

**MULTİPL MYELOMALI HASTALARDA LENFOSİT VE  
ALT GRUPLARININ İMMÜNFENOTİPİK ANALİZLERİ**

**Ramadan Bilgin AKALIN  
1168209102**

**TÜMÖR BİYOLOJİSİ VE İMMÜNOLOJİSİ ANABİLİMDALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN  
DOÇ. DR. Mustafa ORAN**

**Tez No:2019/74**

**2019-TEKİRDAĞ**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ**  
**TEKİRDAĞ NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**MULTİPL MYELOMALI HASTALARDA LENFOSİT VE ALT**  
**GRUPLARININ İMMÜNFENOTİPİK ANALİZLERİ**

**Ramadan Bilgin AKALIN**  
**1168209102**

**TÜMÖR BİYOLOJİSİ VE İMMÜNOLOJİSİ ANABİLİM DALI**  
**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN**  
**Doç. Dr. Mustafa ORAN**

**Tez No: 2019/74**  
**2019-TEKİRDAĞ**

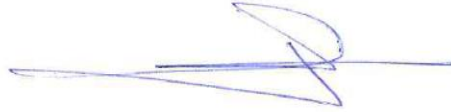
**KABUL VE ONAY**

Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde Doç. Dr. Mustafa ORAN danışmanlığında yürütülmüş bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi

18/06/2019



Prof. Dr. Burhan TURGUT

Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi

Jüri Başkanı

Doç. Dr. Mustafa ORAN

Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi

Üye

Dr. Öğr. Üyesi Elif Gülsüm ÜMİT

Trakya Üniversitesi

Üye

Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Ramadan Bilgin AKALIN'ın "Multipl Myelomalı Hastalarda Lenfosit ve Alt Gruplarının İmmünfenotipik Analizleri" başlıklı tezi 18/06/2019 günü saat 10.00'da Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Nilda TURGUT

Enstitü Müdürü

## TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim süresince her zaman yanımda olan, desteğini esirgemeyen, güvendiğim, danıştığım, akademik duruşu ve karakteri açısından örnek olarak aldığım, tez çalışmamın gerçekleşmesinde bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren, danışman hocam Sayın Doç. Dr. Mustafa ORAN'a,

Yüksek lisans tezimi gerçekleştirmemde bilimsel ve klinik olarak bana destek veren, Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Burhan TURGUT'a

Tez çalışmama ait verilerin analizinde emeği geçen, değerli hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Birol TOPÇU'ya

Tez çalışmam süresince bana her konuda destek olan değerli arkadaşım Öğr. Gör. Demet TERZİ'ye

Çalışmanın çeşitli analizlerini yapmamda destek ve yardımcı olan Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi personeli Sayın Sinem BULUŞ'a

Bütün bu yorucu ve güçlüklerle dolu lisansüstü eğitimimde beni daima destekleyen, manevi olarak bana güç veren, başta annem olmak üzere tüm aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

## ÖZET

**Akahn, R.B. Multipl Myelomalı Hastalarda Lenfosit ve Alt Gruplarının İmmünofenotipik Analizleri, Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Tekirdağ, 2019.** Multipl miyelom (MM), kemik iliğinde malign plazma hücrelerinin büyümesiyle karakterize hematolojik bir malignitedir. Tüm malignitelerin %1'ini, hematolojik malignitelerin %15'ini oluşturur. MM'un nedeni tam olarak bilinmemekle birlikte, kemik iliğinde klonal proliferasyona uğrayan plazma hücreleri tarafından salgılanan paraproteinler aracılığı ile oluşan fonksiyon bozukluğunun neden olduğu immün yetmezliğe bağlı semptomlarla karakterize neoplastik bir hastalıktır. Son yıllarda MM'nin biyolojisinin daha iyi anlaşılmasına başlanmasıyla hastalığın patogenezinde önemli bir rol oynayan kemik iliği mikroçevresini ve myelom hücrelerini hedefleyen talidomid, lenalidomid ve bortezomib gibi güncel tedavilerin geliştirilmesinin önü açılmıştır. Bu çalışmamızda MM hastalarında daha çok kullanılan immünomodülatör ajanlardan (IMA) Lenalidomid'in, kan T lenfosit alt grupları (CD4+ ve CD8+), doğal öldürücü hücre (NK) ve doğal öldürücü T hücre (NKT) üzerindeki etkilerini akım sitometrisiyle değerlendirmeyi amaçladık. Çalışmaya 64 hasta katıldı. Hastaların ortanca yaşı 64 yıl (33-79) olup erkeklerin oranı (%59) kadınlardan (%41) bir miktar daha yüksekti. 34 (%53) lenalidomid tedavisi alan 30 (%47) lenalidomid tedavisi almayan MM hastasının periferik kan örnekleri toplandı. Anti-CD3, CD4, CD8 ve CD56 monoklonal antikorları kullanılarak T lenfosit alt grupları, Doğal öldürücü hücre (NK) ve Doğal öldürücü T hücre (NKT) sayıları saptandı. Çalışma neticesinde lenalidomid tedavisi alan hasta grubunda lenalidomid tedavisi almayanlara göre, total lenfosit sayısı ve CD8+ T hücrelerin sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edildi. CD4+ T hücre, NK ve NKT hücre sayılarında ise istatistiksel olarak anlamlı bir değişim saptanmadı. Sonuç olarak MM hastalarında Lenalidomid'in etkilerinin literatür ile benzer olduğu tespit edilmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Multipl myeloma, Lenalidomid, Akım sitometri

## ABSTRACT

**Akalm, R.B. Immunophenotypic Analysis of Lymphocytes and Subgroups in Patients With Multiple Myeloma, Tekirdag Namık Kemal University, Institute of Health Sciences, Department of Tumor Biology and Immunology Master Thesis, Tekirdag, 2019.** Multiple myeloma (MM) is a hematologic malignancy characterized by the growth of malignant plasma cells in the bone marrow. It constitutes 1% of all malignancies and 15% of hematological malignancies. Although the cause of MM is not known exactly, it is a neoplastic disease characterized by symptoms of immune deficiency caused by dysfunctional paraproteins secreted by clonal proliferating plasma cells in the bone marrow. A better understanding of the biology of MM has led to the development of current therapies such as thalidomide, lenalidomide and bortezomib targeting the bone marrow microenvironment and myeloma cells, which play an important role in the pathogenesis of the disease. In this study, we aimed to evaluate the effects of Lenalidomide, an immunomodulatory agent (IMA) used in MM patients, on blood T lymphocyte subgroups (CD4+ and CD8+), natural killer cell (NK) and natural killer T cell (NKT) by flow cytometry. 64 patients participated in the study. The median age of the patients was 64 years (33-79) and the proportion of men (59%) was slightly higher than women (41%). Peripheral blood samples of 34 MM patients (34%) who received lenalidomide treatment and 30 (47%) patients who did not receive lenalidomide treatment were collected. Anti-CD3, CD4, CD8 and CD56 monoclonal antibodies were used to detect T lymphocyte subgroups, Natural killer cell (NK) and Natural killer T cell (NKT) counts. As a result of the study, there was a statistically significant increase in total lymphocyte count and CD8 + T cells count in the patient group receiving lenalidomide treatment compared to those without lenalidomide treatment. There were no statistically significant changes in CD4+ T cells, NK and NKT cells. As a result, the effects of lenalidomide in MM patients were found to be similar to the literature.

**Key words:** Multiple Myeloma, Lenalidomide, Flow cytometry

## İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY .....	iv
TEŞEKKÜR.....	iv
ÖZET.....	vi
ABSTRACT.....	vii
İÇİNDEKİLER .....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	ix
ŞEKİLLER.....	xi
TABLolar .....	xii
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	3
2.1. Multipl Myeloma .....	3
2.1.1. Epidemiyoloji.....	3
2.1.2. Etiyoloji.....	4
2.1.3. Patogenez ve Patofizyoloji.....	5
2.1.4. Klinik .....	7
2.1.5. Multipl myeloma ve immün sistem ilişkisi.....	9
2.2. Lenalidomid Nedir? .....	14
2.2.1. Lenalidomid'in etki mekanizması.....	14
3. GEREÇ VE YÖNTEM .....	17
3.1. Örneklerin Hazırlanması .....	17
3.1.1. Örnek hazırlama protokolü .....	18
3.2. Verilerin Analizi.....	19
3.3. İstatiksel Analiz.....	20
4. BULGULAR.....	21
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	26
KAYNAKLAR .....	30
EKLER .....	37

## SİMGELER VE KISALTMALAR

<b>ADCC</b>	: Antikora bağı hücrel sitotoksisite
<b>BMSC</b>	: Kemik iliği stromal hücreleri
<b>CCL</b>	: Kemokin ligand
<b>CD</b>	: Cluster of differentiation
<b>C-MYC</b>	: Protoonkogen protein
<b>Dex</b>	: Dexametazon
<b>DNAM1</b>	: DNAX aksesuar molekülü 1
<b>ECM</b>	: Ekstraselüler matriks
<b>FGF</b>	: Fibroblast büyüme faktörü
<b>HLA</b>	: İnsan lökosit antijeni
<b>ICAM</b>	: İntraselüler adezyon molekülü
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	: İnterferon gama
<b>IKZF1</b>	: İkaros ailesi çinko parmak 1 proteini
<b>IL</b>	: İnterlökin
<b>IRF4</b>	: İnterferon düzenleyici faktör 4
<b>İMA</b>	: İmmünomodülatör Ajan
<b>LEN</b>	: Lenalidomid
<b>LFA</b>	: Lökosit ile ilişkili antijen
<b>MFC</b>	: Multiparametre Akım Sitometrisi
<b>MGUS</b>	: Önemi belirsiz monoklonal gammopati
<b>MIP-1<math>\alpha</math></b>	: Makrofaj inflamatuvar protein-1 alfa
<b>MKSH</b>	: Myeloid kökenli supresör hücre
<b>MM</b>	: Multipl Myeloma
<b>MMP</b>	: Matriks metalloproteinaz
<b>NKG2D</b>	: Natural Killer Group 2D
<b>NKp30</b>	: Natural Killer p30 proteini
<b>NK</b>	: Doğal Katil Hücre
<b>NKT</b>	: Doğal Katil T Hücre
<b>OC</b>	: Osteoklast
<b>PC</b>	: Plazma hücresi



<b>sIL-R</b>	: Çözünebilir interlökin reseptörü
<b>Thal</b>	: Talidomid
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	: Tümör Nekroz Faktör alfa
<b>UV</b>	: Ultra Viyole
<b>VCAM</b>	: Vasküler hücresel adezyon molekülü
<b>VEGF</b>	: Vasküler endotelyal büyüme faktörü
<b>VLA</b>	: Very late antijen

## ŞEKİLLER

Şekil 2. 1 Kemik iliği mikroçevresinin multipl myelomanın patogenezindeki rolü ....	7
Şekil 2. 2 MM'da klinik bulgular.....	8
Şekil 2. 3 Tümör hücreleri ve konukçu immün sistem arasındaki etkileşim. ....	11
Şekil 2. 4 Lenalidomid'in immünmodülatör ve tümörosidal etkileri.....	15
Şekil 2. 5 Lenalidomid'in apoptotik mekanizması .....	16
Şekil 3. 1 Boya ile konjuge monoklonal antikorlar.....	18
Şekil 3. 2 Akım sitometri cihazı (Beckman Coulter Navios, USA).....	19
Şekil 3. 3 İleriye saçılım (FS) ve yana saçılım (SS) ölçümleri. ....	20
Şekil 4. 1 Lenalidomid alan ve almayan gruplarda total lenfosit değeri ve CD3+ CD8+ lenfositlerin karşılaştırılması. ....	23

**TABLÖLAR**

Tablo 3. 1 Çalışmada kullanılan araç ve gereçler .....	17
Tablo 4. 1 Lenalidomid alan ve almayan grupların demografik verileri .....	21
Tablo 4. 2 Lenalidomid alan ve almayan gruplardaki total lenfosit ve alt gruplarına ait bulguların istatistiksel karşılaştırılması.....	22
Tablo 4. 3 Lenalidomid tedavisi alanların cinsiyetlerine göre karşılaştırılması. ....	24
Tablo 4. 4 Lenalidomid tedavisi almayanların cinsiyetlerine göre karşılaştırılması. 25	

## 1. GİRİŞ

Multipl miyeloma (MM), kemik iliğinin immünoglobulin üreten plazma hücrelerinin malign transformasyonundan kaynaklanan hematolojik bir kanserdir. MM, hematolojik kanserlerin yaklaşık % 15'ini (tüm kanserlerin % 1'ini) oluşturur ve Avrupa'daki insidansı her yıl yaklaşık 27.500 yeni vakaya karşılık gelen 100.000'de 5.72'dir. Avrupa'da yaşlanan nüfusla birlikte, insidans oranlarının oldukça artması beklenmektedir. Hastalığın ortalama başlangıç yaşı genellikle 65 yaş ve üzeridir ve sıklığı yaş ilerledikçe artış gösterir. Hastaların sadece %2'si 40 yaş ve altındadır (Mortensen ve Salomo 2016).

