T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

AKUT KORONER SENDROMDA İMMÜN KONTROL NOKTASI PROTEİNLERİ İLE TH1/TH2 HÜCRE SİTOKİNLERİ ARASI MOLEKÜLER İLİŞKİ

ULAANKHUU BATGEREL

DANIŞMAN
PROF. DR. GAYE ERTEN YURDAGÜL

AZİZ SANCAR DENEYSEL TIP ARAŞTIRMA ENSTİTÜSÜ İMMÜNOLOJİ ANABİLİM DALI

İSTANBUL-2024

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

AKUT KORONER SENDROMDA İMMÜN KONTROL NOKTASI PROTEİNLERİ İLE TH1/TH2 HÜCRE SİTOKİNLERİ ARASI MOLEKÜLER İLİŞKİ

ULAANKHUU BATGEREL

II. DANIŞMAN
PROF. DR. AYŞE EVRİM BAYRAK

AZİZ SANCAR DENEYSEL TIP ARAŞTIRMA ENSTİTÜSÜ İMMÜNOLOJİ ANABİLİM DALI

İSTANBUL-202

İTHAF

Sevgili ailem, kardeşlerim ve en kıymetli hazinem anneme…

TEŞEKKÜR

Öncelikle doktora eğitimim boyunca bana daima sabır, nezaket ve gayret içinde örnek ve destek olan kıymetli danışman hocam Prof. Dr. Gaye Erten Yurdagül'e, ikinci danışmanım Prof. Dr. Ayşe Evrim Bayrak'a ve genetik çalışmalarda yardımcı olan Uzm. Bio. Hilal Şentürk'e, araştırma grubunun belirlenmesinde katkı sağlayan değerli hocam Prof. Dr. Mustafa Yıldız'a, laboratuvar çalışmalarımda her zaman bana destek olan Biyolog Recep Ergün'e ve her zaman desteklerini hissettiğim annem ve babama, sevgili kardeşlerime çok teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TDK-2021-37295

İÇİNDEKİLER

BEYAN.....**HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.**
İTHAF..... İİ
TEŞEKKÜR..... İİİ
İÇİNDEKİLER.....İV
TABLOLAR LİSTESİ.....Vİ
ŞEKİLLER LİSTESİ.....Vİİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ..... Vİİİ
ÖZET..... X
ABSTRACT.....Xİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ..... 1
2. GENEL BİLGİLER..... 3
2.1. İskemik Kalp Hastalığı..... 3
2.1.1. İskemik Kalp Hastalığı Tanımı..... 3
2.1.2. Miyokardial Hasar..... 4
2.1.3. Miyokardiyal İskemi..... 5
2.1.4. Miyokardial Enfarktüs..... 6
2.2. Akut Koroner Sendrom..... 7
2.2.1. ST Elevasyonlu Miyokard Enfarktüsü (STEMİ)..... 8
2.2.2. ST Elevasyonsuz Miyokard Enfarktüsü (NSTEMİ) / Unstabil Anjina..... 8
2.2.3. MINOCA..... 10
2.3. Non-Oklüziv Miyokard Enfarktüsü (NOMİ) ve Oklüziv Miyokard Enfarktüsü (OMİ)..... 11
2.4. İnflamasyon..... 13
2.4.1. Ateroskleroz..... 15
2.5. İmmün Kontrol Noktası Proteinleri (İKNP)..... 20
2.5.1. PD-1..... 22
2.5.2. CTLA-4..... 24
2.5.3. TIM-3..... 25
2.5.4. TIGIT..... 25
2.5.5. LAG-3..... 27

2.6. Çözünür İmmün Kontrol Noktası Reseptörleri 28
2.6.1. sCTLA-4 28
2.6.2. sPD-1 ve sPD-L1 29
2.6.3.sTIM-3 29
2.6.4. sLAG-3 29
2.6.5. Kardiyovasküler Hastalıklarda İmmün Kontrol Noktalarının Rolü 30
2.6.5.1. Ateroskleroz 30
2.6.5.2. Aterosklerozda Sitotoksik T-Lenfosit Antijeni 4 33
2.6.5.3. Aterosklerozda Lenfosit Aktivasyon Geni 3 (LAG-3) 33
2.6.5.4. Atherosklerozda Otoimmünite 34
3. GEREÇ VE YÖNTEM 35
3.1. Araştırma Vakalarının Seçimi ve Kan Örneklerinin Toplanması 35
3.2. İmmün Kontrol Nokta Proteinleri (İKNP'ler) ve Th1/Th2 Sitokinlerin Akan Hücre Ölçer Yöntemi ile Değerlendirilmesi 37
3.2.1. Kimyasallar ve Aletler 37
3.3. İKNP Gen Transkriptlerinin Genetik Analizler ile Değerlendirilmesi 42
3.3.1. Kimyasallar ve Kullanılan Cihazlar 42
3.3.2. Çözeltiler 43
3.3.3. Genetik Analizlerde Kullanılan Yöntemler 44
3.3.3.1. Periferik Kandan Total RNA İzolasyonu 44
3.3.3.2. Trizol Solüsyonu ile RNA İzolasyonu 44
3.3.3.3. Total RNA'nın Saflık ve Miktar Tayini 44
3.3.3.4. cDNA Sentezi 44
3.3.4. Gen İfadelerinin Kantitatif RT-PZR ile Belirlenmesi 45
3.3.5. Rölatif Kantitasyon (RQ) Hesabı ile Trankskriptlerin İfade Düzeylerinin Belirlenmesi 47
3.4. İstatistiksel Analiz 47
4. BULGULAR 49
5. TARTIŞMA 63
KAYNAKLAR 83
HAM VERİLER ..... **HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.**
FORMLAR ..... **HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.**
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI 108

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Akut miyokardiyal enfarktüs tanımlamaları (45). 12
Tablo 3-1: Serum örneklerinin ve standartların dilüsyon hazırlığı. 38
Tablo 3-2: Plakalarda standart ve örnek kuyularına yapılan pipetlemeler. 39
Tablo 3-3: Serum örneklerinin ve standartların dilüsyon hazırlığı. 40
Tablo 3-4: Plakalarda standart ve örnek kuyularına yapılan pipetlemeler. 41
Tablo 3-5: İmmünolojik çalışmada kullanılan cihazlar ve kullanım yerleri. 42
Tablo 3-6: Kullanılan kimyasallar. 43
Tablo 3-7: Kullanılan cihazlar ve kullanım yerleri. 43
Tablo 3-8: Gen transkriptelerine özgü kantitatif RT-PZR'da kullanılan primerler. 45
Tablo 3-9: Kantitatif RT-PZR protokolü. 46
Tablo 4-1: Çalışma gruplarının demografik dağılımı. 49
Tablo 4-2: Gruplar arası demografik, biyokimyasal ve görüntüleme bulgularının karşılaştırılması. 51
Tablo 4-3: Gruplar arası akan hücre ölçer ile ölçülen sitokin düzeylerinin karşılaştırılması. 52
Tablo 4-4: Gruplar arası akan hücre ölçer ile ölçülen İKNP düzeylerinin karşılaştırılması. 53
Tablo 4-5: Gruplar arası İKNP'lerini kodlayan genlerin ifade düzeylerinin karşılaştırılması. 54
Tablo 4-6: Çalışma gruplarında sitokin/İKNP ve gen ifade düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bulunan korelasyonlar. 56
Tablo 4-7: Gruplar arası akan hücre ölçer ile ölçülen sitokin düzeylerinin sensitivite (duyarlık) ve spesifite (özgüllük) karşılaştırılması. 57
Tablo 4-8: Gruplar arası akan hücre ölçer ile ölçülen İKNP'lerinn sensitivite (duyarlık) ve spesifite (özgüllük) karşılaştırılması. 59
Tablo 4-9: Gruplar arası İKNP'lerini kodlayan genlerin ifade düzeylerinin sensitivite ve spesifite karşılaştırılması 61

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: (A) Koroner makro dolaşım (B) Koroner makro ve mikro dolaşım 4

Şekil 2-2: İskemik kalp hastalığının sınıflandırılması. INOCA: iskemi ve obstrüksiyonun olmadığı koroner arter hastalığı, MINOCA: miyokardiyal iskeminin olduğu ancak obstrüksiyonun olmadığı koroner arter hastalığı 4

Şekil 2-3: Miyokardiyal hasardan miyokardiyal enfarktüse gidişin şematik gösterimi. Miyokardiyal hasarın olmadığı durum = cTn ≤ 99 persantil olması, Miyokardiyal hasar = cTn > 99 persantil, Miyokard enfarktüsü = miyokard iskemisinin klinik kanıtı ve troponinde artma ve/veya düşmenin olduğu 99 persantil üzerindeki bir yükseklik 5

Şekil 2-4: Miyokardiyal zedelenmeden (hasardan) miyokardiyal enfarktüse gidişin patolojisi. Özellikle uzamış iskeminin yarattığı sonuçları göstermesi açısından önem arz etmektedir 6

Şekil 2-5: Akut koroner sendromların (STEMİ, NSTEMİ / Unstabil anjina) klinik ve patolojik özelliklerine göre tanı algoritması 10

Şekil 2-6: Ateroskleroz patogenezindeki ilk yaklaşımların çizimlerinden bir kesit 16

Şekil 2-7: Aterosklerotik sürecin şematik gösterimi..... 16

Şekil 2-8: Ateroskleroz patogenezindeki yaklaşımların evrimi..... 18

Şekil 2-9: Aterom plak komplikasyonlarının patolojik sınıflandırılması. NETs: Nötrofillerin parçalanması sonucu açığa çıkan DNA materyalleri..... 20

Şekil 2-10: T hücre fonksiyonlarının negatif regülasyonundan sorumlu reseptörler 22

Şekil 2-11: TIGIT ve ko-inhibitör reseptör olan CD96 ile aktivatör reseptör olan CD226'nın T hücre ve antijen sunan hücre (ASH) etkileşimindeki rolü. 26

Şekil 3-1: Lökosit örneklerinde endojen kontrol olarak incelenen *ACTB* ve *GAPDH* gen transkriptlerinin RT-PZR amplifikasyon eğrileri ve erime eğrileri. 46

Şekil 3-2: Lökosit örneklerinde *CTLA4, PDL1, PDL2, TIGIT, TNFSF8* ve *TNFSF9* gen transkriptlerinin RT-PZR amplifikasyon eğrileri ve erime eğrileri. 47

Şekil 4-1: Çalışmadaki grupların CTLA4, PDL1, PDL2, TIGIT, TNFSF8 ve TNFRSF9 gen ifade düzeyleri. 54

Şekil 4-2: Th1/Th2 sitokin düzeylerinin ROC eğrisi..... 57

Şekil 4-3: İKNP düzeylerinin ROC eğrisi 59

Şekil 4-4: İKNP'lerini kodlayan genlerin ifade düzeylerinin ROC eğrisi..... 61

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

ADAM10 : A Disintegrin and Metalloproteinase Domain-containing Protein 10
ADAM17 : A Disintegrin and Metalloproteinase Domain-containing Protein 17
ADCC : Antikor Bağımlı Hücre Aracılı Sitotoksisite
aKIR : İmmünoglobülin-benzeri Aktivatör Reseptörü
AMİ : Akut Miyokard Enfarktüsü
BT : Bilgisayarlı Tomografi
BTLA : B ve T Hücre Fonksiyon Azaltıcısı
CA125 : Kanser Antijeni 125 (Cancer Antigen 125)
CAD : Coronary Artery Disease
CAN'TOS : Canakinumab Anti-Inflammatory Thrombosis Outcomes Study
CTLA-4 : Sitotoksik T lenfosit Antijen 4
cTnI : Kardiyak Troponin I
cTnT : Kardiyak Troponin T
EKG : Elektrokardiyogram
FASL : Fas Ligandı
FGL1 : Fibrinojen Benzeri Protein-1
FGL2 : Fibrinojen Benzeri Protein-2
FIGO : Uluslararası Jinekoloji ve Obstetri Federasyonu
GM-CSF : Granülosit Monosit Koloni Stimüle Eden Faktör
HIPEC : Hipertermik Intraperitoneal Kemoterapi
HIV : İnsan İmmünyetmezlik Virüsü
HLA : İnsan Lökosit Antijeni
hs-CRP : Yüksek hassasiyetli C reaktif protein
IgG : İmmünoglobülin G
IL-1 : İnterlökin 1
IL-10 : İnterlökin 10
IL-1β : İnterlökin 1 Beta
IL-6 : İnterlökin 6
INOCA : Ischemia with non-obstructive coronary arteries
JUPITER : Justification for the Use of Statin in Prevention: An Intervention

LAG-3 : Lenfosit Aktivasyon Geni-3
LBBB : Sol dal bloğu
MCP-1 : Monosit Kemoatraktan Faktör-1
MINOCA : Koroner Arterlerin Tıkayıcı Olmadan Oluşan Miyokard nfarktüsü (“MI with non-obstructive coronary arteries”)
Mİ : Miyokard nfarktüsü
NETs : Neutrophil extracellular traps
NLR : Neutrophil to Lymphocyte Ratio
NLRP-3 : NLR family pyrin domain containing 3
NOMİ : Non-oklüziv Miyokard Enfarktüsü
NSTEMİ : ST Elevasyonsuz Miyokard Enfarktüsü
OMİ : Oklüziv Miyokard Enfarktüsü
PD-1 : Programlanmış Ölüm -1
PD-L1 : Programlanmış Ölüm -Ligand 1
PET-BT : Pozitron Emisyon Tomografisi- Bilgisayarlı Tomografi
PMN : Polymorphonuclear neutrophils
SII : Sistemik İmmün İnflamasyon İndeksi
STEMİ : ST Elevasyonlu Miyokard İnfarktüsü
SV : Sol Ventrikül
TGF-β : Transforming Growth Factor-β
TIMI : Thrombolysis in myocardial infarction Trial
TNFRSF8 : CD30, Tümör nekroz faktörü reseptörü süper aile üyesi 8
TNFSF8 : CD30L, CD153, Tümör nekroz faktörü ligandı süper aile üyesi 8
TNFRSF9 : CD137, 4-1BB, Tümör nekroz faktörü reseptörü süper aile üyesi 9
TNFSF9 : CD137L, 4-1BBL, Tümör nekroz faktörü ligandı süper aile üyesi 9
UA : Unstable Angina
ULBP : UL16 Bağlayıcı Protein
VEGF : Vasküler Endotel Büyüme Faktörü (Vascular Endothelial Growh Factor)
YDSOK : Yüksek Dereceli Seröz Over kanseri

ÖZET

BATGEREL, U. (2024). Akut Koroner Sendromda İmmün Kontrol Noktası Proteinleri ile Th1/Th2 Hücre Sitokinleri Arası Moleküler İlişki. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İmmünoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi. İstanbul.

Çalışmamız akut koroner sendrom (AKS) hastaları ve kontrol grubunda immün kontrol noktası proteinleri ve sitokin profillerinin rolünü akım sitometri ve genetik analiz tekniklerini içeren kapsamlı metodolojiler kullanarak inceleyen bir araştırma sunmaktadır. Araştırmamız, ayrıca AKS tanısı almış hastalar (ST segment elevasyonlu miyokard enfarktüsü (STEMI), ST segment elevasyonsuz miyokard enfarktüsü (NSTEMI), unstabil anjina pektoris (USAP)) ve koroner arter hastalığı riski taşımayan kontrol grubundaki bireyler arasında, serum lipid profilleri ve inflamasyon belirteçlerinin karşılaştırmalı analizini içermektedir. Bulgulara göre, HDL seviyeleri kontrol grubunda anlamlı derecede daha yüksek bulunmuş (ortalama 42,5 mg/dL), USAP, NSTEMI ve STEMI gruplarında ise sırasıyla ortalama 34,3 mg/dL, 33,2 mg/dL ve 37,6 mg/dL olarak ölçülmüştür. İstatistiksel analizler, gruplar arasındaki bu farkın anlamlı olduğunu göstermiştir ($p=0,009$). Yüksek hassasiyetli C-reaktif protein (hsCRP) seviyeleri ise kontrol grubunda ortalama 9,3 mg/L iken, NSTEMI ve STEMI gruplarında anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (sırasıyla ortalama 18,2 mg/L ve 18,0 mg/L; $p=0,001$). Ayrıca, akan hücre ölçer saptanan sitokin değerleri ve İKNP (İmmün Kontrol Nokta Proteinleri) düzeylerinin de gruplar arası karşılaştırılması yapılmıştır. IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 ve TNFα gibi sitokinlerin düzeyleri kontrol grubunda anlamlı derecede yüksekken, AKS gruplarında bu düzeyler istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur ($p<0,001$). Özellikle TGF-β1 ve PD-L1 gibi belirli İKNP'ler, AKS gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı şekilde yüksek seviyelerde tespit edilmişken ($p<0,001$), lökositlerdeki gen ifade düzeyleri ise araştırılan 6 genden özellikle *TIGIT*, *CTLA-4* ve *TNFSF8*'nin düşük seviyelere sahip olduğu belirlendi ($p<0,05$). Bu farklılıklar, AKS patofizyolojisinde İKNP ve Th1/Th2 sitokinlerinin önemli rol oynayabileceğini göz önüne sermektedir. Bu bağlamda adı geçen moleküllerin özellikle enflamasyonun ve AKS'nin değerlendirilmesinde önemli belirteç adayları olarak kullanılabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Akut koroner sendrom, immün kontrol noktası proteinleri, sitokinler

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TDK-2021-37295

ABSTRACT

BATGEREL, U. (2024). Molecular Relationship Between Immune Checkpoint Proteins and Th1/Th2 Cell Cytokines in Acute Coronary Syndrome. Institute of Health Sciences, Department of Immunology. PhD Thesis. Istanbul.

Our study presents a comprehensive methodology that describes a combination of flow cytometry and genetic analysis techniques used in research investigating the role of immune checkpoint proteins and cytokine profiles in patients with acute coronary syndrome (ACS) and a control group without the risk of coronary artery disease. The research includes a comparative analysis of serum lipid profiles and inflammatory markers among patients diagnosed with ACS (ST-segment elevation myocardial infarction (STEMI), non-ST-segment elevation myocardial infarction (NSTEMI), and unstable angina pectoris (USAP)) and individuals in the control group who are not at risk for coronary artery disease. According to the findings, HDL levels were significantly higher in the control group (average 42.5 mg/dL), while in the USAP, NSTEMI, and STEMI groups, the levels were measured at an average of 34.3 mg/dL, 33.2 mg/dL, and 37.6 mg/dL, respectively. Statistical analyses have indicated that this difference between the groups is significant (p=0,009). High-sensitivity C-reactive protein (hsCRP) levels were found to be significantly elevated in the NSTEMI and STEMI groups (averaging 18.2 mg/L and 18.0 mg/L, respectively) compared to an average of 9.3 mg/L in the control group, and these differences were statistically significant (p=0.001). Additionally, cytokine levels measured by flow cytometry and levels of Immune Checkpoint Proteins (ICPs) were also compared across groups. Interestingly, cytokine levels such as IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, and TNFα were significantly higher in the control group, while being lower in the ACS groups, with all these differences being statistically significant ($p<0.001$). While certain ICPs, especially TGF-β1 and PD-L1, were detected at significantly higher levels in the ACS groups compared to the control group ($p<0.001$), gene expression levels in leukocytes were found to be low expression levels among the 6 genes investigated, especially *TIGIT*, *CTLA-4* and *TNFSF8* ($p<0.05$). These differences suggest that ICPs and Th1/Th2 cytokines may play an important role in the pathophysiology of ACS. In this context, these molecules may be used as important marker candidates especially in the evaluation of inflammation and ACS.

Key Words: Acute coronary syndrome, immune checkpoint proteins, cytokines

This study has been supported by the Scientific Research Projects Unit of Istanbul University. Project No: TDK-2021-3

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Koroner arter hastalığı (KAH), hem global ölçekte hem de Türkiye'de en yaygın ölüm nedenlerinden biri olarak karşımıza çıkmaktadır. Türkiye'deki yetişkin nüfus üzerinde yürütülen Türk Erişkinlerinde Koroner Arter Hastalığı Risk Faktörleri (TEKHARF) araştırmasının sonuçlarına göre, ülkede yaklaşık 3,5 milyon koroner arter hastası olduğu ve her yıl bu hastalığa bağlı olarak ortalama 210,000 kişinin yaşamını yitirdiği belirlenmiştir (1).

Akut koroner sendromu (AKS)'nun patogenezinde yer alan damar yaralanması ve miyokardiyal yeniden şekillenmeye ("remodelling") çeşitli inflamatuvar kaskadlar katkıda bulunmaktadır (2). Doğal ve edinilmiş bağışıklık yanıtlarının aterosklerotik plak gelişimini ve destabilizasyonunu teşvik ettiği gösterilmiştir (3). T hücrelerinin, arter duvarlarında makrofajlar gibi bağışıklık hücreleri ve bunların ürünleri arasındaki etkileşimler yoluyla ateromatöz plak gelişimini indüklediği bilinmektedir (4). KAH'lı hastalarda kanakinumab ve kolşisin ile ilgili klinik araştırmaların son zamanlardaki olumlu sonuçlarından sonra anti-inflamatuvar stratejiler üzerine yeniden odaklanılsa da (5, 6) etki mekanizmaları henüz tam açıklanamamıştır. Bu nedenle, AKS'nin yönetimi için yeni inflamatuvar belirteçlerin belirlenmesi gerekmektedir.

Son zamanlarda, immün kontrol noktası yolları çeşitli malign hastalıklar için terapötik bir hedef olarak ön plana çıkarılmıştır. Genellikle aktive edilmiş T hücreleri üzerinde eksprese edilen Programlı Ölüm-1 (PD-1)'in ligandı (PD-L1) ile bağlanması, T hücre çoğalmasını ve sitokin salınımını baskılayarak immünotoleransa yol açmaktadır. Geniş bir yelpazedeki malign hücrelerin PD-L1 eksprese ederek T hücrelerinin saldırısından kaçındığı bildirilmiştir (7). Dahası PD-L1, özellikle dendritik hücreler, makrofajlar ve B hücreleri ile birlikte endotel hücreleri üzerinde de yaygın olarak eksprese edilmektedir (8, 9). Diyabetes Mellitus (DM) hastaların aterosklerotik süreçlerinde, PD-L1 düzeylerinin artması ile interferon (IFN)-γ düzeyleri arasında pozitif korelasyon olduğu bildirilmiştir (10).

Özellikle, AKS'nin patofizyolojisi üzerindeki immün mekanizmaların daha derinlemesine incelenmesi, bu sürecin kritik yönlerini açığa çıkarmakta ve Th1/Th2 hücre dengesinin aterosklerotik olaylarla ilişkisini göstermektedir (11). Th1 hücrelerinin

proinflamatuvar sitokinleri olan IFN-γ ve Tümör Nekroz Faktörü-α (TNF-α), aterosklerotik plakların oluşumunda ve ilerlemesinde önemli roller oynamaktadır. Bunun yanında, Th2 hücrelerinden salınan İnterlökin-4 (IL-4), İnterlökin-5 (IL-5), ve İnterlökin-10 (IL-10) gibi antiinflamatuvar sitokinler, inflamasyonun çözülme aşamasında ve dokunun onarımında etkili olabilir (12). AKS'nin immünopatogenezi içerisinde bu sitokinlerin ve onların düzenleyici etkilerinin ayrıntılı incelenmesi, hastalığın seyrini etkileyebilecek moleküler hedefleri belirleme potansiyeline sahiptir.

Bu çalışmada, immün kontrol noktası proteinleri ile Th1/Th2 hücre sitokinleri arasındaki moleküler ilişkilerin AKS patogenezindeki rolü araştırılarak bu ilişkilerin inflamatuvar yanıta ve sonuçta kardiyak yeniden şekillenmeye olan etkileri değerlendirilmiştir. İmmün kontrol noktası inhibitörleri ile yapılan tedavi müdahalelerinin AKS'nin klinik seyri üzerindeki etkilerini belirlemede, inflamatuvar ve immün yanıt profillerindeki değişimlerin belirlenmesi ile daha etkin tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesi mümkün olabilir. Bu amaçla gerçekleştirilen tez çalışmasında, AKS'li olgularda (NSTEMI/STEMI/USAP) immün kontrol noktası proteinleri (İKNP) ve Th1/Th2 hücre sitokinlerinin hem hastalık patogenezindeki ilişkisi hem de immünogenetik etkisi araştırılmıştır. Ek olarak, immün kontrol noktası yollarının manipülasyonunun, aterosklerozun ilerlemesi üzerindeki potansiyel etkileri, mevcut ve gelecek klinik uygulamalar açısından önemi tartışılmıştır.

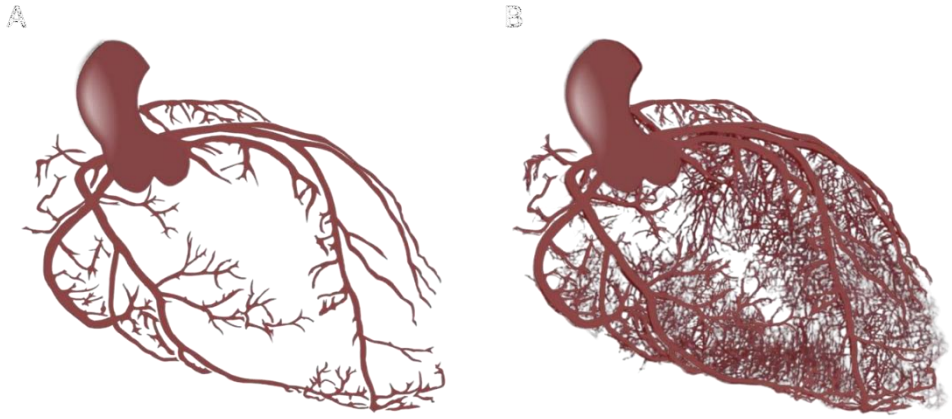
2. GENEL BİLGİLER

2.1. İskemik Kalp Hastalığı

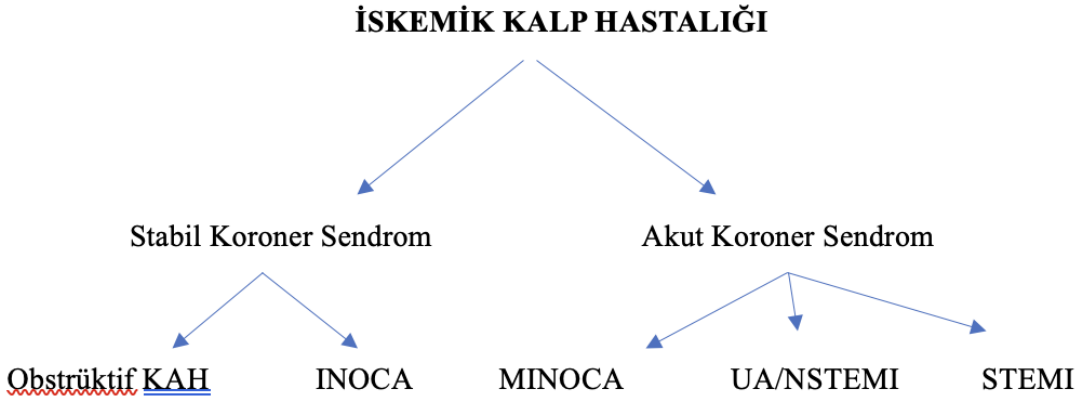
2.1.1. İskemik Kalp Hastalığı Tanımı

Koroner kalp hastalığı (KAH) olarak da tanımlanan iskemik kalp hastalığı, global olarak en sık görülen ölüm sebeplerinden biri olarak bilinmektedir. Bu hastalığın en belirgin belirtisi olan anjina pektoris, göğüs kemiğinin altında başlayan, genellikle çene, omuzlar, sırt ya da kollar boyunca yayılan bir rahatsızlık ve baskı hissi ile karakterize edilir. Fiziksel aktivite, duygusal gerilim veya ağır yemekler sonucu şiddetlenebilen ve istirahat ya da nitrogliserin ile hafifleyebilen bu belirtiler, hastalığın tipik özelliklerindendir. İskemik kalp hastalığı tanısı konmuş bireylerin yarısında ilk gözlemlenen semptom kronik stabil anjina pektoris olup, kronik koroner kalp hastalığına sahip bireylerin de yarısında zamanla akut miyokard enfarktüsü gelişme riski bulunmaktadır (13).

Stabil iskemik kalp hastalığı, miyokardın kan ihtiyacı ile bu ihtiyacı karşılayacak kan miktarı arasındaki dengesizliğe bağlı olarak beliren ve genellikle göğüs ağrısı şeklinde tezahür eden, tekrarlayan ve geçici anjina pektoris ataklarıyla karakterize edilen bir durumdur. Geleneksel olarak, anjina pektoris atağının, koroner arterlerdeki tıkanıklığa bağlı olarak kan akışını kısıtlayan durumlar neticesinde geliştiği düşünülür. Anatomik düzeyde, tıkayıcı koroner arter hastalığının tanımlanmasında kullanılan standart ölçütler; tek bir anjiyografik projeksiyonda %70, iki projeksiyonda %50 oranında daralma gösteren bir ana koroner arter darlığı ya da sol ana koroner arterde %50 darlık olarak saptanır. Ancak, koroner mikrovasküler rahatsızlık gibi durumlarda, makroskopik düzeyde tıkayıcı bir koroner arter hastalığı olmadığı halde anjina pektoris semptomlarının ortaya çıkabileceği göz ardı edilmemelidir (14). Kalp dokusunu besleyen makro ve mikro dolaşımı oluşturan damar ağı Şekil 2-1'de gösterilmektedir. Özellikle ana arterlerde meydana gelen tıkanıklıklar ile oluşan iskemik kalp hastalığının stabil ve akut olarak gelişimine bağlı olarak yapılan sınıflandırma Şekil 2-2'de verilmektedir. (UA: Unstabil anjina, NSTEMİ: Non-ST elevasyonlu Miyokard İnfarktüsü, STEMİ: ST elevasyonlu Miyokard İnfarktüsü).



Şekil 2-1: (A) Koroner makro dolaşım (B) Koroner makro ve mikro dolaşım (15).



Şekil 2-2: İskemik kalp hastalığının sınıflandırılması. INOCA: iskemi ve obstrüksiyonun olmadığı koroner arter hastalığı, MINOCA: miyokardiyal iskeminin olduğu ancak obstrüksiyonun olmadığı koroner arter hastalığı (16).

2.1.2. Miyokardial Hasar

Miyokardiyal hasar ve miyokardiyal iskemi aslında birbirine yakın kavramlardır, çünkü her iki durumun tanımında da yükselen kardiyak troponin seviyeleri temel alınır. Eğer yükselmiş troponin seviyelerine rağmen, miyokardiyal iskeminin varlığını destekleyecek semptomatik bulgular mevcut değilse, bu durumda miyokardiyal hasar tanısı ön plana çıkar. Özetle, miyokardiyal hasar, özellikle koroner dışı ve kardiyak olmayan olaylardan kaynaklanan troponin seviyelerindeki artışın bir sonucu olarak tanımlanabilir (17). Şekil 2-3'te miyokardiyal hasardan miyokardiyal enfarktüse gidişindeki etkenler şematik olarak gösterilmektedir.



Şekil 2-3: Miyokardiyal hasardan miyokardiyal enfarktüse gidişin şematik gösterimi. Miyokardiyal hasarın olmadığı durum = cTn ≤ 99 persantil olması, Miyokardiyal hasar = cTn > 99 persantil, Miyokard enfarktüsü = miyokard iskemisinin klinik kanıtı ve troponinde artma ve/veya düşmenin olduğu 99 persantil üzerindeki bir yükseklik (18).

2.1.3. Miyokardiyal İskemi

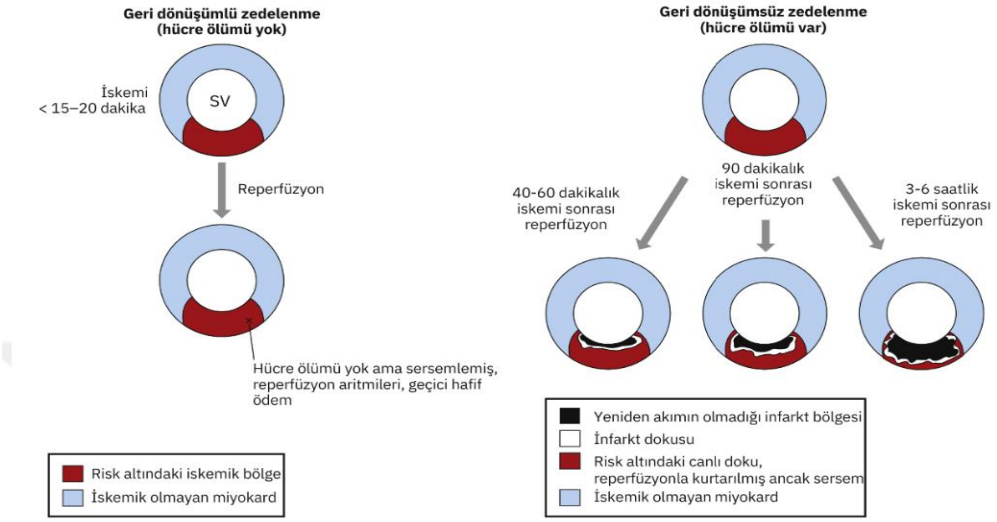
Miyokardiyal iskemi, genellikle bir epikardiyal koroner arterin tam veya tama yakın bir şekilde tıkanması sonucu miyokardın oksijen alamamasıyla oluşur ve sıklıkla anjina pektoris semptomuyla kendini gösteren bir durum olarak karşımıza çıkar (19).

Miyokardiyal hasar, iskemi ve miyokard enfarktüsü terimleri sıkça birbirleriyle ilişkilendirilir ve bu olaylar birbirlerine sıkı sıkıya bağlıdır. Tanımlamalarında kritik öneme sahip bazı temel ölçütler bulunmaktadır. Daha önce de ifade edildiği gibi, miyokardiyal hasarın tespitinde troponin seviyelerindeki artış ana göstergedir. Bu sebeple, miyokardiyal iskemi teşhisi konulan her bireyde aslında miyokardiyal hasarın varlığı varsayılmaktadır. Ancak, miyokardiyal hasar gösteren her hastada iskeminin bulunmadığı gerçeği de göz ardı edilmemelidir (20, 21).

2.1.4. Miyokardial Enfarktüs

Miyokard enfarktüsünün tanımlanmasında, uzun süren miyokard iskemisi sonucu ortaya çıkan miyokardiyal nekrozun klinik olarak kanıtlanması şarttır. Bu tanıyı koymak için, kardiyak troponin seviyelerinde bir yükseliş ve/veya düşüşün görülmesi ve en az bir ölçümün 99. persantilin üzerinde olması zorunludur. Bunun yanı sıra, aşağıdaki kriterlerden en az birinin varlığı da gereklidir: (a) miyokardiyal iskemi belirtileri, (b) ST-T dalga değişiklikleri yeni ise veya yeni olduğu düşünülüyorsa, (c) yeni oluşan sol "bundle branch block", (d) EKG'de yeni patolojik Q dalgalarının ortaya çıkışı, (e) görüntüleme yöntemleriyle kanıtlanan canlı miyokard dokusunun kaybı ya da miyokardiyal bölgesel duvar hareket bozukluğu, (f) anjiyografi veya otopsi yoluyla intrakoroner trombüs varlığının ispatı (17, 22).

Akut miyokard enfarktüsü, güncel klinik rehberler temelinde elektrokardiyogramda ST segment yüksekliği varlığına bakarak pratik bir şekilde sınıflandırılsa da, aynı zamanda altı farklı tip altında da değerlendirilmektedir. Bunlar sırasıyla; koroner aterotromboza dayalı enfarktüs (tip 1), talep ile arz arasındaki dengesizliğe bağlı enfarktüs (tip 2), ani kardiyak ölümle sonuçlanan ve daha fazla kardiyak değerlendirme fırsatı bırakmayan enfarktüs (tip 3), perkütan koroner müdahalelerle ilişkili enfarktüs (tip 4), koroner stent trombozuna bağlı enfarktüs (tip 5), koroner arter baypas greftlemesi ile ilişkili enfarktüs (tip 6) olarak gruplandırılır (23).



Şekil 2-4: Miyokardiyal zedelenmeden (hasardan) miyokardiyal enfarktüse gidişin patolojisi. Özellikle uzamış iskeminin yarattığı sonuçları göstermesi açısından önem arz etmektedir (24).

2.2. Akut Koroner Sendrom

Akut miyokard enfarktüsü, akut koroner sendrom (AKS) olarak adlandırılan klinik durumların başlıca nedenidir. Akut miyokard enfarktüsüne yol açan patolojik süreç, genellikle aterosklerotik bir plak içindeki erozyon ya da yırtılma sonucu tetiklenen trombotik aktivitelerle başlar ve bu durum, koroner kan akışının kısmen veya tamamen durmasına neden olur. Koroner kan akışındaki bu kesinti, önce miyokardda iskemiye ve eğer kesinti uzarsa geri dönüşü olmayan kardiyak hasara (enfarktüs-nekroz) yol açabilir Şekil 2-4). Bu iskemi-enfarktüs-nekroz süreci, hastalarda çeşitli semptomlara, elektrokardiyogram (EKG) ve ekokardiyografi bulgularında değişikliklere, ayrıca kardiyak biyobelirteçlerde anormalliklere neden olur. Bu histopatolojik ve klinik gözlemlerin toplamı, AKS olarak tanımlanan klinik tabloların tanımını oluşturur (25).

Akut koroner sendromlar, elektrokardiyogram (EKG) bulgularına dayanarak pratikte ST segment elevasyonlu miyokard enfarktüsü (STEMİ), ST segment elevasyonu olmayan miyokard enfarktüsü (NSTEMİ) veya unstabil anjina pektoris (USAP) olarak ayrılır. Güncel rehberler ışığında, total koroner arter tıkanıklığının STEMİ'ye yol açtığı, kısmi tıkanıklığın veya iyi gelişmiş kollateral dolaşımın olduğu durumlarda NSTEMİ/unstabil anjinanın ortaya çıktığı kabul edilmektedir. Öte yandan, akut miyokard enfarktüsü yaşamasına karşın yaklaşık %10 oranındaki hastada, kritik bir epikardiyal koroner arter hastalığının tespit edilemediği durumlar da mevcut olabilmektedir. Bu durum, koroner arterlerin tıkayıcı olmadan oluşan Miyokard Enfarktüsüne (“MI with non-obstructive coronary arteries”) (MINOCA) bağlı gelişen AKS olarak adlandırılır (26).

Akut koroner sendromlar için güncel kılavuzlarda önerilen bu sınıflandırmaya göre, NSTEMİ ön tanısı alarak koroner anjiyografiye tabi tutulan hastaların yaklaşık üçte birinde total koroner arter tıkanıklığı tespit edilmektedir. Bu hastaların, STEMİ tanısı almış hastalarla benzer bir ölüm riski taşıdıkları gözlemlenmesine rağmen, erken dönemde yapılan invaziv koroner müdahalelerden beklenen faydayı göremedikleri belirlenmiştir. Bu nedenle, akut koroner sendromların tanı ve yönetim yaklaşımlarında yeni bir paradigmanın geliştirilmesinin gerekliliği yönünde bir fikir birliği oluşmaktadır (27, 28).

2.2.1. ST Elevasyonlu Miyokard Enfarktüsü (STEMİ)

AKS tipleri arasında özel bir yer tutan ve acil müdahale gerektiren STEMİ, tipik olarak devamlı göğüs ağrısı veya iskemik semptomlar gösteren hastalarda, elektrokardiyogramda (EKG) iki bitişik derivasyonda ST segment yükselmesi ile karakterize edilir. AKS nedeniyle hastaneye başvuran hastaların yaklaşık %38'lik bir bölümünde STEMİ tanısı konulmaktadır (29).

Herhangi bir göğüs ağrısı şikayetiyle başvuran hastalara, başvurudan itibaren ilk 10 dakika içerisinde EKG yapılması önerilmektedir. Eğer EKG sonucunda STEMİ teşhisi konulursa, bu durum genellikle total koroner arter tıkanıklığına işaret ettiğinden, hastaların acilen kateter laboratuvarına yönlendirilmesi gerekir. ST segment elevasyonunun EKG'de tanımlanması için belirli milimetre kriterlerine başvurulur. Standart kalibrasyon ayarları (10 mm/mV) altında yapılan EKG'de, ardışık en az iki bitişik derivasyonda; 40 yaş altı erkeklerde ≥ 2.5 mm, 40 yaş ve üzeri erkeklerde ≥ 2 mm veya kadınlarda V2-V3 derivasyonlarında ≥ 1.5 mm ve/veya diğer derivasyonlarda ≥ 1 mm ST segment yükselmesi, sol ventrikül hipertrofisi veya sol "bundle branch block" bulunmadığı sürece tanısal olarak değerlendirilmektedir (30).

2.2.2. ST Elevasyonsuz Miyokard Enfarktüsü (NSTEMİ) / Unstabil Anjina

İskemik kalp hastalıklarının klinik görünümü, kronik stabil anjina ile başlayıp akut koroner sendromlara kadar çeşitlenebilen bir spektrum içerisinde yer alır. Akut koroner sendromlar ile kronik stabil anjinanın ayırt edilmesinde bazı klinik özellikler önem taşır: (a) dinlenme sırasında veya hafif fiziksel aktivite ile ani olarak ortaya çıkan semptomlar, (b) uygun tedavi uygulanmazsa semptomların en az on dakika devam etmesi, (c) göğüs kemiğinin altında yoğun ağrı, baskı hissi veya konfor kaybı yaşanması, (d) zamanla sıklaşan ve şiddetlenen, hatta kişiyi uykusundan uyandıracak kadar ağır anjina ataklarının meydana gelmesi (31).

