

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GÖZ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**RETİNOBLASTOMDA T REGULATUAR HÜCRE
İNFİLTRASYONUNUN KLİNİK VE HİSTOPATOLOJİK
BULGULAR ÜZERİNE ETKİLERİ**

Dr. Berçin TARLAN

UZMANLIK TEZİ OLARAK HAZIRLANMIŞTIR.

ANKARA

2012

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GÖZ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**RETİNOBLASTOMDA T REGULATUAR HÜCRE
İNFİLTRASYONUNUN KLİNİK VE HİSTOPATOLOJİK
BULGULAR ÜZERİNE ETKİLERİ**

Dr. Berçin TARLAN

UZMANLIK TEZİ OLARAK HAZIRLANMIŞTIR.

**TEZ DANIŞMANLARI
Prof. Dr. Hayyam KIRATLI
Prof. Dr. Figen SÖYLEMEZOĞLU**

**ANKARA
2012**

TEŞEKKÜR

Yazar, bu çalıőmanın gerçekleőmesinde katkılarından dolayı, aőađıda adı geçen kiői ve kurumlara teşekkür eder.

Sayın Prof. Dr. Hayyam Kıratlı, tez çalıőmasının gerçekleőmesi için gerekli ortamı sađlamıőtır.

Sayın Prof. Dr. Figen Söylemezoğlu, tez çalıőmasının patoloji ile ilgili bölümlerinin gerçekleőmesi için gerekli ortamı sađlamıőtır.

Sayın Dr. Jale Karakaya, çalıőmanın istatistiksel analizini gerekleőtirmiőtır.

Türk Oftalmoloji Derneđi alıőma için maddi destek sađlamıőtır.

Dr. Berçin TARLAN

ÖZET

Tarlan B., Retinoblastomda T Regulator hücre infiltrasyonunun klinik ve histopatolojik bulgular üzerine etkileri. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Göz Hastalıkları Tezi, Ankara, 2012. Tümör immün kaçış mekanizmalarında T regulator hücreler önemli bir role sahiptir ancak retinoblastomda, tümör mikroçevresinde T regulator hücre varlığını inceleyen bir çalışma yapılmamıştır. Bu çalışmada tümör mikroçevresinde T regulator hücre infiltrasyonunun klinik ve histopatolojik bulgular ile ilişkisini değerlendirmek amaçlanmıştır. 62 hastaya ait 64 olgu değerlendirmeye alınmıştır. Hastalar tanı yaşı, operasyon yaşı, cinsiyet, lateralite, preoperatif tedavi alıp almama durumu, metastaz mevcudiyeti gibi demografik ve klinik özellikler açısından değerlendirilmiştir. Histopatolojik değerlendirme, tümörün diferansiyasyon durumunu, en geniş tümör çapımı, semikantitatif nekroz oranını patolojik olarak yüksek risk faktörü mevcudiyetini, immunohistokimyasal boyama ile CD3, CD4, CD25, FOXP3 eksprese eden hücreleri incelemeyi kapsamaktadır. Değerlendirme sonucunda patolojik olarak yüksek risk faktörü bulunan grupta CD3 ($p=0.02$) ve FOXP3 ($p=0.022$) ekspresyonu anlamlı olarak artmış bulunmuştur. Aynı anlamlı ilişki T regulator hücre infiltrasyonu ile patolojik yüksek risk faktörü bulunan grup arasında izlenmiştir ($p=0.041$). İmmün mekanizmalarda başarısızlık kanser gelişimi ve ya mevcut kanserin yayılımı ile sonuçlanabilir. Retinoblastom immün sistemden kaçış için bir çok basamak kullanılabilir ve T regulator hücreler aracılığı ile immün baskılama bu mekanizmalardan biri olabilir.

Anahtar Kelimeler: Retinoblastom, T Regulator Hücre, FOXP3, Tümör, İmmünoloji

ABSTRACT

Tarlan B., Effects of T regulatory cell infiltration on clinical and histopathological findings in retinoblastoma. Hacettepe University Faculty of Medicine, Thesis in Ophthalmology, Ankara, 2012. The role of T regulatory cells in immune escape mechanisms of tumor appears to be important, but the presence of T regulatory cells in tumor microenvironment in retinoblastoma has not been evaluated. In this study the aim is to evaluate the relationship between T regulatory cell infiltration of the tumor and clinical, histopathological findings in retinoblastoma. A retrospective analysis of the medical records of 64 eyes of 62 patients who underwent enucleation for retinoblastoma and histopathologic review of all specimens were performed. Demographic and clinical information included age at time of presentation and operation, gender, laterality and metastasis. Histologic examination included differentiation of the tumor, size of the tumor, presence of necrosis, presence of high risk pathologic factors and presence of CD3, CD4, CD25, FOXP3 expressing cells. Increased expression of CD3 ($p=0.02$) and FOXP3 ($p=0.022$) was noted for the tumors with high risk pathologic factors. The same relationship was observed between T regulatory cells and the tumor with high risk pathologic factors ($p=0.041$). Interactions between the immune system and tumor cells play an important role in tumorigenesis. Retinoblastoma use multiple mechanism to escape from immunity and this study shows that immunosuppression via T regulatory cells may be one of this mechanism.

Key Words: Retinoblastoma, Regulatory T cell, FOXP3, tumor, immunoloji

İÇİNDEKİLER

Sayfa No:

TEŞEKKÜR.....	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	iv
İÇİNDEKİLER	v
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
TABLolar DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. RETİNOBLASTOM	3
2.2. TÜMÖR İMMÜNOLOJİSİ.....	6
2.2.1. TÜMÖRE ETKİ EDEN EFEKTÖR MEKANİZMALAR.....	6
2.2.2. TÜMÖR ANTİJENLERİ.....	7
2.2.3. İMMÜN KAÇIŞ MEKANİZMALARI	7
2.3. OKÜLER İMMÜNOLOJİ VE T REGULATUAR HÜCRE	11
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	13
3.1. DEMOGRAFİK VE KLİNİK ÖZELLİKLER.....	13
3.2. HİSTOPATOLOJİK DEĞERLENDİRME.....	13
3.2.1. HEMATOKSİLEN-EOZİN BOYAMA.....	13
3.2.2. İMMÜNOHİSTOKİMYASAL BOYAMA.....	19
4. BULGULAR.....	26
5. TARTIŞMA	35
6. SONUÇLAR.....	39
7. KAYNAKLAR	40

SİMGELER VE KISALTMALAR

CD	: Cluster of Differentiation
CD95L	: CD95 ligandı
H-E	: Hematoksilen-eozin boyama
HLA	: Human Leukocyte Antigen
IL-10	: İnterlökin-10
iTreg	: inducible T regulatuar
NK	: Natural Killer
nTreg	: natural T regulatuar
pRb	: Retinoblastom nükleer fosfoproteini
Rb1	: Retinoblastom Geni
RCAS1	: Receptor-binding cancer antigen expressed on SiSo
TGF- β	: Transforming Growth Factor- β
Th1	: T helper 1
Th2	: T helper 2
Treg	: T regulatuar
VEGF	: Vascular Endothelial Growth Factor
FOXP3	: Forkheadboxprotein 3

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No:

- Şekil 1.** H-E boyama, 20x büyütme, tümör dokusunda rozet formasyonu.....14
- Şekil 2.** CD4 immünohistokimya boyama, 40x büyütme, tümör dokusunda rozet formasyonu15
- Şekil 3.** H-E boyama, 10x büyütme, tümör dokusunda nekroz alanları.....15
- Şekil-4.** H-E boyama, 10x büyütme, koroidea invazyonu.16
- Şekil 5.** H-E boyama, 40x büyütme, koroidea invazyonu.17
- Şekil 6.** H-E boyama, 4x büyütme, lamina cribrosa (optik sinir) invazyonu.17
- Şekil 7.** H-E boyama, 4x büyütme, siliyer cisim ve ön kamara invazyonu.18
- Şekil 8.** H-E boyama, 4x büyütme, siliyer cisim ve ön kamara invazyonu.18
- Şekil 9.** CD4 immünohistokimya boyama, 4x büyütme, siliyer cisim ve ön kamara invazyonu.19
- Şekil 10.** CD3 immünohistokimya boyama, 40x büyütme, pozitif boyanma.21
- Şekil 11.** CD3 immünohistokimya boyama, 40x büyütme, pozitif boyanma.21

- Şekil 12.** CD4 immünohistokimya boyama, 40x büyütme, pozitif boyanma.22
- Şekil 13.** CD4 immünohistokimya boyama, 40x büyütme, pozitif boyanma.22
- Şekil 14.** CD25 immünohistokimya boyama, 40x büyütme, pozitif boyanma.23
- Şekil 15.** CD25 immünohistokimya boyama, 40x büyütme, pozitif boyanma.23
- Şekil 16.** FOXP3 immünohistokimya boyama, 40x büyütme, pozitif boyanma.24

TABLolar DİZİNİ

Sayfa No:

Tablo 1.	Yüksek risk faktörü olan ve olmayan grupta ortalama tanı ve operasyon yaşı (ay)27
Tablo 2.	Koroidea invazyonu olan ve olmayan grupta ortalama tanı ve operasyon yaşı (ay).27
Tablo 3.	Yüksek risk faktörü mevcudiyeti ile demografik ve klinik özelliklerin karşılaştırılması.28
Tablo 4.	Yüksek risk faktörü mevcudiyeti ile histopatolojik özelliklerin karşılaştırılması.28
Tablo 5.	Pozitif boyanma durumu ile yüksek risk faktörü mevcudiyetinin karşılaştırılması.29
Tablo 6.	Pozitif boyanma durumu ile koroidea ve invazyonu mevcudiyetinin karşılaştırılması30
Tablo 7.	Pozitif boyanma durumu ile ön kamara invazyonu mevcudiyetinin karşılaştırılması.31
Tablo 8.	Pozitif boyanma durumu ile en geniş tümör çapının karşılaştırılması.32
Tablo 9.	Pozitif boyanma durumu ile diferansiyasyon durumu karşılaştırılması.32

- Tablo 10.** T regulatuar hücre varlığı ve risk faktörü, en geniş tümör çapı, koroidea invazyonu, preoperatif tedavi durumunun karşılaştırılması.33
- Tablo 11.** T regulatuar hücrelerde CD25 pozitif boyanma durumu, yüksek risk faktörü mevcudiyeti ve preoperatif tedavi alma durumu ile karşılaştırılması.34

1. GİRİŞ

Retinoblastom çocukluk çağının en sık görülen birincil göziçi kanser türüdür ve olguların %95 i 5 yaşından önce, % 10 u bir yaşından önce tanı almaktadır. Son yıllarda enükleasyonun yanı sıra sistemik kemoterapi, radyoaktif plak tedavisi, dışsal ışın tedavisi, transpupiller termoterapi, kriyoterapi, süperselektif oftalmik intraarteryel arter kemoterapisi gibi glob koruyucu tedavilerin ön plana çıkmasıyla beş yıllık sağ kalım oranları %90 ın üzerinde izlenmektedir (1). Unilateral olgularda metastaz bulgusu ve görme beklentisi yoksa enükleasyon standart tedavi seçeneğidir (2). Patolojik değerlendirme sonrası ön kamara, iris, siliyer cisim, koroidea, sklera, optik sinir, cerrahi sınır invazyonu gibi literatürde tanımlanan patolojik yüksek risk faktörlerinin varlığında hastanın göz dışı relaps açısından risk altında olduğu kabul edilmekte ve adjuvan sistemik kemoterapi önerilmektedir (3).

Tümör hücreleri immün sistemden kaçabilmek için bir çok yol kullanır ve bu yollar aracılığıyla hem lokal hem sistemik yayılım gösterirler. T regülatuar (Treg) hücre aracılığıyla immün baskılama bu yollardan birisidir ve günümüze kadar bir çok solid kanser türünde bu hücre grubunun rolü üzerine çalışmalar yapılmıştır (4). Bu çalışmalarda T regülatuar hücre popülasyonu hem tümör mikroçevresinde hem de mikroçevrenin yansıması olarak kabul edilen periferik kanda gösterilmiştir.

Literatürde göz içi tümörlerde T regülatuar hücre infiltrasyonuna dair bir çalışma mevcuttur ve uveal melanomda T regülatuar hücre infiltrasyonu değerlendirilmiştir (5).

Bizim çalışmamızda retinoblastomda tümör mikroçevresinde lenfosit ve T regülatuar hücre varlığı araştırılarak, tanı yaşı, operasyon yaşı, cinsiyet, lateralite, preop tedavi alıp almamama, metastaz mevcudiyeti gibi demografik ve klinik

özelliklerle, tümör diferansiyasyonu, semikantitatif nekroz oranı, en geniş tümör çapı, patolojik yüksek risk faktörleri gibi histopatolojik özelliklerle ilişkisini değerlendirmek amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. RETİNOBLASTOM

Retinoblastom, çocukluk çağında en sık görülen kötü huylu göz içi tümördür ve yıllık insidansı dünya genelinde 1/16000-1/18000 canlı doğum arasında değişmektedir (6). Tüm pediatrik malignitelerin %4 ünü oluşturduğu bilinmektedir (7). Her yıl Amerika Birleşik Devletleri'nde yaklaşık 300, Hindistan ve Çin'de yaklaşık 1000 yeni retinoblastom vakası bildirilmektedir (8). Yaş, cinsiyet ya da lateralite gibi özelliklerin insidans açısından farklılık göstermediği genel olarak kabul gören bir görüş olmasına rağmen, son yıllarda Amerika Birleşik Devletleri'nde Latin ırkta daha yüksek insidanda görüldüğüne dair çalışmalar mevcuttur (9).

Hastaların %90 ı 5 yaşından önce, %10 u 10 yaşından önce tanı almaktadır (10). En sık başvuru şikayetleri sırasıyla lökokori, şaşılık, görme kaybı ve aile hikayesidir (11).

Retinoblastom sporadik ya da ailesel, unilateral ya da bilateral, kalıtsal ya da kalıtsal olmayan, somatik ya da germinal retinoblastom olmak üzere dört farklı şekilde sınıflanabilir (8).

Retinoblastom, kanser patogeneğinde genetik etiolojinin incelenmesi bakımından prototip modellerden biridir. Bilateral olgularda unilateral olgulara göre tümör daha erken yaşta ve daha çok sayıda odak halinde görülmektedir. Knudson ve ark. (12) 1971 yılında bilateral ve unilateral retinoblastom olgularında tümör gelişimi arasındaki bu farka dayanarak, Mendelian genetik prensipleri çerçevesinde "çift vuruş" hipotezini geliştirmiştir. Knudson'a göre retinoblastomun herediter geçen formunda bir mutasyon germ hücrelerle aktarılırken, ikinci mutasyon somatik hücrelerde gerçekleşmektedir.

