T.C.

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ

ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

AKUT LENFOBLASTİK LÖSEMİLİ ÇOCUKLARDA KEMOTERAPİNİN DOĞAL ÖLDÜRÜCÜ (NK) HÜCRELER ÜZERİNE ETKİLERİ

Dr. Tuğçe AKSU UZUNHAN

(UZMANLIK TEZİ)

(Tez Danışmanı Prof. Dr. Zeynep KARAKAŞ)

İSTANBUL 2010

Bu proje İstanbul Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir

(Proje no: T-889/02062006).

T.C.

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ

ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

AKUT LENFOBLASTİK LÖSEMİLİ ÇOCUKLARDA KEMOTERAPİNİN DOĞAL ÖLDÜRÜCÜ (NK) HÜCRELER ÜZERİNE ETKİLERİ

Dr. Tuğçe AKSU UZUNHAN

(Tez Danışmanı Prof. Dr. Zeynep KARAKAŞ)

(UZMANLIK TEZİ)

İSTANBUL 2010

Bu proje İstanbul Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir(Proje no: T-889/02062006).

“AKUT LENFOBLASTİK LÖSEMİLİ ÇOCUKLARDA KEMOTERAPİNİN DOĞAL ÖLDÜRÜCÜ (NK) HÜCRELER ÜZERİNE ETKİLERİ” başlıklı tez çalışmamı (Proje No: T-889/02062006) destekleyen İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi’ne teşekkür ederim.

uzmanlık eğitimim süresince bilgisi ve en çok da görgüsüyle bana her zaman yol gösteren, en güç anlarımda desteğini her zaman hissettiğim, öğrencisi olmaktan hep gurur duyacağım Anabilim Dalı Başkanımız sayın *Prof. Dr. Ömer Devecioğlu*'na,

eğitim hayatım boyunca desteklerini gördüğüm, benimle bilgi ve tecrübelerini paylaşan *tüm değerli öğretim üyelerine,*

tezimin hazırlanması için beni her zaman destekleyen, bana güç veren, cesaretlendiren Hematoloji-Onkoloji BD öğretim üyesi sayın hocam *Prof.Dr.Zeynep Karakaş'a,*

tezimin hazırlanmasında yardımlarını eksik etmeyen Fizyoloji ABD öğretim üyesi sayın hocam *Prof. Dr.Serap Erdem Kuruca'ya,*

tezimin planlanmasında yol gösteren DETAE İmmunoloji Bilim Dalı Başkanı *sayın hocam Prof. Dr. Günnur Deniz'e,*

tezimin laboratuvar çalışmalarını titizlikle uzun saatler boyunca yapan *Sn. Sabriye Karadenizli ve Sn. M. Beyza Çetin'e,* sabırla, büyük emek harcayarak çalışan *Sn. Nilgün Akdeniz'e,*

tezimin hasta grubunun oluşturulmasında yardımlarını gördüğüm *Hematoloji BD Polikliniği Laboratuvarı çalışanlarına*, ve kan örneklerini almamı sağlayan *Kan Alma Odası ekibine,*

birlikte çalışmaktan herzaman çok zevk aldığım, tezimin hazırlanma sürecinde de yanımda olan *asistan arkadaşlarıma,*

tezimin çalışma grubuna katılmayı kabul eden tüm *çocuklara,*

beni sevgi ile büyütüp yetiştiren *babam Yaşar, annem Cevriye, ablam Banu AKSU'ya* ve sevgisi için *eşim Ozan ve kızım Ece'ye,* sonsuz teşekkürlerimle.

Dr. Tuğçe Aksu Uzunhan, 2010

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ **I**

İÇİNDEKİLER **II**

TABLO LİSTESİ **V**

ŞEKİL LİSTESİ **VII**

RESİM LİSTESİ **VIII**

KISALTMALAR **IX**

ÖZET **XII**

ABSTRACT **XIII**

1. AMAÇ ve GİRİŞ **1**

2. GENEL BİLGİLER **2**

2.1. TANIM **2**

2.2. AKUT LENFOBLASTİK LÖSEMİ **3**

2.2.1. Giriş **3**

2.2.2. Tarihçe **3**

2.2.3. Epidemiyoloji ve Patogenez **5**

2.2.3.1.Kromozomal translokasyonlar **7**

2.2.3.2.İşbirlikçe mutasyonlar **8**

2.2.4. Klinik özellikler **8**

2.2.4.1.Mediastinal bulgular **10**

2.2.4.2.Santral sinir sistemi bulguları **10**

2.2.4.3.Genitoüriner bulgular **11**

2.2.4.4.İskelet bulguları **13**

2.2.4.5.Gastrointestinal bulgular **13**

2.2.4.6.Göz bulguları **13**

2.2.4.7.Kardiyopulmoner bulgular **14**

2.2.4.8.Cilt bulguları **14**

2.2.5. Laboratuvar bulguları **14**

2.2.6. Tanı ve hücre klasifikasyonu **16**

2.2.6.1.Morfolojik sınıflandırma **16**

2.2.6.2.Sitokimyasal sınıflandırma 17
2.2.6.3.İmmünolojik sınıflandırma 18
2.2.6.4.Sitogenetik ve moleküler sınıflandırma 19
2.2.7. Gelecekte ALL sınıflandırması 21
2.2.8. Prognostik faktörler 22
2.2.9. Tedaviye yanıt 23
2.2.10. Tedavi 24
2.2.10.1. Remisyon indüksiyonu fazı 24
2.2.10.2. Konsolidasyon fazı 25
2.2.10.3. İdame fazı 25
2.2.11. Allojeneik hematopoetik kemik iliği transplantasyonu 26
2.3. DOĞAL ÖLDÜRÜCÜ (NATURAL KILLER-NK) HÜCRELER 27
2.3.1. Giriş 27
2.3.2. NK hücre reseptörleri 29
2.3.2.1.Aktive edici NK hücre reseptörleri 30
2.3.2.2.İnhibe edici NK hücre reseptörleri 31
2.3.2.2.1. Katil hücre immünglobulin benzeri reseptörler (KIR) 31
2.3.3. Antikor bağımlı sitotoksisite 32
2.3.4. Sitokinler 32
2.3.4.1.İnterferonlar 32
2.3.4.2.İnterlökin 15 33
2.3.5. NK hücrelerinin insan sağlığındaki rolü 34
2.3.6. NK hücreleri ve lösemi 36
3. GEREÇ ve YÖNTEM 38
3.1. Hasta seçimi 38
3.2. Grupların belirlenmesi 39
3.3. Etik Kurul onayı ve Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi desteği 41
3.4. Laboratuvar işlemleri 41
3.4.1. NK aktivitesi 41

3.4.1.1.NK Aktivitesi Deneylerinde Kullanılan Malzemeler ve Hazırlanışı 42

3.4.1.2.Mononükleer hücrelerin elde edilmesi 42

3.4.1.3.Hücrelerin sayılması 44

3.4.1.4.Doğal öldürücü (NK) sitotoksisite testi 44

3.4.1.4.1. Litik Ünite(LU) hesaplanması 45

3.4.2. Flow sitometri ölçümü 45

3.4.3. Sitokin Ölçümü 46

3.5. İstatistiksel Analiz 47

4. BULGULAR 47

4.1. Grupların özellikleri 47

4.2. Olguların NK aktivitesinin değerlendirilmesi 49

4.3. NK hücrelerinin reseptör düzeyleri 52

4.4. Olguların profilaktik kranyal ışınlama durumlarına göre karşılaştırılması 55

4.5. Grupların profilaktik kranyal ışınlama durumlarına göre karşılaştırılması 56

4.6. Grupların risk gruplarına göre karşılaştırılması 57

4.7. Tedavi kesilme sürelerine göre olguların değerlendirilmesi 58

4.8. Grupların immünfenotiplerine göre karşılaştırılması 59

4.9. Sitokin düzeylerinin gruplara göre dağılımı 60

5. TARTIŞMA 61

6. SONUÇLAR 65

7. KAYNAKLAR 67

8. ÖZGEÇMİŞ 84

9. EKLER 88

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1. Çocukluk çağı lösemilerinde sınıflandırma

Tablo 2.2. Akut lösemili çocuklarda belirti ve semptomlar

Tablo 2.3. ALL ayırıcı tanısında yer alan hastalıklar

Tablo 2.4. Akut lenfoblastik lösemilerde FAB sınıflaması

Tablo 2.5. Akut lösemilerin sitokimyasal özellikleri

Tablo 2.6. İmmünolojik alt tipe göre klinik özellikler

Tablo 2.7. ALL'de kromozomal anomarliklerin prognostik önemi

Tablo 2.8. Çocukluk çağı akut lenfoblastik lösemisinde uluslararası çalışmaların sonuçları

Tablo 3.1. BFM TRALL 2000 protokolü risk grupları

Tablo 3.2. Risk gruplarına göre koruyucu kranyal ışınlama

Tablo 4.1. Grupların genel özellikleri

Tablo 4.2. Gruplara göre NK sitotoksisite deneyinin farklı effektör, hedef hücre oranlarında ortalama ve standart sapma değerleri

Tablo 4.3. Gruplara göre reseptör ekspresyonu

Tablo 4.4 Tüm olguların profilaktik kranyal ışınlama durumlarına göre karşılaştırılması

Tablo 4.5 Grupların profilaktik kranyal ışınlama durumlarına göre karşılaştırılması

Tablo 4.6. Grupların risk gruplarına göre karşılaştırılması

Tablo 4.7. Tedavi kesilme sürelerine göre NK popülasyonu ve NK aktivitesi

Tablo 4.8. Grupların immünfenotip dağılımlarına göre E:H 1:1, LU ve NK alt gruplarının karşılaştırılması

Tablo 4.9. Gruplar arasında deney öncesi ve sonrası IL-15, INF-γ düzeylerinin karşılaştırılması

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1. NK hücre inhibisyonu ve aktivasyonu şeması

Şekil 2.2 Hematopoetik kök hücre transplantasyonunda graft versus lösemi etkisini regüle eden KIR sisteminin rolü.

Şekil 3.1. BFM TRALL 2000 Risk gruplarına göre tedavi protokolü

Şekil 4.1. Gruplara göre cinsiyet dağılımı

Şekil 4.2. 1:1 efektör ve hedef hücre (E:H) oranlarında, standart sapma değerleri ile gruplara göre NK aktivitesi

Şekil 4.4. Gruplara göre olguların LU ortalama değerlerinin dağılımı

Şekil 4.5. Gruplara göre NK hücre popülasyonlarının karşılaştırılması

Şekil 4.6. Reseptör ekspresyonlarının gruplara göre karşılaştırılması-1

Şekil 4.7. Reseptör ekspresyonlarının gruplara göre karşılaştırılması-2

RESİM LİSTESİ

Resim 2.1. Akut lenfoblastik lösemi hücreleri

Resim 3.1. Kanın fikol üzerine enjektörle yayılması

Resim 3.2. Kanın santrifüj sonrası görünümü.

KISALTMALAR

α	**:** Alfa
β	**:** Beta
γ	**:** Gama
ARA	**:**Akut romatizmal ateş
ARA-C	**:**Sitozin arabinozid
ALL	**:**Akut lenfoblastik lösemi
AML	**:**Akut myeloid lösemi
ADCC	**:**Antikora bağımlı hücresel sitotoksisite
BOS	**:**Beyin omurilik sıvısı
CCG	**:**Children Cancer Group, Çocuk Kanser Grubu
CCL3/MIP-1a	**:**Kemokin ligand 3, Chemokine ligand 3/ Macrophage Inflammatory Proteins-1a
CCL4/MIP-1b	:Kemokin ligand 4 Chemokine ligand 4/ Macrophage Inflammatory Proteins-1b
CCL5/RANTES	:Kemokin ligand 5, Chemokine ligand 5
CD	**:**Farklılaşma kümesi, Clusters of Differentiation
CMV	Sitomegalovirüs
DIC	**:**Dissemine intravasküler koagülasyon
DLI	:Donor lymphocyte infusion
DNAM-1	:DNAX aksesuar molekül, DNAX accessory molecule-1
DNA	**:**Deoksiribonükleik asit
E	:Effektör(Etki eden)
FAB	**:**Fransız-Amerikalı-Britanyalı
FACS	**:**Floresan aktive hücre ayrımlanması, Fluorescence Activated Cell Sorting
GM-CSF	**:**Granülosit Makrofaj Koloni Stimüle Edici Faktör Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor
GvHD	**:**Graft versus host hastalığı, Graft versus host disease

H	:Hedef hücre
HIV	:İnsan immünyetersizlik virüsü, Human immündeficiency virus
HLA	**:**İnsan Lökosit Antijeni, Human Leucocyte Antigen
HRG	**:**Yüksek risk grubu
ICAM	:İntrasellüler adezyon molekülü, intracellular adhesion molecule
IFN	**:**İnterferon
IL	**:**İnterleukin
ITAM	**:**İmmunoreseptör Tirozine dayalı Aktivatör Motif, İmmünoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs
İT	:İntratekal
İTP	**:**İmmün trombositopenik purpura
JMML	:Jüvenil miyelomonositik lösemi
KIR	**:**Katil hücre immünglobulin benzeri reseptörler, Killer cell immünglobulin like reseptors
LFA-1	**:**Lenfosit fonksiyonu ilişkili antijen 1, Lymphocyte function-associated antigen 1
LGL	**:**Büyük granüler lenfosit, Large Granular Lymphocyte
LILR	**:**Lökosit Ig benzeri reseptörler, Leukocyte Ig-like Receptors
LU	**:**Litik ünite
MHC	**:**Doku Uyuşurluk Antijenleri, Major Histocompatibility Antigen
MICA	**:**MHC sınıf I ile ilişkili gen dizisi A, MHC Class I-related chain A
MICB	**:**MHC sınıf I ile ilişkili gen dizisi B, MHC Class I-related chain B
MP	:Merkaptopürin
MRI	**:**Manyetik rezonans görüntüleme
NCR	**:**Doğal sitotoksisite reseptörleri, Natural cytotoxicity receptors
NKG2C	**:**Doğal Öldürücü grup 2, C üyesi
NKG2D	**:**Doğal Öldürücü grup 2, D üyesi
Mtx	**:**Metotreksat
MRG	:Orta risk grubu

MUD	**:**Uyumlu akraba olmayan verici, Matched Unrelated Donor
NK	**:**Doğal Öldürücü, Natural Killer
PAS	**:**Periyodik asit schiff
PKI	**:**Profilaktik kranyal ışınlama
SRG	:Standart risk grubu
TNF	**:**Tümor Nekrozis Faktör.
TRAIL	**:**TNF ilişkili apoptoz indükleyen ligand, TNF Related Apoptosis Inducing Ligand
SSS	**:**Santral sinir sistemi
T	**:**Target(Hedef)
USG	**:**Ultrasonografik görüntüleme
ULBP	**:**UL16' ya bağlanan proteinler, UL16 Binding Proteins

ÖZET

Amaç: Kemoterapi almakta olan ve tedavisi kesilmiş akut lenfoblastik lösemili çocuklarda immünitenin önemli elemanı NK hücrelerinde kemoterapi ile oluşan değişiklikleri hem kantitatif hem de kalitatif olarak incelemektir.

Gereç ve yöntem: Hasta grubu yaşları 2 ile 19 arasında değişen otuz üç ALL'li çocuktan oluşturuldu. İmmünfenotipleri, risk grupları, profilaktik kranyal ışınlama durumları ve klinik özellikleri kayıt edildi. Hastalar grup 1 (ALL TRALL 2000 protokolüne göre protokol M'i bitirmiş), grup 2 (idame kemoterapisi alan) ve grup 3 (tedavisi kesilmiş) olarak sınıflandırıldı. Kontrol grubu (grup 4) ise 2 ile 13 yaşları arasındaki on bir sağlıklı çocuktan oluşturuldu. Hasta ve kontrol grubundan bilgilendirilmiş onam ile alınan kan örneklerinde NK sitotoksisite deneyi, NK alt gruplarının flow sitometri ile tayini, sitokin ölçümü yapıldı, litik ünite hesaplandı ve sonuçlar hastaların klinik özellikleri ile birlikte değerlendirildi. SPSS 14.0 ile "oneway ANOVA" testi kullanılarak analiz edildi.

Bulgular: Grup 2'nin 1:1 E:H oranında NK sitotoksisitesi diğer gruplardan anlamlı derecede yüksekti ($p<0.05$). Profilaktik kranyal ışınlama durumlarına göre tüm olgular değerlendirildiğinde profilaktik kranyal ışınlama alan olguların almayanlara göre E:H 1:1 oranında NK sitotoksisite değeri anlamlı derecede yüksekti ($p<0.05$). Reseptör ekspresyonları değerlendirildiğinde grup 2'de $CD16^{+}CD56^{+}$, $CD16^{+}NKG2D^{+}$, $CD94^{+}NKp46^{+}$ alt gruplarının grup 4'ten anlamlı derecede düşük olduğu gözlendi ($p<0.05$). IFNγ ve IL-15 düzeylerinin ölçülmesinde yalnızca tümör hücreleri ile uyarılmamış örneklerde grup 2 ve grup 3 kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu ($p<0.05$).

Sonuç: Çoğunluğu profilaktik kranyal ışınlama alan grup 2'nin NK sitotoksisitesinin yüksek saptanması düşük dozlarda radyoterapinin NK hücre fonksiyonlarını arttırması ile ilişkili olabilir. Risk gruplarının belirlediği kemoterapi NK hücrelerini sayısal olarak etkileyebilmektedir. Tedavi kesilme süresi ise NK hücrelerinin fonksiyonlarını yeniden kazanmasında önemlidir. Kemoterapi ve radyoterapi ile fonksiyonlarında değişiklikler meydana gelen NK hücrelerini daha iyi anlamak ve bu sayede fonksiyonlarını arttıran tedavi yöntemleri geliştirmek, ALL'li çocukların hayat kalitelerine katkıda bulunacaktır.

Anahtar kelimeler: Akut lenfoblastik lösemi, Kemoterapi, NK sitotoksisitesi, NK reseptörleri, Sitokinler

CHEMOTHERAPY EFFECTS ON NATURAL KILLER CELLS IN CHILDREN WITH ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA

Aim: To analyze qualitative and quantitative changes done by chemotherapy on the immune system's important element NK cells in children with acute lymphoblastic leukemia who are on therapy and finished therapy.

Materials and Methods: Thirty three children aged between 2 and 19 were included in the patient group. Their immunphenotypes, risk groups, prophylactic cranial radiation status and clinical characteristics were recorded. According to ALL TRALL 2000 protocol patients were classified into three groups: group 1 (patients who finished protocol M), group 2 (patients still on maintenance chemotherapy) and group 3 (patients who finished therapy). Control group (group 4) consisted of eleven healthy children aged between 2 and 13. NK cytotoxicity test, flow cytometric analysis of NK subgroups, cytokine analysis were performed in blood samples taken with informed consent from parents of both patients and controls. Clinical characteristics of the patients were evaluated with these results. Analysis was performed with "one way ANOVA" statistical test using SPSS 14.0.

Results: In 1:1 E:T ratio, group 2's NK cytotoxicity was significantly higher than any other group ($p<0.05$). As the receptor expressions evaluated, group 2 was lower significantly than group 4 in $CD16^{+}CD56^{+}$, $CD16^{+}NKG2D^{+}$, $CD94^{+}NKp46^{+}$ subgroups ($p<0.05$). When the prophylactic cranial radiation status of all cases were considered, irradiated patients' NK cytotoxicity value was significantly higher than non-irradiated cases ($p<0.05$). Only in samples which weren't stimulated by tumor cells, IFNγ and IL-15 was found significantly lower in group 2 and group 3 compared with the control group ($p<0.05$).

Conclusion: Mostly consisting of prophylactic cranial radiation performed patients, group 2's higher NK cytotoxicity value may be due to low dose radiation's augmentation effect on NK cell functions. Chemotherapy determined by the risk groups may affect NK cells quantitatively. Time passed since the therapy's end is important for NK cells to regain its funtions back. Understanding NK cells changed by chemotherapy and radiotherapy better and by this way developing treatment that enhance their functions will contribute to the life quality of children with acute lymphoblastic leukemia.

Key words: Acute lymphoblastic leukemia, Chemotherapy, NK cytotoxicity, NK receptors, Cytokines.

1. AMAÇ ve GİRİŞ

Amerika Birleşik Devletleri ve birçok gelişmiş ülkede çocuklarda en yaygın ikinci ölüm nedeni olan kanser, ülkemizde ilk dört sıra içinde yer almaktadır (1). İmmatür lenfohematopoetik hücrelerin malign proliferasyonu ve birikimi olan lösemi, en sık görülen çocukluk çağı kanseridir. En sık görülen alt tipi olan akut lenfoblastik lösemi, vakaların %75-80'nini oluşturur (2). Ülkemizde yıllık insidans hızı milyonda 34.4 olan akut lenfoblastik lösemi (1) remisyon indüksiyonu, intensifikasyon (konsolidasyon) ve idame fazlarından oluşan bir protokol ile tedavi edilir. Güçlendirilmiş tedaviler ile günümüzde beş yıllık olaysız sağ kalım %80'nin üzerinde bildirilmektedir.

Natural killer(NK) hücreleri sitotoksinler (perforinler ve granzimler) salgılayarak virüsle enfekte hücreler ve tümör hücrelerini öldürmek üzere uzmanlaşmışlardır. T hücre reseptörü ve CD3 bulundurmazlar (3). Etkinlikleri için daha önceden virüsle karşılaşmaya gerek olmaması, verdikleri tepkinin virüsle karşılaşma ile şiddetlenmemesi ve herhangi bir etkene özgül olmayışlarından dolayı bunlara natural killer yani doğal öldürücü hücreler adı verilmiştir. Lenfositlerin %5-10'unu oluştururlar. Bu hücreler herhangi bir antikor olmaksızın da öldürebilirse de antikor varlığı bunların etkinliğini arttırır ve bu olaya antikora bağımlı hücresel sitotoksisite (ADCC) denir. IL-12 ve INF-gamma, NK hücrelerinin güçlü etkinleştiricileridir. ADCC dışında yüzeylerinde çeşitli nedenlerle MHC I antijen ekspresyonu olmayan hücreleri (tümör hücresi, virüsle enfekte ya da stres altındaki hücreler) de öldürürler (4). CD56, NK hücrelerini tanımada kullanılabilecek önemli bir markerdır. Son yapılan çalışmalar 48 ayrı NK hücre alt tipinin varlığını göstermektedir ve bunlardan ancak birkaçının görevleri bilinebilmektedir (5).

İnfeksiyon, kanser kontrolü ve fetal implantasyonda görevli, sitokinlerin yapımında kritik role sahip, direkt sitotoksik etkili hücreler (3) olan NK hücrelerini, akut lenfoblastik lösemili çocuklarda uygulanan yoğun kemoterapiler hem kantitatif, hem de kalitatif olarak olumsuz etkilemektedir. Pek çok immün olayda kilit rolü olan NK hücrelerinin etkilenmesi, akut lenfoblastik çocuklarda hem infeksiyonla, hem de kanserle savaşı güçleştirecektir.
Amacımız kemoterapi almakta olan ve tedavisi kesilmiş akut lenfoblastik lösemili çocuklarda immünitenin önemli elemanı NK hücrelerinde, kemoterapi ile oluşan değişiklikleri hem aktivite bazında hem de reseptör tayini ile çeşitli alt gruplarının sayılarını saptayarak

incelemektir. Bu sayede lösemilerin tedavisinde immünoterapi alternatifleri sunabilecek gelecek çalışmalara da yol gösterebilmektir.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Tanım

Akut lösemiler normal myeloid ve lenfoid hematopoezin spesifik bir aşamasında duraklama ve klonal büyüme ile meydana gelen hastalık grubudur. Tüm çocukluk çağı lösemilerinin %97'sini oluşturur. Kronik myeloid lösemiler ise tüm çocukluk çağı lösemilerinin %3'ünü oluşturur (6). Lösemiler öncelikle akut ve kronik, daha sonra da lenfoid ve myeloid olarak sınıflandırılmıştır. İlk kullanıldığında henüz etkin tedaviler yokken akut ve kronik terimleri hastaların rölatif sağ kalım sürelerini ifade etmekteydi. Tedavideki ilerlemelerle birlikte akut ve kronik kavramları yeni anlamlar kazanmıştır. Günümüzde akut lösemi blast hücrelerinin hızlı prolifere olduğu lösemiler için kullanılırken, kronik lösemi nispeten daha differansiye olup daha yavaş proliferasyon gösteren hücrelerden oluşan lösemiler için kullanılmaktadır. Erişkin lösemilerinden farklı olarak çocukluk çağı lösemilerinin çoğu akut lösemilerdir (7). Tablo 2.1'de çocukluk çağı lösemileri sınıflandırılmıştır.

Tablo 2.1. Çocukluk çağı lösemilerinde sınıflama(6)

Akut lösemiler (%97)
• Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL) % 75-80 • Akut Miyeloid Lösemi (AML) % 15-20 • Akut indiferansiye lösemi < % 0,5 • Akut karışık hücreli lösemi
Kronik lösemiler(%3)
• Philadelphia kromozomu pozitif miyeloid lösemi • Jüvenil miyelomonositik lösemi (JMML)

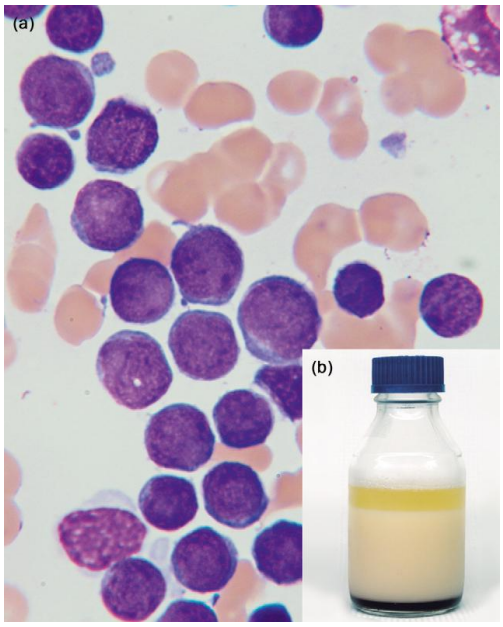
2.2.AKUT LENFOBLASTİK LÖSEMİ

2.2.1. Giriş

Akut lenfoblastik lösemi çocukluk çağında görülen en sık kanser tipidir, tüm çocukluk çağı kanserlerinin %30-35'ini oluşturur. Bundan 30 yıl kadar önce hastalık çocukların büyük çoğunluğunda ölümcüldü (8). 1965 yılında ALL'li çocukların %1'inden azının uzun süre hayatta kalması bekleniyordu (9); ancak günümüzde ALL'li çocukların ve adölesanların %80'i tamamen iyileşmektedir (10-12). Dahası lösemik relaps olan çocukların %20-30'u uzun süreli ikinci bir remisyon ve ikinci basamak tedaviler ile kür şansı elde etmektedir (13-14). Bu gelişmeye rağmen relaps olan ve lösemiden ölen ALL'li çocuk sayısı halen yeni tanı konan akut myeloid lösemili çocuk sayısını geçmektedir.

2.2.2. Tarihçe

Velpeau 1827 yılında löseminin ilk bildirisini oluşturan kişi olarak bilinmektedir. Fransız hekim Alfred Velpeau ateş, halsizlik ve yaygın ağrı şikayetleri olan hastanın kanının püyle(!) dolu olduğunu gözlemlemiş ve otopsisini yapmıştır. Normalde 90 g olan dalağını 4,5 kg olarak saptamıştır. Virchow, Bennett ve Craigie 1845 yılında bu durumu ayrı bir hastalık olarak tanımlamıştır. Virchow 1847 yılında hastalığı lösemi (yunanca leukos beyaz, heima kan) (resim 1)terimini kullanarak tanımlamıştır ve splenik ve lenfatik olarak ikiye ayırmıştır. Ehrlich'in boyama yöntemlerinin 1891 yılında ortaya çıkması lösemi subtiplerinin ileri ayrımına neden olmuştur. Splenik ve myeloid lösemi kısa süre sonra aynı hastalık olarak tanınmıştır. Lösemi 1913 yılında akut veya kronik, lenfatik veya myeloid olarak sınıflandırılmıştır. Çocuklardaki ALL'nin özellikle 1-5 yaş arasında daha yüksek olan prevalansı 1917 yılında fark edilmiştir (15).



Resim 2.1.(a)Akut lenfoblastik lösemi hücreleri genellikle oldukça küçük, çok az sitoplazmalıdır, homojen nükleer kromatini ve göze çarpmayan nükleolusu mevcuttur. (Wright-Giemsa, x1000).
(b)Bu şişede hiperlökositoz ile başvuran ALL'li bir hastadan alınan ve lökoaferez uygulanmış örnek bulunmaktadır ve lösemi (beyaz kan) teriminin tanımını gösterir.
[Campana D, Pui C-H. Chapter 98: Acute lymphoblastic leukaemia. In: Rich RR, et al. (Eds). Clinical İmmünology
2nd ed. London: Harcourt International, in press]

Löseminin farklı bir hastalık olduğu anlaşıldıktan kısa süre sonra hekimler palyatif tedavi amaçlı kimyasallar kullanmaya başlamışlardır. İlk gelişme folik asidin lösemi hücrelerinin çoğalmasını hızlandırdığına dair Farber'ın gözlemi tarafından yönlendirilen folik asit antimetabolitinin (aminopterin) kullanımıdır. Çarpıcı olarak çocuklarda ilk kez aylarca süren klinik ve hematolojik tam remisyonlar gözlenmiştir. Aminopterin ile oluşturulmuş remisyonların klinik yayınından bir yıl sonra yeni izole edilmiş ACTH'nın (adrenokortikotropik hormon) lösemi hastalarında hızlı ancak kısa remisyonları sağladığı bildirilmiştir. Neredeyse eş zamanlı olarak Elion ve arkadaşları pürin ve pirimidin sentezi ile etkileşen antimetabolitler sentezlemişlerdir. Bulguları merkaptopürin, 6-tioguanin ve allopurinolün klinik kullanıma girişine neden olmuştur. 1950'lerden 1960'lara kadar pek çok yeni antilösemik ilaç sunulmuştur. Pinkel ve meslekdaşları tarafından 1962 yılında St.Jude Çocuk Araştırma Hastanesi'nde remisyon indüksiyonu, intensifikasyon veya konsolidasyon, subklinik SSS (santral sinir sistemi) lösemisi için tedavi ve uzatılmış idame tedavilerinden oluşan dört fazlı tam tedavi yaklaşımı geliştirilmiştir. 1970'lerin başlarında çocukların %50'ye yakını bu yenilikçi tedavi ile iyileştirilmiştir. Sonunda ALL klinik, genetik ve immünolojik olarak heterojen hastalıkları tanımlayan geniş bir terim olarak kabul edilerek, risk yönelimli tedaviler geliştirilmiştir (15).

2.2.3. Epidemiyoloji ve Patogenez

Çoğu ALL vakası çocuklarda meydana gelmektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde 0-14 yaş arası insidansı 3-4/100000 ve 15 yaş üstü için bu oran 1/100000'dir (16). Çocuklarda ALL pik insidansı 2-5 yaş olmak üzere tüm akut lösemilerin %75'ini (bu yaş grubunda tüm kanserlerin %34'ü) oluşturur (17). Bu oran akut myeloid lösemi ve kronik lenfositik lösemilerin daha sık olduğu erişkinlerde çok daha düşüktür (17,18). Ülkemizde akut lenfoblastik lösemilerin 0-14 yaş arasında insidansı 41,4/1000000 olarak bildirilmektedir (1). Tüm yaş gruplarında hafif bir erkek üstünlüğü ve beyaz çocuklarda belirgin bir insidans yüksekliği bulunmaktadır (16). ALL temel olarak de novo bir hastalık olarak ortaya çıkar ancak nadir vakalar ikincil neoplazilerdir (19). Bir grup genetik ve çevresel faktör ALL ile ilişkilendirilmiştir. Down sendromu, Bloom sendromu, nörofibromatozis tip I ve ataksi telenjiektazi hastalarında sıklığı artmıştır (20).