12 derivasyonlu EKG ve miyokardiyal nekroza işaret eden kardiyak biyobelirteçler, akut koroner sendromların üç ana tipinin birbirinden ayrılmasında temel önem taşır. Tipik anjina şikayetleri olan hastalarda yapılan EKG'de inatçı (20 dakikadan uzun süren) ST segment yükselmesi gözlemlenmediğinde ve eğer kardiyak biyobelirteçlerde belirgin bir artış varsa, bu durumda NSTEMİ tanısı konulmaktadır (Şekil-5). Öte yandan, tipik anjina şikayetleri olan ve miyokardiyal nekrozun göstergesi olan kardiyak biyobelirteçlerde yükselme olmayan hastalarda unstabil anjina tanısı

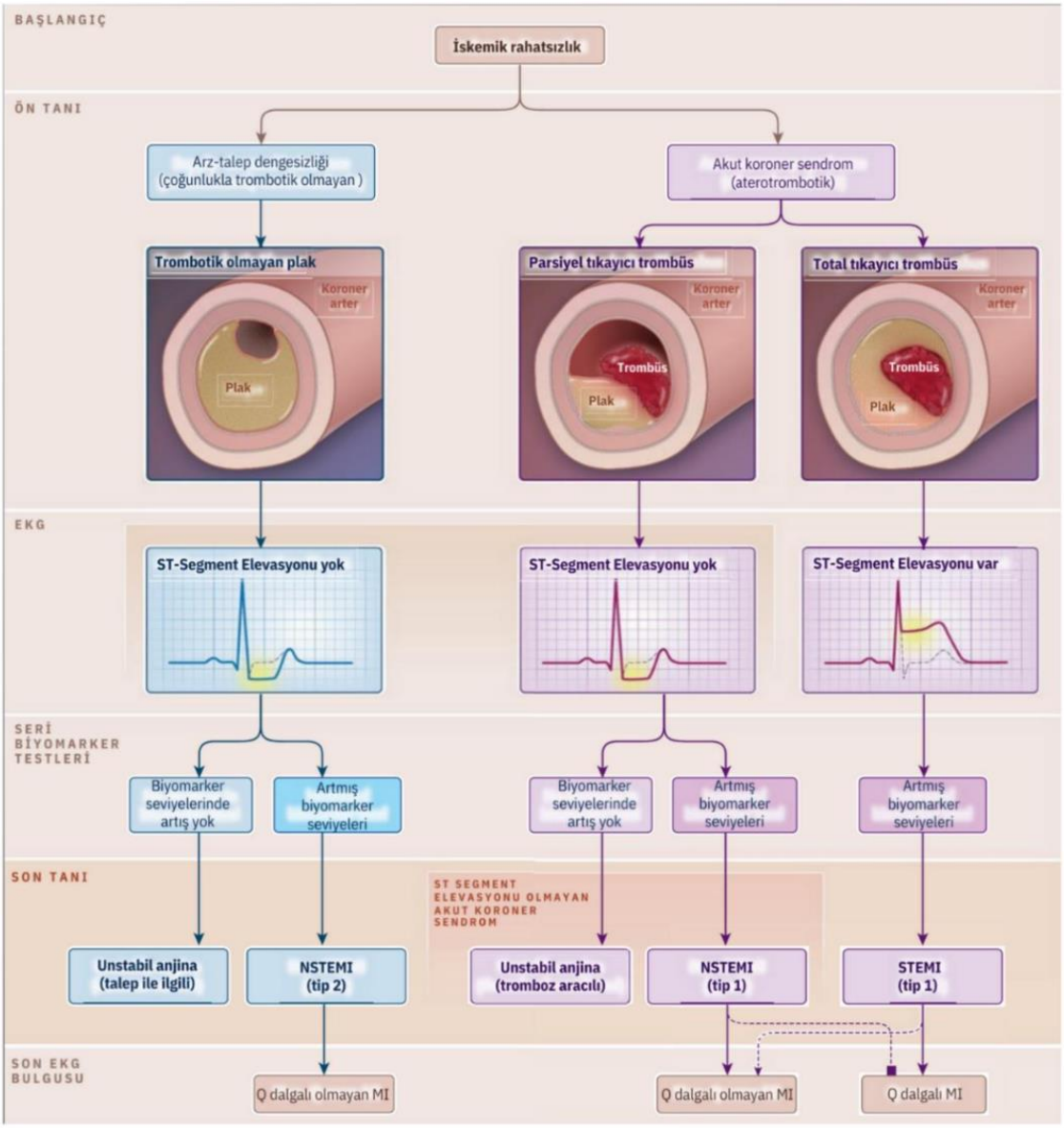
konulur. Unstabil anjina tanısı almış hastalar, genellikle NSTEMİ tanısı almış hastalara göre daha iyi bir prognostik duruma sahiptirler (32).

Günümüzde AKS ile başvuran hastaların yaklaşık %70'i NSTEMİ olarak sınıflandırılmaktadır. Son zamanlarda yapılan araştırmalar, STEMİ vakalarının sıklığının azalırken NSTEMİ vakalarının arttığını göstermektedir. Bu oransal değişimin ana nedenleri arasında koruyucu tedbirlerin artması (antiagregan ve statin kullanımının yaygınlaşması) ve yüksek hassasiyetli troponin testlerinin kullanımının yaygınlaşması yer almaktadır (33). Bu durum, unstabil anjina tanılarının giderek daha fazla NSTEMİ olarak sınıflandırılmasına yol açmaktadır.

Özellikle hastalar semptom gösterdiğinde, en sık rastlanan EKG bulguları arasında ST segment depresyonu ve T dalgası inversiyonu bulunmaktadır. Hastanın semptomatik olduğu durumlarda, mevcut EKG'nin hastanın daha önceki EKG kayıtları ile karşılaştırılması, dinamik değişikliklerin saptanmasında oldukça önemlidir. ST segmentinde görülebilecek 0,05 mV gibi küçük bir değişim bile NSTEMİ tanısını destekleyici bir sensitiviteye sahiptir. Derin (> 0.2 mV) T dalgası inversiyonları da NSTEMİ tanısını destekler nitelikte olsa da, tanı için mutlaka gerekli değildir. Yeni gelişen T dalgası anormalliklerinin, NSTEMİ ön tanısı olan hastalarda yapılan MRI görüntüleme çalışmaları sonucunda miyokardiyal ödem ile güçlü bir ilişki içinde olduğu gösterilmiştir (34, 35).

Akut koroner sendromların ayrımında ST segment değişikliklerinin önemi daha önce belirtilmiştir. 20 dakikadan daha kısa süren geçici ST segment yükselmesi durumunda, bu hastaların yaklaşık %10'luk bir kısmında unstabil anjina ve koroner vazospazm tanılarının mümkün olduğu göz önünde bulundurulmalıdır. Bunun yanı sıra, NSTEMİ tanısı konulan hastaların yarısından fazlasında EKG bulgularının normal olduğunu bilmek de önemlidir. Bu durum, NSTEMİ tanısının, EKG bulguları normal olan hastalarda bile düşünülmesi gerektiğini göstermektedir (36).

Unstabil anjina, NSTEMİ ve STEMİ durumları arasında erken dönem mortalite oranları farklılık gösterir. Erken dönemde, unstabil anjinanın NSTEMİ ve STEMİ'ye göre daha düşük bir mortalite oranına sahip olduğu bilinmektedir. Benzer şekilde, NSTEMİ de erken dönemde STEMİ'ye kıyasla daha düşük bir mortalite oranına sahiptir. Ancak, uzun vadede bakıldığında, NSTEMİ mortalite oranının STEMİ'ye göre arttığı gözlemlenmektedir (37, 38).



Şekil 2-5: Akut koroner sendromların (STEMİ, NSTEMİ / Unstabil anjina) klinik ve patolojik özelliklerine göre tanı algoritması (23).

2.2.3. MINOCA

Akut koroner sendromlar içerisinde yer alan ve tıkayıcı olmayan koroner arterlerin eşlik ettiği miyokard enfarktüsü (MINOCA), anjiyografik incelemede tıkayıcı koroner arter oklüzyonunun (hiçbir koroner arterde %50'den fazla tıkanıklık olmaması) bulunmadığı, fakat iskemiye bağlı enfarktüsün klinik kanıtlarının var olduğu durumlar olarak tanımlanır. Bu klinik tablo, miyokard enfarktüsü tanısı ile başvuran hastaların yaklaşık %5-10'luk bir kısmında gözlemlenmektedir (39).

2.3. Non-Oklüziv Miyokard Enfarktüsü (NOMİ) ve Oklüziv Miyokard Enfarktüsü (OMİ)

Trombolitik tedavi ve perkütan koroner girişimler, total veya neredeyse totale yakın koroner tıkanıklığı olan AKS hastalarında iskemik miyokardiyumu kurtarmada ve geri dönüşsüz enfarktüse gidişi engellemede etkili olduğu kanıtlanmış yöntemlerdir. Güncel kılavuzlara göre, akut koroner sendrom ile başvuran hastalarda akut koroner tıkanıklığın belirlenmesinde EKG kriterleri esas alınır. ST segment elevasyonunun varlığı veya yokluğu, erken reperfüzyon tedavisine karar verilmesinde temel kriter olarak kullanılır (40). Ancak, EKG'ye dayalı bu sınıflamanın bazı eksiklikleri, özellikle anjiyografi uygulamalarının yaygınlaşmasıyla daha belirgin hale gelmiştir. Yapılan araştırmalara göre, NSTEMİ tanısı alan hastaların yaklaşık %25-30'unda akut koroner oklüzyon saptanmaktadır. Bu durum, tanıdaki bu eksiklikler nedeniyle, bu hastaların invaziv tedaviyi geç almasına yol açmaktadır (41).

Total koroner tıkanıklığı yaşayan AKS hastalarının tanısında, klasik EKG yaklaşımının yetersiz kaldığı artık net bir şekilde görülmektedir. Trombolitik dönemden günümüze kalan bu elektrokardiyografik tanı yaklaşımı, akut koroner sendromların anatomik yapılarını tam olarak yansıtamamaktadır (42). Bu durum, anjiyografinin o dönemde tanı yöntemi olarak kullanılmamasından kaynaklanmaktadır. Günümüzdeki gelişmiş anjiyografik tekniklerin ışığında, akut koroner sendromlar için daha yenilikçi ve kapsamlı bir tanı yaklaşımının geliştirilmesi gerekliliği ortaya çıkmaktadır. Bu yeni yaklaşım, özellikle anjiyografi gibi gelişmiş tanı araçlarının sağladığı detaylı bilgileri dikkate alarak, daha doğru ve etkili bir tanı ve tedavi sürecinin temelini oluşturabilir (43).

Koroner arter hastalığının tarih boyunca bilinen bir yönü olan akut koroner oklüzyon, güncel kılavuzlarda STEMİ ile eş anlamlı olarak kullanılmakta, ancak daha önce de belirtildiği gibi bu iki durum tam olarak örtüşmemektedir (44). Son yıllarda yapılan araştırmalar sonucunda, Oklüziv miyokard enfarktüsü (OMİ) ve Non-oklüziv miyokard enfarktüsü (NOMİ) olmak üzere iki ayrı tanım geliştirilmiştir (45). OMİ, anatomik olarak tam veya neredeyse tam koroner oklüzyonun yetersiz epikardiyal kollateral damar varlığında meydana gelmesi olarak tanımlanmaktadır. Diğer yandan, NOMİ, OMİ bulgularının olmadığı akut miyokard enfarktüsü vakaları için kullanılan bir tanımdır (40, 46). Sonuç olarak, akut miyokardiyal enfarktüs tanımlamaları ile OMİ ve NOMİ tanımlarının terminolojideki yeri Tablo 2-1'de verilmektedir.

Tablo 2-1: Akut miyokardiyal enfarktüs tanımlamaları (45).

Yaklaşımların tanımları ve terminolojileri	
STEMİ	4. Uluslararası Miyokardiyal infarktüsü tanım kılavuzuna göre STEMİ kriterleri ile örtüşen elektrokardiyogram bulgularının olduğu akut miyokardiyal infarktüs
Yanlış pozitif STEMİ	STEMİ ile örtüşen elektrokardiyogram kriterlerinin olması ancak bu durumun herhangi bir iskemiye sebep olmaması, sorumlu damar lezyonunun olmaması ve akut miyokardiyal infarktüsün olmaması
Gerçek pozitif STEMİ STEMİ(+)OMİ	STEMI ile örtüşen EKG kriterlerinin olması ve Akut miyokard infarktüsüne sebep olan oklüziv miyokard infarktüsünün olması
Oklüziv Mİ(OMİ)	Tip 1 miyokardiyal infarktüse sebep olan total koroner oklüzyon veya totale yakın koroner oklüzyonun yetersiz epikardiyal kollateral dolaşım ile birlikte olması, Oklüziv miyokard infarktüsü STEMI'nin anatomik ve patofizyolojik substratıdır ancak her OMI, STEMİ şeklinde manifest olmamaktadır.
Non-oklüziv Mİ(NOMİ) Oklüzyonun olmadığı NSTEMİ	Anjiyografik, laboratuvar ve klinik olarak OMİ kanıtının olmadığı Akut miyokard infarktüsü

STEMİ kriterleri, akut koroner oklüzyonların yaklaşık dörtte birini tespit edememekte ve aynı oranda gereksiz anjiyografik işlemlere yol açmaktadır. Günümüzdeki bazı uzman görüşleri, akut koroner oklüzyonun sadece bir EKG bulgusu olarak değil, patolojik bir durum olarak tanımlanması gerektiğini savunmaktadır (47). Bu yaklaşım, tanı süreçlerinin daha doğru ve etkin olmasını sağlamayı amaçlamakta, böylece hastalara gereksiz işlemlerin uygulanmasını önlemeyi ve akut koroner oklüzyonları daha etkili bir şekilde tespit etmeyi hedeflemektedir. Bu durum, koroner arter hastalığı yönetiminde yeni bir yaklaşımın geliştirilmesi ve mevcut tanı kriterlerinin gözden geçirilmesi anlamına gelir (48).

STEMİ kriterlerinin hem duyarlılığının hem de özgüllüğünün düşük olduğu bilinmektedir. Bu durum, STEMİ kriterlerini karşılamayan ancak akut koroner oklüzyonu olan AKS hastalarının varlığına işaret etmektedir, bu da OMİ ve NOMİ tanımlamasının ortaya çıkmasına yol açmıştır. Yapılan araştırmalar, ST segment elevasyonu gösteren birçok OMİ hastasının EKG bulgularının STEMİ kriterleri ile uyumlu olmadığını ortaya koymuştur. Ayrıca, OMİ tanısında hiperakut T dalgaları, terminal QRS distorsiyonu ve düşük QRS amplitüdü gibi bazı özgül EKG indikatörlerinin varlığı da gözlemlenmiştir (49).

EKG bulgularının yorumlanmasının kişiden kişiye değişebileceği ve subjektif bir nitelik taşıdığı unutulmamalıdır. Yapılan çeşitli çalışmalar, dikkat çekmeyen veya kriterlere tam uymayan ST segment elevasyonları, hiperakut T dalgaları (Winter paterni dahil), karşıt ST segment depresyonları ve/veya negatif hiperakut T dalgaları, OMİ'de

tipik olarak V1-4 derivasyonlarında görülen ST segment depresyonları, şüpheli akut patolojik Q dalgaları, terminal QRS distorsiyonu, inferior derivasyonlardaki ST segment elevasyonları ve aVL'de ST segment depresyonu veya T dalgası inversiyonu gibi EKG bulgularının OMİ ile ilişkili olabileceğini göstermiştir (50). Ayrıca, sol "bundle branch block" (LBBB) veya "pace" ritmi olan hastalarda pozitif modifiye Sgarbossa kriterlerinin kullanılması da OMİ tanısında yardımcı olabilir (51, 52). Bu tür EKG bulguları, OMİ tanısını destekleyebilir ve akut koroner sendromların yönetiminde önemli rol oynayabilir (53). Bu nedenle, EKG yorumlama sürecinde bu tür bulguların dikkatli bir şekilde değerlendirilmesi gerekmektedir (54).

OMİ tanımı, belirli kriterlere dayanarak yapılır. Bu tanım şu şekildedir: Akut ve sorumlu lezyonun TIMI ("Thrombolysis in Myocardial Infarction") akım skalasında 0-2 arasında olması, ya da anjiyografik olarak akut tıkayıcı olmayan ancak TIMI 3 akıma sahip olan ve geniş bir infarkt bölgesiyle ilişkili lezyonun bulunması (pik troponin T değeri ≥ 1.0 ng/mL veya troponin I ≥ 10,0 ng/mL) şeklindedir. Eğer anjiyografi yapılmamışsa, yüksek kardiyak troponin seviyeleri ile birlikte yeni gelişen sol ventrikül duvar hareket bozukluğu da OMİ tanısını destekler. Ayrıca, anjiyografi yapılamamış ölüm vakalarında, STEMİ'nin EKG kanıtları da OMİ tanısı için yeterli görülmektedir (55). Bu tanımlama, OMİ'nin anjiyografik ve klinik özelliklerine dayanarak yapılan ayrıntılı bir değerlendirme sürecini yansıtmaktadır (56).

2.4. İnflamasyon

Rudolph Virchow, 1858 yılında arteriosklerotik plak gelişiminde inflamasyonun önemli bir rol oynadığını ilk kez tanımlamıştır (57). Yaklaşık altmış yıl sonra, Russell Ross ise aterosklerozun inflamatuvar bir hastalık olduğunu ve patogenezinde sadece lipit birikiminin değil, çeşitli hücre tiplerinin multifaktöriyel olarak etkili olduğunu belirtmiştir (58). İlerleyen yıllarda yapılan çeşitli araştırmalar, inflamatuvar hipotezi destekleyen sonuçlar ortaya koymuştur. Özellikle, yüksek hassasiyetli C-reaktif protein (hs-CRP) gibi bir inflamatuvar belirtecin, düşük yoğunluklu lipoprotein kolesterolü (LDL-K) gibi güçlü bir kardiyovasküler risk belirteci olarak belirlenmiş olması dikkat çekicidir. Buna rağmen, günümüzde halen inflamatuvar hipotez, klinik yaklaşımlara tam olarak yansımamıştır (59).

Aterosklerotik sürecin tüm aşamalarında inflamasyonun yer aldığı bilinmektedir. Özellikle, oklüzyona ve miyokard enfarktüsüne yol açan plak formasyonu ve akut plak

rüptürü gibi durumlar arasında önemli bir patofizyolojik ilişki bulunmaktadır. Sonuçta aterosklerozun sadece lipid metabolizması ile ilgili bir hastalık olmadığını, aynı zamanda inflamatuvar süreçlerin de hastalığın gelişiminde ve ilerlemesinde kritik roller oynadığını göstermektedir (60).

Aterojenezde önemli bir rol oynayan IL-1, inflamatuvar sitokinler arasında yer alır. NLRP3 inflamazomu tarafından aktive edildikten sonra, mesajcı sitokin IL-6'nın ekspresyonunu tetikler. IL-6, inflamasyonun meydana geldiği bölgelerden salınarak karaciğere ulaşır ve burada protein sentezini yeniden düzenleyerek akut faz yanıtını başlatır. Bu akut faz yanıtında karaciğerden salınan temel reaktan, klinik pratikte en çok çalışılan ve araştırılan molekül olan hs-CRP'dir. hs-CRP, miyokard enfarktüsü, inme, periferik arter hastalığı ve ani kardiyak ölüm gibi durumlar için, LDL-K seviyeleri düşük olsa bile bağımsız bir risk faktörü olarak kabul edilir. JUPITER çalışması, hs-CRP'nin ≥ 2 mg/dL olmasının artan bir risk faktörü olarak değerlendirilebileceğini ortaya koymuştur (61).

hs-CRP seviyelerinin altta yatan aterosklerotik hastalık ile olan ilişkisi ılımlıdır, diğer bir değişle subklinik hastalıkla zayıf bir ilişkisi vardır. Özellikle akut plak rüptürü ve/veya tromboz gibi ani gelişen klinik durumlarda hs-CRP'nin önemi artmaktadır. JUPITER çalışmasında, statin tedavisinin LDL-K seviyelerini düşürmesinden bağımsız olarak antiinflamatuvar etkisiyle hs-CRP düzeylerini azalttığı ve bunun vasküler olaylarda azalmaya yol açtığı gösterilmiştir (62). Ayrıca, statin tedavisinden sonra hem LDL-K hem de hs-CRP düzeylerindeki azalmanın bir arada oluşması, klinik faydayı ciddi şekilde arttırmaktadır. Bu bulgular, statinlerin hem lipit düşürücü hem de antiinflamatuvar özelliklerinin kardiyovasküler hastalıkların yönetiminde önemli bir rol oynadığını göstermektedir (63).

JUPITER çalışmasının önemli sonuçlarına rağmen, bu çalışmanın inflamasyon hipotezine ve özellikle aterotromboza olan doğrudan etkisine odaklanmadığı göz önünde bulundurulmalıdır. CANTOS çalışması ise bu eksikliği gidermek amacıyla tasarlanmıştır. IL-1β'ya özgül bir monoklonal antikor olan Canakinumab'ın kullanıldığı bu çalışmada, ilaç kullanan hastalarda plasebo grubuna göre majör istenmeyen kardiyak olaylarda yaklaşık %15'lik bir azalma gözlemlenmiştir (5, 64). Bu sonuçlar, inflamasyonun ateroskleroz ve kardiyovasküler olaylar üzerindeki etkisini doğrudan hedef alan tedavilerin potansiyel etkinliğini ve önemini göstermektedir. CANTOS çalışması,

inflamasyonun kardiyovasküler hastalıklar üzerindeki rolünü daha iyi anlamamıza ve bu mekanizmaları hedef alan yeni terapötik yaklaşımlar geliştirmemize olanak tanımaktadır (65).

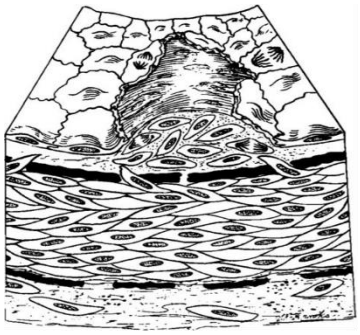
2.4.1. Ateroskleroz

Ateroskleroz sürecinin sadece lipit birikiminden ibaret olmadığı konusu, yıllar içindeki araştırmalar ve keşiflerle daha da derinleşmiştir. Aterojenezin kavramsal anlayışı zamanla evrilmiş olsa da, Rudolph Virchow'un inflamasyonun bu süreçte rol oynadığına dair yaptığı ilk keşiften bu yana (Şekil 6), mevcut bilgilerin ve yaklaşımların bir sentezi şeklinde yeni bir kavram gelişmiştir. Bu modern kavram, aterosklerozun sadece bir lipid birikimi süreci olmadığını, aynı zamanda bir dizi inflamatuvar ve proliferatif olaylar dizisini de içerdiğini göstermektedir. Bu anlayış, aterosklerozun patogenezi ve tedavisine yönelik yaklaşımların geliştirilmesinde yol gösterici olmuş, hastalığın daha kompleks ve çok boyutlu doğasını ortaya koymuştur (66).

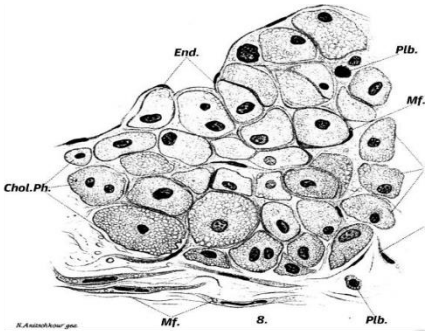
Aterom plaklarının oluşumunda ve gelişiminde vasküler düz kas hücrelerinin oynadığı rolün önemli olduğu düşünülmektedir. Endotel hasarına yanıt olarak aktive olan trombositlerin salgıladığı “Platelet-Derived Growth Factor” (PDGF) düz kas hücrelerinin proliferasyonunu tetiklemede merkezi bir rol oynamaktadır. Son zamanlarda yapılan çalışmalar, inflamasyonun arteriyel duvarın hücresel yapısı ile tüm risk faktörlerinin etkileşiminde kilit bir rol oynadığını göstermektedir. Bu yeni bilgiler ışığında, inflamasyonun ateroskleroz sürecindeki rolünün daha iyi anlaşılması, aterosklerozun tedavisi ve yönetimi için yeni stratejilerin ve tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine yol açması beklenmektedir (67).

Vasküler intimada lipoprotein moleküllerinin birikmesiyle başlayan süreç, bu moleküllerin oksidatif stres ürünleri tarafından modifiye edilmesiyle devam eder. Bu modifikasyon, immün sistem yanıtının tetiklenmesine neden olan modifiye lipoprotein moleküllerini ve lokal sitokinleri indükler. Bunun sonucunda dolaşımdaki monositler intimal bölgeye göç ederek doku makrofajlarına dönüşür. Bu makrofajlar, çöpçü (“scavenger”) reseptörleri aracılığıyla lokal dokuda bulunan modifiye lipoprotein moleküllerini temizlemeye çalışır, ancak bu süreç genellikle köpük hücrelerinin oluşumuyla sonuçlanır. Bu olaylar zinciri sırasında (Şekil 2-7), vasküler media tabakasındaki düz kas hücreleri de intima tabakasına, yani hasar bölgesine göç etmeye

başlar. Bu göç ve düz kas hücrelerinin proliferasyonu, aterosklerotik plağın gelişimine ve büyümesine katkıda bulunur (68, 69).



Vasküler düz kas hücrelerinin endotel hasarı sonrası trombositlerden salınan PDGF mediyatörünün etkisiyle aterom plağa göçü ve proliferasyonu. Bu fenomen aterosklerozu inflamasyon ve lökositlerden bağımsız basit bir fenomen olarak görüyordu. (Ross ve Glomset 1970)

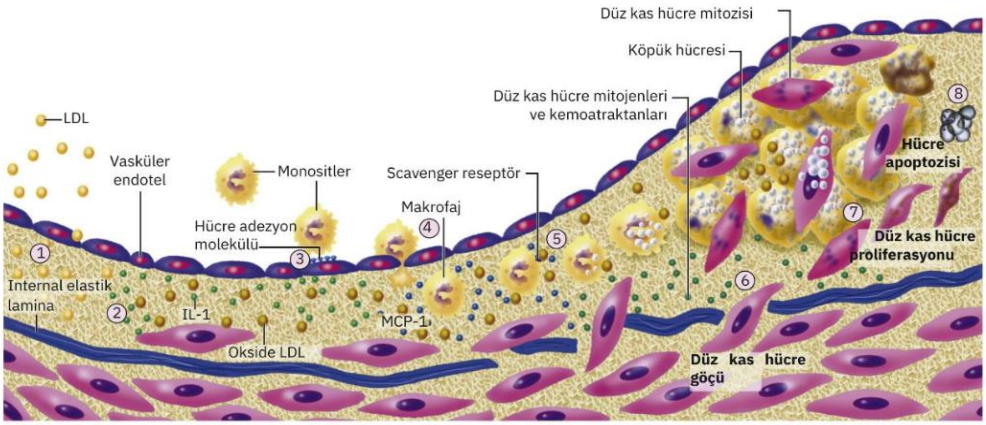


Kolesterol zengin diyet uygulanan farede köpük hücrelerinden zengin bir arteriyel lezyon. Devamlılığı bozulmamış endotel (End.). Makrofajlar (Mf.). Bazıları çift çekirdekli olan kolesterol yüklü fagositler (Chol.Ph.). Köpük hücrelerinin altında muhtemelen düz kas hücreleri olan bipolar iğ şeklindeki hücreler. (Anitchkov)



Ateromatöz köpük hücreleri (a′). Çoğalan hücrelerin tabakası (p). Bir hücre katmanı (h). İntimal endotel hücre sırasının altındaki lümen yüzeyi (i). 19. yy ortalarında yapılan bu çizimde lipit çekirdek (a,a′), düz kas hücre invazyonu (p), fibröz başlık, intakt endotel tabakası görülmektedir. (Virchow)

Şekil 2-6: Ateroskleroz patogenezindeki ilk yaklaşımların çizimlerinden bir kesit (67).



1- İntimada lipoprotein partiküllerinin birikimi. **2-** Oksidatif stres ürünleri, bunlar modifiye lipoproteinlerdekiler de dahil olmak üzere lokal sitokinleri indükleyebilmektedirler. **3-** İndüklenen sitokinler, dolaşımdaki lökositlerin bağlanmasını ve intimaya göçünü sağlayan adezyon moleküllerinin endotel yüzeyindeki ekspresyonunu arttırırlar. **4-** Kandaki monositler Monosit kemoatraktan faktör-1 (MCP-1) gibi sitokinler vasıtasıyla arteriyel duvardan içeri girerler. **5-** Scavenger reseptörleri modifiye lipoprotein moleküllerini hücre içine alarak makrofajların köpük hücrelerine dönüşümünü sağlar. **6-** Düz kas hücreleri media tabakasından intima tabakasına göç eder. **7-** Düz kas hücrelerinin çoğalması ile aterosklerotik plağın gelişimi sağlanır. Klinik olarak bu aşamada yağlı çizgilenmeler fibro-yağlı lezyonlara dönüşmektedir. **8-** İlerleyen aşamalarda kalsifikasyon gelişebilir, fibrozis devam eder. Bazen programlı olarak düz kas hücreleri apoptoza uğrar. Lipit çekirdeğin yüzeyini kaplayan fibröz kapsül programlı olarak apoptoza uğrayan hücreler ve onların materyallerinden oluşmaktadır.

Şekil 2-7: Aterosklerotik sürecin şematik gösterimi (24).

Geçmiş yıllarda yapılan gözlemsel çalışmalar ve elde edilen klinik kanıtlar, inflamasyon ve immünitenin aterogenezdeki temel rolünü ortaya koymuştur. Bu sürecin erken evrelerinde, makrofaj kökenli köpük hücreleri lipit moleküllerinin dokuya girişini kolaylaştırır ve bu moleküllerin depolanmasında bir rezervuar işlevi görerek aterosklerotik lezyonun gelişimine katkıda bulunur. Ayrıca, bu hücreler çeşitli inflamasyonu tetikleyen mediyatörler salgılar. Fagositik bu hücreler, lezyon bölgesinde serbest oksijen radikalleri salarak inflamasyonu artırır ve bu şekilde lezyonların ilerlemesine neden olur. Bu immünolojik yanıt, doğal bağışıklık sistemi ile ilişkilendirilmektedir (70, 71).

Aterosklerotik plakların ilerlemesinde, kazanılmış (adaptif) bağışıklık yanıtının da önemli bir rolü bulunmaktadır. Aterosklerotik lezyonlardaki fagositlerin yanı sıra, dendritik hücrelerin T hücrelerine antijen sunmasının, kazanılmış bağışıklık yanıtının başlatılmasında kilit bir etkiye sahip olduğu bilinmektedir. Adaptif bağışıklık sisteminin doğası gereği, farklı fonksiyonlara sahip çeşitli T hücre tipleri farklı etkilere neden olabilmektedir. Bazı T hücre tipleri inflamasyonu arttırıcı etkiler gösterirken, diğerleri çeşitli mediyatörler (örneğin, TGF-β, IL-10) aracılığıyla inflamasyonu baskılayabilirler. Bu nedenle, adaptif bağışıklık yanıtı, aterosklerotik lezyonların gelişiminde ve ilerlemesinde orkestra şefi gibi bir rol üstlenmektedir (72).

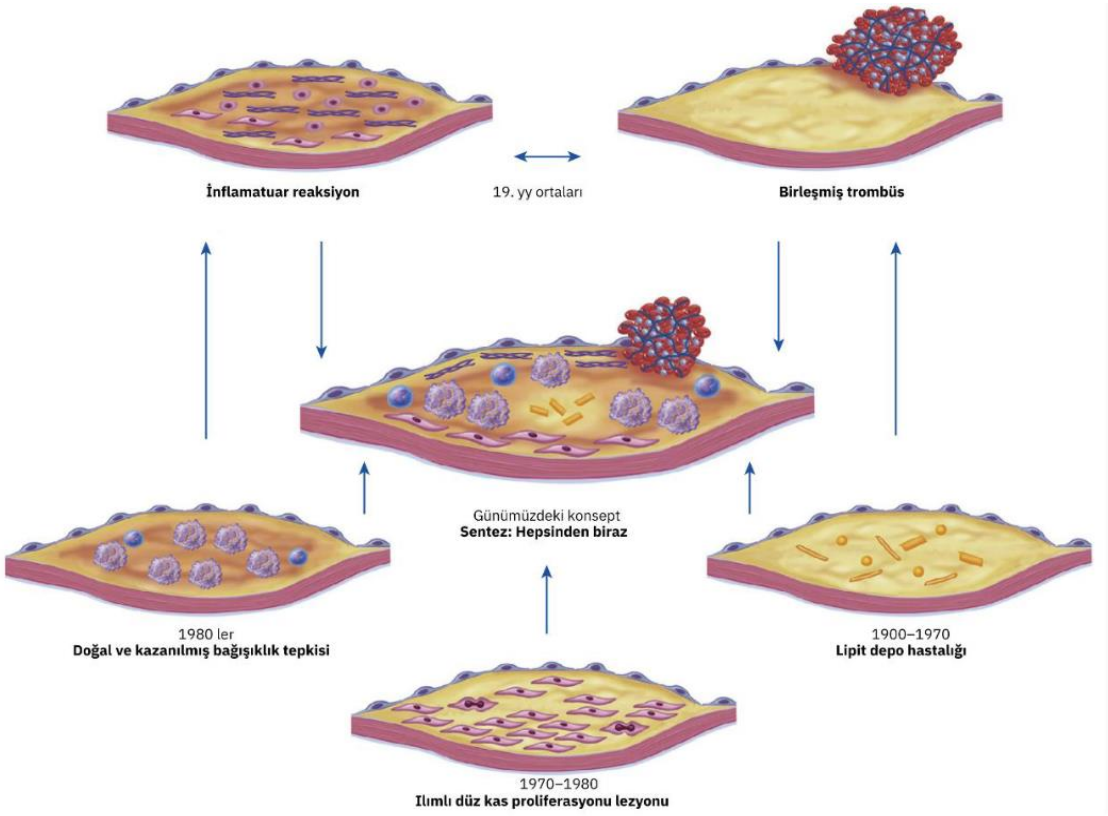
Aterosklerozun en ciddi komplikasyonlarından biri olan plak rüptürü ve tromboz, genellikle ani ve beklenmedik şekilde ortaya çıkar. Aterosklerotik süreç, yıllar boyunca yavaş yavaş gelişen bir durum olup, ilerleyen zaman içinde arteriyel lümenin daralmasına ve sonuç olarak hastada semptomların oluşmasına neden olabilir (Şekil 2-8). Ancak, ani gelişen plak rüptürü ve tromboz sonucu meydana gelen miyokard enfarktüsü durumunda, çoğu hasta ne yazık ki bu kritik olaydan önce belirgin semptomlar göstermeyebilir (73).

Akut koroner sendromların ortaya çıkmasında, plak bütünlüğünün bozulması temel bir etkendir. Klinik olarak ciddi sonuçlar doğuran bu olayların yaklaşım ve tedavisinde, patofizyolojik mekanizmalar önemli bir rehberlik sağlar. Plak bütünlüğünün bozulması, genellikle iki ana mekanizma ile açıklanır (74):

1. **Plak Rüptürü:** En sık görülen mekanizmadır ve aterosklerotik plağın fibroz kapağının yırtılması sonucu ortaya çıkar. Rüptüre olan plak, trombosit aktivasyonunu ve trombus oluşumunu tetikler, bu da koroner arterde ani bir tıkanıklığa ve dolayısıyla miyokardiyal iskemiye yol açabilir.

2. **Plak Erozyonu:** Plak erozyonu, endotel hücrelerinin kaybı ile karakterize edilir ve trombosit aktivasyonu ile trombus oluşumuna neden olur. Erozyon, genellikle daha az stabil olmayan plağın özelliklerine sahiptir ve daha az şiddetli klinik sonuçlarla ilişkilendirilebilir.

Aterom plaklarında fibröz kapak ince olduğunda, bu plakların rüptürü genellikle total oklüzyona ve buna bağlı olarak trombüs oluşumuna yol açar. Bu tür lezyonlar, genellikle makrofajların baskın olduğu, kolajen sentezinin ise yetersiz olduğu bir yapıya sahiptir (75).



Şekil 2-8: Ateroskleroz patogenezindeki yaklaşımların evrimi (67).

Fibröz başlığı kalın ve bütünlüğü bozulmamış olan aterom plaklarında, genellikle erozyona bağlı olarak oklüziv olmayan trombüsler gelişebilir (76). Bu lezyonlarda düz kas hücreleri baskındır ve granülositler, özellikle nötrofiller inflamasyon sürecinde önemli bir rol oynar (77). Aktive olan granülositlerden salınan pro-oksidan ve pro-inflamatuvar mediyatörler, bu hücresel yapıların ölmesi sonucu açığa çıkan nötrofil ekstraselüler tuzaklar (ölen hücrelerin DNA artıkları, NETs), inflamatuvar süreçlerin artmasına neden olabilir (78, 79).

Erozyon Sonucu Gelişen Trombüs:

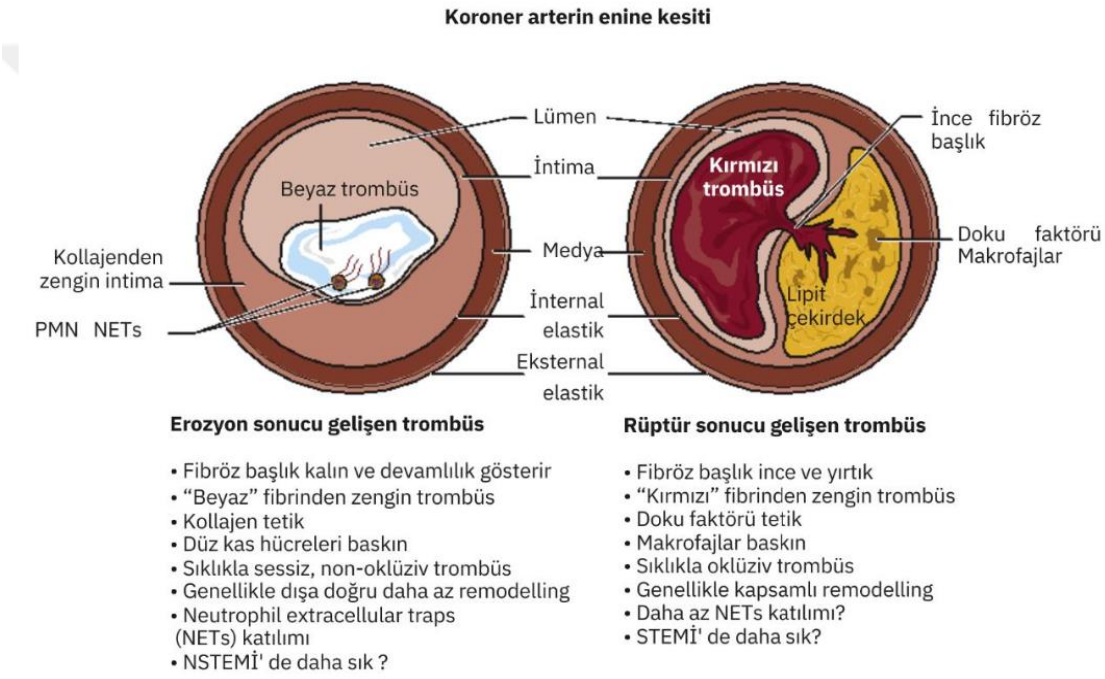
- Bu tip trombüs, damarın iç yüzeyindeki endotel tabakasının aşınması ile oluşur.
- Gösterilen "beyaz trombüs", fibrinden zengin ve genellikle kollajen ile tetiklenir.
- Trombüs yapısında düz kas hücreleri baskındır ve genellikle non-oklüzivdir, yani damarın tamamen tıkanmasına neden olmaz.
- Bu trombüs türü sessiz olabilir ve genellikle dışarı doğru daha az damar duvarı yeniden şekillenmesi (remodelling) gösterir.
- Neutrofil ekstrasellüler tuzakların (NETs) katılımı görülür, bu da inflamasyonun bir göstergesi olabilir.
- NSTEMI (Non-ST Elevasyonlu Miyokard İnfarktüsü) durumlarında daha sık rastlanır.

Rüptür Sonucu Gelişen Trombüs:

- Bu trombüs türü, damar duvarındaki bir plakın çatlaması veya yırtılması (rüptür) sonucu oluşur.
- "Kırmızı trombüs" fibrinden zengin olup, genellikle lipid çekirdekli ve ince bir fibröz başlık ile karakterizedir.
- Doku faktörü (tissue factor) bu trombüs oluşumunu tetikler ve makrofajların baskın olduğu bir yapıdadır.
- Bu tip trombüs genellikle oklüzivdir ve damarın tamamen tıkanmasına yol açabilir.
- Rüptüre uğramış plakın çevresinde kapsamlı bir damar duvarı remodellemesi gözlenebilir.
- NETs katılımı bu türde daha az mıdır sorusu sorulmuştur, bu da inflamatuar yanıtın bu türde daha farklı olabileceğini düşündürebilir.
- STEMI (ST Elevasyonlu Miyokard İnfarktüsü) durumlarında daha yaygındır.

Her iki durumda da, koroner arterin enine kesiti gösterilmiştir ve trombüsün oluşumunun arterin lümenini daralttığı veya tıkadığı gözlemlenebilir. Bu tür trombüsler akut koroner sendromun, özellikle miyokard infarktüsünün önemli nedenlerindendir.

Erozyon sonucu gelişen trombüs genellikle daha az ciddi klinik sonuçlara yol açarken, rüptür sonucu gelişen trombüs daha ciddi kardiyak olaylara neden olabilir (Şekil 2-9).



Şekil 2-9: Aterom plak komplikasyonlarının patolojik sınıflandırılması. NETs: Nötrofillerin parçalanması sonucu açığa çıkan DNA materyalleri (24).

2.5. İmmün Kontrol Noktası Proteinleri (İKNP)

İmmün kontrol noktası proteinleri, T hücrelerinin aktivasyon ve fonksiyonunu negatif yönde etkileyen, ko-inhibitör reseptörler olarak işlev görürler. Bu reseptörlerin inhibitör etkileri, hücre içinde ve dışında, aynı zamanda immünolojik yanıtın birçok farklı aşamasında gerçekleşebilir. İmmün kontrol noktası proteinlerinin inhibitör etki mekanizmalarını özetlemek gerekirse (80):

Ko-stimulatör Reseptörlerle Rekabet: İmmün kontrol noktası reseptörleri, T hücrelerinin yüzeyinde bulunan ko-stimulatör reseptörlerle rekabet ederek, bu reseptörlere (örneğin, B7-1 ve B7-2) bağlanmalarını engeller ve bu şekilde T hücre aktivasyonunu inhibe eder.

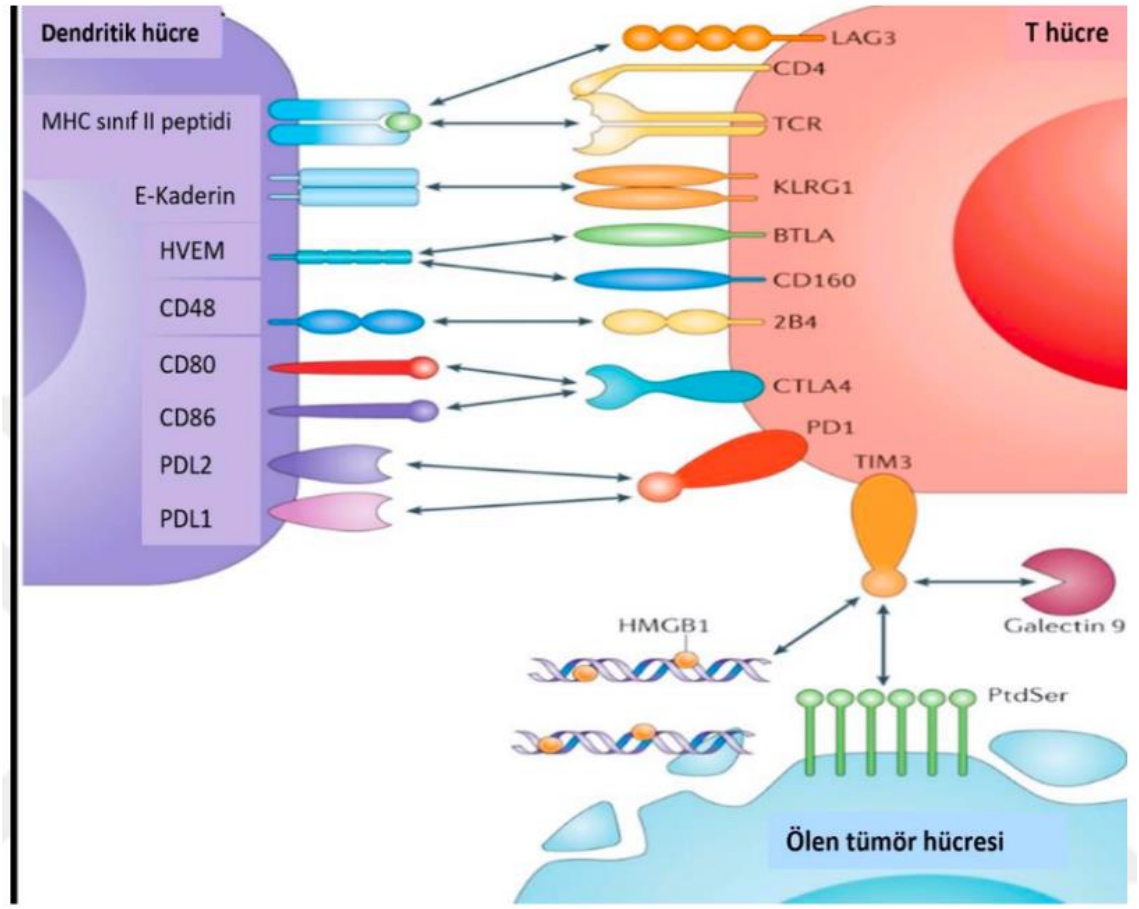
Ko-aktivatör ve T Hücre Reseptörü Alt Sinyal Yollarını Engelleme: Bu reseptörler, T hücre reseptörü veya ko-aktivatör sinyal yollarını bloke ederek, T hücrelerinin aktivasyonunu ve fonksiyonunu kısıtlar.

