

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI



SERÖZ PAPİLLER OVER TÜMÖRLERİNDE CXCR4 YOLAĞININ İMMÜN YANITLA İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Doktora Tezi

Burak TATAR

Danışman

Prof. Dr. Sezgin GÜNEŞ

II. Danışman

Doç. Dr. Sercan ERGÜN

Bu çalışma Ondokuz Mayıs Üniversitesi tarafından PYO.TIP.1904.21.026 proje numarası ile desteklenmiştir.

SAMSUN
2023

TEZ KABUL VE ONAYI

Burak TATAR tarafından, **Prof. Dr. Sezgin GÜNEŞ** danışmanlığında hazırlanan **“SERÖZ PAPİLLER OVER TÜMÖRLERİNDE CXCR4 YOLAĞININ İMMÜN YANITLA İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI”** başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından 31.8.2023 tarihinde yapılan sınav sonucunda oy birliği ile başarılı bulunarak Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

	Unvanı Adı Soyadı Üniversitesi Ana Bilim/Ana Sanat Dalı	Sonuç
Başkan	Prof. Dr. Cumhuri GÜNDÜZ Ege Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı	☒ Kabul ☐ Ret
Üye	Prof. Dr. Sezgin GÜNEŞ Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı	☒ Kabul ☐ Ret
Üye	Prof. Dr. Hamiyet ALTUNTAŞ Erciyes Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı	☒ Kabul ☐ Ret
Üye	Dr. Öğretim Üyesi Sultan ÇALIŞKAN Ondokuz Mayıs Üniversitesi Patoloji Ana Bilim Dalı	☒ Kabul ☐ Ret
Üye	Dr. Öğretim Üyesi Engin ALTUNGÖZ Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıbbi Genetik Ana Bilim Dalı	☒ Kabul ☐ Ret

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen ve yukarıda adları yazılı jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

Prof. Dr. Ahmet TABAK
Enstitü Müdürü

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI

Hazırladığım Doktora tezinin bütün aşamalarında bilimsel etiğe ve akademik kurallara riayet ettiğimi, çalışmada doğrudan veya dolaylı olarak kullandığım her alıntıya kaynak gösterdiğimi ve yararlandığım eserlerin Kaynaklar'da gösterilenlerden oluştuğunu, her unsurun enstitü yazım kılavuzuna uygun yazıldığını ve TÜBİTAK Araştırma ve Yayın Etiği Kurulu Yönetmeliği'nin 3. bölüm 9. maddesinde belirtilen durumlara aykırı davranılmadığını taahhüt ve beyan ederim.

Etik Kurul Gerekli mi?

Evet ☒ (Gerekli ise ekler kısmına ekleyiniz)

Hayır ☐

22 /06/ 2023
Burak TATAR

TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI

Tez Başlığı: SERÖZ PAPİLLER OVER TÜMÖRLERİNDE CXCR4 YOLAĞININ İMMÜN YANITLA İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Yukarıda başlığı belirtilen tez çalışması için şahsım tarafından 06/07/2023 tarihinde intihal tespit programından alınmış olan özgünlük raporu sonucunda;

Benzerlik oranı : % 7

Tek kaynak oranı : % 2 çıkmıştır.

06/07/ 2023
Prof. Dr. Sezgin GÜNEŞ

ÖZET

SERÖZ PAPİLLER OVER TÜMÖRLERİNDE CXCR4 YOLAĞININ İMMÜN YANITLA İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Burak TATAR

Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Moleküler Tıp Ana Bilim Dalı

Doktora, Ağustos/2023

Danışman: Prof. Dr. Sezgin GÜNEŞ

Genel bilgiler: Seröz papiller epitelyal over kanseri (EOK), tümöre yönelik immün verilen yanıtla göre aktive ya da inhibe olarak iki gruba ayrılabilir. İmmün yanıt aktive (TIL pozitif) olan hastalarda daha uzun hastalıksız ve genel sağ kalım gösterilmiştir. Kemokin reseptörü CXCR4 ve bunun ligandı olan CXCL12 (SDF-1), kanser kemotaksisi, progresyon ve metastaz açısından etkili olabilir. CXCL12'nin tümör yatağında bulunması, immün baskılayıcı CXCR4+ Treg ve plazmasitoid dendritik hücrelerin (pDC) tümör çoğaltıcı etkisini artırır. EOK, TIL pozitif ve negatif olarak sınıflandırılmış ve bu iki grupta CXCL1-CXCR4-CXCR7 kemokin yolağının ilişkisi ve sağkalıma etkisi araştırılmıştır.

Materyal ve Metod: Tez çalışması retrospektif olarak Ondokuz Mayıs Üniversitesi'nde son 10 yılda opere edilmiş 86 hastanın patolojik spesimenleri ve hasta dosya kullanılarak Patoloji Anabilim Dalı ve Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir. İmmün alt grupta ve immün olmayan alt gruptaki CXCL12 ekspresyonu ve immünohistokimyasal (İHK) CXCR4-CXCR7 reseptör pozitivitesi asosiasyonu için Pearson korelasyon ve lojistik regresyon analizi kullanılmıştır. Gruplar arasındaki sağkalım farkı Kaplan-Meier ve log rank metodu ile karşılaştırılmıştır. $P < 0,05$ olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Bulgular: Ortalama progresyonsuz sağkalım süresi 30,3 ay (1-137, standart sapma: 39,6) ve ortalama genel sağkalım süresi de 56,2 aydır (1,9-194 standart sapma: 39,6). Tümörde CXCR7'nin kuvvetli ifade edilmesi, TIL sayısını azaltmaktadır [$P < 0,01$ binary logistic regression, OR:0,17 (0,05-0,56) %95 CI]. Tümörde CXCR4'ün kuvvetli ifade edilmesi (İHK), CD8+ lenfosit sayısını azaltmaktadır [$P < 0,05$ binary logistic regression, OR:0,033 (0,02-0,66) %95 CI]. Hastalıksız ve genel sağkalım, CXCL12 kat değişim değerinin 0,4 ve üzerinde olması ya da altında olması durumunda değişmemektedir (log-rank test).

Sonuç: EOK'de CXCL12 ifadesi bağımsız bir prognostik faktör değildir. Tümörde kemokin reseptörleri CXCR7 ve CXCR4'ün yoğun olarak bulunması, tümöre T lenfosit girişini serbest ligand azlığı nedeni ile azaltmaktadır. CXCL12'nin belirli bir eşğin üstünde ifadesi, TIL sayısını arttırmakta ve bu ilişkiyi CXCR7 ya da CXCR4 ifadesi değiştirmemektedir. Neo-adjüvan kemoterapi CD8+ T lenfosit sayısını, CXCL12 ifadesini değiştirmeden arttırmaktadır. Mevcut çalışma ışığında, CXCL12 ifadesi düşük olan hastalarda CXCR7 blokajının, tümörün immün profilini değiştirmede PD-1/PDL-1 antagonistleri ile beraber kullanılması düşünülebilir.

Anahtar Sözcükler: Over Kanseri, Kemokin Reseptörü, CXCR4, CXCR7, CXCL12, İmmünite

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE RELATIONSHIP BETWEEN THE CXCR4 PATHWAY AND IMMUNE RESPONSE IN SEROUS PAPILLARY OVARIAN TUMORS

Burak TATAR

Ondokuz Mayıs University

Institute of Graduate Studies

Department of Molecular Medicine

Ph.D., August/2023

Supervisor: Prof. Dr. Sezgin GÜNEŞ

General Information: Serous papillary epithelial ovarian cancer (EPOC) can be divided into two groups where the immune response to the tumor is either activated or inhibited. Longer disease-free survival and overall survival have been demonstrated in patients with activated immune response (TIL positive). CXCR4 and its ligand CXCL12 (SDF-1) may be effective in cancer chemotaxis, progression, and metastasis. The presence of CXCL12 in the tumor bed increases the tumor-promoting effect of immunosuppressive CXCR4⁺ Tregs and plasmacytoid dendritic cells (pDC). EPOC is classified as TIL positive and negative, and the association of the CXCL1-CXCR4-CXCR7 chemokine pathway in these two groups and its effect on survival was investigated.

Material and Method: The thesis was conducted retrospectively with the pathological specimens and patient files of 86 patients who had been operated in the last 10 years at the Department of Pathology and Ondokuz Mayıs University Department of Medical Biology. Pearson correlation and logistic regression analysis were used for the association of *CXCL12* expression and immunohistochemical (IHC) CXCR4-CXCR7 receptor positivity in the immune and non-immune subgroups. The survival difference between the groups was compared by Kaplan-Meier and log-rank methods. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Results: The average progression-free survival time was 30.3 months (1-137, standard deviation: 39.6) and the average overall survival time was 56.2 months (1.9-194 standard deviation: 39.6). Strong expression of CXCR7 in the tumor reduces the number of TILs [$P < 0.01$ binary logistic regression, OR:0.17 (0.05-0.56) 95% CI]. Strong expression of CXCR4 in the tumor (IHC) reduces the number of CD8⁺ lymphocytes [$P < 0.05$ binary logistic regression, OR:0.033 (0.02-0.66) 95% CI]. Disease-free and overall survival do not change if the fold change value of CXCL12 is above or below 0.4 (log-rank test).

Conclusion: *CXCL12* expression is not an independent prognostic factor in EPOC. The presence of chemokine receptors CXCR7 and CXCR4 intensively in the tumor reduces the entry of T lymphocytes into the tumor due to the scarcity of free ligand. Expression of *CXCL12* above a certain threshold increases the number of TILs, and this relationship is not altered by CXCR7 or CXCR4 expression. Neoadjuvant chemotherapy increases the number of CD8⁺ T lymphocytes without changing the expression of *CXCL12*. In light of the current study, in patients with low *CXCL12* expression, the blockade of CXCR7 could be considered for use with PD-1/PDL-1 antagonists to change the immune profile of the tumor.

Keywords: Ovarian Cancer, Chemokine Receptor, CXCR4, CXCR7, CXCL12, SDF-1, Immunity

ÖN SÖZ VE TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince değerli bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, her konuda sonsuz destek sunan, tez çalışmamda desteğini esirgemeyen tez danışmanım Prof. Dr. Sezgin GÜNEŞ'e;

Doktora programına başlamama vesile olan, bana genetiğin temel ilkelerini öğreten, bilgi ve tecrübelerini koşulsuz paylaşan, kaybı hepimizi derinden üzen sayın hocamız merhume Prof. Dr. Methiye Gönül OĞUR'a;

Birlikte çalışmaktan keyif aldığım, tez süresince de desteklerini esirgemeyen Doç. Dr. Sercan ERGÜN ve Dr. Öğretim Üyesi Gülgez Neslihan TAŞKURT HEKİM'e;

Çalışmada büyük emekleri olan Patoloji Bölümü'nden Prof. Dr. Mehmet KEFELİ ve Dr. Öğretim Üyesi Sultan ÇALIŞKAN'a;

Bugünlere gelmemde büyük emeği olan annem Sebahat ERDOĞAN, babam Taner TATAR, kardeşim Başak TATAR ÖZDEMİR ve teyzem Ülkü Suna ERDOĞAN'a;

Son olarak da gerek bilimsel gerek manevi desteğini hiç esirgemedi bu zorlu süreci benimle göğüsleyen sevgili eşim Gül ŞEKERLİSOY TATAR'a;

Sonsuz şükran ve teşekkürlerimi sunarım.

