



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**



**AKUT MİYELOBLASTİK LÖSEMİ HASTALARINDA TANI
VE TEDAVİ SÜRECİNDE PD-1 VE PD-L1 EKSPRESYON
DÜZEYLERİNİN PROGNOZ ÜZERİNE ETKİSİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Dr. Uğur ÇALIŞ

**İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

DANIŞMAN

Prof. Dr. Selami Koçak TOPRAK

ANKARA

2024

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**AKUT MİYELOBLASTİK LÖSEMİ HASTALARINDA TANI
VE TEDAVİ SÜRECİNDE PD-1 VE PD-L1 EKSPRESYON
DÜZEYLERİNİN PROGNOZ ÜZERİNE ETKİSİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Dr. Uğur ÇALIŞ

**İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

DANIŞMAN

Prof. Dr. Selami Koçak TOPRAK

**Bu tez çalışması Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü
tarafından TTU-2022-2464 proje kodu ile desteklenmiştir.**

ANKARA

2024

Ankara Üniversitesi
Tıp Fakültesi Dekanlığı'na,

Tıpta Uzmanlık Tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Akut Miyeloblastik Lösemi Hastalarında Tanı ve Tedavi Sürecinde PD-1 ve PD-L1 Ekspresyon Düzeylerinin Prognoz Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan araştırma tarafımda yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Bu tez çalışmasıyla ilgili tüm süreçler Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından 10 Mart 2022 tarihinde, İ03-107-22 numaralı kararla onaylanmıştır.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Uğur ÇALIŞ

Tarih: 05/01/2024

İmza:

ÖZGÜNLÜK RAPORU

Gönderim Tarihi: 04-Oca-2024 12:01PM (UTC+0300)

Gönderim Numarası: 2266638671

Dosya adı: Turnitin_Kontrol.pdf (917.93K)

Kelime sayısı: 11904

Karakter sayısı: 76710

ORJİNALLİK RAPORU

% **13**

BENZERLİK ENDEKSİ

% **12**

İNTERNET KAYNAKLARI

% **7**

YAYINLAR

% **4**

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

KABUL ONAY SAYFASI

ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ TEZ SINAVI TUTANAĞI

I. UZMANLIK ÖĞRENCİSİNİN		
Adı, Soyadı	: Uğur Çalış	Sınav tarihi: 19/01/2024
Anabilim/Bilim Dalı	: İç Hastalıkları Anabilim Dalı	
Tez Danışmanı	: Prof. Dr. Selami Koçak Toprak	

II. TEZ İLE İLGİLİ BİLGİLER		
Tezin Başlığı: Akut Miyeloblastik Lösemi Hastalarında Tanı ve Tedavi Sürecinde PD-1 ve PD-L1 Ekspresyon Düzeylerinin Prognoz Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi		
Tezin Niteliği:	☒ Ana Dal Uzmanlık Tezi ☐ Yan Dal Uzmanlık Tezi	
Kaçıncı tez sınavı olduğu:	☒ 1 ☐ 2 ☐ 3	

III. KARAR		
Yapılan tez sınavı sonucunda yukarıda belirtilen tezin “Tıpta Uzmanlık Tezi” olarak		
☒ Kabulüne		
☐ Reddine		
☐ Düzeltmeler yapıldıktan sonra tekrar değerlendirilmesine		
☒ Oy birliği ☐ Oy çokluğu ile karar verilmiştir.		

IV. AÇIKLAMALAR		
Lütfen, tezin reddi veya düzeltme istenmesi durumunda gerekçeli açıklamalarınızı buraya yazınız.		

Prof. Dr. Önder ARSLAN
Jüri Başkanı
Hematoloji Bilim Dalı

Prof. Dr. Selami Koçak TOPRAK
Jüri Üyesi
Tez Danışmanı
Hematoloji Bilim Dalı

Doç. Dr. Güldane CENGİZ SEVAL
Jüri Üyesi
Hematoloji Bilim Dalı

ÖNSÖZ

Tez sürecinin başından beri bilgi birikimi ve deneyimiyle beni yönlendiren, tüm sorularıma sabırla yanıt veren, değerli rehberliği ve destekleriyle tezimi tamamlamamda kilit bir rol oynayan tez danışmanım Prof. Dr. Selami Koçak Toprak'a,

Uzmanlık eğitimimiz boyunca yetişmemizde emeği bulunan saygıdeğer bütün hocalarıma,

Tezin hazırlık süreci boyunca beni hep destekleyen sevgili eşim Başak Değirmenci Çalış'a,

Araştırmamızın yürütülmesinde gerekli malzemelerin teminini sağlayan ve tez çalışmasını TTU-2022-2464 proje kodu ile destekleyen Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne,

Tez çalışması ve asistanlık süreci boyunca bilimsel desteklerini sunan Lösemi Lenfoma Miyelom Derneği'ne ve dernek başkanı Prof. Dr. Muhit Özcan'a,

Çalışmanın fikir sürecinde ve yürütülmesinde büyük emekleri olan akım sitometri laboratuvarı sorumlusu Doç. Dr. Klara Dalva hocama, laboratuvar çalışmalarını özveriyle uygulayan Şenay İpek, Nihal Okul, Aydın Öztürk ve Fatma Maden Taşkıra,

Süreç boyunca fikir ve destekleriyle yanımda olan arkadaşlarım Uzm. Dr. Sanlı Arabacı ve Dr. Alp Seven'e teşekkür ederim.

Dr. Uğur ÇALIŞ

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	i
Özgünlük Raporu	ii
Kabul ve Onay Sayfası	iii
Önsöz	iv
İçindekiler	v
Simgeler ve Kısaltmalar	vi
Şekiller Dizini	vii
Tablolar Dizini	viii

1. TÜRKÇE ÖZET	1
2. ABSTRACT	3
3. GİRİŞ VE AMAÇ	5
4. GENEL BİLGİLER	6
4.1. Akut Miyeloid Lösemi	6
4.1.1. Epidemiyoloji	6
4.1.2. Risk Faktörleri	6
4.1.3. Patogenez	7
4.1.4. Tanı	7
4.1.5. Klinik Özellikler	8
4.1.6. Sınıflandırma	8
4.1.7. Prognoz	12
4.1.8. Tedavi	13
4.2. İmmün Kontrol Noktası Belirteçleri	15
4.3. Akut Miyeloid Lösemi ve İmmün Kontrol Noktası Belirteçleri	17
5. GEREÇ VE YÖNTEM	20
5.1. Çalışmanın Tasarımı	20
5.2. Yanıt Değerlendirmesi	21
5.3. Örneklem Hesabı	22
5.4. Kullanılan İstatistiksel Yöntemler	22
5.5. Akan Hücre Ölçerde (Flow Cytometry, FCM) Yapılan Çalışmalar	23
6. BULGULAR	25
7. TARTIŞMA	42
8. SONUÇ VE ÖNERİLER	50
9. KAYNAKLAR	52

SİMGELER VE KISALTMALAR

AML	: Akut Miyeloid Lösemi
PD-1	: Programmed Death – 1 (Programlanmış Hücre Ölümü Reseptörü-1)
PD-L1	: Programmed Death Ligand – 1 (Programlanmış Hücre Ölümü Ligandı-1)
SEER	: Surveillance Epidemiology and End Results Program (Gözetim Epidemiyoloji ve Son Sonuçlar Programı)
FISH	: Floresan In Situ Hibridizasyon
CD	: Cluster of Differentiation (Farklılaşma Kümesi)
HLA	: Human Leukocyte Antigen (İnsan Lökosit Antijeni)
MPO	: Miyeloperoksidaz
DİK	: Dissemine İntravasküler Koagülasyon
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
ELN	: European Leukemia Network (Avrupa Lösemi Ağı)
MDS	: Miyelodisplastik Sendrom
MPAL	: Mixed Phenotype Acute Leukemia (Miks Fenotip Akut Lösemi)
MPN	: Miyeloproliferatif Neoplazi
VAF	: Varyant Allel Frekansı
FAB	: French-American-British (Fransız-Amerikan-İngiliz)
FLT3	: FMS-like Tyrosine Kinase-3 (FMS-benzeri tirozin kinaz-3)
NPM1	: Nucleophosmin-1 (Nükleofosmin-1)
IDH	: İzositrat Dehidrogenaz
MHC	: Major Histocompatibility Complex (Majör Doku Uygunluk Kompleksi)
TCR	: T Cell Receptor (T Hücre Reseptörü)
EDTA	: Etilen Diamin Tetra Asetik Asit

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: ELN 2022 Önerilerine Göre Hiyerarşik Sınıflama	11
Şekil 2: PD-1 Sinyal Yolağı Mekanizması	16
Şekil 3: Tümör Hücrelerine Karşı T Hücre İmmün Yanıtında PD-1/PD-L1 Yolunun Mekanizması.....	19
Şekil 4: Farklı Hastaların PD-L1 Ekspresyonlarına ait Akım Sitometrik Analiz Örnekleri....	32



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1: AML Tanısı İçin Hücre Yüzeyi ve Sitoplazmik Belirteçlerin Ekspresyonu.....	7
Tablo 2: Dünya Sağlık Örgütü 5. baskısına göre AML sınıflaması	9
Tablo 3: ELN 2022 Önerilerine Göre AML ve İlişkili Neoplazilerin Sınıflandırılması	10
Tablo 4: Fransız-Amerikan-İngiliz (FAB) Sınıflandırması.....	12
Tablo 5: ELN 2022 Önerilerince Tanı Anındaki Genetik Özelliklere Göre Risk Sınıflandırması	12
Tablo 6: Yoğun Kemoterapiye Uygun Olmayan Hastaları Tanımlamak İçin Kullanılan Ferrara Kriterleri.....	13
Tablo 7: Çalışmanın Dahil Edilme ve Dışlama Kriterleri	21
Tablo 8: ELN 2022 önerilerine göre yanıt kriterleri	21
Tablo 9: Verilerin Analizi İçin Kullanılacak Antikorlar ve Fluorokrom Eşleştirmesi.....	23
Tablo 10: Hastaların Demografik ve Laboratuvar Özellikleri.....	26
Tablo 11: Hasta Özellikleri ve Tedaviye Yanıt Durumları	27
Tablo 12: Tanı Anında Kemik İliğindeki Blastik Hücrelerde PD-L1 Ekspresyon Durumu ...	28
Tablo 13: PD-L1 ekspresyon düzeyinin cinsiyet, genetik, ELN 2022 risk grubu, FAB alt tipi ve MRD durumuna göre dağılımları	30
Tablo 14: MRD Negatif ve MRD Pozitif Hastalarda PD-L1 Ekspresyon Yüzdesi	31
Tablo 15: MRD Negatif Hastalar ile MRD Pozitif veya Yanıtsız Hastalardaki PD-L1 Ekspresyon Yüzdesi	31
Tablo 16: Tanı Anında Kemik İliğindeki T Lenfositlerde PD-1 Ekspresyon Durumu	33
Tablo 17: MRD Yanıtına Göre PD-1 Ekspresyon Durumu.....	36
Tablo 18: MRD Negatif ve MRD Pozitif/Yanıtsız Hastalardaki PD-1 Ekspresyon Durumu .	37
Tablo 19: Hastaların Tanı Anında Kemik İliği ve Periferik Kandaki T Lenfositlerinde PD-1 Ekspresyon Durumu	39
Tablo 20: Hastalar ve Sağlıklı Gönüllülerin Periferin Kan Örneklerindeki T Lenfositlerde PD-1 Ekspresyon Durumu.....	41

1. TÜRKÇE ÖZET

Amaç: Akut miyeloid lösemi (AML), kemik iliğinde olgunlaşmamış miyeloid hücrelerin bozulmuş farklılaşma ve hızlı proliferasyonu ile karakterize klonal bir hastalıktır. İmmün kontrol noktası belirteçlerinin yüksek düzeyde ekspresyonu, lösemik hücrelerin immün sistemden kaçışına aracılık ederek daha kötü hastalık prognozuyla ilişkili olabilir. Çalışmamız AML hastalarında PD-1/PD-L1 ekspresyon düzeylerinin prognozla ilişkisini inceleyerek, bu belirteçlerin tedavi yanıtlarına olan etkisini ve hastalığın immün sistemle olan etkileşimini aydınlatmayı amaçlamaktadır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmaya Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Bilim Dalı'nda Nisan 2023-Kasım 2023 tarihleri arasında de novo AML tanısı alan hastalar dahil edildi. Hastaların tanı anındaki kemik iliği aspirasyon örneklerinde PD-1 ve PD-L1 ekspresyonları akım sitometri yöntemiyle belirlendi. Remisyon indüksiyon tedavisi sonrası hastalar da PD-1 ekspresyon düzeyleri tekrar değerlendirildi. Tanı anında hastaların periferik kan örneklerinde de PD-1 ekspresyon düzeyleri belirlendi ve hastaların kemik iliği örneklerindeki PD-1 ekspresyon düzeyleriyle karşılaştırıldı. Hastaların periferik kan örneklerindeki PD-1 ekspresyon düzeyleri yaş ve cinsiyete göre eşleştirilmiş sağlıklı gönüllülerden alınan periferik kan örnekleriyle karşılaştırıldı.

Bulgular: Çalışmaya 21 hasta ve 18 sağlıklı gönüllü dahil edildi. Hastalar indüksiyon tedavisi sonrası yanıt açısından ELN 2022 kriterlerine göre değerlendirildi. 4 hasta indüksiyon tedavisini alırken hayatını kaybettiğinden yanıt değerlendirmesi yapılamadı. İndüksiyon tedavisine yanıt durumuna göre yanıt ve yanıt olarak hastalar iki gruba ayrıldı. 13 hasta indüksiyon tedavisine yanıt, 4 hasta ise yanıt olarak saptandı.

İndüksiyon tedavisine yanıt hastaların PD-L1 ekspresyon yüzdesi ortalama 34.55, MFI değeri ortalama 1.07 olarak saptandı. İndüksiyon tedavisine yanıt hastaların PD-L1 ekspresyon yüzdesi ortalama 30.18, MFI değeri ortalama 1.09 olarak saptandı. İki grup arasında PD-L1 ekspresyon yüzdesi ve şiddeti açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı. (sırasıyla $p=0.70$ ve $p=0.87$) İndüksiyon tedavisine yanıt ve yanıt hastalar arasında tanı anında kemik iliğindeki CD3+, CD4+ ve CD8+ T lenfositlerde PD-1 ekspresyon düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı. (sırasıyla $p=0.78$, $p=0.47$ ve $p=0.95$)

MRD pozitif hastalarda MRD negatif hastalara göre PD-L1 ekspresyon düzeyleri daha yüksek olsa da istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı. ($p=0.18$) MRD negatif hastalarda

CD3+, CD4+ ve CD8+ T lenfositlerdeki PD-1 ekspresyon yüzdesi, MRD pozitif ve yanıtızsız hastalara göre daha düşük saptandı ancak istatistiksel olarak anlamlı değildi. (sırasıyla $p=0.26$, $p=0.15$ ve $p=0.20$)

HLA-DR negatif hastalarda, HLA-DR pozitif hastalara göre PD-L1 ekspresyon yüzdesi ve şiddeti (MFI) istatistiksel olarak anlamlı derecede daha düşüktü. (sırasıyla $p=0.05$ ve $p<0.01$) Aberran CD7 pozitif olan hastalarda CD3+ ve CD8+ T lenfositlerde PD-1 ekspresyon yüzdesi daha yüksekti ve istatistiksel olarak anlamlıydı. (sırasıyla $p=0.03$ ve $p=0.03$)

Tanı anında kemik iliğindeki CD3+ ve CD8+ T lenfositlerdeki PD-1 ekspresyon yüzdesi, periferik kandakilere göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksek saptandı. (sırasıyla $p<0.01$ ve $p<0.01$)

Hastaların tanı anında alınan periferik kan örneklerindeki CD3+ve CD8+ T lenfositlerdeki PD-1 ekspresyonu, yaş ve cinsiyete göre eşleştirilmiş sağlıklı gönüllülere göre istatistiksel anlamlı olarak daha yüksekti. (sırasıyla $p=0.03$ ve $p=0.03$)

Sonuç: Çalışmamızda akut miyeloid lösemi tanılı hastalarda PD-1 ve PD-L1 ekspresyon düzeylerinin prognozla ilişkisi aydınlatılmaya çalışılmıştır. Elde edilen bulgular, AML hastalarında immün kontrol noktası belirteçlerinin potansiyel prognostik önemini desteklemekte ve bu belirteçlerin gelecekteki tedavi stratejilerinde değerlendirilebileceğine işaret etmektedir. Ancak bu alanda daha kapsamlı ve geniş ölçekli çalışmaların yapılması gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: akut miyeloid lösemi, PD-1, PD-L1, akım sitometri, immün kontrol noktası belirteçleri

2. ABSTRACT

Aim: Acute myeloid leukemia (AML) is a clonal disease characterized by impaired differentiation and rapid proliferation of immature myeloid cells in the bone marrow. High expression of immune checkpoint markers may be associated with poorer disease prognosis by mediating the escape of leukemic cells from the immune system. Our study aims to investigate the relationship between PD-1/PD-L1 expression levels and prognosis in AML patients and to elucidate the effect of these markers on treatment responses and the interaction of the disease with the immune system.

Materials and Methods: Patients diagnosed with de novo AML between April 2023 and November 2023 in the Department of Hematology, Ankara University Faculty of Medicine were included in the study. PD-1 and PD-L1 expressions were determined by flow cytometry in bone marrow aspiration samples at the time of diagnosis. PD-1 expression levels were re-evaluated after remission induction therapy. PD-1 expression levels were also determined in the peripheral blood samples of the patients at the time of diagnosis and compared with PD-1 expression levels in the bone marrow samples of the patients. PD-1 expression levels in the peripheral blood samples of the patients were compared with peripheral blood samples obtained from age- and sex-matched healthy controls.

Results: The study included 21 patients and 18 healthy volunteers. Patients were evaluated according to ELN 2022 criteria for response after induction therapy. As 4 patients died while receiving induction treatment, response evaluation could not be performed. Patients were divided into two groups as responders and non-responders according to response to induction therapy. 13 patients were found to be responders to induction therapy and 4 patients were found to be non-responders.

In patients who responded to induction therapy, the median PD-L1 expression percentage was 34.55 and the median MFI value was 1.07. In patients who did not respond to induction therapy, the median PD-L1 expression percentage was 30.18 and the median MFI value was 1.09. There was no statistically significant difference in the percentage and intensity of PD-L1 expression between the two groups ($p=0.70$ and $p=0.87$, respectively). There was no statistically significant difference between PD-1 expression levels in CD3+, CD4+ and CD8+ T lymphocytes in the bone marrow at the time of diagnosis between patients with and without response to induction therapy. ($p=0.78$, $p=0.47$ and $p=0.95$, respectively)

Although PD-L1 expression levels were higher in the MRD positive group, no statistically significant difference was found. ($p=0.18$ and $p=0.18$, respectively) The percentage of PD-1 expression in CD3+, CD4+ and CD8+ T lymphocytes was lower in MRD negative patients than in MRD positive and non-responders, but not statistically significant ($p=0.26$, $p=0.15$ and $p=0.20$, respectively).

The percentage and intensity (MFI) of PD-L1 expression were statistically significantly lower in HLA-DR negative patients than in HLA-DR positive patients ($p=0.05$ and $p<0.01$, respectively) The percentage of PD-1 expression in CD3+ and CD8+ T lymphocytes was higher and statistically significant in patients with aberrant CD7 positive. ($p=0.03$ ve $p=0.03$, respectively)

At the time of diagnosis, the percentage of PD-1 expression in CD3+ and CD8+ T lymphocytes in bone marrow was significantly higher than in peripheral blood ($p<0.01$ and $p<0.01$, respectively).

PD-1 expression in CD3+ and CD8+ T lymphocytes in peripheral blood samples obtained at the time of diagnosis was statistically significantly higher than in age- and gender-matched healthy volunteers ($p=0.03$ and $p=0.03$, respectively).

Conclusion: In our study, we tried to elucidate the relationship between PD-1 and PD-L1 expression levels and prognosis in patients with acute myeloid leukemia. The results support the potential prognostic significance of immune checkpoint markers in AML patients and suggest that these markers may be included in future treatment strategies. However, more comprehensive and large-scale studies are needed in this field.

