

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

HEMATOPOETİK KÖK HÜCRE NAKLİNDE
ENGRAFTMAN SÜRECİNDE TH22 HÜCRELERİNİN
ROLÜ

Melike ULUBAŞI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

2020-ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

HEMATOPOETİK KÖK HÜCRE NAKLİNDE
ENGRAFTMAN SÜRECİNDE TH22 HÜCRELERİNİN
ROLÜ

Melike ULUBAŞI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Levent ÜNDAR

“Kaynakça gösterilerek tezinden yararlanılabilir”

2020-ANTALYA

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu çalışma jürimiz tarafından İç Hastalıkları Anabilim Dalı, İmmünohematoloji Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir. 05 Şubat 2020

İmza

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Levent ÜNDAR
Akdeniz Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Erdal KURTOĞLU
Sağlık Bilimleri Üniversitesi

Üye : Doç Dr. Ozan SALİM
Akdeniz Üniversitesi

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../..... tarih ve/..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Narin DERİN

Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı beyan ederim.

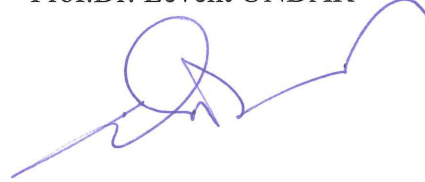
Öğrenci

Melike ULUBAŞI



Tez Danışmanı

Prof.Dr. Levent ÜNDAR



TEŐEKKÜR

Bu çalışmanın gerçekleşmesinde ve yüksek lisans sürecimin her aşamasında, kıymetli bilgileri ve tecrübeleri ile bana yol gösteren, gelecek ve hayata dair kattığı bakış aılları ile asla unutmayacağım danışman hocam sayın Prof. Dr. Levent ÜNDAR'a sonsuz teőekkür ve saygılarımı sunarım.

Çalışmalarım boyunca ilgi ve desteğini hep üzerimde hissettiğim, bilgi ve tecrübeleri ile sürekli katkıda bulunan Akdeniz Üniversitesi Hastanesi Hematoloji Bilim Dalı ğretim yesi Doç. Dr. Ozan SALİM'e ve ayrıca tezimin istatistik hesaplamalarında ve yorumlamalardaki yardımlarından dolayı Yakın Doğu Üniversitesi Hastanesi Hematoloji Bilim Dalı ğretim yesi Prof. Dr. Turgay ULAŐ'a teőekkürlerimi sunarım.

Çalışmamın her aşamasında yardımlarını esirgemeyen ve hasta grubu örneklerinin toplanmasını sağlayan Akdeniz Üniversitesi Hastanesi Erişkin Kök Hücre Nakil nitesi sorumlu ğretim yesi Dr. Öğretim yesi Orhan Kemal YÜCEL'e ve Kök Hücre Nakil nitesi çalışanlarına ayrıca teőekkür ederim.

Deneyimlerim sırasında bana her açıdan bilgi ve deneyim olarak destek olup sıkıntılarımı paylaşan çalışma arkadaşlarım Deniz EKİNCİ'ye, Hediye SOLTEKİN YILDIRIM'a ve Kamil KANDEMİR'e sonsuz teőekkürler.

ğrenim hayatım boyunca bana destekleri ve sabırlarından dolayı aileme ve tezimde emeği geçen herkese ayrı ayrı teőekkür ederim.

ÖZET

Amaç: IL-22 salgılayan hücrelerin bir CD4⁺ T lenfosit alt tipi olduğu ve özellikle Th22 ve Th17 hücrelerinin bu sitokini salgıladığı bilinmektedir. Th22 hücrelerinin enfeksiyon, kronik inflamasyon, tümör gelişimi, otoimmün hastalık patogenezi ve hücre gelişiminde rol oynadığı bildirilmiştir. Bununla birlikte, hematopoietik kök hücre nakli olan hastalarda IL-22 taşıyan hücrelerin rolü ve sayısı bilinmemektedir. Bu çalışmada, IL-22, IL-17, TNF- α ve IFN- γ taşıyan dolaşımdaki hücrelerin sayısı, hematopoietik kök hücre nakli öncesi ve engraftman sırasında araştırılmıştır.

Yöntem: Hücrelerin; PMA, iyonomisin ve monensin ile uyarımına takiben hasta ve kontrol grubunda, CD3 ve CD4 double pozitif T hücrelerinde; IL-22, IL-17A, TNF- α ve IFN- γ taşıyan mutlak lenfosit sayıları akan hücre ölçer ile belirlendi.

Bulgular: Hasta grubunda kontrol grubuna göre IL-22, IL-17A, TNF- α ve IFN- γ taşıyan mutlak lenfosit sayıları istatistiksel olarak düşük düzeyde saptandı ve engraftman döneminde de bu düşüklüğün devam ettiği görüldü. Diğer taraftan hasta grubunda, kök hücre infüzyonu günü (0.gün) ile engraftman dönemindeki sitokin taşıyan hücre sayıları karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı.

Sonuç: Çalışmamızda, hematopoietik kök hücre nakli öncesi uygulanan hazırlama rejiminin etkisi ile düzeyleri düşmüş olan IL-22, IL-17A, TNF- α ve IFN- γ gibi sitokinlerin engraftman döneminde artmadığı, taşıyan hücre sayılarının benzer kaldığı gözlemlendi. Bu konuda daha geniş ölçekli prospektif çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: Hematopoietik kök hücre nakli, Sitokinler, Engraftman, Th22 hücreleri

ABSTRACT

Objective: The IL-22 secreting cells are a subtype of CD4+ T lymphocytes and especially Th22 and Th17 cells are known to secrete this cytokine. Th22 cells have been reported to play a role in infection, chronic inflammation, tumor development, autoimmune disease pathogenesis, and cell development. However, the role and number of cells carrying IL-22 in patients with hematopoietic stem cell transplantation is unknown. In this study, the number of circulating cells carrying IL-22, IL-17A, TNF- α and IFN- γ were investigated before hematopoietic stem cell transplantation and during engraftment.

Method: The PBMC cells separated from the peripheral blood at the transplantation day (before stem cell infusion) and at the engraftment period than stimulated with PMA, ionomycin and monensin. The number of absolute lymphocytes carrying IL-22, IL-17A, TNF- α and IFN- γ among CD3 and CD4 double-positive T cells were determined by flow cytometry in patient and control groups.

Results: The number of absolute lymphocytes carrying IL-22, IL-17A, TNF- α and IFN- γ was found significantly lower in the patient group compared to the control group. However, these distribution of lymphocytes was not different between the transplantation day and the engraftment period.

Conclusion: In the peripheral blood of patients, the low number of absolute lymphocytes carrying IL-22, IL-17A, TNF- α and IFN- γ could be associated with the conditioning regimen performed before hematopoietic stem cell transplantation. Also, our results are implying that these counts of the cytokine-producing cells were not elevated during the engraftment period. Further prospective studies are needed to better understand the role of IL-22 secreting cells on the hematopoietic stem cell transplantation.

Key words: Hematopoietic stem cell transplantation, Cytokines, Engraftment, Th22 cell

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
TABLolar DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR	vii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Th22 Hücreleri	3
2.2. Hematopoetik Kök Hücre Nakli	7
2.3. Hematopoetik Kök Hücre Nakillerinde Hücreyel İmmünoterapinin Kullanımı	10
2.3.1. Düzenleyici T Hücre İnfüzyonu	11
2.3.2. Doğal Katil Hücre Adoptif İmmünoterapi	11
2.3.3. Anti-Tümör Aşılama	12
2.3.4. Kimerik Antijen Alıcıları	12
2.3.5. Antiviral Sitotoksik Hücre Hatları	13
3. GEREÇ ve YÖNTEM	14
3.1. Olgular	14
3.2. Deneylerde Kullanılan Kimyasallar	14
3.2.1. PBS (Fosfat Tampon Tuz Çözeltisi)	14
3.2.2. Histopaque-1077	14
3.2.3. Fiksasyon, Permeabilizasyon Kiti ve Golgi Stop	14
3.3. Periferik Kan Mononükleer Hücre Eldesi (PKMH)	15
3.4. Hücre yüzey molekülü ve hücre içi sitokin belirlenmesi	15
3.4.1. Hücre Yüzey Boyaması	15
3.4.2. Hücre İçi Boyama	15
4. BULGULAR	23

5. TARTIŞMA	25
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	28
KAYNAKLAR	29
ÖZGEÇMİŞ	36

TABLolar DİZİNİ

Tablo 2.1. IL-22 salgıladığı bilinen T hücre alt tipleri (Eyerich ve Eyerich, 2015).	6
Tablo 2.2. Otolog ve allojenik kök hücre transplantasyonu için güncel endikasyonlar (Henig ve Zuckerman, 2014).	9
Tablo 4.1. Hasta ve kontrol grubunun demografik özellikleri tablosu	23
Tablo 4.2. Hasta ve kontrol grubu mutlak lenfosit sayısı karşılaştırma tablosu	23
Tablo 4.3. Hasta ve kontrol grubu 0. gün ve engraftman yönünden karşılaştırma tablosu	24 25

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Th22 hücrelerinin fenotipi (Eyerich ve Eyerich, 2015).	5
Şekil 2.2. Hazırlık rejimi yoğunluğu (Henig ve Zuckerman, 2014).	10
Şekil 3.1. Kontrol (1) Akan Hücre Ölçer Analiz	17
Şekil 3.2. Kontrol (2) Akan Hücre Ölçer Analiz	18
Şekil 3.3. Hasta (1) Day0 Akan Hücre Ölçer Analizi	19
Şekil 3.4. Hasta (1) Engraftman Akan Hücre Ölçer Analizi	20
Şekil 3.5. Hasta (2) Day0 Akan Hücre Ölçer Analizi	21
Şekil 3.6. Hasta (2) Engraftman Akan Hücre Ölçer Analizi	22

SİMGELER ve KISALTMALAR

- BMDW** : Bone Marrow Donors Worldwide
- CARs** : Kimerik antijen reseptörleri
- Cy** : Siklofosfamid
- EBMT** : Avrupa Kan ve İlik Nakli Grubu
- FGF** : Fibroblast büyüme faktörü
- GVHD** : Graft-versus-Host Hastalığı
- GVL** : Graft-versus-leukemia
- HKH** : Hemopoetik kök hücre
- HLA** : İnsan lökosit antijenleri
- HSCT** : Hematopoetik kök hücre nakli
- IFN GAMA** : İnterferon-gama
- IL** : İnterlökin
- IL-22R** : IL-22 reseptörü
- IL-22BP** : IL-22 bağlayıcı protein
- NK** : Doğal katil
- NMDP** : National Marrow Donor Program
- PBS** : Fosfat Tampon Tuz Çözeltisi
- PDGF** : Trombosit kaynaklı büyüme faktörü
- PKMH** : Periferik Kan Mononükleer Hücre Eldesi
- RORs** : Retinoid-related orphan C reseptörü
- TBI** : Toplam vücut ışınlamasına
- TCD** : T cell depletion
- TNF** : Tümör Nekroz Faktörü
- UCB** : Umbilical cord blood

1. GİRİŞ

Hemopoetik kök hücre (HKH) nakillerinde hazırlık rejimini takip eden aplazi sonrası lenfohematopoetik hücrelerinin alıcıda yerleşmesi ve yeni kan hücrelerinin oluşması “engraftman” (yamanma) olarak isimlendirilir. HKH transplantasyonunda başarının önemli kriterlerinden biri aplazininin kök hücrenin engraftmanı ile ortadan kalkmasıdır. HKH engraftmanı kompleks olaylar zinciri sonrasında oluşmaktadır ve biyolojisi tam olarak anlaşılamamıştır. Nişte HKH'nin proliferasyon ve diferansiyasyonu hücreler, büyüme faktörleri, adhesyon molekülleri, ekstrasellüler matriks proteinleri gibi diğer birçok molekül arasındaki kompleks bir etkileşim ile gerçekleşmektedir (Nilsson ve ark., 2006; Jo ve ark., 2000).

Sitokinlerin rolü bu kompleks engraftment patogenezinde çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Chen ve ark. deneysel olarak iyonize radyasyon sonrası gelişen ciddi kemik iliği yetersizliğinde IL-12 nin endojen hematopoez ve engraftmanına katkı sağladığını göstermişlerdir (Chen ve ark., 2007). Hu ve ark. ise kemik iliği mikroçevresindeki stromal-hücre kaynaklı IL-15'in makrofaj, NK, T ve B hücrelerinin aktivasyonunda ve proliferasyonunda rol alarak engraftmana katkıda bulunduğunu göstermişlerdir (Hu ve ark., 2012). Engraftmanın daha abartılı olduğu non-infeksiyöz ateş, ciltte döküntü, diffüz pulmoner infiltrasyon, hipoksik nonkardiojenik pulmoner ödem veya multi organ yetmezliğinin görülebildiği ölümcül potansiyeli olabilecek engraftman sendromunda da benzer proinflamatuvar sitokinlerin (IL-1, TNF- α ve IFN- γ gibi) benzer mekanizmalar ile rolü olduğu gösterilmiştir (Cornell ve ark., 2015). Khandelwal ve ark. çocuklarda yapılan allojenik HKH nakli sonrasında gelişen engraftman sendromunda önce proinflamatuvar sitokinler olan IL-1b, IL-6, IL-12 nin arttığını sonrasında da bunlara yanıt olarak antiinflamatuvar sitokinler olan IL-4 ve IL-13 ün arttığını göstermişler ve olayı başlatan sitokinin IL-1b olduğunu bildirmişlerdir (Khandelwal ve ark., 2016).

Son zamanlarda rolü ve etkisi yeni tanımlanan CD4⁺ T hücrelerinin bir alttipi olan Th22 hücreleri IL-22 ve TNF- α salıverir; STAT-3 fosforilasyonu ile hücre büyümesini tetikler; infeksiyonda, kronik inflamasyonda, tümör gelişiminde, otoimmün hastalıkların

patogenezinde ve hücre gelişiminde rol aldığı bildirilmiştir. Önemli görevlerinden birisi de mikroçevredeki hemopoetik sistem ile hemopoetik olmayan stromal hücreler arası ilişkiye aracılık etmesidir. Bunu da stromal fibroblastların proliferasyonu ve monosit kemoatraktan protein-1 in üretiminde önemli rolü olan ERK1/2 ve p38 MAPK gibi önemli kinazları aktive etmek yolu ile yapmaktadır. Bu yollar ile Th22 ve Th17'nin proinflamatuvar sitokinlerle birlikteliğinin olması inflamatuvar immün reaksiyonun abartılı ve dramatik şekilde yüksekliği ile sonuçlanır (Shao ve ark., 2012; Di ve ark., 2015).