ALL'nin oluşumuna neden olan olaylar halen bilinmemektedir ancak sonuçta lenfoid homeostazından sorumlu genleri etkileyerek immatür öncül hücrelerin klonal çoğalmasına neden olurlar. Bazı lösemilerin prenatal orijini eş zamanlı lösemi olan tek yumurta ikizlerinin genetik çalışmalarında belirlenmiştir. Ayrıca lösemi spesifik füzyon gen sekansları da neonatal spot kartlarında geçmişe dönük olarak bulunmuştur (örnek *MLL-AF4, TEL-AML1*) (21). *MLL-AF4* ve t(4;11) füzyon sekansı tek yumurta ikizlerinde yüksek konkordansa(%25-100) ve çok kısa latent periyoda sahiptir (birkaç haftadan birkaç aya) ki bu da lökomogenez için bu füzyonun yeterli olabildiğini veya en azından lösemi gelişimine neden olabilecek ikincil bir değişikliğe neden olabileceğini göstermektedir (22). Diğer lösemi tiplerinde örneğin *TEL-AML1* füzyon veya T hücre fenotiplide konkordans oranı düşüktür, postnatal latent periyod uzun ve değişkendir, klinik ve tedavi yanıtı tek yumurta ikizlerinde geniş ölçüde farklılık gösterebilir. Bu özellik lösemik dönüşüm için gerekli postnatal ikincil bir moleküler olayın gerekli olduğunu düşündürür (22). Monozigotik ikizlerin üç yaşında eş zamanlı identik *TEL-AML1* füzyonu ile lösemi geliştirdiği fakat dizigotik (farklı genetik yapıda) diğer eşin füzyon sekansına sahip olmadığı ve lösemi geliştirmediği bir üçüz gebelikten yakın zamanda elde edilen bilgiler yeni bakış açıları kazanmamıza neden olmuştur (23). Tek yumurta ikizleri füzyon transkriptine ek olarak normal yeniden düzenlenmemiş *TEL* allelinin bağımsız ikinci bir delesyonuna sahiptiler ki bu da farklı belki de ek bir postnatal olayı düşündürmektedir. Dikkat çekici olarak *TEL-AML1* füzyonu lenfoid hücrelerde

apoptozis stimülatörleri tarafından indüklenebilmektedir (24) ve ateşli normal çocukların önemli bir oranının(%40) kanında saptanabilmiştir (25), bu da füzyon transkriptinin kendiliğinden lösemi oluşturmak için yeterli olmadığına dair kanıt oluşturmaktadır.

Çeşitli epidemiyolojik araştırmalar 11q23 kromozom bandı üzerindeki *MLL* genini ilgilendiren infant lösemiler üzerine yoğunlaşmıştır (26), *MLL* yeniden düzenlemeleri ayrıca topoizomeraz II inhibitörleri (temel olarak epipodofilotoksinler) ile tedaviden kısa süre sonra ortaya çıkan terapi ilişkili AML'de de sıktır (27). İnfant ve topoizomeraz II inhibitör ilişkili lösemilerdeki moleküler genetik anormalliklerin benzerlikleri, topoizomeraz II'yi inhibe eden maddelere transplasental maruziyetin lösemilerin oluşumunda kritik olabileceğini düşündürmektedir. Flavonoidler (yiyecek ve içecek), kinolon antibiyotikler, benzen metabolitleri, kateşinler ve östrojenler hem *in vivo* hem de *in vitro* topoizomeraz II'yi inhibe ederler, ve *MLL* yeniden düzenlenmeleri ile akut lösemiye yol açan mutasyonlara neden olabilirler (26). Yakın zamanda vaka kontrollü bir çalışma DNA hasarlayan ilaçlar, bitkisel ilaçlar ve annenin maruz kaldığı pestisitlere in utero maruziyetle *MLL* yeniden düzenlenmelerinin olduğu infant lösemi gelişimi arasında anlamlı ilişkileri ortaya çıkardı (28).

Araştırmacılar ayrıca ksenobiyotik (organizmaya yabancı kimyasallar) metabolizmasındaki genetik çeşitlilik ve akut lenfoblastik löseminin gelişimini etkileyebilecek çevresel, diyetsel, maternal ve diğer eksternal faktörlerle etkileşebilecek DNA tamir yolları ve hücre siklusu kontrol noktası fonksiyonları üzerinde odaklandılar. Her ne kadar araştırmaların sayısı az ve örneklem küçükse de sitokrom p450, NAD(P)H quinone, oksidoredüktaz, glutatyon S-transferazlar, metilen tetrahidrofolat redüktaz, timidilat sentetaz, serin hidroksimetil transferaz ve hücre siklusu inhibitörlerini kodlayan genlerdeki polimorfizmle muhtemel nedensel ilişkiyi destekleyecek bilgiler bulunmaktadır (29-34).

Devam eden moleküler epidemiyolojik çalışmalar çocuklardaki lökomogenezin altta yatan mekanizmalarını daha fazla anlamamızı ve etkin önlemlerin geliştirilmesine neden olacaktır (35).

Her ne kadar, fazla doğum tartılı olmanın çocukluk çağı akut lenfoblastik lösemisinde bir risk faktörü olması üzerine çok sayıda yayınlanmış yazı olması (36) nedeniyle ikna olsak da hastalık için artmış risk olduğu öne sürülen ebeveyn mesleği, annenin reprodüktif öyküsü,

ebeveyn alkol veya sigara kullanımı, maternal diyet, prenatal vitamin kullanımı, pestisitlere veya çözücülere maruziyet ve meskun mahallerde en yüksek seviyede güç frekanslı manyetik alanlara (>0.3 veya 0.4 μT) maruz kalmanın dahil olduğu faktörlerin yer aldığı çelişkili ve izole yayınlardan oluşan geniş bir liste bulunmaktadır (37,38).

Çocukluk çağı ALL'sinin gelişiminin pik yaşının 2-5 yaş olması, endüstrileşen, modern, zengin toplumlarda hastalığın prevalansının artması ve çocukluk çağı lösemi vakalarının zaman zaman kümeleşmesi (özellikle yeni kasabalarda) İngiliz araştırmacılar tarafından oluşturulmuş iki paralel infeksiyon temelli hipotezi ateşlemiştir: Kinlen'in toplumun karışması hipotezi ve Greaves'in gecikmiş infeksiyon hipotezi (şekil 1) (39,40). Kinlen'in hipotezi büyük boyutlarda şehirden kırsala toplumsal karışmaların (göçler vs ile) infeksiyonların lokalize epidemisine neden olabileceğini (duyarlı ve enfekte kişilerin karışması ile), böylelikle komplikasyon olarak küme halinde lösemi vakalarının oluşabileceğini öne sürer. Greaves'in gecikmiş infeksiyon hipotezi minimal iki vuruş hipotezine dayanmaktadır ve prenatal edinilmiş prelösemik klonu olan bazı duyarlı kişilerin hijyenik bir ortamda yaşadığı için sık görülen infeksiyonlara hayatın erken dönemlerinde az yada hiç maruz kalmadıklarını ileri sürer. Artmış lenfoid proliferasyona uygun yaş döneminde, sık görülen infeksiyon ajanlarıyla gecikmiş hastalık immün sistemin aberran veya patolojik yanıtlar vermesine neden olur. Büyük kardeşler varlığında veya erken yaşta kreşe başlama ile bildirilen düşük risk altta yatan infeksiyon teorisini desteklemektedir. Doğum sırasının etkisi ile ilgili bulgular tutarlı olmasa da büyük çalışmalardan birinde bu etki gözlenmiştir. Kreşe erken gitme ile lösemiden korunmanın kanıtları daha tutarlıdır (39).

2.2.3.2. Kromozomal translokasyonlar

Spesifik genleri aktive eden kromozomal translokasyonlar insan lösemilerinin, özellikle de akut lenfoblastik löseminin tanımlayıcı karakteristik bir özelliğidir (41, 42). Yeni tanı konmuş lösemilerle yapılan geniş vaka serilerindeki gen ekspresyon paternleri spesifik kromozomal translokasyonların hastalığın özgün alt tiplerini belirlediğini kanıtlamıştır (43,44). Çocuklardaki akut lenfoblastik löseminin en sık formu olan prekürsör B hücreli akut lenfoblastik lösemi vakalarının yaklaşık %25'i t(12;21)(p13;q22) kromozomal translokasyonu tarafından oluşturulan *TEL-AML1* füzyon genini taşır (41). Böylelikle B hücre öncüllerinde TEL-AML1 füzyon proteininin varlığı lösemik erken evre B hücre serisi gelişimine neden

olur. *TEL-AML1* ile uyarılmış kordon kanı hücrelerinin analizi, füzyon geninin prelösemik hücrelere değişmiş kendi kendini yenileme ve canlı kalma özelliklerini vererek ilk vuruş (first hit) mutasyonunu meydana getirdiğini ileri sürer(45).

T hücreli akut lenfoblatik lösemi vakalarının %50'den fazlası normal T hücre gelişiminde rol oynayan bir transmembran reseptörünü kodlayan (46) *NOTCH1*'i de içine alan aktive edici mutasyonlara sahiptir (47).

2.2.3.3. İşbirlikçi mutasyonlar

Her ne kadar kromozomal anormallikler akut lenfoblastik löseminin patogenezinin ayırıcı özelliği olsa da kanıtlara göre aşikar lösemiyi ortaya çıkarabilmek için başka genetik lezyonlarla birlikte hareket etmeleri gerekmektedir. Bunun birincil örneği her iki tümör süpresörünü (p16INK4A ve p14ARF) kodlayan siklin bağımlı kinaz inhibitör 2A geninin (*CDKN2A*) biallelik delesyonu veya epigenetik sessizleştirilmesidir. Bu genin inaktivasyonu B prekürsör ve T hücreli ALL vakaların çoğunluğunda hem TP53 hem de retinoblastoma yolaklarının nötralize edilmesi ile sonuçlanır (41). İki yüz kırk iki pediyatrik ALL vakasının yüksek rezolüsyonlu tek nükleotid polimorfizm kullanılarak yapılan genom boyu analizinde B prekürsör hücreli ALL vakalarının %40 kadarında B lenfosit gelişiminin düzenleyicilerini kodlayan genlerde delesyonlar, amplifikasyonlar, nokta mutasyonları ve diğer yapısal yeniden düzenlemeler saptanmıştır (48). PAX5 geni vakaların neredeyse üçte birinde değişikliğe uğrayarak somatik mutasyonun en sık hedefi olarak saptanmıştır. T hücreli akut lenfoblastik lösemide aşikar lösemiye neden olan en azından beş çok basamaklı mutasyonel yolaklar tanımlanmıştır ve bazı vakalarda bu yolaklar beş veya daha fazla dokümente edilmiş genetik lezyon gerektirmektedir (42,46,49).

2.2.4. Klinik özellikler

ALL'nin klinik prezentasyonu lenfoblastlar infiltrasyonunun neden olduğu kemik iliği yetersizliğinin derecesi ve ekstramedüller organ infiltrasyonu ile belirlenmektedir. ALL'li çocukların üçte ikisi tanı anında hastalığın belirti ve semptomlarını dört haftadan daha az süredir göstermektedir, bununla beraber birkaç aylık bir öykü de ayrıca ALL tanısı ile uyumlu olabilir. İlk semptomlar genellikle non-spesifiktir ve letarji, geçmeyen bitkinlik, kemik ağrısı veya iştah kaybıdır. Anemi, kanama ve infeksiyonlar gibi daha spesifik semptomlar kemik

iliğini infiltre eden lenfoblastların sonucudur ve geriye kalan normal hematopoezi engellemektedir (50). Çocukluk çağı ALL'sinin belirti ve semptomları tablo 2.2'de özetlenmiştir.

Tablo 2.2 Akut lösemili çocuklarda belirti ve semptomlar(50)

Anemi belirtileri: letarji, yorgunluk, bitkinlik, çabuk yorulma, iştah kaybı
İnfeksiyonlara eğilim belirtileri: ateşli hastalık
Kanamaya eğilim belirtileri: purpura, mukozal kanama, hematom ve morarma
Organ infiltrasyonu belirtileri: kemik ve eklem ağrısı, hepatomegali, splenomegali, generalize lenf nodu büyümesi, mediastinal kitle ve sonrasında superior vena kava sendromu
Sistemik hastalık belirtileri: nedeni bilinmeyen ateş, kilo kaybı, gece terlemeleri

Öykü ve klinik ile bir kez lösemiden şüphelenildiğinde kan sayımının ve özellikle periferik yaymanın değerlendirilmesi çoğu vakada hızlı tanıyı sağlar. Bununla birlikte normal kan sayımı ve normal kan yayması ALL'yi dışlamaz, bu nedenle ALL şüphesi varsa derhal kemik iliği aspirasyonu yapılmalıdır. Geçmişte romatizmal prezentasyon gösteren pek çok çocuk yanlışlıkla steroidlerle tedavi edilmiştir. Bu uygulama şimdilerde neyse ki altta yatan hastalığı maskeleyip, geçici remisyona ve ilaç direncine neden olduğundan daha az yaygındır (50).

ALL'nin ayırıcı tanısında infeksiyonlar, nöroblastom gibi kemik iliğini tutan çocukluk çağı maligniteleri, kollajen vasküler hastalıklar, İTP ve aplastik anemi gibi diğer hematolojik hastalıklar yer almaktadır (50) (Tablo 2.3).

Tablo 2.3. ALL ayırıcı tanısında yer alan hastalıklar

Aplastik anemi ve diğer kemik iliği yetmezlik sendromları (örn:Fanconi aplastik anemisi)
Romatolojik hastalıklar (Örn: Still hastalığı, ARA)
Osteomyelit
Farklı malignitelerin kemik iliğine yayılması (Nöroblastom, rabdomyosarkom)
Myeloproliferatif, myelodisplastik sendromlar
Viral ve diğer infeksiyonlar (Örn:infeksiyöz mononükleoz, CMV, *Leishmania*)
Lökomoid reaksiyon (difteri ve sepsis)
İdiyopatik trombositopenik purpura

ALL asemptomatik çocukta rutin kan sayımı sırasında insidental bir bulgu olarak veya özellikle hiperlökositozu olan T hücreli ALL'li çocuklarda solunum sıkıntısı epizodu veya hayatı tehdit eden kanama veya infeksiyon ile ortaya çıkabilir. Lenfadenopati genellikle mevcuttur ve genellikle yüksek lökosit sayısı ile korelasyon gösterir (lenfomatöz özellik). ALL'li çocukların %30-60 kadarında tanı anında belirgin hepatomegali ve/veya splenomegali mevcuttur. Hepatosplenomegali tanı anında yüksek lökosit sayısı ile ilişkilidir. Her ne kadar ALL temelde kemik iliği hastalığı olsa da diğer organlar da lösemik blastlar tarafından infiltre edilebilirler. İnfiltrasyon lenfadenopati veya hepatosplenomegali gibi klinik olarak belirgin olabilir ancak diğer organların lösemik infiltrasyonu gizli ve yalnızca tanısal görüntüleme veya sitolojik değerlendirme ile saptanabilir olabilir (50). Matür B hücreli ALL'li az sayıdaki vaka baş ve boyun bölgesinde lenfadenopatinin cilt lezyonları veya gizli kemik lezyonları gösterebilir (51).

2.2.4.1. Mediastinal bulgular

Sıklıkla timus içindeki ön mediastinal kitleler T-ALL'li çocukların 2/3'ünde mevcuttur fakat diğer immünolojik subtiplerde oldukça nadirdir. Lösemik plevral effüzyonlar T-ALL olan bazı çocuklarda mediastinal kitlelerle ilişkili olabilir (52). Superior vena kava sendromu ve ciddi solunum sıkıntısı medikal acillere neden olabilir. İndüksiyon kemoterapisi sırasında bu çocuklar bariz tümör lizis sendromu geliştirebilirler.

2.2.4.2. Santral sinir sistemi bulguları

BOS'da (beyin omurilik sıvısı) lenfoblastların bulunması ile tanımlanan aşikar SSS lösemisi immünolojik alt tiplerine göre değişmek üzere yeni tanılı ALL'li çocukların %1,5 ile %10'unda bulunmaktadır. SSS lösemisi nispeten daha nadir olan matür B hücreli, T hücreli ve yüksek lökosit sayılı lösemilerde daha sıktır. Tanıda SSS lösemisi olan çocuklar çoğunlukla ense sertliğinin olmadığı artmış intrakranyal basınç belirtileri gibi diffüz veya fokal nörolojik belirtilerle kendilerini gösterebilirler. Kranyal sinir tutulumu genellikle III, IV, VI, ve VII. kranyal sinirler olmak üzere dikkatli nörolojik muayenede kendini gösterebilir. Bazen VI. ve VII. kranyal sinir paralizileri SSS hastalığının başka belirtisi olmadan oluşur. SSS lösemisi nadiren aşırı kilo alımı ve davranış değişikliklerine neden olan hipotalamik tutulumla ortaya çıkar (53). Lösemik blastlar SSS'ne hematojen yayılımla veya daha nadiren etkilenmiş

kafatası kemiğindeki kemik iliğinin köprü venleri ile yüzeyel araknoide direkt yayılması ile olabilir. SSS lösemisinin ilerlemesi ile blastlar sonunda derin araknoidi ve daha sonra pia/glial membranı infiltre ederler ve en sonunda beyin parankimi tutulur. Ciddi kombine immün yetersizliği olan fare modelinde, kafatasında, vertebral kemik iliğinde ve meninkslerde histolojik olarak saptanabilen lösemik hücrelerin engraftmanı tüm diğer bölgelerin engraftmanından önce olmuştur (54).

Başlangıçta SSS lösemisi olan çocukların çoğunda lösemik blastların varlığının sonucu olarak SSS pleositozu mevcuttur. Blastlar sitosantrifüj ve May–Grünewald–Giemsa boyaması kullanılarak saptanabilir. Lösemik blastları intratekal kemoterapiden sonra veya SSS infeksiyonu sırasında görülebilen reaktif kan hücrelerinden ayırmak için dikkatli morfolojik değerlendirme gereklidir.

SSS'nin kan ile kontaminasyonu morfolojik değerlendirmeyi zor hatta imkansız kılar. Tanı anında SSS lösemi insidansı kullanılan tanı kriterlerine göre önemli ölçüde değişiklik gösterir (55). 1986 yılında Roma Uluslararası Çalışma Grubu (Rome International Workshop) serebromeningeal löseminin tanımı olarak sitosantrifüj preparatında $\geq 5 \times 10^6$/L blasttan oluşan lökosit sayısını önermiştir (56). Tanı anında BOS'da az sayıda blast olmasının aşikar SSS lösemisi veya SSS relapsının gelişimine neden olmadığını bazı araştırmacılar bildirdilerse de (57) pek çok diğer çalışma az sayıda blast varlığında (<5 her büyük büyütmede) ve lomber ponksiyonun tanı anında travmatik olduğu durumlarda lösemik hücrelerin ekilmesi yoluyla SSS relapsı riskinin artmış olduğunu göstermektedir (58). SSS durum sınıflaması;
SSS-1:Blast hiç yok.
SSS-2:Lökosit sayısı $<5x10^6$/L Morfolojik olarak saptanabilen blastlarla
SSS-3:Lökosit sayısı $\geq 5x10^6$/L Morfolojik olarak saptanabilen blastlarla ve/veya kranyal sinir tutulumu (59) şeklindedir. Travmatik lomber ponksiyon durumunda veya SSS-2 grubu tutulumda tedaviye iki intratekal uygulama eklenmektedir.

2.2.4.3. Genitoüriner bulgular

Sonografi veya dikkatli palpasyonla saptanan aşikar testiküler hastalık ALL tanısı sırasında nadirdir. Bununla birlikte lösemik blastlar tanı anında erkek çocukların %25 kadar

çoğunda testis biyopsisi ile saptanmıştır (60). Gizli testiküler hastalık ihtimali testiküler rekürrensin sıklıkla sistemik relapsı takip etmesi gerçeği ile birleşince pek çok merkez idame kemoterapisi sırasında ve bitiminden hemen önce rutin bilateral testiküler biyopsi yapılmasını savunmuştur. Ancak bu uygulama son zamanlarda pek çok merkez tarafından terk edilmiştir çünkü çalışmalar göstermiştir ki tanı anında, indüksiyondan sonra, idame sırasında veya kemoterapi kesilmeden önce yapılan testiküler biyopsiler sıklıkla anlamlı oranda yalancı negatiflikle ilişkilidir ve sonradan gelişebilecek testiküler bir relapsı doğru tahmin edememektedir (61, 62, 63). Bu nedenle tedavinin sonunda gizli hastalık için rutin testiküler biyopsiler artık önerilmemektedir. Gizli testiküler hastalık için transskrotal USG (ultrasonografik görüntüleme) ve MRI (manyetik rezonans görüntüleme) kullanarak non invazif görüntüleme değerlendirilmiş; ancak her iki teknik de yeterli duyarlılıkta saptanmamıştır (64).

Klinik olarak aşikar testiküler etkilenme genellikle tek taraflı ağrısız testis büyümesi olarak ortaya çıkar. Tanı testiküler biyopsi ile konmalıdır. Testiküler lösemiden klinik olarak şüphelenildiğinde bilateral testiküler biyopsi endikedir çünkü hastalık sıklıkla kontralateral testisi de etkiler (65). Wedge biyopsi tercih edilen tanı tekniğidir çünkü bu işlemin örnekleme hatası ile sonuçlanma ihtimali daha düşüktür.

ALL için etkin kemoterapinin gelişinden önce klinik olarak belirgin testis relapsı nadir bir olaydı (66). Paradoksik olarak tedavinin iyileştirilmesi ve uzamış sürvi ile testiküler tutulum arttı. Aşikar testiküler relapsın 1970 ve 1980'lerde insidansı her ne kadar gerçek oran %10 olsa bile %16 kadar yüksek bildirilmişti (67). Daha güçlü tedavilerin ortaya çıkışı ile testiküler relapsın insidansı %5 veya daha azına inmektedir (68,69).

Testiküler relaps gelişme riski yüksek lökosit sayısı (>20000 /mm^3), T hücreli hastalık, belirgin lenfadenopati ve splenomegali veya belirgin trombositopeni (<30.000/mm^3) de dahil olmak üzere çok sayıda faktör ile ilişkilendirilmiştir (70,71). Aşikar testis relapsının gelişme süresi 2 aydan birkaç yıla kadar değişkenlik gösterebilir (67,72,73).

Renal infiltrasyon oligüriye neden olabilir veya semptom vermeyebilir, sonografi veya bilgisayarlı tomografide böbreklerin büyük görülmesi ile saptanabilir (50). Bir BFM çalışmasında tedavi öncesi renal infiltrasyon insidansı %18 idi ancak günümüzde rasburikazın

böyle vakalarda kullanımı ile diyalize nadiren ihtiyaç duyulmaktadır (74). Priapizm T-ALL'li ve hiperlökositoz/lökostaz sendromlu çocuklarda çok nadiren görülmektedir (75).

2.2.4.4. İskelet bulguları

ALL'li çocukların %20-30 kadarı, topallama veya yürümeyi reddetmeye neden olan özellikle alt ekstremitelerde olan ciddi ağrı ile başvurur. Bu çocukların neredeyse tamamı B prekürsör hücreli ALL'dir ve sıklıkla normal kan sayımı ve tanının gecikmesine neden olan kanda lenfoblastların az yada hiç olmaması(alösemik lösemi) ile karşımıza gelirler (76). ALL'li çocukların %20 kadarı metafizlerde transverse radyolüsen çizgiler, subperiostal yeni kemik oluşumu, primer kemik tümörlerini taklit eden osteolitik lezyonlar veya Langerhans hücreli histiositozu taklit eden karakteristik radyografik kemik değişiklikleri ile karşımıza gelirler (77,78). Özellikle kalça ve dizin ostenekrozu ciddi kemik ağrısına neden olur ve özellikle steroidlerle antilösemik tedavinin nadir bir komplikasyonudur (79).

2.2.4.5. Gastrointestinal bulgular

Akut lösemili çocuklarda oral kavitenin spesifik problemleri sıktır. *Candida albicans* ile infeksiyon, peteşi, kanama, diş eti kanaması, mukozal ülserasyonlar sıktır. Kanama dışkıda makroskopik veya mikroskopik kan görülmesi ile löseminin en sık gastrointestinal belirtisidir ve trombositopeni, DIC (dissemine intravasküler koagülasyon), lösemik hücrelerin infiltrasyonu veya infeksiyon (örn: Candida…) nedeniyle oluşabilir. Hassasiyetle birlikte olan sağ alt kadran ağrısı, abdominal gerginlik, kusma ve sepsisden oluşan karakteristik bir sendrom (nötropenik tiflit veya nekrotizan enterokolit) yoğun kemoterapiye bağlı gelişen derin nötropenide sıklıkla görülür (80). Ciddi kanama veya nekrotizan pankreatit asparaginaz tedavisi sırasında ALL'li çocuklarda görülebilir ve tanısı zor konabilir. Ayırıcı tanıda çocukluk çağının sık görülen apandisit, kolanjit ve invaginasyon gibi cerrahi sorunlarını düşünmek gerekir. Hastalar karaciğer infiltrasyonuna bağlı karaciğer enzim yüksekliği ve nadiren ciddi hepatik disfonksiyon ile prezente olabilirler.

2.2.4.6. Göz bulguları

Dikkatli oftalmolojik değerlendirmede saptanan gizli göz bulguları yeni tanı alan ALL'li çocukların üçte bir kadarında bulunabilir (81). Gerçekte tüm oküler yapıların

etkilendiği bulunmuştur (82). Aşikar lösemik infiltrasyon tanı anında sık değildir ve genellikle daha çok lösemik relaps ile ilişkilidir (83). Lösemik göz infiltrasyonu olan çocukların yaklaşık yarısı aşikar SSS relapsı ile başvurur (84). Bu nedenle gözün, SSS ve testisler gibi ALL için barınak bir alan olduğu ileri sürülmektedir (85). Bugünün yüksek doz kemoterapi ve SSS'yi hedef alan yoğun polikemoterapi protokolleri altında ALL'de oküler belirtilerin insidansı SSS ve testis belirtilerinin insidansında olduğu gibi geçmişten daha azdır (10, 86).

2.2.4.7. Kardiyopulmoner bulgular

Akciğerler ve kalbin lösemik infiltrasyonu nadirdir. Ancak bu bulguların varlığı yaşamı tehdit edici olabilir. T-ALL'li çocukların 1/3'ünde ekokardiyografi ile perikardiyal lösemik effüzyonlar bulunur ve sıklıkla lösemik plevral effüzyon ve mediastinal kitle ile birliktelik gösterir. Yüksek lökosit sayıları olan hastaların akciğerlerinin infiltrasyonu ve lökostaz ile yaşamı tehdit eden hiperlökositoz/lökostaz sendromu masif solunum sıkıntısına neden olabilir. Çoklu kemoterapi sırasında lösemili çocuklarda pulmoner komplikasyonların hemen hemen hepsinin infeksiyöz bir orijini vardır.

Lösemili çocuklarda ciddi kardiyomyopati ciddi septisemi, yüksek lökosit sayısı ve lenfoblastların hızlı yıkımının olduğu metabolik bozukluklar sırasında görülebilir. Geç kardiyomyopati antrasiklinler ile yoğun tedaviden sonra karşımıza çıkabilir (87,88).

2.2.4.8. Cilt bulguları

Monositik lösemili çocuklara göre ALL'li çocuklarda cilt bulguları nadiren görülür. Bununla birlikte trombositopeniye bağlı cilt içine kanamalara sekonder ciltte lenfoblastlar prolifere olabilir. Nadir görülen konjenital lösemide yenidoğanların %50'sinde cilt infiltrasyonu bildirilmiştir (89).

2.2.5. Laboratuvar Bulguları

Kan sayımı: Ortadan ağıra kadar giden bir spektrumda anemi gözlenir. Normositik normokrom eritrosit morfolojisi mevcuttur. Anemi ne kadar ağırsa löseminin süresi de o kadar uzun demektir, yüksek hemoglobin seviyeleri daha hızlı çoğalan lösemiyi düşündürür. Lökosit sayısı artmış, normal ya da azalmış olabilir. Periferik yaymada blastlar lökopenili

hastalarda az yada hiç olmayabilir. Lökosit sayısı 10000/mm^3'den çok olduğunda periferde blastlar genellikle çoktur. Eozinofili ALL'li çocuklarda sıklıkla görülür. Hastaların %92'sinde trombosit sayıları normalin altındadır (6).

Kemik iliği: Genellikle %80-100 oranında blastlar tarafından işgal edilmiştir. Megakaryositler genellikle yoktur. Lösemiden kemik iliği %5'den fazla blast içerdiğinde şüphelenilmelidir. Blastların ayırıcı özelliği diffüz dağılmış nükleer kromatine, bir veya birçok nukleolusa ve bazofilik bir stoplazmaya sahip göreceli olarak differansiye olmamış olmasıdır. Ayrıntılı hücre sınıflamalarına izin veren özel kemik iliği çalışmaları histokimya, immün fenotipleme ve sitogenetiği içerir (6).

Göğüs röntgeni: T hücreli lösemide mediastinal kitleyi göstermede faydalıdır.

Kan biyokimyası: Elektrolitler, üre, ürik asit, karaciğer fonksiyon testleri değerlendirilmelidir. Yüksek lösemik hücre yükü olan hastalarda sık görülen yüksek ürik asit seviyeleri artmış pürin anabolizma ve katabolizmasını gösterir. Hiperüriseminin major komplikasyonu ürik asit nefropatisidir ve ardından gelen böbrek yetmezliğidir. Hiperkalsemi kemik iliğinin infiltrasyonundan meydana gelebilir. Hücre yıkımından kaynaklanan artmış fosfor düzeyleri hipokalsemiyi tetikleyebilir (90).

BOS: Hücre yapısı ve biyokimyasına bakılarak SSS tutulumu belirlenmelidir.

Koagülasyon profili:Koagülasyon anormallikleri oluşabilir ancak genellikle hastalığın bir özelliği değildir. Tanıda veya terapinin erken aşamalarında koagülopatiler oluşsa da lösemiden çok genellikle terapi (L-asparaginaz) veya beraberindeki infeksiyon ile ilişkilidir (90).

Kardiyak fonksiyonlar, infeksiyöz hastalık profili tanı anında değerlendirilmesi gereken diğer laboratuar incelemeleridir (6).

2.2.6. Tanı ve hücre klasifikasyonu

Akut lösemi morfolojik, sitokimyasal, immünolojik, sitogenetik ve moleküler karakteristiklere göre sınıflandırılabilir.

2.2.6.1. Morfolojik Sınıflandırma

Hücre boyutu, nukleus-stoplazma oranı, nükleus şekli, nukleolusun sayısı ve belirginliği, bir boyama ajanı ile stoplazmik boyanmanın yoğunluğu ve doğası, stoplazmik granüllerin varlığı, stoplazmik vakuollerin belirginliği ve nükleer kromatinin karakteri gibi kriterleri kullanarak ALL hücrelerini morfolojik olarak sınıflandırmak için çeşitli çabalar gösterildi (91, 92). Bu çabaların çoğu başarısızlıkla sonuçlandı çünkü teknik olarak ya yapması zordu ya da anlamlı klinik korelasyondan yoksundu (93, 94). Bununla birlikte Fransız-Amerikalı-Britanyalı (FAB) Kooperatif Çalışma Grubu tarafından öne sürülen bir sistem kabul edildi (95, 96). FAB sistemi lenfoblastları üç gruba ayırmaktadır (Tablo 2.4). L1 lenfoblastları genellikle daha küçük, çok az stoplazmalı ve belirsiz nukleolusludur. L2 çeşidinin hücreleri daha büyüktür ve boyutta ciddi heterojenlik vardır, nukleolus belirgindir ve daha bol stoplazmalıdır. L3 tipli lenfoblastlar derin stoplazmik bazofilileri ile dikkat çekmektedir, büyüktür, belirgin stoplazmik vakuolleri vardır ve morfolojik olarak Burkitt lenfoma hücreleri ile eş görünümlüdür.

ALL'li çocukların %85 kadarı belirgin L1 morfolojisi, %14 kadarı L2, %1 kadarı L3 morfolojisi gösterir (97). L3 tipinin lenfoblastları hücre yüzey immünglobulini ve diğer karakteristik B hücre markerlarını taşır. Bununla birlikte FAB L1 ve L2 morfolojik tipleri ve immünolojik hücre yüzey markerları arasında hiç bariz bir korelasyon yoktur (98,99). Her ne kadar FAB sınıflandırmasına farklı yaklaşımların varlığı, çalışmalar arası kıyaslamayı zorlaştırsa da, bir grup bireysel çalışma FAB sınıflanmasının prognostik değeri olduğunu göstermiştir (100,101,102).