Retinoblastom geni (RB1) ilk tanımlanan tümör baskılayıcı gendir ve 13. kromozomda yerleşmektedir (13). Retinoblastom geni, 110 kD luk 98 aminoasitten oluşan nükleer bir fosfoprotein (pRb) kodlar ve bu protein hücre döngüsünde G1den S1 e geçişte düzenleyici rol oynar. Fosfoprotein pRb E2F ailesinden transkripsiyon faktörlerine bağlanır ve hücrenin S fazına geçmesini engeller. Bu proteinin normal fonksiyonunu yitirmesi için retinoblastom geninin her iki allelinde mutasyon olması gerekir (çift vuruş hipotezi) ve bunun sonucu hücrelerde kontrolsüz çoğalma görülür.

Olguların % 60 ı somatik retinoblastom, %40 ı germinal retinoblastom olarak sınıflandırılmaktadır. Somatik olgularda, bir retinal öncü hücrede retinoblastom geninin her iki allelinde mutasyon görülür. Bu olgular her zaman tek taraflı ve tek odak halinde izlenmektedir. Germinal retinoblastom olgularında, vücuttaki tüm hücrelerde retinoblastom geninin bir allelinde germinal mutasyon görülür, ve retinadaki öncü hücrelerde ikinci allelin somatik mutasyonu sonucu tümör gelişmektedir. Bilateral olguların tümünün germinal mutasyon taşıdığı kabul edilmektedir. Unilateral olgularda ise %7-15 oranında germinal mutasyon görülmektedir (14).

Tümör klasik olarak gri-beyaz renkte nodüler retinal kitle şeklinde görülmektedir. Makroskopik olarak büyüme şekline göre endofitik, ekzofitik, miks ve nekrotik retinoblastom olarak sınıflandırılır. Mikroskopik olarak küçük, yuvarlak ve mavi hücrelerden oluşur. Tümör hücreleri damar etrafında yerleşir ama büyüme hızlı olduğu için nekroz ve kalsifikasyon sıktır. Histopatolojik olarak diferansiye ve indiferansiye olarak sınıflandırılabilir. Hücrelerin farklılaşma evrelerine göre Flexner-Wintersteiner, Homer Wright veya çiçek demeti tarzı rozet yapılanmaları (flöret) görülebilir. İndiferansiye tümörler dar sitoplazmalı ve büyük hiperkromatik çekirdekli hücrelerden oluşur. Diferansiye tümörler ise rozetlerin varlığı ile karakterizedir. Flexner-Wintersteiner rozetleri retinoblastom için karakteristik olup, boş bir lümen etrafına dizilmiş hücrelerden oluşur (15). Homer-Wright rozetlerinde ise santral lümeni nöral fibrillerden oluşan ağısı bir yapı doldurur, hücreler radyal olarak lümenin etrafında dizilmiştir.

Erişkinlerde en sık görülen kötü huylu göz içi tümör olan uveal melanomun aksine retinoblastomda hala üzerinde görüş birliğine varılmış patolojik yüksek risk faktörleri ve prognostik kriterler mevcut değildir. Bu probleme yönelik olarak 2009 yılında "Uluslararası Retinoblastom Evreleme Çalışma Grubu" bazı yüksek risk faktörleri tanımlamışlardır (16). Koroidea ve optik sinir invazyonu bu grup tarafından tanımlanan faktörlerden ikisidir.

Göz dışına yayılım en sık optik sinir ya da perinöral serebrospinal sıvı yoluyla intrakraniyal invazyon şeklinde olmaktadır. Bu direkt yayılım ya da metastaz dışında herediter retinoblastom olguları pinealoblastom veya diğer nöroblastik tümörler gibi intrakraniyal maligniteler açısından yüksek risk altındadır (17). Bilateral retinoblastom ve pinealoblastom birlikteliği "trilateral retinoblastom" olarak adlandırılmaktadır ve herediter olguların %10 unda görülmektedir (18).

Klinik, hastalığın evresine göre değişmektedir (19). Evrelemede günümüze dek bir çok sınıflama kullanılmış olup, son yıllarda en yaygın kullanılan "Uluslararası Retinoblastom Sınıflaması" kabul görmektedir (20). Tedaviye her olguda hastalığın evresi, lateralite, beklenen görme prognozu, metastaz mevcudiyeti ve sistemik duruma göre karar verilir. Günümüzde retinoblastom tedavisinde sistemik kemoterapi, subkonjonktival karboplatin enjeksiyonu, selektif oftalmik arteriyel kemoterapi, termoterapi, kriyoterapi, plak radyoterapi, dışsal ışın tedavisi ve enükleasyon gibi tedavi seçenekleri mevcuttur (21-23). Uluslararası retinoblastom sınıflaması esas alınarak yapılan bir çalışmada kemoterapi başarısı grup A tümörlerde %100, grup B tümörlerde %93, grup C tümörlerde %90, grup D tümörlerde %47 olarak bulunmuştur (24). Günümüzde retinoblastom olgularının yaklaşık %30'una tanı anında enükleasyon endikasyonu koyulmaktadır. Metastaz bulgusu ve görme beklentisi olmayan unilateral olgularda, günümüzde önerilmekte olan süperselektif oftalmik intraarteriyel kemoterapi bir tedavi seçeneği olmakla birlikte standart yaklaşım enükleasyondur (2). Bu olgularda enükleasyon gerekliliği yaklaşık %75 oranında görülür (23). Enükleasyon sonrası tanımlanmış yüksek risk faktörlerinin mevcudiyetine bağlı olarak adjuvan kemoterapi bazı merkezlerce

önerilmektedir ancak bu konu halen tartışmalıdır. Bu yüksek risk faktörleri ön kamara, iris, siliyer cisim, koroidea, sklera, optik sinir invazyonu ve göz dışı yayılımdır (3,25). Bu faktörlerin mevcut olduğu hastalarda enükleasyon sonrası mikroskopik düzeyde rezidüel tümör kaldığı, bunun göz dışı relapsa neden olduğu düşünülmektedir.

Bilateral retinoblastom olgularında sistemik kemoterapiye ek olarak termoterapi, kriyoterapi gibi lokal tedaviler gerekmektedir ve yaklaşık olarak vakaların % 60 ında bir gözde ileri hastalık nedeniyle tüm tedavi seçeneklerine rağmen enükleasyon ihtiyacı doğmaktadır (26-28).

2.2. TÜMÖR İMMÜNOLOJİSİ

İmmün sistem organizmaya zarar veren patojenleri tespit eden ve ortadan kaldıran savunma sistemidir. Doğal ve kazanılmış immünite olarak iki ayrı kısımda incelenir (29,30). Tümör immünolojisi ise tümöre etki eden humoral ve hücrel immün mekanizmalar, tümör antijenleri, ve immün sistemden kaçış mekanizmaları olmak üzere üç ayrı başlık altında toplanabilir.

2.2.1. TÜMÖRE ETKİ EDEN EFEKTÖR MEKANİZMALAR

Tümörle savaşta anahtar rolü kazanılmış immünitinin bir parçası olan T hücreler oynar. T hücre reseptörü yoluyla tümör hücrelerini tanıyan hücre yüzey moleküllerinden (cluster of differentiation-CD) CD8 taşıyan T hücreler artık sitotoksik T hücre adını alırlar ve tümör hücrelerini öldürebilirler. CD4⁺ T hücrelerin alt grubu olan yardımcı T hücreler tip 1 (Th1), CD8⁺ T hücreleri aktive ederler. CD4⁺ T hücrelerin başka bir alt grubu olan yardımcı T hücreler tip 2 (Th2) ise humoral immün sistem için gerekli ortamı sağlanmasından ve Th1 aktivasyonundan

sorumludurlar. Aynı zamanda CD4⁺ T hücreler de bazı durumlarda sitotoksik görev üstlenebilirler (4).

2.2.2. TÜMÖR ANTİJENLERİ

Vücutta tümörle savaşan T hücreler tarafından tanınan bir çok tümör antijeni tanımlanmıştır. Karsinogenezin basamaklarında, normal hücrel genlerin mutasyonu ya da translokasyonu tümör hücresi tarafından antijen ekspresyonuna neden olur ve bunlara tümör antijeni denir (31-33). Sadece tümör hücreleri tarafından değil, aynı zamanda vücuttaki diğer hücreler tarafından da eksprese edilen antijenlere ise tümör ilişkili antijenler denir.

Tümöre karşı immün cevapta iki farklı model tanımlanmıştır: immün takip ve tehlike modeli. İmmün takip modeline göre immün sistem antijen eksprese eden hücreyi kendinden olmayan olarak tanımlar ve asıl görevi vücudu bu hücreler açısından taramak, yok etmektir (34). Tehlike modeline göre immün sistem tehlikeyi saptamak için özelleşmiş antijen sunan hücreleri kullanır. Bu antijen sunan hücreler T hücreleri uyarırlar. Tehlike modeli tümör hücrelerinin immün sistem tarafından tehlikeli kabul edilmediğini, bu nedenle T hücre cevabının başlamadığını savunur (35).

2.2.3. İMMÜN KAÇIŞ MEKANİZMALARI

Tüm savunma mekanizmalarına rağmen tümör hücreleri immün sistemden kaçabilir ve bunu bir çok yolla başarırlar. Görmezden gelme, hasarlı antijen sunumu, immün baskılayıcı faktörlerin salınımı, tolerans indüksiyonu, apoptozise direnç ve karşı saldırı tümörün immün sistemle savaştığı mekanizmalardır.

İmmünolojik olarak ayrıcalıklı bölgelerde gelişen tümörler, adezyon moleküllerinin ekspresyonunun azaldığı tümör hücreleri, lenf nodlarına ulaşmayan tümör hücreleri immün sistem tarafından görmezden gelinebilir (36-41). Genel olarak antijen sunumunda defekt primer tümörden daha çok metastatik lezyonda görülür. Hücre yüzey antijenleri (Human leukocyte antigen-HLA) grup 1 ekspresyonunun azalmasıyla tümör hücresi immün sistemden kaçabilir (42,43). Ancak bu ekspresyonun azalması tümörü doğal öldürücü hücreler (Natural killer-NK) için direk hedef haline getirir, hücrenin NK hücre aracılı lizisten korunmak için yeni mekanizmalara ihtiyacı vardır (44,45).

İmmün sistemden kaçış için bir başka mekanizma ise tümör hücreleri ya da tümör mikroçevresindeki immün, epitelial, stromal hücreler tarafından sitokinler, prostaglandinler ve çeşitli membran proteinleri gibi immün baskılayıcı faktörlerin salınımıdır. Transforming growth faktör β (TGF- β) bu faktörlerden en çok bilinenidir. Diğerleri arasında vascular endothelial growth factor (VEGF), interlökin 10 (IL-10), çözünebilir gangliozidler, receptor-binding cancer antigen expressed on SiSo (RCAS1) sayılabilir (46-54).

Vücuttaki normal hücreler tarafından eksprese edilen tümör ilişkili antijenlere karşı T hücre cevabının oluşmaması toleransın indüksiyonu ile açıklanabilir (55,56). Santral tolerans; kendine karşı reaktif T hücrelerinin timusta yok edilmesidir. Periferik tolerans ise santral toleranstan kaçan reaktif T hücrelerinin sebep olduğu otoimmüniteyi önlemekten sorumludur (57,58). Periferik tolerans dört yolla uyarılır. Bunlardan ilki anerji indüksiyonudur. T hücrenin aktive olması için T hücre reseptörüne HLA-peptid kompleksinin bağlanması ve B7 gibi yardımcı uyarıcı moleküllerin T hücre yüzeyindeki CD28 gibi ligandlara bağlanması gerekir. Tümör hücrelerinde olduğu gibi yardımcı uyarıcı moleküller eksprese edilmezse T hücre anerjik hale gelir ve aktive olmaz(59,60). Periferik toleranstan sorumlu ikinci mekanizma ise immün sapmadır. İmmün cevap, sitotoksik T hücreleri tarafından Th-1 hücrelerden Th-2 hücrelere kaydırılır. Bir diğer mekanizma tümör hücreleri regülatuar T hücrelerinin gelişimini uyarmasıdır (61). (Bu konu altta ayrıntılı olarak

anlatılmıştır). Periferik toleranstan sorumlu son mekanizma ise T hücre delesyonudur. "Aktivasyonun indüklediği hücre ölümü" adı verilen bir mekanizma ile antijen ile sürekli uyarılma tümör hücresi ile savaşıyan T hücrelerde apoptozisi indükler (62-65).

Tümör hücrelerinin immün sistemle savaşında son iki mekanizma apoptozisle ilgilidir. Tümör hücresi apoptozisi başlatacak pro-apoptotik moleküllerin ekspresyonunu azaltır, anti-apoptotik moleküllerin ekspresyonunu artırır (4).

Son mekanizmada tümör hücreleri, tümörü infiltre eden lenfositleri öldürebilir, bu "tümör karşı saldırısı" olarak adlandırılır (66-68). CD95 ligandı (CD95L) göz ve testis gibi immünolojik olarak ayrıcalıklı bölgelerde eksprese edilir ve CD95-CD95L birlikteliği immünolojik olarak korunmanın devamı için gereklidir (69-71). Stuart ve ark. (71) yaptıkları çalışmada, fare modelinde CD95L ekspresyonu gösteren kornea allograftlarının %45 oranında kabul edildiğini, fonksiyonu göstermeyen mutasyonlu CD95L ekspresyonu gösteren fareden alınan korneaların reddedildiğini göstermişlerdir. Tümör hücrelerinin CD95L ekspresyonu ile T lenfositlerden kaçtığına dair görüşler olsa da, bu mekanizma ile ilgili basamaklar halen tam olarak aydınlatılamamıştır.

2.2.3.1. T REGULATUAR HÜCRELER

İmmün sistem hem yabancı patojenleri tanıyıp cevap verme kapasitesinde olmalı, hem de kendinden olanı tanıyıp cevap vermemelidir. İmmün sisteminin vücudun kendi hücrelerine reaksiyon göstermesi haline self-reaktivite denir (72). Santralde self-reaktif hücre klonları timusta yok edilirken, periferde santral toleranstan kaçmayı başaran bu klonlar periferik tolerans aracılığıyla yok edilir. Bu kontrol mekanizmasında CD4⁺ CD25⁺ T regulatuar hücreler önemli rol oynar (72,73). İlk defa 1995 yılında farede T regulatuar hücrelerin interlökin 2 reseptörü (CD25) eksprese ettiği gösterildikten sonra, 2001 yılında birden çok araştırmacı

tarafından insanda CD4⁺ CD25⁺ T regulatuar hücreler gösterilmiştir (74-77). Günümüzde CD4⁺ T regulatuar hücrelerin sınıflaması ve alt grupları üzerine bir çok çalışma mevcuttur ancak tanımlanabilmiş iki major alt grup vardır: "Doğal T Regulatuar Hücreler" (natural T regulatory cells- nTreg hücreler) ve "Uyarılabilen T Regulatuar Hücreler" (inducible T regulatory cells- iTreg hücreler). Tüm CD4⁺ T hücre popülasyonunun %10 unu teşkil eden nTreg hücreler timustan köken alır, yüksek oranda CD4 CD25 ve forkheadboxprotein 3 (FOXP3) adı verilen bir transkripsiyon faktörü eksprese ederler (78). FOXP3 ilk defa 2003 yılında farede tanımlanmıştır, daha sonra hem insan hem farede Treg hücreler için önemli bir belirteç olduğu gösterilmiştir (79-81). Transkripsiyon faktörü FOXP3 47 kDa ağırlığında, DNA bağlanması için önemli transkripsiyon faktörlerini içeren forkhead/wingedhelix ailesinin üyesidir ve nukleusta bulunur (82). Doğal T regulatuar hücreler self-antijenlere yüksek bağlanma gösterirler ve fonksiyonlarının sitokinlerden bağımsız olduğu kabul edilmektedir (83). Uyarılabilen T regulatuar hücreler timustan sadece CD4 eksprese ederek ayrılırlar ve CD25, FOXP3 eksprese eden hücelere yeterli antijenik uyarı sonucunda, çeşitli sitokinlerin etkisiyle (TGF- β , IL-10, IL-4) farklılaşırlar (84).