Burak TATAR

İÇİNDEKİLER

TEZ KABUL VE ONAYI	i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI	ii
TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT.....	iv
ÖN SÖZ VE TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
TABLOLAR DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Epitelyal Over Kanseri.....	3
2.1.1. Epitelyal Over Kanseri Epidemiyolojisi	3
2.1.2. Epitelyal Over Kanseri Histolojisi ve Genetiği.....	4
2.1.3. Epitelyal Over Kanseri Tanı ve Tedavisi	5
2.2. CXCR4 ve Epitelyal Over Kanseri	7
2.2.1. Kemokin Reseptörleri	7
2.2.2. CXCR4-CXCR7-CXCL12 Yolağı.....	9
2.2.3. Epitelyal Over Kanseri İmmün Yanıt.....	11
2.2.4. EOK’de CXCR4-CXCR7-CXCL12 Yolağı ve İmmünite	13
3. ARAŞTIRMA HİPOTEZİ, AMACI VE HEDEFİ	16
4. MATERYAL VE YÖNTEM.....	17
4.1. Etik Kurul.....	17
4.2. Araştırmanın Evreni.....	17
4.3. İmmünohistokimya	18
4.4. CXCL12 Ekspresyonunun Değerlendirilmesi.....	21
4.4.1. C-X-C Motif Chemokine Ligand 12 (CXCL12) Geninin m RNA Eldesi	21
4.4.2. C-X-C Motif Chemokine Ligand 12 (CXCL12) Geninin mRNA’sından cDNA Eldesi	22
4.4.3. Gerçek Zamanlı Kantitatif PCR (qPCR) ile Gen Ekspresyon Analizi	22
4.5. İstatistik.....	23
5. BULGULAR.....	24
6. TARTIŞMA.....	29
7. SONUÇ	34
KAYNAKLAR	35
EKLER	47
ÖZ GEÇMİŞ.....	48

SİMGELER VE KISALTMALAR

APC	: Antijen sunan hücre
Ca125	: Kanser antijeni 125
CD8	: Farklılaşma kümesi 8 lenfosit
cDNA	: Komplementer deoksiribo nükleik asit
Ct	: Eşik döngü
CXCL12	: Kemokin motif ligand 12CXCR4 : Kemokin motif reseptör 4
CXCR7	: Kemokin motif reseptör 7
EOK	: Epitelyal over kanseri
FFPE	: Formalinle sabitlenmiş parafine gömülü
GAPDH	: gliseraldehid 3-fosfat dehidrogenaz
GPCR	: G proteinine bağlı reseptörler
H&E	: Hemotoksilen ve Eozin
HIF-1 α	: Hipoksi ile indüklenen faktör
HIV	: İnsan bağışıklık yetmezliği virüsü
İHK	: İmmünohistokimya
JAK	: Janus kinaz
mRNA	: Haberci ribo nükleik asit
MHC	: Major histokompatibilite kompleksi
NAKT	: NEO-adjuvan kemoterapi
NK	: Doğal öldürücü hücreler
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
PD-1	: Programlı hücre ölümü proteini 1
PDL-1	: Programlı hücre ölümü proteini ligandı 1
PI3K	: Fosfoinositid 3-kinaz
SEOK	: Seröz epitelyal over kanseri
STAT	: Sinyal iletilici ve transkripsiyon aktivatörü
TAM	: Tümör asosiye makrofajlar
TCR	: T hücre reseptörü
Treg	: T-regülatör hücreler
TCSC	: Dokuya adanmış kök hücreler
Δ	: Delta
TİL	: Tümöre infiltre lenfositler

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. a. Sağ hemi-diyafraıı tutan bir seröz EOK görünümü (Kalın oklar tümöral implantları, ince ok ise ameliyat sahasını görebilmek için bağları kesilmiş ve cerrah tarafından sola çekilmiş karaciğeri göstermektedir) (Burak Tatar, 2023) b. Tüm bağırsak yüzeylerini ve mezenterini tutan inoperabil kabul edilen bir seröz EOK görüntüsü (Burak Tatar, 2023).....	7
Şekil 4.1. A. Yüksek dereceli seröz karsinomun histomorfolojik görünümü (H&E, x200). Tümöre infiltre lenfositlerin (TIL) dağılımı; B. Tümör sınırında minimal lenfosit (skor: 1), C. Tümör adaları ve tümör stroması içinde lenfosit (skor:2), D. Tümör hücreleri ve stroma arasında belirgin yer kaplayan lenfosit (skor:4).....	18
Şekil 4.2. CD8 immünohistokimyası. A. Tümöre infiltre lenfositlerin (TIL) %1-10'unda boyanma (skor: 1), B. TIL'in %10-50'sinde boyanma (skor: 2), C: TIL'in %50'sinden fazlasında boyanma (skor: 3)	19
Şekil 4.3. Anti-SDF-1(CXCL12) immünohistokimyası. A. Fokal zayıf boyanma (skor: 1), B. Yaygın zayıf boyanma (skor: 2), C. Yaygın güçlü boyanma (skor: 3)	20
Şekil 4.4. CXCR4 immünohistokimyası. A. Fokal zayıf boyanma (skor: 1), B. Yaygın zayıf boyanma (skor: 2), C. Yaygın güçlü boyanma (skor: 3).....	20
Şekil 4.5. CXCR7 immünohistokimyası. A. Boyanma yok. B. Fokal zayıf boyanma (skor: 1), C. Yaygın zayıf boyanma (skor: 2), D. Yaygın güçlü boyanma (skor:3).....	21
Şekil 5.1. Tüm vakalar için a) Genel sağkalım b) Progresyonsuz sağkalım.....	24
Şekil 5.2 CD8 + hastalarda a) hastalıksız sağkalım b) genel sağkalım.....	25
Şekil 5.3. İmmünojen tümörler ile immünojen olmayan (immün dışlama ve immün duyarsız) tümörler arasında a) hastalıksız sağkalım b) genel sağkalım.....	26
Şekil 5.4. CXCL12 Δ ct değerinin 0,4 altında ve üstünde olan hastalarda a) genel sağkalım b) hastalıksız sağkalım	28
Şekil 5.5. CXCL12 kat değişiminin (y aksı) ortalama değişimine göre artan TIL miktarının (x aksı) a) CXCR7 ekspresyonuna (İHK) göre dağılımı. B) CXCR4 ekspresyonuna (İHK) göre dağılımı (Yoğun boyanan: yeşil seyrek/negatif boyanan: mavi) (CXCL12 kat değişim değeri ile TIL arasındaki ilişkiyi moderatör olarak CXCR7 ya da CXCR4 ekspresyonu değiştirmemektedir (Her iki durum için $p>0.05$, multivariate logistic regression). CXCR7 ekspresyonu TIL miktarını bağımsız olarak etkilemektedir ($p<0.05$)).	28

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 2.1. Over kanseri evrelemesi (FIGO 2018) (Prat & Oncology, 2014).....	6
Tablo 2.2. CXC, CX3C ve XC Ailelerine ait kemokin reseptörleri, en sık eksprese olan hücre tipleri ve bilinen hastalık ilişkileri (Charo & Ransohoff, 2006).....	8
Tablo 5.1. Tümörde TIL sayısına etki etmesi olası faktörler (binary logistic regression)	25
Tablo 5.2. Tümörde CD8+ T lenfosit sayısına etki etmesi olası faktörler (binary logistic regression).....	25



1. GİRİŞ

Seröz papiller epitelyal over kanseri, dünya genelinde en fazla mortalite oranına sahip jinekolojik kanserdir ve kanserle ilişkili ölümlerde 7. sıradadır (Bray et al., 2018). Epitelyal over kanseri (EOK), tüm over kanseri vakalarının %90-95'ini oluşturur ve tanı anında, vakaların %75'i evre 3 veya 4' tür (Quirk, Natarajan, and Mettlin, 2005). Standart tedavi, görünen tümöral kitlelerin tümünün cerrahi rezeksiyonunu içeren sitoredüktif cerrahiyi takiben platin bazlı kemoterapidir. Cerrahi evreleme sonrası bazı erken evre (Ia ve Ib, Grade 1 ve 2) kanserler hariç, adjuvan kemoterapinin sağkalımı arttırdığı gösterilmiştir ve metastatik epitelyal over kanserinde platin bazlı sistemik çoklu-ajan kemoterapi, standart tedavidir (Stewart and Advanced Ovarian Cancer Trialists, 2000; Young et al., 1990). Son yıllarda paklitakselin de kullanıma girmesi ile platin ve paklitaksel kombinasyonu tercih edilmeye başlanmıştır. Bu kombinasyonun nüksü geciktirdiği ve sağkalımı arttırmadaki üstünlüğü gösterilmiştir.. Başka bir kemoterapotüğün ampirik olarak eklenmesi nükse veya sağkalıma etki etmemektedir (Sarosy et al., 2010).

Hastaların %80'nin kemoterapiye yanıt vermesine rağmen, bu hastaların çoğunda hastalık tekrar eder ve her kemoterapi siklusu sonunda daha dirençli tümörler seçilir. Bu süreç, tümör kemoterapiye hiç cevap vermeyene ya da çok az cevap verene kadar devam etmektedir. Platine dirençli over tümörlerinde tek ajan kemoterpisi uygulanmaktadır. Maalesef, bu kemoterpiye yanıt genel olarak %30'un altındadır ve herhangi bir ajanın diğerine üstünlüğü net olarak gösterilememiştir ve hastaların sadece %40'tan azı 5 yıl hayatta kalabilir (Bast, Hennessy, and Mills, 2009).

Son yıllarda birçok tümörde artan oranda immünoterapi ajanlarının kullanılmasına rağmen, EOK'de bu ajanların belirgin bir etkisi bulunmamaktadır. İmmünoterapinin daha etkili olduğu tümörler genellikle yüksek mutasyon yüküne ve dolayısıyla daha yüksek immünojeniteye sahiptir. Örneğin, melanom ve akciğer kanseri gibi tümörler genellikle yüksek mutasyon yüküne sahiptir ve bu da geniş bir antijen yelpazesinin sunulmasına ve güçlü bir T hücre yanıtının uyarılmasına olanak sağlar (Rizvi et al., 2015; Snyder et al., 2014). Bu nedenle bu tümörlerde, güncel immünoterapi yaklaşımı olan immün kontrol noktalarının inhibisyonu genellikle daha etkili olabilmektedir. EOK'deki bu etki kısıtlılığında tümör mikroçevresinin indüklediği immün-baskılamının da etkili olduğu düşünülmektedir. EOK, tümöre yönelik immün yanıtı göre aktive ya da inhibe olarak iki gruba ayrılabilir (Zhang et

al., 2003). Hastaların %45'inde tümör infiltre eden lenfosit (TIL) negatif, %55'inde ise TIL pozitif bulunmuştur. TIL pozitif olan hastalarda daha uzun hastalıksız sağ kalım ve genel sağ kalım gösterilmiştir (Zhang et al., 2003).