Literatürde IL-22'nin kök hücre ile ilişkisini gösteren sadece bir çalışma bulunmaktadır. Buda Lindemans ve ark. yapmış oldukları bağırsak kök hücresi ile ilgili deneysel çalışmadır. Bu çalışma; bağırsak kök hücrelerinin IL-22 vasıtasıyla hasarlı bağırsaklarda doğal bağışıklık yolunu aktive etmesini, böylece epitel rejenerasyonunu ve proliferasyonunu sağladığını göstermiştir. Ayrıca yazarlar stromal ve epitelyal komponentleri olan bağırsak kök hücresi Niş'inin epitelyum devamlılığı için gerekli olduğuna, doku hasarı sonrası epitelin tekrardan yenilenmesi için aktive olan IL-22'nin de bağırsak kök hücresi Niş'ine immunolojik olarak katkıda bulunduğunu söylemişlerdir (Lindemans ve ark., 2012).

Bilgilerimize göre Th-22 hücrelerinden salıverilen IL-22'nin HKH nakli sonrası ve engraftmanda ne şekilde rol aldığı bu zamana kadar çalışılmamış ve bilinmemektedir. Geçmiş çalışmalarda bakılan IL-1b, IL-4, IL-6, IL-12, IL-13, IL-15, TNF- α ve INF- γ ... gibi sitokinler bu soruya tam olarak cevap vermemiştir. Bu çalışmada HKH nakli yapılan hastalarda nakilin ilk günü, engraftmanın ilk gününde periferal kanda Th22 hücre popülasyonu ile IL-22 ve diğer olası sitokinler olan IL-17, TNF- α ve INF- γ taşıyan hücre sayılarını belirleyip, Th22 hücrelerinin engraftmana katkı sağlayıp sağlamadığını ve/veya engraftman sendromunda rol alıp almadığını öğrenmeyi amaçlıyoruz.

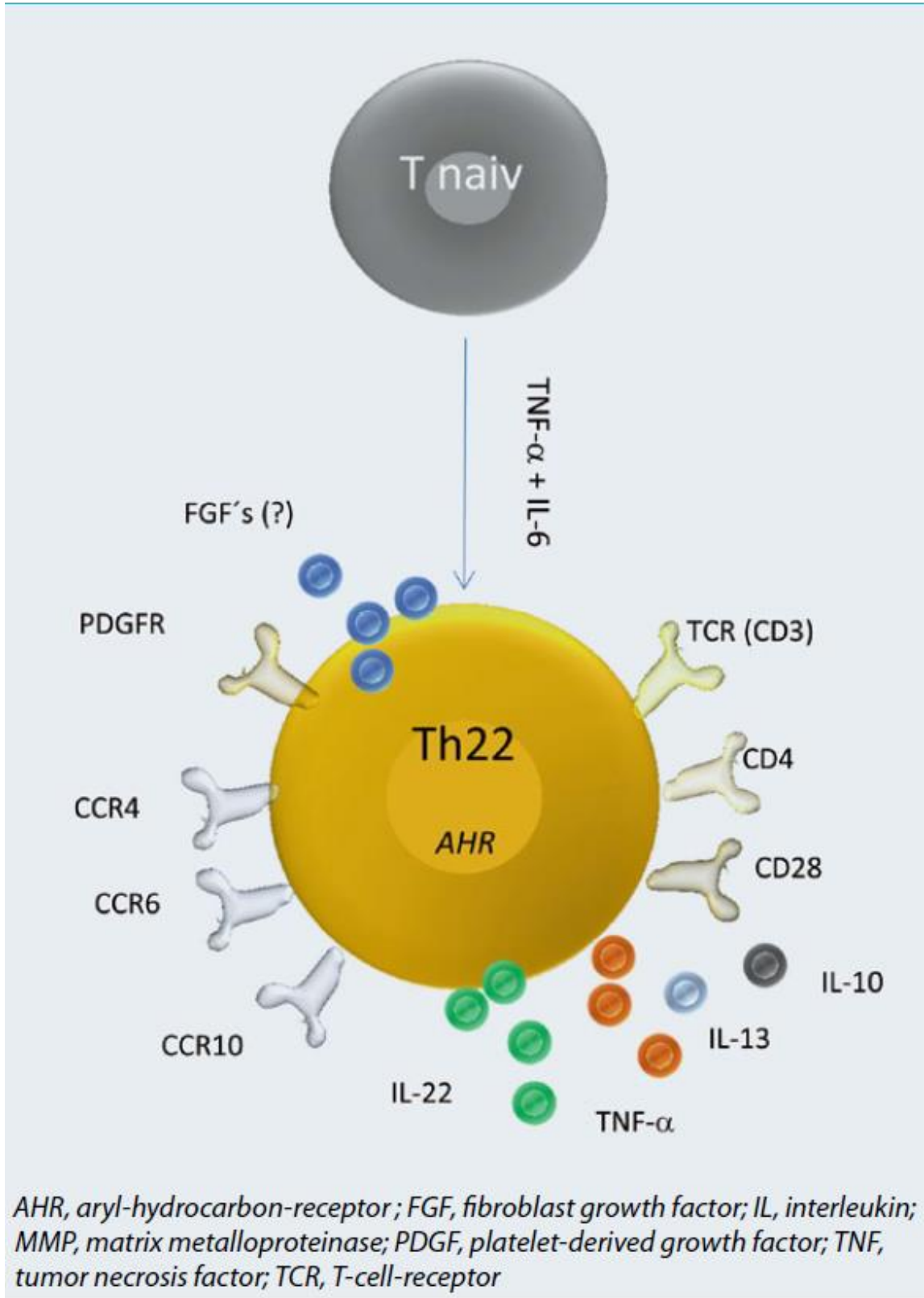
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Th22 Hücreleri

T ve B lenfositler edinsel immüitenin hücresele komponentlerini oluşturur. Kemik iliğinden köken alan T lenfositler, timusta olgunlaşır ve kan dolaşımına geçer. Dolaşımında bulunan lenfositlerin % 60-% 80'i T hücrelerden oluşur. T hücrelerin üçte ikisi CD4, üçte biri CD8 yüzey antijenlerini taşır. Naif CD4 T hücreleri, salgıladıkları sitokinlere göre farklı alt gruplara ayrılırlar. Bunlar Th1, Th2, Th9, Th17 ve Th22 hücreleridir (Trifari ve ark., 2009). 2009 yılında IL-22 salgılayan, Th17 hücrelerinden farklı tipte bir CD4 T hücre alt tipi Trifari ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır. Bu hücreler, Th22 hücreleri olarak adlandırılmıştır. IL-22'nin kaynağının bu T hücre tipi ve Th17 olduğu belirtilmiştir. Th22 hücrelerinin cilde yerleşen CCR4, CCR6 reseptörleriyle birlikte CCR10 reseptörlerini yüzeyinde eksprese ettikleri gösterilmiştir (Trifari ve ark., 2009).

Efektör ve hafıza T lenfositleri farklı dokularda mevcut olan patojenlere karşı koymak zorundadır ve bu nedenle oldukça uzmanlaşmışlardır. Sitokin üretimi ve göç kapasitesi bakımından doğru yerde doğru hücrelerin bu özellikleri bakımından koordineli olarak düzenlenmesi esastır. Efektör CD4⁺ T hücreleri heterojen gruplardır ve sitokin üretimleri ve farklılaşması için gereken transkripsiyon faktörlerine göre sınıflandırılırlar. Th1 farklılaşması interlökin 12 (IL-12) ve transkripsiyon faktörü T-bet ile desteklenir. Th2 farklılaşması ise IL-4 tarafından desteklenir ve GATA-3 transkripsiyon faktörü ekspresyonuna bağlı olarak meydana gelir. Th17 hücreleri ayrı bir alt grup olarak tanımlanmıştır. IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22 ve tümör nekroz faktörü (TNF) üretirler. Th17 farklılaşması IL-6 ile desteklenir. Th17 hücrelerinin farklılaşması retinoid-related orphan C reseptörü (RORs) üzerinden olurken, Th22 hücrelerinin farklılaşması aril hidrokarbon reseptörü üzerinden olmaktadır. STAT3, Th17 transkripsiyon faktörü ROR γ t indüksiyonunda önemlidir. ROR γ t, IL-17 gen transkripsiyonunu tetikler ve IL-23 reseptör ekspresyonunu güçlendirir. IL-21 ve IL-23 ayrıca Th17 farklılaşmasını teşvik ederken, yüksek dozlarda TGF-b, IL-12, IL-4 ve IL-2 inhibe edici bir etki gösterir (Duhon ve ark., 2009).

Th22 hücreleri, naif T hücrelerinden IL-6 ve TNF- α varlığında oluşmaktadır. Th22 hücreleri, CCR4 ve CCR10 reseptörleriyle normal cilde yerleşirler. Ayrıca birçok dermatolojik hastalıkta sayıları artar. Th22 hücrelerinin fenotipi Şekil 2.1.'de verilmiştir (Eyerich ve Eyerich, 2015). IL-22, IL-10 ailesinden bir sitokindir. IL-22 reseptör kompleksi özellikle epitelyal hücrelerde olmak üzere, pankreasta, barsak dokusunda, karaciğerde bulunmaktadır (Sonnenberg ve ark., 2011). IL-22 salgıladığı bilinen T hücre alt tipleri Tablo 2.1'de özetlenmiştir (Eyerich ve Eyerich, 2015). Yukarıda belirtilen kemokin reseptörlerinin yanında Th22 hücreleri, CD3 ve CD4 gibi T yardımcı hücreleri için tüm tipik markerleri ifade eder. Daha karakteristik biçimde trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) reseptörlerini yüksek ifade eder. Bu durumun işlevsel önemi henüz bilinmemektedir. Fas ve TRAIL gibi apoptozisin indüklenmesinde yer alan moleküller Th22 hücrelerinde zayıf şekilde eksprese edilir ve sonuç olarak yakından ilişkili CD8⁺ T22 hücreleri (Tc22 hücreleri), IL-22 negatif hücrelere kıyasla apoptozu indükleme konusunda daha düşük bir kapasiteye sahiptir. Daha önce belirtildiği gibi Th22 hücreleri Th2, veya Th17 hücrelerinin imza sitokinlerini salgılamaz. Bununla birlikte Th22 hücreleri az miktarda IL-13 ve TNF- β birlikte salgırlar. Gen ekspresyon düzeyinde Th22'nin bir fibroblast büyüme faktörü (FGF) ifade ettiği gösterilmiştir. Şimdiye kadar FGF'nin işlevsel olarak ilgili miktarlarda salgılanıp salgılanmadığı araştırılmamıştır (Eyerich ve ark., 2009).



Şekil 2.1. Th22 hücrelerinin fenotipi (Eyerich ve Eyerich, 2015).

Tablo 2.1. IL-22 salgıladığı bilinen T hücre alt tipleri (Eyerich ve Eyerich, 2015).

cell	additional secreted factors	development	transcription factor	surface marker
adaptive immunity				
Th17 [44]	IL-17 IL-21 IL-26 TNF- α (IL-10) CCL20	differentiation: naive T cell plus TGF- β /IL-1 β /IL-6 [45, 46]; amplification: IL-21 [47]; stability: IL-23 [48]	RORC	CD4+ CCR4+ CCR6+ CXCR3- CD161+ IL-23R+ [49, 50]
Th22 [9, 51]	TNF- α IL-13 (IL-10) FGF(?)	naive T cell plus TNF- α /IL-6	AHR(?)	CD4+ CCR4+ CCR6+ CCR10+ PDGFR+
Th1/IL-22	IFN- γ TNF- α (IL-10)	unknown		
Th2/IL-22	IL-4 IL-5 IL-13 IL-22 (IL-10)	unknown		
CD8+ T cell [52]		<i>murine</i> : CD8+ T cell plus TGF- β /IL-6 [53]/IL-1 β /IL-23 [54]	<i>murine</i> : ROR γ t	CD3+ CD8+ CD45RO+
T follicular helper cell [55]	IL-21	naive T cell plus + IL-21 + IL-6 + ICOSL [56]	unknown (BCL6? [57])	CD4+ ICOS+ CXCR5+
innate immunity				
ILC1	IFN- γ	ID2+ precursor cell (?)	Tbet	LIN-CD56+NKp46+NKp30+NKp44+IL-7Ra <i>murine</i> : LIN-Thy1+SCA1+
ILC1 - NK	IFN- γ , TNF	ID2+ precursor cell (?)	Tbet, Eomes	CD122+NKG2D+CD161+KIR+ <i>murine</i> : NKp46+NK1.1+CD122+NKG2D+CD161+CD16+CD11b+
ILC2	IL-5, IL-9, IL-13, IL-4	ID2+ precursor cell (?)	GATA3	LIN-IL-7Ra+CD45hiCD161+CRTH2 <i>murine</i> : LIN-ICOS+SCA1+IL-7Ra+
ILC3 [10]	IFN- γ , TNF	ID-2+ precursor cell (?)	ID-2 (?)	LIN-CD56+NKp46+NKp30+NKp44+IL-7Ra+ <i>murine</i> : LIN-NKp46+
Lti (to ILC3) [59]	IL-5, IL-9, IL-13, IL-4	unknown (NK cell?)	RORC, AHR	LIN-IL-7RaHiCD45int <i>murine</i> : NKp46-
NKT [58]	IL-17, IL-22 LT- α , LT- β	lymphoid precursor cell	ROR	CD3+ CD56+ CD161+ CD16+
$\gamma\delta$ T-cell [60]	IL-17 IFN- γ	naive T cell		CD3+CD4+ $\gamma\delta$ TCR+ <i>murine</i> : CD3+ CD4-CD8- CD27- [61] CD25+ CD122- [62]

Th22 hücrelerinin genel fenotipi dokuda, özellikle de ciltte koruyucu bir role işaret eder. Bu durum özellikle IL-22 fonksiyonu ile temsil edilir. IL-22, IL-10R β ve IL-22RA zincirinden oluşan bir heterodimerik reseptöre bağlanır. IL-22 reseptörü (IL-22R) epitel hücrelerde güçlü ve bol bir şekilde eksprese edilirken, immün hücrelerde IL-22R yoktur (Wolk ve ark., 2004). Bu nedenle Th22 hücreleri uyarlanabilir bağışıklık ile bariyer organları arasında fonksiyonel özelliklerinin “doku sinyal lökositleri” olmasına yol açan önemli bir bağlantı oluşturur (Eyerich ve ark., 2010). Reseptörüne bağlanarak IL-22 hedef hücrenin proliferasyonunu ve göçünü indükler ve aynı anda apoptoza farklılaşmayı ve reaktiviteyi inhibe eder (Boniface ve ark., 2005). Bu etkilerin bir kombinasyonu etkili yara iyileşme reaksiyonları için temel oluşturur. Gerçekten de Th22 hücrelerinin yara iyileşme reaksiyonlarında önemli aktörler olduğu gösterilmiştir (Eyerich ve ark., 2009). Bu olumlu özellik düzenleyici mekanizmalar eksikse patolojik hale gelebilir. Çok fazla IL-22 etkisi keratinositlerde aşırı aktive metabolizma ile birlikte psoriatik bir fenotipe yol açabilir, bu da akantoz ve hiperkeratozla sonuçlanır (Zheng ve ark., 2007). Ek olarak bazı durumlarda özellikle (pre)-maligniteler ve hücre içi enfeksiyonlar durumunda bir epitelyal hücreyi apoptozdan korumak faydalı olmayabilir. Buna paralel olarak Th22 hücrelerinin gastrointestinal tümörler üzerinde olumsuz etkileri olduğu bildirilmiştir (Zhuang ve ark., 2012). Tümörlerde, IL-22'nin koruyucu fonksiyonu ek olarak bilinen bir apoptoz ve tümör yaşlanmasının indükleyicisi olan IFN- γ ile doğrudan bir antagonizm ile güçlendirilir (Pennino ve ark., 2013). Bu nedenle IL-22'nin kesin düzenlenmesi önemsizdir ve esas olarak çözünür bir antagonist IL-22 bağlayıcı protein (IL-22BP) aracılığıyla gerçekleşir (Xu ve ark., 2001).