MM'da, kemik iliği mikroçevresi ile tümör hücreleri arasındaki etkileşimler sıklıkla kemik yıkımlarıyla sonuçlanır. Tümörün kendisi, ürünleri ve konağın yanıtı myelom için karakteristik olan kemik ağrıları, litik kemik bölgeleri, kolay enfeksiyona yakalanma, kanda yüksek düzeyde kalsiyum ve monoklonal (M) protein seviyesi, böbrek yetmezliği ve anemi gibi semptom ve disfonksiyonlara sebep olur.

MM'nin biyolojik yapısının daha iyi anlaşılmasına başlanmasıyla hastalığın patogenezinde önemli bir rol oynayan kemik iliği mikroçevresini ve myelom hücrelerini hedefleyen talidomid, lenalidomid ve bortezomib gibi güncel tedavilerin geliştirilmesinin önü açılmıştır. Talidomid, lenalidomid ve bortezomib gibi yeni anti-miyelom ajanları tümör redüksiyonu ve süpresyonuna yol açarak miyelom tedavisini önemli ölçüde etkilemektedir (Catley vd. 2005, Ander 2007, Ciolli 2013).

İmmünofenotipik değerlendirme multipl miyelomda tanı için çok değerli veri sağlamaktadır. Birçok çalışma, malign plazma hücrelerinin (PC) analizinde, geleneksel morfolojiyle karşılaştırıldığında akış sitometrisinin yüksek klinik duyarlılığını göstermiştir. Son yıllarda, hem tanı hem de izleme amacıyla hematolojik malignitelerin klinik tedavisinde multiparametre akım sitometrisi (MFC) immünofenotipleme zorunlu hale gelmiştir. Klonal PC hastalıkları için MFC, birçok durumda açık ve kesin bir klinik öneme sahiptir. MM ile diğer PC ile ilgili hastalıklar arasındaki ayırıcı tanısı, yüksek riskli önemi belirsiz monoklonal

gammopati (MGUS) ve sessiz MM'nin tanımlanması ve tedaviden sonra minimal rezidüel hastalık araştırılması bu durumlara örnek olarak verilebilir. Ayrıca, prognoz ile ilişkili antijenik profillerin tanımlanması ve yeni terapötik hedeflerin belirlenmesi için de yararlı olabilir (Paiva vd. 2010).

Bu bilgilerden yola çıkarak yapılan çalışmamızda, MM hastalarında çoğunlukla İmmünomodülatör Ajan (İMA) olarak kullanılan lenalidomidin, kanser hücrelerine karşı savaşan majör immün sistem hücrelerinden T lenfosit ve alt grupları üzerindeki etkilerinin akış sitometrisi yöntemiyle belirlenmesi amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Multipl Myeloma

Multipl miyeloma (MM) olarak bilinen myelom hastalığı, kemik iliğinde klonal plazma hücrelerinin çoğalması ile görülen bir kanser türüdür. Bu malign hastalık, tipik olarak serumda veya idrarda saptanabilen monoklonal immüoglobulinlerin salgılanması ile karakterizedir ve tüm hematolojik kanserlerin yaklaşık % 10-15'ini oluşturmaktadır (Ekinci ve Özkan 2017, Röllig vd. 2014).

Tarihte kayıtlara geçen ilk myelom vakası 1844 yılında Samuel Solley tarafından bildirilen Sarah Newbury'dir. Ancak Solly'nin bildirdiği bu vaka detaylı bir idrar incelemesi içermemektedir. 1945'de İngiliz Profesör Henry Bence Jones'un idrarda anormal protein olan Bence-Jones proteinürisini tanımlaması MM konusundaki bilimsel çalışmaları hızlandırmıştır. 1873 yılında Rustizky çoklu kemik tümörü olan bir hasta için "Multipl Myeloma" terimini kullanmıştır. 1890'da Cajal, plazma hücrelerinin ilk mikroskopik tanımını yapmış ve 1900'de Wright, MM hücrelerinin plazma hücreleri olduğunu keşfetmiştir (Kyle 1991, Kyle 1996).

Multipl myeloma tanısı koymak, genellikle zor olmamakla beraber, zaman zaman güçlüklerle karşılaşmaktadır. Bu nedenle, MM tanısı kemik iliği aspirasyonu, kemik iliği biyopsisi ve immünohistokimyasal incelemenin yanı sıra klinik ve laboratuvar bulgular ışığında konmalıdır (Ekuklu 1998).

#### 2.1.1. Epidemiyoloji

Multipl miyelom, tüm hematolojik malignitelerin yaklaşık %10-15'ini, tüm kanserlerin % 1'ini oluşturur ve Birleşik Krallık'ta yaklaşık 2 / 100.000 oranında görülmektedir (Cartwright vd. 1990, Cartwright vd. 1997). Uluslararası olarak, miyelom insidansı Afrika kökenli Amerikalılar arasında en yüksektir, bunu Maoriler, Hawaiiiler, İsraili Yahudiler, Kuzey Avrupalılar, ABD ve Kanadalı beyazlar

izlemektedir (Blattner vd. 1978). En düşük oranlar Orta Doğu, Japonya ve Çin'de görülmektedir (Bowden vd. 1993).

MM, yaşlı nüfusun bir hastalığıdır ve Afrika kökenli Amerikalılarda görülme sıklığı Avrupa kökenli Amerikalıların iki katıdır. Yapılan çalışmalarda ABD'de 69 ortalama yaş olarak belirlenmiştir (Kazandjian 2016).

### 2.1.2. Etiyoloji

Etiyoloji tam olarak anlaşılamamıştır. Bu kısmen tütün tüketimi ve beslenme gibi genel olarak malign hastalıklarda önemli rol oynayan risk faktörlerinin, multipl miyeloma etiyojisinde güçlü bir şekilde yer almamasına bağlıdır (Becker 2011). MM'un etiyojisinde rolü olduğu düşünülen faktörler aşağıda verilmiştir.

**Radyasyon:** Multipl miyeloma insidansı ile atom bombasına maruz kalma arasında bir ilişki olduğu düşünülmüştür. Hiroşima ve Nagazaki'de atom bombasına maruz kalıp kurtulanlar arasından oluşturulan çalışma gruplarında standardize edilmiş bağıl riskin, ilik tarafından emilen radyasyon ile arttığı gösterilmiştir (Ichimaru vd. 1982). Başka bir çalışmada UV'ye maruz kalmadaki artışın MM riskindeki artışla tutarlı olduğu gösterilmiştir (Boffetta vd. 2008).

**Mesleki ve çevresel faktörler:** Yapılan mesleki çalışmalarda, çoğunlukla böcek ilacına maruz kalan çiftçiler arasında aşırı risk tespit edilmiştir (Khuder ve Mutgi 1997, Baris vd. 2004). Kuaförler, sprey boyacıları, itfaiyeciler, kimyasal, petrol, kereste, ayakkabı, kauçuk ve plastik endüstrilerindeki işçiler ve iyonlaştırıcı radyasyona, asbeste, metallere, motor egzozlarına ve benzen gibi özel solventlere maruz kalan işçiler arasında daha az tutarlı sonuçlar ortaya çıkmıştır (morgan vd. 2002, De Roos vd. 2006).

Yapılan başka bir çalışmada, tarım / ormancılık / balıkçılık sektöründe ve pastacılık yapan aşılarda multipl miyeloma insidansının yüksek olduğu gösterilmiştir. Yüksek molekül ağırlıklı ve hassaslaştırıcı maddelere maruz kalan

işçiler, özellikle de fırıncılar ve hamur işi aşçıların, zaman zaman yoğun bir şekilde pestisitlere maruz kalan mesleklerde olduğu gibi yüksek risk altında olduğu gösterilmiştir (Lope vd. 2008).

Multipl miyeloma nadir görülen bir tümör olması nedeniyle, çoğu meslek grubunda topluluk çalışması yapmak istatistiki olarak güçtür. Yapılan vaka kontrol çalışmaları belirli mesleklerde veya kimyasal maruziyet kategorilerinde az sayıda maruz kalan çalışanı bildirmektedir (Alexander vd. 2007).

**İnfeksiyonlar ve diğer kronik hastalıklar:** Kronik olarak stimüle edilen immün sistem ve otoimmün hastalıklar ile MM arasındaki ilişki, yapılan epidemiyolojik çalışmalarla araştırılmıştır. Tüberküloz gibi kronik infeksiyonlar ve aşılardan MM arasında herhangi bir bağ kurulamamıştır (Kartı 2013). Bazı otoimmün hastalıkların MM riskini arttırdığını belirten çalışmalara karşın, böyle bir risk olmadığını belirten yayınlarda mevcuttur (Prior vd. 1984). Yapılan bazı çalışmalarda AIDS'li ve hepatit C virüsü tarafından enfekte kişilerde MM riskinin dikkat çekici düzeyde arttığı belirtilmiştir. (Grulich vd. 1999, Duberg vd. 2005).

**Sigara ve alkol:** Alkol ve sigara tüketimiyle ilgili çalışmalar yapılmış ancak MM ile kayda değer bir ilişki tespit edilememiştir (Brown vd. 1992, Friedman 1993).

### 2.1.3. Patogenez ve Patofizyoloji

Multipl Myelomada patogenez halen tam olarak belirlenememiş olmakla birlikte, hastalığın patogenezinde başta sitogenetik anormallikler olmak üzere kronik antijenik stimülasyonun ve birçok sistem bozukluğunun rol aldığı düşünülmektedir.

MM patogenezinde birçok moleküler değişikliğin yanı sıra kemik iliği mikroçevre ilişkileri de önemli rol oynamaktadır (Cao vd. 2010). Rapor edilen birkaç çalışma, MM patofizyolojisinin klonal plazma hücreleri ve çevresindeki kemik iliği mikro ortamı arasındaki güçlü bir etkileşim ile desteklendiğini açıkça göstermiştir (Manier vd. 2012).

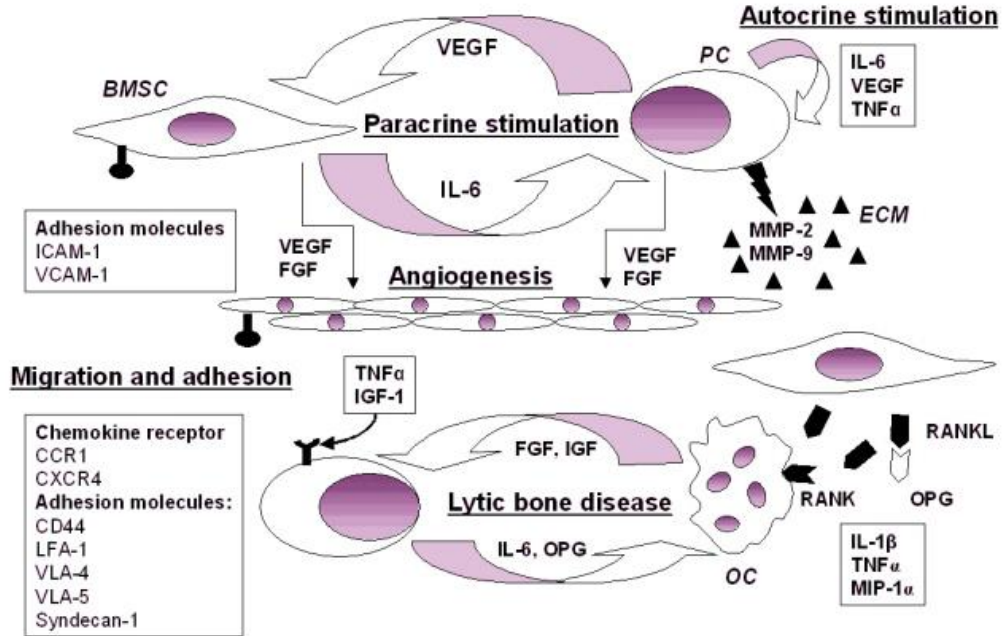


**Kemik iliği mikroçevresinin MM ‘deki rolü:** Multipl myelom hücreleri ve kemik iliği mikroçevresi arasındaki etkileşimle ilgili güncel araştırmalar, hücre-hücre ve hücre-matris, etkileşimlerine, büyüme faktörlerine ve sitokinlere odaklanır. Mikroçevrenin hücresel bileşenleri arasında kemik iliği stromal hücreleri, osteoblastlar, endotel hücreleri ve regülatör T hücreleri de olmak üzere doğal ve adaptif bağışıklık sisteminin hücreleri bulunur (Röllig vd. 2014).

