

Multipl Miyelomda Galektin-1 Ekspresyonunun Düzenleyici T Hücreler ve Otolog Kemik İliği Transplantasyonu ile İlişkisi

GALECTIN-1 EXPRESSION IN MULTIPLE MYELOMA IN RELATION WITH T REGULATORY CELLS AND AUTOLOGOUS BONE MARROW TRANSPLANTATION

Ayşe Pınar ERÇETİN¹, Safiye AKTAŞ¹, Özden PİŞKİN², Mehmet Ali ÖZCAN²

¹Dokuz Eylül Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji Ana Bilim Dalı

²Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Ana Bilim Dalı, Hematoloji Bilim Dalı

ÖZET

Amaç: Multipl Miyelom (MM), plazma hücrelerinin ve plazma hücresi öncülerinin malign proliferasyonu ile karakterize olan bir hematolojik kanserdir. Düzenleyici T hücreler (Treg) organizmanın kendisine ait ve yabancı antijenlere karşı verdiği immün yanıtı kontrol ederek, immünite ve tolerans arasındaki dengeyi sağlamaktadırlar. Immünsüpresif CD4+CD25+FOXP3+ Tregler MM'de yüksek düzeylerde görülmektedir. Galektin-1 (Gal-1) hücre gelişiminin inhibisyonunu indüklemekte ve dinlenme halinde olmayan, aktif immün hücrelerin apoptozunu iletir ve aktivasyonun ardından Treglerde aşırı ekspresyonu görülmektedir. Bu çalışmanın amacı MM'de Gal-1 ekspresyonunun CD4+CD25+Foxp3+ Treg hücreler ve Otolog Kemik İliği Transplantasyonu (OKİT) ile ilişkisini araştırmaktır.

Gereç ve Yöntem: Periferik kan örnekleri 19 MM hastasından toplanıp OKİT varlığına göre iki grup olarak alt sınıflandırıldı. Periferik Kan Mononükleer Hücreleri (PKMH) Biocoll solüsyonunda yoğunluk gradiyenti santrifüjü ile izole edilip Tregler için hemen akım sitometri analizi yapıldı. Gal-1 ekspresyonu PKMH yaymalarında immüno-sitokimya ile tespit edilerek semikantitatif olarak düşük, orta ve yüksek ifadeleri ile değerlendirildi. Bulgular nonparametrik testler ile istatistiksel olarak analiz edildi.

Bulgular: Bu çalışma 7 tanesi OKİT (+) olan toplam 19 MM hastası içermektedir. Gal-1 ekspresyonu olguların %52,6'sında orta veya yüksek olarak saptanmıştır. CD4+CD25+Foxp3+ Tregler miktarı OKİT (+) grupta daha yüksek bulunmuştur. Treg yüzdeleri ve Gal-1 ekspresyonu istatistiksel anlamlı bir ilişki ($p>0,05$) göstermemiştir. Buna ek olarak Gal-1 ekspresyonu OKİT varlığı ya da prognoz ($p>0,05$) ile de istatistiksel anlamlılık göstermemiştir.

Sonuç: Bu çalışma ile Gal-1 ekspresyonu MM'da PKMH'lerinde Tregler, OKİT ve prognoz ile ilişkisi açısından ilk defa sorgulanmıştır. Gal-1 ekspresyonu ile Tregler, OKİT ve prognoz arasında hiçbir istatistiksel anlamlı ilişki saptanmamıştır. Sınırlı sayıda olgu bulunması bu duruma neden olmuş olabilir. Bundan sonraki adımımız Gal-1'in MM'da kemik iliğindeki ekspresyon düzeyini ortaya koymak olabilir.

Anahtar sözcükler: Galektin-1, düzenleyici T hücreler, multipl miyelom, otolog kemik iliği transplantasyonu

Ayşe Pınar ERÇETİN
Dokuz Eylül Üniversitesi
Onkoloji Enstitüsü
35340, İnciraltı İZMİR
e-posta: pinarercetin@gmail.com

SUMMARY

Objective: Multiple Myeloma (MM) is a hematological cancer which is characterized with malignant proliferation of plasma cells and their precursors. Regulatory T cells (Tregs) control immune responses to self-and foreign-antigens and maintain the balance between immunity and tolerance. Immunosuppressive CD4+CD25+FOXP3+ Tregs shows high levels in MM. Galectin-1 (Gal-1) induces the inhibition of cell growth and promotes the apoptosis of activated, not resting, immune cells and it is overexpressed in Tregs after activation. The aim of this study is to determine Gal-1 expression in MM and its relation with CD4+CD25+Foxp3+ Tregs levels and autologous bone marrow transplantation (ABMT).