Kemokin reseptörlerinden CXCR4 ve bu reseptörün ligandı olan CXCL12 (SDF-1)'ye, kanser kemotaksisi, progresyon ve metastaz açısından son zamanlarda daha çok dikkat edilmektedir. CXCL12'nin CXCR4 üzerinden sinyalizasyonu, 20'den fazla malignitede primer tümör büyümesini ve metastazı tetiklemektedir. CXCL12, kanser hücrelerinde CXCR4'ü aktive eder, doğrudan proliferasyonu artırır, tümör büyümesini artırarak anjiyogenez artışı ve immünosupresif bir tümör mikroçevresi oluşturur (Smith et al., 2004; Zou et al., 2001). EOK'de, CXCR4'ün metastatik dokularda ifadesi artmıştır (Jiang, Wu, Shi, Wu, and Yin, 2006; Orimo et al., 2005). Bu çalışma başladıktan sonra yayınlanan bir çalışmada ise EOK hastalarında CXCL12 ifadesi daha az hastalıksız sağkalımla ilişkili bulunmuştur (D'Alterio et al., 2022). Başka bir çalışmada da CXCL12'nin bağımsız olarak kötü sağkalımı öngördüğü gösterilmiştir ve hastaların %20'sinde yüksek seviyede eksprese edildiği görülmüştür (Popple et al., 2012). CXCL12'nin tümör yatağında bulunması, immün baskılayıcı CXCR4⁺ Treg ve plazmasitoid dendritik hücrelerin (pDC) tümör çoğaltıcı etkisini artırır (Zou, 2005; Zou et al., 2001). CXCL12-CXCR4'ün ve immünoterapide sıklıkla kullanılan PD-1(programmed cell death protein 1)–PD-L1'in beraber blokajı, yapılan bir çalışmada tek blokaja göre tümör büyümesini daha etkili kontrol etmiş ve sağkalımı arttırmıştır (Zeng et al., 2019).

Araştırmanın amacı, EOK, TIL ve CD8 boyanmasına göre immünojenik ve immünojenik olmayan olarak sınıflandırılıp, bu gruplarda CXCR4 kemokin yolağının aktivitesini incelemektir. CXCL12 ifadesinin prognostik öneminin olup olmadığı, yine CXCL12 ifadesine tümör mikro çevresinde (TMÇ) CXCR4 ve CXCR7'nin etki edip etmediği analiz etmektir. Ayrıca, TIL sayısı ile CXCR4 yolağının ilişkisinin nedenselliğinin de incelenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Epitelyal Over Kanseri

2.1.1. Epitelyal Over Kanseri Epidemiyolojisi

Over kanseri genellikle, peritoneal yüzeyler, fallop tüpleri ve overden (Mülleryan kompartman) kaynaklanan kanserleri ifade etmek için kullanılan bir ifadedir. Genetik mutasyonlar, ailede over kanserli birey/bireylerin olması, doğurganlık, emzirme, erken menarş, geç menopoz, hormon yerine koyma tedavisi, oral kontraseptif kullanımı ve endometriozis over kanseri gelişiminde risk faktörleri olarak düşünülmektedir. Over kanserlerinin geniş bir yelpazesi vardır ve bunlar farklı histolojik tipler, hücre tipleri ve biyolojik davranışlar temelinde sınıflandırılır. En yaygın sınıflandırma sistemi, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından kullanılan ve tümörün köken aldığı hücrelere dayalıdır: yüzeyel epitelyal tümörler, germ hücreli tümörler ve stromal tümörler. Epitelyal over kanserleri, en yaygın tip olup, tüm over kanserlerinin yaklaşık %90'ını oluşturur (Bray et al., 2018).

EOK'ler daha da alt tiplere ayrılır: yüksek dereceli seröz, düşük dereceli seröz, müsinöz, endometrioid, berrak hücreli ve tranzisyonel hücre (Brenner) tümörler (Prat and Oncology, 2014). EOK'nin tüm histolojik alt tipleri için tek bir etiyolojiden bahsedilmesi doğru olmayabilir. Örneğin, yukarıda bahsedilen reproduktif ve hormonal risk faktörleri genellikle berrak hücreli ve endometrioid alt tiplere aittir (Wentzensen et al., 2016). Daha önce over yüzeyindeki çöломik epitelden veya over içerisindeki kistlerinden türediği düşünülse de çoğu seröz karsinomun fallop tüplerinden kaynaklandığı gösterilmiştir, diğer alt tipler (berrak hücreli, endometrioid) ise endometriozis gibi farklı lezyonlardan türeyebilmektedir (Labidi-Galy et al., 2017).

EOK, dünya çapında kadınlar arasında beşinci en ölümcül kanserdir, en yüksek mortalite oranına sahip jinekolojik kanserdir. Ayrıca, EOK en yüksek ölüm oranına sahip jinekolojik kanser türüdür (Bray et al., 2018; Reid, Permuth, and Sellers, 2017). Kanserle ilişkili ölümlerde 7. sıradadır ve kadınlarda görülen over kanserlerinin %90'ından fazlasını oluşturur (Bray et al., 2018). EOK'ların %70'inden fazlası teşhis anında ileri evrede bulunur, bu nedenle prognozu genellikle kötüdür ve genel 5 yıllık sağkalım oranı %45'ten azdır (P. M. Webb and Jordan, 2017).

2.1.2. Epitelyal Over Kanseri Histolojisi ve Genetiği

EOK'nin farklı alt tiplerinin genetik altyapıları da farklıdır. Bu alt tiplerin ayırt edici en sık görülen mutasyonları şu şekildedir:

- Seröz tümörler: EOK'ların en yaygın formudur ve genellikle *TP53* geni mutasyonlarıyla ilişkilidir ve histolojik olarak, bu tümörler genellikle papiller, psammomatöz veya solid özellikler gösterir ve yüksek nükleer atipi ve mitotik aktivite ile karakterize edilir (Cancer Genome Atlas Research, 2011).
- Müsinöz tümörler: Bu tümörler daha nadirdir ve genellikle multiloküler kistler şeklinde bulunurlar ve müsin üretimi ile karakterizedir. Genellikle *KRAS* ve *BRAF* genlerindeki mutasyonlarla ilişkilidir (Gemignani et al., 2003).
- Endometrioid tümörler: Genellikle *PTEN*, *KRAS* ve *β -catenin* genlerindeki mutasyonlarla ilişkilidir. Görünüm olarak endometriyal karsinomlara benzer ve genellikle glandüler yapılar ve çizgili çekirdekler ile karakterizelerdir (McConechy et al., 2014).
- Berrak hücreli tümörler: Solid, tübüler veya papiller alanlar ve karakteristik "hobnail" hücreleri ile karakterize edilir. Genellikle *ARID1A* gen mutasyonlarıyla ilişkilidirler (Wiegand et al., 2010).
- Tranzisyonel hücre (Brenner) tümörler: Bu tümörler nadirdir ve genellikle benign veya düşük malign potansiyellidir. Genellikle *KRAS* mutasyonu ile ilişkililerdir (Tafe et al., 2016).

Yüksek dereceli seröz EOK, EOK'nin en yaygın alt tipidir ve genetik alt yapısı diğer alt tiplerden belirgin şekilde farklıdır. En sık rastlanan genetik değişiklik, *TP53* genindeki mutasyonlardır. *TP53* geni, hücre döngüsünü düzenleyen ve DNA hasarına yanıt veren p53 proteinini kodlar. *TP53* genindeki mutasyonlar neredeyse tüm yüksek dereceli seröz EOK vakalarında bulunur ve genellikle hastalığın erken evrelerinde ortaya çıkar (Ahmed et al., 2010). *BRCA1* veya *BRCA2*, over kanseri hastalarında en sık tanımlanan herediter mutasyondur (%14 ila %18), ardından Lynch sendromu ile bağlantılı genlerde (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*) mutasyonlar gelir (Alsop et al., 2012; Norquist et al., 2016).

2.1.3. Epitelyal Over Kanseri Tanı ve Tedavisi

Hastalar genellikle karın şişliği, karın ağrısı, dispepsi gibi özgül olmayan şikayetlerle başvurmaktadırlar. EOK, overlerin benign neoplazmlarından ve fonksiyonel kistlerinden ayrılmalıdır. Pelvik inflamatuvar hastalık, endometriozis ve saplı uterin leiomyomalar gibi üreme sisteminin çeşitli benign durumları EOK'yi taklit edebilir. EOK teşhisinde CA125 ve transvajinal ultrasonografi, bu konuda sıkça kullanılan araçlar olsa da bu testlerin duyarlılık ve özgüllüklerinin ideal olmadığı gösterilmiştir (Olivier, Lubsen-Brandsma, Verhoef, and van Beurden, 2006).

Preoperatif değerlendirmede, overe metastaz yapan diğer primer kanserler dışlanmalıdır. EOK, hücrelerin peritoneal boşluğa eksfoliyasyonu, lenfatik yayılım ve hematojen yayılım ile yayılabilir. Seröz EOK için bu yayılım tipi genellikle eksfoliyasyondur ve hücreler genellikle peritoneal sıvının dolaşım yolunu izler. Seröz "over" kanserinin kökeni olarak, fallop tüplerinde belirlenen bir öncül lezyon olan seröz tubal intraepitelyal karsinom (STIC) bulunmuştur (Kuhn et al., 2012). Artık çoğu seröz "over" kanserinin fallop tüpünde STIC olarak başladığına inanılmaktadır ve TP53 mutasyonu bu lezyonlar için öncü kabul edilmektedir (Kuhn et al., 2012). Seröz over, fallop tüpü ve peritoneal kanserin yayılım şekilleri, malign hücrelerin peritoneal boşluğa dökülme eğilimleri nedeniyle klinik olarak ayırt edilemez ve hastaların hayatta kalma süreleri çok benzerdir ve bu tümörler genellikle aynı şekilde tedavi edilirler. Sıvı, solunum gibi doğal vücut hareketlerinin sağladığı güçle tümörlerin başladığı pelvisten, özellikle sağdaki çıkan kolonun yanındaki parakolik oluklardan yukarıya, intestinal mezenter ve sağ hemi-diyafraqmaya hareket eder ve bu bölgelerde akımın yavaşlaması ile implante olurlar (Şekil 2-1.a). Hastalık nadiren intestinal lümene ve bağırsak mezenterine invaze olur (Şekil 2-1. b) ve sonrasında tedrici olarak bağırsakları aglütine eder ve intestinal tıkanıklığa yol açar. Bu duruma karsinomatöz ileusu adı verilir ve EOK'den ölümün en sık nedenidir (Lorente et al., 2015).

EOK tanısı, tercihen bir jinekolojik onkoloji cerrahisi uzmanı tarafından, ameliyat esnasında, tümörlü dokunun hızlı patolojik incelemeye gönderilmesi sonucunda konulur. Ameliyata eksploratif laparotomi veya laparoskopi gibi minimal invaziv bir teknik ile başlanabilir. EOK ameliyat esnasında tanısı konulduğu zaman, aynı seansta gözle görülür tüm tümörlü dokuların çıkarıldığı sitoredüktif cerrahi uygulanabilmektedir. Seröz EOK, genellikle Evre 3 ya da 4'te karşımıza çıkmaktadır

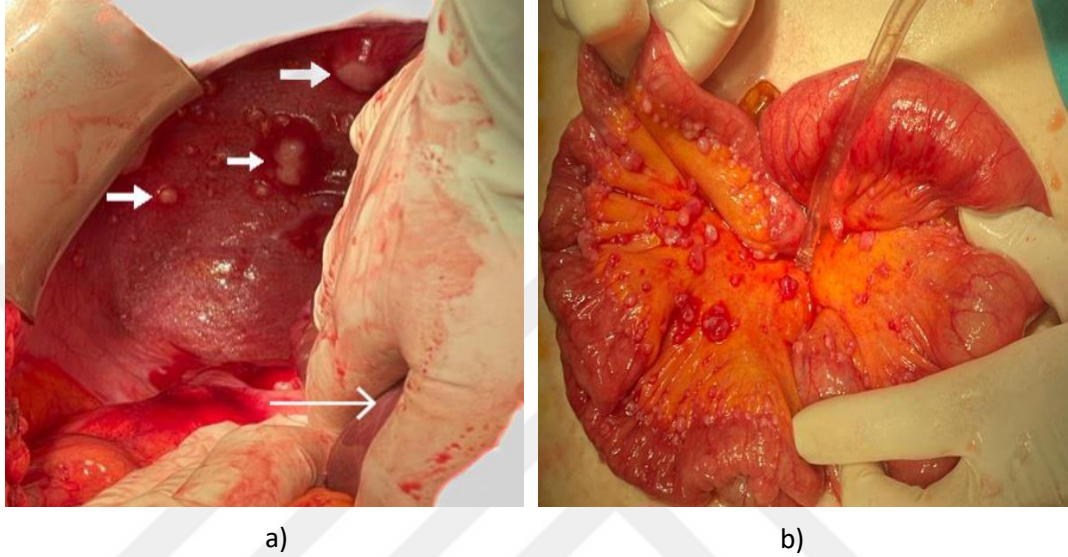
(Berek, Kehoe, Kumar, and Friedlander, 2018). Over kanserinin cerrahi evrelemesi Tablo 2.1’de gösterilmiştir.