Myelom hücreleri birçok adezyon molekülü sayesinde kemik iliği stromal hücreleri ile etkileşim içindedir (Şekil 2.1). Bunlar CD56/CD56; Syndecan-1 (CD138) / kollajen; intraselüler adezyon molekülü (ICAM) -1 / lökosit ile ilişkili antijen (LFA)-1; CD49d/ vasküler hücresel adezyon molekülü (VCAM)-1 veya fibronektin ve CD38/CD31 moleküllerini içerir. CD49d/VCAM-1 büyük olasılıkla, kemik iliği içinde myelom hücrelerinin etkili olmasını sağlayabilen en önemli yoldur. Bu adezyon moleküllerinin yanında myelom hücreleri tarafından salgılanan CCL1, myelom hücrelerinin bir araya toplanmasına neden olur. Stromal hücreler ile myelom hücrelerinin etkileşimi kemik yıkımı, myelom hücrelerinin yaşamı, proliferasyon, ilaç direnci ve genetik instabiliteye yol açar (Zhou vd. 2005).

**Sitokinlerin MM’deki rolü:** Birçok çalışma multipl miyelomda büyüme faktörlerine odaklandığından, sitokin ağının çalışması bu amaç için yararlı görünmektedir. İnterlökin-6 (IL - 6) ve IL - 2 ile diğer çözünebilir reseptörler (IL-3, IL-4, IL-10 ve IL-11) incelenmiştir. Plazma hücreleri, otokrin mekanizma ile IL-6 üretebilirken, parakrin mekanizma ile de miyelom plazma hücrelerinde bulunan adezyon molekülleri ile kemik iliği stromal hücrelerinde bulunan ilgili reseptörler arasındaki bir etkileşim yoluyla, kemik iliği stromal hücrelerinin IL-6 üretimine katıldığı düşünülmektedir. IL-6 normal ve miyelom plazma hücrelerinin büyümesini desteklerken aynı zamanda miyelom plazmablastik hücrelerinin olgun plazma hücrelerine farklılaşmasını da indükler. Bu son etki aynı zamanda IL-3, IL-4 ve büyük olasılıkla IL-8 tarafından da paylaşılmaktadır. IL-6, C reaktif protein, çözünebilir IL-6 reseptörü (sIL-6R) ve çözünebilir IL-2 reseptörünün (sIL-2R) serum seviyesinin, IL-3 ve IL-4 tarafından uygulanan aktivite ile birlikte değerlendirilmesi, bazı hücresel altkümelerde, sınır vakaların ayırıcı tanısında ek bir

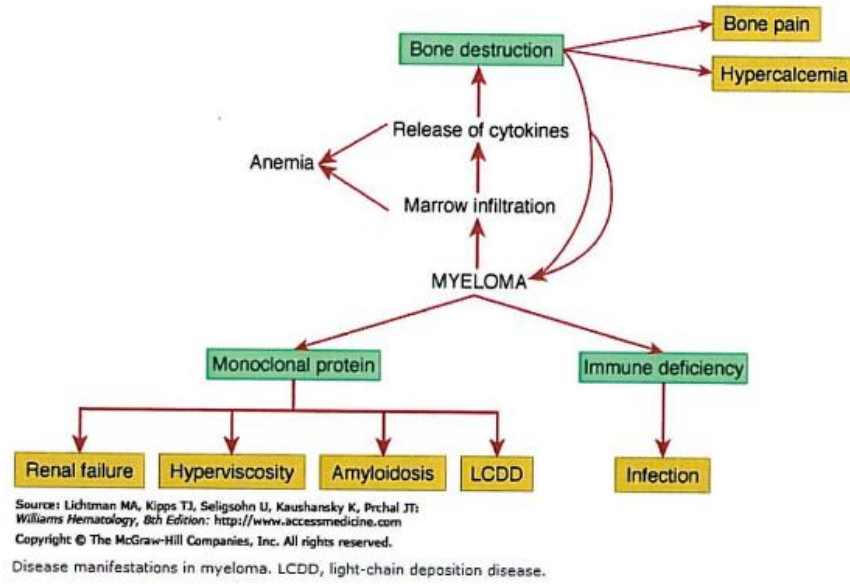
unsur olabilir. Bununla birlikte, tüm immünolojik parametrelerin birlikte değerlendirilmesi, tek bir IL değerinden daha faydalı olabilir (Lauta 2003).



Şekil 2. 1 Kemik iliği mikroçevresinin multipl myelomannın patogenezindeki rolü. BMSC: Kemik iliği stromal hücreleri; PC: Plazma hücreleri; ECM: Ekstraselüler matriks; OC: Osteoklast (Zhou vd. 2005).

#### 2.1.4. Klinik

MM'da plazma hücrelerinin kemik iliği ve organ filtrasyonu, kan veya idrarda monoklonal protein üretimi, malign plazma hücrelerinin salgıladığı paraproteinlerin fonksiyon bozukluğunun neden olduğu immün yetmezliğe bağlı semptomlar görülür ( Şekil 2.2) (Fairfield vd. 2016).



Şekil 2. 2 MM’da klinik bulgular (Williams Hematology Eight Ed.).

Hastalığın başlarında herhangi bir şikayet olmasa da MM geliştikçe birçok belirti ortaya çıkmaya başlar. Özellikle sırt, kaburga ve bazen de kollarda oluşan kemik ağrıları miyelom hücrelerinin kemikte harabiyete sebep olacak kadar fazla biriktiğine işarettir (Yeh ve Berenson 2006). Normalde kemik iliğinde %5 ‘in altında bulunan plazma hücreleri, MM’da  $\geq$  %10 gibi bir değerde klonal kemik iliği plazma hücresi olarak ortaya çıkar. Kemik iliğinde aşırı monoklonal plazma hücre birikimi hematopoez işleyişini bozarak anemiye yol açar. Hastada normal hemoglobin miktarına sahip normal boyalı eritrositi ifade eden normokromik veya hemoglobin değeri  $> 2$  g/dL olan normositer (normal eritrosit) veya hemoglobin değeri  $< 10$  g/dL olan anemi durumları gözlenebilir (San Miguel ve Gracia-Sanz 2005). Malign plazma hücreleri tarafından salınan sitokinler (interlökin) nedeniyle kemik yıkımını sağlayan osteoklastların miktarındaki artış sonucunda ciddi osteopeni veya patolojik kırıkların eşlik ettiği osteolitik kemik lezyonları meydana gelir. Manyetik rezonans görüntüleme (MRI) veya bilgisayar tomografisi (CT) ile bu lezyonlar görülebilir. Aşırı monoklonal protein üretimi nedeniyle diğer Ig tiplerinde meydana gelen azalma enfeksiyon duyarlılığını arttırarak hastada on iki ayda 2’den fazla olmak üzere sık sık enfeksiyonlara yakalanma şikayeti ile kendini gösterir. Ayrıca serum ve/veya idrarda monoklonal protein varlığı serum elektroforez paterninde belirgin bir pik ile gözlenir.

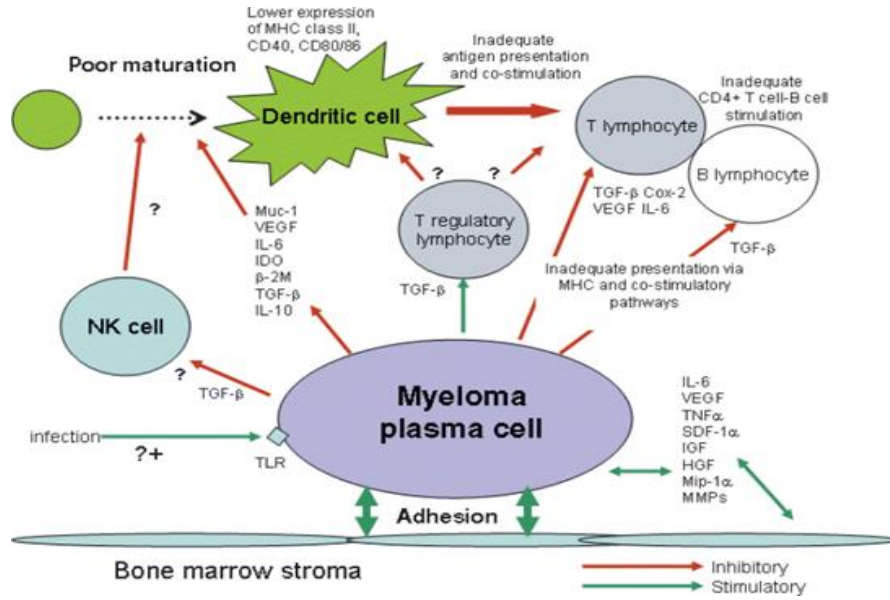
En sık karşılaşılan belirtilerden biri de böbrek yetmezliğidir. Bunun miyelom böbrek yapısı ve hiperkalsemi olmak üzere iki önemli nedeni vardır. Bir bütün halinde bulunan immünglobülinler yapı olarak büyük oldukları için böbreklerdeki glomerüler filtreden geçemezler. Ancak IgG ve IgA'ya bağlı miyelomların çoğunda idrara geçebilecek kadar küçük monoklonal serbest hafif zincirler de üretilir. Bu hafif zincirlere Bence-Jones proteinleri denir. Bu proteinler renal tübüllerden geçerken çökerler ve etrafını çok çekirdekli dev hücreler sararak miyelom böbrek yapısına dönüştür. Böylece renal tübüllerde genleşme ve atrofi meydana gelerek tüm nefron fonksiyon gösteremez hale gelir (San Miguel ve Gracia-Sanz 2005, Katzel vd. 2007). Kemik yıkımındaki artışın yol açtığı  $\geq 11,5$  mg/dL değerindeki yüksek serum kalsiyum düzeyi (hiperkalsemi) olması ciddi böbrek hasarına yol açar. Bunlardan başka özellikle burun ve dişetlerinde kanamaya eğilim artar çünkü M proteini koagülasyon faktörlerini ve trombosit fonksiyonlarını etkileyebilir ve ilerlemiş hastalıkta trombositopeni meydana gelir. Buna ek olarak çoğu kez kanamayla ilişkilendirilen hiperviskozite ile özellikle IgM miyelom vakalarında karşılaşılr. MM hastalarının %10'undan daha azında görülen bu durum serum viskozitesi ölçülerek anlaşılabilir. Tüm bu belirtilerden başka hasta vücutta kolayca meydana gelen çürükler, halsizlik, zihin bulanıklığı, ciltte genel bir hissizlik, tat alma duyu kaybı gibi yakınmalarla doktora başvurabilir (San Miguel ve Gracia-Sanz 2005, Yeh ve Berenson 2006, Katzel vd. 2007).

### **2.1.5. Multipl myeloma ve immün sistem ilişkisi**

İmmün sistem, organizmaların patojenlere, herhangi bir infeksiyon sonrası yabancılaşmış hücrelere yahut kanserleşerek morfolojik değişiklik geçirmiş hücrelere karşı vücudumuzun savunma mekanizmasıdır. Antijen sunan hücre tarafından başlatılan immün yanıt hümmoral ve hücrenel bağışıklık, hücre-mediatör etkileşimleri ve immün sistemi düzenleyici sinyal iletici fonksiyona sahip bir polipeptit olan lenfokin üretimi ile aktive edilmektedir. Bunun sonucunda sitotoksik efektör T hücreleri oluşarak antijene özgül yanıt oluşturacak antikorlar salınır. İmmün sistemin vücudun kendi antijenlerini tanıyarak zarar vermeden sadece patojen türevli enfekte molekülleri yani yabancı antijenleri yok etmesi oldukça hassas bir denge

gerektirmektedir. Oluşan bu dengeli sisteme immün tolerans denir. İmmün toleransın bozulması halinde organizmanın kendi antijenlerine immün yanıt oluşturması durumunda ortaya çıkan hastalığa otoimmün hastalık denir. Bunun yanısıra immün yanıtın azalması halinde immün sistem çökebilir veya immün yanıtındaki dengesizlikler alerjiye sebep olabilir (Larche 2006, Akdis 2008). Bu durumların ortaya çıkmasını kontrol ederek immünregulasyonu sağlayacak bazı sistemler mevcuttur. İmmün tolerans klonal delesyon yoluyla gerçekleşen merkezi tolerans ve periferal tolerans mekanizmalarına sahiptir. Merkezi toleransta T hücrelerinin timustaki gelişme sürecinde vücudun kendi antijenlerine karşı reseptör taşıyan hücreler yıkıma uğramaktadır. Böylece daha lenfositlerin olgunlaşma sürecinde negatif seleksiyon gerçekleşerek klonal bir delesyon meydana gelmektedir (McCaughy 2008, Saurer ve Mueller 2009). Periferal toleransta antijen sunan hücrelerin antijen sunumu sırasında ikinci bir sinyal iletilmesi bozularak klonal anerji adı verilen durum oluşturulur. Klonal anerjide sıklıkla görev yapan B7 ailesi moleküllerinin etkileşimi önem taşır. Olgunlaşmış bir dendritik hücre veya antijen sunan hücre üzerindeki B7 reseptörü ile aktif haldeki bir T hücresinin üzerindeki CD28 'in ya da sitotoksik T-lenfosit antijen 4 (CTLA4)'ün etkileşimi sonucunda ikincil sinyal iletimi engellenebilmektedir (Seliger vd. 2008, Liu vd. 2009). Periferal toleransın en önemli parçası olan bir diğer sistem ise düzenleyici T hücreleridir (Treg). Düzenleyici T hücreler immün sistemi baskılayıcı yönde etki ederek otoimmüniteyi ve graft rejeksiyonu önlemekte olup azalan Treg fonksiyon aktivitesi ise otoimmün hastalıklara duyarlılığı arttırmaktadır. Ancak Treg hücrelerinin infeksiyöz ajanlara ve tümör hücrelerine karşı tüm immün cevapları module ederken anormal immünsüpresif fonksiyon göstermesi sonucunda infeksiyon veya malign durumlar da ortaya çıkabilmektedir. Monoklonal immünglobülin üretimi ile karakterize olan MM'da baskılanmış diğer immünglobülin ekspresyonlarıyla birlikte fonksiyon göstermeyen T hücre yanıtları da mevcuttur. Bu immün fonksiyon bozukluğunun temelindeki sebeplerden birinin Treg hücrelerinin anormal aktivitesi olduğu bilinmektedir (Ozer vd. 1981, Lehner 2008, Rosenblatt ve Avigan 2008, Saurer ve Mueller 2009).