2.2. Hematopoetik Kök Hücre Nakli

Kök hücre nakli birkaç farklı tekniği kapsayan genel bir terimdir. Allojenik nakiller için hematopoetik kök hücreler bir aile üyesi ya da akraba dışı bir gönüllü olabilen HLA tipi için uygun sağlıklı bir donörün kemik iliğinden, periferik kandan veya göbek kordon kanından alınır. Otolog nakillerde kök hücreler hastanın kendi kemik iliğinden veya periferik kanından alınır (Lennard ve Jackson, 2001). Hematopoetik kök hücre nakli (HSCT) tıptaki en eşsiz prosedürlerden biridir. Bugün HSCT hematolojik maligniteler, hematopoetik sistemin konjenital veya edinilmiş bozuklukları için bir standart haline gelmiştir ve ayrıca bazı katı tümörlerde terapötik bir seçenek olarak uygulanmaktadır.

Son yirmi yıl boyunca HSCT kullanımı dünya çapında genişlemiş ve teknolojisinde gelişmiştir. Günümüzde HSCT otoimmün ve kalıtsal metabolik bozukluklar gibi yeni endikasyonlar için kullanılmaktadır (Henig ve Zuckerman, 2014).

İlk insan kemik iliği transfüzyonu 1939'da aplastik anemili bir hastaya verilmiştir (Osgood ve ark., 1939). Bu hasta günlük kan transfüzyonları aldı, lökosit ve trombosit sayısını arttırma girişiminde intravenöz kemik iliği enjeksiyonu yapıldı. II. Dünya Savaşı ve atom bombasının kullanılmasından sonra araştırmacılar radyasyona maruz kalmanın neden olduğu aplazilerde kemik iliği fonksiyonunu geri kazanmanın yollarını bulmaya çalıştılar. 1950'lerde, bir fare modelinde radyasyona sekonder ilik aplazisinin sinjenik ilik grefti ile üstesinden gelinebileceği kanıtlandı (Rekers ve ark., 1950). İlk allojenik HSCT (mevcut durumuna öncülük eden) E. Donnall Thomas tarafından öncülük edildi ve 12 Eylül 1957'de New England Tıp Dergisi'nde rapor edildi. Ancak o yıllarda HLA (insan lökosit antijenleri) bilinmediğinden sonuçlar başarılı değildi. Ancak E. Donnall Thomas uzun yıllar çalışmaya devam edtti. E. Donnall Thomas insan hastalığının tedavisinde hücre nakli alanındaki keşiflerinden dolayı Nobel Ödülü kazandı (Thomas ve ark., 1957). 1974 yılında HSCT alanında Avrupa işbirliği için Avrupa Kan ve İlik Nakli Grubu (EBMT) kuruldu. Akraba dışı ilk bağış nakil 1986'da National Marrow Donor Program (NMDP) ve 1988'de Bone Marrow Donors Worldwide (BMDW) kuruluşuna ilham verdi. Bu kuruluş, 73 ülkede kayıtlı 23 milyondan fazla bağışçıyı ve 32 ülkede kordon kanı bankalarından 600.000 kordon kanı ünitesini birleştirmektedir (Henig ve Zuckerman, 2014).

Allojenik HSCT'de bir kök hücre donörü bir eşleşmiş ilişkili kardeş veya bir haploidentical (kısmen eşleşmiş) aileden akrabası olabilir. Kök hücre greftleri ilgisiz bir gönüllüden veya dondurarak korunmuş bir kordon kan ünitesinden de elde edilebilir. Mevcut gönüllü bağışçıların ve kordon kanı ünitelerinin sayısı sürekli artmaktadır ve 1989'da kayıtlı 200.000 bağışçı şimdi 23 milyondan fazla artmıştır (Henig ve Zuckerman, 2014). Allojenik kök hücre nakli yeterli şartlara sahip bir tesisteki (hasta çevre izolasyonu, hücresel işlem nakli laboratuvarı, aferez ünitesi) bir tesiste uzman sağlık personeli tarafından gerçekleştirilir. Hem tıbbi hem de psikolojik hasta hazırlığı tam ve eksiksiz olmalıdır. Transplantasyon sonrası hasta takibi multidisipliner bir ekip

tarafından nitelikli bir yönetim gerektirmektedir. Solid organ nakillerinde olduğu gibi süreç kök hücre toplama işlemi için tıbbi bir prosedür geçirmesi gereken sağlıklı bir gönüllü hazırlığı ve bakımını içerir. Bununla birlikte allojenik HSCT hala belirgin morbidite ve mortalite ile ilişkilidir ve yüksek maliyetler içerir (Khera ve ark., 2014).

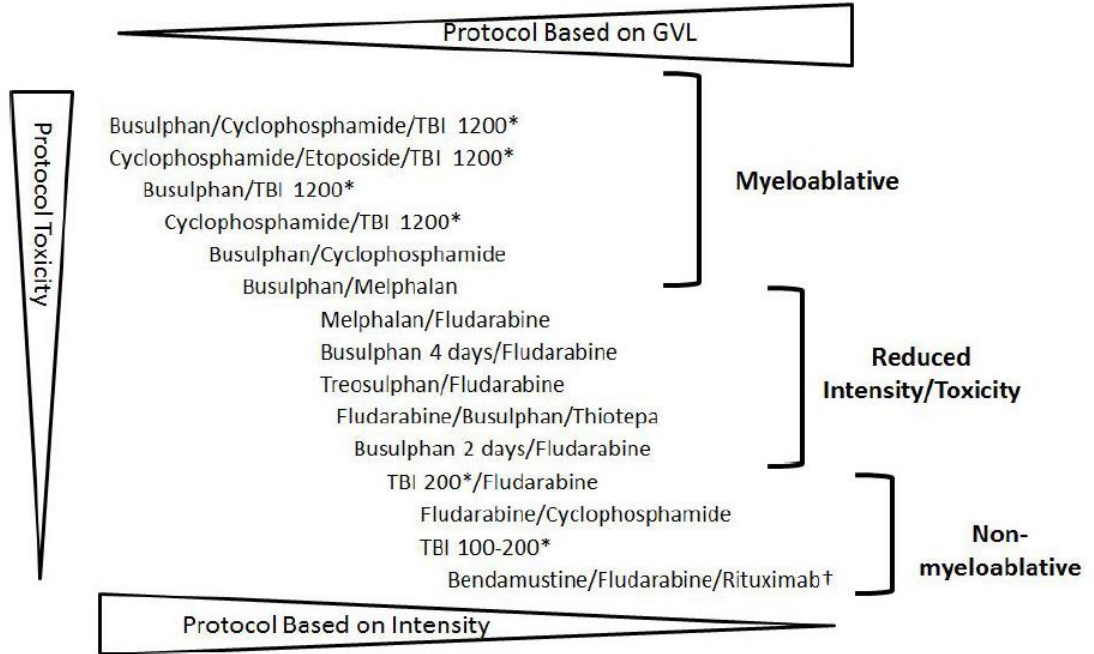
Otolog HSCT bugün Avrupa'da yapılan transplantasyonların %58'ini oluşturmaktadır. Otolog HSCT'nin % 47'si Multipl Miyelom, Non Hodgkin Lenfoma için %30, Hodgkin Lenfoma için %11 ve lösemiler için %3 olarak gerçekleştirilmektedir. Otolog HSCT için diğer daha az görülen endikasyonlar arasında otoimmün hastalık (multipl skleroz, sistemik skleroz ve Crohn hastalığı) ve solid tümörler (sarkom, germinal tümörler ve nöroblastom) bulunur. Akut Miyeloid Lösemi ve Akut Lenfoblastik Lösemi allojenik HSCT'nin % 50'sini, Miyelodisplastik Sendrom ve miyeloproliferatif neoplazmaların %15'i ve kemik iliği yetmezliği sendromununun % 6'sını oluşturur. Allojenik HSCT için diğer daha az görülen endikasyonlar arasında lenfoma, miyelom ve aplastik anemi ve talasemi gibi hematolojik bozukluklar bulunur (Pasquini ve Wang, 2013). Tablo 2.2'de otolog ve allojenik kök hücre transplantasyonu için güncel endikasyonlar özetlenmiştir.

Tablo 2.2. Otolog ve allojenik kök hücre transplantasyonu için güncel endikasyonlar (Henig ve Zuckerman, 2014).

	Autologous Transplantation*	Allogeneic Transplantation†
Malignancies	Multiple myeloma Non-Hodgkin lymphoma Hodgkin disease Acute myeloid leukemia Neuroblastoma Ovarian cancer Germ-cell tumors	Acute myeloid leukemia Acute lymphoblastic leukemia Chronic myeloid leukemia Myelodysplastic syndromes Myeloproliferative neoplasms Non-Hodgkin lymphoma Hodgkin disease Multiple myeloma Juvenile chronic myeloid leukemia
Non-malignant disorders	Autoimmune disease Amyloidosis	Aplastic anemia Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria Fanconi's anemia Diamond-Blackfan anemia Thalassemia major Sickle cell anemia Severe combined immunodeficiency Wiskott-Aldrich syndrome Inborn errors of metabolism Congenital neutropenia syndromes

*More than 30,000 autologous transplantations are performed annually worldwide, two-thirds for multiple myeloma or non-Hodgkin lymphoma. †More than 24,000 allogeneic transplantations are performed annually worldwide, more than half for acute leukemias.

Kök hücre transfüzyonundan önce kemoterapinin veya kombine kemoterapinin ve radyoterapinin hazırlayıcı rejimi rezidüel tümörün yok edilmesinde ve greft reddinin engellenmesinde, hastanın bağışıklık sisteminin baskılanmasında rol oynar. Klinik çalışmalardan elde edilen verilere dayanarak her endikasyon için spesifik rejimler vardır. Rejimler yoğunluk düzeylerine göre tam miyeloablatif, azaltılmış toksisite veya düşük yoğunluklu ve non-miyeloablatif olanlar olarak kategorize edilir (Şekil 2.2). İlk allojenik HSCT'ler, 1,000-1,600 Rad'lik dozlarda toplam vücut ışınlamasına (TBI) dayanıyordu. Hem anti-tümör aktivitesini hem de immün supresyonu artırmak için daha sonra siklofosfamid (Cy) eklenmiş ve bu da engraftmanı kolaylaştırmıştır. Ayrıca, siklofosfamid ve busulfanın transplant ile ilişkili daha düşük bir mortalite ve AML'de TBI / Cy rejimine kıyasla daha iyi bir hastaliksız hayatta kalma sağladığı bulunmuştur. Yüksek toksisite oranı ve düşük bir mortalite bu rejimlerin kullanımını 50 yaşına kadar olan genç ve zinde hastalarla sınırlandırmıştır (Henig ve Zuckerman, 2014).



Şekil 2.2. Hazırlık rejimi yoğunluğu (Henig ve Zuckerman, 2014).

2.3. Hematopoetik Kök Hücre Nakillerinde Hücrel İmmünoterapinin Kullanımı

Son yıllarda araştırmalar hastalığın nüks oranını azaltma stratejileri üzerinde odaklanmıştır. Graft-versus-Host Hastalığının (GVHD) minimize edilmesiyle greft immün aktivitesini Graft-versus-lösemiye (GVL) yönlendiren yöntemler allojenik

HSCT'de bir sonraki atılımı teşvik edebilecek yeni ve heyecan verici bir yönü temsil etmektedir. Graft-versus-lösemi esas olarak donör T lenfositlerin kalıntı veya relaps lösemik hücrelere karşı immün tepkisine ve ayrıca doğal katil (NK) hücrelerinin ve B lenfositlerinin immün tepkisine atfedilir (Wu 2008).