Tablo 0.1. Over kanseri evrelemesi (FIGO 2018) (Prat and Oncology, 2014)

Evre	Açıklama
IA	Tümör 1 overe (kapsül bütün) veya fallop tüpüne sınırlı; over veya fallop tüpü yüzeyinde tümör yok; asit veya peritoneal yıkamalarda malign hücre yok (T1a-N0-M0)
IB	Tümör her iki overe (kapsüller bütün) veya fallop tüplerine sınırlı; over veya fallop tüpü yüzeyinde tümör yok; asit veya peritoneal yıkamalarda malign hücre yok (T1b-N0-M0)
IC	Tümör 1 veya her iki overe veya fallop tüpüne sınırlı, aşağıdakilerden herhangi biri ile: IC1: Cerrahi sırasında sızıntı (T1c1-N0-M0); IC2: Cerrahi öncesi kapsül patlamış veya over veya fallop tüpü yüzeyinde tümör (T1c2-N0-M0); IC3: Asit veya peritoneal yıkamalarda malign hücreler (T1c3-N0-M0)
II	Tümör 1 veya her iki over veya fallop tüplerini içerir ve pelvik genişlemeye (pelvik çıkıntının altında) veya peritoneal kansere neden olur (T2-N0-M0)
IIA	Rahim ve/veya fallop tüpleri ve/veya overlere uzanma ve/veya implantlar (T2a-N0-M0)
IIB	Diğer pelvik intraperitoneal dokulara uzanma (T2b-N0-M0)
III	Tümör 1 veya her iki over veya fallop tüplerini içerir veya peritoneal kanser, sitolojik veya histolojik olarak onaylanmış pelvis dışındaki periton yayılımı ve/veya retroperitoneal lenf nodlarına metastaz ile (T1/T2-N1-M0)
IIIA1	Yalnızca pozitif retroperitoneal lenf nodları (sitolojik veya histolojik olarak kanıtlanmış): IIIA1(i) Metastaz en büyük boyutta 10 mm'ye kadar; IIIA1(ii) Metastaz en büyük boyutta 10 mm'den fazla
IIIA2	Retroperitoneal lenf nodlarıyla veya olmaksızın mikroskobik ekstrapelvik (pelvik çıkıntının üzerinde) peritoneal etkilenme (T3a2-N0/N1-M0)
IIIB	Pelvik dışı makroskopik peritoneal metastaz, en büyük boyutta 2 cm'ye kadar, retroperitoneal lenf nodlarına metastaz olup olmamasıyla birlikte (T3b-N0/N1-M0)
IIIC	Pelvik dışı makroskopik peritoneal metastaz, en büyük boyutta 2 cm'den fazla, retroperitoneal lenf nodlarına metastaz olup olmamasıyla birlikte (karaciğer ve dalak kapsülüne tümör yayılımını içerir, her iki organın parankimal tutulumu olmadan) (T3c-N0/N1-M0)
IV	Peritoneal metastazlar hariç uzak metastaz
IVA	Pozitif sitoloji ile plevral efüzyon
IVB	Parankimal metastazlar ve ekstra-abdominal organlara metastazlar (inguinal lenf nodları ve karın boşluğu dışındaki lenf nodları dahil)

İleri evre, başlangıçta cerrahi olarak rezeke edilemeyecek tümörlere platin bazlı kemoterapiden (karboplatin ve paklitaksel) oluşan neo-adjuvan kemoterapi (NAKT) başlanır ve kemoterapi cevabına göre -genellikle 3 kür sonrasında- interval sitoredüktif cerrahi uygulanır. NAKT'ye hastaların yanıtı, genellikle RECIST (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors) kriterleri ile değerlendirilir (Bogani et al., 2019). Bu kriterlere göre, tümör yanıtı tam yanıt, kısmi yanıt, stabil hastalık ve progresif hastalık olarak sınıflandırılır. Bu değerlendirmeler, tümör boyutlarının belirlenmesi ve karşılaştırılmasına dayanır. Yeterli yanıt alınamayan hastalar opere edilmeyip platin

dışı ikinci sıra kemoterapötikler kullanılır. Platin bazlı ajanlara yanıt, hastaların sağkalımını büyük ölçüde etkiler. Hastalar genellikle platin direnci veya platin refrakter durumlarında daha kötü prognoza sahiptir. Platin refrakter hastalar, platin bazlı tedavi sırasında veya sonrasındaki 4 hafta içinde hastalığı ilerleyen hastaları tanımlar. Platin dirençli hastalar, platin bazlı tedavi tamamlandıktan sonra 6 ay içinde hastalığı ilerleyen hastalar olarak tanımlanırlar (Oronsky et al., 2017).



Şekil 0.1. a. Sağ hemi-diyaframı tutan bir seröz EOK görünümü (Kalın oklar tümöral implantları, ince ok ise ameliyat sahasını görebilmek için bağları kesilmiş ve cerrah tarafından sola çekilmiş karaciğeri göstermektedir) (Burak Tatar, 2023) b. Tüm bağırsak yüzeylerini ve mezenterini tutan inoperabil kabul edilen bir seröz EOK görüntüsü (Burak Tatar, 2023)

2.2. CXCR4 ve Epitelyal Over Kanseri

2.2.1. Kemokin Reseptörleri

C-X-C veya kemokin ailesi, tek bir amino asit ile ayrılmış bir çift sistein kalıntısı ile karakterize edilir ve genellikle dokular arasındaki hücre trafiğini düzenlerler (Baggiolini, 1998). Kemokinler, amino uç yakınındaki iki sistein kalıntısının düzenine dayanarak dört aileye (CC, CXC, CX3C ve XC) ayrılabilir (C sistein ve X amino asidi temsil eder; X3 üç ardışık amino asidi ifade eder). Kemokin reseptörleri genellikle G proteinine bağlı reseptörler (GPCR'ler) olup, yedi transmembran alfa heliks ve altı loop (üçü hücre dışı ve üçü hücre içi) içerir; N-terminus hücre dışında ve C-terminus sitoplazmada bulunur (Bachelier et al., 2014). Bir kemokin bağlandığında, reseptörün intraselüler bölümü bir G proteini ile etkileşime girer. Bu etkileşim, hücre içi sinyal yollarını aktive eder ve hücre göçünü, hücre proliferasyonunu ve diğer önemli hücresel yanıtları başlatır. Kemokinler ve kemokin

reseptörleri arasındaki iletişim karmaşıktır: birçok kemokin birden fazla reseptöre bağlanabilir ve kemokin reseptörleri birden fazla kemokine bağlanabilir (D'Agostino, Cecchinato, and Uguccioni, 2018). Genel olarak, CC reseptörleri CXC reseptörlerinden daha az seçicidir (New and Wong, 2003). Bugüne kadar en az 20 kemokin reseptörü (CCR1-11, CXCR1-7, XCR1 ve CX3CR1) tanımlanmıştır.

Kemokin reseptörleri, vücudun çeşitli hücre türlerini yönlendiren ve harekete geçiren proteinler olan kemokinlerin hedefi olan bir protein ailesidir. Kemokin reseptörleri, hücreSEL göçü, adezyonu, büyümeyi, bağışıklığı ve embriyonik gelişmeyi düzenler. Bu reseptörler, çoğunlukla lökositler olmak üzere birçok hücre tipi üzerinde bulunur ve bu hücrelerin enflamasyon bölgelerine veya lenfoid doku gibi belirli anatomik bölgelere göç etmesini sağlar (Mellado, Rodriguez-Frade, Manes, and Martinez, 2001; Nomenclature, 2003). Kemokin reseptörleri ve kemokinler, enfeksiyon, otoimmün hastalıklar ve kanser gibi bir dizi hastalıkta önemli bir rol oynarlar. Kemokin reseptörlerinin inhibisyonu, çeşitli immünolojik ve inflamatuvar hastalıkların tedavisi için hedeflenebilir ve bu durum, kemokin reseptörlerini ilaç hedefi olarak cazip kılar (Mollica Poeta, Massara, Capucetti, and Bonecchi, 2019). Tablo 2.2'de CXC, CX3C ve XC Ailelerine ait kemokin reseptörleri, en sık eksprese olan hücre tipleri ve bilinen hastalık ilişkileri gösterilmiştir (Charo and Ransohoff, 2006).

Kemokinlerin ve kemokin reseptörlerinin belki de en önemli rollerinden biri metastazı düzenlemeleridir. Kemokin reseptörlerinin potansiyel olarak metastazın anahtar aşamalarında rol oynadığı düşünülmektedir: tümör hücrelerinin endotelyuma yapışması, kan damarlarından dışarı çıkması, metastatik kolonizasyon, anjiyogenez, proliferasyon, ERK/MAPK, PI-3K/Akt/mTOR veya Janus Kinaz (JAK)/sinyal iletim ve transkripsiyon aktivasyonu (STAT) gibi hayatta kalma yollarının aktivasyonu aracılığıyla immün yanıtı kaçabilir (Keeley, Mehrad, and Strieter, 2010; Kruizinga et al., 2009) . Ek olarak, kemokinlerin, kanser hücreleri ile TMÇ'deki hücreler (endotelial hücreler, fibroblastlar) arasındaki iletişimi sağlamada önemli bir rol oynadığı giderek daha çok fark edilmektedir. Ayrıca TMÇ içinde nötrofillerin ve tümör ile ilişkili makrofajların (TAM'ler) infiltrasyonunu ve aktivasyonunu uyarırlar (Allinen et al., 2004).