Material and Method: Peripheral blood samples were collected from 19 MM patients and sub-classified into two groups according to presence of ABMT. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated by density gradient centrifugation on Biocoll solution and underwent immediate analysis by flow cytometry for Tregs. Gal-1 was determined by immunocytochemistry on imprints of PBMCs and scored as low, medium and high expression semiquantitatively. Results were statistically analyzed by nonparametric tests.

Results: This study included 19 MM patients and 7 of them were ABMT (+). Moderate or high levels of Gal-1 expression were detected in 52.6 % of all cases. CD4+CD25+Foxp3+ Tregs were shown to be higher in ABMT (+). Tregs percentage and Gal-1 expression did not show statistical significance ($p>0.05$). In addition Gal-1 expression did not show statistical significance with ABMT presence or prognosis ($p>0.05$).

Conclusion: In this study Gal-1 expression in PBMCs was the first time questioned for the relation of Tregs, ABMT and prognosis in MM. Gal-1 did not show statistical relation with any. Limited number of cases might be the reason. Our next step shall be determining its expression in bone marrow.

Key words: Galectin-1, T regulatory cells, multiple myeloma, autologous bone marrow transplantation

Multipl Miyelom (MM), plazma hücrelerinin ve plazma hücresi öncülerinin malign proliferasyonu ile karakterize olan bir hematolojik kanserdir (1). Tüm yetişkin malignitelerin %1'ini, hematolojik malignitelerin ise %13'ünü oluşturan bu kanser tipi konvansiyonel kemoterapi ve yüksek doz terapilere rağmen tamamen tedavi edilememektedir (2,3). Kontrolsüz çoğalan klonal plazma hücrelerinin neden olduğu baskılanmış immünooglobülin ekspresyonları ve fonksiyon göstermeyen T-hücre yanıtları söz konusudur.

Düzenleyici T hücreleri (Tdüz, Treg) immünsupresyon ile oto-immün kontrolde, T-hücre homeostazisinde, transplanta ve tümör hücrelerine karşı tüm immün yanıtın modülasyonunda önemlidir (4,5). Bu negatif düzenleyici aktivite farklı gerçekleşerek tümörlere karşı normalde olması gereken immün yanıtı baskılayabilir. Timus kökenli doğal bulunan CD4+ CD25+ Treg hücreler total periferik CD4+ T hücrelerin %5-10'unu oluşturan immünsüpresif etkili T hücre popülasyonudur (6,7). Foxp3 transkripsiyon faktörünün Treg hücreleri tanımlayıcı özel bir belirteç olduğunu ortaya konmuştur. CD4+

CD25+ Treg hücrelerin gelişimi ve fonksiyonu için Foxp3 oldukça önemli bir transkripsiyon faktörüdür. Foxp3 'ün fonksiyonunu kaybetmesi sonucunda gelişen mutasyonlar Treg hücrelerin eksikliğine ve bundan kaynaklanan ciddi bazı otoimmün bozukluklara yol açmaktadır. T hücrelerde Foxp3'ün ektopik ekspresyonu bu hücrelerin regülatör fenotip ve süpresif fonksiyon kazanmasına neden olmaktadır. Ayrıca Foxp3 bir Rel ailesi transkripsiyon faktörü olan aktif T- hücrelerin Nükleer Faktörü (NFAT) ve aktif B hücrelerinin NFκB hafif zincirlerinin hedef genlerini indükleme özelliklerini engellemektedir (4-10). Bunun sonucunda IL-2 ve diğer sitokin genlerinin (IFNγ, IL-4 gibi) transkripsiyonel bir baskılayıcısı özelliğini kazanır. Tüm bunlara ek olarak Foxp3 devam etmekte olan immün yanıtların kontrolü için aktif T hücrelerine negatif geri besleme yoluyla etki etmektedir (9,11).

