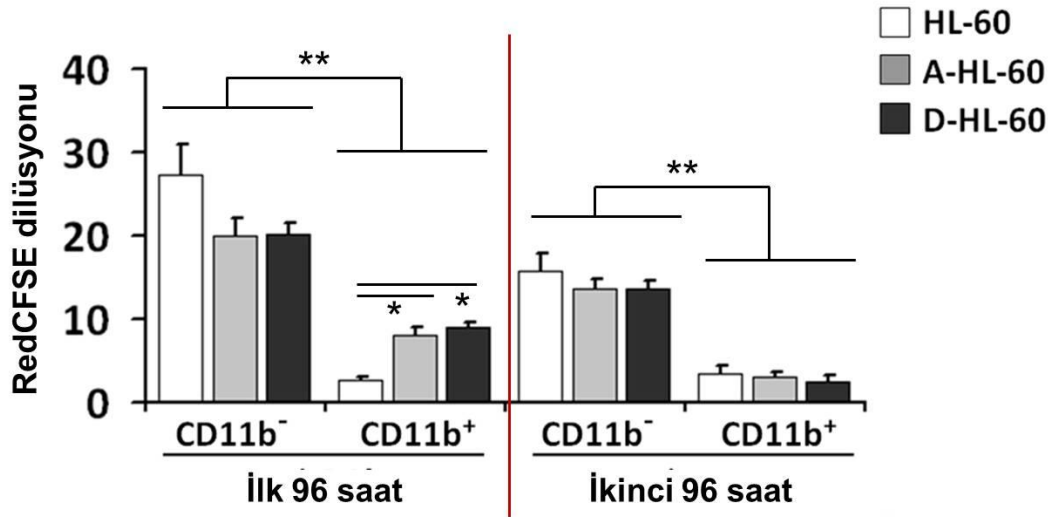
HL-60, A-HL-60, D-HL-60 ve bu hücrelerin IFN- γ veya LPS varlığında gösterdikleri proliferasyon aktivitesinin, farklılaşma (olgunlaşma) derecesi ile ilişkilendirilmesi amaçlanmıştır. Bu hücreler, negatif, çok düşük, düşük, orta ve yüksek CD11b ekspresyon düzeylerine göre sınıflandırıldı. Proliferasyon kapasitesi iki farklı strateji izlenerek değerlendirildi (Bölüm 3.7). Hücrelerin ATRA, D3, LPS, IFN- γ veya bu ajanların kombinasyonları varlığında (ilk 96 saatlik) proliferasyon düzeylerini belirlemek için hücreler inkübasyona başlarken RedCFSE ile boyandı (ilk 96 saat deneyi). Proliferasyonun kararlılığını belirlemek amacıyla ise, bu kez 96 saat boyunca farklılaştırılan hücreler yıkanarak uyaranlar ortamdaki uzaklaştırıldı ve RedCFSE ile boyanma gerçekleştirildi. Herhangi bir uyaran olmadan sadece tam RPMI kültür ortamı varlığında 96 saat daha inkübasyon gerçekleştirildi (ikinci 96 saat deneyi). İnkübasyon sonunda RedCFSE boyasının dilüsyonu akım sitometri ile değerlendirildi.

Proliferasyon kapasitesinin ilk, (Şekil 4.17A, Şekil 4.19A ve Şekil 4.20A) ve ikinci 96 saatte, (Şekil 4.17B, Şekil 4.19B ve Şekil 4.20B) CD11b ekspresyonu yüksek tüm gruptaki hücrelerde, CD11b ekspresyonu daha düşük olan hücrelere göre azaldığı belirlenmiştir, (Şekil 4.18 ve Şekil 4.22). Proliferasyon ve CD11b pozitifliği arasındaki bu ters orantı ikinci 96 saatte daha belirgin olarak gözlenmiştir, (Şekil 4.18, Şekil 4.21 ve Şekil 4.22). Gerek kontrol, gerekse LPS veya IFN- γ ile uyarılan HL-60 hücrelerinde CD11b pozitifliği çok düşük oranda idi, (Şekil 4.13A). Bu azınlık hücre grubunun dahi proliferasyon düzeyleri genel CD11b⁺ popülasyona kıyasla azaldığı belirlendi, (Şekil 4.17, Şekil 4.19 ve Şekil 4.20). A-HL-60 ve D-HL-60 hücrelerin IFN- γ veya LPS ile uyarılması sonucunda ilk ve ikinci 96 saatte CD11b yüzey belirtecini yüksek düzeyde eksprese eden hücrelerin proliferasyon düzeylerinde belirgin azalış saptandı. Bu düşüş özellikle ikinci 96 saatte görüldü, (Şekil 4.17B, Şekil 4.19B, Şekil 4.20B ve Şekil 4.23).

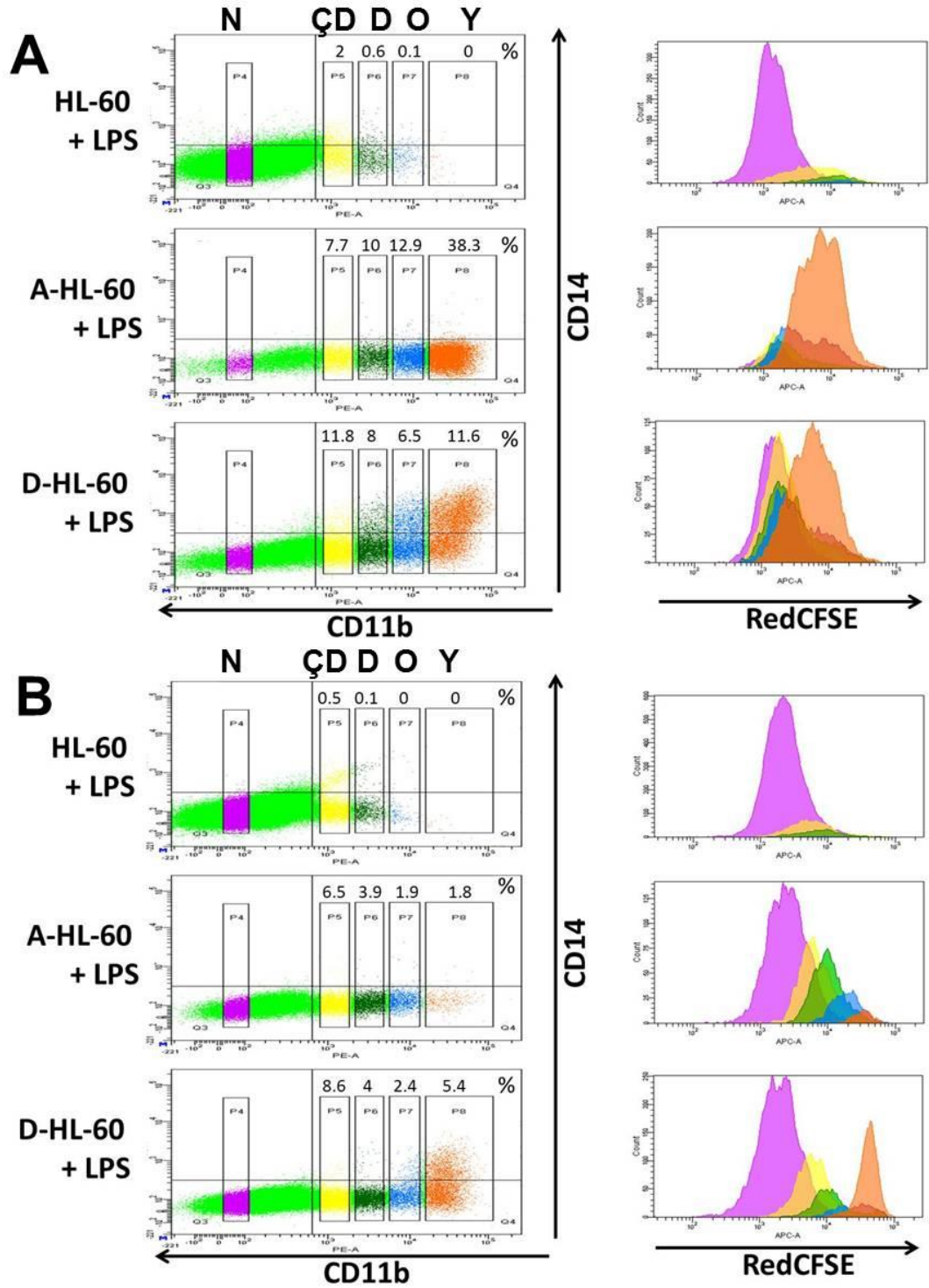
Genel olarak hücreler (A-HL-60, A-HL-60+LPS, A-HL-60+IFN γ , D-HL-60, D-HL-60+LPS, D-HL-60+IFN γ) CD11b-pozitif ve CD11b-negatif olarak gruplandırılıp proliferasyon düzeyleri araştırıldığında, iki alt-popülasyon arasındaki farkın ikinci 96 saatte daha belirgin olduğu görüldü, (Şekil 4.21). İlginç olarak, CD11b taşınamalarına ve ortamdan ATRA, D3, LPS veya IFN- γ gibi ajanların uzaklaştırılmış olmasına rağmen CD11b-negatif hücrelerin ikinci 96 saat inkübasyon sonunda proliferasyon kapasitesinin anlamlı oranda düştüğü görülmüştür, (Şekil 4.22).

Şekil 4.17. HL-60 hücrelerinin A) kontrol, ATRA veya D3 varlığında ilk 96 saatlik inkübasyonu, B) 96 saatlik ilk inkübasyon sonrasında ortamdan ajanların yıkanarak uzaklaştırılmasını takiben ikinci 96 saatlik inkübasyon süresince çoğalma kapasitesi ve CD11b ekspresyonu. İlk ve ikinci 96 saat

inkübasyonların sonrasında hücreler anti-CD11b ve anti-CD14 antikorları ile işaretlenmiştir. CD11b düzeylerine göre; P4 bölgesi negatif (N), P5 bölgesi çok düşük (ÇD), P6 bölgesi düşük (D), P7 bölgesi orta (O) ve P8 bölgesi yüksek (Y) olarak kapı seçilmiştir. Bu kapılara düşen hücrelerin Red CFSE ile boyanma histogramları sağ panellerde görülmektedir. P bölgesine düşen hücreler ve sağ panelde yer alan histogram renkleri örtüşmektedir. Her P bölgesi içerisine düşen ortalama hücre yüzdeleri kapıların üzerinde belirtilmiştir. Temsili akım sitometri nokta saçılım ve histogram grafikleri gösterilmiştir.

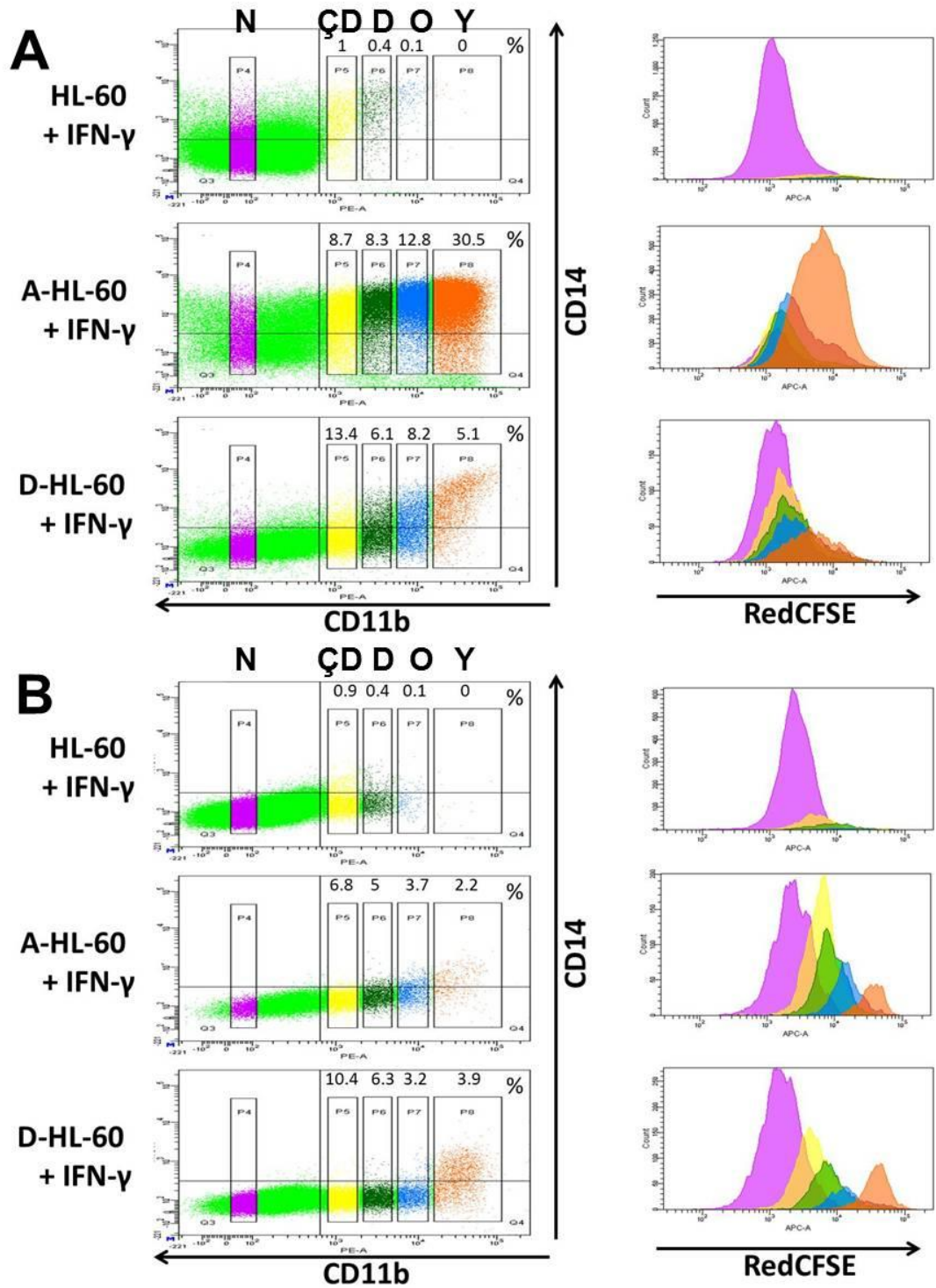


Şekil 4.18. HL-60, A-HL-60 ve D-HL-60 hücrelerinin ilk ve ikinci 96 saatlerde CD11b-pozitif ve CD11b-negatif popülasyonlarında proliferasyon düzeylerinde meydana gelen farklılıkların gösterimi, (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$).



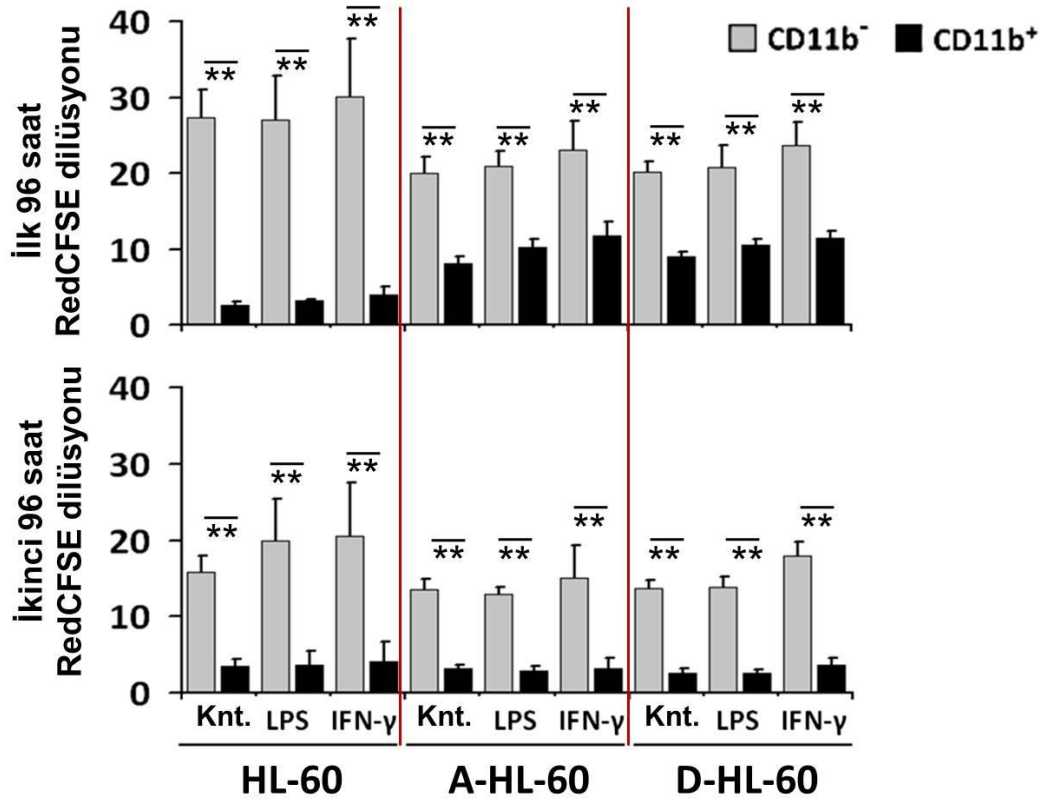
Şekil 4.19. LPS varlığında farklılaştırılan, HL-60, A-HL-60 ve D-HL-60 hücrelerinin A) kontrol, ATRA veya D3 varlığında ilk 96 saatlik inkübasyonu, B) 96 saatlik ilk inkübasyon sonrasında ortamdan ajanların yıkanarak uzaklaştırılmasını takiben ikinci 96 saat süresince çoğalma kapasitesi ve

CD11b ekspresyonu. İlk ve ikinci 96 saat inkübasyonların sonrasında hücreler anti-CD11b ve anti-CD14 antikorları ile işaretlenmiştir. CD11b düzeylerine göre; P4 bölgesi negatif (N), P5 bölgesi çok düşük (ÇD), P6 bölgesi düşük (D), P7 bölgesi orta (O) ve P8 bölgesi yüksek (Y) olarak kapı seçilmiştir. Bu kapılara düşen hücrelerin Red CFSE ile boyanma histogramları sağ panellerde görülmektedir. P bölgesine düşen hücreler ve sağ panelde yer alan histogram renkleri örtüşmektedir. Her P bölgesi içerisine düşen ortalama hücre yüzdeleri kapıların üzerinde belirtilmiştir. Temsili akım sitometri nokta saçılım ve histogram grafikleri gösterilmiştir.