2.3.1. Düzenleyici T Hücre İnfüzyonu

İnsan doğal düzenleyici T hücreleri (Treg'ler) timustan türetilir. Yüksek seviyelerde CD25 (interlökin 2 reseptör α) ve bir ana anahtar transkripsiyon faktörü olan hücre içi Foxp3 ifade eder. Treg'lerin kemik iliği naklinin hayvan modellerinde immün toleransı indükleyebildiği, böylece GVL'yi engellemeden GVHD'yi önleyebildiği gösterilmiştir (Joffre ve ark., 2004). Bir çalışmada yüksek riskli hastalarda allojenik HSCT sonrası nüksü önlemek için immün baskılanmayı durdurduktan sonra önleyici Treg DLI yapılmıştır (Edinger ve Hoffmann, 2011). Başka bir çalışmada bir donörden Treg DLI allojenik HSCT sonrası aktif kronik GVHD tedavisi olarak verilmiştir (Trzonkowski ve ark., 2009). Haploidentical HSCT ayarında yapılan diğer iki çalışmada, Tregler, geleneksel T infüzyonu ile birleştirilmiş bir T cell depletion (TCD) kök hücre greftinin transfüzyonundan birkaç gün önce infüze edilmiştir. Treg ve Tcon oranı 2: 1 idi ve çalışmanın amacı Treg'leri tek GVHD profilaksisi stratejisi olarak kullanmak ve hastalık nüks oranını arttırmadan immün sulandırmayı iyileştirmenin bir yolu olarak kullanmaktır (Di Ianni ve ark., 2011; Martelli ve ark., 2014). Bu çalışmalarda GVHD ve nüks oranları tarihsel kontrollere göre daha düşükken, nüksüz mortalite hala yetersizdir.

2.3.2. Doğal Katil Hücre Adoptif İmmünoterapi

TCD haploidentical HSCT'de, hematopoetik kök hücrelerin farklılaşmasından türetilmiş olgun tamamen işleyen NK hücrelerinin, alıcının periferik kanında allografttan sadece birkaç hafta sonra ortaya çıktığı, transplant sonrası erken dönem olgunlaşmamış zayıf NK hücrelerinin baskın olduğu gösterilmiştir (Pende ve ark., 2009). Bu nedenle haploidentical NK alloreaktif bağıl donörlerden allogreft alan hastalar transplant sonrası erken dönemde NK aracılı GVL etkisinden faydalanamazlar. Bu greft yetmezliğini önleme ve GVHD'yi arttırmadan GVL etkisini artırmak amacıyla donör NK hücrelerinin (nakil sonrası 4. günde, 30. günde ve 100. günde) önleyici infüzyonunun bir faz II çalışmasında araştırılmıştır. Tarihsel kontrollerle karşılaştırıldığında greft yetmezliği

veya hastalık nüksünün önlenmesinde bir avantaj yoktu. Bununla birlikte, bu tedavi güvenli ve uygulanabilir bir yöntemdir ve NK hücresi dozu, zamanlaması ve transfeksiyonundan önce NK hücrelerinin aktivasyonu için ihtiyaç konusunda daha fazla araştırılmalıdır (Pende ve ark., 2009).

2.3.3. Anti-Tümör Aşılama

Spesifik tümörle ilişkili antijenlere veya tüm tümör hücresine karşı hedeflenen otolog prime edilmiş T hücreleri, akut miyeloid lösemide (Wilms tümör ile ilişkili antijen 1, WT1), kronik miyeloid lösemide (BCR-ABL peptidi epitopları) ve miyelomda (dendritik hücre / miyelom füzyon hücreleri) test edilmiştir. Allojeneik HSCT ortamında immünojenik hedefler ve immünizasyon stratejileri bulmak için daha fazla deneme yapılması gerekir. Asıl sınırlama aşı prosedürlerinin sağlıklı bir donörde yapılması gerekliliğidir. Verici T hücrelerinin kullanıma hazırlanması ve genişletilmesi, hastanın TAA'sına karşı ex vivo olarak, hastanın kendisini aşılama sorununu çözecektir. Ancak bu çok yüksek maliyetler gerektirecektir (Henig ve Zuckerman, 2014).

2.3.4. Kimerik Antijen Alıcıları

Kimerik antijen reseptörleri (CARs), hem antijen bağlama hem de T hücresi aktivasyon fonksiyonları sağlayan rekombinant reseptörlerdir. CAR'ların T hücrelerine mühendisliği, T hücrelerinin gen transdüksiyonu ve stabil klonal genişlemeye izin vermek için kültürlenmesini gerektirir. Herhangi bir hücre yüzeyi molekülü bir CAR ile hedeflenebilir. Mevcut CAR'ler, sadece hücre yüzeyi antijenlerini tanımakla sınırlıdır (T hücre reseptörleri, hem hücre yüzeyini hem de hücre içi proteinleri tanır). Bununla birlikte, CARs, HLA tarafından antijen işleme ve sunumu gerektirmez. Ayrıca CAR'ler, HLA ekspresyonunu aşağı regüle eden veya TCR aracılı immüniteden tümörün kaçmasına katkıda bulunan iki mekanizma olan proteasomal antijen işleme kullanan tümör hücrelerini hedefleyebilir. Bugüne kadar en çok araştırılan hedef, B hücreli lenfosit ve ondan kaynaklanan malignitelerde bulunan CD19'dur. Refrakter hastalığı olan hastalarda umut verici sonuçlar veren çalışmalarla birlikte bazı faz I – II çalışmaları yapılmıştır (Kochenderfer ve ark., 2010; Porter ve ark., 2011). Akut miyeloid lösemi hücrelerinde bulunan CD123'e karşı umut verici CAR'ler gibi prelinik ortamda yeni hedefler araştırılmaktadır (Mardiros ve ark., 2013; Tettamanti ve ark., 2013). Kimerik

antijen reseptörü T hücresi adaptif tedavinin büyük bir potansiyeli var gibi gözükmektedir ve en iyi etkisi allojenik HSCT ortamında olabilir.

2.3.5. Antiviral Sitotoksik Hücre Hatları

Virial enfeksiyonlar transplantasyonda, özellikle pediatrik hastalarda ve özellikle TCD haploidentik transplantasyonunda ve Umbilical cord blood (UCB) transplantasyonunda önemli bir morbidite ve mortalite nedenidir. Etkili tedaviler refrakter enfeksiyonlarda sınırlıdır ve sıklıkla önemli yan etkilerle ilişkilidir. Virüs reaktif T hücrelerinin adoptif transferi, antiviral immüneyi yeniden oluşturmak için bir araç sunar ve bu yaklaşım, sitomegalovirüs, Epstein-Barr virüsü ve adenovirüs enfeksiyonlarını önlemek ve tedavi etmek için başarıyla kullanılmıştır. Adoptif antiviral sitotoksik T hücre hatları on yıldan uzun bir süredir etkin bir şekilde kullanılmaktadır. Bununla birlikte bu terapi “iyi üretim uygulamaları” tesisi gerektirmektedir (Leen ve Heslop, 2008).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Olgular

Çalışma için hasta grubu Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Erişkin Kök Hücre Nakil Ünitesine Hemopoetik Kök Hücre Nakli için alınıp takip edilen (n: 10; 4erkek -6kadın, ortalama yaş 57,5±11,5) hastalardan oluşturulmuştur. Hasta grubuna ait heparinize periferik kan örnekleri, nâkilin ilk günü ve engraftmanın ilk gününde Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Erişkin Kök Hücre Nakil Ünitesi'nden alınmış ve deney aşamaları Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı Akım Sitometri Birimi'nde gerçekleştirilmiştir.

3.2. Deneyleerde Kullanılan Kimyasallar

3.2.1. PBS (Fosfat Tampon Tuz Çözeltisi)

PBS (Sigma-Aldrich, USA), hücre canlılığını koruyan izotonik bir çözelti (Ph=7,4) olup, hücre süspansiyonu hazırlama ve hücre yıkamada kullanılmaktadır.

3.2.2. Histopaque-1077

Lenfositlerin ve diğer mononükleer hücrelerin saflaştırılmasında bir yoğunluk ortamı oluşturmak için kullanılır. Histopaque 1077(Cegrogen Biotech), 1.077 +/- 0.001 g / ml yoğunluğa ayarlanmış bir polisükroz ve sodyum diatrizoat çözeltisidir. Bu besiyeri canlı lenfositlerin küçük miktarlarda tam kandan hızlı bir şekilde geri kazanılmasını kolaylaştırır.

3.2.3. Fiksasyon, Permeabilizasyon Kiti ve Golgi Stop

Fiksasyon & Permeabilizasyon Kiti (BD Biosciences San Diego, USA) hücre içi stoplazmik proteinleri boyamak için tasarlanmıştır. Hücre yüzeyini sabitlemek için 1x konsantrasyon da ki 125 ml'lik fiksasyon çözeltisi kullanılmaktadır. Permeabilizing çözeltisi ise 10X konsantrasyondadır ve kullanılmadan önce 1:10 oranında distile suyla sulandırılır. İlk aşamada proteinlerin çapraz bağlanmasını sağlayarak fikse etmek için fiksasyon tampon kullanılırken, ikinci aşamada ise hücre membran içerisinde porlar açmak için permeabilizasyon tampon kullanılır.

3.3. Periferik Kan Mononükleer Hücre Eldesi (PKMH)

Heparinli tüpe alınan 7 ml periferik kan örneği 50 ml'lik falcon tüp içerisinde 1:1 oranında PBS ile sulandırıldı. Aynı bir 50 ml'lik falcon tüpe 3 ml Histopaque 1077 koyulup, PBS ile sulandırılmış kan pipet yardımıyla yavaşça ficoll ile örnek birbirine karışmayacak şekilde sızdırılarak falconun yan duvarından bırakıldı. Örnekler 1800 rpm de 20 dakika santrifüj edilip ficoll ile plazma arasındaki beyaz bulutumsu tabaka, pastör pipeti ile 15 ml'lik konik tabanlı falcon tüpe aktarıldı. Üzeri 15 ml PBS ile tamamlanıp 2500 rpm de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası sıvının üst kısmı uzaklaştırılıp 100 ul'de 100.000 PKMH olacak şekilde PBS ile sulandırılarak ayarlanıp 200 ul 12x75 mm falcon içine aktarılır. PMA 10 µg/ml (Sigma-Aldrich), İyonomisin 5 µg/ml (Sigma-Aldrich) ve Monensin 7 µg/ml (BD Bioscience) eklenerek %5 CO₂ içeren etüve konarak 4 saat inkübe edildi.

3.4. Hücre Yüzey Molekülü ve Hücre İçi Sitokin Belirlenmesi

Hücreler, %5 CO₂ içeren etüvede 4 saat inkübe edildikten sonra 2 ml PBS eklenerek 500g de 5 dk santrifüj edildi. Hücre pelleti+PBS 100ul kalacak şekilde süpernatant aspire edildi. PMKH'lerinde yüzey boyaması yapılarak CD3⁺ ve CD4⁺ T hücre popülasyonunda hücre içi IL-22, IL-17A, TNF- α ve IFN- γ taşıyan hücre sayıları akan hücre ölçer cihazı ile tespit edildi. (Facs CantoII, Becton Dickinson)

3.4.1. Hücre Yüzey Boyaması

Anti-CD3 FITC (Becton Dickinson), -CD4 APC-H7 (Becton Dickinson) ve -CD45 V-450 (Becton Dickinson) işaretli monoklonal antikorlar süspansiyon üzerine eklenerek 15 dk karanlıkta oda ısısında inkübe edildi. İnkübasyonu takiben üzerine 2mL PBS eklenerek 500g de 5 dk santrifüj edilip hücre içi boyama yapıldı.

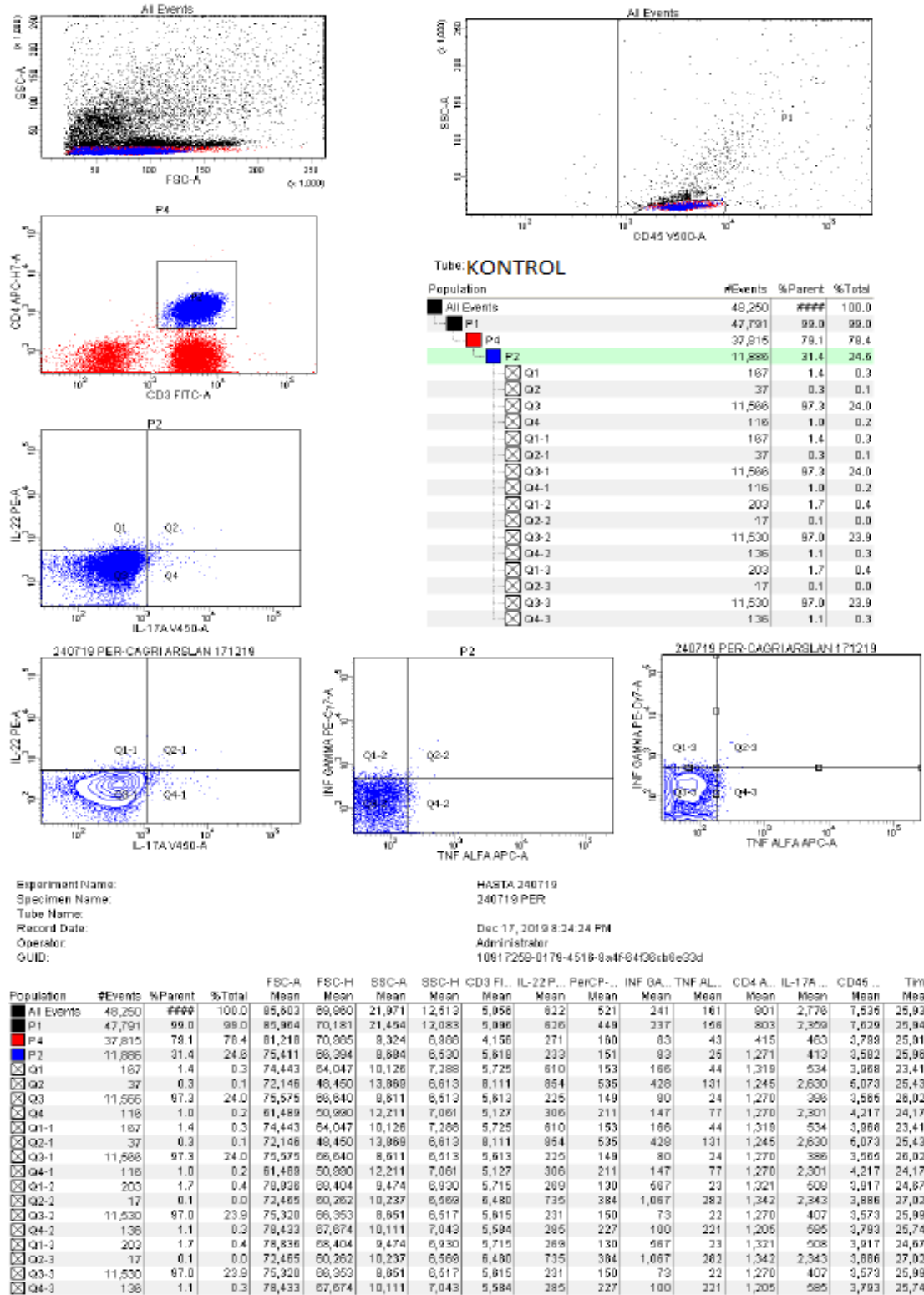
3.4.2. Hücre İçi Boyama

Hücre içi sitokin düzeyinin belirlenmesinde Fiksasyon & Permeabilizasyon Kit (BD Biosciences San Diego, USA) kullanıldı. Bunun için üst sıvı uzaklaştırılıp 500 ul 1X Fiksasyon & Permeabilizasyon solüsyonu eklenerek vortex ile karıştırıldıktan sonra 20 dk karanlıkta oda ısısında inkübe edildi. Bu işlemde sonra tüp içine 1X perm wash bufferdan 2 ml eklenerek 10 dk karanlıkta oda ısısında inkübe edilip 500g de 5 dk santrifüj edildi. Üst sıvı uzaklaştırıldıktan sonra IL-22 PE (eBioscience), IL-17A V-450

