

← Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya
(sol yandaki gibi) olacak .



← Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;
Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak

← Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**KÜÇÜK HÜCRELİ DIŞI AKCİĞER KANSERLİ
OLGULARDA MEDİASTİNAL LENF NODU
DİSEKSİYONU VE SİTOTOKSİK T LENFOSİT
İNHİBİTÖR RESEPTÖR İLİŞKİSİ**

AYŞE ENGİN

**DANIŞMAN
PROF. DR. ESİN ÇETİN**

**İMMÜNOLOJİ ANABİLİM DALI
İMMÜNOLOJİ PROGRAMI**

İSTANBUL-2019

TEZ ONAYI**YÜKSEK LİSANS TEZİ ONAYI**

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü İmmünoloji Anabilim Dalı, İmmünoloji Programı'nda Yüksek Lisans öğrencisi Ayşe ENGİN tarafından Prof. Dr. Esin ÇETİN'in danışmanlığında hazırlanan "**Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri Olgularında Mediastinal Lenf Nodu Diseksiyonu ve Sitotoksik T Lenfosit İnhibitör Reseptör İlişkisi**" başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 19.06.2019 tarihinde yapılan Tez Savunma oturumunda başarılı bulunmuş ve Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Günnur DENİZ
İ.Ü. Aziz Sancar DETAE
İmmünoloji Anabilim Dalı



Prof. Dr. Esin ÇETİN
İ.Ü. Aziz Sancar DETAE
İmmünoloji Anabilim Dalı



Prof. Dr. Akif TURNA
İ.Ü. Cerrahpaşa Cerrahpaşa Tıp Fak.
Cerr. Tıp Bil. B. Göğüs Cerrahisi A.D.

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.



Ayşe Engin

İTHAF

Annem Selma Engin'e ve babam Abdulkadir Engin'e ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Tezimin planlanmasında ve deneysel çalışmalarım boyunca her konuda desteğini esirgemeyen, bilgi ve deneyimleriyle eğitimime katkıda bulunan çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Esin Çetin'e

Eğitimime katkıda bulunan, yol gösteren değerli ikinci danışman hocam Prof. Dr. Günnur Deniz'e,

Tezimin deneysel çalışmalarına katkılarından dolayı Abdullah Yılmaz'a,

Yardımları ve bilgi birikimleri ile her zaman destek olan kıymetli bir doktor ve hocam olan Prof. Dr. Akif Turna'ya, ekibine ve Cerrahpaşa göğüs cerrahisi poliklinik hemşiresi Leyla hanıma,

Tezimin istatistiksel hesaplamalardaki ve veri yorumlamalarındaki desteğinden dolayı Dr. Öğr. Üyesi Fehim Esen'e,

Yüksek lisans eğitimim süresince bilimsel fikir ve düşünceleriyle bana yardım eden bölümümün saygıdeğer hocalarına ve her zaman yardımcı olan, tecrübelerini paylaşan değerli iş arkadaşlarıma; Prof. Dr. Ali Osman Gürol, Doç. Dr. Suzan Çınar, Doç. Dr. Umut Can Küçüksezer, Doç. Dr. Sema Bilgiç Gazioğlu, Dr. Metin Yusuf Gelmez, Msc. İlhan Tahrallı, Msc. Gülce Özçit ve Fatma Betül Öktelik'e,

İhtiyacım olan her aşamada yardımlarını esirgemeyen sabırlı ve özverili arkadaşlarım; Uzm. Dr. Duygu İlke Çıkman, Uzm. Dr. Şengül Beyaz, Uzm. Dr. Gizem Ayan, Dr. Melek Ağkoç ve Yeliz Ekici'ye,

Güleryüzleri ile manevi desteklerini her zaman hissettiğim naif oda arkadaşlarım; Prof. Dr. Elif Özkök, Prof. Dr. Gaye Erten Yurdağül ve Dr. Öğr. Üyesi Feyza Nur Tuncer'e,

Tezimin yazım aşamaları için bana manevi destek olan ev arkadaşım Büşra Yılmaz ve Zeynep Demirdağ'a

Hayatımın her aşamasında maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyen ve yanımda olan sevgili anneme, babama ve kardeşlerim Havva ve Talha'ya sonsuz teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No:26280



İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	ii
BEYAN	iii
İTHAF	iv
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vii
TABLolar LİSTESİ	x
ŞEKİLLER LİSTESİ	xi
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	xiii
ÖZET	xv
ABSTRACT	xvi
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Akciğer Kanseri	4
2.1.1. Epidemiyoloji	4
2.1.2. Etiyoloji	4
2.1.2.1. Tütün ve Tütün Ürünlerinin Kullanımı	5
2.1.2.2. Genetik Faktörler	5
2.1.2.3. Yaş ve Cinsiyet	6
2.1.2.4. Beslenme ve Obezite	6
2.1.2.5. Kronik Hastalıklar ve Enfeksiyonlar	7
2.1.2.6. Çevresel Etmenler (Hava Kirliliği, Asbest)	7
2.1.3. Klinik Belirtileri	8
2.1.4. Evreleme	9
2.1.4.1. Video Yardımlı Mediastinal Lenfadenektomi	10
2.2. Akciğer Kanseri ve Bağışıklık Sistemi	12
2.3. T lenfositler	13
2.3.1. T lenfositleri ve Akciğer Kanseri	16
2.4. İmmün Kontrol Noktaları	19
2.4.1. Programlı Hücre Ölüm Reseptörü	20
2.4.2. Sitotoksik T Lenfosit Antijen-4 ve CD28 Molekülü	21

2.4.3. Çözünebilir Programlı Hücre Ölüm Reseptörü ve Çözünebilir Sitotoksik T Lenfosit Antijen-4	22
2.5. Sitokinler	23
2.5.1. Tümör Nekrozis Faktör Alfa	24
2.5.2. Interferon Gamma	25
3. GEREÇ VE YÖNTEM	27
3.1. Çalışma Grubu	27
3.1.1. Olgu Seçimi	27
3.1.2. Araştırmaya Dahil Edilme ve Dışlanma Kriterleri	27
3.1.2.1. Genel Dahil Edilme Kriterleri	27
3.1.2.2. Dahil Edilmeme Dışlanma Kriterleri	27
3.2. Lenf Nodu ve Periferik Kan Örneklerinin Patoloji ve İmmünoloji Laboratuvarına Transferi	29
3.3. Mediastinal Lenf Nodlarından Lenfosit İzolasyonu	29
3.4. Periferik Kandan Mononükleer Hücre İzolasyonu	30
3.5. A549 Hücre Serisinin Kültür aşamaları	30
3.6. Mediastinal Lenf Nodu Biyopsileri ve Periferik Kan Örneklerinde Lenfosit Alt Grupları ve Sitotoksik T Hücrelerinde İnhibitör Reseptör Ekspresyonlarının Saptanması	31
3.7. PD1 ve CTLA-4 Eksprese Eden CD8 ⁺ Sitotoksik T Lenfositlerinde Hücre İçi IFN- γ ve TNF- α Sitokin Salınımının Belirlenmesi	32
3.8. CD8 ⁺ Sitotoksik T Lenfositlerinde Sitotoksik Aktivitenin Saptanması	34
3.9. Plazma Örneklerinde Çözünebilir CTLA-4, PD-1 ve PDL-1 Düzeylerinin Tayini	35
3.9.1. Çözünebilir PD-1 ELISA Tayini	35
3.9.2. Çözünebilir CTLA-4 ELISA Tayini	36
3.9.3. Çözünebilir PDL-1 ELISA Tayini	36
3.10. İstatistiksel analiz	37
4. BULGULAR	38
4.1. T Lenfosit Alt Grupları ve HLA-DR Ekspresyonlarının Belirlenmesi	38
4.2. Doğal Öldürücü Hücre (NK), NKT ve B Lenfosit Oranları	39
4.3. CD28 ⁺ CD8 ⁺ Regülatör Sitotoksik T lenfosit Ekspresyonlarının Belirlenmesi	40

4.4. Sitotoksik T lenfositlerinde PD-1 ve CTLA-4 Ekspresyon Düzeylerinin Değerlendirilmesi.....	42
4.5. Sitotoksik T lenfositlerinde IFN- γ ve TNF- α Salınımının Belirlenmesi.....	45
4.6. CTLA-4 ve PD-1 Ekspresyonunun Sitotoksik T lenfositlerinde IFN- γ , TNF- α Salınımına Etkisi	46
4.7. Sitotoksik T lenfositlerinde Granzim Düzeylerinin Belirlenmesi	49
4.8. sCTLA-4, sPD-1 ve sPDL-1 Düzeylerinin ELISA Metodu ile Belirlenmesi	51
5. TARTIŞMA.....	53
KAYNAKLAR	62
HAM VERİLER	71
FORMLAR.....	72
ETİK KURUL KARARI	74
PATENT İZİN HAKKI.....	76
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	77
ÖZGEÇMİŞ	78

TABLolar LİSTESİ

Tablo 2-1 : 8. TNM SINIFLANDIRMASI	10
Tablo 2-2 : Çözünebilir Reseptörler ve Ligandlar.....	23
Tablo 3-1: KHDak'lı Hastaların Klinik Özellikleri	28
Tablo 3-2 : Lenfosit Alt Grupları ve Tc Hücrelerinde İnhibitör Reseptör Ekspresyonlarının Tayininde Kullanılan Monoklonal Antikorlar.....	32
Tablo 3-3 : CD8 ⁺ Tc Lenfositlerinde Hücre İçi IFN- γ ve TNF- α Sitokin Salınımının Belirlenmesi İçin Kullanılan Monoklonal Antikorlar.....	34
Tablo 3-4: Sitotoksik T Lenfositlerde CD107a ve Granzim A Salınımının Tayini için Kullanılan Monoklonal Antikorlar	35

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1 : Videomediastinoskop [59].....	12
Şekil 2-2: Sitotoksik T lenfositlerin direkt öldürme mekanizmaları [74]	15
Şekil 2-3: Sitotoksik T lenfosit indirekt öldürme mekanizması [74]	16
Şekil 2-4 : Akciğer tümörü ve mikro çevresi [68]	18
Şekil 2-5 : CTLA-4 ve PD-1/PD-L1 yolakları [101].....	22
Şekil 3-1: Heparinli kan ve lenf nodu örnekleri için tasarlanan deneysel akış şeması.....	29
Şekil 4-1: T lenfosit alt grup oranları ve HLADR ekspresyon düzeyleri.....	38
Şekil 4-2: CD19 ⁺ B, NK ve NKT hücre oranlarının periferik kan ve mediastinal lenf nodu analizleri	39
Şekil 4-3: KHDAK VAMLA öncesi periferik kan ve mediastinal lenf nodu örnekleri immünofenotiplendirme analizlerinde Tc, Th, B, NK ve NKT lenfosit oranları dot plot görüntüleri.....	40
Şekil 4-4: Aktivatör ve inhibitör sitotoksik T lenfositlerinin sağlıklı, VAMLA öncesi, sonrası periferik kan ve lenf nodu oranları alt grup analizleri.....	41
Şekil 4-5: Aktivatör ve inhibitör sitotoksik T lenfositlerinin sağlıklı kontrol, VAMLA öncesi ve lenf nodundaki akan hücre görüntüleri.....	41
Şekil 4-6: Stimülasyonsuz ve stimülasyon şartlarında sitotoksik T lenfositlerinde aktivatör ve inhibitör reseptör oranları	43
Şekil 4-7 : KHDAK'li grup periferik kan ve lenf nodu (lenf nodunda PD-1 ve CTLA-4 ekspresyonu artmış) CD3 ⁺ CD8 ⁺ Tc hücrelerinde PD-1 ve CTLA-4 ekspresyonu.....	43
Şekil 4-8: KHDAK'li grupta VAMLA sonrası stimülasyonsuz ve stimülasyon sonrası CD3 ⁺ CD8 ⁺ Tc hücrelerinde PD-1 ve CTLA-4 ekspresyonundaki değişimler	44
Şekil 4-9 : KHDAK ve sağlıklı bireylerde sitotoksik T lenfositlerinden salgılanan IFN- γ ve TNF- α ekspresyonunun değerlendirilmesi	45
Şekil 4-10: KHDAK'li grup VAMLA öncesi periferik kan ve lenf nodu CD3 ⁺ CD8 ⁺ Tc hücrelerinde hücre içi TNF- α ve IFN- γ ekspresyonlarının akan hücre ölçeği görüntüleri.....	46

Şekil 4-11 : CTLA-4 ve PD-1 inhibitör kontrol noktası reseptörlerinin sitotoksik T lenfositlerinden salgılanan IFN- γ ve TNF- α salınımına etkisi.....	47
Şekil 4-12 : CTLA-4 ve PD-1 inhibitör kontrol noktası reseptör ekspresyonunun VAMLA sonrası ve mediastinal lenf nodu sitotoksik T lenfositlerinden salgılanan IFN- γ ve TNF- α salınımına etkisi.....	48
Şekil 4-13 : Sağlıklı periferik kan ve KHDAK VAMLA öncesi periferik kan örneklerinde CTLA-4 ve PD-1 inhibitör kontrol noktası reseptör ekspresyonunun sitotoksik T lenfositlerinden salgılanan IFN- γ ve TNF- α salınımına etkisi.....	49
Şekil 4-14 : Sitotoksik T lenfositlerden stimülasyonsuz (US) ve A549 hücre serisi ile stimülasyon sonrası salınan granzim A ekspresyonlarının değerlendirilmesi	50
Şekil 4-15 : VAMLA öncesi periferik kan ve lenf nodu örneklerinde CD8 ⁺ T lenfositlerinde stimülasyonsuz (US) ve A549 hücre serisi ile stimülasyon sonrası granzim A ekspresyonu akan hücre ölçer görüntüleri.....	51
Şekil 4-16 : VAMLA öncesi ve sonrası KHDAK hastaları ve sağlıklı bireylerden alınan plazma örneklerinde sPD-1, sPDL-1 ve sCTLA-4 düzeyleri	52

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

ACTH: Adrenokortikotropik hormon

ADH: Antidiüretik hormon

ALK: Anaplastik lenfoma kinaz

ARG1: Arginaz 1

BRAF: B-Raf Proto-Onkogen, Serin/Tirozin Kinaz

COX2: Siklooksijenaz 2

CTLA-4: Sitotoksik T lenfosit antijen 4

EGFR : Epidermal büyüme faktörü reseptörü

EML-4: Ekinoderm Mikrotübül ilişkili protein 4 benzeri

HIV: İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü

IDO: İndolamin 2,3 di-oksijenaz

iNOS: İndüklenebilir nitrik oksit sentaz

IFN- γ : İnterferon gamma

JAK2: Janus Kinaz 2

JAK3: Janus Kinaz 3

KHAK: Küçük hücreli akciğer kanseri

KHDAK: Küçük hücreli dışı akciğer kanseri

KOAH: Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı

KRAS: KRAS Proto-Onkogen Gtpaz

LN: Lenf Nodu

MHC: Major histokompatibilite kompleks

miRNA: mikroRNA

MMP-9: Matriks metalloproteinaz 9

NK: Doğal öldürücü hücreler

PD-L1: Programlı hücre ölüm reseptörü 1

PD-L2: Programlı hücre ölüm reseptörü 2

PGE2: Prostaglandin E2

PKMH: Periferik Kan Mononükleer Hücre

ROS1: Reaktif Oksijen

sCTLA-4: Çözünebilir CTLA-4

SHP2: Protein tirozin fosfataz 2 enzimi

sPD-1: Çözünebilir PD-1

STAT 3: Aktivatör Transkripsiyon 3

Tc: Sitotoksik T hücresi

TGF- β : Transforme Edici Büyüme Faktörü -Beta

Th: Yardımcı T hücresi

THR: T hücre reseptörü

TNFR1: Tümör Nekroz Faktörü Reseptör 1

TNFR2: Tümör Nekroz Faktörü Reseptör 2

TNF- α : Tümör nekrotize edici faktör alfa

TTIA: Transtorasik iğne aspirasyonu

Treg: Regülatör T hücre

VAMLA: Video yardımcı mediastinal lenfadenektomi

VEGF: Vasküler endotelial büyüme faktör

ÖZET

Engin A. (2019). Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri Olgularda Mediastinal Lenf Nodu Diseksiyonu Sitotoksik T Lenfosit İnhibitör Reseptör İlişkisi

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İmmünoloji A.D. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul. 2019

Küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) kansere bağlı ölüm nedenleri arasında ilk sıradadır. Evreleme amacı ile uygulanan video yardımcı mediastinoskopik lenfadenektominin (VAMLA) sağkalımı arttırdığı gösterilmiştir. Çalışmamızda VAMLA uygulanan KHDAK hastalarında sitotoksik T (Tc) lenfositlerinin fonksiyon ve fenotipleri incelenmiştir.

Çalışmaya VAMLA uygulanan 17 T1-4N0-2M0 KHDAK hastasıyla, 20 sağlıklı birey dahil edilmiştir. Hastalarda; preoperatif periferik kan (PK), lenf nodu (LN), postop 2. hafta periferik kan örnekleri, sağlıklılarda ise PK örneği alınmıştır. Tc lenfositlerinde PD-1, CTLA-4 ve CD28 ekspresyonları, TNF- α & IFN- γ salınımları ve sitotoksik aktiviteleri akan hücre ölçerle değerlendirilmiştir. sPD-1, sPDL-1 ve sCTLA-4 düzeyleri ELISA'yla ölçülmüştür.

LN Tc hücrelerinde; CTLA-4, PD-1 ekspresyonunun arttığı, CD8⁺CD28⁻ inhibitör hücre oranının kana kıyasla yüksek ve CD8⁺CD28⁺ aktivatör hücre oranlarında düşük izlenmiştir. KHDAK hastalarında, sağlıklılara kıyasla PK CD3⁺CD8⁺CD28⁺ hücre oranları daha düşük ve CD3⁺CD8⁺CD28⁻ hücre oranları ise daha yüksekti. VAMLA sonrasında PK Tc hücrelerinde PD-1 ve CTLA-4 ekspresyonu azalmış, ancak CD28 ekspresyonu ve sitokin salınımı değişmemiştir. LN Tc lenfositlerinin TNF- α ve IFN- γ TNF- α ekspresyonları PK'ya kıyasla anlamlı olarak düşüktü. Tüm gruplardaki CTLA-4 eksprese eden Tc lenfositlerinde, hem IFN- γ hem de TNF- α salınımı baskılamıştır. PK Tc lenfositlerinde granzim A salınımı KHDAK hastalarında sağlıklı bireylere kıyasla azalmış, ancak VAMLA sonrası PK'da granzim A salınımı artmıştır. Ayrıca plazma sCTLA-4 düzeyi KHDAK'li olgularda, sağlıklı bireylere göre yüksek saptanmıştır.

Tümörü drene eden LN'larında CD8⁺ Tc hücrelerinin efektör fonksiyonları azalmış, baskılayıcı fenotip ise artmıştır. VAMLA sonrasında immün kontrol noktası reseptörlerinden PD-1 ve CTLA-4'teki azalmaya paralel olarak Tc hücrelerindeki fonksiyon kaybı düzelmiştir. Tc hücrelerindeki bu etki sağkalım artışında rol oynamış olabilir.

Anahtar kelimeler: Sitotoksik T hücre, KHDAK, VAMLA, PD-1, CTLA-4.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No:26280

ABSTRACT

Engin A. (2019). The Effect of Mediastinal Lymph Node Dissection on Inhibitory Receptor Expression of Cytotoxic T Lymphocyte in Non-Small Cell Lung Cancer Patients

Istanbul University, Institute of Health Science, Aziz Sancar Institute of Experimental Medicine, Department of Immunology, Msc Thesis. Istanbul, 2019.

Non-small cell lung cancer (NSCLC) is leading cause of cancer-related death. Video-assisted mediastinoscopic lymphadenectomy (VAMLA) increases survival. We evaluated the phenotype and function of cytotoxic T cells (Tc) in NSCLC patients, who underwent VAMLA.

We included 17 T1-4N0-2M0 NSCLC patients and 20 healthy subjects. Preoperative peripheral blood, lymph node (LN), postoperative 2nd-week blood samples were taken in patients. Healthy subjects donated one blood sample. PD1, CTLA-4 and CD28 expression, TNF- α & IFN- γ secretion, and cytotoxic activity of Tc lymphocytes were evaluated by flow-cytometry. sPD-1, sPDL-1 and sCTLA-4 was measured with ELISA.

In LN Tc cells; CTLA-4, PD-1 expression was increased; the ratio of CD8⁺CD28⁻ inhibitor cells was lower and CD8⁺CD28⁺ activator cells was higher compared to blood. In NSCLC, the ratio of CD3⁺CD8⁺CD28⁺ cells was lower and CD3⁺CD8⁺CD28⁻ cells was higher in blood. After VAMLA, expression of PD-1 and CTLA-4 was reduced in blood Tc, but CD28 expression and cytokine secretion remained unchanged. The ratio of TNF- α and IFN- γ ⁺TNF- α ⁺ expressing Tc cells was significantly-lower in LN compared to blood. CTLA-4 expressing Tc cells secreted less IFN- γ and TNF- α . Granzyme A secretion was lower in blood Tc cells in NSCLC, but granzyme A expression increased after VAMLA. Plasma sCTLA-4 levels were higher in NSCLC.

The effector functions of CD8⁺ Tc cells are reduced and suppressive phenotype is increased in tumor-draining lymph nodes. After VAMLA, the functional loss in Tc cells improved along with a decrease of PD-1 and CTLA-4 expression. This effect of VAMLA on Tc cells might contribute to its effect on survival rates.

Key Words: Cytotoxic T cells, NSCLC, VAMLA, lymph node, PD-1, CTLA-4.

This study was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No:26280

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Akciğer kanseri, gelişmiş ülkelerde kalp hastalıklarının ardından ikinci ölüm nedenidir ve kansere bağlı ölümler arasında ilk sırayı almaktadır. Akciğer kanserinde başlıca risk faktörlerinin sigara içimi ve pasif maruziyet, sanayileşmenin getirdiği hava kirliliği, genetik faktörler, mesleki nedenler, cinsiyet, diyet, kronik akciğer hastalıkları olduğu gösterilmiştir [1]. Tanı anında hastaların %80'i ileri evrededir ve 5 yıllık ortalama sağkalım süresi %5-15 arasındadır. KHDAK olgularında klinik olarak tedavi yönteminin değerlendirmesinde, opera edilebilir olgularda cerrahi tedavi seçiminde, prognozun belirlenmesi ve araştırma verileri ile klinik sonuçların karşılaştırılmasında TNM sınıflandırması kullanılmaktadır [2]. Küçük hücreli akciğer kanserinde primer tedavi kemoterapi ve/veya radyoterapi iken, KHDAK'de seçkin tedavi cerrahidir. Evreleme için farklı sistemler kullanılsa da en çok kabul göreni TNM [tümör boyutu (T), lenf nodu tutulumu (N), metastaz (M)] sınıflamasıdır. Bu evrelemeye göre T1aN0M0 (Evre IA) en erken evredir ve bu evredeki hastaların en iyi tedavi şekli olan cerrahi tedavi sonrası en çok yaşaması beklenmektedir. Ancak Evre IA olgularda bile 5 yıllık yaşam oranı %73'tür. Akciğer kanserli olguların uygun şekilde evrelendirilmesi, tedavi yönteminin seçimi ve prognoz açısından önemlidir. Bu konuda deneyimli merkezlerin sonuçlarına bakıldığında; cerrahi tedavi uygulanan hasta grubunda 5 yıllık sağkalım oranı evre IA için %67, evre IIA için %55 ve evre IIIA için %23 olarak bildirilmektedir [3].

KHDAK evrelemesinde en önemli noktalardan biri lenf nodu tutulumudur ve evrelemede mediastinal lenf nodu tutulumu (N2), intrapulmoner, hiler ya da intrapulmoner lenf nodu tutulumuna (N1) kıyasla daha önem teşkil etmektedir [4]. Klasik evreleme yerine T, N ve M faktörleri dışında başka faktörlerin olduğu ve bu faktörlerin gerek klinik sonuçlara dair öngörüyü gerek tedavi seçiminde başarıyı arttıracakı düşünülmektedir. Akciğer kanserli olgularda, ameliyat öncesi yapılan ve hastaların cerrahi rezeksiyona uygunluğunu belirleyen işlemlerden biri, mediastinal lenf nodlarının tutulumunu değerlendirmek için yapılan ileri bir mediastinoskopi yöntemi olan 'videomediastinoskopi yardımcı lenfadenektomi (Video-assisted mediastinoscopic lymphadenectomy; VAMLA)'dir [5]. Bu metot, mediastinal lenf nodu tutulumunu saptamak için yapılan doğruluğu en yüksek (mevcut lenf nodu tutulumunu en büyük doğru-pozitiflik ve doğru negatiflik ile bulan) yöntemdir. Ayrıca, bu yöntemin uygulandığı ve ardından akciğer kanseri rezeksiyonu yapılan olgularda, standart mediastinoskopi ardından rezeksiyon yapılan hastalara göre sağkalım daha yüksek bulunmuştur [6].

T hücreleri adaptif immün cevabın düzenlenmesinde ve hastalıkların patogeneğinde anahtar rol oynamakta aynı zamanda tümör hücrelerinin yok edilmesine aracılık etmektedir [7]. T hücreleri fenotipik ve fonksiyonel olarak esas olarak $CD3^+CD4^+$ yardımcı T (Th) ve $CD3^+CD8^+$ sitotoksik (Tc) hücrelerinden oluşmaktadır. CD8 eksprese eden Tc hücreler hücrel immün sistemin kritik bir komponentidir ve hücre aracılı anti-tümöral immünitede önemli rollere sahiptir. $CD8^+$ Tc hücrelerinin başlıca fonksiyonları enfeksiyonları kontrol altına almak ve tümör gelişimini engellemektir ve bu hücrelerin eksprese ettiği özgün T hücre reseptörleri antijen sunucu hücre tarafından sunulan peptid/MHC sınıf I komplekslerini tanımaktadır. T hücre reseptör uyarımı sonrası bu hücreler aktive olmakta ve fonksiyonel hale gelmektedir. Tümörün $CD8^+$ T hücrelerinden kaçış mekanizmalarından biri tümör hücrelerinde HLA sınıf I molekül ekspresyonlarının baskılanmasıdır. Akciğer kanserlerinde bu mekanizmanın kanser gelişiminde önemli rol oynadığı ve uygulanan anti-tümöral aşılarda başarıya ulaşmadığı gösterilmiştir. KHDAK genel olarak immüjenitesi düşük bir kanser türüdür [8]. Fonksiyonel Tc lenfositleri interferon- γ (IFN- γ) ve tümör nekrotize edici faktör (TNF)- α gibi proenflamatuvar sitokinler salgılamakta ve T hücre reseptörü tarafından MHC sınıf I aracılı sunulan yabancı peptitleri tanıyarak hedef hücrenin lizisine yol açmaktadır. $CD8^+$ Tc hücreler çoğalma, aktivasyon ve farklılaşma periyodunda sitotoksik efektör fonksiyonlarını kazanmaktadır. Patojenik sürecin çözülmesini takiben efektör $CD8^+$ T hücrelerinin çoğu apoptoza uğrarken küçük bir alt grubu uzun ömürlü bellek hücreleri halini almaktadır. Tc hücreleri hedef hücre ile immünolojik sinaps oluşturdıkları zaman sitolitik efektör proteinler salgılayarak tümör hücre ve hücre içi patojenleri granül ya da reseptör aracılı mekanizmalarla yok ederler. Bu hücrelerin esas öldürme mekanizması hedefi tanımayı takiben ekzositozla salınan perforin ve granzim gibi litik proteinler içeren hazır granüllerin salınması yoluyla olmaktadır. İkinci yolla ise hedef hücre yüzeyinde reseptör birleşmesi rol oynamakta ve bu olayda Fas-Fas Ligand gibi reseptörler klasik olarak kaspaz bağlı apoptozu başlatmaktadır. Sitolitik granüller özelleşmiş sekretuar lizozomlardır ve bu granüller perforin ve granzim olarak adlandırılan serin proteazlar içermektedir [9]. Birçok çalışmada KHDAK'de $CD8^+$ Tc hücrelerinin tek başına ya da diğer belirteçlerle kombinasyon halinde anlamlı prognostik etkiye sahip olduğu ortaya konmuştur. KHDAK'de tümörle ilişkili stromada tümör infiltrate eden $CD8^+$ T hücre yoğunluğunun TNM sınıflandırmasının içerdiği diğer klinikopatolojik değişkenlerden bağımsız olarak, en güçlü prognostik etkiye sahip belirteçlerden biri olabileceği düşünülmektedir [10].