T Hücre Fonksiyon Kaybına Neden Olan Gen Ekspresyonunu Arttırma: İmmün kontrol noktası reseptörleri, T hücrelerinin fonksiyon kaybına yol açabilecek genlerin ekspresyonunu artırır ve böylece T hücrelerinin etkinliğini azaltır.

CTLA-4 ve PD-1 reseptörlerinin inhibisyonu, kanser hücrelerinin bağışıklık sisteminden kaçışını engelleyerek, T hücrelerinin kanser hücrelerine karşı daha etkili bir şekilde savaşmasını sağlar. Bu yaklaşım, özellikle geleneksel kanser tedavi yöntemlerine dirençli olan bazı kanser türlerinde büyük başarılar elde etmiştir. Bu keşifler, onkolojide immünoterapinin yükselen bir alanı olarak ortaya çıkmış ve bu alanda birçok klinik deney ve tedavi seçeneğinin geliştirilmesine yol açmıştır (81).

Kanser tedavisinde PD-1 ve CTLA-4 gibi immün kontrol noktası inhibitörlerinin klinik kullanıma girmesi, bu alanda yeni inhibitör reseptörlerin keşfini ve bunların kanser tedavisindeki rolünü araştıran bir dizi çalışmanın başlamasına yol açmıştır. PD-1 ve CTLA-4 inhibisyonuna yanıt veren hasta gruplarını seçmek için etkili biyobelirteçlerin eksikliği ve yüksek oranda PD-1 eksprese eden bazı hastaların anti-PD-1 tedavilerine yanıt vermemesi, farklı kontrol noktası reseptörlerinin eş zamanlı olarak eksprese edildiği ve etkileşimde bulunduğu hipotezini güçlendirmiştir (82). Bu durum, immün kontrol noktası inhibitörlerinin etkinliğini artırmak ve yanıt oranlarını iyileştirmek için kombinasyon tedavileri ve yeni hedeflerin araştırılmasını gerektirir.

Şekil 2-10'da T hücre fonksiyonlarını negatif yönde etkileyen, diğer bir deyişle inhibitör fonksiyonlara sahip reseptörler ve ligandları gösterilmektedir. Bu reseptörlerin her biri, kanser tedavisindeki potansiyel rolleri ve mekanizmaları bakımından önemlidir.



Şekil 2-10: T hücre fonksiyonlarının negatif regülasyonundan sorumlu reseptörler (82).

2.5.1. PD-1

Programlı Ölüm-1 (PD-1) reseptörü, regülatör T (Treg) hücrelerde ve aktivasyonu takiben NK hücreleri, Doğal öldürücü T (NKT) hücreleri, efektör T hücreleri ve B hücrelerinde eksprese edilmektedir. PD-1'in majör ligandı olan PD-L1; T lenfositleri, B hücreleri, makrofajlar, dendritik hücreler ve birçok nonhematopoietik hücrede, PD-1'in diğer bir ligandı olan PD-L2 ise PD-L1 kadar yaygın olmamakla birlikte dendritik hücreler ve NK hücrelerinde eksprese edilmektedir (83). PD-1 fizyolojik olarak T hücre yanıtlarının düzenlenmesinde önemli rol oynayan ve bunun sonucu olarak da öz antijenlere tolerans gelişmesinden sorumlu moleküllerden biridir (84). Kronik enfeksiyonlarda ortaya çıkan T hücre tükenmişliğinin PD-1 blokajı ile ortadan kaldırıldığı gösterilmiştir (85, 86).

Son zamanlarda elde edilen bulgular ışığında, klinik çalışmalar PD-1 inhibisyonunun, özellikle solid tümörlerde ve ardından hematolojik malignitelerde anti-tümöral immün yanıta olumlu etkiler gösterdiğini ortaya koymuştur (87). PD-1/PD-L1

yolaklarını inhibe eden tedavilerde, tümörün artan mutasyon yükü ve PD-L1 ekspresyon düzeyinin tedaviye yanıtı etkileyen önemli faktörler olduğu belirlenmişken; bu faktörlerin varlığına rağmen çok sayıda vakada tedaviye yanıt alınamaması, araştırmacıları PD-1 temelli tedavilere karşı direnç mekanizmalarını incelemeye itmiştir. Anti PD-1 tedavi direnci, primer direnç ve kazanılmış direnç olmak üzere iki ana kategoriye ayrılmaktadır. PD-1 ekspresyonu yüksek olan (PD-1 yüksek) T hücrelerinin, ileri derecede tükenmişlik fenotipine sahip oldukları ve bu nedenle anti-PD-1 tedavilerine dirençli oldukları belirlenmiştir (88). Bu durumun aksine, PD-1 ekspresyonu düşük olan hücre gruplarında ise bu tedavilere yanıt verildiği gözlemlenmiştir. PD-1 yüksek $CD8^{+}$T lenfositlerinin primer direnç mekanizmasından sorumlu oldukları ve bu sürecin tetiklediği artmış tükenmişlik hücre fenotipinin ise kazanılmış direncin başlıca mekanizması olduğu düşünülmektedir (89).

Çeşitli kanserlerde ve enfeksiyon hastalıklarında gen ifade profillerinde araştırılan PD-1 ligandlarını (PD-L1 ve PD-L2) kodlayan genlerindeki ifade değişimlerinin ateroskleroz gelişimindeki rolleri halen belirsizdir. Bu çalışma kapsamında hem serum düzeyleri hem de lökositlerdeki gen ifadesi incelenen CD274 veya B7 homolog 1 (B7-H1) olarak da bilinen programlanmış ölüm ligandı 1 (PD-L1), insanlarda *CD274* geni tarafından kodlanan bir proteindir. *PDL1 (PDCD1LG1, CD274)* geni, 9. kromozomda 9p24.1 bölgesine lokalize 7 ekzonlu bir gen olup T hücreleri ve B hücreleri gibi hematopoietik ve hematopoietik olmayan hücreler ve çeşitli tümör hücreleri tarafından eksprese edilen bir immün inhibitör reseptör ligandını kodlamaktadır. Bu ligandın reseptörüyle etkileşimi, T hücresi aktivasyonunu ve sitokin üretimini inhibe eder. Referans transkriptinden (NM_014143.4) 290 aminoasitlik a-izoformu (NP_054862.1), bir diğer transkiptten (NM_ NM_001267706.2) ise 176 aminoasitlik b-izoformu (NP_001254635.1) sentezlenmektedir (NCBI-"National Center for Biotechnology Information" data bankası verileri).

Diğer programlanmış ölüm ligandı olan PD-L2, (B7-DC), insanlarda *PDCD1LG2 (PDL2, CD273)* geni tarafından kodlanan bir proteindir. PD-L2, edinilmiş bağışıklık tepkisinin negatif düzenlenmesinde rol oynayan bir İKNP ligandı olup PD-1 ile etileşen ikinci liganttır. *PDL2 (PDCD1LG2*) geni de 9. kromozomda 9p24.1 bölgesine lokalize olup 7 ekzonludur ve tek bir referans trankriptinden (NM_025239.4) 273 aminoasitlik

(NP_079515.2) polipeptide translasyonu yapılır (NCBI-"National Center for Biotechnology Information" data bankası verileri).

2.5.2. CTLA-4

Sitotoksik T lenfosit antijen 4 (CTLA-4) (CD152) ve CD28, hem $CD4^+$ hem de $CD8^+$ T hücrelerinde bulunan ve birbirlerinin işlevlerine zıt etkiler gösteren homolog reseptörlerdir. Bu reseptörler, antijen sunan hücrelerin yüzeyinde bulunan CD80 ve CD86 moleküllerine bağlanma kapasitesine sahiptir. CD28, CD80/CD86 ile etkileşime girerek T hücrelerinin aktivasyonunda ko-stimülatör görevi üstlenen bir moleküldür. CD28'in aktive ettiği sinyal yolları, hem efektör T hücre aktivasyonunu hem de Treg hücreleri işlevlerini desteklemekte önemli rol oynar. Bu reseptörlerin etkileşimi, T hücre yanıtlarının düzenlenmesi ve bağışıklık sisteminin dengeyi sağlaması açısından kritik öneme sahiptir (90). CTLA-4, CD28 ile aynı ligandlara (CD80 ve CD86) bağlanarak yarışır ve bu şekilde CD28 aracılı ko-stimülasyonun antagonisti olarak işlev görür (91). Bu etkileşimler, T hücreleri ile antijen sunan hücreler arasında gerçekleşen immün sinapsta meydana gelir (92). CTLA-4'ün ligandları olan CD80 ve CD86, fonksiyonel olarak farklılıklarının henüz tam olarak tanımlanmadığı bilinen reseptörlerdir. Bu nedenle bu ligandlar genellikle B7 molekülü ya da CD80/86 olarak adlandırılır. Bu ligandlar, B lenfositler ve dendritik hücreler gibi antijen sunan hücrelerde de eksprese edilir (93). CTLA-4 ve CD28 arasındaki bu etkileşimler, T hücre yanıtlarının düzenlenmesinde ve immün toleransın sağlanmasında önemli bir rol oynar.

CD28/CTLA-4 yolağını hedefleyen antikorların geliştirilmesi, kanser ve otoimmün hastalıkların tedavisi alanında giderek artan bir popülariteye sahiptir. CTLA-4, vücudun kendi dokularına yönelik immün yanıtlarını düzenler ve böylece otoimmün hastalıkların tedavisinde bu yolağın aktive edilmesi veya güçlendirilmesi potansiyel bir tedavi yöntemi olarak görülmektedir. Aynı zamanda, bu yolağın inhibe edilmesi, tümör hücrelerinin vücut tarafından daha etkin bir şekilde tanınmasını ve anti-tümöral immün yanıtın güçlenmesini sağlamaktadır (94).

CTLA4 (CD152) geni, immünoglobulin süper ailesinin bir üyesi olan ve T hücrelerine inhibitör sinyal ileten bir proteini kodlar. 2. Kromozomda 2q33.2 bölgesinde lokalize olan *CTLA4* geni, 4 ekzonlu olup 223 aminoasitlik a-izoformu olan polipeptidi kodlayan (NP_005205.2) referans transkript (NM_005214.5) yanısıra diğer transkript varyantından (NM_001037631.3) transmembran domaini olmayan çözünür formdaki

(CTLA-4delTM veya sCTLA4) 174 aminoasitlik polipeptid (NP_001032720.1) sentezlenmektedir (NCBI-"National Center for Biotechnology Information" data bankası verileri).

2.5.3. TIM-3

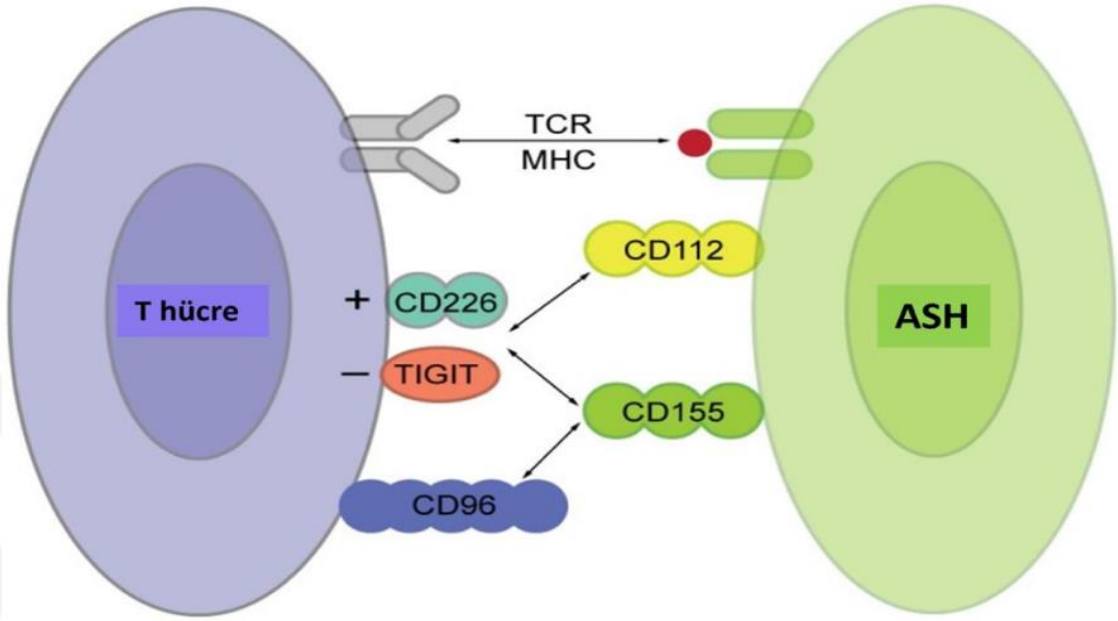
T hücre immünoglobülin ve müsin domeini içeren molekül-3 (TIM-3), yardımcı T (Th) hücreleri, sitotoksik T lenfositleri ve düzenleyici T hücreleri üzerinde yaygın olarak eksprese edilen bir moleküldür (95). Treg hücrelerinde TIM-3 ekspresyonunun artmasıyla, bu baskılayıcı hücre popülasyonunun genişlediği ve CTLA-4 ile FOXP3 düzeylerinin arttığı gözlemlenmiştir (96). Ayrıca, TIM-3'ün sadece adaptif immün sistem hücrelerinde değil, aynı zamanda doğal öldürücü (NK) hücrelerinde de eksprese edildiği belirlenmiştir. TIM-3 ekspresyonu yüksek olan NK hücrelerinde, sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında hem sitotoksik aktivite ve proliferasyon kapasitelerinde azalma hem de sitokin salınımlarında düşüş gözlemlenmiştir (97).

TIM-3, diğer immün kontrol noktası reseptörleriyle birlikte eksprese edilebilir ve en sık olarak PD-1 inhibitör reseptörü ile birlikte ifade edildiği gözlemlenmiştir. Özellikle $CD8^+$ sitotoksik T lenfositlerde TIM-3 ve PD-1'in birlikte ekspresyonunun, immün hücrelerde tükenmişlik fenotipine yol açtığı saptanmıştır. Bu reseptörlerin blokajının ise tükenmiş T hücre fenotipini azaltarak, anti-tümöral etkiyi arttırdığı gösterilmiştir (98).

2.5.4. TIGIT

TIGIT (T hücresi immunoglobulin ve ITIM domain immünreseptörü) ve CD96, antijen sunan hücreler üzerindeki CD155 ile etkileşim yoluyla işlev gösteren ko-inhibitör reseptörlerdir. Ko-stimülatör bir reseptör olan CD226 ise, CD155'e bağlanarak TIGIT ve CD96 ile rekabet eder ve bu şekilde antijen sunan hücrelerin aktivasyonuna katkıda bulunur. Bu yolak, CTLA-4/CD28 yolaklarıyla benzerlik göstermektedir (99). T hücresi ile antijen sunan hücre (ASH) arasındaki bu etkileşimler Şekil 2-11'de şematik olarak gösterilmektedir. Yapısal olarak, TIGIT immünoglobülin süperailesinin bir üyesidir ve genellikle inhibitör reseptörlerde bulunan immünreseptör tirozin bazlı inhibitör motif (ITIM) TIGIT'te de yer almaktadır; bu motif, TIGIT'in inhibitör fonksiyonlarından sorumludur (100). TIGIT, bellek T hücreleri, αβ T hücreleri, Treg hücreleri, NKT hücreleri, foliküler yardımcı T (Tfh) hücreleri ve NK hücreleri gibi çeşitli immün hücrelerde eksprese edilmektedir (101, 102). Bu reseptörlerin etkileşimleri, immün

yanıtların düzenlenmesinde ve immün toleransın sağlanmasında önemli rol oynamaktadır.



Şekil 2-11: TIGIT ve ko-inhibitör reseptör olan CD96 ile aktivatör reseptör olan CD226'nın T hücre ve antijen sunan hücre (ASH) etkileşimindeki rolü (99).

TIGIT, hem intrinsik hem de ekstrinsik mekanizmalar aracılığıyla inhibe edici etkilerini sergilemektedir. İntrinsik mekanizmada, TIGIT, CD155 aracılı etkileşim yoluyla TIGIT eksprese eden T hücrelerinde interferon (IFN)-γ salınımını inhibe eder. Bu etki, hem $CD4^+$ hem de $CD8^+$ T lenfositlerinde gözlemlenmiştir (103, 104). Ayrıca TIGIT, Treg hücrelerinde TIGIT agonistleriyle uyarıldığında, intrinsik etki mekanizması aracılığıyla hem IL-10 hem de Fibrinojen benzeri protein-2 (FGL2) düzeylerinde bir artışa neden olmaktadır (105). Bunun yanı sıra, TIGIT'in ekstrinsik inhibisyon mekanizmasında, TIGIT ve CD155'in etkileşimi sonucu dendritik hücrelerde Erk aktivasyonu inhibe olur ve bu durum IL-12 üretiminin azalmasına, IL-10 üretiminin artmasına yol açar (106). TIGIT eksprese eden Treg hücrelerinin, Th1/Th17 ve Th2 tipi immün yanıtlar arasındaki dengeyi bozma konusunda önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. TIGIT eksprese eden Treg hücrelerin, Th1/Th17 immün yanıtlarını seçici bir şekilde baskılamak ve Th2 immün fonksiyonlarını korumak gibi spesifik görevleri bulunmaktadır. Bu etki, $TIGIT^+$ Treg hücrelerinin, $TIGIT^-$ Treg hücrelerine kıyasla daha fazla FGL2 üretmesiyle ilişkilendirilmektedir (105). Ayrıca, T lenfositlerin yanı sıra, NK hücrelerinde de TIGIT'in önemli bir rol oynadığı belirtilmektedir. TIGIT'in

NK hücreleri üzerindeki etkisi, genellikle CD155'e bağlı ekstrinsik yolak aracılığı ile gerçekleşmektedir (102). TIGIT ekspresyonu ve IFN-γ salınımı ile sitotoksik aktivite arasında negatif bir korelasyon saptanmıştır (107).

TIGIT, bazı T hücrelerinde ve doğal öldürücü hücrelerde (NK) bulunan bir immün reseptör olarak dendritik hücreler (DC'ler), makrofajlar vb. hücrelerin yüzeyindeki CD155'e yüksek afiniteyle ve ayrıca CD112'ye daha düşük afiniteyle bağlanabilmektedir. 3. Kromozomda 3q13.31 bölgesine lokalize *TIGIT* geni, 5 ekzonlu olup 5 alternatif kırpılma ile farklı uzunlukta polipeptidleri kodlayan mRNA'lara transkribe olmaktadır. Bunlardan 244 aminoasitlik polipeptide tranlasyonu yapılan (NP_776160.2) mRNA (NM_173799.4), ncbi ve ensembl genom databankalarına göre referans transkript olarak tanımlanmaktadır (NCBI-"National Center for Biotechnology Information" data bankası verileri).

2.5.5. LAG-3

Lenfosit aktivasyon geni-3 (LAG-3), 1990'ların başlarında keşfedilen ve CD4 molekülü ile yapısal homoloji gösteren bir transmembran proteindir (108). LAG-3 proteini, esas olarak aktive T hücreleri ve NK hücreleri üzerinde eksprese edilir ve ilk kez keşfedildiğinde $CD4^+$ ve $CD8^+$ T hücrelerinin aktivasyon belirteci olarak tanımlanmıştır (109). LAG-3'ün $CD4^+$ T lenfositleri ile etkileşiminin, Majör histokompatibilite kompleksi (MHC) sınıf II molekül aracılı olarak gerçekleştiği düşünülmektedir. Bu bağlamda yapılan araştırmalar, LAG-3'ün MHC sınıf II molekülüne bağlandığını, ancak $CD4^+$ T hücrelerinden farklı bir bağlanma noktası kullandığını ortaya koymuştur (110). Yapılan çalışmalar LAG-3'ün MHC sınıf II molekülünün yanı sıra Fibrinojen benzeri protein-1 (FGL-1), a-sinüklein, Galektin-3 ve karaciğer ve lenf nodu sinüzodial C-tipi lektin (LSECtin/CLEC4G) ile bağlanabildiğini göstermiştir (111-113). LAG-3'ün PD-1, TIGIT, TIM-3 ve 2B4 (CD244) gibi diğer inhibitör moleküller ile birlikte eksprese edilmesi immün hücre tükenmişliğine yol açmakta ve sonuç olarak sitokin salınımında azalmaya yol açmaktadır (114).

LAG-3'ün birçok hücrede eksprese edilmesi ve çok sayıda ligandının tanımlanmış olmasına rağmen, molekülün yapısı ve işlevleri hakkında hâlâ bilinmeyen birçok nokta bulunmaktadır. Bununla birlikte, son yıllarda yapılan immuno-onkolojik çalışmalar, LAG-3 blokajının anti-tümöral immünite üzerindeki etkilerini incelemektedir. İlk

preklinik ve hayvan çalışmaları, LAG-3'ün inhibe veya bloke edilmesinin T hücre tükenmişliğini hafif düzeyde azaltabileceğini göstermiştir. Ancak, LAG-3 ve PD-1 moleküllerinin birlikte kullanımı, *LAG3* ve *PD1* genleri işlevsiz hale getirilen ("knock out") transgenik farelerde T hücre tükenmişliğinin anlamlı biçimde azaltıldığını ortaya koymuştur (115). Son zamanlarda yapılan araştırmalar, over kanseri ve melanom gibi solid tümörlerde anti-PD1 tedavilerinin sınırlı etkilerine karşı, LAG-3 inhibisyonunun eklenmesinin anti-tümöral etkiyi anlamlı şekilde artırabileceğini göstermektedir (115, 116). Bu çalışmalar, PD-1'e yönelik immünoterapi etkinliğinin, LAG-3 inhibisyonu ile birleştirildiğinde potansiyel olarak artabileceğini öne sürmektedir.

2.6. Çözünür İmmün Kontrol Noktası Reseptörleri

İmmün kontrol noktası inhibitörleri, immün sistemin baskılanmasında kritik fonksiyonlara sahip çeşitli moleküllerden oluşmaktadır. Bu reseptörler arasında tümör immünolojisinde en etkin rolleri oynayanlar ve PD-1, CTLA-4, TIM-3, LAG-3 ve TIGIT olarak bilinir. Bu reseptörlerin etkilerinin ve prognostik önemlerinin daha iyi anlaşılabilmesi için yapılan biyobelirteç araştırmaları sırasında, bu kontrol noktası inhibitörlerinin çözünür ("soluble") izoformlarının dolaşımda bulunduğu tespit edilmiştir (117). Bu bulgu, kanser ve diğer hastalıkların tanı ve tedavisinde kullanılabilecek potansiyel biyobelirteçlerin keşfini içermekte ve bu kontrol noktası inhibitörlerinin immün yanıtlar ve tümör biyolojisi üzerindeki etkilerini daha iyi anlamamıza yardımcı olmaktadır.

2.6.1. sCTLA-4

Çözünür CTLA-4 (sCTLA-4), yüzeyde bulunan CTLA-4'ün alternatif mekanizmalarla bölünmesi sonucu oluşan ve transmembran bölümü içermeyen bir formudur. Bu nedenle hücre yüzeyine bağlanmak yerine hücre yüzeyinden salgılanır (118). *In vitro* çalışmalar, sCTLA-4'ün T hücre fonksiyonunu güçlü bir şekilde inhibe ettiğini göstermektedir. Treg hücreleri de sCTLA-4 salgılar ve bu mekanizma, Treg hücrelerinin immüniteyi bastırıcı etkisini daha da belirgin hale getirir. sCTLA-4, kanser gibi immün sistem dengesinin bozulduğu hastalıkların yanı sıra otoimmün hastalıklarda da önemli bir rol oynar (119). Kolorektal kanser hastalarında, sCTLA-4 düzeylerinin membrana bağlı CTLA-4 ile benzer şekilde kötü bir prognozla ilişkili olduğu gösterilmiştir (120).

2.6.2. sPD-1 ve sPD-L1

Son yıllarda özellikle kanser şiddeti ile yakından ilişkilendirilen, sPD-1 (çözünür PD-1) ve sPD-L1 (çözünür PD-L1) adı verilen çözünür immün kontrol noktası reseptörleri bulunmaktadır. sPD-L1 ve sPD-1, sCTLA-4 gibi alternatif bölünme mekanizmalarıyla oluşurlar ve hücre zarını içermeyen salgılanan formlardır (121, 122). sPD-1, ekstrasellüler parçası aracılığıyla PD1:PD-L1 bağlanmasını engeller ve T hücre baskılanmasını önleyerek anti-tümöral immün yanıtı harekete geçirir. Bu mekanizma kanser immünolojisi açısından olumlu bir gelişme olabilirken, sağlıklı bireylerde sPD-1 düzeyinin artması otoimmüniteye yol açabilir (123). İlginç bir şekilde, anti-PD-1 tedavilerinin ardından serumdaki sPD-L1 düzeylerinde artış gözlenir ve tedavi sonrası sPD-L1 düzeyleri düşük olan grubun daha olumlu bir prognoza sahip olduğu saptanmıştır (124). Over kanseri ile ilişkilendirilen bir çalışma, sPD-1 düzeyinin over kanserinde benzer lezyonlarla karşılaştırıldığında anlamlı şekilde yükseldiğini göstermiştir (125). Bu sonuçlar, sPD-1 düzeyinin henüz prognostik veya tanısal açıdan ne kadar önemli olduğunu belirtmese de gelecekteki araştırmalar için önemli bir yol gösterici olabilir.

2.6.3.sTIM-3

TIM-3'ün çözünür formu (sTIM-3), diğer immün kontrol noktası reseptörlerinin çözünür formları gibi alternatif kırpılma süreciyle ortaya çıkar. Başka bir mekanizma ise hücre yüzeyinden kesilme işlemidir ve bu süreç, matriks metalloproteinaz enzimleri ADAM10 (“A Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10”) ve ADAM17 (“A Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 17”) tarafından gerçekleştirilir (126). sTIM-3, $CD8^+$ T lenfositlerin tükenmişlik fenotipini artırarak bellek T hücre gelişimini engellemektedir (127). Yine de $CD8^+$ T hücre tükenmişliği üzerinde sTIM-3'ün rolü tam olarak anlaşılamamıştır. Ancak, sTIM-3'ün tükenmişlik fenotipi dışında, T lenfositlerin antijen spesifik immün yanıtlarını da inhibe ettiği bilinmektedir (128).

2.6.4. sLAG-3

LAG-3, özellikle aktive edilmiş insan T hücrelerinde, Treg hücrelerinde ve NK hücrelerinde tanımlanan immünoglobülin üst ailesinin bir transmembran proteinidir (129, 130). LAG-3, CD4'e oldukça benzer ve genellikle CD4'ten daha yüksek bir afiniteye sahip istikrarlı peptid-MHC sınıf II (pMHCII) komplekslerini tanır (131, 132). LAG-3'ün

pMHCII ile çapraz bağlanması, çift yönlü inhibisyona yol açar. T hücresinde, çoğalmayı ve IL-2 ile IFNγ üretimini azaltır (131).

Doğal olarak meydana gelen çözünür LAG-3 (sLAG-3), hücre yüzeyinden metalloproteazlar ADAM10 ve ADAM17 aracılığıyla gerçekleşen proteolitik kesim ile eksprese edilir ve hücre yüzeyindeki LAG-3 miktarının yerine konulan bir belirteç olarak kabul edilir (131). Çözünür LAG-3, bir monomerdir ve MHCII ile herhangi bir belirgin afiniteye sahip değildir (129). İnsanlarda, yüksek sLAG-3 düzeyleri kanserde daha az olumlu bir hastalık sonucu ile ilişkilendirilmekte ve rekombinant Fc ile bağlı LAG-3 (Fc-LAG-3) eklenmesi ile *in vitro* olarak anti-apoptotik bir etki göstermektedir (133). Etki, T hücreleri yanı sıra Treg hücreleri tarafından da eksprese edilir, ancak farklı hücre tiplerindeki rolü hala belirsizdir (134).

LAG-3'ün romatoid artrit (RA) dahil otoimmün hastalıklardaki ekspresyonu ve rolü hakkında çok az bilgi bulunmaktadır. LAG-3'ün anti-inflamatuvar kapasitesi, CD4 ile benzerliği ve pMHCII ile bağlanma yeteneği, RA'da araştırma için ilginç bir hedef yapmaktadır. Bir çalışmada, LAG-3'ün erken ve kronik RA hastalarında yükseldiğini ve daha şiddetli hastalık belirtileri ile ilişkilendiği gösterilmiştir. Ayrıca, LAG-3'ün RA'da proinflamatuvar sitokin salınımını baskılama konusunda biyolojik olarak etkin bir rol oynadığını, bu etkinin LAG-3/Gal-3 etkileşimini inhibe etmekle değişmediği görülmüştür (135).

2.6.5. Kardiyovasküler Hastalıklarda İmmün Kontrol Noktalarının Rolü

2.6.5.1. Ateroskleroz

Son zamanlarda yapılan çalışmalar, immün kontrol (IC) inhibitörü tedavisinin miyokard enfarktüsü ve inme riskini artırdığına işaret etmiştir (136, 137). Tek merkezli, eşleştirilmiş kohort çalışmasında, immün kontrol inhibitörü alan hastaların kardiyovasküler olay riskinin, muhtemelen aterosklerozun hızlandırılmış ilerlemesi yoluyla, üç kat daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir (136). Bu nedenle, T hücrelerinin IC inhibisyonunun ateroskleroza karşı koruma sağladığı düşünülmekle birlikte, halen uzun süreli çalışmalar mevcut değildir.

PD-1/PD-L1'in ateroskleroza karşı koruması, genetik olarak PD-1 veya PD-L1'i işlevsizleştirilmiş (“knock out”) farelerde, daha büyük plaklar oluşması, bu plaklarda daha yüksek T hücre ve makrofaj sayıları, artmış Tümör Nekroz Faktörü alfa (TNFα)

seviyeleri, antijen sunan hücreler tarafından T hücre aktivasyonu ve CD8 T hücrelerinin artmış sitotoksik aktivitesi gibi durumlarla gösterilmektedir. Bunlar, inflamasyon ve plak oluşumunu artırmaktadır (138, 139). Ayrıca, PD-1'in PD-L1'e bağlanması sonucu farklılaşan Treg hücreleri, Th1 hücrelerinin sitokin üretimini inhibe eder, bu da interferon γ (IFNγ) ve TNFα dahil olmak üzere sitokinlerin üretimini azaltır (140, 141). IFNγ'nin aterojenezde, T hücre ve makrofajların çekilmesi, sitokin salgılanması ve endotelyal hücreler tarafından artmış antijen sunumu yoluyla anahtar bir rol oynadığı belirlendiğinden, bu bağlanma hem plak boyutunu hem de inflamatuvar T hücre yanıtlarını azaltır (142, 143).

IFNγ, damar düz kas hücrelerinin çoğalmasını inhibe ederek ve kolajen sentezini azaltarak plak istikrarsızlığına da katkıda bulunur. Buna karşılık, Treg hücreleri anti-inflamatuvar sitokinler IL-10 ve TGF-β salgılayarak ve birden fazla inhibitör immün kontrol (IC) reseptörleri eksprese ederek aterojenezi azaltır ve pro-inflamatuvar efektör T hücrelerinin çoğalmasını baskılar (144). Farelerde Treg hücrelerinin tükenmesinin, IL-10 eksikliğinin veya TGF-β'nin bozulmasının aterosklerotik hastalığı kötüleştirdiği gözlemlenmesi, bu durumu vurgulamaktadır (145, 146). Ayrıca, T hücrelerinin sürekli olarak antijene veya inflamatuvar sinyallere maruz kalması, aterosklerotik lezyonlarda TGF-β ve IFNγ ile birlikte, hücrelerin tükenmişliğe uğramasına ve efektör fonksiyonlarının bir kısmını kaybetmesine yol açar. Bu durum, azalmış T hücre çoğalması ve sitokin üretimi ile PD-1 ve LAG-3 gibi artmış inhibitör IC ekspresyonu ile kendini gösterir (147). Aterosklerotik lezyonlarda PD-1 eksprese eden tükenmiş T hücreleri bulunmuş olup, bu durum PD-1'in ICI ile inhibe edilmesinin, tükenmiş T hücrelerini yeniden aktive ederek aterosklerozun hızlanmasına ve şiddetlenmesine katkıda bulunabileceğini düşündürmektedir (148).

Hücresel düzeyde, PD-L1 ekspresyonu, endotelyal hücreler üzerinde IFNγ ve TNFα tarafından indüklenmektedir (149). İnsan göbek kordonu ven endotelyal hücreleri (HUVECs) üzerinde yapılan bir çalışma, PD-L2'nin sürekli ekspresyonunu ve IFNγ tedavisi sonrası PD-L1'in indüklenmiş ekspresyonunu göstermiştir (150). Okside düşük yoğunluklu lipoprotein (ox-LDL) tarafından bozulmuş ve PD-L1 eksprese eden HUVECs, Treg hücrelerinde CTLA-4 ve PD-1 ekspresyonunu artırabilmekte ve IL-10 ile TGF-β üretimlerini modüle edebilmektedir. Anti-PD-L1 ile tedavi edildiğinde, HUVECs PD-L1 ekspresyonunu ve sitokin üretimini artırma yeteneğini kaybetmektedir. T

hücrelerindeki PD-1'e trans bağlanmanın yanı sıra, PD-L1, vasküler endotelyal hücreler (VECs) üzerindeki PD-1'e cis olarak da bağlanabilir. Bu durum, PD-L1 yüzey ekspresyonunun azalmasına ve sonuç olarak CD8 T hücrelerinin toksisitesinin artmasına yol açar, bu da VEC'lere perforin, TNFα ve IFNγ aracılı hasar ve apoptoza neden olur (151). Buna uygun olarak, endotelyal PD-L1/2 blokajı, CD8 T hücrelerinin IFNγ salgılamasını ve litik aktivitesini artırmaktadır (152).

PD-L1 eksprese eden kanser hücrelerinden, intrinsik yolağın, JAK/STAT3/kaspaz 7 bağımlı yolakları inhibe ederek IFNγ'nin sitotoksik etkilerine, karşı koyduğu ve böylece IFNγ ile indüklenen apoptozdan korunmayı sağladığı bilinmektedir (153). PD-L1'in benzer bir fonksiyonu, lenf düğümü kasılmasında apoptozdan korunmayı gösteren ve yüksek seviyelerde PD-L1 eksprese eden lenfatik endotelyal hücreler üzerinde yapılan bir çalışmada tanımlanmıştır (154). Genel olarak, endotelyal hücrelerdeki PD-L1/2 ekspresyonu, Treg aktivitesini artırarak ve CD8 T hücre aktivitesini azaltarak immün sistemi inhibe etme yeteneğini göstermekte ve bu durum, immün hasarın pro-aterosklerotik etkilerine karşı endotelyumu korumaktadır.

T hücresine bağımlı immün yanıtta rol oynayan TNF reseptörü CD30 için bir sitokin ligandı olan Tümör nekroz faktörü ligandı süper aile üyesi 8 (TNFSF8) olarak da bilinen CD153, insanlarda 9. Kromozomda 9q32-q33.1 bölgesinde lokalize *TNFSF8 (CD30LG)* geninden kodlanan bir proteindir. 5 ekzonlu genden alternatif kırpılma ile iki transkript üretilmekte ve bu transkriptlerden (sırasıyla, NM_001244.4 ve NM_001252290.1) 234 aminoasitlik TNFSF8'nin 1. isoformu (NP_001235.1) ve 164 aminoasitlik 2. isoformu (NP_001239219.1) sentezlenmektedir (NCBI-"National Center for Biotechnology Information" data bankası verileri).

Tümör nekroz faktörü (TNF) reseptör ailesinin bir üyesi olan TNFRSF9 (Tümör nekroz faktörü reseptörü süper aile üyesi 9), lökositlerin ve immün olmayan hücrelerin yüzeylerinde eksprese edilen tip 1 transmembran proteini olup 1. Kromozomun 1p36.23 bölgesine lokalize *TNFRSF9* geninden kodlanır. TNFRSF9'un alternatif isimleri, CD137 antijeni veya T hücre Antijen 4-1BB Homoloğu'dur ve lenfosit aktivasyonu (ILA) tarafından indüklenmektedir. 10 ekzonlu *TNFRSF9* geninden alternatif kırpılmalar ile 3 transkript üretilmektedir. Esas olarak genin 8 ekzonundan transkribe edilen mRNA'dan (NM_001561.6) 255 aminoasitlik protein (NP_001552.2) olan CD137 sentezlenmektedir (NCBI-"National Center for Biotechnology Information" data bankası verileri). Daha

önce ateroskleroz ile ilişkisi bilinmeyen *TNFSF8* ve *TNFRSF9* gen ifade düzeyleri, bu çalışma kapsamında AKS hastaların lökositlerinde diğer İKNP'leri kodlayan genler (*TIGIT* ve *CTLA*4 ek olarak PD-1 ligand genleri *PDL1* ve *PDL2*) ile birlikte araştırıldı.

2.6.5.2. Aterosklerozda Sitotoksik T-Lenfosit Antijeni 4

PD-1/PD-L1'e benzer şekilde, *CTLA4* geni işlevsizleştirilmiş transgenik farelerde lezyon büyüklüğünde artış gözlemlenirken, anti-CTLA-4 bloke edici antikorları alan farelerde, esas olarak T hücresi kaynaklı inflamasyon tarafından yönlendirilen aterosklerozun ilerlediği gösterilmiştir (155). *CTLA4* geni işlevsizleştirilmiş farelerde yapılan çalışmalara paralel olarak, *CTLA4* geni aşırı eksprese eden ("knock in") fareler veya CTLA-4 analoğu "abatacept" alan farelerde, intimal kalınlaşmada azalma (%58,5 azalma), CD4 T hücre sayısında azalma, daha az proliferasyon aktivitesi ve proinflamatuvar sitokin üretiminde azalma gözlemlenmiştir (156, 157). CTLA-4 ligandlarının hücresel ekspresyonuna ilişkin olarak, miyokard enfarktüsünden sonra iskemik kalp hasarını taklit etmek için hipoksi ile tedavi edilen indüklenmiş pluripotent kök hücre türevi kardiyomiyositlerde (iPSC-CM), hem CD80 hem de CD86 gen seviyelerinde artış bulunmuştur (158). Bu, farelerde enfarktüs sınır bölgelerinde gözlemlenen CD80/86 ekspresyonunun hem gen hem de protein seviyelerinde önemli ölçüde artması ile daha da güçlenmiştir. Bu fare modeli, hastalarda görüleni yansıtmakta olup "abatacept" tedavisinin anti-CTLA-4 kalp hasarını hafiflettiği ve daha iyi hayatta kalma oranları sağladığı gösterilmiştir (158).

Ayrıca, dendritik hücrelerde CTLA-4'e bağlanmanın CD80/86 sinyalizasyonunu tetiklemesi, "Indeolamine 2,3-dioxygenase" (IDO) ekspresyonunu indükler (159). IDO düzeyindeki artış, T hücre döngüsünün ilerlemesini engelleyerek T hücre aktivasyonunun azalmasına ve T hücre apoptozunun artmasına yol açar (160). Sonuç olarak, anti-CTLA-4 antikorlarının, dendritik hücrelerde CD80/86 sinyalizasyonunu azaltması, böylece öz-toleransın azalmasına ve otoimmünitenin artmasına yol açabilir.

2.6.5.3. Aterosklerozda Lenfosit Aktivasyon Geni 3 (LAG-3)

Ateroskleroz veya koroner arter hastalığı (KAH) vakaları, klinik deneylerde anti-LAG-3 tedavisi için henüz bildirilmemiştir. Anti-LAG-3 tedavisi FDA tarafından henüz yeni onaylandığı için, uzun takip süreleri olan büyük ölçekli çalışmalar hala eksiktir. Bu nedenle, anti-LAG-3 tedavisinin aterosklerotik hastalıkla ilişkili olup olmadığına dair kesin sonuçlar veya öneriler henüz yapılmamıştır. Ancak, LAG-3'ün bağımsız olarak

KAH ile pozitif bir korelasyon gösterdiği ve aterosklerotik plaklardaki tükenmiş T hücrelerinde bulunduğu tespit edilmiştir (147, 161).

Farelerde tek başına LAG-3'ün geninin işlevsizleştirilmesi, hastalık gelişimine yol açmasa da Gal-3'ün inhibisyonunun veya eksikliğinin, özellikle tümör mikroçevresinde $CD8^+$ T hücrelerini aktive ettiği gösterilmiştir. Bu durum, PD-L1 inhibisyonuna benzer şekilde bir anti-tümör etkisi olduğunu düşündürmektedir (113). PD-L1'e benzer şekilde, LAG-3-MHCII bağlanması da Fas aracılı ve ilaç indüklenmiş apoptozu önlemek için hem MAPK/Erk hem de PI3K/Akt/mTOR yollarını yukarı yönlü düzenleyerek koruma sağlamaktadır (162). Bu bağlamda, LAG-3 ve PD-L1'in endotelyal hücrelerde benzer işlevlere sahip olabileceği ve endotelyal hücre ölümüne karşı koruma sağlayarak plak stabilitesini artırabileceği düşünülmektedir.

2.6.5.4. Atherosklerozda Otoimmünite

İmmün kontrol inhibitörleri (ICI) ile indüklenen aterosklerozun ek bir mekanizması, öz-antijenler yoluyla olabilir. KAH'lı vakalarda birçok potansiyel öz-antijen tanımlanmıştır, bunlardan biri Keratin 8'dir (163). Keratin-8, KAH hastalarının insan periferik kan mononükleer hücrelerinde (PBMC) PD-1 seviyelerini artırmazken, kontrollerden elde edilen PBMC'lerde PD-1 mRNA seviyelerini artırmıştır. Bu durum, PD-1'in öz-antijenler tarafından indüklenerek T hücre yanıtını sınırlayabileceğini ve bu mekanizmanın KAH hastalarında bozulmuş olduğunu göstermektedir (151, 163). Ek olarak, yüksek PD-L1 ekspresyonunda sahip mide adenokarsinom hücreleri, hücre içi yağ asidi bağlayıcı protein (Fabp4/5) seviyelerini artırarak lipid alımını artırmaktadır. PD-L1 blokajı; Fabp4/5 ekspresyonunu azaltır ve böylece lipid alımını azaltır (164). Benzer bir süreç, PD-L1 eksprese eden hücrelerde anti-PD-L1 tedavisi ile hücresel lipid alımının azalmasına ve böylece plak bölgesinde serbest yağ asidi seviyelerinin yükselmesine, muhtemelen aterosklerozun kötüleşmesine neden olabilir. Bir diğer ilginç öz-antijen, düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) kolesterolünün temel proteini olan apolipoprotein B (apoB)'dir. Yayın öncesi yapılan bir retrospektif analiz, özellikle $\geq$25 kg/m^2 vücut kitle indeksine sahip ve kemoterapi ile kombine tedavi alan hastalarda, apoB açısından yüksek lipoproteinlerin kötü ICI yanıtı için risk faktörleri olduğunu bulmuştur (165). ApoB ve IC arasındaki etkileşim tam olarak açıklığa kavuşturulmasa da apoB spesifik $CD4^+$ T hücrelerinin aterosklerozda otoimmüniteyi tetikleyebileceği öne sürülmektedir (166).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırma Vakalarının Seçimi ve Kan Örneklerinin Toplanması

Bu çalışma, cinsiyet ve yaş dağılımları dengeli olacak şekilde 78 akut koroner sendrom hastası ve 26 koroner arter hastalığı riski olmayan kontrol grubu aşağıdaki şeklinde tasarlandı.