Tablo 0.2. CXC, CX3C ve XC Ailelerine ait kemokin reseptörleri, en sık eksprese olan hücre tipleri ve bilinen hastalık ilişkileri (Charo and Ransohoff, 2006)

Reseptör	Kemokin Ligandları	Hücre Tipleri	Hastalık Bağlantısı
CXCR1	CXCL8 (interleukin-8), CXCL6 (GCP2)	Nötrofiller, monositler	İnflamatuvar akciğer hastalığı, KOAH
CXCR2	CXCL7, CXCL1 (GROa), CXCL2 (GROB), CXCL3 (GROY), CXCL5 (ENA-78), CXCL6	Nötrofiller, monositler, damar endotelial hücreler	İnflamatuvar akciğer hastalığı, KOAH, tümör büyümesi için anjiyojenik
CXCR3-A	CXCL9 (MIG), CXCL10 (IP-10), CXCL11 (I-TAC)	Tip 1 yardımcı hücreler, mast hücreleri, mezengiyal hücreler	İnflamatuvar deri hastalığı, multipl skleroz, transplant reddi
CXCR3-B	CXCL4 (PF4), CXCL9 (MIG), CXCL10 (IP-10), CXCL11 (I-TAC)	Mikro damar endotelial hücreler, neoplastik hücreler	Tümör büyümesi için anjiyostatik
CXCR4	CXCL12 (SDF-1)	Genişçe ifade edilmiştir	HIV-1 ko-reseptörü (T-hücre-tropik), tümör metastazları, hematopoez
CXCR5	CXCL13 (BCA-1)	B hücreleri, foliküler yardımcı T hücreleri	B hücreli folikül oluşumu
CXCR6	CXCL16 (SR-PSOX)	CD8+ T hücreleri, doğal öldürücü hücreler ve bellek CD4+ T hücreleri	İnflamatuvar karaciğer hastalığı, ateroskleroz (CXCL16)
CXCR1	CX3CL1 (fraktalkin)	Makrofajlar, endotelial hücreler, düz kas hücreleri	Ateroskleroz
XCR1	XCL1 (lenfotaktin), XCL2	T hücreleri, doğal öldürücü hücreler	Romatoid artrit, IgA nefropatisi, tümör yanıtı

2.2.2. CXCR4-CXCR7-CXCL12 Yolağı

CXCR4, CXCL12 – SDF-1 (Stromal cell-derived factor 1) olarak da bilinir- için reseptördür (Bleul, Fuhlbrigge, Casasnovas, Aiuti, and Springer, 1996). CXCR4, başlangıçta bir orfan kemokin reseptörü olarak klonlanmış ve LESTR veya fusin olarak bilinen G-protein-bağılı yedi transmembran reseptörüdür (Bleul, Wu, Hoxie, Springer, and Mackay, 1997). CXCR4, tüm B hücreleri dahil çoğu lökositin hücre yüzeyinde, monositler ve çoğu T lenfosit alt grubu üzerinde eksprese edilir, ancak NK hücrelerinde zayıf bir şekilde ifade edilir. CXCR4, insan bağışıklık yetmezliği virüsü (HIV)'in CD4 + T hücrelerini enfekte etmek için kullanabileceği birkaç kemokin ko-reseptöründen biridir (Bleul et al., 1997). CXCR4 kullanan HIV izolatları geleneksel olarak T hücresi-tropik izolatları olarak bilinir. Tipik olarak, bu virüsler enfeksiyonda geç olarak bulunur. CXCR4 kullanan HIV'in ortaya çıkmasının bağışıklık yetmezliğinin bir sonucu mu yoksa nedeni mi olduğu belirsizdir.

CXCL12, farklı doku tiplerinde yaygın bir şekilde ifade edilir, ayrıca olgunlaşmamış ve olgun hematopoetik hücreler için güçlü bir kemotaktik ajan olarak işlev görür (Secchiero et al., 2000; Wright et al., 2005). CXCL12'nin hematopoetik kök hücrelerin kemik iliğine yerleşmesinde ve progenitör hücrelerin hayatta kalmasında ve proliferasyonlarını düzenlemede önemli bir rol oynadığı tespit edilmiştir (Gillette, Larochelle, Dunbar, and Lippincott-Schwartz, 2009; Kyriakou, Rabin, Pizzey, Nathwani, and Yong, 2008). 10q11 kromozomunda yer alan *CXCL12* geni, 6 alternatif kesil varyantını kodlar (Janssens, Struyf, and Proost, 2018). CXCL12'nin iki ana izoformu, α ve β vardır ve her ikisi de tek bir gen tarafından üretilirken, CXCL12 β , alternatif kesilim sonucunda C-terminal ucunda dört ek amino asit ile farklılaşır (Dettin et al., 2004). CXCL12 α , kemik iliği stromal hücreleri ve endotelial hücreler tarafından salgılanan baskın izoformdur ve neredeyse tüm organlarda bulunur. Alfa izoformunun salgılanması doku hasarını artırabilir, ancak kan dolaşımı içinde hızla proteolize olur (Janowski, 2009). Buna karşın, β -izoformu bozunmaya daha dirençlidir, anjiyogenezi uyarır ve karaciğer, dalak ve böbrekler gibi damarlanması yüksek organlarda bulunur (Janowski, 2009). CXCL12'nin yaralanmış dokuların içinde veya etrafında salgılanması, dolaşımdaki endotelial kök hücrelerin çağırılması ve etkilenen dokuya yerleşmesini kolaylaştıran kritik bir olaydır (Kucia et al., 2006). Sonuç olarak, bu süreç organ rejenerasyonu veya doku onarımı ile sonuçlanır. Ayrıca, CXCL12 promotörü, iki HIF-1 α (Hipoksi ile İndüklenen Faktör) bağlama bölgesi içerir ve CXCL12 ifadesi, HIF-1 α ifade eden endotel hücrelerinde artar. Hipoksik veya hasar görmüş dokularda HIF-1 α ifadesinin yükselmesi, CXCL12 seviyelerinin yükselmesine ve doku rejenerasyonuna katılan CXCR4⁺ dokuya adanmış kök hücrelerin (TCSC'lerin) kemotaksi etkisiyle çekilmesine yol açar (Ceradini et al., 2004).

CXCR4 ve CXCL12'ye, kanser kemotaksisi, progresyon ve metastaz açısından son zamanlarda daha çok dikkat edilmektedir. SHH-GLI1-NANOG ağında, Janus JAK/ STAT, fosfoinositid 3-kinaz (PI3K)/AKT ve NF-K β 57 yollarında rol oynar (Hinton, Avraham, and Avraham, 2010; Peng et al., 2005; Soldevila et al., 2004; Vila-Coro et al., 1999). Böylece CXCL12/CXCR4 sinyali, MAPK aktivasyonu sağlar ve bu kemotaksi ve hücre proliferasyonunu artırır (Janssens et al., 2018). Ayrıca, CXCL12'nin CXCR4 ile bağlanması β -arrestini indükler ve bu diğer sinyal yollarını bloke edebilir. Bu durum reseptör ile CXCL12'nin internalizasyonunu ve

parçalanmasını başlatabilir, ancak aynı zamanda p38 MAPK sinyallemesini doğrudan aktive ederek CXCR4-aracılı kemotaksiyi daha da arttırabilir (Janssens et al., 2018).

CXCL12-CXCR4 etkileşimi eskiden (diğer kemokinlerden ve reseptörlerinden farklı olarak) özgül olarak kabul edilmişti, ancak son zamanlarda CXCR7'nin de (ACKR3 olarak da adlandırılmakta) CXCL12'yi bağlayabileceği öne sürülmüştür (Balabanian et al., 2005). Bazı araştırmalar, reseptörün ligand bağlanmasını takiben sinyal oluşturduğunu iddia ederken, zebra balığı ile ilgili bulgular CXCR7'nin öncelikle CXCL12'yi sekestre ederek işlev gösterdiğini düşündürmektedir (Naumann et al., 2010). Ek olarak, CXCR7'nin IL-8 ve VEGF gibi proanjiyopoetik faktörlerin ifadesini artırdığı görülmüştür (Wang et al., 2008). CXCR7'nin prostat kanserinde tümör büyümesini uyardığı ve neo-vaskülarizasyonu arttırdığı görülmüştür (Wang et al., 2008). Meme kanserinde de CXCR7 aktivasyonu akciğer ve beyin metastazlarını arttırdığı görülmüştür (Miao et al., 2007; Salmaggi et al., 2009). Diğer taraftan da bazı tümörlerde CXCR7 ifadesi, daha iyi prognozla ilişkili bulunmuştur (Marechal et al., 2009; Moreno et al., 2018).

2.2.3. Epitelyal Over Kanserinde İmmün Yanıt

İmmün yanıt ve kanser hücrelerinin etkileşimi, birçok biyolojik ve moleküler süreci içerir. Kanser hücreleri ve immün sistemin saldırı ve savunma mekanizmaları arasındaki karmaşık dinamikler, kanser immünolojisinin temelini oluşturur. Reseptörler ve moleküler mekanizmalar bu süreçlerin çoğunda kritik rol oynar.

İmmün sistem ve kanser hücreleri arasındaki etkileşimin merkezinde, tümör hücrelerinin yüzeyinde bulunan ve T hücrelerinin tanıdığı özgül moleküller bulunur. Antijen sunan hücreler (APC'ler), özellikle dendritik hücreler, makrofajlar ve B hücreleri, çevrelerindeki patojenlerden ve hücrelerden antijenleri alır, işler ve MHC (major histocompatibility complex) molekülleri aracılığıyla sunarlar APC'ler tarafından sunulan bu antijenler, T hücre reseptörlerine (TCR) bağlanır ve T hücrelerinin aktivasyonunu tetikler. Her TCR, belirli bir peptid-MHC molekülüne özgüdür. MHC sınıf I molekülleri genellikle endojen antijenler (örneğin, viral veya tümör antijenleri) sunarlar ve sitotoksik T hücreleri (CD8+ T hücreleri) tarafından tanınırlar. MHC sınıf II molekülleri, eksojen antijenler (örneğin, bakteriyel proteinler) sunarlar ve yardımcı T hücreleri (CD4+ T hücreleri) tarafından tanınırlar (Germain, 2002). TCR ve peptid-MHC kompleksi arasındaki etkileşim, T hücrelerinin

aktivasyonunu tetikler. Ancak, bu etkileşim genellikle yetersizdir ve tam aktivasyon için ko-stimülatör moleküllerin de gerekliliği vurgulanmıştır. En bilinen ko-stimülatör molekül CD28'dir, bu molekül T hücrelerinde bulunur ve APC'lerin yüzeyinde bulunan B7 molekülleriyle etkileşime girer (Sharpe and Freeman, 2002). Bununla beraber tümör hücreleri genellikle immün sistemi kandırmak için bir dizi strateji geliştirir. Örneğin, bazı tümör hücreleri MHC sınıf I moleküllerinin ifadesini azaltarak T hücrelerinin tanınmasını ve saldırısını engeller. Diğer taktikler arasında immüsupresif moleküllerin salınması ve immün kontrol noktalarının manipülasyonu bulunur (Dunn, Bruce, Ikeda, Old, and Schreiber, 2002). Ayrıca PD-1 ve onun ligandı PD-L1'in kanser immünolojisi üzerindeki etkileri de önemlidir. PD-L1, birçok tümör hücresi üzerinde ifade edilir ve PD-1 ile etkileşime girerek, T hücrelerinin aktivasyonunu inhibe eder ve böylece tümörün immün yanıtı karşı korunmasına yardımcı olur (D. S. Chen and Mellman, 2013). Over kanseri, immün sistemin bir ölçüde tümörü tanıyıp infiltre ettiği immün yanıt aktive ya da inhibe olarak iki gruba da ayrılabilir. EOK'de hastaların %45'i TIL negatif, %55'inde hastada ise TIL pozitif bulunmuştur. TIL pozitif olan hastalarda daha uzun hastalıksız sağkalım ve genel sağkalım gösterilmiştir (Zhang et al., 2003). Bin sekiz yüz on beş hastada yapılan bir meta-analizde ise düşük CD3+ ve CD8+ hücrelerin olması kısa sağ kalımla ilişkilidir (Hwang, Adams, Tahirovic, Hagemann, and Coukos, 2012). CD8+ tümöre infiltre eden lenfositlerin yoğun olması ve yüksek CD8+/T reg hücre oranı, yumurtalık kanserinde daha iyi prognoz ile ilişkilidir (Sato et al., 2005). İmmünojenik olmayan tümörler de immün dışlama ve immün duyarsız olarak iki alt kategoriye ayrılabilir. İmmün dışlama durumunda T hücreler tümörü tanımakta ama bir şekilde tümöre saldırılamamakta ya da mikroçevresinin içine girememektedir. İmmün duyarsız tümörlerde ise T hücreleri hiçbir şekilde tümöral dokuyu tınamamaktadır.