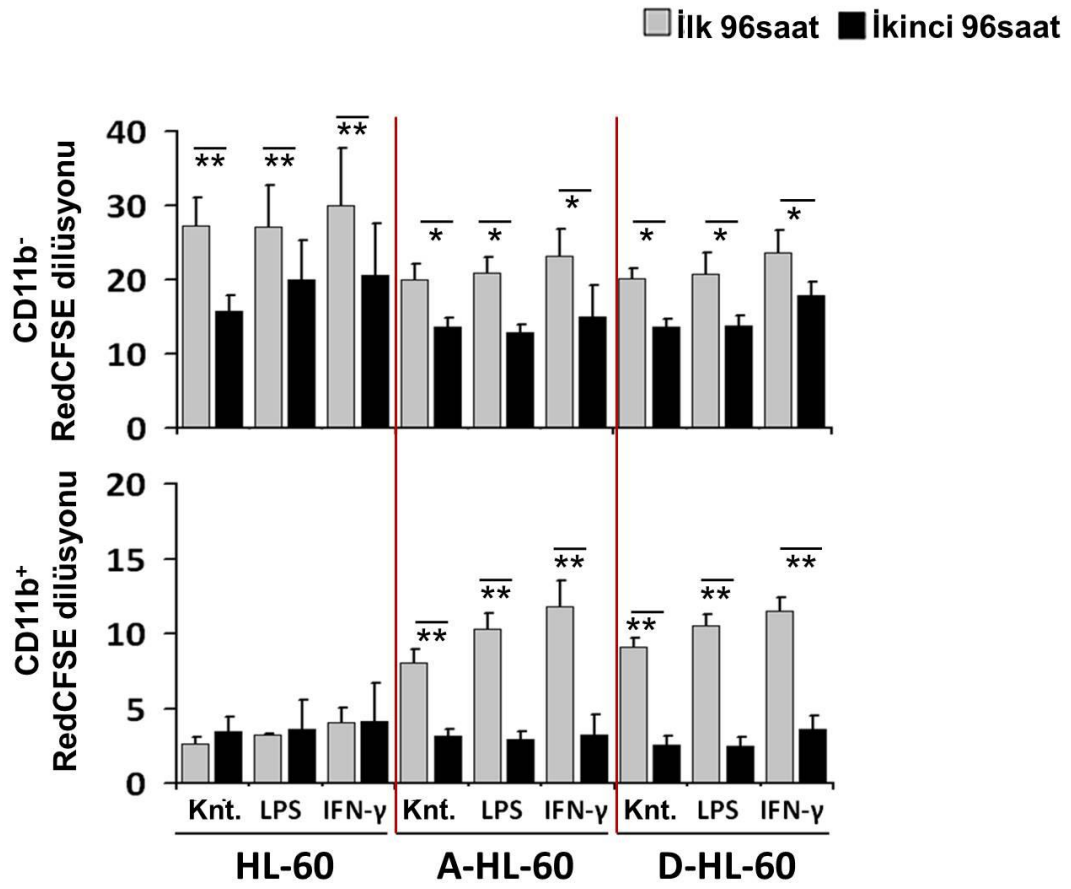


Şekil 4.20. IFN- γ varlığında farklılaştırılan, HL-60, A-HL-60 ve D-HL-60 hücrelerinin A) kontrol, ATRA veya D3 varlığında ilk 96 saatlik inkübasyonu, B) 96 saatlik ilk inkübasyon sonrasında ortamdaki ajanların yıkanarak uzaklaştırılmasını takiben ikinci 96 saat süresince çoğalma kapasitesi ve

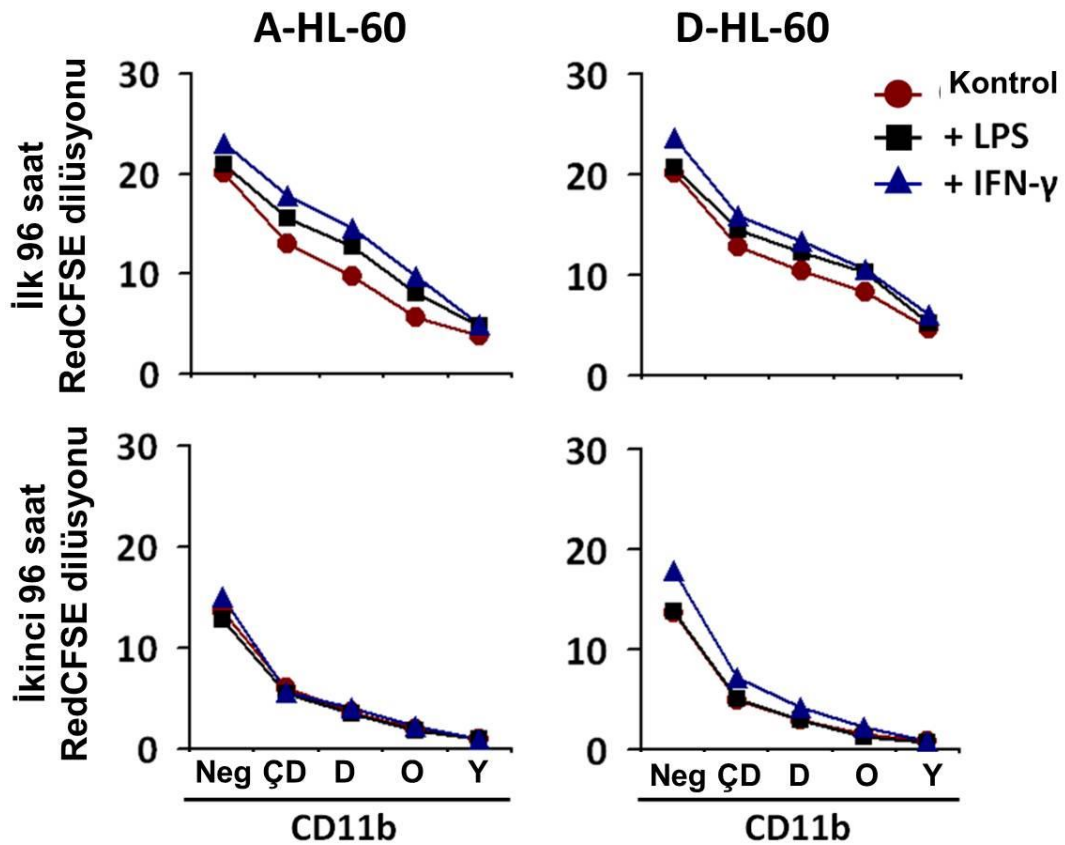
CD11b ekspresyonu. İlk ve ikinci 96 saat inkübasyonların sonrasında hücreler anti-CD11b ve anti-CD14 antikorları ile işaretlenmiştir. CD11b düzeylerine göre; P4 bölgesi negatif (N), P5 bölgesi çok düşük (ÇD), P6 bölgesi düşük (D), P7 bölgesi orta (O) ve P8 bölgesi yüksek (Y) olarak kapı seçilmiştir. Bu kapılara düşen hücrelerin Red CFSE ile boyanma histogramları sağ panellerde görülmektedir. P bölgesine düşen hücreler ve sağ panelde yer alan histogram renkleri örtüşmektedir. Her P bölgesi içerisine düşen ortalama hücre yüzdeleri kapıların üzerinde belirtilmiştir. Temsili akım sitometri nokta saçılım ve histogram grafikleri gösterilmiştir.



Şekil 4.21. LPS veya IFN-γ varlığında farklılaştırılan, HL-60, A-HL-60 ve D-HL-60 hücrelerinin ilk ve ikinci 96 saatler (Red CFSE dilüsyonları) süresince gösterdikleri proliferasyon ve CD11b pozitifliği ile ilişkisi, (** $P < 0.01$). Knt., kontrol HL-60 hücreleri.



Şekil 4.22. LPS veya IFN- γ varlığında farklılaştırılan, HL-60, A-HL-60 ve D-HL-60 CD11b-pozitif ve CD11b-negatif alt-popülasyonlarının proliferasyon kapasitesinin kıyaslanması. ilk ve ikinci 96 saat deneyleri süresince proliferasyon düzeylerindeki farklılıklar gösterilmiştir, (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$).

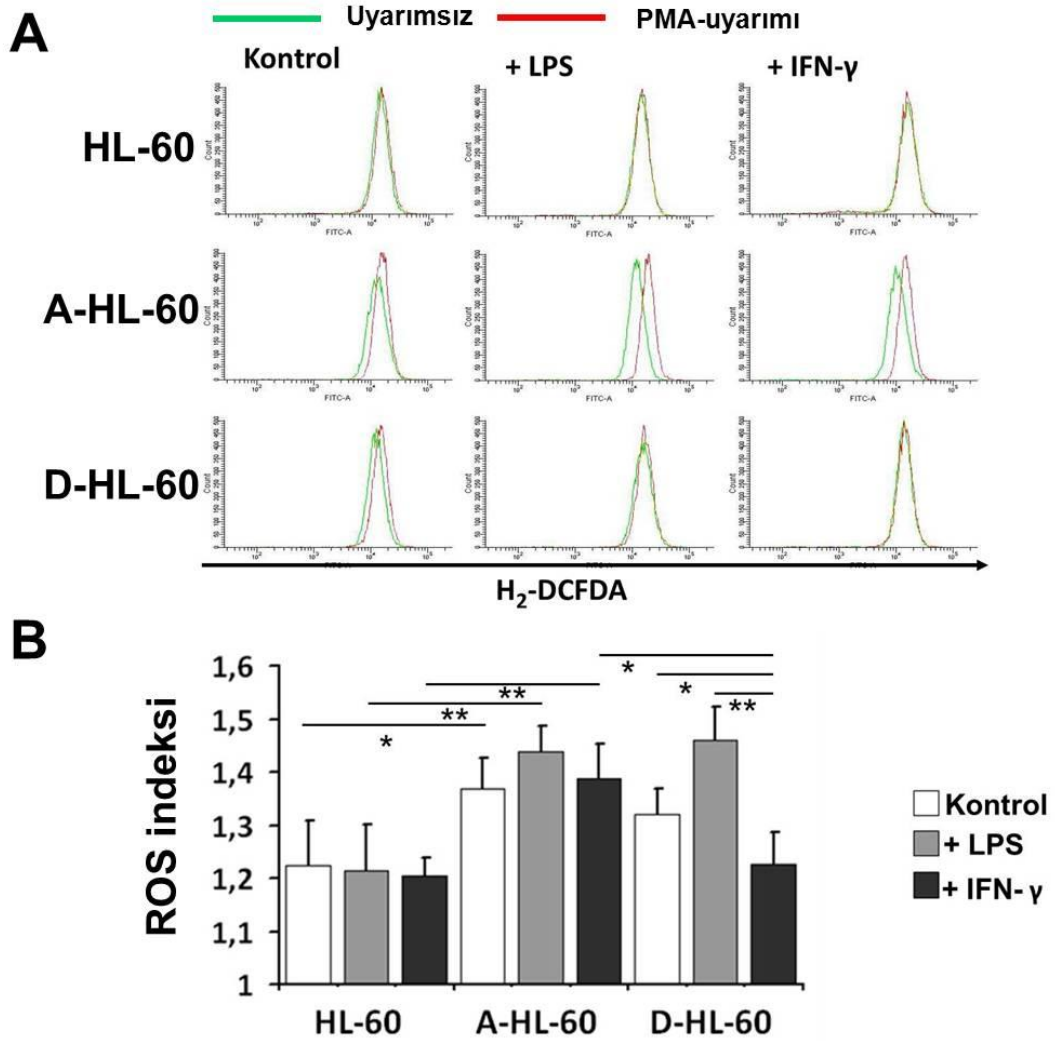


Şekil 4.23. LPS veya IFN- γ varlığında farklılaştırılan, A-HL-60 ve D-HL-60 hücrelerinin ilk ve ikinci 96 saatlik inkübasyon sonrasında, CD11b düzeylerine göre; negatif (Neg), çok düşük (ÇD), düşük (D), orta (O) ve yüksek (Y) ekspresyonlara sahip hücre alt-popülasyonlarının bu ajanların etkisi sonucu proliferasyon düzeylerinde meydana gelen farklılıklar.

4.2.6. LPS veya IFN- γ Varlığında Farklılaştırılan Kontrol HL-60, A-HL-60 ve D-HL-60 Hücrelerinde Reaktif Oksijen Türlerinin (ROS) üretimi

Hücreler, protein kinaz C (PKC) agonisti Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) ile kısa süre uyarılarak reaktif oksijen türleri (*reactive oxygen species*, ROS) üretiminden sorumlu sinyal yolları aktive edilebilir (167). Böylece, hücre sahip olduğu tüm ROS üretme kapasitesini kullanır. PMA ile uyarılmış koşullardan elde edilen verilerin, uyarılmamış kontrol hücrelerine oranı ROS üretim indeksini verir. H₂DCFDA boyası ile yapılan akım

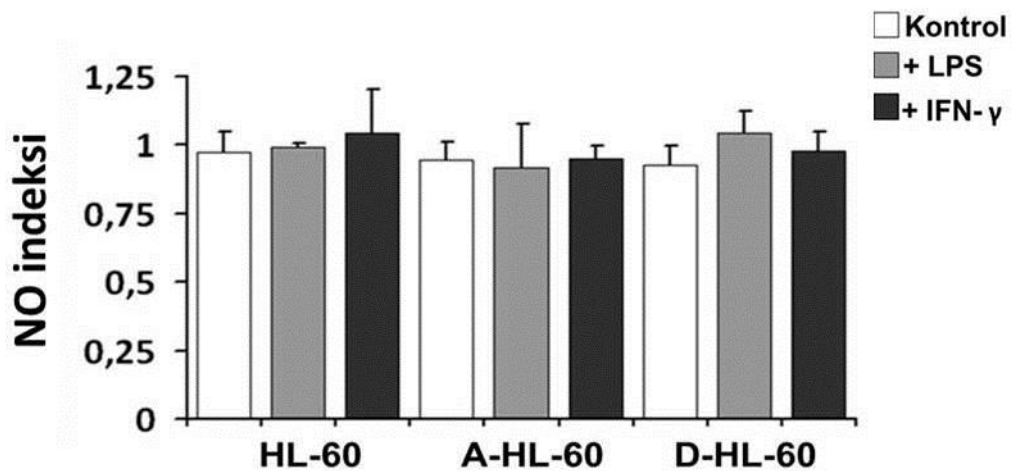
sitometrik analizler sonucunda kontrol HL-60 hücrelerinin LPS veya IFN- γ varlığında ROS üretiminde anlamlı bir fark görülmedi. A-HL-60 hücrelerinin ROS üretme kapasitesinde kontrol HL-60'a göre anlamlı artış olmasına rağmen LPS veya IFN- γ 'nın etkisi görülmedi. Diğer taraftan, D-HL-60 grubunda sadece LPS varlığında kontrol HL-60 hücrelerine kıyasla anlamlı derecede artış saptandı, (Şekil 4.24)



Şekil 4.24. Kontrol HL-60, A-HL-60, D-HL-60 ve bu hücrelerin LPS ve IFN- γ varlığında farklılaştırılmaları sonucunda ROS üretim kapasitelerinin uyarımsız veya PMA ile uyarılmış koşullar altındaki akım sitometrik analizleri A) Temsili akım sitometri histogramları B) ROS üretim indeksi, (* P <0.05, ** P <0.01). H₂DCFDA, diklorofloresan diasetat.

4.2.7. LPS veya IFN- γ Varlığında Farklılaştırılan Kontrol HL-60, A-HL-60 ve D-HL-60 Hücrelerinde Nitrik Oksit (NO) Üretimi

LPS veya IFN- γ varlığında farklılaştırılan kontrol HL-60, A-HL-60 ve D-HL-60 hücreleri 96 saat inkübasyonun sonrasında uyarım ajanları ortamdan uzaklaştırılıp, 24 saat daha inkübe edildi. Hücrelerin nitrik oksit (NO) üretimlerini belirleyebilmek için süpernatantlarındaki nitrit ve nitrat düzeyleri araştırıldı. NO düzeylerini analiz etmek için tüm hücre gruplarının PMA ile uyarılarak elde edilen elde edilen değerler, PMA'sız koşulların değerlerine oranlandı. Bu şekilde NO üretim indeksi belirlendi. Bu değerler analiz edildiğinde tüm hücre gruplarının NO üretimini gerçekleştirdiği fakat bu üretim düzeyleri arasında anlamlı bir fark bulunmadığı görüldü, (Şekil 4.25).



Şekil 4. 25. Kontrol HL-60, A-HL-60, D-HL-60 ve bu hücrelerin LPS ve IFN- γ varlığında farklılaştırılmaları sonucunda NO üretim kapasiteleri

4.3. Farklılaştırılan HL-60 Hücrelerinin T Hücre Yanıtları Üzerine Etkileri

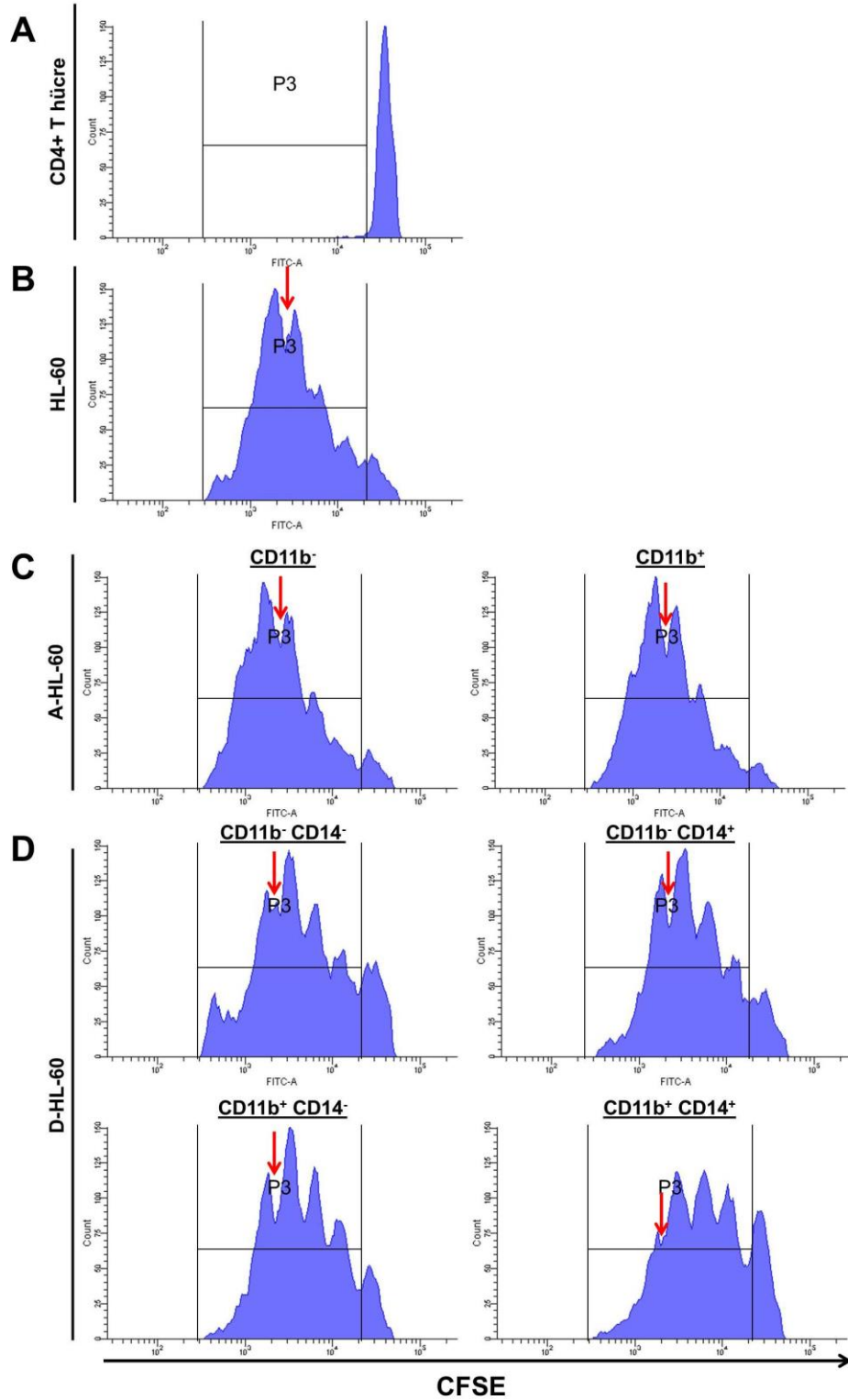
4.3.1. CD11b ve CD14 Varlığına Göre Ayrımlanan A-HL-60 ve D-HL-60 Hücrelerinin CD4⁺ T Hücre Proliferasyonuna Etkisi

Gerek ATRA veya D3, gerekse bu ajanların LPS veya IFN- γ ile kombinasyonları sonucunda immünofenotiplendirme, yoğunluk ayırılması

ve proliferasyon düzeylerinin değerlendirildiği deneyler sonucunda CD11b belirtecinin ekspresyonunun veya bu ekspresyonun yüksek oluşunun hücre farklılaşması ile pozitif korelasyon gösterdiği belirlenmiştir. Bu nedenle, ilk etapta CD11b⁺ hücrelerin CD4⁺ T hücre yanıtlarına olan etkisi araştırıldı.