- ST Segment Elevasyonlu Miyokard Enfarktüslü olgu sayısı=26
- ST Segment Elevasyonsuz Miyokard Enfarktüssüz olgu sayısı=26
- Unstable Angina Pektorisli olgu sayısı=26
- Sağlıklı Kontrol Grubu sayısı=26

İstanbul Üniversitesi Kardiyoloji Enstitüsü Acil Kardiyoloji Anabilim Dalı ekipleri tarafından Ocak 2016-Aralık 2017 tarihleri arasında çalışma kriterlerine uygun ve bilgilendirilmiş onam ile rızası alınmış vakaların kan örnekleri uygun koşullarda laboratuvara iletildi. Ateroskleroz gelişmiş romatoid artrit, sistemik lupus eritematozus, antifosfolipid sendromunu içine alan çeşitli sistemik otoimmün veya kronik inflamatuvar hastalığın bir arada bulunduğu hastalar ve daha önce vasküler olayları olan hastalar çalışmaya dahil edilmedi. Araştırmaya dâhil edilen vaka ve kontrol grubunda, koroner arterlerindeki plak yaygınlığı ve ciddiyeti Gensini ve Syntax skorlamaları ile belirlendi. Hastaların kullandıkları ilaçlar ve dozları not edildi.

Araştırmanın asgari örnek sayısı, G*Power 3.1 programı kullanılarak belirlendi. Buna göre, 75 hastanın akut dönemlerindeki örnekleri ile 25 kontrol grubu örnekleri arasındaki yüksek derecede istatistiksel öneme ($p<0,05$) sahip farklılıkları en az %80 güçle saptanabileceği belirlendi.

Koroner Arter Sendromlu Hastaların Seçimi

Kardiyoloji Anabilim Dalı ekibince kabul edilen Akut Koroner Sendrom (AKS) tanısı alan hastalar (n=78) arasından güç analizlerinde belirlenen minimum örneklem sayıları dikkate alınarak seçildi.

AKS tanısında; 20 dakikayı aşan tipik göğüs ağrısı, yeni başlayan şiddetli göğüs ağrısı (Kanada Kardiyovasküler Topluluğu sınıflandırmasına göre en az sınıf III), daha önceden kararlı olan anjina pektorisin kararsız hale gelmesi ve elektrokardiyografide iskemik değişiklikler (iki ya da daha fazla komşu derivasyonda >0.5 mm ST segment

çökmesi, iskemik T negatifliği) kriterleri dikkate alındı. Miyokard iskemisinin biyokimyasal belirteçlerinin düzeyleri de (troponin, CK-MB vb.) değerlendirmeye alındı.

Koroner anjiyografi

Selektif koroner anjiyografi femoral perkütan yolla gerçekleştirildi. Sol ön inen arter (LAD) ve sirkumfleks arter (Cx) en az dört pozda, sağ koroner arter (RCA) en az iki pozda değerlendirildi. Kılavuz kateter çapı ile kıyaslanarak koroner arter çapı ve lümen darlığı ölçüldü.

Gensini ve SYNTAX skorunun hesaplanması

AKS hastalarında aterosklerozun yaygınlığı ve plak yükü anjiyografik görüntülerde değerlendirildi, lezyonların derece ve yerleşimine göre Gensini ve SYNTAX skorlamaları ile puanlandı.

Akut koroner sendromlarda patogenezden sorumlu rüptüre yatkın kulprit lezyonların büyük çoğunluğu daha öncesinde ciddi koroner darlık oluşturmayan lezyonlardan kaynaklanmaktadır. Gensini skorlamasında kulprit lezyon dışındaki lezyonlar da değerlendirilerek hastanın total aterosklerotik plak yükü ve koroner arter hastalığının yaygınlığı belirlenebilmektedir. Bu skorlamada hastanın kulprit lezyonunun derecesi ve lokalizasyonunun yanı sıra diğer aterosklerotik darlık ve plaklarına da puan verilmektedir. Puanlamaları; <%25 darlıklar için 2 puan, %26-50 darlıklar için 4 puan, %51-75 darlıklar için 8 puan, %76-90 darlıklar için 16 puan, %91-99 darlıklar için 32 puan ve total oklüzyonlar için 64 puan olarak yapıldı. Ardından bu puanlar her bir ana koroner arter ve her bir segment için tanımlanmış olan katsayı ile çarpıldıktan sonra sonuçlar toplandı. 20 puan ve üzeri değerler ciddi koroner arter hastalığı olarak değerlendirildi.

Kontrol grubunun seçilmesi

Kontrol grubu olguları (n=26), diğer sebepler ile koroner angiografi uygulaması yapılmış, koroner arterlerinde aterom plak gözlenmeyen veya normale yakın koroner arterlere sahip ve aterosklerotik majör risk faktörü olmayan bireyler arasından seçildi. Bunun için, gönüllü bireylerin ailesinde KAH öyküsü ve bilinen genetik yatkınlığı olmayan, yaş ve cinsiyet ile sigara içiciliği dağılımı hasta grubu ile benzer olan, majör risk faktörlerini taşımayan bireyler arasından rastgele seçildi.

Kan örneklerinin toplanması

Hasta ve kontrol grubundaki olgulardan hekim veya deneyimli hemşire tarafından EDTA'lı ve kuru kan tüplerine 10'ar ml periferik kan örnekleri alındı. EDTA'lı kan örneklerindeki lökositler ayrıştırılarak RNA eldesi, kuru kan tüplerinden 2500 rpm'de 10 dk santrifüj sonrasında serum elde edildi. Elde edilen serum örnekleri çalışma kriterlerine uygun şekilde -80ºC'de saklandı.

3.2. İmmün Kontrol Nokta Proteinleri (İKNP'ler) ve Th1/Th2 Sitokinlerin Akan Hücre Ölçer Yöntemi ile Değerlendirilmesi

İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar DETAE İmmünoloji Anabilim dalı laboratuvarında tez çalışmasında araştırmak üzere, İmmün Kontrol Nokta Proteinleri ve Th1/Th2 sitokinleri için uygun panellerin seçimi yapıldı. LEGENDplexTM İnsan "Immune Checkpoint" Panel, sCD25 (IL-2Ra), 4-1BB (CD137), B7.2 (CD86), "Free Active" TGF-β1, CTLA-4, PD-L1, PD-1, Tim-3, LAG-3, Galectin-9 içermektedir. Ek olarak, LEGENDplexTM İnsan Th1/Th2 Panel içeriğinde ise IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IFN-γ and TNF-α mevcut olup bu antikorların kantitasyonlarının yapılmak üzere seçildi. Nepenthe Araştırma Teknolojileri (Kocaeli – Türkiye Tübitak Teknopark Barış Mahallesi Koşuyolu Caddesi No 30/5-2 Gebze Kocaeli) araştırma laboratuvarında akan hücre ölçer cihazı (Sysmex Marka Cube 8 Flow Cytometry Cihazı) kullanılarak akan hücre ölçer yöntemi ile seçilen panellerdeki İKNP'ler ve Th1/Th2 sitokinleri vakaların (26 NTEMI, 26 STEMI, 26 USAP ve 26 Kontrol grubu) serum örneklerinde çalışıldı.

3.2.1. Kimyasallar ve Aletler

Çalışma protokolü aşağıda açıklanmaktadır. Checkpoint panel "mix and match" olduğu için boncuk hazırlığı aşamasında farklılık mevcuttur.

Th1/Th2 Panel

Boncukların Hazırlanması

Boncukların iyice süspanse hale gelmesi için 1 dakika boyunca vorteks yapıldı.

Yıkama Solüsyonunun Hazırlanması

20X Yıkama Solüsyonu oda ısısına çıkarıldı. 475mL distile su içerisine 25 mL 20X Yıkama Solüsyonu eklenerek, 1X haline getirildi.

Matrix B Hazırlanması

Liyofilize Matrix B içerisine 5 mL Assay Buffer eklendi. 15 dakika oda ısısında çözünmesi beklendi.

Standartların Hazırlanması

Liyofilize Human Th Panel Standartı içerisine 250 uL Assay Buffer eklendi ve çözünmesi için 10 dakika beklendi. 8 adet mikrosantrifüj tüpü C7, C6, C5, C4, C3, C2, C1 ve C0 olarak belirlendi.

Aşağıdaki tablo gibi tüpler hazırlandı:

Tablo 3-1: Serum örneklerinin ve standartların dilüsyon hazırlığı.

Tüp	Dilüsyon	Eklenen Assay (µL)	Eklenen Standard	Final Konsantrasyon (pg/mL)
C7	--	--	--	10,000
C6	1:4	75	25 µL of C7	2,500
C5	1:16	75	25 µL of C6	625
C4	1:64	75	25 µL of C5	156.3
C3	1:256	75	25 µL of C4	39.1
C2	1:1024	75	25 µL of C3	9.8
C1	1:4096	75	25 µL of C2	2.4
C0	--	75	--	0

Çalışma Protokolü

V-tabanlı Plaka Kullanılarak Deneyin Yapılması: Tüm reaktiflerin kullanımdan önce oda sıcaklığına (20-25°C) getirildi. Tüm deney süreci boyunca, yıkama adımları dâhil olmak üzere, boncuklar kaybolmaması için plaka dik tutuldu. Plaka, tüm inkübasyon adımları boyunca karanlıkta tutuldu veya alüminyum folyo ile sarıldı.

Standartlar ve örnekler çift olarak çalışıldı. Veri toplama ve analiz için uygun olan dikey bir konfigürasyonda plakaya yerleştirildi. Standartların ilk iki sütuna yüklenmesi gerektiğinden emin olundu.

Serum örneklerinin ölçümleri için aşağıdaki tabloda gösterildiği sıralamada (soldan sağa doğru) plakaya yüklendi.

Tablo 2-2: Plakalarda standart ve örnek kuyularına yapılan pipetlemeler.

	Assay Tamponu	Matrix B	Standart	Örnek
Standart Kuyuları	---	25 µL	25 µL	---
Örnek Kuyuları	25 µL	---	---	25 µL

Karışık boncuklar 30 saniye boyunca vortekslendi. Her bir kuyuya 25 µL karışık boncuk eklendi. Boncuk eklemesinden sonra her kuyuda toplam hacim 75 µL olacak şekilde ayarlandı. Plakayı bir plaka sızdırmazlık malzemesi ile mühürlendi. Plakayı ışıktan korumak için üzerini tamamen alüminyum folyo ile kaplandı. Plaka oda sıcaklığında 2 saat boyunca bir plaka çalkalayıcısında 800 rpm'de sallandı. Plaka, mikroplaka adaptörü ile bir salınım kovası rotoru (G.H 3.8) kullanarak 1050 rpm (~250 g) hızında 5 dakika süreyle santrifüjlendi. Aşırı santrifüj hızı kullanmaktan kaçınıldı çünkü bu, sonraki adımlarda boncukların tekrar süspansiyon haline getirilmesini zorlaştırmaktadır. Santrifüjleme işleminden hemen sonra, süpernatantı hızlı bir şekilde ters çevirip plaka tek bir hareketle lavaboya döküldü. Plaka temizlendi temiz bir kağıt havlu yığınına vurarak kuyulardaki kalan sıvı mümkün olduğunca direne edildi. Her bir kuyuya 200 µL 1X Yıkama Tamponu eklenerek plaka bir dakika süreyle inkübe edildi. Her kuyuya 25 µL Tespit Antikorları eklendi. Plaka, yeni bir plaka mühürleyici ile mühürlendi. Plakanın tamamı ışıktan korumak için alüminyum folyo ile kaplandı. Plaka, oda sıcaklığında 1 saat boyunca bir plaka çalkalayıcısında yaklaşık 800 rpm'de sallandı. Her bir kuyuya doğrudan 25 µL SA-PE eklendi. Plaka, yeni bir plaka mühürleyici ile mühürlendi. Plakanın tamamı alüminyum folyo ile sarıldı ve oda sıcaklığında 30 dakika boyunca plaka çalkalayıcısında yaklaşık 800 rpm'de sallandı. Her bir kuyuya 200 µL 1X Yıkama Tamponu eklenerek plaka bir dakika süreyle inkübe edildi. Her bir kuyuya 150 µL 1X Yıkama Tamponu eklendi. Boncuklar, pipetle karıştırılarak süspansiyon haline getirildi. Örnekler, deneyin yapıldığı gün içinde bir akan hücre ölçerde okundu. Akım sitometri cihazının okutma öncesinde ayarları yapıldı. 1 adet FSC - SSC plotu açıldı ve her iki boncuk popülasyonu ayrı ayrı kapılandı. Her bir kapı için ayrı olarak FL2 PE - FL5 APC kanalları seçilerek plotlar oluşturuldu. Örnekler FACS tüplerine aktarıldı ve manuel olarak tek tek akım sitometri cihazına yüklenerek okutuldu.

Checkpoint Paneli

Boncukların Hazırlanması: Boncukların iyice süspansiyon haline gelmesi için 1 dakika boyunca vorteks yapıldı. “Mix and Match” olduğundan her boncuk 13X olduğu

için 1X'e çevrilmek zorundaydı. Tüm çalışma için 3 mL boncuk süspansiyonu hazırlandı. 11 adet boncuk olduğu için her boncuktan 230 uL eklendi. 470 uL Assay Tamponu eklendi ve toplamda 3 mL'ye ulaşıldı.

Yıkama Solüsyonunun Hazırlanması

20X Yıkama Solüsyonu oda sıcaklığına çıkarıldı. 475 mL distile su içine 25 mL 20X Yıkama Solüsyonu eklenerek, 1X haline getirildi.

Matrix B Hazırlanması

Liyofilize Matrix B içine 5 mL Assay Tamponu eklendi. 15 dakika oda sıcaklığında çözünmesi beklenildi.

Standartların Hazırlanması

Liyofilize İnsan Th Panel Standartı içine 250 uL Assay Tamponu eklendi ve çözünmesi için 10 dakika beklenildi. 8 adet mikrosantrifüj tüpü C7, C6, C5, C4, C3, C2, C1 ve C0 olarak belirlendi. Tablo 3-3'deki gibi tüpler hazırlandı.

Tablo 3-3: Serum örneklerinin ve standartların dilüsyon hazırlığı.

Tüp	Dilüsyon	Eklenen Assay (µL)	Eklenen Standard	Final Konsantrasyon (pg/mL)
C7	--	--	--	10,000
C6	1:4	75	25 µL of C7	2,500
C5	1:16	75	25 µL of C6	625
C4	1:64	75	25 µL of C5	156.3
C3	1:256	75	25 µL of C4	39.1
C2	1:1024	75	25 µL of C3	9.8
C1	1:4096	75	25 µL of C2	2.4
C0	--	75	--	0

Çalışma Protokolü

V-tabanlı plaka kullanılarak deney yürütüldü. Kullanımdan önce tüm reaktifler oda sıcaklığına (20-25°C) ısıtıldı. Boncukların kaybolmaması için, yıkama adımları da dâhil olmak üzere, tüm deney süreci boyunca plaka dik tutuldu. Plaka, tüm inkübasyon adımları boyunca karanlık bir yerde tutuldu veya alüminyum folyo ile sarıldı. Standartlar ve örnekler çift olarak koşuldu ve veri toplama ve analizi için uygun olan dikey bir konfigürasyonda plakaya düzenlendi. İlk iki sütuna standartlar yüklendi. Akım sitometri

cihazının okutma öncesinde ayarları yapıldı. 1 adet FSC - SSC plotu açıldı ve her iki boncuk popülasyonu ayrı ayrı kapılandı. Her bir kapı için ayrı olarak FL2 PE - FL5 APC kanalları seçilerek plotlar oluşturuldu. Örnekler FACS tüplerine aktarıldı ve manuel olarak tek tek akım sitometri cihazına yüklenerek okutuldu. Serum örneklerini ölçmek üzere, Tablo 3-4'te gösterildiği sıralamada (soldan sağa doğru) plakaya yüklendi.

Tablo 3-4: Plakalarda standart ve örnek kuyularına yapılan pipetlemeler.

	Assay Tamponu	**Matrix B**	**Standart**	**Örnek**
Standart Kuyuları	---	25 µL	25 µL	---
Örnek Kuyuları	25 µL	---	---	25 µL

Karışık boncuklar 30 saniye boyunca vortekslendi ve her bir kuyuya 25 µL karışık boncuk eklendi. Boncuk eklemesinden sonra her kuyuda toplam hacim 75 µL oldu (Not: Boncuk eklerken, boncukların çökmemesi için karışık boncuk şişesi aralıklı olarak sallandı). Plaka bir plaka mühürleyici ile mühürlendi ve plakanın tamamı ışıktan korunması için alüminyum folyo ile kaplandı. Plaka, oda sıcaklığında bir plaka çalkalayıcıda 800 rpm'de 2 saat boyunca sallandı. (Çalkalayıcıya bağlı olarak, hızın ayarlanması gerekti. Optimal hız, boncukların inkübasyon sırasında süspansiyonda kalmasını sağlayacak kadar yüksek, ancak kuyulardan taşmaya neden olmayacak kadar düşük oldu). Plaka, mikroplaka adaptörü ile bir salınım kovası rotoru (G.H 3.8) kullanılarak 1050 rpm (~250 g) hızında 5 dakika süreyle santrifüj edildi. Aşırı santrifüj hızından kaçınıldı çünkü bu, sonraki adımlarda boncukların tekrar süspansiyon haline getirilmesini zorlaştırmaktadır. Santrifüjün zamanlayıcısının doğru çalıştığından ve santrifüjün önceden belirlenen hıza ulaştığından emin olundu. Santrifüjleme işleminden hemen sonra, süpernatant hızlı bir şekilde ters çevirip plakayı bir hareketle çalkalayarak lavaboya döküldü. Boncuklar, kuyunun ucunda gözlendi. Plaka, temiz bir kağıt havlu yığınına vurularak kuyulardaki kalan sıvı mümkün olduğunca dİrenE edildi. Boncuk pelletini bozmamaya özen gösterildi. Alternatif olarak, süpernatantın çıkarılması 75 µL ayarlanmış birçok kanallı pipet kullanılarak tamamlandı. Boncukları çıkarmadan mümkün olduğunca çok sıvı çıkarılmaya çalışıldı. Her sıra veya sütun arasında pipet uçlarının değiştirilmesine dikkat edildi. Her bir kuyuya 200 µL 1X Yıkama Tamponu eklenip, plaka bir dakika süreyle inkübe edildi. Her bir kuyuya 25 µL Tespit Antikorları eklendi. Plaka, yeni bir plaka mühürleyici ile mühürlenip, plakanın tamamı ışıktan

korunması için alüminyum folyo ile kaplandı. Plaka, oda sıcaklığında bir plaka çalkalayıcıda 800 rpm'de 1 saat boyunca sallandı. Plaka yıkanmadı. Her bir kuyuya doğrudan 25 µL SA-PE eklendi. Plaka, yeni bir plaka mühürleyici ile mühürlenip, plakanın tamamı alüminyum folyo ile sarıldı ve plaka, oda sıcaklığında bir plaka çalkalayıcıda yaklaşık 800 rpm'de 30 dakika boyunca sallandı. Plaka, her bir kuyuya 200 µL 1X Yıkama Tamponu eklenerek ve bir dakika süreyle inkübe edilerek yıkandı. Her bir kuyuya 150 µL 1X Yıkama Tamponu eklendi. Boncuklar, pipetleme yoluyla tekrar süspansiyon haline getirildi. Örnekler, deneyin yapıldığı aynı gün içinde FACS tüplerine aktarıldı ve manuel olarak tek tek akım sitometri cihazına yüklenerek okutuldu.

Tablo 3-5: İmmünolojik çalışmada kullanılan cihazlar ve kullanım yerleri.

Aletler	Kullanım Yeri
Allerga X-30R Santrifüj (Backman Couter)	Boncuk Hazırlığı
Biolegend Mikrosantrifüj (Eppendorf)	Boncuk Hazırlıgı
Tek ve Çok kanallı Mikropipetler (Gibson)	Dengeli Solüsyon hazırlığı
Çok kanallı Adjust Mikropipet (Disaasemble)	Dengeli Solüsyon Hazırlığı
Mini Rocker-Shaker (MR-1). BioSan	Solüsyon Hazırlığı
Benchmark heat Block	Boncuk Hazırlığı
Cube 8 Modeli Akan Hücre Ölçer Cihazı (Sysmex)	İKNP ve Th1/Th2 tayini

3.3. İKNP Gen Transkriptlerinin Genetik Analizler ile Değerlendirilmesi

Tez çalışmasının bu aşamasında İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar DETAE Genetik Anabilim Dalı'nda, immün kontrol nokta proteinleri / TNF süperailesi proteinlerinden gen ekspresyon analizi için *CTLA4, PDL1, PDL2, TIGIT, TNFSF8* ve *TNFSF9* gen transkriptleri için primer çiftleri dizayn edildi ve kantitatif eş-zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PZR) ile ifade düzeyleri belirlendi.

3.3.1. Kimyasallar ve Kullanılan Cihazlar

Bu çalışmada genetik analizler için kullanılan kimyasalların listesi Tablo 3-6'te verildi.

Tablo 3-6: Kullanılan kimyasallar.

Kimyasal Adı	Kullanım Yeri
$KHCO_3$, Potasyum Bikarbonat (Merck)	Gey's solüsyonu
NH_4Cl, Amonyum Klorür (Merck)	Gey's solüsyonu
%75'lik etanol (Merck)	RNA izolasyonu
DEPC (Dietil Pirokarbonat) (Sigma)	RNA izolasyonu
%100'lük izopropanol (Sigma)	RNA izolasyonu
PBS Tablet (BIOMATIK)	RNA izolasyonu
Kloroform (Merck)	RNA izolasyonu
Trizol (Qiagen)	RNA izolasyonu

Genetik çalışmada kullanılan cihazlar ve kullanım yeri listesi Tablo 3-7'da verildi.

Tablo 3-7: Kullanılan cihazlar ve kullanım yerleri.

Aletler	Kullanım Yeri
Santrifüj (Heraus)	RNA izolasyonu
Mikrosantrifüj (Eppendorf)	RNA izolasyonu ve RT-PZR
Mikropipetler (Eppendorf)	RNA izolasyonu ve RT-PZR
LightCycler 480 Cihazı (Roche)	RT-PZR
PZR kabini (Özkara Çelik)	RT-PZR
Hassas Terazi (Shimadzu)	Solüsyon Hazırlığı
Spektrofotometre (Thermo Nanodrop 2000)	RNA ölçümü

Buzdolapları ve derin dondurucular (+4ºC, -20ºC, -80ºC) (Uğur, Thermo) Kit malzemeleri ve örnek saklama

3.3.2. Çözeltiler

10X Gey's Solüsyonu Hazırlanması: 82,91 gr Amonyum Klorür (155mm NH_4Cl). 10,01 gr Potasyum Bikarbonat (10mm $KHCO_3$) tartıldı ve şişe içerisine aktarıldı ve DEPC'li su ile 1 litreye tamamlandı. Manyetik karıştırıcı ile çözüldükten sonra otoklavlandı.

1X Gey's Solüsyonu Hazırlanması

Hazırlanan 10X Gey's solüsyonundan 100 ml alındı ve 1 litreye DEPC'li suyla tamamlandı.

1X PBS Solüsyonu Hazırlanması

1 adet PBS tableti 100 ml suyun içinde çözünmesi sağlandı.

3.3.3. Genetik Analizlerde Kullanılan Yöntemler

3.3.3.1. Periferik Kandan Total RNA İzolasyonu

Gey's Solüsyonu ile Hücre Ayırma: Periferik kan, 10 ml'lik EDTA'lı tüplere alındı ve en kısa zamanda Gey's solüsyonu ile lökosit ayrılımı yapıldı. Bunun için, kanın iki katı kadar 1X Gey's solüsyonu, 50 ml'lik tüpe eklenerek kan ile karıştırıldı. Daha sonra, +4°C'de 20 dakika bekletildi ve 1500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant döküldükten sonra pelletin üzerine tekrar 10 ml Gey's solüsyonu eklendi ve 1500 rpm'de 10 dakika daha santrifüj edildi. Süpernatant döküldükten sonra pelletin üzerine 1 ml PBS eklendi ve 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek süpernatant döküldü. Buz üzerindeki tüp içerisindeki pelletin üzerine 800 µl trizol (buz üzerinde) eklenerek pipetle homojenize edildi ve 1.5 ml'lik tüplere alındı.

3.3.3.2. Trizol Solüsyonu ile RNA İzolasyonu

Trizolde çözünen örneklerin üzerine, +4°C'deki kloroformdan 160 µl eklendi. Mikrosantrifüj tüpleri, 15 saniye boyunca vorteks yapıldı. Buz üzerinde 3 dakika bekletildi ve 12000 g'de +4°C'de 20 dakika boyunca santrifüj edildi. Aköz fazlar dikkatlice yeni 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüplere alındı. Üzerine 1:1 oranında soğutulmuş %100'lük izopropanol eklenerek iyice çalkalandı. Tüpler, -20°C'de gece boyunca bekletildi. Ertesi gün, 12000 g'de 10 dakika +4°C'de santrifüj edildi. Süpernatant döküldü ve pelletin üzerine %75'lik soğutulmuş etanol eklenerek 1 ml eklendi ve 9000 g'de +4°C'de 5 dakika santrifüj edildi. Pellet kurutuldu ve üzerine 50 µl RNazsız su eklendi. Total RNA örnekleri, ölçümden sonra -80ºC derin dondurucuda saklandı.

3.3.3.3. Total RNA'nın Saflık ve Miktar Tayini

İzole edilen total RNA örneklerinin miktarı, NanoDrop 2000 (Thermo Scientific™, ABD) cihazı kullanılarak ölçüldü. RNA saflığı, RNA'daki protein kirliliğini gösteren 260/280 oranları ve kimyasal kirliliği gösteren 260/230 oranları belirlendi. Bu değerlerin 1,6-2,0 arasında olmasına dikkat edildi.

3.3.3.4. cDNA Sentezi

200 ng/µl olarak sulandırılan total RNA örneklerinden iScript™ cDNA sentez kiti (Bio-Rad) kullanılarak cDNA sentezi gerçekleştirildi. Bunun için buz üzerindeki mikrosantrifüj tüpüne her bir örnek için 5x iScript Reaksiyon miksinden 4 µl, iScript ters

transkriptaz enziminden 1 µl, RNAzsız sudan 10 µl ve sulandırılmış RNA örneklerinden 5 µl alındı. Tüm tüpler, cDNA sentezi için PZR cihazında 25°C'de 5 dakika, 46°C'de 30 dakika, 95°C'de 1 dakika süresince inkübe edildi. Sentezlenen cDNA örnekleri, sonraki aşamalara kadar -20°C'de muhafaza edildi.

3.3.4. Gen İfadelerinin Kantitatif RT-PZR ile Belirlenmesi

İKNP'lerden B7 immünoglobülin süperailesinden *CTLA4, PDL2* ve *PDL1* transkriptleri ile TNF reseptörü süperailesinden *TNFRSF9* ve *TNFSF8* transkriptleri ve yeni bir İKN proteini olan *TIGIT* transkriptlerine özgü kantitatif RT-PZR için primer çiftleri tasarlandı. Bu genlerin ifade düzeylerinin normalleştirilmesi için endojen kontrol genleri olarak *ACTB* (β-aktin) ve *GAPDH* gen transkriptleri kullanıldı. qRT-PZR için SYBR Green kiti (Bio-Rad) ve her gen transkripti için Tablo 3-8'de belirtilen primer çiftleri kullanıldı. Reaksiyon karışımı olarak, 96'lı plakaların her bir kuyucuğuna Supermiks'ten 5 µl, 2 µM'lık primerlerin her bir gen transkriptine özgü ileri ve geri yönlü primerlerden 1 µl, DNA-RNAzsız sudan 2 µl ve cDNA örneklerinden 1 µl eklenerek hazırlandı. Daha sonra 96'lı plakalar şeffaf film ile kapatılarak LightCycler 480 cihazına (Roche) yerleştirildi ve Tablo 3-9'de belirtilen optimize edilmiş kantitatif RT-PZR protokolü uygulandı.

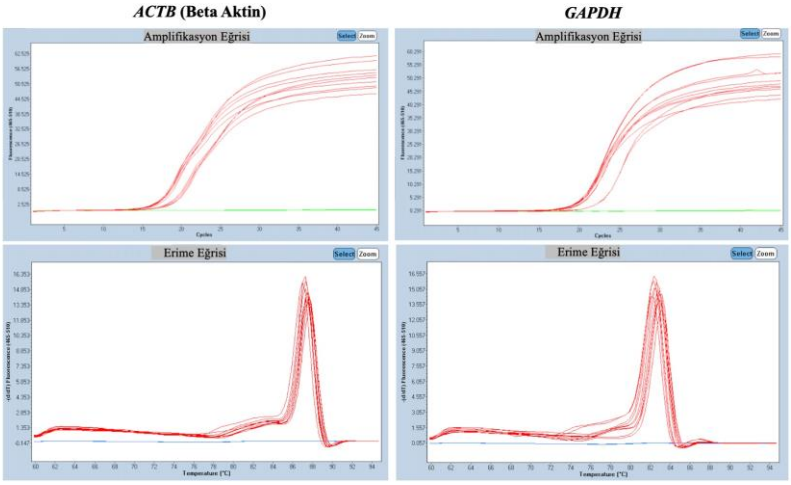
Tablo 3-8: Gen transkriptelerine özgü kantitatif RT-PZR'da kullanılan primerler.

Gen Adı	Primer Dizileri	Amplikon Boyu (bç)
TIGIT	5'-GCTGGTGTCTCCTCCTGATCT-3', 5'-GTGCCTGTCATCATTCCTGAGG-3'	73
TNFRSF9	5'-CCTCACGCTCCGTTTCTCTG-3', 5'-TGGAAATCGGCAGCTACAGC-3'	124
PDL1 (CD274)	5'-TGCCGACTACAAGCGAATTACTG-3', 5'-CTGCTTGTCCAGATGACTTCGG-3'	150
PDL2	5'-AGCCACAGTGATAGCCCTAA-3', 5'-AGCACTGTTCACTTCCCTCT-3'	106
CTLA4	5'-CTACCTGGGCATAGGCAACG-3', 5 '-CCCCGAACTAACTGCTGCAA-3'	103
TNFSF8	5'-ATGGTGTTGGTCGTTCAGAGG-3', 5'-CTTTGCCACTTGGAGGTAGGC-3'	147
ACTB (β-aktin)	5'- CATGTACGTTGCTATCCAGGC-3', 5'-TGGTGGTGAAGCTGTAGCC-3'	215
GAPDH	5'- ACCATCTTCCAGGAGCGAG-3', 5'- CAGGAGGCATTGCTGATGA-3'	233

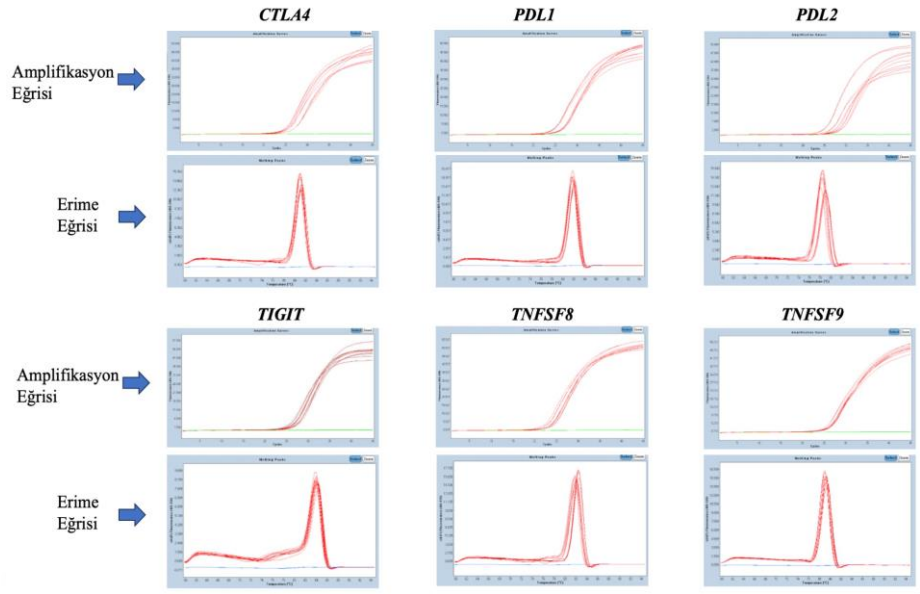
Tablo 3-9: Kantitatif RT-PZR protokolü.

Aşama	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süre	Rampa Hızı (°C/saniye)
Ön inkübasyon	1	95 ºC	2 dakika	4,4
Amplifikasyon	45	95 ºC, 58 ºC, 65 ºC	5 saniye, 30 saniye, 10 saniye	2,2, 2,2, 4,4
Erime Eğrisi	1	60 ºC, 95 ºC	2 dakika, devamlı 5 ºC	2,2, 0,11
Soğutma	1	40 ºC	20 saniye	-

Reaksiyon protokolü sonlandıktan sonra LC480 yazılımının "Release Absolute Quantification/2nd Derivative Max" analizi ile elde edilen Ct değerleri kullanılarak rölatif kantitasyon değerleri transkriptlerin ifade düzeyleri olarak belirlendi. Bu işlemde, SYBR Green boyası DNA'nın çift zincirli sarmal yapısına bağlanarak, floresan ışıma sağlamakta ve çoğalma miktarı erime eğrisi ("Melting curves") analizi ile belirlenebilmektedir. Çoğaltılan gen bölgeleri erime eğrisi ("Tm calling") analizi ile kontrol edildi. Çalışmamızdaki gen transkriptlerinin ve endojen gen olarak kullanılan *ACTB* ve *GAPDH*'in amplifikasyon ve erime eğrisi grafikleri Şekil 3-1'de ve *CTLA4, PDL1, PDL2, TIGIT, TNFSF8* ve *TNFSF9* gen transkriptlerinin amplifikasyon eğrileri Şekil 3-2'te verilmektedir.



Şekil 3-1: Lökosit örneklerinde endojen kontrol olarak incelenen *ACTB* ve *GAPDH* gen transkriptlerinin RT-PZR amplifikasyon eğrileri ve erime eğrileri.



Şekil 3-2: Lökosit örneklerinde *CTLA4, PDL1, PDL2, TIGIT, TNFSF8* ve *TNFSF9* gen transkriptlerinin RT-PZR amplifikasyon eğrileri ve erime eğrileri.

3.3.5. Rölatif Kantitasyon (RQ) Hesabı ile Trankskriptlerin İfade Düzeylerinin Belirlenmesi

Her bir vakanın cDNA örnekleri RT-PZR'de çift olarak çalışıldı ve araştırılan gen transkriptlerinin (*CTLA4, PDL1, PDL2, TIGIT, TNFSF8* ve *TNFSF9*) Ct değerleri, Excel dosyasına aktarıldı ve delta delta Ct metoduyla ifade düzeyleri hesaplandı. Her bir hedef genin Ct değeri endojen kontrol genlerin (*ACTB* ve *GAPDH* ortalaması) Ct değerinden çıkarıldı. Böylece delta Ct değeri belirlendi. Kontrol grubunun (n=26) ortalama Ct değeri rölatif hesaplamada kalibratör olarak kullanıldı. Her bir delta Ct değerinden, bu kalibratör ortalama delta Ct değeri çıkartılarak delta delta Ct değeri hesaplandı. Çift çalışılan örneklerin delta delta Ct değerinin ortalaması alınarak bu değer 2^-ΔΔCt formülüne uygulandı. Sonuçta, rölatif kantitasyon değeri (RQ) olan değişim katsayıları ("fold change" değerleri) hesaplandı.

3.4. İstatistiksel Analiz

Veri analizi, Statistical Package for the Social Sciences (SPSS), sürüm 25.0 (SPSS Inc., Chicago, IL), korelasyon testi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Normal dağılımın değerlendirilmesi için Kolmogorov-Smirnov testi uygulanmıştır. Gruba göre normal dağılım gösteren verilerin çoklu karşılaştırmaları için tek yönlü analiz kullanılmış ve eşleştirilmiş karşılaştırmalar için Tukey HSD testi uygulanmıştır. Gruba göre normal dağılım göstermeyen verilerin çoklu karşılaştırmalarında Kruskal Wallis testi kullanılmış ve eşleştirilmiş karşılaştırmalarda Bonferroni düzeltmesi yapılmıştır. Nicel veri analiz

sonuçları ortalama ± standart sapma ve medyan [çeyrekler aralığı] olarak raporlanırken, kategorik veriler sıklık (yüzde) olarak sunulmuştur. ACS tanısı için testin prediksiyonu ve sınır değerleri ROC (Reciver Operating Characteristic) uygulanmış ve sonuçlar sunulmuştur. Tüm testlerde %95 güven aralığında istatistiksel anlamlılık için $p<0,05$ kabul edildi.

4. BULGULAR

Bu tez çalışmasının deneysel araştırmaları, Temmuz 2021- Temmuz 2023 tarihleri arasında İstanbul Üniversitesi-Sağlık Bilimleri Enstitüsü Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü İmmünoloji ve Genetik Anabilim Dalı laboratuvarlarında akan hücre ölçer kısmı Nepenthe Araştırma Teknoloji laboratuatında gerçekleştirildi. Kardiyolojik açıdan normal, unstabil anjina, ST Elevasyonsuz MI (NSTEMİ), ST elevasyonlu MI (STEMİ) gruplarının her bir grupta 26 vaka ile toplamda 104 katılımcının kan örneklerinde immünolojik ve genetik biyobelirteçler düzeyleri belirlenerek klinik parametreler ile ilişkileri değerlendirildi. Tablo 4-1'de araştırma gruplarının demografik dağılımı verilmektedir. Gruplar arasında cinsiyet dağılımı benzer olup, hipertansiyon, dislipidemi, hiperkolesterolemi, tip 2 diyabet ve obesite gibi komorbitelerin gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı belirlendi. Ek olarak sigara içimi ve alkol tüketimi gruplar arasında yine benzer oranlarda idi (Tablo 4-1).

Tablo 4-1: Çalışma gruplarının demografik dağılımı.

		Kontrol		**USAP**		**NSTEMİ**		**STEMİ**	
		n	**%**	**n**	**%**	**n**	**%**	**n**	**%**
Cinsiyet	*Kadın*	15	31,2	12	25,0	9	18,8	12	25,0
	Erkek	11	19,6	14	25,0	17	30,4	14	25,0
HT	*Yok*	13	26,0	13	26,0	11	22,0	13	26,0
	Var	13	32,5	13	32,5	10	25,0	4	10,0
Dislipidemi	*Yok*	3	6,1	16	32,7	16	32,7	14	28,5
	Var	0	0,0	3	60,0	1	20,0	1	20,0
HK	*Yok*	18	28,6	17	27,0	14	22,2	14	22,2
	Var	6	25,0	9	37,5	6	25,0	3	12,5
DM	*Yok*	22	34,4	16	25,0	14	21,9	12	18,8
	Var	4	15,4	10	38,5	7	26,9	5	19,2
Obezite	*Yok*	23	24,0	22	22,9	25	26,0	26	27,1
	Var	3	37,5	4	50,0	1	12,5	0	0,0
Sigara içimi	*Yok*	16	34,0	11	23,4	11	23,4	9	19,1
	Var	9	22,0	14	34,1	10	24,4	8	19,5
	Bırakmış	1	50,0	1	50,0	0	0,0	0	0,0
Alkol kullanımı	*Yok*	16	21,6	23	31,1	19	25,7	16	21,6

Kısaltmalar: USAP: unstabil anjina pektoris, NSTEMİ: non-ST elevasyonlu miyokard infarktüsü, STEMİ: ST elevasyonlu miyokard infarktüsü, HT: hipertansiyon, HK:hiperkolesterolemi, DM:diyabetes mellitus.

Araştırma grupları arası demografik, biyokimyasal ve görüntüleme bulguları karşılaştırması Tablo 4-2'de verilmektedir. Kontrol grubundaki yaş ortalaması 54.0±12.0

yıl, medyanı 56.0 ve çeyrekler arası değerlerin aralığı [46.0; 65.0] idi. USAP grubunda yaş ortalaması 54.0±9.0, medyan 52.0 ve çeyrekler arası değerlerin aralığı [48.0; 59.0]. NSTEMI grubunda yaş ortalaması 53.0±8.0, medyan 53.0 ve çeyrekler arası değerlerin aralığı [47.0; 58.0]. STEMI grubunda ise yaş ortalaması 53.0±11.0, medyan 51.0 ve çeyrekler arası değerlerin aralığı [45.0; 59.0] idi. Yaş açısından gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi (p=0.901).

Ejeksiyon fraksiyonu (EF) değerleri ise kontrol grubunda ortalama 57.0±7.0, medyan [60.0; 60.0]; USAP grubunda ortalama 57.0±7.0, medyan [60.0;60.0]; NSTEMI grubunda ortalama 52.0±10.0, medyan [45.0;60.0]; STEMI grubunda ise ortalama 49.0±9.0, medyan [44.0;58.0] olup istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu mevcuttur (p<0,001). Gruplar arasında açlık glukoz seviyelerinin kontrol grubunda ortalama 103.2±36.5, medyan [95.0;102.0]; USAP grubunda ortalama 120.5 ±43.5, medyan [101.7;150.0]; NSTEMI grubunda ortalama 127.7±66.1, medyan [99.3;132.9]; STEMI grubunda ise ortalama 161.3±81.6, medyan [123.3;192.1] olup istatistiksel olarak anlamlı farka sahip oldukları belirlendi (p=0,005). Ek olarak gruplar arasında AST düzeyleri ve ALT seviyeleri istatistiksel olarak anlamlı bulundu (sırasıyla, p<0,001 ve p=0,001).

Tablo 11'de gruplar arasında kan lipid parametrelerinden sadece HDL (Yüksek yoğunluklu lipoprotein) seviyelerinin kontrol grubunda ortalama 42.5±13.6 mg/dL, medyan 42.5 mg/dL ve çeyrekler arası değerlerin aralığı [32.0;48.0]. USAP grubunda ortalama 34.3±7.3 mg/dL, medyan 32.8 mg/dL ve çeyrekler arası değerlerin aralığı [29.7;40.6]. NSTEMI grubunda ortalama 33.2±9.4 mg/dL, medyan 32.5 mg/dL ve çeyrekler arası değerlerin aralığı [27.4;35.6]. STEMI grubunda ortalama 37.6±10.8 mg/dL, medyan 38.3 mg/dL ve çeyrekler arası değerlerin [29.0;44.5] aralığında olduğu ve bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu gösterildi (p=0,009).

Ek olarak Tablo 4-2'de görüldüğü üzere, yüksek hassasiyetli C-reaktif protein (hsCRP) seviyelerinin kontrol grubunda ortalama 9.3±14.4 mg/L, medyan 2.6 mg/L ve çeyrekler arası değerlerin aralığı [1.1;11.0], USAP grubunda ortalama 6.6±8.7 mg/L, medyan 3.5 mg/L ve çeyrekler arası değerlerin aralığı [2.0;6.0], NSTEMI grubunda ortalama 18.2±32.1 mg/L, medyan 9.0 mg/L ve çeyrekler arası değerlerin aralığı [4.0;19.0], STEMI grubunda ise ortalama 18.0±19.7 mg/L, medyan 13.0 mg/L ve çeyrekler arası değerlerin aralığı [6.0;23.0] olup hsCRP seviyeleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır (p=0,001).

Tablo 4-2: Gruplar arası demografik, biyokimyasal ve görüntüleme bulgularının karşılaştırılması.