$CD8^+$ T hücre yetmezliğinin farklı tip tümörlerde belirgin olduğu ve dolayısıyla tümör hücrelerinden salgılanan ve mikroçevrede immün supresyona yol açan sitokinler ve

diğer faktörlerin etkisiyle CD8⁺ Tc' ler de etkilenmekte ve fonksiyonel özelliklerini yitirebilmektedir. İnhibitör reseptörler ekspresyonu aracılığıyla bu hücrelerin proliferatif yanıt, sitokin üretimi ve sitotoksitesinde baskılanma oluşmaktadır [11]. Programlanmış ölüm (PD)-1/PD Ligand-1(PDL-1) ilişkili T hücre yetmezliği diğer solid tümörlerde olduğu gibi akciğer kanserlerinde de gösterilmiştir. Günümüzde kullanılan tedavide kullanılan immünomodulator ajanlar Tc lenfosit yetmezliğinin sonlandırılması ve bu hücrelerin tümöre karşı sitolitik etkilerini arttırmayı hedeflemektedir. Son yıllarda, T lenfositlerinde izlenen PD-1 proteinine bağlanan antikorlar ile tümöre karşı immünitenin artırılarak akciğer kanserli olgularda belirgin ve çok önemli yanıtlar alındığı, ileri evre akciğer kanserli olgularda dahi bu tedavi ile daha uzun sağkalımlar elde edildiği bilinmektedir. Diğer inhibitör reseptör olan sitotoksik T hücre ile ilişkili protein (CTLA)-4 de immün sistemin aktivasyonunu kontrol eden bir moleküldür. Antijen sunan hücreler tarafından MHC molekülü eşliğinde sunulan peptidi yüzeyindeki reseptör ile tanıyan T hücrelerinin aktive olabilmesi için T hücrelerinde bulunan CD28'in Antijen sunan hücrelerdeki B7 molekülleri ile etkileşmesi gerekmektedir. Aktive T hücrelerinde bulunan CTLA-4 dendritik hücreler veya antijen sunan hücrelerdeki ligandlarına bağlandığında immün sistemin aktivasyonu inhibe olmakta ve immün reaksiyon durdurulmaktadır. PD-1/CTLA-4 sinyal yolağının blokasyonunun kanser hastalarında immün yanıtı arttırdığı gösterilmiştir [12]. Çalışmamızda standart olarak yapılması önerilen mediastinoskopiye göre çok daha yüksek doğruluk oranı sağlayan VAMLA uygulanan KHDAK'li hastalarda cerrahi rezeksiyon sonrası saptanan sağkalım oranlarındaki artışın mekanizmasında Tc lenfositlerinin rollerini araştırmayı planladık. Artmış sağ kalımın VAMLA ile neden daha iyi olabileceğine dair bir dayanak saptanmamıştır. Olası hipotezlerden biri, VAMLA'nın hastada tümöre karşı gelişen immün baskılanmayı azaltabileceğidir. Bu baskılanmanın özellikle Tc lenfositlerindeki etkisi, bu lenfositlerin sayısı ve fonksiyonunun araştırılmasının önemli olduğu düşünülmektedir. KHDAK'li hastalarda CD8⁺CD28⁻ fenotipteki hücrelerin baskılayıcı fonksiyona sahip oldukları gösterilmesine rağmen tümörü drene eden mediastinal lenf nodlarında PD-1 ve CTLA-4 gibi inhibitör kontrol noktası reseptörleri taşıyan Tc hücre oranları, sitotoksik aktivite ve fonksiyonlarını belirlendiği bir çalışma henüz bulunmamaktadır. Mevcut çalışmaların ışığında çalışmamızda, KHDAK tanılı ve radyoterapi almamış hastalarda VAMLA öncesinde periferik kan ve lenf nodu örnekleri ile VAMLA sonrası ve sağlıklı kontrollerde periferik kan CD8⁺ Tc lenfositlerinde hem PD-1 ve CTLA-4 inhibitör reseptör ekspresyonları hem de çözünebilir PD-1, PDL-1 ve CTLA-4 düzeyleri saptanmıştır. Bu hücrelerin anti-tümöral ve sitotoksik fonksiyonları granzim A ve IFN- γ ve TNF- α ekspresyon analizleri ile değerlendirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Akciğer Kanseri

Akciğer kanseri, dünyada erkeklerde prostat, kadınlarda ise meme kanserinden sonra en sık görülen ikinci kanser türüdür [13, 14]. Hastaların büyük çoğunluğu ileri evre veya metastatik hastalık ile tanı almakta ve erken evre akciğer kanserli hastalarda dahi ameliyat sonrası nüksler sık görülmektedir [1].

Solunum yollarındaki epitel hücrelerinden kaynaklanan akciğer kanseri %15 oranında küçük hücreli (KHAK) ve %85 oranında küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) olmak üzere iki ana gruba ayrılmaktadır [15]. KHDAK kaynaklandığı hücre grubuna bağlı olarak skuamöz hücreli karsinom, adenokarsinom ve büyük hücreli karsinom olarak 3 grupta sınıflandırılmaktadır [16]. Evreleme ve bölgesel farklılıklara bağlı olarak akciğer kanserli hastaların 5 yıllık sağkalım oranları %4 ile %17 arasında değişmektedir [17].

2.1.1. Epidemiyoloji

Dünyada erkek ve kadınlarda kansere bağlı ölümlerdeki ilk sırayı akciğer kanseri almakta ve Amerika Birleşik Devletleri'nde kansere bağlı ölümlerin %20'sini akciğer kanseri oluşturmaktadır [15, 18, 19]. Akciğer kanseri nedeniyle ölenlerin %80'ini tütün, tütün ürünleri kullananlar veya bunlara pasif olarak maruz kalanlar oluşturmaktadır [20]. Ülkemizde ise, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Kanser Savaş Daire Başkanlığı tarafından yayımlanmış olan kanser istatistiklerine göre akciğer kanseri, erkeklerde %21,8 ile en sık görülen kanser, kadınlarda ise en sık görülen kanserler sıralamasında %4,9 beşinci sırada yer almaktadır [21]. Akciğer kanseri teşhisi konulan hastaların %50'si 70 yaşın üzerinde, %15'i 80 yaşın üzerinde tanı almaktadır [22].

2.1.2. Etiyoloji

Akciğer kanseri oluşumunda sigara (tütün ve tütün ürünleri) ve pasif mâruziyetin yanı sıra yaş, ırk, cinsiyet, meslek, diyet, genetik ve immünolojik faktörler, radon, yağ buharı, kömür dumanı, hormon tedavileri, asbest, ağır

metaller, enfeksiyonlar (geçirilmiş akciğer hastalığı sekeli, viral enfeksiyonlar), radyasyon ve hava kirliliği de etkili olmaktadır [23].

2.1.2.1. Tütün ve Tütün Ürünlerinin Kullanımı

Akciğer kanserinde etkisi bilinen en önemli risk faktörü sigaradır [24, 25]. Sigara tüketimi ile akciğer kanseri arasında güçlü bir ilişki olduğunu gösteren çok sayıda çalışma bulunmaktadır [24-27]. Akciğer kanseri teşhisi konulan hastaların %85'i hayatlarının bir döneminde sigara kullanmış veya hâlen kullanmaktadır [28]. Uluslararası Akciğer Kanseri Konsorsiyumu'nun 766 akciğer kanseri vakası ve hiç sigara içmemiş 1954 sağlıklı Asyalı ile yaptığı çalışmada, sigara dumanına pasif mâruziyetin akciğer kanseri riskini arttırdığı gösterilmiştir [29]. Sigaraya başlama yaşı, içme süresi, içilen sigara sayısı ve sigara tipi kanser gelişme riskini etkilemektedir. Sigara kullanımının azalması, akciğer kanseri insidansında azalmayı da beraberinde getirmektedir [30].

2.1.2.2. Genetik Faktörler

Parkin ve arkadaşlarının 2002 yılında yaptıkları bir çalışmada, dünyada akciğer kanseri hastalarının %25'inin, erkeklerin %15'i ve kadınların da %53'ünün hiç sigara içmemiş olduğunu bildirmişlerdir [31]. Hiç sigara içmemiş akciğer kanseri olgularında genetik faktörlerin bu durumda etkili olduğu düşünülmektedir. Epidermal büyüme faktörü reseptörünün (epidermal growth factor receptor - EGFR) ve B-Raf Proto-Onkogen, Serin/Tirozin Kinaz (BRAF) veya Ekinoderm Mikrotübül ilişkili protein 4 benzeri (EML-4), Anaplastik lenfoma kinaz füzyonları ve Proto-Onkogen 1, Reaktif Oksijen (ROS1) füzyonları gibi mutasyonlar akciğer kanseri ile ilişkilendirilmiştir [32]. EGFR'yi aktive edici mutasyonlar, asyalı kadınlarda ve hiç sigara içmemiş hastalarda daha sık olmakla beraber özellikle de adenokarsinom alt tipinde bulunduğu gösterilmiştir. Bu mutasyonu barındıran tümörlerin anti-EGFR tedavilerine (afatinib, gefitib, erlotinib) iyi yanıt verdiği de bilinmektedir. Evre IV KHDAK'li hastalar arasında EGFR mutasyonu görülen olgularda prognozun daha iyi olduğu gözlemlenmiştir [33]. ROS1 yada EML4-anaplastik lenfoma kinaz (ALK) füzyon onkogeni barındıran KHDAK olgularının, çoğunlukla genç ve sigara içmeyen hastalardan oluştuğu ve bu olguların krizotinib tedavisine iyi yanıt verdiği tespit edilmiştir [34].

Aromatik aminlerin defosforilasyonundan sorumlu N-asetil transferaz genindeki mutasyonlar akciğer kanseri açısından risk teşkil etmektedir [23]. Tümör baskılayıcı genlerden *TP53* ve *TP63*'teki mutasyonlar sigaradan bağımsız olarak akciğer kanseri ile ilişkilendirilmiştir [23]. KRAS Proto-Onkogen Gtpaz (KRAS), KHDAK'li olguların yaklaşık %3'unda görülen onkogenik bir mutasyondur. Genellikle nokta mutasyon olan KRAS, sıklıkla beyaz ırkta, sigara içen veya daha önce sigara içmiş adenokarsinom olgularında görülmektedir [34].

Kodlanmayan kısa nükleotid zincirlerinin oluşturduğu RNA'lar olan mikroRNA'ların (miRNA'lar) da akciğer kanserinde kritik rol oynadığı bilinmektedir [35]. Zhang ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada, mir-411 ekspresyonunun KHDAK'li olguların tümör dokularında arttığı gösterilmiştir. Tümör progresyonunda miRNA'lar; hücre proliferasyonunu, apoptozu, hücre göçünü ve kök hücre farklılaşmasını etkilemektedir [35]. Bu moleküler paternlerin dışında, üzerinde çalışılan akciğer kanseriyle ilişkili pek çok mutasyon bulunmaktadır.

2.1.2.3. Yaş ve Cinsiyet

Bronş ve akciğer kanserleri vakalarının yaklaşık %0,2'sini 20-34 yaş arası, %1,5 'ini 35-44 yaş arası, %20,9'unu 45-54 yaş arası, %31,1'ini 65-74 yaş arası, %29'unu 75-84 yaş arası, %8,3'ünü de 85 yaş üzeri hastalar oluşturmaktadır [15].

Günümüzde ülkemizdeki genç nüfus oranı kansere yakalanmama açısından avantaj sağlarken, 2030 yılında 45 yaş üzeri popülasyonun bu oranı %22'den %32'lere çıkarması beklenmektedir. Değişen demografik yapı ile birlikte kanser, ülkemiz için her geçen gün daha ciddi bir sağlık problemi haline gelmektedir [36]. Avrupa Birliği'ne bağlı ülkelerdeki erkeklerde akciğer kanserine bağlı ölüm oranı 2013 yılında 2009 yılına göre %6 azalırken, kadınlarda bu oran %7 artış göstermiştir [37] .

2.1.2.4. Beslenme ve Obezite

Kanser gelişimi ile obezite arasındaki ilişkiyi vurgulayan çok sayıda çalışma bulunmaktadır [38-40]. İnsan ve hayvanlarda yapılan çalışmalarda, vücut kitle indeksi 18,5 – 24,9 arasında olduğunda normalde yağ dokusundan

anti-enflamatuvar sitokinler salgılanırken, yağ dokusu artışı ile pro-enflamatuvar sitokinlerin salgılandığı gösterilmiştir [40].

A, C ve E vitaminleri gibi antioksidanların serumda düşük konsantrasyonda olmasının akciğer kanseri gelişimini tetiklediği ve vitamin takviyesinin akciğer kanseri riskini azalttığı bilinmektedir [15].

2.1.2.5. Kronik Hastalıklar ve Enfeksiyonlar

Kronik enflamasyon süreci anti-apoptotik sinyal iletimini ve anjiyogenezi kolaylaştırarak tümör hücrelerinin büyümesine ve yayılmasına sebep olmaktadır [41]. Bu yüzden astım, tüberküloz, zatürre, amfizem gibi akciğerde enflamasyona sebep olan solunum yolları hastalıklarının akciğer kanseri için risk oluşturduğu bilinmektedir [41]. Akciğerdeki epiteliyal hücreler normal koşullarda patojenlere ve partiküllere karşı bariyer görevi görmektedir. Bununla birlikte Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı (KOAH) gibi kronik inflamasyon oluşturan durumlar, bu bariyere zarar vermekte ve karsinogenezi tetikleyebilmektedir [42].

İnsan immün yetmezlik virüsü (Human Immunodeficiency Virus- HIV) enfeksiyonu ile birlikte tümör supresör gen olan *p53* ekspresyonunun azalması ve proto-onkogenlerin ekspresyonunun artması akciğer kanserine yatkınlığına sebep olmaktadır [41].

2.1.2.6. Çevresel Etmenler (Hava Kirliliği, Asbest)

Kokusuz ve görünmez bir gaz olan radon, ABD’de her yıl yaklaşık 21.000 kişinin akciğer kanseri nedeniyle ölümüne sebep olarak, tütün ve tütün ürünlerinden sonra en önemli risk faktörü olarak ortaya çıkmaktadır [43]. Ayrıca çalışma ortamındaki uranyum, berilyum, vinil klorid, mustard gazı, klorometil eter, dizel ürünleri, nikel krom gibi maddelerin kanserojen olduğu ve akciğer kanseri etyolojisinde bulunduğu bilinmektedir [41].

Silikonun oksijen ile kristalize formu olan silikaya maruziyet ile akciğer kanseri arasında güçlü bir ilişki bulunmaktadır [44]. Hayvan çalışmaları ile silikanın akut enflamasyonu tetiklediği ve mikroçevrede immün sistemi baskılayarak tümör oluşumunu desteklediği gösterilmiştir [44]. Silikat minarelleri

olan asbestin tüm formları, serbest radikallerin üretimini uyararak ve DNA'ya zarar vermek suretiyle tümör oluşumunu arttırmaktadır [41].

Çinli kadınlar arasında sigara kullanımı düşük olmasına rağmen Çin'de kadınlarda izlenen akciğer kanseri vakalarındaki artış sebebinin, yemek yapmak ve ısınmak için kullandıkları kömür dumanından kaynaklı olduğu düşünülmektedir [13]. Kontamine su, yiyecek ve hava ile insana ulaşan arseniğin akciğer, böbrek, mesane ve deri kanseri gibi birçok kanser türüne neden olduğu bilinmektedir [45].

Hava kirliliği akciğer kanserini de içeren birçok akut ve kronik enflamatuvar hastalığa sebep olmaktadır [46]. Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı hava kirliliğini en önemli karsinogen sınıfına koymaktadır. Taşıtlar; karbonmonoksit, ozon, nitrojen dioksit aldehytleri, benzen, polisiklik aromatik hidrokarbonlar içeren gaz ve partiküllerin havaya karışmasına sebep olarak hava kirliliğinin en büyük etkenleri olarak karşımıza çıkmaktadır [47]. İnsanlar ve hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarda, havada bulunan 2.5 mikrometrenin altındaki partiküller ile akciğer kanseri arasında ilişki olduğu gösterilmiştir [47]. İnsanlar ve hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarda, havada bulunan 2.5 mikrometrenin altındaki partiküller ile akciğer kanseri arasında ilişki olduğu gösterilmiştir [46, 48].

2.1.3. Klinik Belirtileri

Akciğer kanseri olgularının kliniğe en sık başvuru şikayeti öksürük olmaktadır (%35-75) [49, 50]. En sık ikinci görülen diğer semptomlar ise kilo kaybı ve vakaların %36-60'ında görülen nefes darlığı ve göğüs ağrısıdır [50]. Nefes darlığı tümörün bronşa basısı, oblitere etmesi gibi mekanik sebepler dışında tümör embolisi ve pulmoner emboli nedeniyle de olabilmektedir [51]. Hemoptizi ise %24-30 civarı hastada görülmektedir [49]. Lokal hastalığa bağlı semptomlar; vena kava superior sendromu, disfaji, ses kısıklığı, horner sendromu, hırıltılı solunum ve stridordur. Bunların yanı sıra sistemik metastazlara bağlı kemik ağrısı, sarılık, baş dönmesi, bulantı/kusma gibi şikayetler görülebilmektedir [52]. Tümörün kendisinin ya da metastazlarının dışında tümörün salgıladığı bazı mediyatörler ve hormonlar aracılığı ile de paraneoplastik sendrom adı verilen tablolar ortaya çıkmaktadır [53]. Bunun

dışında tümörden salınan Adrenokortikotropik hormon (ACTH) aracılığı ile hastalarda kas zayıflığı, aydede yüzü, psikoz, depresyon, kılınma artışı, hipokalsemi ve hiperglisemi görülebilmektedir [50]. Uygunsuz antidiüretik hormon sendromu, Eaton Lambert sendromu, hipertrofik osteoartropati, çomak parmak, hematolojik ve dermatolojik patolojiler diğer paraneoplastik sendromlardır [52].

2.1.4. Evreleme

Hastaların tedavi seçeneklerini belirleme ve tanı anında sağkalımlarını öngörebilmekte en önemli faktör hastalığın evresi olmaktadır [54]. Evreleme için farklı sistemler kullanılsa da en çok kabul göreni TNM (tümör boyutu (T), Lenf nodu tutulumu (N), metastaz (M)) sınıflamasıdır [3]. Amerikan kanser dairesi (AJCC) ve Uluslararası kanser kontrol birliği (UICC) tarafından 2016 yılında yayınlanan 8. TNM sınıflaması 16 ülkenin katılımı ile 1999-2010 yılları arasında 100.000'e yakın hastanın T/N/M verileri alınarak hazırlanmıştır [55-57]. Sekizinci TNM sınıflandırılmasında en önemli değişikliklerden biri metastazın M0,M1a ve M1b olarak 3'e değil M0, M1a, M1b ve M1c olarak 4'e ayrılmasıdır.

Tablo 2-1 : 8. TNM SINIFLANDIRMASI

Evre 0	Tis	N0	M0
Evre IA1	T1a	N0	
Evre IA2	T1b	N0	
Evre IA3	T1c	N0	
Evre IB	T2a	N0	
Evre IIA	T2b	N0	
	T1(a,b)	N1	
	T2a	N1	
Evre IIB	T2b	N1	
	T3	N0	
Evre IIIA	T1(a,b,c)	N2	
	T2(a,b)	N2	
	T3	N1	
	T4	N0	
	T4	N1	
Evre IIIB	T3	N2	
	T4	N2	
	T1(a,b,c)	N3	
	T2(a,b)	N3	
Evre IIIC	T3, T4	N3	
Evre IVA	T ve N'den bağımsız		M1a, M1b
Evre IVB	T ve N'den bağımsız		M1c

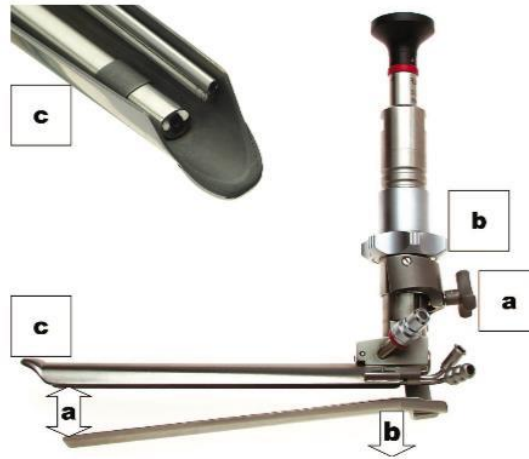
2.1.4.1. Video Yardımlı Mediastinal Lenfadenektomi

Mediastinal lenf nodu tutulumu cerrahi rezeksiyon için önemli olduğundan mediasteninin doğru değerlendirilmesi gerekmektedir [6]. Mediastinal lenf nodlarının değerlendirilmesi için altın standart olarak kabul edilen mediastinaskopi yaklaşık %10 oranında yanlış negatif sonuç verebilmektedir [6]. Lenf nodlarının daha doğru değerlendirilebilmesi için video yardımlı mediastinal

lenfadenektomi (VAMLA) yönteminin tekniği ve ilk sonuçları 2002’de Huertgen ve ark. tarafından bildirilmiştir [58].

VAMLA’da daha geniş görüş alanına ve bimanual diseksiyona olanak sağlayan videomediastinoskop kullanılmaktadır [58, 59] (Şekil 2-1). Diseksiyonda sol trakeobronşial ve paratrakeal istasyonlardan lenf nodlarının tamamen çıkartılması (lenfadenektomi) ve subkrainal, sağ paratrakeal, sağ trakeobronşial ve pretrakeal istasyonlarda lenf nodlarına ek olarak yağlı dokunun da rezeke edilmesi gerekmektedir [58]. VAMLA ile konvansiyonel mediastinoskopiye göre daha fazla lenf nodunun çıkarılması mümkün olmaktadır [59]. Bu yolla lenf nodları ve yağlı dokudaki mikro metastazların saptanmasına da olanak sağlayan VAMLA’nın sensitivitesi %95,5, doğruluğu %96,6 ve yanlış negatiflik oranı %3,4 olarak bildirilmiştir [6]. Daha uzun operasyon zamanı ve yüksek komplikasyon oranı ise VAMLA’nın dezavantajları olarak bildirilmektedir [60]. Fakat neredeyse bütün mediastinal lenf nodlarının çıkarılmasını sağlayan VAMLA, rezeksiyon sırasındaki lenf nodu diseksiyonu zamanını da kısaltmaktadır. En sık görülen komplikasyonları arasında geçici veya kalıcı ses kısıklığı ile pnömotoraks bulunmaktadır [60].

Akciğer kanseri nedeniyle rezeksiyon yapılan 433 hastanın eğilim eşleştirme analizi ile irdelendiği bir çalışmada, VAMLA ile evreleme yapılan hastalarda sağkalım oranı, T ve N evresinden bağımsız olarak, standart mediastinoskopi yapılanlara göre daha yüksek bulunmuştur [6]. N2 evresinin akciğer kanserinde VAMLA ile daha yüksek doğrulukta saptanması bu hastalarda gereksiz cerrahi operasyondan ve oluşacak komplikasyonlardan kaçınılmasını sağlamaktadır. Ayrıca komple lenfadenektominin kanserli olgularda sağkalıma katkısının olabileceği de belirtilmektedir [6].



Şekil 2-1 : Videomediastinoskop [59]

(a) 32 mm'ye kadar açılabilen iki adet kaşık, (b) alt kaşığın ek olarak 20 mm'ye kadar açılmasına yarayan bir ara parçası ve (c) optik, ışık ile bir aspiratörden oluşmaktadır

2.2. Akciğer Kanseri ve Bağışıklık Sistemi

Yabancı ve öz antijenleri tanımak suretiyle patojenlere karşı savunmada ve kanserle mücadelede rol oynayan immün sistem, doğal ve edinsel immünite olarak iki ana grupta tanımlanmaktadır [61]. Doğal immünite immün cevabın başlangıç evresinde yer almakla birlikte, edinsel immün cevabı da etkilemektedir [62]. T ve B hücrelerinin rol oynadığı edinsel immün sistem ise hücresel ve humoral immün sistem olmak üzere ikiye ayrılmaktadır [61]. Anti-tümöral immünitede Tc lenfositlerinin önemli bir yeri olmakla birlikte, meme ve over kanserinde tümörü infiltre eden Tc hücrelerinin yoğunluğu ve epitelyumda lokalize CD103 eksprese eden Tc hücre oranlarının sağkalımı arttırdığı bildirilmiştir [63-65]. Ayrıca CD103 eksprese eden dokuya ait Tc hücrelerinin meme, karaciğer, akciğer, over gibi solid tümörlerde de arttığı gösterilmiştir [65].

Tümör hücreleri, konakçının immün kontrol noktaları işlevlerini yerine tam getiremediği zaman konakçının immün gözetiminden kaçmaktadır [66]. Akciğer kanseri de düşük antijenitesi ve fenotipik olarak heterojen bir yapı göstermesinden dolayı konakçının immün sisteminden kaçabilmektedir [67]. Akciğerin adenokarsinom tipi kanserlerinde tümör hücreleri dışında, damarlarda, kanser ilişkili fibroblastlarda, ekstraselüler matrikste ve tümörü infiltre eden lenfosit alt tiplerinde de heterojenlik göstermektedir [68].

Kanserle ilişkili fibroblastlar IL-6 salgılayarak Janus Kinaz 2 (JAK2) ve Aktivatör Transkripsiyon 3 (STAT-3)'ü sinyal yollarını uyararak metastazı arttırmaktadır. KHDAK'lı olgulardan izole edilen kanserle ilişkili fibroblastların programlı hücre ölüm reseptör ligandları 1 ve 2'yi (PDL-1 ve PDL-2) eksprese ettiği ve T hücreleri ile yapılan kokültür çalışmalarında T hücre fonksiyonlarını baskıladığı gösterilmiştir [69].

Anti-tümöral efektör fonksiyonlara sahip granülositler ve monositler gibi miyeloid hücreler tümör infiltre lenfositlerin fonksiyonlarını etkileyerek edinsel immüniteyi düzenlemektedir [70]. Mieloid kökenli olan dendritik hücreler lenf nodunda tümör antijenlerini T hücrelerine çapraz sunma yeteneklerinden dolayı anti-tümöral immünitenin merkez düzenleyicisi olarak da tanımlanmaktadır [71]. Bununla birlikte tümörler dendritik hücre fonksiyonlarını tümör mikro çevresine bağlı olarak inhibe edebilmektedir [72].

Nötrofiller interlökin (IL)-1 β ve IL-6 gibi sitokinler salgılayarak tümörün progresyonunda etkili olmaktadır [68] (Şekil 2-4). Tümör hücreleri, doğal öldürücü (NK) hücreler ve tümör ilişkili makrofajlardan salgılanan vasküler endotelyal büyüme faktör (VEGF) anjiyogenezi uyarmaktadır. Ayrıca tümör ilişkili makrofajlar IL-6, siklooksijenaz 2 (COX2), matriks metalloproteinaz 9 (MMP-9) salgılayarak tümörün invazyonuna ve metastazına da neden olabilmektedir [73] (Şekil 2-4). NK hücreleri fonksiyon kaybı nedeniyle anti-tümöral immüniteyi baskılayabilmektedir [68]. NK hücreleri aktivatör reseptörler ve IFN- γ ekspresyonlarını azaltarak, inhibitör reseptör ekspresyonlarını arttırarak ve aynı zamanda sitotoksik fonksiyonlarını inhibe ederek immün supresyona neden olabilmektedir [68].

2.3. T lenfositler

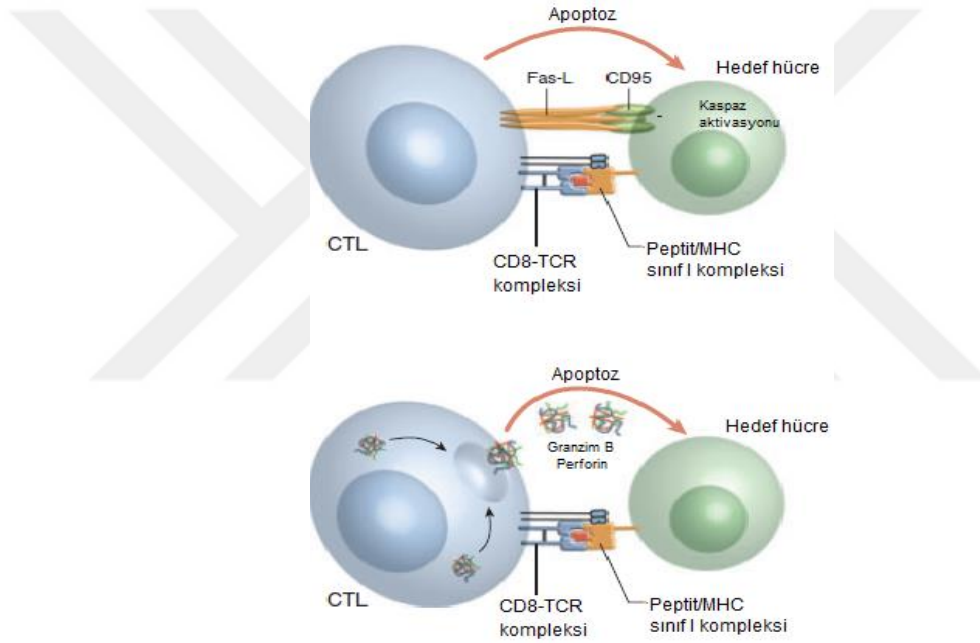
Kemik iliğinden köken alan ve timüste olgunlaşan T hücreleri, yüzeyindeki T hücre reseptörü (THR) ve majör histokompatibilite kompleks (MHC) sınıf I veya MHC sınıf II ile sunulan protein kökenli antijenleri tanımaktadır [62, 74]. Sınıf I ve sınıf II MHC molekülleri T hücrelerinin yüzeyindeki farklı antijenlere bağlanmaktadır; yüzeyinde CD4 antijenini taşıyan T hücreleri; sınıf II MHC moleküllerine bağlanırken, CD8 antijenini taşıyanlar sınıf I MHC moleküllerine bağlanmaktadır. CD4 eksprese eden T lenfositleri yardımcı T hücresi (Th), CD8

eksprese eden T hücreleri ise Tc hücresi olarak tanımlanmaktadır [74]. Akciğer kanserinin gelişmesinde ve ilerlemesinde immün sistem hücrelerinden özellikle T hücre fonksiyonlarının bozulmasıyla ilişkili olduğu düşünülmektedir [68]. T hücreleri adaptif immün cevabın düzenlenmesinde ve birçok hastalıkların patogeneğinde anahtar rol oynamakta ve aynı zamanda tümör hücrelerinin yok edilmesine aracılık etmektedir [75]. Tc hücreleri hücreSEL immün sistemin kritik bir komponenti olup, hücre aracılı anti-tümöral immünitede önemli role sahiptirler [66]. CD8⁺ T hücreleri, konakçıyı tehdit edebilecek virüsle enfekte hücreyi ve bazen de kendiliğinden gelişen malign tümörleri antijenik değişimlerinden ötürü tanıyabilmektedir [74]. Sonrasında ise Tc lenfositleri çoğalmakta ve kanser hücrelerinin olduğu bölgelere giderek kanser hücrelerini öldürmektedir [76].

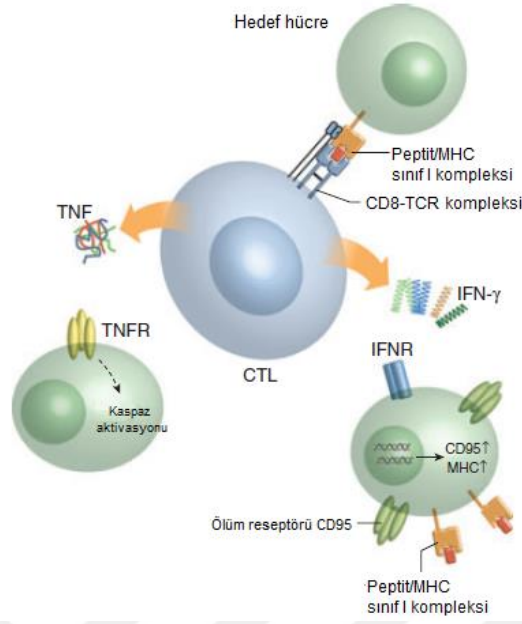
Naif T hücreleri kanda, dalak ve lenf nodu gibi lenfoid yapılar arasında dolaşmaktadır [77]. Antijen sunucu hücreler tarafından naif T hücrelerine antijen sunulduktan sonra T hücreleri klonal olarak çoğalmakta ve efektör T hücrelerine farklılaşarak enfeksiyon bölgesine gitmektedir. Fonksiyonel Tc lenfositleri IFN- γ ve tümör nekrotize edici faktör alfa (TNF- α) gibi proenflamatuvar sitokinler salgılamakta ve THR tarafından MHC sınıf-I aracılı sunulan yabancı peptitleri tanıyarak hedef hücrenin lizisine yol açmaktadır [9, 65]. Patojenik sürecin çözülmesini takiben efektör CD8⁺ T hücrelerinin çoğu apoptoza uğrarken küçük bir alt grubu uzun ömürlü bellek hücreleri halini almaktadır. Tc hücrelerinin CCR7 ve CD45RA ekspreslerine göre CCR7⁺CD45RA⁺ naif (uyarılmamış) hücre, CCR7⁺CD45RA⁻ santral hafıza, CCR7⁻CD45RA⁻ efektör hafıza ve CCR7⁻CD45RA⁺ efektör hücreler olmak üzere 4 alt grubu bulunmaktadır [78, 79].