Key Words: acute myeloid leukemia, PD-1, PD-L1, flow cytometry, immune checkpoint markers

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Akut miyeloid lösemi (AML), kemik iliğinde olgunlaşmamış miyeloid hücrelerin bozulmuş farklılaşma ve hızlı proliferasyonu ile karakterize klonal bir hastalıktır. Oldukça heterojen bir doğaya sahip bu hastalıkta geleneksel kemoterapi yöntemleri ve hedefe yönelik tedaviler ile hastalar tedavi ediliyor olsa da hala mortalite oranları yüksek seyretmektedir. Hastalık ilişkili prognostik belirteçlerin saptanması, tanı anında ve tedavi süreçlerinde hastalar ile ilgili kararların alınmasına katkıda bulunacaktır. AML ile ilişkili birçok prognostik faktör daha önce tanımlanmış olsa da hastalıkla ilişkili olabilecek yeni belirteçler tanımlanmaya devam etmektedir. İmmün kontrol noktası belirteçleri de oldukça umut vaat eden ve hedefe yönelik tedavilerde kullanılabilecek belirteçler olarak solid tümörlerde ve hematolojik malignitelerde çalışılmaya devam etmektedir.

İmmün kontrol noktası belirteçlerinin yüksek düzeyde ekspresyonu, lösemik hücrelerin immün sistemden kaçışına aracılık ederek daha kötü hastalık prognozuyla ilişkili olabilir. Tanı ve tedavi sürecinde bu belirteçlerin tespiti, prognostik bir gösterge olarak hastaların yönetimine katkı sağlayabilir, kötü prognoz gösterebilecek hastaların tahmin edilmesi ile tedavi yaklaşımlarının buna göre belirlenmesine öncü olabilir. Ayrıca gelecek çalışmalar ışığında yüksek ekspresyon düzeyleri varlığında immünoterapi alabilecek ve bu tedavilerden fayda görebilecek hasta popülasyonu da tespit edilebilecektir.

Çalışmamız AML hastalarında PD-1/PD-L1 ekspresyon düzeylerinin prognozla ilişkisini inceleyerek, bu belirteçlerin tedavi yanıtlarına olan etkisini ve hastalığın immün sistemle olan etkileşimini aydınlatmayı amaçlamaktadır. Hastaların tanı anında PD-1 ve PD-L1 düzeyleri saptanmış olup, PD-1 ve PD-L1 düzeylerinin indüksiyon tedavisine yanıt, ölçülebilir kalıntı hastalık (MRD), sitogenetik veya moleküler anormallikler, blast yüzdesi, hematolojik parametreler ve akım sitometrik yüzey belirteçlerinin ekspresyonları ile olan ilişkisi araştırılması hedeflenmiştir. Remisyon indüksiyon tedavisi sonrası hastaların kemik iliği aspirasyon örneklerinde PD-1 düzeyleri tekrar değerlendirilerek PD-1 düzeylerinin tedavi sonrası değişimi de saptanacaktır. Aynı zamanda tanı anında hastaların periferik kan örneklerindeki PD-1 ekspresyon düzeylerinin kemik iliği örneklerindeki PD-1 ekspresyon düzeyleri ile karşılaştırılması hedeflenmiştir. Hastalardan tanı anında alınan periferik kan örneklerinde T hücrelerinde eksprese edilen PD-1 düzeyi ile sağlıklı gönüllülerden alınan periferik kan örneklerindeki PD-1 düzeyi karşılaştırılarak, AML tanısı alan hastalardaki ekspresyon düzeyi ile sağlıklı kontroller arasındaki farkın belirlenmesi amaçlanmıştır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Akut Miyeloid Lösemi

Akut miyeloid lösemi (AML), hematopoetik sistemin anormal şekilde farklılaşmış klonal hücreleri tarafından kemik iliği, kan ve diğer dokuların istilasına ile karakterize bir kanser türüdür. (1) AML'nin klinik, sitogenetik ve moleküler düzeylerdeki heterojenitesi anlaşıldığında, daha iyi prognostik belirteçler elde edilmiş ve AML alt grupları için seçilmiş tedavilerin geliştirilmesine yol açmıştır. (2) Özellikle blastik hücrelerin aşırı çoğalmasına bağlı tümör lizis sendromu veya yaygın intravasküler koagülasyon gibi ölümcül durumlar ile hastalar başvuru edebileceğinden, AML tanısının hızlı bir şekilde konulması ve tedavinin mümkün olan en kısa sürede başlanması gerekmektedir. (3)

4.1.1. Epidemiyoloji

AML, yetişkinlerde en sık görülen akut lösemi tipidir ve ortalama tanı yaşı 68'dir. (4) AML öncelikle yaşlı yetişkinlerin bir hastalığıdır ve 65 yaş üzeri kişiler için yaşa göre düzeltilmiş insidans 100.000 kişi yılı başına 20,1 iken, 65 yaş altı kişiler için 100.000 kişi yılı başına 2,0'dır. (5) SEER (Surveillance Epidemiology and End Results) kanser istatistikleri verilerine göre erkeklerde AML tanısı alma olasılığı kadınlara göre 1,6 kat daha fazladır. Yaşa göre düzeltilmiş insidans erkeklerde 100.000 kişi yılı başına 5,42 iken kadınlarda 100.000 kişi yılı başına 3,47 olarak belirtilmiştir. (5)

4.1.2. Risk Faktörleri

İyonize radyasyon, mesleki olarak benzen veya tarım ilaçları maruziyeti, AML ile ilişkili çevresel faktörler olarak tanımlanmıştır. (6) Tedavi ilişkili AML, hematolojik maligniteler veya solid tümörler nedeniyle kemoterapi ya da radyoterapi ile tedavi görmüş hastalarda saptanan bir tedavi komplikasyonudur. (7) Tedavi ilişkili AML gelişimi ile en çok ilişkilendirilen iki sitotoksik ilaç kategorisi alkilleyici ilaçlar ve topoizomeraaz inhibitörleridir. (7) Tedavi ilişkili AML hastalarında prognoz de novo AML hastalarına göre daha kötüdür. (8) Miyeloablatif kemoradyoterapinin ardından otolog periferik kök hücre nakli uygulanan hastalarda, sekonder hematolojik malignite riskinin arttığı gösterilmiştir. (9)

Kronik miyeloid lösemi, polisitemi vera, esansiyel trombositoz, primer miyelofibrozis gibi klonal miyeloid hastalıkların progresyonu sonucunda akut miyeloid lösemi görülebilmektedir. Down sendromu, Fankoni anemisi gibi birçok kalıtsal hastalığın seyrinde de akut miyeloid lösemi ortaya çıkabilmektedir. (10, 11)

4.1.3. Patogenez

Son yıllardaki gelişmeler ve geniş kapsamlı genomik analizler ile değerlendirme sonucunda akut miyeloid lösemisinin patogenezinde rol oynayan mekanizmalar daha iyi anlaşılmaya başlanmıştır. Lösemisinin ortaya çıkış mekanizmasının, hematopoetik bir kök hücrenin ya da kendi kendine klonal çoğalma özelliği kazanmış progenitör hücrelerin onkojenik dönüşümünden kaynaklandığı düşünülmektedir. (12) Kendi kendini yenileyen bu lösemik kök hücre malign klonu koruma potansiyeline sahiptir. Lösemik kök hücreler sayıca az bulunur, kemoterapiye karşı direnç ve hastalık nüksünde rol oynarlar. (13) Yine de farklı lösemi alt tiplerinde farklı moleküler mekanizmaların olabileceği ve tek bir mekanizma ile lösemi oluşumunu açıklamanın mümkün olmadığı akılda tutulmalıdır. (14)

4.1.4. Tanı

Kemik iliği aspirasyonu ve biyopsisi tanı için standart yöntemdir. Tanıda kemik iliği %10 ile %100 oranında miyeloblastlar ile infiltre durumdadır. (6) Kemik iliği aspirasyon örneğinden çok parametrelili akım sitometri ile immün fenotipleme, hücre yüzey belirteçlerini tanımlayarak AML'yi doğru bir şekilde teşhis etmek için gereklidir. Akım sitometrik inceleme ile AML tanısı koymak için kullanılan belirteçler Tablo 1'de gösterilmiştir. (15) Konvansiyonel sitogenetik analizi ve floresan in situ hibridizasyon (FISH), tanı sonrası değerlendirme amacıyla mutlaka uygulanması gereken yöntemlerdir. Moleküler genetik testler, hastalık ve risk kategorilerini tanımlayan veya hedeflenen tedavi yöntemleri için gerekli olan tüm genetik anormallikleri taramalıdır. (15) Hastaların demografik özellikleri, medikal geçmişleri, ayrıntılı aile öyküsü, kanama öyküsü ve komorbid durumların varlığı da tanı anında kaydedilmelidir.

Tablo 1: AML Tanısı İçin Hücre Yüzeyi ve Sitoplazmik Belirteçlerin Ekspresyonu (15)

AML Tanısı	
Prekürsör belirteçler	CD34, CD117, HLA-DR
Miyeloid belirteçler	Sitoplazmik MPO, CD33, CD13
Miyeloid maturasyon belirteçleri	CD11b, CD15, CD64, CD65
Monositik belirteçler	CD14, CD36, CD64, CD4, CD38, CD11c
Megakaryositik belirteçler	CD41, CD61, CD36
Eritroid belirteçler	CD235a (glikoforin A), CD71, CD36

4.1.5. Klinik Özellikler

Akut miyeloid lösemi, anormal tam kan sayımı olan asemptomatik bir hastadan yoğun bakım desteği gerektiren kritik hastalığı olan bir hastaya kadar değişen bir spektrumda ortaya çıkabilir. Tanı anında çoğu hastada anemi ve nötropeni saptanmaktadır. Çoğu hastada kemik iliği yetmezliğine ikincil semptomlar görülür, nötropeni ilişkili ateş veya enfeksiyonlar, anemi ilişkili halsizlik, yorgunluk gibi semptomlar veya trombositopeni ilişkili kanama semptomları ile hastalar başvurabilmektedir. (16) Lökositoz hastaların yarısından fazlasında görülmektedir. Yorgunluk, iştahsızlık, kilo kaybı yaygın belirtilerdir. Nadir olarak hastalar kemik iliği dışında herhangi bir anatomik bölgede ortaya çıkabilen, miyeloid blastlardan oluşan bir tümör kitlesiyle yani miyeloid sarkom ile başvurabilir. Miyeloid sarkom en sık olarak deri, lenf nodları, gastrointestinal sistem ve testiste görülmektedir. (17)

Akut promiyelositer lösemi tanılı hastalarda farklı olarak gelişebilecek dissemine intravasküler koagülasyon (DİK) tablosuna bağlı kanama veya tromboz kliniği ile başvurabilir. Mukokütanöz kanamalar gibi hafif bir tablodan intrakraniyal kanama gibi ciddi bir tabloya kadar hastalarda kanama kliniği görülebilir. Hastaların bir kısmında da DİK tablosuna bağlı tromboz gelişebilir. Akut promiyelositer lösemi hastalarında koagülopatinin patofizyolojisi için birçok faktör tanımlanmıştır. (18)

Fizik muayenede anemiye sekonder solukluk görülebilir. Trombositopenik hastalarda deride peteşi, purpura veya ekimozlar gözlenebilir. Derinin lösemik tutulumunu düşündüren infiltratif lezyonlar hastaların yaklaşık %13'ünde ve daha çok monositik veya miyelomonositik AML hastalarında görülür. (19) Hastalarda nadir olarak lenfadenopati, hepatomegali veya splenomegali de saptanabilmektedir.

4.1.6. Sınıflandırma

AML sınıflaması son yıllardaki gelişmeler ışığında Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) 2022 yılında güncellediği 5. baskısında yeniden gözden geçirilmiştir. DSÖ sınıflamasına göre AML iki ana gruba ayrılmıştır: tanımlayıcı genetik anomalilere sahip AML ve farklılaşma ile tanımlanan AML. DSÖ 5.baskısına göre AML sınıflaması Tablo 2'de gösterilmiştir. (20)

Tablo 2: Dünya Sağlık Örgütü 5. baskısına göre AML sınıflaması (20)

Tanımlayıcı Genetik Anomalilere Sahip Akut Miyeloid Lösemi
• Akut promiyelositik lösemi, PML::RARA füzyonu ile • Akut miyeloid lösemi, RUNX1::RUNX1T1 füzyonu ile • Akut miyeloid lösemi, CBFβ::MYH11 füzyonu ile • Akut miyeloid lösemi, DEK::NUP214 füzyonu ile • Akut miyeloid lösemi, RBM15::MRTFA füzyonu ile • Akut miyeloid lösemi, BCR::ABL1 füzyonu ile • Akut miyeloid lösemi, KMT2A yeniden düzenlenmesi ile • Akut miyeloid lösemi, MECOM yeniden düzenlenmesi ile • Akut miyeloid lösemi, NUP98 yeniden düzenlenmesi ile • Akut miyeloid lösemi, NPM1 mutasyonu ile • Akut miyeloid lösemi, CEPBA mutasyonu ile • Akut miyeloid lösemi, miyelodisplazi-iliskili • Akut miyeloid lösemi, diğer tanımlanmış genetik değişiklikler ile
Farklılaşma ile Tanımlanan Akut Miyeloid Lösemi
• Akut miyeloid lösemi, minimal farklılaşma ile • Akut miyeloid lösemi, maturasyon olmadan • Akut miyeloid lösemi, maturasyon ile • Akut bazofilik lösemi • Akut miyelomonositik lösemi • Akut monositik lösemi • Akut eritroid lösemi • Akut megakaryoblastik lösemi

European Leukemia Network (ELN) 2022 önerilerinde ise AML sınıflaması Tablo 3'te belirtildiği şekilde güncellenmiştir. (15)

Tablo 3: ELN 2022 Önerilerine Göre AML ve İlişkili Neoplazilerin Sınıflandırılması (15)

AML ve ilişkili neoplaziler
AML, tekrarlayan genetik anomaliler ile (kemik iliği ya da periferik kanda $\geq$ %10 blast varlığında) • APL, t(15;17)(q24.1;q21.2)/PML::RARA • AML, t(8;21)(q22;q22.1)/RUNX1::RUNX1T1 • AML, inv(16)(p13.1q22) ya da t(16;16)(p13.1;q22)/CBFB::MYH11 • AML, t(9;11)(p21.3;q23.3)/MLLT3::KMT2A • AML, t(6;9)(p22.3;q34.1)/DEK::NUP214 • AML, inv(3)(q21.3q26.2) ya da t(3;3)(q21.3;q26.2)/GATA2, MECOM(EVI1) • AML, diğer nadir tekrarlayan translokasyonlar • AML, NPM1 mutasyonu ile • AML, bZIP içeren CEPBA mutasyonu ile • AML, (9;22)(q34.1;q11.2)/BCR::ABL1
AML (kemik iliği ya da periferik kanda $\geq$ %20 blast varlığında) ya da MDS/AML (kemik iliği ya da periferik kanda %10-19 blast varlığında) olarak sınıflanmalar • AML, TP53 mutasyonu ile • AML, miyelodisplazi-ilişkili mutasyonlar ile (ASXL1, BCOR, EZH2, RUNX1, SF3B1, SRSF2, STAG2, U2AF1 ve/veya ZRSR2 mutasyonları) • AML, miyelodisplazi-ilişkili sitogenetik anomaliler ile • AML, başka türlü sınıflanmamış
Miyeloid Sarkom
Belirsiz Kökenli Akut Miyeloid Lösemi • Akut undiferansiye lösemi • MPAL*, t(9;22)(q34.1;q11.2)/BCR::ABL1 • MPAL, t(v;11q23.3)/KMT2A-rearranged • MPAL, B/miyeloid, başka türlü sınıflanmamış • MPAL, T/miyeloid, başka türlü sınıflanmamış
Down Sendromu ilişkili Miyeloid Proliferasyonlar • Down Sendromu ilişkili geçici anormal miyelopoez • Down Sendromu ilişkili miyeloid lösemi
Blastik Plazmositoid Dendritik Hücreli Neoplazi
Tanı Niteleyicileri • Tedavi ilişkili (önceki kemoterapi, radyoterapi, immünolojik girişimler) • MDS⁺⁺den progrese olan (AML tanısından en az 3 ay önce MDS tanısı olmalıdır) • MDS/MPN^{&}den progrese olan (AML tanısından en az 3 ay önce MDS/MPN tanısı olmalıdır) • Genetik Yatkınlık

*: miks-fenotip akut lösemi, +: miyelodisplastik sendrom, &: miyeloproliferatif neoplazi

Tablo 4: Fransız-Amerikan-İngiliz (FAB) Sınıflandırması (21)

M0	Minimal farklılaşma gösteren akut miyeloblastik lösemi
M1	Olgunlaşma göstermeyen akut miyeloblastik lösemi
M2	Granülositik olgunlaşma gösteren akut miyeloblastik lösemi
M3	Akut promiyelositer lösemi
M4	Akut miyelomonositer lösemi
M5	Akut monositer lösemi
M6	Akut eritrolösemi
M7	Akut megakaryoblastik lösemi

4.1.7. Prognoz

Akut miyeloid lösemide prognoz hastaya bağlı çeşitli faktörlere bağlı olsa da prognozun belirlenmesinde en önemli faktör genetikdir. ELN 2022 önerilerine göre prognostik sınıflama Tablo 5’te gösterilmiştir. (15) Hastalar bu prognostik sınıflamaya göre iyi, orta ve kötü risk olarak ayrılır. Bu prognostik sınıflama hastaların yönetim süreçlerine katkı sağlamaktadır.

Tablo 5: ELN 2022 Önerilerince Tanı Anındaki Genetik Özelliklere Göre Risk Sınıflandırması (15)

Risk Kategorisi	Genetik Anomali
İyi	- t(8;21)(q22;q22.1)/RUNX1::RUNX1T1 - inv(16)(p13.1;q22) ya da t(16;16)(p13.1;q22)/CBFB::MYH11 - FLT3-ITD mutasyonu olmadan NPM1 mutasyonu - bZIP içeren CEBPA mutasyonu
Orta	- FLT3-ITD mutasyonu ile birlikte NPM1 mutasyonu - NPM1 mutasyonu olmadan FLT3-ITD mutasyonu - t(9;11)(p21.3;q23.3)/MLLT3::KMT2A - İyi ya da kötü risk grubunda bulunmayan sitogenetik ve/veya moleküler anomaliler
Kötü	- t(6;9)(p23.3;q34.1)/DEK::NUP214 - t(v;11q23.3)/KMT2A rearranjmanı - t(9;22)(q34.1;q11.2)/BCR::ABL1 - t(8;16)(p11.2;p13.3)/KAT6A::CREBBP - inv(3)(q21.3;q26.2) ya da t(3;3)(q21.3;q26.2)/GATA2, MECOM(EVI1) - t(3q26.2;v)/MECOM(EVI1)-rearranjmanı -5 ya da del(5q); -7; -17/anormal(17p) - Kompleks karyotip - ASXL1, BCOR, EZH2, RUNX1, SF3B1, SRSF2, STAG2, U2AF1 ve/veya ZRSR2 mutasyonu - TP53 mutasyonu

4.1.8. Tedavi

AML tanısı almış hastalarda tedaviye başlamadan önce yoğun kemoterapi almaya uygun olup olmadığı değerlendirilmelidir. Yoğun kemoterapiye uygun olmayan hastaları tanımlamak için Ferrara ve ark. tarafından bazı ölçütler belirlenmiştir. (Tablo 6) (22) Ferrara kriterleri, yoğun kemoterapi sonrası kısa vadeli mortaliteyi öngörmek için geniş bir hasta kohortunda doğrulanmıştır. (23)

Tablo 6: Yoğun Kemoterapiye Uygun Olmayan Hastaları Tanımlamak İçin Kullanılan Ferrara Kriterleri (22)

İleri yaş (≥ 75 yaş)
Şiddetli kardiyak komorbidite
Şiddetli pulmoner komorbidite
Şiddetli renal komorbidite
Şiddetli hepatik komorbidite
Anti enfektif tedavilere dirençli aktif enfeksiyon
Kognitif bozukluk
Düşük performans skoru
Hekimin kemoterapiyle uyumsuz olduğuna karar verdiği diğer herhangi bir komorbidite

Tedaviye yönelik genel yaklaşım, lösemi yükünü azaltmak ve tam yanıt elde etmek, ardından kemoterapi ve/veya allojeneik kök hücre nakli ile remisyon sonrası tedaviyi uygulamaktır. Uygun remisyon indüksiyon tedavisinin seçimi için hastanın yaşı, eşlik eden hastalıkları, medikal geçmişi, moleküler ve sitogenetik risk sınıfı gibi birçok parametre değerlendirilmelidir. (24)

AML hastalarında indüksiyon tedavisinin temelini antrasiklin ve sitarabin bazlı tedavi oluşturmaktadır. En yaygın olarak 3 gün boyunca 60-90 mg/m² dozunda daunorubisin ve 7 gün boyunca 100-200 mg/m² dozunda sitarabin içeren 7+3 rejimi kullanılmaktadır. (25, 26)

Son yıllarda FLT3 mutasyonu olan hastalar için midostaurin ve quizartinib, orta risk kategorisinde olan hastalar için gemtuzumab ozogamisın ve sekonder AML hastalarında CPX-351 gibi seçeneklerin de devreye girmesiyle 7+3 tedavisine yeni ajanlar eklenmeye başlamıştır. (16, 27, 28)

IDH1, IDH2 inhibitörleri, menin inhibitörleri, BCL2 inhibitörleri ve yeni monoklonal antikörler gibi yeni grup ilaçların da dahil olmasıyla AML'nin ilk basamak tedavisinde gelecekte değişimler olmaya devam edecektir. (29)

AML tanısı alan hastaların büyük bir çoğunluğu yaşlı olduğundan yoğun indüksiyon tedavisini alamamaktadır. Yapılan çok merkezli randomize kontrollü bir çalışmada bu hastalar için azasitidin ve venetoklaks kombinasyonunun azasitidin ve plasebo kombinasyonuna üstün olduğu gösterilmiştir. (30) Böylece yaşlı ve yoğun kemoterapiye uygun olmayan hastalarda standart tedavinin temelini azasitidin ve venetoklaks kombinasyonu oluşturmuştur.