	Kontrol	USAP	NSTEMI	STEMI	p değeri
Yaş, yıl	54,0±12,0 56,0 [46,0; 65,0]	54,0 ±9,0 52,0 [48,0; 59,0]	53,0 ±8,0 53,0 [47,0; 58,0]	53,0 ±11,0 51,0 [45,0; 59,0]	0,901[a]
EF, %	57,0±7,0 60,0 [60,0; 60,0]	57,0 ±7,0 60,0 [60,0; 60,0]	52,0 ±10,0 60,0 [45,0; 60,0]	49,0 ±9,0 48,0 [44,0; 58,0]	**<0,001[b]**
WBC, mcL	6,8 ±1,9 7,0 [5,3; 7,6]	8,4 ±1,4 8,6 [7,8; 9,0]	9,1 ±2,4 8,3 [7,0; 11,4]	10,1 ±4,1 8,9 [6,9; 12,5]	0,10[b]
BUN, mg/dL	15,0 ±4,3 14,0 [12,0; 17,0]	15,7 ±5,0 14,5 [12,0; 19,0]	14,4 ±5,1 13,0 [13,0; 16,5]	14,2 ±3,2 14,0 [12,0; 15,0]	0,899[b]
Glukoz, mg/dL	103,2 ±36,5 95,0 [87,0; 102,0]	120,5 ±43,5 101,7 [84,4; 150,0]	127,7 ±66,1 99,3 [94,0; 132,9]	161,3 ±81,6 123,3 [107,9; 192,1]	**0,005[b]**
Albumin, g/dL	40,1±6,0 42,5 [37,6; 44,5]	40,6±2,9 40,5 [38,9; 42,8]	37,1±9,0 39,8 [35,1; 41,6]	37,9±9,1 39,6 [36,2; 43,6]	0,242[a]
AST, U/L	19,8±3,4 19,4 [17,4; 21,1]	23,4±6,0 23,5 [18,8; 25,1]	73,7±65,7 39,0 [31,4; 108,4]	170,1±182,5 87,8 [37,6; 245,3]	**<0,001[b]**
ALT, U/L	19,4±5,4 17,5 [16,5; 18,9]	23,4±11,9 20,3 [16,6; 24,9]	42,5±46,8 32,4 [21,2; 48,8]	46,4±28,1 36,4 [21,9; 71,8]	**0,001[b]**
TG, mg/dL	135,0±46,0 126,0 [92,0; 156,0]	208,0±131,0 160,0 [122,0; 266,0]	178,0±99,0 145,0 [109,0; 244,0]	169,0±160,0 147,0 [71,0; 204,0]	0,164[b]
HDL, mg/dL	42,5±13,6 42,5 [32,0; 48,0]	34,3±7,3 32,8 [29,7; 40,6]	33,2±9,4 32,5 [27,4; 35,6]	37,6±10,8 38,3 [29,0; 44,5]	**0,009[a]**
LDL, mg/dL	119,5±38,6 123,0 [95,3; 148,0]	125,9±37,0 133,8 [103,3; 149,6]	124,4±35,9 122,9 [93,6; 148,5]	132,5±39,1 126,3 [103,1; 161,2]	0,667[a]
VLDL, mg/dL	26,0±4,0 25,0 [24,0; 26,0]	44,0±30,0 29,0 [24,0; 67,0]	34,0±20,0 27,0 [20,0; 67,0]	36,0±33,0 30,0 [19,0; 42,0]	0,560[b]
Ca, mg/dL	9,1±0,5 9,0 [9,0; 9,4]	9,3±0,5 9,3 [9,0; 9,6]	9,2±0,5 9,3 [9,0; 9,4]	9,2±0,7 9,3 [8,8; 9,7]	0,299[b]
hsCRP, mg/L	9,3±14,4 2,6 [1,1; 11,0]	6,6±8,7 3,5 [2,0; 6,0]	18,2±32,1 9,0 [4,0; 19,0]	18,0±19,7 13,0 [6,0; 23,0]	**0,001[b]**

Değerler ortalama ± Standart Sapma, medyan [çeyrekler arası aralık] olarak gösterilmiştir Kısaltmalar: USAP: unstabil anjina pektoris, NSTEMİ: non-ST elevasyonlu miyokard infarktüsü, STEMİ: ST elevasyonlu miyokard infarktüsü, EF: ejeksiyon fraksiyonu, WBC: beyaz küre, BUN: kan üre azotu, TG: trigliserid, HDL: yüksek dansiteli lipoprotein, LDL: düşük dansiteli lipoprotein, VLDL: çok düşük dansiteli lipoprotein, Ca: kalsiyum, hsCRP: C-reaktif protein, *p* değeri [a]One-way ANOVA ya da [b]Kruskal Wallis testi ile hesaplandı. İstatistiksel olarak anlamlı olanlar kalın olarak gösterildi.

Araştırma gruplarının serum sitokin düzeylerinin gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı oldukları bulundu (Tablo 4-3). Tablo 4-3'te Th1/Th2 panelinde incelenen IL-2, IL-4, IL-5, IL-10 ve IL-13 ortalama değerlerinin kontrol

grubunda USAP, NSTEMİ ve STEMİ kıyasla gruplarında 4-20 kat daha fazla olduğu görülmektedir. IL-6'nın ortalama değerlerinin ise kontrol ve NSTEMİ gruplarında USAP ve STEMİ gruplarına göre yaklaşık 10 kat daha fazla olduğu bulundu. IFN-γ and TNF-α ortalama değerlerinin de kontrole kıyasla STEMİ grubunda azaldığı; ancak USAP ve NSTEMİ gruplarında yaklaşık 2,5 kat daha azaldığı bulundu (Tablo 4-3).

Tablo 4-3: Gruplar arası akan hücre ölçer ile ölçülen sitokin düzeylerinin karşılaştırılması.

	Kontrol	**USAP**	**NSTEMİ**	**STEMİ**	**p değeri**
IL-2, pg/mL	0,4±0,4 0,2 [0,1; 0,7]	0,1±0,1 0 [0; 0]	0,1±0,1 0 [0; 0,1]	0±0,4 0 [0; 0,1]	**<0,001**
IL-4, pg/mL	25,9±26,2 12,8 [0,9; 49,6]	2,0±5,4 0,3 [0,2; 0,7]	1,1±3,2 0,3 [0,2; 0,7]	0±13,6 0,4 [0,2; 1,1]	**<0,001**
IL-5, pg/mL	23,2±27,4 6,3 [0,7; 52,4]	3,7±12,5 0,4 [0,2; 0,7]	0,8±1,3 0,4 [0,2; 0,7]	0±13,2 0,4 [0,3; 0,8]	**<0,001**
IL-6, pg/mL	19,2±50,0 3,2 [0,7; 13,5]	1,7±3,4 0,5 [0,3; 0,7]	20,2±41,8 2,5 [0,7; 15,0]	0±26,3 6,6 [1,2; 30,2]	**<0,001**
IL-10, pg/mL	2,1±8,1 0,2 [0,1; 1,1]	0,1±0,2 0,1 [0; 0,1]	0,2±0,5 0,1 [0; 0,1]	0±33,5 0,1 [0,1; 0,2]	**<0,001**
IL-13, pg/mL	4,0±5,0 1,6 [0,3; 8,1]	0,6±1,1 0,3 [0,2; 0,4]	0,4±0,3 0,3 [0,2; 0,4]	0±2,9 0,3 [0,3; 0,5]	**0,012**
TNF-α, pg/mL	5,0±6,6 1,5 [0,2; 7,3]	0,3±0,6 0,2 [0,1; 0,3]	0,4±0,7 0,2 [0,1; 0,3]	3,7±14,0 0,2 [0,2; 0,4]	**<0,001**
IFN-γ, pg/mL	14,8±19,7 2,2 [0,1; 29,0]	2,7±11,7 0,1 [0; 0,1]	2,5±6,3 0,1 [0; 0,8]	7,0±23,2 0,1 [0; 0,9]	**0,001**

Değerler ortalama ± Standart Sapma, medyan [çeyrekler arası aralık] olarak gösterilmiştir. Kısaltmalar: USAP: unstabil anjina pektoris, NSTEMİ: non-st elevasyonlu miyokard infarktüsü, STEMİ: ST elevasyonlu miyokard infarktüsü, IL: interlökin, TNF:tümör nekrozis faktör, IFN:interferon, *p* değeri Kruskal Wallis testi ile hesaplandı. İstatistiksel olarak anlamlı olanlar kalın olarak gösterildi.

Araştırma gruplarının serum İKNP düzeylerinin gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı oldukları bulundu (Tablo 4-4). CTLA (Cytotoxic T-Lymphocyte Associated protein), CD25-IL2Rα (IL-2 reseptör alfa) ile BB düzeyleri gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı değilken; sCD27, B7-2 (CD86), TGF-β1 (Transforming Growth Factor Beta 1), PD-L1 (Programmed Death-Ligand 1) ve TIM-3 (T-cell Immunoglobulin and Mucin-domain containing-3) düzeyleri gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklara sahipti (sırasıyla, p=0,033, p=0,018, p<0,001, p<0,001 ve p<0,001). PD-L2 (Programmed Death-Ligand 2) ve PD-1 (Programmed Cell Death Protein 1gözlenmedi (p>0,05). Tablo 4-3'te İKNP düzeylerinin gruplar arasındaki ortalama ile standart sapmaları ve medyan [çeyrekler arası aralık] değerleri gösterilmektedir.

Tablo 4-4: Gruplar arası akan hücre ölçer ile ölçülen İKNP düzeylerinin karşılaştırılması.

İKNP	Kontrol	USAP	NSTEMI	STEMI	P değeri
CTLA-4, pg/mL	1,8±1,7 1,1 [0,8; 1,9]	1,8±1,8 1,1 [1,0; 1,6]	1,8±1,7 1,0 [0,9; 1,5]	1,7±1,7 1,0 [1,0; 1,3]	0,620
CD25-IL2Ra, pg/mL	1136,9±734,4 961,2 [615,6; 1529,0]	1304,3±671,8 1130,1 [889,7; 1480,1]	1551,3±1090,7 1166,4 [970,2; 1858,1]	1433,0±646,6 1265,5 [1058,0; 1562,5]	0,130
4-1BB (CD137), pg/mL	27,5±19,6 20,3 [10,1; 40,7]	24,0±22,8 17,8 [11,7; 24,7]	29,5±29,8 20,3 [15,7; 27,3]	24,3±12,6 19,4 [17,0; 26,0]	0,458
sCD27(10^3), pg/mL	92,0±54,6 70,3 [52,3; 114,4]	106,2±40,3 93,9 [80,7; 131,6]	120,1±47,8 106,4 [84,9; 149,7]	107,2±36,3 97,6 [80,8; 125,7]	**0,033**
B7-2 (CD86), pg/mL	122,1±160,7 78,1 [62,9; 115,4]	126,2±84,2 95,0 [65,7; 174,1]	158,7±92,7 152,9 [89,0; 207,1]	155,6±84,9 165,0 [87,1; 211,6]	**0,018**
TGFb1, pg/mL	7,1±20,9 1,3 [0,9; 2,7]	16,3±29,9 3,6 [1,7; 12,7]	17,7±23,1 4,5 [2,1; 30,1]	20,4±24,7 6,8 [3,5; 24,3]	**<0,001**
PD-L1, pg/mL	4,7±3,8 3,3 [1,9; 6,4]	12,5±17,1 7,0 [4,9; 13,8]	16,3±23,1 11,4 [8,1; 15,7]	20,3±20,7 14,1 [10,0; 17,9]	**<0,001**
PD-L2(10^3), pg/mL	6,7±2,8 6,2 [5,4; 6,8]	6,2±1,4 6,1 [5,3; 6,8]	6,6±1,5 6,7 [5,4; 7,6]	6,7±1,4 6,5 [5,7; 7,4]	0,371
PD-1, pg/mL	2,8±4,1 1,3 [1,0; 2,8]	4,4±11,1 1,7 [0,9; 2,6]	2,7±4,2 1,4 [1,2; 1,6]	2,9±5,1 1,2 [1,1; 1,7]	0,678
TIM-3(10^3), pg/mL	3,0±3,4 2,3 [0,7; 3,5]	8,8±6,3 7,4 [4,3; 1,3]	10,1±7,5 8,3 [2,7; 14,3]	7,7±7,3 5,9 [2,7; 10,2]	**<0,001**
LAG-3, pg/mL	775,3±2643,7 162,7 [40,7; 301,2]	210,0±183,3 156,2 [54,3; 328,5]	410,3±821,6 111,6 [33,0; 328,5]	190,2±161,8 162,7 [41,6; 253,3]	0,933

Değerler ortalama ± Standart Sapma, medyan [çeyrekler arası aralık] olarak gösterilmiştir Kısaltmalar: USAP: unstabil anjina pektoris, NSTEMİ: non-ST elevasyonlu miyokard infarktüsü, STEMİ: ST elevasyonlu miyokard infarktüsü, IL: interlökin, TNF: tümör nekrozis faktör, IFN: interferon, *p* değeri Kruskal Wallis testi ile hesaplandı. İstatistiksel olarak anlamlı olanlar kalın olarak gösterildi.

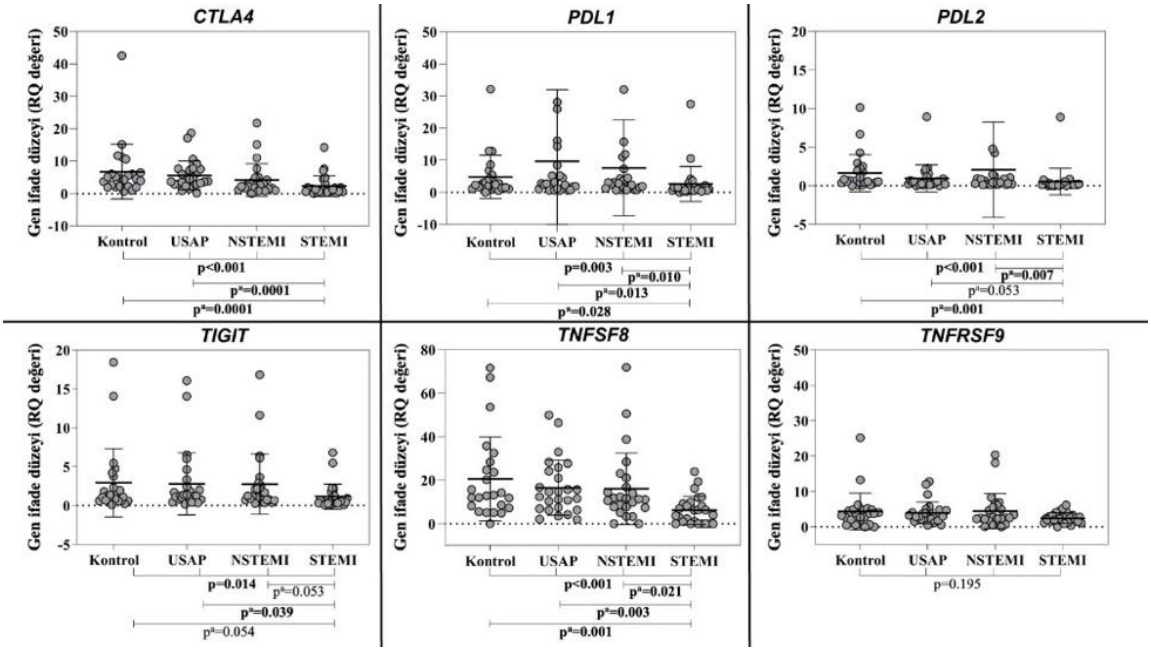
Tablo 4-5'te ifade düzeyleri belirlenen gen transkriptlerinin rölatif kantitasyon (RQ) değerleri gruplar arasındaki ortalama ile standart sapmaları ve medyan [çeyrekler arası aralık] değerleri gösterilmektedir. *TIGIT, CTLA-4*, *PD-L1*, *PD-L2* ve *TNFSF8* gen transkriptlerinin araştırma gruplarının lökositlerindeki ifade düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlı olarak farklı olduğu (sırasıyla, p=0,014, p<0,001, p=0,003, p<0,001 ve p<0,001) bulunurken *TNFRSF9* gen transkriptinin ifade düzeyleri arasındaki fark gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı saptanmadı (p=0.195).

Tablo 4-5: Gruplar arası İKNP'lerini kodlayan genlerin ifade düzeylerinin karşılaştırılması.

Gen Transkripti	Kontrol	USAP	NSTEMI	STEMI	p değeri
TIGIT	2,9±4,4 1,3 [0,6; 3,0]	2,8±4,0 1,3 [0,8; 2,4]	2,8±3,9 1,3 [0,7; 2,6]	1,2±1,6 0,6 [0,3; 1,3]	**0,014**
CTLA4	6,7±8,5 4,7 [2,2; 6,2]	5,6±4,4 4,1 [2,9; 7,5]	4,2±5,0 2,6 [1,5; 4,2]	2,3±3,2 1,2 [0,6; 1,8]	**<0,001**
PDL1	4,8±6,8 2,4 [1,4; 4,9]	9,7±22,3 2,6 [1,2; 5,2]	7,6±15,0 2,8 [1,4; 4,5]	2,6±5,5 0,9 [0,6; 1,6]	**0,003**
PDL2	1,6±2,4 0,6 [0,4; 2,1]	0,9±1,8 0,4 [0,2; 0,9]	2,1±6,2 0,4 [0,2; 0,9]	0,6±1,7 0,2 [0,1; 0,3]	**<0,001**
TNFSF8	20,6±19,3 13,0 [7,8; 26,5]	16,5±12,6 13,5 [6,9; 24,1]	16,1±16,4 11,3 [7,7; 16,8]	6,2±6,5 5,1 [1,6; 9,2]	**<0,001**
TNFRSF9	4,4±5,2 3,6 [1,9; 4,9]	4,0±3,1 3,6 [1,9; 4,9]	4,5±5,0 2,5 [2,2; 5,6]	2,5±1,5 2,4 [1,4; 3,2]	**0,195**

Değerler ortalama ± Standart Sapma, medyan [çeyrekler arası aralık] olarak gösterilmiştir. Kısaltmalar: USAP: unstabil anjina pektoris, NSTEMİ: non-ST elevasyonlu miyokard infarktüsü, STEMİ: ST elevasyonlu miyokard infarktüsü, *TIGIT*: T-cell immunoglobulin and ITIM domain, *CTLA4*: Sitotoksik T lenfosit Antijen 4, *PDL*: Programlanmış Ölüm Ligandı, *TNFSF*: tumor necrosis factor superfamily, *TNFRSF*: tumor necrosis factor receptor superfamily, *p* değeri Kruskal Wallis testi ile hesaplandı. İstatistiksel olarak anlamlı olanlar kalın olarak gösterildi.

Şekil 4-1'de ifade düzeyleri belirlenen gen transkriptlerinin rölatif kantitasyon (RQ) değerleri gruplar arasındaki ortalama ile standart sapmaları grafik olarak verilmekte ve istatistiksel olarak grupların ikili karşılaştırmaları belirtilmektedir.



Şekil 4-1: Çalışmadaki grupların *CTLA4, PDL1, PDL2, TIGIT, TNFSF8* ve *TNFRSF9* gen ifade düzeyleri.

Değerler ortalama ± Standart Sapma olarak gösterilmiştir. 4 grup arasındaki p değeri Kruskal Wallis testi ile hesaplandı. Grupların ikili karşılaştırmalarında, [a]anlamlılık değerleri Bonferroni düzeltmesi ile ayarlandı. İstatistiksel olarak p<0,05 altında olanlar kalın yazı ile gösterildi.

Şekil 4-1'deki grafiklere göre *CTLA4* gen ifade düzeyleri (RQ değeri); 4 grup arasında istatistiksel olarak anlamlı iken (p<0,001) STEMİ durumunda, kontrol grubuna göre yaklaşık 3 kat azaldığı (p=0,0001) ve USAP grubuna göre ise 2,4 kat azaldığı bulundu (p=0,0001). 4 grup arasında istatistiksel olarak anlamlı değişimlere sahip olan *PDL1* gen ifade düzeyleri ise ikili karşılaştırmalarda, STEMİ durumunda kontrol grubuna göre azaldığı (p=0,028), STEMİ durumundaki düzeyin USAP grubuna göre (p=0,013) ve NSTEMİ grubuna göre azaldığı (p=0,010) belirlendi. *PDL2* gen ifade düzeyi; 4 grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p<0,001). NSTEMI ve USAP durumları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi (p=0,053) ancak STEMİ grubunda kontrole göre 2.7 kat (p=0,001), NSTEMİ grubuna göre 3.5 kat (p=0,007) azaldığı belirlendi. 4 grup arasında anlamlı farklara (p=0,014) sahip *TIGIT* gen ifade düzeyleri; kontrol grubu ile STEMİ grubu arasında (p=0,054) yine NSTEMİ ve STEMİ arasında ise (p=0,053) sınırda anlamlılıklar mevcuttu. STEMI durumunda USAP grubuna göre düzeylerinin azaldığı bulundu (p=0,039). 4 grup arasında istatistiksel olarak anlamlı (p<0,001) olan *TNFSF8* gen ifade düzeyleri; STEMİ grubunda kontrol grubuna göre 3,3 kat (p=0,001), USAP grubuna göre 2,7 kat (p=0,003) ve NSTEMI grubuna göre ise 2,6 kat azaldığı (p=0,021) gösterildi. *TNFRSF9* gen ifade düzeyleri ise 4 grup arasında da (p=0.195) ikili karşılaştırmalarda da gruplar arasında fark olmadığı bulundu.

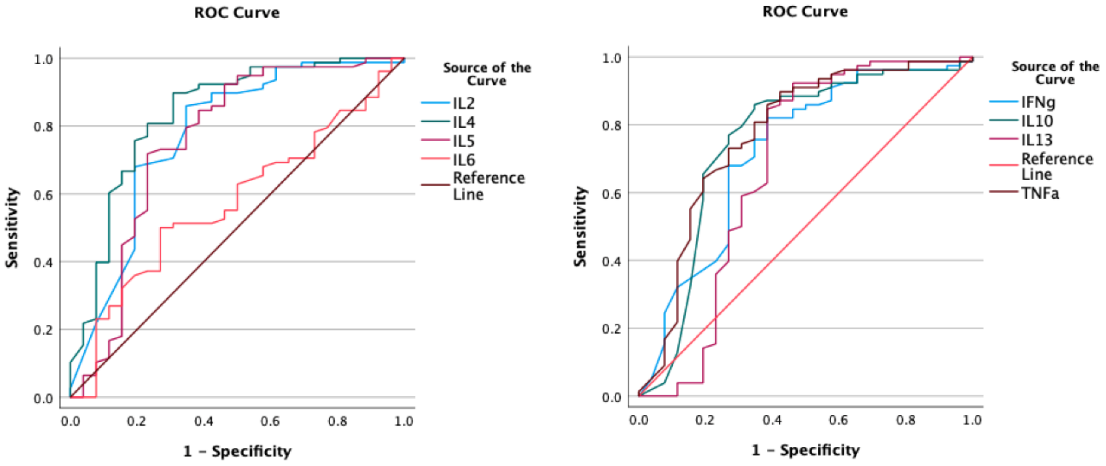
Ek olarak ifade düzeyleri belirlenen genlerin 4 grupta ayrı ayrı İKNP ve sitokin düzeyleri ile olan korelasyonları incelendi (Tablo 4-6). Buna göre; kontrol grubunda anlamlı bulunan sitokin veya İKNP düzeyleri ile anlamlı olan (p<0,05) gen ifade düzeylerinden (*TNSRFS9* ile B7-2 arasındaki negatif yönlü korelasyon dışında diğerleri pozitif yönlü korelasyona sahiptir) sadece B7-2 düzeyinin USAP grubunda *TIGIT* gen ifadesi ile *TNSRFS9* gen ifadesi ile pozitif yönlü olarak anlamlı korelasyonlarının olduğu bulundu. Kontrol grubunda *CTLA4* gen ifadesi ile korele olan sitokin/İKNP'nin (IL-6, IL-10 ve PD-L1) NSTEMİ ve STEMİ gruplarında korelasyonun olmadığı NSTEMİ grubunda IL-5 ve IL-13 sitokin düzeyleri ile STEMİ grubunda ise TNF-α ve IFN-γ düzeyleri ile anlamlı korelasyonların gözlendiği bulundu. NSTEMİ grubunda IL-5 ve IL-13 sitokin düzeylerinin ayrıca *TIGIT*, *PDL1* ve *TNSFS8* gen ifadeleri ile korelasyonlarının olduğu bulundu. STEMİ grubunda ise IFN-γ ve TNF-α düzeylerinin *CTLA4* yanısıra *TIGIT* gen ifadesi ile de anlamlı korelasyonu mevcuttu. Bu grupta ayrıca, PDL1 gen ifadesi BB ve PD1 düzeyleri ile korele idi. Bu tablo anlamlı ve p<0.1 altındaki anlamlı olmayan korelasyon verilerine sahip olup gen ifade düzeyleri ile Tablo 4-3 ve 4-4'te

değerlendirilen diğer sitokin/İKNP düzeyleri arasındaki ilişkili olmayan verileri içermemektedir. Dolayısıyla lökositlerdeki *CTLA4*, *PDL1* ve *PDL2* gen ifadeleri, vakaların serumlarında ölçülen CTLA, PD-L1 ve PD-L2 düzeyleri ile arasında bir korelasyon mevcut değildi.

Tablo 4-6: Çalışma gruplarında sitokin/İKNP ve gen ifade düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bulunan korelasyonlar.

Sitokin/İKNP	***TIGIT* Korelasyon katsayısı (r), p**	***CTLA4* Korelasyon katsayısı (r), p**	***PDL1* Korelasyon katsayısı (r), p**	***PDL2* Korelasyon katsayısı (r), p**	***TNSFS8* Korelasyon katsayısı (r), p**	***TNSRFS9* Korelasyon katsayısı (r), p**
Kontrol						
IL-6	-	**(0,424), 0,039**	-	-	-	-
IL-10	-	**(0,456), 0,025**	-	-	-	-
B7-2	-	-	-	-	-	**(-0,411), 0,046**
PD-L1	-	**(0,449), 0,028**	-	**(0,515), 0,010**	-	-
USAP						
B7-2	(0,386), 0,052	-	-	-	(0,359), 0,072	**(0,414), 0,035**
NSTEMİ						
IL-5	**(0,0475), 0,016**	**(0,462), 0,020**	**(0,462), 0,020**	(0,388), 0,055	**(0,533), 0,006**	-
IL-13	**(0,518), 0,008**	**(0,424), 0,035**	(0,384), 0,058	(0,344), 0,092	**(0,467), 0,019**	-
STEMİ						
IFN-γ	**(0,446), 0,022**	**(0,447), 0,022**	-	-	-	-
TNF-α	**(0,457), 0,019**	**(0,439), 0,025**	-	-	-	-
BB	-	(0,341), 0,088	**(0,410), 0,038**	-	-	-
PD1	-	-	**(0,396), 0,045**	-	-	-

p değeri Sperman's korelasyon testi ile hesaplandı.



Şekil 4-2: Th1/Th2 sitokin düzeylerinin ROC eğrisi

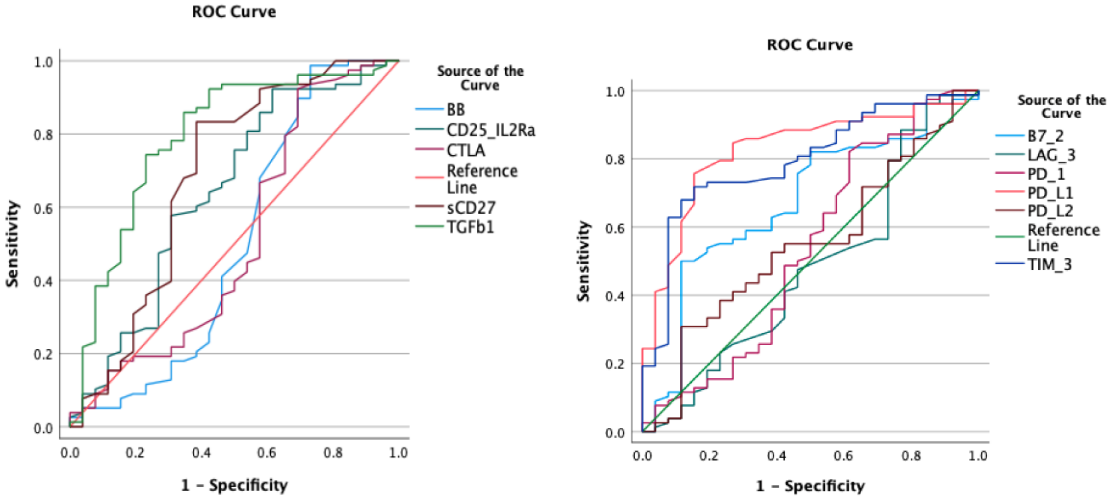
Tablo 4-7: Gruplar arası akan hücre ölçer ile ölçülen sitokin düzeylerinin sensitivite (duyarlık) ve spesifite (özgüllük) karşılaştırılması.

	AUC	Sensitivite %	Spesifite %	"Cut off" değeri	95% CI	p değeri
IL-2	0,775	85,9	65,4	0,085	0,660 - 0,891	***<0,001***
IL-4	0,837	89,7	69,2	3,840	0,739 - 0,936	***<0,001***
IL-5	0,756	71,8	76,9	0,640	0,628 - 0,884	***<0,001***
IL-6	0,573	50	73,1	1,370	0,450 - 0,696	*0,243*
IL-10	0,753	85,9	61,5	0,135	0,626 - 0,880	***<0,001***
IL-13	0,677	84,6	61,5	0,510	0,525 - 0,829	***0,023***
TNF-α	0,774	85,9	61,5	0,710	0,657 - 0,892	***<0,001***
IFN-γ	0,722	82,1	61,5	1,120	0,599 - 0,846	***<0,001***

Kısaltmalar; AUC: eğri altında kalan alan, IL: interlökin, CI: güven aralığı, TNF: tümör nekroz faktör, IFN: interferon

Tablo 4-7'de gruplar arası akan hücre ölçer ile ölçülen sitokin düzeylerinin sensitivite (duyarlık) ve spesifite (özgüllük) karşılaştırılması yapılmıştır, grafik olarak Şekil 4-2'de gösterilmiştir. IL-2 için; AUC değeri 0.775 olarak bulunmuştur ve bu durum; IL-2'nin yüksek tanısal performansa sahip olduğunu göstermektedir. IL-2'nin %85.9 duyarlık ve %65.4 özgüllük ile belirli bir durumu ayırt etmede iyi bir biyobelirteç olduğu anlaşılmaktadır. "Cut-off" değeri 0,085 olarak belirlenmiş ve 95% güven aralığı 0.660 ile 0.891 arasında değişmektedir. p değeri <0,001 olarak hesaplanmıştır, bu da sonucun istatistiksel olarak anlamlı olduğunu belirtir. IL-4 için; AUC değeri 0.837 olarak tespit edilmiştir, bu değer; IL-4'ün mükemmel tanısal yeteneğe sahip olduğunu gösterir. IL-4, %89.7 duyarlık ve %69.2 özgüllük ile belirli bir durumu tanımlamada etkili bir biyobelirteçtir. "Cut-off" değeri 3.840 olarak belirlenmiş ve 95% güven aralığı 0.739 ile 0.936 arasında saptanmıştır. p değeri <0,001'dir, bu da bulguların yüksek istatistiksel

anlamlılığını işaret eder. IL-5 için; AUC değeri 0.756 bulunmuştur, bu değer IL-5'in iyi bir tanısal performans gösterdiğini belirtir. IL-5, %71.8 duyarlık ve %76.9 özgüllük oranları ile bir durumu belirlemede kullanışlı bir göstergedir. “Cut-off” değeri 0.640 olarak hesaplanmış ve 95% güven aralığı 0.628 ile 0.884 arasındadır. p değeri <0,001'dir, bu sonuçların istatistiksel olarak anlamlı olduğunu gösterir. IL-6 için; AUC değeri daha düşük, 0.573 olarak bulunmuştur ve bu IL-6'nın belirli bir durumu ayırt etme yeteneğinin nispeten sınırlı olduğunu gösterir. IL-6, %50 duyarlık ve %73.1 özgüllük ile daha düşük bir tanısal değere sahip olup “Cut-off” değeri 1.370'tir ve 95% güven aralığı 0.450 ile 0.696 arasındadır. p değeri 0.243'tür, bu nedenle IL-6'nın tanısal değeri istatistiksel olarak anlamlı değildir. IL-10 için; AUC değeri 0.753 olarak tespit edilmiş, IL-10'un %85.9 duyarlık ve %61.5 özgüllük ile etkili bir biyobelirteç olduğu belirlenmiştir. “Cut-off” değeri 0.135'tir ve 95% güven aralığı 0.626 ile 0.880 arasındadır. p değeri <0,001'dir, bu da IL-10'un tanısal anlamda istatistiksel olarak anlamlı olduğunu gösterir. IL-13 için; AUC değeri 0.677 olarak belirlenmiştir, bu da IL-13'ün makul bir tanısal performansa işaret eder. IL-13, %84.6 duyarlık ve %61.5 özgüllük ile bir durumu ayırt etmede etkili bir biyobelirteç olarak kabul edilebilir. “Cut-off” değeri 0.510'dur ve 95% güven aralığı 0.525 ile 0.829 arasındadır. p değeri 0,023'tür, bu da IL-13'ün tanısal değerinin istatistiksel olarak anlamlı olduğunu gösterir. TNF-α için; AUC değeri 0.774 olarak bulunmuştur ve bu bulgu; yüksek bir tanısal performansa işaret eder. TNF-α, %85.9 duyarlık ve %61.5 özgüllük ile belirli bir durumu ayırt etmede güçlü bir biyobelirteçtir. “Cut-off” değeri 0.710 olarak belirlenmiş ve 95% güven aralığı 0.657 ile 0.892 arasındadır. p değeri <0,001 olarak hesaplanmıştır, bu da sonucun istatistiksel olarak anlamlı olduğunu gösterir. IFN-γ için; AUC değeri 0.722 olarak tespit edilmiştir, bu da IFN-γ'nın iyi bir tanısal performansa sahip olduğunu gösterir. IFN-γ, %82.1 duyarlık ve %61.5 özgüllük oranları ile bir durumu tanımlamada kullanışlı bir göstergedir. “Cut-off” değeri 1.120'dir ve 95% güven aralığı 0.599 ile 0.846 arasındadır. p değeri <0,001'dir, bu da IFN-γ'nın tanısal anlamda istatistiksel olarak anlamlı olduğunu gösterir.



Şekil 4-3: İKNP düzeylerinin ROC eğrisi

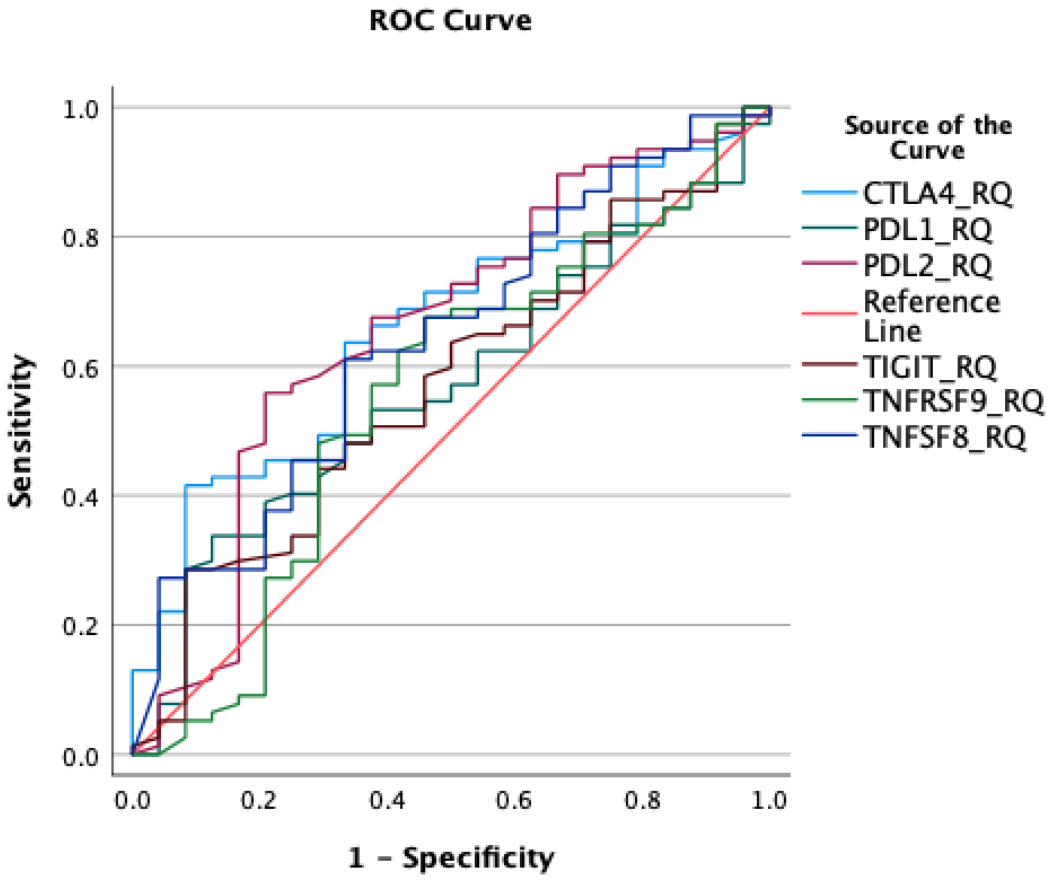
Tablo 4-8: Gruplar arası akan hücre ölçer ile ölçülen İKNP'lerinn sensitivite (duyarlık) ve spesifite (özgüllük) karşılaştırılması.

	AUC	Sensitivite %	Spesifite %	"Cut off" değeri	95% CI	p değeri
CTLA	0,511	92,3	30,80	0,840	0,365 - 0,656	*0,884*
CD25	0,642	92,3	38,5	701,7	0,508 - 0,775	***0,038***
BB	0,502	98,7	27	10,3	0,348 - 0,657	*0,975*
sCD-27	0,685	83,3	61,5	72.144,1	0,547 - 0,824	***0,009***
TGF-B1	0,790	74,4	76,9	2,695	0,681 - 0,900	***<0,001***
B7-2	0,675	50	88,5	146,5	0,554 - 0,795	***0,004***
PD-L1	0,828	75,6	84,6	6,855	0,740 - 0,916	***<0,001***
PD-L2	0,548	31	88,5	7.274,5	0,421 - 0,674	*0,459*
PD-1	0,536	82,1	38,5	1,045	0,393 - 0,680	*0,621*
TIM-3	0,795	67,9	88,5	5.199,3	0,700 - 0,891	***<0,001***
LAG-3	0,478	88,5	23,1	27,650	0,341 - 0,614	*0,748*

Tablo 4-8'de gruplar arası akan hücre ölçer ile ölçülen İKNP'nin (duyarlık) ve spesifite (özgüllük) karşılaştırılması görülmekte olup grafik olarak Şekil 4-3'de verilmiştir. CTLA için; AUC değeri 0,511 olup, düşük tanısal performansı işaret eder. CTLA, %92,3 duyarlık ve %30,8 özgüllük ile belirli bir durumu ayırt etmede kısıtlı bir biyobelirteçtir. "Cut-off" değeri 0,840 ve 95% güven aralığı 0,365 ile 0,656 arasındadır. p değeri 0.884'tür, bu da istatistiksel olarak anlamlı olmadığını gösterir. CD25-IL2Ra için; AUC değeri 0,642 olarak bulunmuştur ve bu değer, CD25-IL2Ra'nın makul bir tanısal performansa sahip olduğunu gösterir. Duyarlık %92,3 ve özgüllük %38,5'tir. "Cut-off" değeri 701.720 ve 95% güven aralığı 0,508 ile 0,775 arasındadır. p değeri 0,038'dir, bu da sonucun istatistiksel olarak anlamlı olduğunu gösterir. TGF-β1 için; AUC değeri

0.790 olup, yüksek tanısal performansı işaret eder. TGF-β1, %74.4 duyarlık ve %76.9 özgüllük ile belirli bir durumu ayırt etmede güçlü bir biyobelirteçtir. “Cut-off” değeri 2.695 ve 95% güven aralığı 0,681 ile 0,900 arasındadır. p değeri <0,001'dir, bu da sonucun istatistiksel olarak anlamlı olduğunu gösterir. PD-L1 için; AUC değeri 0,828 olarak tespit edilmiştir, bu da PD-L1'in mükemmel tanısal yeteneğe sahip olduğunu gösterir. PD-L1, %75,6 duyarlık ve %84,6 özgüllük ile belirli bir durumu tanımlamada etkili bir biyobelirteçtir. “Cut-off” değeri 6.855 ve 95% güven aralığı 0,740 ile 0,916 arasındadır. p değeri <0,001'dir, bu da bulguların yüksek istatistiksel anlamlılığını işaret eder. TIM-3 için; AUC değeri 0,795 olarak bulunmuştur, bu değer TIM-3'ün iyi bir tanısal performans gösterdiğini belirtir. TIM-3, %67,9 duyarlık ve %88,5 özgüllük oranları ile bir durumu belirlemede kullanışlı bir göstergedir. “Cut-off” değeri 5.199.290 ve 95% güven aralığı 0,700 ile 0,891 arasındadır. p değeri <0,001'dir, bu sonuçların istatistiksel olarak anlamlı olduğunu gösterir. BB için; AUC değeri 0.502 olup, düşük tanısal performansı işaret eder. BB, %98,7 duyarlık ve %27 özgüllük ile belirli bir durumu ayırt etmede çok sınırlı bir biyobelirteç olarak kabul edilebilir. “Cut-off” değeri 10.285 ve 95% güven aralığı 0,348 ile 0,657 arasındadır. p değeri 0.975'tür, bu da istatistiksel olarak anlamlı olmadığını gösterir. sCD-27 için; AUC değeri 0,685 olup, iyi tanısal performansı işaret eder. sCD-27, %83,3 duyarlık ve %61,5 özgüllük ile belirli bir durumu ayırt etmede iyi bir biyobelirteçtir. “Cut-off” değeri 72.144.105 ve 95% güven aralığı 0,547 ile 0,824 arasındadır. p değeri 0,009'dur, bu da sonucun istatistiksel olarak anlamlı olduğunu gösterir. B7-2 için; AUC değeri 0,675 olup, iyi tanısal performansı işaret eder. B7-2, %50 duyarlık ve %88,5 özgüllük ile belirli bir durumu ayırt etmede güçlü bir biyobelirteçtir. “Cut-off” değeri 146.455 ve 95% güven aralığı 0,554 ile 0,795 arasındadır. p değeri 0,004'tür, bu da sonucun istatistiksel olarak anlamlı olduğunu gösterir. PD-L2 için; AUC değeri 0,548 olup, orta seviye tanısal performansı işaret eder. PD-L2, %31 duyarlık ve %88,5 özgüllük ile belirli bir durumu ayırt etmede kısıtlı bir biyobelirteçtir. “Cut-off” değeri 7.274.525 ve 95% güven aralığı 0,421 ile 0,674 arasındadır. p değeri 0,459'dur, bu da istatistiksel olarak anlamlı olmadığını gösterir. PD-1 için; AUC değeri 0,536 olarak bulunmuştur ki bu, PD-1'in sınırlı tanısal performansa sahip olduğunu gösterir. PD-1, %82,1 duyarlık ve %38,5 özgüllük ile belirli bir durumu ayırt etmede orta düzey bir biyobelirteç olarak değerlendirilebilir. “Cut-off” değeri 1,045 ve 95% güven aralığı 0,393 ile 0,680 arasındadır. p değeri 0,621'dir, bu da sonucun istatistiksel olarak anlamlı olmadığını gösterir. LAG-3 için; AUC değeri 0,478 olup, düşük tanısal performansı işaret

eder. LAG-3, %88,5 duyarlık ve %23,1 özgüllük ile belirli bir durumu ayırt etmede oldukça sınırlı bir biyobelirteçtir. “Cut-off” değeri 27.650 ve 95% güven aralığı 0,341 ile 0,614 arasındadır. p değeri 0,748'tür, bu da istatistiksel olarak anlamlı olmadığını gösterir.