T regulatuar hücreler hem timus hem periferde bulunurlar. Timik Treg hücrelerde CD25 ekspresyonu daha çok görülürken, periferde CD25⁻ Treg hücreler görülebilir.

T regulatuar hücre aracılı immün baskılamda TGF- β ve IL-10 olmak üzere başlıca iki inhibitör sitokin rol alır. Treg hücrelerin bağlı ve serbest formda TGF- β 1 salgıladıkları da bilinmektedir. Treg hücrelerin yüzeylerinde B7 eksprese ederek, efektör T hücreler üzerindeki CTLA-4 e bağlanma yoluyla hücre hücre teması düzeyinde inhibisyona yol açtıkları gösterilmiştir (85).

Sağlıklı insanda Treg hücrelerin görevi self-reaktiviteyi baskılayarak otoimmün hastalıkları önlemekten sorumludur (86). Treg hücreler bir çok direk ve indirek mekanizma ile immün yanıtı baskırlar(87). Biyolojilerinin anlaşılması için

bir çok çalışma yapılmıştır ve halen devam etmektedir. İmmün baskılamada rollerinin tam olarak aydınlatılması otoimmün hastalıkların önlenmesi, transplantasyon reddinin önüne geçilmesi, tümör biyolojisinde metastaz basamaklarına yönelik tedavilerin geliştirilmesi açısından önemlidir.

Graft versus host hastalığı günümüzde allojenik kemik iliği transplantasyonu ve lenfosit infüzyonlarının başlıca mortalite ve morbidite sebeplerinden biridir (88). Yapılan çalışmalarda yüksek oranda Treg hücre içeren periferik kan kök hücre nakli yapılan hastalara graft versus host hastalığı için düşük kümülatif insidans bildirilmiştir (89-92).

Tümör biyolojisinde Treg hücreler immün cevabı baskılayan ve immün toleransı uyaran düzenleyici elemanlar olarak yer almaktadırlar. Kanser patogeneğinde Treg hücrelerin rolü üzerine bir çok çalışma solid maligniteler üzerine yapılmıştır. Kanser hastalarında Treg hücre fonksiyonunun inhibisyonunu amaçlayan tedavi modaliteleri üzerine çalışmalar mevcuttur (86).

Treg hücreler tümör dokusunda ve tümör mikroçevresinde bir çok yolla gösterilebilirler. İmmünohistokimyasal yöntemler ve akım sitometrisi ile CD25 ve FOXP3 eksprese eden hücreler tanımlanarak, Treg hücre sayısı belirlenebilir (93-95).

2.3. OKÜLER İMMÜNOLOJİ VE T REGULATUAR HÜCRE

Treg hücreler gözde inflamasyonun baskılanmasına önemli rol oynarlar ve baskılanma gözü immünolojik olarak ayrıcalıklı bölgelerden biri yapar.

Medawar ve ark. (96,97) 1945 yılında ilk defa immünojik ayrıcalık kavramını ortaya atmışlardır ve zaman içerisinde en çok çalışılan immünolojik ayrıcalık modellerinden birisi göz olmuştur. Ön kamara ile ilgili immün sapma terimi ise (ACAID) ilk defa 1981 yılında kullanılmıştır.(98,99) Gözde antijenlere karşı immün cevapta Th-1 ve Th-2 hücreleri baskılayan Treg hücre aracılı mekanizmaların rol oynadığı gösterilmiştir (100,101). İmmünolojik ayrıcalık modeli gözde iki ayrı

modeli sergileyen bir sistemdir, bir yandan oküler mikroçevreyi işgal eden mikroorganizmaya karşı yeterli cevap verilmeye çalışılırken diğer yandan bu cevabın konağa zarar vermemesine çalışılmaktadır (102,103).

ACAID modelinde, ön kamaraya verilen bir antijene cevapta iki tip Treg hücre rol oynar; aferent CD⁴ Treg hücreler ve efektör CD8⁺ Treg hücreler (104). Aynı Treg hücre cevabı periferde de başlar. Pigment epiteli gibi gözde bulunan stromal hücreler TGF- β , B7 ekspresyonu yoluyla Treg hücre aktivasyonunu uyarabilirler (4).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları Anabilim Dalı Oküler Onkoloji Birimi'nde retinoblastom tanısıyla izlenen ve 1999 ile 2012 yılları arasında takiplerinin herhangi bir evresinde enükleasyon yapılan, bu tanının histopatolojik olarak doğrulandığı 62 olguya ait 64 patoloji örneği bu tez çalışması kapsamında kullanılmıştır. Hastaların demografik bulguları, ve klinik bulguları Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastaneleri bilgisayar kayıt sistemi ve hasta dosyalarından elde edilmiştir.

Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Değerlendirme Komisyonu'ndan 03.05.2012 tarihli LUT 12/03 kayıt numaralı etik kurul izni alınmıştır.

3.1. DEMOGRAFİK VE KLİNİK ÖZELLİKLER

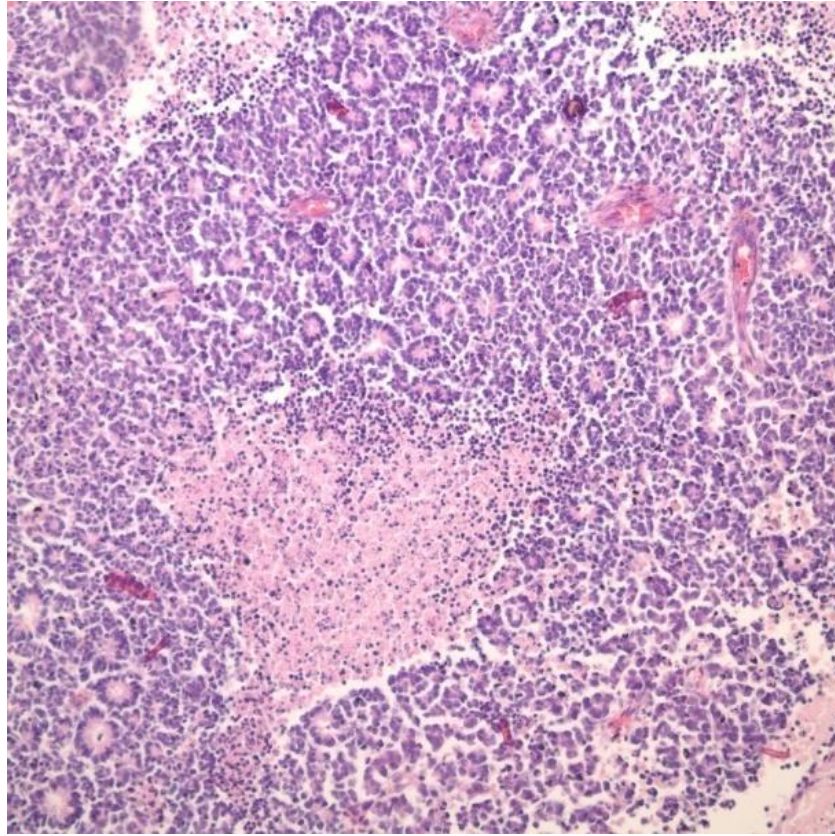
Hastalar cinsiyet, tanı yaşı, operasyon yaşı, cinsiyet, lateralite, opere olan göz, preoperatif tedavi durumu, sistemik metastaz mevcudiyeti gibi özellikler açısından değerlendirildi.

3.2. HİSTOPATOLOJİK DEĞERLENDİRME

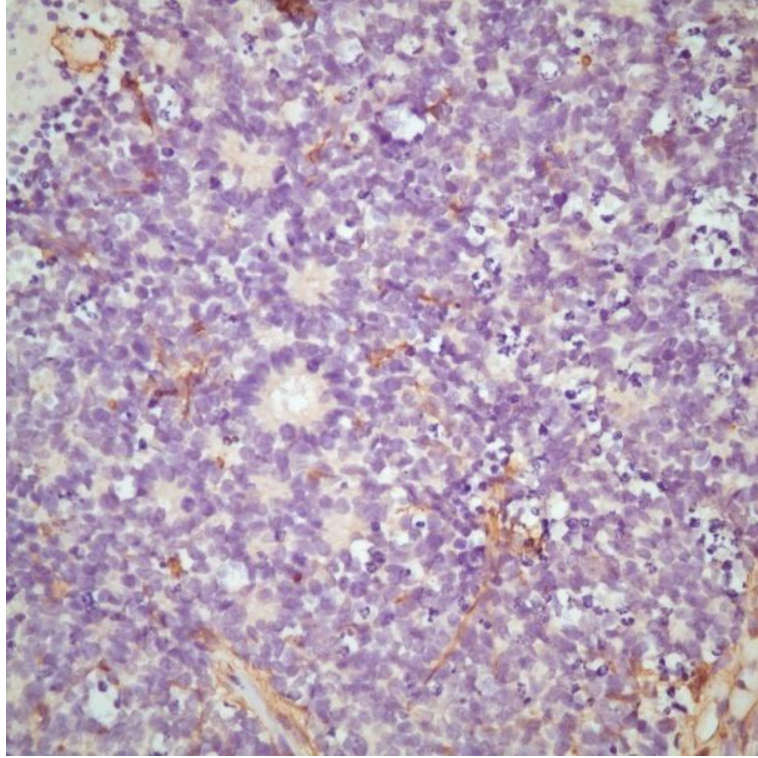
3.2.1. HEMATOKSİLEN-EOZİN BOYAMA

Parafine gömülü doku bloklarından alınan seri kesitler öncelikle hematoksilen-eozin (H-E) boyaması ile incelemeye alınmıştır. Bu inceleme ile tümörün boyutu, diferansiyasyon ya da indifferansiyasyon durumu, nekroz oranı, yüksek risk faktörü mevcut olup olmadığı tanımlanmıştır. Boyut açısından tümör, en

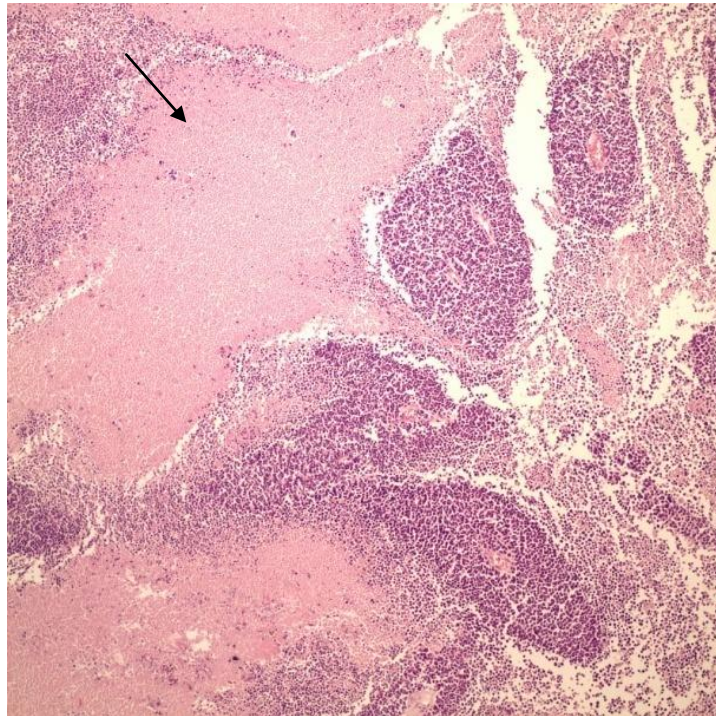
geniş tümör çapı 14 mm'den küçük ve eşit olanlar, 14 mm'den büyük olanlar olarak sınıflandırılmıştır. Diferansiyasyon açısından rozet formasyonu gösteren tümör iyi diferansiye, göstermeyen tümörler ise indiferansiye tümör olarak ayrılırken nekroz oranı, semikantitatif olarak tümör dokusunda %50 den az ve eşit nekroz bulunanlar ve %50 den çok nekroz bulunanlar olarak sınıflandırılmıştır (Şekil 1,2,3). Tüm glob ve optik siniri içeren kesitler incelenerek yüksek risk faktörü olarak tanımlan ön kamara, iris, siliyer cisim, sklera, koroidea invazyonu, optik sinir invazyonu, optik sinir cerrahi sınırdaki tümör mevcudiyeti aranarak, mevcut olan tümörde hangisinin mevcut olduğu tanımlanarak alt gruplar oluşturulmuştur. (Şekil 4,5,6,7,8,9)



Şekil 1. H-E boyama, 20x büyütme, tümör dokusunda rozet formasyonu.

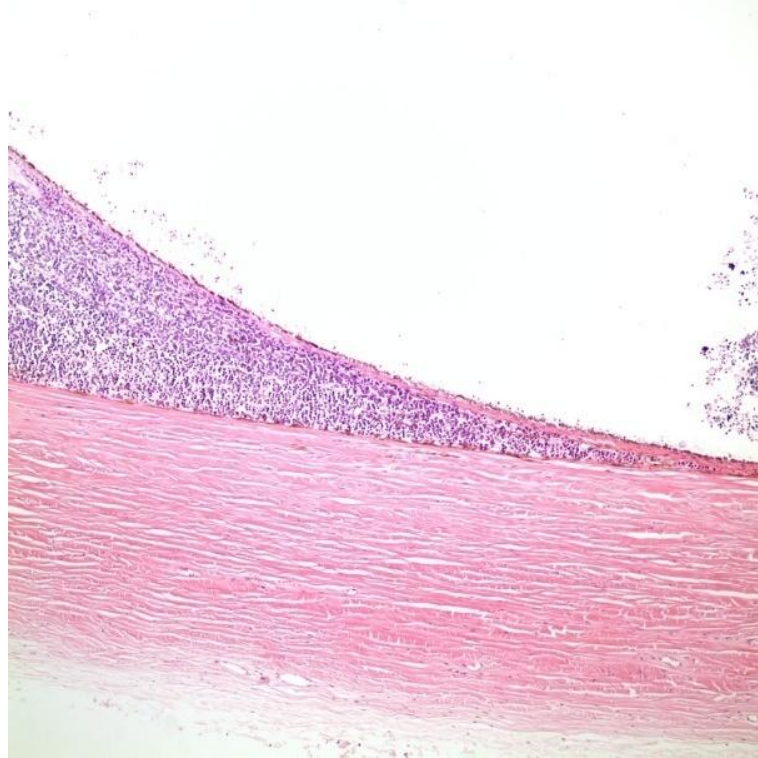


Şekil 2. CD4 immnühistokimya boyama, 40x büyütme, tümör dokusunda rozet formasyonu.