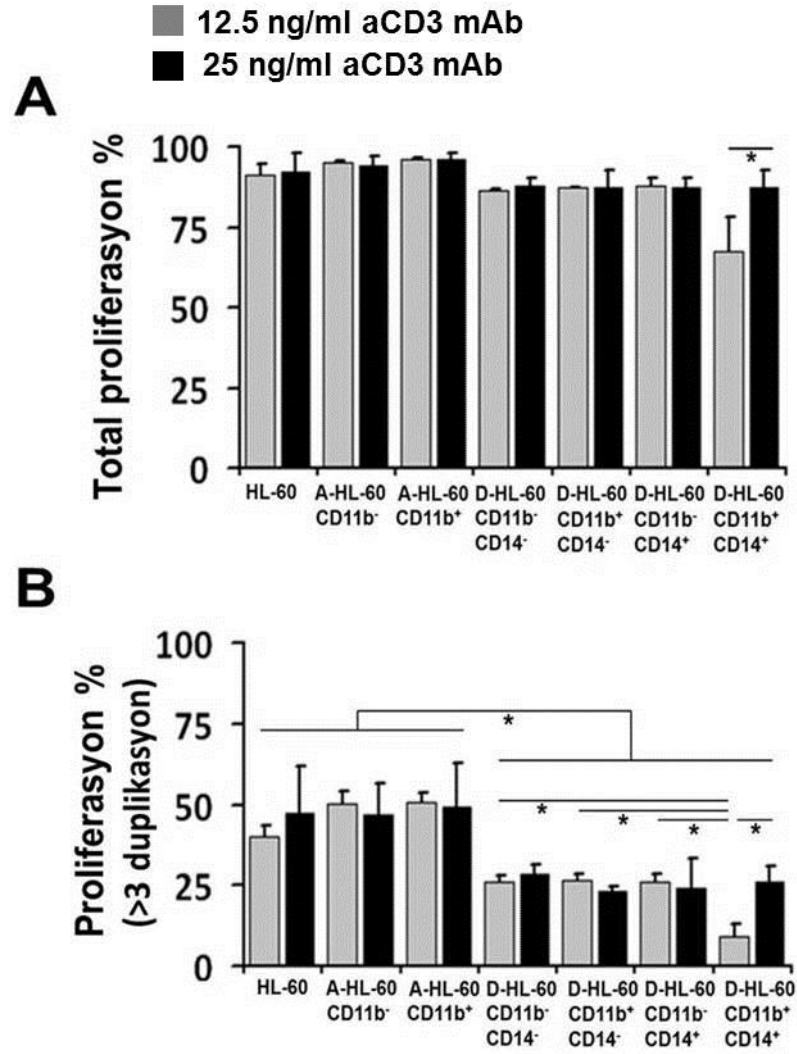
CD11b pozitifliğine göre saflaştırılan A-HL-60 hücreleri; CD11b ve CD14 belirteçlerinin varlığına göre FACS yöntemi ile saflaştırılan D-HL-60 hücreleri (CD11b⁻ A-HL-60, CD11b⁺ A-HL-60, CD11b⁻CD14⁻ D-HL-60, CD11b⁻CD14⁺ D-HL-60, CD11b⁺CD14⁻ D-HL-60, CD11b⁺CD14⁺ D-HL-60) CFSE ile işaretlenmiş naif CD4⁺ T hücreleri ile 96 saat boyunca ko-kültür yapıldı. Kültür ortamına T hücre uyarımı için anti-CD3 (klon HIT3a) antikoru 12.5 ng/ml veya 25 ng/ml konsantrasyonlarında eklendi. Ayrımlanmamış kontrol HL-60 hücreleri ile yapılan ko-kültürler kontrol olarak kullanılmıştır. Miyeloid hücre proliferasyonunun (özellikle CD11b⁻ hücrelerin sahip olduğu yüksek proliferatif kapasiteden dolayı) deney sonuçlarını etkilememesi için ko-kültürler 0.5:1 miyeloid hücre:CD4⁺ T hücre oranında gerçekleştirilmiştir.

Genel olarak CD11b veya CD14 pozitifliğinden bağımsız olarak tüm HL-60 uyarım koşullarının CD4⁺ T hücre proliferasyonunu etkin şekilde uyardığı görüldü, (Şekil 4.26 ve Şekil 4.27A). Total CD4⁺ T hücre proliferasyonu açısından D-HL-60 hücrelerinin uyarıcılığı daha az idi. Ancak, sadece 12.5 ng/ml anti-CD3 mAb varlığında CD11b⁺CD14⁺ hücrelerinde istatistiksel anlamlılığa ulaşıldı, (Şekil 4.27A). CD4⁺ T hücrelerin proliferasyon hızı değerlendirildiğinde ise (3 duplikasyondan ileri giden hücrelerin yüzdesi) D-HL-60 grubunun uyarıcılığının (özellikle 12.5 ng/ml anti-CD3 mAb varlığında) anlamlı derecede az olduğu belirlendi, (Şekil 4.27B).



Şekil 4.26. Miyeloid hücre:CD4⁺ T hücre 96 saat 0.5:1 oranında ko-kültür sonucunda elde edilen akım sitometrik CFSE histogramları. A) Tek başına CD4⁺ T hücre ve B) kontrol HL-60 C) CD11b⁻ A-HL-60 ve CD11b⁺ A-HL-60 D) ilk satır CD11b⁻CD14⁻ D-HL-60 ve CD11b⁻CD14⁺ D-HL-60; ikinci satır

CD11b⁺CD14⁻ D-HL-60 ve CD11b⁺CD14⁺ D-HL-60 ile ko-kültürleri gerçekleşen CD4⁺ T hücrelerin temsili akım sitometri histogramları. P3, total proliferasyon; ok üç proliferasyonu tamamlamış T hücreleri göstermektedir.

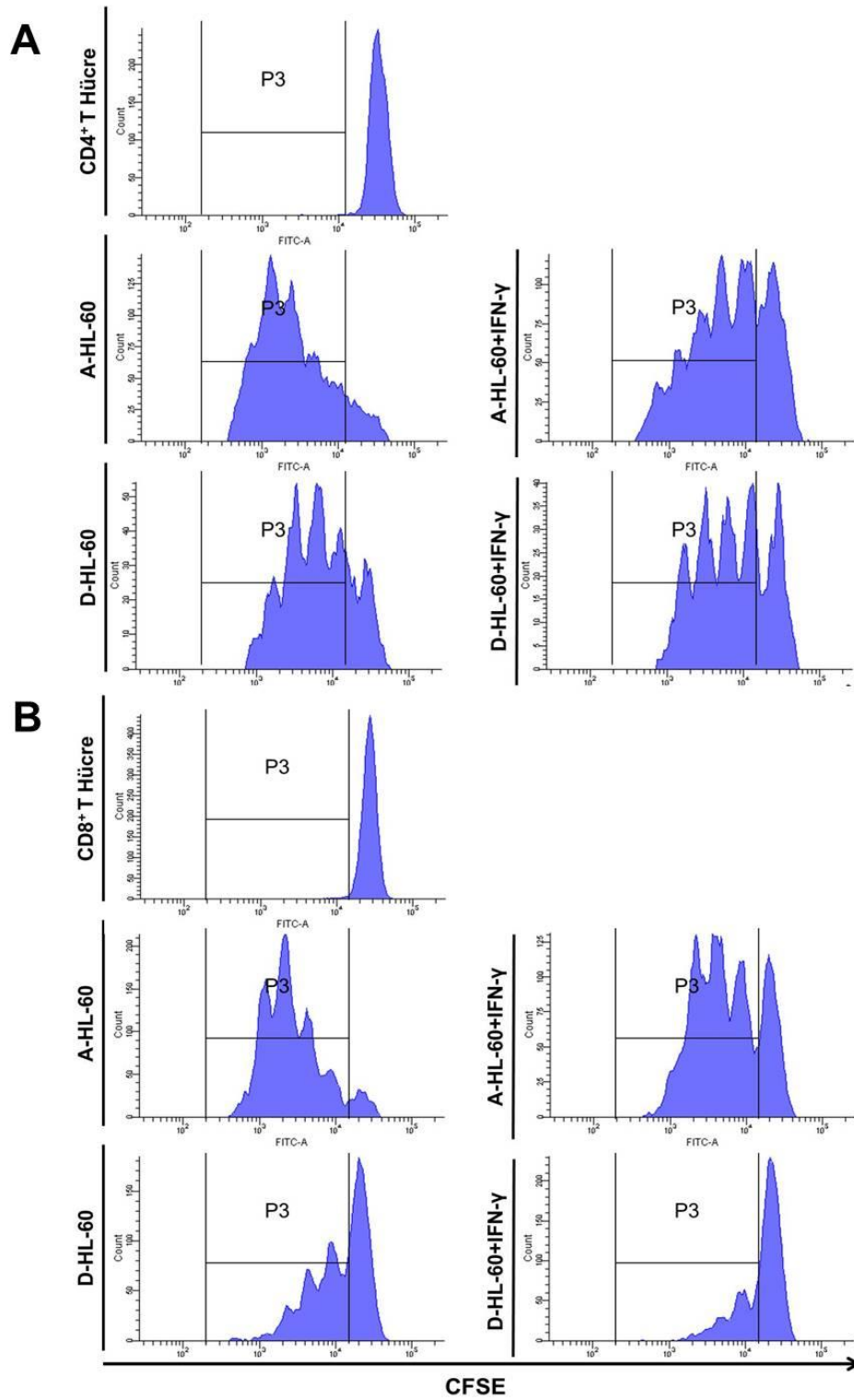


Şekil 4.27. Miyeloid hücre:CD4⁺ T hücre 96 saat 0.5:1 oranında ko-kültür sonucunda proliferasyon yapan CD4⁺ T hücrelerin yüzdeleri. A) Total proliferasyon, B) üç duplikasyon sonrasında belirlenen proliferasyon yüzdesi. Hücre gruplarının sıralaması HL-60, CD11b⁻ A-HL-60, CD11b⁺ A-HL-60, CD11b⁻ CD14⁻ D-HL-60, CD11b⁺CD14⁻ D-HL-60, CD11b⁻CD14⁺ D-HL-60, CD11b⁺CD14⁺ D-HL-60, (*P<0.05). aCD3 mAb, anti-CD3 (klon HIT3a) antikoru.

4.3.2. IFN- γ Varlığında Farklılaştırılan A-HL-60 ve D-HL-60 Hücrelerinin CD4⁺ ve CD8⁺ T Hücre Proliferasyonuna Etkisi

ATRA veya D3 ve IFN- γ ile farklılaştırılan HL-60 hücrelerinden, 96 saat inkübasyonun sonunda CD11b yüzey belirtecini yüksek düzeyde eksprese eden (CD11b^{hi}) popülasyonlar FACS yöntemi ile saflaştırılmıştır. Bu hücrelerin CFSE ile işaretlenmiş CD4⁺ veya CD8⁺ T hücreler ile 96 saat ko-kültürü yapıldı. Kültür ortamına T hücre uyarımı için 12.5 ng/ml konsantrasyonda anti-CD3 (klon HIT3a) antikoruna eklendi. Miyeloid hücrelerin, CD4⁺ veya CD8⁺ T hücrelerin proliferasyonu üzerindeki etkilerinin daha iyi belirlenebilmesi için deneylerde 0.25:1 miyeloid hücre:CD4⁺ veya CD8⁺ T hücre oranı kullanıldı.

IFN- γ varlığında 48 saat ve ATRA veya D3 ile total 96 saat farklılaştırılmış HL-60 hücrelerinin, CD11b^{hi} popülasyonları ile yapılan 0.25:1 miyeloid hücre:T hücre ko-kültür deneylerinin sonucunda genel olarak IFN- γ ile gerçekleşen koşullarda hem CD4⁺ T hemde CD8⁺ T hücrelerde proliferasyon düşüşü görüldü. Bu düşüş D-HL-60 hücreleri ile gerçekleşen ko-kültür sonucunda çok daha belirgin idi, (Şekil 4.28A ve Şekil 4.28B). Bu sonuçlar doğrultusunda D-HL-60 hücrelerinin T hücre (CD4⁺ ve CD8⁺ T hücreler) proliferasyonlarını etkin olarak baskıladığı görülmüştür.



Şekil 4.28. CD11 yüzey belirtecini yüksek düzeylerde eksprese eden (CD11b^{hi}) miyeloid hücre:T hücre 96 saat 0.25:1 oranında ko-kültür sonucunda prolifere olan A) CD4⁺ T hücre ve B) CD8⁺ T hücrelerin temsili akım sitometri histogramları.

5. TARTIŞMA

Lösemi, hematopoez sırasında immün hücrelerin farklılaşma sinyallerine duyarsızlaşarak, immatür fenotiplerini muhafaza etmeleri ve sınırsız çoğalma yeteneği kazanmaları ile gelişir (168,169) . Bu hücreler sahip oldukları yaşam ve çoğalma avantajı sağlayan mutasyonlar ile devamlılığını sürdürür ve immün sistemi farklı yollardan etkileyerek yok edilmekten kurtulur (170) . AML hücrelerinin immün sistemle başa çıkmalarını sağlayan biyolojik karakterlerin anlaşılabilmesi için lösemi hücre hatları önemli bir model teşkil eder.

HL-60 hücre hattı ilk kez 1979 yılında akut promiyelositik lösemi (M3) tanısı almış 36 yaşında kadın bir hastadan izole edilmiştir (171) . Daha sonra yapılan çalışmalarda ise translokasyon t(15;17)'yi bulundurmaması ve morfolojik olarak AML-M3'den farklılıklar göstermesi nedeni ile AML-M2 olarak yeniden sınıflandırılmıştır (172) . Ayrıca, bu hücrelerin çoğunda CD34, HLA-DR ekspresyonunun bulunmaması; CD13, CD33, CD15 ekspresyonunun görülmesi ile de HL-60 hücrelerinin hem AML-M2 hem de AML-M3 ile uyumlu immünofenotipik karaktere sahip olduğu gösterilmiştir (173) . HL-60, immatür karakterini kolayca yitirerek farklı miyeloid hücre serilerine farklılaşma kapasitesine sahiptir. Bu nedenle, *in vitro* miyeloid olgunlaşma ve farklılaşma çalışmalarında sıklıkla tercih edilen hücre hattıdır. Örneğin, dimetil sülfoksit (*dimethyl sulfoxide*, DMSO) (174) veya all-trans retinoik asit (ATRA) uyarımı ile nötrofil benzeri (9) ; phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (174) veya 1 α ,25-dihidroksivitamin D3 (D3) ile monosit/makrofaj benzeri (8,175) ; n-Butyrate (176) veya orta dereceli alkali koşullarda (pH 7.6-7.8) (177) eozinofil benzeri hücrelere farklılaşabildiği bildirilmektedir. İmmatür miyeloid lösemi hücreleri, sınırsız çoğalma ve *in vitro* farklılaşma kapasiteleri sayesinde normal hematopoetik hücre gelişiminin de modellenmesi için kullanılmaktadır (7) . Ancak, taşıdıkları genomik bozukluklar nedeniyle miyelopoez tam anlamıyla taklit edilemez ve son farklılaşma (*final differentiation*) aşamasındaki lökositlerin tüm karakterleri taşınmaz (144,145) .

Tam olarak olgunlaşmamış miyeloid hücrelerin immün yanıtları başlatma veya sürdürme kapasiteleri sınırlıdır. Hatta, sistemik inflamatuvar koşullarda veya ileri evre kanserlerde kemik iliğinde artan miyelopoez, tam olarak farklılaşmamış monositik ve granülositik hücrelerin kan dolaşımına geçmesine neden olur. Bu hücreler miyeloid-kökenli baskılayıcı hücreler (*myeloid-derived suppressor cells*, MDSC) olarak adlandırılır (178,179) . MDSC'ler genel olarak antijene özgül T hücrelere yanıtlarını etkin şekilde baskılar. Ürettikleri peroksinitrit radikali, antijen sunumu sırasında hücre-hücre etkileşimi (yakın temas) sayesinde T-hücre reseptörlerinde, CD4 veya CD8 moleküllerinde bulunan birçok amino asidi nitrasyon veya nitrozilasyona uğratar (167,180,181) . Diğer taraftan, miyeloid lösemi hücreleri de kemik iliğini tam olgunlaşmadan terk eder ve immün yanıtlardan sağ çıkmayı başarır. AML hücrelerinin immün yanıtları MDSC hücrelerinin kullandıkları mekanizmalarla da baskılayabildiği gösterilmiştir (182) .