Tc hücreleri hedef hücreyi üç farklı yolla öldürmektedir. Birinci mekanizmada Tc hücresinin THR hedef hücredeki MHC sınıf I ile kompleks oluşturur ve Tc hücresinin FasL ile hedef hücredeki reseptörüne (CD95'e) bağlanması sonucu kaspaz kaskatı başlayarak hedef hücreyi apoptoza sürükler [74] (Şekil 2-2). Direkt öldürme mekanizmasında ise Tc hücreleri hedef hücre ile immünolojik sinaps oluşturdıkları zaman sitolitik efektör proteinler salgılayarak tümör hücre ve hücre içi patojenleri granül ya da reseptör aracılı mekanizmalarla yok etmektedir [77] (Şekil 2-2). Bu aşama hedefi tanımayı takiben ekzositozla salınan perforin ve granzim gibi litik proteinler içeren hazır

granüllerin salınması yoluyla olmaktadır [74, 75, 77]. Perforin ile hedef hücre membranında porlar oluşurken, granzim ile hedef hücre lizise uğramaktadır [9]. Üçüncü mekanizma olan indirekt yolda ise hedef hücre THR ile MHC sınıf I oluşan kompleksle tanındıktan sonra Tc hücresi $\text{IFN-}\gamma$ ve $\text{TNF-}\alpha$ salgılamaktadır. Salgılanan $\text{TNF-}\alpha$ yakındaki hedef hücrelerin $\text{TNF-}\alpha$ reseptörüne bağlanarak hedef hücrede kaspaz kaskadı başlar ve hücre apoptoza sürüklenir [9, 74, 75, 77]. $\text{IFN-}\gamma$ 'nın reseptörüne bağlanması sonrasında hedef hücrede Fas hücre aracılı lizis meydana gelmektedir [9, 74] (Şekil:2-3).



Şekil 2-2: Sitotoksik T lenfositlerin direkt öldürme mekanizmaları [74]



Şekil 2-3: Sitotoksik T lenfosit indirekt öldürme mekanizması [74]

2.3.1. T lenfositleri ve Akciğer Kanseri

CD8⁺ Tc hücreleri tek başına veya CD4⁺ Th lenfositleri ile birlikte kansere karşı oluşan adaptif immün yanıtta önemli rol oynamaktadır [74]. Tümörlerde bu efektör hücrelerin fonksiyonları kanser hücreleri ve regülatör T hücre (Treg), Tip 2 makrofajlar gibi tümöral stroma hücreler tarafından baskılanmaktadır. Buna ek olarak naif CD8⁺ T hücrelerinin saatler ve günler içerisinde aktive hale gelmesi sonrasında tümör stromasında baskılayıcı reseptör ekspresyonunda artış oluşmakta ve Tc hücre fonksiyonu inhibe olabilmektedir. Bu durum tümörün invazyonu ve progresyonuna yol açabilmektedir [80].

Akciğerdeki tümör mikroçevresinde en önemli baskılanma CD8⁺ Tc hücrelerinde olmaktadır [68]. Olgunlaşmamış dendritik hücreler salgıladıkları TGF- β (Transforme Edici Faktör -Beta) vasıtasıyla FoxP3 eksprese eden immünsupresif özellikte Treg hücrelerini uyarmakta ve CD8⁺ T hücrelerinin inhibisyonuna sebep olmaktadır. Dendritik hücreler PD-1 ve PDL-1 eksprese etmekte ve direkt olarak CD8⁺ T hücrelerinin inhibisyonuna da sebep olabilmektedir [68] (Şekil 2-4).

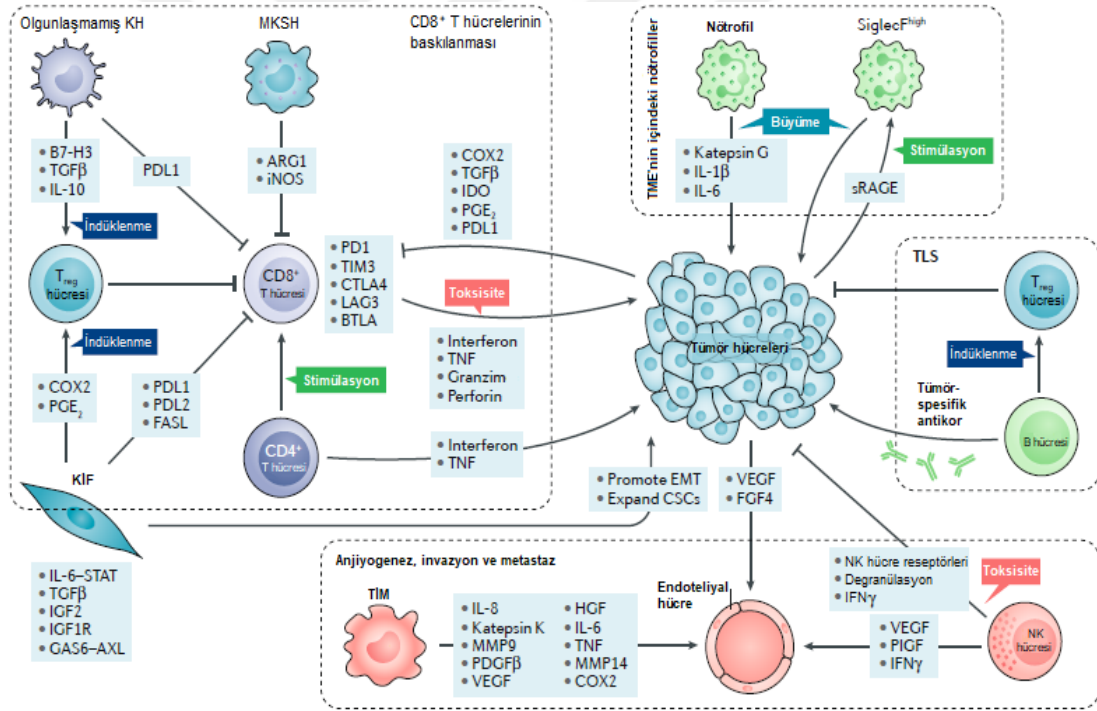
Miyeloid kökenli baskılayıcı hücreler, T hücre inhibisyonuna katkıda bulunan arginaz 1 (ARG1) ve indüklenebilir nitrik oksit sentazı (iNOS) eksprese etmektedirler [70]. Kanserle ilişkili fibroblastlar, Treg hücrelerini aktive ederek veya PDL-1, PDL-2 ve Fas-L eksprese ederek CD8⁺ T hücrelerinin inhibisyonuna sebep olmaktadır [81] (Şekil 2-4). Tümör hücreleri COX2, PGE2 (prostaglandin E2), PDL-1 ve İndolamin 2,3 di-oksijenaz (IDO) gibi inhibitör moleküller salgılayarak tümör infiltre eden CD8⁺ lenfositlerin aktivasyonlarını baskılamaktadır [68] (Şekil 2-4.)

KHDAK'li olgularda CD8⁺CD103⁺CD39⁺ fenotipindeki tümörü infiltre eden lenfositlerin MHC sınıf I aracılığıyla otolog tümör hücrelerini öldürdüğü gösterilmiştir [65]. Ayrıca KHDAK hastalarından izole edilen bazı CD8⁺CD103⁺ tümörü infiltre eden lenfositlerin dokuya ait T hücreleriyle aynı mRNA ve protein belirteçlerini taşıdıkları ve yüksek oranda PD-1 ve Tim-3 eksprese ettikleri bulunmuştur [65]. Zeng ve arkadaşları evre I ve IV arasındaki 7006 KHDAK'li hastanın verileri ile yaptıkları meta analiz çalışmasında en iyi sağkalım süresinin tümörü infiltre eden CD8⁺ T lenfosit oranları ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir [82]. Birçok çalışmada, KHDAK'de Tc lenfositlerin tümörü infiltre etmesinin iyi prognostik faktör olduğu gösterilmiştir [65, 83, 84]. CD4⁺/CD8⁺ hücre oranının, immünolojik fonksiyonlarının stabil tutulması ve anti-tümöral dengenin dinamik olarak korunabilmesinde önemli rol oynadığı gösterilmiştir [75]. Akciğer kanserli hastalarda tümör mikro çevresinde bulunan CD8⁺ Tc hücre fonksiyonu ile ilişkili transkriptlerin anti-PD1 ajanları ile yapılan tedavilerle pozitif korelasyon gösterdiği saptanmıştır [85].

PD-1/ PDL-1 yolağı immün baskılanmanın önemli bir düzenleyicisi olarak kabul edilmektedir ve bu yolağın blokajının T hücrelerinin anti-tümöral aktivitesini arttırdığı bulunmuştur [86]. Seak-Hyun Kim ve arkadaşları tarafından opere edilebilen KHDAK hastalarında tümör dokusunda immünohistokimya ve mikroarray yöntemiyle CD8⁺ T hücreleri ve PD-L1 oranlarına bakılmış ve hastaların sağkalım analizleri yapılmıştır. Çalışmanın sonucunda tümörü infiltre eden lenfositler analiz edildiğinde CD8 negatif gruba göre CD8 pozitif grupta ve hem total hem de nüksüz sağkalım oranlarının arttığı ve bu bulguya ek olarak PDL-1 pozitif grupta PDL-1 negatif gruba göre sağkalım oranlarının

azaldığı bulunmuştur. CD8 pozitif PDL-1 negatif grubun sağkalım oranlarının diğer üç gruba göre (CD8 pozitif PDL-1 pozitif, CD8 negatif PDL-1 negatif, CD8 negatif PD-L1 pozitif) en yüksek olduğu ve bunun sonucu olarakta CD8 pozitifliği ve PDL-1 negatifliğinin total sağkalımda ve nüksüz sağkalımda pozitif bir prognostik faktör olabileceği düşünülmüştür [87].

Kolorektal kanser veya bazı solid kanser türlerinde tümöral alanda bulunan hafıza Tc hücrelerinin hastaların yaşam süresini belirleyen bir faktör olabileceği ve klonal olarak çoğalan tümöre spesifik CD4⁺ yardımcı T ve CD8⁺ Tc hücrelerin bu bölgelerde artış gösteren temel lenfosit alt grupları olduğu gösterilmiştir [75].



Şekil 2-4 : Akciğer tümörü ve mikro çevresi [68]

MKSH ; Miyeloid Kökenli Supresör Hücre, KİF ; Kanser İlişkili Fibroblast ,TİM; Tümör İlişkili Makrofaj

2.4. İmmün Kontrol Noktaları

Normal fizyolojik koşullarda, T hücreleri çevredeki normal dokuya zarar vermemeyi ve otoimmüniteden korunmayı immün kontrol noktaları ile sağlamaktadır [88]. Fakat kanser hücreleri yüzeylerinde bulunan artmış orandaki negatif sinyal reseptörleri T hücrelerinin aktive olamamasına veya apoptoza yönelmesine sebep olmakta ve bunun sonucunda kanser hücreleri büyüyüp, çoğalarak yayılmaktadır [66].

T hücrelerinin efektör faza geçebilmesi için iki sinyal alması gerekmektedir [74]. Birinci sinyal T hücre membranında yer alan THR, antijenik peptitlerin sunulduğu MHC sınıf I /sınıf II ile arasındaki etkileşim ile olmaktadır [78] (Şekil 2-5). İkincisi ise antijenden bağımsız olan eş uyaran sinyalidir [88]. T lenfositlerinin tam olarak aktive olması için antijen sunan hücrede eksprese edilen B7 ligandlarına (CD80 ve CD86) bağlanır [62] (Şekil 2-5). CD28 molekülünden başka CD134, CD137 ve glukokortikoidle teşvik edilen TNF ilişkili protein OX-40 T hücre aktivasyonu, proliferasyonu ve farklılaşmasını sağlayan diğer eş uyaran moleküllerdir [62]. MHC molekülü eşliğinde sunulan peptidi yüzeyindeki reseptör ile tanıyan T hücrelerinin aktive olabilmesi için T hücrelerinde bulunan CD28'in antijen sunan hücrelerdeki B7 molekülleri ile etkileşmesi gerekmektedir [88] (Şekil 2-5).

Eş uyaran moleküller T hücrelerinin naif fazdan efektör faza geçmelerini sağlamakta ve THR sinyalinin yokluğunda fonksiyonunu kaybetmektedir. Eş baskılayıcılar ise T hücrelerinin inhibisyonuna sebep olmaktadır [89]. CD28 molekülü, CD80/CD86 ile etkileşime geçtiğinde T hücresi aktive olurken, CD28'in sitotoksik T lenfosit antijen 4 (CTLA-4) ile bağlanması T hücre fonksiyonlarını inhibe etmektedir [89] (Şekil 2-5). Protein tirozin fosfataz 2 enzimi (SHP2), Zap70 gibi sinyal moleküllerinin defosforilasyonu ve THR ile CD28 etkileşiminin azalmasına sebep olarak T hücre aktivasyonunu engellemektedir. Tümör hücrelerinde PD-L1 ve CTLA-4 ekspresyonunun artması T hücrelerinde yetmezlik olarak da bilinen duyarsızlaşmaya sebep olmaktadır [90] .

2.4.1. Programlı Hücre Ölüm Reseptörü

CD279 olarak da bilinen programlı hücre ölüm reseptörü PD-1 T hücre aktivasyonu sonrasında eksprese edilen ve immünolojik aktivasyonu inhibe eden bir molekül olarak tanımlanmaktadır [91]. CD4⁺ ve CD8⁺ T hücreleri dışında PD-1 molekülü, B hücreleri, monositler, dendritik hücreler, NK hücreleri ve Treg hücreleri tarafından da eksprese edilmektedir [66].

PD-1'i yüksek oranda eksprese eden CD8⁺ Tc hücrelerinin çoğalma kapasitelerinin, sitokin salınımlarının düşük olduğu ve PD-1'in sağlıklı dokularda ve tümör hücrelerinin yüzeyinde eksprese olan PD-L1 (B7-H1) veya PD-L2 (B7-DC) ligandları T ile etkileşime girdiğinde T hücresinde anergiye, apoptoza veya yetmezliğe sebep olduğu gösterilmiştir [90, 92]. Tümöre spesifik T hücrelerinin fonksiyon yetersizliği altında yatan nedenler tam olarak bilinmemekle birlikte tümör mikroçevresinin yetersiz bir anti-tümöral immün yanıt oluşturduğu öne sürülmektedir [91]. PD-1'in ligandı olan PDL-1, lenfoid olmayan dokularda, tümör hücreleri, tümörle ilişkili fibroblastlar ve aktive olmuş antijen sunan hücreler tarafından eksprese edilmekte ve PD-1/PDL-1 etkileşimi T hücre reseptör aracılı çoğalma ve sitokin üretimini inhibe etmektedir [76]. Ayrıca vasküler endotelial hücreler ve pankreasdaki adacık hücreleri de PD-L1 eksprese etmektedir [66]. PD-1 eksprese etmeyen mutant farelerde lupus, kardiyomiyopati ve tip I diyabet gibi çeşitli otoimmün hastalıklar gelişmektedir [93]. Bir çok solid tümör PDL-1'i aşırı eksprese ettiği için immün sistemi baskılamakta ve kanserin ilerlemesini desteklemektedir [63, 94].

Tümörde PD-L1 ekspresyonu iki ana mekanizmayla regüle edilmektedir. Bunlar instrinsik ekspresyon mekanizması ve IFN- γ salgılayan tümörü infiltre eden lenfositler tarafından uyarılan ekstrinsik mekanizmadır [95]. Instrinsik mekanizmayla artış gösteren PD-L1 ekspresyonu kötü prognoz ile korele iken, IFN- γ salınımı ile uyarılan PD-L1 ekspresyonunun iyi prognoz ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [95]. Aktivasyon sonrası oluşan Janus Kinaz 3 (JAK3)- aktive edici mutasyonların KHDAK'li olgularda PDL-1 ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir [96, 97].

Yan Zhang ve arkadaşları 21 KHDAK hastasının rezeke edilen tümör dokusunda ve periferik kanlarından CD8⁺ T lenfositleri izole ederek bu

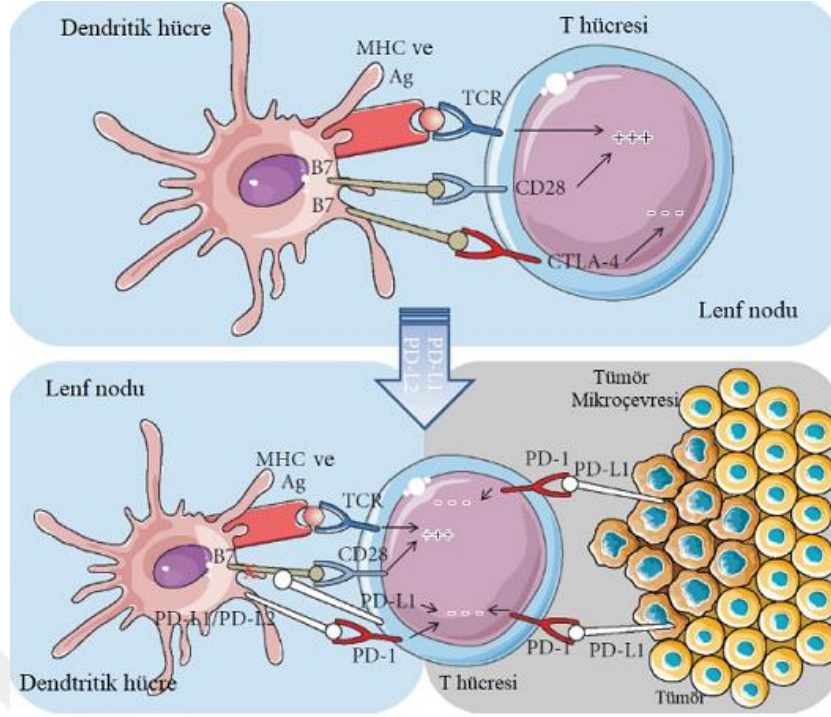
hücrelerin fonksiyonlarını araştırmıştır. KHDAK'lı olgularda PD-1 eksprese eden tümör infiltrate CD8⁺ T hücrelerinin fonksiyonunun bozulduğu ve hem tümör dokusu hem de periferik kanda CD8⁺ T hücrelerinde PD-1 ekspresyonunun arttığını bulunmuştur. Araştırmanın sonucu olarakta CD8⁺ T hücrelerinde PD-1 ekspresyonunun o hücrenin profilerasyonu ve sitokin üretimini kısıtlamakta olduğunu belirtmişlerdir [88].

2.4.2. Sitotoksik T Lenfosit Antijen-4 ve CD28 Molekülü

Diğer inhibitör reseptör olan CTLA-4 de immün sistemin aktivasyonunu kontrol eden bir moleküldür. Aktive T hücrelerinde bulunan CTLA-4 dendritik hücreler veya antijen sunan hücrelerdeki ligandlarına bağlandığında immün sistemin aktivasyonu inhibe olmakta ve immün reaksiyon durdurulmaktadır [62]. Ayrıca CTLA-4 IL-2 üretimini inhibe ederek naif CD4⁺ T hücrelerinin farklılaşmasını etkilemektedir [98]. CTLA-4 molekülü immün aktivasyonun kontrolünü daha erken bir dönemde, PD-1 molekülü ise immünolojik kontrolü biraz daha geç bir dönemde sağlamaktadır [62].

CTLA-4 eksprese etmeyen farelerde CD28 aktivasyonuna bağlı olarak otoimmünite geliştiği gösterilmiştir [98]. *In vitro* ve *in vivo* çalışmalar ile CD80/86-CTLA-4 etkileşiminin affinitesinin CD28-CD80/86 etkileşiminden yüz kat daha fazla olduğu gösterilmiştir [89, 99]. Tc hücresindeki CTLA-4 ile dendritik hücredeki CD80/86 etkileşimi ile dendritik hücreden eksprese edilenIDO artmaktadır. Artan IDO triptofanın katabolize olmasına sebep olarak Tc hücresinin cevabını inhibe etmektedir [89].

CD28 sinyali T hücresinin sensivitesinin artmasına, T hücre gelişimine ve farklılaşmaya aracılık etmektedir [100]. CD28'in aktivasyonu negatif yüklü fosfolipidler ve pozitif yüklü kalsiyum iyonları ile düzenlenmektedir [100]. Fonksiyonel açıdan CD8⁺CD28⁻ fenotipteki hücrelerin baskılayıcı fonksiyona sahip oldukları ve tümör bölgelerinde lokalize oldukları gösterilmiştir [1, 78, 79]. Eş baskılayıcı sinyaller B7-CD28 yolağını sınırlandırarak doku hasarını ve inflamasyonu azaltmaktadır [98]. Ayrıca tümör mikro çevresinde antijen sunan hücreler ve hematopoetik olmayan hücrelerin yüzeyinden eksprese olan inhibitör moleküller immün regülasyona aracılık etmektedir [98].



Şekil 2-5 : CTLA-4 ve PD-1/PD-L1 yolları [101].

2.4.3. Çözünebilir Programlı Hücre Ölüm Reseptörü ve Çözünebilir Sitotoksik T Lenfosit Antijen-4

Çözünebilir reseptörler veya ligandları membran yüzeyinde yer alan reseptör ve ligandların parçalanması sonucunda oluşmakla birlikte yeniden de üretilmekte ve plazmada serbest olarak bulunmaktadır [102].

Plazmada bulunan çözünebilir CTLA-4 (sCTLA-4) ve çözünebilir PD-1 (sPD-1) seviyesi kanserinin gelişimini, prognozu ve tedaviyi etkilemektedir [102]. Ayrıca sPD-1; PD-L1/CD80, PD-L1/PD-1 ve PD-L2/PD-1 etkileşimlerini inhibe etmektedir [102]. *In vivo* araştırmalar özellikle PD-L1⁺ tümör hücrelerinde sPD-1-CH50 rekombinant peptidin hem makrofajlar hem de CD8⁺ T lenfositlerde sitolitik aktiviteyi arttırdığı gösterilmiştir [103]. Sitolitik aktivitedeki bu etki IFN- γ ve TNF- α salınımının artmasından kaynaklanmaktadır. Bu bulgular rekombinant protein sPD-1-CH50'nin tümör cerrahisi sonrası bir tedavi adayı olabileceği düşünülmektedir [86].

Harmjan ve arkadaşları, antijen sunan hücreler ve T hücrelerinin kokültürlerini yaparak sPD-1 molekülünün etkisini araştırmıştır. Deney şartlarına sPD-1 eklenmesinin hem T hücre proliferasyonunu hem de IL-2 üretimini baskıladığı gösterilmiştir [104]. EGFR mutasyonuna sahip, erlotinib tedavisi

alan, ileri evre KHDAK'lı 38 hastada gerçekleştirilen bir çalışmada; hastalardan erlotinibe dirençli olanların serum sPD-1 konsantrasyonunda tedavi almayan hasta grubuna göre arttığı gözlemlenmiştir. Erlotinib tedavisi süresince sPD-1 düzeyi artan hasta grubunda sağkalım sürelerinin sPD-1 konsantrasyonu düşük hastalara göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir [105] .

Tablo 2-2 : Çözünabilir Reseptörler ve Ligandlar

Çözünabilir Reseptör veya Ligand	Yapısı	Hücre Kaynağı	Üretim şekli	Ligandı veya Reseptörü	Fonksiyonu
sPD-1	Monomerik	Periferik Kan Mononükleer Hücre (PKMH)	mRNA	PD-L1/2	PD-L/PD-1 etkileşimini bloke etmek CD8 ⁺ T hücrelerini aktive etmek
sCTLA-4	Monomerik	Monosit Regülatör T hücreleri (Treg) Olgunlaşmamış Dendritik hücreler	mRNA	CD80/CD86	T hücre cevabını baskılamak
sPD-L1	Bilinmiyor	Olgunlaşmış Dendritik Hücreler	Membranın yüzeyinde yer alan proteinin parçalanması	PD-1	T hücre cevabını baskılamak
sPD-L2	Bilinmiyor	Aktive Lökositler	mRNA	PD-1	Bilinmiyor
sCD80	Homodimer	Uyarılmamış Monositler B hücreleri	mRNA	CTLA-4 / CD28	PD-1/PD-L1 yolağını inhibe etmek
sCD86	Monomer	Dinlenme Fazındaki Monositler Dendritik Hücreler	Membranın yüzeyinde yer alan proteinin parçalanması / mRNA	CTLA-4	T hücre cevabını baskılamak

2.5. Sitokinler

Sitokinler doğal ve kazanılmış immünitede rol oynayan bir protein ailesidir. Hücre büyümesi, hücre aktivasyonu, enflamasyon, doku onarımı, fibrosis ve morfogenez gibi önemli biyolojik olayların regülasyonundan sorumludurlar. Genel olarak sitokinler enflamasyonda veya antijen stimülasyonuna yanıt olarak sentezlenir ve lokal olarak etki ederler [106]. Bazı

sitokinler doğrudan antiproliferatif etkileri veya indirekt olarak proapoptatik veya sitotoksik etkileriyle tümör hücrelerinin büyümesini sınırlandırmaktadır [106].

2.5.1. Tümör Nekrozis Faktör Alfa

TNF- α ; tümör hücrelerinden ve konakçının hücrelerinden salınan, doğal ve edinsel immün yanıtta önemli rolleri bulunan, aynı zamanda tümör mikro çevresinde enflamasyona sebep olan önemli bir sitokindir [107]. TNF- α , hücre içinde amino ucu bulunan bir tip II transmembran proteindir [108]. TNF- α iki adet transmembran reseptörleri Tümör Nekrozis Faktör Reseptör 1 (TNFR1) ve Tümör Nekrozis Faktör Reseptör 2 (TNFR2)'ye bağlanarak hücre proliferasyonu, farklılaşması ve apoptozis gibi çok sayıda hücre fonksiyonu regüle etmektedir. TNFR1 birçok hücrede eksprese edilirken, TNFR2 esas olarak hematopoetik hücrelerde eksprese olmaktadır [107]. TNF- α 'nın TNFR1 reseptörüne bağlanması sonucunda hücre içi sinyal yolları aktive olmakta hedef hücreyi apoptoza sürüklemektedir. Bununla birlikte TNF- α 'nın TNFR2 reseptörüne bağlanması hücreyi apoptoza sürüklememekte sadece ortamda enflamatuvar yanıt oluşmaktadır [109]. TNF- α yüksek oranda tümörde eksprese edildiğinden pro-anjiyogenik özelliklerinin bulunduğu düşünülmektedir [109]. Paradoksal olarak aynı zamanda yüksek dozlarda etkili bir anti-vasküler sitokin olan TNF- α tümör vaskülarizasyonu önlemek için de kullanılabilir. Fakat güçlü ve toksik yan etkilerinden dolayı bu sitokinin tedavi amaçlı kullanımında bazı sınırlamalar bulunmaktadır [108]. Kronik enflamatuvar hastalıkların tedavisi için TNF- α 'yı hedef alan çözünebilir füzyon proteinleri ve nötralizasyon antikorlarından geliştirilmiştir [107].

TNF- α hem malign hücrelerde hem konakçının hücrelerinde onkogenleri aktive edebilmektedir [110]. Tümör dokularından TNF- α mRNA'sı ve proteini izole edilmekle birlikte kötü prognozla seyreden bazı kanser olgularının plazmalarında çözünebilir TNF- α seviyesinin yüksek olduğu tespit edilmiştir [111].

Kanserle enflamasyonun birbiri ile ilişkili olduğuna dair veriler bulunmaktadır [108, 112]. Birçok kronik enflamatuvar hastalıkla birlikte kanser riskinin artması, kanserlerin kronik enflamasyon bölgelerinde ortaya çıkması,

enflamasyonda rol oynayan kimyasal mediyatörlerin birçok kanserde bulunması ve enflamasyonunun azalması ile kanserin yayılımının engellenmesi bu kanıtlar arasında yer almaktadır [112-114]. Lewis Akciğer Kanseri hücre hattında, ekstraselüler matriksten salgılanan proteinlerin makrofajlardan IL-6 ve TNF- α üretimine neden olduğu ve bu sitokinlerin akciğer kanser metastazlarını arttırdığı gösterilmiştir [111, 115]. Başka bir akciğer kanseri modelinde malign hücrelerden salgılanan TNF- α 'nın kan damarlarının aşırı geçirgenliğine ve plevral efüzyona neden olduğu saptanmıştır [116].

2.5.2. Interferon Gamma

IFN- γ , interferon ailesinin bir parçası olarak keşfedilen pluripotent bir sitokindir [117]. Doğal bağışıklığın bir parçası olan NK hücreleri tarafından da salgılanmaktadır. İmmün yanıtların adaptif fazında CD4⁺ ve CD8⁺ T hücreleri tarafından salgılanan IFN- γ immün sistemin düzenlenmesinde ve anti-mikrobiyal/anti-viral konak savunmasında önemli fizyolojik işlevlere sahiptir [118]. Ayrıca, IFN- γ 'nın hamilelik, obezite, allerji, otoimmün hastalıkların yanı sıra kanserde de önemli biyolojik rolleri bulunmaktadır [118, 119].

IFN- γ , kanser hücreleri üzerinde doğrudan anti-proliferatif ve proapoptotik etkilere sahip olmakla birlikte sergilediği immünomodülatör etkilerle kansere karşı immün yanıtı da arttırmaktadır [120]. Plataniyas ve arkadaşları akciğer karsinomu ve lenfomanın IFN- γ eksikliği olan farelerde kendiliğinden gelişebildiğini kanıtlayarak bu sitokinin hayvan modellerinde anti-tümöral etkisini göstermiştir [121]. Hodge ve arkadaşları, akciğer kanseri dokusunu, kanser dışı akciğer dokusu ile karşılaştırarak, tümörle ilişkili CD4⁺, CD8⁺, NKT hücrelerinde ve NK hücrelerinde IFN- γ üretiminin azaldığını bulmuşlardır [122].