Miyelom tümör hücreleri, bazen pek çok malign hastalıkta ortak olan, bazende daha spesifik olan potansiyel mekanizmaların zenginliği yoluyla bağışıklık sistemini alt edebilir (Şekil 2.3).



Şekil 2. 3 Tümör hücreleri ve konukçu immün sistem arasındaki etkileşim. Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), İnterlökin 6 (İL 6), İndoleamin 2,3-dioksijenaz (İDO),  $\beta$  2 mikroglobulin ( $\beta$  2M), Dönüşüm faktörü  $\beta$  (TGF  $\beta$ ), İnterlökin-10 (İL 10), Tümör nekroz faktörü  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ), Stromal - türetilmiş faktör 1 a (SDF - 1 a), İnsülin büyüme faktörü (IGF), Hepatosit büyüme faktörü (HGF), Matris metaloproteazlar (MMP), Toll benzeri reseptörler (TLR) (Pratt vd. 2007).

Multipl miyelomdaki kemik iliği mikroçevresi, çeşitli çözünür faktörlerin aşırı üretimi nedeniyle immün baskılayıcıdır. Miyelom plazma hücrelerinin antijeni sunma kapasitesi azalmış olmasına rağmen belirsizdir. Dentritik hücre (DC) fonksiyonu miyelomda bozulmuştur. Co-sitümülator yollarında bozukluklar ve çoklu miyelomda T hücrelerinde, B hücrelerinde ve NK hücrelerinde kantitatif, fenotipik ve fonksiyonel kusurlar vardır. Bu değişikliklerin ne kadar geri dönüşlü olduğu henüz tam olarak ele alınmamıştır (Pratt vd. 2007).

**Dentritik hücre disfonksiyonu:** Dendritik hücreler (DC), antijene özgü tepkilerin aktivasyonunda ve kuvvetlendirilmesinde kritik bir rol oynayan, çok özel antijen sunan hücrelerdir. Bir dizi kanserli hastada DC disfonksiyonu gösterilmiştir. Ancak bu defektlerin altında yatan moleküler mekanizmalar genellikle yeterince anlaşılammıştır (Pratt vd. 2007).

Kemik iliği mikroçevresi, DC-MM ve T lenfosit etkileşimlerinin yeni bir modelinde, MM plazma hücreleri üzerindeki ortak uyarıcı molekül CD28'in ekspresyonu ve kemik iliği DC'ler üzerindeki CD80 / CD86 ligandlarının eksprese edilmesi, hem IL-6 hem de immünoşüpresif enzim indoleamin 2,3 dioksijenaz (İDO) üretmesi için DC'leri indüklediği görülmüştür. IL-6, MM hücrelerinin hayatta kalmasına yardımcı olan en önemli faktörlerinden biridir; IDO, aktive T hücrelerinin T hücre anerjisini ve T hücrelerinin baskılayıcı CD25<sup>high</sup> / FOXP3 + / CD4 + Treg hücrelerine farklılaşmasını indükler. CD28'in tıkanması, DC'ler tarafından IL-6 ve IDO üretimini inhibe eder, böylece DC'lerin MM hücreleri üzerindeki koruyucu etkisini iptal eder (Nair vd. 2012).

**MM'de T hücreler:** T hücrelerini diğer lenfositlerden ayıran en önemli özelliklerinden biri, olgunlaşma süreçlerini timusta tamamlamalarıdır (Miller 1961). Kazanılmış (adaptif) bağışıklık sistemine mensup T hücreleri, kansere yahut diğer patojenlere karşı vücut savunmasının en önemli elemanlarındanıdır. Kemik iliğindeki ortak lenfoid progenitörden köken alarak timusta gelişen T hücreleri; iki farklı soya ayrılarak, reseptör tiplerine göre  $\alpha\beta$  ve  $\gamma\delta$  T hücreleri şeklinde gelişimlerini sürdürürler. Kan dolaşımındaki T hücrelerinin yaklaşık %95'ini teşkil eden  $\alpha\beta$  T hücreleri, yüzeylerindeki CD3 proteini ile diğer lenfositlerden ayrılırlar ve bağışıklık sisteminin düzenlenmesinde farklı roller oynayan alt grupları kapsarlar. Bu gruplar, hücre yüzeyinde CD8 proteini sentezleyen CD3+CD8+ sitotoksik T lenfositleri (CTL), CD4 proteini sentezleyen CD3+CD4+ yardımcı T hücreleri (Th1,Th2, Th17 ve foliküler T hücreleri), CD56 proteini sentezleyen CD3+CD56+ NKT hücreleri ve düşük afiniteli IL-2 reseptörü CD25'i sentezleyen CD3+CD4+CD25+ regülatör T hücreleri (Treg)'dir. Th1 hücreleri, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2 gibi sitokinleri salgılayarak inflamasyon oluşturmak suretiyle hücresele immüniteyi aktive etmek; Th2 hücreleri

IL-4, IL-5, IL-10 ve IL-13 gibi inflamasyon durdurucu sitokinleri salgılamak ve antikor üretimine yardımcı olmaktan sorumluyken (Romagnani 1999); Th17 hücreleri ise IL-17 salgılayarak inflamasyon tabanlı doku hasarı ve otoimmün reaksiyonlara sebep olmaktadır (Weaver vd. 2006).

CD4 T hücrelerinin gelişimi, mikroçevre ortamının sitokinlerinden etkilenen şekillenebilir bir işlemdir. Edinsel bağışıklığın tipik bir örneği, spesifik çözünebilir faktörlerden dolayı Th1/Th2 CD4 alt popülasyonları arasındaki dengeyi ayrıntılı olarak tarif etmektedir. MM'deki Th1/Th2 dengesi, Th2 sitokinleri IL-10 ve IL-4'ün ekspresyonunun artması ve Th1 sitokinleri IL-2 veya IFN- $\gamma$  gibi sitokinlerin üretiminin azalmasıyla değişmiştir (Romano vd. 2014).

**MM'da NK ve NKT hücreleri:** Doğal öldürücü (NK) hücreler, tümör hücrelerinin veya viral olarak enfekte olmuş hücrelerin lizisinde önemli bir role sahiptir ve baskın olarak, insan lökosit antijeni (HLA) sınıf I ekspresyonunun aşağı regülasyonunun tanınmasıyla aktive edilir (Pratt vd. 2007).

Doğal öldürücü (NK) ve CD8 T hücreleri gibi sitotoksik lenfositler, tümörün bağışıklık sürveyansının önemli aktörleridir. NK hücreleri, granüle bağlı sitotoksiste, TNF- $\alpha$  ve IFN- $\gamma$  gibi sitokinlerin salgılanması ve immün yanıtları sırasında belirgin rolleri olan CCL3-5 kemokinlerin salgılanması dahil olmak üzere çeşitli antitümör fonksiyonlarına aracılık eder. NK hücreleri, tümör hücrelerini, aktifleştirici veya inhibe edici reseptörleri sayesinde tanır. Ayrıca, immünglobulin G'nin Fc fragmenti için düşük afiniteli aktive edici reseptörü olan CD16 vasıtasıyla antikor kaplı hedef hücreleri tanıyabilir ve öldürebilirler. Bu sürece antikora bağımlı hücre aracılı sitotoksiste (ADCC) adı verilir (Moretta ve Moretta 2003, Vivier vd. 2008).

NK hücreleri anti - miyelom aktivitesine sahiptir ve talidomid ve buna bağlı immünomodülatör ilaçlar (lenalidomid vb.) bu etkiyi artırabilir. Bununla birlikte, tümör hücrelerinde kaçış mekanizmaları bulunabilir (Pratt vd. 2007).



Doğal öldürücü T (NKT) hücreleri, CD1d molekülleri bağlamında glikolipid ligandlarını tanıyan NK markörlerini taşıyan T lenfositlerdir. NKT hücreleri, tümör ve patojenlere karşı korunmada ve immün düzenlemede önemli bir rol oynamaktadır. Bu hücreler, güçlü sitokin üretimi, antianjiyogenez ve diğer hücrelerin, özellikle NK hücrelerinin ve dendritik hücrelerin aktivasyonu gibi çeşitli mekanizmalarla antitümör etkilere aracılık eder. Talidomid ve analogu lenalidomid, miyelom ve miyelodisplastik sendromda (MDS) klinik aktivite göstermiştir. Bununla birlikte, gözlenen antitümör etkilerinin mekanizması belirsizliğini korumaktadır.

Yapılan bazı çalışmalar talidomidin, insan T hücrelerini stimüle edebileceğini gösterirken, immün modülatör bir türev olarak da lenalidomidin (LEN) geliştirilmesini sağlamıştır. Miyelomda talidomid ile yapılan ilk çalışmalarda NK hücreleri üzerinde etkinliği tanımlanmış olmasına rağmen daha sonraki çalışmalar NK hücreleri üzerinde gözlenen etkilerin dolaylı olduğunu göstermiştir. Doğuştan CD1d ile kısıtlanmış NKT hücrelerinin, LEN'in proksimal bir hücresel hedefi olabileceği varsayılarak LEN'nin, insan NKT hücreleri tarafından ligand bağımlı aktivasyonunu, proliferasyonu ve sitokin üretimini ve ayrıca in vivo olarak NKT hücrelerinin gelişimini büyük ölçüde artırdığı gösterilmiştir (Chang vd. 2006).

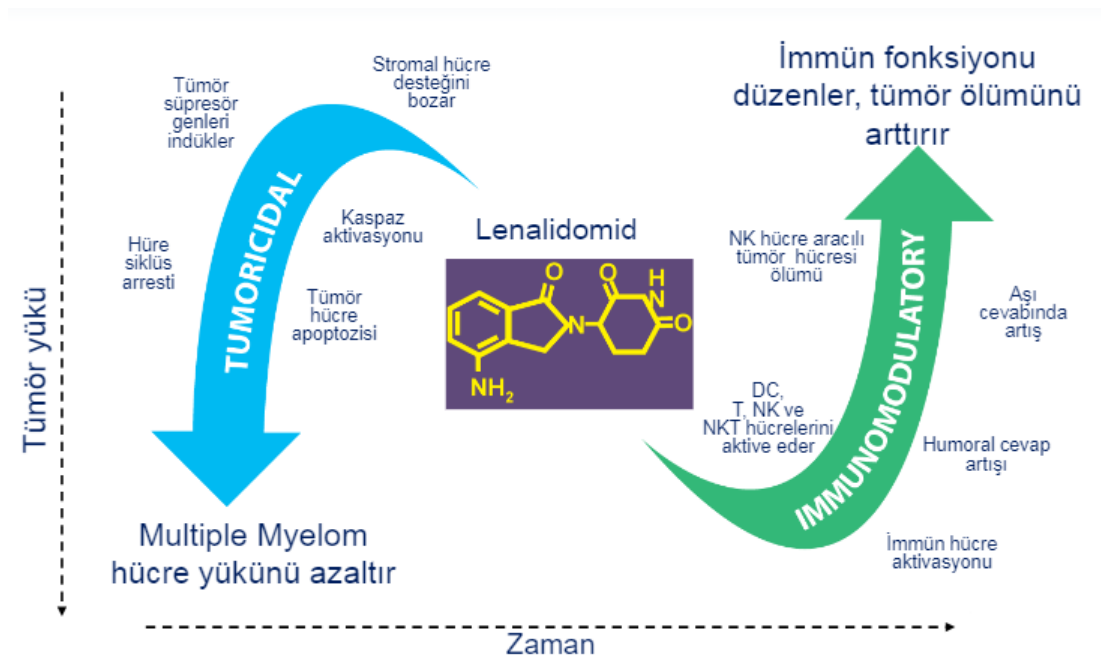
## **2.2. Lenalidomid Nedir?**

Talidomid'in (Thal) MM dahil çeşitli hastalıklarda faydalı olduğu gösterilmiştir; ancak, güçlü bir teratojendir ve periferik nöropati dahil bir çok yan etkisi bulunmaktadır. Bu nedenle, daha güçlü ve daha az yan etkisi olan Thal analogu geliştirme çalışmaları yapılmıştır. Lenalidomid, bu çalışmalar sırasında geliştirilen immünomodülatör ilaçlar sınıfına (IMiD'ler) ait bir analogdur (Hideshima vd. 2008).