Bu tez çalışmasında, ATRA, D3, LPS ve IFN- γ ajanlarından faydalanılarak HL-60 hücrelerinin farklı olgunlaşma basamaklarına ilerletilmesi amaçlanmıştır. Literatürde belirtilen monositik ve/veya granülositik olgunlaşma hakkında bilgi veren veya bu aşamadaki fonksiyonel farklılıkların ayırt edilmesini sağlayan belirteçler, hücre morfolojisi, hücrelerin çoğalma düzeyi, ROS ve NO üretme kapasiteleri değerlendirilmiştir. Bu hücrelerde T hücre karakter, fonksiyon ve aktivasyonunu etkileyen başlıca ko-stimülatör moleküllerin ekspresyonu araştırılmıştır. Böylelikle, farklı olgunlaşma aşamalarına ilerletilmiş AML hücrelerinin CD4⁺ ve CD8⁺ T hücre yanıtlarına olan etkileri hakkında çıkarımlar yapılmıştır. Bu bilgilerden yola çıkarak farklı olgunlaşma düzeyindeki monositik veya granülositik seri özelliklerini taşıyan lösemi hücrelerinin, T hücre yanıtlarını etkileme kapasitesinin değişiklik göstereceği hipotezi oluşturulmuştur.

Temel Onkoloji Anabilim Dalı hücre stoklarında bulunan HL-60 hücrelerinin karakterizasyonu gerçekleştirildiğinde literatürde ve sağlayıcı firma American Tissue Culture Collection (ATCC)'nin belirttiği özelliklerin bulunduğu görüldü. Hücreler blastik karakterdeydi ve CD15 yüzey ekspresyonuna sahip popülasyonu yüksekti; diğer taraftan, yalnızca küçük bir

alt-popülasyonda CD11b, CD11c, HLA-DR taşınmaktaydı. Daha önce yapılan çalışmalarda, bu küçük popülasyonun göz ardı edildiği dikkat çekmektedir (9,183) . Ancak, gerek kültür ortamında hücre (sayısının) yoğunluğunun artışı, gerekse bu yoğunluğa bağlı olarak asidite oluşması, HL-60 hücrelerinin spontan olarak olgunlaşmasını tetikleyebilir (184) . Bu nedenle, bu tez çalışmasında HL-60 hücreleri rutin olarak pasajlanmış ve hücreler 7.-10. pasajdan daha ileriye götürülmemiştir. 96 saatlik kültür koşullarında azalan CD15 düzeyi veya CD11b ve CD11c olgunlaşma belirteçlerini taşıyan %5'ten küçük bu popülasyonun varlığı bu şekilde açıklanabilir. Ayrıca, kontrol HL-60 içerisinde yer alan CD11b⁺ hücrelerinin de çoğalma kapasitesinin çok düşük düzeyde olması da bu çıkarımı güçlendirmektedir. Blastik aşamada olmalarına rağmen bu hücrelerin ROS ve NO üretebildikleri de belirlendi. Daha önce yapılan bir çalışmada bu hücrelerin hidrojen peroksit (H₂O₂) ve süperoksit (O₂⁻) üretebildikleri gösterilmiştir (9) .

HL-60 hücrelerinin, diğer bazı AML hücre hatları gibi CD86 (B7-2) ko-stimülatör molekülü aracılığı ile CD4⁺ T hücrelere CD28-aracılı ikinci sinyalleri ulaştırdığı bilinmektedir (185) . CD86⁺ küçük bir alt-popülasyonun varlığı bunun için yeterlidir. B7-H2 ko-stimülatör moleküllerinin de bu hücreler üzerinde bulunması ICOS-aracılı uyarıların iletilebileceğine işaret etmektedir (185) . Diğer taraftan PD-1 inhibitör reseptörünün ligandları B7-H1 (PD-L1) ve B7-DC (PD-L2) (186) , HL-60 hücrelerinde düşük düzeyde bulundu. Bağımsız deneyler tamamlanmamış olsa bile, CD70 ekspresyonun da T hücrelerin aktivasyonunu CD27-aracılı olarak (187) destekleyebileceği düşünülmektedir. Bu sonuçların öngördüğü şekilde ve yine literatürle paralellik göstererek, HL-60 hücrelerinin anti-CD3 ile uyarılmış CD4⁺ T hücre proliferasyonunu desteklediği görülmüştür. Dölen ve Esendağlı tarafından gerçekleştirilmiş bir çalışmada, AML hücreleri tarafından desteklenen yardımcı T hücre yanıtlarının, bu hücrelerin B7-H1 ve B7-DC düzeyinde artışa sebep olduğu ve PD-1 aracılı baskılama mekanizmalarının devreye girdiği gösterilmiştir. İlgili çalışmada, CD86⁺ ve/veya B7-H2⁺ AML blastlarına sahip hastaların neden daha kötü prognoza sahip olduğuna da açıklık

getirilmeye çalışılmıştır (173) . Farklı AML alt-tiplerinde CD11b pozitifliğinin de kötü prognozla ilişkili olduğu bildirilmektedir (10) . Bu tez çalışması kapsamında ise CD11b, hem ATRA hem de D3 ile uyarılan HL-60 hücrelerinin olgunlaştığını gösteren güvenilir ve tutarlı bir belirteç olarak belirlenmiştir.

ATRA'nın HL-60 hücrelerinde granülositik yönde farklılaşmayı uyardığı bilinmektedir (9) . Ancak, fonksiyonel nötrofillerin gelişimi söz konusu değildir (157,158) . Literatür ile benzer şekilde ATRA ile farklılaştırılan HL-60 hücrelerinin, azürofilik granüller taşıması, sitoplazmanın genişlemesi, nükleus segmentasyonunun belirgin hale gelmesi ile baskın hücre karakterinin metamiyelositik morfolojide olduğu gözlenmiştir. ATRA ile inkübasyonu takiben HL-60 hücrelerinin miyelosit, metamiyelosit, band hücresi veya segmentli nükleusa sahip nötrofil aşamalarında görülebildiği bildirilmektedir [13]. Band hücresi ve segmentli nükleuslu hücrelere az sayıda rastlanmaktadır [29]. Morfolojik değişimlere ek olarak hücresel yoğunluğun artması; CD11b, CD11c, CD62L yüzey belirteçlerinin bu artışla korelasyon göstermesi ATRA'nın miyeloid olgunlaşmayı ilerlettiğine kanıt oluşturmuştur. HL-60 hücrelerinde granülositik farklılaşmayı araştırmak üzere kullandığımız CD16 ve CD66b belirteçlerine ATRA uyarımı sonrasında rastlanmamıştır. Nötrofilik olgunlaşmayı işaret eden CD66 belirteci, CD66a, CD66b, CD66c ve CD66d olmak üzere dört adet izoforma sahiptir (188) . Nötrofilik farklılaşmaya yönelik HL-60 hücrelerinde CD66a, CD66c ve CD66d izoformlarının ekspresyonu uyarılabilirken, bu hücrenin CD66b ekspresyon kapasitesinin bulunmadığı bildirilmiştir (188,189) . CD16 ise son farklılaşma aşamasına ulaşmış nötrofillerde (18) ve periferik kandaki monositlerin bir alt-grubunda bulunmaktadır (190) . CD11b, CD11c ve CD62L nötrofil adezyonuna aracılık eder. CD11b ve CD11c kompleman proteinlerinin tanınmasında reseptör görevi görür (191) . Kontrol HL-60 hücrelerine göre anlamlı düzeye ulaşmamış olsa dahi, nötrofil granülositlere özgül bir belirteç olan adezyon ve fagositozda görevli CD15'in ATRA uygulaması ile düzeyindeki zamana bağlı azalması dikkat çekmektedir. ATRA varlığında farklılaştırılan HL-60 hücrelerinde ROS üretim kapasitesinde artış görülmüştür. Literatürde, bu

hücrelerde katepsin D ve lizozim ekspresyonunun arttığı da belirtilmektedir (156) . Buradan hareketle, olgunlaşmış nötrofillere son farklılaşma olmasa da, A-HL-60'ın fonksiyonel açıdan da nötrofil-benzeri hücreler olduğu sonucuna varılmıştır. Zira, NO üretim kapasitesi kontrol HL-60 hücrelerine kıyasla değişmemiştir. Nötrofilik hücrelerin NO'dan ziyade ROS üretim düzeyinin daha fazla olduğu bildirilmektedir (11) . Ayrıca, ATRA'nın fizyolojik koşullarda kemik iliğindeki nötrofil farklılaşmasını desteklediği ve yoksunluğunda da miyeloid öncüllerin sayısında artış görüldüğü bilinmektedir (127,128) .

A-HL-60 hücreleri arasında CD86⁺ alt-popülasyonun oranı artarken, B7-H2 pozitifliğinin çok düşük seviyelere indiği görüldü. CD86⁺ hücrelerin neredeyse tamamı CD11b⁺ idi. Bu hücreler CD11b'yi ne kadar yüksek düzeyde taşıyorlarsa, o kadar farklılaşmış ve olgunlaşmış olarak belirlendiler (özellikle de proliferasyon kaybı ve hücresel yoğunluk açısından). CD11b⁺ A-HL-60 hücrelerinin daha fazla CD86 taşıması, kontrol HL-60'a göre B7-H2 taşınamaması veya T hücre çoğalmasını bozduğu bilinen ROS üretimi yapıyor olmasına rağmen, CD11b⁺ ve CD11b⁻ A-HL-60 hücrelerinin CD4⁺ T hücrelerini uyarıcılığı açısından bir fark görülmedi. 96 saat süren T hücre proliferasyonu ko-kültür deneyleri sırasında gerek CD11b⁺ gerekse CD11b⁻ A-HL-60 hücrelerinin yeni karakterler kazanması söz konusu olabilir (173) . Ayrıca bu çalışmada araştırılmayan pek çok ko-stimülatör (örneğin, OX40L, B7-H3, B7-H4 vb. moleküller) veya proinflamatuvar sitokinler de T hücre çoğalmasını desteklemiş olabilir.

AML-M3 alt-sınıfında bulunan hastalara ATRA tedavisi uygulanmaktadır. Fakat bu tedavi tek başına uygulandığı zaman remisyonlar geçicidir ve çoğunlukla hastalar tedaviye direnç kazanırlar. Kemoterapi ile beraber kullanıldığı durumlarda bile hastalık nüks etmekte ve daha ağır seyretmektedir (144,145) . ATRA'nın MDSC hücrelerinin makrofaja farklılaşmasını uyardığı bilinmektedir; dahası, bu farklılaşma sonrasında meydana gelen hücrelerin MDSC'den daha baskılayıcı olduğu bildirilmiştir (192) . Tüm bu bilgiler doğrultusunda ATRA'nın granülositik farklılaşmayı

desteklediği fakat bu hücrelerin immün baskılama kapasitelerini daha kolay kazanabildiği düşünülmektedir.

D3 uyarımı ile HL-60 hücrelerinin monositik farklılaşmaya yöneldiği bildirilmiştir (8,175) . Bu hücrelerde kontrol HL-60 hücrelerinde olduğu gibi dar sitoplazma ve merkezi nükleusa sahip blastik karakter görüldü. Literatürde D3 uygulaması ile nükleusun hafif girintili bazen reniform şekilde görüldüğü ve bizim boyamalarımızda gözlemlediğimiz gibi hücrenin büyük bir kısmını kapladığı bildirilmiştir (96) . Morfolojik olarak değişimler çok belirgin olmasa da, ATRA uyarımında da olduğu gibi CD11b ve CD11c belirteçlerinde artış görülmüştür. CD62L ekspresyonunun da artışı görülmüştür. Lökositlerde CD11b artışı ve CD62L ekspresyonunda meydana gelen azalmanın, hücrelerin kandan ilgili dokuya göçünde rol oynadığı gösterilmiştir (193) . Ayrıca, lösemi de CD62L (L-selektin) ekspresyonunda meydana gelen düşüş ile olgunlaşmalarını tamamlamamış immatür miyeloid hücrelerin kemik iliğinden çıkarak dolaşıma katıldığı bildirilmiştir. Ayrıca CD62L'nin ekspresyonunun çok düşük olması kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir (194) . Hem ATRA hem de D3 ile ekspresyonu artmış olan bu belirtecin hücrelerin olgunlaşma düzeylerinden dolayı meydana geldiği düşünülmektedir. Monositik farklılaşma belirteçlerinden CD14 ekspresyonu uyarılırken, HLA-DR ekspresyonu görülmemiştir. CD15 pozitifliği D-HL-60 hücrelerinde de devam etmiştir. CD15 belirteci nötrofillerde yüksek düzeylerde bulunurken, bu belirtecin monositik gelişimde de ekspresyonunun arttığı fakat nötrofillerdeki kadar yüksek olmadığı bildirilmiştir (18) . Ayrıca, olgun monositlerde eksprese olduğu bilinen CD16 belirtecinin de bulunmaması ile hücrelerin tam olgunlaşmış bir monositik gelişim göstermediği ve promonositik-benzeri karaktere sahip olduğuna işaret etmektedir. Yüzey belirteçlerinde meydana gelen değişimlere ek olarak hücre yoğunluğunun artması da D3 uyarımının HL-60 hücreleride miyeloid farklılaşmayı uyardığına dair kanıt oluşturmaktadır. D-HL-60 hücrelerinde ROS üretim kapasitesinde göreceli bir artış gözlenmiştir. Ayrıca literatür çalışmalarında ROS aktivasyonunda görevli nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (*nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*, NADPH) oksidazı aktive eden

Gp91phox geninin D3 uyarımı ile artışı gösterilmiştir (97) . Bir çalışmada ROS ve NO üretim kapasitesini belirlemek amacıyla yapılan PKC (PMA ile) uyarımları sonucunda NO üretiminde kontrol HL-60 hücrelerine göre bir değişim görülmez iken, başka bir çalışmada daha düşük PMA uyarımı sonrasında NO üretimi ile ilişkili uyarılabilir nitrik oksit sentaz (*inducible nitric oxide synthase*, iNOS) artışı görülmüştür (98) . D-HL-60 hücreleri arasında B7-H2 pozitifliğinin çok düşük seviyelere indiği görüldü.

CD86⁺ D-HL-60 hücrelerinin oranı neredeyse kontrol HL-60 hücrelerindeki kadardı ve tamamı CD11b⁺ idi. D-HL-60 hücrelerinin CD11b⁺ CD14⁺ alt-popülasyonunun CD4⁺ T hücrelerin proliferasyonunu daha az uyardığı görülmüştür. Ayrıca, D-HL-60 hücrelerinden CD11b⁺'yi yüksek düzeylerde eksprese eden alt-popülasyonun hem CD4⁺ hem de CD8⁺ T hücre proliferasyonunu daha az uyardığı da belirlenmiştir. Aktivasyon sinyali ileten moleküllerin ekspresyonlarının çok düşük düzeylerde bulunması ve ROS üretim kapasitesinde meydana gelen hafif artışın, bu hücrelerin T hücre yanıtlarını baskılamakta kullandıkları mekanizmaları olabilir.

Lipopolisakkarit (LPS) özellikle miyeloid kökenli doğal immün sistem hücrelerinin en güçlü uyarılarından birisidir. LPS miyeloid hücre yüzeyinde bulunan CD14, TLR4 ve MD-2 ile oluşturulmuş ko-reseptöre bağlanır. Aktive olan sinyal iletim yolları CD14-bağımlı ve CD14-bağımsız olmak üzere iki şekilde düzenlenir. CD14 bulunmadığı zaman LPS MD-2'ye bağlanarak TLR4'ün aktivasyonunu sağlar. MyD88 üzerinden aktive olan NF-κB, TNF genlerinin transkripsiyonunu sağlar. CD14-bağımlı yolda ise, LPS CD14 molekülüne bağlanarak TLR4 ve ko-reseptörü MD-2'nin aktivasyonu sağlar. Bu aktivasyon sonucunda MyD88-bağımlı mekanizmalar ile NF-κB üzerinden TNF ailesi-genlerinin transkripsiyonu sağlanırken, TRAM- ve TRIF-aracılı sinyal ise, IRF-3 aktivasyonuna neden olarak MyD88-bağımsız mekanizmalar ile IFN-β transkripsiyonunu sağlar (195) . LPS ile inkübe edilen (kontrol) HL-60 hücrelerinin üzerinde TLR4, CD14 gibi LPS uyarımı için kritik reseptörler bulunmamasına rağmen hücrelerde bazı minimal morfolojik değişimler izlenmiştir; ancak, blastik karakter korunmuştur. Diğer taraftan, araştırılan herhangi bir yüzey belirteci, çoğalma, canlılık, ROS ve NO üretimi gibi

parametrelerde bir değişim görülmemesi LPS reseptörlerinin HL-60 hücreleri tarafından taşınmıyor olmasına bağlanmıştır.

IFN-  uyarımının HL-60 hücrelerinde monositik farklılaşmayı uyardığı bilinmektedir (196) . Yapılan morfolojik analizlerde hücrelerde sitoplazmik alanlarının genişlediği ve nükleusun segmentasyonu belirgin oval bir şekil aldığı belirlendi. Hücrelerin büyük çoğunluğunda monositik belirteçlerden CD14 ve HLA-DR pozitifliğinin görülmesi de bu gözlemleri destekleyici nitelikte oldu. Ayrıca, IFN-  uyarımı sonucunda miyeloid hücrelerin LPS uyarımına açık hale gelmesini sağlayan CD14 belirtecinin ve MD-2 ko-reseptörünün de arttığı bildirilmiştir (197) . Diğer taraftan, bu hücreler belirlediğimiz önemli olgunlaşma belirteci CD11b'yi ve olgunlaşmış monositlerde bulunan CD16 belirtecini bulundurmamakta idi. Bu sonuçlar doğrultusunda, hücrelerin monoblast/promonosit-benzeri bir karakterde oldukları d ş n ld . Ayrıca, NO ve ROS  retim kapasitelerinde herhangi bir fark görülmemesi de bu çıkarımı doğrulamaktadır. B7-H2 molekülünün ekspresyonunda ATRA veya D3 uyarımına göre sınırlı düzeyde bir düşüş görülmüştür. B7-DC, B7-H1 ve CD86 moleküllerinde de artış belirlenmiştir, fakat CD11b pozitifliği uyarılmayan bu hücrelerde olgunlaşma seviyesi ve ko-stimülatör moleküller arasında bir korelasyon yapılamamıştır. Yapmış olduğumuz proliferasyon deneyleri ve literatürün de gösterdiği üzere (196) , bu hücrelerde tek başına IFN- 'nın farklılaştırıcı etkisinin hücre proliferasyonunu durdurucu bir etkisi görülmedi. CD11b gibi kritik miyeloid belirteçlerin ekspresyonunun uyarılmamış olması ve proliferasyonun kontrol HL-60 hücreleri ile benzer düzeyde olmayışı IFN- 'nın farklılaşma ve olgunlaşmayı doğrudan etkilemediği görüşünü desteklemektedir. Tüm bu sonuçlar doğrultusunda tek başına IFN- 'nın, tek başına LPS'e göre farklılaşmayı daha etkin ve monositik-benzeri yönde uyardığı görülmüştür. Farklılaşma basamaklarına ilerletilmiş A-HL-60 ve D-HL-60 hücrelerinin de LPS ve IFN-  uyarımına verdikleri cevaptan faydalanarak karakterlerini anlayabilmek için inkübasyonun 48. saatinde bu ajanlar kültür ortamına eklenerek uyarım toplamda 96 saate tamamlanmıştır. Bu ajanların etkilerinin yorumlanabilmesi için hücrelerin farklılaşma belirteçlerini eksprese etmeye

başladıkları zaman olan 48. saat seçilmiştir. Ayrıca, bu ajanlar inflamatuvar koşullarda hücrelerin nasıl bir davranış sergileyeceğini anlamak için önemlidir.