AML'de indüksiyon tedavisinin birincil amacı tam yanıt ve remisyonu sağlamaktır. Remisyon sonrasında yüksek doz sitarabin ile konsolidasyon tedavisi uygulanmaktadır. (31) Orta ve kötü risk grubuna dahil hastalarda ilk tam remisyonda allojeneik kök hücre nakli önerilmektedir ve genel sağkalım avantajı birçok çalışmada gösterilmiştir. (32)

4.2. İmmün Kontrol Noktası Belirteçleri

T hücrelerinin aktivasyonu için iki adet sinyale ihtiyaç vardır. Spesifik olarak immün yanıtı sağlayan ilk sinyal, antijenik peptit-MHC kompleksi ile T hücre reseptörü (TCR) etkileşimi yoluyla oluşur. Antijenden bağımsız olarak ikinci sırada ortaya çıkan kostimülatör sinyal, T hücrelerinin klonal olarak genişlemesini, sitokin salgılanmasını ve efektör fonksiyonunu teşvik etmek için antijen sunan hücreler tarafından T hücrelerine iletilir. İkinci sinyalin yokluğunda, antijene özgü lenfositler etkili bir şekilde yanıt veremez ve işlevsel olarak inaktive veya anerjik olurlar ve antijen tarafından sonraki aktivasyona direnç gösterirler. (33) Bu modelin keşfinden sonra ikincil sinyalin immün sistemde oynadığı rol daha fazla araştırılmıştır. B7-CD28 ailesinin daha fazla üyesinin keşfi, antijen deneyimine sahip efektör T hücrelerine pozitif ve negatif ikinci sinyaller sağlayabilen ek kostimülatör yolları ortaya çıkarmıştır. Bu yeni yolların işlevleri, kostimülasyon kavramını genişletmiştir. (34) Pozitif ve negatif olarak tüm bu sinyallerin dengesi sayesinde immünolojik tolerans korunur ve otoimmünite önlenir.

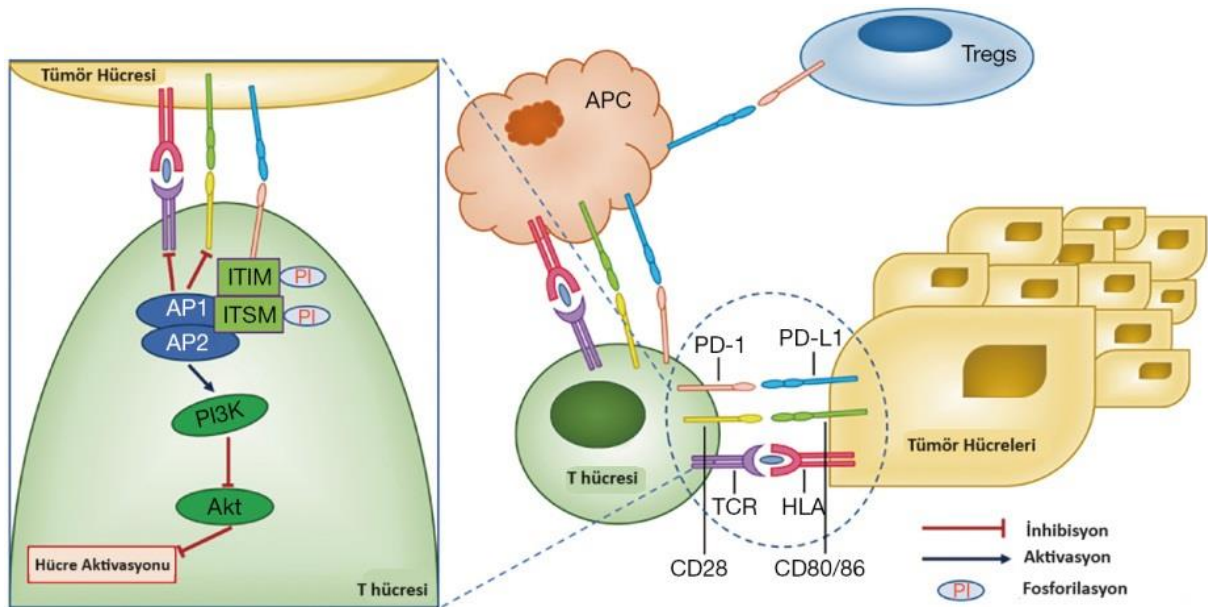
Aktive edilmiş T hücreleri üzerindeki inhibitör yüzey reseptörü programlanmış hücre ölümü reseptörü 1 (PD-1), kromozom 2q37.3 üzerindeki PDCD1 geni tarafından kodlanır. (34) CD279 olarak da adlandırılan PD-1, immünoglobulin süper ailesine ait inhibitör bir reseptördür. (35) PD-1 reseptörü, 1992 yılında programlanmış hücre ölümüne neden olan genleri tanımlamak amacıyla yapılan bir çalışmada T hücre hibridoma dizileri üzerinde ekspresyon artışıyla fark edilmiştir. Programlanmış hücre ölümü için gerekli olan geni tanımlamak için hibridizasyon yöntemi uygulanmış ve PD-1 reseptörüne ait cDNA tanımlanmıştır. (36) Çıkarılan amino asit dizisi ile PD-1'in hücre dışı bölgede immünoglobulin ağır zincir alanına sahip tip I transmembran proteini olduğu öngörülmüştür. (37)

2000 ve 2001 yıllarında PD-L1 (B7-H1, CD274) ve PD-L2 (B7-DC, CD273) PD-1'in ligandları olarak tanımlanmış ve PD-1 reseptörü ile olan etkileşimlerinin immün sistemdeki etkilerinin moleküler mekanizmaları ortaya çıkarılmıştır. (38, 39) PD-L1 (B7-H1), 290 aminoasitten oluşan B7-CD28 immünoglobulin süper ailesine ait tip 1 transmembran glikoproteindir. (40)

PD-1, T hücreleri, B hücreleri ve miyeloid hücreler üzerinde eksprese edilen ortak inhibitör bir moleküldür. PD-1 ve PD-L1 etkileşimi immün hemostazı korumak ve otoimmüniteyi engellemek amacıyla regülatör T hücreleri üzerinden fonksiyon gösterir. (41)

PD-1 geni çıkarılmış fare modellerinde lupus benzeri otoimmün hastalık geliştiği gözlenmiştir. (42) CD274 ve CD273 olarak da bilinen PD-L1 ve PD-L2 ligandlarıyla birlikte, PD-1 self toleransın korunmasında önemli bir rol oynar ve doğrudan CD8-pozitif T hücrelerinin kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik aktivitesini inhibe ederek kanser hücrelerinin immün sistemden kaçışında rol oynar. (43) Bu etkileşim T hücrelerinin apoptozunu indükler ve T hücre reseptör sinyal aktivitesini zayıflatarak T hücrelerinin tümöre karşı olan etkilerini zayıflatır. (44) Tümör hücreleri tarafından PD-L1 ekspresyonu immün yanıtı karşı oluşturulmuş bir çeşit adaptif direnç mekanizmasıdır.

T hücre reseptörünün uyarılmasından sonra PD-1, sitoplazmik kuyruktaki immün reseptör tirozin bazlı inhibisyon motifi (ITIM) ile immün reseptör tirozin bazlı anahtar motifi (ITSM) arasındaki tirozin kalıntıları fosforile olur ve bu da T hücre reseptörü ve CD28'in aşağı yönlü proksimal sinyal moleküllerini defosforile eden SHP-1 (Src homology region 2 domain-containing phosphatase-1) ve SHP-2 (Src homology region 2 domain-containing phosphatase-2) fosfatazlarının devreye girmesiyle sonuçlanır. PD-1, SHP-2 tarafından proksimal fosfoinozitid 3-kinazın (PI3K) aktivasyonu yoluyla Akt aktivasyonunu inhibe eder. Böylece T hücre aktivasyonu engellenmiş olur. (45) Bu etkileşimler şekil 3'te gösterilmiştir. (35)



Şekil 2: PD-1 Sinyal Yolağı Mekanizması (35)

APC: antijen sunucu hücre, Tregs: T regülatuar hücreler, ITIM: immünoreseptör tirozin bazlı inhibisyon motifi, ITSM: immünoreseptör tirozin bazlı anahtar motifi, PI3K: fosfoinozitid 3-kinaz

PD-1/PD-L1 etkileşimi, tükenme, anergi ve apoptoz gibi farklı mekanizmalarla efektör hücrelerin işlevini engeller. (46) PD-L1 ekspresyonunun yüksek olduğu tümör hücrelerinin varlığında PD-1 eksprese eden hücreler proliferasyon, sitotoksik aktivite ve fonksiyonel kapasitelerinin azaldığı bir tükenme sürecine girer. (47)

PD-1 ekspresyonunun normal dokulardaki ve periferik kandaki T hücrelerinin aksine, tümör infiltre eden T lenfositlerde daha yüksek düzeylerde olduğu saptanmıştır. Bu durum tümör mikro çevresinin tümör reaktif T hücrelerinde PD-1 ekspresyon artışına neden olduğunu ve tümöre karşı oluşan yanıtları azaltabileceğini düşündürmüştür. (48)

4.3. Akut Miyeloid Lösemi ve İmmün Kontrol Noktası Belirteçleri

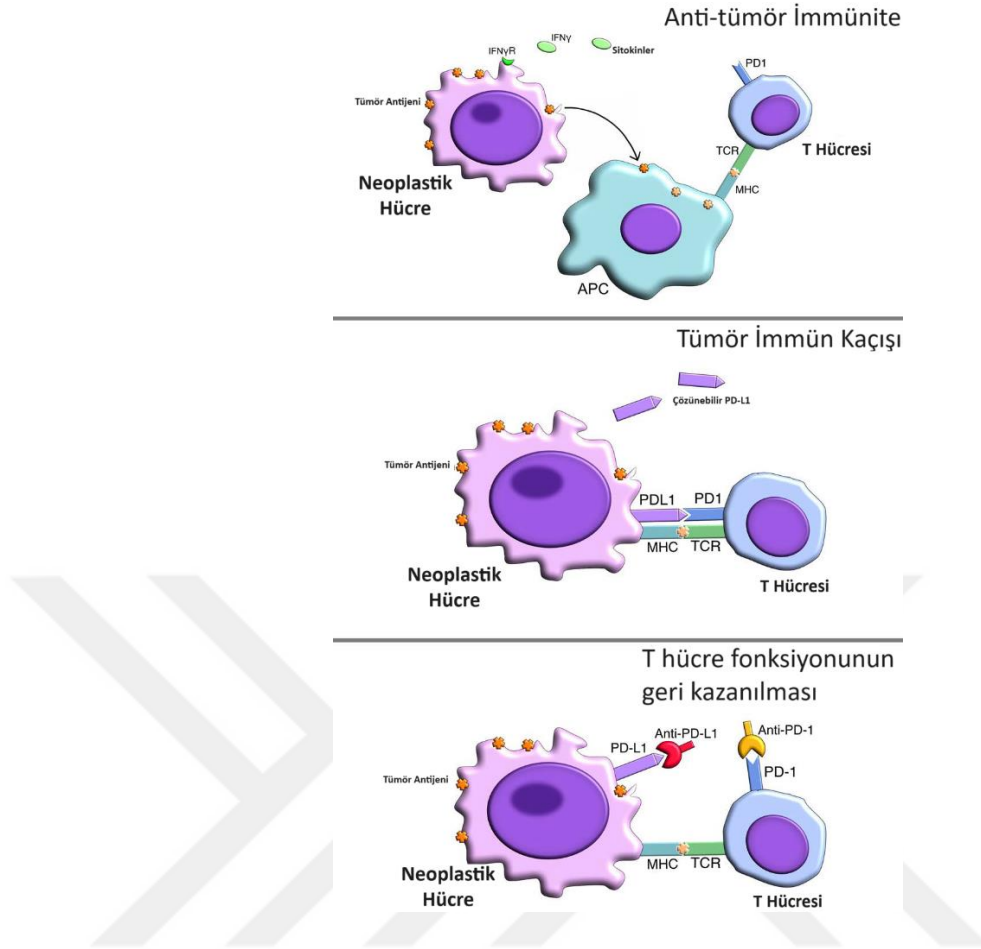
Tümör immünolojisi ve immün kontrol noktası belirteçleri solid tümörler ve hematolojik malignitelerde çokça araştırılan ve araştırılmaya da devam eden bir konudur.

PD-1 ve PD-L1 etkileşiminin daha iyi anlaşılmasıyla, bu mekanizmanın inhibisyonunun kanser tedavisinde kullanımı için çalışmalar başlamıştır. İmmün kontrol noktası inhibitörleri, ortak inhibitör sinyal yollarını kesintiye uğratarak tümöre karşı verilen immün yanıtı yeniden oluşturan ve tümör hücrelerinin immün sistem hücreleri tarafından yok edilmesini teşvik eden moleküllerdir. (49) PD-1 reseptörü ve PD-L1 ligandına karşı geliştirilmiş monoklonal antikolar bu amaçla yaygın olarak kullanıma girmiş, birçok solid tümör ve hematolojik malignitede oldukça iyi sonuçlar elde edilmiştir. 2014 yılında FDA tarafından onaylanan PD-1 inhibitörleri nivolumab ve pembrolizumabın kanser immünoterapisi için klinik kullanıma girmesiyle, bu alandaki çalışmalar oldukça hızlı bir gelişim kaydetmiştir. (50) İmmün kontrol noktası inhibitörlerinin keşfi 2018 yılında Nobel Tıp Ödülüne layık görülmüştür. (51)

Solid tümörlerde PD-1 yolağının hedeflenmesi ve blokajı sonrasında elde edilen umut verici sonuçlar göz önünde bulundurularak, hematolojik malignitelerde de bu alanda yeni çalışmalar yürütülmeye devam etmektedir. (52) AML için yapılan prelinik çalışmalarda, PD-1/PD-L1 etkileşiminin lösemik hücrelerin immün kaçıışı kolaylaştırmak için kullandığı bir yolak olduğu gösterilmiştir. (53) PD-1 yolunun blokajı, T hücrelerinin anti lösemik etkilerini geri kazanmasın aracılık ederek tedavi için bir avantaj sağlayabilir. PD-1 yolağının inhibe edici antikolarla bloke edilmesi ile malign hücrelerin neden olduğu immün baskılama ortadan kaldırılarak immün sistem hücrelerinin tümöre karşı olan etkileri geri kazandırılabilir. İmmünoterapi ile iki çeşit etki elde edilebilir; tümör hücrelerinden gelen negatif PD-L1

sinyalleri bloke edilebilir ve T hücrelerdeki inhibe edici PD-1 sinyalleri bloke edilerek anti tümör immün yanıt elde edilebilir. (54)

Tümöre karşı oluşturulan immün yanıt, APC (antijen sunan hücreler) tarafından ifade edilen MHC molekülleri ile tümör antijeni sunumundan sonra T hücrelerinin hazırlanması ve aktivasyonu ile başlatılır. Aktivasyondan sonra, efektör hücreler tümör bölgesine göç eder ve aralarında interferon gammanın (IFN- γ) da bulunduğu çeşitli sitokinler salgılamaya başlar, böylece tümör hücrelerinde PD-L1 ekspresyonu artar. Tümör hücrelerinin immün sistemden kaçışı, tümör hücrelerinde eksprese edilen PD-L1 ligandının aktive T hücrelerinde eksprese edilen inhibitör reseptör PD-1 ile etkileşimi yoluyla sağlanmaktadır. PD-1/PD-L1 bağlanması, T hücrelerinin işlevselliğini, proliferasyonunu ve sitotoksik aktivitesini bozarak T hücrelerinin tükenmesine (exhaustion) neden olur. PD-1 veya PD-L1'e karşı yönlendirilmiş antikorlar kullanılarak PD-1/PD-L1 etkileşiminin bozulması ve T hücresi aktivasyonunun yeniden sağlanması mümkündür. PD-1/PD-L1 etkileşiminin engellenmesi, tümörü infiltre eden efektör hücrelerin hem sitokin salgılama hem de neoplastik hücrelere yönelik sitolitik işlevler uygulama kapasitesini geri kazandırır. Tümör hücrelerine karşı T hücre immün yanıtında PD-1/PD-L1 yolunun mekanizması Şekil 4'te gösterilmiştir. (52)



Şekil 3: Tümör Hücrelerine Karşı T Hücre İmmün Yanıtında PD-1/PD-L1 Yolunun Mekanizması (52)

(Çizim Francesco B. Tocci tarafından yapılmıştır, G. Bruno Fen Lisesi, Roma (İtalya))

(O. Annibali ve ark. makalesinden Türkçe uyarlanarak alınmıştır)

İmmünoterapi için bir diğer önemli nokta da hedef hücrelerdeki PD-1 ve/veya PD-L1 ekspresyon düzeylerinin antikor bağlama ve etkileşim kapasitesi ile olan ilişkisidir. Ekspresyon düzeyi ne kadar yüksek olursa antikor ile bağlanma sağlayabilecek hedef kapasitesi o kadar yüksek olmaktadır. Bu nedenle tedavi öncesinde PD-1 ve PD-L1 ekspresyon düzeyleri tespit edilerek, antikor bağlanma kapasitesi daha yüksek olan ve tedaviden fayda görme olasılığı daha fazla hasta grubu belirlenmelidir.

5. GEREÇ VE YÖNTEM

5.1. Çalışmanın Tasarımı

Çalışmaya Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Bilim Dalı'nda Nisan 2023-Kasım 2023 tarihleri arasında de novo AML tanısı alan hastalar dahil edildi. Hastaların tanı anındaki kemik iliği aspirasyon örneklerinde T hücrelerinde PD-1 ve lösemik blastlarda PD-L1 ekspresyonları akım sitometri yöntemi ile belirlendi. Remisyon indüksiyon tedavisi sonrası hastaların kemik iliği aspirasyon örneklerinde PD-1 düzeyleri tekrar değerlendirildi. Remisyon indüksiyon tedavisi sonrası yanıt alınamayan hastalarda kurtarma tedavisi sonrası/yanıt alınan hastalarda konsolidasyon tedavisi sonrası alınan kemik iliği aspirasyon örneklerinde tekrar bu belirteçler çalışılarak ve bu düzeylerin tedaviye yanıt ve hastalık prognozu ile olan ilişkisi araştırıldı.

Tanı anında hastaların periferik kan örneklerinde de PD-1 ekspresyon düzeyleri belirlendi ve hastaların kemik iliği örneklerindeki PD-1 düzeyleri ile karşılaştırıldı. Tanı anında hastaların periferik kan örneklerindeki PD-1 ekspresyon düzeyleri, yaş ve cinsiyete göre eşleştirilmiş sağlıklı gönüllülerden alınacak periferik kan örneklerinden yapılan çalışma ile karşılaştırıldı. Böylece AML tanısı alan hastalar ile sağlıklı kontrol grubu arasında T hücrelerinde PD-1 ekspresyon düzeyinin farkı değerlendirildi. Ayrıca sağlıklı gönüllü grubunda PD-L1 ekspresyonunun olmadığı da gösterilmiş oldu. Sağlıklı gönüllüler bilinen herhangi bir hastalık tanısı olmayan, çalışmaya katılmaya olur vermiş sağlıklı bireylerden, hasta grubuna benzer özellikler olacak şekilde seçildi.

AML hastalarında tanı anından itibaren mevcut kılavuzlara göre belirlenmiş ve takip eden hekimin uygun gördüğü standart tedavi şemaları uygulanan hastalarda, tedavi yanıtları prognoz ile ilişkilendirilerek, PD-1 ve PD-L1 düzeyi farklılıklarının, prognozu nasıl etkilediği analiz edildi.