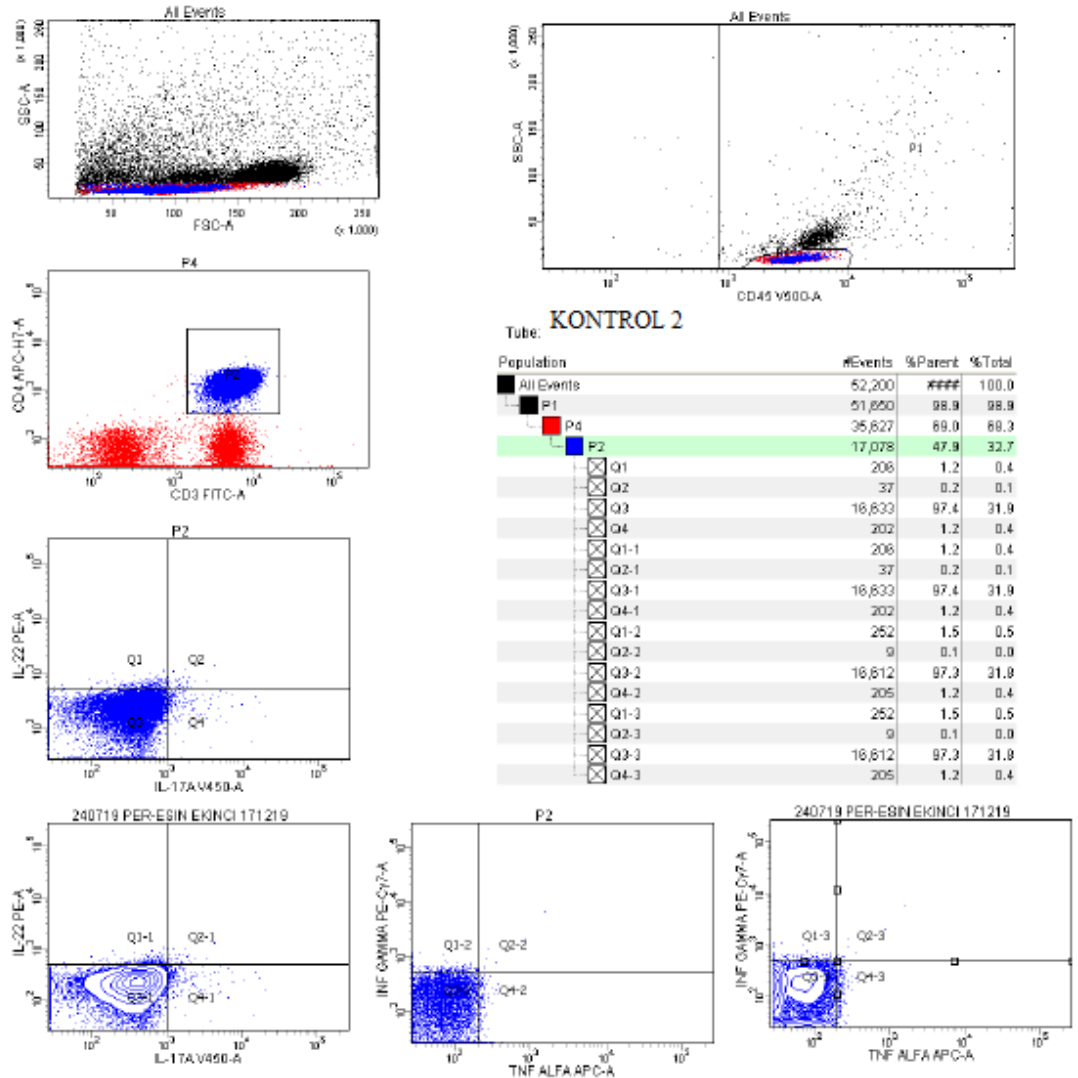
(Becton Dickinson), TNF- α APC (Becton Dickinson) ve IFN- γ PE-Cy7 (Becton Dickinson) monoklonal antikorları ilave edilip vortexlendikten sonra 30 dk karanlıkta oda ısısında inkübe edildi. İnkübasyondan sonra tüplere 2 ml 1X perm wash buffer eklenerek 500g de 5 dk santrifüj edildi. Üst sıvı uzaklaştırılıp üzerine 500 μ l BDcellwash sıvısı eklenerek örnekler akan hücre ölçer cihazında değerlendirildi. Th22 hücre profilinin belirlenmesinde; CD45-yandan saçılım (Side scatter, SSC) grafiğinde lenfositler kapıldıktan sonra CD3+ ve CD4+ yardımcı T hücreleri kapılanarak IL-22, IL-17A TNF- α ve IFN- γ taşıyan hücre sayıları değerlendirildi.

Periferik kan mononükleer hücreler (PKMH) PMA, iyonomisin ve monensin varlığında in vitro koşulda 4 saat inkübe edildikten sonra IL-22, IL-17, TNF- α ve INF- γ 'nın hücre içi sayıları akan hücre ölçer ile değerlendirildi.

Tüm istatistiksel analizler için SPSS 24 programı (Şikago, ABD) kullanıldı. Kategorik değişken karşılaştırması ve aralarındaki istatistiksel farklılık için Pearson Ki Kare analizi kullanıldı. Her iki grup sayısal verilerin karşılaştırması için nonparametrik analizlerden Mann-Whitney U Testi; hasta grubu 0. gün ve engraftman zamanı sayısal verilerin karşılaştırmasında ise Wilcoxon testi kullanıldı. Her iki yönlü p değerinin < 0.05 olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



Şekil 3.1. Kontrol (1) Akan Hücre Ölçer Analiz



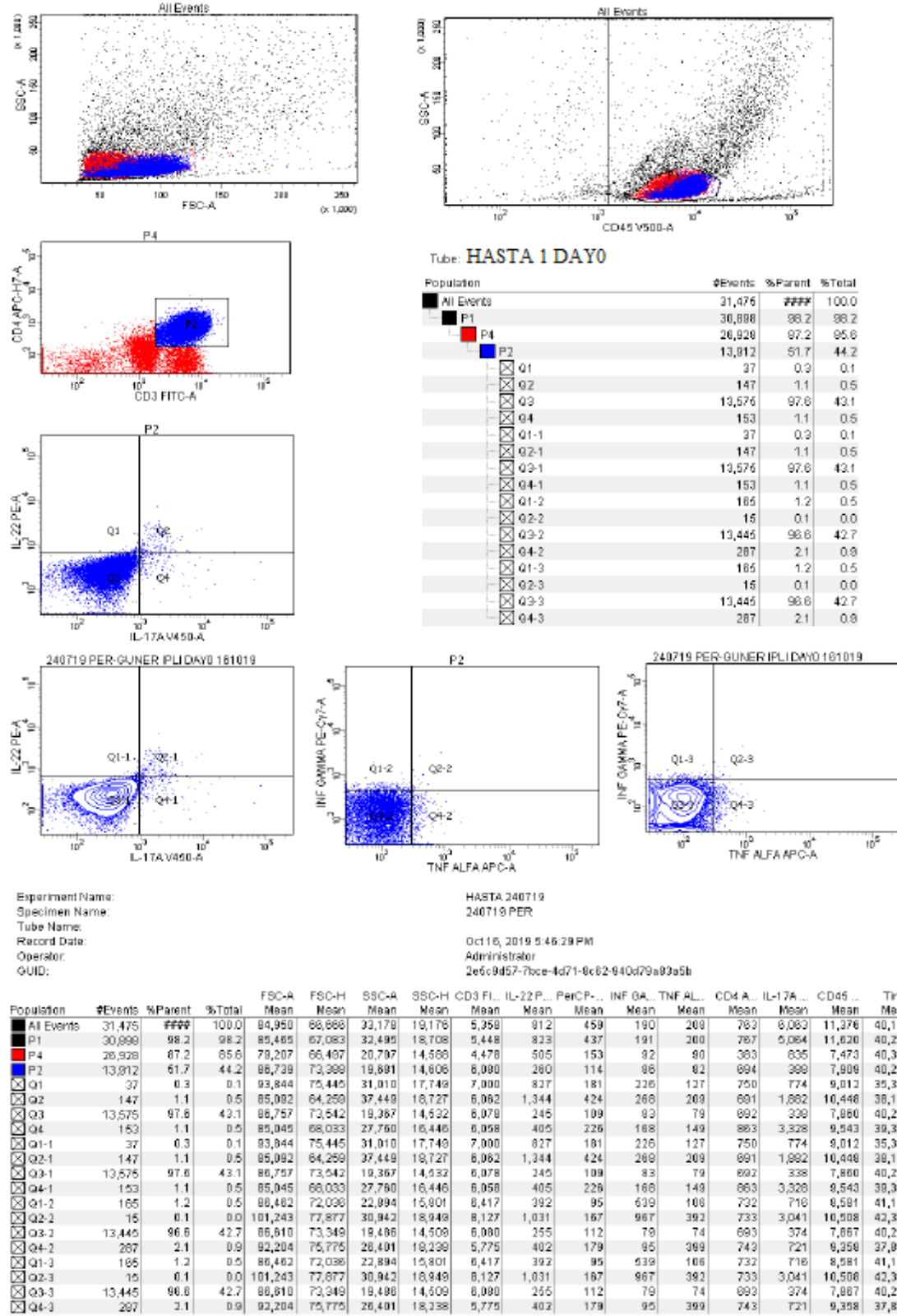
Tube: **KONTROL 2**

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	52,200	###	100.0
P1	51,650	98.9	98.9
P4	35,627	68.0	68.3
P2	17,078	47.9	32.7
Q1	206	1.2	0.4
Q2	37	0.2	0.1
Q3	16,633	97.4	31.9
Q4	202	1.2	0.4
Q1-1	206	1.2	0.4
Q2-1	37	0.2	0.1
Q3-1	16,633	97.4	31.9
Q4-1	202	1.2	0.4
Q1-2	252	1.5	0.5
Q2-2	9	0.1	0.0
Q3-2	16,612	97.3	31.8
Q4-2	205	1.2	0.4
Q1-3	252	1.5	0.5
Q2-3	9	0.1	0.0
Q3-3	16,612	97.3	31.8
Q4-3	205	1.2	0.4

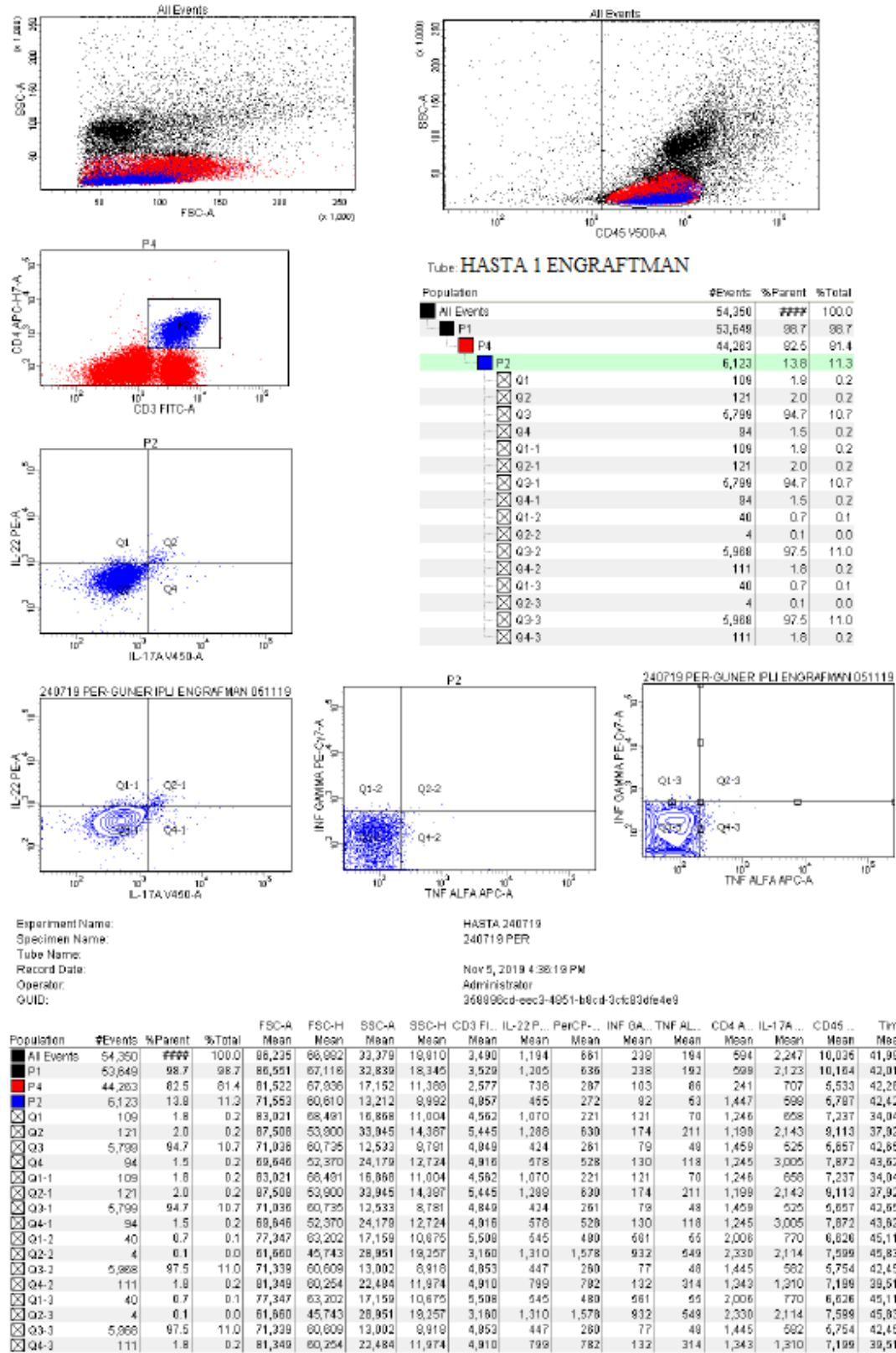
Experiment Name: HASTA.240719
 Specimen Name: 240719 PER
 Tube Name:
 Record Date: Dec 17, 2019 8:02:55 PM
 Operator: Administrator
 GUID: d17d8097-f4a9-4398-8599-bca90w532610