### **2.2.1. Lenalidomid'in etki mekanizması**

Kapsamlı olarak yapılan klinik öncesi araştırmalar sayesinde, lenalidomidin, konakçı mikroçevre üzerindeki doğrudan tümör öldürücü ve immünomodülatör etkilerini içeren benzersiz bir etki mekanizmasına sahip olduğu görülmüştür.

Doğrudan tümör sitotoksitesi, aktin polimerizasyonuna ve hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesine yol açan zar proteinlerinin yer değiştirmesine, hücre döngüsünün durdurulmasına, otokrin sitokinlerin inhibisyonuna, (IRF4) ve C-MYC gibi tümör onkogenlerinin inhibe edilmesine ve ayrıca tümör baskılayıcı genlerin birlikte indüklenmesine neden olur (Şekil 2.4) (Zeldis vd. 2011).

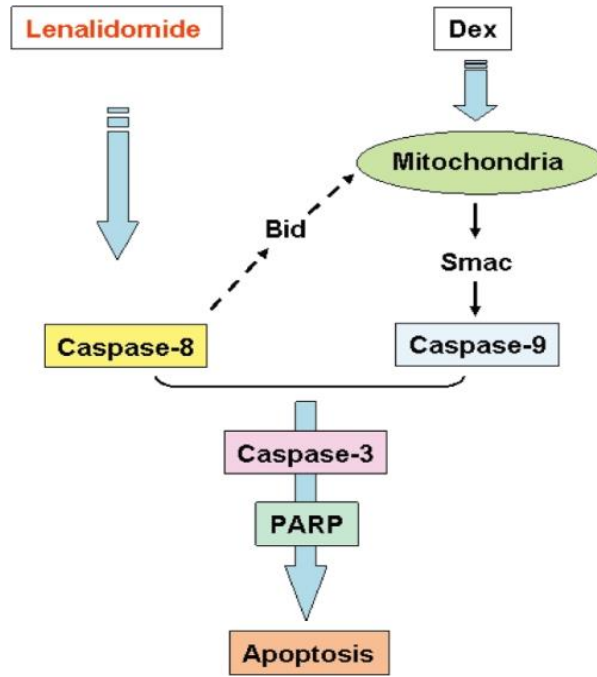


Şekil 2. 4 Lenalidomid'in immünmodülör ve tümörosidal etkileri.

MM'de, lenalidomid kaynaklı tümör sitoksisitesi, kaspazların ve sonuçta ortaya çıkan apoptozun aktivasyonuna yol açar. Lenalidomid ve deksametazonun (Dex) birlikte verildiği tedavilerde sinerjistik sitotoksisite görülür (Şekil 2.5).

Konakçı mikroçevrenin etkileri, bağışıklık sinaps oluşumunun (hematolojik kanserli hastalarda genellikle kusurlu olan) restorasyonunu, doğal öldürücü hücre sitotoksitesinin artırılmasını ve düzenleyici T hücrelerinin inhibisyonunu içerir. Ortaya çıkan immün aracılı tümör hücresi öldürülmesi, şiddetli immün baskılanmasıyla sonuçlanabilen kemoterapötik ajanların doğrudan karşıtıdır. Lenalidomid ayrıca konakçı mikroçevreyi, antianjiyogenik bir etki ve parakrin

salgısında bir azalma ile değiştirir. Lenalidomidin aktivitesi, immün fonksiyon bozukluğunun restorasyonu nedeniyle sıklıkla devam eden gelişmiş ve hızlı klinik tepkilerden sorumlu olabilir. Lenalidomidin pleiyotropik etkileri, belki de hücrel fizyolojinin kilit düzenleyicileri olan spesifik bir gen veya protein kümesinin hedeflenmesinin veya çeşitli yollara ters bağlanmasının sonucu olabileceği düşünölmektedir (Zeldis vd. 2011).



şekil 2. 5 Lenalidomid'in apoptotik mekanizması. Lenalidomid, kaspaz-8'e bağlı apoptozu tetiklerken, Dex, kaspaz-9'a bağlı apoptozu tetikler. Bu nedenle kombinasyon, çift apoptotik sinyalleşme kaskadını tetiklemektedir (Hideshima vd. 2008).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi (TNKÜ) Hematoloji Bilim dalında Şubat 2018 - Mart 2018 tarihlerinde yürütüldü. Çalışma Helsinki Deklarasyonu Kararlarına, Hasta Hakları Yönetmeliğine ve etik kurallarına uygun olarak yapılmış olup TNKÜ Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulundan onay aldı (Ek 1). Çalışmaya başlamadan önce çalışma grupları sözlü ve yazılı olarak bilgilendirildi ve yazılı onayları alındı (Ek 2). Hematoloji Bilim Dalında takip edilen, 18-85 yaş arası, 10-25 mg lenolidomid tedavisi alan 34 (16 k, 18 e) ve lenalidomid tedavisi almayan 30 (10 k, 20 e) MM hastası çalışmaya alındı. Çalışmada kullanılan araç ve gereçler tablo 3.1. de verilmiştir.

Tablo 3. 1 Çalışmada kullanılan araç ve gereçler

<b>CİHAZ</b>	<b>MARKA</b>
Akım Sitometri Cihazı	Beckman Coulter Navios, USA
Santifrüz	Nüve NF800
Vortex	WiseMix VM-10
Otomatik Mikropipet (100µl)	Eppendorf Plus Otomatik Pipet
Otomatik Mikropipet (10µl)	Eppendorf Plus Otomatik Pipet

Akım sitometrik analiz kan örnekleri hastalardan sabah saat 08.00-10.00 arasında, aç karnına, antekubital brakial venden 2 ml %7,5 etilendiamin-tetraasetikasit (EDTA) içeren vacutainer tüplere (BD Vacutainer K 3E) alındı. Kan örnekleri alındıktan sonra 2 saat içinde çalışıldı.

#### 3.1. Örneklerin Hazırlanması

Lenfosit alt tipleri, hastalardan alınan venöz kan örneklerinde akım sitometrisi yöntemiyle değerlendirildi. Florokrom ile işaretlenmiş monoklonal antikolar kombinasyonlar halinde kullanılarak T lenfosit (CD3+CD56-), NK (CD3-CD56+), NKT (CD3+ CD56+), T helper (CD3+ CD4+) ve T sitotoksik (CD3+ CD8+) sayıları saptandı.

CD3+ lenfositlerin analizinde; fluorescein isothiocyanate (FITC) ile konjuge monoklonal anti-CD3, CD4+ lenfositlerin analizinde; T4-ECD ile konjuge monoklonal anti-CD4, CD8+ lenfositlerin analizinde; Pacific Blue ile konjuge monoklonal anti-CD8 ve CD56+ lenfositlerin analizinde; PC5 ile konjuge monoklonal anti-CD56 kullanıldı (Şekil 3.1).

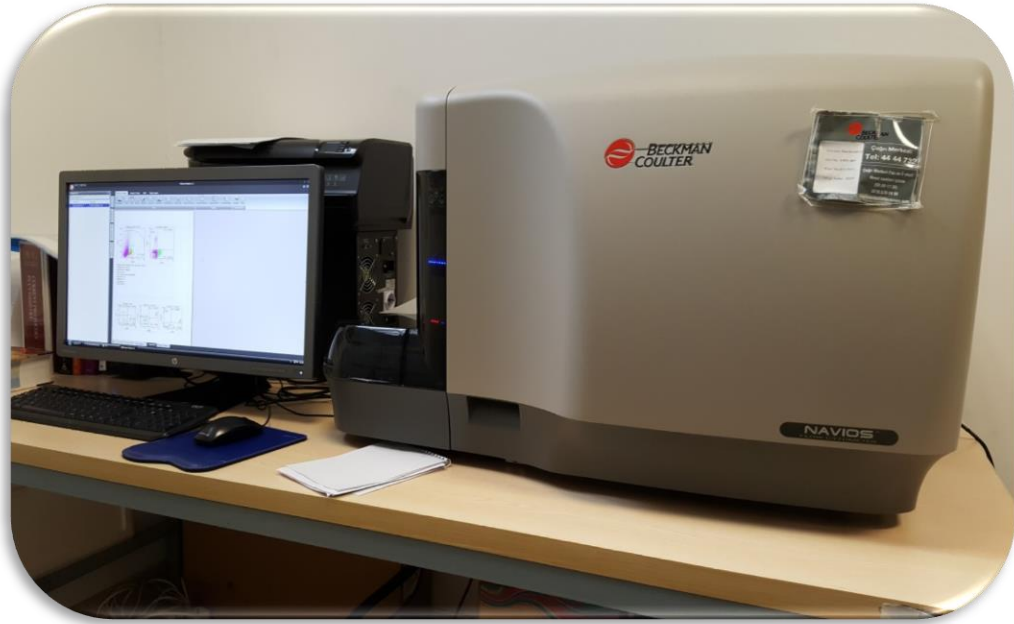


Şekil 3. 1 Boya ile konjuge monoklonal antikorlar.

### 3.1.1. Örnek hazırlama protokolü

- 1- Numaralandırılmış tüplere antikorlar (10 $\mu$ l) pipetlendi.
- 2- Üzerine 100  $\mu$ l kan örneği pipetlenip vortekslendi.
- 3- 15 dk oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübe edildi.
- 4- Tüplere 500  $\mu$ l Optilyse C eklenip vortekslendi.
- 5- 10 dk oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübe edildi.
- 6- Tüplere 500  $\mu$ l PBS (IsoFlow) eklenip vortekslendi.
- 7- 10 dk oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübe edildi.
- 8- 1300 rpm'de 5 dk santifrüj edildi.
- 9- Süpernatant yavaşça döküldü.
- 10- Üzerine 2 ml PBS eklenip vortekslendi.

- 11- 1300 rpm'de 5 dk santifrüj edildi.
- 12- Süpernatant yavaşça döküldü.
- 13- Tüplere 500 µl PBS konuldu ve örnekler akım sitometri cihazında çalışıldı (Şekil 3.2).

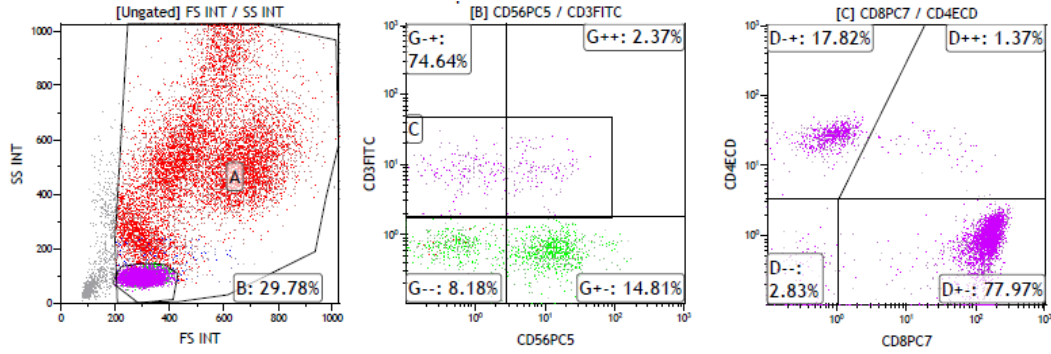


Şekil 3. 2 Akım sitometri cihazı (Beckman Coulter Navios, USA).

### 3.2. Verilerin Analizi

Verilerin analizi için Kaluza kullanıldı. Forward scatter-ileriye saçılım (FS) ve side scatter-yana saçılım (SS) ölçümleri için lineer yükselticiler, floresan ölçümleri için ise logaritmik yükselticiler kullanıldı. Kaluza tarafından FS ve SS parametrelerinin kullanımı ile oluşturulan; lökositleri lenfosit, monosit ve granülositler olarak ayıran histogramda, lenfositler etrafından manuel olarak kapı alındı. Bu kapının tanıtıldığı, Kaluza tarafından oluşturulan ve 2 parametreyi aynı anda gösteren, dot plotlar ile immunfenotipik analizler yapıldı. Pozitiflik sınırı, izotipik kontrollerle pozitif hücre oranı %2'den daha az olacak şekilde ayarlandı. Total lenfosit popülasyonu üzerinde CD3, CD4, CD8 ve CD56 oranları belirlendi. Kan sayımları sonuçlarından elde edilen lenfosit yüzdesi ile toplam lökositler

içindeki mutlak lenfosit sayısı bulundu. Akım sitometrisi ile elde edilen lenfosit alt tiplerinin yüzdesi ile bulunan mutlak lenfosit sayısından lenfosit alt tiplerinin mutlak sayısı hesaplandı (Şekil 3.3).



Şekil 3. 3 İleriye saçılım (FS) ve yana saçılım (SS) ölçümleri.