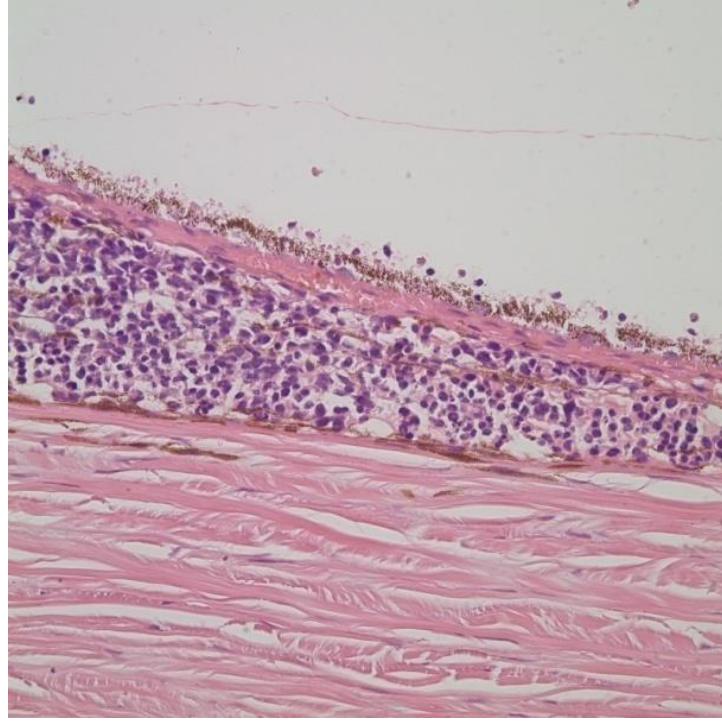


Şekil 3. H-E boyama, 10x büyütme, tümör dokusunda nekroz alanları (ok).

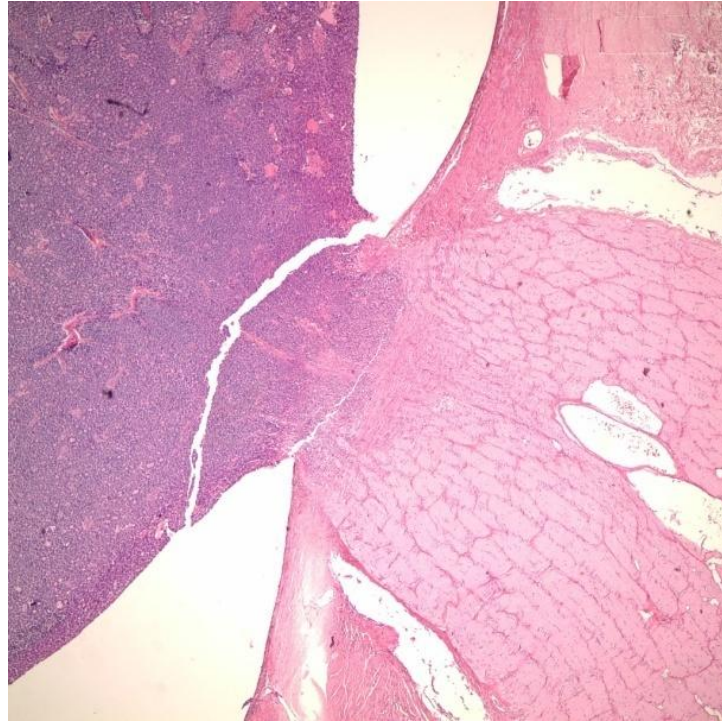
Yüksek risk faktörü içeren grupta tümör dokusunu temsil eden 2 farklı alan ve yüksek risk faktörünün tanımlandığı bölgeye ait 1 alan, eğer birden fazla risk faktörü taşıyorsa her risk faktörüne ait alanlar, yüksek risk faktörü içermeyen grupta ise tümör dokusunu temsil eden 3 farklı alan immünohistokimyasal olarak değerlendirmeye alınmıştır.



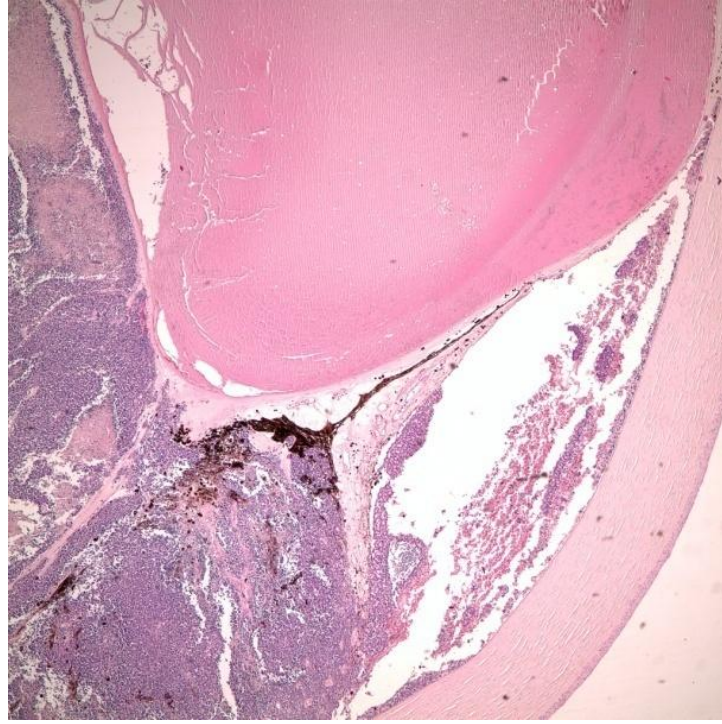
Şekil 4. H-E boyama, 10x büyütme, koroidea invazyonu.



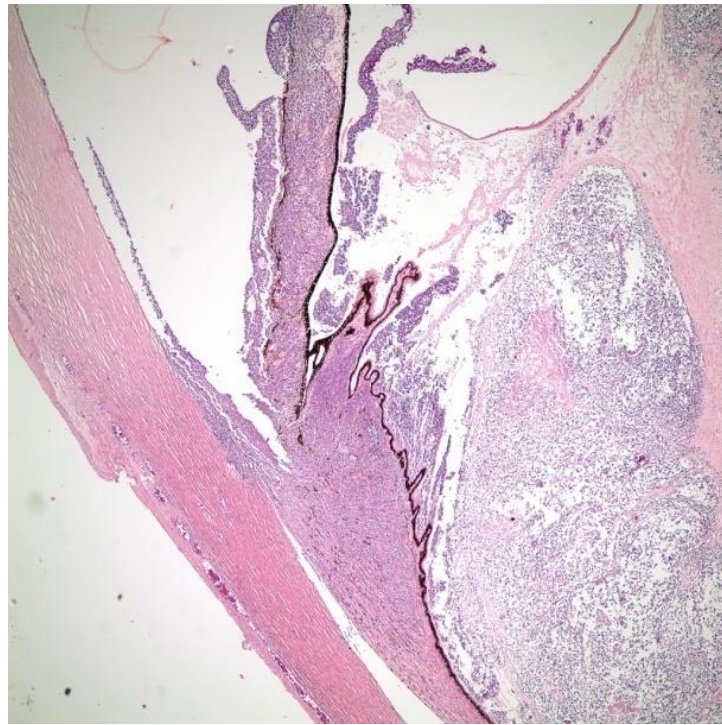
Şekil 5. H-E boyama, 40x büyütme, koroidea invazyonu.



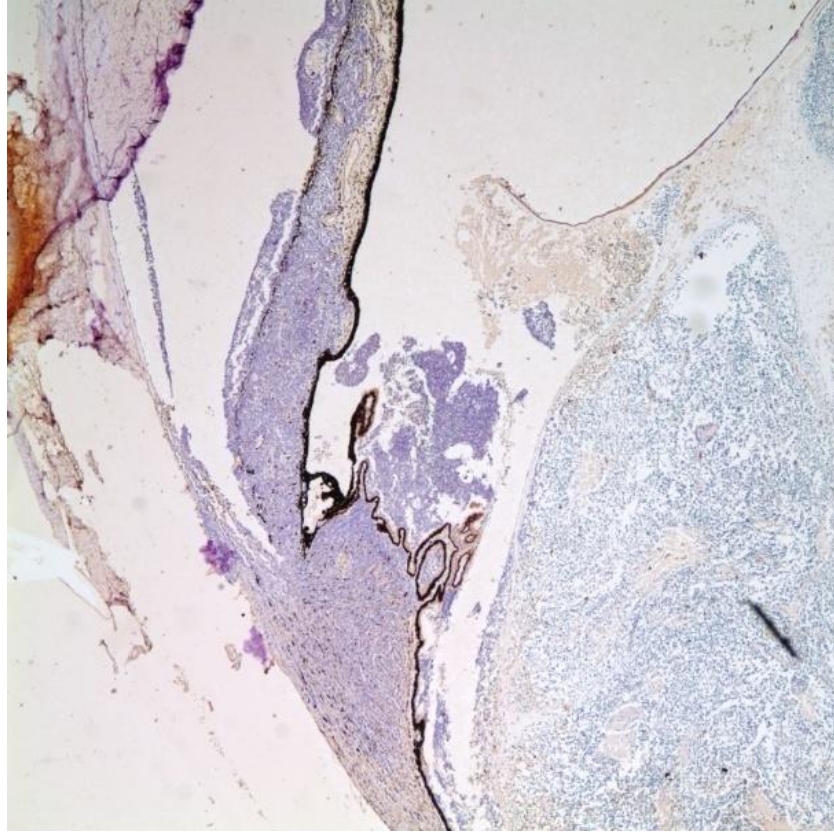
Şekil 6. H-E boyama, 4x büyütme, lamina cribrosa (optik sinir) invazyonu.



Şekil 7. H-E boyama, 4x büyütme, siliyer cisim ve ön kamara invazyonu.



Şekil 8. H-E boyama, 4x büyütme, siliyer cisim ve ön kamara invazyonu.



Şekil 9. CD4 immünohistokimya boyama, 4x büyütme, siliyer cisim ve ön kamara invazyonu.

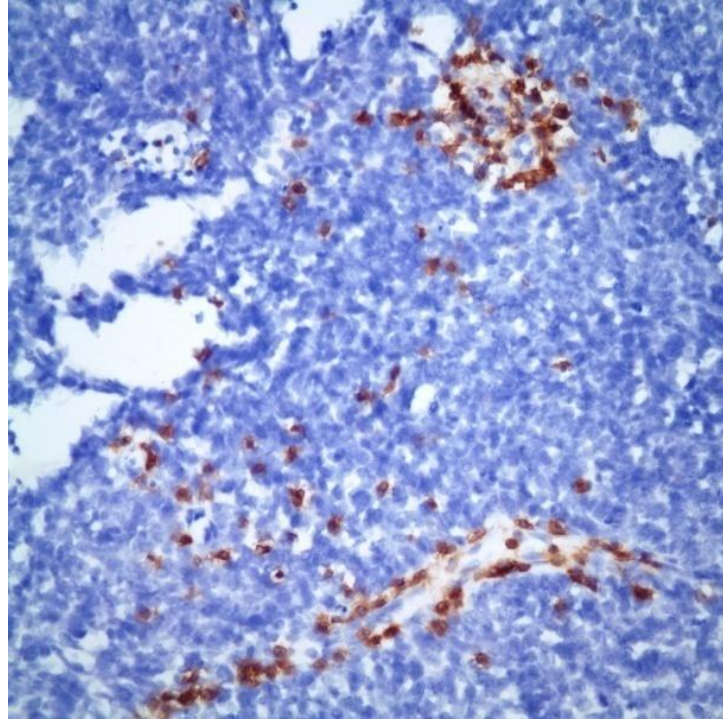
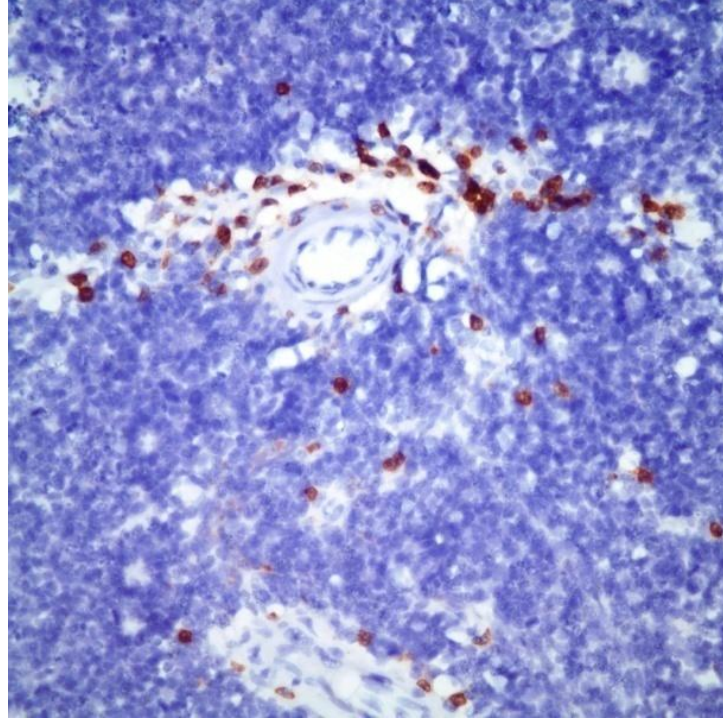
3.2.2. İMMÜNOHİSTOKİMYASAL BOYAMA

Parafine gömülü %10 formalinde fikse edilmiş dokular 4 mikron (μm) kalınlığında kesilmişler ve deparafinizasyon sonrasında antijen geri kazanımı işlemine maruz bırakılmışlardır. Bu amaçla kaynatılan etilen diamin tetra asetik asit (EDTA) (pH 8) ve sitrat (pH 6) solüsyonları içerisine daldırılan örnekler 20 dakika inkübe edilmişlerdir. Ardından endojen peroksit aktivitesini engellemek için %3 lük hidrojen peroksitle 10 dakika boyunca bloklama gerçekleştirilmiştir. Birincil antikorlar olan CD3 (1:100 dilüsyon, fare monoklonal, Leica Novocastra, UK), CD4 (1:20 dilüsyon, fare monoklonal, Leica Novocastra, UK), CD25 (1:100 dilüsyon, fare monoklonal, Leica Novocastra, UK) ve FOXP3 (1:100 dilüsyon, fare monoklonal,