Tablo 2.4. Akut lenfoblastik lösemilerde FAB sınıflaması (6)

Hücresel özellikler§	L1	L2	L3*
Hücre büyüklüğü	Küçük hücreler çoğunlukta	Büyük, farklı Büyüklükte	Büyük, heterojen
Çekirdek kromatin	Homojen	Değişken, heterojen	İnce noktalanma tarzında
Çekirdek şekli	Düzgün bazen çentikli	Düzensiz genelde çentikli	Düzgün oval veya Yuvarlak
Çekirdekçik	Görülmez veya küçük belirsiz	Bir veya birden fazla, büyük	Bir veya birden fazla, veziküler
Sitoplazma	İnce	Değişken genellikle büyük	Büyük
Sitoplazmik bazofil	Az veya orta nadiren koyu	Değişken bazen koyu	Çok koyu
Sitoplazmada vakuoller	Değişken	Değişken	Genellikle belirgin

§ Her parametre için lösemik hücrelerin %10'u genel özellikleri taşımayabilir

* L3 tipi morfolojik olarak tanımlanıp spesifik özellik gösteren tek gruptur; hücre membranında yüzey IgM reseptörü taşırlar

2.2.6.2. Sitokimyasal sınıflandırma

Sitokimyasal boyalar ALL'nin klinik ve immünolojik alt grupları arasında ayırım yapma yeteneklerine göre araştırılmışlardır. PAS, asit fosfataz, β-glukuronidaz, a-naftil asetat esteraz reaksiyonları değerlendirilmiştir (tablo 2.5) (103-107). Her ne kadar bazı korelasyonlar güçlü görünse de (örn:güçlü fokal paranükleer asit fosfataz aktivitesi T hücreli hastalıkta daha sık gibi görülmektedir) bu bilginin pratik kullanımı sınırlıdır ve FACS(Fluorescence Activated Cell Sorting) ile immünfenotipleme gibi daha sofistike immünolojik teknikler tarafından gölgede bırakılmıştır. Mevcut immünolojik veya moleküler metodlarla kesin olarak sınıflandırılamayan nadir akut lösemi vakalarında platelet peroksidaz veya myeloperoksidazın ultrastrüktürel saptanması hastalığın myeloid veya megakaryositik doğasını tanımlamada yararlı olabilmektedir (108).

Tablo 2.5. Akut lösemilerin sitokimyasal özellikleri

Sitokimyasal özellikler	Akut lenfoblastik lösemi	Akut myeloid lösemi
Enzimatik olmayan		
PAS	Kaba granüller veya bloklar halinde değişken sayıda hücrede pozitif	Negatif veya diffüz pozitif
Sudan Black	Negatif	Pozitif
Enzimatik		
Peroksidaz	Negatif	Pozitif
Alkali fosfataz	Normal	Düşük
Esterazlar		
Naphthol AS-D chloroacetate	Negatif	Pozitif
Naphthol AS-D acetate	Negatif veya zayıf pozitif	Pozitif
a-Naphthyl acetate	Negatif	Negatif
Asit fosfataz	T-ALL'de pozitif	Negatif

2.2.6.3. İmmünolojik sınıflandırma

Lösemik lenfoblastlar spesifik morfolojik ve sitokimyasal özelliklerden yoksun olduklarından immünfenotipleme tanısal değerlendirmenin temelidir. Lösemi tanısını koymak ve immünolojik subklonlar arasında ayrım yapabilmek için bir antikor paneli kullanılmaktadır. Bu panel en azından soya spesifik bir marker içermelidir örneğin B hücre serisi için CD19, T hücre serisi için CD7 ve myeloid hücreler için CD13 veya CD33 içermelidir. Ek olarak erken pre-B hücreli köken için sitoplazmik CD79a'nın, T hücreli köken için stoplazmik CD3'ün kullanımı net olmayan immünfenotipleri ayırt etmede yardımcı olabilir (6). Her ne kadar ALL, B serisi (erken pre-B, pre-B, geçiş pre-B, matür B) veya T serisi (erken, orta, geç timosit) yolaklarında bilinen normal matürasyon basamaklarına göre alt gruplara ayrılabilirse de terapötik önem açısından farklılık sadece T hücreli, matür B hücreli ve diğer B hücreli (B hücreli prekürsör) immünfenotipler arasındadır (109). ALL'nin altı immünolojik alt tipi ve onların klinik özellikleri tablo 2.6'da sunulmuştur. Bazı çalışmalarda

B hücreli prekürsör ALL vakaları CD10 pozitif (Common ALL diye adlandırılan) ve CD10 negatif olarak iki gruba ayrılırken, T hücreli seri ise pre-T(pro-T) ve matür T hücreli lösemi olarak ayrılır (110, 111). Prognostik önemlerine rağmen bu kategoriler tedavi seçiminde kullanılmamıştır.

Tablo 2.6. İmmünolojik alt tipe göre klinik özellikler

Alt tip	Tipik markerlar	Çocukluk çağı	İlişkili özellikler
B hücreli prekürsör	CD19+, CD22+, CD79a+, sIg±, yIgμ-, HLA-DR+		
Pre pre B	CD10-	%5	Yüksek lökosit sayısı Tanıda SSS lösemisi, Psödoploidi, MLL gen yeniden düzenlemeleri, kötü prognoz
Erken pre B	CD10+	%63	1-9 yaş grubu, düşük lökosit sayısı, hiperploidi
Pre B	CD10±, sIg+	%16	Yüksek lökosit sayısı, Psödoploidi, siyah ırk
B hücreli	CD19+, CD22+, CD79a+, sIg+, yIgμ+, sIgκ+ veya sIgλ+	%3	Erkek predominansı, tanıda SSS lösemisi, abdominal kitle, renal tutulum
T hücre serisi	CD7+, sCD3+		
T hücreli	CD2+, CD1±, CD4±, CD8±, HLA-DR-, TdT ±	%12	Erkek predominansı, hiperlökositoz, ekstra medüller hastalık
Pre-T hücreli	CD2-, CD1-, CD4-, CD8-, HLA-DR±, TdT+	%1	Erkek predominansı, Hiperlökositoz, ekstramedüller hastalık, kötü prognoz

sCD3, stoplazmik CD3; sIg, stoplazmik immünglobulin; yIg, yüzey immünglobulin; TdT, terminal deoxynucleotidyl transferase

2.2.6.4. Sitogenetik ve moleküler sınıflandırma

Lösemide gözlenen sitogenetik anormalliklerin biyolojik ve prognostik önemi vardır. Lösemi sitogenetiğinin öneminin anlaşılması, lökomogenezin çeşitli mekanizmalarını anlamak için moleküler metodların kullanılması ile sonuçlanmıştır. Prognostik öneme sahip spesifik sitogenetik anormallikler tablo 2.7'de gösterilmiştir (6).

İki ploidi grubunun (hiperploidi >50 kromozom ve hipoploidi <45 kromozom) klinikle ilişkisi vardır. Hiperploidi çocukluk çağı vakalarının yaklaşık %25'inde görülür ve

metotreksat ve onun poliglutamatlarının artmış hücresel birikmesi, terapötik antimetabolitlere artmış duyarlılık ve bu hücrelerin apoptozise girme eğiliminde artışın sonucunda iyi prognoz ile ilişkilidir (112-114). Tersine hipoploidi istisnai olarak kötü prognoz ile ilişkilidir (115-118). Hücresel DNA içeriğinin flow sitometrik olarak değerlendirilmesi sitogenetik analize faydalı bir yardımcıdır çünkü otomatik, hızlı ve pahalı olmayan bir yöntemdir ve ölçümleri hücre popülasyonunun mitotik indeksinden etkilenmez, sonuçlar neredeyse tüm vakalardan alınabilir.

Tablo 2.7. ALL'de kromozomal anormalliklerin prognostik önemi

Kromozomal anormallikler	5 yıllık olaysız sağ kalım (güven seviyesi)
Hipeploidi	
>50 kromozom	%80 (%65–90)
47–50 kromozom	%90 (%50–98)
Triploidiye yakın, 66–73 kromozom	Bilinmiyor, muhtemelen iyi
Tetraploidiye yakın, 82–94 kromozom (klinik özellikleri: daha sık T-ALL; L2 morfolojisi; bir veya daha fazla myeloid antijenin ekspresyonu)	Bilinmiyor, muhtemelen <%60
Normal diploid, 46 kromozom	%80 (%65–90)
Hipoploidi, <46 kromozom	%71(%55–85)
Pseudodiploid	%73(%55–85)
t(1;19)	%53
t(4;11)	%45
t(9;22)	%14

En önemli tranlokasyonlar ve klinikle ilişkileri aşağıdaki gibidir;

1.*TEL-AML1* füzyon geni t(12;21)(p13q;q22).t(12;21) standart sitogenetikle vakaların %1'inden azında saptanırken, moleküler teknikler kullanılarak pre-B vakalarının %25'inde saptanır. Bu translokasyon mükemmel bir prognozla ilişkildir.

2. *BCR-ABL* füzyon geni t(9;22)(q34;q11). t(9;22) pediatrik ALL vakalarının yalnızca %3-5'inde meydana gelir. Bu erişkin ALL'de tam terstir, erişkinlerde bu translokasyon vakaların %25'inde ve KML vakalarının %95'inde mevcuttur. Pediatrik *BCR-ABL* pozitif ALL'de,

BCR kırılma noktası 190-kb protein(p190) üretir, KML'de ise farklı bir protein p210 genellikle üretilir. Pediyatrik ALL'de t(9;22) genellikle büyük yaş ve tanı anında yüksek lökosit sayısı ile ilişkilidir.

3. *E2A-PBX1* füzyon geni t(1;19)(q23;p13.3). t(1;19) tanı anında sıklıkla yüksek lökosit sayısı ile ilişkilidir ve pre-B stoplazmik Ig pozitif fenotipli vakaların %25 kadarında mevcuttur. Bu alt tipte yoğun tedavi gerekmektedir.

4.Kromozom band 11q23'deki *MLL* gen düzenlemeleri infantlardaki ALL vakalarının %80 kadarını, daha büyük çocuklardaki ALL vakalarının %3 kadarını ve topoizomeraz II inhibitörünü ilgilendiren sekonder AML vakalarının %85'ini etkiler. Bu tranlokasyon yoğun tedaviye rağmen %20'den daha az sağ kalım ile çok kötü prognoz taşır.

5.B hücreli ALL translokasyonları 8q24 kromozomu üzerinde *MYC* genlerini ilgilendirir. B ALL vakalarının %80 kadarı t(8;14)(q24;q32) taşır, geri kalan vakalar ise t(2;8)(p12;q24) veya t(8;22)(q24;q11) içerir. Tüm bu translokasyonlar *MYC* ekspresyonunu bozarlar ve Burkitt lenfoma tedavisinde kullanılan ajanlarla yoğun olarak tedavi edilmeleri gerekir (6).

2.2.7. Gelecekte ALL sınıflandırması

ALL sınıflandırmasının geleceğini ilgilendiren iki yön bulunmaktadır. Bunlardan ilki DNA mikroassay teknolojisidir. Bu şekilde gen ekspresyon profili oluşturmak biyolojik ve prognoz olarak farklı ALL alt gruplarını tanımlamak için kullanılabilir, lökomogenezden sorumlu genler tanımlanabilir ve hedeflenmiş tedavinin geliştirilebileceği genler belirlenebilir. İkincisi de konak farmakogenomiğidir. İlaç metabolize eden enzimleri kodlayan genler için gen polimorfizmleri kemoterapinin etkinliği veya toksisitesini etkileyebilir. Örneğin;

a. Merkaptopürini inaktivasyonunu katalize eden Thiopurine metiltransferaz(TPMT)'daki gen polimorfizmi. Toplumun %10'nu en azından bir varyant alel taşır. Bu merkaptopürinin aktif metabolitlerinin yüksek seviyelerde olması ile sonuçlanır. Bu hastalar özellikle homozigot olanlar yan etkiler açısından yüksek risklidir ve 6-merkaptopürin dozlarında ciddi azalmaya ihtiyaç duyarlar.
b. Metotreksatın hedefi olan timidilat sentetaz için gen polimorfizmi artmış enzim ekspresyonu ve ALL'de kötü prognoz ile ilişkilidir(6).

2.2.8. Prognostik faktörler

Yaşları 1 ve 9 arasında ve başlangıç lökosit sayısı <50000/mm^3 olan pre-B ALL vakalarının 2/3'ünü kapsayan hastaların dört yıllık olaysız sağ kalımı %80'dir. Kalan yüksek riskli hastaların dört yıllık olaysız sağ kalımı %65'dir (6). Çeşitli uluslar arası çalışmalarda saptanan beş yıllık olaysız sağ kalım tablo 2.8'de sunulmuştur.

Tablo 2.8.Çocukluk çağı akut lenfoblastik lösemisinde uluslararası çalışmaların sonuçları (35)

			5 YILLIK OLAYSIZ SAĞ KALIM*				
ÇALIŞMA	**YIL**	**YAŞ**	**HASTA SAYISI**	**TÜM(%)**	**STANDART (B-ALL) (%)**	**YÜKSEK (B-ALL) (%)**	**T-ALL(%)**
AIEOP-91	1991–1995	≤15	1194	70.8 ± 1.3	79.9 ± 1.5	61.5 ± 2.9	40.4 ± 4.1
BFM-90	1990–1995	≤18	2178	78.0 ± 0.9	87.4 ± 1.0	66.3 ± 2.1	61.1 ± 2.9
BFM-05	1995–1999	≤18	2012	79.0 ± 1.0	MD	MD	MD
CCG-1800	1989–1995	≤21	5121	75 ± 1	80 ± 1	67 ± 2	73 ± 2
COALL-CLCG-92	1992–1997	≤18	538	76.9 ± 1.9	82.1 ± 2.4	75.7 ± 3.9	71.2 ± 5.1
DCLSG-8	1991–1996	≤18	467	73 ± 2	79 ± 2	67 ± 5	71 ± 6
DFCI-91-01	1991–1995	≤18	377	83 ± 2	85 ± 2	82 ± 4	79 ± 8
EORTC-58881	1989–1998	≤18	2065	70.9 ± 1.1	78.4 ± 1.3	57.3 ± 2.4	64.4 ± 2.9
NOPHO-92	1992–1998	≤15	1143	77.6 ± 1.4	85.2 ± 1.5	67.9 ± 3.3	61.3 ± 4.9
POG	1986–1994	≤21	3828	70.9 ± 0.8	77.4 ± 0.9	55.3 ± 1.6	51.0 ± 2.4
SJCRH-13B	1994–1998	≤18	247	80.8 ± 2.6	87.3 ± 3.2	76.7 ± 4.6	71.9 ± 6.8
TCCSG-L92-13	1992–1995	≤15	347	63.4 ± 2.7	67.8 ± 3.4	56.7 ± 5.4	59.3 ± 8.6
UKALL-XI	1990–1997	≤15	2090	63 ± 1.1	74 ± 2.2	59 ± 4.1	51 ± 3.5

*Standard risk grubu 1–9 yaşlarında, lökosit sayısı < 50 x 10^9/L olan çocuklar; yüksek riskli çocuklar infantlar dışındaki tüm diğerleri.

AIEOP, Associazione Italiana di Ematologia ed Oncologia Pediatrica; BFM, Berlin-Frankfurt-Münster ALL Study Group; CCG, Children's Cancer Group; COALL, Cooperative ALL Study Group; DCLSG, Dutch Childhood Leukemia Study Group; DFCI, Dana Farber Cancer Institute ALL consortium; EORTC-CLCG, European Organisation for Research and Treatment of Cancer, Children's Leukaemia Cooperative Study Group; NOPHO, Nordic Society of Pediatric Hematology and Oncology; POG, Pediatric Oncology Group; SJCRH, St Jude Children's Research Hospital; TCCSG, Tokyo Children's Cancer Study Group; UKALL, UK Medical Research Council Working Party on Childhood Leukaemia;MD, Mevcut Değil.

1. Yaş: Bir yaşın altında ve 10 yaştan büyük çocuklar >1 yaş ve <10 yaş çocuklardan daha kötü prognoza sahiptir. Bir yaş altı çocuklar en kötü prognozludur.
2. Lökosit sayısı: Lökosit sayısı yüksek olan çocuklar kötü prognozludur.
3. İmmünfenotip: Erken pre-B hücreli ALL en iyi prognozludur. Matür T hücreli ALL tanı anında büyük yaş ve yüksek lökosit sayısı ile ilişkisine bağlı olarak daha kötü prognozludur. Matür B hücreli ALL önceleri erken relaps ve SSS tutulumu ile kötü prognozlu idi ancak yeni agresif tedaviler prognozu iyileştirdi.
4. DNA indeksi: Elli kromozomdan fazla, >1.16 hiperploid ALL, artmış apoptoz ve kemoterapötik ajanlara artmış duyarlılığa bağlı iyi prognoz ile ilişkilendirilmiştir.
5. Sitogenetik: Kromozom 4, 10, 17'nin trizomilerinin kombinasyonları çok düşük tedavi başarısızlığı ve iyi prognozla ilişkilendirilmiştir. 11q23 üzerindeki MLL yeniden düzenlenmelerini içeren translokasyonlar daha kötü prognozla ilişkilendirilmiştir. Philadelphia kromozomlu t(9;22)(q34;q11) ALL tedavi etmesi en zor ve kötü prognozlu olandır. Hipoploid ALL ayrıca kötü prognozla ilişkilidir.
6. SSS hastalığı: Tanı anında SSS hastalığının varlığı SSS ışınlaması ve ek intratekaller ile tedavinin güçlendirilmesine rağmen kötü prognostik öneme sahiptir.
7. İndüksiyon tedavisine erken yanıt: İndüksiyon tedavisinin sonunda remisyonda olmayan hastalar çok kötü prognozludur (6).

2.2.9. Tedaviye yanıt

Tedaviye yanıt lösemik hücrenin biyolojik özellikleri (intrensek ilaç duyarlılığı), konağın farmakodinamik ve farmakogenomik özellikleri, verilen tedaviler ve tedavi uyumu ile bütün olarak belirlenir. Remisyon indüksiyon terapisinin erken dönemlerindeki lösemik hücre klonunun azalma derecesinin, biyolojik ve klinik özelliklerle tanımlanmış düşük riskli vakalarda bile, (119) bağımsız prognostik önemi vardır (35,120, 121-124). Bununla birlikte tedavi yanıtını değerlendirmek için geleneksel olarak kullanılan morfoloji temelli metodlar bu hücresel küçülmeyi güvenilir olarak ölçmek için ne yeteri kadar kesin ne de hassastır (35,125). Morfolojik belirlemelerden en az 100 kat daha duyarlı olan moleküler ve flow-sitometrik metodlar şimdi minimal rezidüel löseminin çok düşük seviyelerde (<%0.01) saptanmasına olanak sağlar, böylelikle relaps riski çok düşük veya yüksek olan hastalar belirlenebilir (35,120,121-125). Aslında remisyon indüksiyon tedavisinin 4-6 haftasının sonunda %1 veya daha fazla lösemik hücresi olan hastalar kabul edilen morfolojik standart

(≥%5 lösemik hücre) ile klinik remisyona ulaşmayı başaramayanlar kadar kötü prognozludurlar oysa ki moleküler veya immünolojik remisyonu başaranların (<%0.01 lösemik hücreler) mükemmel prognozu vardır (35,120).

Erişkinlerdeki bir çalışmanın bulguları minimal rezidüel löseminin takip edilmesinin yaklaşmakta olan bir relapsın erken saptanması ve böylelikle erken tedavi ile araya girmek için kullanılabileceğini göstermiştir (126).

Rezidüel lösemik T hücreleri terminal deoksinükleotidil transferaz ve stoplazmik CD3 pozitifliği ile kolayca saptanabilir. B prekürsör hücreli ALL'de minimal rezidüel lösemiyi saptamak için basit ve pahalı olmayan bir test geliştirilmiştir (127). Normal, immatür, CD19+ B hücreli progenitörler (CD10, CD34 veya her ikisini de eksprese ederler) kortikosteroidlere ve diğer antilösemik ilaçlara mükemmel bir biçimde duyarlıdırlar ve remisyon indüksiyon terapisinin iki haftasından sonra kemik iliğinde tutarlı bir biçimde saptanamayacak düzeylerdedir. Bu yüzden remisyon indüksiyon terapisinin iki haftasından sonra bu immünfenotipli her hücre minimal rezidüel lösemiyi ifade eder (127).

2.2.10. Tedavi

Kısa süreli yoğun kemoterapi (yüksek doz Mtx, ARA-C, siklofosfamid içeren) ile tedavi edilen matür B hücreli akut lenfoblastik lösemi hastaları haricinde (128-130) akut lenfoblastik löseminin tedavisi tipik olarak remisyon indüksiyonu fazı, konsolidasyon fazı ve rezidüel hastalığı yok etmek için idame tedavisinden oluşur. Tedavi ayrıca SSS'de sekestre olmuş lösemik hücrelere bağlı gelişebilecek relapsı önlemek için klinik seyrin erken aşamalarında SSS'ye yönlendirilmiştir (120).

2.2.10.1. Remisyon indüksiyonu fazı

Remisyon indüksiyonu tedavisinin hedefi başlangıçtaki lösemik hücre yükünün %99'undan fazlasını eradike etmektir ve normal hematopoez ve sağlıklı performans durumuna dönüşü sağlamaktır. Bu yaklaşım tipik olarak bir glikokortikoid, vinkristin ve en azından üçüncü bir ilacı içerir. Üç ilaçlı indüksiyon rejimi, çoğu standart risk hasta için güçlendirilmiş postremisyon tedavisi alacakları düşünüldüğünde yeterlidir. Yüksek riskli veya

çok yüksek riskli ALL'li çocuklar ve tüm erişkin vakalar remisyon indüksiyonu için dört ilaçlı rejimlerle tedavi edilirler.

2.2.10.2. Konsolidasyon (intensifikasyon) fazı

Normal hematopoez ve vücut fonksiyonunu kazanmayla birlikte intensifikasyon tedavisi genellikle ilaç dirençli rezidüel lösemi hücrelerini eradike etmek ve böylelikle relaps riskini azaltmak için kullanılır. Örneğin *TEL-AML1* pozitif hastaların kortikosteroidler, vinkristin ve asparaginazdan oluşan post-remisyon kemoterapisini içeren klinik çalışmalarında iyi bir prognozu vardır (131,132). Her ne kadar bu tedavi fazının önemi nadiren tartışılsa da tedavi süresi ve en iyi tedavi rejimleri hakkında konsensus yok denecek kadar azdır. Sıklıkla kullanılan stratejiler yüksek doz metotreksat ve merkaptopurini içerir, reindüksiyon tedavisi başlangıçta kullanılan ilaçlarla yapılır, 20-30 hafta süre ile vinkristin, kortikosteroid ve yüksek doz asparaginaz'ın sık tekrarlayan pulse tedavileri uygulanır (120,133,134). Güçlendirilmiş rejim ise reindüksiyon tedavisi ve myelosüpresyon dönemlerinde vinkristin, asparaginaz ve intravenöz metotreksat içerir.

Metotreksatın en iyi dozu kişinin farmakogenetik ve farmakokinetik değişkenlerine ve lösemik hücre genotipine bağlıdır. Metotreksatın 1-2 g/m^2 dozu, standart risk ALL'li çoğu hasta için yeterlidir ancak yüksek dozdan, 5 g/m^2 dozundan T hücreli veya yüksek riskli B prekürsör hücreli hastalığı olan kişiler fayda görebilir (135,136). Metotreksat poliglutamatlarının *TEL-AML1* veya *E2A-PBX1* füzyonu olan blast hücrelerinde oldukça az birikmesi bu genotiplerdeki hastaların ayrıca yüksek doz metotreksat seviyelerinden de fayda görebileceğini düşündürür (137). Bununla birlikte ALL hastaları için metotreksatın mega dozları (örn: 33.6 g/m^2) gerekli görülmemektedir (138). Lökovorin ile kurtarma her ne kadar yüksek doz metotreksat tedavisinden sonra gerekli olsa da çok erken veya çok yüksek verilmemelidir çünkü metotreksatın antilösemik etkileri ile etkileşebilir (136, 138, 139).

2.2.10.3. İdame fazı

Akut lenfoblastik lösemili hastalar anlaşılması zor sebeplerden dolayı relapsı önlemek veya önüne geçmek için idame tedavisine ihtiyaç duyarlar. Her ne kadar çocukluk çağı vakalarının 2/3'ü başarılı bir şekilde tedavinin yalnızca on iki ayı ile kür elde edebilirken, prospektif olarak herhangi bir kesinlikle tanımlanamazlar (140). Bundan dolayı tüm hastalar

2-2,5 yıl tedavi alırlar. Günlük merkaptopürin ve her hafta metotreksat idame rejimlerinin bel kemiğini oluşturur. Pek çok araştırıcı idame fazı sırasında yeterli doz yoğunluğunu sağlamak için ilaç dozlarının lökosit sayısı $3x10^9$/L altında ve nötrofil sayılarının 0.5 ve $1.5x10^9$/L arasında kalacak şekilde ayarlanmasını savunur (120).

Model sistemlerinde tiyoguanin merkaptopürinden daha potent olduğundan, BOS'ta ve hücrelerde tiyoguanin nüklotidleri yüksek konsantrasyonlara ulaştığından (141) pek çok randomize kontrollü çalışma, bu iki ilacın etkinliğini kıyaslamak için yapılmıştır (142-144). Tiyoguanin 40 mg/m^2 veya daha fazla günlük dozda verildiğinde merkaptopurine göre daha üstün antilösemik yanıtlar oluşturmuştur ancak derin trombositopeni, remisyonda artmış ölüm riski ve kabul edilemez yükseklikte (%10-20) hepatik veno okluzif hastalık ile ilişkilendirilmiştir (142-144). Her ne kadar tiyopürin metiltransferazın düşük aktivitesi tiyoguanin ilişkili karaciğer hasarı ile ilişkiliyse de bu ölçüm güvenilir şekilde risk altında olan hastaları tanımlayamamaktadır (145). Bu yüzden tiyoguanin tedavinin güçlendirme fazı sırasında kısa dönemli tedavilerde hala kullanılsa da merkaptopürin ALL için tercih edilen ilaç olarak kalmaktadır. Çok merkezli randomize bir çalışmada erken idame tedavisi sırasında vinkristin ve deksametazonun altı pulse olarak eklenmesi orta riskli ALL'li çocuklarda sonuçlarda iyileşmeyi sağlayamamıştır. (146). Daha yoğun pulse tedavilerin günümüzde sonucu iyileştirip iyileştirmeyeceğinin araştırılması gerekmektedir.

2.2.11. Allojeneik hematopoetik kemik iliği transplantasyonu

Allojeneik hematopoetik kök hücre transplantasyonu akut lenfoblastik lösemi tedavisinin en yoğun tedavi formudur. Kemik iliği transplantasyonu ve yoğun kemoterapi arasındaki kıyaslamalar, vaka seçim kriterlerindeki farklılıklar ve çalışılan az sayıda vakaya bağlı çelişkili sonuçlar vermiştir (147-150). Yine de allojeneik tranplantasyon Philadelphia kromozom pozitif hastalığı ve tedaviye kötü başlangıç yanıtı olan kişiler gibi yüksek riskli ALL'li çeşitli hasta altgruplarında fayda göstermektedir (147,150,151,152,153,154). Çalışmaların bulguları MUD (matched unrelated donor) veya kordon kanı transplantasyonunun sonuçlarının, doku grubu uyumlu donörlerle elde edilen sonuçlarla kıyaslanabilir olduğunu ortaya koymaktadır (155, 156). Bu işlemle ilişkili mortalite ve morbidite düşünüldüğünde ve effektif hedeflenmiş tedavinin gelişen beklentileri ile allojeneik

transplantasyon ihtiyacı sürekli olarak yeniden değerlendirilmelidir. Otolog tranplantasyon çok çeşitli pratik avantajına rağmen hem erişkin hem de pediatrik ALL'de sonucu etkilemede yetersiz kalmıştır (148, 157).

2.3. DOĞAL ÖLDÜRÜCÜ(NK) HÜCRELER

2.3.1. Giriş

NK hücreleri memelilerdeki en büyük üçüncü lenfosit popülasyonunu oluşturur ve doğal (innate) immün yanıtlar için kritik öneme sahiptir. İnhibitör ve aktivatörler olarak adlandırılan ve fonksiyonlarını düzenleyen çeşitli reseptörlerin varlığı ile karakterizedir. Bu hücreler kemik iliği ve aynı zamanda lenf düğümleri kaynaklı geniş, granüler lenfositlerdir. Bununla birlikte NK hücreleri T hücrelerinden veya B hücrelerinden farklıdır ve morfolojik, fenotipik ve fonksiyonel özellikleri vardır. Bu hücreler doğal olarak oluşur ve T ve B lenfositlerinden farklı olarak aktivitelerinin ifadesi için önceden duyarlanmaya ihtiyaç duymazlar. NK hücreleri kana dolaşan hücreler olarak ve vücudun diğer organlarına ise yerleşmiş hücre olarak dağılmıştır. Periferik kanda karakteristik olarak büyük granüler lenfosit(LGL) morfolojisine sahip olarak tanımlanırken, dokularda akciğer ve dalakta gösterildiği gibi organın mikroçevresinin NK hücresinin aktivitesi ve fenotipi üzerinde etkisi vardır (158).

NK hücre fonksiyonları üç kategoride sınıflanabilir:

(A) Sitotoksisite – NK hücreleri virüslerle enfekte hücreleri ve tümör hücrelerini MHC ekspresyonundan bağımsız olarak öldürebilir. NK hücreleri perforin ve çeşitli granzimler içeren oldukça çok sayıda sitolitik granüllere sahiptir. NK hücresi ve hedefi arasında temas sırasında bu granüller duyarlı hedef hücre ile oluşan temas zonuna (immünolojik sinaps diye adlandırılan) taşınırlar ve lizisi gerçekleştirmek için salınırlar. Her ne kadar NK hücreleri perforinden bağımsız olarak, Fas ligand, TNF veya TNF ilişkili apoptoz indükleyen ligandı (TRAIL) kullanarak (daha az efektif ve daha yavaş olsa da) öldürebilirse de perforin bağımlı sitotoksisite NK hücre lizisinin ana mekanizmasıdır.

(B) Sitokin ve kemokin sekresyonu – NK hücreleri en iyi IFNγ üretme yetenekleri ile bilinmelerine rağmen TNF-α, GM-CSF, IL-5, IL-13, CCL3/MIP-1a, CCL4/MIP-1b ve CCL5/RANTES dahil olmak üzere bir grup diğer sitokin ve kemokini de üretirler (159-161).