### 3.3. İstatiksel Analiz

Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Bilgi İşlem Daire Başkanlığında bulunan SPSS PASW STATISTISC 18.0 paket programı kullanılarak yapıldı. Nicel veriler için iki grup ortalamasının karşılaştırılması normal dağılım gösterenler student t testi ile normal dağılım göstermeyenler Mann-Whitney U testi ile değerlendirildi. Bütün analizlerde  $p < 0,05$  değer anlamlı kabul edildi.

#### 4. BULGULAR

Lenalidomid alan ve almayan grupların demografik verileri Tablo 4.1’de gösterilmiştir.

Tablo 4. 1 Lenalidomid alan ve almayan grupların demografik verileri

<b>Değişken</b>	<b>N (Sayı)</b>	<b>% (Yüzde)</b>
<b>Lenalidomid Tedavisi</b>		
Alan	34	53,1
Almayan	30	46,9
<b>Cinsiyet,</b>		
Kadın	26	40,6
Erkek	38	59,4
<b>Yaş,</b>		
18-45	5	7,8
46-65	28	43,8
66-85	31	48,4

Lenalidomid alan ve almayan gruplardaki total lenfosit ve alt gruplarına ait bulgular Tablo 4.2’de gösterilmiştir.

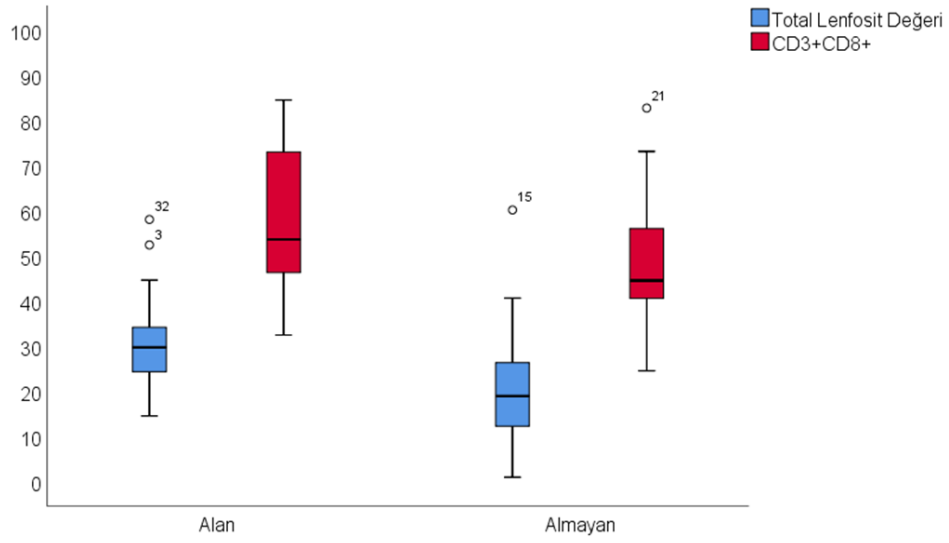


Tablo 4. 2 Lenalidomid alan ve almayan gruplardaki total lenfosit ve alt gruplarına ait bulguların istatistiksel karşılaştırılması

Değişken	N (sayı)	Mean±SS (%)	P
Total Lenfosit Değeri,			
Lenalidomid Alan	34	30,13±9,85	<b>0,002<sup>1</sup></b>
Lenalidomid Almayan	30	21,15±12,65	
CD3+CD56-,			
Lenalidomid Alan	34	60,82±15,41	0,279 <sup>1</sup>
Lenalidomid Almayan	30	64,79±13,48	
CD3-CD56+,			
Lenalidomid Alan	34	18,90±12,50	0,097 <sup>2</sup>
Lenalidomid Almayan	30	14,25±10,87	
CD3+CD56+,			
Lenalidomid Alan	34	6,51±4,91	0,545 <sup>2</sup>
Lenalidomid Almayan	30	8,41±8,86	
CD3+CD4+,			
Lenalidomid Alan	34	38,33±16,20	0,119 <sup>1</sup>
Lenalidomid Almayan	30	44,55±15,17	
CD3+CD8+,			
Lenalidomid Alan	34	57,18±15,11	<b>0,021<sup>1</sup></b>
Lenalidomid Almayan	30	48,55±13,87	

<sup>1</sup> Student t testi, <sup>2</sup> Mann whitney u, p<0.05

İstatistiksel analizlerde lenalidomid alan ve almayan grupta total lenfosit, CD3+CD56-, CD3+CD4+ ve CD3+CD8+ lenfosit değerleri normal dağılım göstermiştir. CD3-CD56+ ve CD3+CD56+ lenfositler ise normal dağılım göstermemiştir. Lenalidomid alan ve almayan gruplar karşılaştırıldığında CD3+CD56-, CD3-CD56+, CD3+CD56+ ve CD3+CD4+ lenfosit sayıları açısından istatistiksel farklılık saptanmamıştır (sırasıyla p= 0,279, p= 0,097, p= 0,545, p= 0,119). Lenalidomid alan grupta lenalidomid almayan gruba göre total lenfosit sayısı ve CD3+CD8+ lenfosit sayısı daha yüksek saptanmış, aradaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (sırasıyla p= 0,002, p= 0,021)(Şekil 4.1).



Şekil 4. 1 Lenalidomid alan ve almayan gruplarda total lenfosit değeri ve CD3+CD8+ lenfositlerin karşılaştırılması.

MM hastalarından lenalidomid tedavisi alanların cinsiyetlerine göre karşılaştırılması Tablo 4.3'de ve almayanların cinsiyetlerine göre karşılaştırılması Tablo 4.4'de verilmiştir.

Tablo 4. 3 Lenalidomid tedavisi alanların cinsiyetlerine göre karşılaştırılması.

Değişken	N (sayı)	N-mean±ss (%)	P değeri
Total Lenfosit Değeri,			
Kadın	16	31,15±7,56	0,575 <sup>1</sup>
Erkek	18	29,21±11,67	
CD3+CD56-,			
Kadın	16	62,64±15,85	0,524 <sup>1</sup>
Erkek	18	59,20±15,27	
CD3-CD56+,			
Kadın	16	14,54±9,16	0,112 <sup>2</sup>
Erkek	18	22,76±13,99	
CD3+CD56+,			
Kadın	16	5,44±5,15	0,078 <sup>2</sup>
Erkek	18	7,46±4,62	
CD3+CD4+,			
Kadın	16	40,11±15,73	0,553 <sup>1</sup>
Erkek	18	36,74±16,89	
CD3+CD8+,			
Kadın	16	57,60±15,19	0,880 <sup>1</sup>
Erkek	18	56,81±15,47	

1 Student t testi, 2 Mann whitney u, p<0.05

Lenalidomid alanlar cinsiyetlerine göre karşılaştırıldığında total lenfosit sayısı CD3+CD56-, CD3-CD56+, CD3+CD56+, CD3+CD4+ ve CD3+CD8+ lenfosit sayıları açısından istatistiksel farklılık saptanmamıştır (sırasıyla p= 0,575, p= 0,524, p= 0,112, p= 0,078, p=0,553, p=0,880).

Tablo 4. 4 Lenalidomid tedavisi almayanların cinsiyetlerine göre karşılaştırılması.

Değişken	N (sayı)	Mean±ss (%)	P değeri
Total Lenfosit Değeri,			
Kadın	10	17,33±7,96	0,249 <sup>1</sup>
Erkek	20	23,06±14,24	
CD3+CD56-,			
Kadın	10	65,05±12,71	0,943 <sup>1</sup>
Erkek	20	64,67±14,17	
CD3-CD56+,			
Kadın	10	13,54±8,88	0,725 <sup>2</sup>
Erkek	20	14,60±11,95	
CD3+CD56+,			
Kadın	10	4,64±2,64	0,104 <sup>2</sup>
Erkek	20	10,30±10,27	
CD3+CD4+,			
Kadın	10	51,95±13,74	0,057 <sup>1</sup>
Erkek	20	40,86±14,79	
CD3+CD8+,			
Kadın	10	41,32±10,53	<b>0,041<sup>1</sup></b>
Erkek	20	52,17±14,14	

1 Student t testi, 2 Mann whitney u, p<0.05

Lenalidomid almayanlar cinsiyetlerine göre karşılaştırıldığında total lenfosit sayısı, CD3+CD56-, CD3-CD56+, CD3+CD56+ ve CD3+CD4+ lenfosit sayıları açısından istatistiksel farklılık saptanmamıştır (sırasıyla p= 0,249, p= 0,943, p= 0,725, p= 0,104, p=0,057). Lenalidomid almayan grupta erkeklerde kadınlara göre CD3+CD8+ lenfosit sayısı daha yüksek saptanmış, aradaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p= 0,041).

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Transforme plazma hücrelerinin klonal aşırı çoğalması ile seyirli bir hematolojik malignite olan Multipl Myelom (MM) çeşitli immünolojik disregülasyonlarla beraber seyredilebilen bir hastalıktır (Romano vd. 2014). Bu özellik, diğer pek çok solid ve non-solid tümörlerde de olduğu gibi MM'da da majör mortalite ve morbidite nedeni olan enfeksiyonlara eğilimin, hastalık progresyonu ve kemoterapi direncinin oldukça önemli bir nedenidir. MM'de immün sistem ile ilgili çok sayıda defekt tanımlanmakla beraber klinik önemi hakkında aydınlatılacak pek çok yön bulunmaktadır. MM hastalarında B hücrelerini ilgilendiren belirgin bir immün disregülasyonun yanı sıra NK hücreleri, T hücresi ve dentritik hücre gibi immün sistemin diğer hücrelerinde de disregülasyon gösterilmesiyle birlikte ileri evre MM hastalarında hastalık progresyonunda rolü olan Treg, Breg ve myeloid kökenli supresör hücreler (MKSH) gibi immün supresör hücrelerde de sayısal artış gösterilmiştir (Tamura 2018).

B hücresinden köken alan plazma hücre malignitesi olan MM'da T hücrelerinde hem kantitatif hem de fonksiyonel anormallikler gösterilmiştir (Pratt 2007). Mills ve ark. T hücre alt gruplarında sıklıkla anormalliklerin saptandığını ve CD4/CD8 oranının ters döndüğü gözlemlemiştir (Mills ve Cawley 1983). Ek olarak Ogawara ve arkadaşları MM hastalarında anormal Th1/Th2 CD4+ oranını göstermişlerdir (Ogawara vd. 2005). CD4+ ve CD8+ T hücrelerindeki sayıca azalmanın hastalık sürvisi ile ters ilişkili olduğu ve bu durumun immün sistemin selüler komponentlerinin hastalık kontrolündeki potansiyel rolü Kay ve ark. tarafından ortaya konmuştur (Kay vd. 2001). Artan miktarda literatür bilgisi NK hücrelerinin MM'de predomnan bir rol sahibi olduğunu göstermiştir. Myeloma hücreleri NKG2D (MHC-I polipeptid ilişkili sekans (MIC) A/B ve retinoik asit erken transkript), NKp30(B7-H6), DNAM1 (CD112/nektin 2 ve CD155/necl5) gibi çeşitli ligandları eksprese ederek NK hücre yüzeyinde eksprese olan sinyal moleküllerine bağlanıp aktive eder. Böylelikle NK hücreleri DNA hasarı, mitokondrial ve diğer immünoenzimatik apoptotik kaskatları indükleyen sitotoksik molekülleri salgılar (Liu vd. 2018). Pek çok diğer T hücre alt grubu gibi NKT hücrelerinde de

değişiklikler görülmektedir. Fakat hastalık durumu ile ilişkileri ve prognozla ilişkili olup olmadıklarına dair literatür bilgileri çelişkilidir. Çünkü tedavisiz MM hastalarında belirgin bir sayı değişikliği gözlemlenmemiştir (Chan vd. 2014). Dhodapkar ve ark. yaptıkları çalışmada NKT hücrelerindeki reversibl defektin prognoz ile ilişkili olduğunu ileri sürmüştür (Dhodapkar vd. 2003), Chang ve ark. NKT hücrelerinin alfa galaktozilseramid (  $\alpha$ -GalCer) yüklü dentritik hücreler ile *in vivo* indüksiyonunun ve benzer şekilde Nur ve arkadaşlarının 5T33 fare modelinde yaptığı çalışmalar bu hücrelerin stimülasyonunun potansiyel protektif rolünü göstermiştir (Chang vd. 2005, Nur vd. 2013).