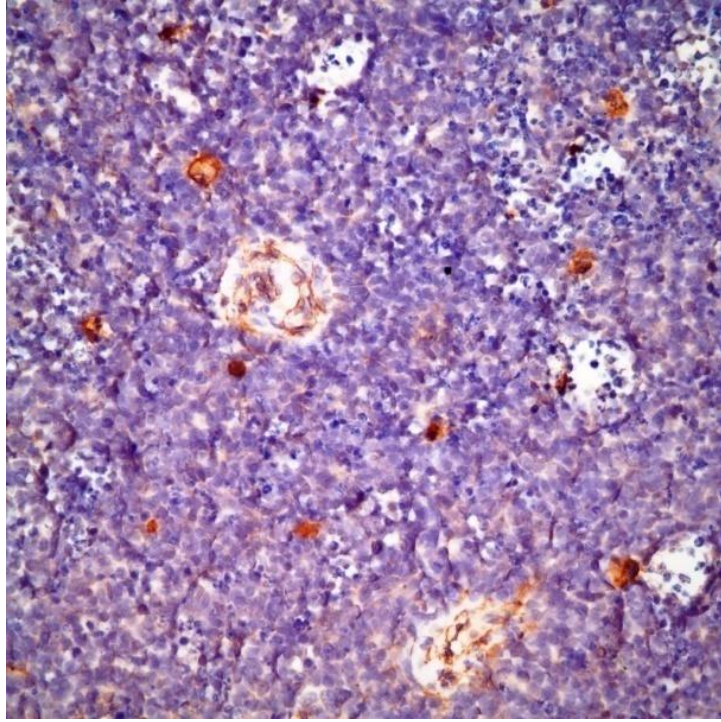
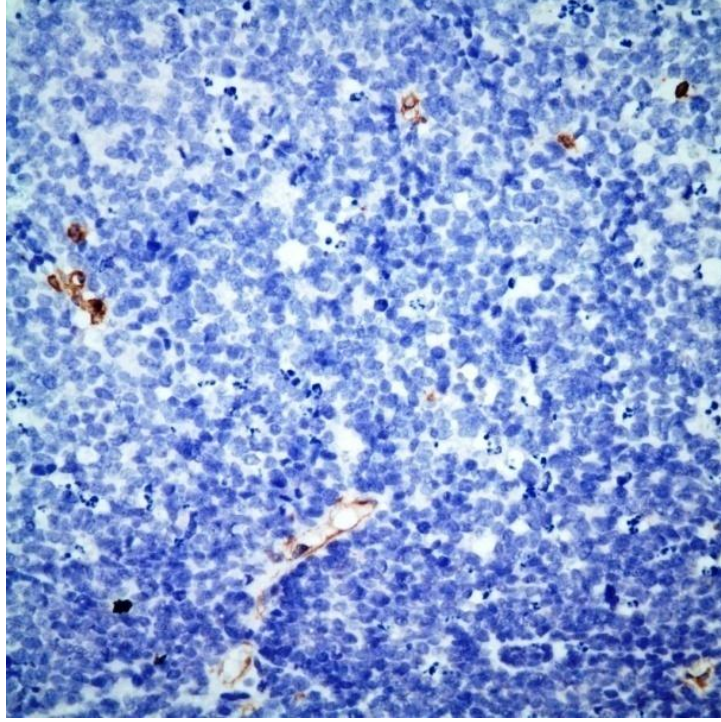
Abcam, UK) belirtilen dilüsyonlarda örneklere eklenerek 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmişlerdir. Birincil antikor işaretleme sonrası bloklama işlemi için Polymer Detection Kit (Leica, Novocastra, UK) kullanılmış olup ardından kit içeriğinde mevcut olan ve içerisinde tavşan kaynaklı fare karşıtı ikincil antikor bulunduran NovoLink Polymer solüsyonu ile ikincil antikor işaretleme gerçekleştirilmiştir. Stabilize edici ajan olarak kullanılan DAB kromojen ile 6 dakika muamele edilen örnekler, sonrasında hematoksilin ile boyanmış dokuların yeniden su kazanması ve berraklaşması için sırasıyla dereceli alkol serilerine ve ksilene maruz bırakılmıştır. Örnekler uygun yapıştırma solüsyonu ile kapatılarak görüntülemeye hazır hale getirilmişlerdir.

Bir olguya ait patoloji örneğinden yukarıda tanımlandığı gibi değerlendirmeye alınan alanlarda CD3, CD4, CD25 ve FOXP3 ile pozitif boyanma gösteren hücreler sayılmış ve her bir boyanma için pozitif ya da negatif boyanma gösteren hücre tanımlaması yapılmıştır

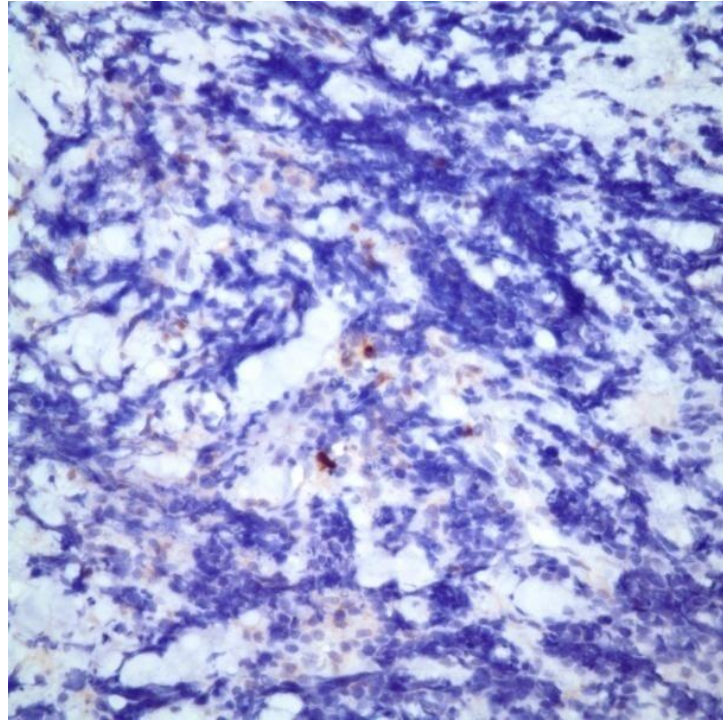
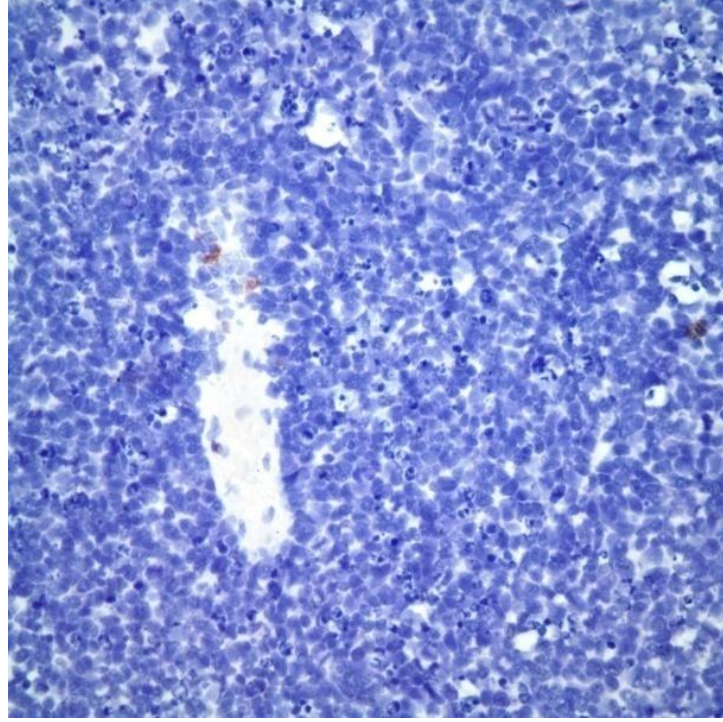
Pozitif boyanma gösteren bir hücrenin Treg hücre olarak tanımlanması için CD3, CD4 ve FOXP3 pozitif boyanma göstermesi şartı aranmıştır. Bu şartı sağlayan hücreler CD25 pozitif boyanma gösterip göstermemesine göre alt gruplara ayrılmıştır.



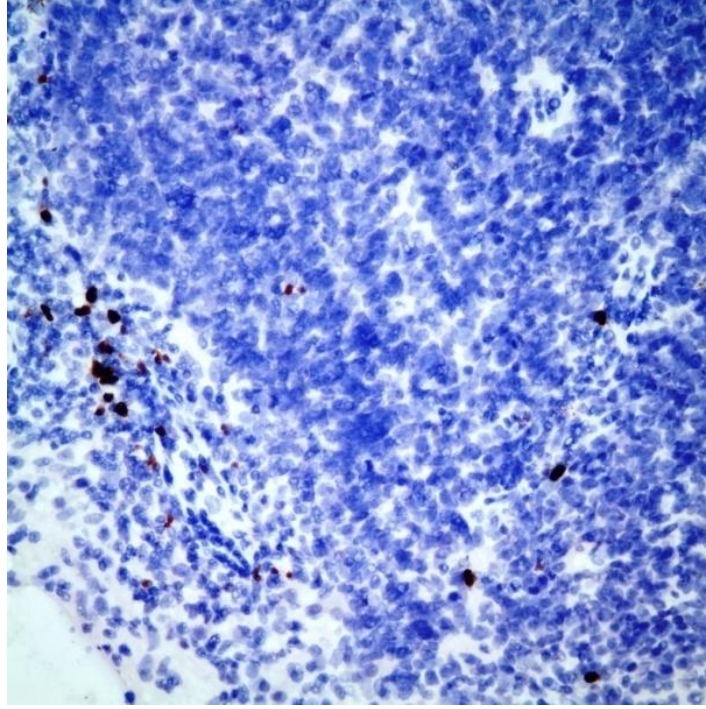
Şekil 10-11. CD3 immünohistokimya boyama, 40x büyütme, pozitif boyanma



Şekil 12-13. CD4 immünohistokimya boyama, 40x büyütme, pozitif boyanma



Şekil 14 -15. CD25 immünohistokimya boyama, 40x büyütme, pozitif boyanma



Şekil 16. FOXP3 immünohistokimya boyama, 40x büyütme, pozitif boyanma.

Kesitler mikroskop altında Spot Software Version 4.1 programı kullanılarak değerlendirilmiştir.

3.3. İSTATİSTİKSEL YÖNTEM

Tez çalışmasındaki tüm analizler SPSS 15.0 programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sayısal değişkenlerin normal dağılım gösterip göstermedikleri Kolmogorov Smirnov testi ile incelenmiş olup normal dağılım gösteren sayısal değişkenlerin iki grup karşılaştırılmaları için iki ortalama arasındaki farkın önemlilik testi, normal dağılım göstermeyen değişkenlerin belirlenmesi için Mann Whitney U testi kullanılmıştır. Kategorik değişkenler arası ilişki Ki kare (χ^2) testi (Pearson ki kare, Yates düzeltmeli kare, Fisher kesin Ki kare) ile incelenmiştir.

Tanımlayıcı istatistik olarak normal dağılım gösteren değişkenler için ortalama standart sapma (\pm), normal dağılım göstermeyen değişkenler için ortanca

(min-maks) değerleri verilirken, kategorik değişkenler için yüzde (%) değerler kullanılmıştır.

Tüm analizlerde p deęerinin 0.05'ten küçük olduğu deęerler anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

Hastaların %64.1 i erkek (n=41), %35.9 u (n=23) kızdı.

Hastaların ortalama tanı yaşı 24.61 ± 18.766 ay, ortalama operasyon yaşı 37.47 ± 19.414 aydı.

Hastalardan %54.7 (n=35) hasta unilateral retinoblastom, %45.3 (n=29) hasta bilateral retinoblastom olgusu olarak izlenmekteydi.

Opere olan gözlerin % 40.6 sı (n=26) sağ göz, %5.4 ü (n=38) sol gözdü.

Hastaların %56.3 ü (n=36) preoperatif dönemde sistemik kemoterapi, kriyoterapi, termoterapi gibi tedavilerden en az birini almıştı. Tedavi alan hastalardan yalnızca 2 hasta operasyona kadar lokal tedavi izlenmiş, kalan 32 hasta (%34) sistemik ve lokal tedavi seçeneklerinden her ikisini birlikte almıştı.

Hastaların % 6.3 ünde (n=4) operasyon sonrası dönemde sistemik metastaz saptandı, operasyon öncesi dönemde sistemik metastazı bulunan hasta yoktu.

Olguların %81.3 ünde (n=52) en geniş tümör çapı ≤ 14 mm, %18.8 inde (n=12) en geniş tümör çapı >14 mm olarak saptandı.

İyi diferansiye tümör oranı %67.2 (n=43), kötü diferansiye tümör oranı %32.8 (n=21) olarak değerlendirildi.

Nekroz oranı olguların %28.1 inde (n=18) %50'den büyük, %71.9 unda (n=46) %50'den küçük ve %50 olarak tanımlandı.

Tüm olguların %71.9 unda (n=46) yüksek risk faktörü mevcutken, %28.1 inde (n=18) yüksek risk faktörü saptanmadı. Yüksek risk faktörü olan ve olmayan tüm hastalar ele alınarak alt gruplara bakıldığında ön kamara invazyonu %9.4 (n=6),

siliyer cisim invazyonu %18.8 (n=12), optik sinir invazyonu %20.3 (n=13), koroidea invazyonu %46.9 (n=30), sklera invazyonu %14.1 (n=9), optik sinir cerrahi sınırda tümör mevcudiyeti %6.3 (n=4) olguda görüldü.

Risk faktörü olan ve olmayan grupta ortalama tanı yaşı ve ortalama operasyon yaşı karşılaştırıldığında; ortalama tanı yaşının risk faktörü pozitif olan grupta anlamlı olarak daha düşük olduğu saptandı.

Tablo 1. Yüksek risk faktörü olan ve olmayan grupta ortalama tanı ve operasyon yaşı (ay).

	Risk Faktörü (+)	Risk Faktörü (-)	p değeri
Tanı Yaşı (ay)	20.54 ± 14.742	35.00 ± 23.892	0.025
Operasyon Yaşı (ay)	36.1 ± 17.786	40.17 ± 23.425	0.491

Aynı ilişki yüksek risk faktörü alt gruplarında incelendiğinde; koroidea invazyonu dahil olmak üzere hiçbir alt grupta anlamlı ilişki saptanmadı.

Tablo 2. Koroidea invazyonu olan ve olmayan grupta ortalama tanı ve operasyon yaşı (ay).