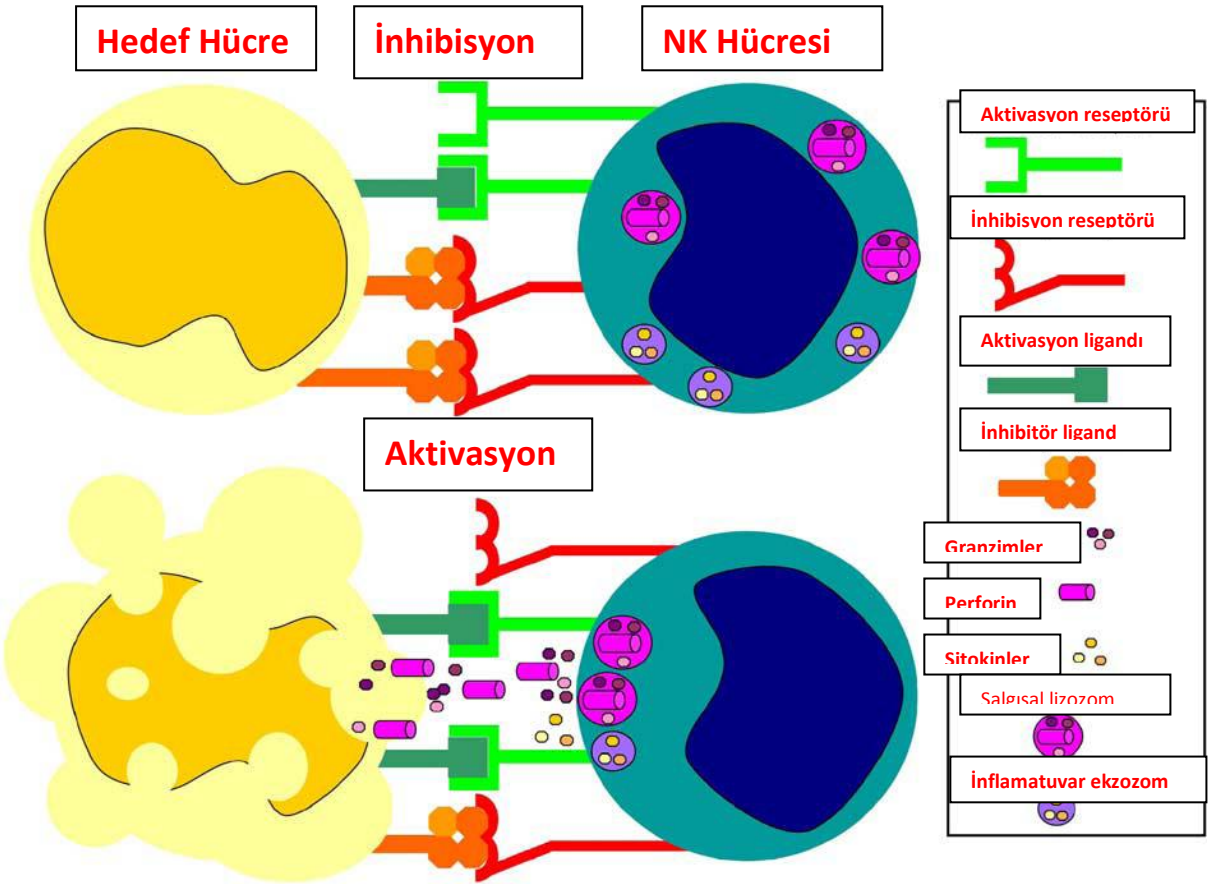
Öldürme ve sitokin salınımı (muhtemelen yüzeylerindeki CD56 ekspresyonunun yoğunluğu ile ayrılan) iki farklı NK hücre alt grubu ($CD56^{sönük}$, $CD56^{parlak}$) tarafından düzenlenir.

(C)Temas bağımlı hücre kostimülasyonu – NK hücreleri T veya B hücrelerine kostimülatuvar sinyaller göndermelerini sağlayan, CD40L (CD154) ve OX40L de dahil olmak üzere çok sayıda kostimülatuvar ligand eksprese ederler (162,163). Böylelikle NK hücreleri doğal ve kazanılmış bağışıklık arasındaki interaktif düğümde köprü rolü oynarlar. Dendritik hücreler (DC) NK hücrelerini stimüle ederler, böylelikle NK hücreleri optimal immün yanıtı sağlamak için B veya T hücrelerine kostimülatuvar sinyal gönderir.

NK hücre aktivasyonu ve inhibisyonu için mevcut model spesifik aktivatör ve inhibitör reseptörler arasındaki fonksiyonun dengesi üzerine kuruludur. Denge inhibitör sinyaller tarafında olursa hücre fonksiyonuna neden olan hücre içi olaylar olmayacaktır. Denge aktivasyon sinyalleri tarafında olursa, NK hücreleri fonksiyonlarını yerine getirmek için bir seri hücre içi basamak ve kontrol noktasına ilerleyebilir. NK hücresi tarafından alınan inhibitör ve stimülatuvar sinyallerin dengesi hedef hücrelerle ilişkilerin sonucunu belirler (şekil 2.1). Stimülatuvar ligandlar tarafından dağıtılan sinyaller MHC class I molekülleri tarafından dağıtılan inhibitör sinyallerle dengelendiğinde normal hedef hücreler NK hücreleri tarafından öldürülmekten kurtulurlar.

Bununla birlikte eğer bir hedef hücre MHC class I moleküllerinin ekspresyonunu kaybederse (transformasyon veya infeksiyonun sonucu olarak) hedef hücre tarafından dağıtılan stimülatuvar sinyaller inhibitör sinyaller olmadığından rakipsiz kalır ve NK hücre aktivasyonu ve hedef hücrenin yıkımı ile sonuçlanır (kendi hücrelerini tanımanın kaybolması-missing self recognition). Transformasyon veya infeksiyon ayrıca stimülatuvar liganların ekspresyonunu indükleyebilir böylelikle inhibitör reseptörler tarafından yayılan temel inhibisyon yenilmiş olur (tetiklenmiş kendini tanıma) (induced self recognition) (158).

Geçmişte NK hücrelerinin temel fonksiyonu duyarlı virüsle enfekte veya tümör hedef hücrelerini öldürme kapasiteleri ile ilişkiliydi. Günümüzde bu hücrelerin parazitik hastalıklar ve intrasellüler patojenlere karşı konak savunması, kemik iliği naklinde rejeksiyon, reprodüksiyon ve annenin fetusu toleransı gibi konularda kilit roller oynadığı ayrıca gösterilmiştir (164).



Şekil 2.1. NK hücre inhibisyonu ve aktivasyonu şeması. NK hücresi (sağ) hedef hücre (sol) ile etkileşime geçtiğinde ya inhibitör(üstte) bir sinyal alır yada aktivatör(altta) bir sinyal alır. İnhibitör etkileşimde hem aktive edici hem de inhibitör reseptörler bağlanabilir fakat inhibitör reseptör etkileşimi üstün gelir. Aktivasyon durumunda aktive edici reseptörlerin çoğunluğu inhibitör sinyale üstün gelir. Bu sekretuvar cisimlerin temas noktasına (immünolojik sinaps) ulaşmasını sağlayan hücre yüzey moleküllerinin ve hücre iskeletinin yeniden organizasyonu ile sonuçlanır. Bu yer değiştirme olduktan sonra granüller sitotoksik etkilerini yerine getirmek için eksositoza uğrarlar (164).

2.3.2. NK hücre reseptörleri

Morfolojik olarak geniş granüler lenfositler(LGL) olarak sınıflanan NK hücreleri kazanılmış bağışıklığın hücrelerinin tersine önceden duyarlanma olmadan hedef hücreleri hızlıca parçalayabilir. İşlevsel olarak bir grup allojeneik hedefe karşı non spesifik, temas bağımlı, fagositik olmayan ve bir antijenle önceden duyarlılaşma gerektirmeyen sitolitik aktivite sergilerler. NK hücreleri sitolitik faaliyetlerini aktive eden veya inhibe eden çeşitli reseptörler eksprese ederler. Bu reseptörler hedef hücrelerdeki hem endojen hem de eksojen çeşitli ligandlara bağlanırlar ve NK hücre yanıtını düzenlemede önemli rolleri vardır (158).

NK ve T hücreleri benzer olarak CD2 eksprese ederler ve LFA-1(Lymphocyte function-associated antigen 1) yüzey antijenini efektör hücrenin hedef hücrelere adezyonunu arttırmak

için kullanır. Bununla birlikte insan NK hücreleri T lenfositlerden CD56, CD16 gibi ayrı fenotipik markerların ekspresyonu ve yeniden düzenlenmiş T hücre reseptör gen ürünlerinin ve CD3 yokluğu ile ayrılırlar. Bir zamanlar hayli homojen olarak düşünülürken şimdilerde NK hücrelerinin oldukça çeşitli olduğu bilinmektedir. Bir bireyde reseptörlerin farklı kombinasyonlarının ekspresyonu, immün yanıtta spesifiklikler gösteren farklı özelliklerde bir NK hücre repertuvarını oluşturur (158).

NK hücrelerinin neredeyse %80'i CD2 antijenini eksprese eder ve CD2 negatif popülasyon periferik kandaki NK hücrelerinde bulunur (165). Adhezif özellikleri yanında CD2 ayrıca NK hücreleri üzerinde kostimülatuvar molekül olarak da görev yapar. LFA-1 integrindir ve α_L(CD11a) ve β_2 (CD18) polipeptidlerininin heterodimeri olarak eksprese edilir. LFA-1 intersellüler adezyon molekülü (ICAM)-1'i ICAM-5 sayesinde bağlar (166,167). Her ne kadar NK hücreleri diğer integrinleri eksprese etse de LFA-1'in hedef hücre lizisinde esas rolü oynadığına inanılır. CD16, ayrıca CD56'yı orta seviyelerde eksprese eden ($CD56^{sönük}$) periferik kandaki NK hücrelerinin büyük bir alt grubunda eksprese edilir. Fenotipik ve fonksiyonel olarak ayrı $CD56^{parlak}$, $CD16^{-}$ NK hücre alt grubu periferik kandaki NK hücrelerinin %10'nundan azını oluşturur. $CD56^{sönük}$ NK hücreleri ADCC'ye CD16'yı bağlayarak aracılık ederler.

2.3.2.1. Aktive edici NK hücre reseptörleri

Yapısal olarak farklı bir grup reseptör NK hücrelerinin effektör fonksiyonlarının aktivasyonunda görev alır. NK hücrelerini aktive etmek için reseptörlerin gerekli veya yeterli olup olmadığı henüz net olarak belli değildir.

Aktivasyon reseptörleri üç kategoride gruplanır:

(A)İmmün reseptör tirozin temelli aktivasyon motifi (ITAM) içeren alt gruplar (örn:CD16, NKp46, NKp44),

(B)DAP10 ilişkili reseptör NKG2D ve diğer reseptörler (örn:2B4, CD2, DNAM-1) (170-172).

(C)NKp46, NKp44 ve NKp30'dan oluşan doğal sitotoksisite reseptörleri (NCR)

NCR transforme hücrelere karşı NK hücre sitotoksisitesinde temel rolü oynarlar. Her ne kadar NCR ligandları belirlenmediyse de IL-2 ile aktive edilmiş ve dinlenmekte olan NK hücrelerinde NCR'ye karşı antikorlar tümör hücrelerinin lizisini bloke etmektedir. HLA sınıf I

ligandlarını tanımayan reseptörler olan NCR'ler ek stimulus yokluğunda NK hücrelerini aktive edebilme yetenekleri ile bilinirler. NKp30 ve NKp46 tüm NK hücreleri tarafından eksprese edilirken, NKp44 ekspresyonu aktive olmuş NK hücrelerine sınırlıdır. Her ne kadar kesin bir fenomen olup olmadığı bilinmese de NK hücre klonları yüzey reseptör yoğunluklarına göre NCR^{parlak} veya $NCR^{sönük}$ olarak tanımlanırlar ve yüksek NCR seviyeleri pek çok hedef hücreye karşı yüksek doğal sitotoksisite ile koreledir. Aslında NCR ve NKG2D arasında tamamlayıcı bir ilişki varmış gibi görünmektedir ve $NCR^{sönük}$ klonlar tümör hücrelerini NKG2D bağımlı bir şekilde öldürürler. NCR ve NKG2D birlikte geniş bir çeşit tümör hedef hücre tipine karşı NK hücreleri tarafından yönlendirilen sitotoksisitenin neredeyse tamamından sorumludurlar (158).

NKG2D'nin ligandlarının stresle indüklenen antijenler MICA, MICB ve ULBP oldukları bilinirken NCR'nin endojen ligandlarının tanımlanması gereklidir. Bununla birlikte NCR, NK hücreleri tarafından patojen-spesifik parçaları tanımaları için düzenlenmiş olabilir, hem NKp46, hem de NKp44 virüs spesifik hemaglütininleri tanıyıp, virüsle enfekte hücrelerin lizisini gerçekleştirirler. Tersine NKp30 insan sitomegalovirüsünün pp65 proteini tarafından hedefleniyormuş gibi görünmektedir, bu protein NKp30'a bağlanır ve NK hücre sitotoksisitesini inhibe eder. İmmün sistemin spesifik patojenler için NK hücre reseptörlerini seçimi ve spesifik viral proteinlerle bu reseptörlerin hedeflenmesi, immün yanıtta bu infeksiyonlara karşı onların önemini göstermektedir (158).

2.3.2.2. İnhibe edici NK hücre reseptörleri

NK hücreleri MHC sınıf I moleküllerini tanıyan ve NK hücre aracılı sitotoksisiteyi bloke eden çeşitli inhibitör reseptörleri eksprese eder. İnsanlarda bu reseptörler KIR (killer cell immünglobulin like reseptors) ailesini, lökosit immünglobulin benzeri reseptör (LILR) ailesini ve CD94/NKG2 lektin benzeri reseptörler ailesini içerir (168). Bu inhibitör reseptörler için bilinen ligandlar MHC sınıf I veya konağın molekülleri veya MHC sınıf I ile homolog olan patojenlerdir.

2.3.2.2.1. Katil Hücre İmmünglobulin Benzeri Reseptörler (Killer İmmünglobulin Receptor-KIR)

KIR insanlarda yeni evrimleşmiş immünglobulin benzeri ekstrasellüler alan reseptörlerinin multigen ailesine aittir ve klasik MHC I için ana reseptörlerdir. KIR belirli HLA alt tipleri (HLA-A, HLA-B, HLA-C) için spesifiktir. KIR ile inhibisyon NK hücre aktivasyonunu çok erken bir aşamada, aktin bağımlı aşamalardan önce bloke eder (158).

2.3.3. Antikor Bağımlı Sitotoksisite

Sitotoksisite NK hücrelerinin en iyi tanımlanan effektör fonksiyonudur ve tümör hücrelerini, virüslerle enfekte hücreleri, intrasellüler bakteriyel patojenlerle enfekte hücreleri ve yakın zamanda bildirildiği gibi immatür dendritik hücreleri (iDC) içerir. NK hücreleri makrofajlar ve diğer pek çok hücre tipi ile birlikte antikorların Fc kısmını bağlayan aktive edici biyokimyasal reseptör olan FcR reseptörünü eksprese ederler. Bu NK hücrelerinin hedef hücreleri ADCC (antikor bağımlı hücresel sitotoksisite) yoluyla parçalamalarını sağlar. Pek çok aktive edici reseptör CD16, NKG2C, NKG2D, LFA-1, 2B4 ve doğal sitotoksisitie reseptörleri (NKp30, NKp44 ve NKp46) NK hücreleri üzerinde bulunur ve bu reseptörlere bağlanılması ayrıca aktivasyon ve artmış sitotoksisite ile sonuçlanır (158).

2.3.4. Sitokinler

2.3.4.1. İnterferonlar

IFN'ler ilk olarak 1957'de isimlendirilmişlerdir. Üç majör gruba ayrılır. IFN'nin 2 orijinal grubu tip I ve tip II' dir. Tip I; immün olmayan IFN ve tip II immün IFN olarak adlandırılır. Tip II (IFNγ), spesifik immün reaksiyonlarda yüksek miktarda üretilir. Oysaki tip I IFN' ler non-spesifik uyarı ile çoğu hücre tarafından üretilebilirler. Tip I IFN'ler IFNα, IFNβ, IFNε, IFNκ, IFNω, IFNδ, IFNτ, IFNξ/limitin' den oluşmaktadır. Antiviral ve antiproliferatif etkiler gösterirler. T hücrelerini, NK hücrelerini, monositleri, makrofajları ve dendritik hücreleri uyarırlar. MHC sınıf I ekspresyonunu ve pro-apoptotik genlerin aktivasyonunu arttırırlar. IFNξ/limitin'in antiviral ve antitümör etkilerinin olduğu gösterilmiştir ama lenfobaskılayıcı etkisi IFNα' dan daha düşüktür (169). Tip II IFN' nin tek üyesi IFNγ' dır. NK hücrelerinde IFNγ üretiminin indüksiyonunda IL12 önemlidir. Diğer

taraftan IFNγ; IL12'yi pozitif feedback ile kontrol eder. IL10, IL11, IL13 ve tip I IFN' ler ise IL12' yi inhibe eder. IL4' ün IL12' yi inhibe edip etmediği tartışmalıdır. IL12' nin başlıca fonksiyonu NK, B ve T hücrelerinde IFNγ üretimine neden olmaktır. IL12 aynı zamanda IL18 reseptörünün ekspresyonunu da arttırır.

IFNγ, fagositik hücrelerin bakterilere karşı aktivitesini uyarır (170, 171). Tip I IFN' ler, NK hücreleri tarafından IFNγ' nın üretimini arttırabilirler. TNFα tek başına NK hücrelerinin IFNγ üretimini uyarmada başarısız olurken IL12 ile birlikte sinerjistik etki göstermektedir. IL1' in de IL12' nin indüklediği IFNγ üretimini arttırıcı etkisi vardır. Ama IL18, IL1' e göre daha fazla uyarıcıdır. CD44; IL12 ve IFNγ üretimini arttırabilme yeteneği nedeniyle doğal bağışıklığın düzenlenmesinde önemli rol oynar. NK hücrelerinin IL2 ve IL15 ile inkübasyonu CD44 düzeyinin artmasına ve aktivasyonuna yol açar (172).

IFNα, IFNβ ve IL12 parazitlere karşı savunmada önemlidirler. NK hücrelerinin salgıladığı IFNγ, makrofajları aktive eder ve onların NO üretmesine neden olur. IFNα ve IFNβ; NK sitotoksisitesini arttırır (173). IFNα, immün cevabı direkt olarak ve Th1 sitokinlerin üretimini destekleyerek modüle eder. Çünkü Th1 sitokinleri, koruyucu antitümör hücresel immün reaksiyonların artmasına yol açar. Böylece periferik kanda lenfosit alt gruplarının yeniden düzenlenmesine neden olur. Tümör antijenlerinin ekspresyonu ve NK ile T lenfositlerinin sitotoksik aktivitesi artar. Ayrıca IL2, IL12 ve IFNγ' nın üretimini arttırır (174). IL6 ve IFNγ; tümör hücreleri üzerinde MHC antijen ekspresyonunu arttırırken, TGFβ1 ise IFNγ' nın indüklediği MHC sınıf I ve II antijen ekspresyonu üzerine inhibitör etkiye sahiptir (175).

2.3.4.2. İnterlökin 15 (IL15)

IL15, 1994 yılında keşfedilmiştir ve IL2 benzeri aktiviteye sahiptir. IL15R alfa zinciri dendritik hücre gibi antijen sunan hücrelerde bulunur (176). IL15'in mRNA'sı hem hematopoetik hem de hematopoetik olmayan dokuların büyük bir kısmında bulunmuştur. Normal şartlar altında IL15 protein düzeyini tespit etmek oldukça zordur. Çünkü yarılanma süresi oldukça kısadır. Ayrıca sıkı bir transkripsiyonel ve translasyonel kontrol altındadır. IL15 reseptörü 3 polipeptidden oluşur. IL15Rα, IL2/IL15Rβ ve genel γ zinciri γC. IL15Rα;

hücre tiplerinin büyük bir çoğunluğu tarafından eksprese edilir. Ama IL2/IL15Rβ ve γC ile bağlanmış olması gerekmez (177).

IL15; IL2 reseptör β' ya bağlanma özelliğine sahiptir ve T hücre klonlarının proliferasyonuna neden olabilir. IL2 ve IL15' in özellikle doğal bağışıklıkta ayrı rolleri vardır. T hücre aracılı immün cevapta ise zıt fonksiyonları vardır. IL2; T hücre cevabının büyüklüğünü sınırlandırır ve bellek CD8 T hücre canlılığını azaltır. IL15 ise T lenfositlerinde IL2 aracılı aktivasyonun neden olduğu hücre ölümünü engeller ve bellek hücrelerinin üretimi ile canlılığını korur (178).

IL15; NK hücrelerinin gelişmesi ve olgunlaşmasında oldukça etkilidir. Fibroblastlar, epitelial hücreler ve stromal hücreler tarafından üretilirler. Ayrıca IFNα/β ya da tehlikeli bir sinyale karşı cevapta olgun dendritik hücreler tarafından üretilirler. IL15; hem doğal hem de adaptif bağışıklığın hücrelerinin homeostatik korunmasında ve onların aktivasyonunda önemlidirler. Bellek CD8 T hücreleri ve naif T hücrelerinin proliferasyonu ile canlılığının kontrolünde önemli rol oynarlar. IL15 eksikliğinde NK ve bellek CD8 T hücrelerinin soyunda defekt görülür. Bu hücrelerin gelişiminde IL15 zorunludur (179, 180).

Antijen sunan hücrelerin IL12, IFNγ ve NO salınımı için IL15 sitokini oldukça önemlidir. NK ve NKT hücrelerinin IFNγ üretimi ve sitotoksik aktivitesini güçlü bir sekilde arttırır (181). Bellek $CD8^+$ T hücrelerinin antijenden bağımsız proliferasyonunu ve canlılığını destekler. Aynı zamanda dendritik hücreleri aktive ederek $CD8^+$ T hücrelerinin antijene spesifik cevabını yürütür. IL21, aktive edilmiş T hücreleri tarafından üretilir ve naif NK hücrelerinin IL15 tarafından yayılımını inhibe ederken, allojenik uyarıya cevapta T hücrelerinin efektör cevabını ve yayılımını arttırır (182).

2.3.5. NK hücrelerinin insan sağlığındaki rolü

NK hücrelerinin ana görevi infeksiyona karşı özellikle de viral infeksiyona karşıdır. NK hücreleri antiviral savunmaya, virüsle enfekte hücrelerin direkt sitotoksisitesi ve viral replikasyonu kontrol eden sitokinlerin üretimi aracılığıyla katkıda bulunur. Pek çok virüs, kazanılmış bağışıklığın hücreleri tarafından tanınmaktan kaçmak için stratejiler geliştirmiştir. Örneğin enfekte hücreler, T hücrelerine antijen sunumunu bloke etmek için hücre yüzeyinden

HLA moleküllerini azaltırlar. Bununla beraber bu enfekte hücreler NK hücrelerindeki inhibitör reseptörleri bağlayamazlar ve böylelikle NK hücre lizisine duyarlı hale gelirler (164). NK hücrelerinin viral infeksiyon varlığında görevi viral replikasyonun kontrolü olduğu kadar kazanılmış bağışıklığın regülasyonudur. Bu model için kanıt, perforin bağımlı sitotoksisitenin eksikliğine bağlı bir viral infeksiyonun potansiyel olarak öldürücü bir hastalık ile sonuçlandığı perforin eksikliği olan hastalardan kaynaklanır (183). NK hücreleri ayrıca intrasellüler bakteriler, pyojenik bakteriler, mantar ve belli protozoaların dahil olduğu infeksiyonlara karşı olan yanıtlarda da rol oynarlar.

NK hücrelerinin diğer önemli bir fonksiyonu tümör hücrelerinin eliminasyonudur. Kanserle savaşırken NK hücrelerinin en önemli fonksiyonu tümöre neden olmadan önce malign hale gelen hücrelerin takibi ve yok edilmesidir. Pek çok malign hücre HLA ekspresyonunu azaltır, böylelikle NK aracılı parçalanmaya açık hale gelir. NK hücrelerinin insan tümör hücrelerini in vivo parçalamaya katıldığına dair en ikna edici kanıt allojeneik kemik iliği transplantasyonundan kaynaklanır. İnsan anti kanser savunmalarında NK hücrelerinin görev aldığını destekleyen diğer bulgular ex vivo olarak pek çok tümör hücresini parçalama yeteneği, IL-2 ile tedavi edilen kişilerde artmış anti tümör yanıtı, artmış NK hücre fonksiyonu ve tümör büyümesi ile azalmış NK hücre fonksiyonunun korelasyonudur (184,185).

NK hücreleri ayrıca insan gebeliğinde de temel bir rol oynar. NK hücrelerinin gebelikteki potansiyel rolü gebelik desiduasında yerleşmiş lenfositlerin yaklaşık %70'inin NK hücreleri olması ile akla gelmektedir. Bunlar fenotipik olarak periferik kan NK hücrelerinden farklıdır ve ayrı bir NK hücre soyundan veya eşsiz bir mikroçevreden oluşurlar (164). Özellikle yüksek seviyelerde CD56 eksprese ederler. NK hücrelerinin gebe uterusunda öne sürülen görevleri (1)invazyon yapan trofoblastların kontrolü ve desidualizasyonu hızlandırmak için sitokinlerin üretimi (186) (2)maternal immün saldırıdan fetal dokuların korunması (187) ve (3)enfeksiyöz hastalıklardan fetusun korunmasıdır (188).

Bu bağlamda trofoblastlar neredeyse tüm NK hücreleri üzerinde eksprese edilen KIR2DL4 reseptörünü bağlayabilen klasik olmayan MHC molekülü HLA-G'yi eksprese ederler. KIR2DL4 NK hücre sitotoksisitesini inhibe edebilir fakat bağlanma ile birlikte NK hücre sitokin üretimini tetikleyebilir (164). Maternal KIR ve fetal HLA ekspresyonu arasında

elverişsiz kombinasyonların preeklampsi ve tekrarlayan düşükle ilişkili olabileceğine dair yakın zamanda bildiriler bulunmaktadır (189, 190).

Mevcut benzer kanıt ayrıca atopi, astım ve otoimmünite gibi insan inflamatuvar hastalıklarında NK hücrelerinin rolüne dikkati çekmektedir. Bu hastalıklarda NK hücrelerinin rolünün onların sitokin üretiminin bir fonksiyonu olması muhtemeldir. Son olarak önemli bir çalışma alanı belirli KIR haplotipleri ile belirli hastalıklara karşı duyarlılığın ilişkisidir. Gebelik, belirli KIR haplotiplerinin önemini destekleyen bir örnektir. Diğer örnekler (1)hepatit C virüsünün hızlı temizlenmesi (2)HIV hastalığının ilerlemesi (3)psöriatik artrit (4)psöriazis (5)skleroderma (6)tip I diabettir (164). Bu liste, KIR haplotipleri daha çok hastalıkta incelendikçe büyüyecektir.

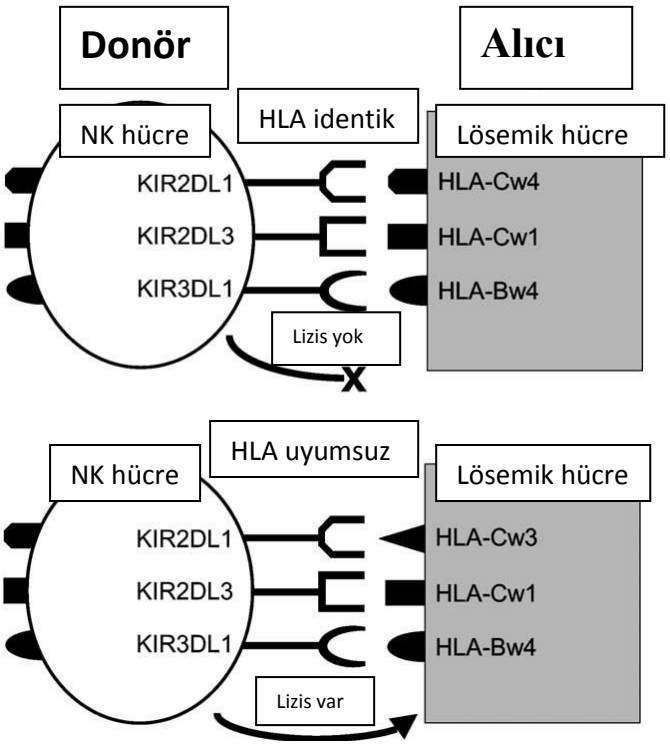
2.3.6. NK hücreleri ve Lösemi

Kanserde önemi anlaşıldıkça çeşitli kanser tiplerinde NK hücrelerinin fonksiyonları araştırılmıştır. Erişkin kanserleri yanında çocukluk çağı kanserlerinde de NK aktivitesi hem kalitatif hem de kantitatif değerlendirilmiştir. Lösemiler özellikle de çocukluk çağında sık görülen ALL, araştırmaların başında yer almaktadır. ALL tanısı konan, henüz tedavi edilmemiş hastalarda görülen düşük NK aktivitesi hastalığın etyolojisini anlama amacıyla tartışılmıştır (191).

ALL hastalarında yoğun kombine kemoterapinin başlanması ile hematopoez ve immün fonksiyonlarda derin bir bozulma meydana gelmektedir. Tedavinin kesimi ile immünolojik yeniden yapılanma primer hastalığa, tedavinin yoğunluğuna ve hastanın yaşına bağlıdır. Çocukluk çağı akut lösemilerinde kemoterapi sırasında ve sonrasında periferik kanda azalmış NK aktivitesi bildirilirken (192-194), 20 Gy'e kadar olan radyasyon dozlarının NK aktivitesini arttırdığı (195) ifade edilmektedir. ALL için uygulanan tedavilerle NK hücrelerinin kantitatif olarak ya azaldığı ya da neredeyse değişmeden kaldığı bildirilmektedir (192-194).

NK hücrelerinin önemi giderek anlaşıldıkça yeni tedavi stratejileri bulma açısından da değerlendirilmiştir. En etkin olarak kullanıldığı yer allojeneik kemik iliği transplantasyonudur. Donör KIR ve alıcı HLA ligandları arasında istenerek yaratılan bir uyumsuzluğun alıcıda gelişebilecek graft anti tümör etki yaratabileceği varsayılmıştır. Bu

konseptin ilk uygulaması yaratılan KIR uyumsuzluğunun sürviyi büyük ölçüde arttırdığını ve AML'li erişkinlerde graft versus host hastalığını azalttığını öne sürmektedir (196)(Şekil 2.2). Diğer çalışmalar bu sonuçları desteklememiştir ve pretransplant hazırlanmayı ilgilendiren bir grup teknik sorunu ortaya çıkarmıştır (197). Bununla birlikte sonraki bilgiler donör KIR ve alıcı HLA ligandlarını spesifik olarak uyumsuzlaştırmanın, KIR uyumsuzluşturmasının faydalarını arttırabileceğini ileri sürmektedir (198,199).



Şekil 2.2. Hematopoetik kök hücre transplantasyonunda graft versus lösemi etkisini regüle eden KIR sisteminin rolü. Bu örnekte belirli bir KIR haplotipine (KIR2DL1, KIR2DL3 ve KIR3DL1 dahil olduğu) sahip bir kişiden hematopoetik kök hücreler HLA identik(üst) veya HLA uyumsuz(alt) lösemili alıcıya transfer edilir. Donör kaynaklı NK hücreleri resmedilmiştir ve NK hücre repertuvarını göstermek için tüm reseptörler tek bir NK hücresi üzerinde gösterilmiştir. Üstteki örnekte tüm KIR reseptörleri alıcıdaki MHC ligandları ile bağlandığında oluşan inhibitör sinyaller NK hücre sitotoksisitesi ile oluşabilecek graft versus tümör etkisini engeller. Tersine HLA uyumsuzluğu örneğinde olduğu gibi, alıcıda KIR2DL1 için hiç ligand olmadığında NK hücresi inhibitör sinyal almayacaktır ve böylelikle tümör hücresini öldürebilir.

Alloreaktif NK hücreleri transplantasyondan önce hazırlık rejiminin parçası olarak da uygulanabilir. Bu bağlamda nakil sonrasında kök hücreden matür NK hücrelerinin oluşması için haftalar gerekmektedir. Bu dönemde hazırlık rejiminden kaçan lösemik hücreler NK hücreleri tarafından öldürülemez ve böylelikle çoğalarak erken relapsa neden olur. Matür alloreaktif NK hücrelerinin infüzyonu rezidüel lösemi hücrelerinin NK hücre aracılı lizisini, kök hücre kaynaklı NK hücreleri meydana çıkmadan önce gerçekleştirir (200).

Faydaları yalnızca graft versus lösemi etkisini azaltmakla sınırlandırılamaz, hastanın antijen sunan hücrelerinin azaltılması, engraftmanın hızlandırılması, T hücrelerinin öldürülmesi, myelopoezin hızlı olması ve engraftman için gerekli büyüme faktörlerinin üretimi gibi rolleri de vardır (200). NK hücre temelli DLI'nın gelişimi haploidentik veya

kordon kanı nakilleri yapılan hastalardaki relapsları tedavi edebilmek için yeni seçenekler sunmaktadır. Bu klinik gözlemler NK hücrelerinin insan kök hücre naklinde ve anti tümör yanıtlarında ne kadar önemli olduğunu bir kez daha gösterir.

Kötü prognozlu erişkin AML hastalarında ise umut verici sonuçlar elde edilmiştir. Yüksek doz siklofosfamid ve fludarabin içeren yoğun kemoterapi rejimi sonrasında haploidentik NK hücrelerinin infüzyonu ve IL-2 uygulamaları %26 hematolojik remisyon ile sonuçlanmıştır (201). Çocukluk çağında AML olan tam remisyondaki on hastada allojeneik kemik iliği nakli uygulanmadan, IL-2 ile birlikte haploidentik NK hücre infüzyonunda iki yıllık olaysız sağ kalım %100 olarak bildirilmektedir (202).