Bir talidomid derivativesi olan ve bir başka derive olan pomalidomid gibi T hücrelerinde IL-2 prodüksiyonunu artırması ve proinflatuar sitokinleri azaltması nedeni ile immün modülatör ilaç olarak dizayn edilen lenalidomidin B hücre transkripsiyon faktörleri olan IKZF1 ve IKZF3'un ubiquitinasyonu ve takip eden proteozomal degradasyonuna yol açarak myeloma hücrelerinin ölümünü sağladığı gösterilmiştir (Fink ve Ebert 2015). Hasslet ve ark. lenalidomid öncüsü olan talidomid ile ilgili yaptıkları bir çalışmada talidomidin insan T lenfosit ve alt grupları üzerine etkilerini ve özellikle CD8+ alt grubuna ait sitotoksik yanıtları irdelemişler, talidomidin *in vitro* potent bir insan T hücre stimülatörü olduğunu göstermişlerdir. Talidomidin kostimülatör etkisinin CD8+ alt grubunda CD4+ T hücre alt grubuna göre daha belirgin olduğunu bulan araştırmacılar, talidomidin CD4+ T hücre olmadan allojenik dentritik hücre ile indükte CD8+ sitotoksik T hücre yanıtını artırdığını göstermişlerdir. Bu bulguyu, özellikle CD8+ alt grubu başta olmak üzere insan T hücre kostimülasyonunun talidomid ile farmakolojik olarak başarılabileceği şeklinde yorumlamışlardır (Haslet vd. 1998). Çalışmamızda, araştırmacıların bulgularına benzer şekilde talidomid derivativesi olan lenalidomid alan hastalar almayanlar ile karşılaştırıldığında T lenfosit ve CD8+ T hücre sayılarında belirgin artış saptanmış ve sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmakla beraber, tedavi alanlarda CD4+ T hücre sayısında artış saptanmamıştır. Bu sonuç yazarların belirttiği gibi ilacın özellikle CD8+ T hücre grubu üzerindeki etkisinin bir sonucu olabilir. Malign plazma hücrelerine karşı NK hücre fonksiyonlarının azaldığı MM hastalığında, yaygın olarak lenalidomidin NK hücre biyolojisi üzerine etkisi pek

bilinememektedir. Bu konuyu irdeleyen bir çalışmada Lagrue ve ark. lenalidomidin NK sayısını artırmadan NK hücre aktivasyon eşiğini düşürdüğünü; aktivasyon için efektif konsantrasyon %50 (EC50)'i CD16 aracılı aktivasyonda %66 oranında, NKG2D (NK group 2 member D) aracılı aktivasyonda %38 oranında düşürdüğünü saptamışlar ve lenalidomidin daha düşük ligand dozlarında yanıt vermesini sağladığı yorumunda bulunmuşlardır. Şaşırtıcı şekilde, lenalidomidin interferon- $\gamma$  üreten NK hücre oranında 2 kat artış ve hücre başına üretilen interferon- $\gamma$  miktarında 20 kat artış saptamışlardır (Lagrue vd. 2015). Çalışmamızda araştırmacıların bulgularına benzer şekilde lenalidomid alan ve almayan grupta NK hücre sayısı açısından fark saptanmamıştır.

CD1d kısıtlı glikolipid reaktif T lenfositler olan ve anti tümör aktivitesi bilinen NKT hücrelerinin pek çok malignitede olduğu gibi MM'da öne çıkan araştırma konusu olmakta ancak immünmodülatör ilaçlardan olan lenalidomidin bu hücre grubu üzerine etkilerine dair nadir çalışma bulunmaktadır. Bu çalışma örneklerinden birisi olan ve Chang ve ark. tarafından yapılan çalışmada sağlıklı ve MM hastalığı olan katılımcılardan elde edilen monosit derive dentritik hücrelere NKT ligandı olan  $\alpha$ -GalCer yüklenmiş, NKT ile kokültüre edilme sonucu NKT'lerde hem aktivasyon hem de ekspansyon elde edilmiştir. Hem sağlıklı hem de MM hastalarından elde edilen kültürlerle ek olarak lenalidomid eklendiğinde NKT ekspansyonu belirgin şekilde artmıştır. Bununla beraber lenalidomidin sadece  $\alpha$ -GalCer stimüle kültür ortamında NKT hücre ekspansyonu sağladığı gözlemlenmiştir. Bu sonuç lenalidomidin ligand bağımlı NKT aktivasyonunun işareti olabilir (Chang vd. 2006). Çalışmamızda lenalidomid alan ve almayan gruplar arasında NKT hücreleri arası fark saptanmamasının nedeni ligand bağımlı indüksiyonun olmayışı muhtemeldir.

Sonuç olarak, çalışma sonuçları ve literatür değerlendirmeleri immün modülatör bir ilaç olan lenalidomidin bilinen IKZF1 ve IKZF3'un ubiquitinasyonu ve takip eden proteozomal degradasyonunun yanı sıra T hücresi ve alt gruplarında çeşitli değişikliklere yol açtığı, literatürle uyumlu olarak artmış T hücre ve CD8+ T hücrelerine ek olarak özellikle NK ve NKT hücrelerinde sayısal artış olmaksızın

aktivite artışı sağlayarak antitümör aktiviteyi artırdığı düşünülebilir. Lenalidomid ile T hücre ve alt grupları ile ilgili yapılacak in vivo ve in vitro araştırmalar bu ilacın immün sistem ilişkisini daha ayrıntılı olarak aydınlatacaktır.



## KAYNAKLAR

- Akdis, C.A. 2008. New insights into mechanisms of immunoregulation in 2007. *J Allergy Clin Immunol.* 122:700-709
- Alexander, D.D., Mink, P.J., Adami, H.O., et al. 2007. Multiple myeloma: a review of the epidemiologic literature. *Int J Cancer.* 12:40–61
- Ander, K.C. 2007. Targeted therapy of multiple myeloma based upon tumor microenvironmental interactions. *Exp Hematol.* 35:155–162
- Baris, D., Silverman, D.T., Brown, L.M. et al. 2004. Occupation, pesticide exposure and risk of multiple myeloma. *Scand J Work Environ Health.* 30:215–22
- Becker, N. 2011. Epidemiology of Multiple Myeloma. *Recent Results in Cancer Research.* pp:25-35
- Blattner, W.A., Jacobson, R.J., Shulman, G. 1979. Multiple myeloma in South African blacks. *Lancet.* 928-929
- Boffetta, P., Van der Hel, O., Kricker, A., Nieters, A., de Sanjosé, S., Maynadié, M., Cocco, P.L., Staines, A., Becker, N., Font, R., Mannetje, A., Goumas, C., Brennan, P. 2008. Exposure to ultraviolet radiation and risk of malignant lymphoma and multiple myeloma--a multicentre European case-control study. *Int J Epidemiol.* 37(5):1080-94
- Bowden, M., Crawford, J., Cohen, H.J., Noyama, O. 1993. A comparative study of monoclonal gammopathies and immunoglobulin levels in Japanese and United States elderly. *J Am Geriatr Soc.* 41:11-14
- Brown, L.M., Gibson, R., Burmeister, L.F., Schuman, L.M., Everett, G.D., Blair, A. 1992. Alcohol consumption and risk of leukemia, non-Hodgkin's lymphoma, and multiple myeloma. *Leukemia Research.* 16(10): 979-984
- Cao, Y., Luetkens, T., Kobold, S., Hildebrant, Y., Gordic, M., Lajmi, N., Meyer, S., Bartels, K., Zander, A.R., Bokemeyer, C., Kröger, N., Atanackovic, D. 2010. The cytokine/chemokine pattern in the bone marrow environment of multiple myeloma patients. *Experimental Hematology.* 38(10):860-867
- Cartwright, R.A., Alexander, F.E., McKinney, P.A., Ricketts, T.J. 1990. Leukaemia and lymphoma: an atlas distribution within areas of England and Wales 1984-1988. *Leukaemia Research Fund.* s161

- Cartwright, R.A., McNally, R.J.Q., Rowland, D.J., Thomas, J. 1997. The descriptive epidemiology of leukaemia and related conditions in parts of the United Kingdom 1984-1993. Leukaemia Research Fund.
- Catley, L., Tai, Y., Chauhan, D., Anderson, K.C. 2005. Perspectives for combination therapy to overcome drug resistant multiple myeloma. *Drug Resist Updat.* 8:205–218
- Chang, D.H., Osman, K., Connolly, J., et al. 2005. Sustained expansion of NKT cells and antigen-specific T cells after injection of alpha-galactosyl-ceramide loaded mature dendritic cells in cancer patients. *J Exp Med.* 201:1503-1517
- Chang, D.H., Liu, N., Klimek, V., Hassoun, H., Mazumder, A., Nimer, S.D., Jagannath, S., Dhodapkar, M.V. 2006. Enhancement of ligand-dependent activation of human natural killer T cells by lenalidomide: therapeutic implications. *Blood Journals.* 108(2): 618–621
- Chan, A.C., Neeson, P., Leeansyah, E., et al. 2014. Natural killer T cell defects in multiple myeloma and the impact of lenalidomide therapy. *Clin Exp Immunol.* 175:49-58
- Ciulli, S. 2013. Effects on bone metabolism of new therapeutic strategies with standard chemotherapy and biologic drugs. *Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism.* 10(3):183-186
- De Roos, A.J., Baris, D., Weiss, N.S., Herrinton, L.J. 2006. Multiple myeloma. In: Schottenfeld D, Fraumeni JF, Jr. editors. *Cancer epidemiology and prevention.* 3rd ed. New York: Oxford University Press. p. 919–45
- Dhodapkar, M.V., Geller, M.D., Chang, D.H., et al. 2003. A reversible defect in natural killer T cell function characterizes the progression of premalignant to malignant multiple myeloma. *J Exp Med.* 197:1667-1676
- Duberg, A.S., Nordström, M., Törner, A., Reichard, O., Strauss, R., Janzon, R., Bäck, E., Ekdahl, K. 2005. Non-Hodgkin's lymphoma and other nonhepatic malignancies in Swedish patients with hepatitis C virus infection. *Hepatology.* 41:652-659
- Ekinci, D., Özkan, A. 2017. Multipl Miyelom'da CD4+ Regülatör T Hücrelerinin rolü. *Cukurova Med J.* 42(3):546-551

- Ekuklu, Z. 1998. Multipl yelom olgularında klinik, histopatolojik, immünohistokimyasal değerlendirme ve prognoz (tez). Edirne: Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi
- Fairfield, H., Falank, C., Avery, L., Reagan, M.R. 2016. Multiple myeloma in the marrow: pathogenesis and treatments. *Ann N Y Acad Sci.* 1364(1): 32–51
- Fink, E.C., Ebert, B.L. 2015. The novel mechanism of lenalidomide activity. *Blood.* 126(21):2366-9
- Friedman, G.D. 1993. Cigarette smoking, leukemia, and multiple myeloma. *Annals of Epidemiology.* 3(4):425-428
- Grulich, A.E., Wan, X., Law, M.G., Coates, M., Kaldor, J.M. 1999. Risk of cancer in people with AIDS. *AIDS.* 13:839-843
- Haslett, P.A., Corral, L.G., Albert, M., Kaplan, G. 1998. Thalidomide costimulates primary human T lymphocytes, preferentially inducing proliferation, cytokine production, and cytotoxic responses in the CD8+ subset. *J Exp Med.* 187(11):1885-92
- Hideshima, T., Raje, N., Richardson, P.G., Anderson, K.C. 2008. A review of lenalidomide in combination with dexamethasone for the treatment of multiple myeloma. *Ther Clin Risk Manag.* 4(1): 129–136
- Ichimaru, M., Ishimaru, T., Mikami, M., Matsunaga, M. 1982. Multiple myeloma among atomic bomb survivors in Hiroshima and Nagasaki, 1950-76: relationship to radiation dose absorbed by marrow. *J Natl Cancer Inst.* 69(2):323-328.
- Kartı, S.S. 2013. Multipl Myelom Epidemiyoloji ve Etiyoloji. *Türk Hematoloji Derneği.* 1-7
- Katzel, J.A., Hari, P., Vesole, D.H. 2007. Multiple myeloma: charging toward a bright future. *CA Cancer J Clin.* 57:301-318
- Kay, N.E., Leong, T.L., Bone, N., Vesole, D.H., Greipp, P.R., Van Ness, B., Oken, M.M., Kyle, R.A. 2001. Blood levels of immune cells predict survival in myeloma patients: results of an Eastern Cooperative Oncology Group phase 3 trial for newly diagnosed multiple myeloma patients. *Blood.* 98:23–28