Galektin-1 (Gal-1), karbohidrat bağlayan galektin protein ailesinden olan beta-galaktozidaz spesifitesine sahip homodimerik yapıda bir lektindir (12). Hücre içinde karbohidrat bağımsız etkileşimler ile hücre sinyal yollarında rol alırken, karbohidrat motiflerini tanıma özelliği

ile ekstrasellüler fonksiyonlara da sahiptir. Yapılan araştırmalar sonucu, Gal-1'in hücre adhezyonunda ve gelişiminde, apoptozda, immünmodülasyonda, metastazda, inflamasyonda ve bunlara ek olarak mRNA kırılmasında (*mRNA splicing*) rol aldığı bilinmektedir (12,13). Kolon, akciğer, meme, böbrek, over, pankreas gibi solid tümörlerin yanı sıra B hücreli ve Burkitt lenfoma ile MM 'da Gal-1'in normal dokuya kıyasla artmış ekspresyon gösterdiği ve bu durumun metastaz ve kötü prognoz ile ilişkilendirildiği literatürde yer alan çalışmalarla aydınlatılmıştır (13-16). Gal-1 ve Gal-3, K-Ras ve H-Ras gibi onkogenik Raslar ile etkileşerek neoplastik hücre transformasyonunu düzenleyebilmekte ve Ras aracılı sinyal iletimini ilerletebilmektedir (12,15). Tümör hücreleri tarafından ekspresyonu gerçekleşen Gal-1'in aktin hücreiskelet elemanlarının organizasyonunu sağlayarak hücre motilitesini arttırmakla birlikte integrinler ile ekstrasellüler matriks hücre komponentlerinden laminin ve fibronektinin çapraz bağlanmasını etkileyerek tümör hücrelerinin adhezyonunu arttırdığı bilinmektedir (15,16). İmmün regülasyon üzerine de etkisi olan Gal-1 dinlenme halindeki ve tümör infiltre edici T lenfositlerin de CD95/ Fas aracılı apoptoza uğramasını indüklemektedir (17,18). Tüm bunlara ek olarak normal epitel hücrelerde az eksprese edilen Gal-1'in özellikle meme ve kolon kanserinde anjiyogenez sürecindeki etkinliği ile ilişkili olarak epitel hücreler tarafından aşırı ekspresyonu tespit edilmiştir ve bu nedenle antianjiyogenik terapiler için hedef teşkil edebileceği düşünülmektedir (19,20).

Bu çalışmada tümör hücrelerine karşı yetersiz T hücreli immün yanıtın ortaya çıktığı bilinen MM olgularında immünregülasyonda negatif yönde etkinlik gösteren Gal-1'in immünsüpresif etkili CD4+CD25+Foxp3+ Treg hücreleri ile ilişkisi araştırılırken, Gal-1 ekspresyonunun Otolog Kemik İliği Transplantasyonu (OKİT) olan olgulardaki düzeyleri değerlendirilerek prognozla ilişkisi araştırılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından onay almıştır. Çalışma materyali olarak hastanın rutin tetkikleri sırasında bir tüp periferik kan alınmıştır. Kan örneklerinin alınması gönüllülük esasla-

rına uygun şekilde hastalardan kan alınmadan önce gönüllü onam formları okutulup imzalatılarak gerçekleştirilmiştir. Çalışma sırasında iyi klinik ve laboratuvar uygulamaları esaslarına uyulmuş, Helsinki Bildirgesi dikate alınmış ve etik standartlara uyulmuştur.

Olguların Özellikleri

Bu çalışmaya 2001-2009 yılları arasında tanı almış, tedavi edilmiş ve izlenmekte olan yaşları 41-78 arasında değişen 5 kadın 14 erkek olmak üzere toplam 19 OKİT olan veya OKİT olmayan ve yeni tanı MM olgusu dahil edilmiştir. Olguların 7'si OKİT olmuştur. Olgular Dokuz Eylül Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Hematoloji servisi ve polikliniğince izlenmektedir. Olgular MM için Uluslararası Evreleme Sistemine (ISS) göre evrelenmiştir. Olgulara ait arşiv dosyaları yeniden incelenmiş, tanı doğrulanmıştır. Dokuz Eylül Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Hematoloji polikliniğine gelen ve servisinde yatan hastalara gönüllü bilgilendirme formları verilip imzalandıktan sonra rutin prosedürler sırasında kan örnekleri alınmıştır.