Akut myeloid lösemide NK hücreleri ile elde edilen gelişmeler akut lenfoblastik lösemi için söylenememektedir. Erişkin hastalardan sadece birkaçının blastları in vitro olarak NK aracılı lizise duyarlıdır ve akut myeloid löseminin aksine HLA uyumsuz kök hücre naklinde KIR ligand uyumsuzluğundan hiç fayda görmezler. Bununla birlikte bir çalışmada çocukluk çağı ALL'sinde NK hücrelerinin graft versus lösemi etkisi gösterdiği ileri sürülmüştür (198).

Tümör hücrelerinin NK hücre yanıtını çok çeşitli yönlerden alt edebileceği düşünüldüğünde yalnızca kombine bir immünoterapi yaklaşımının kesin olarak kanser hücre çoğalmasını durdurması mümkündür (203). NK hücrelerinin immün sistemdeki rolleri daha iyi anlaşıldıkça immünoterapi alternatifleri ve yeni stratejiler geliştirilmeye devam edilecektir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hasta seçimi

Çalışma İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AnaBilim Dalı'nda 1 Eylül 2009 – 15 Mart 2010 tarihleri arasında yürütüldü. Çalışmaya katılan hasta grubu İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AnaBilim Dalı Hematoloji ve Onkoloji Bilim Dalı tarafından takipli otuz üç ALL tanılı hastadan oluşturuldu. Çalışmaya alınan tüm çocukların; cinsiyetleri, doğum tarihleri, yaşları, tanı konma yaşları, risk grupları, idameye başlama tarihleri, idame kemoterapi süreleri, tedavi kesim tarihleri, tedavisiz geçen süreleri, ALL immünfenotipleri ve mevcut kromozom

anomalileri kayıt edildi. Kontrol grubu ise İstanbul Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AnaBilim Dalı kan alma ünitesine başvuran medikal sorunu olmayan elektif cerrahi planlanan onbir sağlıklı çocuktan oluşturuldu. Hasta ve kontrol grubundan 6 cc periferik kan heparinli tüpe alındı.

3.2. Grupların belirlenmesi ve özellikleri

Olgular aşağıda görüldüğü gibi düzenlendi.

grup 1: protokol M'i tamamlayan;

grup 2: idame kemoterapisi alan;

grup 3:kemoterapisi kesilmiş

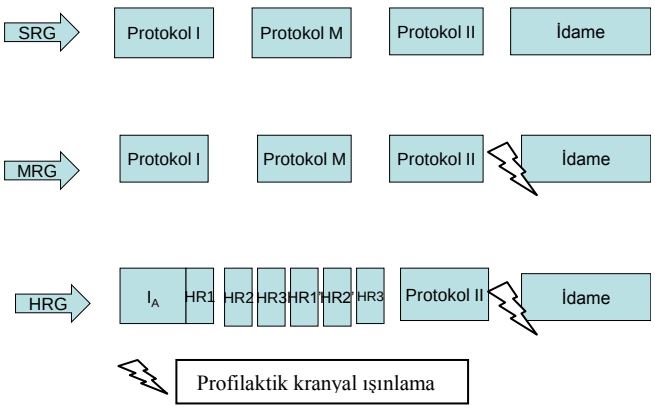
grup 4:sağlıklı kontrol grubu

Grup 1 ve grup 2'nin olguları BFM TRALL 2000 protokolü ile tedavi edilmekteydi. BFM TRALL 2000 protokolünde risk grupları üçe ayrılmaktadır (tablo 3.1).

Tablo 3.1. BFM TRALL 2000 protokolü risk grupları

Standart (SRG)	Orta (MRG)	Yüksek (HRG)
• Lök <20000/mm3 • Yaş ≥1 ve <6 • 8.gün periferik blast <1000/mm^3 • T immünolojisi yok. • t(9;22) ve BCR-ABL(-) • t(4;11) ve MLL/AF4 (-) • 33.günde tam remisyon • Hastalar tüm kriterlere uymalı.	• Lökosit ≥20000/mm3 veya • Yaş<1 veya ≥ 6 veya T-hüc. ve aşağıdakilerden her biri • 8.gün periferik blast <1000/mm^3 • t(9;22) ve BCR-ABL(-) • t(4;11) ve MLL/AF4 (-) • 33.günde tam remisyon	• Yaş ve lökosit sayısından bağımsız • 8.günde periferde blast ≥1000/mm^3 • t(9;22) ve/veya BCR-ABL(+) • t(4;11) ve/veya MLL/AF4 (+) • 33.günde tam remisyon yok. • Med. kitle başlangıç çapının %30'undan büyük • SSS hala + • Kriterleden biri yeterli

Hastalar risk gruplarına uygun kemoterapi protokolleri ile tedavi edildiler (şekil 3.1). Protokol 1 faz 1'de prednisolon, vinkristin, daunorubisin, L-asparaginaz, intratekal (İT) metotreksat uygulanmaktaydı. Protokol 1 faz 2'de ise siklofosfamid, ARA-C, oral 6-MP ve İT mtx kullanılmaktaydı. Protokol M ise dört 5 g/m^2 mtx infüzyonu, oral 6-MP ve İT metotreksat tedavilerinden oluşmaktaydı.



Şekil 3.1. BFM TRALL 2000 Risk gruplarına göre tedavi

HR bloklar yüksek risk grubu hastalara uygulanmaktaydı, altı HR blok'tan oluşmaktaydı. Birinci HR blokta yüksek doz ARA-C, yüksek doz Mtx, deksametazon, siklofosfamid, L-asparaginaz, İT Mtx, ARA-C, Prednisolon tedavileri bulunmaktaydı. Protokol II ise deksametazon, vinkristin, doksorubisin, L-asparaginaz, siklofosfamid, ARA-C, oral thioguanin ve İT Mtx'dan oluşmaktaydı. Koruyucu kranyal ışınlama protokol II'den sonra, idame kemoterapisinden hemen önce uygulanmaktaydı (Tablo 3.2). İdame kemoterapisinde oral 6-MP 50 mg/m2/gün ve Mtx 20 mg/m2/hafta olarak verilmekteydi. Tedavinin toplam süresi tedavinin başlangıcından itibaren SRG grubundaki erkeklerde 36 ay, diğerlerinde 24 ay olarak belirlenmişti.

Grup 3 tedavisi kesilmiş hastalardan oluşmaktaydı. Bu hastalar CCG-1891 ile tedavi edilmişlerdi. Standart risk grubu bu hastalar için <50000/mm^3 lökosit sayısı ve yaşın <10 altında olması ile belirlenmekteydi. Yüksek risk grubunda ise >50000/mm^3 lökosit sayısı veya yaşı >10 yaş üzerinde olan hastalar mevcuttu. Kötü prognostik göstergeler olan t(4,11) veya t(9,22) de yüksek risk grubu kriterlerindendi.

Tablo 3.2. Risk gruplarına göre profilaktik kranyal ışınlama

SRG	Uygulanmaz
MRG	
• < 1yaş	• Uygulanmaz
• >1 yaş, <2 yaş	• Sadece T-ALL'de 12 Gy
• ≥2 yaş	• 12 Gy
HRG	
• >1 yaş <2 yaş	• 12 Gy
• ≥2 yaş	• 18 Gy

3.3. Etik Kurul Onayı ve Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Desteği

Tez çalışmasına katılan gönüllülerin aileleri çalışma hakkında bilgilendirildi, yazılı aydınlatılmış onam imzaladılar. Araştırma İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından 12 Nisan 2006'da onaylandı (Etik kurul dosya no 2006/519) ve İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından desteklendi (Proje no T-889/02062006).

3.4. Laboratuvar işlemleri

3.4.1. NK aktivitesi

Çalışmamıza katılan gönüllü kişilerin NK aktivitesine İÜ İstanbul Tıp Fakültesi Fizyoloji BD laboratuvarlarında bakıldı. Sonuçlar analiz edilirken, NK hücrelerinin mononükleer hücreler arasında sitotoksisitesi değerlendirildi.

3.4.1.1. NK Aktivitesi Deneylerinde Kullanılan Malzemeler ve Hazırlanışı

Iscoves' Modified Dulbecco Medium (IMDM, Sigma I-7633)

1000 ml medyum hazırlamak için 17,7 gr IMDM, 0,3 gr L-Glutamin ve 3,024 gr sodyum bikarbonat hazırlandı. Her biri 100 ml saf suda eritildi. Steril bir erlenmayere konarak, saf su ile bu karışım 1000 ml'ye tamamlandı. Medyumu süzmek için; 47 mm'lik ve 0,22 μm çapındaki Millipore marka durapore membran filtresi (GVWP04700) kullanıldı. Filtre edilmiş medyuma %10 oranında Fetal Dana Serumu (FCS) ve 50 μg/ml olacak şekilde streptomisin ve penisilin eklendi.

Fetal Dana Serumu (FCS, Sigma)

10 ml' lik stoklara bölünerek -20^{o}C'de saklandı.

Fikol (Histopague 1077 Sigma)

Standart olarak 100 ml' lik şişelerde bulunan fikol +4^{o}C'de saklandı.

MTT (methyl-thiazol-tetrazolium) Grow Assay Kit (CT01, Millipore)

MTT için kit içinde yer alan Reagent A (5 mg MTT/vial) içinde fosfat tamponu(PBS) bulunan 10 ml Solution B içerisinde çözüldü ve +4^{o}C'de saklandı.

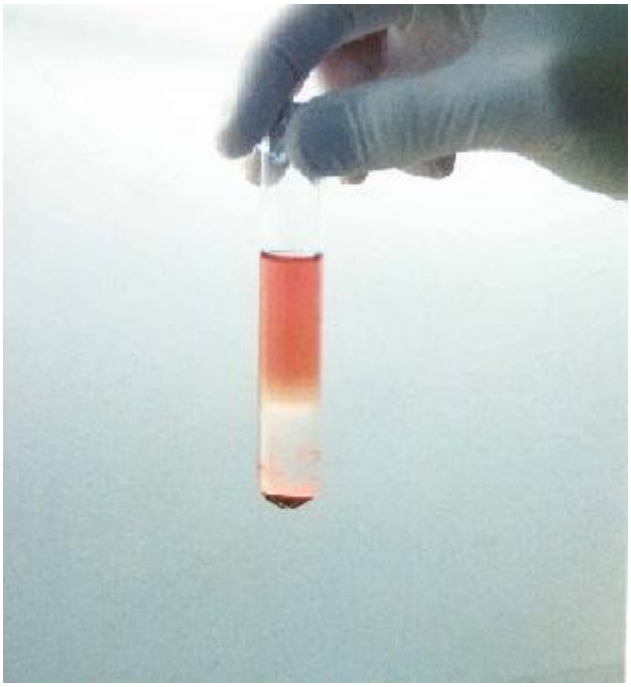
MTT ile boyanan hücrelerin çözülmesi için kit içinde hazır bulunan 0,04 N HCL içeren izopropanol solusyonu kullanıldı.

3.4.1.2. Mononükleer hücrelerin elde edilmesi

Çalışmamıza gönüllü olarak katılan ALL tanılı hastalardan ve sağlıklı kişilerden alınan heparinli periferik kan; IMDM medyumu ile 1:1 dilüe edildi. 15 ml'lik konik tabanlı 2 falkon tüpe, 3 ml fikol eklendi. Hazırlanan kan, enjektör ile yavaşça tüpün kenarından sızdırarak tabakalandırıldı (iki sıvı birbirine karışmayacak şekilde) (Resim 3.1).



Resim 3.1. Kanın fikol üzerine enjektörle yayılması



Resim 3.2. Santrifüj sonrası.

Tüpler +4^{o}C'de, 2000 rpm'de 30 dakika santrifüj edildi. Mononükleer hücreler yoğunluk gradientine göre fikolle ayrıldı. Santrifüj sonunda, en altta eritrosit çökeltisi, çökeltinin üzerinde fikol tabakası, en üstte plazma/medyum tabakası ve fikol ile en üst tabaka arasında ise sarı renkte olan mononükleer hücrelerin oluşturduğu tabaka meydana geldi (Resim 3.2).

Mononükleer hücrelerin oluşturduğu tabakanın diğer tabakalarla karışmamasına dikkat edilerek pipetle çekilip bir tüpe kondu. Tüp 2000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda süpernatant atıldı ve üzerine bir miktar medyum koyularak tekrar 10 dakika santrifüj edildi. Bu şekilde hücreler yıkanarak fikol uzaklaştırıldı. Yıkanan hücrelerin süpernatantı atılarak yeni medyum koyuldu ve karıştırıldı.

3.4.1.3. Hücrelerin sayılması

Hazırlanan hücre süspansiyonundan 10 µl alınıp, üzerine 10 µl ölü hücreleri boyayan %4'lük Tripan mavisi (Sigma Cat. No: T8154) eklendi ve pipetaj yapıldı. Pipetajdan sonra homojen karışımdan 10 µl alındı ve Neubouer lamında 10X40 büyütmeyle sayım yapıldı. Sayım yapılırken Tripan mavisi ile boyanmamış olan canlı ve düzgün hücre morfolojisine sahip hücreler dikkate alındı. Hücre sayımından sonra lökositler, ml' de 10^7 olacak şekilde ayarlandı.

3.4.1.4. Doğal öldürücü (NK) sitotoksisite testi

NK aktivitesi 3 saatlik MTT inkübasyonu sonucu, değişen boyanın spektral analizi ile ölçüldü. Hedef olarak eritrolösemi hücreleri (K562) kullanıldı. K562; blast krizinde kronik miyeloid lösemili bir hastadan elde edilen multipotansiyelli hemopoetik standardize edilmiş hücre dizisidir. Çalışma boyunca %10 FCS'li medyumda ve %5 CO_2 içeren etüvde K562 hücreleri inkübe edildi. K562; MHC sınıf I negatif olan bir hücre dizisi olduğu için, NK hücreleri bu hücre dizisine karşı doğal sitotoksik aktivite gösterebilmektedir.

NK sitotoksisite testlerinde, NK hücreleri (efektör=E) ve NK'ya duyarlı olan eritrolösemi hücreleri (K562, target(hedef) =H,) farklı oranlarda karşılaştırılarak, NK'nın bu oranlarda K562'yi öldürebilme potansiyeline bakıldı. E:H oranları olarak 1:1, 10:1, 20:1, 30:1, 50:1 kullanıldı. Ölçüm 96 kuyulu U tabanlı mikropleytlerde yapıldı. K562 mikropleyte, kuyuda 5000 hücre/ml olacak şekilde eklendi.

Çalışmamızda NK aktivitesine mononükleer hücreler arasında bakıldı. Direkt olarak hücre sayısı, efektör hücre sayısı olarak hesaplandı. K562 sayısı tüm oranlarda sabit tutuldu. Oranların yapılabilmesi için efektör hücrenin sayısı her oranda değiştirildi. Bu nedenle her E:T oranında farklı efektör kontrolü kullanıldı. Mikropleyte hücrelerin ekimi yapıldıktan sonra 12 saat %5 CO_2 içeren

etüvde inkübe edildi. Deneyin sonunda sitokin ölçümü için süpernatantlar alınıp üzerine aynı miktarda medyum ilave edildi ve kuyulara 10 µl MTT (methylthiazoltetrazolium) kondu.

MTT' nin konulmasından sonra mikropleyt 3 saat etüvde bekletildi. 3 saat sonunda her kuyudan 130 µl süpernatant çekildi ve 100 µl 0,04 N HCl içeren izopropanol çözeltisi kondu.

Alkolün uçmasını engellemek ve ışık geçirmemesi için pleyt ile kapağının arasına aliminyum folyo ile sıkıştırıldı. 30 dakika karanlıkta bekletildi, daha sonra ELISA spektrofotometresinde, 655 nm referans dalga boyuna göre 570 nm' de okundu. Hesaplama yapılırken NK/K562' nin birlikte bulunduğu 3 kuyunun ortalaması alınıp, NK kontrollerinin ortalama değerinden çıkartılarak K562' nin absorbansı bulundu. Bulunan değer, K562 kontrollerinin ortalamasına bölünerek bu hücrelerin ne kadarının canlı kaldığına bakıldı ve 1' den çıkartılarak 100 ile çarpıldı.

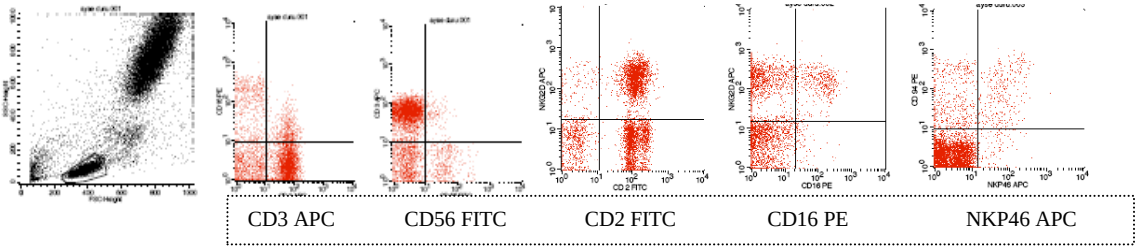
$$\% \text{ NK sitotoksitesi} = (1-[\ (NK+K562_{OD})-(NK_{OD})\ ] / (K562_{OD}))x100)$$

3.4.1.5. Litik ünite(LU) hesaplanması

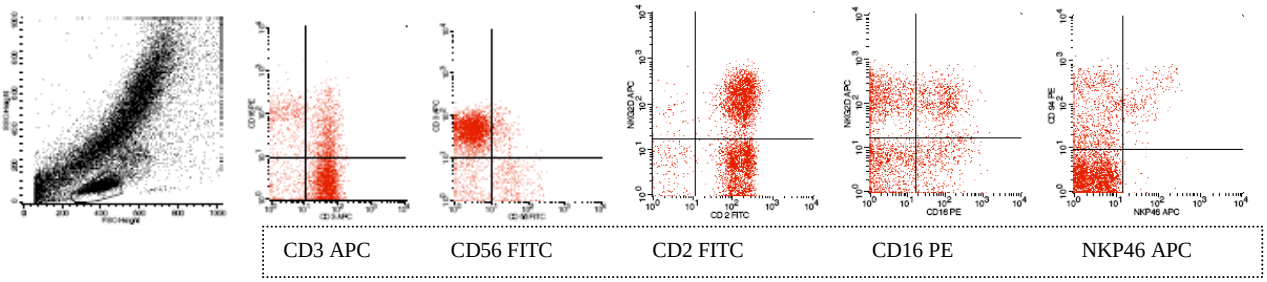
NK sitotoksisitesi sonuçları litik üniteye(LU) de çevrilerek tek bir değerle ifade edildi. Bir litik ünite hedef hücrelerin %50'sini lizise uğratmak için gereken effektör hücrelerin sayısı olarak tanımlandı. Elde edilen bu sayılar tekrar % 100 NK olarak kullanılan hücre sayısına(10^{-5}) bölündü (204).

3.4.2. Flow sitometri ölçümü

ALL hastalarında (şekil 3.3.) ve sağlıklı kişilerde (şekil 3.2.); NK aktivitesi deneyinden önce NK hücrelerinin yüzey markerları ve NK aktivatör reseptörlerin ekspresyonu flow sitometri ile DETAE Laboratuvarları kullanılarak tayin edildi.



Şekil 3.2. Kontrol grubundan bir olguya ait flow sitometri görüntüsü



Şekil 3.3 Hasta grubundan bir olguya ait flow sitometri görüntüsü

Deneylerin analizi FACS Calibur, Becton Dickinson ile yapıldı.

Hücreler polipropilen sitometri tüplerine kondu. Florosanizotiosiyanat (FITC, 518 nm) ile konjuge CD56, CD2; allofikosiyanin (APC, 660 nm) ile konjuge NKG2D, NKp46; fikoeritrin (PE, 575 nm) ile konjuge CD16, CD94 ve allofikosiyanin-siyanin-7 (APC-Cy7, 785 nm) ile konjuge CD3 antikorlarıyla işaretlendi. Negatif kontrol olarak antikorla işaretlenmemiş hücreler kullanıldı. 20 dak. karanlıkta inkübe edildi. 2 ml Phosphate buffered saline (%1 Bovine serum albumin, %0,1 sodium azide) (PBS) eklendi. 1000 g 5 dak +4°C' de santrüfüj edildi. Bu işlem 2 kez yapıldı.

Lenfosit populasyonunun tanımlanabilmesi için Forward scatter (FSC) ve side scatter (SSC) plotları kullanıldı. Her data set için 10000 hücre sayıldı. Floresan yoğunluğuna göre sonuçlar analiz edildi. CD56, CD3, NKp46, CD2, CD94, NKG2D ve CD16 reseptörlerinin ve bunların ikili kombinasyonlarının ekspresyonu tayin edildi.

3.4.3. Sitokin Ölçümü

ALL'li hastalarda ve sağlıklı kişilerden; deney öncesi plazma ve mononükleer hücreler arasındaki NK aktivitesi deneyinin sonunda sitokin ölçümü için süpernatantlar alındı. Deney öncesi alınan plazma uyarılmamış hücrelerin sitokin düzeyi olarak, K562 hücreleri ile uyarılmış ve 50:1 E:T oranındaki hücrelerin süpernatantı deneyden sonraki sitokin düzeyi olarak kabul edildi.

Deneyden önceki ve deneyden sonraki süpernatantların içindeki INF-γ ve IL-15 düzeyleri ELISA kitleri aracılığıyla pg/ml olarak ölçüldü. Her sitokinin miktarı; kullanılan ELISA kitininin protokolüne uyularak tayin edildi. Supernatantlar ölçülecek sitokine göre çeşitli miktarlarda 96 kuyulu tabakalara kondu. Üzerine biotin konjugat eklendi. 2 saat oda ısısında bekletildi. Streptavidin-HRP solusyonu eklenip oda ısısında yarım saat inkübe edildi. Daha sonra stabilize edici kromojen eklenip

30 dak. bekletildi. Son olarak stop solusyon konduktan sonra, Absorbanslar 490 nm de Biotek Instruments Mikropleyt Reader'da okundu. 96 kuyulu mikro ELISA striplerin, ilk 12 tanesi kontrol için, kalan diğer kuyular ise test supernatantları için kullanıldı.

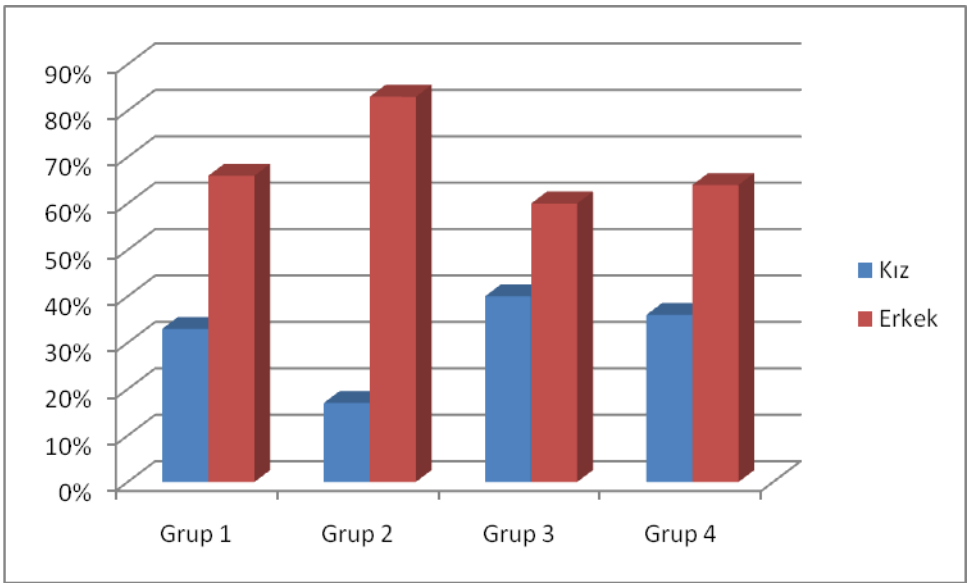
3.5. İstatistiksel Analiz

Çalışmaya katılan ALL'li hastalar ile kontrollerin izole olarak NK aktivitesinin karşılaştırılması, kontrollerle hastalar arasındaki reseptör ekspresyonu ve sitokin düzeyi farkı SPSS 14.0 ile "oneway ANOVA" testi kullanılarak yapılmıştır. Anlamlılık değeri $p<0,05$ olan sonuçlar anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Grupların özellikleri

Protokol M'i tamamlamış olgulardan oluşan grup 1(n=6)'in %33'ü kız, %66'sı erkek olup yaş ortalaması 7,31±4,45 idi. İdame kemoterapisi almakta olan olgulardan oluşan grup 2(n=12)'nin %17'si kız, %83'ü erkekti ve yaş ortalaması 10,14±4,08 idi. Kemoterapisi kesilmiş olgulardan oluşan grup 3'ün(n=15) %40'ı kızlardan, %60'ı erkeklerden oluşuyordu ve yaş ortalamaları 13,09±4,32 idi. Sağlıklı kontrollerden oluşan grup 4'ün (n=11) %36'sı kız, %64'ü erkek olup yaş ortalaması 8,56±3,92 idi. Cinsiyet dağılımları şekil 4.1'de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. Gruplara göre cinsiyet dağılımı

Grupların sırasıyla ortalama tanı yaşları 7,07±4,45, 8,33±4,39, 6,56±3,92 idi. Olguların immünfenotipleri, risk grupları, kromozom anomalileri, idame kemoterapisi aldıkları süreler, profilaktik kranyal ışınlama durumları ve tedavisiz geçen süreleri, ve bu özellikler açısından gruplar arası farklar tablo 4.1'de belirtilmiştir.

Tablo 4.1. Grupların genel özellikleri

	Grup 1 (Prot. M bitmiş) n:6	**Grup 2 (İdame KT)** n:12	**Grup 3 (Ted. kesilmiş)** n:15	**Grup 4 (Kontrol grubu)** n:11	**p**
Cinsiyet					
• Kız, n(%)	2(%33)	2(%17)	6(%40)	4(%36)	Grup 1,4:>0.05 Grup2,4:>0.05 Grup3,4:>0.05
• Erkek, n(%)	4(%67)	10(%83)	9(%60)	7(%63,7)	Grup 1,4:>0.05 Grup2,4:>0.05 Grup3,4:>0.05
Yaş (yıl)					
• Ort±SD	7,31±4,45	10,14±4,08	13,09±4,32	8,56±3,92	Grup 1,4:>0.05 Grup 2,4:>0,05 Grup 3,4:0.044
• Minimum	2,67	2,83	6,42	2	
• Maksimum	12,25	16,58	19,17	13,75	
Tanı yaşı (yıl)	7,07±4,45	8,33±4,39	6,56±3,92	-	>0.05(Gruplar arası)
İmmünfenotip					
• B hücreli	5(%83)	5(%42)	12(%80)	-	
• T hücreli	1(%17)	7(%58)	3(%20)	-	
Risk grubu					
• Standart	3(%50)	2(%17)	7(%47)	-	
• Orta	3(%50)	4(%33)	-	-	
• Yüksek	-	6(%50)	8(%53)	-	
Kromozom anomalisi					
• t(4,11)	-	1(%8)	-	-	

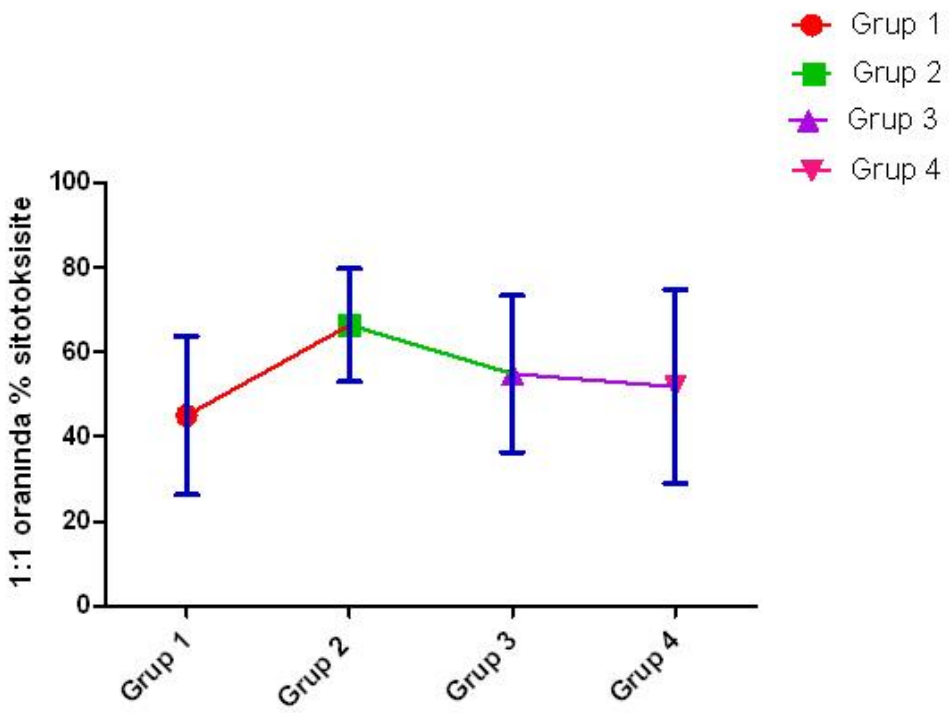
İdame kemoterapisi süresi (yıl)					
• Ort±SD	-	1,2±0,9	-	-	
• Minimum	-	0,08	-	-	
• Maksimum	-	2,75	-	-	
Profilaktik Kranyal Işınlama	-	10(%83)	8(%53)	-	
Tedavisiz süre (yıl)					
• Ort±SD	-	-	3,5±3,6	-	
• Minimum	-	-	0,08	-	
• Maksimum	-	-	9,58	-	

4.2. Olguların NK aktivitesinin değerlendirilmesi

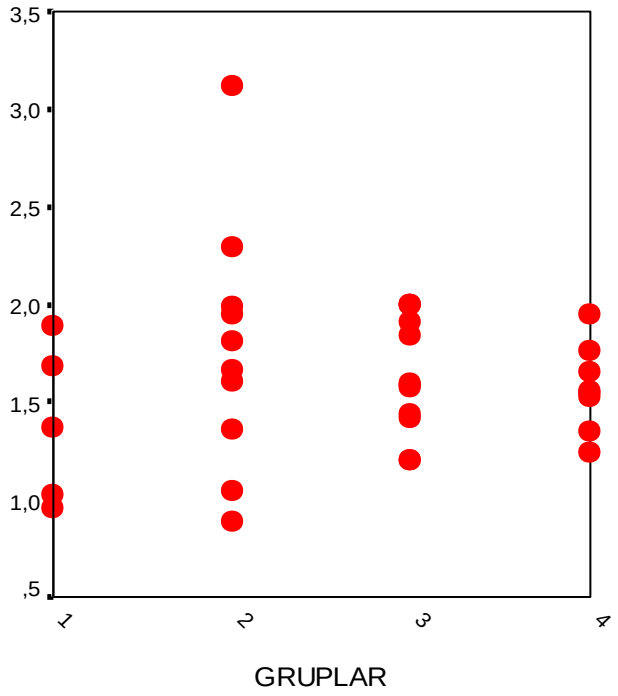
Gruplar NK aktivitesi yönünden 1:1, 10:1, 20:1, 30:1, 50:1 E:H oranları ile değerlendirildi (şekil 4.2.). Gruplar 1:1 oranında NK sitotoksisitesi testi ile değerlendirildiğinde grup 1'in ortalama değeri %20,35±3,61 idi. Grup 2'nin ortalama değeri %48,22±10,78, grup 3'ün ise %24,34±16,49 idi. Kontrol grubu olan grup 4'ün ise ortalama değeri %20,61±10,98 olarak saptandı. Grup 2'nin değeri grup 1 ile grup 3'den anlamlı derecede yüksekti ($p<0,01$). Grup 2'nin değeri grup 4'ten anlamlı derecede yüksekti ($p<0,001$). Gruplar arasında 10:1, 20:1, 30:1, 50:1 E:H oranlarında anlamlı fark yoktu. NK aktivitesi litik ünite (LU) olarak belirlendiğinde grup 1'in ortalaması %1,38±0,41, grup 2'nin ortalaması % 1,77±0,64, grup 3'ün ortalaması %1,64±0,30, grup 4'ün ortalaması ise % 1,55±0,22 idi ve aralarında anlamlı fark yoktu. Gruplara göre NK sitotoksisite deneyinin farklı effektör, hedef hücre oranlarında ortalama ve standart sapma değerleri tablo 4.2'de sunulmuştur.