Tüm bu bilgiler ışığında çalışmamızda VAMLA uygulanan KHDAK'li hastalarda cerrahi rezeksiyon sonrası saptanan sağkalım oranlarındaki artışın mekanizmasında Tc lenfositlerinin rollerini araştırmayı planladık. Mevcut çalışmaların ışığında çalışmamızda, KHDAK (adenokarsinom, epidermoid-skuamöz-hücreli karsinom, büyük hücreli anaplastik karsinom) tanılı ve radyoterapi almamış hastalarda VAMLA öncesinde periferik kan ve lenf nodu örnekleri ile VAMLA sonrası ve sağlıklı kontrollerde periferik kan CD8⁺ Tc

lenfositlerinde hem CD28, PD-1 ve CTLA-4 inhibitör reseptör ekspresyonları hem de çözünebilir PD-1, PDL-1 ve CTLA-4 düzeyleri saptanmıştır. Bu hücrelerin anti-tümöral ve sitotoksik fonksiyonları granzim A ve IFN- γ ve TNF- α ekspresyon analizleri ile değerlendirilmiştir.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışma Grubu

3.1.1. Olgu Seçimi

Çalışmaya İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa - Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Göğüs Cerrahisi Anabilim Dalı'na gelen transtorasik iğne aspirasyonu (TTİA), bronkoskopi, bilgisayarlı toraks tomografisi (Toraks BT) ve/veya PET-BT ve mediastinoskopi yöntemleri ile T1-T4N0M0 evrelerinde olduğu saptanan 18 yaşından büyük, daha önce kemoterapi ve radyoterapi almamış, VAMLA uygulanacak olan KHDAK'lı hastalar dahil edilmiştir (Tablo 3-1). Hastalara, doku ve kan örneklerinin alınması için bilgilendirilmiş gönüllü onam formu imzalatılmıştır. KHDAK'lı olguların VAMLA öncesi periferik kan örnekleri ve mediastinal lenf nodu örnekleri (n=17, yaş ortalaması 64 ± 7) ile VAMLA'dan yaklaşık 1 ay sonraki periferik kan örnekleri (n=12) alınmıştır. Hastaların demografik özellikleri (cinsiyet, yaş), sigara içimi miktarı, varsa ek hastalıkları, hemoglobin, lökosit, LDH, eritrosit, CRP, solunum fonksiyon testi parametreleri, ameliyat öncesi yapılmış ise bronkoskopi, PET-BT irdelenmesi sonuçları, ameliyat öncesi ve sonrası tümöre ait T, N ve M belirleyicileri, yapılan ameliyat tipi ve ameliyat sonrası parametreleri de kayıt edilmiştir. Biyokimyasal parametreleri ve tıbbi geçmişi dosya olarak tutulmuştur.

Her bir hasta için kontrol teşkil etmesi amacıyla aynı yaş ve cinsiyetteki, sigara kullanmayan sağlıklı gönüllünün (n=20, yaş ortalaması 57 ± 8) periferik kanı alınmıştır.

3.1.2. Araştırmaya Dahil Edilme ve Dışlanma Kriterleri

3.1.2.1. Genel Dahil Edilme Kriterleri

1. 18 yaş üstü
2. KHDAK tanılı klinik T1-T4N0M0 evresindeki olgular

3.1.2.2. Dahil Edilmeme Dışlanma Kriterleri

1. 18 yaş altı
2. Radyoterapi ve/veya kemoterapi almış/almakta olan olgular

3. İnoperabl olgular
4. Klinik T1-T4N0M0'dan ileri evredeki olgular
5. Nüks veya metastaz kaynaklı tümörü olan olgular

Tablo 3-1: KHDAK'lı Hastaların Klinik Özellikleri

Demografik Tablo

Cinsiyet

— Erkek	14 (%82)
— Kadın	3 (%18)

Yaş (Ort ± SD)

65.33 ±6.95

Sigara Öyküsü (Ort)

40.5

Operasyon

— Lobektomi	4 (%44)
— Bilobektomi	3 (%33)
— Pnöminektomi	2 (%23)

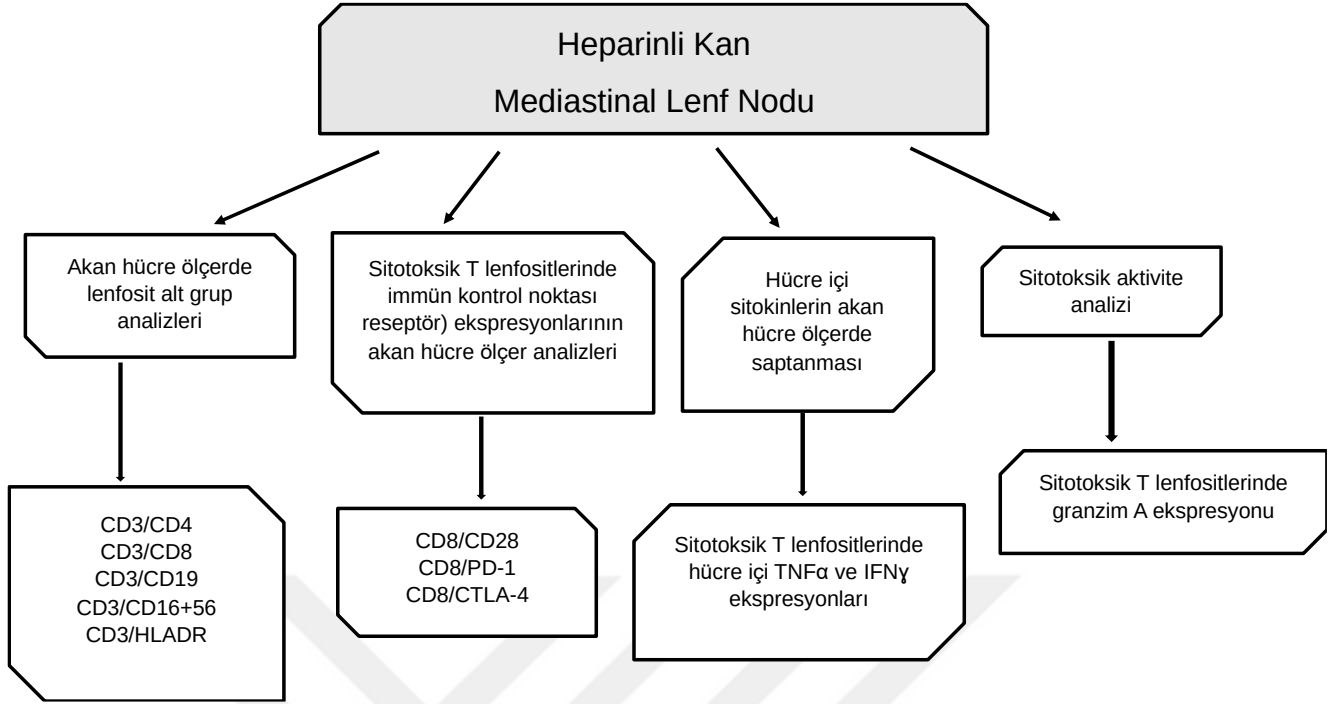
Patolojik Tanısı

— Adenokarsinom	2 (%23)
— Non-Adenokarsinom	4 (%44)
KHDAK	
— Diğer	3 (%33)

Patolojik Evre

— Evre 1	1 (%17)
— Evre 2	3 (%50)
— Evre 3	2 (%33)

KHDAK hastalarından ve kontrol grubundan edilen periferik kan ve mediastinal lenf nodu temini sonrasında yapılan deney aşamaları aşağıda özetlenmiştir. (Şekil: 3-1)



Şekil 3-1: Heparinli kan ve lenf nodu örnekleri için tasarlanan deneysel akış şeması

3.2. Lenf Nodu ve Periferik Kan Örneklerinin Patoloji ve İmmünoloji Laboratuvarına Transferi

VAMLA işlemi ile elde edilen materyalden alınan lenf nodu örnekleri ameliyat masasının hemen ardındaki bir masada patolojik incelemeyi bozmayacak şekilde disekte edilmiş ve hemen RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute medium, Biological Industries, USA) kültür besiyeri içine aktarılmıştır. Patoloji laboratuvarında hastanın tanısı için lenf nodlarının patolojik ve immünohistokimyasal boya incelemeleri yapılmıştır. Heparinli tüplere alınan periferik kan ve steril doku kültürü medyumumu RPMI-1640 içine konulan lenf nodu örnekleri Aziz Sancar DETAE immünoloji laboratuvarına hızlıca ulaştırılmıştır.

3.3. Mediastinal Lenf Nodlarından Lenfosit İzolasyonu

Steril şartlarda laboratuvarımıza ulaştırılan lenf nodları RPMI-1640 (Biological Industries, USA) doku kültürü besiyeri içeren petri kabına aktarılmış ve lenf dokusunun etrafındaki yağ parçaları ve artık dokular 18 numaralı steril bistüri ucu (plusMED) yardımıyla uzaklaştırılmıştır. Steril 2 cc'lik enjektör yardımıyla lenf nodu içeriği tamamen petri kabına çıkartılmıştır ve 70 µm'lik cell strainerdan (BD Biosciences, CA) süzülerek büyük doku artıklarından

arındırılmıştır. Lenfositlerin eritrositlerden ve diğer doku hücrelerinden arındırılması amacıyla hücre süspansiyonu 1:2 (Ficoll:Hücre süspansiyonu) oranında Ficoll/Hypaque (Biochrom AG, Berlin, Germany) üzerine yayılarak oda ısısında 1800 rpm'de 25 dakika santrifüj edilmiştir. Daha sonra interfazdan toplanan mononükleer hücreler 2 kez 5 dakika PBS (Sigma-Aldrich, USA) ile 2000 rpm'de soğutmalı santrifüjde yıkama aşamasını takiben akan hücre ölçer analizleri için hücreler buzda RPMI-1640 besiyerinde bekletilmiştir. Tüm hücre kültürlerinde zenginleştirilmiş RPMI-1640 (%10 fetal calf serum, 1 mM sodyum pirüvat, %1 MEM (Minimal essential medium) non esansiyel aminoasit ve vitamin solusyonu, 2 mM L-glutamin, 100 U/ml penisilin, 100 µg/ml streptomisin, 50 µM 2 merkaptotanol, (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MA) kullanılmıştır.

3.4. Periferik Kandan Mononükleer Hücre İzolasyonu

KHDAK'li hasta gruplarından VAMLA işlemi öncesi ve sonrası ile sağlıklı kontrollerden alınan 10 ml heparinli kan örneklerinden periferik kan mononükleer hücreler (PKMH) steril şartlarda Ficoll/Hypaque (Biochrom AG, Berlin, Germany) yoğunluk gradiyent santrifüjü ile ayrılmıştır. Bu amaçla heparinize kan örnekleri hücre süspansiyonu 1:2 (Ficoll:Hücre süspansiyonu) oranında Ficoll/Hypaque üzerine yayılarak oda ısısında 1800 rpm'de 25 dakika santrifüj edilmiştir. Konik tabanlı falcon tüpün içerisine konulan ficoll üzerine yayılan kan, yoğunluk gradiyentine göre yukarıdan aşağıya doğru serum, PKMH, ficoll ve eritrosit/granülositler olmak üzere tabakalara ayrılmış ve PKMH'ler kolaylıkla toplanabilmiştir. PKMH'ler 2 kez PBS ile 2000 rpm'de 5 dakika soğutmalı santrifüjde yıkanmıştır. Elde edilen PKMH'ler tripan mavisi boyama yöntemi ile boyanıp Neubauer hemositometresinde sayılmış ve deneylerde kullanılabilecek kadar buzda zenginleştirilmiş RPMI-1640 besiyerinde muhafaza edilmiştir.

3.5. A549 Hücre Serisinin Kültür aşamaları

Sitotoksikite deneylerimizde A549 ATCC® CL-185™. KHDAK hücre serisi için zenginleştirilmiş Gibco™ Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F-12) mediumu (%10 fetal sıgır serumu, %1 MEM (Minimal essential medium) non esansiyel aminoasit, 1 mM sodyum pirüvat, ve

vitamin solusyonu, 2mM L-glutamin, 100 U/ml penisilin, 100 µg/ml streptomisin, 50 µm 2 merkaptotanol, (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MA) besiyeri kullanılmıştır. Hücreler 75 cm² flasklarda çoğaltılmış, 37°C %5 CO₂'li inkübatörde kültüre alınmıştır. Belli aralıklarla yapılan pasaj işlemi için tek tabaka olarak çoğalan A549 hücreleri flask yüzeyinden %0,25 (w/v) Tripsin-0.53 mM EDTA solüsyonu (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MA) ile kaldırılmış ve fetal sığır serumu ihtiva eden DMEM/F-12 ve takiben PBS (pH=7.4) (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MA) solüsyonu ile yıkama aşamalarını takiben uygun miktardaki yeni hücre süspansiyonu 75 cm² flasklara aktarılmış ve 37°C %5 CO₂'li etüvde inkübe edilmiştir. Kültürlerin pasaj aralıklarında besiyeri değişimleri yapılmıştır.

3.6. Mediastinal Lenf Nodu Biyopsileri ve Periferik Kan Örneklerinde Lenfosit Alt Grupları ve Sitotoksik T Hücrelerinde İnhibitör Reseptör Ekspresyonlarının Saptanması

Laboratuvarımıza ulaştırılan lenf nodu biyopsilerinde lenfosit izolasyonu sonrası, periferik kan örneklerinde ise tam kan lizis metodu ile lenf dokusu ve kanda bulunan lenfositlerin alt grup oranları ve inhibitör reseptör ekspresyon analizleri yapılmıştır. Lenf nodundan izole edilen lenfosit süspansiyonundan ve periferik kandan hücre oranı 2x10⁵/ml hücre olacak şekilde ayarlanıp tüplere pipetlenmiş ve üzerlerine yüzey antikorlar olan anti-human-IgG1-FITC/-IgG2a-PE, anti-human-CD4-FITC/CD8-PE, anti-human-CD3-FITC/CD19-PE, anti-human-CD3-FITC/-CD16+56-PE, anti-human-CD3-FITC/-HLADR-PE ve son tüpümüzde 5 renkli boyamaya uygun olarak anti-human-CD3-FITC/-PD-1-APC/Cy7/-CD28-AlexaFluor700/-CD8-PE^{DAZZLE}/-CTLA-4-APC monoklonal antikorları uygun dilüsyonlarda eklenerek, örnekler 20 dakika oda sıcaklığında, karanlıkta inkübe edilmiştir (Tablo 3-2). İnkübasyon sonrasında periferik kan üzerine eritrositlerin patlatılarak ortamdaki uzaklaştırılması amacıyla 2 ml FACS Lysing (BD Bioscience, San Jose, CA) çözeltisi eklenerek 15 dk karanlıkta inkübe edilerek eritrositler ortamdaki uzaklaştırılmıştır. İnkübasyon sonrasında hücrelerin üzerine izotonik bir tampon çözelti olan 2 ml PBS (Fosfat Tampon Tuz Çözeltisi) (Sigma-Aldrich, USA) eklenerek 10 dk 1800 rpm'de 2 kez santrifüj edilmiştir. Santrifüjü takiben üst sıvılar uzaklaştırılarak tüplere 300 µl

FACS Flow Sheath sıvısı (BD Bioscience, San Jose, CA) ilave edilerek akan hücre ölçer cihazında (FacsAriaII, BectonDickinson, SanJose, CA) hücre yüzey molekül ekspresyonu saptanmıştır. Veri analizleri FlowJo™10.2 (Tree Star Inc., USA) ve FACSDiva 8.0.1 (BD Biosciences, CA) programları ile yapılmıştır.

Tablo 3-2 : Lenfosit Alt Grupları ve Tc Hücrelerinde İnhibitör Reseptör Ekspresyonlarının Tayininde Kullanılan Monoklonal Antikorlar

Monoklonal Antikor	Renk	Marka
anti-human IgG1/IgG2a	FITC/PE	BD Biosciences, San Diego, CA
anti-human CD3/CD19	FITC/PE	BD Biosciences, San Diego, CA
anti-human CD4/CD8	FITC/PE	BD Biosciences, San Diego, CA
anti-human CD3/CD16+56	FITC/PE	BD Biosciences, San Diego, CA
anti-human CD3/HLA DR	FITC/PE	BD Biosciences, San Diego, CA
anti-human CD3	FITC	Biolegend, San Diego, CA
anti-human CD8	PE Dazzle	Biolegend, San Diego, CA
anti-human CD28	AlexaFluor700	Biolegend, San Diego, CA
anti-human CD279(PD1)	APC/Cy7	Biolegend, San Diego, CA
anti-human CD152(CTLA-4)	APC	Biolegend, San Diego, CA

3.7. PD1 ve CTLA-4 Eksprese Eden CD8⁺ Sitotoksik T Lenfositlerinde Hücre İçi IFN- γ ve TNF- α Sitokin Salınımının Belirlenmesi

Lenf nodu örnekleri ve periferik kandan elde edilen PKMH'ler tripan mavisi boyama yöntemi ile boyanıp Neubauer hemositometresinde (sayma kamarası) hücre sayımı yapılmış ve 1×10^6 hücre/ml olacak şekilde RPMI-1640 besiyerinde karbondioksitli etüvde 37°C'de %5 CO₂'li ortamda 4 saat 24 kuyucuklu doku kültürü plaklarında hücre içi sitokin düzeylerinin belirlenebilmesi ve aynı zamanda salgılanan sitokinlerin hücre içinde tespit edilebilmesi amacıyla hücre stimülasyon kokteyli (eBiosciences, San Diego, CA) ile stimüle

edilmiştir. İnkübasyon sonrası hücreler toplanarak ve 2 kez PBS ile 1800 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası lenfosit ($2 \times 10^5/\text{ml}$) süspansiyonu tüplere pipetlenerek ve hücre yüzey molekül ekspresyonu için uygun dilüsyonlarda anti-human-CD3-FITC, anti-human-CD8-PE^{DAZZLE}, anti-human-PD-1-APC-Cy7 ve anti-human-CTLA-4-APC monoklonal antikorları ve negatif kontrol tüpünde ise immunoglobulin izotipindeki izotipik kontrol antikorları ile boyanıp karanlık ortamda 30 dakika inkübe edilmiştir. Yüzey boyama aşamalarını takiben fiksasyon ve permeabilizasyon aşamalarına geçilmiştir. Bu amaçla tüplere 250 µl Cytifix Perm solusyonu (BD Biosciences, San Diego, CA) eklenmiş ve 15 dakika +4°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası tüplere 1 ml PermWash solusyonu (BD Bioscience, San Diego, CA) ilave edilip 5 dakika 2000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Üst sıvıların uzaklaştırılmasını takiben tüplere 150 µl PermWash solüsyonu eklenmiştir. Bu aşamayı takiben hücre süspansiyonuna 10 µl anti-human-IFN- γ -PE-Cy7, anti-human-TNF- α -PerCp monoklonal antikorları ve nonspesifik bağlanmaların önlenmesi amacıyla izotipik kontrol antikorlarının ilavesinin ardından deney tüpleri karanlık ortamda 30 dakika +4°C'de inkübe edilmiştir (Tablo: 3-3). İnkübasyonu takiben hücreler 2000 rpm'de 10 dakika PBS ile santrifüf edilmiş ve 500 µL %2'lik paraformaldehitli PBS ilavesinin ardından akan hücre ölçer cihazı (FACS Aria II, Becton Dickonson) ile analiz yapılmıştır. FlowJoTM10.2 (Tree Star Inc., USA) ve FACSDiva 8.0.1 (BD Biosciences, CA) programları ile veri analizleri tamamlanmıştır.

Tablo 3-3 : CD8⁺ Tc Lenfositlerinde Hücre İçi IFN- γ ve TNF- α Sitokin Salınımının Belirlenmesi İçin Kullanılan Monoklonal Antikorlar

Monoklonal Antikor	Renk	Marka
anti-human-CD3	FITC	Biolegend, San Diego, CA
anti-human-CD8	PE Dazzle	Biolegend, San Diego, CA
anti-human-CD28	AlexaFluor700	Biolegend, San Diego, CA
anti-human-CD279 (PD1)	APC/Cy7	Biolegend, San Diego, CA
anti-human-CD152 (CTLA-4)	APC	Biolegend, San Diego, CA
anti-human-TNF- α	PerCp	Biolegend, San Diego, CA
anti-human-CD152 (CTLA-4)	PE-Cy7	Biolegend, San Diego, CA

3.8. CD8⁺ Sitotoksik T Lenfositlerinde Sitotoksik Aktivitenin Saptanması

KHDAK'li hastaların VAMLA esnasında alınan lenf nodu ve periferik kan örnekleri ile sağlıklı kişilerin kanlarında CD8⁺ Tc hücrelerinin sitotoksik aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla PKMH'ler, stimülasyonsuz ve tümör hücre stimülasyonlu şart olarak efektör:hedef hücre(10:1) oranında A549 hücreleriyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası yıkama aşamasını takiben hücreler anti-human-CD3-FITC ve anti-human CD8-APC antikoruyla oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon aşaması sonrası PBS ile yıkama aşamasını takiben hücre içi boyama aşamalarına geçilmiştir. Fiksasyon ve permeabilizasyon aşamalarını takiben hücre süspansiyonuna 10 μ l anti human-Granzim A-PE antikoru ve nonspesifik bağlanmaların önlenmesi amacıyla diğer tüpe izotipik kontrol antikorlar pipetlenmiş ve hücreler karanlık ortamda 20 dakika +4⁰C'de inkübe edilmiştir. Deney tüplerinin analizleri FACS Aria II akan hücre ölçer cihazında yapılmıştır. Sonuçların yorumlanması FlowJo™10.4.2 (Tree Star Inc., USA) programında yapılmıştır.

Tablo 3-4: Sitotoksik T Lenfositlerde CD107a ve Granzim A Salınımının Tayini için Kullanılan Monoklonal Antikorlar

Monoklonal Antikor	Renk	Marka
anti-human-CD3	FITC	Biolegend, San Diego, CA
anti-human-CD8	APC	Biolegend, San Diego, CA
anti-human-Granzim A	PE	Biolegend, San Diego, CA

3.9. Plazma Örneklerinde Çözünebilir CTLA-4, PD-1 ve PDL-1 Düzeylerinin Tayini

KHDAK hasta grubu VAMLA öncesi ve sonrası ile sağlıklı grup periferik kandan izole edilen plazma örnekleri ELISA tayinine kadar -80°C'de muhafaza edilmiştir. ELISA kiti olarak insan sPD1, sPDL-1, sCTLA-4 ELISA kitleri kullanılmıştır.

3.9.1. Çözünebilir PD-1 ELISA Tayini

- **Standart ve Örneklerin Konulması:** Deneylerimizde insan çözünebilir PD-1 (sPD-1) ELISA kiti (Shenghai Yehua Biological Technologies, China) kullanılmıştır. Standart kuyularına 50 µl standart dilüsyonları ve 50 µl Streptavidin-HRP, örnek kuyularına 50 µl plazma örnekleri, 10µl sPD-1 antikor ve 50 µl Streptavidin-HRP pipetlenmiş ve plak 1 saat 37°C'de ısısında inkübe edilmiştir. İnkübasyonu takiben yıkama tamponu ile plaklar 5 kez ELX50 cihazında (Biotek Instruments, USA) yıkanarak bağlanmayan antikorlar uzaklaştırılmıştır.
- **Kromojen ilavesi:** Bu aşamada kuyucuklara stabilize edilmiş 50 µl kromojen A ve B pipetlenmiş ve 10 dakika 37°C'de karanlıkta inkübe edilmiştir.

- **Reaksiyonun Durdurulması:** Plaklara 50 µl/kuyu oranında stop solüsyon ilave edilip reaksiyon durdurulmuştur.
- **Plakların Okunması:** Plaklardaki optik yoğunluk (OD) 450 nm dalga boyunda ELX800 ELISA okuyucusunda (Biotek Instruments, USA) okunarak değerlendirilmiştir. sPD'in ölçüm aralığı 20-1600 µmol/L, sensitivitesi ise 10.08 µmol/L'dir.

3.9.2. Çözünebilir CTLA-4 ELISA Tayini

- **Standart ve Örneklerin Konulması:** ELISA kiti olarak insan çözünebilir CTLA-4 (sCTLA-4) ELISA kiti (Shenghai Yehua Biological Technologies, China) kullanılmıştır. Standart kuyularına 50 µl standart dilüsyonları ve 50 µl Streptavidin-HRP, örnek kuyularına 40 µl plazma örnekleri , 10µl sCTLA-4 antikor ve 50 µl Streptavidin-HRP pipetlenmiş ve ELISA plağı 1 saat 37°C'de ısısında inkübe edilmiştir. İnkübasyonu takiben yıkama tamponu ile plaklar 5 kez ELX50 cihazında (Biotek Instruments, USA) yıkanarak bağlanmayan antikorlar uzaklaştırılmıştır.
- **Kromojen ilavesi:** Bu aşamada kuyucuklara stabilize edilmiş 50 µl kromojen A ve B pipetlenmiş ve 10 dakika 37°C'de karanlıkta inkübe edilmiştir.
- **Reaksiyonun Durdurulması:** Plaklara 50 µl/kuyu oranında stop solüsyon ilave edilip reaksiyon durdurulmuştur.
- **Plakların Okunması:** Plaklardaki optik yoğunluk (OD) 450 nm dalga boyunda ELX800 ELISA okuyucusunda (Biotek Instruments, USA) okunarak değerlendirilmiştir. sCTLA-4'ün ölçüm aralığı 2-600 ng/L sensitivitesi ise 1,17 ng/L olarak belirtilmiştir.

3.9.3. Çözünebilir PDL-1 ELISA Tayini

- **Standart ve Örneklerin Konulması:** İnsan çözünebilir PDL-1 ELISA kiti (Shenghai Yehua Biological Technologies, China) deneylerimizde kullanılmıştır. Standart kuyularına 50 µl standart dilüsyonlar, örnek kuyularına 50 µl plazma örnekleri ve tüm kuyucuklara önceden belirlenen dilüsyon oranında dilüsyon tampon solüsyonu pipetlenmiştir. Plaklar 30 dakika 37°C'de inkübe edilmiş ve ardından yıkama tamponu ile plaklar 5

kez ELX50 cihazında (Biotek Instruments, USA) yıkanarak bağlanmayan antikorlar uzaklaştırılmıştır.

- **Enzim ilavesi:** Bu aşamada kuyucuklara 50 µl HRP-konjugat eklenmiş ve 30 dakika 37°C'de karanlıkta inkübe edilmiştir. Plaklar yıkama tamponu ile plaklar 5 kez ELX50 cihazında yıkanarak bağlanmayan antikorlar uzaklaştırılmıştır.
- **Kromojen ilavesi:** Bu aşamada kuyucuklara stabilize edilmiş 50 µl kromojen solüsyon A ve 50 µl kromojen solüsyon B pipetlenmiş ve 15 dakika 37°C'de karanlıkta inkübe edilmiştir.
- **Reaksiyonun Durdurulması:** Plaklara 50 µl/kuyu oranında stop solüsyon ilave edilip reaksiyon durdurulmuştur.
- **Plakların Okunması:** Plaklardaki optik yoğunluk (OD) 450 nm dalga boyunda ELX800 ELISA okuyucusunda (Biotek Instruments, USA) okunarak değerlendirilmiştir. sPDL-1'in ölçüm aralığı 0,2-60 ng/ml sensitivitesi 0,13 ng/ml olarak belirtilmiştir.

3.10. İstatistiksel analiz

Araştırmada elde edilen bulguların istatistiksel analizler ile değerlendirilmesinde IBM SPSS (Statistical Package for Social Sciences) for Mac 21.0 programı kullanılmış ve verilerin dağılımı Kolmogorov-Smirnov testi ile değerlendirilmiştir. Bağımsız değişkenlerin karşılaştırılmasında Mann-Whitney testi, tekrarlayan değişkenlerin karşılaştırılmasında ise Wilcoxon testi tercih edilmiştir. İstatistiksel anlamlılık sınırı $p < 0,05$ olarak belirlenmiştir.

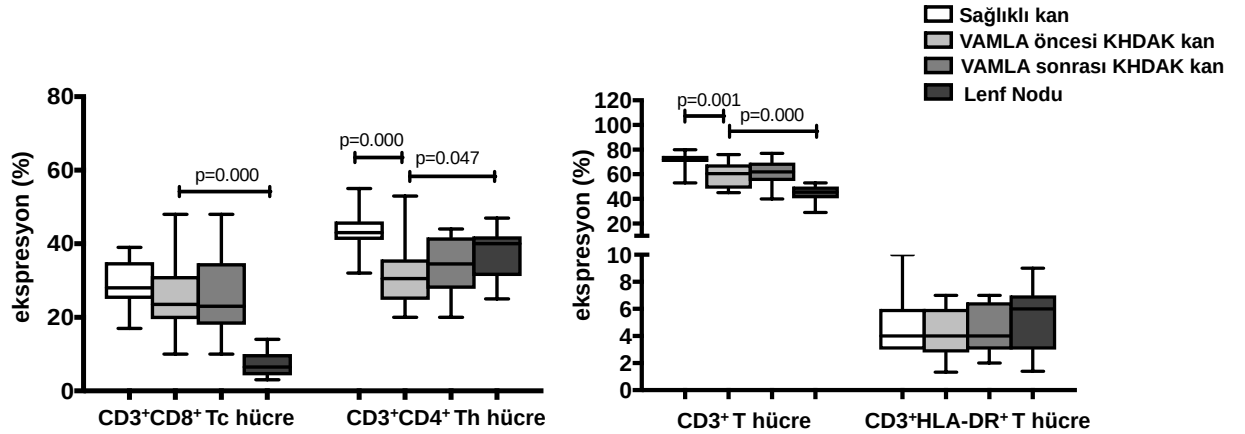
4. BULGULAR

4.1. T Lenfosit Alt Grupları ve HLA-DR Ekspresyonlarının Belirlenmesi

KHDAK'li hastaların VAMLA öncesi periferik kan örnekleri ile sağlıklı kontrol grubu kıyaslandığında $CD8^+$ T hücre ve $CD3^+HLADR^+$ aktive T hücre oranları arasında fark görülmemesine karşılık $CD3^+$ total T ($p=0.001$) ve $CD3^+CD4^+$ Th lenfositleri ($p<0.001$) KHDAK'li grupta düşük saptanmıştır.

KHDAK'li olguların VAMLA öncesi ve sonrası periferik kanları değerlendirildiğinde T hücre alt grupları ve HLA-DR ekspresyonu açısından fark görülmemiştir.

Mediastinal lenf nodu T lenfosit alt grupları ve HLA-DR ekspresyonları, VAMLA öncesi KHDAK'li olguların periferik kan örnekleri ile karşılaştırıldığında sitotoksik T ($p<0.001$) ve total T hücre ($p<0.001$) oranlarında lenf nodunda azalma, $CD4^+$ Th hücre oranlarında ($p=0.047$) ise istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artış görülmüştür. $CD3^+HLADR^+$ T aktive hücrelerinin benzer oranlarda bulunduğu tespit edilmiştir (Şekil 4-1 ve Şekil 4-3).