Örneklerin Hazırlanması

Literatürde yer alan bilgiye göre Gal-1 solid tümörlerde parafin gömülü bloklarda immünohistokimyasal boyama ile analiz edilirken MM gibi hematolojik kanserlerde kan örneklerinden PKMH'lerin izolasyonu ön aşaması gerekmektedir (21). Buna benzer şekilde literatürdeki çalışmalarda normalde tümör dokusunda yüksek seviyelerde olduğu bilinen CD4+CD25+Foxp3+ Treg hücreler de MM'da kan veya kemik iliği örneklerinin PKMH'leri izole edildikten sonra en etkin ve spesifik olarak akım sitometrik analize tabi tutulmaktadır (5). Bu bilgilere dayanarak alınan taze kan örneklerine fosfat tamponu ile seyrelttikten sonra hemen PKMH'lerinin izolasyonu için Biocoll (d 1,077g/ml Biochrom) solüsyonunda yoğunluk gradiyenti santrifüjü yapılmıştır. Yıkama işlemlerinin ardından PKMH'lerden 100 er µl akım sitometri analizi için ayrı tüpe alınıp kalan kısım ile Gal-1 ekspresyonunun analizi için de polilizinli lama yayma yapılmıştır. Lamlar boyama işlemine kadar -20 °C'de saklanmıştır.

Gal-1 Ekspresyon Düzeylerinin İmmünohistokimyasal Saptanması

Polilizinli lamlara yayılan PKMH'lar -20°C'den çıkartıl-

dıktan sonra alkol serisinden geçirilerek fikse edilmiştir. Universal boyama kiti (*invitrogen*) ile yapılan bloklama ardından anti-Gal-1 primeri (*abcam, ab25138*) kullanılarak Gal-1 eksprese eden PKMH'lerde bağlanma sağlanmıştır. Daha sonra yıkama işlemleri ve Diaminobenzidin (DAB) ile prosedür tamamlandıktan sonra hematoksilen boyama yapılmıştır. Işık mikroskop ile incelenen lamalarda boyanma yüzdelerine ve yoğunluğa göre değerlendirmeler yapılmıştır.

CD4+CD25+Foxp3+ Treg Hücrelerin Akım Sitometrik Analizi

İzole edilen PKMH'lar dört renkli *Epics XL* (*Beckman Coulter*) akım sitometri cihazı kullanılarak *Expo 32 ADIC XL 4Color* yazılımı ile analiz edilmiştir. Bunun için PKMH'lere izolasyonlarının hemen ardından anti-CD4-florosein izotiyosiyanat (FITC), anti-CD25-fikoeritrin (PE) (*eBioscience*) olarak konjuge edilmiş monoklonal anti-korlar (moAb) ve uygun izotipik kontroller (IgG) kullanılarak direkt boyamalar yapılmıştır. Akım sitometri boyamaları ve analizi sırasında donmuş ya da bekletilmiş örnek kullanılmamıştır. Foxp3 ekspresyon analizi için intraselüler indirekt boyama yapıldığından fiksasyon ve permeabilizasyon prosedürleri uygulanmıştır. Fikoeritrin siyanin-5 (PE-Cy5) konjuge, PCH101 klonundan anti-Foxp3 (*eBioscience*) ve uygun izotipik kontrolü ile anti-CD4 ve anti-CD25 direkt boyama yapılan örnekler boyanmıştır. Tüm bu boyamalar sırasında non-spesifik bağlanmalar normal rat serumu kullanılarak bloke edilmiştir. Ticari kit içeriğindeki prosedüre göre uygulanan boyama protokollerinin ardından örnekler cihaza verilip, bir dizi kapılama stratejilerinin ardından Tregler CD4+ CD25+ Foxp3+ T hücreler olarak tanımlanmış ve bulunma yüzdeleri tespit edilmiştir (22).

İstatistiksel Analiz

Bulgular Mann Whitney U non-parametrik testi ve Ki kare testi ile istatistiksel açıdan değerlendirilmiş ve $p < 0,05$ istatistiksel anlamlı olarak kabul edilmiştir. Treg hücreler için yüksek ve düşük şeklindeki değerlendirme aritmetik ortalama değeri (*mean*) üzerinden yapılmıştır. Ortalamanın üzerinde kalanlar yüksek, altında kalanlar düşük olarak ayrılmıştır.