	Koroidea İnvazyonu (+)	Koroidea İnvazyonu (-)	p değeri
Tanı Yaşı (ay)	20.27 ± 15.879	28.44 ± 20.457	0.082
Operasyon Yaşı (ay)	41.00 ± 19.082	34.35 ± 19.448	0.174

Demografik, klinik ve histopatolojik özellikler ile yüksek risk faktörü mevcudiyeti ilişkisi incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı.

Tablo 3. Yüksek risk faktörü mevcudiyeti ile demografik ve klinik özelliklerin karşılaştırılması.

		Risk Faktörü (+)	Risk Faktörü (-)	p değeri
Cinsiyet	Kız	% 87.0	% 13.0	0.085
	Erkek	% 63.4	% 36.6	
Lateralite	Bilateral	% 78.6	% 21.4	0.441
	Unilateral	% 66.7	% 33.3	
Opere Göz	Sağ	% 76.9	% 23.1	0.646
	Sol	% 68.4	% 31.6	
Sistemik Metastaz	(+)	% 100	% 0	0.570
	(-)	% 70.0	% 30.0	

Tablo 4. Yüksek risk faktörü mevcudiyeti ile histopatolojik özelliklerin karşılaştırılması.

		Risk Faktörü (+)	Risk Faktörü (-)	p değeri
En Geniş Tümör Çapı	≤ 14mm	% 75.0	% 25.0	1.00
	> 14mm	% 71.2	% 28.8	
Diferansiyasyon	İyi	% 72.1	% 27.9	1.00
	Kötü	% 71.4	% 28.6	

Pozitif boyanma durumu ile yüksek risk faktörü mevcudiyetinin ilişkisi incelendiğinde; yüksek risk faktörü bulunan grupta CD3 ve FOXP3 pozitif boyanma gösteren hücre sayısının anlamlı olarak yüksek olduğu saptandı.

Tablo 5. Pozitif boyanma durumu ile yüksek risk faktörü mevcudiyetinin karşılaştırılması (*p<0.05).

		CD3	CD4	FOXP3	CD25
Risk Faktörü (+)	Median	18.0	5.5	1.5	0.00
	Maksimum	119.0	22.0	26.0	12.00
	Minimum	0.0	0.0	0.0	0.00
Risk Faktörü (-)	Median	5.5	3.0	0.0	0.00
	Maksimum	44.0	14.0	3.0	1.00
	Minimum	0.0	0.0	0.0	0.00
p değeri		0.02*	0.135	0.022*	0.05

Aynı ilişki yüksek risk faktörü alt gruplarında incelendiğinde koroidea ve ön kamara invazyonu bulunan grupta CD3 pozitif boyanma gösteren hücre sayısının anlamlı olarak yüksek olduğu saptandı, diğer alt gruplarda anlamlı bir ilişki saptanmadı.

Tablo 6. Pozitif boyanma durumu ile koroidea ve invazyonu mevcudiyetinin karşılaştırılması (*p<0.05).

		CD3	CD4	FOXP3	CD25
Koroidea İnvazyonu (+)	Median	22.5	6.0	3.0	0.0
	Maksimum	119.0	22.0	26.0	22.0
	Minimum	0.0	0.0	0.0	0.0
Koroidea İnvazyonu (-)	Median	7.0	3.5	0.0	0.0
	Maksimum	68.0	21.0	12.0	8.0
	Minimum	0.0	0.0	0.0	0.0
p değeri		0.012*	0.120	0.06	0.104

Tablo 7. Pozitif boyanma durumu ile ön kamara invazyonu mevcudiyetinin karşılaştırılması (*p<0.05).

		CD3	CD4	FOXP3	CD25
Ön Kamara (+)	Median	25.0	9.0	8.5	0.5
	Maksimum	46.0	22.0	12.0	11.0
	Minimum	18.0	2.0	0.0	0.0
Ön Kamara (-)	Median	8.0	4.0	0.0	0.0
	Maksimum	119.0	22.0	26.0	22.0
	Minimum	0.0	0.0	0.0	0.0
p değeri		0.026*	0.168	0.249	0.115

Pozitif boyanma durumu ile en geniş tümör çapının ilişkisi incelendiğinde; tümör çapı >14mm olan grupta CD3 ve CD4 pozitif boyanma gösteren hücre sayısının tümör çapı ≤14mm olan gruba göre anlamlı olarak yüksek olduğu saptandı.

Tablo 8. Pozitif boyanma durumu ile en geniş tümör çapının karşılaştırılması (*p<0.05)

		CD3	CD4	FOXP3	CD25
En Geniş Tümör Çapı (>14mm)	Median	16.0	6.0	1.0	22.0
	Maksimum	119.0	22.0	26.0	0.0
	Minimum	0.0	0.0	0.0	0.0
En Geniş Tümör Çapı (≤14mm)	Median	0.0	0.0	0.0	0.0
	Maksimum	18.0	4.0	4.0	2.0
	Minimum	0.0	0.0	0.0	0.0
p değeri		0.001*	0.001*	0.07	0.068

Pozitif boyanma durumu ile diferansiyasyon durumu ilişkisi incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı.

Tablo 9. Pozitif boyanma durumu ile diferansiyasyon durumu karşılaştırılması

		CD3	CD4	FOXP3	CD25
İyi Diferansiye	Median	9.0	4.0	0.0	0.0
	Maksimum	68.0	22.0	26.0	22.0
	Minimum	0.0	0.0	0.0	0.0
Kötü Diferansiye	Median	14.0	3.0	1.0	0.0
	Maksimum	119.0	18.0	16.0	4.0
	Minimum	0.0	0.0	0.0	0.0
p değeri		0.747	0.908	0.827	0.521

T regulatuar hücre varlığı ile klinik ve histopatolojik özellikler, yüksek risk faktörü mevcudiyeti ilişkisi incelendiğinde; yüksek risk faktörü mevcut olan grupta olmayan gruba göre, en geniş tümör çapı >14 mm olan grupta en geniş tümör çapı ≤14 mm olan gruba göre anlamlı olarak fark saptandı. Aynı ilişki yüksek risk faktörü alt gruplarında incelendiğinde sadece koroidea invazyonu olan grupta izlendi.

Tablo 10. T regulatuar hücre varlığı ve risk faktörü, en geniş tümör çapı, koroidea invazyonu, preoperatif tedavi durumunun karşılaştırılması (*p<0.05)

		Treg (+)	Treg (-)	p değeri
Risk Faktörü	(+)	% 54.3	% 45.7	0.041*
	(-)	% 22.2	% 72.8	
En Geniş Tümör Çapı	(>14mm)	% 53.8	%46.2	0.011*
	(≤14mm)	% 8.3	%91.7	
Koroidea İnvazyonu	(+)	% 60.0	%40.0	0.049*
	(-)	% 32.4	% 67.6	
Preoperatif Tedavi	(+)	% 52.8	% 35.7	0.268
	(-)	% 47.2	%64.3	

T regulatuar hücrelerde CD25 pozitif boyanma durumu ile yüksek risk faktörü mevcudiyeti ve preoperatif tedavi durumu ilişkisi incelendiğinde, istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı.

Tablo 11. T regulatuar hücrelerde CD25 pozitif boyanma durumu ile yüksek risk faktörü mevcudiyeti ve preoperatif tedavi durumu ile karşılaştırılması.

		CD25+ Treg (+)	CD25+ Treg (-)	CD25- Treg (+)	CD25- Treg (-)
Risk Faktörü	(+)	% 60.0	% 40.0	% 40.0	% 60.0
	(-)	% 50.0	% 50.0	% 75	% 25
p değeri		1.0		0.299	
Preop. Tedavi	(+)	% 57.9	% 42.1	% 47.4	% 52.6
	(-)	% 60.0	%40.0	% 40.0	% 60.0
p değeri		1.0		1.0	

5. TARTIŞMA

Günümüzde gelişen yeni tedavi stratejileri ve erken teşhisin etkisiyle retinoblastomda sağkalım oranı % 90 in üzerindedir. Tümör metastazı mortalitenin en önemli sebebidir ve prognoza yönelik risk faktörlerini tanımlamak adına bir çok klinik ve histopatolojik çalışma mevcuttur. Bu risk faktörleri dört grup altında toplanabilir: genetik, oküler, histopatolojik ve tedavi ilişkili faktörler (105,106).

Enükleasyon önerilen hastalarda cerrahi öncesi neoadjuvan kemoterapi gerekliliği, ve hastalarda histopatolojik yüksek risk faktörü mevcudiyetinin ön görülüp görülemeyeceği günümüzde halen cevaplanması için çalışılan tartışmalı sorulardan birisidir ve son yıllarda bu konu üzerine bir çok çalışma mevcuttur. Manyetik rezonans görüntülemenin bu risk faktörlerinden birisi olan optik sinir invazyonunu tespit etmedeki yeri tartışmalıdır (107-111).

Bazı araştırmacılar artmış göz içi basıncı ve buftalmus gibi bazı klinik özelliklere göre enükleasyon önce neoadjuvan kemoterapi gerekliliğini savunmuşlardır (112,113).

Chantada ve ark. (114) 182 unilateral retinoblastom olgusunu dahil ettikleri çalışmada buftalmus, glokom, ortanca göz içi basıncı, rubeozis ve yaş gibi klinik özelliklerle yüksek risk faktörü mevcudiyetinin ilişkisini değerlendirmişler, artmış göz içi basıncı ve glokom mevcudiyetini yüksek risk faktörü mevcut olan invaziv hastalık ile ilişkili bulmuşlardır.

Wilson ve ark. (115) klinik ve histopatolojik özellikleri karşılaştırmayı amaçladıkları retrospektif çalışmada 67 enükleasyon olgusunu değerlendirmişlerdir. Patoloji spesimenlerini tümörün diferansiyasyon durumu, büyüme paterni, koroidea, optik sinir, siliyer cisim, iris, ön kamara, sklera invazyonu, neovasküler glokom, eksudatif retina dekolmanı, vitreus ve subretinal tohumlanmalar, göz dışı yayılım

açısından incelemişlerdir. Bu histopatolojik özelliklerin sağ veya sol göz, kornea çapı, göz içi basıncı, Reese-Ellsworth evrelemesi, Uluslararası Retinoblastom Sınıflaması'na göre grubu gibi klinik özelliklerle ilişkisini incelemişlerdir. Bu çalışmada kornea çapı, göz içi basıncı, Reese-Ellsworth evrelemesi arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmamıştır ancak Uluslararası Retinoblastom Sınıflaması'na göre grup E olgularda grup D olgulara göre yüksek risk faktörleri anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Grup E olgularda %50 oranında bulunan yüksek risk faktörü mevcudiyetini enükleasyon öncesi grup E hastalara kemoterapi önermek açısından yetersiz bulmuşlardır.

Kashyap ve ark. (116) histopatolojik risk faktörlerini inceledikleri 609 olguluk çalışmada, iyi diferansiye tümörlerde tanı yaşının, kötü diferansiye tümörlere göre anlamlı olarak düşük olduğunu saptamışlardır. Bizim çalışmamızda tümör diferansiyasyonu ile ortalama tanı yaşı arasında anlamlı bir ilişki saptanmazken, ortalama tanı yaşının risk faktörü pozitif olan grupta daha düşük olduğu saptandı. Aynı çalışmada yüksek risk faktörü mevcudiyeti ile yaygın nekroz oranı ve kötü diferansiyasyon anlamlı ilişkisi vurgulanırken, bizim çalışmamızda aynı anlamlı ilişki saptanmadı.

Göz içi tümörlerde Treg hücrelerin rolü üzerine çalışmalar sınırlıdır ve günümüzde sadece uveal melanom Treg hücre ilişkisinin incelendiği yalnız bir çalışma mevcuttur. Aynı ilişkinin retinoblastomda incelendiği bir çalışma daha önce yapılmamıştır. Lagouros ve ark. (5) enükleasyon uygulanan 42 uveal melanom olgusunu değerlendirdikleri çalışmada, CD3 ekspresyonu ile tanımlanan lenfosit infiltrasyonu oranını %40.5 (n=17) bulmuşlardır. Bu 17 olgunun 5 tanesinde $CD3^+CD4^+ CD25^+ FOXP3^+$ ya da $CD3^+CD4^+ CD25^- FOXP3^+$ olarak tanımladıkları Treg hücrelerin mevcudiyetini saptamışlardır ancak bu olgularda kötü prognoz ile Treg hücre mevcudiyeti arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptamamışlardır. $CD3^+$ lenfosit infiltrasyonu ile kötü prognoz arasında anlamlı ilişki saptanmıştır.

Kahaly ve ark. (117) Graves orbitopatili hastalarda orbita inflamasyonunda Treg hücrelerin rolünü incelemeyi amaçladıkları çalışmada; orbitopati tanısı olmayan 7 Graves hastasını, 29 graves orbitopati hastasını ve 15 sağlıklı bireyi çalışmaya dahil etmişler, periferik kan analizi ile Treg hücre durumunu değerlendirmişlerdir. Bu çalışmada iki önemli sonuç üzerinde durmuşlardır: Orbitopati hastalarında Treg hücre düzeyi daha düşük oranda bulunmuştur ve anti-T lenfosit globulin infüzyonu sonrası bu oranda artış görülmüştür.

T regulatuar hücre fonksiyonunu baskılamayı hedefleyen tedavi modalitelerinin anti-tümör bağışıklığı güçlendirmek amacıyla kullanıp kullanılmayacağı günümüzde üzerinde çalışılan konular biri olmakla birlikte otoimmün hastalıklarda doku hasarını önlemek ve transplantasyonda red reaksiyonun engellemek amacıyla Treg hücre sayısını arttırmayı hedefleyen tedavi seçenekleri üzerinde de çalışılmaktadır (118). T regulatuar hücre yüzey antijeni CD25 blokajı yapan monoklonal antikoru daklizumab'ın Treg hücre fonksiyonu üzerine etkisini anlamak amacıyla yapılan bir çalışmada, metastatik meme kanseri olgularında Treg hücre sayısının azaldığı gösterilmiştir (119).

Retinoblastomda tümör dokusunda mikroçevrede T regulatuar hücre mevcudiyeti ve bu mevcudiyetin klinik ve histopatolojik bulgular ile ilişkisini inceleyen ilk çalışma özelliğini taşıyan bu çalışma ile daha önce tanımlanan patolojik yüksek risk faktörlerinin bulunduğu invaziv kabul edilen tümör grubunda T regulatuar hücre popülasyonu anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Bu sonuç retinoblastomun immün sistemden kaçışta, daha önce literatürde tanımlanmış bir çok solid kanser gibi T regulatuar hücre aracılı immün baskılamayı kullanıyor olabileceğini göstermektedir. Çalışılan kanser türlerinde tümör mikroçevresinde gösterilen T regulatuar hücre infiltrasyonunun periferik kanda da yansıması görüldüğü bilinmektedir ve akım sitometrisi gibi daha az invazif yöntemlerle periferik T regulatuar hücre düzeyi hakkında bilgi sahibi olunabilir. Bu sonuç ile

ameliyat sonrası dönemde kemoterapi önerilmesi gelecek hasta grubunun ön görülebileceği düşünülmektedir.