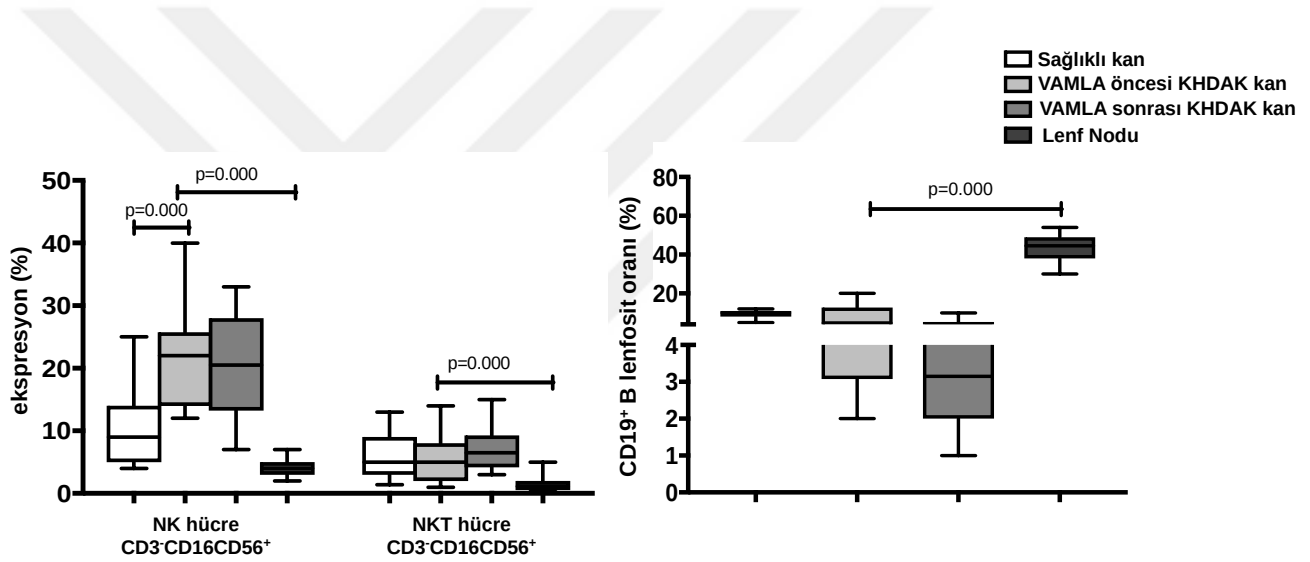
Şekil 4-1: T lenfosit alt grup oranları ve HLADR ekspresyon düzeyleri

4.2. Doğal Öldürücü Hücre (NK), NKT ve B Lenfosit Oranları

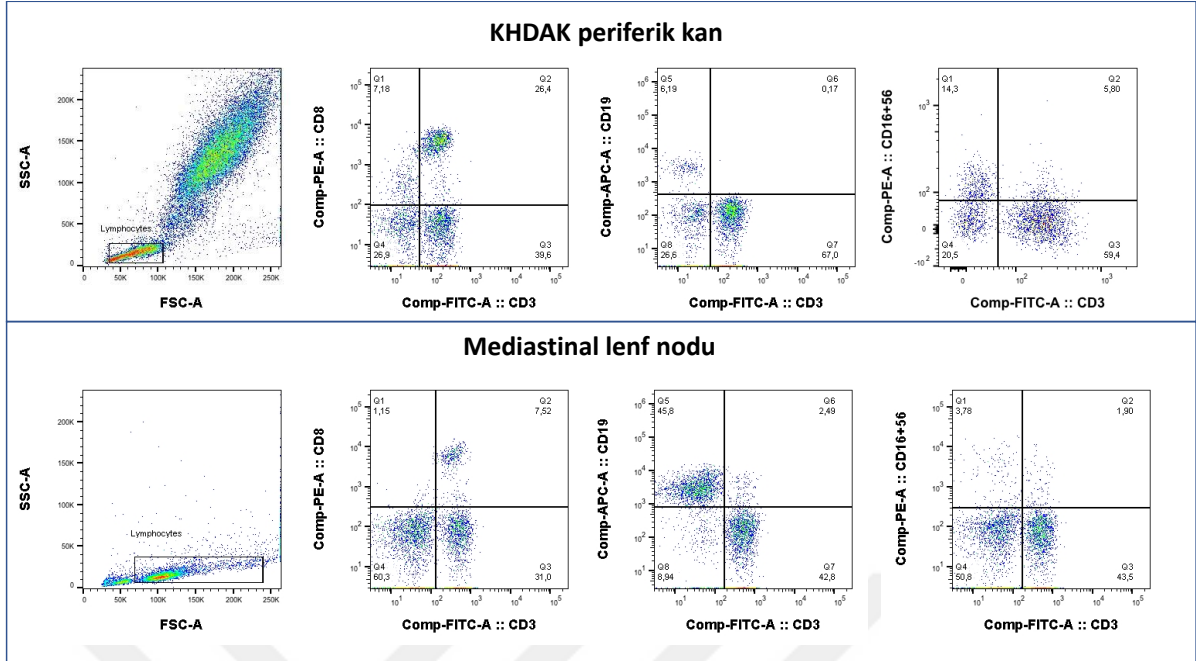
KHDAK'li hastaların VAMLA öncesi periferik kan örnekleri ile sağlıklı kontrol grubu analiz edildiğinde $CD19^+$ B lenfosit ve $CD3^+CD16^+CD56^+$ NKT hücre oranları arasında fark saptanmamasına karşılık $CD3^+CD16^+CD56^+$ NK hücre oranlarında artış ($p<0.001$) görülmüştür.

VAMLA öncesi ve sonrası yapılan analizlerde B hücre, NK ve NKT hücre oranlarında anlamlı fark saptanmamıştır (Şekil 4-2).

Mediastinal lenf nodu ve KHDAK'li hasta periferik kan örnekleri analiz edildiğinde NK ($p<0.001$), NKT hücre ($p<0.001$) oranlarında azalma, B lenfositlerinde ise artış ($p<0.001$) saptanmıştır (Şekil 4-2 ve Şekil 4-3).



Şekil 4-2: $CD19^+$ B, NK ve NKT hücre oranlarının periferik kan ve mediastinal lenf nodu analizleri



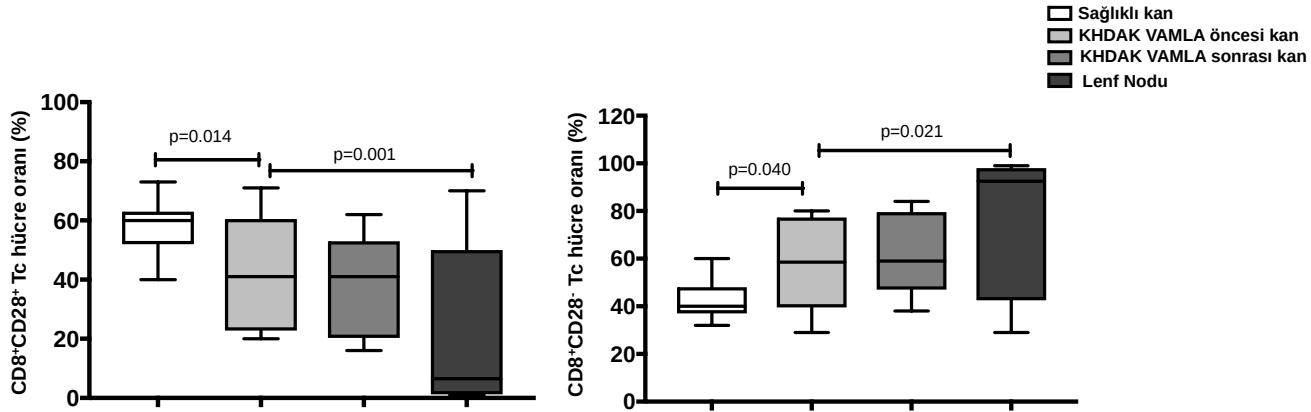
Şekil 4-3: KHDAC VAMLA öncesi periferik kan ve mediastinal lenf nodu örnekleri immünofenotiplendirme analizlerinde Tc, Th, B, NK ve NKT lenfosit oranları dot plot görüntüleri

4.3. CD28⁻CD8⁺ Regülatör Sitotoksik T lenfosit Ekspresyonlarının Belirlenmesi

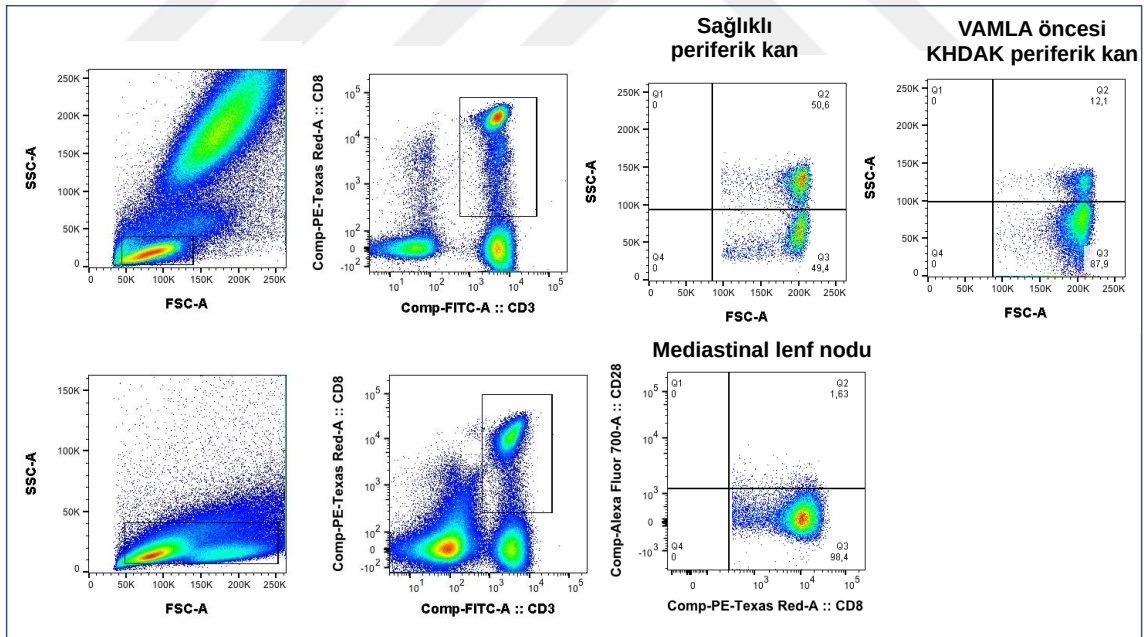
Sitotoksik T lenfositlerinde CD28 ekspresyonundaki düşüş bu hücrelere inhibitör özelliği kazandırmaktadır. VAMLA öncesi KHDAC periferik kan örnekleri ile sağlıklı kontrol grubu analiz edildiğinde CD3⁺CD8⁺CD28⁺ aktivatör Tc hücre oranında düşüş ($p=0.014$), CD3⁺CD8⁺CD28⁻ inhibitör Tc hücre oranında ise artış ($p=0.040$) saptanmıştır.

Bulgularımız VAMLA öncesi ve sonrası hem CD8⁺CD28⁺ aktivatör hem de CD28 eksprese etmeyen inhibitör fenotipteki T lenfosit oranlarının benzer yüzdelerde olduğunu göstermektedir (Şekil 4-4).

Bununla birlikte lenf nodlarında bulunan Tc lenfositlerinde VAMLA öncesi periferik kana göre CD8⁺CD28⁺ alt grup oranlarında azalma ($p=0.001$), CD8⁺CD28⁻ inhibitör grupta ise artış ($p=0.021$) saptanmıştır.(Şekil 4-4 ve Şekil 4-5).



Şekil 4-4: Aktivatör ve inhibitör sitotoksik T lenfositlerinin sağlıklı, VAMLA öncesi, sonrası periferik kan ve lenf nodu oranları alt grup analizleri



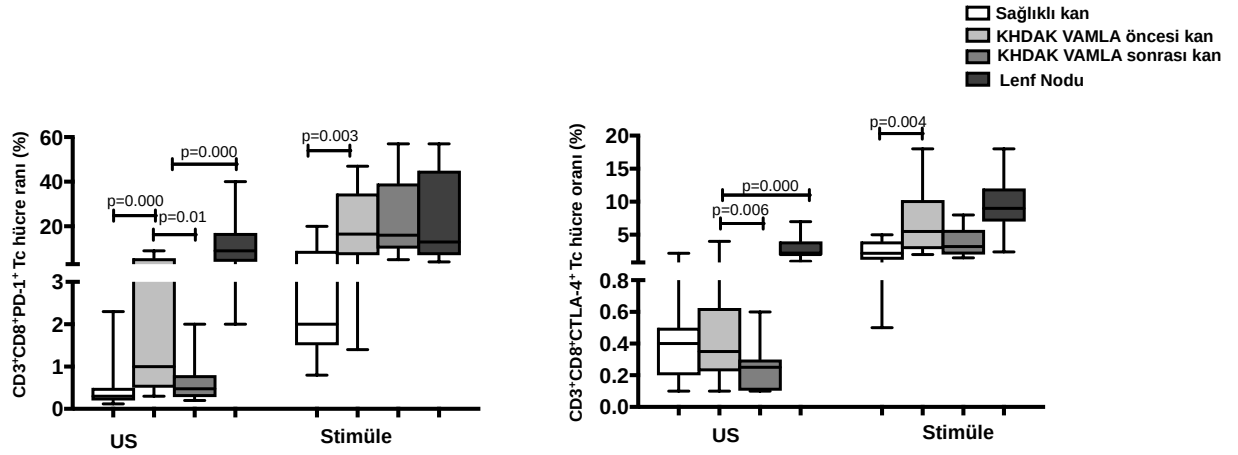
Şekil 4-5: Aktivatör ve inhibitör sitotoksik T lenfositlerinin sağlıklı kontrol, VAMLA öncesi ve lenf nodundaki akan hücre görüntüleri

4.4. Sitotoksik T lenfositlerinde PD-1 ve CTLA-4 Ekspresyon Düzeylerinin Değerlendirilmesi

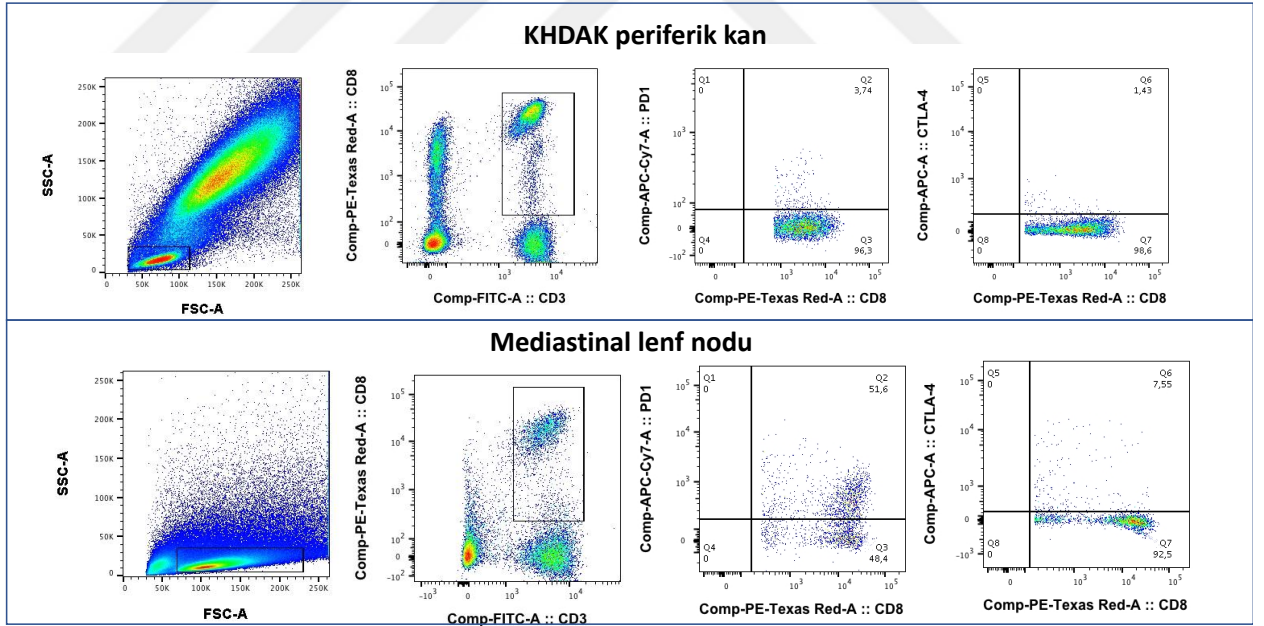
Sitotoksik T lenfositleri inhibitör reseptörlerinden PD-1 ve CTLA-4 ekspresyonu gruplar arasında hem stimülasyonsuz hem de hücre stimülasyon kokteyli ile 4 saat stimüle edilerek akan hücre ölçerinde analiz edilmiştir. Sitotoksik T hücre fonksiyon kaybına yol açan PD-1 ekspresyonu sağlıklı kan ve VAMLA öncesi yeni teşhis KHDAK'li gruplar arasında analiz edildiğinde, CD3⁺CD8⁺PD-1⁺ hücre oranları hem stimülasyonsuz ($p<0.001$) hem de stimülasyonlu ($p=0.003$) şartlarda KHDAK'li olgularda artmıştır. Diğer bir immün kontrol noktası reseptörü olan CTLA-4 ekspresyonunun ise KHDAK'li olgularda sağlıklılara kıyasla sadece stimülasyonlu şartlarda istatistiksel olarak anlamlı derecede yükseldiği ($p=0.004$) saptanmıştır (Şekil 4-6).

KHDAK'li grup VAMLA öncesi ve sonrası inhibitör reseptör oranları değerlendirildiğinde hastanın stimülasyonsuz tam kan örneklerinde hem PD-1 ($p=0.01$) hem de CTLA-4 ($p=0.006$) ekspresyonunun VAMLA sonrası Tc hücrelerinde azalmaya karşılık stimülasyon sonrası farklılık saptanmamıştır (Şekil 4-6, Şekil 4-7, Şekil 4-8)

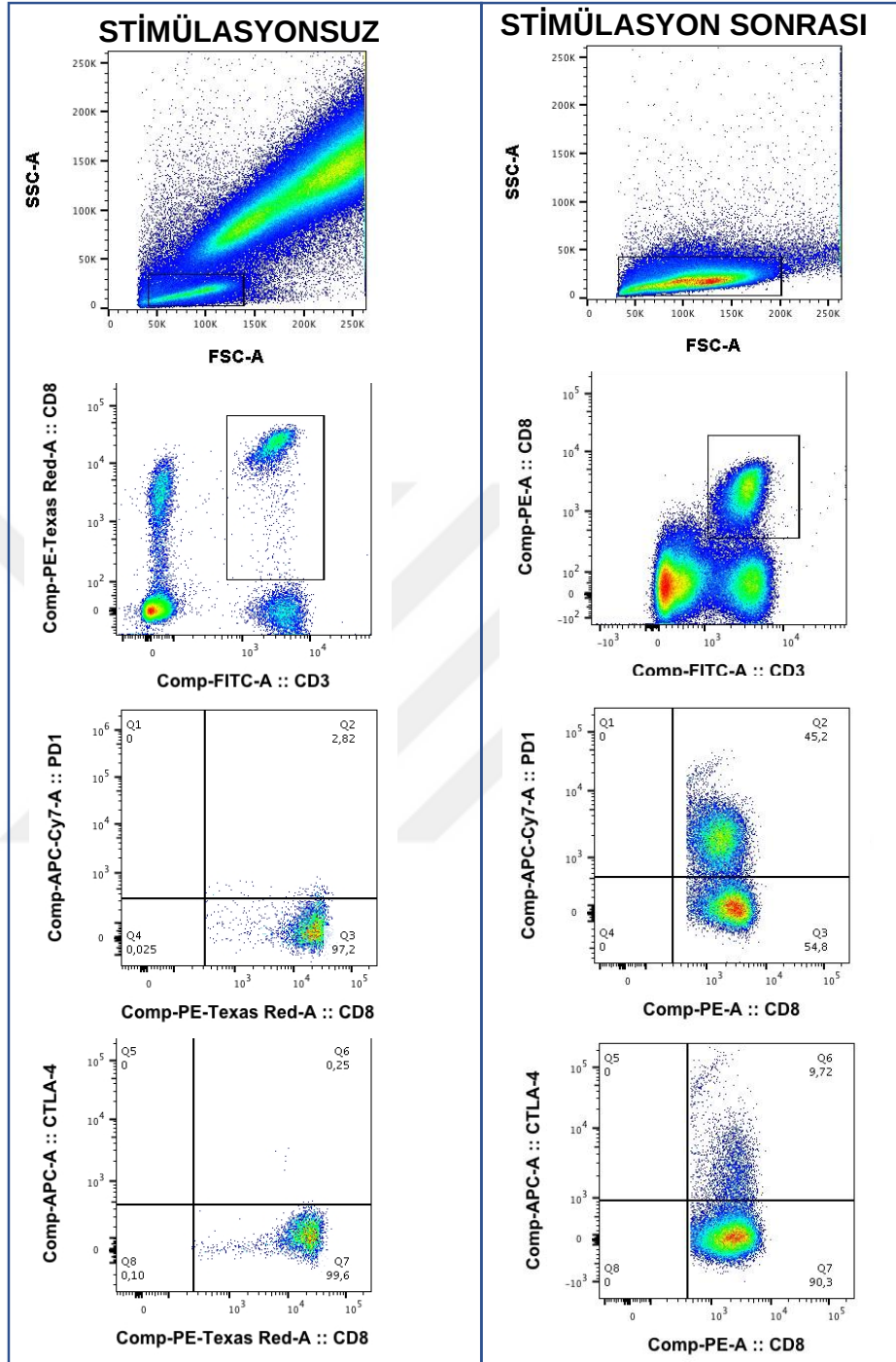
Mediastinal lenf nodu Tc lenfositlerinde periferik kan Tc hücrelerine göre PD-1 ($p<0.001$) ve CTLA-4 ($p<0.001$) ekspresyonu anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Stimülasyonlu koşulda ise bu farklılık gözlemlenmemiştir (Şekil 4-6, Şekil 4-8).



Şekil 4-6: Stimülasyonsuz ve stimülasyon şartlarında sitotoksik T lenfositlerinde aktivatör ve inhibitör reseptör oranları



Şekil 4-7 : KHD AK'li grup periferik kan ve lenf nodu (lenf nodunda PD-1 ve CTLA-4 ekspresyonu artmış) CD3⁺CD8⁺ Tc hücrelerinde PD-1 ve CTLA-4 ekspresyonu



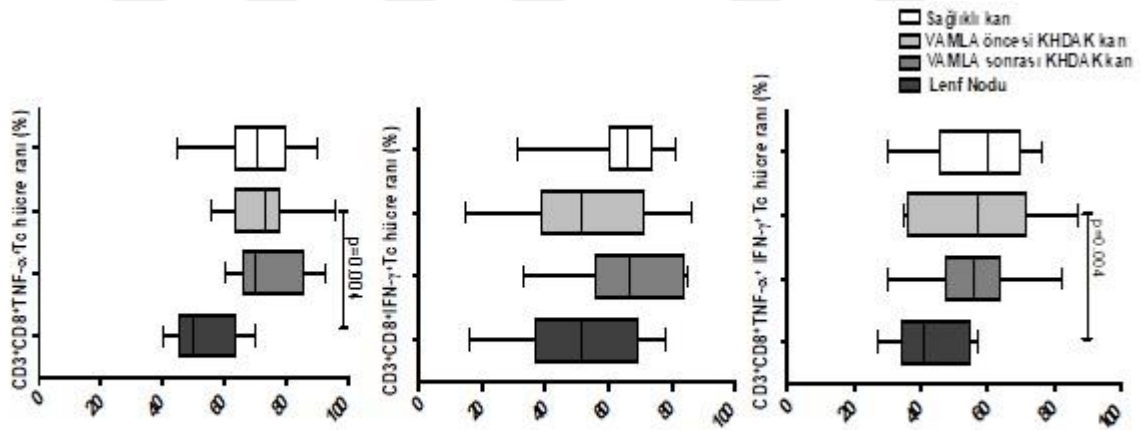
Şekil 4-8: KHDAC'li grupta VAMLA sonrası stimülasyonsuz ve stimülasyon sonrası CD3⁺CD8⁺ Tc hücrelerinde PD-1 ve CTLA-4 ekspresyonundaki değişimler

4.5. Sitotoksik T lenfositlerinde IFN- γ ve TNF- α Salınımının Belirlenmesi

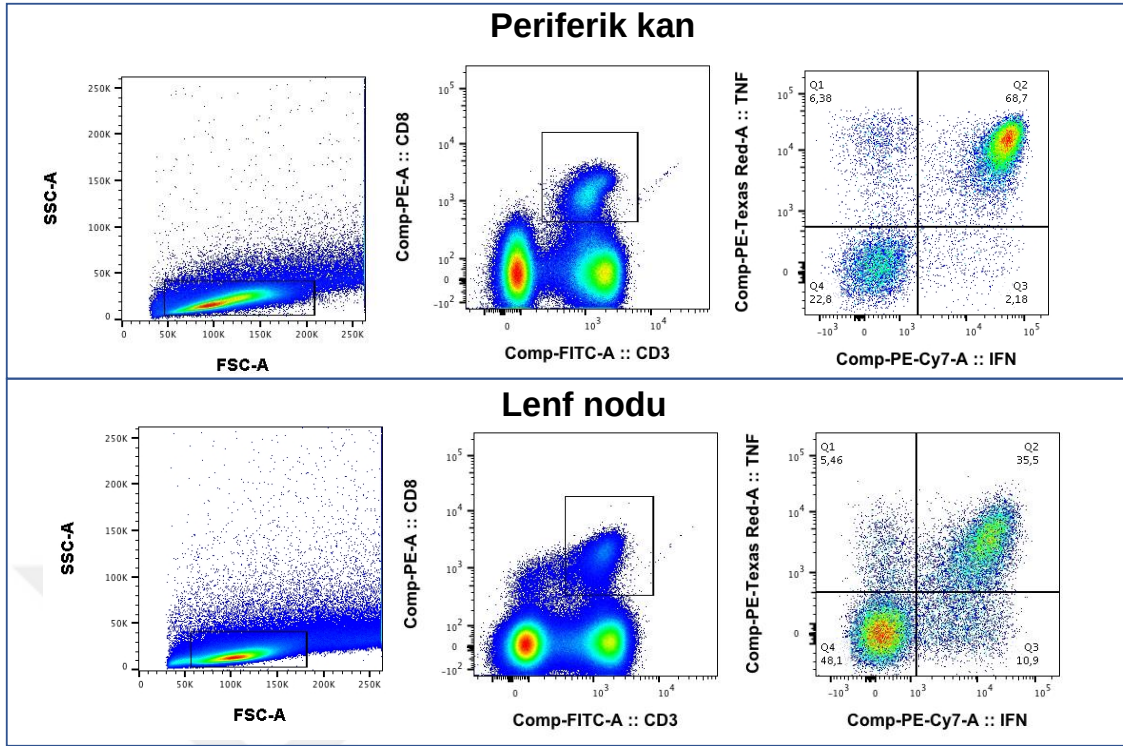
Yeni teşhis KHDAK'lı hastaların ve sağlıklı kontrollerden izole edilen Tc lenfositlerinde anti-tümöral immünitede önemli rol oynayan IFN- γ , TNF- α salınımları akan hücre ölçerinde değerlendirilmiştir. KHDAK ve sağlıklı bireylerde CD8⁺CD3⁺IFN- γ , CD8⁺CD3⁺TNF- α ve CD8⁺CD3⁺TNF- α IFN- γ Tc oranları arasında fark gözlenmemiştir (Şekil 4-9).

VAMLA öncesi alınan periferik kan değerleri VAMLA sonrası ile kıyaslandığında hem CD8⁺CD3⁺IFN- γ , CD8⁺CD3⁺TNF- α ve CD8⁺CD3⁺TNF- α IFN- γ sitotoksik T lenfositlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (Şekil 4-9).

Mediastinal lenf nodu sitotoksik T lenfositlerinde ise her iki sitokini salgılayan CD8⁺CD3⁺TNF- α IFN- γ Tc (p=0.004) lenfositler hem de CD8⁺CD3⁺TNF- α Tc (p=0.004) lenfosit oranlarında VAMLA öncesi periferik kana göre azalma saptanmasına karşılık, CD8⁺CD3⁺ IFN- γ Tc lenfositlerinde fark görülmemiştir (Şekil 4-9 ve Şekil 4-10).



Şekil 4-9 : KHDAK ve sağlıklı bireylerde sitotoksik T lenfositlerinden salgılanan IFN- γ ve TNF- α ekspresyonunun değerlendirilmesi



Şekil 4-10: KHDAK'lı grup VAMLA öncesi periferik kan ve lenf nodu CD3⁺CD8⁺ Tc hücrelerinde hücre içi TNF- α ve IFN- γ ekspresyonlarının akan hücre ölçer görüntüleri

4.6. CTLA-4 ve PD-1 Ekspresyonunun Sitotoksik T lenfositlerinde IFN- γ , TNF- α Salınımına Etkisi

Deneylerimizde sağlıklı bireyler, KHDAK VAMLA öncesi ve sonrası periferik kan ile mediastinal lenf nodu sitotoksik T lenfositlerinde CTLA-4 ve PD-1 ekspresyonunun IFN- γ ve TNF- α salınımlarına etkisi analiz edilmiştir.

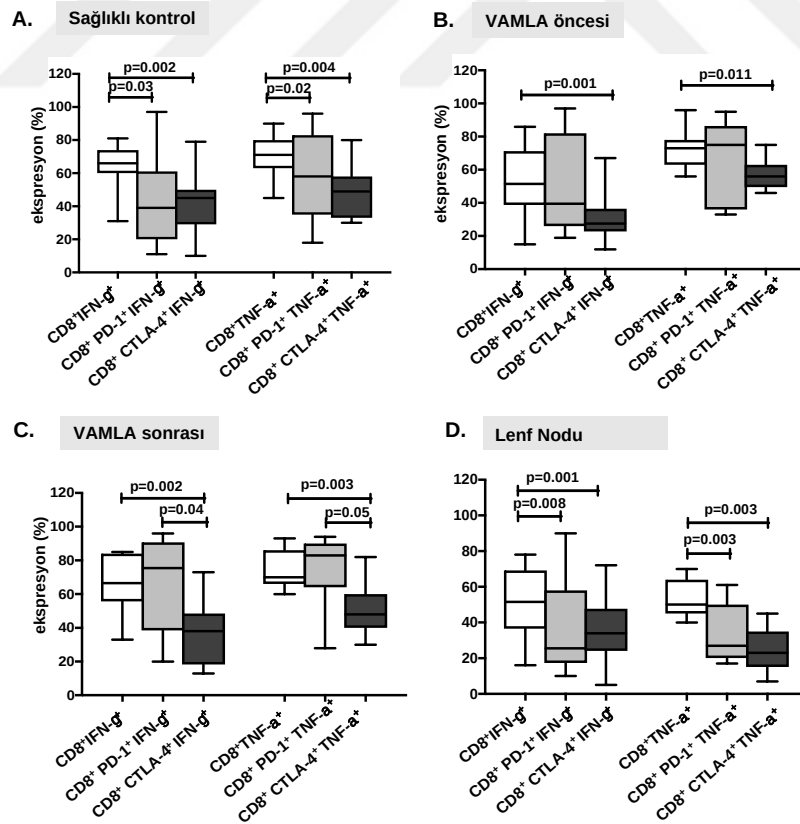
Sağlıklı kontrollerde PD-1 ve CTLA-4 eksprese eden Tc lenfositlerinde PD-1 ekspresyonu IFN- γ (p=0.03) ve TNF- α (p=0.02) salınımını baskılamıştır. Benzer şekilde CTLA-4 ekspresyonu CD8⁺IFN- γ ⁺CTLA-4⁺ (p=0.002) ve CD8⁺TNF- α ⁺CTLA-4⁺ (p=0.004) hücre oranlarında azalmaya neden olmuştur (Şekil 4- 11 A).