Şekil 4-4: İKNP’lerini kodlayan genlerin ifade düzeylerinin ROC eğrisi

Tablo 4-9: Gruplar arası İKNP’lerini kodlayan genlerin ifade düzeylerinin sensitivite ve spesifite karşılaştırılması.

	AUC	Sensitivite %	Spesifite %	“Cut off” değeri	95% CI	p değeri
TIGIT	0,571	28,60	90,7	0,555	0,443 - 0,700	*0,275*
CTLA-4	0,662	41,6	91,7	1,875	0,546 - 0,777	***0,006***
PD-L1	0,567	33,8	87,5	1,070	0,443 - 0,690	*0,291*
PD-L2	0,659	55,8	79,2	0,350	0,528 - 0,790	***0,018***
TNFSF8	0,640	61,0	66,4	11,825	0,515 - ,765	***0,029***
TNFRSF9	0,555	67,5	54,2	3,455	0,415 - ,695	*0,441*

Şekil 4-4’de grafik olarak verilen ROC analizinde, Tablo 4-9’de gruplar arası İKNP’lerini kodlayan genlerin ifade düzeylerinin sensitivite ve spesifite karşılaştırılması

TIGIT için; AUC değeri 0.571 olup, orta seviye tanısal performansı işaret eder. *TIGIT*, %28,60 duyarlık ve %90,7 özgüllük ile belirli bir durumu ayırt etmede kısıtlı bir biyobelirteçtir. "Cut-off" değeri 0,555 ve 95% güven aralığı 0,443 ile 0,700 arasındadır. p değeri 0,275'tir, bu da istatistiksel olarak anlamlı olmadığını gösterir. *CTLA4* için; AUC değeri 0,662 olup, iyi tanısal performansı işaret eder. *CTLA4*, %41,6 duyarlık ve %91,7 özgüllük ile belirli bir durumu ayırt etmede etkili bir biyobelirteçtir. "Cut-off" değeri 1,875 ve 95% güven aralığı 0,546 ile 0,777 arasındadır. p değeri 0,006'dır, bu da sonucun istatistiksel olarak anlamlı olduğunu gösterir. *PDL1* için; AUC değeri 0,567 olup, orta seviye tanısal performansı işaret eder. *PDL1*, %33,8 duyarlık ve %87,5 özgüllük ile belirli bir durumu ayırt etmede kısıtlı bir biyobelirteç olarak değerlendirilebilir. "Cut-off" değeri 1,070 ve 95% güven aralığı 0,443 ile 0,690 arasındadır. p değeri 0,291'dir, bu da istatistiksel olarak anlamlı olmadığını gösterir. *PDL2* için; AUC değeri 0,659 olup, iyi tanısal performansı işaret eder. *PDL2*, %55,8 duyarlık ve %79,2 özgüllük ile belirli bir durumu ayırt etmede etkili bir biyobelirteçtir. "Cut-off" değeri 0,350 ve 95% güven aralığı 0,528 ile 0,790 arasındadır. p değeri 0,018'dir, bu da sonucun istatistiksel olarak anlamlı olduğunu gösterir. *TNFSF8* için; AUC değeri 0,640 olup, iyi tanısal performansı işaret eder. *TNFSF8*, %61,0 duyarlık ve %66,4 özgüllük ile belirli bir durumu ayırt etmede iyi bir biyobelirteçtir. "Cut-off" değeri 11,825 ve 95% güven aralığı 0,515 ile 0,765 arasındadır. p değeri 0,029'dur, bu da sonucun istatistiksel olarak anlamlı olduğunu gösterir. *TNFRSF9* için; AUC değeri 0,555 olup, düşük tanısal performansı işaret eder. *TNFRSF9*, %67,5 duyarlık ve %54,2 özgüllük ile belirli bir durumu ayırt etmede sınırlı bir biyobelirteçtir. "Cut-off" değeri 3,455 ve 95% güven aralığı 0,415 ile 0,695 arasındadır. p değeri 0,441 ile istatistiksel olarak anlamlı değildir.

5. TARTIŞMA

Son yirmi yıl içerisinde, immün kontrol noktalarını (İKN) hedef alarak kanser terapisinde büyük ilerlemeler kaydedilmiştir. Bu T-hücresi yüzey membran reseptörleri, T-hücresinin aktive edilmesi veya inhibe edilmesi için gerekli ikincil sinyali sağlar. Tümör hücreleri, karşılık gelen inhibe edici ligandları eksprese etme yeteneğine sahip olduklarından, İKN'ye bağlanabilir ve etkili bir şekilde T-hücresi aktivasyonunu engelleyebilir, böylece potansiyel bir anti-tümör immün yanıtını devre dışı bırakabilirler (94). Bu etkileşimi önlemek için monoklonal antikorlar olan immün kontrol noktası inhibitörleri (ICI) geliştirilmiştir. İmmün kontrol noktası inhibitörleri, T-hücrelerindeki İKN'ye veya tümör hücrelerindeki karşılık gelen ligandlarına bağlanır, T-hücre-tümör hücresi etkileşiminin inhibe edici etkisini bloke eder ve T-hücresi aktivasyonu için fırsat sağlar. Şu anda, Programlanmış Hücre Ölüm Proteini-1 (PD-1) ve onun ligandı PD-L1, Sitotoksik T-Lenfosit İlişkili Protein 4 (CTLA-4) ve Lenfosit Aktivasyon Geni-3 (LAG-3) hedef alan ICI'lar bulunmaktadır; bunların hepsi çeşitli tümör türlerinde olağanüstü ve kalıcı etkinlik göstermiştir (167-170).

Kanser terapisinde büyük bir başarı elde edilmesine rağmen, İKN inhibitörlerinin ana dezavantajlarından biri, bağışıklıkla ilgili advers etkilerdir (irAE). İKN inhibitörlerinin oluşturduğu T-hücre inhibisyonunun sistemik olması ve tümör ile çevresine özgü olmaması nedeniyle, birden fazla organa otoimmün hasar verebilir (171-173). Bir meta-analiz, rastgele klinik deneylerde immün kontrol noktası inhibitörleri alan 21.000'den fazla hastada kardiyovasküler olayların %8,32 (95% CI = 6,35–10,53) oranında meydana geldiğini göstermiştir ve bu kardiyovasküler immünle ilgili advers etkiler, hafif aritmilerden miyokardite kadar değişen şiddetlerde ciddi bir sağlık tehdidi oluştururken, sonuncunun mortalitesi %50'ye kadar çıkan deneylerde dikkatlice gözlemlenmiştir (174, 175). Bu, kardiyovasküler irAE'lerin en az meydana gelen üç advers etkiden biri olduğunu (8%), ancak ölüm nedenleri arasında ikinci sırada olduğunu (25%) bulan başka bir meta-analizde de ihtiyatla gözlemlenmiştir (176). Kardiyovasküler irAE tanısı konduğunda, mevcut yönergeler immün kontrol noktası inhibitörleri terapisinin geçici veya kalıcı olarak durdurulmasını ve derhal immünsüpresiflerle tedaviye başlanmasını göstermektedir (177). Ne yazık ki, tüm hastalar immünsüpresiflere

yanıt vermez ve bazı durumlarda bu tedavi yöntemi ölüm şansını bile artırabilir (178, 179).

Kardiyovasküler sistemde immün kontrol noktası proteinlerine ilişkin çalışmalar henüz sınırlıdır ve bu alanda derinlemesine araştırmalara büyük bir ihtiyaç bulunmaktadır. PD-1, CTLA-4 ve LAG-3 gibi proteinlerin, T-hücrelerinin yüzeyindeki ekspresyonu ve immün sistem üzerindeki düzenleyici rolleri kanser immünoterapisinde önemli birer hedef haline gelmiştir. Ancak, bu proteinlerin kardiyovasküler sistemdeki işlevleri ve patolojiler üzerindeki etkileri henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Kardiyovasküler hastalıklar, dünya genelinde morbidite ve mortalitenin önde gelen nedenlerinden biri olduğundan, bu kontrol noktası proteinlerinin kardiyovasküler sistemde nasıl işlediğini anlamak, hem hastalık mekanizmalarını daha iyi kavramamıza yardımcı olabilir hem de yeni terapötik hedeflerin belirlenmesine ışık tutabilir. İmmün kontrol noktası inhibitörlerinin kardiyovasküler irAE'leri dahil olmak üzere çeşitli yan etkileri göz önünde bulundurulduğunda, bu proteinlerin kardiyovasküler sistemdeki rollerini detaylı bir şekilde incelemek, bu yan etkileri yönetme ve önleme stratejilerini geliştirebilir. Bu nedenle, bu alandaki araştırmaların genişletilmesi, kardiyovasküler hastalıkların önlenmesi ve tedavisinde yeni yollar açabilir ve immün kontrol noktası inhibitörleri terapisinin güvenlik ve etkinliğini artırabilir.

İmmün kontrol noktası işlevindeki bozulmalar, immünolojik toleransta dengesizliklere yol açarak, klinik olarak irAE olarak kendini gösterebilecek olumsuz bir immün yanıta neden olabilir (180). İlginç bir şekilde, irAE'ler ile klinik yanıtlar arasında bir ilişki bildirilmiştir (181). Kanserde T-hücre aktivasyonu ve proinflamatuvar sitokinlerin büyük bir değeri varken, aterosklerotik lezyonlarda istenmeyen immün sistemi aktivasyonunun baskılanması gerekmektedir. Aterosklerotik lezyonlarda bir homeostaz mekanizması olarak immün kontrol yolları tarafından T hücre aktivasyonu baskılanmaktadır (3); ancak, nivolumab PD-1-PD-L1/PD-L2 yollarını bloke ederek T hücrelerini ve antijen sunan hücreleri aktive edebilir. Doğuştan gelen ve kazanılmış bağışıklığın; plak gelişimini, ilerlemesini ve destabilizasyonunu teşvik ettiği gösterilmiştir (3). Makrofaj ve dendritik hücreler, proinflamatuvar mediyatörlerin salgılanması veya T-hücre çekimi ile inflamasyonu teşvik eder (Şekil 1F). Aktive edilen T hücreleri, IFN-γ ve TNF-α gibi pro-aterojenik sitokinler üreterek, hem büyümeye hem de lezyonların destabilizasyonuna ve sonuç olarak rüptüre katkıda bulunur. Bu, PD-1

blokaj tedavisinin, koroner aterosklerotik lezyonlarda immün aktivasyon aracılığıyla aterosklerotik lezyonların büyümesini ve destabilizasyonunu tetikleyerek akut koroner sendroma neden olabileceği hipotezine yol açar.

PD-1, CTLA-4 ve LAG-3 gibi immün kontrol noktası reseptörleri, T-hücrelerinin yüzeyinde eksprese edilir ve T-hücre aktivasyonunu önlerler (94). T-hücre aktivasyonu, T-hücre reseptörünün (TCR) majör histokompatibilite kompleksi I veya II'ye (MHC-I/II) bağlanması ve ek olarak CD28-B7.1/B7.2 bağlanması yoluyla ko-stimülasyon sağlandığında gerçekleşir, bu da CD28'in hücre içi kısmına aralarında fosfoinozitid 3-kinazın (PI3K) da bulunduğu çok sayıda molekülün çekilmesi sonucunu doğurur (182). PI3K'nin çekilmesi; PI3K/Akt yolaklarını aktive eder, bu da T-hücrelerinde çoğalma, farklılaşma ve anti-apoptotik sinyallemeyi teşvik eder (183). T-hücrelerinin aktivasyonu, çevredeki sitokinlere bağlı olarak CD8 hücrelerinin sitotoksik T-hücrelere ve CD4 hücrelerinin uyarıcı T yardımcı hücrelerine (Th) veya inhibe edici Treg hücrelerine farklılaşmasına neden olur (141). Öte yandan, inhibe edici İKN, immün sistemin aşırı aktivasyonunu önleyebilir ve öz toleransı teşvik edebilir.

PD-1, T-hücrelerinin yüzeyinde eksprese edilir ve iki ligand, PD-L1 ve PD-L2 ile etkileşime girer (184). PD-L2, esas olarak makrofaj ve dendritik hücreler (DC'ler) üzerinde eksprese edilirken, PD-L1 hematopoetik hücrelerde ve çeşitli organlardaki doku hücrelerinde bulunur (141). PD-1'in ligandlarından herhangi birine bağlanması, aşağı akış SHP-2 sinyallemesi yoluyla T-hücre aktivitesinin düşürülmesine ve ardından PI3K-Akt yolaklarının defosforilasyonu ve inhibisyonu sonucu, inflamatuvar sitokin üretiminin, hücre sağkalım sinyallerinin ve çoğalmanın azalmasına yol açar; (153, 185, 186). PD-1'in T-hücreleri üzerindeki baskılanmasının genellikle bir immün yanıtın son aşamalarında, periferik dokuda gerçekleştiği öne sürülmektedir (187).

CTLA-4, hücre içinde bulunur ve T-hücresi aktivasyonu üzerine yüzeye taşınır (185, 188). B7.1 ve B7.2'ya, CD28'den daha yüksek bir afinitesiyle bağlanır ve PD-1 inhibisyonuna benzer şekilde, PI3K aşağı akış sinyallemesinin inhibisyonu yoluyla T-hücresi aktivasyonunu baskılar (189). Ek olarak, CTLA-4, AKT'nin defosforilasyonunu gerçekleştiren PP2A ile etkileşime girebilir ve yolak daha da söndürülür (186). Bu, CD8 T hücrelerinde sitokin üretimini azaltır ve CD4 T-hücrelerinin Treg hücrelerine doğru farklılaşmasını teşvik eder (190, 191). PD-1'in aksine, CTLA-4'ün; immün yanıtın daha erken aşamalarında T-hücre aktivasyonunu baskıladığı öne sürülmektedir (187).

Son zamanlarda yapılan çalışmalar, immün kontrol noktası inhibitörleri tedavisinin miyokard enfarktüsü ve inme riskini artırdığı ile bağlantılıdır (136, 137). Tek merkezli, eşleştirilmiş kohort çalışmasında, immün kontrol noktası inhibitörleriI alan hastaların kardiyovasküler olay riski üç kat daha yüksek bulunmuş, bu durumun muhtemelen aterosklerozda hızlandırılmış bir ilerleme yoluyla gerçekleştiği düşünülmektedir (136). Bu nedenle, T hücrelerinin İKN inhibisyonunun ateroskleroza karşı koruma sağladığı düşünülmektedir, ancak bu konuda çalışmalar halen eksiktir.

PD-1/PD-L1 aracılı ateroskleroza karşı koruma; geni işlevsizleştirilmiş ("knockout") farelerde genişlemiş plaklar içeren ve daha yüksek T hücre ve makrofaj sayıları, artmış Tümör Nekroz Faktör α (TNFα) seviyeleri ve antijen sunan hücreler tarafından T hücre aktivasyonu ve CD8 T hücrelerinin artan sitotoksik aktivitesi gibi, iltihabı ve plak oluşumunu artıran tüm özelliklerin varlığı ile gösterilmektedir. (138, 139). Ek olarak, PD-1'in PD-L1'e bağlanmasıyla indüklenen farklılaşmış Treg hücreleri, Th1 hücrelerinin sitokin üretimini inhibe eder, bu da interferon γ (IFNγ) ve TNFα'yı içerir (140, 141). T hücre ve makrofajların toplanması, sitokin salgısını ve endotel hücreleri tarafından artırılmış antijen sunumunu indükleyerek aterojenezde ana oyuncu olarak tanımlanan IFNγ, bu bağlanma ile hem plak boyutunu hem de iltihabi T hücre yanıtlarını azaltır (142, 143). IFNγ ayrıca, vasküler düz kas hücre çoğalmasını inhibe ederek ve kolajen sentezini azaltarak plak istikrarsızlığına da katkıda bulunur. Buna karşılık, Treg hücreleri, antiinflamatuvar sitokinler olan IL-10 ve TGF-β salgılayarak ve çoklu inhibe edici İKN eksprese ederek ve proinflamatuvar efektör T-hücrelerinin çoğalmasını baskılayarak aterojenezi azaltır (144). Treglerin sayıca azalması, IL-10 eksikliği veya TGF-β bozulmasının aterosklerotik hastalığı kötüleştirdiği farelerde gösterilmiştir (145, 146). Tüm bunlara ek olarak; T-hücreleri aterosklerotik lezyonlarda olduğu gibi sürekli olarak antijen veya inflamatuvar sinyallere, TGF-β ve IFNγ ile maruz kaldığında, efektör fonksiyonlarının bir kısmını kaybederek tükenmiş hale gelebilir.

Bu, T hücre çoğalmasının ve sitokin üretiminin azalması ve PD-1 ve LAG-3 gibi inhibe edici İKN ekspresyonunun artması anlamına gelir (147). Aterosklerotik lezyonlarda PD-1 eksprese eden tükenmiş T-hücreler bulunmuştur, bu da immün kontrol noktası inhibitörleri ile PD-1'in inhibe edilmesiyle, tükenmiş T hücrelerin yeniden aktive edildiği ve aterosklerozun hızlanmasına ve şiddetlenmesine katkıda bulunduğu ihtimalini gündeme getirmektedir (148).

Hücresel düzeyde, endotel hücrelerinde PD-L1 ekspresyonu IFNγ ve TNFα tarafından indüklenebilir (149). İnsan göbek kordonu ven endotel hücreleri (HUVEC'ler) üzerinde yapılan bir çalışma, PD-L2'nin sürekli ekspresyonu ve IFNγ tedavisi sonrası PD-L1'in indüklenmiş ekspresyonunu göstermektedir (150). Okside düşük yoğunluklu lipoprotein (ox-LDL) ile bozulmuş PD-L1 eksprese eden HUVEC'ler, Treg hücrelerinde CTLA-4 ve PD-1 ekspresyonunu artırabilmekte ve IL-10 ile TGF-β üretimlerini modüle edebilmektedir. Anti-PD-L1 ile tedavi edildiğinde, HUVEC'ler İKN ekspresyonunu ve sitokin üretimini artırma yeteneklerini kaybetmektedir. PD-L1'in T hücrelerindeki PD-1'e trans bağlanmasının yanı sıra, PD-L1 vasküler endotel hücrelerindeki (VECs) PD-1 ile cis olarak da bağlanabilir. Bunu takiben gelişen PD-L1 yüzey ekspresyondaki azalmasonucunda perforin, TNFα ve IFNγ yoluyla VEC'lerin yaralanmasına ve apoptoza neden olan artmış CD8 T hücre toksisitesine yol açar (151). Buna uygun olarak, endotel PD-L1/2 blokajı IFNγ salgısını ve CD8 T hücrelerinin litik aktivitesini artırır (152).

PD-1/PD-L1'ye benzer şekilde, CTLA-4 geni işlevsizleştirilmiş (“knockout”) farelerinde lezyon boyutu artmıştır ve anti-CTLA-4 bloke edici antikorlar alan farelerde, esas olarak T hücre kaynaklı inflamasyon tarafından yönlendirilen aterosklerozun ilerlemesi artmıştır (192). CTLA-4 knockout çalışmalarına karşılık gelen, CTLA-4'ü aşırı eksprese eden fareler veya CTLA-4 analogu abatacept alan fareler, daha az intimal kalınlaşma (%58.5 azalma), azalmış CD4 T hücre sayıları, daha az proliferasyon aktivitesi ve proinflamatuvar sitokin üretimi göstermiştir (156, 157). CTLA-4 ligandlarının hücresel ekspresyonlarına ilişkin olarak, hipoksi ile tedavi edilen indüklenmiş pluripotent kök hücre türevi kardiyomiyositler (iPSC-CM) çalışması, MI sonrası iskemik kardiyak yaralanmayı taklit etmek için, hem B7.1 hem de B7.2 gen seviyelerinde artış bulmuştur (158). Bu, farelerin MI sonrası sınır bölgelerinde, hem gen hem de protein seviyelerinde B7.1/86 ekspresyonunun önemli ölçüde arttığı şeklinde daha da güçlendirilmiştir. Bu fare modeli, hastalarda görüleni, yani abatacept tedavisinin anti-CTLA-4 kardiyak yaralanmasını iyileştirdiğini ve karşılaştırıldığında daha iyi sağkalım sağladığını yeniden canlandırmıştır.

Ateroskleroz veya koroner arter hastalığı (KAH) vakaları, klinik denemelerde anti-LAG-3 terapisi için bildirilmemiştir. Anti-LAG-3 terapisi FDA tarafından sadece yakın zamanda onaylandığı için, uzun takip süreleriyle yapılan büyük ölçekli çalışmalar hala eksik olduğundan, anti-LAG-3 terapisinin aterosklerotik hastalıkla ilişkilendirilip

ilişkilendirilmediğine dair kesin sonuçlar veya öneriler henüz yapılmamıştır. Ancak, LAG-3'ün bağımsız olarak KAH ile pozitif korelasyon gösterdiği ve aterosklerotik plaklardaki tükenmiş T-hücrelerde bulunduğu tespit edilmiştir (147, 161).

Farelerde, tek LAG-3 knockout'u hastalığın gelişimine yol açmamıştır, ancak Gal-3'ün inhibisyonunun veya eksikliğinin özellikle tümör mikroçevresinde CD8 T hücrelerini aktive ettiği gösterilmiştir, bu da PD-L1 inhibisyonuna benzer şekilde anti-tümör etki önermektedir (113). PD-L1'e benzer şekilde, LAG-3-MHCII bağlanması, hem MAPK/Erk hem de PI3K/Akt/mTOR yollarını yukarı yönlü düzenleyerek Fas aracılı ve ilaç indüklenmiş apoptoza karşı koruma sağlar (162). Bu nedenle, LAG-3 ve PD-L1'in endotel hücrelerinde benzer işlevlere sahip olabileceği ve endotel hücre ölümüne karşı korunarak plak stabilitesini artırabileceği düşünülmektedir.

İmmün kontrol noktası inhibitörleri kaynaklı aterosklerozun ek bir mekanizması, öz antijenler aracılığıyla olabilir. KAH hastalarında birkaç potansiyel öz-antijen tanımlanmıştır, bunlar arasında Keratin 8 de bulunmaktadır (163). Keratin sekiz, KAH'li insanların periferik kan mononükleer hücrelerinde (PBMC'ler) PD-1 seviyelerini artırmazken, kontrol grubundan elde edilen PBMC'lerde PD-1 mRNA seviyelerini artırmıştır. Bu, PD-1'in T-hücre yanıtını kısıtlamak için öz antijenler tarafından indüklenebileceğini ve bu mekanizmanın KAH hastalarında farklı olduğunu gösterir (151, 163). Ayrıca, yüksek PD-L1 ekspresyonuna sahip mide adenokarsinom hücreleri, intraselüler yağ asidi bağlayıcı protein (Fabp4/5) seviyelerini artırarak lipid alımını artırır. PD-L1 blokajı Fabp4/5 ekspresyonunu azaltarak, dolayısıyla lipid alımını da azaltmıştır (164). Speküle edilecek olursa, PD-L1 eksprese eden hücrelerde benzer bir süreç, anti-PD-L1 terapisi sırasında hücresel lipid alımını azaltabilir ve bu da plak bölgesinde serbest yağ asidi seviyelerinin yükselmesine, muhtemelen aterosklerozun kötüleşmesine neden olabilir. Bir diğer ilginç öz antijen, LDL kolesterolünün çekirdek proteini olan apolipoprotein B (apoB)'dir. Preprint'te bulunan bir retrospektif analiz, apoB'de yüksek lipoproteinlerin, özellikle ≥25 kg/m^2 VKİ'ye sahip hastalarda kemoterapi ile kombine tedavi alanlarda kötü immün kontrol noktası inhibitör yanıtı için risk faktörleri olduğunu göstermiştir (165). ApoB ve İKN arasındaki etkileşim henüz aydınlatılmasa da, apoB özgül CD4 T hücrelerinin aterosklerozda otoimmüniteyi sürükleyebileceği öne sürülmüştür (166).

TIM-3, ilk olarak Th1 hücreleri için özgül bir işaretleyici olarak keşfedilmiştir (193) ancak NK hücreleri, monositler, makrofajlar ve mast hücreleri gibi çeşitli bağışıklık hücrelerinde de eksprese edilir (194). TIM-3, ligandı galectin-9'a bağlandıktan sonra T-hücrelerinin hücre ölümünü indükleyerek IFN-γ kaynaklı inflamasyonu sonlandırır (195). Ayrıca, TIM-3 Treg aktivitesini indükleyebilir (196). Hou ve ark. ateroskleroz hastalarında NK hücrelerinde artmış TIM-3 ekspresyonu olduğunu ve bunun ateroskleroz sırasında NK hücre fonksiyonunu etkileyebileceğini göstermiştir (197). Dahası, aterosklerozdan muzdarip hastalar, sağlıklı kontrollere kıyasla dolaşımda artmış düzenleyici $PD\text{-}1^{+}TIM\text{-}3^{+}CD8^{+}$ T hücrelerine sahiptir (198). Bu düzenleyici $CD8^{+}$ T hücreleri, PD-1 ve TIM-3'ü (birlikte) eksprese etmeyen CD8 T-hücrelerine kıyasla yüksek oranda çoğalan ve artmış IL-10 üreten, azalmış IFN-γ ve TNF-α üreten hücrelerdir. Hiperkolesterolemik $LDLr^{-/-}$ farelerde yapılan bir çalışma, TIM-3 blokajının erken ve ileri aterosklerozu artırdığını ve dolaşımdaki monositleri ve plak makrofajlarını artırarak, IL-10 üreten Treg'leri ve Breg'leri azaltarak immün yanıtları güçlendirdiğini göstermiştir (199). Araştırmada TIM-3 seviyelerinin incelenmesi sonucunda, kontrol grubuna göre akut koroner sendrom (AKS) grubunda anlamlı derecede yüksek seviyelerde TIM-3 gözlenmiştir. En yüksek TIM-3 düzeyleri ise Miyokard Enfarktüsü olan grupta tespit edilmiştir. TIM-3'ün artmış ekspresyonu, T hücrelerinin ölümünü indükleyerek IFN-γ kaynaklı inflamasyonu sonlandırma kapasitesiyle bağlantılıdır ve bu da aterosklerotik hastalık süreçlerinde rol oynayabilir. MI'de, aterosklerotik plakların rüptürü sonucu oluşan yoğun inflamasyon, TIM-3 ekspresyonunun artışına neden olabilecek bir tepki olarak görülebilir. Bu artış, özellikle TIM-3'ün NK hücrelerinde ve düzenleyici T-hücrelerde artmış ekspresyonu ile bağlantılı olabilir ve bu da aterosklerozun ilerlemesi ve MI gibi akut olayların patogenezinde önemli bir faktör olabilir.

TNF(R) ailesinin T-hücre aktivasyonunda yer alan başka bir ko-stimülatör çifti, CD30 ve TNFSF8 (CD153 veya CD30 ligandı) tarafından oluşturulur. CD30, naif $CD4^{+}$ ve $CD8^{+}$ T hücreleri, erken timositler, B hücreleri ve NK hücrelerinde sürekli olarak eksprese edilen bir transmembran homodimerdir (200, 201). TNFSF8 ise aktive DH'ler, makrofajlar, B hücreleri ve aktive T-hücrelerinde eksprese edilen bir tip II transmembran glikoproteindir (202-204). CD30 ile TNFSF8 etkileşimi NF-κB ve JNK yollarını aktive eder (205) ve efektör ve bellek T hücrelerinin çoğalmasını ve hayatta kalmasını artırır (206). Ayrıca, CD30 ve TNFSF8, Treg gelişimi için esastır (207). İnsanlarda,

$CD4^+CD25^+$ T hücreleri CD30 eksprese eder ve bu hücreler yüksek düzeyde baskılayıcı bir Treg alt kümesini temsil eder (208, 209). Sardella ve ark., miyokard enfarktüsü olan hastalarda sağlıklı bireylere kıyasla azalmış $CD30^+$Treg'lerin olduğunu bildirmiştir (210). Hem CD30 hem de TNFSF8, insan aterosklerotik lezyonlarındaki T hücreleri ve makrofajlarda eksprese edilir ve TNFSF8 ekspresyonunun stabil lezyonlara kıyasla rüptüre uğramış karotid aterosklerotik lezyonlarında daha yüksek olduğu gösterilmiştir (211). ApoE*3-Leiden farelerinde B hücrelerinde TNFSF8'in transgenik aşırı ekspresyonu kullanılarak, van Olffen ve ark., T-hücrelerinde sürekli CD30 sinyallemesini tetiklemiş, bu da IFN-γ üreten efektör T-hücreleri ve inflamatuvar Ly6Chi monositlerin sayısında artışa yol açmıştır (212). Şaşırtıcı bir şekilde, bu fareler ateroskleroza karşı korunmuş, bu durum kronik CD30–TNFSF8 stimülasyonunu takiben B hücre kaybı sonucunda Ly6Chi monositlerin apoptoza gitme eğilimlerinin artması ve aşırı düşük oxLDL özgül antikorlar nedeniyle artan duyarlılığa atfedilmiştir. Son zamanlarda, TNFSF8'nin aterosklerozdaki kesin katkısı üzerine daha fazla bilgi edinilmiştir. Aterosklerozun iki modeli olan, 18 haftalık yemle beslenen $ApoE^{-/-}TNFSF8^{-/-}$ fareler ve yüksek yağlı diyetle beslenen TNFSF8 eksikliği olan kemik iliği kimerası, kontrollerine kıyasla daha ileri aterosklerotik lezyonlar göstermiştir (211). Çalışmada TNFSF8 (CD30 ligandı) seviyelerinin kontrol grubunda en yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu bulgu, TNFSF8 seviyelerinin miyokard enfarktüsü olan gruplarda, özellikle ST Segment Yükselmesi olan Miyokard İnfarktüsü (STEMI) grubunda anlamlı oranda düşük olduğunu göstermektedir. Bu durum, literatüre paralel bir şekilde TNFSF8'in potansiyel olarak koruyucu bir faktör olarak işlev gördüğünü düşündürebilir. TNFSF8 eksikliğinin, bozulmuş makrofaj canlılığı ve işlevi ile pro-aterojenik bir etkiye neden olduğu ve bu durumun, makrofajların metabolik olarak inaktif olması, apoptoza daha duyarlı hale gelmesi ve kolesterol metabolizmasında alım ve atılım süreçlerinde etkisiz olması şeklinde ortaya çıktığını düşündürmektedir. Bu da aterosklerozun ilerlemesine katkıda bulunabilir. CD30-TNFSF8 yolunun aterosklerozda ko-inhibitör bir rol oynadığı düşünülmekte ve bu yolak üzerinde etki eden agonistik antikorların modülasyonu, kardiyovasküler hastalıkların önlenmesinde terapötik bir potansiyel taşıyabilir. Bu bulgular, ateroskleroz ve MI patofizyolojisinde TNFSF8 ve onun etkileşimli yollarının önemli rolleri olabileceğini ve potansiyel tedavi hedefleri oluşturabileceğini göstermektedir.

Aterosklerozda patojenik $CD4^+$ T-hücrelerinin çoğunluğu, proinflamatuvar sitokinler olan IFN-γ ve TNF-α üreten ve T hücrelerinde T-box ekspresse edilen özgül transkripsiyon faktörü Tbet eksprese eden Th1 hücreleridir (213). Yüksek seviyelerde IFN-γ, makrofajların, DH'lerin ve T hücrelerinin plağa çekilmesini teşvik eder, makrofajlar tarafından lipid alımını artırır ve antijen sunan hücreleri aktive eder (214, 215). Buna karşılık, Tbet eksikliği gösteren $LDLr^{-/-}$ fareleri (216) veya IFN-γ'da eksiklik gösteren $ApoE^{-/-}$ fareler azaltılmış ateroskleroz sergiler (217). Th2 hücreleri IL-4, IL-5 ve IL-13 üretir ve trans-aktör T hücre özgül transkripsiyon faktörü-3 (GATA-3) ekspresyonu ile tanınır. Th2 hücrelerinin aterosklerozdaki rolü, fare modeline, hastalığın evresine ve ilgi duyulan Th2-imza sitokinine bağlı olarak tartışmalıdır. IL-5 ve IL-13'ün aterosklerozda koruyucu olduğu gösterilmiştir (218); buna karşılık IL-4'ün hem anti-aterojenik hem de pro-aterojenik olduğu gösterilmiştir (219-221). İnsanlarda, yüksek sayıda Th2 hücreleri, kardiyovasküler hastalıklarda koruyucu bir rolü olduğunu gösteren ortalama karotis intima-media kalınlığı ile ilişkilendirilmiştir (222). Çalışmamızda TNF-α ve IFN-γ kontrol grubunda en yüksek düzeyde bulunmuştur. Ancak ilginç bir şekilde bu iki sitokin de akut koroner sendrom grubunda en yüksek düzeyleri STEMI grubunda görülmüştür. Sağlıklı kontrol grubunda yüksek seviyelerde TNF-α ve IFN-γ'nin bulunması, bu sitokinlerin sistemik düzeylerini yansıtıyor olabilir. Bununla birlikte, aterosklerotik lezyonların ve özellikle akut koroner sendrom veya miyokard enfarktüsü gibi kardiyovasküler olayların bağlamında, bu sitokinlerin lokal artışı, lezyon bölgesindeki inflamatuvar hücre infiltrasyonunu, endotel işlev bozukluğunu ve plak oluşumunu teşvik ederek aterosklerozun ilerlemesine ve kardiyovasküler komplikasyonların artmasına neden olabilir. Dolayısıyla, kontrol grubunda yüksek seviyelerin olması, inflamatuvar yanıtın patojenik rolünü değil, normal immün fonksiyonun bir parçasını yansıtıyor olabilir. Akut koroner sendrom grubunda ve özellikle STEMI grubunda bu sitokinlerin daha da artmış olması ise, akut inflamatuvar yanıtın, aterosklerotik plakların akut fazda istikrarsızlaşmasına ve rüptüre yol açan olaylarda önemli bir artış gösterdiğini düşündürebilir. Bu bulgular, hem sağlıklı bireylerde hem de kardiyovasküler hastalığı olan bireylerde TNF-α ve IFN-γ'nin düzeylerinin nasıl değişebileceğine dair daha kapsamlı çalışmaların yapılmasının gerekliliğini vurgulamaktadır.

B7 süperailesine ait ilk tanımlanan ve en iyi karakterize edilen ko-stimülatör moleküller, antijen sunan hücreler üzerinde eksprese edilen CD80 (B7.1) ve CD86 (B7.2)

ile bunların reseptörü olan ve T hücreleri, B hücreleri, timosit ve makrofajlar üzerinde eksprese edilen CD28'dir (223). CD28-B7.1/B7.2 sinyallemesi, T-hücrelerinin aktivasyonu, çoğalması, sitokin salgısı ve hayatta kalması için esastır ve CD28 ko-stimülasyonunun olmaması durumunda T-hücreleri anerjik hale gelir (224). OX40, CTLA-4 (ICOS) ve CD27 gibi birçok ko-stimülatör molekül, naif T hücreleri üzerinde düşük seviyede eksprese edilir, ancak T hücre reseptörü ve CD28 sinyallemesi sonrasında artış gösterir. Hem B7.1 hem de B7.2 ve CD28, insan aterosklerotik lezyonlarında makrofajlar üzerinde eksprese edilir (225). Dopheide ve ark., koroner arter hastalığı olan hastalardan elde edilen monosit türevli DH'lerin, sağlıklı kontrollerden elde edilen DH'lere kıyasla B7.1 ve B7.2 ekspresyonunun arttığını göstermiştir (226). Deneysel aterosklerozda, B7.1/B7.2 eksikliği olan $LDLr^{-/-}$ farelerin, $LDLr^{-/-}$ farelere kıyasla hem başlangıç hem de ilerlemiş ateroskleroz modellerinde daha küçük aterosklerotik lezyonlar geliştirdiği gösterilmiştir (216). $LDLr^{-/-}B7.1^{-/-}B7.2^{-/-}$ fareler, lezyonlarında düşük düzeyde düz kas hücresi ve kolajen seviyesi göstermiş ve HSP60 ile restimülasyon yapıldığında $LDLr^{-/-}$ farelere kıyasla daha az miktarda IFN-γ üreten $CD4^{+}$ T hücreleri sergilemiştir. Bu çalışmalar, aterosklerozda CD28-B7.1/86 yolunun proinflamatuvar bir rolü olduğunu düşündürse de, kemik iliği kimerası olan $LDLr^{-/-}B7.1^{-/-}B7.2^{-/-}$ ve $LDLr^{-/-}CD28^{-/-}$ fareler, Treg'lerdeki bir azalma nedeniyle lezyon büyüklüğünde iki kat artış göstermiştir (146). Çalışmamızda B7.2 (CD86) düzeyleri incelendiğinde en düşük seviye kontrol grubunda gözlenmiştir. Akut koroner sendrom grubunda ise kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olarak bulunmuştur. B7.2 (CD86) düzeylerinin kontrol grubunda en düşük seviyede bulunması, sağlıklı bireylerin immün sisteminin dinlenik veya bazal durumunu yansıtıyor olabilir. Diğer yandan, akut koroner sendrom grubunda B7.2 düzeylerinin kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olması, akut koroner sendrom sırasında immün sisteminin aktivasyon durumuna işaret edebilir. CD86, antijen sunan hücrelerdeki ko-stimülatör moleküllerden biri olarak, T hücre aktivasyonunun ve sitokin salgısının artmasında rol oynar. Aterosklerozda, aktive olmuş immün hücrelerin plak bölgesine çekilmesi ve bunun sonucunda inflamatuvar süreçlerin tetiklenmesi, hastalığın ilerlemesinde ve plakların istikrarsızlaşmasında önemli bir faktördür. Akut koroner sendrom durumunda, özellikle miyokard enfarktüsü yaşayan hastaların aterosklerotik plakları daha fazla inflamatuvar hücre içerebilir ve bu hücrelerin aktivasyonu daha yoğun olabilir. Bu bağlamda, çalışmanızda gözlemlenen yüksek CD86 düzeyleri, aktive immün hücrelerin ve

inflamatuvar yanıtın aterosklerozun akut fazında, özellikle Akut koroner sendrom ve MI durumlarında artışını gösteriyor olabilir. Böyle bir artış, inflamatuvar süreçlerin ve immün hücrelerin aktive olmasının aterosklerotik lezyonların büyümesi ve plak istikrarsızlaşmasına katkıda bulunduğunu ve MI riskini artırdığını düşündürebilir.

CD28'e benzer şekilde, B7 ailesinin bir üyesi olan sitotoksik T lenfosit ilişkili antijen 4 (CTLA-4, CD152), ko-stimülatör moleküller CD80 ve CD86'ya bağlanır. CD80/CD86 ile CD28 arasındaki etkileşim T hücre yanıtlarını teşvik ederken, CTLA-4'ün CD80/CD86'ya bağlanması T hücre aktivasyonunu ve çoğalmasını inhibe eder (227, 228). CTLA-4, immünoglobülin süperailesinin tip 1 transmembran glikoproteinidir (229) ve esas olarak Treg'lerde ve aktive edilmiş $CD4^+$ ve $CD8^+$ T-hücrelerinde eksprese edilir (230, 231); ancak monositler (232) ve aktive B hücreleri (233) gibi diğer çeşitli hücrelerde de bulunabilir. Kardiyovasküler hastalardaki CTLA-4 hakkında sınırlı bilgi vardır. Bir çalışma, non-ST yükselmesi olmayan akut koroner sendromlu hastalarda ve stabil hale gelmiş hastalarda (Akut koroner sendrom sonrası 6-12 ay) sağlıklı bireylere kıyasla dolaşımdaki Treg sayısında ve işlevinde azalma olduğunu tarif etmektedir (234). İlginç bir şekilde, bu Treg popülasyonu içinde $CTLA\text{-}4^+$ hücreler artmıştır, bu da periferdeki Treg sayısında ve işlevindeki azalmayı telafi etmek için olabilir. Farelerde, CTLA-4 mRNA seviyelerindeki artışın, Treg'lerin artışı ve birkaç çalışmada aterosklerozun azalmasıyla ilişkilendirildiği gösterilmiştir (235, 236). Yakın zamanda, 16 haftalık CTLA-4 transgenik $ApoE^{-/-}$ farelerin, $ApoE^{-/-}$ farelere kıyasla belirgin şekilde azalmış ateroskleroz gösterdiği ortaya konulmuştur (157). CTLA-4'ün aşırı ekspresyonu, proliferatif kapasitelerinin bozulması ve IFN-γ gibi sitokin salınımında azalma ile lenfoid organlardaki lezyonel $CD4^+$ T-hücreleri ve efektör T-hücrelerinin sayısını azaltmıştır. Ayrıca, örneğin CD80 ve CD86 ekspresyonu gibi DH'lerin olgunlaşması, CTLA-4 aşırı eksprese eden farelerde azalmış ve bu da farelerde T hücre aktivasyonunun azalmasına katkıda bulunmuştur. Bu bulgularla uyumlu olarak, CTLA-4 mimetiği olan CTLA-4 IgG (abatacept) ile yapılan tedavi, $ApoE^{-/-}$ farelerde homosistein-hızlandırılmış aterosklerozu iyileştirmiş (237) ve post-intervansiyonel yeniden şekillendirme için fare modelinde hiperkolesterolemik ApoE3 Leiden farelerde intimal kalınlaşmayı %59 oranında önlemiştir (156). Dahası, abatacept ile tedavi, hızlandırılmış ateroskleroz gelişiminde %78 oranında azalmaya yol açarken, bir CTLA-4 bloke edici antikorla yapılan tedavi, lezyon boyutunu %67 oranında güçlü bir şekilde arttırmıştır (156). Abatacept'in ateroprotektif etkisi, Th1 ve Treg'lerin aktivasyonundaki azalmaya, buna bağlı olarak

serum IFN-γ seviyelerindeki azalmaya ve IL-10 seviyelerindeki artışa atfedilmiştir. Çalışmamızda da literatür ile uyumlu olarak CTLA-4 seviyelerinın kontrol grubunda yüksek, ancak Akut korone sendromda CTLA-4 seviyesinin azaldığı bulunmuştur. Bu bulgular, CTLA-4'ün ateroskleroz patogenezindeki koruyucu rolünü desteklemektedir. Literatürde CTLA-4'ün aterosklerozu azalttığı ve T hücre aktivasyonunu baskıladığı gösterilmiştir. CTLA-4 eksikliğinin veya fonksiyonunun bozulmasının, aterosklerozun ilerlemesine ve kardiyovasküler hastalıkların şiddetlenmesine katkıda bulunabileceği düşünülmektedir. Dolayısıyla, çalışmamızda gösterilen CTLA-4 seviyelerindeki azalma, Akur koroner sendrom hastalarında artan inflamatuvar ve immünolojik aktivasyonun bir sonucu olarak yorumlanabilir ve bu durum, ateroskleroz patogenezinde CTLA-4'ün potansiyel terapötik hedef olarak önemini artırır.