Başlangıçta cerrahi olarak rezeke edilemeyen EOK'de 2 ya da 3 siklus kombinasyon kemoterapisinden oluşan neo-adjuvan kemoterapi kullanılmaktadır ve sonrasında opere edilebilir boyuta gelen tümör ya da iyileşen hasta performansı sonrasında tümör rezeke edilmektedir. Neo-adjuvan kemoterapi sonrası hücre ölümü ile tümör antijenlerinin salınımını arttırdığı, böylece TIL sayısını ve PD-L1 ifadesini arttırdığı gösterilmiştir (Mesnage et al., 2017). Neo-adjuvan kemoterapiye iyi cevap verenlerde ise bağışıklık baskılayıcı Treg hücre sayısı azalmaktadır ve böylece immün yanıt baskılanması azalmaktadır (Bohm et al., 2016).

2.2.4. EOK'de CXCR4-CXCR7-CXCL12 Yolağı ve İmmünite

Sitotoksik kemoterapinin yan etkileri, özellikle nüks tümörlerde etkinliği azaldığında daha çok sorgulanmaktadır. Hedefe yönelik tedavi, kanser hücresinde olan ve sağlıklı hücrelerde olmayan yolakları etkilemelidir ve teorik olarak sağlıklı hücrelere zarar vermeden kanser hücrelerini öldürmelidir. Günümüzde, hedefe yönelik tedaviler kanser tedavisinde önemli bir yeri olmakla beraber, henüz küratif bir seçenek olmaktan uzaktırlar. Bu bağlamda yeni tedavilerin geliştirilmesi gerekmektedir. Çeşitli kanser türlerindeki başarılı sonuçlarına rağmen, EOK'de immünoterapi ajanlarının belirgin bir etkisi bulunmamaktadır (Mantia-Smaldone, Corr, and Chu, 2012). Bu etki kısıtlılığında tümör mikro çevresinin indüklediği immün-baskılamının etkili olduğu düşünülmektedir (Conrad et al., 2012).

Kemokin reseptörleri, esas olarak nötrofiller için kemo-çekici maddeler olarak işlev görür. CXCL12'nin (SDF-1) T hücreleri ve monositler için güçlü bir kemo-çekici olarak işlev gördüğü, ancak nötrofiller için işlev göstermediği gösterilmiştir (Janssens et al., 2018). CXCL12, farelerde beyin, timus, kalp, akciğer, karaciğer, böbrek, dalak ve kemik iliği dahil olmak üzere birçok dokuda eksprese edilir (Schrader et al., 2002). CXCR4 ise meme kanseri, over kanseri, melanom ve prostat kanseri dahil olmak üzere 23'ten fazla insan kanserinde aşırı ifade edildiği gösterilen en yaygın kemokin reseptörlerinden biridir (Balkwill, 2004a). CXCR4 over kanseri dahil birçok doku türünde ifade edilmesine rağmen, normal over dokusunda CXCR4 ifadesi düşük veya yoktur (Muller et al., 2001). Malign hücrelerde ise CXCR4 ifadesi, birkaç mekanizma aracılığıyla artırılır. Örneğin VEGF, bilinen bir CXCR4 ekspresyon indükleyicisidir ve HIF-1'in de VEGF'yi indüklediği gösterilmiştir (Zagzag et al., 2006).

Over kanserinde, CXCR4'ün özellikle metastatik dokularda ifadesi artmıştır (Jiang et al., 2006; Orimo et al., 2005). CXCR4'ün AMD 3100 (antagonist) ya da siRNA ile inhibisyonu, hücre kültürlerinde proliferasyonu, migrasyonu ve invazyonu azaltmıştır, hücre apoptozisini arttırmıştır (Y. Liu, Ren, Yang, Xu, and Chen, 2019). Bir meta-analizde over kanserli hastalarda CXCR4 aşırı ifadesinin azalmış sağkalımla bağlantılı olduğu görülmüştür (HR=3,03, 95% CI, 1,89-4,88) (H. Zhao et al., 2015). CXCL12, hasara uğramış dokularda artmış konsantrasyonda bulunur ve doku iyileşmesi için dolaşımdaki endotelial kök hücreler için kemoatraktan olarak işlev görür ve dokuda artmış ifadesinin bağımsız bir prognostik faktör olabileceği düşünülmüştür (Jiang et al., 2006; Kucia et al., 2006). “İyileşmeyen yaralar” olarak

da bilinen tümörlerde bu yolak, kanser kök hücre migrasyonunda (metastazda) rol oynayabilir.

İmmün sistemden kaçış, karsinogenez sürecinin en önemli basamaklarından biridir (Hanahan and Weinberg, 2011). Karsinogenez sonrasında tümör mikro çevresindeki hipoksi; anjiyogenez ve artmış invazyonun yanında immünsüpresyona da neden olabilmektedir (Huang, Goel, Duda, Fukumura, and Jain, 2013; Wilson and Hay, 2011). Artmış hipoksi, tümör asosiye makrofajlar (TAM) ve T reg gibi myeloid ve lenfoid immün baskılayıcı hücrelerin tümöre toplanmasına ve aktivasyonlarına neden olur (Flecken et al., 2014; Motz and Coukos, 2011). Ayrıca, hipoksi CXCR4 sinyal iletimini artırır (Romain et al., 2014). Persiste tümör hipoksisine rağmen, CXCL12-CXCR4 etkileşiminin inhibisyonu tümör büyümesini engeller (Y. Chen et al., 2014). CXCL12 aracılı ERK yolağı aktivasyonu, T hücre sinyal iletimi, adezyonu ve apoptozunu etkileyen çoklu gen aktivasyonu yapar (Suzuki, Rahman, and Mitsuya, 2001). CXCL12, CXCR4 reseptörü aracılığı ile T hücrelerde uzamış ERK-MAP kinaz aktivasyonu yaratır (Kremer, Humphreys, Kumar, Qian, and Hedin, 2003). Ayrıca, tirozin kinaz inhibitörleri uygulanması, doğal öldürücü (NK) hücre yüzeyindeki CXCR4 reseptörlerini artırır (Bellora et al., 2017). Küçük hücre dışı akciğer kanserinde artmış CXCL12 ifadesi, CD4+, CD69+ ve CXCR4+ T hücrelerini çeker, CD8+ T hücreleri değişmemesine rağmen, Treg oranı artar ve tümördeki NK hücre sayısı azalır (Wald et al., 2006). Bellek fenotipine sahip Treg'ler sıklıkla, CXCR4/CXCL12 sinyalleme yoluyla, metastazın yaygın bir hedefi olan kemik iliğine çekilir ve burada Treg'lerin kanser ilerlemesini sürdüren anti-inflamatuar bir ortam sağladığı düşünülmektedir (E. Zhao et al., 2012; Zou, 2006). Solid tümörlerde CXCL12'nin tümör yatağında bulunması, immün baskılayıcı CXCR4+ Treg ve plazmasitoid dendritik hücrelerin (pDC) tümör çoğaltıcı etkisini artırır (Zou, 2005; Zou et al., 2001). CXCL12-CXCR4'ün ve immünoterapide sıklıkla kullanılan PD-1–PD-L1'in beraber blokajı, fare modelinde tek blokaja göre tümör büyümesini daha etkili kontrol etmiş, sağkalımı arttırmıştır (Zeng et al., 2019).

Sitotoksik T-lenfositlerin tümöre infiltrasyonunun azalması veya supresör hücrelerin (örneğin, miyeloid derive kök hücreler) artan birikiminden dolayı, immünoterapiye direnç, *in vitro* olarak CXCL12 sinyal yolağı ile NFκB aracılığıyla indüklenmiştir ve bu da tümör büyümesi ile sonuçlanmıştır. (Garg et al., 2018) Osteosarkomların epigenetik olarak CXCL12 ifadesini azaltabileceği ve böylece

metastaz oluşturma yeteneği kazanabileceği (artan CXCL12 gradyanı) ve sitotoksik T-lenfositlerin tümör bölgesine yerleşmesini bozabileceği gösterilmiştir (Li et al., 2018). Azalmış CXCL12 sinyallemesi, pankreatik kanser alt gruplarının T-lenfosit aracılı sitotoksisiteye direncine katkıda bulunmuştur (Lin et al., 2022).

AMD3100 (CXCR4 antagonisti) kullanımı tek başına, tümör içi hafıza T hücrelerini anlamlı olarak artırmamaktadır (Kaka et al., 2009). Ancak over kanserinde, aPD-1 antagonisti ile beraber kullanıldığında, kombinasyon, merkezi hafıza T hücresi fenotipini temsil eden CD44⁺ CD27⁺ T hücrelerini önemli ölçüde artırmıştır (Zeng et al., 2019). AMD3100, MDSC'leri azaltmasa da Treg hücrelerini önemli ölçüde inhibe etmiş, bu da AMD3100 monoterapi grubunda daha düşük IL-6 ve IL-10 seviyeleri ile ilişkilendirilmiştir. Kombinasyon tedavisi, over kanserine bağlı asit içindeki IL-6 ve IL-10'u önemli ölçüde düşürmüştür (Zeng et al., 2019).

3. ARAŞTIRMA HİPOTEZİ, AMACI VE HEDEFİ

Araştırmada EOK, TIL sayımı ve CD8 boyanmasına göre TIL pozitif ve negatif, CD8 pozitif ve negatif şeklinde immünohistokimyasal olarak sınıflandırılmış (Zeng et al., 2019), immün yanıt aktive olmamış (ya da inhibe olmuş) over kanserinde kemokin reseptör yolağı aktivasyonuna bakılmıştır. CXCL12'nin hem tümör metastazı için hem de TIL'ler -özellikle immün baskılayıcı Treg'ler- için çekici görev üstlendiği bilinmektedir. İmmün yanıt inhibisyonunun nedeninin kemokin reseptörlerinden kaynaklandığı hipotezi üretilmiştir ve bu ilişki irdelenmiştir. İki grupta kemokin yolağının aktivasyonu dokuda CXCR4, CXCR7 ve CXCL12 düzeyi ile değerlendirilmiştir. Ortaya çıkan sonuca göre EOK'nin tedavisinde yeni hedef/hedefler belirleyip çeşitli ilaç kombinasyon çalışmalarının (immünoterapi – DNA metiltransferaz inhibitörleri – kemokin reseptör antagonisti) önünü açabilecektir. Bu kombinasyonların EOK'de genel sağkalımı uzatması umut edilmektedir.

Çalışmada ikincil amaç olarak ise alt grupların (immün yanıt olan/olmayan, CXCR4-CXCR7 yolağı aktif/aktif değil) sağkalım ile ilişkili olup olmadığına bakılacaktır ve bunun prognostik bir faktör olup olmadığı tartışılacaktır.

4. MATERYAL VE YÖNTEM

4.1. Etik Kurul

Araştırma, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 23.07.2020 tarihli toplantısında incelenmiş ve etik açıdan uygun bulunmuştur (Ek 1).