ATRA ile metamiyelositik aşamaya ilerletilmiş hücrelerin LPS uyarımı sonrasında sitoplazmik hacimlerinde artış ve vakuol oluşumu görüldü. Vakuollerin, fagositik karakterde olan hücrelerde bakteri öldürülmesinde etkili inflamazom kompleksi için gerekli olduğu ve LPS uyarımı ile oluşumlarının tetiklendiği bilinmektedir (198) . LPS uyarımı ile meydana gelen inflamatuvar koşula tepki olarak bu vakuollerin oluşumu, bu hücrelerin fagositoz yapabilme yeteneklerinin bulunabileceğine işaret edebilir. Ayrıca, bu uyarım sonrasında azürofilik ikincil granüllerin sayısında belirgin azalma görüldü. Hücrelerin farklılaşma ve olgunlaşma düzeylerinin ilerlemesiyle özgün granüllüer oluşmaya başlamış, bu yüzden azürofilik granüller azalmış olabilir. Monositik veya granülositik seriyi belirlemek için kullanılan yüzey belirtecinde ise değişim görülmedi. Paralel olarak LPS uyarımı bu hücrelerde ko-stimülasyon moleküllerini taşıyan hücre yüzdelerinde de değişimlere neden olmadı. A-HL-60 hücrelerinde LPS taşıyan reseptörlerden TLR4 ve CD14 taşıyan hücre yüzdesi oldukça düşük olmasına rağmen, 48 saat boyunca LPS ile uyarım TLR4 düzeyinde kısmi artışa neden olabilmıştır. ATRA'nın HL-60 hücrelerinde TLR4 ekspresyonunu oldukça düşük düzeyde uyurabildiğine dair yayınlar olmasına rağmen (199) bizim uyarım koşullarımızda bu reseptör gözlenmemiştir. Ancak, A-HL-60 hücrelerinin LPS ve özellikle IFN- γ 'ya yanıt olarak TLR4 artışı, ATRA'nın hücreleri bu reseptörü eksprese edecek düzeyde farklılaştırdığı şeklinde yorumlanabilir.

A-HL-60 hücrelerinde IFN- γ uyarımı sonrasında, böbrek şekilli eksentrik konuma sahip nükleuslar ve granül artışı saptanmıştır. LPS ile uyarılmış A-HL-60 hücrelerinde gözlenen vakuollere bu hücrelerde rastlanmamıştır. Ayrıca, CD14 ve HLA-DR monositik belirteçlerini yüksek düzeyde eksprese eden hücre alt-popülasyonları belirlenirken, CD16 ekspresyonu yine hiç bir hücrede görülmemiştir. IFN- γ 'nın uyardığı bilinen TLR4 (197) taşıyan hücre yüzdesinde de büyük oranda artış saptandı. Bu durum IFN- γ 'nın A-HL-60 hücrelerini LPS uyarımına açık hale getirdiği

şeklinde yorumlanabilir. Metamiyelositik farklılaşma aşamasında olan bu hücreler IFN- γ uyarımı sonrasında monositik karakterler göstermeye başlamıştır. Fakat, ROS ve NO üretim kapasitesinde belirgin bir artış görülmemiştir. Ayrıca, IFN- γ uyarımı hücreleri LPS uyarımına açık hale getirmiştir.

IFN- γ , inflamasyonda monositik farklılaşmayı uyarmasının yanı sıra erken dönem anti-tümör yanıtlarda etkili olan pro-inflamatuvar bir sitokindir (196) . Doğal öldürücü hücrelerden (NK) de IFN- γ salgılanır ve anti-tümör immün yanıtlar desteklenir. Fakat, IFN- γ -aracılı immün yanıtlardan tümör baskılayıcı ko-inhibitör moleküllerin düzeylerini arttırarak veya ko-aktivatör moleküllerin düzeyini azaltarak bir kaçış stratejisi uygular. Böylelikle, T hücre yanıtlarını sınırlandırır. Özellikle B7 ailesi ko-stimülatör moleküllerin ekspresyonlarını değiştirerek immün gözetimden saklanır. Bu mekanizma bir çok kanser çeşidinde olduğu gibi AML'de de gösterilmiştir (170,185,197,200) . A-HL-60 hücrelerinin CD11b⁺ tüm alt-popülasyonlarında da IFN- γ uyarımına yanıt olarak, CD86 ve B7-H1 moleküllerinin ekspresyonu artarken, B7-H2 molekülünde büyük oranda düşüş görülmüştür. Hücrelerin büyük çoğunluğunda B7-DC molekülü de CD11b ile beraber eksprese olurken, bir grup hücrenin bu molekülü tek başına da eksprese ettiği görülmüştür. CD11b'yi yüksek düzeylerde bulunduran alt-popülasyonlar CD4⁺ ve CD8⁺ T hücre proliferasyonlarını farklı düzeylerde etkilese de, bu hücrelerin aktivasyonlarını etkin olarak uyarmamışlardır. Bu durum aktivatör moleküllerin azalmasından ziyade, inhibitör PD-1 ligandlarının artışına bağlanabilir. Ayrıca, CD11b-pozitifliğine ek olarak neredeyse tüm hücrelerin CD14 belirtecini bulundurması, bu uyarım sonrasında hücrelerin daha olgun bir karaktere sahip olduğunu göstermektedir. Proliferasyon deneylerinde de CD11b⁺ CD14⁺ alt-popülasyonun proliferasyon yüzdelerinin daha düşük olması da bu çıkarımı desteklemektedir.

D3 ile monositik farklılaşmaya yöneltilmiş hücreler LPS varlığında belirgin morfolojik değişim göstermiştir. Hücrelerde böbrek şekilli, pleomorfik eksentrik konumlu nükleus ve geniş vakuoller dikkat çekmektedir. LPS'in A-HL-60 hücrelerine kıyasla D-HL-60 hücrelerinde morfolojik değişimleri daha

etkin uyardığı görülmüştür. Bunun sebebi olarak D-HL-60 hücrelerinde bulunan LPS reseptör bileşen üyesi CD14 gösterilebilir. Fakat CD14 bağımlı mekanizmalar ile sinyalin iletilebilmesi için TLR4 molekülüne ihtiyaç duyulduğu bilimektedir (195) . Fakat, LPS uyarımı ile TLR4 ekspresyonunda bir artış görülmeydi. Literatürde D3 ile farklılaştırılmış HL-60 hücrelerinde TLR2 gene ekspresyonunda artış görülmüştür (95) ve TLR4 olmadığı zaman sinyalin TLR2 ile de iletilebildiği bildirilmiştir (201) . Bu hücrelerde meydana gelen belirgin vakuol artışı LPS'in bu moleküller aracılı sinyali uyarması ile gerçekleşmiş olabilir. Ayrıca, bu hücrelerde kontrol HL-60 hücrelerine göre daha fazla ROS üretme kapasitesi de belirlenmiştir. Fakat LPS uyarımı ile bu hücrelerin ko-stimülatör molekül düzeylerinde D-HL-60 hücrelerine göre bir fark izlenmemiştir. Yalnızca çok az bir hücre grubunda CD11b ve CD86'nın beraber pozitifliği belirlenmiştir. Bu nedenle LPS ile uyarılmış D-HL-60 hücrelerinin T hücreler ile ko-kültürü gerçekleştirilmemiştir.

D-HL-60 hücrelerinde IFN- γ uyarımı, nükleusun oval bir şekil almasına ve hücrelerde makrofaj veya dendritik hücre karakteri olan sitoplazmik projeksiyonların oluşmasına neden olmuştur. D-HL-60 hücrelerinde de uyarılmış CD14 ve HLA-DR belirteçlerinin ekspresyonunda artışa neden olarak monositik farklılaşmayı daha da desteklemiştir. Bu uyarım sonucunda ROS ve NO düzeylerinde herhangi bir değişim görülme de, IFN- γ D-HL-60 hücrelerinin monosit-benzeri karakterlerini hem morfolojik hem de immünofenotipik olarak güçlendirmiştir. Fakat yine tam bir olgunlaşma aşamasına ilerletilememiştir. CD86 ve B7-DC molekülü taşıyan tüm hücre alt-popülasyonları CD11b pozitifliği gösterirken, CD11b⁺ neredeyse tüm alt-popülasyonun B7-H1 molekülünü eksprese ettiği görüldü. Ayrıca CD11b⁺ olmayan fakat B7-H1 molekülünü taşıyan alt-popülasyonlar da belirlendi. IFN- γ ile uyarılmış D-HL-60 hücrelerinin CD11b'yi yüksek düzeylerde eksprese eden alt-popülasyonlarının hem CD4⁺ hemde CD8⁺ T hücre çoğalmasında daha az uyardığı görülmüştür. D-HL-60 hücrelerinde IFN- γ uyarımı sonrasında PD-1 ligandlarından özellikle B7-H1'in artışı görüldüğü için, T hücre çoğalmasında meydana gelen bu düşüş PD-1 bağımlı mekanizmalar üzerinden gerçekleştiği düşünülmektedir.

Sonuç olarak, bu tez çalışması kapsamında daha önce bilimsel literatürde kapsamlı şekilde karakterize edilmiş olan HL-60 hücrelerinin ATRA veya D3 varlığında sırasıyla nötrofil-benzeri (A-HL-60) veya monosit-benzeri (D-HL-60) hücrelere farklılaştırılması/olgunlaştırılması aşamaları başarı ile gerçekleştirilmiştir. Bu farklılaşma süreci hücre morfolojisi, yüzey belirteçlerindeki değişimler, hücre çoğalması, hücresel yoğunluk ve miyeloid hücrelere özgü çeşitli fonksiyonel parametreler ile takip edilmiştir. Gerek A-HL-60 gerekse D-HL-60 hücrelerinin olgunlaşma ve farklılaşması ile ilgili tüm karakterler, bu hücrelerin CD11b taşıma oranı ve bu molekülün ekspresyon düzeyi ile korele edilebilmiştir. CD11b pozitifliği gösteren AML hastalığının ağır seyretmesi ve kötü prognoz ile ilişkilendirilmesi (10) . ise A-HL-60 ve D-HL-60 hücrelerinin sergilediği karakter ile tam olarak örtüşmemektedir. A-HL-60 ve D-HL-60 hücrelerinin proliferasyonu yavaşlamıştı ve T hücre çoğalmasını desteklemekteydiler. Aksine, miyeloid kökenli immün baskılayıcı/düzenleyici hücrelerin olgunluk derecesi ile immün yanıtları baskılama etkinliği arasında pozitif bir ilişki olduğu bildirilmektedir (180) . Örneğin, tümör-ilişkili makrofajlar MDSC'lere göre daha güçlü immün baskılayıcılardır (192) . AML hücrelerinin ise (HL-60 hücre hattı dahil) sıklıkla taşıdıkları ko-stimülatör moleküller CD86 ve B7-H2 sayesinde yardımcı T hücre yanıtlarına destek olabildikleri laboratuvarımızda daha önce gerçekleştirilen bir çalışmada belirlenmiştir (173) . A-HL-60 ve D-HL-60 hücrelerinin de benzer etkileşimler sayesinde CD4⁺ T hücrelerin çoğalmasına aracılık ettiği görülmüştür. AML hücreleri T hücre yanıtlarına (özellikle Th1) karşılık olarak B7-H1 ve B7-DC inhibitör ligandlarını eksprese etme kapasitesine sahiptir (202) . İmmün yanıtlara “adaptif direnç” mekanizması olarak adlandırılan bu olay (203) . A-HL-60 veya D-HL-60 hücrelerinin IFN- γ 'ya maruz bırakıldıklarında, özellikle CD11b pozitifliği gösteren hücrelerde de izlenmiştir. CD11b⁺ HL-60 veya CD11b⁺ D-HL-60 hücrelerinin B7-H2 taşıma oranları oldukça azalmıştır, B7-H1 ve B7-DC moleküllerini ise yaygın olarak taşımaya başladıkları görülmüştür. CD86⁺ hücre düzeyindeki artış ise bu hücrelerin CD28-aracılığı ile ko-stimülasyon kapasitelerini sürdürdükleri, ancak, PD-1 yolağı üzerinden immün baskılama yapabileceklerine ve hatta

yardımcı T hücrelerin düzenleyici (Treg) fenotipine dönüşmesine aracılık edebileceklerine işaret edebilir.

Bu çalışmada, ATRA veya D3 inkübasyonu ile miyeloid olgunlaşma/farklılaşma basamaklarında ilerletilen CD11b⁺ HL-60 hücrelerinin immün uyarıcılığının devam ettiği gösterilmiştir. IFN- γ varlığında geliştirilen CD11b⁺ A-HL-60 veya CD11b⁺ D-HL-60 hücrelerinin ise gerek CD8⁺ gerekse CD4⁺ T hücreleri sınırlı düzeyde uyardığı ve/veya baskılayabildiği belirlenmiştir. Genel olarak, D-HL-60 hücrelerinin ise daha az immün uyarıcılık kapasitesine sahip olduğu not edilmiştir. T hücre çoğalmasını uyarma kapasitesindeki düşüş veya kazanılan baskılama yeteneğinin ROS veya NO üretimi ile değil, PD-1 yolağı üzerinden olduğu yönünde ön bulgular elde edilmiştir. Bu açıdan, Th1, sitotoksik T ve NK hücrelerinin anti-tümör yanıtlar sırasında ürettikleri IFN- γ 'ya (202) maruz kalan CD11b⁺ AML blastlarının bu duruma (CD11b⁺'lere kıyasla) daha başarılı şekilde adapte olarak, PD-1-aracılı immün kaçış mekanizmalarını kullanabileceği yönünde in vitro bilgiler elde edilmiştir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada

1. ATRA uyarımı, HL-60 hücrelerinde CD11b, CD11c ve CD62L ekspresyonunda artışa neden olarak olgunlaşma ve farklılaşmayı uyarmıştır.
2. D3 uyarımı, HL-60 hücrelerinde CD11b, CD11c ve CD14 ekspresyonunda artışa neden olarak olgunlaşma ve farklılaşmayı uyarmıştır.
3. ATRA veya D3 HL-60 hücrelerinin farklılaşmasını ve olgunlaşmasını özellikle CD11b belirtecinin artışına neden olarak etkilemiştir.
4. ATRA veya D3 ile uyarılmış HL-60 hücrelerinde CD11b pozitif hücre alt-popülasyonunun daha olgun karakterde olduğu, yoğunluk ayırlama deneyleri ile de desteklendi.
5. A-HL-60 hücrelerinde LPS uyarımı, minimal morfolojik değişimler görülürken, bu uyarım immünofenotipik değişikliklere neden olmamıştır. IFN- γ uyarımıyla ise, CD14, HLA-DR ve TLR4 ekspresyonlarında belirgin artış görüldü.
6. D-HL-60 hücrelerinde LPS uyarımı ile belirgin morfolojik değişimler görülürken, bu uyarım immünofenotipik değişikliklere neden olmamıştır. IFN- γ uyarımıyla ise, halihazırda eksprese olan CD14 artış gösterirken, bu uyarı ile HLA-DR'nin de belirgin artışı görüldü.
7. Kontrol HL-60 hücreleride LPS uyarımı ile bir değişim gözlenmezken, IFN- γ uyarımı bu hücrelerde CD14 ve HLA-DR artışının yanı sıra, morfolojik değişimlere de neden olmuştur.
8. Hücre grupları arasında nitrik oksit (NO) üretme kapasiteleri açısından bir fark görülmez iken, A-HL-60 ve LPS ile uyarılmış D-HL-60 hücrelerinde reaktif oksijen türleri (ROS) üretme kapasitesi kontrol HL-60 hücrelerine göre daha yüksek belirlendi.

9. ATRA veya D3 ve LPS veya IFN- γ ile uyarılmış tüm hücre gruplarında CD11b⁺ hücre alt-popülasyonlarının proliferasyon kapasitesi daha düşük olarak belirlendi. Bu bulgu CD11b belirtecinin olgunluk düzeyini belirlemek için kullanılan doğru bir parametre olduğunu destekledi.
10. HL-60 hücrelerinde ko-stimülatör moleküllerden B7-H2 bulunurken, B7-H1, B7-DC varlığı saptanmadı. Ayrıca CD86 pozitif çok küçük bir hücre alt-popülasyonu da görüldü. ATRA veya D3 uyarımı ile B7-H2 eksprese eden hücrelerin sayısında belirgin bir azalma gözlenirken, ATRA uyarımı CD86 artışına da neden olmuştur.
11. Tüm hücre gruplarında, LPS'e belirgin bir yanıt gözölmezken, IFN- γ uyarımı B7-H1 ve B7-DC ko-inhibitör moleküllerinin ekspresyonunu artırdı, B7-H2 ko-aktivatör molekülünde düşüşe neden oldu. Ayrıca, CD11b⁺ hücrelerin CD86, B7-H1 ve B7-DC moleküllerini yaygın olarak taşıyan alt-popülasyon olduğu saptandı.
12. T hücre ko-kültür deneylerinde ATRA veya D3 inkübasyonu ile miyeloid olgunlaşma/farklılaşma basamaklarında ilerletilen CD11b⁺ HL-60 hücrelerinin immün uyarıcılığının devam ettiği gösterilmiştir. IFN- γ varlığında geliştirilen CD11b⁺ hücrelerinin (özellikle D3 ile uyarılan grubun) ise, CD8⁺ ve CD4⁺ T hücreleri sınırlı düzeyde uyardığı ve/veya baskılayabildiği belirlenmiştir.

Bu verilere dayanarak;

13. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda, T hücre yanıtlarının PD-1 aracılı mekanizmalarla baskılanabildiği düşünüldüğünden, antikor aracılı bu reseptörün inhibe edilmesi düşünülmektedir. Böylece baskılama sinyalinin hangi reseptör üzerinden iletildiği belirlenebilecektir. Ayrıca bu tez çalışmasında araştırılmamış diğer ko-stimülatör moleküllerin ekspresyon düzeyleri de araştırılabilir.