Population	#Events	%Parent	%Total	FSC-A Mean	FSC-H Mean	SSC-A Mean	SSC-H Mean	CD3 FL Mean	IL-22 P... Mean	PerCP... Mean	INF GA... Mean	TNF AL... Mean	CD4 A... Mean	IL-17A... Mean	CD45... Mean	Time
All Events	52,200	###	100.0	108,492	99,699	23,098	13,143	4,862	669	449	214	137	753	2,422	6,469	25,292
P1	51,650	98.9	98.9	110,183	90,269	22,450	12,617	4,703	672	406	215	134	759	1,845	6,562	25,308
P4	35,627	68.0	68.3	82,918	61,560	8,974	6,830	4,352	236	162	82	39	704	431	3,611	25,408
P2	17,078	47.9	32.7	90,204	79,626	8,891	6,696	6,293	223	157	87	26	1,454	392	3,646	25,399
Q1	206	1.2	0.4	88,780	77,358	10,506	7,718	5,945	592	154	172	45	1,486	541	4,101	23,810
Q2	37	0.2	0.1	76,865	60,682	15,422	7,324	6,322	660	255	313	124	1,318	1,511	6,046	22,033
Q3	16,633	97.4	31.9	90,343	79,902	8,613	6,665	6,242	217	157	85	25	1,455	369	3,626	25,423
Q4	202	1.2	0.4	82,730	70,820	12,054	7,988	5,732	282	169	135	62	1,350	1,069	4,340	25,703
Q1-1	206	1.2	0.4	88,780	77,358	10,506	7,718	5,945	592	154	172	45	1,486	541	4,101	23,810
Q2-1	37	0.2	0.1	76,865	60,682	15,422	7,324	6,322	660	255	313	124	1,318	1,511	6,046	22,033
Q3-1	16,633	97.4	31.9	90,343	79,902	8,613	6,665	6,242	217	157	85	25	1,455	369	3,626	25,423
Q4-1	202	1.2	0.4	82,730	70,820	12,054	7,988	5,732	282	169	135	62	1,350	1,069	4,340	25,703
Q1-2	252	1.5	0.5	91,401	80,494	9,054	6,997	6,394	250	97	693	30	1,491	423	3,771	24,435
Q2-2	9	0.1	0.0	76,322	65,644	10,849	6,615	7,913	703	347	1,540	462	1,817	1,281	5,398	22,228
Q3-2	16,612	97.3	31.8	90,176	79,610	8,675	6,666	6,232	222	157	79	23	1,454	360	3,640	25,447
Q4-2	205	1.2	0.4	91,679	80,543	9,498	7,142	6,064	239	199	65	227	1,359	404	3,036	22,879
Q1-3	252	1.5	0.5	91,401	80,484	9,054	6,887	6,334	250	97	693	30	1,491	423	3,771	24,435
Q2-3	9	0.1	0.0	76,322	65,644	10,849	6,615	7,913	703	347	1,540	462	1,817	1,281	5,398	22,228
Q3-3	16,612	97.3	31.8	90,176	79,610	8,675	6,666	6,232	222	157	79	23	1,454	360	3,640	25,447
Q4-3	205	1.2	0.4	91,679	80,543	9,498	7,142	6,064	238	198	65	227	1,358	484	3,835	22,879

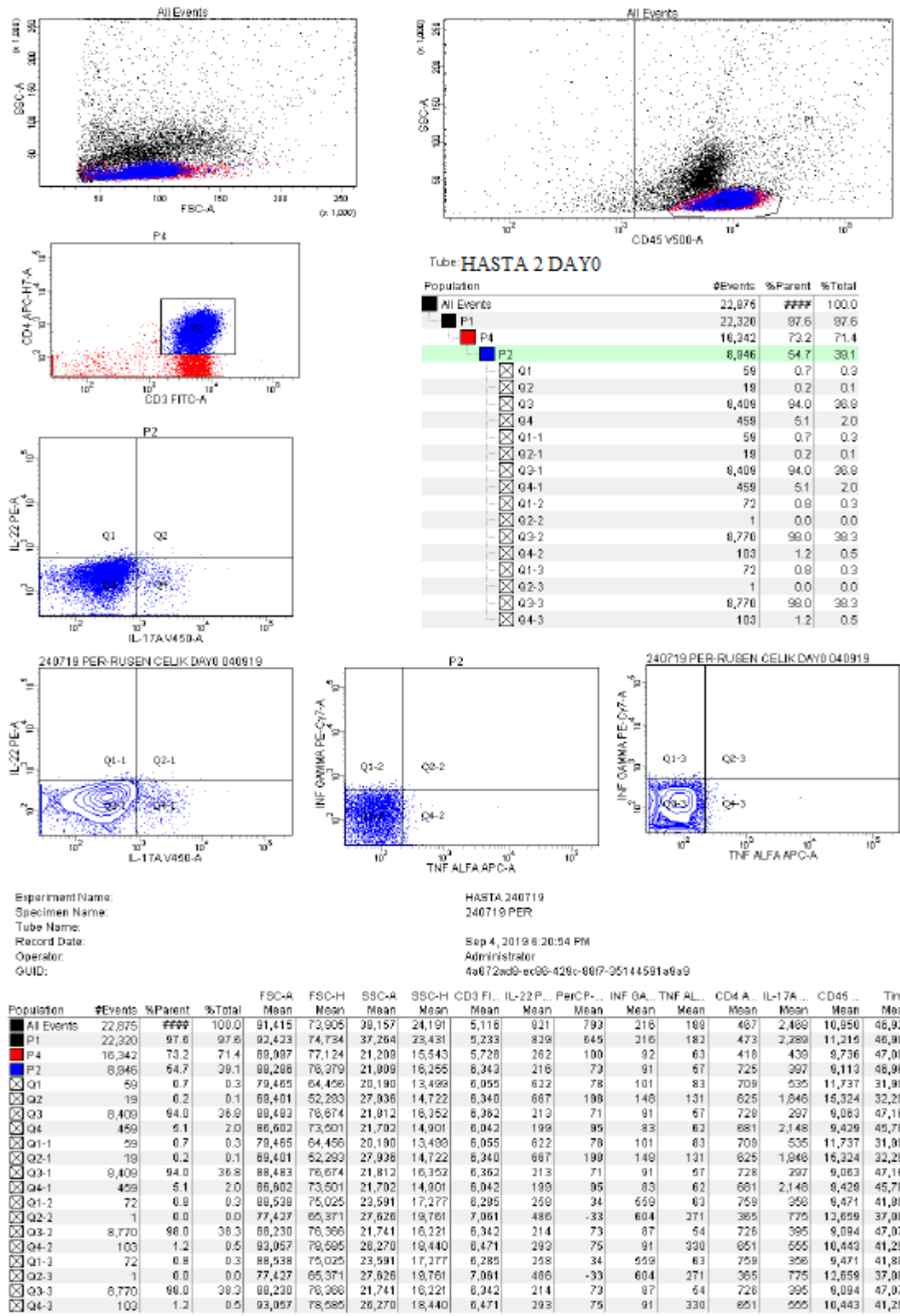
Şekil 3.2. Kontrol (2) Akan Hücre Ölçer Analiz



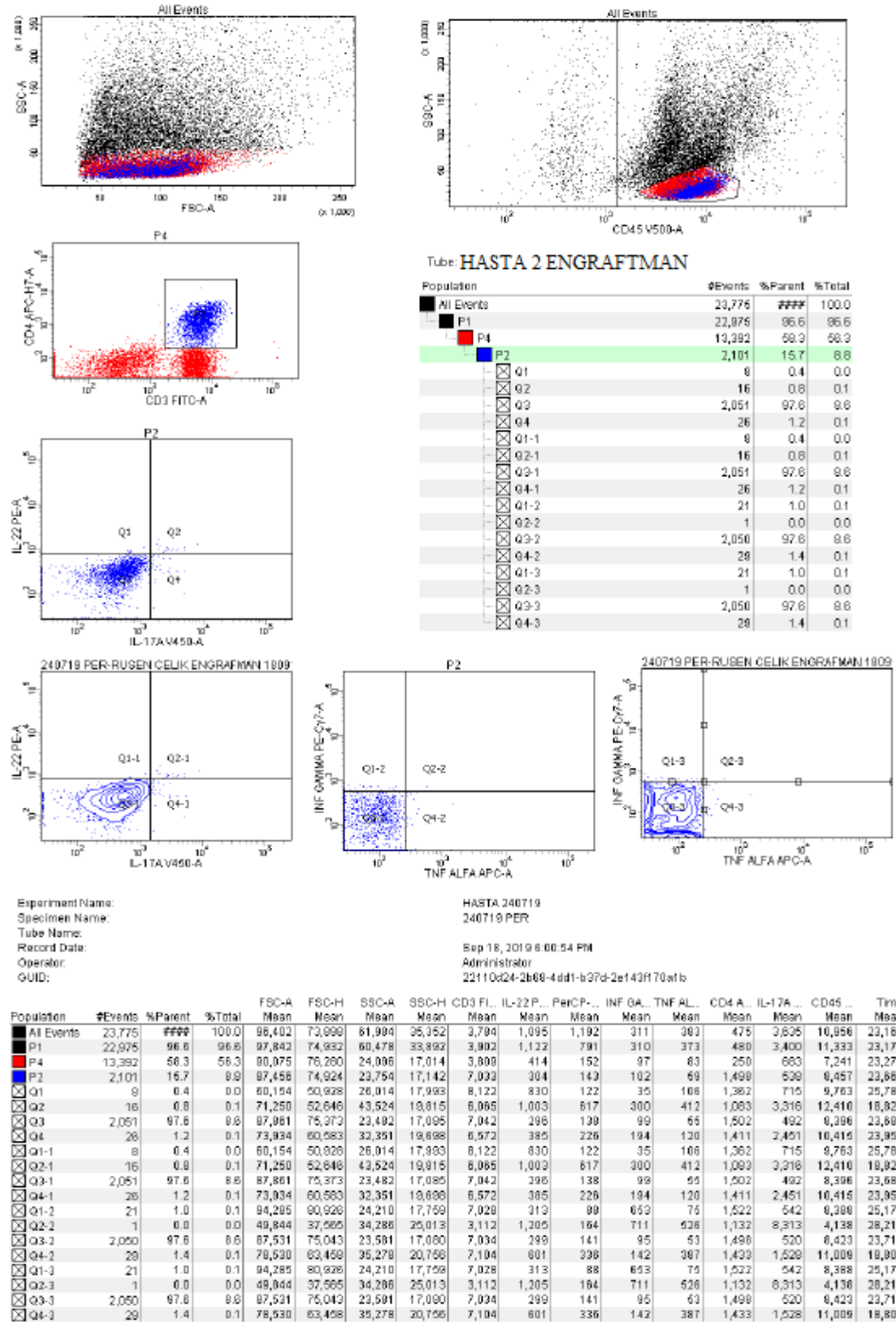
Şekil 3.3. Hasta (1) Day0 Akan Hücre Ölçer Analizi



Şekil 3.4. Hasta (1) Engraftman Akan Hücre Ölçer Analizi



Şekil 3.5. Hasta (2) Day0 Akan Hücre Ölçer Analizi



Şekil 3.6. Hasta (2) Engraftman Akan Hücre Ölçer Analizi

4. BULGULAR

Hasta ve kontrol grubunun demografik özellikleri aşağıdaki (Tablo 4.1.)’de sunulmuştur. PMA, iyonomisin ve monensin uyarımına takiben hasta ve kontrol grubu sitokin taşıyan mutlak lenfosit sayıları birbirleri ile karşılaştırıldıklarında; CD3 ve CD4 double pozitif T hücrelerin; IL-22, IL-17, TNF- α ve INF- γ taşıyan mutlak lenfosit sayıları hasta grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak düşük sayıda saptandı (Tablo 4.2.). Hasta grubu; IL-22, IL-17, TNF- α ve INF- γ taşıyan hücre sayıları 0. gün ve engraftman yönünden incelendiğinde ise istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmedi (Tablo 4.3.).