B7-CD28 ailesinin başka bir ko-inhibitör moleküler çifti, Programlanmış Hücre Ölümü 1 (PD-1, CD279) (238) tarafından oluşturulur. Bu çift, Programlanmış Ölüm Ligandı 1 (PD-L1, B7-H1, CD274) (239, 240) ve 2 (PD-L2, B7-DC, CD273) (241, 242) ile bağlantı kurar. PD-1 esas olarak aktive edilmiş T hücrelerinde eksprese edilir; fakat aynı zamanda B hücrelerinde ve aktive monositlerde de bulunur (243, 244). PD-L1, T-hücrelerinde, antijen sunan hücrelerde ve kemik iliği kökenli mast hücrelerinde sürekli olarak eksprese edilir ve ayrıca vasküler endotel hücreleri, epitelyal hücreler ve kas hücreleri gibi hematopoetik olmayan hücre türlerinde de bulunabilir (245). Buna karşılık, PD-L2 ekspresyonu yalnızca DH'lerde ve aktive makrofajlarda oldukça kısıtlıdır (241, 246). PD-1 ve PD-L1/2 arasındaki etkileşim, T hücre çoğalmasını ve sitokin salgısını inhibe eder. Koroner arter hastalığından muzdarip hastalarda PD-1 ve PD-L1'in T hücrelerinde ve miyeloid DH'lerde anlamlı derecede azalmış ekspresyonu gösterilmiş ve bu durum, $CD4^+$ ve $CD8^+$ T hücre çoğalmasını ve proinflamatuvar sitokin üretimini artırmıştır (247). Daha önce, hiperkolesterolemik $LDLr^{-/-}$ farelerindeki aortik T hücrelerinde PD-1'in arttığı gösterilmiştir (139), buna karşılık PD-L1 ve PD-L2, aortik lezyonlarda makrofajlar ve DH'lerde saptanmıştır (248). PD-L1 ve PD-L2'nin kombine eksikliği $LDLr^{-/-}$ farelerinde aterosklerozu kötüleştirmiş ve lezyonel $CD4^+$ ve $CD8^+$ T hücre sayısını artırmıştır (138). Ayrıca, PD-1 eksikliği olan veya bloke edici anti-PD-1 ile tedavi edilen $LDLr^{-/-}$ fareler de artmış ateroskleroz gelişimi göstermiştir (139, 249). PD-L1 ve PD-L2 eksikliğine benzer şekilde, $LDLr^{-/-}PD1^{-/-}$ farelerinin lezyonları yüksek sayıda T hücre ve makrofaj içermiş ve serumdaki TNF-α seviyeleri artmıştır. Çalışmamızda PD-L1 düzeyleri daha belirgin olmak üzere PD-L2 düzeyi kontrol

grubunda yüksek olmak üzere Akut koroner sendromunda daha düşük düzeyde izlenmiştir. Bu bulgular, PD-1/PD-L1/PD-L2 ve CTLA-4 yollarının ateroskleroz ve Akut koroner sendrom patofizyolojisindeki rolünü ve bu yolların potansiyel terapötik müdahalelerdeki önemini vurgulamaktadır. PD-1/PD-L1/PD-L2 yolu, normalde T hücre aktivasyonunu ve inflamatuvar yanıtı baskılamak için görev yapar. PD-L1 ve PD-L2'nin yüksek ekspresyonu, immün sistemdeki hücreler arası etkileşimleri düzenleyerek inflamasyonu kontrol altında tutabilir. Kontrol grubunda bu ligandların yüksek seviyelerde olması, immün toleransın korunması ve otoreaktiviteye karşı koruma altında olabileceğini gösterir. Ancak, Akur koroner sendrom gibi ağır kardiyovasküler olaylar sırasında bu ko-inhibitör yolların baskılanması, T hücrelerinin aşırı aktivasyonuna ve artmış inflamasyon yanıtlarına yol açabilir. Bu durum, aterosklerotik lezyonların büyümesini hızlandırabilir ve plak istikrarsızlaşmasına katkıda bulunarak klinik durumu kötüleştirebilir.

CD137 (4-1BB, TNFRSF9) ve CD137L (4-1BBL, TNFSF9), TNF(R) süperailesinin üyeleridir. TNFRSF9, istirahatteki monositler, DH'ler, nötrofiller ve Treg'lerde sürekli olarak eksprese edilir ama aynı zamanda aktive $CD4^+$ ve $CD8^+$ T hücrelerinde, NK hücrelerinde, NKT hücrelerinde ve mast hücrelerinde de bulunabilir (250, 251). Aktivasyon üzerine, TNFRSF9 ekspresyonu yavaşça artar, yaklaşık 60 saat sonra zirve yapar ve stabil bir şekilde eksprese edilmeye devam eder (252). TNFRSF9, monosit, makrofaj, dendritik hücre ile aktive B ve T hücrelerinde eksprese edilen ligandı CD137L ile bağlanır (252, 253). TNFRSF9 ile CD137L arasındaki etkileşim, TNF reseptörü ilişkili faktör-2 üzerinden aşağı akış sinyallemesi ve NF-κB'nin aktivasyonu yoluyla ko-stimülatör yanıtları başlatır, bu da T hücre çoğalmasını ve IL-2 üretimini artırır (254). İlginç bir şekilde, TNFRSF9-CD137L sinyallemesi CD8+ T hücre çoğalmasını $CD4^+$ T-hücre çoğalmasına göre daha şiddetli etkiler (255). Ayrıca, TNFRSF9-CD137 sinyallemesi, humoral yanıtları da etkiler; çünkü CD137L'nin bağlanması B hücre çoğalmasını ve immünoglobülin sentezini tetikler (256). Kardiyovasküler hastalıkların patogenezi içinde TNFRSF9-CD137L yolunun olası rolü ilk olarak Drenkard ve ark. tarafından gösterilmiştir. Araştırmacılar, TNFRSF9'nin inflamasyon bölgelerinde arter duvarındaki insan endotel hücrelerinde eksprese edildiğini ve monositlerin intima içine göçünü artırdığını saptamıştır (257). Bu bulgu, Olofsson ve ark. tarafından teyit edilmiş ve sağlıklı arterlere kıyasla insan aterosklerotik arterlerinde 17 kat daha yüksek TNFRSF9 mRNA seviyeleri saptanarak TNFRSF9'nin esas olarak

endotel hücreleri ve $CD8^+$ T hücreleri ile birlikte lokalize olduğu gösterilmiştir (258). Çalışmamızda TNFRSF9 düzeylerinin kontrol grubu ve Akut koroner sendrom grubu arasında benzer düzeyde olduğu gözlenmiştir. Sadece STEMİ grubunda diğer gruplara göre daha düşük düzeylerde bulunmuştur. STEMI hastalarında gözlenen bu düşük TNFRSF9 seviyeleri, akut miyokard enfarktüsü sırasında immün yanıtların baskılanmasını ve potansiyel olarak kalp dokusunun daha fazla zarar görmesini önlemek için vücudun adaptif bir tepkisi olabilir. Diğer bir ihtimal ise, STEMI'nin kendisinin T hücre aktivasyonunu ve ko-stimülasyon yollarını baskılaması ve bu durumun TNFRSF9 seviyelerinde azalmaya yol açması olabilir. Ayrıca, düşük TNFRSF9 ekspresyonu, akut miyokard enfarktüsünün şiddeti ve inflamatuvar yükü ile ilişkili olabilir ve bu da T hücre yanıtlarının regülasyonunda bir değişikliğe işaret edebilir. Sonuç olarak, STEMI'deki düşük TNFRSF9 seviyeleri, bu durumun patofizyolojisi ve akut miyokard enfarktüsü sırasında immün sistemin rolü hakkında daha fazla araştırma yapılması gerektiğini öne çıkarır. Bu bulgular, TNFRSF9'un kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde potansiyel bir hedef olabileceğini gösteren daha geniş bir literatürün parçası olabilir.

TIGIT, Ig süperailesinin bir reseptörü olan ve bir inhibitör immün kontrol noktası molekülüdür. IgV ekstrasellüler bölgesi, tip 1 transmembran bölgesi ve ITIM ile immünoglobülin kuyruk tirozin (ITT) motifi içeren bir sitoplazmik kuyruktan oluşmaktadır. Esas olarak aktive edilmiş T hücreleri, bellek T hücreleri, NK hücreleri ve Treg hücreler üzerinde eksprese edilir (105). T hücreleri ve doğal öldürücü hücreler de dâhil olmak üzere immün hücreler üzerindeki TIGIT ekspresyonunun rolü birçok hastalıkta araştırılmıştır; lenfositler üzerindeki TIGIT ekspresyonunun otoimmün hastalıklarda ve kanserde değiştiği bildirilmiştir. Sistemik lupus eritematozus (SLE) ve romatoid artrit (RA) durumlarında, NK hücreleri üzerindeki TIGIT ekspresyonu azalmış ve $CD4^+$ T hücreleri üzerinde ise artmıştır (107, 259-261). NK hücreleri üzerindeki TIGIT ekspresyonu, mide ve kolon kanserlerinde de artmıştır (107). Ayrıca, sedef hastalığı (262) ve aplastik anemi (263) durumlarında $CD4^+$ T hücreleri üzerinde azalmış TIGIT ekspresyonu belgelenmiştir. TIGIT, araştırmacılar tarafından yoğun bir şekilde araştırmalara konu edilmiştir (264). $TIGIT^+$ Treg'ler, $TIGIT^-$ Treglere kıyasla daha yüksek inhibe edici kapasiteleri nedeniyle hem insanlarda hem de farelerde işlevsel olarak farklı bir Treg alt grubunu temsil eder. İlginç bir şekilde, TIGIT'in, Th1 ve Th17 hücre yanıtlarını inhibe edebilen çözünür fibrinojen benzeri protein 2 (sFGL2) salgılamak yoluyla inhibe edici bir etki gösterdiği saptanmıştır (105). Literatürdeki bir derlemede,

TIGIT AKS hastalarında anlamlı derecede düşük düzeyde olduğu gösterildi (265). Ayrıca, TIGIT'in Akut koroner sendrom için ROC eğrisi analiziyle önemli bir ayırt edici güce sahip olduğunu gösterilmiştir. Çalışmamızda da TIGIT düzeylerinin Akut koroner sendrom grubunda anlamlı olarak kontrol grubuna göre daha düşük olduğu görüldü. TIGIT, Akut koroner sendrom grubundaki USAP, NSTEMİ ve STEMİ subgrupları arasında STEMİ grubunda en düşük düzeyde gözlenmiştir. Yapılan ROC eğrisinde ise bir belirteç olarak kullanılabilmesi anlamında zayıf olarak gözlenmiştir. Toplamda, bu sonuçlar $TIGIT^{+}$ Treg'lerin Akut koroner sendromda hassas bir Treg alt grubu olabileceğini ve azalmasının aterosklerotik plak istikrarsızlığında rol oynayabileceğini göstermektedir.

Bağışıklık kontrol noktası genleri (İKNGs), CTLA-4 ve PD-1/PD-L1 gibi, immün ko-stimülatör ve inhibitör yollarında yer alan, İKNP inhibitör terapisi için potansiyel hedefler olarak kabul edilmelidir. Son zamanlarda, LAG3, TIM3 ve TIGIT üzerindeki araştırmalar devam etmekte olup, bu İKNGs'leri bloke eden ilaçlar klinik veya preklinik gelişim aşamalarındadır. Ayrıca, TNFRSF4, TNFRSF9 ve TNFRSF18 gibi stimülatör kontrol noktası yollarının agonistleri, indüklenebilir ICOS, CD40 veya tümör mikroçevresi (TME) bileşenlerini hedef alan moleküller, örneğin IDO1, üzerinde araştırmalar yapılmaktadır. Böylece, İKNGs'lerin ifade profilini kapsamlı bir şekilde keşfetmek, aday immün kontrol noktası hedeflerini tanımlamaya yardımcı olabilir. Hu ve ark. yapmış olduğu çalışmada, Kanser Genom Atlası (TCGA) ve Memelilerin Fonksiyonel Anotasyonu (FANTOM5) verilerinde İKNP'lerin ifade profilini kapsamlı bir şekilde incelenmiş ve bunların immün infiltrasyon ve hasta sağkalımı ile ilişkisini araştırmışlardır. İKNGs'lerin ifade profili, hastaların İKNP inhibitör tedavisine yanıtını tahmin etmek için hassas ve sağlam bir model geliştirmek için kullanmışlardır (266). Bulgular immün hücrelerin infiltrasyon seviyesi ile ilişkili olan İKNGs'lerin ifade profilinin, TIMER imzaları ile örtüşmediğini göstermektedir. Bu durum, İKNGs'lerin, toplu sekanslama verilerinde immün hücrelerin bolluğunun tahmin edilmesi için değerli işaretçiler olduğunu ortaya koymaktadır (267). Ayrıca, İKNGs'lerin ifade düzeyleri, tümör bağışıklığının durumunu yansıtabilir (268) ve kanserlerde prognostik bir öngörücü olarak işlev görebilir. Farklı kanserlerin farklı immün infiltrasyon durumları vardır ve TME'nin bileşimi, tümörün dokular içindeki işgali tarafından belirlenir, bu da farklı kanserlere sahip hastaların İKNP inhibitör terapilerine çeşitli yanıtlar verdiğini öne sürmektedir. Akciğer tümörlerinin, aynı tümör hücre hattının meme içinde büyümesine

kıyasla immünoterapiye daha dirençli olduğu bildirilmiştir (269). Bu, immün hücrelerin nidusa daha az infiltrasyon gösterdiği, immün-dışlanmış bir kanser olan LUSC'nin bulgularımızı desteklediğini göstermektedir. Farklı dokuların farklı miktarda immün hücre barındırdığını göz önünde bulundurarak, immün hücrelerin ve IKNGs'lerin aktivasyonunun karakterize edilmesi için kullanılan eşik, tümörler arasında farklı olabilir (270). Bucitelli ve Selbach'ın yaptığı çalışmada, mRNA düzeylerinin protein düzeylerini tahmin etmede ne kadar faydalı olduğu, gen ifadesi kontrolünün prensiplerinin bu karşılaştırmadan türetilebileceği ve mRNA düzeyi ve/veya protein düzeyi ölçümlerinin fenotipleri anlamak ve tahmin etmek için ne kadar değerli olduğu soruları, yoğun ve devam eden bir tartışmanın konusudur (271). Bu tartışma aynı zamanda önyargılarla da yanlış yönlendirilmektedir: proteomiks araştırmacıları, proteinlerin fenotiplere daha yakın olduğunu ve bu nedenle fonksiyonel olarak daha alakalı olduğunu savunurken, genomiks araştırmacıları mRNA düzeyi verilerinin elde edilmesinin (ve analiz edilmesinin) daha kolay olduğunu ve anlamlı sonuçlar elde etmeyi kanıtladığını belirtmektedir. Gen ifadesi, mRNA'ların ve proteinlerin transkripsiyonunu, çevirisini ve dönüşümünü içeren çok aşamalı bir süreçtir. Hayatın en temel süreçlerinden biri olmasına rağmen, bu tüm kaskad hiçbir zaman genom çapında nicel olarak ölçülmemiştir. Burada, memeli hücrelerinde 5.000'den fazla gen için mutlak mRNA ve protein bolluğunu ve dönüşümünü, paralel metabolik nabız etiketlemesi ile eş zamanlı olarak Schwanhausser ve ark. tarafından ölçülmüştür (272). mRNA ve protein düzeyleri daha önce düşünülenden daha iyi korele olmasına rağmen, karşılık gelen yarı ömürler arasında hiçbir korelasyon göstermemiştir. Kullanılan nicel bir model ile ilk defa mRNA ve proteinlerin sentez hızlarına dair genom çapında bir tahmin elde etmişlerdir. Benzer mRNA ve protein kararlılık kombinasyonlarına sahip genler, enerji ve dinamik kısıtlamalar altında yarı ömürlerin evrimleştiğini gösteren fonksiyonel özellikleri paylaştı. Gen ekspresyonunun tüm aşamaları hakkında nicel bilgi, zengin bir kaynak sağlar ve altında yatan tasarım prensiplerinin daha büyük bir anlayışını sağlamaya yardımcı olmaktadır. Gen ifadesi yolu hiyerarşiktir: protein sentezi, bir mRNA molekülünün varlığını gerektirir, bu da bir DNA şablonu gerektirir. Diğer bir deyişle, yolun bir seviyesinin ne kadar düzenlenebileceği, önceki seviyelerin aktivitesine bağlıdır. Dolayısıyla, transkripsiyonel olarak sessiz bir gen (hiç mRNA mevcut değilse), mRNA'sını veya proteinini daha kararlı hale getirerek veya çevirisini artırarak yükseltilemez. Bu hiyerarşi, metazoan gelişiminde transkripsiyonel kontrolün önemini

açıklar: hücresel farklılaşma, genellikle aktive edilmesi gereken genler tarafından kodlanan doku özgülü proteinlerin üretimini içerir. Transkripsiyon faktörlerinin belirli cis-düzenleyici elementlere bağlanması, hayvan gelişimini kontrol eden gen düzenleyici ağlarda kilit bir rol oynar (273). Erken gelişim dönemi hariç bu farklılaşmanın sıklıkla koordine edilmiş mRNA düzeyi ve protein düzeyi değişiklikleriyle karakterize edilmesini açıklamaya yardımcı olur (274, 275). Benzer şekilde, yeni koşullarda gereken sessiz genlerin transkripsiyonunu aktive eden pertürbasyonlar, büyük ölçüde transkripsiyonel mekanizmalar aracılığıyla ilgili protein düzeylerinde değişikliklere neden olur. Örneğin, lipopolisakkarid (LPS) tedavisi gibi güçlü bir proinflamatuar uyarı, dendritik hücrelerdeki immün-yanıt proteinlerinin çoğunlukla transkripsiyon yoluyla yükseltilmesine neden olur (276). Gen ifadesinin düzenlenmesi ve mRNA ile protein düzeyleri arasındaki ilişkinin anlaşılması, özellikle AKS gibi kompleks hastalıkların moleküler temellerini çözümlemek için kritik öneme sahiptir. AKS'de gözlemlenen immün düzenleme ve inflamasyon süreçlerinde, immün kontrol noktası proteinleri ile TH1/TH2 hücre sitokinleri arasındaki etkileşimler özellikle dikkat çekicidir. İmmün kontrol noktası proteinlerinin, immün cevabın düzenlenmesinde ve TH1/TH2 dengesinin belirlenmesinde önemli roller oynadığı bilinmektedir. Dolayısıyla, bu proteinlerin mRNA ve protein düzeylerindeki değişimlerin, AKS gelişimi ve ilerlemesi üzerindeki etkilerini anlamak, hastalığın moleküler mekanizmalarını çözümlemede ve potansiyel tedavi hedefleri belirlemede bize yol gösterici olabilir.

Çalışmamızda gözlemlediğimiz serum protein seviyelerindeki artış ile lökositlerdeki gen ifadesindeki azalış arasında doğrudan bir korelasyon eksikliği, gen düzenleme mekanizmalarının karmaşıklığını, hastalığın çok boyutlu doğasını yansıtmaktadır ve yukarıdaki paragrafta bahsedildiği gibi mRNA düzeylerinin protein düzeylerini tahmin etmede ne kadar faydalı olduğu, gen ifadesi kontrolünün prensiplerinin bu karşılaştırmadan türetilebileceği ve mRNA düzeyi ve/veya protein düzeyi ölçümlerinin fenotipleri anlamak ve tahmin etmek için ne kadar değerli olduğu soruları, yoğun ve devam eden bir tartışmanın konusudur Bu, bir yandan, protein seviyelerinin yükselmesinin, post-translasyonel modifikasyonlar, proteinin yıkım hızı, sekresyon mekanizmaları ve hücresel trafik gibi ek düzenleyici süreçler tarafından etkilenebileceğine işaret ederken, diğer yandan, gen ifadesindeki azalışın, transkripsiyon faktörlerinin aktivitesi, mRNA stabilitesi ve çevirisi gibi öncü düzenleyici mekanizmaların sonucu olabileceğini göstermektedir. Bu iki düzey arasındaki ilişkinin

belirsizliği, yukarıdaki yayınlarda da belirtildiği gibi, gen ifadesi ve protein bolluğunun bağımsız olarak düzenlenebileceğini ve AKS gibi hastalıkların moleküler patogenezinin daha derinlemesine incelenmesi gerektiğini vurgulamaktadır. Bu durum, immün yanıtın ve inflamasyonun çeşitli yönlerinin aynı anda aktif olduğu ve bu süreçlerin birbiriyle karmaşık etkileşim içinde olduğu AKS gibi durumlar için özellikle geçerlidir. Dolayısıyla, protein ve gen ifadesi düzeyleri arasında doğrudan bir korelasyon beklenmemelidir; zira her bir moleküler sinyal yolu, gen regülasyonunun farklı aşamalarında ve çeşitli hücresel bağlamlarda özgün düzenlemelere tabidir. Bu nedenle, gen ifadesi ve protein bolluğu arasındaki bu ilişkisizliğin, hastalığın moleküler mekanizmalarını anlamak ve potansiyel tedavi hedefleri belirlemek için kapsamlı bir biyolojik bağlamda değerlendirilmesi gerekmektedir. Sonuç olarak incelenen altı genin 3'ünün araştırma grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. CTLA-4, PD-L2 ve TNFSF8 genlerinin ise nispeten yüksek duyarlık ve özgüllükle AKS tanısı için biyobelirteç olarak değerlendirilebileceğini bulduk. Ayrıca bu genlerin çeşitli sitokin ve İKNP düzeyleri ile korelasyonlarının olmasının AKS grupları arasında patofizyolojik süreçlerde rol oynadığının bir göstergesi olabilir. Bunun için daha kapsamlı moleküler çalışmalara ve daha fazla hasta grubunda incelenmesi gerekmektedir.

Çalışmamız, özellikle AKS patogenezinde İKNP ile sitokinlerin ilişkisini araştırırken önemli bulgular elde etmiştir; ancak, bazı kısıtlamaları da beraberinde getirmektedir. İlk olarak, çalışmaya dahil edilen hasta sayısının sınırlı olması, elde edilen sonuçların genel popülasyona uyarlamada dikkatli olmayı gerektirir. Bu, özellikle nadir görülen alt tipler veya çeşitli demografik özelliklere sahip hastalar açısından daha geniş bir hasta yelpazesini kapsayan çalışmalar için bir ön koşuldur. İkincisi, İKNP'lerin yanı sıra incelenen sitokinlerin gen ifade profillerinin detaylı analizi, moleküler düzeydeki etkileşimleri daha iyi anlamamızı sağlayabilir ve AKS'nin moleküler mekanizmalarını daha derinlemesine çözümlememize olanak tanıyabilir. Sitokinlerin ve İKNP'lerin ifade düzeylerindeki değişimlerin korelasyonunu ve bu değişimlerin klinik sonuçlarla olan ilişkisini belirlemek, hastalığın tedavisine yönelik olarak hedeflenebilecek yeni yolların keşfedilmesine ışık tutabilir. Son olarak, gen ifadesinin yanı sıra post-transkripsiyonel ve post-translasyonel düzenlemelerin de incelenmesi, protein seviyelerinin düzenlenmesinde ve hastalık fenotiplerindeki değişikliklerde oynadıkları rolleri daha kapsamlı bir şekilde anlamamızı sağlayacaktır. Bu, hem gen ifadesinin hem de protein seviyelerinin hastalık durumlarındaki değişikliklere katkıda bulunan karmaşık regülasyon

mekanizmalarını yansıtacaktır. Bu çalışmanın en önemli kısıtlılıkları, obezite ve tip 2 diyabetin kronik inflamasyonla ilişkilisi nedeni ile hasta ve kontrol gruplarında bu klinik durumlara sahip bireylerin varlığı, AKS hasta grupları arasında ek olarak stabil koroner arter hastalığı (stabil anjina pektoris-SAP) olan bireylerin dahil olduğu ayrı bir grubun olmaması, katılımcıların serum örneklerinde IKNP'lerinin sadece çözünür formlarının tespit edilmiş olmaları ve atereosklerotik plak ile normal koroner arterlerde lokal inlamasyon ve gen ifade düzeylerinine bakılamamış olmasıdır. Bu kısıtlılıklar, gelecekteki çalışmaların tasarımında göz önünde bulundurulmalı ve bu alanlardaki bilgi boşluklarını doldurmak için yönlendirici olmalıdır. Bu bağlamda, çalışmamızın sonuçları, bu yönlerde yapılacak daha geniş ve kapsamlı çalışmalar için bir temel oluşturmakta ve AKS'nin moleküler patogenezindeki karmaşıklığı anlama çabasına katkıda bulunmaktadır. Mümkün olabildiği takdirde ileride, tanı esnasında yapılmış olan bu çalışmanın takip çalışmalarında aynı parametreler ile değerlendirilerek hastalık patogenezindeki rollerinin ve takipteki biyobelirteç özelliklerinin değerlendirilmesi planlanmaktadır. Bu çalışmada, mevcut literatürün ışığında, AKS patogenezinde önemli rol oynayan altı İKNP geni ilk kez bir arada incelenmiş ve bu genlerin ifade düzeyleri ile AKS'nin klinik seyri arasındaki ilişki değerlendirilmiştir. Ayrıca, bu gen ifade düzeylerinin potansiyel tanısal kesme noktaları (cut off değerleri) belirlenerek, bu değerlerin klinik anlamda kullanılabilirliği de ilk kez tartışılmıştır.

Sonuç olarak bu çalışma, immün kontrol noktası proteinlerinin kardiyovasküler hastalıklar üzerindeki etkilerine odaklanarak, kanser terapisindeki gelişmelerin dışında bu moleküllerin başka kritik rollerini de ortaya koymaya çalışmaktadır. Gelişen bulgular, immün kontrol noktası proteinlerinin ateroskleroz ve akut koroner sendromlar gibi kardiyovasküler patolojiler üzerinde önemli etkileri olabileceğini göstermekte ve bu moleküllerin kardiyovasküler sistemdeki regülasyonunun daha iyi anlaşılmasının gerekli olduğunu vurgulamaktadır. Kardiyovasküler sistemde, PD-1, CTLA-4 ve LAG-3 gibi kontrol noktası proteinlerinin immün hücre aktivitesi ve aterosklerotik lezyonların gelişimi üzerindeki düzenleyici rolleri, bu proteinlerin potansiyel tedavi hedefleri olarak önemini artırmaktadır. Çalışmamız, immün kontrol noktası proteinleri kardiyovasküler sistem üzerindeki etkilerini anlamada önemli bir adım atmıştır. Çalışmamızda elde edilen bulgular, immün kontrol noktası proteinleri, ateroskleroz ve Akut koroner sendrom gibi kardiyovasküler hastalıkların patofizyolojisinde kritik roller oynadığını ve bu yolların spesifik immün hücre popülasyonlarını hedef alarak aterosklerozun ilerlemesini

sınırlayabileceğini ya da aterosklerozu arttırdığı ve Akut koroner sendrom ile ilişkilendirilebileceğini ve hatta ileride belirteç olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir.

KAYNAKLAR

1. Altan O GC. Erişkinlerimizde kalp hastalıkları prevalansı, yeni koroner olaylar ve kalpten ölüm sıklığı. In: Altan O GC, Hüsniye Y, et.al., editors. , editor: TEKHARF 2017. İstanbul: Logos Yayıncılık Tic. A.Ş.; 2017. ; 2017.
2. Moriya J. Critical roles of inflammation in atherosclerosis. J Cardiol. 2019;73(1):22-7.
3. Foks AC, Kuiper J. Immune checkpoint proteins: exploring their therapeutic potential to regulate atherosclerosis. Br J Pharmacol. 2017;174(22):3940-55.
4. Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. Nature. 2011;473(7347):317-25.
5. Ridker PM, Everett BM, Thuren T, MacFadyen JG, Chang WH, Ballantyne C, et al. Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease. N Engl J Med. 2017;377(12):1119-31.
6. Tardif JC, Kouz S, Waters DD, Bertrand OF, Diaz R, Maggioni AP, et al. Efficacy and Safety of Low-Dose Colchicine after Myocardial Infarction. N Engl J Med. 2019;381(26):2497-505.
7. Thompson RH, Gillett MD, Cheville JC, Lohse CM, Dong H, Webster WS, et al. Costimulatory B7-H1 in renal cell carcinoma patients: Indicator of tumor aggressiveness and potential therapeutic target. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004;101(49):17174-9.
8. Kruger S, Legenstein ML, Rösgen V, Haas M, Modest DP, Westphalen CB, et al. Serum levels of soluble programmed death protein 1 (sPD-1) and soluble programmed death ligand 1 (sPD-L1) in advanced pancreatic cancer. Oncoimmunology. 2017;6(5):e1310358.
9. Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, et al. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. J Exp Med. 2000;192(7):1027-34.
10. Shi B, Du X, Wang Q, Chen Y, Zhang X. Increased PD-1 on CD4(+)CD28(-) T cell and soluble PD-1 ligand-1 in patients with T2DM: association with atherosclerotic macrovascular diseases. Metabolism. 2013;62(6):778-85.

11. Yang Y, Liu Y, Chen X, Gong J, Huang Z, Wang W, et al. 5-Aminolevulinic Acid-Mediated Sonodynamic Therapy Alleviates Atherosclerosis via Enhancing Efferocytosis and Facilitating a Shift in the Th1/Th2 Balance Toward Th2 Polarization. Cell Physiol Biochem. 2018;47(1):83-96.
12. Nguyen TV, Piao CH, Fan YJ, Yu ZN, Lee SY, Song CH, et al. Artemisia gmelinii Extract Alleviates Allergic Airway Inflammation via Balancing TH1/TH2 Homeostasis and Inhibiting Mast Cell Degranulation. Int J Mol Sci. 2022;23(23).
13. Cassar A, Holmes DR, Jr., Rihal CS, Gersh BJ. Chronic coronary artery disease: diagnosis and management. Mayo Clin Proc. 2009;84(12):1130-46.
14. Ford TJ, Corcoran D, Berry C. Stable coronary syndromes: pathophysiology, diagnostic advances and therapeutic need. Heart. 2017.
15. Taqueti VR, Di Carli MF. Coronary Microvascular Disease Pathogenic Mechanisms and Therapeutic Options: JACC State-of-the-Art Review. J Am Coll Cardiol. 2018;72(21):2625-41.
16. Ford TJ, Corcoran D, Berry C. Stable coronary syndromes: pathophysiology, diagnostic advances and therapeutic need. Heart. 2018;104(4):284-92.
17. Chapman AR, Adamson PD, Mills NL. Assessment and classification of patients with myocardial injury and infarction in clinical practice. Heart. 2017;103(1):10-8.
18. Thygesen K. 'Ten Commandments' for the Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction 2018. Eur Heart J. 2019;40(3):226.
19. Crossman DC. The pathophysiology of myocardial ischaemia. Heart. 2004;90(5):576-80.
20. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, Chaitman BR, Bax JJ, Morrow DA, et al. Fourth universal definition of myocardial infarction (2018). Eur Heart J. 2019;40(3):237-69.
21. Saleh M, Ambrose JA. Understanding myocardial infarction. F1000Res. 2018;7.
22. DeFilippis AP, Chapman AR, Mills NL, de Lemos JA, Arbab-Zadeh A, Newby LK, et al. Assessment and Treatment of Patients With Type 2 Myocardial Infarction and Acute Nonischemic Myocardial Injury. Circulation. 2019;140(20):1661-78.
23. Anderson JL, Morrow DA. Acute Myocardial Infarction. N Engl J Med. 2017;376(21):2053-64.
24. Zipes DP. Braunwald's heart disease: a textbook of cardiovascular medicine. BMH Medical Journal-ISSN 2348–392X. 2018;5(2):63-.

25. Bergmark BA, Mathenge N, Merlini PA, Lawrence-Wright MB, Giugliano RP. Acute coronary syndromes. Lancet. 2022;399(10332):1347-58.
26. Libby P, Pasterkamp G, Crea F, Jang IK. Reassessing the Mechanisms of Acute Coronary Syndromes. Circ Res. 2019;124(1):150-60.
27. Aslanger EK, Meyers HP, Smith SW. Time for a new paradigm shift in myocardial infarction. Anatol J Cardiol. 2021;25(3):156-62.
28. Aslanger EK, Meyers PH, Smith SW. STEMI: A transitional fossil in MI classification? J Electrocardiol. 2021;65:163-9.
29. Menozzi A. An overview on STEMI. Minerva Cardioangiol. 2018;66(4):391.
30. Ibanez B, James S, Agewall S, Antunes MJ, Bucciarelli-Ducci C, Bueno H, et al. 2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation: The Task Force for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC). European heart journal. 2018;39(2):119-77.
31. Contessotto P, Spelat R, Ferro F, Vysockas V, Krivickienė A, Jin C, et al. Reproducing extracellular matrix adverse remodelling of non-ST myocardial infarction in a large animal model. Nat Commun. 2023;14(1):995.
32. Cohen M, Visveswaran G. Defining and managing patients with non-ST-elevation myocardial infarction: Sorting through type 1 vs other types. Clin Cardiol. 2020;43(3):242-50.
33. Elbadawi A, Elgendy IY, Mahmoud K, Barakat AF, Mentias A, Mohamed AH, et al. Temporal Trends and Outcomes of Mechanical Complications in Patients With Acute Myocardial Infarction. JACC Cardiovasc Interv. 2019;12(18):1825-36.
34. Collet JP, Bangalore S. Timing of Invasive Coronary Angiography in NSTEMI. JACC Cardiovasc Interv. 2023;16(1):76-8.
35. Bae S, Cha JJ, Lim S, Kim JH, Joo HJ, Park JH, et al. Early Invasive Strategy Based on the Time of Symptom Onset of Non-ST-Segment Elevation Myocardial Infarction. JACC Cardiovasc Interv. 2023;16(1):64-75.
36. Case BC, Weintraub WS. Non-ST-Segment-Elevation Myocardial Infarction: When Is Rapid Revascularization Critical? J Am Heart Assoc. 2021;10(19):e023645.
37. Collet JP, Thiele H, Barbato E, Barthélémy O, Bauersachs J, Bhatt DL, et al. 2020 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients

presenting without persistent ST-segment elevation. Eur Heart J. 2021;42(14):1289-367.

38. Mann DL, Zipes DP, Libby P, Bonow R. Braunwalds Heart Disease. A Textbook of Car. 2008.
39. Bonow RO, Mann DL, Zipes DP, Libby P. Braunwald's heart disease e-book: A textbook of cardiovascular medicine: Elsevier Health Sciences; 2011.
40. Pendell Meyers H, Bracey A, Lee D, Lichtenheld A, Li WJ, Singer DD, et al. Accuracy of OMI ECG findings versus STEMI criteria for diagnosis of acute coronary occlusion myocardial infarction. Int J Cardiol Heart Vasc. 2021;33:100767.
41. Aslanger EK. Beyond the ST-segment in Occlusion Myocardial Infarction (OMI): Diagnosing the OMI-nous. Turk J Emerg Med. 2023;23(1):1-4.
42. Barstow C, Rice M, McDivitt JD. Acute Coronary Syndrome: Diagnostic Evaluation. Am Fam Physician. 2017;95(3):170-7.
43. Damluji AA, Forman DE, Wang TY, Chikwe J, Kunadian V, Rich MW, et al. Management of Acute Coronary Syndrome in the Older Adult Population: A Scientific Statement From the American Heart Association. Circulation. 2023;147(3):e32-e62.
44. Aslanger EK, Meyers HP, Bracey A, Smith SW. The STEMI/NonSTEMI Dichotomy needs to be replaced by Occlusion MI vs. Non-Occlusion MI. Int J Cardiol. 2021;330:15.
45. Meyers HP, Bracey A, Lee D, Lichtenheld A, Li WJ, Singer DD, et al. Comparison of the ST-Elevation Myocardial Infarction (STEMI) vs. NSTEMI and Occlusion MI (OMI) vs. NOMI Paradigms of Acute MI. J Emerg Med. 2021;60(3):273-84.
46. Khan AR, Golwala H, Tripathi A, Bin Abdulhak AA, Bavishi C, Riaz H, et al. Impact of total occlusion of culprit artery in acute non-ST elevation myocardial infarction: a systematic review and meta-analysis. Eur Heart J. 2017;38(41):3082-9.
47. Konijnenberg LSF, Damman P, Duncker DJ, Kloner RA, Nijveldt R, van Geuns RM, et al. Pathophysiology and diagnosis of coronary microvascular dysfunction in ST-elevation myocardial infarction. Cardiovasc Res. 2020;116(4):787-805.
48. Stengaard C, Sørensen JT, Rasmussen MB, Bøtker MT, Pedersen CK, Terkelsen CJ. Prehospital diagnosis of patients with acute myocardial infarction. Diagnosis (Berl). 2016;3(4):155-66.

49. Miranda DF, Lobo AS, Walsh B, Sandoval Y, Smith SW. New Insights Into the Use of the 12-Lead Electrocardiogram for Diagnosing Acute Myocardial Infarction in the Emergency Department. Can J Cardiol. 2018;34(2):132-45.
50. Smith SW, Dodd KW, Henry TD, Dvorak DM, Pearce LA. Diagnosis of ST-elevation myocardial infarction in the presence of left bundle branch block with the ST-elevation to S-wave ratio in a modified Sgarbossa rule. Ann Emerg Med. 2012;60(6):766-76.
51. Meyers HP, Limkakeng AT, Jr., Jaffa EJ, Patel A, Theiling BJ, Rezaie SR, et al. Validation of the modified Sgarbossa criteria for acute coronary occlusion in the setting of left bundle branch block: A retrospective case-control study. Am Heart J. 2015;170(6):1255-64.
52. Lee DH, Walsh B, Smith SW. Terminal QRS distortion is present in anterior myocardial infarction but absent in early repolarization. Am J Emerg Med. 2016;34(11):2182-5.
53. Aslanger EK, Meyers HP, Smith SW. Recognizing electrocardiographically subtle occlusion myocardial infarction and differentiating it from mimics: Ten steps to or away from cath lab. Turk Kardiyol Dern Ars. 2021;49(6):488-500.
54. McLaren JTT, Meyers HP, Smith SW, Chartier LB. From STEMI to occlusion MI: paradigm shift and ED quality improvement. Cjem. 2022;24(3):250-5.
55. Aslanger EK, Yıldırımtürk Ö, Şimşek B, Bozbeyoğlu E, Şimşek MA, Yücel Karabay C, et al. DIagnostic accuracy oF electrocardiogram for acute coronary OCClUsion resuLTing in myocardial infarction (DIFOCCULT Study). Int J Cardiol Heart Vasc. 2020;30:100603.
56. Femia G, French JK, Juergens C, Leung D, Lo S. Right ventricular myocardial infarction: pathophysiology, clinical implications and management. Rev Cardiovasc Med. 2021;22(4):1229-40.
57. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2012;32(9):2045-51.
58. Ross R. George Lyman Duff Memorial Lecture. Atherosclerosis: a problem of the biology of arterial wall cells and their interactions with blood components. Arteriosclerosis. 1981;1(5):293-311.
59. Medina-Leyte DJ, Zepeda-García O, Domínguez-Pérez M, González-Garrido A, Villarreal-Molina T, Jacobo-Albavera L. Endothelial Dysfunction, Inflammation and

Coronary Artery Disease: Potential Biomarkers and Promising Therapeutical Approaches. Int J Mol Sci. 2021;22(8).

60. Herrmann J. Cardio-Oncology Practice Manual: A Companion to Braunwald's Heart Disease: Elsevier Health Sciences; 2022.
61. Corrado E, Rizzo M, Coppola G, Fattouch K, Novo G, Marturana I, et al. An update on the role of markers of inflammation in atherosclerosis. J Atheroscler Thromb. 2010;17(1):1-11.
62. Ridker PM, Pradhan A, MacFadyen JG, Libby P, Glynn RJ. Cardiovascular benefits and diabetes risks of statin therapy in primary prevention: an analysis from the JUPITER trial. Lancet. 2012;380(9841):565-71.
63. Mora S, Caulfield MP, Wohlgemuth J, Chen Z, Superko HR, Rowland CM, et al. Atherogenic Lipoprotein Subfractions Determined by Ion Mobility and First Cardiovascular Events After Random Allocation to High-Intensity Statin or Placebo: The Justification for the Use of Statins in Prevention: An Intervention Trial Evaluating Rosuvastatin (JUPITER) Trial. Circulation. 2015;132(23):2220-9.
64. Ridker PM. The JUPITER trial: results, controversies, and implications for prevention. Circ Cardiovasc Qual Outcomes. 2009;2(3):279-85.
65. Aday AW, Ridker PM. Antiinflammatory Therapy in Clinical Care: The CANTOS Trial and Beyond. Front Cardiovasc Med. 2018;5:62.
66. Wolf D, Ley K. Immunity and Inflammation in Atherosclerosis. Circ Res. 2019;124(2):315-27.
67. Libby P, Hansson GK. From Focal Lipid Storage to Systemic Inflammation: JACC Review Topic of the Week. J Am Coll Cardiol. 2019;74(12):1594-607.
68. Kobiyama K, Ley K. Atherosclerosis. Circ Res. 2018;123(10):1118-20.
69. Libby P, Buring JE, Badimon L, Hansson GK, Deanfield J, Bittencourt MS, et al. Atherosclerosis. Nat Rev Dis Primers. 2019;5(1):56.
70. Gusev E, Sarapultsev A. Atherosclerosis and Inflammation: Insights from the Theory of General Pathological Processes. Int J Mol Sci. 2023;24(9).
71. Ketelhuth DF, Hansson GK. Adaptive Response of T and B Cells in Atherosclerosis. Circ Res. 2016;118(4):668-78.
72. Ley K. Role of the adaptive immune system in atherosclerosis. Biochem Soc Trans. 2020;48(5):2273-81.

73. Crea F, Libby P. Acute Coronary Syndromes: The Way Forward From Mechanisms to Precision Treatment. Circulation. 2017;136(12):1155-66.
74. Libby P. Mechanisms of acute coronary syndromes and their implications for therapy. N Engl J Med. 2013;368(21):2004-13.
75. Lüscher TF. Substrates of acute coronary syndromes: new insights into plaque rupture and erosion. Eur Heart J. 2015;36(22):1347-9.
76. Partida RA, Libby P, Crea F, Jang IK. Plaque erosion: a new in vivo diagnosis and a potential major shift in the management of patients with acute coronary syndromes. Eur Heart J. 2018;39(22):2070-6.
77. Quillard T, Franck G, Mawson T, Folco E, Libby P. Mechanisms of erosion of atherosclerotic plaques. Curr Opin Lipidol. 2017;28(5):434-41.
78. Martinod K, Wagner DD. Thrombosis: tangled up in NETs. Blood. 2014;123(18):2768-76.
79. Döring Y, Libby P, Soehnlein O. Neutrophil Extracellular Traps Participate in Cardiovascular Diseases: Recent Experimental and Clinical Insights. Circ Res. 2020;126(9):1228-41.
80. Khan M, Arooj S, Wang H. NK Cell-Based Immune Checkpoint Inhibition. Front Immunol. 2020;11:167.
81. Sadeghi Rad H, Monkman J, Warkiani ME, Ladwa R, O'Byrne K, Rezaei N, et al. Understanding the tumor microenvironment for effective immunotherapy. Med Res Rev. 2021;41(3):1474-98.
82. Nguyen LT, Ohashi PS. Clinical blockade of PD1 and LAG3--potential mechanisms of action. Nat Rev Immunol. 2015;15(1):45-56.
83. Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. Annu Rev Immunol. 2008;26:677-704.
84. Okazaki T, Honjo T. The PD-1-PD-L pathway in immunological tolerance. Trends Immunol. 2006;27(4):195-201.
85. Horne-Debets JM, Faleiro R, Karunarathne DS, Liu XQ, Lineburg KE, Poh CM, et al. PD-1 dependent exhaustion of CD8+ T cells drives chronic malaria. Cell Rep. 2013;5(5):1204-13.
86. Day CL, Kaufmann DE, Kiepiela P, Brown JA, Moodley ES, Reddy S, et al. PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. Nature. 2006;443(7109):350-4.