Tablo 4.2. Gruplara göre NK sitotoksisite deneyinin farklı effektör, hedef hücre oranlarında ortalama ve standart sapma değerleri

E:H oranları	**Grup 1** **(Prot. M bitmiş)** n:6	**Grup 2** **(İdame KT)** n:12	**Grup 3** **(Ted. kesilmiş)** n:15	**Grup 4** **(Kontrol grubu)** n:11	**p**
1:1 (%)	20,35± 3,61	48,22± 10,78	24,34± 16,49	20,61± 10,98	Grup 1,2:<0,01 Grup 1,4:>0.05 Grup 2,3: <0,01 Grup 2,4: <0,001 Grup 3,4:>0.05
10:1 (%)	37,13± 14,41	63,43± 20,01	51,62± 20,55	40,61± 14,85	Grup 1,4: >0,05 Grup 2,4: >0,05 Grup 3,4: >0,05
20:1 (%)	42,04± 15,73	61,54± 18,37	62,67± 25,03	50,57± 15,86	Grup 1,4: >0,05 Grup 2,4: >0,05 Grup 3,4: >0,05
30:1 (%)	56,05± 16,12	76,81± 17,54	63,98± 29,38	69,61± 13,33	Grup 1,4: >0,05 Grup 2,4: >0,05 Grup 3,4: >0,05
50:1 (%)	69,51± 20,48	81,73± 20,81	71,49± 33,81	77,66± 10,73	Grup 1,4: >0,05 Grup 2,4: >0,05 Grup 3,4: >0,05
$LU_{50}/10^5$	1,38±0,41	1,77±0,64	1,64±0,30	1,55±0,22	Grup 1,4: >0,05 Grup 2,4: >0,05 Grup 3,4: >0,05



Şekil 4.2. 1:1 efektör ve hedef hücre (E:H) oranlarında, standart sapma değerleri ile gruplara göre NK aktivitesi



Şekil 4.3. Gruplara göre olguların litik ünite (LU) değerlerinin dağılımı

4.3. NK hücrelerinin reseptör düzeyleri

Gruplar NK hücrelerinin reseptör ekspresyonu yönünden değerlendirildi (tablo 4.3). NK hücre popülasyonunu yansıtan $CD16^{+}CD56^{+}$'liğinin grup 1 için ortalama değeri %4,04±2,64, grup 2 için %4,00±2,04, grup 3 için %6,77±4,01 ve grup 4 için %9,75±6,80 idi (şekil 4.3.). İdame kemoterapisi alan grubun (grup 2) değeri kontrol (grup 4) grubuna göre anlamlı olarak düşüktü ($p<0.05$). Protokol M'i tamamlamış olan grup 1 ile kontrol grubu olan grup 4 arasında ise anlamlılık açısından sınırda bir değer elde edildi ($p=0.06$).

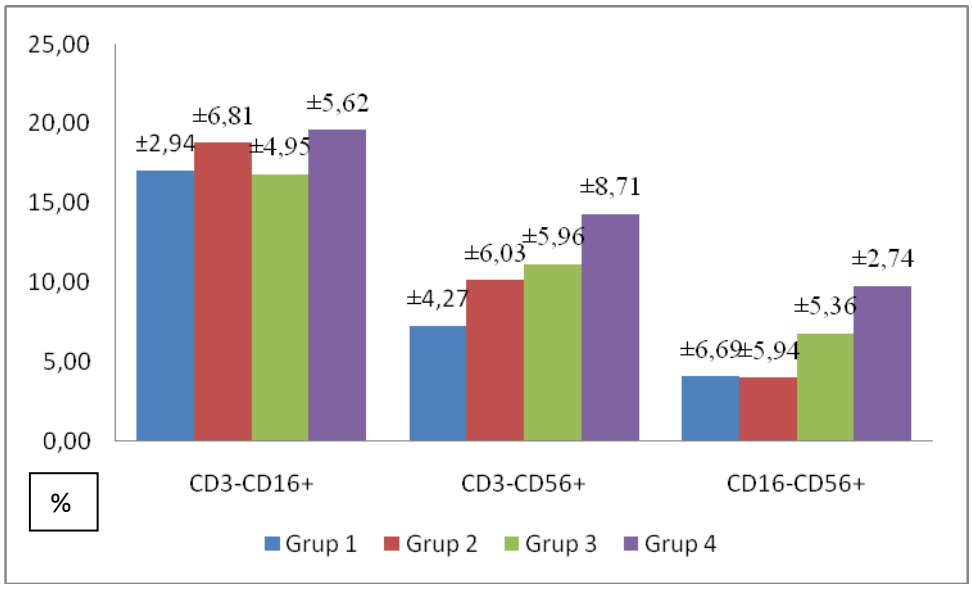
$CD16^{+}NKG2D^{+}$'liği açısından değerlendirildiğinde grup 1'in ortalama değeri %9,40±3,39, grup 2'nin %7,23±2,48, grup 3'ün %9,53±3,83 ve grup 4'ün %12,94±6,33 idi (şekil 4.4). Grup 2 değeri grup 4'e göre anlamlı derecede düşüktü ($p<0.05$).

$CD94^{+}NKp46^{+}$'liği açısından değerlendirildiğinde grup 1'in ortalama değeri %2,97±1,41, grup 2'nin %2,46±1,41, grup 3'ün %5,34±4,13 ve grup 4'ün %6,49±2,31 idi. Grup 2 değeri grup 4'e göre anlamlı derecede düşüktü ($p<0.05$).

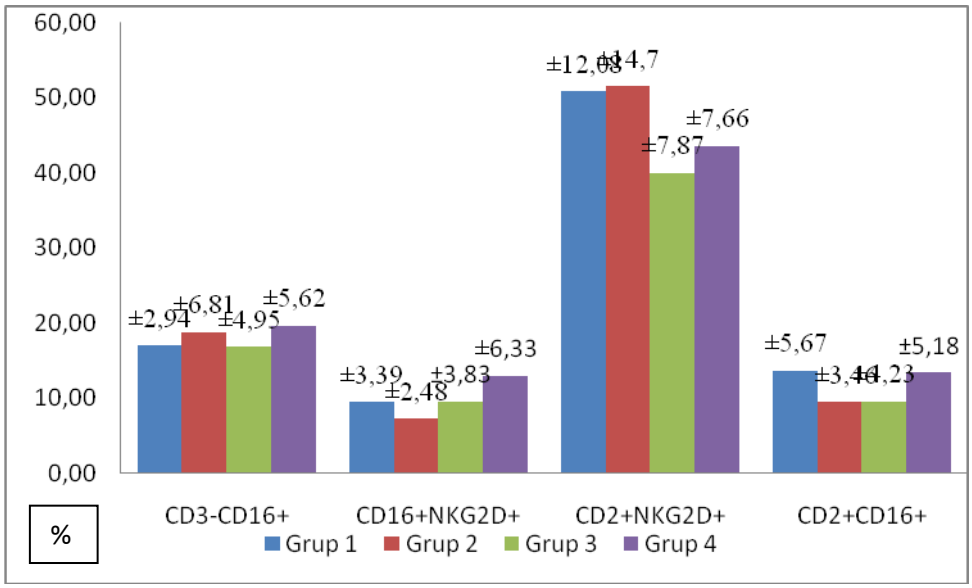
$CD56^{+}CD94^{+}$liği açısından değerlendirildiğinde grup 1'in ortalama değeri %4,38±2,49, grup 2'nin %5,47±2,78, grup 3'ün %6,11±3,18 ve grup 4'ün %9,59±5,14 idi (şekil 4.5.). Grup 1 değeri grup 4'e göre anlamlı derecede düşükken ($p<0.05$), grup 2 ile grup 4 arasındaki fark anlamlılık sınırındaydı ($p=0,05$).

Tablo 4.3. Gruplara göre reseptör ekspresyonu

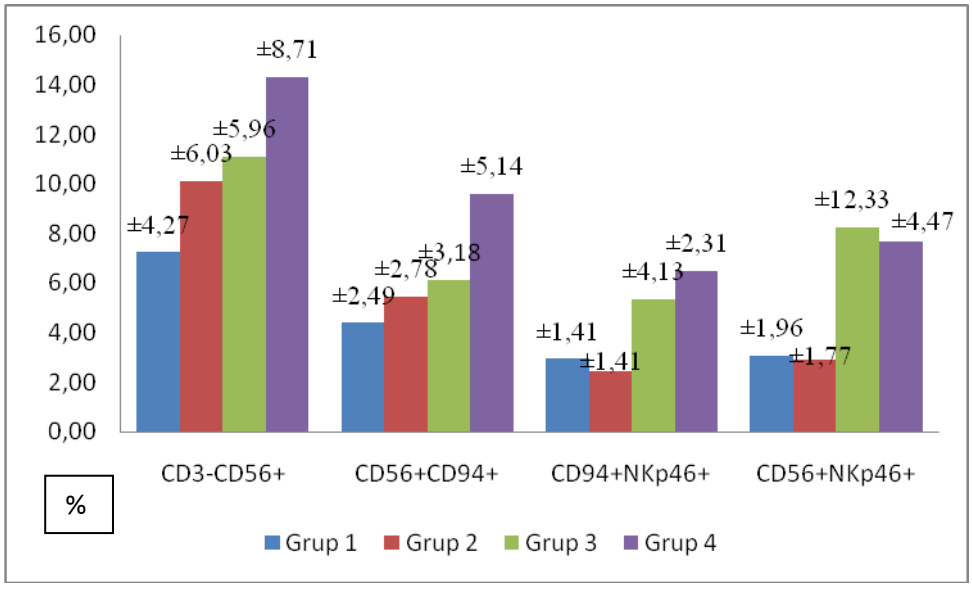
Reseptörler (%)	**Grup 1 (Prot. M bitmiş)**	**Grup 2 (İdame KT)**	**Grup 3 (Tedavi kesilmiş)**	**Grup 4 (Kontrol grubu)**	**p**
CD3(-) CD16(+)	17,00±2,94	18,78±6,81	16,78±4,95	19,57±5,62	Grup 1,4: >0.05 Grup 2,4: >0.05 Grup 3,4: >0.05
CD3(-) CD56(+)	7,25±4,27	10,11±6,03	11,09±5,96	14,29±8,71	Grup 1,4: >0.05 Grup 2,4: >0.05 Grup 3,4: >0.05
CD3(+) CD16(+)	12,49±6,69	11,25±5,94	9,57±5,36	7,32±2,74	Grup 1,4: >0.05 Grup2,4: >0.05 Grup 3,4: >0.05
CD3(+) CD56(+)	3,55±1,63	5,24±4,51	3,31±1,20	2,78±1,99	Grup 1,4: >0.05 Grup 2,4: >0.05 Grup 3,4: >0.05
CD16(+) CD56(+)	4,04±2,64	4,00±2,04	6,77±4,01	9,75±6,80	Grup 1,4: 0,066 Grup 2,4: 0,02 Grup 3,4: >0,05
CD16(+) NKG2D(+)	9,40±3,39	7,23±2,48	9,53±3,83	12,94±6,33	Grup 1,4: >0,05 Grup 2,4: 0,02 Grup 3,4: >0,05
CD2(+) NKG2D(+)	50,88±12,08	51,58±14,70	39,97±7,87	43,53±7,66	Grup 1,4: >0,05 Grup 2,4: >0,05 Grup 3,4: >0,05 Grup 2,3:0,047
CD2(+) CD16(+)	13,67±5,67	9,46±3,45	9,45±4,23	13,35±5,18	Grup 1,4: >0,05 Grup 2,4: >0,05 Grup 3,4: >0,05
CD94(+) NKp46(+)	2,97±1,41	2,46±1,41	5,34±4,13	6,49±2,31	Grup 1,4: >0,05 Grup 2,4: 0,01 Grup 3,4: >0,05 Grup 2,3:0,063
CD56(+) CD94(+)	4,38±2,49	5,47±2,78	6,11±3,18	9,59±5,14	Grup 1,4: 0,04 Grup 2,4: 0,05 Grup 3,4: >0,05



Şekil 4.4. Gruplara göre NK hücre popülasyonlarının karşılaştırılması



Şekil 4.5. Reseptör ekspresyonlarının gruplara göre karşılaştırılması-1



Şekil 4.5. Reseptör ekspresyonlarının gruplara göre karşılaştırılması-2

4.4. Olguların profilaktik kranyal ışınlama durumlarına göre karşılaştılması

Tüm olgular profilaktik kranyal ışınlama durumlarına göre E:H 1:1 oranında NK sitotoksisitesi ve CD16(+)CD56(+)'liği yönünden değerlendirildi. Profilaktik kranyal ışınlama alanlarla almayanların E:H 1:1 oranında NK sitotoksisite değerinde anlamlı farklılık elde edildi ($p<0.05$) (Tablo 4.4). NK hücre sayısını yansıtan CD16(+) CD56(+)'liği açısından anlamlı fark yoktu.

Tablo 4.4 Tüm olguların profilaktik kranyal ışınlama durumlarına göre karşılaştırılması

	E:H 1:1 (%)	**CD16(+) CD56(+) (%)**
PKI(+)	40,69±16,23 (n:13)	4,69±3,17 (n:18)
PKI(-)	22,99±14,5 (n:13)	5,90±3,59 (n:14)
p	**0,007***	**>0,05**

*p<0.05

4.5. Grupların profilaktik kranyal ışınlama durumlarına göre karşılaştırılması

Grup 2 ve grup 3 olguları NK hücre sayıları ve NK hücre aktiviteleri yönünden profilaktik kranyal ışınlama durumlarına göre karşılaştırıldı (Tablo 4.4). İdame kemoterapisi alan olguların (grup 2) %83'üne profilaktik kranyal ışınlama uygulanmıştı. LU ile ifade edilen NK aktivitesi açısından profilaktik kranyal ışınlama alan ve almayanlar arasında anlamlı fark yoktu. $CD16^{+}CD56^{+}$'liği yönünden bakıldığında PKI(+) olguların ortalama değeri %3,80±2,15 iken, PKI(-) olguların ortalama değeri %5±1,41 idi, ancak aralarında anlamlı fark yoktu. Tedavisi kesilmiş olguların (grup 3) %53'ü PKI(+) idi, E:H oranı 1:1 için değerlendirildiğinde PKI(+) olguların değeri PKI(-) olgulardan daha yüksekti ancak fark anlamlı değildi. NK aktivitesi yönünden bakıldığında LU değeri ortalaması PKI(+) grupta 1,49±0,24, PKI(-) grupta 1,75±0,31 idi. Tedavisi kesilmiş grupta PKI(+)'lerin $CD16^{+}CD56^{+}$'liği açısından ortalama değeri %5,81±3,98, PKI(-)'lerin ise %8,05±4,01 idi ancak aralarındaki fark anlamlı değildi.

Tablo 4.5. Grupların profilaktik kranyal ışınlama durumlarına göre karşılaştırılması

	Grup 2 (İdame KT) n=12	**Grup 3 (Tedavi kesilmiş) n=15**
PKI (+)		
• **N**	10(%83)	8(%53)
• **E:H 1:1**	%48,06± 11,51	%28,90±16,62
• **$LU_{50}/10^5$**	1,77±0,68	1,49±0,24
• **CD16+ CD56+**	%3,80±2,15	%5,81±3,98
PKI (-)		
• **N**	1(%8)	7(%47)
• **E:H 1:1**	%49,54	%21,08±16,86
• **$LU_{50}/10^5$**	1,81	1,75±0,31
• **CD16+ CD56+**	%5±1,41	%8,05±4,01
• **p**		>0.05

4.6. Grupların risk gruplarına göre karşılaştırılması

Risk gruplarına göre gruplar kendi içlerinde NK hücre popülasyonu ve NK hücre aktivitesi yönünden değerlendirildi (tablo 4.5.). Grup 1 vakalarının %50'si standart, geri kalanı ise orta risk grubundandı. Standart risk grubunun LU ortalama değeri 1,51±0,49 ve $CD16^+CD56^+$ ortalama değeri

4,48±3,31 idi. Grup 2 vakalarının %17'si standart, %34'ü orta, %50'si yüksek risk grubundandı. NK hücre populasyonunu ifade eden $CD16^{+}CD56^{+}$'liği açısından standart risk grubu değerleri yüksek risk grubundan daha yüksekti ancak fark anlamlı değildi. Grup 3 vakalarının %47'si standart risk grubu, %53'ü yüksek risk grubundandı. Standart risk grubunun LU ortalama değeri 1,75±0,31 ve $CD16^{+}CD56^{+}$ ortalama değeri %8,05±4,01 idi.

Tablo 4.6. Risk gruplarına göre litik ünite ve NK alt gruplarının karşılaştırılması*

	Grup 1 (Prot. M bitmiş)		**Grup 2 (İdame KT)**			**Grup 3 (Tedavi kesilmiş)**	
	Standart	**Orta**	**Standart**	**Orta**	**Yüksek**	**Standart**	**Yüksek**
N	3	3	2	4	6	7	8
$LU_{50}/10^5$	1,51±0,49	1,20±0,25	1,81	1,47±0,47	2,00±0,78	1,75±0,31	1,49±0,24
CD16+ CD56+ (%)	4,48±3,31	3,60±2,42	5,00±1,4	3,75±0,96	3,83±2,79	8,05±4,01	5,81±3,98

*p>0.05

4.7. Tedavi kesilme sürelerine göre olguların değerlendirilmesi

Tedavisinin kesilmesinin üzerinden bir yıldan az süre geçen olgularla, aynı gruptaki diğer olgular ve kontrol grubu NK popülasyonu ve NK aktivitesi yönünden kıyaslandı (tablo 4.6.). E:T oranı 1:1 için değerlendirildiğinde TK≤1 yıl olan olguların değeri %22,36±15,87, bir yıldan uzun süre olan olguların değeri ise %26,32±18,35 bulundu. $CD16^{+}CD56^{+'}$liği TK≤1 yıl için %5,05±3,58, TK>1 yıl için %8,06±4,02 saptandı. Gruplar arasında anlamlı farklılık saptanmadı.

Tablo 4.7. Tedavi kesilme sürelerine göre NK popülasyonu ve NK aktivitesi

	*TK≤1 yıl	TK>1 yıl	Kontrol grubu	p
N	7	8	9	
E:H 1:1	%22,36±15,87	%26,32±18,35	%20,61±10,98	>0.05
$LU_{50}/10^5$	1,57±0,3	1,71±0,32	1,55±0,22	>0.05
CD16+ CD56+	%5,05±3,58	%8,06±4,02	%9,75±6,80	>0.05

***TK: Tedavi kesimi

4.8. Grupların immünfenotiplerine göre karşılaştırılması

Gruplar immünfenotip durumlarına göre E:H 1:1, LU ve değerlerine göre karşılaştırıldı (tablo 4.7). Anlamlı farklılık tedavisiz grupta B ve T hücre immünfenotipleri arasında $CD16^+CD56^+$'liği açısından saptandı ($p<0.05$).

Tablo 4.8. Grupların immünfenotip dağılımlarına göre E:H 1:1, LU ve NK alt gruplarının karşılaştırılması

	Grup 1 (Prot. M bitmiş)		**Grup 2 (İdame KT)**		**Grup 3 (Tedavi kesilmiş)**		**p***
	B hücre	**T hücre**	**B hücre**	**T hücre**	**B hücre**	**T hücre**	
n	5	1	5	7	12	3	
1:1 E:H (%)	19,67± 3,79	23,04	41,36±11,58	50,18± 10,60	24,11±17,95	24,80±15,64	>0.05
$LU_{50}/10^5$	1,49±0,38	0,95	2,31±0,71	1,54±0,49	1,64±0,26	1,65±0,41	>0.05
CD16+ CD56+ (%)	4,56±2,58	1,43	4,00±1,58	4,00±2,45	5,03±3,85	9,90±1,88	0.38**

*p:Her grup kendi içinde **Grup 3 ve $p<0.05$

4.9. Sitokin düzeylerinin gruplara göre dağılımı

Olguların deney öncesi (uyarılmamış- serum düzeyi) ve deney sonrası (uyarılmış-tümor hücreleri ile) alınan örnekleriyle ölçülen IL-15 ve INF-γ düzeyleri gruplara göre değerlendirildi. Deney öncesi alınan örneklerde INF-γ düzeylerinde grup 2 ve grup 3 değerleri grup 4'ten anlamlı derecede düşüktü ($p<0.05$) (tablo 4.6.). Diğer farklılıklar anlamlı değildi.

Tablo 4.9. Gruplar arasında deney öncesi ve sonrası IL-15, INF-γ düzeylerinin karşılaştırılması

	Grup 1 (Prot. M bitmiş)	**Grup 2 (İdame KT)**	**Grup 3 (Tedavi kesilmiş)**	**Grup 4 (Kontrol grubu)**	**p**
IL-15 (Uyarılmamış)	9,94±5,82	8,01±9,27	11,31± 8,60	10,61± 5,01	Grup 1,4: >0,05 Grup 2,4: >0,05 Grup 3,4: >0,05
INF-γ (Uyarılmamış)	238,53±115,17	173,94±338,94	106,73±178,05	637,59±336,04	Grup 1,4: ,070 Grup 2,4: ,007 Grup 3,4: ,001
IL-15 (Uyarılmış)	48,21± 86,28	43,63±121,39	9,72±16,86	24,92± 38,32	Grup 1,4: >0,05 Grup 2,4: >0,05 Grup 3,4: >0,05
INF-γ (Uyarılmış)	11,31± 3,51	18,29± 23,89	12,33± 3,03	10,88± 2,47	Grup 1,4: >0,05 Grup 2,4: >0,05 Grup 3,4: >0,05

5. TARTIŞMA

Lösemiler gibi neoplastik hastalıkların yoğun sitostatik tedavisi total remisyonlarda hatta bazı hastalıklarda total kürlerde ciddi artışa neden olurken tedavinin kendisinden kaynaklanan çeşitli komplikasyonları da beraberinde getirmiştir. Sitostatiklerin yan etkilerinden bir tanesi de immün sistem üzerine inhibe edici etkileridir. İmmün sistem disfonksiyonları hem kalitatif hem de kantitatif olup, oluşan etki çeşitli derecelerde bu sistemin tüm temel elemanlarına karşıdır (205) . NK hücreleri de immün sistemin doğal (innate) immün yanıtları için kritik öneme sahip hücrelerdir.

Akut lenfoblastik lösemili çocuklarda NK aktivitesi hem hastalığın kökenini anlamak, hem de kemoterapi sürecince gelişebilecek infeksiyonlardan korunmak için önemlidir. Kombine kemoterapinin öncüleri bu immün disfonksiyonun farkında olmuşlar ve tedavi altındaki çocuklarda immün fonksiyonları güçlendirmek için aralıklı BCG uygulamaları gibi çeşitli girişimlerde bulunmuşlardır (206). Tüm bu girişimlere rağmen immün fonksiyonların düzelmesi ancak idame kemoterapisi kesildikten sonra olmaktadır (207). Yine de günümüze kadar bu konuda çalışmalar yoğun olarak süregelmiştir.

Çalışmamızda ALL'li çocukların kemoterapinin çeşitli aşamalarında NK aktivitelerini sayısal ve fonksiyonel olarak değerlendirmeyi ve bu özellikleri klinik ile ilişkilendirmeyi hedefledik. Olgularımızın genel özellikleri değerlendirildiğinde gruplar arasında cinsiyet dağılımı açısından anlamlı farklılık yoktu. Yaş olarak değerlendirildiğinde en büyük yaş ortalaması (13,09±4,32) tedavisi kesilmiş gruba (grup 3) aitti. Tanı yaşları arasında anlamlı fark olmayan ALL'li çocuklarda grup 3'e ait farkın sebebi, grubun tedavisinin üzerinden belirli bir zaman geçmiş çocuklardan oluşmasıydı. Olguların immünfenotipleri, risk grupları, profilaktik kranyal ışınlama durumları ve kromozom anomalileri de değerlendirilmeye alındı. Kromozom anomalisi t(4,11) pozitifliği olan bir vaka idame kemoterapisi alan gruptaydı ve kromozom anomalisinden dolayı yüksek riskli grupta değerlendirilmişti.

NK hücre aktivitesini ALL'li çocuklarda değerlendiren Sørskaar ve arkadaşlarının çalışmasında tanı anında ALL'li çocukların periferik kanda ve kemik iliğinde NK aktivitesi normal sağlıklı kontrollere göre anlamlı olarak düşük saptanmıştır. Remisyondaki hastaların ise NK aktivitesi kontrol grubundan farklı bulunmamıştır. Ancak hasta sayısının az olması ve kontrol grubunun çocuklar yerine sağlıklı erişkinlerden oluşması çalışmanın sonuçlarını yorumlamayı zorlaştırmaktadır (191).

Daha geniş vaka serisi olan bir çalışmada idame kemoterapisi alan ALL'li çocukların NK aktivitesinin ($LU/10^7$ %20 öldürme oranından hesaplanarak) erişkin ve çocuk kontrollere göre anlamlı olarak düşük olduğu, tedavisi kesilmiş grupla kontrol arasında litik ünite açısından anlamlı fark olmadığı belirlenmiştir (208). Benzeri sonuçlar elde eden bir başka çalışmada idame kemoterapisi alan yirmi iki ALL'li çocukta sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında, NK hücre sayısı normal olsa bile NK aktivitesinin düşük olduğu, ancak NK aktivitesinin tedavinin kesimi ile birkaç ay içinde normale döndüğü saptanmıştır (209).

Çalışmamızda NK aktivitesi hem farklı E:H oranlarında % sitotoksisite olarak, hem de $LU_{50}/10^5$ olarak değerlendirildi. $LU_{50}/10^5$ olarak bakıldığında grup 2'nin ortalama değeri en yüksekti, ancak fark anlamlı değildi. İdame kemoterapisi alan grubun (grup 2) 1:1 E:H oranlarında NK aktivitesi gruplar arasında en yüksekti. Grup 1 ile grup 2, grup 2 ile grup 3, grup 2 ile grup 4 arasında anlamlı farklılıklar vardı. Bu bulgu söz konusu çalışmalardan farklıydı. Çocukluktan erişkinliğe uzanan yaşamda NK hücrelerinin hem sayısında hem de aktivitesinde artış olduğu bilinmektedir (210). Yaş dağılımında diğer gruplardan farklı olmayan idame kemoterapisi alan grubun (grup 2) NK aktivitesindeki yükseklik bu durumla açıklanamamaktadır. Hodgkin hastalığı üzerinde yapılan bir çalışmada radyoterapi veya radyoterapi+kemoterapi ile tedavi edilmiş hasta grubunda NK aktivitesi kontrol grubuna göre çalışmamıza benzer şekilde artmış bulunmuştur (211). İdame kemoterapisi alan gruptaki çocukların %83'üne profilaktik kranyal ışınlama idame kemoterapisine başlamadan hemen önce uygulanmıştı. Yamada ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 24 Gy profilaktik kranyal ışınlama uygulanan ALL'li çocuklarda ışınlamadan hemen sonra bakılan NK hücre aktivitesi anlamlı olarak artmıştır. Sağlıklı kişilerden alınan lenfositlerin in vitro 20 Gy radyasyona maruz bırakılması ile NK aktivitesinin ışınlanmayanlara göre 1.4 kat arttığı ($p<0.05$) ancak 50 Gy radyasyona maruz bırakıldığında anlamlı olarak azaldığı bildirilmiştir. Radyoterapinin geç etkileri değerlendirildiğinde ışınlanan hastaların NK aktivitelerinin ortalaması ışınlanmayanlara ve kontrol grubuna göre yüksek bulunmuştur. Çalışmada bu durumun süpresör T lenfositlerinin azalması veya hümoral etki ile ilişkili olup olmadığı da araştırılmış bunun radyoterapinin direkt NK üzerine etkisi olduğu saptanmıştır (195). Bir başka çalışmada ise sağlıklı kişilerde düşük radyasyon dozlarında NK aktivitesinin ortalama değerlerinin arttığı görülmektedir (212). Çalışmamızda idame kemoterapisi alan grubun büyük çoğunluğuna (%83) 12 Gy-18 Gy radyasyon dozu uygulanmıştır. Ayrıca tüm olgular istatistiksel olarak değerlendirildiğinde profilaktik kranyal ışınlama alan olguların almayanlara göre NK sitotoksisite değerlerinin anlamlı derecede yüksek olduğunu saptandı. İdame grubundaki NK aktivitesi artışına belki böyle bir yorum getirilebilir.

Aktivite reseptör ilişkisini değerlendirmek için; gruplara göre reseptör ekspresyonları incelendiğinde NK hücrelerini yansıtan $CD16^{+}CD56^{+}$ populasyonu grup 1 (protokol M bitmiş) ve grup 2 (idame kemoterapisi alan)'de grup 4 (kontrol grubu)'e göre anlamlı olarak azalmıştır. Mazur ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ALL'li çocuklar protokol II'nin sonunda ve tedavileri kesildikten bir yıl sonra $CD16^{+}CD56^{+}$ populasyonu açısından kontrol grubu ile karşılaştırılmışlar ve yoğun kemoterapi alan grupta bu populasyon diğer gruplara göre düşük saptanmıştır (213).

2009 yılında yayınlanan Eyrich ve arkadaşlarına ait prospektif bir çalışmada standart ve orta risk, radyoterapi almamış yirmi ALL'li çocuğun kemoterapinin çeşitli aşamalarında hücresel ve hümoral immünitesi değerlendirilmiştir. NK hücrelerinin tanıda normal sınırlar içinde olduğu, ancak yoğun kemoterapi ile diğer lenfositler gibi sayılarının azaldığı, indüksiyon faz II'nin sonunda kısa bir toparlanma sürecinden sonra reindüksiyon ve idame kemoterapi süresince normal sınırların altında devam ettiği ifade edilmektedir. Tedavinin kesilmesinden 3-6 ay sonra tekrar yükseldikleri görülmektedir (214). Benzeri bulgular NK hücre populasyonu açısından bizim çalışmamızda da elde edilmiştir. Bu prospektif çalışmada sitokinler de araştırılmıştır. IL-4, IL-7, IL-13, IL-15, IFNγ ve TGFβ düzeyleri değerlendirilmiş, bu sitokinlerin düzeylerinde tedavinin seyri sırasında minör değişiklikler elde edilmiştir. Çalışmamızda çeşitli tedavi gruplarında IFNγ ve IL-15 düzeyleri mononükleer hücreler tümör hücreleri ile uyarılmadan ve uyarıldıktan sonra değerlendirilmiş ve yalnızca tümör hücreleri ile uyarılmamış örneklerde grup 2 ve grup 3 kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur.

Çalışmamızda $CD16^{+}NKG2D^{+}$ hücre popülasyonu idame kemoterapisi alan grup 2'de kontrol grubu (grup 4)'na göre düşük saptanmıştır ($p<0.05$). NKG2D ligandları MICA, MICB ve ULBP olan aktivatör bir reseptördür. Çalışmalarda tek başına NKG2D sinyallerinin NK hücre fonksiyonlarını başlatmakta yeterli olduğu ifade edilmektedir (158).

Kemoterapinin yoğunluğu, süresi immün fonksiyonları önemli ölçüde etkilemektedir. Kemoterapinin yoğunluğunu belirleyense risk gruplarıdır. Ek ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada çocukluk çağı ALL'sinde standart, orta ve yüksek risk grupları karşılaştırılmış ve tedaviden altı ay sonra bile yüksek risk grubunda T, B ve NK hücrelerinin alt gruplarında kalıcı anormalliklerin olduğu belirlenmiştir (215). Çalışmamızda olguların risk gruplarına göre değerlendirilmesinde grup 1 (protokol M bitmiş) içindeki standart risk grubunun LU ve NK hücre populasyonu ortalamaları orta

risk grubundan fazlaydı. Grup 2 (idame kemoterapisi alan)'de NK aktivitesini yansıtan LU değeri yüksek risk grubunda standart ve orta risk grubundan fazlaydı. $CD16^{+}CD56^{+}$'liği açısından ise standart grup değeri diğer risk gruplarından fazlaydı. Grup 3 (tedavisi kesilmiş)'de ise hem NK aktivitesi, hem NK hücre sayısı açısından standart risk grubu daha üstündü. Grup 2'de yüksek risk grubunda gözlenen NK aktivitesindeki artışın sebebi bu grubun hepsine profilaktik kranyal ışınlama uygulanması olabilir. Onun dışındaki diğer gruplarda Ek'in çalışmasına benzer şekilde standart risk grubunda yani daha az yoğun kemoterapi alan olgularda NK fonksiyonları kalitatif ve kantitatif daha fazlaydı. Grupların immünfenotiplerine göre değerlendirilmesi risk grupları değerlendirmesi ile benzerdi. T hücreli grup yüksek risk grubunu ifade ederken, B hücreli grup ya standart ya da orta risk grubunu yansıtmaktaydı.