Hastaların kemik iliği ve periferik kan örnekleri lösemi tedavisi başlamadan önce toplandı. Tüm hastalar ve sağlıklı gönüllüler örneklerin alınması ve çalışılmasından önce çalışma hakkında bilgilendirilmiş, bilgilendirilmiş onam formu imzalatılarak çalışmaya katılmaları için onamları alındı.

Çalışmanın dahil edilme ve dışlama kriterleri Tablo 7'de belirtilmiştir.

Tablo 7: Çalışmanın Dahil Edilme ve Dışlama Kriterleri

Dahil Edilme Kriterleri
• 18 yaşından büyük • De novo AML tanısı alan hastalar
Dışlama Kriterleri
• 18 yaşından küçük hastalar • Çalışmaya dahil edilmeden önce kemoterapi almış hastalar • Sekonder AML tanılı hastalar • Otoimmün hastalık hikayesi olanlar • Başka bir solid tümör tanısı olan hastalar

5.2. Yanıt Değerlendirmesi

De novo AML tanısı alan hastalar, tanı anında PD-1 ve PD-L1 ekspresyon durumu değerlendirildikten sonra, takip eden hekimin belirlediği protokollere uygun şekilde remisyon indüksiyon kemoterapisi aldı. Tedavi başlangıcından sonraki 28 gün içinde hastalar yanıt açısından değerlendirildi. Yanıt değerlendirilmesi kemik iliği aspirasyonu ve biyopsisi ile yapıldı. Yanıt değerlendirilmesi için kriterler ELN 2022 kılavuzunda belirtildiği şekilde kullanıldı ve hastalar gruplandırıldı. (15) Yanıt kategorileri ve kriterleri Tablo 8'de belirtilmiştir.

Tablo 8: ELN 2022 önerilerine göre yanıt kriterleri (15)

CR (Tam Yanıt)	Kemik iliği blast oranı <%5, dolaşımda blast yok, ekstramedüller hastalık yok, mutlak nötrofil sayısı $\geq 1.0 \times 10^9/L$ (1.000/ μl), trombosit sayısı $\geq 100 \times 10^9/L$ (100.000/ μl)
CRi (İnkomplet Tam Yanıt)	Diğer tüm CR kriterleri karşılanırken kalıcı nötropeni $<1.0 \times 10^9/L$ (1.000/ μl) ya da trombositopeni $<100 \times 10^9/L$ (100.000/ μl)
MLFS (Morfolojik Lösemisiz Durum)	Kemik iliği blast oranı <%5, dolaşımda blast yok, ekstramedüller hastalık yok ancak hematolojik iyileşme sağlanamamış
PR (Kısmi Yanıt)	Tüm hematolojik kriterler CR karşılarken, kemik iliği blast yüzdesi %5 ile %25 aralığında ve başlangıç kemik iliği blast yüzdesi en az %50 azalmış
Yanıtsız	CR, CRh, CRi, MLFS ya da PR ile belirtilen kriterlerin hiçbirinin karşılanmaması. Yanıt elde edilemeyen hastalar refrakter hastalık olarak tanımlanır.
Yanıt için değerlendirilemez	Kemik iliği yanıt değerlendirilmesi için yeterli örneğin olmaması halidir. Bu kategori erken ölüm, yanıt değerlendirilmesinden önce hastanın ayrılması ya da teknik olarak suboptimal kemik iliği örneği elde edilmesini içerir.

Hastalar istatistiksel analiz yapılabilmesi amacıyla yanıt ve yanıt olarak iki kategoriye ayrıldı. ELN 2022 önerilerine göre CR, CRh, CRi, MLFS kategorilerine dahil olan hastalar “yanıt”, PR ve Yanıt kategorilerine dahil olan hastalar “yanıt” olarak nitelendirildi ve istatistiksel analiz buna göre yapıldı. Yanıt için değerlendirilemez kategorisine dahil olan hastalar, yanıt açısından istatistiksel analize dahil edilememiştir.

5.3. Örneklem Hesabı

Çalışmada AML tanılı hastalarda PD-1 ve PD-L1 ekspresyon düzeylerinin hastalık prognoza olan etkisi araştırılacaktır. Örneklem hesabı, tedavi sonrası yanıt alınan ve alınmayan AML hastalarında PD-1 yüzdelerinin ortalama ve standart sapma değerleri kullanılarak hesaplanmıştır. Hasta grubunda PD-1 düzeyi 15 ± 6 ; kontrol grubunda 10 ± 3 değerleri kullanılmıştır. Etki büyüklüğü 1,05 olarak hesaplanıp; Tip-I hata oranı $\alpha=0,05$, istatistiksel güç 0,80 alınarak, iki ortalama arasındaki farkın önemlilik testi uygulandığında, örneklem büyüklüğü 32 (Grup 1: 16 kişi; Grup 2: 16 kişi) olarak hesaplanmıştır. Güç analizi G*Power ver.3.1.9.2 programında gerçekleştirilmiştir. Çalışmadaki örneklem büyüklüğü ana hipoteze göre belirlenmiş olup, aynı sayıda sağlıklı gönüllü araştırmaya dahil edilmesi planlanmıştır.

5.4. Kullanılan İstatistiksel Yöntemler

Çalışmada tanımlayıcı istatistikler dağılımı normal olan nicel değişkenlerde ortalama $\pm$ standart sapma (min-maks), dağılımı normal olmayan değişkenlerde ortanca, çeyrekler arası dağılım genişliği (min-maks) ile nitel değişkenlerde frekans (yüzde) ile sunulmuştur. Bağımsız 2 gruba ilişkin ortalamaların karşılaştırılmasında “Mann-Whitney U testi”, bağımlı 2 gruba ilişkin ortalamaların karşılaştırılmasında “Wilcoxon Eşleştirilmiş İki Örnek Testi” kullanılmıştır. İki den fazla bağımsız grubun ortalamaları “Kruskal-Wallis Varyans Analizi” ile incelenmiştir. İki sayısal değişken arasındaki ilişki Spearman Korelasyon Katsayısı ile değerlendirilmiştir. İstatistiksel analizlerde SPSS 11.5 programı kullanılmıştır.

5.5. Akan Hücre Ölçerde (Flow Cytometry, FCM) Yapılan Çalışmalar

Deney grubundaki her bir hastadan çalışmaya dahil edildikten sonra tanı anında EDTA'lı tüpe alınan periferik kan örneği ve kemik iliği aspirasyon (KİA) örneği; indüksiyon tedavisi sonlandığında ve tedaviye yeterli yanıt vermeyen hastalarda kurtarma rejimini takiben alınan KİA örnekleri uygun koşullarda (oda ısısında yatay durumda muhafaza edilen tüpler, örnek alındıktan sonra maksimum 4 saat içerisinde laboratuvara iletildi) hematoloji laboratuvarına transfer edildi. Kontrol grubundaki her gönüllüden çalışmaya dahil edildikten sonra EDTA'lı tüpe alınan periferik kan örneği uygun koşullarda hematoloji laboratuvarına transfer edildi. Akan hücre ölçer incelemeleri ile CD3, CD4, CD8, CD45, CD38, CD34, CD117, HLA-DR, CD279(PD-1), CD274(PD-L1) yüzey işaretlerine yönelik monoklonal antikorlar kullanılarak T hücrelerde PD-1, lösemik blastlardaki PD-L1 ifadesi yüzde olarak belirlendi. Hücrelerdeki PD-1 ve PD-L1 ifadesinin şiddeti de Ortalama Floresan Yoğunlukları (Mean Fluorescent Intensity, MFI) kaydedilerek değerlendirmeye alındı. Kullanılan antikorlar ve fluorokromlar Tablo 9'da özetlenmiştir.

Tablo 9: Verilerin Analizi İçin Kullanılacak Antikorlar ve Fluorokrom Eşleştirmesi

Antikor	Fluorokrom
CD45	KO
CD3	FITC
CD4	ECD
CD8	A700
CD38	A750
CD34	PE
CD117	PC7
HLA-DR	PB
CD274(PD-L1)	APC
CD279(PD-1)	PC5.5

Uygulanan işlemler aşağıda belirtildiği şekilde özetlenebilir;

Laboratuvara ulaşan kan/KİA örneklerinden alınacak 200 mikrolitre örnek üzerine her bir antikordan 10 ar mikrolitre eklenerek oda ısısında karanlıkta 15 dakika bekletilerek floresanla işaretli antikorların, varsa, hücre yüzeyindeki antijenlere bağlanması sağlandı. Çalışma tüplerine olgun eritrositlerin parçalanmasını sağlamak amacıyla 500 µl “opti lyse” solüsyonu ilave edildi ve tüpler karanlıkta oda ısısında 10 dakika bekletildi. Yıkama için çalışma tüplerine 500 µl fosfatla tamponlanmış serum fizyolojik (PBS) ilave edildi ve oda ısısında karanlıkta 5 dakika bekletildikten sonra çalışma tüpleri 250g de 5 dk santrifüj edildi. Tüpler tek hamlede ters döndürülerek (hücre kaybı olmadan) süpernatant atıldı. Çalışma tüplerine 1500 µl tamponlanmış PBS ilave edilip, tekrar 250g de 5 dk santrifüj edildi. Tüpler tek hamlede ters döndürülerek (hücre kaybı olmadan) süpernatant atıldı. Çalışma tüplerine 500 µl tamponlanmış PBS ilave edilerek veri toplama aşamasına geçildi. Günlük kontrolleri yapılmış olan akım sitometri cihazına ait karosere (dairese tüp taşıma tablasına) örnekler dizilerek en geç 4 saat içinde veri toplama işlemi tamamlandı. Tüm veriler laboratuvarında 3 lazer 10 renk okuma kapasitesi olan NaviOS 2 cihazı kullanılarak toplandı. Her tüpten tercihen 1 milyon lökosit (minimum 100.000 lökosit) e ait veriler toplandı ve Kaluza analiz yazılımı kullanılarak veri analizi yapıldı.

Veri analizi için CD45+ olan lökositlerin seçilmesini takiben;

- i) Işık saçılım özellikleri ve CD3 ifade etmeleriyle ayrılan T hücrelerde PD-1,
- ii) T hücrelerinin CD4 ve CD8 ifade eden alt gruplarında ayrı ayrı PD-1,
- iii) Işık saçılım özellikleri ve CD34 ve/veya CD117, HLA-DR ifade eden, CD45 i zayıf ifade eden miyeloid progenitörlerde PD-L1 ifadelerinin oranı ve şiddeti (MFI) değerlendirildi.

6. BULGULAR

Nisan 2023-Kasım 2023 tarihleri arasında Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Bilim Dalında de novo akut miyeloid lösemi tanısı alan 21 hasta ve 18 sağlıklı gönüllü çalışmaya dahil edildi.

AML tanısı alan hasta grubunda 7 (%33,3) erkek, 14 (%66,7) kadın hasta vardı. Hastaların ortalama yaşı 45 (20-77) olarak saptandı.

Tanı anında hastaların lökosit sayısı 41.24 ± 83.17 ($2.12-337.67$) ($\times 10^3/\text{mm}^3$), trombosit sayısı 63.76 ± 44.31 ($2-172$) ($\times 10^3/\text{mm}^3$), hemoglobin değeri 9.30 ± 1.30 ($8.30-13.80$) (g/dL), laktat dehidrogenaz (LDH) değeri 556.09 ± 477.03 ($173-1746$) (U/L), kemik iliği blast yüzdesi $\%78 \pm 29.18$ ($10-100$) olarak saptandı. Hastalığın heterojen karakteriyle tutarlı bir şekilde parametreler arasında geniş bir çeşitlilik ve aralık vardı.

Hastaların FAB alt tipleri değerlendirildiğinde 1 hasta M0, 8 hasta M2, 2 hasta M3, 6 hasta M4, 3 hasta M5 ve 1 hasta M6 olarak sınıflandırıldı.

Hastalarda moleküler ve sitogenetik değişiklikler incelendi. 2 hasta t(15;17), 4 hasta NPM1-A, 2 hasta FLT3-TKD, 3 hasta NPM1-A + FLT3-ITD, 4 hasta inv(16), 1 hasta t(8;21) değişikliğine sahip olarak saptandı. 5 hastada herhangi bir mutasyon tanımlanamadı.

Hastalar ELN 2022 kriterlerine göre risk gruplarına ayrıldı. 10 hasta iyi, 9 hasta orta, 2 hasta kötü risk grubuna dahil oldu.

Hastaların demografik ve laboratuvar özellikleri Tablo 10'da gösterilmiştir.

Tablo 10: Hastaların Demografik ve Laboratuvar Özellikleri

Değişken		Toplam (n=21)
Yaş		
Ortanca		45
Minimum-Maksimum		20-77
Cinsiyet		
Kadın		14 (%66,7)
Erkek		7 (%33,3)
Lökosit Sayısı (x10³/mm³)		
Ortalama ± Standart Sapma		41.24 ± 83.17
Minimum-Maksimum		2.12-337.67
Trombosit Sayısı (x10³/mm³)		
Ortalama ± Standart Sapma		63.76 ± 44.31
Minimum-Maksimum		2-172
Hemoglobin (g/dL)		
Ortalama ± Standart Sapma		9.30 ± 1.30
Minimum-Maksimum		8.30-13.80
LDH (U/L)		
Ortalama ± Standart Sapma		556.09 ± 477.03
Minimum-Maksimum		173-1746
Tanı Anında Kemik İliği Blast Yüzdesi (%)		
Ortalama ± Standart Sapma		78 ± 28.47
Minimum-Maksimum		10-100
FAB Alt Tipi		
M0		1
M1		0
M2		8
M3		2
M4		6
M5		3
M6		1
M7		0
Genetik		
t(15;17)		2
NPM1-A		4
FLT3-TKD		2
NPM1-A + FLT3-ITD		3
inv(16)		4
t(8;21)		1
Özellik yok		5
ELN 2022 Risk Grubu		
İyi		10
Orta		9
Kötü		2

Hastaların cinsiyet, yaş, FAB alt tipi, genetik, ELN risk grubu, indüksiyon tedavileri, indüksiyon tedavilerine yanıtları ve MRD durumları Tablo 11’de gösterilmiştir.

Tablo 11: Hasta Özellikleri ve Tedaviye Yanıt Durumları

Hasta No	Cinsiyet	Yaş	FAB Alt Tipi	Genetik	ELN Risk Grubu	İndüksiyon Tedavisi	İndüksiyon Tedavisine Yanıt	Akım Sitometrik MRD
1	E	45	3	t(15:17)	İyi	ATRA+ATO	CR	Negatif
2	E	20	2	NPM1-A	Kötü	7+3	Yanıt için değerlendirilemez	
3	K	22	2	NPM1-A	İyi	7+3	CR	Pozitif
4	K	51	5	FLT3-TKD	Orta	7+3+midostaurin	Yanıtızsız	
5	E	41	4	NPM1-A, FLT3-ITD	Orta	7+3+midostaurin	PR	
6	K	62	0	NPM1-A	İyi	Tedavi alamadı	Yanıt için değerlendirilemez	
7	K	24	2	Özellik yok	Orta	7+3	CR	Negatif
8	K	58	4	inv(16)	İyi	7+3	MLFS	Pozitif
9	K	42	2	t(8:21)	İyi	7+3	MLFS	Pozitif
10	K	77	2	NPM1-A	İyi	AZA+VEN	Yanıt için değerlendirilemez	
11	K	21	4	inv(16)	İyi	7+3	CR	Pozitif
12	K	20	2	Özellik yok	Orta	7+3	Yanıtızsız	
13	K	62	4	inv(16)	İyi	7+3	CR	Pozitif
14	K	73	4	Özellik yok	Kötü	AZA+VEN	Yanıt için değerlendirilemez	
15	K	44	2	NPM1-A, FLT3-ITD	Orta	7+3+midostaurin	CRi	Negatif
16	E	33	3	t(15:17)	İyi	ATRA+ATO	CR	Pozitif
17	E	77	6	Özellik yok	Orta	AZA+VEN	MLFS	Negatif
18	E	60	5	FLT3-TKD	Orta	7+3+midostaurin	Yanıtızsız	
19	K	62	2	NPM1-A, FLT3-TKD	Orta	7+3+midostaurin	CR	Negatif
20	K	43	5	Özellik yok	Orta	7+3	CR	Negatif
21	E	53	4	inv(16)	İyi	7+3	CR	Pozitif

Hastalar indüksiyon tedavisi sonrası yanıt açısından ELN 2022 kriterlerine göre değerlendirildi. 4 hasta indüksiyon tedavisini alırken hayatını kaybetti. 2 hastanın ölüm nedeni sepsis, 2 hastanın ölüm nedeni intrakraniyal kanama olarak kaydedildi. ELN 2022 kriterlerine göre 9 hasta CR, 1 hasta CRi, 3 hasta MLFS, 1 hasta PR, 3 hasta Yanıtızsız olarak değerlendirildi. İstatistiksel analiz için CR, CRi, MLFS grubuna dahil olan hastalar yanıtı, PR ve Yanıtızsız grubuna dahil olan hastalar yanıtızsız olarak değerlendirildi. Böylece 13 hasta indüksiyon tedavisine yanıtı, 4 hasta ise yanıtızsız olarak saptandı.

Hastaların tanı anında alınan kemik iliği örneklerinde blastik hücreleri seçilerek, blastlardaki PD-L1 ekspresyon yüzdesi ve şiddeti (MFI) değerleri akım sitometri yöntemiyle belirlendi. İndüksiyon tedavisine yanıt durumuna göre yanıtı ve yanıtızsız olarak hastalar iki gruba ayrıldı. İndüksiyon tedavisine yanıtı hastaların PD-L1 ekspresyon yüzdesi ortalama 34.55, MFI değeri ortalama 1.07 olarak saptandı. İndüksiyon tedavisine yanıtızsız hastaların PD-L1 ekspresyon yüzdesi ortalama 30.18, MFI değeri ortalama 1.09 olarak saptandı. İki grup arasında PD-L1 ekspresyon yüzdesi ve şiddeti açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu.

($p=0.70$ ve $p=0.87$) Hastaların tanı anında saptanan PD-L1 ekspresyon durumu Tablo 12’de gösterilmiştir.

Tablo 12: Tanı Anında Kemik İliğindeki Blastik Hücrelerde PD-L1 Ekspresyon Durumu

	İndüksiyon Tedavisine Yanıtlı (n=13)	İndüksiyon Tedavisine Yanıtız (n=4)	p
PD-L1 Ekspresyon Yüzdesi- Tanı			
Ortanca	34.55	30.18	0.70
Minimum-Maksimum	5.98-68.60	20.05-69.89	
PD-L1 Ekspresyonu (MFI)- Tanı			
Ortanca	1.07	1.09	0.87
Minimum-Maksimum	0.94-1.57	0.97-1.27	

*Mann-Whitney U testi kullanılmıştır.