14. Hücrelerin NO ve ROS üretme kapasitesinde görevli bir takım genlerin ekspresyonu da belirlenerek, uyarımlar sonucu meydana gelmiş olası değişimler mRNA düzeyinde de incelenebilir.
15. LPS aracılı immün yanıtların iletilmesinde görevli reseptör kompleksi üyelerinden CD14 ve TLR4'ün değişimleri incelenmiştir. Bu reseptör kompleksinin diğer bileşeni olan MD-2'de meydana gelen olası ekspresyon değişimleri de incelenebilir. Ayrıca hücrelerde TLR2 ekspresyon değişimleri de araştırılabilir.
16. *In vitro* koşullardan elde edilen bu sonuçların anlamlılık derecelerini kuvvetlendirmek için, AML hasta kemik iliği örneklerinden elde edilen lösemi blastlarının da aynı deney koşulları altında ko-stimülatör moleküllerde ve CD11b belirtecinde meydana gelen değişimler belirlenebilir.

KAYNAKLAR

1. Weissman, I.L., Anderson, D.J., Gage, F. (2001) Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 17, 387-403.
2. Hartenstein, V. (2006) Blood cells and blood cell development in the animal kingdom. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 22, 677-712.
3. Pollyea, D.A., Kohrt, H.E., Medeiros, B.C. (2011) Acute myeloid leukaemia in the elderly: a review. *Br J Haematol*, 152 (5), 524-542.
4. Stone, R.M., O'Donnell, M.R., Sekeres, M.A. (2004) Acute myeloid leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 98-117.
5. Slovak, M.L., Kopecky, K.J., Cassileth, P.A., Harrington, D.H., Theil, K.S., Mohamed, A., Paietta, E., Willman, C.L., Head, D.R., Rowe, J.M., Forman, S.J., Appelbaum, F.R. (2000) Karyotypic analysis predicts outcome of preremission and postremission therapy in adult acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group/Eastern Cooperative Oncology Group Study. *Blood*, 96 (13), 4075-4083.
6. Yanada, M., Suzuki, M., Kawashima, K., Kiyoi, H., Kinoshita, T., Emi, N., Saito, H., Naoe, T. (2005) Long-term outcomes for unselected patients with acute myeloid leukemia categorized according to the World Health Organization classification: a single-center experience. *Eur J Haematol*, 74 (5), 418-423.
7. Fontana, J.A., Colbert, D.A., Deisseroth, A.B. (1981) Identification of a population of bipotent stem cells in the HL60 human promyelocytic leukemia cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78 (6), 3863-3866.
8. Pan, Q., Granger, J., O'Connell, T.D., Somerman, M.J., Simpson, R.U. (1997) Promotion of HL-60 cell differentiation by 1,25-dihydroxyvitamin D3 regulation of protein kinase C levels and activity. *Biochem Pharmacol*, 54 (8), 909-915.

9. Harris, P., Ralph, P. (1985) Human leukemic models of myelomonocytic development: a review of the HL-60 and U937 cell lines. *J Leukoc Biol*, 37 (4), 407-422.
10. Foucar K., R.K., Czuchlewski D.,. Acute Myeloid Leukemia.
11. Abbas A.K., L.A.H., Pillai S. (2010) *Cellular and Molecular Immunology*. 6, 566.
12. Taichman, R.S. (2005) Blood and bone: two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem-cell niche. *Blood*, 105 (7), 2631-2639.
13. Xie, Y., Yin, T., Wiegraebe, W., He, X.C., Miller, D., Stark, D., Perko, K., Alexander, R., Schwartz, J., Grindley, J.C., Park, J., Haug, J.S., Wunderlich, J.P., Li, H., Zhang, S., Johnson, T., Feldman, R.A., Li, L. (2009) Detection of functional haematopoietic stem cell niche using real-time imaging. *Nature*, 457 (7225), 97-101.
14. Majumdar, M.K., Thiede, M.A., Mosca, J.D., Moorman, M., Gerson, S.L. (1998) Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells. *J Cell Physiol*, 176 (1), 57-66.
15. Rosenbauer, F., Tenen, D.G. (2007) Transcription factors in myeloid development: balancing differentiation with transformation. *Nat Rev Immunol*, 7 (2), 105-117.
16. Olweus, J., Lund-Johansen, F., Terstappen, L.W. (1995) CD64/Fc gamma RI is a granulo-monocytic lineage marker on CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Blood*, 85 (9), 2402-2413.
17. Leary, A.G., Ogawa, M., Strauss, L.C., Civin, C.I. (1984) Single cell origin of multilineage colonies in culture. Evidence that differentiation of multipotent progenitors and restriction of proliferative potential of monopotent progenitors are stochastic processes. *J Clin Invest*, 74 (6), 2193-2197.

18. Wood, B.L. (2007) Myeloid malignancies: myelodysplastic syndromes, myeloproliferative disorders, and acute myeloid leukemia. *Clin Lab Med*, 27 (3), 551-575, vii.
19. Deo, A. (2011) Hematology Atlas and Morphology of Myeloid Precursursors, <http://allaboutblood.com/2011/06/04/morphology-of-myeloid-precursursors/>.
20. Mirza, T. ((t.y.)) Myelopoiesis.
21. Wognum, A.W., Westerman, Y., Visser, T.P., Wagemaker, G. (1994) Distribution of receptors for granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on immature CD34+ bone marrow cells, differentiating monomyeloid progenitors, and mature blood cell subsets. *Blood*, 84 (3), 764-774.
22. Lichtman, M.A., Chamberlain, J.K., Weed, R.I., Pincus, A., Santillo, P.A. (1977) The regulation of the release of granulocytes from normal marrow. *Prog Clin Biol Res*, 13, 53-75.
23. Gasson, J.C., Weisbart, R.H., Kaufman, S.E., Clark, S.C., Hewick, R.M., Wong, G.G., Golde, D.W. (1984) Purified human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: direct action on neutrophils. *Science*, 226 (4680), 1339-1342.
24. Weisbart, R.H., Golde, D.W., Clark, S.C., Wong, G.G., Gasson, J.C. (1985) Human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is a neutrophil activator. *Nature*, 314 (6009), 361-363.
25. Lefevre, P., Lacroix, C., Tagoh, H., Hoogenkamp, M., Melnik, S., Ingram, R., Bonifer, C. (2005) Differentiation-dependent alterations in histone methylation and chromatin architecture at the inducible chicken lysozyme gene. *J Biol Chem*, 280 (30), 27552-27560.
26. Tagoh, H., Melnik, S., Lefevre, P., Chong, S., Riggs, A.D., Bonifer, C. (2004) Dynamic reorganization of chromatin structure and selective DNA demethylation prior to stable enhancer complex formation during

- differentiation of primary hematopoietic cells in vitro. *Blood*, 103 (8), 2950-2955.
27. Pongubala, J.M., Van Beveren, C., Nagulapalli, S., Klemsz, M.J., McKercher, S.R., Maki, R.A., Atchison, M.L. (1993) Effect of PU.1 phosphorylation on interaction with NF-EM5 and transcriptional activation. *Science*, 259 (5101), 1622-1625.
 28. Pahl, H.L., Scheibe, R.J., Zhang, D.E., Chen, H.M., Galson, D.L., Maki, R.A., Tenen, D.G. (1993) The proto-oncogene PU.1 regulates expression of the myeloid-specific CD11b promoter. *J Biol Chem*, 268 (7), 5014-5020.
 29. Shin, M.K., Koshland, M.E. (1993) Ets-related protein PU.1 regulates expression of the immunoglobulin J-chain gene through a novel Ets-binding element. *Genes Dev*, 7 (10), 2006-2015.
 30. Hohaus, S., Petrovick, M.S., Voso, M.T., Sun, Z., Zhang, D.E., Tenen, D.G. (1995) PU.1 (Spi-1) and C/EBP alpha regulate expression of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor alpha gene. *Mol Cell Biol*, 15 (10), 5830-5845.
 31. Schepers, H., Wierenga, A.T., van Gosliga, D., Eggen, B.J., Vellenga, E., Schuringa, J.J. (2007) Reintroduction of C/EBPalpha in leukemic CD34+ stem/progenitor cells impairs self-renewal and partially restores myelopoiesis. *Blood*, 110 (4), 1317-1325.
 32. Scott, L.M., Civin, C.I., Rorth, P., Friedman, A.D. (1992) A novel temporal expression pattern of three C/EBP family members in differentiating myelomonocytic cells. *Blood*, 80 (7), 1725-1735.
 33. Yamanaka, R., Kim, G.D., Radomska, H.S., Lekstrom-Himes, J., Smith, L.T., Antonson, P., Tenen, D.G., Xanthopoulos, K.G. (1997) CCAAT/enhancer binding protein epsilon is preferentially up-regulated during granulocytic differentiation and its functional versatility is determined by alternative use of promoters and differential splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94 (12), 6462-6467.

34. Estey, E.,Dohner, H. (2006) Acute myeloid leukaemia. *Lancet*, 368 (9550), 1894-1907.
35. Türk Hematoloji Derneği. (t.y.). Erişim: 15 Nisan 2014, <http://www.thd.org.tr/>.
36. Bendix-Hansen, K. (1988) Myeloperoxidase deficient polymorphonuclear leucocytes in leukaemia and allied disorders. *Dan Med Bull*, 35 (6), 501-520.
37. Miraki-Moud, F., Anjos-Afonso, F., Hodby, K.A., Griessinger, E., Rosignoli, G., Lillington, D., Jia, L., Davies, J.K., Cavenagh, J., Smith, M., Oakervee, H., Agrawal, S., Gribben, J.G., Bonnet, D.,Taussig, D.C. (2013) Acute myeloid leukemia does not deplete normal hematopoietic stem cells but induces cytopenias by impeding their differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110 (33), 13576-13581.
38. Austin, H., Delzell, E.,Cole, P. (1988) Benzene and leukemia. A review of the literature and a risk assessment. *Am J Epidemiol*, 127 (3), 419-439.
39. Sandler, D.P., Shore, D.L., Anderson, J.R., Davey, F.R., Arthur, D., Mayer, R.J., Silver, R.T., Weiss, R.B., Moore, J.O., Schiffer, C.A.,et al. (1993) Cigarette smoking and risk of acute leukemia: associations with morphology and cytogenetic abnormalities in bone marrow. *J Natl Cancer Inst*, 85 (24), 1994-2003.
40. Levine, E.G.,Bloomfield, C.D. (1992) Leukemias and myelodysplastic syndromes secondary to drug, radiation, and environmental exposure. *Semin Oncol*, 19 (1), 47-84.
41. Bullinger, L.,Valk, P.J. (2005) Gene expression profiling in acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*, 23 (26), 6296-6305.
42. Le Beau, M.M., Albain, K.S., Larson, R.A., Vardiman, J.W., Davis, E.M., Blough, R.R., Golomb, H.M.,Rowley, J.D. (1986) Clinical and cytogenetic correlations in 63 patients with therapy-related myelodysplastic syndromes and acute nonlymphocytic leukemia: further

evidence for characteristic abnormalities of chromosomes no. 5 and 7. *J Clin Oncol*, 4 (3), 325-345.

43. Thirman, M.J., Gill, H.J., Burnett, R.C., Mbangkollo, D., McCabe, N.R., Kobayashi, H., Ziemer-van der Poel, S., Kaneko, Y., Morgan, R., Sandberg, A.A., et al. (1993) Rearrangement of the MLL gene in acute lymphoblastic and acute myeloid leukemias with 11q23 chromosomal translocations. *N Engl J Med*, 329 (13), 909-914.
44. Super, H.J., McCabe, N.R., Thirman, M.J., Larson, R.A., Le Beau, M.M., Pedersen-Bjergaard, J., Philip, P., Diaz, M.O., Rowley, J.D. (1993) Rearrangements of the MLL gene in therapy-related acute myeloid leukemia in patients previously treated with agents targeting DNA-topoisomerase II. *Blood*, 82 (12), 3705-3711.
45. Miller, J.S., Arthur, D.C., Litz, C.E., Neglia, J.P., Miller, W.J., Weisdorf, D.J. (1994) Myelodysplastic syndrome after autologous bone marrow transplantation: an additional late complication of curative cancer therapy. *Blood*, 83 (12), 3780-3786.
46. Stone, R.M., Neuberg, D., Soiffer, R., Takvorian, T., Whelan, M., Rabinowe, S.N., Aster, J.C., Leavitt, P., Mauch, P., Freedman, A.S., et al. (1994) Myelodysplastic syndrome as a late complication following autologous bone marrow transplantation for non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol*, 12 (12), 2535-2542.
47. German, J., Bloom, D., Passarge, E., Fried, K., Goodman, R.M., Katzenellenbogen, I., Laron, Z., Legum, C., Levin, S., Wahrman. (1977) Bloom's syndrome. VI. The disorder in Israel and an estimation of the gene frequency in the Ashkenazim. *Am J Hum Genet*, 29 (6), 553-562.
48. Butturini, A., Gale, R.P., Verlander, P.C., Adler-Brecher, B., Gillio, A.P., Auerbach, A.D. (1994) Hematologic abnormalities in Fanconi anemia: an International Fanconi Anemia Registry study. *Blood*, 84 (5), 1650-1655.

49. Rothe, G., Schmitz, G. (1996) Consensus protocol for the flow cytometric immunophenotyping of hematopoietic malignancies. Working Group on Flow Cytometry and Image Analysis. *Leukemia*, 10 (5), 877-895.
50. Menendez, P., Prosper, F., Bueno, C., Arbona, C., San Miguel, J.F., Garcia-Conde, J., Sola, C., Hornedo, J., Cortes-Funes, H., Orfao, A. (2001) Sequential analysis of CD34+ and CD34- cell subsets in peripheral blood and leukapheresis products from breast cancer patients mobilized with SCF plus G-CSF and cyclophosphamide. *Leukemia*, 15 (3), 430-439.
51. Bene, M.C., Castoldi, G., Knapp, W., Ludwig, W.D., Matutes, E., Orfao, A., van't Veer, M.B. (1995) Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia*, 9 (10), 1783-1786.
52. J.B, B. (1999) Leukemia Diagnosis. 2, 200.
53. M, A. (2011) Acute Leukemia - The Scientist's Perspective and Challenge. 428.
54. Plesa, A., et al., Diagnostics of the AML with immunophenotypical data. *Math. Model. Nat. Phenom*, 2008. 1(2):104-123.
55. Pludowski, P., Holick, M.F., Pilz, S., Wagner, C.L., Hollis, B.W., Grant, W.B., Shoenfeld, Y., Lerchbaum, E., Llewellyn, D.J., Kienreich, K., Soni, M. (2013) Vitamin D effects on musculoskeletal health, immunity, autoimmunity, cardiovascular disease, cancer, fertility, pregnancy, dementia and mortality-a review of recent evidence. *Autoimmun Rev*, 12 (10), 976-989.
56. Holick, M.F. (2007) Vitamin D deficiency. *N Engl J Med*, 357 (3), 266-281.
57. Holick, M.F., Uskokovic, M., Henley, J.W., MacLaughlin, J., Holick, S.A., Potts, J.T., Jr. (1980) The photoproduction of 1 alpha,25-

dihydroxyvitamin D3 in skin: an approach to the therapy of vitamin-D-resistant syndromes. *N Engl J Med*, 303 (7), 349-354.

58. Mora, J.R., Iwata, M., von Andrian, U.H. (2008) Vitamin effects on the immune system: vitamins A and D take centre stage. *Nat Rev Immunol*, 8 (9), 685-698.
59. Sigmundsdottir, H., Pan, J., Debes, G.F., Alt, C., Habtezion, A., Soler, D., Butcher, E.C. (2007) DCs metabolize sunlight-induced vitamin D3 to 'program' T cell attraction to the epidermal chemokine CCL27. *Nat Immunol*, 8 (3), 285-293.
60. Chen, S., Sims, G.P., Chen, X.X., Gu, Y.Y., Chen, S., Lipsky, P.E. (2007) Modulatory effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on human B cell differentiation. *J Immunol*, 179 (3), 1634-1647.
61. Rachez, C., Freedman, L.P. (2000) Mechanisms of gene regulation by vitamin D(3) receptor: a network of coactivator interactions. *Gene*, 246 (1-2), 9-21.
62. Shapira, Y., Agmon-Levin, N., Shoenfeld, Y. (2010) Mycobacterium tuberculosis, autoimmunity, and vitamin D. *Clin Rev Allergy Immunol*, 38 (2-3), 169-177.
63. Arnson, Y., Amital, H., Shoenfeld, Y. (2007) Vitamin D and autoimmunity: new aetiological and therapeutic considerations. *Ann Rheum Dis*, 66 (9), 1137-1142.
64. Lemire, J.M., Adams, J.S., Sakai, R., Jordan, S.C. (1984) 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 suppresses proliferation and immunoglobulin production by normal human peripheral blood mononuclear cells. *J Clin Invest*, 74 (2), 657-661.
65. Rigby, W.F., Yirinec, B., Oldershaw, R.L., Fanger, M.W. (1987) Comparison of the effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on T lymphocyte subpopulations. *Eur J Immunol*, 17 (4), 563-566.
66. Reichel, H., Koeffler, H.P., Tobler, A., Norman, A.W. (1987) 1 alpha,25-Dihydroxyvitamin D3 inhibits gamma-interferon synthesis by normal

- human peripheral blood lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84 (10), 3385-3389.
67. Rigby, W.F., Stacy, T., Fanger, M.W. (1984) Inhibition of T lymphocyte mitogenesis by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ (calcitriol). *J Clin Invest*, 74 (4), 1451-1455.
 68. Bhalla, A.K., Amento, E.P., Krane, S.M. (1986) Differential effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on human lymphocytes and monocyte/macrophages: inhibition of interleukin-2 and augmentation of interleukin-1 production. *Cell Immunol*, 98 (2), 311-322.
 69. Meehan, M.A., Kerman, R.H., Lemire, J.M. (1992) 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ enhances the generation of nonspecific suppressor cells while inhibiting the induction of cytotoxic cells in a human MLR. *Cell Immunol*, 140 (2), 400-409.
 70. Mahon, B.D., Wittke, A., Weaver, V., Cantorna, M.T. (2003) The targets of vitamin D depend on the differentiation and activation status of CD4 positive T cells. *J Cell Biochem*, 89 (5), 922-932.
 71. Aihara, H., Asaoka, Y., Yoshida, K., Nishizuka, Y. (1991) Sustained activation of protein kinase C is essential to HL-60 cell differentiation to macrophage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88 (24), 11062-11066.
 72. van Etten, E., Mathieu, C. (2005) Immunoregulation by 1,25-dihydroxyvitamin D₃: basic concepts. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 97 (1-2), 93-101.
 73. Boonstra, A., Barrat, F.J., Crain, C., Heath, V.L., Savelkoul, H.F., O'Garra, A. (2001) 1 α ,25-Dihydroxyvitamin d₃ has a direct effect on naive CD4(+) T cells to enhance the development of Th2 cells. *J Immunol*, 167 (9), 4974-4980.
 74. Penna, G., Adorini, L. (2000) 1 Alpha,25-dihydroxyvitamin D₃ inhibits differentiation, maturation, activation, and survival of dendritic cells leading to impaired alloreactive T cell activation. *J Immunol*, 164 (5), 2405-2411.