Tablo 4.1. Hasta ve kontrol grubunun demografik özellikleri tablosu

	Hasta	Kontrol	p
Yaş, Ortanca (min-maks)	57,5 (34-69)	38 (26-45)	<0.001
Cinsiyet, K/E	6/4	4/6	0.371
Primer Hastalık,			
Multiple Myeloma(n/%)	6/60		
Non Hodgkin Lenfoma (n/%)	1/10		
B-ALL (n/%)	1/10		
AML (n/%)	1/10		
Gestasyonel Trofoblastik Tümör (n/%)	1/10		
Nakil Tipi, Otolog (n/%)	6/60		
Allojenik (n/%)	4/40		

Tablo 4.2. Hasta ve kontrol grubu mutlak lenfosit sayısı karşılaştırma tablosu

	HASTA	KONTROL	p
IL22 (mutlak) - Ortanca (Min-Max)	1,37 (,08-5,76)	24,31 (7,66-77,22)	<0.001
IL17A (mutlak) - Ortanca (Min-Max)	2,39 (,08-2754,00)	27,86 (7,19-59,64)	0.017
IFN- γ (mutlak) - Ortanca (Min-Max)	1,60 (,08-17,46)	26,43 (5,75-72,39)	<0.001
TNF- α (mutlak) - Ortanca (Min-Max)	2,14 (,08-23,28)	17,11 (3,83-57,91)	<0.001

Tablo 4.3. Hasta ve kontrol grubu 0. gün ve engraftman yönünden karşılaştırma tablosu

	0.GÜN	ENGRAFTMAN	p
IL22 (mutlak) - Ortanca (Min-Max)	1,37 (,08-5,76)	4,28 (,12-54,94)	0.139
IL17A (mutlak) - Ortanca (Min-Max)	2,39 (,08-2754,00)	4,49 (,20-71,83)	0.575
IFN- γ (mutlak) - Ortanca (Min-Max)	1,60 (,08-17,46)	7,74 (,18-45,76)	0.047
TNF- α (mutlak) - Ortanca (Min-Max)	2,14 (,08-23,28)	10,43 (,22-12457,00)	0.059

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada hematopoetik kök hücre nakli öncesi ve engraftmen döneminde IL-22, IL-17A, IFN- γ ve TNF- α taşıyan hücre sayıları birlikte incelenmiş olup bildiğimiz kadarı ile literatürde bu yönde yapılan ilk çalışmadır. Çalışmanın ana sonucu olarak, hasta grubunda bakılan tüm sitokin taşıyan hücre sayıları kontrol grubuna göre düşük bulunmuş olup engraftmen döneminde de bu düşüklüğün devam ettiği görülmüştür.

Literatürde hematopoetik kök hücre nakli yapılan hastalarda IL-1Beta, IL-2, IL-6, IL8, IL-10, IL-12, IL-15, IL-17, TGF-Beta, IFN- γ ve TNF- α gibi birçok sitokinler çalışılmıştır. Bu sitokinler genel olarak greft versus host hastalığında (GVHD) çalışılmış olup IL-22 taşıyan hücrelerin engraftmen ve GVHD sürecinde nasıl rol oynadığı bilinmemektedir.

IL-17'nin nakil sonrası tek başına çalışıldığı bir çalışma bulunmaktadır. Cho ve arkadaşları miyeloablative allojenik kök hücre naklinin sonrası erken lösemi nüksü için bir belirteç olarak peri-transplant döneminde dolaşımdaki IL-17 seviyelerini ölçmüşlerdir; bu çalışmada IL-17'nin tümör büyümesi veya GVHD ile ilişkisini ele almışlardır. Peri-transplant döneminde serum IL-17 seviyeleri 95 lösemili hastada nakil öncesi ve nakilden sonra 0, +7 ve +14. günlerde ELISA kullanılarak ölçülmüştür. Ortalama 17 aylık takipte 180 gün içinde nüks eden hastaların daha yüksek sIL-17 seviyelerine sahip olduğunu, sIL-17 seviyeleri ile akut GVHD dahil diğer klinik sonuçlar arasında herhangi bir ilişki olmadığını ortaya göstermişlerdir. Çok değişkenli analizler ve sadece standart hastalık durumu ile alt grup analizleri, transplantasyonda ki hastalık durumundan bağımsız olarak sIL-17 düzeylerinin erken nüks ile ilişkisini göstermektedir (Cho ve ark., 2012). Bizim çalışmamızda IL-17 düzeyi sağlıklı kontrollere göre istatistiksel olarak düşük bulunmuş olup, bu düşük bulunan değerler engraftmen döneminde de düşük seyretmiştir. Hasta grubunun kendi içinde ki farklı olan IL-17 değerlerinin ileriki aşamalarda hangi açıdan hastalara etki edeceği çalışmamızın ana amacının dışındadır.

IFN- γ , TNF- α ve IL-6'nın yine GVHD de birlikte çalışıldığı Imamura ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmasında; kemik iliği transplantasyonu sonrası akut GVHD olan hastalarda, IL-6'nın, akut GVHD'nin klinik başlangıcından > 14 gün önce yavaş yavaş arttığını ve akut GVHD kaybolduğunda azaldığını gözlemlemişlerdir. İnterferon-Gama (IFN- γ) seviyelerinin ise klinik akut GVHD'den <14 gün önce artmış ve akut GVHD'nin ortadan kalkmasıyla azaldığını tespit etmişlerdir. Tümör nekroz faktörü-Alfa(TNF- α) seviyelerinin ise, akut GVHD'nin başlamasıyla hemen hemen aynı anda arttığını ve kaybolduğunda da azaldığını göstermişlerdir. Çalışma grubu bu sonuçların, kesin olarak IL-6, IFN- γ ve TNF- α kaynaklı akut GVHD seviyelerinin arttığı anlamına gelmediğini; sadece akut GVHD'nin artmış IL-6, IFN- γ ve TNF- α seviyelerine sahip hastalarda normal seviyelere göre daha sık görüldüğünün kanıtı olduğunu savunmaktadır. Araştırmacılar tarafından; birlikte ele alındığında, akut GVHD'nin, bir sitokin kaskadı ile tutarlı olarak IL-6, IFN- γ ve TNF- α 'nın sinerjistik etkileşimi ile indüklendiği görülmüştür (Imamura ve ark., 1994). Bu çalışmada her üç sitokin birlikte artıp azalırken; bizim çalışmamızda ise IFN- γ ve TNF- α taşıyan hücre sayıları hem nakil öncesi hem de engraftmen döneminde birlikte düşük olarak bulunmuştur.

TNF- α ve IL-17'nin birlikte çalışıldığı DiCarlo ve arkadaşlarının yaptığı allojenik ve otolog HSCT alan 51 çocukta yapılan sitokin çalışma sonucunda (IL-1, IL-2, IL-4,IL-5, IL-6, IL-7, IL-13, IL15, IL-17, TNF- αsitokinler çalışılmıştır) HSCT alıcılarında global sitokin sekresyonunu, eşzamanlı kontrol hastalarına göre anlamlı olarak daha düşük bulmuşlardır (DiCarlo ve ark., 2014). Her ne kadar çocuklarda yapılsada bu çalışma IL-17 ve TNF- α düzeyleri nin kontrol grubuna göre düşük bulunması bizim çalışma sonuçları ile örtüşmektedir. Min ve arkadaşları allojenik hematopoetik kök hücre nakli sonrasında IL-6, TNF- α , IL-8 ve IL-10 dahil olmak üzere dolaşımdaki sitokinlerin kinetiğini değerlendirmişlerdir. Araştırmalarında; allojenik hematopoetik kök hücre nakli uygulanan 52 hastanın haftalık örneklerinde pro-enflamatuar (IL-6, TNF- α ve IL-8) ve anti-enflamatuar (IL-10) sitokin düzeylerine bakılmıştır. IL-6'nın, +3. haftada pik noktasından hemen sonra arttığını, ancak IL-8 düzeylerinin sadece +1. Haftada yükseldiğini tespit etmişlerdir. Bununla birlikte; IL-8'in +1 haftasında hafif bir düşüşten sonra, TNF- α 'nın +2. haftasında önemli ölçüde arttığını ve +3 haftasında pik

yaptığını, IL-10 değerlerinin ise +2. haftasında yükselmeye başladığını ve +4. haftasında pik yaptığını gözlemlemişlerdir (Min ve ark., 2001). Çalışmada IL-6 ve TNF- α seviyeleri, +2. Haftadan +4. haftaya kadar pozitif korelasyon göstermiş. Her ne kadar bu çalışmada TNF- α düzeyi 2. haftada da yüksek bulunmuşsa da bizim çalışmamızda bu yükseklik görülmemiştir.

Nakil yapılan hastalarda daha çok TNF- α ve beraberinde diğer farklı sitokinlerin rolleri ile ilgili çalışmalar çoğunlukta görülmektedir. Berger ve arkadaşları; hematopoetik kök hücre naklini takiben TNFR1, IL-2, IL-8 ve IL-12 nin pediatrik hastalarda Graft-versus-host hastalığı biyobelirteçleri olarak rollerini araştırmışlardır ve serum sitokin seviyelerinin GVHD nin prediktörleri olabileceğini belirtmişlerdir (Berger ve ark., 2013). Bir diğer çalışmada, Willems ve arkadaşları miyeloablative olmayan HCT'nin 7. gününden önce ve sonraki TNF düzeylerini değerlendirerek, daha sonra akut GVHD yaşama riski hakkında yararlı bilgiler sağlamışlardır (Willems ve ark., 2010). Choi ve arkadaşları ise yaptıkları çalışmada; transplantasyondan önce ve transplantasyondan sonraki 7. günde 438 miyeloablative HCT alıcısında TNF reseptörü 1'i ölçmüşlerdir. TNFR1 düzeylerinin artmış olmasının GVHD derece 2 ile 4'ün nihai gelişimine ve tedaviye bağlı mortalitede artmaya neden olabileceğini belirtmişlerdir (Choi ve ark., 2008). Ancak, bu çalışmalarda kontrol grubu ile ilgili karşılaştırma olmaması bulunan sitokin düzeylerinin normale göre düşük veya yüksek olup olmadığı konusunda bilgi vermemektedir.

Yukarıda belirtildiği üzere nakil yapılan hastalarda çeşitli sitokinler çalışılmış olup, bu sitokinlerin engraftmen yönünden ilişkileri henüz net değildir, tartışmalı ve bu sitokinlerin rolü kapsamlı bir şekilde randomize kontrollü çalışmalar olmadığı için belirsizdir. Çalışmamız bu konuda literatürde tek olmakla beraber en önemli kısıtlılığımız hasta sayımızın göreceli olarak az olması ve bulunan sitokinlerin ileriki dönemlerde nasıl seyrettiğinin bilinmemesidir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Otolog ve allojenik hemopoetik kök hücre nakli yapılan hastalarda uygulanan hazırlama rejimlerinin ve ayrıca allojenik nakilde verilen immunsupresif tedavinin yapmış olduğu immunsupresyonun otolog nakil olanlarda en az 6 ay, allojenik nakil olanlarda ise en az 1 yıl kadar sürdüğü bilinmektedir. Immunsupresyona bağlı sitokin düzeylerinin özellikle IL-22, IL-17, TNF- α ve INF- γ taşıyan hücre sayılarının ne derecede değiştiği bilinmemektedir. Bizim çalışmamızda hemopoetik kök hücre nakli öncesi uygulanan hazırlama rejiminin etkisi ile sayıları düşmüş olan IL-22, IL-17, TNF- α ve INF- γ gibi sitokinlerin engraftmen döneminde artmadığı, hücre sayılarının stabil kaldığı görülmüştür. Bu sayının daha sonraki dönemlerde nasıl olacağı ve hücre sayılarının ne zaman normale geleceği ile ilgili hasta sayısının daha fazla olduğu prospektif çalışmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

Berger M, Signorino E, Muraro M, Quarello P, Biasin E, Nesi F, Vassallo E, Fagioli F. Monitoring of TNFR1, IL-2R α , HGF, CCL8, IL-8 and IL-12p70 following HSCT and their role as GVHD biomarkers in paediatric patients. *Bone Marrow Transplant.* 2013;48:1230-6.

Boniface K, Bernard FX, Garcia M, Gurney AL, Lecron JC, Morel F. IL-22 inhibits epidermal differentiation and induces proinflammatory gene expression and migration of human keratinocytes. *J Immunol.* 2005;174:3695–702.

Chen T, Burke KA, Zhan Y, Wang X, Shibata D, Zhao Y. IL-12 facilitates both the recovery of endogenous hematopoiesis and the engraftment of stem cells after ionizing radiation. *Exp Hematol.* 2007; 35(2): 203-13.

Cornell RF, Hari P, Drobyski WR. Engraftment Syndrome after Autologous Stem Cell Transplantation: An Update Unifying the Definition and Management Approach. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2015; 21(12): 2061-8.

Cho BS, Lim JY, Yahng SA, Lee SE, Eom KS, Kim YJ, Chung NG, Jeong DC, Lee S, Kim HJ, Cho SG, Kim DW, Lee JW, Min WS, Park CW, Min CK. Circulating IL-17 levels during the peri-transplant period as a predictor for early leukemia relapse after myeloablative allogeneic stem cell transplantation. *Ann Hematol.* 2012;91:439-48.

Choi SW¹, Kitko CL, Braun T, Paczesny S, Yanik G, Mineishi S, Krijanovski O, Jones D, Whitfield J, Cooke K, Hutchinson RJ, Ferrara JL, Levine JE. Change in plasma tumor necrosis factor receptor 1 levels in the first week after myeloablative allogeneic transplantation correlates with severity and incidence of GVHD and survival. *Blood.* 2008;112:1539-42.

DiCarlo J, Agarwal-Hashmi R, Shah A, Kim P4, Craveiro L, Killen R, Rosenberg-Hasson Y, Maecker H. Cytokine and chemokine patterns across 100 days after hematopoietic stem cell transplantation in children. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2014;20:361-9

Di Ianni M, Falzetti F, Carotti A, Terenzi A, Castellino F, Bonifacio E, Del Papa B, Zei T, Ostini RI, Cecchini D, Aloisi T, Perruccio K, Ruggeri L, Balucani C, Pierini A, Sportoletti P, Aristei C, Falini B, Reisner Y, Velardi A, Aversa F, Martelli MF. Tregs prevent GVHD and promote immune reconstitution in HLA-haploidentical transplantation. *Blood.* 2011;117:3921–8.

Di Lullo G, Marcatti M, Heltai S, Brunetto E, Tresoldi C, Bondanza A, Bonini C, Ponzoni M, Tonon G, Ciceri F, Bordignon C, Protti MP. Th22 cells increase in poor prognosis multiple myeloma and promote tumor cell growth and survival. *Oncoimmunology.* 2015; 4(5): e1005460.

Duhen T, Geiger R, Jarrossay D, Lanzavecchia A, Sallusto F. Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. *Nat. Immunol.* 2009; 10:857-863.

Edinger M, Hoffmann P. Regulatory T cells in stem cell transplantation: strategies and first clinical experiences. *Curr Opin Immunol.* 2011;23:679–84.

Eyerich S, Eyerich K, Pennino D, Carbone T, Nasorri F, Pallotta S, Cianfarani F, Odorisio T, Traidl-Hoffmann C, Behrendt H, Durham SR, Schmidt-Weber CB, Cavani A. Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling. *J Clin Invest.* 2009;119(12):3573-85.

Eyerich S, Eyerich K, Cavani A, Schmidt-Weber C. IL-17 and IL-22: siblings, not twins. *Trends Immunol.* 2010;31:354–61.