BULGULAR

Olgulara Genel Bakış

Çalışmaya dahil edilen toplam 19 olgunun 5'i kadın (%26,3) 14'ü (%73,7) erkektir. Olguların yaş ortalaması 59 ± 10,53 yıl (41 - 78) olarak belirlenmiştir. OKİT olan 7 olgu %36,8, olmayan 12 olgu ise %63,2'lik kesimi oluşturmaktadır. ISS evreleme sistemine göre olguların 5'i ISS evre 1 (%26,3), 4'ü ISS evre 2 (%21,1) ve 5'i ISS evre 3 (%26,3) olup 5 olgunun ilgili verilerine ulaşılamamıştır. İzlem süreci içinde olguların 13'ü (%68,4) yaşamına devam ederken 6 (%31,6) olgu ise ex olmuştur.

İmmünotokimya Bulguları

Gal-1 ekspresyonları boyanma yüzdesine göre %20'nin altında negatif, %20 -49 arası düşük, %50-89 arası orta ve %90 üzeri ise yüksek seviyeler olarak tanımlanmıştır. Buna göre yapılan değerlendirmelerde tüm olgular içinde Gal-1 ekspresyon yüzdesi 3 olguda negatif (%15,8), 6 olguda düşük (%31,6), 7 olguda orta (%36,8) ve 3 olguda yüksek (%15,8) seviyelerde tespit edilmiştir. Ayrıca hücre boyanma yoğunluğuna göre Gal-1 boyamaları derecelendirildiğinde tüm olgular içinde bir olgu negatif (%5,3), 10 olgu + (%52,6) ve 8 olgu ++ (%42,1) şeklinde dağılım göstermiştir (Tablo I).

Tablo. Gal-1 ekspresyonunun immünotokimya bulguları

Ekspresyon Düzeyi	Negatif (< %20)	Düşük (%20-49)	Orta (%50-89)	Yüksek (> %90)
Olgu sayısı	3	6	7	3
Yüzdesi	15,8	31,6	36,8	15,8
Hücre Boyanma Yoğunluğu	-	+	++	+++
Olgu sayısı	1	10	8	0
Yüzdesi	5,3	52,6	42,1	0

Akım Sitometri Bulguları

Akım sitometri analizleri ile uygun pencereleme stratejileri sonucunda olguların PKMH'lerinde CD4+ CD25+ Foxp3+ Treg hücreler saptanmıştır. Buna göre olguların tümünde CD4+ CD25+ Foxp3+ Treg hücreler % 0 ile %6,6 arasında değişkenlik gösterirken, OKİT olan olgularda %0,5 ile %6,6 arasında ve OKİT olmayan olgularda %0 ile %3,9 arasında değişkenlik göstermektedir. OKİT olan olgulardaki OKİT olmayan olgulara kıyasla daha yüksek CD4+ CD25+ Foxp3+ Treg hücrelerin varlığına dair bir örnek Şekil 1'deki akım sitometri sonucunda gösterilmektedir. CD4+ hücrelerin seçildiği pencereden tanımlanan CD25+ Foxp3+ hücrelerin bakıldığı alanda da OKİT olan olguda daha yüksek oran görülmektedir.

İstatistik Bulgular

Gal-1 ekspresyon düzeyleri OKİT olan ve olmayan gruplar için değerlendirilirken negatif ve düşük ekspresyonlar bir arada, orta ve yüksek ekspresyonlar bir arada toplanarak iki grup oluşturulmuştur. Bu şekilde yapılan Ki-Kare Testi sonucunda OKİT varlığı ile Gal-1 ekspresyonları arasında istatistiksel anlamlı bir ilişki saptanmamıştır ($p>0,05$).