75. Daniel, C., Sartory, N.A., Zahn, N., Radeke, H.H., Stein, J.M. (2008) Immune modulatory treatment of trinitrobenzene sulfonic acid colitis with calcitriol is associated with a change of a T helper (Th) 1/Th17 to a Th2 and regulatory T cell profile. *J Pharmacol Exp Ther*, 324 (1), 23-33.
76. Fritsche, J., Mondal, K., Ehrnsperger, A., Andreesen, R., Kreutz, M. (2003) Regulation of 25-hydroxyvitamin D3-1 alpha-hydroxylase and production of 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 by human dendritic cells. *Blood*, 102 (9), 3314-3316.
77. Griffin, M.D., Lutz, W.H., Phan, V.A., Bachman, L.A., McKean, D.J., Kumar, R. (2000) Potent inhibition of dendritic cell differentiation and maturation by vitamin D analogs. *Biochem Biophys Res Commun*, 270 (3), 701-708.
78. Deeb, K.K., Trump, D.L., Johnson, C.S. (2007) Vitamin D signalling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics. *Nat Rev Cancer*, 7 (9), 684-700.
79. Griffin, M.D., Lutz, W., Phan, V.A., Bachman, L.A., McKean, D.J., Kumar, R. (2001) Dendritic cell modulation by 1alpha,25 dihydroxyvitamin D3 and its analogs: a vitamin D receptor-dependent pathway that promotes a persistent state of immaturity in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98 (12), 6800-6805.
80. Hardin, J.A. (2005) Dendritic cells: potential triggers of autoimmunity and targets for therapy. *Ann Rheum Dis*, 64 Suppl 4, iv86-90.
81. Hewison Research Lab. (t.y.) Erişim: 15 Mayıs 2014, <http://ortho.ucla.edu/body.cfm?id=208>.
82. Bolland, M.J., Grey, A.B., Ames, R.W., Mason, B.H., Horne, A.M., Gamble, G.D., Reid, I.R. (2007) The effects of seasonal variation of 25-hydroxyvitamin D and fat mass on a diagnosis of vitamin D sufficiency. *Am J Clin Nutr*, 86 (4), 959-964.
83. Hassan, I.B., Islam, S.I., Alizadeh, H., Kristensen, J., Kambal, A., Sondag, S., Bernseen, R.M. (2009) Acute leukemia among the adult

population of United Arab Emirates: an epidemiological study. *Leuk Lymphoma*, 50 (7), 1138-1147.

84. Lee, H.J., Muindi, J.R., Tan, W., Hu, Q., Wang, D., Liu, S., Wilding, G.E., Ford, L.A., Sait, S.N., Block, A.W., Adjei, A.A., Barcos, M., Griffiths, E.A., Thompson, J.E., Wang, E.S., Johnson, C.S., Trump, D.L., Wetzler, M. (2014) Low 25(OH) vitamin D3 levels are associated with adverse outcome in newly diagnosed, intensively treated adult acute myeloid leukemia. *Cancer*, 120 (4), 521-529.
85. Srivastava, M.D., Ambrus, J.L. (2004) Effect of 1,25(OH)₂ Vitamin D3 analogs on differentiation induction and cytokine modulation in blasts from acute myeloid leukemia patients. *Leuk Lymphoma*, 45 (10), 2119-2126.
86. Ketley, N.J., Allen, P.D., Kelsey, S.M., Newland, A.C. (1997) Modulation of idarubicin-induced apoptosis in human acute myeloid leukemia blasts by all-trans retinoic acid, 1,25(OH)₂ vitamin D3, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood*, 90 (11), 4578-4587.
87. Gocek, E., Kielbinski, M., Bauriska, H., Haus, O., Kutner, A., Marcinkowska, E. (2010) Different susceptibilities to 1,25-dihydroxyvitamin D3-induced differentiation of AML cells carrying various mutations. *Leuk Res*, 34 (5), 649-657.
88. Puccetti, E., Obradovic, D., Beissert, T., Bianchini, A., Washburn, B., Chiaradonna, F., Boehrer, S., Hoelzer, D., Ottmann, O.G., Pelicci, P.G., Nervi, C., Ruthardt, M. (2002) AML-associated translocation products block vitamin D(3)-induced differentiation by sequestering the vitamin D(3) receptor. *Cancer Res*, 62 (23), 7050-7058.
89. Miyaura, C., Abe, E., Kuribayashi, T., Tanaka, H., Konno, K., Nishii, Y., Suda, T. (1981) 1 alpha,25-Dihydroxyvitamin D3 induces differentiation of human myeloid leukemia cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 102 (3), 937-943.

90. Lee, Y.Y., Kim, E.S., Seol, J.G., Kim, B.K., Binderup, L., Elstner, E., Park, D.J., Koeffler, H.P. (1996) Effect of a vitamin D3 analog, EB1089, on hematopoietic stem cells from normal and myeloid leukemic blasts. *Leukemia*, 10 (11), 1751-1757.
91. Chen, W.J., Huang, Y.T., Wu, M.L., Huang, T.C., Ho, C.T., Pan, M.H. (2008) Induction of apoptosis by vitamin D2, ergocalciferol, via reactive oxygen species generation, glutathione depletion, and caspase activation in human leukemia Cells. *J Agric Food Chem*, 56 (9), 2996-3005.
92. Tagliafico, E., Tenedini, E., Bergamaschi, A., Manfredini, R., Percudani, R., Siena, M., Zanocco-Marani, T., Grande, A., Montanari, M., Gemelli, C., Torelli, U., Ferrari, S. (2002) Gene expression profile of Vitamin D3 treated HL60 cells shows an incomplete molecular phenotypic conversion to monocytes. *Cell Death Differ*, 9 (11), 1185-1195.
93. Trayner, I.D., Bustorff, T., Etches, A.E., Mufti, G.J., Foss, Y., Farzaneh, F. (1998) Changes in antigen expression on differentiating HL60 cells treated with dimethylsulphoxide, all-trans retinoic acid, alpha1,25-dihydroxyvitamin D3 or 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate. *Leuk Res*, 22 (6), 537-547.
94. Brackman, D., Lund-Johansen, F., Aarskog, D. (1995) Expression of leukocyte differentiation antigens during the differentiation of HL-60 cells induced by 1,25-dihydroxyvitamin D3: comparison with the maturation of normal monocytic and granulocytic bone marrow cells. *J Leukoc Biol*, 58 (5), 547-555.
95. Liu, Y., Wang, Y., Yamakuchi, M., Isowaki, S., Nagata, E., Kanmura, Y., Kitajima, I., Maruyama, I. (2001) Upregulation of toll-like receptor 2 gene expression in macrophage response to peptidoglycan and high concentration of lipopolysaccharide is involved in NF-kappa b activation. *Infect Immun*, 69 (5), 2788-2796.
96. Mangelsdorf, D.J., Koeffler, H.P., Donaldson, C.A., Pike, J.W., Haussler, M.R. (1984) 1,25-Dihydroxyvitamin D3-induced differentiation in a

- human promyelocytic leukemia cell line (HL-60): receptor-mediated maturation to macrophage-like cells. *J Cell Biol*, 98 (2), 391-398.
97. Samuelson, D.J., Powell, M.B., Lloria-Prevatt, M., Romagnolo, D.F. (2001) Transcriptional activation of the gp91phox NADPH oxidase subunit by TPA in HL-60 cells. *J Leukoc Biol*, 69 (1), 161-168.
 98. Kawase, T., Orikasa, M., Oguro, A., Burns, D.M. (1998) Up-regulation of inducible nitric oxide (NO) synthase and NO production in HL-60 cells stimulated to differentiate by phorbol 12-myristate 13-acetate plus 1,25-dihydroxyvitamin D3 is not obtained with dimethylsulfoxide plus 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Calcif Tissue Int*, 63 (1), 27-35.
 99. Olson, J.A. (1994) Needs and sources of carotenoids and vitamin A. *Nutr Rev*, 52 (2 Pt 2), S67-73.
 100. Blomhoff, R., Blomhoff, H.K. (2006) Overview of retinoid metabolism and function. *J Neurobiol*, 66 (7), 606-630.
 101. Sommer, A. (1994) Vitamin A: its effect on childhood sight and life. *Nutr Rev*, 52 (2 Pt 2), S60-66.
 102. Lotan, R. (1980) Effects of vitamin A and its analogs (retinoids) on normal and neoplastic cells. *Biochim Biophys Acta*, 605 (1), 33-91.
 103. Sommer, A. (2008) Vitamin a deficiency and clinical disease: an historical overview. *J Nutr*, 138 (10), 1835-1839.
 104. Sommer, A., Tarwotjo, I., Djunaedi, E., West, K.P., Jr., Loeden, A.A., Tilden, R., Mele, L. (1986) Impact of vitamin A supplementation on childhood mortality. A randomised controlled community trial. *Lancet*, 1 (8491), 1169-1173.
 105. Blomhoff, R., Green, M.H., Berg, T., Norum, K.R. (1990) Transport and storage of vitamin A. *Science*, 250 (4979), 399-404.
 106. Lampen, A., Meyer, S., Arnhold, T., Nau, H. (2000) Metabolism of vitamin A and its active metabolite all-trans-retinoic acid in small intestinal enterocytes. *J Pharmacol Exp Ther*, 295 (3), 979-985.

107. Iwata, M. (2009) Retinoic acid production by intestinal dendritic cells and its role in T-cell trafficking. *Semin Immunol*, 21 (1), 8-13.
108. Iwata, M., Hirakiyama, A., Eshima, Y., Kagechika, H., Kato, C., Song, S.Y. (2004) Retinoic acid imprints gut-homing specificity on T cells. *Immunity*, 21 (4), 527-538.
109. Coombes, J.L., Siddiqui, K.R., Arancibia-Carcamo, C.V., Hall, J., Sun, C.M., Belkaid, Y., Powrie, F. (2007) A functionally specialized population of mucosal CD103⁺ DCs induces Foxp3⁺ regulatory T cells via a TGF- β and retinoic acid-dependent mechanism. *J Exp Med*, 204 (8), 1757-1764.
110. Chambon, P. (1996) A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J*, 10 (9), 940-954.
111. Moise, A.R., Noy, N., Palczewski, K., Blaner, W.S. (2007) Delivery of retinoid-based therapies to target tissues. *Biochemistry*, 46 (15), 4449-4458.
112. Ertesvag, A., Engedal, N., Naderi, S., Blomhoff, H.K. (2002) Retinoic acid stimulates the cell cycle machinery in normal T cells: involvement of retinoic acid receptor-mediated IL-2 secretion. *J Immunol*, 169 (10), 5555-5563.
113. Geissmann, F., Revy, P., Brousse, N., Lepelletier, Y., Folli, C., Durandy, A., Chambon, P., Dy, M. (2003) Retinoids regulate survival and antigen presentation by immature dendritic cells. *J Exp Med*, 198 (4), 623-634.
114. Lovett-Racke, A.E., Racke, M.K. (2002) Retinoic acid promotes the development of Th2-like human myelin basic protein-reactive T cells. *Cell Immunol*, 215 (1), 54-60.
115. Dawson, H.D., Collins, G., Pyle, R., Key, M., Weeraratna, A., Deep-Dixit, V., Nadal, C.N., Taub, D.D. (2006) Direct and indirect effects of retinoic acid on human Th2 cytokine and chemokine expression by human T lymphocytes. *BMC Immunol*, 7, 27.

116. Iwata, M., Eshima, Y., Kagechika, H. (2003) Retinoic acids exert direct effects on T cells to suppress Th1 development and enhance Th2 development via retinoic acid receptors. *Int Immunol*, 15 (8), 1017-1025.
117. Stock, A., Booth, S., Cerundolo, V. (2011) Prostaglandin E2 suppresses the differentiation of retinoic acid-producing dendritic cells in mice and humans. *J Exp Med*, 208 (4), 761-773.
118. Hammerschmidt, S.I., Ahrendt, M., Bode, U., Wahl, B., Kremmer, E., Forster, R., Pabst, O. (2008) Stromal mesenteric lymph node cells are essential for the generation of gut-homing T cells in vivo. *J Exp Med*, 205 (11), 2483-2490.
119. Sigmundsdottir, H., Butcher, E.C. (2008) Environmental cues, dendritic cells and the programming of tissue-selective lymphocyte trafficking. *Nat Immunol*, 9 (9), 981-987.
120. Hall, J.A., Grainger, J.R., Spencer, S.P., Belkaid, Y. (2011) The role of retinoic acid in tolerance and immunity. *Immunity*, 35 (1), 13-22.
121. Denning, T.L., Wang, Y.C., Patel, S.R., Williams, I.R., Pulendran, B. (2007) Lamina propria macrophages and dendritic cells differentially induce regulatory and interleukin 17-producing T cell responses. *Nat Immunol*, 8 (10), 1086-1094.
122. Uematsu, S., Fujimoto, K., Jang, M.H., Yang, B.G., Jung, Y.J., Nishiyama, M., Sato, S., Tsujimura, T., Yamamoto, M., Yokota, Y., Kiyono, H., Miyasaka, M., Ishii, K.J., Akira, S. (2008) Regulation of humoral and cellular gut immunity by lamina propria dendritic cells expressing Toll-like receptor 5. *Nat Immunol*, 9 (7), 769-776.
123. Sun, C.M., Hall, J.A., Blank, R.B., Bouladoux, N., Oukka, M., Mora, J.R., Belkaid, Y. (2007) Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid. *J Exp Med*, 204 (8), 1775-1785.

124. Benson, M.J., Pino-Lagos, K., Roseblatt, M., Noelle, R.J. (2007) All-trans retinoic acid mediates enhanced T reg cell growth, differentiation, and gut homing in the face of high levels of co-stimulation. *J Exp Med*, 204 (8), 1765-1774.
125. Littman, D.R., Rudensky, A.Y. (2010) Th17 and regulatory T cells in mediating and restraining inflammation. *Cell*, 140 (6), 845-858.
126. Maun, N.A., Gaines, P., Khanna-Gupta, A., Zibello, T., Enriquez, L., Goldberg, L., Berliner, N. (2004) G-CSF signaling can differentiate promyelocytes expressing a defective retinoic acid receptor: evidence for divergent pathways regulating neutrophil differentiation. *Blood*, 103 (5), 1693-1701.
127. Kuwata, T., Wang, I.M., Tamura, T., Ponnamperna, R.M., Levine, R., Holmes, K.L., Morse, H.C., De Luca, L.M., Ozato, K. (2000) Vitamin A deficiency in mice causes a systemic expansion of myeloid cells. *Blood*, 95 (11), 3349-3356.
128. Tsai, S., Bartelmez, S., Heyman, R., Damm, K., Evans, R., Collins, S.J. (1992) A mutated retinoic acid receptor-alpha exhibiting dominant-negative activity alters the lineage development of a multipotent hematopoietic cell line. *Genes Dev*, 6 (12A), 2258-2269.
129. Lefebvre, P., Thomas, G., Gourmel, B., Agadir, A., Castaigne, S., Dreux, C., Degos, L., Chomienne, C. (1991) Pharmacokinetics of oral all-trans retinoic acid in patients with acute promyelocytic leukemia. *Leukemia*, 5 (12), 1054-1058.
130. Kalin, J.R., Starling, M.E., Hill, D.L. (1981) Disposition of all-trans-retinoic acid in mice following oral doses. *Drug Metab Dispos*, 9 (3), 196-201.
131. Kraft, J.C., Slikker, W., Jr., Bailey, J.R., Roberts, L.G., Fischer, B., Wittfoht, W., Nau, H. (1991) Plasma pharmacokinetics and metabolism of 13-cis- and all-trans-retinoic acid in the cynomolgus monkey and the identification of 13-cis- and all-trans-retinoyl-beta-glucuronides. A

- comparison to one human case study with isotretinoin. *Drug Metab Dispos*, 19 (2), 317-324.
132. Wang, Z.G., Ruggero, D., Ronchetti, S., Zhong, S., Gaboli, M., Rivi, R., Pandolfi, P.P. (1998) PML is essential for multiple apoptotic pathways. *Nat Genet*, 20 (3), 266-272.
 133. Quignon, F., De Bels, F., Koken, M., Feunteun, J., Ameisen, J.C., de The, H. (1998) PML induces a novel caspase-independent death process. *Nat Genet*, 20 (3), 259-265.
 134. Lin, R.J., Egan, D.A., Evans, R.M. (1999) Molecular genetics of acute promyelocytic leukemia. *Trends Genet*, 15 (5), 179-184.
 135. Kakizuka, A., Miller, W.H., Jr., Umesono, K., Warrell, R.P., Jr., Frankel, S.R., Murty, V.V., Dmitrovsky, E., Evans, R.M. (1991) Chromosomal translocation t(15;17) in human acute promyelocytic leukemia fuses RAR alpha with a novel putative transcription factor, PML. *Cell*, 66 (4), 663-674.
 136. Wells, R.A., Catzavelos, C., Kamel-Reid, S. (1997) Fusion of retinoic acid receptor alpha to NuMA, the nuclear mitotic apparatus protein, by a variant translocation in acute promyelocytic leukaemia. *Nat Genet*, 17 (1), 109-113.
 137. Slack, J.L., Gallagher, R.E. (1999) The molecular biology of acute promyelocytic leukemia. *Cancer Treat Res*, 99, 75-124.
 138. Melnick, A., Licht, J.D. (1999) Deconstructing a disease: RARalpha, its fusion partners, and their roles in the pathogenesis of acute promyelocytic leukemia. *Blood*, 93 (10), 3167-3215.
 139. Slack, J.L. (1999) Biology and treatment of acute progranulocytic leukemia. *Curr Opin Hematol*, 6 (4), 236-240.
 140. Casini, T., Pelicci, P.G. (1999) A function of p21 during promyelocytic leukemia cell differentiation independent of CDK inhibition and cell cycle arrest. *Oncogene*, 18 (21), 3235-3243.