VAMLA öncesi KHDAK'lı grupta TNF- α ve IFN- γ salınımı analiz edildiğinde PD-1 ekspresyonu CD8⁺IFN- γ ⁺PD-1⁺ ve CD8⁺TNF- α ⁺PD-1⁺ oranında değişiklik oluşturmamıştır. CTLA-4 eksprese eden CD8⁺ T hücresinde

IFN- γ ($p<0.001$) ve TNF- α salınımında ($p=0.011$) azalma tespit edilmiştir (Şekil 4-11 B).

VAMLA sonrası KHDAK'lı grupta ise PD-1 ekspresyonu Tc lenfositlerinde IFN- γ ve TNF- α salınımında fark yaratmamasına rağmen, CD8⁺IFN- γ ⁺CTLA-4⁺ ($p=0.002$) ve CD8⁺TNF- α ⁺CTLA-4⁺ ($p=0.003$) hücre oranlarını baskılamıştır. Ayrıca PD-1⁺CD8⁺ Tc lenfositlerinde hem IFN- γ ($p=0.04$) hem de TNF- α ($p=0.05$) salınımı CTLA-4⁺CD8⁺ Tc lenfositlerine kıyasla yüksek saptanmıştır (Şekil 4- 11 C, Şekil 4-12).

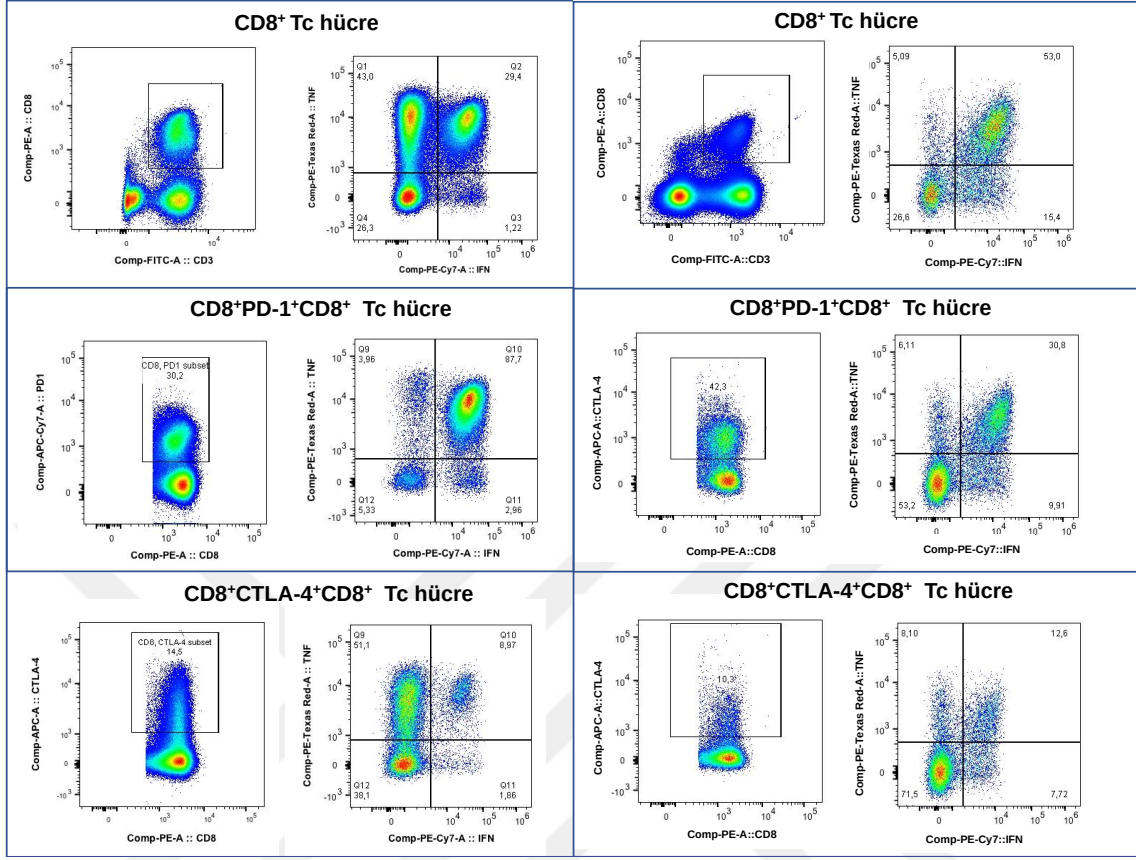
Mediastinal lenf nodunda Tc lenfositlerinde sağlıklı kontrol periferik kana benzer şekilde PD-1 ekspresyonu CD8⁺IFN- γ ⁺PD-1⁺ ($p=0.008$) ve CD8⁺TNF- α ⁺PD-1⁺ ($p=0.003$) ekspresyonunu azaltmıştır. CTLA-4 ekspresyonu PD-1 ekspresyon paternine benzer şekilde CD8⁺IFN- γ ⁺CTLA-4⁺ ($p=0.001$) ve CD8⁺TNF- α ⁺CTLA-4⁺ ($p=0.003$) hücre oranlarında düşüşe neden olmuştur (Şekil 4-11 D, Şekil 4-12).



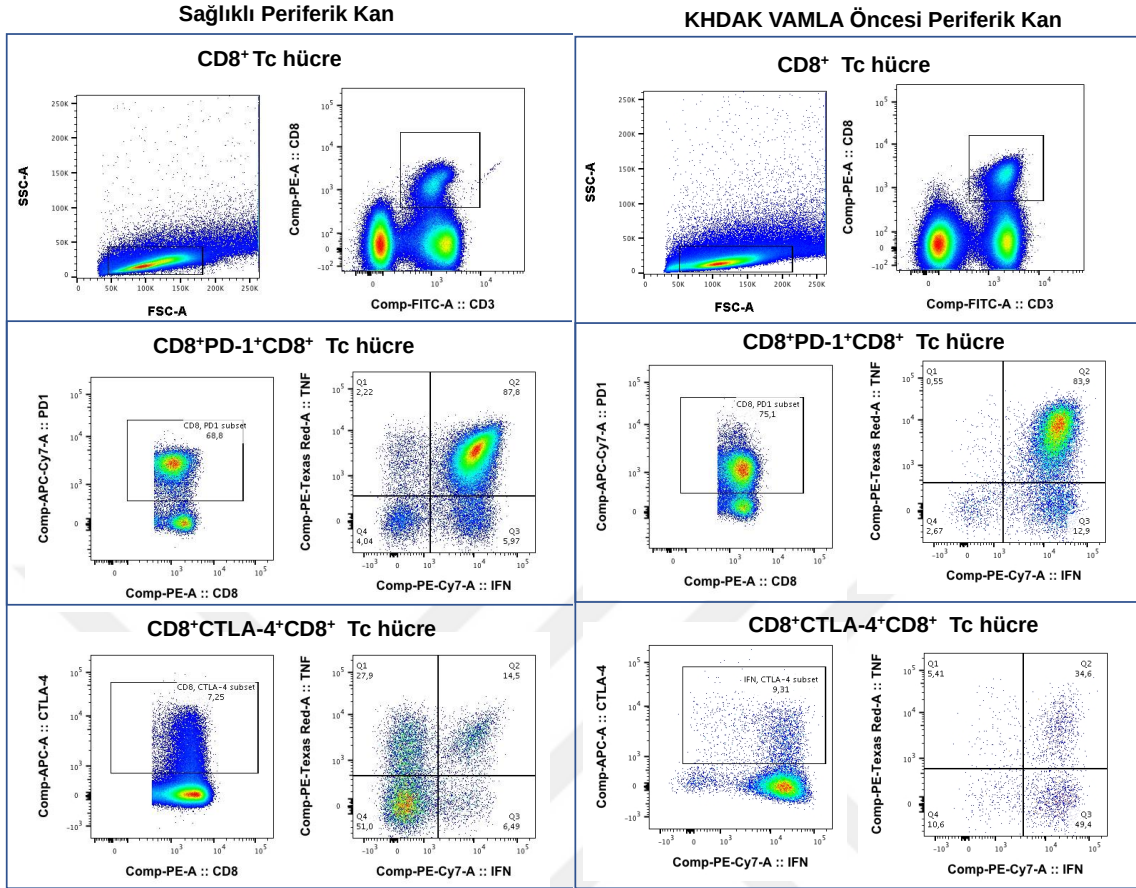
Şekil 4-11 : CTLA-4 ve PD-1 inhibitör kontrol noktası reseptörlerinin sitotoksik T lenfositlerinden salgılanan IFN- γ ve TNF- α salınımına etkisi

KDDAK VAMLA Sonrası Periferik Kan

KDDAK Mediastinal Lenf Nodu



Şekil 4-12 : CTLA-4 ve PD-1 inhibitör kontrol noktası reseptör ekspresyonunun VAMLA sonrası ve mediastinal lenf nodu sitotoksik T lenfositlerinden salgılanan IFN- γ ve TNF- α salınımına etkisi



Şekil 4-13 : Sağlıklı periferik kan ve KHDAC VAMLA öncesi periferik kan örneklerinde CTLA-4 ve PD-1 inhibitör kontrol noktası reseptör ekspresyonunun sitotoksik T lenfositlerinden salgılanan IFN- γ ve TNF- α salınımına etkisi

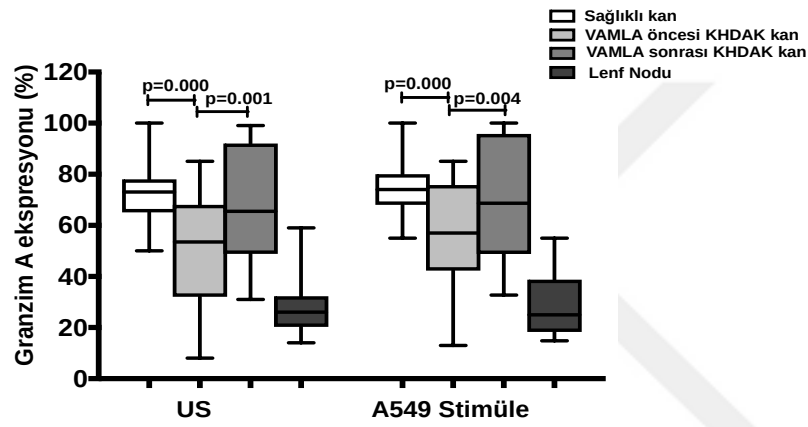
4.7. Sitotoksik T lenfositlerinde Granzim Düzeylerinin Belirlenmesi

KHDAC'li hastalar ve sağlıklı bireylerden alınan periferik kan örnekleri ve lenf nodu örneklerinde CD8⁺ Tc hücrelerinin sitotoksik aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla izole edilen PKMH ler, stimülasyonsuz ve A549 tümör hücreleriyle efektör:hedef hücre(10:1) oranında inkübe edilmiş ve Granzim A ekspresyon düzeyleri belirlenmiştir.

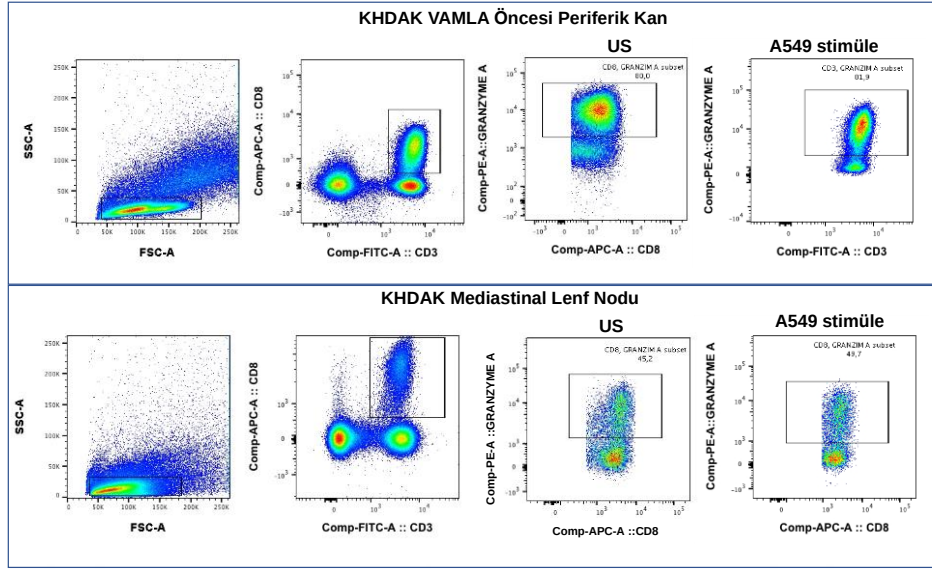
Sitotoksik CD8⁺ T lenfosit granzim salınımı analiz edildiğinde sağlıklı gruba göre KHDAC'li olgularda hem stimülasyonsuz ($p < 0.001$) hem de tümör hücre stimülasyonu ($p < 0.000$) sonrasında granzim salınımında azalma tespit edilmiştir (Şekil 4-12)

VAMLA işleminin Tc hücre granzim salımına etkisi incelendiğinde hem stimülasyonsuz ($p=0.001$) hem de A549 hücre serisi ile stimüle şartlarda ($p=0.004$) VAMLA sonrası periferik kan Tc lenfositlerinde granzim A salınımında artış tespit edilmiştir (Şekil 4-12 ve Şekil 4-13).

Mediastinal lenf nodlarında bulunan Tc lenfositlerinin KHDAK'li olguların periferik kanlarıyla kıyaslandığında granzim A salınımı düşük olmasına karşılık hem stimülasyonsuz ($p=0.926$) hem de stimüle koşullarda ($p=0.590$) istatistik olarak bir anlamlılığa ulaşmamıştır (Şekil 4-12).



Şekil 4-14 : Sitotoksik T lenfositlerden stimülasyonsuz (US) ve A549 hücre serisi ile stimülasyon sonrası salınan granzim A ekspresyonlarının değerlendirilmesi



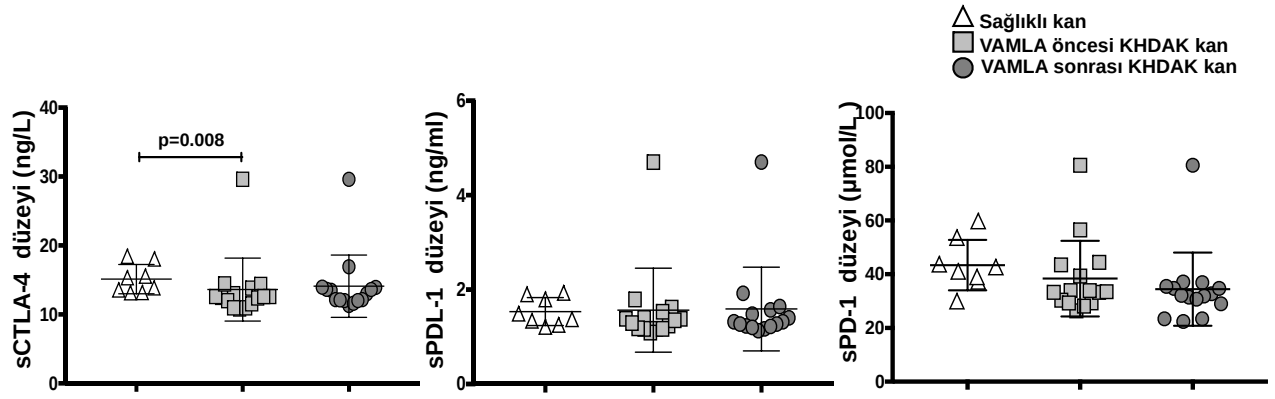
Şekil 4-15 : VAMLA öncesi periferik kan ve lenf nodu örneklerinde CD8⁺ T lenfositlerinde stimülasyonsuz (US) ve A549 hücre serisi ile stimülasyon sonrası granzim A ekspresyonu akan hücre ölçer görüntüleri

4.8. sCTLA-4, sPD-1 ve sPDL-1 Düzeylerinin ELISA Metodu ile Belirlenmesi

Yeni teşhis KHD AK olguları ve sağlıklı bireylerden alınan heparinize kan örneklerinden plazmalar ayrılmış ve örnekler çözünabilir immün kontrol noktası reseptörleri ELISA testi çalışılana kadar -80°C'de saklanmıştır. Plazma örneklerinde sPD-1, sPDL-1 ve sCTLA-4 düzeyleri ELISA yöntemi ile tayin edilmiştir.

Sağlıklı ve VAMLA öncesi KHD AK'li grup kıyaslandığında plazma sCTLA-4 düzeyi KHD AK'li olgularda sağlıklı bireylere göre artmış olmasına rağmen sPD-1 ($p=0.10$) ve sPDL-1 ($p=0.22$) düzeylerinde anlamlı bir fark saptanmamıştır.

VAMLA öncesi ve sonrası plazma çözünabilir reseptör ELISA analizleri sonucunda sPD-1 ($p=0.74$), sPDL-1 ($p=0.5$) ve sCTLA-4 ($p=0.47$) düzeylerinde anlamlı bir fark saptanmamıştır. (Şekil 4-16).



Şekil 4-16 : VAMLA öncesi ve sonrası KHDAC hastaları ve sağlıklı bireylerden alınan plazma örneklerinde sPD-1, sPDL-1 ve sCTLA-4 düzeyleri

5. TARTIŞMA

Kansere bağlı ölümlerin dörtte biri akciğer kanserinden kaynaklanmaktadır [123]. Yeni tanı alan akciğer kanserli olguların %80'den fazlasını KHDAA hastaları oluşturmaktadır [124]. KHDAA olgularında klinik olarak tedavi yönteminin değerlendirmesinde, opere edilebilecek evredeki olgularda cerrahi tedavi seçiminde, prognozun belirlenmesi ve araştırma verileri ile klinik sonuçların karşılaştırılmasında TNM sınıflandırması kullanılmaktadır [56]. KHDAA tanısı konulduğunda olguların %50'sinde mediastinal lenf tutulumu mevcuttur ve %33'den daha azı cerrahi rezeksiyona uygundur [125]. Akciğer kanserlerinin birçoğu erken dönemde bulgu vermediği için, erken evrede akciğer kanseri daha az teşhis edilmektedir [125]. Cerrahi tedavi ile başarı sağlamak için hastalığı mümkün olduğunca erken evrede yakalamak gerekir [125]. Akciğer kanserinin tedavi şekli ve kanserin prognozu hakkında en önemli noktalardan biri mediastinal lenf nodlarına metastaz olup olmadığıdır [125]. Bunun incelenmesi için altın standart olarak belirtilen standart mediastinoskopi yerine Huertgen ve ark tüm mediastinal lenf nodlarının disekte edilebildiği VAMLA yöntemini geliştirmişlerdir [58]. VAMLA'nın konvansiyonel mediastinoskopi göre en önemli avantajı lenf nodu tutulumundaki yanlış negatiflik oranlarının azalmasıdır [126]. Lenf nodu evrelemesi için standart olarak yapılan mediastinoskopiye göre VAMLA uygulanan hastaların sağkalım oranının daha yüksek olduğu gösterilmiştir [6]. Literatürde bu sağkalıma sebep olabilecek mekanizmalar aydınlatılmamıştır [6].

Hücre aracılı anti-tümöral immünite görev alan Tc hücreleri, efektör fazdayken yüksek oranda IFN- γ , TNF- α ve IL-2 salgılamakta ve sitotoksik fonksiyon sergilemektedir [74]. Fakat akciğer kanseri de dahil bir çok kanser türünde T lenfositlerin yüzeyinde PD-1 ve CTLA-4 gibi inhibitör reseptör moleküllerin oranının artması anti-tümöral immüniteyi zayıflatmaktadır [95]. PD-1, T hücrelerinin aktivasyonları sonrasında CD4⁺ ve CD8⁺ T hücrelerince eksprese edilen immünolojik aktivasyonu inhibe eden bir moleküldür [93]. İmmün kontrolün erken evresinde görev alan CTLA-4 molekülü, eş uyaran reseptör olan CD28 ile ortak ligand B7 'ye bağlanmaktadır [127]. Hastalık progresyonu ile artmış oranda inhibitör reseptör eksprese eden ve hem periferik

kan hem de tümörü infiltre eden CD8⁺ T hücre yetmezliğine yol açan bu durumun farklı tip tümörlerde belirgin olduğu gösterilmiştir [128]. Dolayısıyla tümör hücrelerinden salgılanan ve mikroçevrede immün supresyona yol açan sitokinler ve diğer faktörlerin etkisiyle CD8⁺ sitotoksik T lenfositleri de etkilenmekte ve fonksiyonel özelliklerini yitirebilmektedir [128]. Birçok tümör stromasında tümör antijenlerine spesifik T hücreleri bulunmasına rağmen tümör büyümeye devam etmektedir [91]. Tümöre spesifik T hücrelerinin fonksiyon yetersizliği altında yatan nedenler tam olarak bilinmemekle birlikte tümör mikroçevresinin güçsüz bir anti-tümöral immün yanıt oluşumuna katkıda bulunduğu öne sürülmektedir [91]. İmmünoonkolojik tedaviler kapsamında bu inhibitör etkileşimleri engelleyici özgül monoklonal antikorların kullanımı ile bu moleküllerin blokajları hem tümör lezyonlarına lenfosit infiltrasyonunu arttırmakta hem de efektör mekanizmaları arttırarak anti-tümör immüniteyi güçlendirebilmektedir [129]. CTLA-4 veya PD-1/PD-L1 molekülleri gibi inhibitör immün kontrol noktası reseptörlerine karşı geliştirilen bloke edici antikor tedavileriyle kanserlerin tedavisi ve hastaların yaşam süresinin uzatılması hedeflenmektedir. Ancak KHDAK'li hastalarda immün kontrol noktası blokajı tedavisine sadece %20 oranında cevap alınabilmektedir [130]. Bu nedenle KHDAK hastalarında doğru teşhis, sağkalım oranının ve immünoterapiye yanıtın belirlenmesi için immün yanıtları karakterize edecek yöntemlerin geliştirilmesi önemlidir [130].

Sheng ve ark. KHDAK'li hastalarda naif, santral hafıza, efektör hafıza T hücre alt gruplarını akan hücre ölçer metoduyla araştırmıştır [131]. Bu çalışmada KHDAK hastalarının mediastinal lenf nodları ve periferik kanları ile malignitesi olmayan hastaların lenf nodları ve periferik kanları T hücre alt grupları açısından kıyaslamıştır. KHDAK'li hastaların sağlıklılara göre periferik kanlarında CD4⁺ T hücre oranlarının normal düzeylerde olduğu, efektör sitotoksik T hücrelerinin sayıca arttığı, efektör hafıza fenotipi gösteren Tc hücrelerinin ise azaldığı gösterilmiştir. Hasta grubunda CD3⁺CD8⁺ Tc hücre oranlarının kanda ve lenf nodunda kontrol grubuna göre arttığını saptamıştır [131]. Karagöz ve ark. radyoterapi ve kemoterapi almamış KHDAK ve sağlıklı kontrollerde gruplar arasında CD3⁺, CD4⁺ T hücre alt gruplarında fark bulunmadığını ancak Tc hücrelerinin hastalarda arttığını saptamıştır [132].

Nakamura ve ark tarafından 287 akciğer kanserli hastada tedavi öncesi periferik kan NK hücrelerinin aktiviteleri, lenfosit alt grup oranları (CD3, CD4, CD8 ve HLA-DR) değerlendirilmiştir. Çalışmada sağkalım oranının NK aktivitesi, CD3, CD4, CD8 ve CD4/CD8 oranları ile ilişkili olmadığı gösterilmiştir. Aktive T ve B lenfositlerinde eksprese edilen HLA-DR moleküllerinin ise kanser hastalarında yüksek olduğu bulunmuş ve bu durumun kötü prognozla ilişkili olduğu düşünülmüştür [133]. Lenf nodu metastazı bulunan akciğer kanserli hastalarda HLA-DR eksprese eden Tc hücre oranlarındaki bu artışın hücrelerin metastatik lenf nodlarından periferik kana göçlerinden dolayı olduğu düşünülmüştür [133]. Bu aktive CD8⁺ T hücrelerindeki artışın tümör progresyonu ile ilişkisi daha önce meme, larinks, kolon ve over kanserlerinde de gösterilmiştir [133-137]. Cozzolino ve ark. larinks ve mesane karsinomunda lenf nodunu infiltre eden T hücrelerinin çoğunun aktive Tc hücrelerinden oluştuğunu göstermiştir [138]. Aritta ve ark. ise ileri evre KHDAK'li hastalar ile sağlıklı bireylerde periferik kanda CD3⁺, CD3⁺CD8⁺, PD-1⁺PBMC, PD-1⁺CD3⁺, PD-1⁺CD3⁺CD8⁺ hücrelerinin oranlarını incelemişler, ancak bu hücreler açısından hastalar ile kontroller arasında anlamlı bir fark saptamamışlardır [124]. Bizim çalışmamızda da benzer bir şekilde periferik kandaki CD3⁺, CD3⁺ CD8⁺, CD3⁺CD19⁺, CD3⁺CD16⁺CD56⁺, CD3⁺HLADR⁺ hücre oranları açısından fark izlenmemiştir. Ancak çalışmamızda hastalardaki PD1⁺CD3⁺CD8⁺ hücre oranının kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha fazla olduğu tespit edilmiştir. İleri evre KHDAK hastaları ve sağlıklı bireylerde Barrera ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise periferik kanda CD3⁺, CD3⁺CD8⁺, CD3⁺CD4⁺ T hücresi oranlarının hastalarda anlamlı derecede düşük olduğu tespit edilmiştir [139]. KHDAK'li hastalarda tedavi öncesi immün sistem hücre alt gruplarının karakterize edilerek tedavi öncesi biyobelirteç olup olamayacağı ve bazı hastaların neden immünoterapiye yanıt vermediğini açıklama amacı ile primer tümör için ameliyat edilen KHDAK'li hastalar ve sağlıklı gönüllülerde immün sistem hücreleri analiz edilmiştir [140]. Total lökosit sayımı, dolaşımdaki dendritik hücrelerin sayısı, HLA-DR'yi düşük eksprese eden monositler ve lenfosit alt grupları sekiz renkli akan hücre ölçer cihazı ile değerlendirilmiştir. Ayrıca, immün parametreler ve hastaların sağkalım analizleri de yapılmıştır. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, KHDAK hastalarında CD4⁺ Treg

lenfositleri, HLA-DR^{low} monosit ve nötrofil oranlarının arttığı bununla birlikte dendritik hücre, NK, CD4⁺ ve CD8⁺ T hücre yüzdelerinin azaldığı saptanmıştır [140]. Treg hücrelerinin yanında, HLA-DR^{low} monositler ve naif T hücrelerinin KHDAK hastaları için prognostik belirteç olarak kullanılabileceği ve gelecekteki çalışmalarda hastaların immünoterapilere verdiği yanıtların izlenmesinde yararlı olabileceği düşünülmüştür [140]. Çalışmamızda ise CD8⁺ T hücre oranı açısından sağlıklı kontrol grubu ile KHDAK'li grup arasında anlamlı bir fark saptanmamasına rağmen, CD3⁺, CD3⁺CD4⁺ T hücre oranlarının kontrol grubunda daha fazla olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca hastaların mediastinal lenf nodu ile periferik kanlarını kıyasladığımızda, CD3⁺, CD3⁺CD8⁺ T, NK, NKT, hücrelerinin periferik kanda yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Sağlıklı insanlarda CD4⁺/CD8⁺ oranının 1,5-2 arasında olması beklenmektedir [141]. Bu oranın değişmesi immün sistemin dengesini bozabilmektedir. CD4⁺ T hücrelerinin KHDAK'li grupta azalması bu oranın bozulduğunu ve CD4⁺ T hücrelerinin sitotoksik fonksiyonu olmamasına karşın anti-tümöral immüniteyi azalttığını düşündürmektedir.

Naif Tc hücrelerinin aktivasyonu için THR sinyali dışında önemli bir koreseptör olan CD28 molekülünden de sinyal alması gerekmektedir. CD28 ile etkileşim oluşmadığı takdirde T hücreleri yanıtsız kalmakta, anergi veya hücre ölümü gerçekleşmektedir [142, 143]. Kansere hastalarında kronik stimülasyona bağlı olarak Tc hücrelerinde CD28 ekspresyonu azalmakta ve Tc hücreleri tümör antijenlerine karşı duyarsızlaşmaktadır [142, 143]. CD8⁺CD28⁻ T hücreler, Treg hücreleri gibi baskılayıcı fenotipe sahiptir ve T hücre proliferasyonunu ve sitotoksik özelliklerini baskılamaktadır [1]. Karagöz ve ark. KHDAK hastası ve sağlıklı gönüllülerin Tc hücre yanıtlarını inceledikleri çalışmalarında hastaların periferik kanlarında CD8⁺CD28⁻ hücre oranının arttığını tespit etmişlerdir [129]. Liu ve ark. KHDAK'li hastaların periferik kanı ile yaptığı bir çalışmada CD8⁺CD28⁺ Tc hücre oranının radyoterapiye cevap veren grupta vermeyen gruba oranla daha yüksek olduğunu göstermiştir [144]. Meme kanserinde CD8⁺CD28⁺ T hücreleri ile sağkalım arasında pozitif korelasyon da bulunmuştur [144]. CD28 molekülü CD8 T hücrelerinin sitotoksik fonksiyonlarını baskılamakta ve proliferasyonlarını inhibe etmektedir

[144]. Mevcut çalışmamızda da KHDAK hastalarında $CD8^+CD28^-$ T hücrelerinin hem tümörü drene eden lenf nodlarında yüksek olduğu, hem de periferik kanda sağlıklı bireylere kıyasla daha yüksek olduğu saptanmıştır. Baskılayıcı fenotipteki bu hücre grubunun oranının hastalarda sağlıklı gruba göre, hastaların mediastinal lenf nodlarında periferik kanlarına göre fazla olması; T hücrelerinin tümör hücrelerini tanısa bile sitotoksik fonksiyonlarını gösteremedikleri için tümörün gelişimini engelleyemediklerini düşündürmektedir. Bu aynı zamanda tümöre karşı gelişen bağışıklık yanıtının periferin kandan daha çok lenf nodlarında gelişmiş olduğunu gösteriyor olabilir. Ancak, bu baskılayıcı fenotipteki hücrelerin periferik kandaki oranlarında VAMLA işleminden sonra bir değişiklik izlenmemiştir. Mediastinal lenf nodunda baskılayıcı fenotipteki Tc'ler anti-tümöral immünitenin zayıf olmasına neden oluyor olabilir. Bu yüzden VAMLA ile hemen hemen tüm mediastinal lenf nodlarının çıkarılabilmesi ile bu baskılanmanın ortadan kalkmış olabileceği, standart olarak önerilen mediastinoskopide ise tüm lenf nodlarının çıkarılması mümkün olmadığı için bu baskılama devam ediyor olabilir. Ancak, çalışmamızda, mediastinoskopi öncesi ve sonrası hücre alt gruplarını irdelemedik ve dolayısı ile bu alt grupları VAMLA yapılan hastalardaki değişim ile karşılaştıramadık. Yine de VAMLA'da gözlemlediğimiz bu baskılayıcı hücreleri azaltan etki, VAMLA'nın sağkalıma etkisinin sebeplerinden biri olabilir.