Hastaların tanı anındaki PD-L1 ekspresyon durumları yaş, cinsiyet, genetik mutasyon çeşidi, FAB sınıfı, kemik iliği blast yüzdesi ve laboratuvar parametrelerine göre değerlendirildi. Erkek hastalarda PD-L1 ekspresyon yüzdesi ortanca 27.07, şiddeti (MFI) ortanca 1.03; kadın hastalarda PD-L1 ekspresyon yüzdesi ortanca 33.44, şiddeti (MFI) ortanca 1.12 olarak saptandı. İki cinsiyet arasında PD-L1 ekspresyon yüzdesi ve şiddeti açısından istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu. ($p=0.23$ ve $p=0.07$) Hastaların yaşı ile tanı anındaki PD-L1 ekspresyon yüzdesi ve şiddeti (MFI) arasında istatistiksel anlamlı bir korelasyon izlenmedi. ($r=-0.29$, $p=0.20$ ve $r=-0.13$, $p=0.56$)

Genetik mutasyon çeşidi ile tanı anındaki PD-L1 ekspresyon yüzdesi arasındaki ilişki incelendiğinde; $t(15;17)$ değişikliğine sahip iki hastanın PD-L1 ekspresyon yüzdesi ortanca 36.32, şiddeti (MFI) ortanca 1.03; NPM1-A değişikliğine sahip 4 hastanın PD-L1 ekspresyon yüzdesi ortanca 8.37, şiddeti (MFI) ortanca 0.98; FLT3-TKD değişikliğine sahip 2 hastanın PD-L1 ekspresyon yüzdesi ortanca 48.48, şiddeti (MFI) ortanca 1.19; NPM1-A ile birlikte FLT3 değişikliğine sahip 3 hastanın PD-L1 ekspresyon yüzdesi ortanca 20.05, şiddeti (MFI) ortanca 0.97; $inv(16)$ değişikliğine sahip 4 hastanın PD-L1 ekspresyon yüzdesi ortanca 39.13, şiddeti (MFI) ortanca 1.07; $t(8;21)$ değişikliğine sahip 1 hastanın PD-L1 ekspresyon yüzdesi 55.75, şiddeti (MFI) ortanca 1.16 olarak saptandı. NPM1 mutasyonuna sahip alt grupta PD-L1

ekspresyon yüzdesi düşük olma eğiliminde gözlenirken, genetik mutasyon çeşidi ile PD-L1 ekspresyon yüzdesi ve şiddeti arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamadı. ($p=0.70$ ve $p=0.50$)

ELN risk grubu ile tanı anındaki PD-L1 ekspresyon yüzdesi arasındaki ilişki incelendiğinde; iyi risk grubuna dahil olan 10 hastanın PD-L1 ekspresyon yüzdesi ortanca 35.15, şiddeti (MFI) ortanca 1.07; orta risk grubuna dahil olan 9 hastanın PD-L1 ekspresyon yüzdesi ortanca 27.83, şiddeti (MFI) ortanca 1.11 ve kötü risk grubuna dahil olan 2 hastanın PD-L1 ekspresyon yüzdesi ortanca 16.15, şiddeti (MFI) ortanca 0.93 olarak saptandı. ELN risk grubu ile PD-L1 ekspresyon yüzdesi ve şiddeti (MFI) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamadı. ($p=0.30$ ve $p=0.09$)

FAB sınıfı ile tanı anındaki PD-L1 ekspresyon yüzdesi arasındaki ilişki incelendiğinde; M0 sınıfındaki 1 hastanın PD-L1 ekspresyon yüzdesi ortanca 8.61, şiddeti (MFI) ortanca 0.90; M2 sınıfındaki 8 hastanın PD-L1 ekspresyon yüzdesi ortanca 29.77, şiddeti (MFI) ortanca 1.11; M3 sınıfındaki 2 hastanın PD-L1 ekspresyon yüzdesi ortanca 36.32, şiddeti (MFI) ortanca 1.03; M4 sınıfındaki 6 hastanın PD-L1 ekspresyon yüzdesi ortanca 35.14, şiddeti (MFI) ortanca 1.04; M5 sınıfındaki 3 hastanın PD-L1 ekspresyon yüzdesi ortanca 68.60, şiddeti (MFI) ortanca 1.27; M6 sınıfındaki 1 hastanın PD-L1 ekspresyon yüzdesi ortanca 10.15, şiddeti (MFI) ortanca 1.05 olarak saptandı. M5 sınıfına dahil olan hastalarda PD-L1 ekspresyon yüzdesi yüksek olmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamadı. ($p=0.16$)

Hastaların tanı anındaki kemik iliği blast yüzdesi ile PD-L1 ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon izlenmedi. ($r=-0.25$, $p=0.27$) Tanı anındaki lökosit sayısı, trombosit sayısı, hemoglobin değeri, nötrofil değeri, LDH değeri ile PD-L1 ekspresyonu arasındaki ilişki incelendi, belirtilen laboratuvar parametreleri ile PD-L1 ekspresyon yüzdesi ve şiddeti (MFI) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon izlenmedi.

Hastaların tanı anında kemik iliğinde akım sitometri ile saptanan atipik miyeloid progenitör hücre oranı ile tanı anında kemik iliğinde saptanan PD-L1 ekspresyon yüzdesi ve şiddeti (MFI) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon izlenmedi. ($r=-0.07$, $p=0.76$ ve $r=-0.13$, $p=0.56$) Tanı anında kemik iliğinde akım sitometri ile saptanan atipik miyeloid progenitör hücre oranı ile tanı anında kemik iliği patolojisindeki blast yüzdesi arasında istatistiksel olarak anlamlı orta düzeyde korelasyon saptandı. ($r=0.47$ ve $p=0.03$)

Hastaların tanı anındaki PD-L1 ekspresyon düzeyinin cinsiyet, genetik, ELN 2022 risk grubu, FAB alt tipi ve MRD durumuna göre dağılımları Tablo 13'te gösterilmiştir.

Tablo 13: PD-L1 ekspresyon düzeyinin cinsiyet, genetik, ELN 2022 risk grubu, FAB alt tipi ve MRD durumuna göre dağılımları

	Hasta Sayısı	PD-L1 Ekspresyon Yüzdesi (ortanca)	p	PD-L1 Ekspresyonu (MFI) (ortanca)	p
Cinsiyet*			0.23		0.07
Kadın	14	33.44		1.07	
Erkek	7	27.07		1.02	
Genetik^{&}			0.70		0.51
t(15;17)	2	36.32		1.03	
NPM1-A	4	8.37		0.98	
FLT3-TKD	2	48.48		1.19	
NPM1-A + FLT3-ITD	3	20.05		0.97	
inv(16)	4	39.13		1.07	
t(8;21)	1	55.75		1.16	
ELN 2022 Risk Grubu^{&}			0.33		0.13
İyi	10	35.14		1.08	
Orta	9	32.92		1.08	
Kötü	2	16.15		0.93	
FAB Alt Tipi^{&}			0.16		0.10
M0	1	8.61		0.90	
M2	8	29.77		1.11	
M3	2	36.32		1.03	
M4	6	35.14		1.04	
M5	3	68.60		1.27	
M6	1	10.15		1.05	

*Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. [&]Kruskal-Wallis testi kullanılmıştır.

İndüksiyon tedavisine yanıt veren 13 hasta MRD durumuna göre akım sitometri ile yeniden değerlendirildi. 6 hasta MRD pozitif, 7 hasta MRD negatif olarak saptandı. MRD pozitif grupta PD-L1 ekspresyon yüzdesi ortanca 36.70 saptanırken, MRD negatif grupta PD-L1 ekspresyon yüzdesi ortanca 31.13 olarak saptandı. MRD pozitif grupta median PD-L1 ekspresyon yüzdesi daha yüksek olsa da fark istatistiksel olarak anlamlı bulunamadı. (p=0.18) MRD ile tanı anında kemik iliğinde saptanan PD-L1 ekspresyon yüzdesi ile ilişki Tablo 14'te gösterilmiştir.

Tablo 14: MRD Negatif ve MRD Pozitif Hastalarda PD-L1 Ekspresyon Yüzdesi

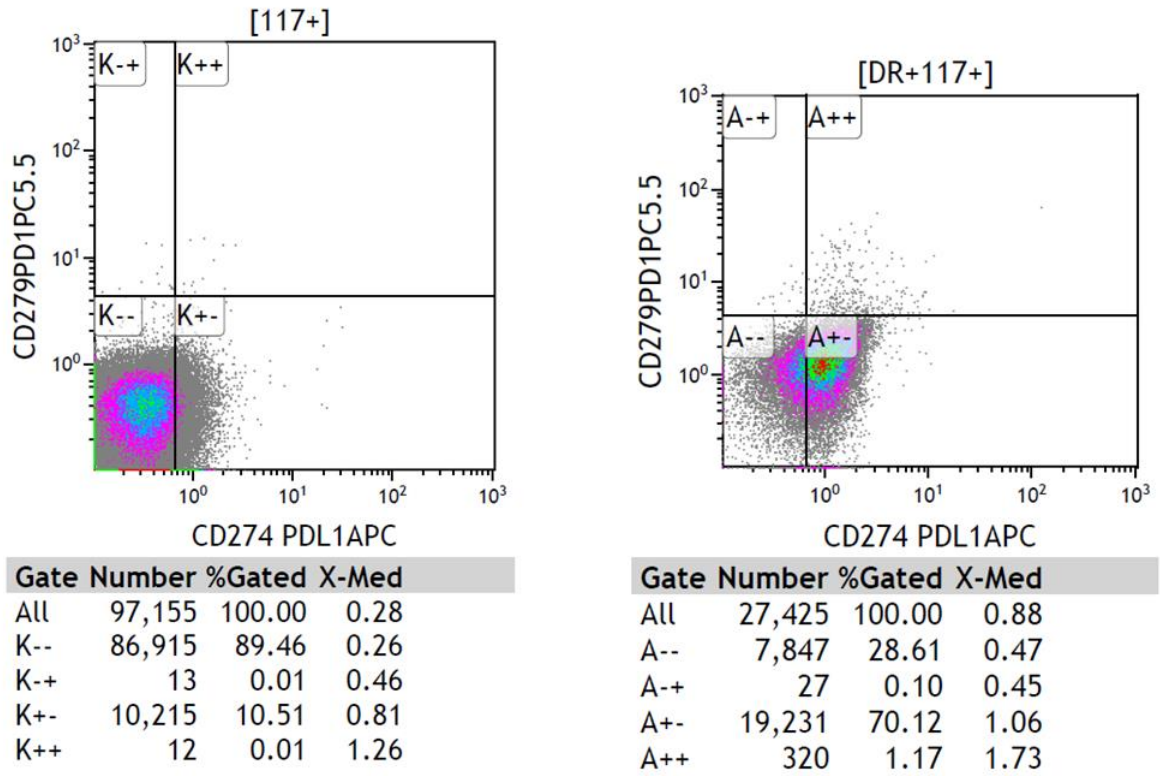
	MRD Negatif (n=6)	MRD Pozitif (n=7)	p
PD-L1 Ekspresyon Yüzdesi			
Ortanca	31.13	36.70	0.18
Minimum-Maksimum	5.98-68.60	31.71-61.3	

Hastalar MRD negatif ve MRD pozitif/Yanıtsız olarak iki gruba ayrılarak, MRD negatifliğinin PD-L1 ekspresyon yüzdesi ile olan ilişkisi değerlendirildi. MRD negatif grupta PD-L1 ekspresyon yüzdesi ortalanca 31.19, MRD pozitif/Yanıtsız grubunda PD-L1 ekspresyon yüzdesi ortalanca 33.59 olarak saptandı. MRD negatif grupta PD-L1 ekspresyon yüzdesi daha düşük olsa da iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark izlenmedi. (p=0.23) MRD negatifliği ile PD-L1 ekspresyon yüzdesi arasındaki ilişki Tablo 15’te gösterilmiştir.

Tablo 15: MRD Negatif Hastalar ile MRD Pozitif veya Yanıtsız Hastalardaki PD-L1 Ekspresyon Yüzdesi

	MRD Negatif (n=6)	MRD Pozitif/Yanıtsız (n=11)	p
PD-L1 Ekspresyon Yüzdesi			
Ortanca	31.19	33.59	0.23
Minimum-Maksimum	5.98-68.60	20.05-69.89	

Hastaların PD-L1 ekspresyonlarına ait akım sitometrik analiz örnekleri Şekil 4’te gösterilmiştir. Sol taraftaki analiz sonucunda PD-L1 ekspresyon yüzdesi 10.51 olarak düşük düzeyde görülmektedir. Sağ taraftaki analiz sonucunda PD-L1 ekspresyon yüzdesi 70.12 olarak yüksek düzeyde görülmektedir.



Şekil 4: Farklı Hastaların PD-L1 Ekspresyonlarına ait Akım Sitometrik Analiz Örnekleri

Hastaların tanı anında kemik iliği aspirasyon örneğindeki miyeloid progenitör hücrelerin akım sitometrik yüzey belirteçlerinin ekspresyonu ile PD-L1 ekspresyon düzeyleri arasındaki ilişki değerlendirildi. HLA-DR negatif olan 9 hastada PD-L1 ekspresyon yüzdesi ortalama 24.18, şiddeti (MFI) ortalama 1.00; HLA-DR pozitif olan 12 hastada PD-L1 ekspresyon yüzdesi ortalama 33.44, şiddeti (MFI) ortalama 1.13 olarak saptandı. HLA-DR negatif hastalarda, HLA-DR pozitif hastalara göre PD-L1 ekspresyon yüzdesi ve şiddeti (MFI) istatistiksel olarak anlamlı derecede daha düşüktü. ($p=0.05$ ve $p<0.01$) Aberran CD56 pozitifliği görülen 6 hastada PD-L1 ekspresyon yüzdesi ortalama 36.50, şiddeti (MFI) ortalama 1.12 ; CD56 negatif 15 hastada PD-L1 ekspresyon yüzdesi ortalama 31.71, şiddeti (MFI) ortalama 1.05 olarak görüldü. CD56 pozitif grupta PD-L1 ekspresyon yüzdesi ve şiddeti (MFI) daha yüksek olsa da aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı saptanmadı. ($p=0.17$ ve $p=0.13$)

Hastalarda akım sitometri ile tanı anında kemik iliğindeki T lenfositlerde CD3+ grupta, CD4+ ve CD8+ alt gruplarında ayrı ayrı olarak PD-1 ekspresyonları yüzde ve şiddet (MFI) olarak değerlendirildi. İndüksiyon tedavisine yanıtı hasta grubunda, tanı anında CD3+, CD4+ ve CD8+ T lenfositlerdeki PD-1 ekspresyon yüzdesi sırasıyla ortalama 53.49, 45.90 ve 59.31

olarak saptandı. İndüksiyon tedavisine yanıtızsız hasta grubunda ise tanı anında CD3+, CD4+ ve CD8+ T lenfositlerdeki PD-1 ekspresyon yüzdesi sırasıyla ortanca 54.59, 53.75 ve 59.21 olarak saptandı. İki grup arasında CD3+, CD4+ ve CD8+ T lenfositlerdeki PD-1 ekspresyon yüzdesi açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi. (sırasıyla p=0.78, p=0.47 ve p=0.95)

İndüksiyon tedavisine yanıtı hasta grubunda, tanı anında CD3+, CD4+ ve CD8+ T lenfositlerdeki PD-1 ekspresyon şiddeti (MFI) sırasıyla ortanca 2.71, 2.16 ve 3.62 olarak saptandı. İndüksiyon tedavisine yanıtızsız hasta grubunda ise, tanı anında CD3+, CD4+ ve CD8+ T lenfositlerdeki PD-1 ekspresyon şiddeti (MFI) sırasıyla ortanca 3.32, 2.77 ve 4.85 olarak saptandı. İki grup arasında CD3+, CD4+ ve CD8+ T lenfositlerdeki PD-1 ekspresyon şiddeti (MFI) açısından sadece CD3+ grup için istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlendi (p=0.01), CD4+ ve CD8+ gruplar için anlamlı bir fark saptanamadı. (sırasıyla p=0.20 ve p=0.10) Hastaların tanı anında kemik iliğindeki T lenfositlerde saptanan PD-1 ekspresyon durumu Tablo 16’da gösterilmiştir.

Tablo 16: Tanı Anında Kemik İliğindeki T Lenfositlerde PD-1 Ekspresyon Durumu

	İndüksiyon Tedavisine Yanıtlı (n=13)	İndüksiyon Tedavisine Yanıtızsız (n=4)	p
CD3+ Lenfositlerde PD-1 Ekspresyon Yüzdesi- Tanı			
Ortanca			
Minimum-Maksimum	53.49 36.56-93.01	54.59 48.59-58.29	0.78
CD4+ Lenfositlerde PD-1 Ekspresyon Yüzdesi- Tanı			
Ortanca			
Minimum-Maksimum	45.90 27.53-91.24	53.75 42.67-70.03	0.47
CD8+ Lenfositlerde PD-1 Ekspresyon Yüzdesi- Tanı			
Ortanca			
Minimum-Maksimum	59.31 45.26-97.85	59.21 49.57-67.96	0.95
CD3+ Lenfositlerde PD-1 Ekspresyonu (MFI)- Tanı			
Ortanca			
Minimum-Maksimum	2.71 2.19-4.62	3.32 3.18-3.39	0.01
CD4+ Lenfositlerde PD-1 Ekspresyonu (MFI)- Tanı			
Ortanca			
Minimum-Maksimum	2.16 1.35-3.25	2.77 2.19-3.13	0.20
CD8+ Lenfositlerde PD-1 Ekspresyonu (MFI)- Tanı			
Ortanca			
Minimum-Maksimum	3.62 2.58-6.14	4.85 3.66-8.33	0.10

*Mann-Whitney U testi kullanılmıştır.

Hastaların tanı anında kemik iliğindeki T lenfosit gruplarında PD-1 ekspresyon durumları yaş, cinsiyet, genetik mutasyon çeşidi, FAB sınıfı, kemik iliği blast yüzdesi ve laboratuvar parametrelerine göre değerlendirildi.

Tanı anında kemik iliğindeki CD3+ T lenfositlerde erkek hastalarda PD-1 ekspresyon yüzdesi ortalama 55.89, şiddeti (MFI) 3.31; kadın hastalarda PD-1 ekspresyon yüzdesi ortalama 53.54, şiddeti (MFI) 2.85 olarak saptandı, fark istatistiksel olarak anlamlı bulunamadı. (sırasıyla $p=0.44$ ve $p=0.60$) Tanı anında kemik iliğindeki CD3+ T lenfositlerde PD-1 ekspresyon yüzdesi ve şiddeti (MFI) ile yaş arasındaki korelasyon incelendiğinde, yaş arttıkça PD-1 ekspresyon yüzdesi artıyor olsa da, istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon izlenmedi. (sırasıyla $r=0.36$, $p=0.10$ ve $r=0.13$, $p=0.55$) Genetik mutasyon çeşidine göre hastalar gruplandırıldığında tanı anında kemik iliğindeki CD3+ T lenfositlerde PD-1 ekspresyon yüzdesi ve şiddeti (MFI) ile genetik mutasyon çeşidi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı. ($p=0.57$ ve $p=0.15$) FAB alt tipi ile tanı anında kemik iliğindeki CD3+ T lenfositlerde PD-1 ekspresyon yüzdesi ve şiddeti (MFI) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı. ($p=0.64$) ELN kötü risk grubundaki hastalarda CD3+ T lenfositlerde PD-1 ekspresyon şiddeti (MFI), iyi ve orta risk grubuna göre daha yüksek saptansa da istatistiksel olarak anlamlı değildi. ($p=0.06$) Lökosit sayısı, trombosit sayısı, hemogloblin değeri, nötrofil sayısı ve kemik iliği blast yüzdesi ile tanı anında kemik iliğindeki CD3+ T lenfositlerde PD-1 ekspresyon yüzdesi ve şiddeti (MFI) arasında anlamlı bir korelasyon saptanmadı. LDH değeri ile CD3+ T lenfositlerdeki PD-1 ekspresyon şiddeti (MFI) arasında istatistiksel olarak anlamlı orta düzeyde korelasyon saptandı. ($r=0.45$, $p=0.03$)

Tanı anında kemik iliğindeki CD4+ T lenfositlerde erkek hastalarda PD-1 ekspresyon yüzdesi ortalama 56.55, şiddeti (MFI) 2.81; kadın hastalarda PD-1 ekspresyon yüzdesi ortalama 49.68, şiddeti (MFI) 2.54 olarak saptandı, fark istatistiksel olarak anlamlı bulunamadı. ($p=0.28$ ve $p=0.76$) Tanı anında kemik iliğindeki CD4+ T lenfositlerde PD-1 ekspresyon yüzdesi ve şiddeti (MFI) ile yaş arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon izlenmedi. ($r=0.22$, $p=0.31$ ve $r=0.21$, $p=0.34$)

Tanı anında kemik iliğindeki CD8+ T lenfositlerde erkek hastalarda PD-1 ekspresyon yüzdesi ortalama 59.31, şiddeti (MFI) 4.44; kadın hastalarda PD-1 ekspresyon yüzdesi ortalama 59.92, şiddeti (MFI) 3.70 olarak saptandı, fark istatistiksel olarak anlamlı bulunamadı. ($p=0.68$ ve $p=0.48$) Tanı anında kemik iliğindeki CD8+ T lenfositlerde PD-1 ekspresyon yüzdesi ile yaş arasında istatistiksel olarak anlamlı orta düzeyde ilişki saptandı. ($r=0.50$, $p=0.02$) Yaş arttıkça

CD8+ T lenfositlerde PD-1 ekspresyon yüzdesi de artma eğiliminde izlendi. Ancak PD-1 ekspresyon şiddeti (MFI) ile yaş arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon saptanamadı. ($r=0.05$, $p=0.80$)

İndüksiyon tedavisine yanıtı hastalar MRD pozitif ve negatif olarak ayrıldığında, MRD pozitif grupta tanı anında kemik iliğindeki CD3+ T lenfositlerde PD-1 ekspresyon yüzdesi ortalama 53.49, şiddeti (MFI) 2.71; MRD negatif grupta tanı anında kemik iliğindeki CD3+ T lenfositlerde PD-1 ekspresyon yüzdesi ortalama 49.52, şiddeti (MFI) 2.56 olarak saptandı. MRD pozitif grupta ekspresyon yüksek olsa da istatistiksel olarak anlamlı bir fark izlenmedi. ($p=0.31$ ve $p=0.36$)

MRD pozitif grupta tanı anında kemik iliğindeki CD4+ T lenfositlerde PD-1 ekspresyon yüzdesi ortalama 45.90, şiddeti (MFI) 2.16; MRD negatif grupta tanı anında kemik iliğindeki CD4+ T lenfositlerde PD-1 ekspresyon yüzdesi ortalama 46.97, şiddeti (MFI) 2.21 olarak saptandı. İki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark izlenmedi. (sırasıyla $p=0.77$ ve $p=0.52$)

MRD pozitif grupta tanı anında kemik iliğindeki CD8+ T lenfositlerde PD-1 ekspresyon yüzdesi ortalama 59.91, şiddeti (MFI) 3.62; MRD negatif grupta PD-1 ekspresyon yüzdesi ortalama 55.36, şiddeti (MFI) 3.61 olarak saptandı. MRD pozitif grupta ekspresyon yüzdesi daha yüksek olsa da istatistiksel olarak anlamlı bir fark izlenmedi. ($p=0.18$) PD-1 ekspresyon şiddeti (MFI) ile MRD arasında da istatistiksel anlamlı bir ilişki saptanamadı. ($p=0.41$) MRD yanıtına göre PD-1 ekspresyon durumu Tablo 17’de gösterilmiştir.