87. Festino L, Botti G, Lorigan P, Masucci GV, Hipp JD, Horak CE, et al. Cancer Treatment with Anti-PD-1/PD-L1 Agents: Is PD-L1 Expression a Biomarker for Patient Selection? Drugs. 2016;76(9):925-45.
88. Sznol M, Chen L. Antagonist antibodies to PD-1 and B7-H1 (PD-L1) in the treatment of advanced human cancer. Clin Cancer Res. 2013;19(5):1021-34.
89. Ngiow SF, Young A, Jacquelot N, Yamazaki T, Enot D, Zitvogel L, et al. A Threshold Level of Intratumor CD8+ T-cell PD1 Expression Dictates Therapeutic Response to Anti-PD1. Cancer Res. 2015;75(18):3800-11.
90. Hui E, Cheung J, Zhu J, Su X, Taylor MJ, Wallweber HA, et al. T cell costimulatory receptor CD28 is a primary target for PD-1-mediated inhibition. Science. 2017;355(6332):1428-33.
91. Walker LS, Sansom DM. The emerging role of CTLA4 as a cell-extrinsic regulator of T cell responses. Nat Rev Immunol. 2011;11(12):852-63.
92. Yokosuka T, Kobayashi W, Takamatsu M, Sakata-Sogawa K, Zeng H, Hashimoto-Tane A, et al. Spatiotemporal basis of CTLA-4 costimulatory molecule-mediated negative regulation of T cell activation. Immunity. 2010;33(3):326-39.
93. Su KY, Watanabe A, Yeh CH, Kelsoe G, Kuraoka M. Efficient Culture of Human Naive and Memory B Cells for Use as APCs. J Immunol. 2016;197(10):4163-76.
94. Sharma P, Allison JP. The future of immune checkpoint therapy. Science. 2015;348(6230):56-61.
95. Dixon KO, Tabaka M, Schramm MA, Xiao S, Tang R, Dionne D, et al. TIM-3 restrains anti-tumour immunity by regulating inflammasome activation. Nature. 2021;595(7865):101-6.
96. Gautron AS, Dominguez-Villar M, de Marcken M, Hafler DA. Enhanced suppressor function of TIM-3+ FoxP3+ regulatory T cells. Eur J Immunol. 2014;44(9):2703-11.
97. da Silva IP, Gallois A, Jimenez-Baranda S, Khan S, Anderson AC, Kuchroo VK, et al. Reversal of NK-cell exhaustion in advanced melanoma by Tim-3 blockade. Cancer Immunol Res. 2014;2(5):410-22.
98. Sakuishi K, Apetoh L, Sullivan JM, Blazar BR, Kuchroo VK, Anderson AC. Targeting Tim-3 and PD-1 pathways to reverse T cell exhaustion and restore anti-tumor immunity. Journal of Experimental Medicine. 2010;207(10):2187-94.

99. Kraus AK, Chen J, Edenhofer I, Ravens I, Gaspert A, Cippà PE, et al. The Role of T Cell Costimulation via DNAM-1 in Kidney Transplantation. PLoS One. 2016;11(2):e0147951.
100. Yu X, Harden K, Gonzalez LC, Francesco M, Chiang E, Irving B, et al. The surface protein TIGIT suppresses T cell activation by promoting the generation of mature immunoregulatory dendritic cells. Nat Immunol. 2009;10(1):48-57.
101. Boles KS, Vermi W, Facchetti F, Fuchs A, Wilson TJ, Diacovo TG, et al. A novel molecular interaction for the adhesion of follicular CD4 T cells to follicular DC. Eur J Immunol. 2009;39(3):695-703.
102. Stanietsky N, Simic H, Arapovic J, Toporik A, Levy O, Novik A, et al. The interaction of TIGIT with PVR and PVRL2 inhibits human NK cell cytotoxicity. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009;106(42):17858-63.
103. Lozano E, Dominguez-Villar M, Kuchroo V, Hafler DA. The TIGIT/CD226 axis regulates human T cell function. J Immunol. 2012;188(8):3869-75.
104. Inozume T, Yaguchi T, Furuta J, Harada K, Kawakami Y, Shimada S. Melanoma Cells Control Antimelanoma CTL Responses via Interaction between TIGIT and CD155 in the Effector Phase. J Invest Dermatol. 2016;136(1):255-63.
105. Joller N, Lozano E, Burkett PR, Patel B, Xiao S, Zhu C, et al. Treg cells expressing the coinhibitory molecule TIGIT selectively inhibit proinflammatory Th1 and Th17 cell responses. Immunity. 2014;40(4):569-81.
106. Coyne CB, Kim KS, Bergelson JM. Poliovirus entry into human brain microvascular cells requires receptor-induced activation of SHP-2. Embo j. 2007;26(17):4016-28.
107. Wang F, Hou H, Wu S, Tang Q, Liu W, Huang M, et al. TIGIT expression levels on human NK cells correlate with functional heterogeneity among healthy individuals. Eur J Immunol. 2015;45(10):2886-97.
108. Triebel F, Jitsukawa S, Baixeras E, Roman-Roman S, Genevee C, Viegas-Pequignot E, et al. LAG-3, a novel lymphocyte activation gene closely related to CD4. J Exp Med. 1990;171(5):1393-405.
109. Workman CJ, Rice DS, Dugger KJ, Kurschner C, Vignali DA. Phenotypic analysis of the murine CD4-related glycoprotein, CD223 (LAG-3). Eur J Immunol. 2002;32(8):2255-63.

110. Baixeras E, Huard B, Miossec C, Jitsukawa S, Martin M, Hercend T, et al. Characterization of the lymphocyte activation gene 3-encoded protein. A new ligand for human leukocyte antigen class II antigens. J Exp Med. 1992;176(2):327-37.
111. Wang J, Sanmamed MF, Datar I, Su TT, Ji L, Sun J, et al. Fibrinogen-like Protein 1 Is a Major Immune Inhibitory Ligand of LAG-3. Cell. 2019;176(1-2):334-47.e12.
112. Xu F, Liu J, Liu D, Liu B, Wang M, Hu Z, et al. LSECtin expressed on melanoma cells promotes tumor progression by inhibiting antitumor T-cell responses. Cancer Res. 2014;74(13):3418-28.
113. Kouo T, Huang L, Pucsek AB, Cao M, Solt S, Armstrong T, et al. Galectin-3 Shapes Antitumor Immune Responses by Suppressing CD8+ T Cells via LAG-3 and Inhibiting Expansion of Plasmacytoid Dendritic Cells. Cancer Immunol Res. 2015;3(4):412-23.
114. Baumeister SH, Freeman GJ, Dranoff G, Sharpe AH. Coinhibitory Pathways in Immunotherapy for Cancer. Annu Rev Immunol. 2016;34:539-73.
115. Woo SR, Turnis ME, Goldberg MV, Bankoti J, Selby M, Nirschl CJ, et al. Immune inhibitory molecules LAG-3 and PD-1 synergistically regulate T-cell function to promote tumoral immune escape. Cancer Res. 2012;72(4):917-27.
116. Goding SR, Wilson KA, Xie Y, Harris KM, Baxi A, Akpinarli A, et al. Restoring immune function of tumor-specific CD4+ T cells during recurrence of melanoma. J Immunol. 2013;190(9):4899-909.
117. Chakrabarti R, Kapse B, Mukherjee G. Soluble immune checkpoint molecules: Serum markers for cancer diagnosis and prognosis. Cancer Rep (Hoboken). 2019;2(4):e1160.
118. Oaks MK, Hallett KM, Penwell RT, Stauber EC, Warren SJ, Tector AJ. A native soluble form of CTLA-4. Cell Immunol. 2000;201(2):144-53.
119. Ward FJ, Dahal LN, Wijesekera SK, Abdul-Jawad SK, Kaewarpai T, Xu H, et al. The soluble isoform of CTLA-4 as a regulator of T-cell responses. Eur J Immunol. 2013;43(5):1274-85.
120. Omura Y, Toiyama Y, Okugawa Y, Yin C, Shigemori T, Kusunoki K, et al. Prognostic impacts of tumoral expression and serum levels of PD-L1 and CTLA-4 in colorectal cancer patients. Cancer Immunol Immunother. 2020;69(12):2533-46.
121. Frigola X, Inman BA, Lohse CM, Krco CJ, Cheville JC, Thompson RH, et al. Identification of a soluble form of B7-H1 that retains immunosuppressive activity

and is associated with aggressive renal cell carcinoma. Clin Cancer Res. 2011;17(7):1915-23.

122. Nielsen C, Ohm-Laursen L, Barington T, Husby S, Lillevang ST. Alternative splice variants of the human PD-1 gene. Cell Immunol. 2005;235(2):109-16.

123. Greisen SR, Rasmussen TK, Stengaard-Pedersen K, Hetland ML, Hørslev-Petersen K, Hvid M, et al. Increased soluble programmed death-1 (sPD-1) is associated with disease activity and radiographic progression in early rheumatoid arthritis. Scand J Rheumatol. 2014;43(2):101-8.

124. Zhou J, Mahoney KM, Giobbie-Hurder A, Zhao F, Lee S, Liao X, et al. Soluble PD-L1 as a Biomarker in Malignant Melanoma Treated with Checkpoint Blockade. Cancer Immunol Res. 2017;5(6):480-92.

125. Świderska J, Kozłowski M, Nowak K, Rychlicka M, Branecka-Woźniak D, Kwiatkowski S, et al. Clinical Relevance of Soluble Forms of Immune Checkpoint Molecules sPD-1, sPD-L1, and sCTLA-4 in the Diagnosis and Prognosis of Ovarian Cancer. Diagnostics (Basel). 2022;12(1).

126. Möller-Hackbarth K, Dewitz C, Schweigert O, Trad A, Garbers C, Rose-John S, et al. A disintegrin and metalloprotease (ADAM) 10 and ADAM17 are major sheddases of T cell immunoglobulin and mucin domain 3 (Tim-3). J Biol Chem. 2013;288(48):34529-44.

127. Avery L, Filderman J, Szymczak-Workman AL, Kane LP. Tim-3 co-stimulation promotes short-lived effector T cells, restricts memory precursors, and is dispensable for T cell exhaustion. Proc Natl Acad Sci U S A. 2018;115(10):2455-60.

128. Geng H, Zhang GM, Li D, Zhang H, Yuan Y, Zhu HG, et al. Soluble form of T cell Ig mucin 3 is an inhibitory molecule in T cell-mediated immune response. J Immunol. 2006;176(3):1411-20.

129. Andrews LP, Marciscano AE, Drake CG, Vignali DA. LAG3 (CD223) as a cancer immunotherapy target. Immunol Rev. 2017;276(1):80-96.

130. Anderson AC, Joller N, Kuchroo VK. Lag-3, Tim-3, and TIGIT: Co-inhibitory Receptors with Specialized Functions in Immune Regulation. Immunity. 2016;44(5):989-1004.

131. Li N, Wang Y, Forbes K, Vignali KM, Heale BS, Saftig P, et al. Metalloproteases regulate T-cell proliferation and effector function via LAG-3. Embo j. 2007;26(2):494-504.

132. Liang B, Workman C, Lee J, Chew C, Dale BM, Colonna L, et al. Regulatory T cells inhibit dendritic cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II. J Immunol. 2008;180(9):5916-26.
133. Shapiro M, Herishanu Y, Katz BZ, Dezorella N, Sun C, Kay S, et al. Lymphocyte activation gene 3: a novel therapeutic target in chronic lymphocytic leukemia. Haematologica. 2017;102(5):874-82.
134. Anvari S, Grimbergen A, Davis CM, Makedonas G. Protein transport inhibitors downregulate the expression of LAG-3 on regulatory T cells. J Immunol Methods. 2017;447:47-51.
135. Pedersen JM, Hansen AS, Skejø C, Juul-Madsen K, Junker P, Hørslev-Petersen K, et al. Lymphocyte activation gene 3 is increased and affects cytokine production in rheumatoid arthritis. Arthritis Res Ther. 2023;25(1):97.
136. Drobni ZD, Alvi RM, Taron J, Zafar A, Murphy SP, Rambarat PK, et al. Association Between Immune Checkpoint Inhibitors With Cardiovascular Events and Atherosclerotic Plaque. Circulation. 2020;142(24):2299-311.
137. Oren O, Yang EH, Molina JR, Bailey KR, Blumenthal RS, Kopecky SL. Cardiovascular Health and Outcomes in Cancer Patients Receiving Immune Checkpoint Inhibitors. Am J Cardiol. 2020;125(12):1920-6.
138. Gotsman I, Grabie N, Dacosta R, Sukhova G, Sharpe A, Lichtman AH. Proatherogenic immune responses are regulated by the PD-1/PD-L pathway in mice. J Clin Invest. 2007;117(10):2974-82.
139. Bu DX, Tarrio M, Maganto-Garcia E, Stavrakis G, Tajima G, Lederer J, et al. Impairment of the programmed cell death-1 pathway increases atherosclerotic lesion development and inflammation. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2011;31(5):1100-7.
140. Frostegård J, Ulfgren AK, Nyberg P, Hedin U, Swedenborg J, Andersson U, et al. Cytokine expression in advanced human atherosclerotic plaques: dominance of pro-inflammatory (Th1) and macrophage-stimulating cytokines. Atherosclerosis. 1999;145(1):33-43.
141. Vuong JT, Stein-Merlob AF, Nayeri A, Sallam T, Neilan TG, Yang EH. Immune Checkpoint Therapies and Atherosclerosis: Mechanisms and Clinical Implications: JACC State-of-the-Art Review. J Am Coll Cardiol. 2022;79(6):577-93.

142. Amento EP, Ehsani N, Palmer H, Libby P. Cytokines and growth factors positively and negatively regulate interstitial collagen gene expression in human vascular smooth muscle cells. Arterioscler Thromb. 1991;11(5):1223-30.
143. Gotsman I, Lichtman AH. Targeting interferon-gamma to treat atherosclerosis. Circ Res. 2007;101(4):333-4.
144. Saigusa R, Winkels H, Ley K. T cell subsets and functions in atherosclerosis. Nat Rev Cardiol. 2020;17(7):387-401.
145. Robertson AK, Rudling M, Zhou X, Gorelik L, Flavell RA, Hansson GK. Disruption of TGF-beta signaling in T cells accelerates atherosclerosis. J Clin Invest. 2003;112(9):1342-50.
146. Ait-Oufella H, Salomon BL, Potteaux S, Robertson AK, Gourdy P, Zoll J, et al. Natural regulatory T cells control the development of atherosclerosis in mice. Nat Med. 2006;12(2):178-80.
147. Wherry EJ, Kurachi M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. Nat Rev Immunol. 2015;15(8):486-99.
148. Fernandez DM, Rahman AH, Fernandez NF, Chudnovskiy A, Amir ED, Amadori L, et al. Single-cell immune landscape of human atherosclerotic plaques. Nat Med. 2019;25(10):1576-88.
149. Mazanet MM, Hughes CC. B7-H1 is expressed by human endothelial cells and suppresses T cell cytokine synthesis. J Immunol. 2002;169(7):3581-8.
150. Chen WJ, Hu XF, Yan M, Zhang WY, Mao XB, Shu YW. Human umbilical vein endothelial cells promote the inhibitory activation of CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) regulatory T cells via PD-L1. Atherosclerosis. 2016;244:108-12.
151. Veluswamy P, Wacker M, Scherner M, Wippermann J. Delicate Role of PD-L1/PD-1 Axis in Blood Vessel Inflammatory Diseases: Current Insight and Future Significance. Int J Mol Sci. 2020;21(21).
152. Rodig N, Ryan T, Allen JA, Pang H, Grabie N, Chernova T, et al. Endothelial expression of PD-L1 and PD-L2 down-regulates CD8+ T cell activation and cytolysis. Eur J Immunol. 2003;33(11):3117-26.
153. Gato-Cañas M, Zuazo M, Arasanz H, Ibañez-Vea M, Lorenzo L, Fernandez-Hinojal G, et al. PDL1 Signals through Conserved Sequence Motifs to Overcome Interferon-Mediated Cytotoxicity. Cell Rep. 2017;20(8):1818-29.

154. Lucas ED, Finlon JM, Burchill MA, McCarthy MK, Morrison TE, Colpitts TM, et al. Type 1 IFN and PD-L1 Coordinate Lymphatic Endothelial Cell Expansion and Contraction during an Inflammatory Immune Response. J Immunol. 2018;201(6):1735-47.
155. Poels K, van Leent MMT, Reiche ME, Kusters PJH, Huveneers S, de Winther MPJ, et al. Antibody-Mediated Inhibition of CTLA4 Aggravates Atherosclerotic Plaque Inflammation and Progression in Hyperlipidemic Mice. Cells. 2020;9(9).
156. Ewing MM, Karper JC, Abdul S, de Jong RC, Peters HA, de Vries MR, et al. T-cell co-stimulation by CD28-CD80/86 and its negative regulator CTLA-4 strongly influence accelerated atherosclerosis development. Int J Cardiol. 2013;168(3):1965-74.
157. Matsumoto T, Sasaki N, Yamashita T, Emoto T, Kasahara K, Mizoguchi T, et al. Overexpression of Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Antigen-4 Prevents Atherosclerosis in Mice. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2016;36(6):1141-51.
158. Screever E, Axelrod M, Blair M, Trykall D, Barnett J, Roden D, et al. Novel mechanism in cardiac injury: immune checkpoints. European Heart Journal. 2020;41(Supplement_2):ehaa946. 3625.
159. Grohmann U, Orabona C, Fallarino F, Vacca C, Calcinaro F, Falorni A, et al. CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. Nat Immunol. 2002;3(11):1097-101.
160. Orabona C, Grohmann U, Belladonna ML, Fallarino F, Vacca C, Bianchi R, et al. CD28 induces immunostimulatory signals in dendritic cells via CD80 and CD86. Nat Immunol. 2004;5(11):1134-42.
161. Golden D, Kolmakova A, Sura S, Vella AT, Manichaikul A, Wang XQ, et al. Lymphocyte activation gene 3 and coronary artery disease. JCI Insight. 2016;1(17):e88628.
162. Hemon P, Jean-Louis F, Ramgolam K, Brignone C, Viguier M, Bachelez H, et al. MHC class II engagement by its ligand LAG-3 (CD223) contributes to melanoma resistance to apoptosis. J Immunol. 2011;186(9):5173-83.
163. Mihailovic PM, Lio WM, Herscovici R, Chyu KY, Yano J, Zhao X, et al. Keratin 8 is a potential self-antigen in the coronary artery disease immunopeptidome: A translational approach. PLoS One. 2019;14(2):e0213025.

164. Lin R, Zhang H, Yuan Y, He Q, Zhou J, Li S, et al. Fatty Acid Oxidation Controls CD8(+) Tissue-Resident Memory T-cell Survival in Gastric Adenocarcinoma. Cancer Immunol Res. 2020;8(4):479-92.
165. Hu Z, Zheng Y, Zheng J, Wang Y, Liao J, Lu X, et al. Serum cholesterol-riched apolipoprotein-B (apoB) containing lipoproteins predict the response to immune checkpoints inhibitors (ICIs) in non-small cell lung cancer (NSCLC): A retrospective analysis. 2022.
166. Marchini T, Hansen S, Wolf D. ApoB-Specific CD4(+) T Cells in Mouse and Human Atherosclerosis. Cells. 2021;10(2).
167. Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Grob JJ, Cowey CL, Lao CD, et al. Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. N Engl J Med. 2015;373(1):23-34.
168. Wallin JJ, Bendell JC, Funke R, Sznol M, Korski K, Jones S, et al. Atezolizumab in combination with bevacizumab enhances antigen-specific T-cell migration in metastatic renal cell carcinoma. Nat Commun. 2016;7:12624.
169. Overman MJ, Lonardi S, Wong KYM, Lenz HJ, Gelsomino F, Aglietta M, et al. Durable Clinical Benefit With Nivolumab Plus Ipilimumab in DNA Mismatch Repair-Deficient/Microsatellite Instability-High Metastatic Colorectal Cancer. J Clin Oncol. 2018;36(8):773-9.
170. Lipson EJ, Tawbi HA-H, Schadendorf D, Ascierto PA, Matamala L, Gutiérrez EC, et al. Relatlimab (RELA) plus nivolumab (NIVO) versus NIVO in first-line advanced melanoma: primary phase III results from RELATIVITY-047 (CA224-047). Wolters Kluwer Health; 2021.
171. Okazaki T, Okazaki IM, Wang J, Sugiura D, Nakaki F, Yoshida T, et al. PD-1 and LAG-3 inhibitory co-receptors act synergistically to prevent autoimmunity in mice. J Exp Med. 2011;208(2):395-407.
172. Blansfield JA, Beck KE, Tran K, Yang JC, Hughes MS, Kammula US, et al. Cytotoxic T-lymphocyte–associated antigen-4 blockage can induce autoimmune hypophysitis in patients with metastatic melanoma and renal cancer. Journal of immunotherapy (Hagerstown, Md: 1997). 2005;28(6):593.
173. Iwama S, De Remigis A, Callahan MK, Slovin SF, Wolchok JD, Caturegli P. Pituitary expression of CTLA-4 mediates hypophysitis secondary to administration of CTLA-4 blocking antibody. Sci Transl Med. 2014;6(230):230ra45.

174. Xavier CB, Lopes CDH, Harada G, Peres EDB, Katz A, Jardim DL. Cardiovascular toxicity following immune checkpoint inhibitors: A systematic review and meta-analysis. Transl Oncol. 2022;19:101383.
175. Salem JE, Manouchehri A, Moey M, Lebrun-Vignes B, Bastarache L, Pariente A, et al. Cardiovascular toxicities associated with immune checkpoint inhibitors: an observational, retrospective, pharmacovigilance study. Lancet Oncol. 2018;19(12):1579-89.
176. Wang DY, Salem JE, Cohen JV, Chandra S, Menzer C, Ye F, et al. Fatal Toxic Effects Associated With Immune Checkpoint Inhibitors: A Systematic Review and Meta-analysis. JAMA Oncol. 2018;4(12):1721-8.
177. Andres MS, Ramalingam S, Lyon A. Cardiovascular complications of immune checkpoint inhibitors, TILs and CAR T-cell therapies. European Society of Cardiology. 2021;19.
178. Cautela J, Zeriouh S, Gaubert M, Bonello L, Laine M, Peyrol M, et al. Intensified immunosuppressive therapy in patients with immune checkpoint inhibitor-induced myocarditis. J Immunother Cancer. 2020;8(2).
179. Tison A, Quéré G, Misery L, Funck-Brentano E, Danlos FX, Routier E, et al. Safety and Efficacy of Immune Checkpoint Inhibitors in Patients With Cancer and Preexisting Autoimmune Disease: A Nationwide, Multicenter Cohort Study. Arthritis Rheumatol. 2019;71(12):2100-11.
180. Naidoo J, Page DB, Li BT, Connell LC, Schindler K, Lacouture ME, et al. Toxicities of the anti-PD-1 and anti-PD-L1 immune checkpoint antibodies. Ann Oncol. 2015;26(12):2375-91.
181. Freeman-Keller M, Kim Y, Cronin H, Richards A, Gibney G, Weber JS. Nivolumab in Resected and Unresectable Metastatic Melanoma: Characteristics of Immune-Related Adverse Events and Association with Outcomes. Clin Cancer Res. 2016;22(4):886-94.
182. Chen L, Flies DB. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. Nat Rev Immunol. 2013;13(4):227-42.
183. Herrero-Sánchez MC, Rodríguez-Serrano C, Almeida J, San Segundo L, Inogés S, Santos-Briz Á, et al. Targeting of PI3K/AKT/mTOR pathway to inhibit T cell activation and prevent graft-versus-host disease development. J Hematol Oncol. 2016;9(1):113.

184. Ghiotto M, Gauthier L, Serriari N, Pastor S, Truneh A, Nunès JA, et al. PD-L1 and PD-L2 differ in their molecular mechanisms of interaction with PD-1. Int Immunol. 2010;22(8):651-60.
185. Parry RV, Chemnitz JM, Frauwirth KA, Lanfranco AR, Braunstein I, Kobayashi SV, et al. CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms. Mol Cell Biol. 2005;25(21):9543-53.
186. Willsmore ZN, Coumbe BGT, Crescioli S, Reci S, Gupta A, Harris RJ, et al. Combined anti-PD-1 and anti-CTLA-4 checkpoint blockade: Treatment of melanoma and immune mechanisms of action. Eur J Immunol. 2021;51(3):544-56.
187. Buchbinder EI, Desai A. CTLA-4 and PD-1 Pathways: Similarities, Differences, and Implications of Their Inhibition. Am J Clin Oncol. 2016;39(1):98-106.
188. Rudd CE, Taylor A, Schneider H. CD28 and CTLA-4 coreceptor expression and signal transduction. Immunol Rev. 2009;229(1):12-26.
189. Ronen D, Bsoul A, Lotem M, Abedat S, Yarkoni M, Amir O, et al. Exploring the Mechanisms Underlying the Cardiotoxic Effects of Immune Checkpoint Inhibitor Therapies. Vaccines (Basel). 2022;10(4).
190. Zhu Y, Yao S, Chen L. Cell surface signaling molecules in the control of immune responses: a tide model. Immunity. 2011;34(4):466-78.
191. Chen H, Liakou CI, Kamat A, Pettaway C, Ward JF, Tang DN, et al. Anti-CTLA-4 therapy results in higher CD4+ICOShi T cell frequency and IFN-gamma levels in both nonmalignant and malignant prostate tissues. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009;106(8):2729-34.
192. Poels K, van Leent MM, Reiche ME, Kusters PJ, Huveneers S, de Winther MP, et al. Antibody-mediated inhibition of CTLA4 aggravates atherosclerotic plaque inflammation and progression in hyperlipidemic mice. Cells. 2020;9(9):1987.
193. Monney L, Sabatos CA, Gaglia JL, Ryu A, Waldner H, Chernova T, et al. Th1-specific cell surface protein Tim-3 regulates macrophage activation and severity of an autoimmune disease. Nature. 2002;415(6871):536-41.
194. Nakae S, Iikura M, Suto H, Akiba H, Umetsu DT, Dekruyff RH, et al. TIM-1 and TIM-3 enhancement of Th2 cytokine production by mast cells. Blood. 2007;110(7):2565-8.

195. Zhu C, Anderson AC, Schubart A, Xiong H, Imitola J, Khoury SJ, et al. The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity. Nat Immunol. 2005;6(12):1245-52.
196. Sehrawat S, Suryawanshi A, Hirashima M, Rouse BT. Role of Tim-3/galectin-9 inhibitory interaction in viral-induced immunopathology: shifting the balance toward regulators. J Immunol. 2009;182(5):3191-201.
197. Hou N, Zhao D, Liu Y, Gao L, Liang X, Liu X, et al. Increased expression of T cell immunoglobulin- and mucin domain-containing molecule-3 on natural killer cells in atherogenesis. Atherosclerosis. 2012;222(1):67-73.
198. Qiu MK, Wang SC, Dai YX, Wang SQ, Ou JM, Quan ZW. PD-1 and Tim-3 Pathways Regulate CD8+ T Cells Function in Atherosclerosis. PLoS One. 2015;10(6):e0128523.
199. Foks AC, Engelbertsen D, Kuperwaser F, Alberts-Grill N, Gonen A, Witztum JL, et al. Blockade of Tim-1 and Tim-4 Enhances Atherosclerosis in Low-Density Lipoprotein Receptor-Deficient Mice. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2016;36(3):456-65.
200. Jacquot S. CD27/CD70 interactions regulate T dependent B cell differentiation. Immunol Res. 2000;21(1):23-30.
201. Nolte MA, van Olffen RW, van Gisbergen KP, van Lier RA. Timing and tuning of CD27-CD70 interactions: the impact of signal strength in setting the balance between adaptive responses and immunopathology. Immunol Rev. 2009;229(1):216-31.
202. de Boer OJ, Hirsch F, van der Wal AC, van der Loos CM, Das PK, Becker AE. Costimulatory molecules in human atherosclerotic plaques: an indication of antigen specific T lymphocyte activation. Atherosclerosis. 1997;133(2):227-34.
203. Tesselaar K, Xiao Y, Arens R, van Schijndel GM, Schuurhuis DH, Mebius RE, et al. Expression of the murine CD27 ligand CD70 in vitro and in vivo. J Immunol. 2003;170(1):33-40.
204. Bowman MR, Crimmins MA, Yetz-Aldape J, Kriz R, Kelleher K, Herrmann S. The cloning of CD70 and its identification as the ligand for CD27. J Immunol. 1994;152(4):1756-61.
205. Ramakrishnan P, Wang W, Wallach D. Receptor-specific signaling for both the alternative and the canonical NF-kappaB activation pathways by NF-kappaB-inducing kinase. Immunity. 2004;21(4):477-89.

206. Hendriks J, Xiao Y, Borst J. CD27 promotes survival of activated T cells and complements CD28 in generation and establishment of the effector T cell pool. J Exp Med. 2003;198(9):1369-80.
207. Coquet JM, Ribot JC, Bąbała N, Middendorp S, van der Horst G, Xiao Y, et al. Epithelial and dendritic cells in the thymic medulla promote CD4+Foxp3+ regulatory T cell development via the CD27-CD70 pathway. J Exp Med. 2013;210(4):715-28.
208. Godfrey WR, Spoden DJ, Ge YG, Baker SR, Liu B, Levine BL, et al. Cord blood CD4(+)CD25(+)-derived T regulatory cell lines express FoxP3 protein and manifest potent suppressor function. Blood. 2005;105(2):750-8.
209. Hoffmann P, Eder R, Kunz-Schughart LA, Andreesen R, Edinger M. Large-scale in vitro expansion of polyclonal human CD4(+)CD25high regulatory T cells. Blood. 2004;104(3):895-903.
210. Sardella G, De Luca L, Francavilla V, Accapezzato D, Mancone M, Sirinian MI, et al. Frequency of naturally-occurring regulatory T cells is reduced in patients with ST-segment elevation myocardial infarction. Thromb Res. 2007;120(4):631-4.
211. Winkels H, Meiler S, Smeets E, Lievens D, Engel D, Spitz C, et al. CD70 limits atherosclerosis and promotes macrophage function. Thromb Haemost. 2017;117(1):164-75.
212. van Olffen RW, de Bruin AM, Vos M, Staniszewska AD, Hamann J, van Lier RA, et al. CD70-driven chronic immune activation is protective against atherosclerosis. J Innate Immun. 2010;2(4):344-52.
213. Witztum JL, Lichtman AH. The influence of innate and adaptive immune responses on atherosclerosis. Annu Rev Pathol. 2014;9:73-102.
214. Whitman SC, Ravisankar P, Elam H, Daugherty A. Exogenous interferon-gamma enhances atherosclerosis in apolipoprotein E-/- mice. Am J Pathol. 2000;157(6):1819-24.
215. Gupta S, Pablo AM, Jiang X, Wang N, Tall AR, Schindler C. IFN-gamma potentiates atherosclerosis in ApoE knock-out mice. J Clin Invest. 1997;99(11):2752-61.
216. Buono C, Pang H, Uchida Y, Libby P, Sharpe AH, Lichtman AH. B7-1/B7-2 costimulation regulates plaque antigen-specific T-cell responses and atherogenesis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. Circulation. 2004;109(16):2009-15.

217. Whitman SC, Ravisankar P, Daugherty A. IFN-gamma deficiency exerts gender-specific effects on atherogenesis in apolipoprotein E-/- mice. J Interferon Cytokine Res. 2002;22(6):661-70.
218. Cardilo-Reis L, Gruber S, Schreier SM, Drechsler M, Papac-Milicevic N, Weber C, et al. Interleukin-13 protects from atherosclerosis and modulates plaque composition by skewing the macrophage phenotype. EMBO Mol Med. 2012;4(10):1072-86.
219. Davenport P, Tipping PG. The role of interleukin-4 and interleukin-12 in the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. Am J Pathol. 2003;163(3):1117-25.
220. Huber SA, Sakkinen P, David C, Newell MK, Tracy RP. T helper-cell phenotype regulates atherosclerosis in mice under conditions of mild hypercholesterolemia. Circulation. 2001;103(21):2610-6.
221. King VL, Szilvassy SJ, Daugherty A. Interleukin-4 deficiency decreases atherosclerotic lesion formation in a site-specific manner in female LDL receptor-/- mice. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2002;22(3):456-61.
222. Engelbertsen D, Andersson L, Ljungcrantz I, Wigren M, Hedblad B, Nilsson J, et al. T-helper 2 immunity is associated with reduced risk of myocardial infarction and stroke. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2013;33(3):637-44.
223. Sharpe AH, Freeman GJ. The B7-CD28 superfamily. Nat Rev Immunol. 2002;2(2):116-26.
224. Lenschow DJ, Walunas TL, Bluestone JA. CD28/B7 system of T cell costimulation. Annu Rev Immunol. 1996;14:233-58.
225. de Boer OJ, van der Meer JJ, Teeling P, van der Loos CM, van der Wal AC. Low numbers of FOXP3 positive regulatory T cells are present in all developmental stages of human atherosclerotic lesions. PLoS One. 2007;2(8):e779.
226. Dopheide JF, Sester U, Schlitt A, Horstick G, Rupprecht HJ, Münzel T, et al. Monocyte-derived dendritic cells of patients with coronary artery disease show an increased expression of costimulatory molecules CD40, CD80 and CD86 in vitro. Coron Artery Dis. 2007;18(7):523-31.
227. Krummel MF, Allison JP. CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. J Exp Med. 1995;182(2):459-65.

228. Walunas TL, Lenschow DJ, Bakker CY, Linsley PS, Freeman GJ, Green JM, et al. CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. Immunity. 1994;1(5):405-13.
229. Brunet JF, Denizot F, Luciani MF, Roux-Dosseto M, Suzan M, Mattei MG, et al. A new member of the immunoglobulin superfamily--CTLA-4. Nature. 1987;328(6127):267-70.
230. Perkins D, Wang Z, Donovan C, He H, Mark D, Guan G, et al. Regulation of CTLA-4 expression during T cell activation. J Immunol. 1996;156(11):4154-9.
231. Takahashi T, Tagami T, Yamazaki S, Uede T, Shimizu J, Sakaguchi N, et al. Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. J Exp Med. 2000;192(2):303-10.
232. Wang XB, Giscombe R, Yan Z, Heiden T, Xu D, Lefvert AK. Expression of CTLA-4 by human monocytes. Scand J Immunol. 2002;55(1):53-60.
233. Pioli C, Gatta L, Ubaldi V, Doria G. Inhibition of IgG1 and IgE production by stimulation of the B cell CTLA-4 receptor. J Immunol. 2000;165(10):5530-6.
234. Hasib L, Lundberg AK, Zachrisson H, Ernerudh J, Jonasson L. Functional and homeostatic defects of regulatory T cells in patients with coronary artery disease. J Intern Med. 2016;279(1):63-77.
235. Dietrich T, Hucko T, Schneemann C, Neumann M, Menrad A, Willuda J, et al. Local delivery of IL-2 reduces atherosclerosis via expansion of regulatory T cells. Atherosclerosis. 2012;220(2):329-36.
236. van Puijvelde GH, van Es T, van Wanrooij EJ, Habets KL, de Vos P, van der Zee R, et al. Induction of oral tolerance to HSP60 or an HSP60-peptide activates T cell regulation and reduces atherosclerosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2007;27(12):2677-83.
237. Ma K, Lv S, Liu B, Liu Z, Luo Y, Kong W, et al. CTLA4-IgG ameliorates homocysteine-accelerated atherosclerosis by inhibiting T-cell overactivation in apoE(-/-) mice. Cardiovasc Res. 2013;97(2):349-59.
238. Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. Embo j. 1992;11(11):3887-95.

239. Dong H, Zhu G, Tamada K, Chen L. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. Nat Med. 1999;5(12):1365-9.

240. Freeman GJ, Casasnovas JM, Umetsu DT, DeKruyff RH. TIM genes: a family of cell surface phosphatidylserine receptors that regulate innate and adaptive immunity. Immunol Rev. 2010;235(1):172-89.

241. Latchman Y, Wood CR, Chernova T, Chaudhary D, Borde M, Chernova I, et al. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. Nat Immunol. 2001;2(3):261-8.

242. Tseng SY, Otsuji M, Gorski K, Huang X, Slansky JE, Pai SI, et al. B7-DC, a new dendritic cell molecule with potent costimulatory properties for T cells. J Exp Med. 2001;193(7):839-46.

243. Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH. The B7 family revisited. Annu Rev Immunol. 2005;23:515-48.

244. Agata Y, Kawasaki A, Nishimura H, Ishida Y, Tsubata T, Yagita H, et al. Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. Int Immunol. 1996;8(5):765-72.

245. Liang SC, Latchman YE, Buhlmann JE, Tomczak MF, Horwitz BH, Freeman GJ, et al. Regulation of PD-1, PD-L1, and PD-L2 expression during normal and autoimmune responses. Eur J Immunol. 2003;33(10):2706-16.

246. Keir ME, Francisco LM, Sharpe AH. PD-1 and its ligands in T-cell immunity. Curr Opin Immunol. 2007;19(3):309-14.

247. Lee J, Zhuang Y, Wei X, Shang F, Wang J, Zhang Y, et al. Contributions of PD-1/PD-L1 pathway to interactions of myeloid DCs with T cells in atherosclerosis. J Mol Cell Cardiol. 2009;46(2):169-76.

248. Gotsman I, Grabie N, Gupta R, Dacosta R, MacConmara M, Lederer J, et al. Impaired regulatory T-cell response and enhanced atherosclerosis in the absence of inducible costimulatory molecule. Circulation. 2006;114(19):2047-55.

249. Cochain C, Chaudhari SM, Koch M, Wiendl H, Eckstein HH, Zernecke A. Programmed cell death-1 deficiency exacerbates T cell activation and atherogenesis despite expansion of regulatory T cells in atherosclerosis-prone mice. PLoS One. 2014;9(4):e93280.

250. Heinisch IV, Daigle I, Knöpfli B, Simon HU. CD137 activation abrogates granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-mediated anti-apoptosis in neutrophils. Eur J Immunol. 2000;30(12):3441-6.
251. Nishimoto H, Lee SW, Hong H, Potter KG, Maeda-Yamamoto M, Kinoshita T, et al. Costimulation of mast cells by 4-1BB, a member of the tumor necrosis factor receptor superfamily, with the high-affinity IgE receptor. Blood. 2005;106(13):4241-8.
252. Pollok KE, Kim YJ, Hurtado J, Zhou Z, Kim KK, Kwon BS. 4-1BB T-cell antigen binds to mature B cells and macrophages, and costimulates anti-mu-primed splenic B cells. Eur J Immunol. 1994;24(2):367-74.
253. Goodwin RG, Din WS, Davis-Smith T, Anderson DM, Gimpel SD, Sato TA, et al. Molecular cloning of a ligand for the inducible T cell gene 4-1BB: a member of an emerging family of cytokines with homology to tumor necrosis factor. Eur J Immunol. 1993;23(10):2631-41.
254. Jang IK, Lee ZH, Kim YJ, Kim SH, Kwon BS. Human 4-1BB (CD137) signals are mediated by TRAF2 and activate nuclear factor-kappa B. Biochem Biophys Res Commun. 1998;242(3):613-20.
255. Shuford WW, Klussman K, Tritchler DD, Loo DT, Chalupny J, Siadak AW, et al. 4-1BB costimulatory signals preferentially induce CD8+ T cell proliferation and lead to the amplification in vivo of cytotoxic T cell responses. J Exp Med. 1997;186(1):47-55.
256. Pauly S, Broll K, Wittmann M, Giegerich G, Schwarz H. CD137 is expressed by follicular dendritic cells and costimulates B lymphocyte activation in germinal centers. J Leukoc Biol. 2002;72(1):35-42.
257. Drenkard D, Becke FM, Langstein J, Spruss T, Kunz-Schughart LA, Tan TE, et al. CD137 is expressed on blood vessel walls at sites of inflammation and enhances monocyte migratory activity. Faseb j. 2007;21(2):456-63.
258. Olofsson PS, Söderström LA, Wågsäter D, Sheikine Y, Ocaya P, Lang F, et al. CD137 is expressed in human atherosclerosis and promotes development of plaque inflammation in hypercholesterolemic mice. Circulation. 2008;117(10):1292-301.
259. Luo Q, Li X, Fu B, Zhang L, Deng Z, Qing C, et al. Decreased expression of TIGIT in NK cells correlates negatively with disease activity in systemic lupus erythematosus. Int J Clin Exp Pathol. 2018;11(5):2408-18.

260. Luo Q, Deng Z, Xu C, Zeng L, Ye J, Li X, et al. Elevated Expression of Immunoreceptor Tyrosine-Based Inhibitory Motif (TIGIT) on T Lymphocytes is Correlated with Disease Activity in Rheumatoid Arthritis. Med Sci Monit. 2017;23:1232-41.
261. Mao L, Hou H, Wu S, Zhou Y, Wang J, Yu J, et al. TIGIT signalling pathway negatively regulates CD4(+) T-cell responses in systemic lupus erythematosus. Immunology. 2017;151(3):280-90.
262. Wang FF, Wang Y, Wang L, Wang TS, Bai YP. TIGIT expression levels on CD4+ T cells are correlated with disease severity in patients with psoriasis. Clin Exp Dermatol. 2018;43(6):675-82.
263. Zhang T, Wang J, Zhou X, Liang R, Bai Q, Yang L, et al. Increased expression of TIGIT on CD4+ T cells ameliorates immune-mediated bone marrow failure of aplastic anemia. J Cell Biochem. 2014;115(11):1918-27.
264. Lee DJ. The relationship between TIGIT(+) regulatory T cells and autoimmune disease. Int Immunopharmacol. 2020;83:106378.
265. Xiong X, Luo Z, Zhou H, Duan Z, Niu L, Zhang K, et al. Downregulation of TIGIT Expression in FOXP3+Regulatory T Cells in Acute Coronary Syndrome. J Inflamm Res. 2022;15:1195-207.
266. Hu FF, Liu CJ, Liu LL, Zhang Q, Guo AY. Expression profile of immune checkpoint genes and their roles in predicting immunotherapy response. Brief Bioinform. 2021;22(3).
267. Miao YR, Zhang Q, Lei Q, Luo M, Xie GY, Wang H, et al. ImmuCellAI: A Unique Method for Comprehensive T-Cell Subsets Abundance Prediction and its Application in Cancer Immunotherapy. Adv Sci (Weinh). 2020;7(7):1902880.
268. Kather JN, Suarez-Carmona M, Charoentong P, Weis CA, Hirsch D, Bankhead P, et al. Topography of cancer-associated immune cells in human solid tumors. Elife. 2018;7.
269. Oliver AJ, Davey AS, Keam SP, Mardiana S, Chan JD, von Scheidt B, et al. Tissue-specific tumor microenvironments influence responses to immunotherapies. Clin Transl Immunology. 2019;8(11):e1094.
270. Pao W, Ooi CH, Birzele F, Ruefli-Brasse A, Cannarile MA, Reis B, et al. Tissue-Specific Immunoregulation: A Call for Better Understanding of the "Immunostat" in the Context of Cancer. Cancer Discov. 2018;8(4):395-402.

271. Buccitelli C, Selbach M. mRNAs, proteins and the emerging principles of gene expression control. Nat Rev Genet. 2020;21(10):630-44.
272. Schwanhäusser B, Busse D, Li N, Dittmar G, Schuchhardt J, Wolf J, et al. Global quantification of mammalian gene expression control. Nature. 2011;473(7347):337-42.
273. Davidson EH. Emerging properties of animal gene regulatory networks. Nature. 2010;468(7326):911-20.
274. Lindeboom RG, van Voorthuijsen L, Oost KC, Rodríguez-Colman MJ, Luna-Velez MV, Furlan C, et al. Integrative multi-omics analysis of intestinal organoid differentiation. Mol Syst Biol. 2018;14(6):e8227.
275. Becker K, Bluhm A, Casas-Vila N, Dinges N, Dejung M, Sayols S, et al. Quantifying post-transcriptional regulation in the development of Drosophila melanogaster. Nat Commun. 2018;9(1):4970.
276. Jovanovic M, Rooney MS, Mertins P, Przybylski D, Chevrier N, Satija R, et al. Immunogenetics. Dynamic profiling of the protein life cycle in response to pathogens. Science. 2015;347(6226):1259038.

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

AKUT KORONER SENDROMDA İMMÜN KONTROL NOKTASI PROTEİNLERİ İLE TH1/TH2 HÜCRE SİTOKİNLERİ ARASI MOLEKÜLER İLİŞKİ

ORİJİNALLİK RAPORU

%7	%7	%3	%2
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	%4
2	Submitted to Saglik Bilimleri Universitesi Öğrenci Ödevi	<%1
3	dspace.gazi.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
4	acikerisim.uludag.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
5	Submitted to Erciyes Ãniversitesi Öğrenci Ödevi	<%1
6	hdl.handle.net İnternet Kaynağı	<%1
7	www.journalagent.com İnternet Kaynağı	<%1
8	avesis.istanbul.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
	www.researchgate.net	