Transformasyona uğrayan hücreler antijen sunumunda görevli moleküllerin ve kostimülatör moleküllerin ekspresyonlarını azaltarak veya PD-1 gibi ko-inhibitör molekül ekspresyonlarını artırarak immün sistemden kaçarlar [145]. PD-1 molekülü aktive olmuş makrofajlar, T ve B lenfositler, NK hücreleri ve bazı miyeloid hücrelerin yüzeylerinde eksprese edilir [146]. Arrieta ve ark. tarafından ileri evre KHDAK hastaları ve sağlıklı bireylerin periferik kanında PD-1, PD-L1/2 ekspresyonları araştırılmış, teşhiste potansiyel biyomarker ve tedaviye yanıtta olan etkinliği kıyaslanmıştır [124]. KHDAK ve sağlıklı bireylerin periferik kanlarında $CD3^+$, $CD3^+CD8^+$, $PD-1^+P BMC$, $PD-1^+CD3^+$, $PD-1^+CD3^+CD8^+$ hücrelerinin oranları incelenmiştir [124]. Hastalar ile kontroller arasında $CD3^+$, $CD3^+CD4^+$ ve $CD3^+CD8^+$ T lenfositleri arasında fark saptanmamasına rağmen KHDAK'li grupta PDL-1 eksprese eden $CD3^+$, $CD3^+CD8^+$ ile PDL-2 eksprese

eden $CD3^+$, $CD3^+CD4^+$ T lenfositlerinde artış tespit edilmiştir. Sağkalım oranlarının ise yüksek oranda $PD-1^+PKMH$, $PD-1^+CD3^+$, $PD-L1^+CD3^+$, $PD-L1^+CD3^+CD8^+$, $PD-L2^+CD3^+$, $PD-L2^+CD3^+CD4^+$ veya $PD-L2^+CD3^+CD8^+$ bulunan hastalarda azaldığı bulunmuştur [124]. Haitao ve ark. KHDAK'li hastanın lenf nodlarında PD-1 ekspresyonlarını incelemişler ve bu durumu lenf nodu metastazı olan ve olmayan hastalar arasında karşılaştırmıştır [147]. Metastazlı lenf nodlarında $CD3^+$ T lenfosit oranının metastaz olmayan lenf nodlarına göre anlamlı olarak arttığı ve aynı zamanda bu hücrelerde PD-1 ekspresyonlarının anlamlı olarak daha yüksek olduğu saptanmıştır [147]. Bizim çalışmamızda da 17 KHDAK hastasının lenf nodlarında PD-1 eksprese eden $CD3^+CD8^+$ T hücre oranlarının lenf nodunda anlamlı derecede yüksek olduğu saptanmıştır. Ayrıca VAMLA sonrası periferik kanda da $CD8^+PD-1^+$ Tc lenfosit oranı VAMLA öncesine göre anlamlı olarak azalmıştır. VAMLA sonrasında tespit ettiğimiz bu azalma, VAMLA'nın neden KHDAK'li hastalarda sağkalıma etkisi olduğunu açıklayabilir [6]. Ancak Rutkowski ve ark. erken evre akciğer kanserli hastalarda ve sağlıklı denekler ile yaptığı çalışmada periferik kanda $PD1^+CD3^+CD8^+$ ve $PD1^+CD3^+CD4^+$ T hücre alt grup oranlarının hastalarda kontrol grubuna göre düşük olduğunu saptamıştır [148]. Ayrıca belirtilen çalışmada, KHDAK olgularında kontrol grubuna göre CTLA-4 eksprese eden Th ve Tc hücrelerinde artış, $CD4^+/CD8^+$ T hücre oranlarında azalma saptanmıştır [148]. Bu durum da CTLA-4 ekspresyonunun tümör progresyonunda etkili olabileceğini düşündürmektedir [148]. Bu moleküller, anti-tümör immünitede o kadar etkilidir ki, bu moleküllere karşı oluşturulan antikorlar ile uygulanan immünoterapi ileri evre akciğer kanserli hastaların tedavisinde artık nerede ise, standart hale gelmiş ve son yıllarda kanser tedavisinde devrimsel bir farklılık yaratmıştır [149]. Çalışmamızda anti tümöral immünite rol oynayan Tc hücrelerinde, hastalar ile sağlıklı kontroller arasında oran açısından bir fark izlenmemiş, ancak PD-1 ve CTLA-4 ekspresyonları hastalarda yüksek bulunmuştur. VAMLA sonrasında bu yüksek oranda eksprese edilen PD-1 ve CTLA-4 düzeylerinde ise azalma izlenmiştir. Bu bulgular KHDAK hastalarında Tc hücre sayısında bir azalma olmazken, fonksiyonel kayıp izlendiğini ve VAMLA işleminin bu fonksiyonel kaybı iyileştirdiğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda Tc hücrelerinin sitotoksik aktivitelerinin granzim A ile yapılan ölçümlerine bakıldığında, KHDAK hastalarında sağlıklı bireyler ile karşılaştırıldığında, hem stimülasyonsuz hem de A549 tümör hücre stimülasyonu sonrasında sitotoksitenin düşük olduğu saptanmıştır. VAMLA sonrasında ise granzim A salınımında artış gözlenmiştir. Bu bulgu da, VAMLA'nın Tc hücrelerindeki sitotoksik aktiviteyi artırıcı etkide bulunduğunu göstermekte, böylece VAMLA yapılan hastalarda neden daha yüksek sağkalım olduğunu dair ek bir destek daha sunmaktadır.

Tümörü infiltrate Tc'lerin hücre membranında PD-1 ekspresyonun fazla olması hücrelerin anerjik veya tükenmişlik fenotipine sahip olduğunu düşündürmektedir [150]. Malign melanom hastalarında PD-1 eksprese eden tümörü infiltrate Tc lenfositlerinin sitokin üretme kapasitelerinin PD-1 eksprese etmeyenlere göre daha düşük olduğu gösterilmiştir [150]. KHDAK'li hastalarda hem hafıza hem de naif CD4⁺ ve CD8⁺ T hücrelerinden salgılanan IFN- γ ve TNF- α yüzde oranlarının sağlıklı kontrollere göre azaldığı gösterilmiştir [131]. Diğer bir çalışmada ise ileri evre akciğer kanseri hastalarının plazma IFN- γ ve TNF- α düzeyleri tanı ve anti-PD-1 tedavisinin 3. ayında yüksek sitokin düzeyleri ile hem anti PD-1 tedavi etkinliği hem de total sağkalım arasında olumlu bir bağlantı saptanmıştır [151].

Çalışmamızda, Tc hücrelerinden salgılanan IFN- γ ve TNF- α düzeyleri açısından hastalar ile sağlıklı denekler arasında fark izlenmemiştir. VAMLA süreci benzer şekilde CD8⁺CD3⁺ IFN- γ ⁺ ile CD8⁺CD3⁺TNF- α ⁺ Tc hücre sitokin düzeylerini değiştirmemiştir. Biz bu durumunun açıklaması olarak, Tc hücrelerinin esas efektör fonksiyonlarının sitokin salgısından ziyade sitotoksik mekanizmalar ile ilişkili olabileceğini düşünmekteyiz. Ancak, bu öngörümüzün sınanması için ek çalışmalar gerekmektedir. Mediastinal lenf nodlarında bulunan sitotoksik T lenfositlerinde ise hem TNF- α ⁺IFN- γ ⁺ hem de TNF- α ⁺ salgılayan Tc lenfosit oranlarında periferik kana göre azalma saptanmıştır. Bu durum, tümör hücrelerinin lenf nodlarındaki Tc hücrelerinden aktivasyona yol açan sitokinlerin salgılanmasını baskıladığını düşündürmektedir.

Çalışmamızda, sağlıklı kontrollerde PD-1 ve CTLA-4 eksprese eden Tc lenfositlerinde hem PD-1 hem de CTLA-4 ekspresyonu, IFN- γ ve

TNF- α salınımını baskılamıştır. KHDAK'li grupta ise periferik kanda PD-1 ekspresyonunun sitotoksik T hücrelerinde IFN- γ ve TNF- α sitokin oranlarını etkilemediğini, CTLA-4 ekspresyonu olan hücrelerin IFN- γ ve TNF- α sitokin ekspresyonlarında azalmaya neden olduğu izlenmiştir. VAMLA sonrası KHDAK'li grupta ise PD-1 ekspresyonu Tc lenfositlerinde IFN- γ ve TNF- α salınımında fark gözlemlenmezken, CD8⁺IFN- γ ⁺CTLA-4⁺ ve CD8⁺TNF- α ⁺CTLA-4⁺ hücre oranlarının azaldığını gözlemlenmiştir. CTLA-4 ekspresyonunun regülatör fenotip için daha spesifik bir belirteç olduğunu ancak PD-1 ekspresyonunun ise daha ziyade hücrenin inhibe edilebilir fenotipi ile ilişkili olduğunu düşünmekteyiz.

Ayrıca, anlamlı bir bulgu olarak, lenf nodlarından izole edilen PD-1 ve CTLA-4 eksprese eden Tc'lerde IFN- γ ve TNF- α salınımlarının azalmış olması, bu moleküllerin anti-tümöral yanıt gösteren T lenfositlerinde tümöre karşı oluşan bağışıklığı azalttığını bir başka açıdan göstermektedir. Ancak yine de, akciğer kanserli hastalarda mediastinal lenf nodlarındaki T lenfositleri ile ilgili çalışmalar çok az olduğundan bu öngörümüzün sınanması için ileri çalışmalara gerek bulunmaktadır.

Sistemik lupus eritematozus, çölyak hastalığı, tip I diyabet, Myasthenia gravis gibi otoimmün hastalıklarda plazmadaki sCTLA-4 konsantrasyonunun fazla olduğu gösterilmiştir [152]. CTLA-4'ün genel olarak immünosüpresif bir etkisi olduğu bilinmekle birlikte bazı çalışmalar sCTLA-4'ün membran yüzeyindeki CTLA-4'ün negatif sinyalini baskılayarak T hücre yanıtlarını arttırdığını göstermiştir [153]. Saverino ve ark. sCTLA-4'ün, CD80/CD86:CTLA-4'ün, etkileşimini inhibe ederek T hücre inhibisyonunu azalttığını gözlemlenmiştir [153]. Liu ve ark. 57 akciğer kanserli hastayı kapsayan 141 kanser hastasında tedavi sonrasında serumdaki sCTLA-4 seviyesinin tedavi öncesine göre anlamlı derecede daha yüksek olduğunu ve artmış sCTLA-4 düzeylerinin total sağ kalımla ilişkili olduğunu belirtmişlerdir [152]. Bizim çalışmamızda bu verileri destekleyici nitelikte olacak şekilde sağlıklı deneklerin plazmadaki sCTLA-4 düzeylerinin KHDAK'li olgulara göre arttığı gözlenmiştir.

Otoimmün hastalıklarda T lenfositler enflamatuvar sitokinlerle uyarıldıktan sonra SPD-1 ve SPD-L1 üretebilmektedir [154]. Kruger ve ark. ileri evre pankreas kanseri hastalarında SPD-1 ve SPD-L1 kanserde sistemik enflamasyon belirteçleri olduğunu göstermişlerdir [154]. Sorensen ve ark. EGFR mutasyonlu ileri evre akciğer kanseri hastalarında erlotinib tedavisi sırasında SPD-1'deki artış ile total sağkalım arasında pozitif korelasyon olduğunu belirtmiştir [105]. Okuma ve ark. 96 ileri evre akciğer kanserli hastanın plazmasında SPD-L1 konsantrasyonunun daha önce bildirilen sağlıklı SPD-L1 düzeylerinden yüksek olduğunu tespit etmiştir [155, 156]. Ayrıca plazma SPD-L1 konsantrasyonunun yüksek olması ileri evre akciğer kanserinde kötü prognoz ilişkilendirilmiştir [156]. Çalışmamızda hasta grubu ile sağlıklı kontrol arasında ve ayrıca VAMLA öncesi ve sonrasında plazmadaki SPD-1 ve SPD-L1 konsantrasyonunda anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Bu durum hasta grubumuzun sayısının az olmasından kaynaklı olabilir.

Sonuç olarak tümörü drene eden lenf nodlarında CD8⁺ Tc hücrelerinin efektör fonksiyonlarında azalma olduğu, baskılayıcı fenotiplerinde ise artış olduğu izlenmiştir. Regülatör ve inhibe edilebilir bir fenotipe uygun belirteçler ifade eden hücrelerin (CD8⁺PD-1⁺, CD8⁺CTLA-4⁺ ve CD8⁺CD28⁻ Tc hücreler) ayrıca sitotoksik fonksiyonlarında da kayıp geliştiği gözlemlenmiştir. Tc hücrelerindeki genel olarak bu değişiklikler tümör gelişimine elverişli bir immünolojik ortam oluşturabilecek niteliktedir. Dolayısı ile sitotoksik T hücre fonksiyonu yetersizliğinin hastalık gelişimine katkı sağlaması olasıdır. VAMLA sonrasında immün kontrol noktası reseptörlerinden PD-1 ve CTLA-4'teki azalmaya paralel olarak Tc hücre fonksiyon kaybının düzeldiği izlenmiştir. Bu bulgular VAMLA'nın Tc hücreler üzerindeki bu etkisinin KHDAK hastalarındaki daha önce bildirilmiş olan sağkalım artışında rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Böylece çalışmamızda, VAMLA'nın KHDAK hastalarında sağkalımı neden artırmış olabileceğine dair birden fazla immünolojik destek bulmuş olduk. Ancak, mediastinal lenf nodu diseksiyonunun akciğer kanserli hastalardaki anti-tümöral mekanizmalara etkilerinin tam olarak aydınlatılması için daha ayrıntılı çalışmalar gerekmektedir.

KAYNAKLAR

1. Chen, C., et al., *Changes of CD4+CD25+FOXP3+ and CD8+CD28- regulatory T cells in non-small cell lung cancer patients undergoing surgery*. Int Immunopharmacol, 2014. **18**(2): p. 255-61.
2. Ferlay, J., et al., *Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012*. Int J Cancer, 2015. **136**(5): p. E359-86.
3. Rami-Porta, R., H. Asamura, and P. Goldstraw, *Predicting the prognosis of lung cancer: the evolution of tumor, node and metastasis in the molecular age-challenges and opportunities*. Transl Lung Cancer Res, 2015. **4**(4): p. 415-23.
4. Detterbeck, F.C., et al., *The IASLC Lung Cancer Staging Project: Summary of Proposals for Revisions of the Classification of Lung Cancers with Multiple Pulmonary Sites of Involvement in the Forthcoming Eighth Edition of the TNM Classification*. J Thorac Oncol, 2016. **11**(5): p. 639-650.
5. Falcoz, P.E., et al., *Video-assisted thoracoscopic surgery versus open lobectomy for primary non-small-cell lung cancer: a propensity-matched analysis of outcome from the European Society of Thoracic Surgeon database*. Eur J Cardiothorac Surg, 2016. **49**(2): p. 602-9.
6. Turna, A., et al., *Video-assisted mediastinoscopic lymphadenectomy is associated with better survival than mediastinoscopy in patients with resected non-small cell lung cancer*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2013. **146**(4): p. 774-80.
7. Newell, E.W. and W. Lin, *High-dimensional analysis of human CD8(+) T cell phenotype, function, and antigen specificity*. Curr Top Microbiol Immunol, 2014. **377**: p. 61-84.
8. So, T., et al., *Haplotype loss of HLA class I antigen as an escape mechanism from immune attack in lung cancer*. Cancer Res, 2005. **65**(13): p. 5945-52.
9. Hersperger, A.R., G. Makedonas, and M.R. Betts, *Flow cytometric detection of perforin upregulation in human CD8 T cells*. Cytometry A, 2008. **73**(11): p. 1050-7.
10. Donnem, T., et al., *Combination of low vascular endothelial growth factor A (VEGF-A)/VEGF receptor 2 expression and high lymphocyte infiltration is a strong and independent favorable prognostic factor in patients with nonsmall cell lung cancer*. Cancer, 2010. **116**(18): p. 4318-25.
11. Xie, J., et al., *Expression of immune checkpoints in T cells of esophageal cancer patients*. Oncotarget, 2016. **7**(39): p. 63669-63678.
12. Davarpanah, N.N., et al., *Immunotherapy: a new treatment paradigm in bladder cancer*. Curr Opin Oncol, 2017.
13. Bray, F., et al., *Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries*. CA Cancer J Clin, 2018. **68**(6): p. 394-424.
14. de Groot, P.M., et al., *The epidemiology of lung cancer*. Transl Lung Cancer Res, 2018. **7**(3): p. 220-233.
15. Dela Cruz, C.S., L.T. Tanoue, and R.A. Matthay, *Lung cancer: epidemiology, etiology, and prevention*. Clin Chest Med, 2011. **32**(4): p. 605-44.
16. Travis, W.D., et al., *The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances Since the 2004 Classification*. J Thorac Oncol, 2015. **10**(9): p. 1243-1260.

17. Hirsch, F.R., et al., *Lung cancer: current therapies and new targeted treatments*. Lancet, 2017. **389**(10066): p. 299-311.
18. Rivera, M.P. and D.E. Stover, *Gender and lung cancer*. Clin Chest Med, 2004. **25**(2): p. 391-400.
19. Siegel, R., D. Naishadham, and A. Jemal, *Cancer statistics, 2013*. CA Cancer J Clin, 2013. **63**(1): p. 11-30.
20. Hoffman, R.M. and R. Sanchez, *Lung Cancer Screening*. Med Clin North Am, 2017. **101**(4): p. 769-785.
21. E., H.E.G.M.B.G.D.S.U.E.K.E.A.S.A.T.S.S. *TÜRKİYE KANSER İSTATİSTİKLERİ*. 2017; Available from: <https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/kanser-db/istatistik/2014-RAPOR.uzuuun.pdf>.
22. Ferrara, R., et al., *Immunosenescence and immunecheckpoint inhibitors in non-small cell lung cancer patients: Does age really matter?* Cancer Treat Rev, 2017. **60**: p. 60-68.
23. Okazaki, I., et al., *Lung Adenocarcinoma in Never Smokers: Problems of Primary Prevention from Aspects of Susceptible Genes and Carcinogens*. Anticancer Res, 2016. **36**(12): p. 6207-6224.
24. Bakulski, K.M., et al., *DNA methylation signature of smoking in lung cancer is enriched for exposure signatures in newborn and adult blood*. Sci Rep, 2019. **9**(1): p. 4576.
25. Yang, J.J., et al., *Tobacco Smoking and Mortality in Asia: A Pooled Meta-analysis*. JAMA Netw Open, 2019. **2**(3): p. e191474.
26. Alberg, A.J., et al., *Epidemiology of lung cancer: Diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines*. Chest, 2013. **143**(5 Suppl): p. e1S-e29S.
27. Alsharairi, N.A., *The Effects of Dietary Supplements on Asthma and Lung Cancer Risk in Smokers and Non-Smokers: A Review of the Literature*. Nutrients, 2019. **11**(4).
28. Rahal, Z., et al., *Smoking and Lung Cancer: A Geo-Regional Perspective*. Front Oncol, 2017. **7**: p. 194.
29. Zhou, F. and C. Zhou, *Lung cancer in never smokers-the East Asian experience*. Transl Lung Cancer Res, 2018. **7**(4): p. 450-463.
30. Malvezzi, M., et al., *European cancer mortality predictions for the year 2015: does lung cancer have the highest death rate in EU women?* Ann Oncol, 2015. **26**(4): p. 779-86.
31. Parkin, D.M., et al., *Global cancer statistics, 2002*. CA Cancer J Clin, 2005. **55**(2): p. 74-108.
32. Mayekar, M.K. and T.G. Bivona, *Current Landscape of Targeted Therapy in Lung Cancer*. Clin Pharmacol Ther, 2017. **102**(5): p. 757-764.
33. D'Angelo, S.P., et al., *Distinct clinical course of EGFR-mutant resected lung cancers: results of testing of 1118 surgical specimens and effects of adjuvant gefitinib and erlotinib*. J Thorac Oncol, 2012. **7**(12): p. 1815-1822.
34. Wang, Y., et al., *Outcome analysis of Phase I trial patients with metastatic KRAS and/or TP53 mutant non-small cell lung cancer*. Oncotarget, 2018. **9**(70): p. 33258-33270.
35. Zhang, C., et al., *Oncogenic microRNA-411 promotes lung carcinogenesis by directly targeting suppressor genes SPRY4 and TXNIP*. Oncogene, 2018.

36. Yilmaz, H.H., et al., *Cancer trends and incidence and mortality patterns in Turkey*. Jpn J Clin Oncol, 2011. **41**(1): p. 10-6.
37. Garcia-Campelo, R., et al., *SEOM clinical guidelines for the treatment of non-small cell lung cancer (NSCLC) 2015*. Clin Transl Oncol, 2015. **17**(12): p. 1020-9.
38. Lengyel, E., et al., *Cancer as a Matter of Fat: The Crosstalk between Adipose Tissue and Tumors*. Trends Cancer, 2018. **4**(5): p. 374-384.
39. Ligibel, J.A., et al., *American Society of Clinical Oncology position statement on obesity and cancer*. J Clin Oncol, 2014. **32**(31): p. 3568-74.
40. Quail, D.F. and A.J. Dannenberg, *The obese adipose tissue microenvironment in cancer development and progression*. Nat Rev Endocrinol, 2018.
41. Akhtar, N. and J.G. Bansal, *Risk factors of Lung Cancer in nonsmoker*. Curr Probl Cancer, 2017. **41**(5): p. 328-339.
42. Houghton, A.M., *Mechanistic links between COPD and lung cancer*. Nat Rev Cancer, 2013. **13**(4): p. 233-45.
43. Vogeltanz-Holm, N. and G.G. Schwartz, *Radon and lung cancer: What does the public really know?* J Environ Radioact, 2018. **192**: p. 26-31.
44. Sato, T., T. Shimosato, and D.M. Klinman, *Silicosis and lung cancer: current perspectives*. Lung Cancer (Auckl), 2018. **9**: p. 91-101.
45. Putila, J.J. and N.L. Guo, *Association of arsenic exposure with lung cancer incidence rates in the United States*. PLoS One, 2011. **6**(10): p. e25886.
46. Kc, R., et al., *The role of environmental exposure to non-cigarette smoke in lung disease*. Clin Transl Med, 2018. **7**(1): p. 39.
47. Stabile, L., et al., *A novel approach to evaluate the lung cancer risk of airborne particles emitted in a city*. Sci Total Environ, 2019. **656**: p. 1032-1042.
48. Sram, R.J., et al., *Environmental exposure to carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons--the interpretation of cytogenetic analysis by FISH*. Toxicol Lett, 2007. **172**(1-2): p. 12-20.
49. Ades, A.E., et al., *Symptom lead time distribution in lung cancer: natural history and prospects for early diagnosis*. Int J Epidemiol, 2014. **43**(6): p. 1865-73.
50. Corner, J., et al., *Is late diagnosis of lung cancer inevitable? Interview study of patients' recollections of symptoms before diagnosis*. Thorax, 2005. **60**(4): p. 314-9.
51. Smith, S.M., et al., *Factors contributing to the time taken to consult with symptoms of lung cancer: a cross-sectional study*. Thorax, 2009. **64**(6): p. 523-31.
52. Walter, F.M., et al., *Symptoms and other factors associated with time to diagnosis and stage of lung cancer: a prospective cohort study*. Br J Cancer, 2015. **112 Suppl 1**: p. S6-13.
53. Graus, F. and J. Dalmau, *Paraneoplastic neurological syndromes in the era of immune-checkpoint inhibitors*. Nat Rev Clin Oncol, 2019.
54. Birim, O., et al., *Prognostic factors in non-small cell lung cancer surgery*. Eur J Surg Oncol, 2006. **32**(1): p. 12-23.
55. Detterbeck, F.C., et al., *The IASLC Lung Cancer Staging Project: Methodology and Validation Used in the Development of Proposals for Revision of the Stage Classification of NSCLC in the Forthcoming (Eighth) Edition of the TNM Classification of Lung Cancer*. J Thorac Oncol, 2016. **11**(9): p. 1433-46.

56. Rami-Porta, R., et al., *The IASLC Lung Cancer Staging Project: Proposals for the Revisions of the T Descriptors in the Forthcoming Eighth Edition of the TNM Classification for Lung Cancer*. J Thorac Oncol, 2015. **10**(7): p. 990-1003.
57. Shirasawa, M., et al., *Prognostic significance of the 8th edition of the TNM classification for patients with extensive disease small cell lung cancer*. Cancer Manag Res, 2018. **10**: p. 6039-6047.
58. Hurtgen, M., et al., *Radical video-assisted mediastinoscopic lymphadenectomy (VAMLA)--technique and first results*. Eur J Cardiothorac Surg, 2002. **21**(2): p. 348-51.
59. Kara, H.V., et al., *Minimally invasive injection laryngoplasty in the management of unilateral vocal cord paralysis after video-assisted mediastinal lymph adenectomy*. Wideochir Inne Tech Maloinwazyjne, 2018. **13**(3): p. 388-393.
60. Sayar, A., et al., *Comparison of video-assisted mediastinoscopy and video-assisted mediastinoscopic lymphadenectomy for lung cancer*. Gen Thorac Cardiovasc Surg, 2011. **59**(12): p. 793-8.
61. Okoye, I.S., et al., *Coinhibitory Receptor Expression and Immune Checkpoint Blockade: Maintaining a Balance in CD8(+) T Cell Responses to Chronic Viral Infections and Cancer*. Front Immunol, 2017. **8**: p. 1215.
62. Dal Bello, M.G., et al., *Understanding the checkpoint blockade in lung cancer immunotherapy*. Drug Discov Today, 2017. **22**(8): p. 1266-1273.
63. El-Guindy, D.M., et al., *Programmed cell death ligand-1 (PD-L1) expression combined with CD8 tumor infiltrating lymphocytes density in non-small cell lung cancer patients*. J Egypt Natl Canc Inst, 2018. **30**(4): p. 125-131.
64. Pawlowska, A., et al., *Immunotherapies based on PD-1/PD-L1 pathway inhibitors in ovarian cancer treatment*. Clin Exp Immunol, 2018.
65. Sun, H., et al., *Tissue-resident lymphocytes: from adaptive to innate immunity*. Cell Mol Immunol, 2019.
66. He, J., et al., *Development of PD-1/PD-L1 Pathway in Tumor Immune Microenvironment and Treatment for Non-Small Cell Lung Cancer*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 13110.
67. Domagala-Kulawik, J., I. Osinska, and G. Hoser, *Mechanisms of immune response regulation in lung cancer*. Transl Lung Cancer Res, 2014. **3**(1): p. 15-22.
68. Altorki, N.K., et al., *The lung microenvironment: an important regulator of tumour growth and metastasis*. Nat Rev Cancer, 2019. **19**(1): p. 9-31.
69. Nazareth, M.R., et al., *Characterization of human lung tumor-associated fibroblasts and their ability to modulate the activation of tumor-associated T cells*. J Immunol, 2007. **178**(9): p. 5552-62.
70. Veglia, F., M. Perego, and D. Gabrilovich, *Myeloid-derived suppressor cells coming of age*. Nat Immunol, 2018. **19**(2): p. 108-119.
71. Choi, H., et al., *Transcriptome analysis of individual stromal cell populations identifies stroma-tumor crosstalk in mouse lung cancer model*. Cell Rep, 2015. **10**(7): p. 1187-201.
72. Kastenmuller, W., et al., *Dendritic cell-targeted vaccines--hope or hype?* Nat Rev Immunol, 2014. **14**(10): p. 705-11.
73. Edelman, M.J., et al., *Cyclooxygenase-2 (COX-2) as a predictive marker for the use of COX-2 inhibitors in advanced non-small-cell lung cancer*. J Clin Oncol, 2012. **30**(16): p. 2019-20; author reply 2020.