Mann Whitney U nonparametrik testi ile tüm olgularda CD4+ CD25+ Foxp3+ Treg hücrelerin seviyeleri ortalama %2,13 (0 - 6,6) olarak saptanmıştır. OKİT olan grup ve olmayan grup arasında ise CD4+ CD25+ Foxp3+ Treg hücrelerin seviyelerinde istatistiksel anlamlı fark saptanmıştır ($p=0,041$). Bu fark OKİT olan grup lehinedir. OKİT yapılan grupta ortalama CD4+ CD25+ Foxp3+ Treg hücreler %2,53 iken (0,5 - 6,6) OKİT olmayan grupta ortalama %1,94'dür (0,00 - 3,8).

Ayrıca Gal-1 ekspresyon düzeyi ile Treg hücre seviyeleri arasında da yapılan Ki-kare analizi sonucunda istatistiksel anlamlı bir ilişki saptanmamıştır ($p>0,05$).

TARTIŞMA

Bu çalışmada tümör hücrelerine karşı yetersiz T hücreli immün yanıtın ortaya çıktığı bilinen MM olgularında immünregülasyonda negatif yönde etkinlik gösteren Gal-1'in immünsüpresif etkili CD4+CD25+Foxp3+ Treg hücreler ile ilişkisinin araştırılması ve ayrıca Gal-1 ekspresyonunun OKİT olan olgulardaki düzeylerinin değerlendiril-

mesi amaçlanmıştır. Bu amaçla OKİT olan ve olmayan olgulardan periferik kan örnekleri toplanarak immüno-sitokimyasal ve akım sitometrik analizler yapılmıştır.

Gal-1 özellikle solid tümörlerde anjiyogenezi düzenleyerek tümör hücreleri için metastaz yayılım ile potansiyel bir kaçış yolu oluşturmaktadır. Literatürde meme, kolon, over, prostat, pankreas, kolanjiyokarsinomlar, mesane karsinomları, skuamöz hücreli karsinomlar ve Hodgkin lenfoma gibi bir çok malign neoplazmlarda Gal-1 ekspresyonunun saptandığı çalışmalar yer almaktadır. Buna ek olarak kolon karsinomu, prostat kanseri, gliomlar, baş ve boyun skuamöz hücreli karsinomlarda Gal-1'in prognostik belirleyici değeri olduğu ileri sürülmüştür (14). MM'da ise Gal-1 ekspresyonuna yönelik tek çalışma miyelom hücrelerinin proliferasyonu ve sağ kalımından büyük ölçüde sorumlu olan kemik iliği mikroçevre hücreleri tarafından Gal-1 salınımının gerçekleştiğinin saptandığı in vitro temelli çalışmadır (23). Bir başka hematolojik malignite olan Hodgkin lenfomada ise Gal-1 proteomik analizleri sonucunda yüksek Gal-1 ekspresyonunun relaps ve refrakter Hogkin lenfoma için prediktif bir belirteç olabileceğini öne sürmüştür (24). Bizim çalışmamızda MM olgularından primer çalışılarak PBMH'lerinden alınan yaymalardan yapılan immüno-sitokimyasal boyamalarla ilk kez Gal-1 ekspresyonu OKİT olan ve olmayan olgular arasında karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Ancak bu analiz sonucu OKİT olan ve olmayan olgularda Gal-1 ekspresyonları arasında istatistiksel anlamlı fark bulunamamış ve bu sonucun sınırlı sayıdaki olgu sayısından kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Bir sonraki çalışmalarda daha geniş olgu serileri ile çalışılarak bu durumun aydınlatılabileceği planlanmıştır.

Metodoloji olarak çalışmaların büyük çoğunluğunda Gal-1 ekspresyonu immunohistokimyasal ya da immüno-sitokimyasal boyamalar ile tespit edilmiştir. Örnek bir çalışma olarak pankreas kanseri çalışmalarında tümör dokusunun parafin kesitleri ile çalışılmış ve deparafinize edildikten sonra anti- Gal-1 monoklonal antikorla Gal-1 ekspresyonu immunohistokimyasal olarak belirlenmiştir. Bu çalışmada kullanılan boyama prosedürü deparafinizasyon dışında bizim çalışmamız ile aynıdır (25).