Retinoblastomda immün kaçışta T regülatuar hücrelerin rolü olduğuna dair kanıtların olması, bu tümörde diğere solid kanserlerde kullanılan T regülatuar hücreleri hedefleyen tedavi modalitelerinin kullanılabilir mi sorusunu aydınlatacak çalışmalara öncülük etmektedir.

6. SONUÇLAR

1. Tanı yaşının patolojik risk faktörü olan grupta daha küçük olduğu saptandı, bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı bulundu.
2. Patolojik risk faktörü alt gruplarında klinik ve histopatolojik özellikler arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmadı.
3. Patolojik risk faktörü ve alt gruplarının mevcudiyeti ile CD3, CD4, FOXP3, CD25 pozitif boyanan hücrelerin ilişkisi incelendiğinde CD3 ve FoxP3 sayısının risk faktörü olan grupta anlamlı olarak yüksek olduğu saptandı.
4. Alt gruplarda koroidea ve ön kamara invazyonu bulunanlarda aynı ilişki gözlenirken, diğer histopatolojik özellikler ile anlamlı bir ilişki bulunmadı.
5. Klinik ve histopatolojik özellikler ile T regülatuar hücre ilişkisi incelendiğinde patolojik risk faktörü olanlar ile olmayanlar arasında anlamlı fark olduğu, aynı ilişkinin alt gruplarda sadece koroidea invazyonunda bulunduğu saptandı.
6. T regülatuar hücre mevcudiyeti ile diğer histopatolojik özellikler karşılaştırıldığında anlamlı ilişki sadece en geniş tümör çapı 14 mm'den büyük olanlarda saptandı.

7. KAYNAKLAR

1. Gatta, G., Capocaccia, R., Coleman, M.P., Ries, L.A., Berrino, F. (2002) Childhood cancer survival in Europe and the United States. *Cancer*, 95 (8), 1767-1772.
2. Abramson, D.H., Scheffer, A.C. (2004) Update on retinoblastoma. *Retina*, 24 (6), 828-848.
3. Chantada, G.L., Dunkel, I.J., de Davila, M.T., Abramson, D.H. (2004) Retinoblastoma patients with high risk ocular pathological features: who needs adjuvant therapy? *Br J Ophthalmol*, 88 (8), 1069-1073.
4. Igney, F.H., Krammer, P.H. (2002) Immune escape of tumors: apoptosis resistance and tumor counterattack. *J Leukoc Biol*, 71 (6), 907-920.
5. Lagouros, E., Salomao, D., Thorland, E., Hodge, D.O., Vile, R., Pulido, J.S. (2009) Infiltrative T regulatory cells in enucleated uveal melanomas. *Trans Am Ophthalmol Soc*, 107, 223-228.
6. Kivela, T. (2009) The epidemiological challenge of the most frequent eye cancer: retinoblastoma, an issue of birth and death. *Br J Ophthalmol*, 93 (9), 1129-1131.
7. Abramson, D.H. (2005) Retinoblastoma in the 20th century: past success and future challenges the Weisenfeld lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 46 (8), 2683-2691.
8. Shields, C.L. (2008) Forget-me-nots in the care of children with retinoblastoma. *Semin Ophthalmol*, 23 (5), 324-334.

9. Howe, H.L., Wu, X., Ries, L.A., Cokkinides, V., Ahmed, F., Jemal, A. ve diğerleri. (2006) Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2003, featuring cancer among U.S. Hispanic/Latino populations. *Cancer*, 107 (8), 1711-1742.
10. Shields, J.A., Parsons, H.M., Shields, C.L., Shah, P. (1991) Lesions simulating retinoblastoma. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus*, 28 (6), 338-340.
11. Abramson, D.H., Frank, C.M., Susman, M., Whalen, M.P., Dunkel, I.J., Boyd, N.W., 3rd. (1998) Presenting signs of retinoblastoma. *J Pediatr*, 132 (3 Pt 1), 505-508.
12. Knudson, A.G., Jr. (1971) Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 68 (4), 820-823.
13. Fung, Y.K., Murphree, A.L., T'Ang, A., Qian, J., Hinrichs, S.H., Benedict, W.F. (1987) Structural evidence for the authenticity of the human retinoblastoma gene. *Science*, 236 (4809), 1657-1661.
14. Nichols, K.E., Houseknecht, M.D., Godmilow, L., Bunin, G., Shields, C., Meadows, A. ve diğerleri. (2005) Sensitive multistep clinical molecular screening of 180 unrelated individuals with retinoblastoma detects 36 novel mutations in the RB1 gene. *Hum Mutat*, 25 (6), 566-574.
15. Poulaki, V., Mukai, S. (2009) Retinoblastoma: genetics and pathology. *Int Ophthalmol Clin*, 49 (1), 155-164.
16. Sastre, X., Chantada, G.L., Doz, F., Wilson, M.W., de Davila, M.T., Rodriguez-Galindo, C. ve diğerleri. (2009) Proceedings of the consensus meetings from the International Retinoblastoma Staging Working Group on the pathology guidelines for the examination of enucleated eyes and evaluation of prognostic risk factors in retinoblastoma. *Arch Pathol Lab Med*, 133 (8), 1199-1202.

17. Kivela, T. (1999) Trilateral retinoblastoma: a meta-analysis of hereditary retinoblastoma associated with primary ectopic intracranial retinoblastoma. *J Clin Oncol*, 17 (6), 1829-1837.
18. Shields, C.L., Shields, J.A. (2006) Basic understanding of current classification and management of retinoblastoma. *Curr Opin Ophthalmol*, 17 (3), 228-234.
19. Roarty, J.D., McLean, I.W., Zimmerman, L.E. (1988) Incidence of second neoplasms in patients with bilateral retinoblastoma. *Ophthalmology*, 95 (11), 1583-1587.
20. Novetsky, D.E., Abramson, D.H., Kim, J.W., Dunkel, I.J. (2009) Published international classification of retinoblastoma (ICRB) definitions contain inconsistencies--an analysis of impact. *Ophthalmic Genet*, 30 (1), 40-44.
21. Suzuki, S., Yamane, T., Mohri, M., Kaneko, A. (2011) Selective ophthalmic arterial injection therapy for intraocular retinoblastoma: the long-term prognosis. *Ophthalmology*, 118 (10), 2081-2087.
22. Shields, C.L., Meadows, A.T., Leahey, A.M., Shields, J.A. (2004) Continuing challenges in the management of retinoblastoma with chemotherapy. *Retina*, 24 (6), 849-862.
23. Epstein, J.A., Shields, C.L., Shields, J.A. (2003) Trends in the management of retinoblastoma: evaluation of 1,196 consecutive eyes during 1974 to 2001. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus*, 40 (4), 196-203; quiz 217-198.
24. Shields, C.L., Mashayekhi, A., Au, A.K., Czyz, C., Leahey, A., Meadows, A.T. ve diğ erleri. (2006) The International Classification of Retinoblastoma predicts chemoreduction success. *Ophthalmology*, 113 (12), 2276-2280.
25. Honavar, S.G., Singh, A.D., Shields, C.L., Meadows, A.T., Demirci, H., Cater, J. ve diğ erleri. (2002) Postenucleation adjuvant therapy in high-risk retinoblastoma. *Arch Ophthalmol*, 120 (7), 923-931.

26. Shields, C.L., Mashayekhi, A., Cater, J., Shelil, A., Meadows, A.T., Shields, J.A. (2004) Chemoreduction for retinoblastoma. Analysis of tumor control and risks for recurrence in 457 tumors. *Am J Ophthalmol*, 138 (3), 329-337.
27. Shields, C.L., Honavar, S.G., Shields, J.A., Demirci, H., Meadows, A.T., Naduvilath, T.J. (2002) Factors predictive of recurrence of retinal tumors, vitreous seeds, and subretinal seeds following chemoreduction for retinoblastoma. *Arch Ophthalmol*, 120 (4), 460-464.
28. Shields, C.L., Honavar, S.G., Meadows, A.T., Shields, J.A., Demirci, H., Singh, A. ve diğ erleri. (2002) Chemoreduction plus focal therapy for retinoblastoma: factors predictive of need for treatment with external beam radiotherapy or enucleation. *Am J Ophthalmol*, 133 (5), 657-664.
29. Sogn, J.A. (1998) Tumor immunology: the glass is half full. *Immunity*, 9 (6), 757-763.
30. Smyth, M.J., Godfrey, D.I., Trapani, J.A. (2001) A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. *Nat Immunol*, 2 (4), 293-299.
31. Rosenberg, S.A. (2001) Progress in human tumour immunology and immunotherapy. *Nature*, 411 (6835), 380-384.
32. Houghton, A.N., Gold, J.S., Blachere, N.E. (2001) Immunity against cancer: lessons learned from melanoma. *Curr Opin Immunol*, 13 (2), 134-140.
33. Boon, T., van der Bruggen, P. (1996) Human tumor antigens recognized by T lymphocytes. *J Exp Med*, 183 (3), 725-729.
34. Burnet, F.M. (1970) The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res*, 13, 1-27.
35. Fuchs, E.J., Matzinger, P. (1996) Is cancer dangerous to the immune system? *Semin Immunol*, 8 (5), 271-280.

36. Rocha, G., Deschenes, J., Rowsey, J.J. (1998) The immunology of corneal graft rejection. *Crit Rev Immunol*, 18 (4), 305-325.
37. Piali, L., Fichtel, A., Terpe, H.J., Imhof, B.A., Gisler, R.H. (1995) Endothelial vascular cell adhesion molecule 1 expression is suppressed by melanoma and carcinoma. *J Exp Med*, 181 (2), 811-816.
38. Onrust, S.V., Hartl, P.M., Rosen, S.D., Hanahan, D. (1996) Modulation of L-selectin ligand expression during an immune response accompanying tumorigenesis in transgenic mice. *J Clin Invest*, 97 (1), 54-64.
39. Ochsenbein, A.F., Sierro, S., Odermatt, B., Pericin, M., Karrer, U., Hermans, J. ve diğ erleri. (2001) Roles of tumour localization, second signals and cross priming in cytotoxic T-cell induction. *Nature*, 411 (6841), 1058-1064.
40. Ochsenbein, A.F., Klenerman, P., Karrer, U., Ludewig, B., Pericin, M., Hengartner, H. ve diğ erleri. (1999) Immune surveillance against a solid tumor fails because of immunological ignorance. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96 (5), 2233-2238.
41. Ishido, S., Choi, J.K., Lee, B.S., Wang, C., DeMaria, M., Johnson, R.P. ve diğ erleri. (2000) Inhibition of natural killer cell-mediated cytotoxicity by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus K5 protein. *Immunity*, 13 (3), 365-374.
42. Hicklin, D.J., Marincola, F.M., Ferrone, S. (1999) HLA class I antigen downregulation in human cancers: T-cell immunotherapy revives an old story. *Mol Med Today*, 5 (4), 178-186.
43. Garrido, F., Ruiz-Cabello, F., Cabrera, T., Perez-Villar, J.J., Lopez-Botet, M., Duggan-Keen, M. ve diğ erleri. (1997) Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours. *Immunol Today*, 18 (2), 89-95.

44. Farrell, H.E., Vally, H., Lynch, D.M., Fleming, P., Shellam, G.R., Scalzo, A.A. ve diğeri. (1997) Inhibition of natural killer cells by a cytomegalovirus MHC class I homologue in vivo. *Nature*, 386 (6624), 510-514.
45. Cretney, E., Degli-Esposti, M.A., Densley, E.H., Farrell, H.E., Davis-Poynter, N.J., Smyth, M.J. (1999) m144, a murine cytomegalovirus (MCMV)-encoded major histocompatibility complex class I homologue, confers tumor resistance to natural killer cell-mediated rejection. *J Exp Med*, 190 (3), 435-444.
46. Young, M.R., Knies, S. (1984) Prostaglandin E production by Lewis lung carcinoma: mechanism for tumor establishment in vivo. *J Natl Cancer Inst*, 72 (4), 919-922.
47. Torre-Amione, G., Beauchamp, R.D., Koeppen, H., Park, B.H., Schreiber, H., Moses, H.L. ve diğeri. (1990) A highly immunogenic tumor transfected with a murine transforming growth factor type beta 1 cDNA escapes immune surveillance. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87 (4), 1486-1490.
48. Sotomayor, E.M., Fu, Y.X., Lopez-Cepero, M., Herbert, L., Jimenez, J.J., Albarracin, C. ve diğeri. (1991) Role of tumor-derived cytokines on the immune system of mice bearing a mammary adenocarcinoma. II. Down-regulation of macrophage-mediated cytotoxicity by tumor-derived granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J Immunol*, 147 (8), 2816-2823.
49. Plescia, O.J., Smith, A.H., Grinwich, K. (1975) Subversion of immune system by tumor cells and role of prostaglandins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 72 (5), 1848-1851.
50. Oghiso, Y., Yamada, Y., Ando, K., Ishihara, H., Shibata, Y. (1993) Differential induction of prostaglandin E2-dependent and -independent immune suppressor cells by tumor-derived GM-CSF and M-CSF. *J Leukoc Biol*, 53 (1), 86-92.

51. McLemore, T.L., Hubbard, W.C., Litterst, C.L., Liu, M.C., Miller, S., McMahon, N.A. ve diğerleri. (1988) Profiles of prostaglandin biosynthesis in normal lung and tumor tissue from lung cancer patients. *Cancer Res*, 48 (11), 3140-3147.
52. McKallip, R., Li, R., Ladisch, S. (1999) Tumor gangliosides inhibit the tumor-specific immune response. *J Immunol*, 163 (7), 3718-3726.
53. Matsuda, M., Salazar, F., Petersson, M., Masucci, G., Hansson, J., Pisa, P. ve diğerleri. (1994) Interleukin 10 pretreatment protects target cells from tumor- and allo-specific cytotoxic T cells and downregulates HLA class I expression. *J Exp Med*, 180 (6), 2371-2376.
54. Gabrilovich, D.I., Chen, H.L., Girgis, K.R., Cunningham, H.T., Meny, G.M., Nadaf, S. ve diğerleri. (1996) Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. *Nat Med*, 2 (10), 1096-1103.
55. Kiessling, R., Wasserman, K., Horiguchi, S., Kono, K., Sjöberg, J., Pisa, P. ve diğerleri. (1999) Tumor-induced immune dysfunction. *Cancer Immunol Immunother*, 48 (7), 353-362.
56. Antonia, S.J., Extermann, M., Flavell, R.A. (1998) Immunologic nonresponsiveness to tumors. *Crit Rev Oncog*, 9 (1), 35-41.
57. Ganss, R., Limmer, A., Sacher, T., Arnold, B., Hammerling, G.J. (1999) Autoaggression and tumor rejection: it takes more than self-specific T-cell activation. *Immunol Rev*, 169, 263-272.
58. Arnold, B., Schonrich, G., Hammerling, G.J. (1993) Multiple levels of peripheral tolerance. *Immunol Today*, 14 (1), 12-14.