74. Andersen, M.H., et al., *Cytotoxic T cells*. J Invest Dermatol, 2006. **126**(1): p. 32-41.
75. Wang, W.J., et al., *Variation of blood T lymphocyte subgroups in patients with non- small cell lung cancer*. Asian Pac J Cancer Prev, 2013. **14**(8): p. 4671-3.
76. Zou, W., J.D. Wolchok, and L. Chen, *PD-L1 (B7-H1) and PD-1 pathway blockade for cancer therapy: Mechanisms, response biomarkers, and combinations*. Sci Transl Med, 2016. **8**(328): p. 328rv4.
77. Bevan, M.J., *Memory T cells as an occupying force*. Eur J Immunol, 2011. **41**(5): p. 1192-5.
78. Klebanoff, C.A., L. Gattinoni, and N.P. Restifo, *CD8+ T-cell memory in tumor immunology and immunotherapy*. Immunol Rev, 2006. **211**: p. 214-24.
79. Restifo, N.P., M.E. Dudley, and S.A. Rosenberg, *Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response*. Nat Rev Immunol, 2012. **12**(4): p. 269-81.
80. Farhood, B., M. Najafi, and K. Mortezaee, *CD8(+) cytotoxic T lymphocytes in cancer immunotherapy: A review*. J Cell Physiol, 2019. **234**(6): p. 8509-8521.
81. Del Pozo Martin, Y., et al., *Mesenchymal Cancer Cell-Stroma Crosstalk Promotes Niche Activation, Epithelial Reversion, and Metastatic Colonization*. Cell Rep, 2015. **13**(11): p. 2456-2469.
82. Zeng, D.Q., et al., *Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes for clinical therapeutic research in patients with non-small cell lung cancer*. Oncotarget, 2016. **7**(12): p. 13765-81.
83. Hiraoka, K., et al., *Concurrent infiltration by CD8+ T cells and CD4+ T cells is a favourable prognostic factor in non-small-cell lung carcinoma*. Br J Cancer, 2006. **94**(2): p. 275-80.
84. Kawai, O., et al., *Predominant infiltration of macrophages and CD8(+) T Cells in cancer nests is a significant predictor of survival in stage IV nonsmall cell lung cancer*. Cancer, 2008. **113**(6): p. 1387-95.
85. Manjarrez-Orduno, N., et al., *Circulating T Cell Subpopulations Correlate With Immune Responses at the Tumor Site and Clinical Response to PD1 Inhibition in Non-Small Cell Lung Cancer*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 1613.
86. Qiu, H., et al., *Regulating immunity and inhibiting tumor growth by the recombinant peptide sPD-1-CH50*. Anticancer Res, 2009. **29**(12): p. 5089-94.
87. Kim, S.H., et al., *Prognostic impact of CD8 and programmed death-ligand 1 expression in patients with resectable non-small cell lung cancer*. Br J Cancer, 2019. **120**(5): p. 547-554.
88. Zhang, Y., et al., *Programmed death-1 upregulation is correlated with dysfunction of tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes in human non-small cell lung cancer*. Cell Mol Immunol, 2010. **7**(5): p. 389-95.
89. Chen, L., *Co-inhibitory molecules of the B7-CD28 family in the control of T-cell immunity*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(5): p. 336-47.
90. Kabir, T.F., et al., *Immune Checkpoint Inhibitors in Pediatric Solid Tumors: Status in 2018*. Ochsner J, 2018. **18**(4): p. 370-376.
91. Zou, W., *Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance*. Nat Rev Cancer, 2005. **5**(4): p. 263-74.
92. Curran, M.A., et al., *PD-1 and CTLA-4 combination blockade expands infiltrating T cells and reduces regulatory T and myeloid cells within B16 melanoma tumors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(9): p. 4275-80.

93. Iwai, Y., et al., *Cancer immunotherapies targeting the PD-1 signaling pathway*. J Biomed Sci, 2017. **24**(1): p. 26.
94. Chae, Y.K., et al., *Biomarkers for PD-1/PD-L1 Blockade Therapy in Non-Small-cell Lung Cancer: Is PD-L1 Expression a Good Marker for Patient Selection?* Clin Lung Cancer, 2016. **17**(5): p. 350-361.
95. Prelaj, A., et al., *Predictive biomarkers of response for immune checkpoint inhibitors in non-small-cell lung cancer*. Eur J Cancer, 2019. **106**: p. 144-159.
96. Topalian, S.L., et al., *Mechanism-driven biomarkers to guide immune checkpoint blockade in cancer therapy*. Nat Rev Cancer, 2016. **16**(5): p. 275-87.
97. Van Allen, E.M., et al., *Long-term Benefit of PD-L1 Blockade in Lung Cancer Associated with JAK3 Activation*. Cancer Immunol Res, 2015. **3**(8): p. 855-63.
98. Schildberg, F.A., et al., *Coinhibitory Pathways in the B7-CD28 Ligand-Receptor Family*. Immunity, 2016. **44**(5): p. 955-72.
99. O'Day, S.J., O. Hamid, and W.J. Urba, *Targeting cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 (CTLA-4): a novel strategy for the treatment of melanoma and other malignancies*. Cancer, 2007. **110**(12): p. 2614-27.
100. Yang, W., et al., *Dynamic regulation of CD28 conformation and signaling by charged lipids and ions*. Nat Struct Mol Biol, 2017. **24**(12): p. 1081-1092.
101. Vajaitu, C., et al., *The Central Role of Inflammation Associated with Checkpoint Inhibitor Treatments*. J Immunol Res, 2018. **2018**: p. 4625472.
102. Gu, D., et al., *Soluble immune checkpoints in cancer: production, function and biological significance*. J Immunother Cancer, 2018. **6**(1): p. 132.
103. Shin, S.P., et al., *Adenovirus expressing both thymidine kinase and soluble PD1 enhances antitumor immunity by strengthening CD8 T-cell response*. Mol Ther, 2013. **21**(3): p. 688-95.
104. Kuipers, H., et al., *Contribution of the PD-1 ligands/PD-1 signaling pathway to dendritic cell-mediated CD4⁺ T cell activation*. Eur J Immunol, 2006. **36**(9): p. 2472-82.
105. Sorensen, S.F., et al., *Increase in soluble PD-1 is associated with prolonged survival in patients with advanced EGFR-mutated non-small cell lung cancer treated with erlotinib*. Lung Cancer, 2016. **100**: p. 77-84.
106. Berraondo, P., et al., *Cytokines in clinical cancer immunotherapy*. Br J Cancer, 2019. **120**(1): p. 6-15.
107. Balkwill, F., *TNF-alpha in promotion and progression of cancer*. Cancer Metastasis Rev, 2006. **25**(3): p. 409-16.
108. Balkwill, F., *Tumour necrosis factor and cancer*. Nat Rev Cancer, 2009. **9**(5): p. 361-71.
109. Tracey, D., et al., *Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review*. Pharmacol Ther, 2008. **117**(2): p. 244-79.
110. Yoshida, N., et al., *Interleukin-6, tumour necrosis factor alpha and interleukin-1beta in patients with renal cell carcinoma*. Br J Cancer, 2002. **86**(9): p. 1396-400.
111. Wang, B., et al., *Expression of tumor necrosis factor-alpha-mediated genes predicts recurrence-free survival in lung cancer*. PLoS One, 2014. **9**(12): p. e115945.
112. Balkwill, F., K.A. Charles, and A. Mantovani, *Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease*. Cancer Cell, 2005. **7**(3): p. 211-7.

113. Balkwill, F. and A. Mantovani, *Inflammation and cancer: back to Virchow?* Lancet, 2001. **357**(9255): p. 539-45.
114. Coussens, L.M. and Z. Werb, *Inflammation and cancer*. Nature, 2002. **420**(6917): p. 860-7.
115. Kim, S., et al., *Carcinoma-produced factors activate myeloid cells through TLR2 to stimulate metastasis*. Nature, 2009. **457**(7225): p. 102-6.
116. Stathopoulos, G.T., et al., *Tumor necrosis factor-alpha promotes malignant pleural effusion*. Cancer Res, 2007. **67**(20): p. 9825-34.
117. Isaacs, A. and J. Lindenmann, *Virus interference. I. The interferon*. Proc R Soc Lond B Biol Sci, 1957. **147**(927): p. 258-67.
118. Lees, J.R., *Interferon gamma in autoimmunity: A complicated player on a complex stage*. Cytokine, 2015. **74**(1): p. 18-26.
119. Teixeira, L.K., et al., *The role of interferon-gamma on immune and allergic responses*. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2005. **100 Suppl 1**: p. 137-44.
120. Lin, C.F., et al., *Escape from IFN-gamma-dependent immunosurveillance in tumorigenesis*. J Biomed Sci, 2017. **24**(1): p. 10.
121. Platanias, L.C., *Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(5): p. 375-86.
122. Hodge, G., et al., *Lung cancer is associated with decreased expression of perforin, granzyme B and interferon (IFN)-gamma by infiltrating lung tissue T cells, natural killer (NK) T-like and NK cells*. Clin Exp Immunol, 2014. **178**(1): p. 79-85.
123. Siegel, R.L., K.D. Miller, and A. Jemal, *Cancer statistics, 2019*. CA Cancer J Clin, 2019. **69**(1): p. 7-34.
124. Arrieta, O., et al., *Expression of PD-1/PD-L1 and PD-L2 in peripheral T-cells from non-small cell lung cancer patients*. Oncotarget, 2017. **8**(60): p. 101994-102005.
125. Tsim, S., et al., *Staging of non-small cell lung cancer (NSCLC): a review*. Respir Med, 2010. **104**(12): p. 1767-74.
126. Turna, A., et al., *Validity of the updated European Society of Thoracic Surgeons staging guideline in lung cancer patients*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2018. **155**(2): p. 789-795.
127. Simsek, M., S.B. Tekin, and M. Bilici, *Immunological Agents Used in Cancer Treatment*. Eurasian J Med, 2019. **51**(1): p. 90-94.
128. Darvin, P., et al., *Immune checkpoint inhibitors: recent progress and potential biomarkers*. Exp Mol Med, 2018. **50**(12): p. 165.
129. Karagoz, B., et al., *CD8+CD28- cells and CD4+CD25+ regulatory T cells in the peripheral blood of advanced stage lung cancer patients*. Med Oncol, 2010. **27**(1): p. 29-33.
130. Stankovic, B., et al., *Immune Cell Composition in Human Non-small Cell Lung Cancer*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 3101.
131. Sheng, S.Y., et al., *The distribution and function of human memory T cell subsets in lung cancer*. Immunol Res, 2017. **65**(3): p. 639-650.
132. Cam, C., et al., *The inflammatory cytokine interleukin-23 is elevated in lung cancer, particularly small cell type*. Contemp Oncol (Pozn), 2016. **20**(3): p. 215-9.
133. Nakamura, H., et al., *Immunologic parameters as significant prognostic factors in lung cancer*. Lung Cancer, 2002. **37**(2): p. 161-9.

134. Battaglia, A., et al., *Lymphocyte populations in human lymph nodes. Alterations in CD4+ CD25+ T regulatory cell phenotype and T-cell receptor Vbeta repertoire*. Immunology, 2003. **110**(3): p. 304-12.
135. Carey, M.S., et al., *Good outcome associated with a standardized treatment protocol using selective postoperative radiation in patients with clinical stage I adenocarcinoma of the endometrium*. Gynecol Oncol, 1995. **57**(2): p. 138-44.
136. Kito, R., et al., *Nationwide epidemiological survey of idiopathic sudden sensorineural hearing loss in Japan*. Acta Otolaryngol, 2017. **137**(sup565): p. S8-S16.
137. Lange, M.M., et al., *Level of arterial ligation in rectal cancer surgery: low tie preferred over high tie. A review*. Dis Colon Rectum, 2008. **51**(7): p. 1139-45.
138. Kreimer, A.R., et al., *The case for conducting a randomized clinical trial to assess the efficacy of a single dose of prophylactic HPV vaccines among adolescents*. J Natl Cancer Inst, 2015. **107**(3).
139. Barrera, L., et al., *Levels of peripheral blood polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells and selected cytokines are potentially prognostic of disease progression for patients with non-small cell lung cancer*. Cancer Immunol Immunother, 2018. **67**(9): p. 1393-1406.
140. Riemann, D., et al., *Blood immune cell biomarkers in lung cancer*. Clin Exp Immunol, 2019. **195**(2): p. 179-189.
141. Dorneles, G.P., et al., *Low DNA damage in peripheral lymphocytes of healthy elderly individuals with inverted CD4:CD8 ratio*. Int Immunopharmacol, 2019. **67**: p. 483-486.
142. Rudd, C.E., A. Taylor, and H. Schneider, *CD28 and CTLA-4 coreceptor expression and signal transduction*. Immunol Rev, 2009. **229**(1): p. 12-26.
143. Weng, N.P., A.N. Akbar, and J. Goronzy, *CD28(-) T cells: their role in the age-associated decline of immune function*. Trends Immunol, 2009. **30**(7): p. 306-12.
144. Liu, C., et al., *Increased CD8+CD28+ T cells independently predict better early response to stereotactic ablative radiotherapy in patients with lung metastases from non-small cell lung cancer*. J Transl Med, 2019. **17**(1): p. 120.
145. Domagala-Kulawik, J., *The role of the immune system in non-small cell lung carcinoma and potential for therapeutic intervention*. Transl Lung Cancer Res, 2015. **4**(2): p. 177-90.
146. Chen, S., et al., *Myeloid-derived suppressor cells promote age-related increase of lung cancer growth via B7-H1*. Exp Gerontol, 2015. **61**: p. 84-91.
147. Ma, H., et al., *The Expression and Clinical Signification of PD-1 in Lymph Nodes of Patients with Non-small Cell Lung Cancer*. Immunol Invest, 2017. **46**(7): p. 639-646.
148. Rutkowski, J., et al., *Evaluation of peripheral blood T lymphocyte surface activation markers and transcription factors in patients with early stage non-small cell lung cancer*. Cell Immunol, 2017. **322**: p. 26-33.
149. Mok, T.S.K., et al., *Pembrolizumab versus chemotherapy for previously untreated, PD-L1-expressing, locally advanced or metastatic non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-042): a randomised, open-label, controlled, phase 3 trial*. Lancet, 2019. **393**(10183): p. 1819-1830.
150. Ahmadzadeh, M., et al., *Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired*. Blood, 2009. **114**(8): p. 1537-44.

151. Boutsikou, E., et al., *Tumour necrosis factor, interferon-gamma and interleukins as predictive markers of antiprogrammed cell-death protein-1 treatment in advanced non-small cell lung cancer: a pragmatic approach in clinical practice.* Ther Adv Med Oncol, 2018. **10**: p. 1758835918768238.
152. Liu, Q., et al., *Soluble cytotoxic T-lymphocyte antigen 4: a favorable predictor in malignant tumors after therapy.* Onco Targets Ther, 2017. **10**: p. 2147-2154.
153. Saverino, D., et al., *Soluble CTLA-4 in autoimmune thyroid diseases: relationship with clinical status and possible role in the immune response dysregulation.* Clin Immunol, 2007. **123**(2): p. 190-8.
154. Kruger, S., et al., *Serum levels of soluble programmed death protein 1 (sPD-1) and soluble programmed death ligand 1 (sPD-L1) in advanced pancreatic cancer.* Oncoimmunology, 2017. **6**(5): p. e1310358.
155. Frigola, X., et al., *Identification of a soluble form of B7-H1 that retains immunosuppressive activity and is associated with aggressive renal cell carcinoma.* Clin Cancer Res, 2011. **17**(7): p. 1915-23.
156. Okuma, Y., et al., *High plasma levels of soluble programmed cell death ligand 1 are prognostic for reduced survival in advanced lung cancer.* Lung Cancer, 2017. **104**: p. 1-6.

HAM VERİLER



FORMLAR

ASGARİ BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

1. Kabul etmeniz halinde katılacağınız " Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri Olgularda Mediastinal Lenf Nodu Diseksiyonu ve Sitotoksik T Lenfosit İnhibitör Reseptör ilişkisi " adlı çalışma bir araştırmadır.
2. Araştırmanın amacı Küçük hücre dışı akciğer kanserli hastalarda sitotoksik T lenfositlerde görülen ve tümör öldürücü yanıtı durduran PD1 ve CTLA-4 ekspresyonu ve efektör mekanizmalar arasında ilişkinin değerlendirilmesi; akciğer tümörlü hastalarda bağışıklık sisteminizin, yapılacak VAMLA (Bir çeşit lenf bezi çıkarılması işlemi) ameliyatından nasıl etkilendiğini araştırmaktır.
3. Bu çalışmaya İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Göğüs Cerrahisi Anabilim Dalı'na başvuran ve yapılan transtorasik iğne aspirasyonu (TTİA), bronkoskopi, bilgisayarlı toraks tomografisi (Toraks BT) ve/veya PET-BT ve mediastinoskopi ile T1-T3N0M0 evrelerinde olduğu saptanan 18 yaşından büyük, daha önce kemoterapi ve radyoterapi almamış, küçük hücre dışı akciğer kanseri tanılı hastaların alınması planlanmaktadır.
4. Bu çalışmada İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Göğüs Cerrahisi Anabilim Dalı'na başvuran T1-T3N0M0 evrelerinde olduğu saptanan 18 yaşından büyük, daha önce kemoterapi ve radyoterapi almamış, küçük hücre dışı akciğer kanseri tanılı hastaların doku ve kan örnekleri alınacaktır. Opere edilecek akciğer kanserli olgularda, lenf nodu ('N') evrelemesi yapmak için rutin olarak genel anestezi altında, akciğer kanseri için planlanan ameliyattan önce ayrı bir ameliyat olarak 'Video-yardımlı mediastinoskopik lenfadenektomi' (VAMLA) yapılmaktadır. VAMLA işleminden hemen önce ve işlemden 2 hafta sonra 10 mL kanınız alınarak bağışıklık sisteminizin T hücreleri incelenecektir.
5. Gönüllü olarak sizin araştırma ile ilgili herhangi bir sorumluluğunuz bulunmamaktadır ve kan alımı size hiç bir zarar vermemektedir.
6. Gönüllü olarak sizin araştırma ile ilgili maruz kalacağınız herhangi bir risk bulunmamaktadır. Size ait bilgiler kesinlikle gizli tutulacaktır.
7. İsteğiniz halinde çalışmanın sonuçları ile ilgili bilgiler sizinle paylaşılacaktır.
8. Bu çalışmada gönüllülere herhangi bir tedavi, alternatif tedavi uygulanmayacaktır. .
9. Çalışma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluğunuz yoktur. Bu çalışma sırasında size herhangi bir ücret ödenmeyecektir. Sizden herhangi bir ücret talep edilmeyecek, SGK'dan bir ücret alınmayacaktır.
10. Çalışmada tarafınıza, ulaşım veya yemek gibi masraflar için de bir ödeme yapılmayacaktır. Çalışmada gönüllü katılım esas alınmıştır.
11. Çalışmada yer almak tamamen sizin isteğinize bağlı olup, katılmayı reddedebilirsiniz. Reddetmeniz halinde yararınıza engel ya da cezai bir durum ortaya çıkmayacaktır. Size uygulanan tedavide de herhangi bir değişiklik olmayacaktır.
12. İzleyiciler, yoklama yapan kişiler, Etik Kurul, Kurum ve diğer ilgili sağlık otoriteleri sizin gönüllü olur formunu imzalamanız ile orijinal tıbbi kayıtlara doğrudan erişebilecek, ancak bu bilgiler gizli tutulacaktır.
13. Çalışma esnasında gizlilik ilkesine bağlı kalınacaktır. Araştırma sonuçlarının yayımlanması halinde dahi kimlik bilgileri gizli kalacaktır. Ayrıca, kimliğinizi ortaya koyacak kayıtlar da gizli tutulacaktır.
14. Araştırma konusuyla ilgili ve gönüllünün araştırmaya katılmaya devam etme isteğini etkileyebilecek yeni bilgiler elde edildiğinde gönüllünün veya yasal temsilcisinin zamanında bilgilendirilecektir.
15. Araştırma hakkında veya araştırmayla ilgili herhangi bir olay hakkında daha fazla bilgi almak için, Prof. Dr. Akif Turna'ya 0212 414 3327 numaralı telefondan ulaşabilirsiniz.

16. Araştırmanın yürütülmesi sırasında herhangi bir sebep göstermeden araştırmadan çekilebilirsiniz. Ancak, zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekildiğinizi önceden bildirmeniz uygun olacaktır.
17. Araştırmanın yaklaşık 12 ay kadar süreceği planlanmaktadır.
18. Bu araştırmada tahmini gönüllü sayısının 40 olması beklenmektedir.
19. *“Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formundaki tüm açıklamaları okudum. Bana, yukarıda konusu ve amacı belirtilen araştırma ile ilgili yazılı ve sözlü açıklama aşağıda adı belirtilen hekim tarafından yapıldı. Araştırmaya gönüllü olarak katıldığımı, istediğim zaman gerekçeli veya gerekçesiz olarak araştırmadan ayrılabileceğimi biliyorum.”*
20. *Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu*” gönüllü olan sizin veya yasal temsilcinizin yasal haklarını ortadan kaldıracak bir hüküm veya ifade içermemektedir. Ayrıca araştırmacıyı, kurumu veya bunların temsilcilerini kendi ihmallerinden kaynaklanan herhangi bir yükümlülüğün kurtaracak hüküm veya ifade taşımamaktadır.
21. *“Küçük Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri Olgularında Mediastinal Lenf Nodu Diseksiyonu ve Sitotoksik T Lenfosit İnhibitör Reseptör ilişkisi”* adlı çalışma kapsamında alınan biyolojik örneklerimin (kan,doku vb.)
- a. Sadece bu çalışma kapsamında kullanılmasına izin veriyorum.
- b. İleride yapılması planlanan tüm çalışmalarda kullanılmasına izin veriyorum.
- c. Hiçbir koşulda kullanılmasına izin vermiyorum.
- 22 *Söz konusu araştırmaya, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın kendi rızamla katılmayı kabul ediyorum.”*

Hasta/hasta yakını adı, soyadı	İmzası	Tarih

Açıklama yapan araştırmacının adı, soyadı	İmzası	Tarih

Tanık olan kişinin adı, soyadı	İmzası	Tarih

Yasal temsilci olan kişinin adı, soyadı	İmzası	Tarih

ETİK KURUL KARARI

Tarih ve Sayı: 06/07/2017-259235



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Dekanlığı



Sayı :59491012-604.01.02-
Konu :Yüks.Lis.Öğr.Biyolog Ayşe
Engin'in etik kurul kararı A-19

AZİZ SANCAR DENEYSEL TIP ARAŞTIRMA ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

İlgi : 01.06.2017 tarihli,206271 sayılı yazı

Enstitünüz İmmünoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi **Prof.Dr.Esin ÇETİN**'in danışmanlığında **Yüksek Lisans Öğrencisi Biyolog Ayşe ENGİN**'in yürütücülüğünde **Prof.Dr.Akif TURNA**, **Prof.Dr.Büge ÖZ**, **Prof.Dr.Günnur DENİZ** ve **Uzm.Dr.Şebnem BATUR**'un yardımcılıklarında "**Küçük Hücre Dışı Akciğer Kanseri Olgularında Mediastinal Lenf Nodu Diseksiyonu ve Sitotoksik T Lenfosit Reseptör İlişkisi**" başlıklı **Yüksek Lisans Tezi** hakkında ilgi yazınız ve ekleri **04 Temmuz 2017** tarihinde toplanan Fakültemiz Klinik Araştırmalar Etik Kurulunca müzakere edilmiş olup; Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) desteği alınması koşuluyla etik açıdan uygun olduğuna karar verilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

e-İmzalı
Prof. Dr. Özgür KASAPÇOPUR
Başkan

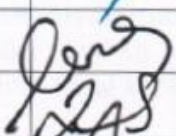
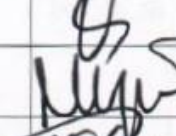
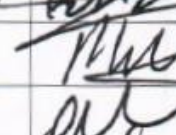
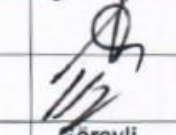
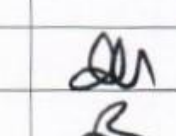
e-İmzalı
Prof. Dr. Feray SAVRUN
Dekan a.
Dekan Yardımcısı

NOT: Yönetmelik gereği Sonuç Raporunun Klinik Araştırmalar Etik Kuruluna iletilmesi gerekmektedir.

EK :
1 dosya elden teslim edilecektir.

KARAR BİLGİLERİ	Karar No: A-19	Tarih: 04 Temmuz 2017
	Yüksek Lisans Öğrencisi Biyolog Ayşe ENGİN'in yürütümlüğünde Prof.Dr.Akif TURNA, Prof.Dr.Büge ÖZ, Prof.Dr.Günnur DENİZ ve Uzm.Dr.Şebnem BATUR'un yardımcılıklarında yapılması tasarlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen klinik araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, gerçekleştirilmesinde etik sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üyelerinin oy birliği ile karar verilmiştir.	

ÇALIŞMA ESASI	İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
ETİK KURUL BAŞKANI UNVANI/ADI/SOYADI: Prof. Dr. Özgür KASAPÇOPUR	

ETİK KURUL ÜYELERİ						
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	İlişki *	Katılım **	İmza
Prof. Dr. Özgür KASAPÇOPUR (Başkan)	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	IÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	E	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. Mehmet Faik ÖZÇELİK (Başkan Yard.)	Genel Cerrahi	IÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	E	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	İzinli
Doç. Dr. Muhlis Cem AR (Raportör)	İç Hastalıkları Hematoloji	IÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	E	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. Zeki ÖNGEN	Kardiyoloji	IÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	E	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof.Dr.Öner SÜZER	Farmakoloji	IÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	E	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. Nurten Uzun ADATEPE	Nöroloji	IÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	K	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. Hakkı Oktay SEYMEN	Fizyoloji	IÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	E	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof.Dr.Ayşe Pervin Sutaş BOZKURT	Anesteziyoloji ve Reanimasyon	IÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	K	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. Gülten DİNÇ	Deontoloji	IÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	K	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç. Dr. Suphi VEHİD	Halk Sağlığı	IÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	E	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç.Dr.Zeynep Hande TURNA	İç Hastalıkları Medikal Onkoloji	IÜ Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	K	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç. Dr. Mutlu NIYAZOĞLU	İç Hastalıkları	İst. Eğitim ve Araştırma Hast.	E	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	Görevli
Avukat Ayfer DİKMEN	Ticaret ve Sağlık Hukuku	Serbest Hukuk Bürosu	K	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Zümrüt GAMLI	Emekli Öğretmen	Sivil Üye	K	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	

* :Araştırma ile İlişki

** :Toplantıda Bulunma

PATENT İZİN HAKKI



İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

KÜÇÜK HÜCRELİ DIŞI AKCİĞER KANSERLİ OLGULARDA MEDİASTİNAL LENF NODU DİSEKSİYONU VE SİTOTOKSİK T LENFOSİT İNHİBİTÖR RESEPTÖR İLİŞKİSİ

ORJİNALLİK RAPORU

%**6**

BENZERLİK ENDEKSİ

%**3**

İNTERNET
KAYNAKLARI

%**1**

YAYINLAR

%**3**

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1

Submitted to Istanbul University

Öğrenci Ödevi

%**2**

2

istanbulsaglik.gov.tr

İnternet Kaynağı

%**1**

3

www.tgcd.org.tr

İnternet Kaynağı

<%**1**

4

www.turkishimmunology.org

İnternet Kaynağı

<%**1**

5

Submitted to Gaziantep Aniversitesi

Öğrenci Ödevi

<%**1**

6

openaccess.inonu.edu.tr:8080

İnternet Kaynağı

<%**1**

7

acikerisim.deu.edu.tr

İnternet Kaynağı

<%**1**

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Ayşe	Soyadı	Engin
Doğ.Yeri	Erzurum	Doğ.Tar.	27.09.1989
Uyruğu	TC	TC Kim No	12929133684
Email	enginay89@gmail.com	Tel	05443272012

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.		
Lisans	Hacettepe Üniversitesi- Fen Fakültesi-Biyoloji Bölümü	2012
Lise	İncesu Anadolu Lisesi	2007

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Biyolog	İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü İmmünoloji Anabilim Dalı	2017-
2.	Dokümantasyon Sorumlusu	İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü	2013-2017
3.	Biyolog	İstanbul Tıp Fakültesi Kemik İliği Bankası	2012-2013

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	Çok iyi	İyi	İyi		81 YÖK DİL

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı			
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödüülleri

1. E. Cetin Aktas, A. Turna, A. Engin, D. I. Cikman, G. Ayan, G. Deniz. Erken Evre Küçük Hücre Dışı Akciğer Kanseri Olgularında İmmünskorlamanın Yeri: Baskılayıcı ve Sitotoksik Hücre Alt Gruplarının Belirlenmesi Hücre XXIV. Ulusal İmmünoloji Kongresi İstanbul Türkiye, 27-30 Nisan 2017, ss 92-92.
2. E. Cetin Aktas, A. Turna, F. Esen, A. Engin, M. Agkoc, G. Deniz . Reduced DNAM expression and impaired function of cytokine-secreting and cytotoxic NK cells in tumor draining. 5th European Congress of Immunology (ECI), P.B1.03.06 (Poster presentation), 220, 2-5 September. 2018, Amsterdam.
3. E. Cetin Aktas, A. Turna, A. Engin, D. I. Cikman, G. Ayan, G. Deniz. Immunophenotyping of suppressor and cytotoxic lymphocyte subsets and cytotoxic mechanisms in non-small cell lung cancer .5th European Congress of Immunology (ECI), P.B3.04.02 (Poster presentation), 283, 2-5 September. 2018, Amsterdam.
4. Turna A, Aktas E, Engin A, Cikman DI, Ayan G, Deniz G. The Importance of Suppressor and Cytotoxic T Lymphocyte subsets and Cytotoxic Mechanisms in Non-Small Cell Lung Cancer. 19th World Conference on Lung Cancer (WCLC 2018) of the International Association for the Study of Lung Cancer (IASLC), P1.04-10 (Poster presentation), 308, 23-27 September, 2018, Toronto, Canada
5. Aktaş Çetin E, Turna A, Esen F, Engin A, Ağkoç M, Deniz G. Erken Evre Küçük Hücre Dışı Akciğer Kanseri Yapılan VAMLA Doğal Öldürücü Hücre Fonksiyonlarını Düzenler VIII. Ulusal Akciğer Kanseri Kongresi, 04-07 Ekim 2018, S-03 (sözlü sunum), 34, Bodrum.
6. Fatma Betül Öktelik, Ayşe Engin, Esin Çetin, Betül Ayşe Sin, Aslı Gelincik, Begüm Görgülü, Şengül Beyaz, Günnur Deniz. Hymenoptera Venom Allerjili Hastalarda Komponent Bazlı Diyagnostik Testin (CRD) Tanıya Katkısı. İmmünolojide Moleküller Sempozyumu, 18-21 Ekim 2018, SS-003, (sözlü sunum), İzmir.
7. Ayşe Engin, Fatma Betül Öktelik, Esin Çetin, Betül Ayşe Sin, Aslı Gelincik, Begüm Görgülü, Şengül Beyaz, Günnur Deniz. Komponent Bazlı Diyagnostik Testin Hymenoptera Venom Allerjili Hastalarda (CRD) Tanıya Katkısı. 25.

Ulusal Allerji ve Klinik İmmünoloji Kongresi, 17-21 Kasım 2018, PP-099, ,(poster sunum), Antalya.

8. Engin A, Turna A, Esen F, Agkoc M, Deniz G, Çetin E Erken Evre Küçük Hücre Dışı Akciğer Kanseri Olgularda Video Yardımlı Mediastinoskopik Lenfadenektomi Uygulamasının Sitotoksik T lenfositlerinde Sitokin Salınımı ve İmmün Kontrol Noktası Reseptör Ekspresyonlarına Etkisi X. Aziz Sancar DETAE günleri, İSTANBUL TÜRKİYE, 29-30 Kasım 2018, ss 6-6 (sözlü sunum)