4.2. Araştırmanın Evreni

Araştırma retrospektif bir biçimde Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı ve Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın evrenini son 10 yılda seröz papiller epitelyal over karsinomu tanıları almış ve Ondokuz Mayıs Üniversitesi'nde opere edilmiş hastaların patolojik formalinle sabitlenmiş parafine gömülü (FFPE) spesmenleri ve hasta dosyaları oluşturmuştur. Hasta dosyalarından elde edilen demografik bilgileri, tümör evre, derece, hastalısız sağkalım, genel sağkalım verileri Microsoft Excel programında kaydedilmiştir. Ayrıca, serum Ca125 düzeyleri, platin sensitif (>6ay nüks), platin dirençli (<6 ay nüks), platin refrakter (tedavi altında ilerleme) özellikleri kullanılacaktır.

Çalışmaya dahil olma kriterleri şu şekildedir:

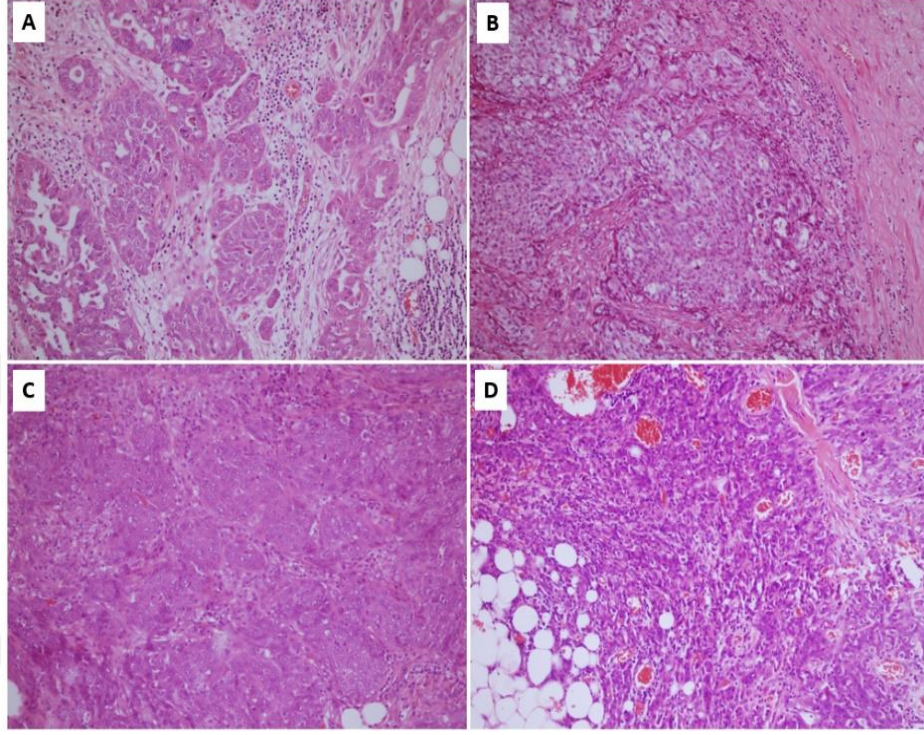
- 18-70 yaş arasındaki kadın hastalar.
- Patolojik olarak yüksek dereceli (Tip 2) seröz papiller epitelyal over kanseri tanısı konulmuş olması.
- Başlangıçta en az makroskobik >2cm intraabdominal/peritoneal metastazı bulunan (Evre IIIc ve IV) tümörler.
- Neo-adjuvan kemoterapi öyküsü olup cerrahi uygulanan ya da primer sitoredüktif cerrahi uygulanan ve adjuvan kemoterapi alan hastalar.
- Sitoredüktif cerrahide rezidü maksimum tümör çapı 1cm'nin altında olması.
- Başvurusunda kanda Ca125 düzeyi bakılmış olması.

Çalışmadan dışlama kriterleri de şu şekildedir:

- Bilgilerine veya dosyasına ulaşamayan hastalar.
- Primer tedavide standart yaklaşım olan paklitaksel ve karboplatin rejiminden farklı bir tedavi başlanması.
- Tümörle ilişkisiz bir nedenden dolayı eksitus olan hastalar (ör: kazalar, doğal afetler)

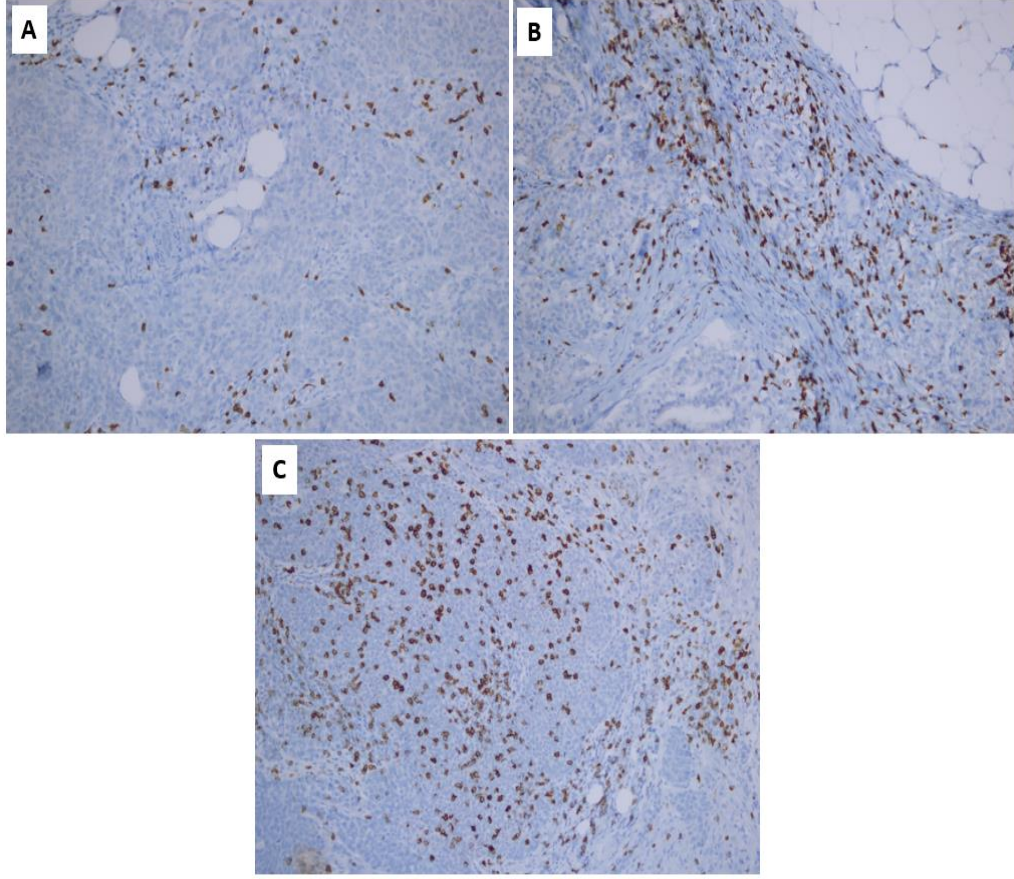
4.3. İmmünohistokimya

Patolojik spesmenler önce Hemotoksilen ve Eozin ile (H&E) boyanmış ve tümör adaları ve stromasındaki içinde TIL'ler aşağıda belirtileceği üzere sınıflandı (Şekil 4.1). TIL de sitotoksik T hücre antijenleri için CD8, kemokin reseptör yolağı için ise CXCR4, CXCR7 ve CXCL12 immünohistokimya yöntemi ile bakıldı:



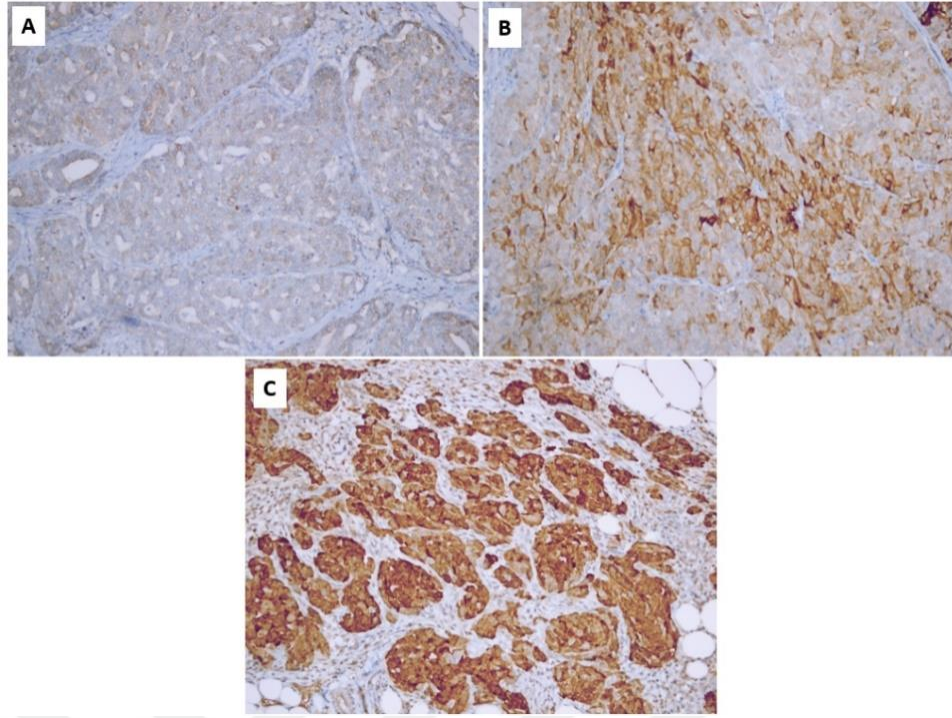
Şekil 0.1. A. Yüksek dereceli seröz karsinomun histomorfolojik görünümü (H&E, x200). Tümöre infiltre lenfositlerin (TIL) dağılımı; B. Tümör sınırında minimal lenfosit (skor: 1), C. Tümör adaları ve tümör stroması içinde lenfosit (skor:2), D. Tümör hücreleri ve stroma arasında belirgin yer kaplayan lenfosit (skor:3)

CD8 [C8/144B] (Biocare, CA, USA), CD8 proteinlerinin formalinle sabitlenmiş parafine gömülü insan dokularında immünohistokimya (İHK) ile kalitatif tanımlanmasında kullanılan fare monoklonal antikorudur. CD8 antikor, 32 kDa CD8 proteini ile reaksiyona girer ve son zamanlarda, CD8, CD8 + tümör infiltre lenfositlerin tanımlanması için kullanılmıştır (S. Liu et al., 2014; J. R. Webb, Milne, and Nelson, 2015) CD8 ve TIL boyanmalarına göre intratümöral T hücreleri 1+, 2+, ya da 3+ (≤ 5 , 6-19 ya da ≥ 20 T hücresi/büyük büyütme alanı) olarak gruplandırılmış ve zayıf ya da orta-kuvvetli immün yanıt olarak EOK spesimenleri sınıflandırıldı (Şekil 4.2).