Olguların tedavi kesilme sürelerine göre değerlendirilmesinde grup 3 vakaları kullanılmıştır. Olgu sayısının az olması nedeniyle tedavi kesiminin üzerinden 1 ay ve 6 ay geçmiş çocuklar olarak gruplandırılamadı. E:H 1:1, LU ve $CD16^{+}CD56^{+}$ açısından tedavi kesimi $\leq$ 1 yıl olan olgular, tedavi kesimi TK > 1 yıl olanlara göre daha düşük değerlere sahipti. $CD16^{+}CD56^{+}$ değerleri ise kontrol grubuna göre daha düşüktü. Kovacs ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada lösemili çocukların %41,9'unda kemoterapi kesilmesinden 15±4,4 ay sonra sellüler immüniteye ait parametrelerden en az biri normal sınırların altındaydı. NK aktivitesi lösemili çocukların %16,3'ünde, ADCC %18,6'sında azalmıştı (216).

Çalışmamızda literatürden farklı olarak hem NK aktivitesini hem de NK hücreleri reseptörlerini birlikte değerlendirdik. Ayrıca risk grupları ve kranyal ışınlama durumlarını da dikkate aldık. Çalışmamızda gruplara düşen olgu sayısının az olması ve homojen dağılmaması istatiksel olarak değerlendirmeyi zorlaştırmıştır. NK aktivitesinin ve sayısının sağlıklı bireylerde yaşla birlikte değişmesi daha geniş vaka serilerinde her grup içinde yaş gruplarını ayırmayı gerekli kılmaktadır. Ayrıca her olguyu diğerinden ayıran kişisel özellikler nedeniyle (hastanın tanısından tedavi kesilinceye kadar geçen sürede çeşitli aralıklarla takibi) ve kemoterapinin değişik aşamalarını içeren prospektif bir çalışma gereklidir. ALL'li çocuklarda immün sistemi hem hümoral hem de hücresel olarak değerlendirmek, bu sisteme tüm yönlerden bakmayı sağlayacaktır.

6. SONUÇLAR

1. NK sitotoksisite deneyinde 1:1 E:H oranında grup 2 (idame KT) değeri grup 1 (protokol M bitmiş) , grup 3 (tedavisi kesilmiş) ve grup 4 (kontrol grubu) değerlerinden anlamlı derecede yüksekti ($p<0.05$).
2. Reseptör ekspresyonları değerlendirildiğinde $CD16^+CD56^+$, $CD16^+NKG2D^+$, $CD94^+NKp46^+$ yönünden grup 2'nin grup 4'ten anlamlı derecede düşük olduğu gözlendi ($p<0.05$). $CD56^+CD94^+$'liği yönünden grup 1'in grup 4'ten anlamlı derecede düşük olduğu izlendi ($p<0.05$).
3. Tüm olgular değerlendirildiğinde profilaktik kranyal ışınlama alanların NK sitotoksisitesi E:H 1:1 oranında profilaktik kranyal ışınlama almayanlara göre anlamlı derecede yüksekti.
4. Profilaktik kranyal ışınlama durumlarına göre NK fonksiyonları kalitatif ve kantitatif değerlendirildiğinde gruplar arasında anlamlı farklılık yoktu.
5. Risk gruplarına göre LU, $CD16^+CD56^+$ değerlendirildiğinde gruplar arasında anlamlı farklılık yoktu ancak grup 1 ve grup 3'de standart risk grubu değerleri ortalaması orta ve yüksek risk grubuna göre daha yüksekti. Grup 2'de ise LU yüksek risk grubu ortalaması standart ve orta risk grubundan fazlaydı.
6. Tedavi kesilme sürelerine göre olguların değerlendirilmesinde E:H 1:1 oranında ve $CD16^+CD56^+$'liği yönünden TK $\leq$ 1 yıl olan olguların TK > 1 yıl olan olgulara göre ortalaması daha düşüktü.
7. Grupların immünfenotiplerine göre karşılaştırılmasında gruplar arasında anlamlı farklılık yalnızca tedavisiz grupta B ve T hücreleri arasında $CD16^+CD56^+$'liği yönünden elde edildi.
8. IFNγ ve IL-15 düzeylerinin ölçülmesinde yalnızca tümör hücreleri ile uyarılmamış örneklerde grup 2 ve grup 3 kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur.

Sonuç olarak, çoğunluğu profilaktik kranyal ışınlama alan grup 2 (idame kemoterapisi alan)'nin NK sitotoksisitesinin yüksek çıkması düşük dozlarda radyoterapinin NK hücre fonksiyonlarını arttırması ile ilişkili olabilir. Risk gruplarının belirlediği kemoterapi ise NK hücreleri sayısal bazda etkileyemektedir. Tedavi kesilme süresi ise NK hücrelerinin fonksiyonlarını yeniden kazanmasında önemlidir. ALL günümüzde elde edilen pek çok başarılı sonuçla bir çocukluk çağı kanseri olmaktan çıkıp bir hastalık haline gelme yolunda ilerlemektedir. Bugünün ALL'li çocukları yarının sağlıklı erişkinleri olacaklardır. Yalnızca tedavi sürecinde değil, tedavi sonrasında da immün sistemin durumu bu nedenle önem kazanmaktadır. Pek çok immün fonksiyonunun merkezinde yer alan NK hücrelerinin fonksiyonlarında radyoterapi ile meydana gelen artış akla MSS relapsını önlediği gibi sistemik relapsı da önleyebilir mi sorusunu getirmektedir. Araştırmalar kafalarda yeni soru işaretleri

oluştururken yeni cevapların da bulunmasını sağlayacaktır. Kemoterapi ve radyoterapi ile fonksiyonlarında değişiklikler meydana gelen NK hücrelerini daha iyi anlamak ve bu sayede fonksiyonlarını arttıran tedavi yöntemleri geliştirmek, ALL'li çocukların hayat kalitelerine katkıda bulunacaktır.

7. KAYNAKLAR

1. Kutluk T. Çocukluk çağı kanserlerin epidemiolojisi. Klinik Gelişim 2007;20: 5-12.

2. Pui CH, Campana D. Childhood Leukemia. In: Abeloff M, Armitage JO, Niederhuber JE, Kastan MB, McKenna WB(eds). Abeloff: Abeloff's Clinical Oncology, 4th ed. Churchill Livingstone, An Imprint of Elsevier, 2008.

3. Miller J.S. The biology of natural killer cells in cancer, infection and pregnancy. Experimental Hematology, 2001;29:1157-68.
4. Levinson W, Jawetz E.(eds) Medical Microbiology & İmmünology. 6th edition, Mc Graw-Hill Medical Publishing Division. 2005:396-422.
5. Jonges LE, Albertsson P, von Vlierberghe RL, et al. The phenotypic heterogeneity of human natural killer cells: presence of at least 48 different subsets in the peripheral blood, Scand. J. İmmünol. 2001;53:103-10.
6. Leukemias In: Lanzkowsky P editor, Manual of Pediatric Hematology and Oncology: Elsevier Academic Press. San Diego, 2005;415-53.
7. Ünal Ş, Tuncer AM. Lösemide epidemiyoloji, Tanısal Yaklaşım ve Sınıflandırma. Katkı Pediatri Dergisi. 2004:26(3),338-49.
8. Zuelzer WW, Inoue S, Thompson RI et al. Long-term cytogenetic studies in acute leukemia of children: the nature of relapse. Am J Hematol 1976; 1: 143–90.
9. Burchenal JH, Murphy ML. Long term survivors in acute leukemia. Cancer Res 1965; 25: 1491–94.
10. Reiter A, Schrappe M, Ludwig W-D et al. Chemotherapy in 998 unselected childhood ALL patients. Results and conclusions of the multicenter trial ALL-BFM ’86. Blood 1994; 84: 3122–33.
11. Gaynon PS, Steinherz PG, Bleyer WA et al. Improved therapy for children with acute lymphoblastic leukemia and unfavorable presenting features: a follow-up report of the Children’s Cancer Group Study CCG-106. J Clin Oncol 1993;11: 2234–42.
12. Rivera GK, Raimondi SC, Williams DL et al. Improved outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia with reinforced early treatment and rotational combination chemotherapy. Lancet 1991; 337: 61–66.
13. Buchanan GR, Rivera GK, Boyett JM et al. Reinduction therapy in 297 children with acute lymphoblastic leukemia in first bone marrow relapse: A Pediatric Oncology Group study. Blood 1988; 72: 1286–92.

14. Henze G, Fengler R, Hartmann R et al. Six-year experience with a comprehensive approach to the treatment of recurrent childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL-REZ BFM 85). A relapse study of the BFM group. Blood 1991; 78: 1166–72.
15. Pui CH. Acute lymphoblastic leukemia. In: Lichtman MA, Beutler E, Kipps TJ, Seligsohn U, Kaushansky K, Prchal JT(eds). Williams Hematology, 7th edition. The McGraw-Hill Companies.2006:1321-42.
16. National Cancer Institute. SEER Cancer Statistics Review, 1975–2006. Erişim: http://seer.cancer.gov/csr/1975İ2006/.
17. Gurney JG, Severson RK, Davis S, et al. Incidence of cancer in children in the United States. Sex-, race-, and 1-year age-specific rates by histologic type. Cancer 1995;75(8):2186–95.
18. American Cancer Society. Cancer facts and figures 2008. Erişim: http://www.cancer.org.
19. Shivakumar R, Tan W, Wilding GE, et al. Biologic features and treatment outcome of secondary acute lymphoblastic leukemia–a review of 101 cases. Ann Oncol 2008;19(9):1634–38.
20. Spector LG, Ross JA, Robison LL, et al. Epidemiology and etiology. In: Pui CH, editor. Childhood leukemias. New York: Cambridge University Press;2006. p. 48–66.
21. Wiemels JL, Cazzaniga G, Daniotti M, et al. Prenatal origin of acute lymphoblastic leukaemia in children. Lancet 1999; 354:1499–503.
22. Greaves M. Molecular genetics, natural history and demise of childhood leukaemia. Euro J Cancer 1999; 35: 1941–53.
23. Maia AT, Ford AM, Martineau M, et al. Molecular tracking of leukaemogenesis: insights from a triplet pregnancy. Blood 2000; 96(suppl 1): 542a.
24. Eguchi-Ishimae M, Eguchi M, Ishiie tE a,l . Breakage and fusion of the TEL(ETV6) gene in immature B lymphocytes induced byapoptogenic signals. Blood 2001; 97: 737–43.
25. Nishimura R, Saikawa Y, Uehara T, et al. Detection of the TELAM1 fusion gene expression in febrile children with virüs infections. Blood 2000; 96 (suppl 1): 542a.
26. Biondi A, Cimino G, Pieters R, et al. Biological and therapeutic aspects of infant leukemia. Blood 2000; 96: 24–33.
27. Pui C-H, Relling MV. Topoisomerase II inhibitor-related acute myeloid leukemia. Br J Haematol 2000; 109: 13–23.
28. Alexander FE, Patheal SL, Biondi A, et al. Transplacental chemical exposure and risk of infant leukemia with MLL gene fusion. Cancer Res 2001; 61: 2542–46.

29. Lanciotti M, Dufour C, Corral L, et al. Genetic polymorphism of NAD(P)H: quinone oxidoreductase is associated with an increased risk of infant acute lymphoblastic leukemia without MLL gene rearrangements. Leukemia 2005; 19: 214–16.
30. Krajinovic M, Labuda D, Sinnett D. Glutathione S-transferase P1 genetic polymorphisms and susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukaemia. Pharmacogenetics 2002; 12: 655–58.
31. Skibola CF, Smith MT, Kane E, et al. Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene are associated with susceptibility to acute leukemia in adults. Proc Natl Acad Sci USA 1999; 96: 12810–15.
32. Skibola CF, Smith MT, Hubbard A, et al. Polymorphisms in the thymidylate synthase and serine hydroxymethyltransferase genes and risk of adult acute lymphocytic leukemia. Blood 2002; 99: 3786–91.
33. Healy J, Bélanger H, Beaulieu P, et al. Promoter SNPs in G1/S checkpoint regulators and their impact on the susceptibility to childhood leukemia. Blood 2007; 109: 683–92.
34. Gast A, Bermejo JL, Flohr T, et al. Folate metabolic gene polymorphisms and childhood acute lymphoblastic leukemia: a case-control study. Leukemia 2007; 21: 320–25.
35. Pui CH, Campana D, Evans WE. Childhood acute lymphoblastic leukaemia--current status and future perspectives. Lancet Oncol. 2001 Oct;2(10):597-607.
36. Hjalgrim LL, Westergaard T, Rostgaard K, et al. Birth weight as a risk factor for childhood leukemia: a meta-analysis of 18 epidemiologic studies. Am J Epidemiol 2003; 158: 724–35.
37. Ahlbom A, Day N, Feychting M, et al. A pooled analysis of magnetic fields and childhood leukaemia. Br J Cancer 2000; 83: 692–98.
38. Buffler PA, Kwan ML, Reynolds P, Urayama KY. Environmental and genetic risk factors for childhood leukemia: appraising the evidence. Cancer Invest 2005; 23: 60–75.
39. Kinlen L. Infections and immune factors in cancer: the role of epidemiology. Oncogene 2004; 23: 6341–48.
40. Greaves M. Infection, immune responses and the aetiology of childhood leukaemia. Nat Rev Cancer 2006; 6: 193–203.
41. Pui CH, Relling MV, Downing JR. Acute lymphoblastic leukemia. N Engl J Med 2004; 350: 1535–48.
42. Armstrong SA, Look AT. Molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia. J Clin Oncol 2005; 23: 6306–15.

43. Yeoh EJ, Ross ME, Shurtleff SA, et al. Classification, subtype discovery, and prediction of outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. Cancer Cell 2002; 1: 133–43.
44. Lu J, Getz G, Miska EA, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. Nature 2005; 435: 834–38.
45. Hong D, Gupta R, Ancliff O, et al. Initiating and cancer-propagating cells in TEL-AML1-associated childhood leukemia. Science 2008;319: 336–39.
46. Grabher C, von Boehmer H, Look AT. Notch 1 activation in the molecular pathogenesis of T-cell acute lymphoblastic leukaemia. Nat Rev Cancer 2006; 6: 347–59.
47. Weng AP, Ferrando AA, Lee W, et al. Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. Science 2004; 306: 269–71.
48. Mullighan CG, Goorha S, Radtke I, et al. Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia. Nature 2007;446: 758–64.
49. Ferrando AA, Neuberg DS, Staunton J, et al. Gene expression define novel oncogenic pathways in T-cell acute lymphoblastic leukemia. Cancer Cell 2002; 1: 75–87.
50. Smith OP, Hann IM. Clinical features and therapy of lymphoblastic leukemia. In: Arceci RJ, Hann IM, Smith OP(eds). Pediatric Hematology, Third Edition. Blackwell Publishing 2006: 450-81.
51. Kahwash SB, Qualman SJ. Cutaneous lymphoblastic lymphoma in children: report of six cases with precursor B-cell lineage. Pediatr Dev Pathol 2002;5(1):45–53.
52. Mainzer R, Taybi H. Thymic enlargement and pleural effusion: an unusual roentgenographic complex in childhood leukemia.Am J Roentgenol 1971; 112: 35–39.
53. Greydanus DE, Burgert O, Gilchrist GS et al. Hypothalamic syndrome in children with acute lymphocytic leukemia. Mayo Clin Proc 1978; 53: 217–22.
54. Gunther R, Chelstrom LM, Tuel-Ahlgren L, Simon J, Myers DE, Uckun FM. Biotherapy for xenografted human central nervous system leukemia in mice with severe combined immunodeficiency using B43 (anti-CD19)-pokeweed antiviral protein immunotoxin. Blood 1995; 85: 2537–45.
55. Lauer SJ, Kirchner PAE. Identification of leukemic cells in the cerebrospinal fluid from children with acute lymphoblastic leukemia: advances and dilemmas. Am J Pediatr Hematol Oncol 1989; 11: 64–73.

56. Mastrangelo R, Poplack D, Bleyer A et al. Report and recommendations of the Rome workshop concerning poorprognosis acute lymphoblastic leukemia in children: biologic bases for staging, stratification, and treatment. Med Pediatr Oncol 1986; 14: 191–94.
57. Gilchrist GS, Tubergen DG, Sather HN et al. Low numbers of CSF blasts at diagnosis do not predict for the development of CNS leukemia in children with intermediate-risk acute lymphoblastic leukemia: a Children's Cancer Group report. J Clin Oncol 1994; 12: 2594–600.
58. Mahmoud HH, Rivera GK, Hancock ML et al. Low leukocyte counts with blast cells in cerebrospinal fluid of children with newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia. N Engl J Med 1993; 329: 314–19.
59. Smith M, Arthur D, Camitta B et al. Uniform approach to risk classification and treatment assignment for children with acute lymphoblastic leukemia. J Clin Oncol 1996; 14: 18–24.
60. Kim TH, Hargreaves HK, Chan WC et al. Sequential testicular biopsies in childhood acute lymphocytic leukemia. Cancer 1986;57: 1038–41.
61. Nachman J, Palmer NF, Sather HN, et al. Open-wedge testicular biopsy in childhood acute lymphoblastic leukemia after two years of maintenance therapy: diagnostic accuracy and influence on outcome—a report from Children's Cancer Study Group. Blood 1990;75:1051–55.
62. Pui CH, Dahl GV, Bowman WP, et al. Elective testicular biopsy during chemotherapy for childhood leukaemia is of no clinical value. Lancet 1985;2:410–12.
63. Kim TH, Hargreaves HK, Chan WC, et al. Sequential testicular biopsies in childhood acute lymphocytic leukemia. Cancer 1986;57:1038–41.
64. Klein EA, Kay R, Norris DG, et al. Noninvasive testicular screening in childhood leukemia. J Urol 1986;136:864–66.
65. Bowman W, Aur R, Hustu H, et al. Isolated testicular relapse in acute lymphocytic leukemia of childhood: categories and influence on survival. J Clin Oncol 1984;2:924.
66. Watson E, Sauer H, Sadugor M. Manifestations of the lymphoblastomas in the genito-urinary tract. J Urol 1949;61:626.
67. Hustu HO, Aur RJ. Extramedullary leukaemia. Clin Haematol 1978;7:313–37.
68. Nachman JB, Sather HN, Sensel MG, et al. Augmented post-induction therapy for children with high-risk acute lymphoblastic leukemia and a slow response to initial therapy. N Engl J Med 1998;338:1663–71.
69. Schrappe M, Reiter A, Ludwig WD, et al. Improved outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia despite reduced use of anthracyclines and cranial radiotherapy: results of trial ALL-BFM 90. German-Austrian-Swiss ALL-BFM Study Group. Blood 2000;95:3310–22.

70. Kuo TT, Tschang TP, Chu JY. Testicular relapse in childhood acute lymphocytic leukemia during bone marrow remission. Cancer 1976;38:2604–12.
71. Kay HE. Testicular infiltration in acute lymphoblastic leukaemia. Br J Haematol 1983;53:537–42.
72. Givler RL. Testicular involvement in leukemia and lymphoma. Cancer 1969;23:1290–95.
73. Stoffel TJ, Nesbit ME, Levitt SH. Extramedullary involvement of the testes in childhood leukemia. Cancer 1975;35:1203–11.
74. Schrappe M, Beck J, Brandeis WE et al. Treatment of acute lymphoblastic leukemia in young age: results of multicenter study ALL-BFM 81. Klin Padiatr 1987; 199: 133–38.
75. Steinhardt GF, Steinhardt E. Priapism in children with leukemia. Urology 1981; 18: 604–6.
76. Ritter J, Hiddemann W. Akute Leukämie bei Kindern. Munich: Urban & Schwarzenberger, 1985.
77. Hughes RG, Kay HEM. Major bone lesions in acute lymphoblastic leukemia. Med Pediatr Oncol 1982; 10: 67–70.
78. Kushner DC, Weinstein HJ, Kirkpatrick JA et al. The radiologic diagnosis of leukemia and lymphoma in children. Semin Oncol 1980; 15: 316–34.
79. Murphy RG, Greenberg ML. Osteonecrosis in pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia. Cancer 1990; 65: 1717–21.
80. Katz JA, Milton L, Wagner MI et al. Typhlitis: an 18-year experience and postmortem review. Cancer 1990; 65: 1041–47.
81. Schachat A, Markowitz JA. Ophthalmic manifestations of leukemia. Arch Ophthalmol 1989; 107: 697–700.
82. Leonardy NJ, Rupani M, Dent G, Klintworth GK. Analysis of 135 autopsy eyes for ocular involvement in leukemia. Am J Ophthalmol 1990; 109: 436–44.
83. Robb RM, Ervin LD, Sallan SE et al. A pathological study of eye involvement in acute leukemia childhood. Med Pediatr Oncol 1979; 6: 171.
84. Lo Curto M, D'Angelo P, Lumia F et al. Leukemic ophthalmopathy: a report of 21 pediatric cases. Med Pediatr Oncol 1994; 23: 813.
85. Ninane J, Taylor D, Day S et al. The eye as a sanctuary in acute lymphoblastic leukaemia. Lancet 1980; i: 452–53.
86. Reiter A, Schrappe M, Ludwig WD et al. Favorable outcome of B-cell acute lymphoblastic leukemia in childhood: a report of three consecutive studies of the BFM group. Blood 1992; 80: 2471–78.

87. Lipshultz SE, Colan SD, Sallan SE et al. Late cardiac effects of doxorubicin therapy for acute lymphoblastic leukemia in childhood. N Engl J Med 1991; 324: 808–15.
88. Lipshultz SE, Lipsitz SR, Mone SM et al. Female sex and higher drug dose as risk factors for late cardiotoxic effects of doxorubicin therapy for childhood cancer. N Engl J Med 1995;332: 1738–43.
89. Spier CM, Kjeldsberg CR, Marty J et al. Pre-B-cell acute lymphoblastic leukemia in the newborn. Blood 1984; 64: 1064–66.
90. Margolin JF, Steuber CP, Poplack DG. In: Acute lymphoblastic leukemia. Pizzo PA, Poplack DG(eds). Principles and Practice of Pediatric Oncology 4th edition. Lippincott Williams and Wilkins Publishers, 2001.
91. Pantazopoulos N, Sinks LF. Morphological criteria for prognostication of acute lymphoblastic leukaemia. Br J Haematol 1974;27:25–30.
92. Lilleyman JS, Hann IM, Stevens RF, et al. Cytomorphology of childhood lymphoblastic leukaemia: A prospective study of 2000 patients. United Kingdom Medical Research Council's Working Party on Childhood Leukaemia. Br J Haematol 1992;81:52–57.
93. Shaw M, Humphrey G, Lawrence R, et al. Lack of prognostic value of the periodic-acid-Schiff reaction and blast cell size in childhood acute lymphocytic leukemia. Am J Hematol 1977;2:237.
94. Lee SL, Kopel S, Glidewell O. Cytomorphological determinants of prognosis in acute lymphoblastic leukemia of children. Semin Oncol 1976;3:209–17.
95. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. Br J Haematol 1976;33:451–58.
96. Bennett J, Catovsky D, Daniel MT. French-American British (FAB) Cooperative Group: the morphological classification of acute leukemias—concordance among observers and clinical correlation. Br J Hematol 1981;47:553.
97. Foon KA, Todd RF III. İmmünologic classification of leukemia and lymphoma. Blood 1986;68:1–31.
98. Nadler LM, Korsmeyer SJ, Anderson KC, et al. B cell origin of non-T cell acute lymphoblastic leukemia. A model for discrete stages of neoplastic and normal pre-B cell differentiation. J Clin Invest 1984;74:332–40.
99. Pullen DJ, Falletta JM, Crist WM, et al. Southwest Oncology Group experience with immunological phenotyping in acute lymphocytic leukemia of childhood. Cancer Res 1981;41:4802–09.

100. Miller DR, Leikin S, Albo V, et al. Prognostic importance of morphology (FAB classification) in childhood acute lymphoblastic leukaemia (ALL). Br J Haematol 1981;48:199–206.
101. Viana MB, Maurer HS, Ferenc C. Subclassification of acute lymphoblastic leukaemia in children: analysis of the reproducibility of morphological criteria and prognostic implications. Br J Haematol 1980;44:383–88.
102. Lilleyman JS, Hann IM, Stevens RF. The clinical significance of blast cell morphology in childhood lymphoblastic leukaemia. Med Pediatr Oncol 1986;14:144–47.
103. McKenna RW, Brynes RK, Nesbit ME, et al. Cytochemical profiles in acute lymphoblastic leukemia. Am J Pediatr Hematol Oncol 1979;1:263–75.
104. Catovsky D, Galetto J, Okos A, et al. Cytochemical profile of B and T leukaemic lymphocytes with special reference to acute lymphoblastic leukaemia. J Clin Pathol 1974;27:767–71.
105. Feldges AJ, Aur RJ, Verzosa MS, et al. Periodic acid-Schiff reaction, a useful index of duration of complete remission in acute childhood lymphocytic leukemia. Acta Haematol 1974;52:8–13.
106. Huhn D, Rodt H, Thiel E. Acid phosphatase in acute lymphoblastic leukemia (ALL). In: Theirfelder S, Rodt H, Thiel E, eds. İmmünological diagnosis of leukemias and lymphomas. Berlin: Springer-Verlag, 1977:169.
107. Knowles DM, Halper JP, Machin GA, et al. Acid alpha-naphthyl acetate esterase activity in human neoplastic lymphoid cells. Usefulness as a T-cell marker. Am J Pathol 1979;96:257–77.
108. Heil G, Gunsilius E, Raghavachar A, et al. Ultrastructural demonstration of peroxidase expression in acute unclassified leukemias: correlation to immunophenotype and treatment outcome. Blood 1991;77:1305–12.
109. Pui CH, Evans WE. Acute lymphoblastic leukemia. N Engl J Med. 1998 Aug 27;339(9):605-15.
110. Béné MC, Bernier M, Castoldi G, et al. Impact of immunophenotyping on management of acute leukemias. Haematologica. 1999 Nov;84(11):1024-34.
111. Ludwig WD, Reiter A, Löffler H, et al. İmmünophenotypic features of childhood and adult acute lymphoblastic leukemia (ALL): experience of the German Multicentre Trials ALL-BFM and GMALL. Leuk Lymphoma. 1994;13 Suppl 1:71-76.
112. Synold TW, Relling MV, Boyett JM, et al. Blast cell methotrexate-polyglutamate accumulation in vivo differs by lineage, ploidy, and methotrexate dose in acute lymphoblastic leukemia. J Clin Invest. 1994 Nov;94(5):1996-2001.

113. Kaspers GJ, Smets LA, Pieters R, et al. Favorable prognosis of hyperdiploid common acute lymphoblastic leukemia may be explained by sensitivity to antimetabolites and other drugs: results of an in vitro study. Blood. 1995 Feb 1;85(3):751-56.

114. Ito C, Kumagai M, Manabe A, et al. Hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia with 51 to 65 chromosomes: a distinct biological entity with a marked propensity to undergo apoptosis. Blood. 1999 Jan 1;93(1):315-20.

115. Secker-Walker LM, Prentice HG, Durrant J, et al. Cytogenetics adds independent prognostic information in adults with acute lymphoblastic leukaemia on MRC trial UKALL XA. MRC Adult Leukaemia Working Party. Br J Haematol. 1997 Mar;96(3):601-10.

116. Mrózek K, Heerema NA, Bloomfield CD. Cytogenetics in acute leukemia. Blood Rev. 2004 Jun;18(2):115-36. Review.

117. Pui CH, Carroll AJ, Raimondi SC, et al. Clinical presentation, karyotypic characterization, and treatment outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia with a near-haploid or hypodiploid less than 45 line. Blood. 1990 Mar 1;75(5):1170-77.

118. Harrison CJ, Moorman AV, Broadfield ZJ, et al. Three distinct subgroups of hypodiploidy in acute lymphoblastic leukaemia. Br J Haematol. 2004 Jun;125(5):552-59.

119. Chauvenet AR, Martin PL, Devidas M, et al. Antimetabolite therapy for lesser-risk B-lineage acute lymphoblastic leukemia of childhood: a report from Children's Oncology Group Study P9201. Blood 2007; 110: 1105–11.

120. Pui CH, Evans WE. Treatment of acute lymphoblastic leukemia. N Engl J Med 2006; 354: 166–78.

121. Panzer-Grümayer ER, Schneider M, Panzer S, et al. Rapid molecular response during early induction chemotherapy predicts a good outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. Blood 2000; 95: 790–94.

122. Dworzak MN, Fröschl G, Printz D, et al. Prognostic significance and modalities of flow cytometric minimal residual disease detection in childhood acute lymphoblastic leukemia. Blood 2002; 99: 1952–58.

123. Zhou J, Goldwasser MA, Li A, et al. Quantitative analysis of minimal residual disease predicts relapse in children with B-lineage acute lymphoblastic leukemia in DFCI ALL Consortium Protocol 95-01. Blood 2007; 110: 1607–11.

124. Bruggemann M, Raff T, Flohr T, et al. Clinical significance of minimal residual disease quantification in adult patients with standard-risk acute lymphoblastic leukemia. Blood 2006; 107: 1116–23.

125. Coustan-Smith E, Sancho J, Behm FG, et al. Prognostic importance of measuring early clearance of leukemic cells by fl ow cytometry in childhood acute lymphoblastic leukemia. Blood 2002; 100: 52–58.
126. Raff T, Gökbüget N, Luschen S, et al. Molecular relapse in adult standard-risk ALL patients detected by prospective MRD monitoring during and after maintenance treatment: data from the GMALL 06/99 and 07/03 trials. Blood 2007; 109: 910–15.
127. Coustan-Smith E, Ribeiro RC, Stow P, et al. A simplified flow cytometric assay identifi es children with acute lymphoblastic leukemia who have a superior clinical outcome. Blood 2006; 108: 97–102.
128. Patte C, Auperin A, Michon J, Behrendt H. The Société Française d'Oncologie Pédiatrique LMB89 protocol: highly eff ective multiagent chemotherapy tailored to the tumor burden and initial response in 561 unselected children with B-cell lymphomas and L3 leukemia. Blood 2001; 97: 3370–79.
129. Woessmann W, Seidemann K, Mann G, et al. The impact of the methotrexate administration schedule and dose in the treatment of children and adolescents with B-cell neoplasms: a report of the BFM Group Study NHL-BFM95. Blood 2005; 105: 948–58.
130. Lee EJ, Petroni GR, Schiff er CA, et al. Brief-duration high-intensity chemotherapy for patients with small noncleaved-cell lymphoma or FAB L3 acute lymphocytic leukemia: results of cancer and leukemia group B study 9251. J Clin Oncol 2001; 19: 4014–22.
131. Pui CH, Sandlund JT, Pei D, et al. Improved outcome for children with acute lymphoblastic leukemia: results of Total Therapy Study XIIIB at St Jude Children's Research Hospital. Blood 2004; 104: 2690–96.
132. Loh ML, Goldwasser MA, Silverman LB, et al. Prospective analysis of TEL/AML1-positive patients treated on Dana-Farber Cancer Institute Consortium Protocol 95-01. Blood 2006; 107: 4508–13.
133. Bürger B, Zimmermann M, Mann G, et al. Diagnostic cerebrospinal fluid examination in children with acute lymphoblastic leukemia: significance of low leukocyte counts with blasts or traumatic lumbar puncture. J Clin Oncol 2003; 21: 179–81.
134. Nachman JB, Sather HN, Sensel MG, et al. Augmented post-induction therapy for children with high-risk acute lymphoblastic leukemia and a slow response to initial therapy. N Engl J Med 1998; 338: 1663–71.