141. Morosetti, R., Park, D.J., Chumakov, A.M., Grillier, I., Shiohara, M., Gombart, A.F., Nakamaki, T., Weinberg, K., Koeffler, H.P. (1997) A novel, myeloid transcription factor, C/EBP epsilon, is upregulated during granulocytic, but not monocytic, differentiation. *Blood*, 90 (7), 2591-2600.
142. Pelicano, L., Li, F., Schindler, C., Chelbi-Alix, M.K. (1997) Retinoic acid enhances the expression of interferon-induced proteins: evidence for multiple mechanisms of action. *Oncogene*, 15 (19), 2349-2359.
143. Fanelli, M., Minucci, S., Gelmetti, V., Nervi, C., Gambacorti-Passerini, C., Pelicci, P.G. (1999) Constitutive degradation of PML/RARalpha through the proteasome pathway mediates retinoic acid resistance. *Blood*, 93 (5), 1477-1481.
144. Falanga, A., Consonni, R., Marchetti, M., Locatelli, G., Garattini, E., Passerini, C.G., Gordon, S.G., Barbui, T. (1998) Cancer procoagulant and tissue factor are differently modulated by all-trans-retinoic acid in acute promyelocytic leukemia cells. *Blood*, 92 (1), 143-151.
145. Fenaux, P., Chomienne, C., Degos, L. (2001) All-trans retinoic acid and chemotherapy in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Semin Hematol*, 38 (1), 13-25.
146. Sonneveld, E., van der Saag, P.T. (1998) Metabolism of retinoic acid: implications for development and cancer. *Int J Vitam Nutr Res*, 68 (6), 404-410.
147. Benedetti, L., Grignani, F., Scicchitano, B.M., Jetten, A.M., Diverio, D., Lo Coco, F., Avvisati, G., Gambacorti-Passerini, C., Adamo, S., Levin, A.A., Pelicci, P.G., Nervi, C. (1996) Retinoid-induced differentiation of acute promyelocytic leukemia involves PML-RARalpha-mediated increase of type II transglutaminase. *Blood*, 87 (5), 1939-1950.
148. Grignani, F., De Matteis, S., Nervi, C., Tomassoni, L., Gelmetti, V., Cioce, M., Fanelli, M., Ruthardt, M., Ferrara, F.F., Zamir, I., Seiser, C., Grignani, F., Lazar, M.A., Minucci, S., Pelicci, P.G. (1998) Fusion

proteins of the retinoic acid receptor- α recruit histone deacetylase in promyelocytic leukaemia. *Nature*, 391 (6669), 815-818.

149. Mehta, K., McQueen, T., Neamati, N., Collins, S., Andreeff, M. (1996) Activation of retinoid receptors RAR α and RXR α induces differentiation and apoptosis, respectively, in HL-60 cells. *Cell Growth Differ*, 7 (2), 179-186.
150. Collins, S.J., Robertson, K.A., Mueller, L. (1990) Retinoic acid-induced granulocytic differentiation of HL-60 myeloid leukemia cells is mediated directly through the retinoic acid receptor (RAR- α). *Mol Cell Biol*, 10 (5), 2154-2163.
151. Ozpolat, B., Mehta, K., Tari, A.M., Lopez-Berestein, G. (2002) all-trans-Retinoic acid-induced expression and regulation of retinoic acid 4-hydroxylase (CYP26) in human promyelocytic leukemia. *Am J Hematol*, 70 (1), 39-47.
152. Kizaki, M., Ueno, H., Yamazoe, Y., Shimada, M., Takayama, N., Muto, A., Matsushita, H., Nakajima, H., Morikawa, M., Koeffler, H.P., Ikeda, Y. (1996) Mechanisms of retinoid resistance in leukemic cells: possible role of cytochrome P450 and P-glycoprotein. *Blood*, 87 (2), 725-733.
153. Nagy, L., Thomazy, V.A., Shipley, G.L., Fesus, L., Lamph, W., Heyman, R.A., Chandraratna, R.A., Davies, P.J. (1995) Activation of retinoid X receptors induces apoptosis in HL-60 cell lines. *Mol Cell Biol*, 15 (7), 3540-3551.
154. Bertagnolo, V., Marchisio, M., Volinia, S., Caramelli, E., Capitani, S. (1998) Nuclear association of tyrosine-phosphorylated Vav to phospholipase C- γ 1 and phosphoinositide 3-kinase during granulocytic differentiation of HL-60 cells. *FEBS Lett*, 441 (3), 480-484.
155. Lee, K.H., Chang, M.Y., Ahn, J.I., Yu, D.H., Jung, S.S., Choi, J.H., Noh, Y.H., Lee, Y.S., Ahn, M.J. (2002) Differential gene expression in retinoic acid-induced differentiation of acute promyelocytic leukemia cells, NB4 and HL-60 cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 296 (5), 1125-1133.

156. Pae, H.O., Seo, W.G., Kim, N.Y., Oh, G.S., Kim, G.E., Kim, Y.H., Kwak, H.J., Yun, Y.G., Jun, C.D., Chung, H.T. (2001) Induction of granulocytic differentiation in acute promyelocytic leukemia cells (HL-60) by water-soluble chitosan oligomer. *Leuk Res*, 25 (4), 339-346.
157. Akagi, T. (2010) Label-free monitoring of the neutrophil differentiation progress of HL-60 cells using microcapillary electrophoresis chips. *International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences*, 14.
158. Barber, N., Belov, L., Christopherson, R.I. (2008) All-trans retinoic acid induces different immunophenotypic changes on human HL60 and NB4 myeloid leukaemias. *Leuk Res*, 32 (2), 315-322.
159. Esendagli, G., Canpinar, H., Yilmaz, G., Kaymaz, F.F., Kansu, E., Guc, D. (2009) Fibronectin promotes the phorbol 12-myristate 13-acetate-induced macrophage differentiation in myeloid leukemia cells. *Int J Hematol*, 89 (2), 167-172.
160. Shin, H.H., Seoh, J.Y., Chung, H.Y., Choi, S.J., Hahn, M.J., Kang, J.S., Choi, M.S., Han, T.H. (1999) Requirement of MEF2D in the induced differentiation of HL60 promyeloid cells. *Mol Immunol*, 36 (18), 1209-1214.
161. Soucek, K., Pachernik, J., Kubala, L., Vondracek, J., Hofmanova, J., Kozubik, A. (2006) Transforming growth factor-beta1 inhibits all-trans retinoic acid-induced apoptosis. *Leuk Res*, 30 (5), 607-623.
162. Van Merrijs, V., Meyer, E., Dosogne, H., Burvenich, C. (2001) Separation of bovine bone marrow into maturation-related myeloid cell fractions. *Vet Immunol Immunopathol*, 83 (1-2), 11-17.
163. Tsujimura, H., Nagamura-Inoue, T., Tamura, T., Ozato, K. (2002) IFN consensus sequence binding protein/IFN regulatory factor-8 guides bone marrow progenitor cells toward the macrophage lineage. *J Immunol*, 169 (3), 1261-1269.

164. Oliveira, M.A., Lima, G.M., Shio, M.T., Leenen, P.J., Abrahamsohn, I.A. (2003) Immature macrophages derived from mouse bone marrow produce large amounts of IL-12p40 after LPS stimulation. *J Leukoc Biol*, 74 (5), 857-867.
165. Cassatella, M.A., Trinchieri, G., Hassan, N.F., Hartman, L., Sorio, C., Berton, G. (1992) Induction of differentiation of the human myeloid cell line, ML3, by tumour necrosis factor and interferon-gamma is accompanied by enhanced expression of the CD4 protein and messenger RNA. *Immunology*, 76 (1), 55-59.
166. Yamamoto, K., Quelle, F.W., Thierfelder, W.E., Kreider, B.L., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Silvennoinen, O., Ihle, J.N. (1994) Stat4, a novel gamma interferon activation site-binding protein expressed in early myeloid differentiation. *Mol Cell Biol*, 14 (7), 4342-4349.
167. Arocena, A.R., Onofrio, L.I., Pellegrini, A.V., Carrera Silva, A.E., Paroli, A., Cano, R.C., Aoki, M.P., Gea, S. (2014) Myeloid-derived suppressor cells are key players in the resolution of inflammation during a model of acute infection. *Eur J Immunol*, 44 (1), 184-194.
168. Domen, J. (2001) The role of apoptosis in regulating hematopoietic stem cell numbers. *Apoptosis*, 6 (4), 239-252.
169. Fialkow, P.J., Singer, J.W., Adamson, J.W., Vaidya, K., Dow, L.W., Ochs, J., Moohr, J.W. (1981) Acute nonlymphocytic leukemia: heterogeneity of stem cell origin. *Blood*, 57 (6), 1068-1073.
170. Teague, R.M., Kline, J. (2013) Immune evasion in acute myeloid leukemia: current concepts and future directions. *J Immunother Cancer*, 1 (13).
171. Gallagher, R.E., et al., . (1979) characterization of continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia. *Blood* 54 (3).

172. Dalton W.T., e.a. (1988) HL-60 cell line was derived from a patient with FAB-M2 and not FAB-M3. *Blood* 71 (1), 242-247.
173. Dolen, Y., Esendagli, G. (2013) Myeloid leukemia cells with a B7-2(+) subpopulation provoke Th-cell responses and become immuno-suppressive through the modulation of B7 ligands. *Eur J Immunol*, 43 (3), 747-757.
174. Collins, J.M., Foster, K.A. (1983) Differentiation of promyelocytic (HL-60) cells into mature granulocytes: mitochondrial-specific rhodamine 123 fluorescence. *J Cell Biol*, 96 (1), 94-99.
175. Zamani, F., Zare Shahneh, F., Aghebati-Maleki, L., Baradaran, B. (2013) Induction of CD14 Expression and Differentiation to Monocytes or Mature Macrophages in Promyelocytic Cell Lines: New Approach. *Adv Pharm Bull*, 3 (2), 329-332.
176. Ishihara, K., Hong, J., Zee, O., Ohuchi, K. (2005) Mechanism of the eosinophilic differentiation of HL-60 clone 15 cells induced by n-butyrate. *Int Arch Allergy Immunol*, 137 Suppl 1, 77-82.
177. Fischkoff, S.A., Pollak, A., Gleich, G.J., Testa, J.R., Misawa, S., Reber, T.J. (1984) Eosinophilic differentiation of the human promyelocytic leukemia cell line, HL-60. *J Exp Med*, 160 (1), 179-196.
178. Ostrand-Rosenberg, S., Sinha, P. (2009) Myeloid-derived suppressor cells: linking inflammation and cancer. *J Immunol*, 182 (8), 4499-4506.
179. Goedegebuure, P., Mitchem, J.B., Porembka, M.R., Tan, M.C., Belt, B.A., Wang-Gillam, A., Gillanders, W.E., Hawkins, W.G., Linehan, D.C. (2011) Myeloid-derived suppressor cells: general characteristics and relevance to clinical management of pancreatic cancer. *Curr Cancer Drug Targets*, 11 (6), 734-751.
180. Gabrilovich, D.I., Nagaraj, S. (2009) Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol*, 9 (3), 162-174.

181. Solito, S., Bronte, V., Mandruzzato, S. (2011) Antigen specificity of immune suppression by myeloid-derived suppressor cells. *J Leukoc Biol*, 90 (1), 31-36.
182. Miner, S., et al., . (2013) Myeloid Leukemias Directly Suppress T Cell Proliferation Through STAT3 and Arginase Pathways. *blood* 122 (21).
183. Barber, N., Gez, S., Belov, L., Mulligan, S.P., Woolfson, A., Christopherson, R.I. (2009) Profiling CD antigens on leukaemias with an antibody microarray. *FEBS Lett*, 583 (11), 1785-1791.
184. Fleck, R.A., Romero-Steiner, S., Nahm, M.H. (2005) Use of HL-60 cell line to measure opsonic capacity of pneumococcal antibodies. *Clin Diagn Lab Immunol*, 12 (1), 19-27.
185. Tamura, H., Dan, K., Tamada, K., Nakamura, K., Shioi, Y., Hyodo, H., Wang, S.D., Dong, H., Chen, L., Ogata, K. (2005) Expression of functional B7-H2 and B7.2 costimulatory molecules and their prognostic implications in de novo acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res*, 11 (16), 5708-5717.
186. Chen, L., Flies, D.B. (2013) Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat Rev Immunol*, 13 (4), 227-242.
187. Boursalian, T.E., McEarchern, J.A., Law, C.L., Grewal, I.S. (2009) Targeting CD70 for human therapeutic use. *Adv Exp Med Biol*, 647, 108-119.
188. Skubitz, K.M., et al.,. (1996) CD66a, CD66b, CD66c, and CD66d each independently stimulate neutrophils. *J Leukoc Biol.*, 60, 106–117.
189. Ozeki, M., Shively, J.E. (2008) Differential cell fates induced by all-trans retinoic acid-treated HL-60 human leukemia cells. *J Leukoc Biol*, 84 (3), 769-779.
190. West, S.D., Goldberg, D., Ziegler, A., Krencicki, M., Du Clos, T.W., Mold, C. (2012) Transforming growth factor-beta, macrophage colony-stimulating factor and C-reactive protein levels correlate with

CD14(high)CD16+ monocyte induction and activation in trauma patients. *PLoS One*, 7 (12), e52406.

191. Rezzonico, R., Chicheportiche, R., Imbert, V., Dayer, J.M. (2000) Engagement of CD11b and CD11c beta2 integrin by antibodies or soluble CD23 induces IL-1beta production on primary human monocytes through mitogen-activated protein kinase-dependent pathways. *Blood*, 95 (12), 3868-3877.
192. Hamilton, M.J., Bosiljcic, M., Lepard, N.E., Halvorsen, E.C., Ho, V.W., Banath, J.P., Krystal, G., Bennewith, K.L. (2014) Macrophages are more potent immune suppressors ex vivo than immature myeloid-derived suppressor cells induced by metastatic murine mammary carcinomas. *J Immunol*, 192 (1), 512-522.
193. Dadfar, E., Lundahl, J., Fernvik, E., Nopp, A., Hylander, B., Jacobson, S.H. (2004) Leukocyte CD11b and CD62l expression in response to interstitial inflammation in CAPD patients. *Perit Dial Int*, 24 (1), 28-36.
194. Graf, M., Reif, S., Hecht, K., Pelka-Fleischer, R., Pfister, K., Nuessler, V., Schmetzer, H. (2003) Low L-selectin (CD62L) expression in acute myeloid leukemia correlates with a bad cytogenetic risk. *Eur J Haematol*, 71 (5), 366-376.
195. Godowski, P.J. (2005) A smooth operator for LPS responses. *Nat Immunol*, 6 (6), 544-546.
196. Ball, E.D., Guyre, P.M., Shen, L., Glynn, J.M., Maliszewski, C.R., Baker, P.E., Fanger, M.W. (1984) Gamma interferon induces monocytoid differentiation in the HL-60 cell line. *J Clin Invest*, 73 (4), 1072-1077.
197. Schroder, K., Sweet, M.J., Hume, D.A. (2006) Signal integration between IFNgamma and TLR signalling pathways in macrophages. *Immunobiology*, 211 (6-8), 511-524.
198. Meunier, E., Dick, M.S., Dreier, R.F., Schurmann, N., Kenzelmann Broz, D., Warming, S., Roose-Girma, M., Bumann, D., Kayagaki, N., Takeda, K., Yamamoto, M., Broz, P. (2014) Caspase-11 activation

requires lysis of pathogen-containing vacuoles by IFN-induced GTPases. *Nature*, 509 (7500), 366-370.

199. Mita, Y., Dobashi, K., Nakazawa, T., Mori, M. (2001) Induction of Toll-like receptor 4 in granulocytic and monocytic cells differentiated from HL-60 cells. *Br J Haematol*, 112 (4), 1041-1047.
200. Berthon, C., Driss, V., Liu, J., Kuranda, K., Leleu, X., Jouy, N., Hetuin, D., Quesnel, B. (2010) In acute myeloid leukemia, B7-H1 (PD-L1) protection of blasts from cytotoxic T cells is induced by TLR ligands and interferon-gamma and can be reversed using MEK inhibitors. *Cancer Immunol Immunother*, 59 (12), 1839-1849.
201. Dziarski, R., Gupta, D. (2000) Role of MD-2 in TLR2- and TLR4-mediated recognition of Gram-negative and Gram-positive bacteria and activation of chemokine genes. *J Endotoxin Res*, 6 (5), 401-405.
202. Afreen, S., Dermime, S. (2014) The immunoinhibitory B7-H1 molecule as a potential target in cancer: killing many birds with one stone. *Hematol Oncol Stem Cell Ther*, 7 (1), 1-17.
203. Yao, S., Chen, L. (2013) Adaptive resistance: a tumor strategy to evade immune attack. *Eur J Immunol*, 43 (3), 576-579.

EKLER

Ek 1. Etik Kurul İzni



T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı : 16969557 - 2 35

10 Mart 2014

ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU

Toplantı Tarihi : 05.03.2014 ÇARŞAMBA
Toplantı No : 2014/04
Proje No : GO 14/ 120 (Değerlendirme Tarihi 05.03.2014)
Karar No : GO 14/ 120- 19

Üniversitemiz Kanser Enstitüsü öğretim üyelerinden Doç.Dr.Güneş ESENDAĞLI'nın sorumlu araştırmacı olduğu Biol.Diğdem Yöyen ERMİŞ'in tezi olan GO 14/120 kayıt numaralı ve "All-Trans Retinoik Asit (ATRA) ve 1a,25-Dihidroksivitamin D3 (vitamin D3) ile Uyarılan Akut Miyeloid Lösemi Hücrelerinin T Hücre Yanıtları Üzerine Etkisi" başlıklı proje önerisi araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş olup, etik açıdan uygun bulunmuştur.

1.Prof. Dr. Nurten Akarsu	(Başkan)	9 Prof. Dr. Melahat Görduysus	(Üye)
GÖREVLİ		GÖREVLİ	
2. Prof. Dr. Nüket Örnek Buken	(Üye)	10. Prof. Dr. Cansın Saçkesen	(Üye)
3. Prof. Dr. M. Yıldırım Sara	(Üye)	11. Prof. Dr. R. Köksal Özgül	(Üye)
GÖREVLİ		12. Prof. Dr. Ayşe Lale Doğan	(Üye)
4. Prof. Dr. Sevdâ F. Müftüoğlu	(Üye)	13 Doç. Dr. S. Kutay Demirkan	(Üye)
5. Prof. Dr. Cenk Sökmenşier	(Üye)	GÖREVLİ	
6. Prof. Dr. Volga Bayrakçı Tunay	(Üye)	14. Prof. Dr. Leyla Dinç	(Üye)
7. Prof. Dr. Songül Vaizoglu	(Üye)	15. Yrd. Doç. Dr. H. Hüsrev Turnagöl	(Üye)
8. Prof. Dr. Yılmaz Selim Erdal	(Üye)	RAPORLU	
		16. Av. Meltem Onurlu	(Üye)