Düzenleyici T hücreler güncel bir çalışma konusu olup tümör hücreleri ile ilişkisi birçok tümörde araştırılmış ya

da araştırılmaktadır. MM'da da bu konuda var olan az sayıda çalışma ile çalışmamızın bulguları ilişkilendirilmiştir. MM'da Treg hücreleri PKMH'larda incelememizin nedeni bu hücrelerin dolaşımında yer almasıdır. Literatürde de var olan çalışmalarda PKMH ile çalışılması bizim metodolojimizi desteklemektedir. İnceleme yöntemi olarak akım sitometriyi seçmemizin nedeni CD4+ CD25+ Foxp3+ Treg hücreleri eş zamanlı tanıyabilme olanağı vermesidir. Bu üçlü kombinasyon güncel literatürde en önemli Treg hücre tipini tanımlayıcı olarak yer almaktadır.

Atanackovic ve arkadaşları, CD4+ CD25+ Foxp3+ Treg hücrelerinin MM hastalarında allojenik kemik iliği transplantasyonu işlemi sonrasında kemik iliğinde yeniden kurulup çoğaldığını böylelikle graft karşıtı konakçı hastalığının (*graft versus host disease, GVHD*) ortaya çıkışını immünsüpresif etkiyle önlediklerini göstermişlerdir (26). Bizim çalışmamızda OKİT olan olgularda CD4+ CD25 + Foxp3+ Treg hücrelerin daha yüksek saptanması OKİT'nun immüniteyi Treg hücreler lehinde stimüle edici rol oynayabileceğini düşündürmüştür.

İmmünregülatör Gal-1 ve CD4+ CD25 + Foxp3+ Treg hücrelerin birbiri ile ilişkisi değerlendirildiğinde ise istatistiksel anlamlı bir sonuca ulaşılamamıştır ancak bu durum önceki çalışmalarda saptandığı üzere MM'da kemik iliği mikroçevresi üzerinde yoğunlaşan Treg hücreleri ve Gal-1 nedeniyle bir sonraki çalışmalarda kemik iliği materyali ile daha geniş olgu serilerinde analiz yapılması planlanmıştır.

Bu çalışma süresince hasta materyali ile çalışırken uygulanması gereken bazı önemli prosedürler hakkında deneyim kazanıldı. Alınan örneklerin veri kaybına neden olmayacak en uygun koşullarda saklanması öğrenildi. İmmünositokimya deneyleri ile boyanma derecelerine göre yorum yapma konusunda deneyim kazanıldı. Pek çok analizde tercih edilebilecek bir yöntem olan akım sitometri uygulaması öğrenildi. Bu analizde uygun pencereleme stratejilerinin önemi ve uygulanma şekilleri anlaşıldı. CD4+ CD25+ Foxp3+ Treg hücre analizi için gerekli olan üçlü boyama kiti ile çalışılırken akım sitometride üç renkli analiz hakkında da deneyim kazanılmış oldu. Üç boyalı analiz için gerekli pencereleme stratejisi ile genelde kullanılan iki boyalı analiz için gerekli

pencereleme stratejisinin farkı anlaşıldı.

Sonuç olarak bu çalışma ile Gal-1 ekspresyonu MM'da PKMH'lerinde Tregler, OKİT ve prognoz ile ilişkisi açısından ilk defa sorgulanmıştır. Ancak Gal-1 ekspresyonu ile Tregler, OKİT ve prognoz arasında hiçbir istatistiksel anlamlı ilişki saptanmamıştır. Bu durum sınırlı sayıda olgu bulunmasından kaynaklanıyor olabilir. Bu çalışmadan yola çıkarak bir sonraki çalışmamız Gal-1'in MM'da kemik iliğindeki ekspresyon düzeyini daha geniş olgu serilerinde ortaya koyacak şekilde planlanabilir.