Tablo 17: MRD Yanıtına Göre PD-1 Ekspresyon Durumu

	MRD Negatif (n=6)	MRD Pozitif (n=7)	p
CD3+ Lenfositlerde PD-1 Ekspresyon Yüzdesi- Tanı			
Ortanca	49.52	53.49	0.31
Minimum-Maksimum	36.56-75.14	44.74-93.01	
CD4+ Lenfositlerde PD-1 Ekspresyon Yüzdesi- Tanı			
Ortanca	45.90	46.97	0.77
Minimum-Maksimum	27.53-66.56	41.85-91.24	
CD8+ Lenfositlerde PD-1 Ekspresyon Yüzdesi- Tanı			
Ortanca	55.36	59.91	0.18
Minimum-Maksimum	45.26-83.36	47.57-97.85	
CD3+ Lenfositlerde PD-1 Ekspresyonu (MFI)- Tanı			
Ortanca	2.56	2.71	0.36
Minimum-Maksimum	2.19-2.99	2.25-3.10	
CD4+ Lenfositlerde PD-1 Ekspresyonu (MFI)- Tanı			
Ortanca	2.21	2.16	0.52
Minimum-Maksimum	1.69-3.16	1.35-3.25	
CD8+ Lenfositlerde PD-1 Ekspresyonu (MFI)- Tanı			
Ortanca	3.61	3.62	0.41
Minimum-Maksimum	2.58-3.85	3.21-5.46	

*Mann-Whitney U testi kullanılmıştır.

Hastalar MRD negatif ve MRD pozitif/Yanıtsız olarak iki gruba ayrıldı. MRD negatif grupta CD3+ T lenfositlerde PD-1 ekspresyon yüzdesi 49.52, şiddeti (MFI) 2.56; MRD pozitif/Yanıtsız grupta CD3+ T lenfositlerde PD-1 ekspresyon yüzdesi 53.49, şiddeti (MFI) 3.09 olarak saptandı. MRD negatif grupta PD-1 ekspresyon yüzdesi ve şiddeti daha düşük olsa da istatistiksel olarak anlamlı değildi. (sırasıyla 0.26 ve p =0.15) MRD negatif grupta CD4+ T lenfositlerde PD-1 ekspresyon yüzdesi 46.97, şiddeti (MFI) 2.21; MRD pozitif/Yanıtsız grupta CD4+ T lenfositlerde PD-1 ekspresyon yüzdesi 51.37, şiddeti (MFI) 2.50 olarak saptandı. MRD negatif grupta PD-1 ekspresyon yüzdesi ve şiddeti daha düşük olsa da istatistiksel olarak anlamlı değildi. (sırasıyla p=0.15 ve p =0.26) MRD negatif grupta CD8+ T lenfositlerde PD-1 ekspresyon yüzdesi 55.36, şiddeti (MFI) 3.61; MRD pozitif/Yanıtsız grupta CD8+ T lenfositlerde PD-1 ekspresyon yüzdesi 59.91, şiddeti (MFI) 3.80 olarak saptandı. MRD negatif grupta PD-1 ekspresyon yüzdesi ve şiddeti (MFI) daha düşük olsa da istatistiksel olarak anlamlı değildi. (sırasıyla p=0.20 ve p=0.20) MRD Negatif ve MRD Pozitif/Yanıtsız hastalardaki PD-1 ekspresyon durumu Tablo 18’de gösterilmiştir.

Tablo 18: MRD Negatif ve MRD Pozitif/Yanıtsız Hastalardaki PD-1 Ekspresyon Durumu

	MRD Negatif (n=6)	MRD Pozitif ve Yanıtsız (n=11)	p
CD3+ Lenfositlerde PD-1 Ekspresyon Yüzdesi- Tanı			
Ortanca	49.52	53.49	0.26
Minimum-Maksimum	36.56-75.14	44.74-93.01	
CD4+ Lenfositlerde PD-1 Ekspresyon Yüzdesi- Tanı			
Ortanca	46.97	51.37	0.15
Minimum-Maksimum	27.53-66.56	41.85-91.24	
CD8+ Lenfositlerde PD-1 Ekspresyon Yüzdesi- Tanı			
Ortanca	55.36	59.91	0.20
Minimum-Maksimum	45.26-83.36	47.57-97.85	
CD3+ Lenfositlerde PD-1 Ekspresyonu (MFI)- Tanı			
Ortanca	2.56	3.09	0.15
Minimum-Maksimum	2.19-4.62	2.25-3.39	
CD4+ Lenfositlerde PD-1 Ekspresyonu (MFI)- Tanı			
Ortanca	2.21	2.50	0.26
Minimum-Maksimum	1.69-3.16	1.35-3.25	
CD8+ Lenfositlerde PD-1 Ekspresyonu (MFI)- Tanı			
Ortanca	3.61	3.80	0.20
Minimum-Maksimum	2.58-6.14	3.21-8.33	

*Mann-Whitney U testi kullanılmıştır.

Tanı anında kemik iliğindeki CD4+ ve CD8+ T lenfosit alt gruplarında PD-1 ekspresyon yüzdesi ve şiddeti (MFI) ile kemik iliği blast yüzdesi, lökosit sayısı, trombosit sayısı, hemoglobin değeri, nötrofil sayısı, LDH değeri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon izlenmedi.

Hastaların tanı anında hem PD-L1 hem de PD-1 ekspresyonları değerlendirilmiş olup, PD-L1 ekspresyonu ile PD-1 ekspresyonu arasındaki ilişki incelendi. PD-L1 ekspresyon yüzdesi ile kemik iliğindeki CD3+, CD4+ ve CD8+ T lenfosit gruplarındaki PD-1 ekspresyonu arasında ters korelasyon izlendi ancak istatistiksel olarak anlamlı düzeyde değildi. (sırasıyla p=0.16, p=0.40 ve p=0.39)

İndüksiyon tedavisi olarak 7+3 tedavisi alan hastalarda almayan hastalara göre tedavi sonrası bakılan PD-1 ekspresyon düzeyleri artış gösterdi. CD8+ T lenfositlerde indüksiyon tedavisi sonrasında bakılan PD-1 ekspresyon düzeyleri tedavi olarak 7+3 almayan 3 hastada

azalırken, 7+3 tedavisi alan 13 hastada artış gösterdi ve aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı saptandı. ($p=0.02$)

Hastaların tanı anında kemik iliği aspirasyon örneğindeki miyeloid progenitör hücrelerin akım sitometrik yüzey belirteçlerinin ekspresyonu ile PD-1 ekspresyon düzeyleri arasındaki ilişki değerlendirildi. Blastlardaki aberran CD7 pozitifliği değerlendirildiğinde, CD3+ T lenfositlerdeki PD-1 ekspresyon şiddeti (MFI) CD7 pozitif olan hastalarda ortalama 3.18, CD7 negatif hastalarda ortalama 2.70 olarak saptandı ve aradaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı. ($p=0.03$) CD8+ T lenfositlerdeki PD-1 ekspresyon şiddeti (MFI) CD7 pozitif olan hastalarda ortalama 4.53, CD7 negatif olan hastalarda ortalama 3.52 olarak saptandı ve aradaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı. ($p=0.03$) Blastlardaki aberran CD56 pozitifliği değerlendirildiğinde, CD3+ T lenfositlerdeki PD-1 ekspresyon şiddeti (MFI) CD56 pozitif olan hastalarda ortalama 2.79, CD56 negatif hastalarda ortalama 3.09 olarak saptandı. CD8+ T lenfositlerdeki PD-1 ekspresyon şiddeti (MFI) CD56 pozitif olan hastalarda ortalama 3.70, CD56 negatif hastalarda ortalama 4.44 olarak saptandı. CD56 pozitif hastalarda daha düşük PD-1 ekspresyon şiddeti (MFI) görülse de aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi. (sırasıyla $p=0.13$ ve $p=0.15$)

Hastalardan tedaviye başlamadan önce hem kemik iliği hem de periferik kan örnekleri toplandı. Tanı anında kemik iliğindeki T lenfositlerde PD-1 ekspresyonları ile periferik kandaki T lenfositlerde PD-1 ekspresyonları karşılaştırıldı. Kemik iliğindeki CD3+ T lenfositlerde PD-1 ekspresyon yüzdesi ortalama 53.80, şiddeti (MFI) ortalama 2.99; periferik kandaki CD3+ T lenfositlerde PD-1 ekspresyon yüzdesi ortalama 48.44, şiddeti (MFI) ortalama 3.13 olarak saptandı. Kemik iliğinde PD-1 ekspresyon yüzdesi periferik kana göre daha yüksekti ve istatistiksel olarak anlamlı olarak saptandı. ($p<0.01$) PD-1 ekspresyon şiddeti (MFI) ise periferik kanda daha yüksek görülürken istatistiksel olarak anlamlı değildi. ($p=0.94$)

Kemik iliğindeki CD4+ T lenfositlerde PD-1 ekspresyon yüzdesi ortalama 51.37, şiddeti (MFI) ortalama 2.58; periferik kandaki CD4+ T lenfositlerde PD-1 ekspresyon yüzdesi ortalama 48.47, şiddeti (MFI) ortalama 2.61 olarak saptandı. Kemik iliğinde PD-1 ekspresyon yüzdesi ve şiddeti periferik kana göre daha yüksek olsa da bu alt grupta istatistiksel olarak anlamlı değildi. (sırasıyla $p=0.07$ ve 0.08)

Kemik iliğindeki CD8+ T lenfositlerde PD-1 ekspresyon yüzdesi ortalama 59.91, şiddeti (MFI) ortalama 3.80; periferik kandaki CD8+ T lenfositlerde PD-1 ekspresyon yüzdesi ortalama 52.45, şiddeti (MFI) ortalama 3.60 olarak saptandı. Kemik iliğinde PD-1 ekspresyon yüzdesi ve

şiddeti (MFI) periferik kana göre daha yüksekti ve istatistiksel olarak anlamlı olarak saptandı. (sırasıyla $p<0.01$ ve $p=0.05$) Hastaların tanı anında kemik iliği ve periferik kandaki T lenfositlerinde PD-1 ekspresyon durumu Tablo 19’da gösterilmiştir.

Tablo 19: Hastaların Tanı Anında Kemik İliği ve Periferik Kandaki T Lenfositlerinde PD-1 Ekspresyon Durumu

	Kemik İliği	Periferik Kan	p
CD3+ Lenfositlerde PD-1 Ekspresyon			
Yüzdesi			
Ortanca	53.80	48.44	<0.01
Minimum-Maksimum	36.56-93.01	32.56-91.11	
CD3+ Lenfositlerde PD-1 Ekspresyonu (MFI)			
Ortanca	2.99	3.13	0.94
Minimum-Maksimum	2.19-5.02	2.23-4.89	
CD4+ Lenfositlerde PD-1 Ekspresyon			
Yüzdesi			
Ortanca	51.37	48.47	0.07
Minimum-Maksimum	27.53-91.24	30.16-96.33	
CD4+ Lenfositlerde PD-1 Ekspresyonu (MFI)			
Ortanca	2.58	2.61	0.08
Minimum-Maksimum	1.35-4.65	1.90-4.38	
CD8+ Lenfositlerde PD-1 Ekspresyon			
Yüzdesi			
Ortanca	59.91	52.45	<0.01
Minimum-Maksimum	45.26-97.85	34.40-77.19	
CD8+ Lenfositlerde PD-1 Ekspresyonu (MFI)			
Ortanca	3.80	3.60	0.05
Minimum-Maksimum	2.58-8.33	2.37-5.66	

*Mann-Whitney U testi kullanılmıştır.

Hastalardan tanı anında alınan periferik kan örneklerindeki T lenfositlerde PD-1 ekspresyonu ile yaş ve cinsiyete göre eşleştirilmiş sağlıklı gönüllülerden alınan periferik kan örneklerindeki T lenfositlerde PD-1 ekspresyonu karşılaştırıldı. Hastaların tanı anındaki periferik kan örneklerinde CD3+ T lenfositlerde PD-1 ekspresyon yüzdesi ortalama 48.44, şiddeti (MFI) ortalama 2.99; sağlıklı gönüllü grubunda periferik kan örneklerinde CD3+ T lenfositlerde PD-1 ekspresyon yüzdesi ortalama 41.35, şiddeti (MFI) ortalama 2.69 olarak görüldü. Bağımsız değişkenler arasındaki fark test edildiğinde, istatistiksel olarak anlamlı düzeyde hastalarda CD3+ T lenfositlerdeki PD-1 ekspresyon yüzdesi, sağlıklı gönüllülere göre daha yüksek saptandı. (sırasıyla $p=0.03$ ve 0.02)

Hastaların tanı anındaki periferik kan örneklerinde CD4+ T lenfositlerde PD-1 ekspresyon yüzdesi ortalama 51.37, şiddeti (MFI) ortalama 2.58; sağlıklı gönüllü grubunda periferik kan örneklerinde CD4+ T lenfositlerde PD-1 ekspresyon yüzdesi ortalama 48.46, şiddeti (MFI) ortalama 2.13 olarak görüldü. Bağımsız değişkenler arasındaki fark test edildiğinde, CD4+ T lenfositlerdeki PD-1 ekspresyon yüzdesi, sağlıklı gönüllülere göre yüksek olsa da fark istatistiksel olarak anlamlı değildi. ($p=0.60$) Ancak PD-1 ekspresyon şiddeti (MFI) hasta grubunda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha fazlaydı. ($p=0.01$)

Hastaların tanı anındaki periferik kan örneklerinde CD8+ T lenfositlerde PD-1 ekspresyon yüzdesi ortalama 59.91, şiddeti (MFI) ortalama 3.80; sağlıklı gönüllü grubunda periferik kan örneklerinde CD8+ T lenfositlerde PD-1 ekspresyon yüzdesi ortalama 38.35, şiddeti (MFI) ortalama 2.76 olarak görüldü. Bağımsız değişkenler arasındaki fark test edildiğinde, istatistiksel olarak anlamlı düzeyde hastalarda CD8+ T lenfositlerdeki PD-1 ekspresyon yüzdesi, sağlıklı gönüllülere göre daha yüksek saptandı. (sırasıyla $p=0.03$ ve 0.02)

Hastalar ve sağlıklı gönüllülerin periferik kan örneklerindeki T lenfositlerde PD-1 ekspresyon durumu Tablo 20’de gösterilmiştir.

Tablo 20: Hastalar ve Sağlıklı Gönüllülerin Periferik Kan Örneklerindeki T Lenfositlerde PD-1 Ekspresyon Durumu

	Hasta	Sağlıklı Gönüllü	p
CD3+ Lenfositlerde PD-1 Ekspresyon			
Yüzdesi			
Ortanca	48.45	41.35	0.03
Minimum-Maksimum	32.56-91.11	10.60-60.53	
CD3+ Lenfositlerde PD-1			
Ekspresyonu (MFI)			
Ortanca	3.13	2.69	0.02
Minimum-Maksimum	2.23-4.89	1.10-3.87	
CD4+ Lenfositlerde PD-1 Ekspresyon			
Yüzdesi			
Ortanca	48.48	48.46	0.60
Minimum-Maksimum	30.16-96.33	35.44-59.13	
CD4+ Lenfositlerde PD-1			
Ekspresyonu (MFI)			
Ortanca	2.61	2.13	0.01
Minimum-Maksimum	1.90-4.38	0.57-3.28	
CD8+ Lenfositlerde PD-1 Ekspresyon			
Yüzdesi			
Ortanca	52.45	38.35	<0.01
Minimum-Maksimum	34.40-77.19	15.95-66.17	
CD8+ Lenfositlerde PD-1			
Ekspresyonu (MFI)			
Ortanca	3.61	2.76	0.05
Minimum-Maksimum	2.37-5.66	0.90-4.90	

*Mann-Whitney U testi kullanılmıştır.

Sağlıklı gönüllülerden alınan periferik kan örneklerindeki hücrelerde PD-L1 ekspresyonu saptanmamıştır.

7. TARTIŞMA

İmmün kontrol noktası belirteçleri T hücrelerinde PD-1, lösemik hücrelerde PD-L1 olarak adlandırılan hücre yüzey belirteçleridir. PD-1 ve PD-L1 reseptör ligand etkileşimi, CD8 pozitif T hücrelerinin kanser hücrelerini tanımasını engelleyerek, kanser hücrelerinin sitotoksik yanıttan kaçışını sağlar. PD-1'in tümör hücreleri üzerinde bulunan PD-L1 gibi B7 ligand ailesine bağlanmasının, hayvan akut miyeloid lösemi modellerinde T hücrelerinin proliferasyonunun ve immün sistem reaksiyonunun baskılanması ile sonuçlandığı gösterilmiştir. (55) Bu belirteçlerin AML tanılı hastalarda düzeylerinin belirlenmesi ile, tanı anında ve tedavi sürecinde hastaların prognozu öngörülebilir.

İmmün kontrol noktası belirteçlerinin yüksek düzeylerde ekspresyonu, lösemik hücrelere immün sistem hücrelerinden kaçış fırsatı sağlayarak tedavi yanıtını azaltabilir ve kötü prognostik olarak rol oynayabilir. Yeni tanı almış 53 AML hastasının değerlendirildiği bir çalışmada indüksiyon tedavisine yanıtızsız hasta grubunda, PD-L1 ekspresyon düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha yüksek olduğu saptanmıştır. (56) 40 yetişkin AML hastasında akım sitometri yöntemiyle PD-L1 ekspresyon düzeylerinin belirlendiği başka bir çalışmada, PD-L1 ekspresyon düzeyinin remisyon indüksiyon tedavisine yanıt ile olan ilişkisi araştırılmıştır. İndüksiyon tedavisine refrakter olan grupta PD-L1 ekspresyon düzeyleri daha yüksek saptansa da istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır. (57) 197 AML örneğinin epigenetik analizinin yapıldığı bir çalışmada ise, lösemik hücrelerde PD-L1 geninin promotor metilasyonundaki azalmanın bağımsız bir negatif prognostik faktör olduğu gösterilmiştir. (58) Bu çalışmada da dolaylı yoldan PD-L1 aktivitesindeki artışın daha kötü prognoz ile ilişkili olduğu saptanmıştır. Başka bir çalışmada ise lösemik blast hücrelerinde düşük PD-L1 ekspresyonu saptandığı ve düşük PD-L1 ekspresyonunun pozitif bir prognostik etkiye sahip olabileceği, daha yüksek genel sağkalım ile ilişkili olabileceği ifade edilmiştir. (59) Bu çalışmalarda hastaların PD-L1 ekspresyon düzeylerine tanı anında bakılmış ve remisyon indüksiyon tedavisi sonrası yanıtlar değerlendirilmiştir. Bizim çalışmamızda da hastaların tanı anındaki PD-L1 ekspresyon durumu ile indüksiyon tedavisine yanıt arasındaki ilişki değerlendirildi. İndüksiyon tedavisine yanıt durumu ile PD-L1 ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı. Bu durum hasta sayısının az olması ile ön planda ilişkilendirildi. Hastaların tanı anındaki PD-L1 ekspresyon düzeyleri oldukça farklılık göstermekteydi. Hasta sayısının artması ile iki grup arasındaki farkın daha da belirgin olarak saptanabilmesi mümkün olacaktır. Ayrıca hastaların izlemine devam edilerek, konsolidasyon

tedavisi sonrası yanıt durumları ve genel sağkalımları ile PD-L1 ekspresyonu arasındaki ilişki değerlendirilebilecektir.