- Kazandjian, D. 2016. Multiple myeloma epidemiology and survival: A unique malignancy. *Seminars in Oncology*. 43:676-681
- Khuder, S.A., Mutgi, A.B. 1997. Meta-analyses of multiple myeloma and farming. *Am J Ind Med*. 32:510–6
- Kyle, R.A. 1991. History Of Multipl Myeloma. In: Neoplastic Diseases of the Blood, 2 nd ed. Wiernik, P.H., Canellos, G.P., Kyle, R.A., Schiffer, C.A. ed. New York: Churchill Livingstone.
- Kyle, R.A. 1996. History Of Multipl Myeloma. In: Neoplastic Diseases of the Blood, 3 rd ed. Wiernik, P.H., Canellos, G.P., Kyle, R.A., Schiffer, C.A. ed. New York: Churchill Livingstone.
- Larche, M. 2006. Immunoregulation by targeting T cells in the treatment of allergy and asthma. *Curr Opin Immunol*. 18:745-750
- Lauta, V.M. 2003. A Review of the Cytokine Network in Multiple Myeloma. *American Cancer Society*. 97:2440–52
- Lehner, T. 2008. Special regulatory T cell review: The resurgence of the concept of contrasuppression in immunoregulation. *Immunology*. 123:40-44
- Liu, P., Jin Y., Sattar, H., Liu, H., Xie, W., Zhou, F. 2018. Natural killer cell immunotherapy against multiple myeloma: Progress and possibilities. *J Leukoc Biol*. 103(5):821-828
- Liu, X., Alexiou, M., Martin-Orozco, N., Chung, Y. ve ark. 2009. Cutting edge: A critical role of B and T lymphocyte attenuator in peripheral T cell tolerance induction. *J Immunol*. 182:4516-4520
- Lope, V., Pérez-Gómez, B., Aragonés, N., López-Abente, G., Gustavsson, P., Plato, N., Zock, J.P., Pollán, M. 2008. Occupation, exposure to chemicals, sensitizing agents, and risk of multiple myeloma in Sweden. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 17(11):3123-7
- Manier, S., Sacco, A., Leleu, X., Ghobrial, I.M., Roccaro, A.M. 2012. Bone Marrow Microenvironment in Multiple Myeloma Progression. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. P: 5

- McCaughy, T.M., Baldwin, T.A., Wilken, M.S., Hogquist, K.A. 2008. Clonal deletion of thymocytes can occur in the cortex with no involvement of the medulla. *J Exp Med.* 205:2575-2584
- Miller, J.F. 1961. Immunological function of the thymus. *Lancet.* 2(7205)748-9
- Mills, K.H., Cawley, J.C. 1983. Abnormal monoclonal antibody-defined helper/suppressor T-cell subpopulations in multiple myeloma: relationship to treatment and clinical stage. *British Journal of Haematology.* 53:271–275
- Moretta, L., Moretta, A. 2003. Unravelling natural killer cell function: triggering and inhibitory human NK receptors. *EMBO J.* 23(2):255–9
- Morgan, G.J., Davies, F.E., Linet, M. Myeloma aetiology and epidemiology. *Biomed Pharmacother.* 56:223–34
- Mortensen, L.G., Salomo, M. 2016. Quality of Life in Patients with Multiple Myeloma: A Qualitative Study. *Journal of Cancer Science & Therapy.* 8:289-293
- Nair, J.R., Rozanski, C.H., Lee, K.P. 2012. Under one roof: the bone marrow survival niche for multiple myeloma and normal plasma cells. *Oncoimmunology.* 1(3)388–389
- Nur, H., Fostier, K., Aspeslagh, S., et al. 2013. Preclinical evaluation of invariant natural killer T cells in the 5T33 multiple myeloma model. *PLoS One,* 8(5):e65075
- Ogawara, H., Handa, H., Yamazaki, T., Toda, T., Yoshida, K., Nishimoto, N., Alma'Quol, W., Kaneko, Y., Matsushima, T., Tsukamoto, N., Nojima, Y., Matsumoto, M., Sawamura, M., Murakami, H. 2005. High Th1/Th2 ratio in patients with multiple myeloma. *Leukemia Research.* 29:135–140
- Ozer, H., Han, T., Henderson, E.S., Nussbaum, A., Sheedy, D. 1981. Immunoregulatory T cell function in multiple myeloma. *J Clin Invest.* 67:779-789
- Paiva, B., Almeida, J., Perez-Andrez, M., Mateo, G., Lopez, A., Rasillo, A., Vidriales, M.B., Lopes-Berges, M.C., San Miguel, J.F. ve Orfao, A. 2010. Utility of Flow Cytometry Immunophenotyping in Multiple Myeloma and Other Clonal Plasma Cell-Related Disorders. *Clinical Cytometry Society.* 78B:239–252

- Pratt, G., Goodyear, O., Moss, P. 2007. Immunodeficiency and immunotherapy in multiple myeloma. *The British Journal of Haematology*. 138:563–579
- Prior, P., Symmons, D.P., Hawkins, C.F., Scott, D.L., Brown, R. 1984. Cancer morbidity in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 43:128-131
- Romano, A., Conticello, C., Cavalli, M., Vetro, C., La Fauci, A., Parrinello, .L., Di Raimondo, F. 2014. Immunological Dysregulation in Multiple Myeloma Microenvironment. *Bio Med Research International*. P:10
- Rosenblatt, J., Avigan, D. 2008. Cellular immunotherapy for multiple myeloma. *Best Pract Res Clin Haematol*. 21:559-577
- Röllig, C., Knop, S., Bornhauser, M. 2014. Multiple myeloma. *The Lancet*. 385:2197-2208
- San Miguel, J.F., Gracia-Sanz, R. 2005. Prognostic features of multiple myeloma. *Best Pract Res Clin Haematol*. 18:569–583
- Saurer, L., Mueller, C. 2009. T cell-mediated immunoregulation in the gastrointestinal tract. *Allergy*. 64:505-19
- Seliger, B., Marincola, F.M., Ferrone, S. 2008. Abken H. The complex role of B7 molecules in tumor immunology. *Trends Mol Med*. 14:550-559
- Tamura, H. 2018. Immunopathogenesis and immunotherapy of multiple myeloma. *Int J Hematol*. 107(3):278-285
- Weaver, C.T., Harrington, L.E., Mangan, P.R., Gavrieli, M., Murphy, K.M. 2006. Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity*. 24(6):677-88
- Yeh, H.S., Berenson, J.R. 2006. Myeloma bone disease and treatment options. *Eur J Cancer*. 42:1554–1563
- Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T., Ugolini, S. 2008. Functions of natural killer cells. *Nat Immunol*. 9(5):10
- Zeldis J.B., Knight, R., Hussein, M., Chopra, R., Muller, G. 2011. A review of the history, properties, and use of the immunomodulatory compound lenalidomide. *Ann N Y Acad Sci*. 1222:76-82

Zhou, J., Maurer, K., Farina, L., Gribben, J.G. 2005. The role of the tumor microenvironment in hematological malignancies and implication for therapy. *Frontiers in Bioscience*. 10:1581-1596

## **EKLER**





T.C  
TEKİRDAĞ  
NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI  
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu



Sayı: 2019/

31.01.2019

Sayın Doç. Dr. Mustafa ORAN

Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kuruluna sunmuş olduğunuz “**Multipl Myelomalı Hastalarda Lenfosit ve Alt Gruplarının İmmünofenotipik Analizleri**” başlıklı ve 2019.11.01.11 nolu prospektif araştırmanız incelenmiş olup, yürütülmesine etik açıdan herhangi bir sakınca olmadığına oy birliği/oy çokluğu ile karar verilmiştir.

NKÜ GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
ÇALIŞMA ESASI	Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu

Unvanı/Adı/Soyadı	Araştırma ile ilişki		Katılım		İmza
	Var	Yok	Evet	Hayır	
Prof. Dr. Ebru YEŞİLDAĞ	V <input type="checkbox"/>	Y <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. M. Metin DONMA	V <input type="checkbox"/>	Y <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Ali Rıza KIZILER	V <input type="checkbox"/>	Y <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Yakup ALBAYRAK	V <input type="checkbox"/>	Y <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Gündüz YÜMÜN	V <input type="checkbox"/>	Y <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Mehmet Bakı ŞENTÜRK	V <input type="checkbox"/>	Y <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Dr. Öğr. Üyesi Aliye ÇELİKKOL	V <input type="checkbox"/>	Y <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Dr. Öğr. Üyesi Berna ERDAL	V <input type="checkbox"/>	Y <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Dr. Öğr. Üyesi Birol TOPÇU	V <input type="checkbox"/>	Y <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Dr. Öğr. Üyesi Demet ÖZKARAMANLI GÜR	V <input type="checkbox"/>	Y <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Dr. Öğr. Üyesi Sonat Pınar KARA	V <input type="checkbox"/>	Y <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Dr. Öğr. Üyesi Ufuk COŞKUNKAN	V <input type="checkbox"/>	Y <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Dr. Öğr. Üyesi Zeynep KURTULUŞ TOSUN	V <input type="checkbox"/>	Y <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	

Başkanın Unvanı /Adı/ Soyadı /İmza: Prof. Dr. Ebru YEŞİLDAĞ

Namık Kemal Mah. Kampüs Cad. No:1 59030  
Telefon: (0 282) 250 59 04 - Faks: (0 282) 250 99 28  
Elektronik Adres: [tin@nku.edu.tr](mailto:tin@nku.edu.tr)

Ayrıntılı Bilgi İçin: Engin Deniz RENÇBER  
e- posta: [edrencber@nku.edu.tr](mailto:edrencber@nku.edu.tr)

**CALIŞMANIN ADI**

Multipl Myelomalı Hastalarda Lenfosit ve Alt Gruplarının İmmünofenotipik Analizleri

**BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU**

**Sorumlu Araştırmacı: Doç. Dr. Mustafa ORAN**

**Araştırmanın Amacı:**

Bu çalışmanın amacı, myelom hastalarından ve sağlıklı kişilerden alınan çevresel kandaki bağışıklık sistemi hücrelerinin alt tiplerinin akış sitometrisi (Flow sitometri) yöntemiyle analizinin yapılmasıdır.

**Araştırmada İzlenecek Yöntem:**

Bu çalışma için sizden EDTA'lı tüplere kan örnekleri alınacaktır. Bunun dışında herhangi bir işlem uygulanmayacaktır.

Bu araştırmanın protokolü, Namık Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi etik değerlendirme komitesi tarafından değerlendirilmiş ve onaylanmıştır. Helsinki beyannamesinde ortaya konan etik prensiplere riayet edilecektir. Bu formun bir kopyası size saklamanız için verilecektir.

**Alternatif Tedavi veya Girişimler:**

Çalışmamızda bir tedavi uygulanmayacaktır.

**Araştırma Sırasında Karşılaşılabilecek Riskler:**

Bu çalışma kan örnekleri ile yapılacak olan hücre analizi çalışması olup hasta ve sağlıklı bireyler için herhangi bir risk oluşturacak yöntem içermemektedir.

**Araştırma İlacının Olası Yan Etkileri:**

Bu çalışma kan örnekleri ile yapılan hücre analizi çalışması olduğu için ilaç kullanılmamaktadır.

**Araştırma Süresince 24 Saat Ulaşılabilir Kişi Adı / Soyadı / Telefonu:**

Öğr. Gör. Ramadan Bilgin AKALIN: 0506 3387583

Bu araştırmaya katılmanız tamamen gizli tutulacaktır. Sizin araştırmaya katılmanıza ilişkin bilgisi olan tek kişi doktorunuz olacaktır. Doktorunuza verdiğiniz bilgiler kadar klinik bilgilerde gizli tutulacaktır. Bununla birlikte yetkili kurumların müfettişleri araştırmanın geçerli yasalar ve sağlık makamları mevzuatına uygun olarak yürütülmesini garantilemek üzere araştırmaya ilişkin kayıtlarınızı incelemekle yükümlü olabilirler. Kayıtlarınızdaki bilgiler sadece bu araştırma amacıyla ve bu araştırmayı izleyen yayınlar için kullanılacaktır. Her durumda kimliğiniz saklanacaktır. Her durumda kimliğiniz diğer amaçlar için kullanılmayacak veya üçüncü şahıslara açıklanmayacaktır. Muayeneleriniz ve diğer işlemler için sizden ücret alınmayacaktır.

Yukarıda yer alan ve araştırmaya başlamadan önce gönüllüye verilmesi gereken bilgileri okudum ve sözlü olarak dinledim. Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formundaki tüm açıklamaları okudum. Bana, yukarıda konusu ve amacı belirtilen araştırma ile ilgili yazılı ve sözlü açıklama aşağıda adı belirtilen hekim tarafından yapıldı. Aklıma gelen tüm soruları araştırıcıya sordum, yazılı ve sözlü olarak bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Çalışmaya katılmayı isteyip istemediğime karar vermem için bana yeterli zaman tanındı. Araştırmaya gönüllü olarak katıldığımı, istediğim zaman gerekçeli veya gerekçesiz olarak araştırmadan ayrılabilceğimi ve kendi isteğime bakılmaksızın araştırmacı tarafından araştırma dışı bırakılabileceğimi biliyorum.

Söz konusu araştırmaya, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın kendi rızamla katılmayı kabul ediyorum, bana ait tıbbi bilgilerin gözden geçirilmesi, transfer edilmesi ve işlenmesi konusunda araştırma yürütücüsüne yetki veriyorum ve söz konusu araştırmaya ilişkin bana yapılan katılım davetini hiçbir zorlama ve baskı olmaksızın büyük bir gönüllülük içerisinde kabul ediyorum.

**Gönüllünün Adı / Soyadı / İmzası / Tarih**

**Açıklamaları Yapan Kişinin Adı / Soyadı / İmzası / Tarih**

**Gerekliyse Olur İşlemine Tanık Olan Kişinin Adı / Soyadı / İmzası / Tarih**

**Gerekliyse Yasal Temsilcinin Adı / Soyadı / İmzası / Tarih**