KAYNAKLAR

1. Schwartz GG. Multiple Myeloma: Clusters, Clues and Dixoins. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1997; 6:49-56.
2. Catley L, Tai Y, Chauhan D, Anderson KC. Perspectives for combination therapy to overcome drug resistant multiple myeloma. *Drug Resist Updat* 2005; 8:205-218.
3. Ander KC. Targeted therapy of multiple myeloma based upon tumor microenvironmental interactions. *Exp Hematol* 2007; 35:155-162.
4. Cools N, Ponsaerts P, Van Tendeloo VF, Berneman ZN. Regulatory T cells and human disease. *Clin Dev Immunol* 2007; 2007:89195.
5. Ozer H, Han T, Henderson ES, Nussbaum A, Sheedy D. Immunoregulatory T cell function in multiple myeloma. *J Clin Invest* 1981; 67:779-789.
6. Toda A, Piccirillo CA. Development and function of naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Leukoc Biol* 2006; 80:458-470.
7. Wang R, Wan Q, Kozhava L, et al. Identification of a regulatory T cell specific cell surface molecule that mediates suppressive signals and induces Foxp3 expression. *Plos One*, 2008; 3:2705.
8. Sakaguchi S, Powrie F. Emerging challenges in regulatory T cell function and biology. *Science* 2007; 317:627-629.
9. Qin FX. Dynamic Behavior and Function of Foxp3+ Regulatory T Cells in Tumor Bearing Host. *Cell Mol Immunol* 2009; 6:3-13.
10. Mottet C, Golshayan D. CD4+CD25+FOXP3+ Regulatory T cells: from basic research to potential therapeutic use. *Swiss Med Wkly* 2007; 137:625-634.
11. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003;

- 299:1057-1061.
12. Camby I, Le Mercier M, Lefranc F, Kiss R. Galectin-1: a small protein with major functions. *Glycobiology* 2006; 16:137-157.
 13. Fischer I, Jeschke U, Friese K, Daher S, Betz AG. The role of galectin-1 in trophoblast differentiation and signal transduction. *J Reprod Immunol* 2011 (in press).
 14. Demydenko D, Berest I. Expression of Galectin-1 in malignant tumors. *Exp Oncol* 2009; 31:74-79.
 15. Liu FT, Rabinovich GA. Galectins as modulators of tumor progression. *Nat Rev Cancer* 2005; 5: 29-41.
 16. Wu MH, Hong TM, Cheng HW, et al. Galectin-1- mediated tumor invasion and metastasis, up-regulated matrix metalloproteinase expression, and reorganized actin cytoskeletons. *Mol Cancer Res* 2009; 7: 311-318.
 17. Bättig P, Saudan P, Gunde T, and Bachmann MF. Enhanced apoptotic activity of a structurally optimized form of galectin-1. *Mol. Immunol* 2004; 41:9-18.
 18. Gieseke F, Böhringer J, Bussolari R, et al. Human multipotent mesenchymal stromal cells use galectin-1 to inhibit immune effector cells. *Blood*. 2010; 116:3770-3779.
 19. Saussez S, Decaestecker C, Cludts S, et al. Adhesion/growth-regulatory tissue lectin galectin-1 in relation to angiogenesis/lymphocyte infiltration and prognostic relevance of stromal up-regulation in laryngeal carcinomas. *Anticancer Res* 2009; 29:59-65.
 20. Thijssen VL, Postel R, Brandwijk RJ, et al. Galectin-1 is essential in tumor angiogenesis and is a target for antiangiogenesis therapy. *Proc Natl Acad Sci* 2006;103:15975-15980.
 21. Gandhi MK, Moll G, Smith C. Galectin-1 mediated suppression of Epstein-Barr virus specific T-cell immunity in classic Hodgkin lymphoma *Blood* 2007; 110:1326-1329.
 22. Ercetin AP, Aktas S, Piskin O, et al. The correlation between T regulatory cells and autologous peripheral blood stem cell transplantation in multiple myeloma *Turkish Journal of Hematology* 2011;28:107-114.
 23. Abroun S, Otsuyama K, Shamsasenjan K, et al. Galectin-1 supports the survival of CD45RA(-) primary myeloma cells in vitro. *Br J Haematol* 2008;142:754-765.
 24. Kamper P, Ludvigsen M, Bendix K. Proteomic analysis identifies galectin-1 as a predictive biomarker for relapsed/refractory disease in classical Hodgkin lymphoma. *Blood* 2011; 117:6638-6649.
 25. Xue X, Lu Z, Tang D, Yao J ve ark. Galectin-1 secreted by activated stellate cells in pancreatic ductal adenocarcinoma stroma promotes proliferation and invasion of pancreatic cancer cells: an in vitro study on the microenvironment of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Pancreas* 2011; 40:832-839.
 26. Atanackovic D, Cao Y, Luetkens T, et al. CD4+CD35+ FOXP3+ T regulatory cells reconstitute and accumulate in the bone marrow of patients with multiple myeloma following allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica* 2008; 93:423-430.