Chen ve ark.; 60 akut lösemi hastasında immünohistokimya ve real-time PCR yöntemleri ile B7-H1(PD-L1) ekspresyon düzeylerini saptamış. AML M5 alt tipindeki hastalarda, diğer alt tiplere göre daha yüksek PD-L1 ekspresyonu olduğu belirlenmiş. Hastaların total sağkalım oranları değerlendirildiğinde, PD-L1 ekspresyonu yüksek olan hastaların daha kötü prognoza sahip olduğu gösterilmiş. (60) Bu çalışmada lösemi alt tiplerinde PD-L1 ekspresyon düzeyleri ayrı ayrı değerlendirilmiş ve AML-M5 alt tipinde ekspresyon düzeylerinin daha fazla olduğu saptanmış. Çalışmamızda hastaların lösemi alt tipiyle hem PD-1 hem de PD-L1 ekspresyon düzeylerini kaydederek lösemik alt tip ile immünolojik belirteçler ve prognoz arasındaki ilişki değerlendirildi. FAB alt tipiyle PD-L1 ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanamadı. Belirtilen çalışmalarda AML-M5 alt tipinde PD-L1 ekspresyon düzeyleri daha yüksek saptanmış olup, bizim çalışmamızda da bu durumla uyumlu olarak AML-M5 alt tipindeki hastalarda PD-L1 ekspresyonu daha yüksek olarak gözlemlendi. Hasta sayısının artmasıyla alt gruplar arasındaki ekspresyon farkı daha da belirgin olarak saptanabilecektir.

Hastalardaki PD-1 ve PD-L1 ekspresyonlarının hastaların sahip olduğu mutasyonlarla ve sitogenetik değişikliklerle olan ilişkisi de araştırılması gereken bir konudur. Lösemik blastlarda yüksek PD-L1 ekspresyon düzeylerinin özellikle FLT3 ve NPM1 mutasyonuna sahip hastalarda daha düşük genel sağkalım süresi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. (61) Başka bir çalışmada ise sitogenetik risk grubu kötü olan hastalarda daha yüksek PD-L1 ekspresyon düzeyleri saptanmıştır. (62) Sallman ve ark. çalışmasında TP53 mutasyonu olan AML ve MDS hastalarında PD-L1 ekspresyonunun daha fazla olduğu, bu durumun bu hasta fenotipinin immün sistemden kaçışında etkili olabileceği ve kötü prognoz göstermesiyle ilişkili olabileceği belirtilmiştir. (63) Bizim çalışmamızda da hastaların sitogenetik risk grupları ve sahip oldukları mutasyonlar ile PD-1 ve PD-L1 düzeyleri arasındaki ilişki değerlendirildi. Farklı mutasyon alt tiplerine göre PD-1 ve PD-L1 ekspresyonu değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanamadı. NPM1-A mutasyonuna sahip hastalarda göreceli olarak PD-L1 ekspresyonları düşük saptandı. NPM1 ve FLT3 mutasyonu birlikteliğinde ise PD-L1 ekspresyonu daha yüksek izlendi. Tek başına FLT3 mutasyonuna sahip hastalarda PD-L1 ekspresyonu diğer mutasyonlara sahip hastalara göre daha fazlaydı. Daha önceki bir çalışmada NPM1 ve FLT3 mutasyonuna sahip hastalarda PD-L1 ekspresyon düzeylerinin yüksek olduğu belirtilmişti. Brodsky ve ark. çalışmasında buna sebep olarak, FLT3 mutasyonu ile birlikte

aktive olan yolakların PD-L1 ekspresyonunu da dolaylı yoldan artırabileceğini ifade etmişlerdir. (61) FLT3 mutasyonu ile birlikte PD-L1 ekspresyon düzeyinin artışı, tedavi hedefi olarak FLT3 inhibitörleri ile immün kontrol noktası inhibitörlerinin birlikte kullanımını sağlayabilir. Bu ilişkinin geniş hasta gruplarında incelenmesi ve biyolojik mekanizmasının aydınlatılması gerekmektedir.

Çalışmamızda miyeloid progenitörlerde HLA-DR pozitif hastalarda tanı anında PD-L1 ekspresyon yüzdesi HLA-DR negatif hastalara göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha yüksekti. HLA-DR'nin immün kaçıştaki rolü düşünüldüğünde, yüksek PD-L1 ekspresyonu ile ilişkisinin biyolojik mekanizmasının aydınlatılması için hücresel düzeyde çalışmalara ihtiyaç vardır.

Bassiouny ve ark. uyguladığı bir çalışmada, 59 yeni tanı AML hastasında tanı anında PD-1 düzeyleri akım sitometri yöntemiyle belirlenmiş. Remisyon indüksiyon tedavisi sonrası 28. gün yanıt oranları karşılaştırıldığında, düşük PD-1 ekspresyonuna sahip hasta grubunun remisyon indüksiyon tedavisine daha yüksek oranda yanıt verdiği saptanmıştır. (64) Jia ve ark. çalışmasında 22 yeni tanı AML hastası değerlendirilmiş. PD-1 ekspresyonu açısından ortalama değer sınır olarak kullanılarak hastalar yüksek ve düşük PD-1 eksprese eden gruplar olarak iki gruba ayrılmış. İki grup arasında indüksiyon tedavisine yanıt ve genel sağkalım açısından anlamlı bir fark izlenmemiş. Bu durum çalışmadaki küçük örneklem büyüklüğü ile ilişkilendirilmiş. (65) Bizim çalışmamızda indüksiyon tedavisine yanıt ile PD-1 ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır. İndüksiyon tedavisine yanıtsız olan hastalarda PD-1 ekspresyon yüzdesi daha yüksek olma eğiliminde izlenmiştir. Çalışmamızın örneklem boyutunun küçük olması sebebiyle tedavi yanıtı ile PD-1 ekspresyonu arasında anlamlı bir ilişki saptanamamış olabilir.

AML, kemik iliğinde miyeloid hematopoetik progenitör hücrelerin bozulmuş farklılaşması ve yüksek proliferasyon kapasitesiyle oluşan bir hastalıktır. AML'nin oluşması ve progresyonu öncelikle kemik iliğinde başlar ve kemik iliği mikroçevresine bağımlıdır. (66) Bu nedenle kemik iliğinde yer alan hem lösemik hücrelerin hem de immün yanıtı aracılık eden T hücrelerinin yapısal özelliklerinin belirlenmesi büyük önem taşımaktadır. Jia ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada yeni tanı AML hastalarında kemik iliği ve periferik kandan elde edilen T hücrelerindeki PD-1 ekspresyonları değerlendirildiğinde, kemik iliğindeki CD8+ T lenfosit alt grubunda PD-1 ekspresyonunun daha yüksek olduğu saptanmış. (65) PD-1

reseptörünün persistan antijen uyarımına yanıtın azaldığı T hücre işlev bozukluğu durumu olan “T hücre tükenmesi” için anahtar bir aracı olduğu gösterilmiştir. Jia ve ark. bu bulguya dayanarak, AML hastalarında kemik iliğindeki CD8+ T hücrelerinde daha yüksek PD-1 ekspresyon düzeyi saptanmasının, bu hastalarda kemik iliğinde baskılayıcı bir ortam olduğunu ve T hücre tükenmesinin daha fazla olduğunu gösterdiğini ifade etmişlerdir. Ek olarak sitokin üretimi, proliferasyon yeteneği ve öldürme kapasitesini değerlendirmek için fonksiyonel çalışmalar uyguladıklarında kemik iliğindeki T lenfositlerin periferik kandaki T lenfositlere göre daha az fonksiyonel olduğunu göstermişlerdir. Bu verilerle, kemik iliğindeki lösemi reaktif CD8+ T lenfositlerin daha yüksek sıklıkla PD-1 pozitif hücrelerden oluştuğunu ve periferik kandaki lenfositlere göre daha işlevsiz olduğunu göstermişlerdir. Bu bulgu AML hastalarında anti lösemi yanıtını artırmak için PD-1 inhibisyonunu hedefleyen tedavi stratejileri için de güçlü bir gerekçe sağlamaktadır. Çalışmamızda hastalardan tanı anında alınmış hem kemik iliği hem de periferik kan örnekleri değerlendirilmiş olup, kemik iliğinde tümör mikroçevresi ile ilişkide olan T lenfositler ile, periferik kanda dolaşan T lenfositler arasındaki PD-1 ekspresyon farklılığını değerlendirdik. Hastaların tanı anında kemik iliği örneklerinde CD3+ ve CD8+ T lenfositlerde PD-1 ekspresyon yüzdesi periferik kandaki T lenfositlere göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksekti. Bu bulgu önceki çalışmalarla uyumlu olarak kemik iliğinde tümör mikroçevresi ile ilişkide olan T lenfositlerde PD-1 ekspresyonlarının arttığını desteklemektedir.

Daha önceki çalışmalarda AML hastalarında T hücrelerinin fonksiyonu ve “T hücre tükenmesi” kavramı üzerinde durulmuştur. PD-1 ve ilişkili kostimülatör moleküllerin ekspresyonlarının T hücrelerinin kanser hücrelerine karşı verdiği immun yanıtı azalttığı ve allojeneik kök hücre nakli sonrası relaps ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. (67) Tan ve ark. yüksek PD-1 ekspresyon düzeylerinin “T hücre tükenmesi” ile ilişkili olduğunu saptamıştır. PD-1 düzeyi yüksek olan hastalarda eş zamanlı olarak CD244 ve CD57 yüzey belirteçlerinin de daha yüksek oranda eksprese edildiği ve bu durumun sitotoksik T hücrelerinde yanıt defekti ile sonuçlandığını göstermiştir. (68) PD-1 ekspresyon düzeylerinin yüksek olması, T hücrelerinin lösemik hücrelere karşı verdiği sitotoksik yanıtı da azaltmış olacaktır.

Bassiouny ve ark. çalışmasında PD-1 düzeyi yüksek CD3+ T lenfositlerde PD-1 düzeyi yüksek hastaların blastlarında aberran CD7 ekspresyonu saptamıştır. Aberran CD56 ekspresyonu değerlendirildiğinde ise PD-1 yüksek ve düşük gruplar arasında anlamlı bir fark saptanmadığını belirtmişlerdir. Bizim çalışmamızda da aberran CD7 pozitifliği saptanan

hastalarda CD3+ ve CD8+ T lenfositlerde PD-1 ekspresyonları istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha yüksek bulunmuştur. Aberran CD56 ekspresyonu olan hastalarda PD-1 düzeyleri daha yüksek olsa da istatistiksel olarak anlamlı değildir. Akım sitometrik olarak beklenmedik şekilde farklı ekspresyon profili gösteren hastaların PD-1 ekspresyonları ile ilişkisinin daha ileri çalışmalar ile moleküler mekanizmalar üzerinden aydınlatılması mümkün olacaktır.

Schnorfeil ve arkadaşları, AML hastalarında tanı anında, indüksiyon tedavisi sonrası relaps anında ve kök hücre nakli sonrası relaps anında periferik kan ve kemik iliği örneklerinde T hücrelerinde PD-1 ekspresyon düzeylerini belirlemiş. AML hastalarında tanı anında bakılan ekspresyon düzeyleri ile sağlıklı kontrollerde bakılan PD-1 ekspresyon düzeyleri benzer olarak saptanmış. Ancak kök hücre nakli sonrasında tekrar bakılan PD-1 ekspresyon düzeyleri, tanı anına göre anlamlı olarak yüksek saptanmış. (69) Chen ve arkadaşlarının çalışmasında; yeni tanı veya nüks AML hastalarında PD-1 ekspresyon düzeyleri sağlıklı kontroller ile karşılaştırıldığında daha yüksek saptanmış ve bu durumun lösemik hücrelerin immün sistemden kaçışına aracılık edebileceği belirtilmiştir. (60) Tan ve arkadaşlarının çalışmasında ise CD4 ve CD8+ T lenfositlerde PD-1 ekspresyon düzeyleri, sağlıklı gönüllülere göre daha yüksek saptanmıştır. (68) Çalışmamızda hastalardan tanı anında alınan periferik kan örneklerindeki CD3+, CD4+ ve CD8+ T lenfositlerde PD-1 ekspresyon yüzdesi ve şiddeti (MFI) yaşa ve cinsiyete göre eşleştirilmiş sağlıklı gönüllülere göre tüm gruplarda istatistiksel anlamlı olarak daha yüksek saptanmıştır. Bu durum hastalarda lösemiye karşı verilmiş bir yanıt olarak değerlendirilebilir. Çalışmamızda bir kontrol grubu olması ve hastalardaki ekspresyon düzeylerinin kontrol grubuna göre daha yüksek saptanması anlamlı bir bulgu olarak değerlendirilmiştir. AML tanılı hastalarda sağlıklı kontrollere göre PD-1 ekspresyon düzeylerinin daha yüksek saptanması, PD-1'e karşı geliştirilmiş monoklonal antikorlar ile uygulanacak tedavilere de hasta bazında aday olabileceğini düşündürmektedir.

Lenfositlerde PD-1 ekspresyonu ya da CD34+ lösemik hücrelerde PD-L1 ekspresyon düzeylerinin yüksek olmasının hipometile edici ilaçlarla immün kontrol noktası inhibitörlerinin birlikte uygulandığı bir çalışmada tedavi direncine sebep olduğu gösterilmiştir. (70) Andreas ve arkadaşlarının Danimarka'da yaptığı bir çalışma, azasitidin tedavisinin hastalarda anti lösemik T hücrelerinin tükenmesini kolaylaştırarak tedaviye direnç gelişimine yol açabileceğini öne sürmektedir. Bu çalışma, hipometile edici ilaç kullanımına hastaların %44'ünde PD-1 promotor geninde DNA metilasyon kaybının eşlik ettiğini ve metilasyon seviyelerinin T hücrelerindeki PD-1 ekspresyonuyla ters orantılı olduğunu göstererek azasitidin ile in vivo

tedavinin PD-1 ekspresyonu üzerinde doğrudan bir etkisi olduğunu ortaya koymaktadır. Ayrıca, PD-1 promotor geninin demetilasyonunun önemli ölçüde daha kötü bir genel yanıt oranı (ORR) ve daha kısa genel sağkalım ile ilişkili olduğunu göstermektedir. (71) Yapılan çalışmalar, hipometile edici ilaç tedavilerinin neden olduğu PD-1 amplifikasyonunun tedaviye yanıt ve dirençte bozulmaya neden olabileceğini ve bu nedenle, bir hipometile edici ilaç ve bir PD-1 kontrol noktası inhibitörü ile kombinasyon tedavisinin bu mekanizmanın üstesinden gelebileceğini, MDS ve AML'de klinik sonuçları iyileştirebileceğini göstermektedir.

AML ve MDS hastalarında hipometile edici ilaçlara maruziyet sonrasında PD-1, PD-L1, CTLA-4 ekspresyonlarının arttığı ve bu durumun hipometile edici ilaçlara karşı tedavi direnci geliştirdiği saptanmıştır. (72) Bu durumdan yola çıkarak, immün kontrol noktası belirteçlerinin ekspresyonlarını artıran hipometile ilaçlarla birlikte PD-1/PD-L1 inhibitörlerinin kombinasyon halinde kullanımı denenmiştir. (73, 74) Bir çalışmada ise sitozin arabinosid tedavisi sonrasında kostimülatör sinyaller artarken, PD-L1 ekspresyonlarının azaldığı ve lösemik hücreleri sitotoksik T lenfosit aracılı öldürmeye daha duyarlı hale getirdiği gösterilmiştir. (75) Böylece potansiyel sinerjik anti lösemik etki hedeflenerek sitotoksik kemoterapötik ilaçlarla immün kontrol noktası inhibitörlerinin birlikte kullanıldığı çalışmalar tasarlanmıştır. (76, 77) Bizim çalışmamızda hastalardan hem tanı anında hem de remisyon indüksiyon tedavisi sonrasında PD-1 ekspresyon düzeyleri çalışıldı. Böylece sitozin arabinosid veya hipometile ilaçlara maruz kalan hastalarda bu belirteçlerin ekspresyon düzeylerinin değişimi incelendi. Hipometile edici ilaç (azasitidin) tedavisi alan ve kontrol kemik iliği örneği olan 1 hastada literatürün aksine PD-1 ekspresyon düzeylerinin azaldığı izlendi. İndüksiyon tedavisi sırasında sitozin arabinosid kullanılan 13 hastanın çoğunda PD-1 ekspresyon yüzdesi tedavi sonrasında artmış olarak izlendi. Akut promiyelositer lösemi tanısı olan ve ATRA+ATO tedavisi alan 2 hastada kontrol kemik iliği örneklerinde PD-1 ekspresyon düzeyleri azalmış olarak saptandı. Önceki çalışmalarda hipometile edici ilaçların PD-L1 ekspresyon düzeylerini arttırdığı belirtilmişse de bizim çalışmamızda yeterli veri olmadığından bu çıkarımı yapmak mümkün olmamaktadır. İndüksiyon tedavisi olarak 7+3 tedavisi alan, sitozin arabinosid kullanmış olan hastalarda PD-1 ekspresyon düzeyleri artmıştı. Daha önce bir çalışmada sitozin arabinosid maruziyetinin kostimülatör sinyalleri arttırdığı ve T hücre aracılı öldürmeye daha duyarlı hale geldiği belirtilmiştir. Ancak bizim çalışmamızda sitozin arabinosid alan hastalarda tedavi sonrası PD-1 ekspresyon düzeyleri arttığından, bu durum PD-1 yolağı üzerinden immün kaçış gerçekleşme olasılığının artmış olabileceği şeklinde yorumlanabilir.

İmmün kontrol noktası belirteçlerinin yüksek düzeylerde ekspresyonu kötü prognostik bir faktör olmasının yanı sıra, mevcut tedavilere yanıtı da azaltılabileceği bu çalışmada gösterilmiştir. Bu belirteçlerin eksprese edilmesi, gelecek çalışmalar ışığında konvansiyonel kemoterapiler yanında immün kontrol noktası inhibitörlerinin de akut miyeloblastik lösemi hastalarının tedavi protokollerine eklenmesine olanak sağlayacaktır.

Daha önce değerlendirilen çalışmalarda MRD durumu ile immün kontrol noktası belirteçlerinin düzeyleri arasındaki ilişki belirtilmemiştir. MRD ile PD-1/PD-L1 ekspresyon durumu arasındaki ilişkiyi inceleyen güncel literatürde bildiğimiz kadarıyla ilk çalışma olmuştur. Çalışmamızda akım sitometri ile hastaların MRD durumu da değerlendirilmiştir. MRD pozitif hasta grubunda, MRD negatif hasta grubuna göre hem PD-L1 hem de PD-1 ekspresyonu daha yüksektir. Özellikle PD-L1 ekspresyonu ve CD8+ T lenfositlerde PD-1 ekspresyonu açısından sınırda istatistiki anlamlılık elde edilmiş olup, hasta sayısı arttığında bu anlamlılık düzeyinin artacağı tahmin edilmektedir. MRD negatif hastalarda, MRD negatif olmayan hastalara göre PD-1 ve PD-L1 ekspresyon düzeyleri düşük saptanmıştır. İmmün kontrol noktası belirteçlerinin yüksek düzeylerde ekspresyonu sonucunda immün sistemden kaçış sağlanarak hastaların tedavi yanıtları yeterince derin olmayabilir ve bu durum prognozu etkileyebilir. Bu belirteçlerin ekspresyon düzeylerinin artması MRD pozitifliğine neden olmuş ve derin yanıtların oluşmasına engel olmuş olabilir. Düşük düzeylerde ekspresyon görülen hastaların MRD negatif yanıtlar vermiş olması, kemoterapinin yanında T hücre aracılı immün yanıtın da daha kuvvetli olabileceği yönünde yorumlanabilir. İmmün kontrol noktası belirteçlerinin ekspresyon düzeylerinin düşük olması MRD negatifliğini tahmin etmenin bir göstergesi olabilir. Bu konuda daha kapsamlı ve geniş ölçekli çalışmalara ihtiyaç vardır.

Çalışmanın en önemli kısıtlılığı örneklem büyüklüğünün yeterli olmamasıdır. Daha çok hasta verisi ile istatistiksel olarak anlamlı olabilecek sonuçlar olacaktır. Bazı değerler istatistik olarak sınırda anlamlı gelmiş olup, yeterli örneklem büyüklüğünde istatistiki olarak anlamlı düzeye erişebilir. Hastaların konsolidasyon sonrası immün kontrol noktası belirteçlerinin düzeyleri de kaydedilmiş olup istatistiki değerlendirme yapılabilecek sayıya ulaşamamıştır. Takip zamanı uzadığında hastaların verileri tamamlanabilecektir. Hastaların genel sağkalımları ile immün kontrol noktası belirteçlerinin ekspresyonu arasındaki ilişki de takip zamanı uzadığında değerlendirilebilecektir. Allojeneik kök hücre nakli yapılan hastalarda nakil sonrası sonuçlar ile PD-1 ve PD-L1 ekspresyon düzeyleri arasındaki ilişki takip zamanı uzadığında değerlendirilebilecektir. PD-1 ve PD-L1'e ek olarak Tim-3/Gal-9, Lag-3, TIGIT gibi diğer

immün kontrol noktası belirteçlerinin de birlikte ekspresyon düzeylerinin saptanması, immün sistem ile hastalık ilişkisini ortaya çıkarabilir. CD4 ve CD8 T Lenfositlere ek olarak regülatör T hücrelerinde de bu belirteçlerin ekspresyonları tespit edilerek immün kaçışta lenfositlerin rolü daha iyi anlaşılabilir.



8. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda akut miyeloid lösemi tanılı hastalarda PD-1 ve PD-L1 ekspresyon düzeylerinin prognoz ile olan ilişkisi aydınlatılmaya çalışılmıştır.

1. İndüksiyon tedavisine yanıt durumuna göre yanıt ve yanıt olarak hastalar iki gruba ayrıldı. İki grup arasında PD-L1 ekspresyon yüzdesi ve şiddeti açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı.
2. İndüksiyon tedavisine yanıt ve yanıt grupları arasında tanı anında kemik iliğindeki CD3+, CD4+ ve CD8+ T lenfositlerde PD-1 ekspresyon düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı. Ancak yanıt hasta grubunda ekspresyon düzeyleri daha yüksekti, hasta sayısının artmasıyla aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı düzeye erişebilir.
3. Tanı anında kemik iliğindeki CD3+ ve CD8+ T lenfositlerdeki PD-1 ekspresyon yüzdesi, periferik kandakilere göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksek saptandı.
4. Hastaların tanı anında alınan periferik kan örneklerindeki CD3+ ve CD8+ T lenfositlerdeki PD-1 ekspresyonu, yaş ve cinsiyete göre eşleştirilmiş sağlıklı gönüllülere göre istatistiksel anlamlı olarak daha yüksekti.
5. Çalışmamız bildiğimiz kadarıyla literatürde ölçülebilir kalıntı hastalık (MRD) ile PD-1/PD-L1 ekspresyon düzeyleri arasındaki ilişkiyi vurgulayan ilk çalışmadır. MRD pozitif hasta grubunda, MRD negatif gruba göre hem PD-1 hem de PD-L1 düzeyleri daha yüksek saptanmıştır ancak hasta sayısının azlığı nedeniyle istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır. Daha geniş çalışmalarda immün kontrol noktası belirteçlerinin yüksek düzeylerde ekspresyonunun MRD pozitifliği ile olan ilişkisi ortaya konulabilir.
6. Akım sitometrik olarak miyeloid progenitörleri HLA-DR pozitif hastalarda tanı anında kemik iliğindeki blastlarda PD-L1 ekspresyon düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha yüksek saptanmıştır.
7. Akım sitometrik olarak miyeloid progenitörleri CD7 pozitif hastalarda tanı anında kemik iliğindeki CD3+ ve CD8+ T lenfositlerde PD-1 ekspresyon düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha yüksek saptanmıştır.
8. CD8+ T lenfositlerde indüksiyon tedavisi sonrasında bakılan PD-1 ekspresyon düzeyleri tedavi olarak 7+3 almayan 3 hastada azalırken, 7+3 tedavisi alan 13 hastada artmıştır ve aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı saptanmıştır. ($p=0.02$)

9. Elde edilen bulgular, AML hastalarında immün kontrol noktası belirteçlerinin potansiyel prognostik önemini desteklemektedir. Bu belirteçler gelecekteki tedavi stratejilerinde hedef olarak değerlendirilebilecektir. Ancak bu alanda daha kapsamlı ve geniş ölçekli çalışmaların yapılması gerekmektedir.



9. KAYNAKLAR

1. Dohner H, Weisdorf DJ, Bloomfield CD. Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. 2015;373(12):1136-52.
2. Kantarjian H, Kadia T, DiNardo C, Daver N, Borthakur G, Jabbour E, et al. Acute myeloid leukemia: current progress and future directions. *Blood Cancer J*. 2021;11(2):41.
3. Zuckerman T, Ganzel C, Tallman MS, Rowe JM. How I treat hematologic emergencies in adults with acute leukemia. *Blood*. 2012;120(10):1993-2002.
4. Juliusson G, Antunovic P, Derolf A, Lehmann S, Mollgard L, Stockelberg D, et al. Age and acute myeloid leukemia: real world data on decision to treat and outcomes from the Swedish Acute Leukemia Registry. *Blood*. 2009;113(18):4179-87.
5. Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Miller D, Brest A, Yu M, Ruhl J, Tatalovich Z, Mariotto A, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA (eds). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2016, National Cancer Institute. Bethesda, MD, https://seer.cancer.gov/csr/1975_2016/, based on November 2018 SEER data submission, posted to the SEER web site, April 2019.
6. Smith M, Barnett M, Bassan R, Gatta G, Tondini C, Kern W. Adult acute myeloid leukaemia. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2004;50(3):197-222.
7. Leone G, Pagano L, Ben-Yehuda D, Voso MT. Therapy-related leukemia and myelodysplasia: susceptibility and incidence. *Haematologica*. 2007;92(10):1389-98.
8. Kayser S, Dohner K, Krauter J, Kohne CH, Horst HA, Held G, et al. The impact of therapy-related acute myeloid leukemia (AML) on outcome in 2853 adult patients with newly diagnosed AML. *Blood*. 2011;117(7):2137-45.
9. Lenz G, Dreyling M, Schiegnitz E, Haferlach T, Hasford J, Unterhalt M, Hiddemann W. Moderate increase of secondary hematologic malignancies after myeloablative radiochemotherapy and autologous stem-cell transplantation in patients with indolent lymphoma: results of a prospective randomized trial of the German Low Grade Lymphoma Study Group. *J Clin Oncol*. 2004;22(24):4926-33.
10. Puumala SE, Ross JA, Olshan AF, Robison LL, Smith FO, Spector LG. Reproductive history, infertility treatment, and the risk of acute leukemia in children with down syndrome: a report from the Children's Oncology Group. *Cancer*. 2007;110(9):2067-74.
11. Rosenberg PS, Alter BP, Ebell W. Cancer risks in Fanconi anemia: findings from the German Fanconi Anemia Registry. *Haematologica*. 2008;93(4):511-7.
12. Lane SW, Gilliland DG. Leukemia stem cells. *Semin Cancer Biol*. 2010;20(2):71-6.
13. Pollyea DA, Jordan CT. Therapeutic targeting of acute myeloid leukemia stem cells. *Blood*. 2017;129(12):1627-35.
14. Steffen B, Müller-Tidow C, Schwäble J, Berdel WE, Serve H. The molecular pathogenesis of acute myeloid leukemia. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2005;56(2):195-221.
15. Dohner H, Wei AH, Appelbaum FR, Craddock C, DiNardo CD, Dombret H, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2022 recommendations from an international expert panel on behalf of the ELN. *Blood*. 2022;140(12):1345-77.
16. Stubbins RJ, Francis A, Kuchenbauer F, Sanford D. Management of Acute Myeloid Leukemia: A Review for General Practitioners in Oncology. *Curr Oncol*. 2022;29(9):6245-59.
17. Avni B, Koren-Michowitz M. Myeloid sarcoma: current approach and therapeutic options. *Ther Adv Hematol*. 2011;2(5):309-16.
18. Hambley BC, Tomuleasa C, Ghiaur G. Coagulopathy in Acute Promyelocytic Leukemia: Can We Go Beyond Supportive Care? *Front Med (Lausanne)*. 2021;8:722614.
19. Bakst RL, Tallman MS, Douer D, Yahalom J. How I treat extramedullary acute myeloid leukemia. *Blood*. 2011;118(14):3785-93.
20. Khoury JD, Solary E, Abla O, Akkari Y, Alaggio R, Apperley JF, et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms. *Leukemia*. 2022;36(7):1703-19.

21. Bennett JM, Catovsky D, Daniel M-T, Flandrin G, Galton DAG, Gralnick HR, Sultan C. Proposals for the Classification of the Acute Leukaemias French-American-British (FAB) Co-operative Group. *British Journal of Haematology*. 1976;33(4):451-8.
22. Ferrara F, Barosi G, Venditti A, Angelucci E, Gobbi M, Pane F, et al. Consensus-based definition of unfit to intensive and non-intensive chemotherapy in acute myeloid leukemia: a project of SIE, SIES and GITMO group on a new tool for therapy decision making. *Leukemia*. 2013;27(5):997-9.
23. Palmieri R, Othus M, Halpern AB, Percival MM, Godwin CD, Becker PS, Walter RB. Accuracy of SIE/SIES/GITMO Consensus Criteria for Unfitness to Predict Early Mortality After Intensive Chemotherapy in Adults With AML or Other High-Grade Myeloid Neoplasm. *J Clin Oncol*. 2020;38(35):4163-74.
24. Shimony S, Stahl M, Stone RM. Acute myeloid leukemia: 2023 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *American Journal of Hematology*. 2023;98(3):502-26.
25. Rai KR, Holland JF, Glidewell OJ, Weinberg V, Brunner K, Obrecht JP, et al. Treatment of acute myelocytic leukemia: a study by cancer and leukemia group B. *Blood*. 1981;58(6):1203-12.
26. Lusk MR, Lee JW, Fernandez HF, Abdel-Wahab O, Bennett JM, Ketterling RP, et al. Benefit of high-dose daunorubicin in AML induction extends across cytogenetic and molecular groups. *Blood*. 2016;127(12):1551-8.
27. Erba HP, Montesinos P, Kim HJ, Patkowska E, Vrhovac R, Žák P, et al. Quizartinib plus chemotherapy in newly diagnosed patients with FLT3-internal-tandem-duplication-positive acute myeloid leukaemia (QuANTUM-First): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet*. 2023;401(10388):1571-83.
28. Kim M, Williams S. Midostaurin in Combination With Standard Chemotherapy for Treatment of Newly Diagnosed FMS-Like Tyrosine Kinase 3 (FLT3) Mutation-Positive Acute Myeloid Leukemia. *Ann Pharmacother*. 2018;52(4):364-9.
29. Thol F. What to use to treat AML: the role of emerging therapies. *Hematology*. 2021;2021(1):16-23.
30. DiNardo CD, Jonas BA, Pullarkat V, Thirman MJ, Garcia JS, Wei AH, et al. Azacitidine and Venetoclax in Previously Untreated Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. 2020;383(7):617-29.
31. Mayer RJ, Davis RB, Schiffer CA, Berg DT, Powell BL, Schulman P, et al. Intensive Postremission Chemotherapy in Adults with Acute Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine*. 1994;331(14):896-903.
32. Koreth J, Schlenk R, Kopecky KJ, Honda S, Sierra J, Djulbegovic BJ, et al. Allogeneic Stem Cell Transplantation for Acute Myeloid Leukemia in First Complete Remission: Systematic Review and Meta-analysis of Prospective Clinical Trials. *JAMA*. 2009;301(22):2349-61.
33. Lafferty KJ, Cunningham AJ. A new analysis of allogeneic interactions. *Aust J Exp Biol Med Sci*. 1975;53(1):27-42.
34. Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH. PD-1 and Its Ligands in Tolerance and Immunity. *Annual Review of Immunology*. 2008;26(1):677-704.
35. Peng S, Bao Y. A narrative review of immune checkpoint mechanisms and current immune checkpoint therapy. *Annals of Blood*. 2021;7.
36. Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J*. 1992;11(11):3887-95.
37. Agata Y, Kawasaki A, Nishimura H, Ishida Y, Tsubata T, Yagita H, Honjo T. Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. *Int Immunol*. 1996;8(5):765-72.
38. Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, et al. Engagement of the Pd-1 Immunoinhibitory Receptor by a Novel B7 Family Member Leads to Negative Regulation of Lymphocyte Activation. *Journal of Experimental Medicine*. 2000;192(7):1027-34.
39. Latchman Y, Wood CR, Chernova T, Chaudhary D, Borde M, Chernova I, et al. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nature Immunology*. 2001;2(3):261-8.

40. Dong H, Zhu G, Tamada K, Chen L. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nature Medicine*. 1999;5(12):1365-9.
41. Francisco LM, Sage PT, Sharpe AH. The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. *Immunological Reviews*. 2010;236(1):219-42.
42. Nishimura H, Nose M, Hiai H, Minato N, Honjo T. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity*. 1999;11(2):141-51.
43. Fife BT, Pauken KE. The role of the PD-1 pathway in autoimmunity and peripheral tolerance. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2011;1217(1):45-59.
44. Blank C, Brown I, Peterson AC, Spiotto M, Iwai Y, Honjo T, Gajewski TF. PD-L1/B7H-1 inhibits the effector phase of tumor rejection by T cell receptor (TCR) transgenic CD8⁺ T cells. *Cancer Res*. 2004;64(3):1140-5.
45. Parry RV, Chemnitz JM, Frauwirth KA, Lanfranco AR, Braunstein I, Kobayashi SV, et al. CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms. *Mol Cell Biol*. 2005;25(21):9543-53.
46. Dong H, Strome SE, Salomao DR, Tamura H, Hirano F, Flies DB, et al. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med*. 2002;8(8):793-800.
47. Tumeh PC, Harview CL, Yearley JH, Shintaku IP, Taylor EJ, Robert L, et al. PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature*. 2014;515(7528):568-71.
48. Ahmadzadeh M, Johnson LA, Heemskerk B, Wunderlich JR, Dudley ME, White DE, Rosenberg SA. Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired. *Blood*. 2009;114(8):1537-44.
49. Sharma P, Allison JP. Immune checkpoint targeting in cancer therapy: toward combination strategies with curative potential. *Cell*. 2015;161(2):205-14.
50. Gong J, Chehraz-Raffle A, Reddi S, Salgia R. Development of PD-1 and PD-L1 inhibitors as a form of cancer immunotherapy: a comprehensive review of registration trials and future considerations. *J Immunother Cancer*. 2018;6(1):8.
51. Huang PW, Chang JW. Immune checkpoint inhibitors win the 2018 Nobel Prize. *Biomed J*. 2019;42(5):299-306.
52. Annibali O, Crescenzi A, Tomarchio V, Pagano A, Bianchi A, Grifoni A, Avvisati G. PD-1 /PD-L1 checkpoint in hematological malignancies. *Leuk Res*. 2018;67:45-55.
53. Zhou Q, Munger ME, Highfill SL, Tolar J, Weigel BJ, Riddle M, et al. Program death-1 signaling and regulatory T cells collaborate to resist the function of adoptively transferred cytotoxic T lymphocytes in advanced acute myeloid leukemia. *Blood*. 2010;116(14):2484-93.
54. Sehgal A, Whiteside TL, Boyiadzis M. Programmed death-1 checkpoint blockade in acute myeloid leukemia. *Expert Opin Biol Ther*. 2015;15(8):1191-203.
55. Zhang L, Gajewski TF, Kline J. PD-1/PD-L1 interactions inhibit antitumor immune responses in a murine acute myeloid leukemia model. *Blood*. 2009;114(8):1545-52.
56. Abdel Hafeez LA MS, Zahran AM, Hamed HB, Abdel Hameed, MR, Bakry RM. Expression of programmed death ligand-1 (PDL-1) in Acute Myeloid Leukemia Patients and its relation to post induction Response. *SECI Oncology*. 2021;2:106-11.
57. Mostafa N, Abdelmohsen E, El-Ghammaz A, Saeed A, Hamza M. Prognostic significance of programmed death ligand 1 expression in adult patients with de-novo acute myeloid leukemia. *The Egyptian Journal of Haematology*. 2018;43:158.
58. Goltz D, Gevensleben H, Grunen S, Dietrich J, Kristiansen G, Landsberg J, Dietrich D. PD-L1 (CD274) promoter methylation predicts survival in patients with acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2017;31(3):738-43.
59. Geduk A, Atesoglu EB, Mehtap O, Demirsoy ET, Menguc MU, Tarkun P, et al. Programmed Cell Death Ligand 1 Expression Level and Prognostic Significance in Acute Myeloid Leukemia. *Indian J Hematol Blood Transfus*. 2022;38(3):464-72.

60. Chen X, Liu S, Wang L, Zhang W, Ji Y, Ma X. Clinical significance of B7-H1 (PD-L1) expression in human acute leukemia. *Cancer Biol Ther.* 2008;7(5):622-7.
61. Brodska B, Otevrelva P, Salek C, Fuchs O, Gasova Z, Kuzelova K. High PD-L1 Expression Predicts for Worse Outcome of Leukemia Patients with Concomitant NPM1 and FLT3 Mutations. *Int J Mol Sci.* 2019;20(11).
62. Zajac M, Zaleska J, Dolnik A, Bullinger L, Giannopoulos K. Expression of CD274 (PD-L1) is associated with unfavourable recurrent mutations in AML. *Br J Haematol.* 2018;183(5):822-5.
63. Sallman DA, McLemore AF, Aldrich AL, Komrokji RS, McGraw KL, Dhawan A, et al. TP53 mutations in myelodysplastic syndromes and secondary AML confer an immunosuppressive phenotype. *Blood.* 2020;136(24):2812-23.
64. Bassiouny N, El-Hoda N, Khalifa IM, Ibrahim S, Salem L, Annaka L. PD1 expression on bone marrow T-cells in newly diagnosed Egyptian AML patients: Correlation with hematological parameters, aberrant antigens expression, and response to induction therapy. *EJHaem.* 2020;1(1):51-7.
65. Jia B, Wang L, Claxton DF, Ehmann WC, Rybka WB, Mineishi S, et al. Bone marrow CD8 T cells express high frequency of PD-1 and exhibit reduced anti-leukemia response in newly diagnosed AML patients. *Blood Cancer J.* 2018;8(3):34.
66. Shafat MS, Gnanaswaran B, Bowles KM, Rushworth SA. The bone marrow microenvironment - Home of the leukemic blasts. *Blood Rev.* 2017;31(5):277-86.
67. Kong Y, Zhang J, Claxton DF, Ehmann WC, Rybka WB, Zhu L, et al. PD-1(hi)TIM-3(+) T cells associate with and predict leukemia relapse in AML patients post allogeneic stem cell transplantation. *Blood Cancer J.* 2015;5(7):e330.
68. Tan J, Chen S, Lu Y, Yao D, Xu L, Zhang Y, et al. Higher PD-1 expression concurrent with exhausted CD8+ T cells in patients with de novo acute myeloid leukemia. *Chin J Cancer Res.* 2017;29(5):463-70.
69. Schnorfeil FM, Lichtenegger FS, Emmerig K, Schlueter M, Neitz JS, Draenert R, et al. T cells are functionally not impaired in AML: increased PD-1 expression is only seen at time of relapse and correlates with a shift towards the memory T cell compartment. *J Hematol Oncol.* 2015;8:93.
70. Daver N, Basu S, Garcia-Manero G, Cortes JE, Ravandi F, Ning J, et al. Defining the Immune Checkpoint Landscape in Patients (pts) with Acute Myeloid Leukemia (AML). *Blood.* 2016;128(22):2900-.
71. Ørskov AD, Treppendahl MB, Skovbo A, Holm MS, Friis LS, Hokland M, Grønbaek K. Hypomethylation and up-regulation of PD-1 in T cells by azacytidine in MDS/AML patients: A rationale for combined targeting of PD-1 and DNA methylation. *Oncotarget.* 2015;6(11):9612-26.
72. Yang H, Bueso-Ramos C, DiNardo C, Estecio MR, Davanlou M, Geng QR, et al. Expression of PD-L1, PD-L2, PD-1 and CTLA4 in myelodysplastic syndromes is enhanced by treatment with hypomethylating agents. *Leukemia.* 2014;28(6):1280-8.
73. Gojo I, Stuart RK, Webster J, Blackford A, Varela JC, Morrow J, et al. Multi-Center Phase 2 Study of Pembrolizumab (Pembro) and Azacitidine (AZA) in Patients with Relapsed/Refractory Acute Myeloid Leukemia (AML) and in Newly Diagnosed (≥65 Years) AML Patients. *Blood.* 2019;134:832.
74. Goswami M, Gui G, Dillon LW, Lindblad KE, Thompson J, Valdez J, et al. Pembrolizumab and decitabine for refractory or relapsed acute myeloid leukemia. *J Immunother Cancer.* 2022;10(1).
75. Verecque R, Saudemont A, Quesnel B. Cytosine arabinoside induces costimulatory molecule expression in acute myeloid leukemia cells. *Leukemia.* 2004;18(7):1223-30.
76. Ravandi F, Assi R, Daver N, Benton CB, Kadia T, Thompson PA, et al. Idarubicin, cytarabine, and nivolumab in patients with newly diagnosed acute myeloid leukaemia or high-risk myelodysplastic syndrome: a single-arm, phase 2 study. *Lancet Haematol.* 2019;6(9):e480-e8.
77. Zeidner JF, Vincent BG, Ivanova A, Moore D, McKinnon KP, Wilkinson AD, et al. Phase II Trial of Pembrolizumab after High-Dose Cytarabine in Relapsed/Refractory Acute Myeloid Leukemia. *Blood Cancer Discovery.* 2021;2(6):616-29.