135. Schrappe M, Reiter A, Ludwig WD, et al. Improved outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia despite reduced use of anthracyclines and cranial radiotherapy: results of trial ALL-BFM 90. Blood 2000; 95: 3310–22.

136. Pui CH, Relling MV, Evans WE. Is mega dose of methotrexate beneficial to patients with acute lymphoblastic leukemia? Leuk Lymphoma 2006; 47: 2431–32.

137. Kager L, Cheok M, Yang W, et al. Folate pathway gene expression differs in subtypes of acute lymphoblastic leukemia and influences methotrexate pharmacodynamics. J Clin Invest 2005;115: 110–17.

138. Nathan PC, Whitcomb T, Wolters PL, et al. Very high-dose methotrexate (33·6 g/m2) as central nervous system preventive therapy for childhood acute lymphoblastic leukemia: results of National Cancer Institute/Children's Cancer Group trials CCG-191P, CCG-134P, and CCG-144P. Leuk Lymphoma 2006, 47: 2488–504.

139. Skärby TV, Anderson H, Heldrup J, et al. High leucovorin doses during high-dose methotrexate treatment may reduce the cure rate in childhood acute lymphoblastic leukemia. Leukemia 2006; 20: 1955–62.

140. Toyoda Y, Manabe A, Tsuchida M, et al. Six months of maintenance chemotherapy after intensified treatment for acute lymphoblastic leukemia of childhood. J Clin Oncol 2000; 18: 1508–16.

141. Jacobs SS, Stork LC, Bostrom BC, et al. Substitution of oral and intravenous thioguanine for mercaptopurine in a treatment regimen for children with standard risk acute lymphoblastic leukemia: a collaborative Children's Oncology Group/National Cancer Institute pilot trial (CCG-1942). Pediatr Blood Cancer 2007; 49: 250–55.

142. Harms DO, Gobel U, Spaar HJ, et al. Thioguanine offers no advantage over mercaptopurine in maintenance treatment of childhood ALL: results of the randomized trial COALL-92. Blood 2003; 102: 2736–40.

143. Stork LC, Sather H, Hutchinson RJ, et al. Comparison of mercaptopurine (MP) with thioguanine (TG) and IT methotrexate (ITM) with IT "triples" (ITT) in children with SR-ALL: results of CCG-1952. Blood 2002; 100: 156a.

144. Vora A, Mitchell CD, Lennard L, et al. Toxicity and efficacy of 6-thioguanine versus 6-mercaptopurine in childhood lymphoblastic leukaemia: a randomised trial. Lancet 2006; 368: 1339–48.

145. Lennard L, Richards S, Cartwright CS, et al. The thiopurine methyltransferase genetic polymorphism is associated with thioguanine-related veno-occlusive disease of the liver in children with acute lymphoblastic leukemia. Clin Pharmacol Ther 2006;80: 375–83.
146. Conter V, Valsecchi MG, Silvestri D, et al. Pulses of vincristine and dexamethasone in addition to intensive chemotherapy for children with intermediate-risk acute lymphoblastic leukaemia: a multicentre randomised trial. Lancet 2007; 369: 123–31.
147. Hunault M, Harousseau JL, Delain M, et al. Better outcome of adult acute lymphoblastic leukemia after early genoidentical allogeneic bone marrow transplantation (BMT) than after late high-dose therapy and autologous BMT: a GOELAMS trial. Blood 2004; 104: 3028–37.
148. Ribera JM, Ortega JJ, Oriol A et al. Comparison of intensive chemotherapy, allogeneic or autologous stem cell transplantation as postremission treatment, for children with very high-risk acute lymphoblastic leukemia: PETHEMA ALL-93 Trial. J Clin Oncol 2007; 25: 16–24.
149. Balduzzi A, Valsecchi MG, Uderzo C, et al. Chemotherapy versus allogeneic transplantation for very-high-risk childhood acute lymphoblastic leukaemia in first complete remission: comparison by genetic randomisation in an international prospective study. Lancet 2005; 366: 635–42.
150. Thomas X, Boiron JM, Huguet F, et al. Outcome of treatment in adults with acute lymphoblastic leukemia: analysis of the LALA-94 trial. J Clin Oncol 2004; 22: 4075–86.
151. Arico M, Valsecchi MG, Camitta B, et al. Outcome of treatment in children with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. N Engl J Med 2000; 342: 998–1006.
152. de Labarthe A, Rousselot P, Huguet-Rigal F, et al. Imatinib combined with induction or consolidation chemotherapy in patients with de novo Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia: results of the GRAAPH-2003 study. Blood 2007; 109: 1408–13.
153. Schrauder A, Reiter A, Gadner H, et al. Superiority of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation compared with chemotherapy alone in high-risk childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia: results from ALL-BFM 90 and 95. J Clin Oncol 2006; 24: 5742–49.
154. Vey N, Thomas X, Picard C, et al. Allogeneic stem cell transplantation improves the outcome of adults with t(1;19)/E2A-PBX1 and t(4;11)/MLL-AF4 positive B-cell acute lymphoblastic leukemia: results of the prospective multicenter LALA-94 study. Leukemia 2006; 20: 2155–61.
155. Rocha V, Labopin M, Sanz G, et al. Transplants of umbilical-cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with acute leukemia. N Engl J Med 2004; 351: 2276–85.

156. Eapen M, Rubinstein P, Zhang MJ, et al. Outcomes of transplantation of unrelated donor umbilical cord blood and bone marrow in children with acute leukaemia: a comparison study. Lancet 2007; 369: 1947–54.

157. Dhedin N, Dombret H, Thomas X, et al. Autologous stem cell transplantation in adults with acute lymphoblastic leukemia in fi rst complete remission: analysis of the LALA-85, -87 and -94 trials. Leukemia 2006; 20: 336–44.

158. V.P.C.P. de Toledo et al. Natural Killer Cells: Deciphering Their Role, Diversity and Functions. In: Zimmer J(editor). Natural killer cells. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2010:1-38.

159. Loza MJ, Zamai L, Azzoni L, Rosati E, Perussia B. Expression of type 1 (interferon gamma) and type 2 (interleukin-13, interleukin-5) cytokines at distinct stages of natural killer cell differentiation from progenitor cells. Blood. 2002 Feb 15;99(4):1273-81.

160. Dorner BG, Smith HR, French AR, et al. Coordinate expression of cytokines and chemokines by NK cells during murine cytomegalovirüs infection. J İmmünol. 2004 Mar 1;172(5):3119-31.

161. Robertson MJ. Role of chemokines in the biology of natural killer cells. J Leukoc Biol. 2002 Feb;71(2):173-83.

162. Zingoni A, Sornasse T, Cocks BG, Tanaka Y, Santoni A, Lanier LL. Cross-talk between activated human NK cells and CD4+ T cells via OX40-OX40 ligand interactions. J İmmünol. 2004 Sep 15;173(6):3716-24.

163. Blanca IR, Bere EW, Young HA, Ortaldo JR. Human B cell activation by autologous NK cells is regulated by CD40-CD40 ligand interaction: role of memory B cells and CD5+ B cells. J İmmünol. 2001 Dec 1;167(11):6132-39.

164. Orange JS, Ballas KZ Natural killer cells in human health and disease. Clin İmmünol. 2006 Jan;118(1):1-10. Epub 2005 Dec 5.

165. Robertson MJ, Caligiuri MA, Manley TJ, Levine H, Ritz J. Human natural killer cell adhesion molecules. Differential expression after activation and participation in cytolysis. J İmmünol. 1990 Nov 15;145(10):3194-201.

166. Hogg N, Laschinger M, Giles K, McDowall A. T-cell integrins: more than just sticking points. J Cell Sci. 2003 Dec 1;116(Pt 23):4695-705.

167. van Kooyk Y, Figdor CG. Avidity regulation of integrins: the driving force in leukocyte adhesion. Curr Opin Cell Biol. 2000 Oct;12(5):542-47.

168. Long EO. Negative signaling by inhibitory receptors: the NK cell paradigm. İmmünol Rev. 2008 Aug;224:70-84.

169. Ellermann-Eriksen S. Macrophages and cytokines in the early defence against herpes simplex virus. *Virol J* 2005; **2:** 59.

170. Nomura A, Takada H, Jin CH, Tanaka T, Ohga S, Hara T. Functional analyses of cord blood natural killer cells and T cells: a distinctive interleukin-18 response. *Exp Hematol* 2001; **29(10):** 1169–1176.

171. Watford WT, Moriguchi M, Morinobu A, O'Shea JJ. The biology of IL-12:coordinating innate and adaptive immune responses. *Cytokine Growth Factor Rev* 2003; **14:** 361–368.

172. Lieberman LA, Hunter CA. Regulatory pathways involved in the infection induced production of IFN-g by NK cells. *Microbes Infect* 2002; **4:** 1531–1538.

173. Une C, Andersson J, Örn A. Role of IFNa/b and IL-12 in the activation of natural killer cells and interferong production during experimental infection with *Trypanosoma cruzi. Clin Exp İmmünol* 2003; **134:** 195–201.

174. Konjevi´c G, Jovi´c V, Juriši´c V, Radulovi´c S, Jeli´c S, Spuži´c I. IL-2-mediated augmentation of NK-cell activity and activation antigen expression on NK- and T-cell subsets in patients with metastatic melanoma treated with interferon-_ and DTIC. *Clin Exp Metastasis* 2003; **20 (7):** 1–9.

175. Hsiao YW, Liao KW, Chung TF, Liu CH, Hsu CD, Chu RM. Interactions of host IL6 and IFNg and cancer-derived TGF-b1 on MHC molecule expression during tumor spontaneous regression. *Cancer İmmünol İmmünother* 2008; **57:**1091–1104.

176. Gill N, Rosenthal KL, Ashkar AA. NK and NKT Cell-Independent Contribution of Interleukin-15 to Innate Protection against Mucosal Viral Infection. *J Virol* 2005; **79(7):** 4470–4478.

177. Stoklasek TA, Schluns KS, Lefrançois L. Combined IL-15/IL-15Ra İmmünotherapy Maximizes IL-15 Activity In Vivo. *J İmmünol* 2006, 177:6072–6080.

178. Gatza E, Okada CY. Adjuvant IL-15 does not enhance the efficacy of tumor cell lysate-pulsed dendritic cell vaccines for active immunotherapy of T cell lymphoma. *Cancer İmmünol İmmünother* 2006; **55:** 420–432.

179. Gill N, Ashkar AA**.** Adaptive immune responses fail to provide protection against genital HSV-2 infection in the absence of IL-15. *Eur J İmmünol* 2007;**37:** 2529–2538.

180. Meier UC, Owen RE, Taylor E, Worth A, Naoumov N, Willberg C, Tang K, Newton P, Pellegrino P, Williams I, Klenerman P, Borrow P. Shared Alterations 95 in NK Cell Frequency, Phenotype, and Function in Chronic Human İmmünodeficiency Virus and Hepatitis C Virus Infections. *J Virol* 2005;**79(19):** 12365–12374.

181. Gill N, Rosenthal KL, Ashkar AA. NK and NKT Cell-Independent Contribution of Interleukin-15 to Innate Protection against Mucosal Viral Infection. *J Virol* 2005; **79(7):** 4470–4478.

182. Hill N, Sarvetnick N. Cytokines: promoters and dampeners of autoimmunity. *Curr Opin İmmünol* 2002; **14:** 791–797.

183. Stepp SE, Dufourcq-Lagelouse R, Le Deist F, et al. Perforin gene defects in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis, Science. 1999;286:1957–59.

184. Fehniger TA, Cooper MA, Caligiuri MA, et al. Interleukin-2 and interleukin-15: immunotherapy for cancer, Cytokine Growth Factor Rev. 2002;13:169–83.

185. Albertsson PA, Basse PH, Hokland M, et al. NK cells and the tumour microenvironment:implications for NK-cell function and anti-tumour activity, Trends İmmünol. 2003;24:603–09.

186. Parham P. NK cells and trophoblasts: partners in pregnancy, J. Exp. Med. 2004;200:951-55

187. Agrawal S, Pandey MK. The potential role of HLA-G polymorphism in maternal tolerance to the developing fetus, J. Hematother. Stem Cell Res. 2003;12: 749–56.

188. Loke YW, Hiby S, King A. Human leucocyte antigen-G and reproduction, J. Reprod. İmmünol. 1999;43:235–42.

189. Hiby SE, Walker JJ, O'Shaughnessy M, et al. Combinations of maternal KIR and fetal HLA-C genes influence the risk of preeclampsia and reproductive success, J. Exp. Med. 2004;200:957–65.

190. Varla-Leftherioti M, Spyropoulou-Vlachou M, Niokou D, et al. Natural killer (NK) cell receptors' repertoire in couples with recurrent spontaneous abortions, Am. J. Reprod. İmmünol. 2003;49:183–91.

191. Sørskaar D, Førre O, Lie SO. Natural Killer Cell Activity of Peripheral Blood and Bone Marrow Mononuclear Cells from Patients with Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. Acta Paediatr Scand 74:433-437,1985.

192. Dickinson AM, Proctor SJ, Jacobs E, et al. Natural killer cell activity in childhood acute lymphoblastic leukemia in remission. Br J Haematol 59:45-53, 1985.

193. Sørskaar D, Førre O, Lie SO. Increased natural killer cell activity and numbers of Leu-7 and Leu-11b (CD 16)-positive cells in bone marrow of children in remission from acute lymphoblastic leukaemia. Scand J İmmünol. 1989 Jan;29(1):65-72.

194. Yoda Y, Abe T, Tashiro A, et al. Normalized natural killer(NK) activity in long term remission of acute leukemia. Br J Haematol 55:305-309, 1983.

195. Yamada S, Kawai H, Miyagawa Y, Komiyama A. Effect of radiotherapy on natural killer activity in childhood acute lymphoblastic leukemia and lymphoma. Leukemia and Lymphoma 4:343-349,1991.

196. Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, et al. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants, Science 2002;295: 2097– 100.

197. Davies SM, Ruggieri L, DeFor T, et al. Evaluation of KIR ligand incompatibility in mismatched unrelated donor hematopoietic transplants. Killer immunoglobulin- like receptor, Blood 2002;100:3825-27.

198. Leung W, Iyengar R, Turner V, et al. Determinants of antileukemia effects of allogeneic NK cells, J. İmmünol. 2004;172:644–50.

199. Burns LJ, Weisdorf DJ, DeFor TE, et al. IL-2-based immunotherapy after autologous transplantation for lymphoma and breast cancer induces immune activation and cytokine release: a phase I/II trial, Bone Marrow Transplant. 2003;32:177–86.

200. Moretta A, Locatelli F, Moretta L. Human NK cells: from HLA class I-specific killer Ig-like receptors to the therapy of acute leukemias. İmmünol Rev. 2008 Aug;224:58-69. Review.

201. Miller JS, Soignier Y, Panoskaltsis-Mortari A, et al. Successful adoptive transfer and in vivo expansion of human haploidentical NK cells in cancer patients, Blood. 2005;105:217– 28.

202. Rubnitz JE, Inaba H, Ribeiro RC, et al. NKAML: A Pilot Study to Determine the Safety and Feasibility of Haploidentical Natural Killer Cell Transplantation in Childhood Acute Myeloid Leukemia. J Clin Oncol. 2010 Feb 20;28(6):955-9. Epub 2010 Jan 19.

203. Costello RT, Fauriat C, Sivori S, Marcenaro E, Olive D. NK cells: innate immunity against hematological malignancies? Trends İmmünol. 2004 Jun;25(6):328-33. Review.

204. Pross HF, Baines MG, Rubin P, Shragge P, Patterson MS. Spontaneous human lymphocyte-mediated cytotoxicity against tumor target cells. IX. The quantitation of natural killer cell activity. J Clin İmmünol. 1981 Jan;1(1):51-63.

205. Mazur B, Olejnik I, Wylezol I, Sonta-Jakimczyk D, Szczepanski T, Karpe J. Assessment of chosen parameters of the immune system in children with acute lymphoblastic leukemia. Pediatr Hematol Oncol. 2003 Jun;20(4):303-8.

206. Ekert H, Jose DG.Letter: Chemotherapy and B.C.G. in acute lymphocytic leukaemia.Lancet. 1975 Oct 11;2(7937):713-4.

207. Alanko S, Salmi TT, Pelliniemi TT Recovery of blood T-cell subsets after chemotherapy for childhood acute lymphoblastic leukemia. Pediatr Hematol Oncol. 1994 May-Jun;11(3):281-92.

208. Jermy A, Lilleyman JS, Jennings R, Rees RC. Spontaneous natural killer cell activity in childhood acute lymphoblastic leukaemia. Eur J Cancer Clin Oncol. 1987 Sep;23(9):1365-70.

209. Aricò M, Lanfranchi A, Molinari E, Maccario R, Nespoli L, Burgio GR. Cell-mediated cytotoxicity in children during and after therapy for acute lymphoblastic leukemia. Pediatr Hematol Oncol. 1988;5(4):279-86.

210. Abo T, Cooper MD, Balch CM. Postnatal expansion of the natural killer and keller cell population in humans identified by the monoclonal HNK-1 antibody. J Exp Med. 1982 Jan 1;155(1):321-6.

211. Pinel MI, Esteves EB, Rumjanek VM. Natural killer cell activity in Hodgkin's disease patients undergoing radiation therapy or chemotherapy and radiation therapy. Clin Lab Haematol. 1998 Oct;20(5):303-6.

212. Zarcone D, Tilden AB, Lane VG, Grossi CE. Radiation sensitivity of resting and activated nonspecific cytotoxic cells of T lineage and NK lineage. Blood. 1989 May 1;73(6):1615-21.

213. Mazur B, Olejnik I, Wylezol I, Sonta-Jakimczyk D, Szczepanski T, Karpe J. Assessment of chosen parameters of the immune system in children with acute lymphoblastic leukemia.Pediatr Hematol Oncol. 2003 Jun;20(4):303-8.

214. Eyrich M, Wiegering V, Lim A, Schrauder A, Winkler B, Schlegel PG. İmmune function in children under chemotherapy for standard risk acute lymphoblastic leukaemia - a prospective study of 20 paediatric patients. Br J Haematol. 2009 Nov;147(3):360-70. Epub 2009 Aug 19.

215. Ek T, Mellander L, Andersson B, Abrahamsson J.İmmune reconstitution after childhood acute lymphoblastic leukemia is most severely affected in the high risk group. Pediatr Blood Cancer. 2005 May;44(5):461-8.

216. Kovacs GT, Barany O, Schlick B, et al. Late immune recovery in children treated for malignant diseases. Pathol Oncol Res. 2008 Dec;14(4):391-7. Epub 2008 Jun 25.

8. YARDIMCI ARAŞTIRMACININ ÖZGEÇMİŞİ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı: Tuğçe AKSU UZUNHAN

Doğum tarihi :22.03.1980

Doğum yeri : İstanbul

Medeni hali: Evli

EĞİTİM

Fındıkzade İlköğretim Okulu

Fındıkzade Ortaokulu (Okul Üçüncüsü)

Şehremini Yabancı Dil Ağırlıklı Lisesi (Okul Birincisi)

İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi (5.sınıf dönem birincisi)

İ.Ü. İ.T.F. Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları A.B.D. Tıpta uzmanlık öğrencisi

ADRES

Ekinoks Beylikdüzü Rezidans E1 Blok D69

Beylikdüzü İstanbul

Tlf: 0 212 8721930

Cep tlf: 0 536 3327138

e-mail : druzunhan@ttmail.com

YABANCI DİL

İngilizce

(22.03.2009 ÜDS Puanı 93.75)

STAJLAR

- Temmuz 2001 LinköpingUniversity Hospital, Linköping, İsveç. Değişim Öğrencisi
- Temmuz 2002 University Hospital of Innsbruck, Innsbruck, Avusturya. Değişim Öğrencisi

MEZUNİYET SONRASI KATILDIĞI KURSLAR

- Nisan 2005 Pediyatrik Hematoloji/Onkoloji Uygulamalı Tanı Kursu
- Eylül 2005 Neonatal Resüsitasyon Kursu
- Nisan 2007 Çocuk İlk Yardım ve İleri Yaşam Desteği Kursu

- Nisan 2009 Çocukluk Çağında Nörolojik Değerlendirme Kursu
- Kasım 2008 Anne Sütü ile Beslenmede Danışmanlık Kursu
- Kasım 2008 Pediatrik Endrokrin Aciller Sempozyumu
- Nisan 2009 Çocuklarda Kafa Travması Kursu
- Temmuz 2009 Amerikan Kalp Cemiyeti / Amerikan Pediatri Akademisi, Çocuklarda İleri Yaşam Desteği Kursu

KATILDIĞI BİLİMSEL TOPLANTILAR:

- 26.Pediatri Günleri, 20-22 Nisan 2004
- 27. Pediatri Günleri, 4-7 Nisan, 2005
- 28. Pediatri Günleri, 18-21 Nisan, 2006
- 4. Ulusal Çocuk Solunum Yolu Hastalıkları Kongresi, 3-5 Mayıs, 2006
- 29. Pediatri Günleri, 10-13 Nisan, 2007
- 30. Pediatri Günleri , 14-17 Nisan, 2008
- 52. Türkiye Milli Pediatri Kongresi, 12-16 Kasım, 2008
- 31. Pediatri Günleri, 14-17 Nisan, 2009
- 32.Pediatri Günleri, 19-23 Nisan 2010

KONUŞMACI OLARAK KATILDIĞI TOPLANTILAR

- **"**Antineoplastikler**"** başlıklı sunum İTF Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları ABD Mezuniyet Sonrası Eğitim Programı. 2004-2005 Dönemi
- **"**Kardiyak Embriyoloji ve Konjential Kalp Hastalıkları**"** başlıklı sunum İTF Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları ABD Mezuniyet Sonrası Eğitim Programı. 2004-2005 Dönemi.

SÖZLÜ SUNUMLAR

- Fatma Oğuz, Fatih Köksal Binnetoğlu, Tuğçe Aksu Uzunhan, Emin Ünüvar, Müjgan Sıdal. Hipokrom mikrositer anemili çocuklarda demir eksikliği anemisi ve talasemi taşıyıcılığı oranlarının belirlenmesi. 50. Milli Pediatri Kongresi, 8-12 Kasım 2006, Antalya.

- Tuğçe Aksu Uzunhan, Nalan Karabayır, Erol Işık, Gülbin Gökçay, Serpil Uğur Baysal. Üniversite Çocuk Sağlığı İzlem Polikliniğinde Yıllara Göre Emzirme Oranları. 29.Pediatri Günleri 10-13 Nisan 2007, İstanbul.
- Tuğçe Aksu Uzunhan, Şükrü Candan, Şükran Poyrazoğlu, ve ark. Turner Sendromlu Olgularımızda Hipotiroidi ve Hashimoto Tiroiditi Sıklığı. 29.Pediatri Günleri. 10-13 Nisan 2007, İstanbul.
- Tuğçe Aksu Uzunhan, Ahmet Hakan Gedik, Nalan Karabayır ve ark. Sağlıklı Çocuklarda Tüberkülin Testi ve Quantiferon Sonuçlarının Karşılaştırılması:Pilot Çalışma. 29.Pediatri Günleri. 10-13 Nisan 2007, İstanbul.

POSTERLER

- Tuğçe Aksu, Bülent Kara, Burak Tatlı, ve ark. Dirençli Epilepsi – Kortikal Displazi Birlikteliği: Olgu Sunumu. 26.Pediatri Günleri. 20-22 Nisan 2004, İstanbul.
- Tuğçe Aksu, Asuman Çoban, Leyla Karadeniz, Fatma Narter, Hüseyin Özbey, Zeynep İnce, Gülay Can. Yenidoğanda Nadir Bir Solunum Sıkıntısı Nedeni: Kistik Adenomatoid Malformasyon Tip II ve Pulmoner Sekestrasyon Birlikteliği. 48.Milli Pediatri Kongresi. 21-24 Eylül 2004, Samsun.
- Arzu Akçay, Tuğçe Aksu, Mahmut Doğru, Zeynep Karakaş, Sema Anak, Leyla Ağaoğlu, Ömer Devecioğlu. Tümör Lizis Sendromu Tedavisinde Kalsiyum Ekstravazasyonuna bağlı nadir bir cilt komplikasyonu. 48.Milli Pediatri Kongresi. 21-24 Eylül 2004, Samsun.
- Şeref Olgar, Taner Yavuz, Kemal Nişli, Tuğçe Aksu, Pınar Aktan, Helen Bornaun, Rukiye Eker Ömeroğlu, Aygün Dindar, Türkan Ertuğrul. İnhale iloprost kullanımının böbrek fonksiyonlarına etkisi. IV. Ulusal Pediatrik Kardiyoloji ve Kardiyak Cerrahi Kongresi. 6-9 Ekim 2004, Kayseri.
- Şeref Olgar, Kemal Nişli, Taner Yavuz, Ahmet Akçay, Tuğçe Aksu, Pınar Aktan, Rukiye Eker Ömeroğlu, Aygün Dindar, Türkan Ertuğrul. İnhale iloprost kullanımının solunum fonksiyonlarına etkisi. IV. Ulusal Pediatrik Kardiyoloji ve Kardiyak Cerrahi Kongresi. 6-9 Ekim 2004, Kayseri
- Tuğçe Aksu Uzunhan, Selim Gökçe, Özlem Durmaz Süoğlu, Seda Özkan, Semra Sökücü. Konjenital Analbuminemi Olgu Sunumu. 28 Pediatri Günleri. 18-21 Nisan 2006, İstanbul.

- Tuğçe Aksu Uzunhan, Firdevs Baş, Sema Kabataş Eryılmaz, Şükran Poyrazoğlu, Feyza Darendeliler, Rüveyda Bundak, Nurçin Saka, Hülya Günöz. Adrenal Yetersizlik/Akalazya/Alakrima (3A sendromu):Olgu sunumu. 29.Pediatri Günleri. 10-13 Nisan 2007, İstanbul.
- Tuğçe Aksu Uzunhan, Gülden Gökçay, Işıl Özer, Ensar Yekeler, Mübeccel Demirkol. Malign İnfantil Tip Osteopetrozis: Olgu Sunumu. 29.Pediatri Günleri. 10-13 Nisan 2007, İstanbul.
- Tuğçe Aksu Uzunhan, Nurver Akıncı, Arzu Akçay, Ilmay Bilge, Agop Çıtak, Gülyüz Öztürk. Transfüzyon İlişkili Akut Akciğer Hasarında (TRALI) Ventilasyon Desteği Olmaksızın Tedavi:Vaka Sunumu. 31. Pediatri Günleri. 14-17 Nisan 2009, İstanbul.
- Sabriye Karadenizli, M.Beyza Çetin, Tuğce Aksu Uzunhan, Nilgün Okumuş Akdeniz, Zeynep Karakaş, Serap Erdem Kuruca. Akut lenfoblastik lösemili (ALL) çocuklarda doğal öldürücü hücre (natural killer-nk) aktivitelerinin remisyon süresince restorasyonu. 3.Multidisipliner Kanser Araştırma Kongresi, Bursa.

YURTDIŞI POSTERLER

- Devecioglu O, Anak S, Unuvar A, Sarıbeyoglu ET, Aksu T, Akcay A, Karakas Z, Agaoglu L. Secondary Hemophagocytic Lymphiohistiocytosis (HLH due to Hodgkin's disease). Histiocyte Society. 20th Annual Meeting Stockholm, Sweden. September 12,13 and 14, 2004.
- Aysegul Unuvar, Sema Anak, Didem Atay, Zeynep Karakas, Gulyuz Ozturk, Tugce Uzunhan, Mesut Garipardic, Leyla Agaoglu, Omer Devecioglu. Respiratory syncytial virus infection outbreak in children with hemato-oncological diseases. 14. European Hematology Association Congress. Berlin, Almanya.

YAYINLAR

- Tuğçe Aksu UZUNHAN, Erol IŞIK, Nalan KARABAYIR, Gülbin GÖKÇAY, Serpil Uğur BAYSAL. Bir Çocuk Sağlığı İzlem Polikliniğinde Emzirme Oranlarının Yıllara Göre Değerlendirilmesi. Çocuk Dergisi 7(3):166-172, 2007.

- Fatma Oğuz , Tuğçe Aksu Uzunhan, Fatih Köksal Binnetoğlu, Hayriye Ertem Vehid. Hipokrom Mikrositer Anemide Demir Eksikliği Anemisi ve Talasemi Taşıyıcılığı Oranları. Çocuk Dergisi 9(3):116-122, 2009.

9. EKLER

Ek1 GÖNÜLLÜ OLURU FORMU

Sayın Anne/Baba,

Size İstanbul Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı'nda yürütülmekte olan bir araştırma hakkında bilgi vermek üzere ulaşmış durumdayız.

Çocukluk çağındaki kanser vakalarının %35'ini lösemiler oluşturur ve birinci sıradadır. **Türkiye'de de her yıl 16 yaşın altında 1200-1500 yeni lösemili çocuk vakası bildirilmektedir.** Tedavi edilmezse ölümcül bir hastalık olan lösemiler etkin tedavi yöntemleri ile %70 oranında iyileştirilmektedir. Ancak kemoterapi ile birlikte bağışıklık sistemi zayıflamakta, pek çok zararlı etkene hassas hale gelmektedir. Kemoterapi tedavisini halen idame olarak alan çocuğunuzdan alınan kan örneği ile bağışıklık sisteminin kemoterapi tedavisi sonrasındaki durumunu değerlendirmeyi amaçlamaktayız. Böylelikle uzun vadede kemoterapinin bağışıklık sistemi üzerine etkilerini anlayıp, bu etkileri azaltmanın yollarına bir kapı açabileceğiz.

Araştırma nedeniyle çocuğunuza herhangi bir zarar verilmeyecek ve herhangi bir ilaç ya da madde kullanılmayacaktır. Bu araştırmadaki bilgiler kesinlikle gizli tutulacaktır. Sizden araştırma esnasında ya da neticesinde herhangi bir ücret talep edilmeyecektir. Bu araştırmada yer almanız durumunda size ek bir ücret de verilmeyecektir. Bu araştırmaya katılmayı kabul etmeyebilir ya da daha sonradan katılmaktan vazgeçebilirsiniz. Bu araştırmaya katılmasanız dahi çocuğunuz her çocuk gibi tedavi ve bakım görecektir. Muhtemel zarar durumunda tarafımızla temasa geçebilirsiniz.

Bu metni tam olarak okuyup anladığınıza ve çalışmada gönüllü olarak yer almayı kabul ettiğinize dair aşağıdaki boş yerleri lütfen doldurunuz.

Bu araştırmada yer almanızdan ötürü teşekkür eder, size ve çocuğunuza sağlıklı bir yaşam dileriz.

Temas kurulacak yardımcı araştırmacının adı ve soyadı:Dr. Tuğçe AKSU UZUNHAN

Temas Adresi: İstanbul Tıp Fakültesi

Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı

Çapa 34390 İstanbul

Adı Soyadı: Tarih:

İmza

Ek2 Çalışma formu

KONU: Akut lösemili çocuklarda kemoterapinin NK hücreleri üzerine etkileri

FORM

Adı Soyadı:

Doğum tarihi:

Yaşı:

Cinsiyeti: Kız ( ) / Erkek( )

Tanısı:

Tanı yaşı:

Kemoterapi protokolü:

Tedavi aldığı tarihler:

Tekrarlayan enfeksiyonları var mı?

Lösemi öncesi tekrarlayan infeksiyonları var mıydı?

ALL ile ilişkili olarak

İmmünfenotip:

Kromozom anomalisi:

Ek3 GÖNÜLLÜ ONAY FORMU

Yukarıda gönüllüye araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri gösteren metni okudum. Bunlar hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu koşullarla söz konusu klinik araştırmaya kendi rızamla hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

Gönüllünün Adı-soyadı, İmzası, Tarih, Adresi (varsa telefon no., faks no,...)

Velayet veya vesayet altında bulunanlar için veli veya vasinin Adı-soyadı, İmzası, Tarih, Adresi (varsa telefon no., faks no,...)

Açıklamaları yapan araştırmacının Adı-soyadı, İmzası, Tarih,

Rıza alma işlemine başından sonuna kadar tanıklık eden kuruluş görevlisinin Adı-soyadı, İmzası, Tarih, Görevi