59. Guinan, E.C., Gribben, J.G., Boussiotis, V.A., Freeman, G.J., Nadler, L.M. (1994) Pivotal role of the B7:CD28 pathway in transplantation tolerance and tumor immunity. *Blood*, 84 (10), 3261-3282.
60. Chen, L., Ashe, S., Brady, W.A., Hellstrom, I., Hellstrom, K.E., Ledbetter, J.A. ve diğeri. (1992) Costimulation of antitumor immunity by the B7 counterreceptor for the T lymphocyte molecules CD28 and CTLA-4. *Cell*, 71 (7), 1093-1102.
61. Sakaguchi, S. (2000) Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell*, 101 (5), 455-458.
62. Russell, J.H., White, C.L., Loh, D.Y., Meleedy-Rey, P. (1991) Receptor-stimulated death pathway is opened by antigen in mature T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88 (6), 2151-2155.
63. Radvanyi, L.G., Mills, G.B., Miller, R.G. (1993) Religation of the T cell receptor after primary activation of mature T cells inhibits proliferation and induces apoptotic cell death. *J Immunol*, 150 (12), 5704-5715.
64. Martin, D.R., Miller, R.G. (1989) In vivo administration of histoincompatible lymphocytes leads to rapid functional deletion of cytotoxic T lymphocyte precursors. *J Exp Med*, 170 (3), 679-690.
65. Kirchhoff, S., Muller, W.W., Krueger, A., Schmitz, I., Krammer, P.H. (2000) TCR-mediated up-regulation of c-FLIP short correlates with resistance toward CD95-mediated apoptosis by blocking death-inducing signaling complex activity. *J Immunol*, 165 (11), 6293-6300.
66. Igney, F.H., Behrens, C.K., Krammer, P.H. (2000) Tumor counterattack--concept and reality. *Eur J Immunol*, 30 (3), 725-731.
67. Walker, P.R., Saas, P., Dietrich, P.Y. (1998) Tumor expression of Fas ligand (CD95L) and the consequences. *Curr Opin Immunol*, 10 (5), 564-572.

68. Krammer, P.H. (1997) The tumor strikes back: new data on expression of the CD95(APO-1/Fas) receptor/ligand system may cause paradigm changes in our view on drug treatment and tumor immunology. *Cell Death Differ*, 4 (5), 362-364.
69. French, L.E., Hahne, M., Viard, I., Radlgruber, G., Zanone, R., Becker, K. ve diğeri. (1996) Fas and Fas ligand in embryos and adult mice: ligand expression in several immune-privileged tissues and coexpression in adult tissues characterized by apoptotic cell turnover. *J Cell Biol*, 133 (2), 335-343.
70. Griffith, T.S., Brunner, T., Fletcher, S.M., Green, D.R., Ferguson, T.A. (1995) Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. *Science*, 270 (5239), 1189-1192.
71. Stuart, P.M., Griffith, T.S., Usui, N., Pepose, J., Yu, X., Ferguson, T.A. (1997) CD95 ligand (FasL)-induced apoptosis is necessary for corneal allograft survival. *J Clin Invest*, 99 (3), 396-402.
72. Ziegler, S.F. (2007) FOXP3: not just for regulatory T cells anymore. *Eur J Immunol*, 37 (1), 21-23.
73. DeJaco, C., Duftner, C., Grubeck-Loebenstien, B., Schirmer, M. (2006) Imbalance of regulatory T cells in human autoimmune diseases. *Immunology*, 117 (3), 289-300.
74. Baecher-Allan, C., Brown, J.A., Freeman, G.J., Hafler, D.A. (2001) CD4⁺CD25^{high} regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol*, 167 (3), 1245-1253.

75. Jonuleit, H., Schmitt, E., Stassen, M., Tuetttenberg, A., Knop, J., Enk, A.H. (2001) Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *J Exp Med*, 193 (11), 1285-1294.
76. Levings, M.K., Sangregorio, R., Sartirana, C., Moschin, A.L., Battaglia, M., Orban, P.C. ve diğeri. (2002) Human CD25+CD4+ T suppressor cell clones produce transforming growth factor beta, but not interleukin 10, and are distinct from type 1 T regulatory cells. *J Exp Med*, 196 (10), 1335-1346.
77. Ng, W.F., Duggan, P.J., Ponchel, F., Matarese, G., Lombardi, G., Edwards, A.D. ve diğeri. (2001) Human CD4(+)CD25(+) cells: a naturally occurring population of regulatory T cells. *Blood*, 98 (9), 2736-2744.
78. Piccirillo, C.A., Thornton, A.M. (2004) Cornerstone of peripheral tolerance: naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells. *Trends Immunol*, 25 (7), 374-380.
79. Fontenot, J.D., Gavin, M.A., Rudensky, A.Y. (2003) Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol*, 4 (4), 330-336.
80. Hori, S., Nomura, T., Sakaguchi, S. (2003) Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*, 299 (5609), 1057-1061.
81. Khattri, R., Cox, T., Yasayko, S.A., Ramsdell, F. (2003) An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nat Immunol*, 4 (4), 337-342.
82. Ziegler, S.F. (2006) FOXP3: of mice and men. *Annu Rev Immunol*, 24, 209-226.
83. Fehervari, Z., Sakaguchi, S. (2004) Development and function of CD25+CD4+ regulatory T cells. *Curr Opin Immunol*, 16 (2), 203-208.

84. Chatenoud, L., Bach, J.F. (2006) Adaptive human regulatory T cells: myth or reality? *J Clin Invest*, 116 (9), 2325-2327.
85. Grohmann, U., Orabona, C., Fallarino, F., Vacca, C., Calcinaro, F., Falorni, A. ve diğeri. (2002) CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. *Nat Immunol*, 3 (11), 1097-1101.
86. Wilke, C.M., Wu, K., Zhao, E., Wang, G., Zou, W. (2010) Prognostic significance of regulatory T cells in tumor. *Int J Cancer*, 127 (4), 748-758.
87. Daniele, N., Scerpa, M.C., Landi, F., Caniglia, M., Miele, M.J., Locatelli, F. ve diğeri. (2011) T(reg) cells: collection, processing, storage and clinical use. *Pathol Res Pract*, 207 (4), 209-215.
88. MacMillan, M.L., Weisdorf, D.J., Brunstein, C.G., Cao, Q., DeFor, T.E., Verneris, M.R. ve diğeri. (2009) Acute graft-versus-host disease after unrelated donor umbilical cord blood transplantation: analysis of risk factors. *Blood*, 113 (11), 2410-2415.
89. Cohen, J.L., Boyer, O. (2006) The role of CD4⁺CD25^{hi} regulatory T cells in the pathogenesis of graft-versus-host disease. *Curr Opin Immunol*, 18 (5), 580-585.
90. Pabst, C., Schirutschke, H., Ehninger, G., Bornhauser, M., Platzbecker, U. (2007) The graft content of donor T cells expressing gamma delta TCR⁺ and CD4⁺foxp3⁺ predicts the risk of acute graft versus host disease after transplantation of allogeneic peripheral blood stem cells from unrelated donors. *Clin Cancer Res*, 13 (10), 2916-2922.
91. Rezvani, K., Mielke, S., Ahmadzadeh, M., Kilical, Y., Savani, B.N., Zeilich, J. ve diğeri. (2006) High donor FOXP3-positive regulatory T-cell (Treg) content is associated with a low risk of GVHD following HLA-matched allogeneic SCT. *Blood*, 108 (4), 1291-1297.

92. Wolf, D., Wolf, A.M., Fong, D., Rumpold, H., Strasak, A., Clausen, J. ve diğerleri. (2007) Regulatory T-cells in the graft and the risk of acute graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation. *Transplantation*, 83 (8), 1107-1113.
93. Gavin, M.A., Torgerson, T.R., Houston, E., DeRoos, P., Ho, W.Y., Stray-Pedersen, A. ve diğerleri. (2006) Single-cell analysis of normal and FOXP3-mutant human T cells: FOXP3 expression without regulatory T cell development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103 (17), 6659-6664.
94. Morgan, M.E., van Bilsen, J.H., Bakker, A.M., Heemskerk, B., Schilham, M.W., Hartgers, F.C. ve diğerleri. (2005) Expression of FOXP3 mRNA is not confined to CD4+CD25+ T regulatory cells in humans. *Hum Immunol*, 66 (1), 13-20.
95. Wang, J., Ioan-Facsinay, A., van der Voort, E.I., Huizinga, T.W., Toes, R.E. (2007) Transient expression of FOXP3 in human activated nonregulatory CD4+ T cells. *Eur J Immunol*, 37 (1), 129-138.
96. Medawar, P.B. (1945) A second study of the behaviour and fate of skin homografts in rabbits; a report to the War Wounds Committee of the Medical Research Council. *J Anat*, 79, 157-176.
97. Medawar, P.B. (1948) Immunity to homologous grafted skin; the fate of skin homografts transplanted to the brain, to subcutaneous tissue, and to the anterior chamber of the eye. *Br J Exp Pathol*, 29 (1), 58-69.
98. Niederkorn, J.Y., Streilein, J.W. (1982) Induction of anterior chamber-associated immune deviation (ACAID) by allogeneic intraocular tumors does not require splenic metastases. *J Immunol*, 128 (6), 2470-2474.
99. Streilein, J.W., Niederkorn, J.Y. (1981) Induction of anterior chamber-associated immune deviation requires an intact, functional spleen. *J Exp Med*, 153 (5), 1058-1067.

100. Katagiri, K., Zhang-Hoover, J., Mo, J.S., Stein-Streilein, J., Streilein, J.W. (2002) Using tolerance induced via the anterior chamber of the eye to inhibit Th2-dependent pulmonary pathology. *J Immunol*, 169 (1), 84-89.
101. Zhang-Hoover, J., Finn, P., Stein-Streilein, J. (2005) Modulation of ovalbumin-induced airway inflammation and hyperreactivity by tolerogenic APC. *J Immunol*, 175 (11), 7117-7124.
102. Streilein, J.W. (1999) Immunoregulatory mechanisms of the eye. *Prog Retin Eye Res*, 18 (3), 357-370.
103. Streilein, J.W., Wilbanks, G.A., Cousins, S.W. (1992) Immunoregulatory mechanisms of the eye. *J Neuroimmunol*, 39 (3), 185-200.
104. Wilbanks, G.A., Streilein, J.W. (1990) Characterization of suppressor cells in anterior chamber-associated immune deviation (ACAID) induced by soluble antigen. Evidence of two functionally and phenotypically distinct T-suppressor cell populations. *Immunology*, 71 (3), 383-389.
105. Kopelman, J.E., McLean, I.W., Rosenberg, S.H. (1987) Multivariate analysis of risk factors for metastasis in retinoblastoma treated by enucleation. *Ophthalmology*, 94 (4), 371-377.
106. Abramson, D.H., Notterman, R.B., Ellsworth, R.M., Kitchin, F.D. (1983) Retinoblastoma treated in infants in the first six months of life. *Arch Ophthalmol*, 101 (9), 1362-1366.
107. Wilson, M.W., Rodriguez-Galindo, C., Billups, C., Haik, B.G., Laningham, F., Patay, Z. (2009) Lack of correlation between the histologic and magnetic resonance imaging results of optic nerve involvement in eyes primarily enucleated for retinoblastoma. *Ophthalmology*, 116 (8), 1558-1563.

108. Schueler, A.O., Hosten, N., Bechrakis, N.E., Lemke, A.J., Foerster, P., Felix, R. ve diğeri. (2003) High resolution magnetic resonance imaging of retinoblastoma. *Br J Ophthalmol*, 87 (3), 330-335.
109. de Graaf, P., Moll, A.C., Imhof, S.M., van der Valk, P.,Castelijns, J.A. (2006) Retinoblastoma and optic nerve enhancement on MRI: not always extraocular tumour extension. *Br J Ophthalmol*, 90 (6), 800-801.
110. de Graaf, P., Barkhof, F., Moll, A.C., Imhof, S.M., Knol, D.L., van der Valk, P. ve diğeri. (2005) Retinoblastoma: MR imaging parameters in detection of tumor extent. *Radiology*, 235 (1), 197-207.
111. Brisse, H.J., Guesmi, M., Aerts, I., Sastre-Garau, X., Savignoni, A., Lumbroso-Le Rouic, L. ve diğeri. (2007) Relevance of CT and MRI in retinoblastoma for the diagnosis of postlaminar invasion with normal-size optic nerve: a retrospective study of 150 patients with histological comparison. *Pediatr Radiol*, 37 (7), 649-656.
112. Bellaton, E., Bertozzi, A.I., Behar, C., Chastagner, P., Brisse, H., Sainte-Rose, C. ve diğeri. (2003) Neoadjuvant chemotherapy for extensive unilateral retinoblastoma. *Br J Ophthalmol*, 87 (3), 327-329.
113. Armenian, S.H., Panigrahy, A., Murphree, A.L.,Jubran, R.F. (2008) Management of retinoblastoma with proximal optic nerve enhancement on MRI at diagnosis. *Pediatr Blood Cancer*, 51 (4), 479-484.
114. Chantada, G.L., Gonzalez, A., Fandino, A., de Davila, M.T., Demirdjian, G., Scopinaro, M. ve diğeri. (2009) Some clinical findings at presentation can predict high-risk pathology features in unilateral retinoblastoma. *J Pediatr Hematol Oncol*, 31 (5), 325-329.
115. Wilson, M.W., Qaddoumi, I., Billups, C., Haik, B.G.,Rodriguez-Galindo, C. (2011) A clinicopathological correlation of 67 eyes primarily enucleated for advanced intraocular retinoblastoma. *Br J Ophthalmol*, 95 (4), 553-558.

116. Kashyap, S., Sethi, S., Meel, R., Pushker, N., Sen, S., Bajaj, M.S. ve diğerleri. (2012) A histopathologic analysis of eyes primarily enucleated for advanced intraocular retinoblastoma from a developing country. *Arch Pathol Lab Med*, 136 (2), 190-193.
117. Kahaly, G.J., Shimony, O., Gellman, Y.N., Lytton, S.D., Eshkar-Sebban, L., Rosenblum, N. ve diğerleri. (2011) Regulatory T-cells in Graves' orbitopathy: baseline findings and immunomodulation by anti-T lymphocyte globulin. *J Clin Endocrinol Metab*, 96 (2), 422-429.
118. McMurchy, A.N., Levings, M.K. (2013) In Vitro Generation of Human T Regulatory Cells: Generation, Culture, and Analysis of FOXP3-Transduced T Cells. *Methods Mol Biol*, 946, 115-132.
119. Rech, A.J., Mick, R., Martin, S., Recio, A., Aqui, N.A., Powell, D.J., Jr. ve diğerleri. (2012) CD25 blockade depletes and selectively reprograms regulatory T cells in concert with immunotherapy in cancer patients. *Sci Transl Med*, 4 (134), 134ra162.