Eyerich K and Eyerich S. Th22 cells in allergic disease. *Allergo J Int.* 2015; 24(1): 1–7.

Henig I ve Zuckerman T. Hematopoietic Stem Cell Transplantation—50 Years of Evolution and Future Perspectives. *Rambam Maimonides Med J.* 2014; 5(4): e0028.

Hu Y, Li H, Zhang L, Shan B, Xu X, Li H, Liu X, Xu S, Yu S, Ma D, Peng J, Hou M. Elevated profiles of Th22 cells and correlations with Th17 cells in patients with immune thrombocytopenia. *Hum Immunol.* 2012; 73(6): 629-35.

Jo DY, Rafii S, Hamada T, Moore MA. Chemotaxis of primitive hematopoietic cells in response to stromal cell-derived factor-1. *J Clin Invest.* 2000; 105(1): 101-11.

Joffre O, Gorsse N, Romagnoli P, Hudrisier D, Van Meerwijk JP. Induction of antigen-specific tolerance to bone marrow allografts with CD4+CD25+ T lymphocytes. *Blood.* 2004;103:4216–21. doi: 10.1182/blood-2004-01-0005.

Khandelwal P, Mellor-Heineke S, Rehman N, Lane A, Smiley K, Villanueva J, Marsh RA, Grimley MS, Davies SM, Filipovich AH. Cytokine Profile of Engraftment Syndrome in Pediatric Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2016; 22(4): 690

Khera N, Emmert A, Storer BE, Sandmaier BM, Alyea EP, Lee SJ. Costs of allogeneic hematopoietic cell transplantation using reduced intensity conditioning regimens. *Oncologist.* 2014;19:639–44.

Kochenderfer JN, Wilson WH, Janik JE, Dudley ME, Stetler-Stevenson M, Feldman SA, Maric I, Raffeld M, Nathan DA, Lanier BJ, Morgan RA, Rosenberg SA. Eradication of B-lineage cells and regression of lymphoma in a patient treated with autologous T cells genetically engineered to recognize CD19. *Blood.* 2010;116:4099–102.

Leen AM, Heslop HE. Cytotoxic T lymphocytes as immune-therapy in haematological practice. *Br J Haematol.* 2008;143:169–79.

Lennard AL and Jackson GH. Stem cell transplantation. *West J Med.* 2001;175(1): 42–46.

Mardiros A, Brown CE, Budde LE, Wang X, Forman SJ. Acute myeloid leukemia therapeutics. *Oncoimmunology.* 2013;2:e27214.

Martelli MF, Di Ianni M, Ruggeri L, Falzetti F, Carotti A, Terenzi A, Pierini A, Massei MS, Amico L, Urbani E, Del Papa B, Zei T, Iacucci Ostini R, Cecchini D, Tognellini R, Reisner Y, Aversa F, Falini B, Velardi A. HLA-haploidentical transplantation with regulatory and conventional T-cell adoptive immunotherapy prevents acute leukemia relapse. *Blood.* 2014;124:638–44.

Min CK, Lee WY, Min DJ, Lee DG, Kim YJ, Park YH, Kim HJ, Lee S, Kim DW, Lee JW, Min WS, Kim CC. The kinetics of circulating cytokines including IL-6, TNF-alpha, IL-8 and IL-10 following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2001;28:935-40.

Nilsson SK, Simmons PJ, Bertoncello I. Hemopoietic stem cell engraftment. *Exp Hematol.* 2006; 34 (2): 123-9.

Imamura M, Hashino S, Kobayashi H, Kubayashi S, Hirano S, Minagawa T, Tanaka J, Fujii Y, Kobayashi M, Kasai M, et al. Serum cytokine levels in bone marrow transplantation: synergistic interaction of interleukin-6, interferon-gamma, and tumor necrosis factor-alpha in graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant.* 1994;13:745-51.

Lindemans CA, Calafiore M, Mertelsmann AM, O'Connor MH, Dudakov JA, Jenq RR, Velardi E, Young LF3, Smith OM, Lawrence G, Ivanov JA, Fu YY, Takashima S, Hua G, Martin ML, O'Rourke KP, Lo YH, Mokry M, Romera-Hernandez M, Cupedo T, Dow L, Nieuwenhuis EE, Shroyer NF, Liu C, Kolesnick R, van den Brink MRM, Hanash AM. Interleukin-22 promotes intestinal-stem-cell-mediated epithelial regeneration. *Nature*. 2015 24;528:560-564

Osgood EE, Riddle MC, Mathews TJ. Aplastic anemia treated with daily transfusions and intravenous marrow; case report. *Ann Intern Med*. 1939;13:357–67.

Pasquini MC, Wang Z. Current use and outcome of hematopoietic stem cell transplantation: CIBMTR Summary Slides, 2013.

Pende D, Marcenaro S, Falco M, Martini S, Bernardo ME, Montagna D, Romeo E, Cognet C, Martinetti M, Maccario R, Mingari MC, Vivier E, Moretta L, Locatelli F, Moretta A. Anti-leukemia activity of alloreactive NK cells in KIR ligand-mismatched haploidentical HSCT for pediatric patients: evaluation of the functional role of activating KIR and redefinition of inhibitory KIR specificity. *Blood*. 2009;113:3119–29.

Pennino D, Bhavsar PK, Effner R, Avitabile S, Venn P, Quaranta M, Marzaioli V, Cifuentes L, Durham SR, Cavani A, Eyerich K, Chung KF, Schmidt-Weber CB, Eyerich S. IL-22 suppresses IFN-gamma-mediated lung inflammation in asthmatic patients. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;131:562–70.

Porter DL, Levine BL, Kalos M, Bagg A, June CH. Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia. *N Engl J Med*. 2011;365:725–33.

Rekers PE, Coulter MP, Warren SL. Effect of transplantation of bone marrow into irradiated animals. *Arch Surg*. 1950;60:635–67.

Shao LL, Zhang L, Hou Y, Yu S, Liu XG, Huang XY, Sun YX, Tian T, He N, Ma DX, Peng J, Hou M. Th22 cells as well as Th17 cells expand differentially in patients with early-stage and late stage myelodysplastic syndrome. *PLoS One*. 2012; 7(12): e51339.

Sonnenberg GF, Fouser LA, Artis D. Border patrol: regulation of immunity, inflammation and tissue homeostasis at barrier surfaces by IL-22. *Nat Immunol* 2011;12:383–90.

Tettamanti S, Marin V, Pizzitola I, Magnani CF, Giordano Attianese GM, Cribioli E, Maltese F, Galimberti S, Lopez AF, Biondi A, Bonnet D, Biagi E. Targeting of acute myeloid leukaemia by cytokine-induced killer cells redirected with a novel CD123-specific chimeric antigen receptor. *Br J Haematol*. 2013;161:389–401.

Thomas ED, Lochte HL, Lu WC, Ferrebee JW. Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. *N Engl J Med*. 1957;257:491–6.

Trifari S, Kaplan CD, Tran EH, Crellin NK, Spits H. Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from T(H)-17, T(H)1 and T(H)2 cells. *Nat Immunol*. 2009;10(8):864-71.

Willems E1, Humblet-Baron S, Dengis O, Seidel L, Beguin Y, Baron F. Elevations of tumor necrosis factor receptor 1 at day 7 and acute graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic cell transplantation with nonmyeloablative conditioning. *Bone Marrow Transplant*. 2010;45:1442-8.

Wolk K, Kunz S, Witte E, Friedrich M, Asadullah K, Sabat R. IL-22 increases the innate immunity of tissues. *Immunity*. 2004;21:241–54.

Wu C. Immunologic targeting of the cancer stem cell. *StemBook* [Internet] Cambridge (MA): Harvard Stem Cell Institute; 2008.

Xu W, Presnell SR, Parrish-Novak J, Kindsvogel W, Jaspers S, Chen Z, Dillon SR, Gao Z, Gilbert T, Madden K, Schlutsmeyer S, Yao L, Whitmore TE, Chandrasekher Y, Grant FJ, Maurer M, Jelinek L, Storey H, Brender T, Hammond A, Topouzis S, Clegg CH, Foster DC. A soluble class II cytokine receptor, IL- 22RA2, is a naturally occurring IL-22 antagonist. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:9511–6.

Zheng Y, Danilenko DM, Valdez P, Kasman I, Eastham-Anderson J, Wu J, Ouyang W. Interleukin-22, a T(H)17 cytokine, mediates IL-23-induced dermal inflammation and acanthosis. *Nature*. 2007;445:648–51.

Zhuang Y, Peng LS, Zhao YL, Shi Y, Mao XH, Guo G, Chen W, Liu XF, Zhang JY, Liu T, Luo P, Yu PW, Zou QM. Increased intratumoral IL-22-producing CD4(+) T cells and Th22 cells correlate with gastric cancer progression and predict poor patient survival. *Cancer Immunol Immunother*. 2012;61:1965–75.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Melike	Uyruğu	T.C
Soyadı	ULUBAŞI	Tel no	0 505 265 2018
Doğum tarihi	06/06/1983	e-posta	mulubahsi@gmail.com

Eğitim Bilgileri

Mezun olduğu kurum		Mezuniyet yılı
Lise	Sandıklı Yabancı Dil Ağırlıklı Lise	2001
Lisans	Kütahya Dumlupınar Üniversitesi	2007
Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi	
Doktora		

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (yıl-yıl)
Biyolog	Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez Laboratuvarı Akım Sitometri Ünitesi	11 Yıl

Yabancı Dilleri	Sınav türü	Puanı
İngilizce	YÖK DİL	51

Proje Deneyimi

Proje Adı	Destekleyen kurum	Süre (Yıl-Yıl)
Hematopoetik kök hücre naklinda engraftman sürecinde Th22 hücrelerin rolü	Akdeniz Üniversitesi	1 yıl
Yeni Tanı Multipl Miyelom Hastalarında Kemik İliğinde CD4+CD25+ FoxP3+ PD-1+ Regülatör T Hücrelerin Düzeyinin ve PD-1, PD-L1 mRNA İfadesinin Araştırılması'. BAP FDK-2017-2382, 2017.	Akdeniz Üniversitesi	1 yıl
Ratlarda Demir Yüklemeinin Hematopoetik Sistem,	Akdeniz Üniversitesi	1 yıl

Kemik İliği ve İlişkili Genler Üzerindeki Etkisi; Fareler üzerinde kontrol grubu ve demir yüklemesi olan farelerde aşırı demirin kanseri tetikleyip tetiklemediğinin araştırılması.		
Aberan Expresyon taşıyan akut lösemi hastaları ile pür akut lösemili hastalara aynı tedavinin uygulanmasının prognoza etkisi.	Akdeniz Üniversitesi	

Burslar-Ödüller :

Deniz EKİNCİ, Aysun ÖZKAN, Ozan SALİM, Aslı TOYLU, Melike ULUBAŞI, Levent ÜNDAR. YENİ TANI MULTIPL MİYELOM HASTALARINDA KEMİK İLİĞİNDE CD4+CD25+ FOXP3+ PD-1+ REGÜLATÖR T HÜCRELERİN DÜZEYİNİN BELİRLENMESİ. Abstract Book (Oral Presentation). 1st International Health Sciences and Life Congress 02-05 Mayıs 2018. Burdur, TURKEY. Pp169. 1st Place Winner.

Yayınlar ve Bildiriler :

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

2018 Deniz Ekinci, Aysun Özkan, Ozan Salim, Aslı Toyly, Melike Ulubaşlı, Levent Ündar. MULTIPL MİYELOMDA PD1/PDL1 İNHİBİTÖRLERİ. Abstract Book (Poster Presentation). 1st International Health Sciences and Life Congress 02-05 Mayıs 2018. Burdur, TURKEY. Pp312.

- 2014** Salim O. Iltar U. Yücel O.K., Erdem R., Ulubahşi M., Ündar L., "Seröz Vücut Sıvılarının Akım Sitometri Ile İncelenmesi; Tek Merkez Deneyimi.", 40. Ulusal Hematoloji Kongresi, ANTALYA, TÜRKİYE, 22-25 Ekim 2014, ss.1-1
- 2013** Altıok Clark Ö., Toylu A., Salim O., Timurağaoğlu A., Okur M., Yücel O.K., Sayın İkinci N., Ulubahşi M., Güler K.E., Karadoğan İ., Ündar L., "Rlip76 Expression Levels In Cml Patients.", American Society of Human Genetics, BOSTON, ABD, 22-26 Ekim 2013, pp.1-1
- 2013** Toylu A., Altıok Clark Ö., Salim O., Timurağaoğlu A., Okur M., Yücel O.K., Ulubahşi M., Güler K.E., Sayın İkinci N., Karadoğan İ., Ündar L., "Hif1a And Phd Gene Expression Levels In Cml Patients", American Society of Human Genetics, BOSTON, ABD, 22-26 Ekim 2013, pp.1-1
- 2013** Gülen E., Toylu A., Ulubahşi M., Salim O., Timurağaoğlu A., "The Effect Of Iron Overload On The Rat Bone Marrow Erythroblast Differentiation And The Expression Of Iron Regulatory Genes", 18 th Congress of the European Hematology Association, STOKHOLM, ISVEÇ, 13-16 Haziran 2013, pp.1-1
- 2013** Yücel O.K., Salim O., Ulubahşi M., Timurağaoğlu A., "The Prognostic Impact Of Aberrant Antigen Expression In Acute Leukemias", 18 th Congress of the European Hematology Association, STOKHOLM, ISVEÇ, 13-16 Haziran 2013, pp.1-1
- 2013** Salim O., Yücel O.K., Ulubahşi M., Aydın Acar Ç. , Akkaya B., Berker S., Ündar L., "Çok Ender Bir Olgu: Myelodisplastik Sendromdan Akut Myeloid Lösemiye Dönüşüm Ve Mantle Hücreli Lenfoma Birlikteliği", 39. Ulusal Hematoloji Kongresi, ANTALYA, TÜRKİYE, 23-26 Ekim 2013, ss.91-91
- 2009** Salim O., Akkaya B., Ulubahşi M., Berker S., Karadoğan İ., Timurağaoğlu A., Ündar L., "Prostat Kanseri Hastada Masif Seröz Efüzyon Ile Prezente Olan T Hücreli Proliferatif Lösemi ", 35. Ulusal Hematoloji Kongresi, ANTALYA, TÜRKİYE, 7-10 Ekim 2009, ss.140-140