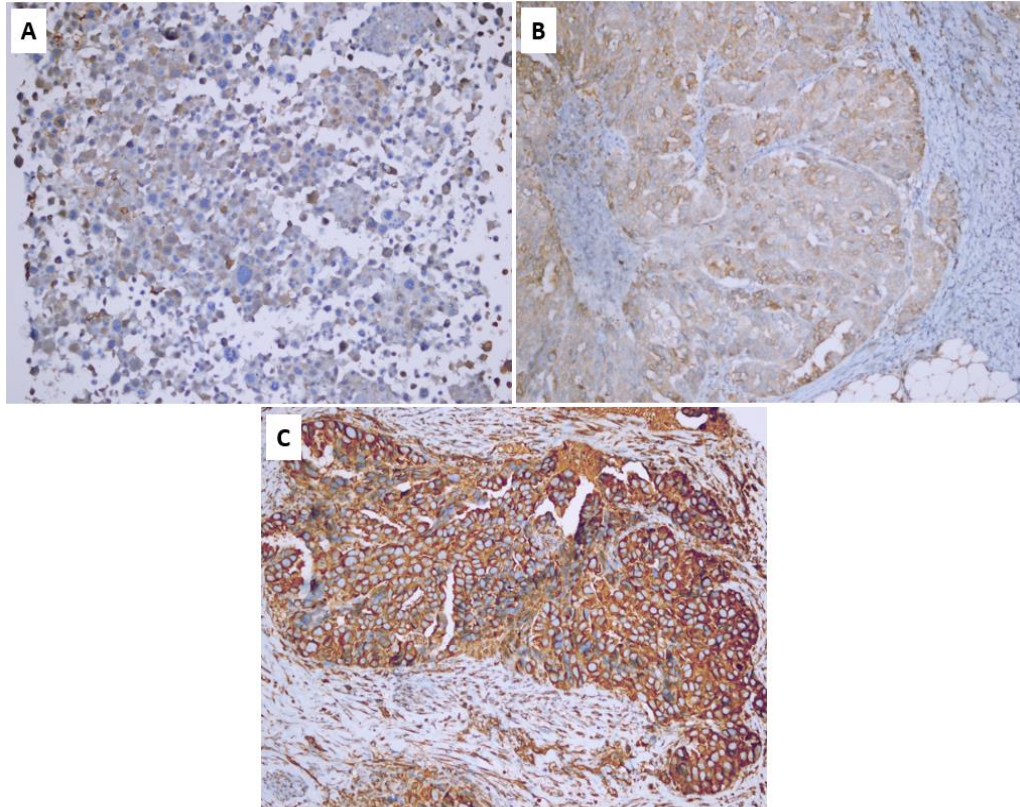


Şekil 0.2. CD8 immünohistokimyası. A. Tümöre infiltrate lenfositlerin (TIL) %1-10'unda boyanma (skor: 1), B. TIL'in %10-50'sinde boyanma (skor: 2), C: TIL'in %50'sinden fazlasında boyanma (skor: 3)

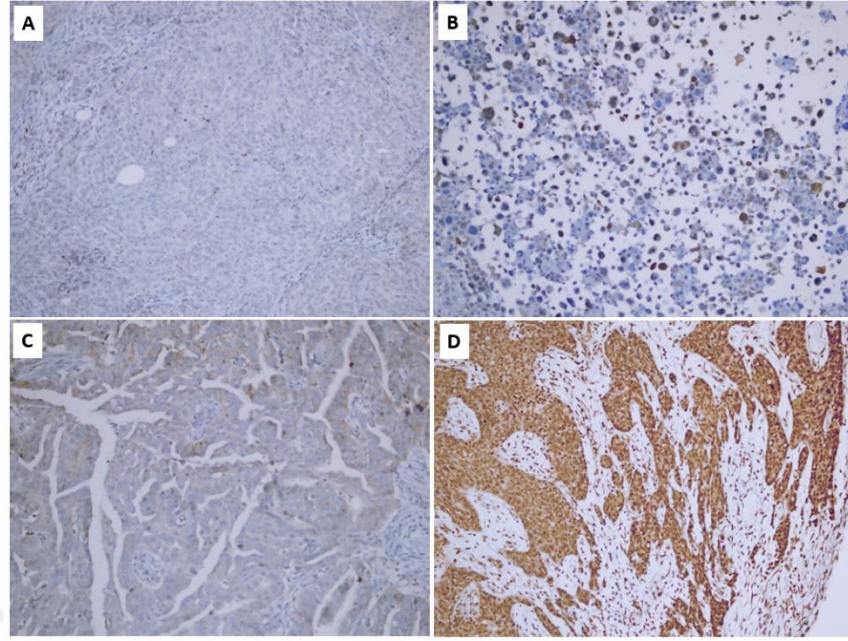
Anti-SDF1/CXCL12, CXCR4 ve CXCR7 (Medaysis, CA, USA), CXCL12, CXCR4 ve CXCR7 proteinlerinin FFPE insan dokularında İHK ile kalitatif tanımlanmasında kullanılan tavşan poliklonal antikorlarıdır CXCL12, CXCR4 ve CXCR7 immünohistokimya boyamaları, boyanma şiddeti ve boyanma yaygınlığı olarak iki parametreye göre ayrı ayrı değerlendirilip, her parametreye göre şu şekilde sınıflandırılmıştır: negatif (1), az yoğun (2), güçlü yoğun (3). Anti-SDF1/CXCL12 için stroma ve metastatik tümördeki boyanma paternleri ayrı ayrı değerlendirildi (Şekil 4.3), diğer boyamalar sadece metastatik tümör dokusunda yapıldı (Şekil 4.4), (Şekil 4.5). Yaygınlık ve boyanma şiddeti skorlarının toplanması ile kombine skor hesaplandı (2-6). Kombine skorlar: 2-3 düşük, 4-6 ise yüksek olarak kategorize edildi.



Şekil 0.3. Anti-SDF-1(CXCL12) immünohistokimyası. A. Fokal zayıf boyanma (skor: 1), B. Yaygın zayıf boyanma (skor: 2), C. Yaygın güçlü boyanma (skor: 3)



Şekil 0.4. CXCR4 immünohistokimyası. A. Fokal zayıf boyanma (skor: 1), B. Yaygın zayıf boyanma (skor: 2), C. Yaygın güçlü boyanma (skor: 3)



Şekil 0.5. CXCR7 immünohistokimyası. A. Boyanma yok. B. Fokal zayıf boyanma (skor: 1), C. Yaygın zayıf boyanma (skor: 2), D. Yaygın güçlü boyanma (skor:3)

4.4. CXCL12 Ekspresyonunun Değerlendirilmesi

4.4.1. C-X-C Motif Chemokine Ligand 12 (CXCL12) Geninin mRNA Eldesi

Arşivdeki her olguya ait FFPE tümör örneklerinin üzerindeki fazla parafin uzaklaştırıldı. Daha sonra mikrotom (Leica Microsystems, Nussloch, Almanya) cihazı kullanılarak 5 µm kalınlığında 3-4 adet kesit alınarak ve steril 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı. Bu aktarım yapıldıktan sonra DNA ve RNA izolasyonu aşamalarına başlayana kadar kesit içeren tüpler -20°C'de bekletilmiştir. FFPE dokudan total RNA izolasyonu için kit protokolünde önerilen yöntem uygulandı (EZ-10 Spin Column Total RNA Mini-Preps Kit, Kanada):

- Her bir tüpe parafini uzaklaştırmak için Xylene eklenip 3 dakika vorteks tutuldu. Daha sonra oda ısısında 5 dakika 300g'de santrifüj edilip supernatant atıldı. 0,45 ml tampon RLT çözeltisi eklenip pipetle hafifçe karıştırıldı.
- Etanol eklenip tüp ters çevrilerek karıştırıldı.
- Oluşmuş olabilecek çökelti dahil çözelti, 2 ml spin-kolonu içeren toplama tüpüne aktarıldı. Oda sıcaklığında 30 saniye boyunca 12.000 x g'de santrifüjleyip akan kısım atıldı.
- Kolona 0,5 ml RW Solüsyonu eklenip, oda sıcaklığında 30 saniye 12.000 x g'de santrifüjleyip akan kısım atıldı,

- Kolona 0,5 ml universal RPE Solüsyonu eklenip, oda sıcaklığında 30 saniye 12.000 x g'de santrifüjlendi ve akan kısım atıldı.
- Kalan etanolün tamamen çıkarılması için kolon, 1,5 ml'lik yeni bir santrifüj tüpüne yerleştirilip 50 µl RNaz içermeyen su eklenip oda sıcaklığında 30 saniye 12.000 x g'de santrifüjlendi.

4.4.2. C-X-C Motif Chemokine Ligand 12 (CXCL12) Geninin mRNA'sından cDNA Eldesi

Ters transkriptaz kiti kullanılarak mRNA cDNA'ya şu şekilde çevrilmiştir:

RNA çözdürüldükten sonra buz üzerine konulur. Primer çözeltileri tampon RT ve RNazsız suyu oda sıcaklığında (15-25°C) çözdürüldü. Her bir çözelti vorteksleyerek karıştırılıp ve kısa süreliğine santrifüj edildi.

- Çözeltiler buz üzerinde soğutuldu.
- RNaz inhibitörü, dNTP karışımı, reverse transkriptaz ve reverse transkriptaz reaksiyon tamponu karıştırıldı. Kısaca santrifüjlendi, vortekslendi.
- Önce 25°C'de 10 dakika, daha sonra 55°C'de 30 dakika inkübe edildi. Bu süreçte, reverse transkriptaz enzimi RNA şablonundan cDNA sentezledi.
- Transkriptor ters transkriptazı inaktive etmek için, 5 dakika boyunca 85°C'ye ısıtılır ve ardından buz üzerinde soğutuldu.

4.4.3. Gerçek Zamanlı Kantitatif PCR (qPCR) ile Gen Ekspresyon Analizi

Elde edilen cDNA'lar, 2X Real-Time PCR Master Mix ve ekspresyon primerleri ile kitin belirttiği oranlarda karıştırılarak yine kitin belirttiği koşullarda Rotor-Gene Q (Qiagen, Germany) cihazına yüklenerek *CXCL12* ifade düzeyleri ölçüldü (Clatot et al., 2015). Gen ifadesinin kantitatif olarak ölçülmesi için gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qPCR) sıklıkla kullanıldı. Ancak, qPCR sonuçları, numune hazırlığından ve amplifikasyon verimliliğinden etkilenebileceği için, doğru bir şekilde normalleştirildi.

$2^{-\Delta Ct}$ yöntemi, qPCR sonuçlarının doğru bir şekilde normalleştirilmesinde yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntem, iki farklı örnekteki bir hedef genin ifade düzeyleri arasındaki farkı karşılaştırmak için kullanılır (Rao, Huang, Zhou, and Lin, 2013). Bu karşılaştırma, önce hedef genin Ct (threshold cycle) değerleri belirlenir. Ct değeri, hedef genin sinyal şiddetinin belirli bir eşiği geçtiği döngü sayısını gösterir.

Daha sonra, her iki örnekteki hedef genin Ct değerleri arasındaki fark (ΔCt) hesaplanır (Livak and Schmittgen, 2001). Örnekler arasındaki farklılıkları normalleştirmek için referans gen olarak çalışmamızda gliseraldehid 3-fosfat dehidrogenaz (*GAPDH*) aynı örneklerde kullanıldı.

ΔCt , hedef genin ifade düzeyindeki değişimi gösterir. ΔCt değeri, kat değişim değerine dönüştürülerek ifade edilebilir. Kat değişim değeri, iki örnekteki hedef gen ifadesi arasındaki farkı ifade eder ve çoğunlukla log2 skala kullanılarak ifade edilir (Livak and Schmittgen, 2001; Pfaffl, 2001; Rao et al., 2013).

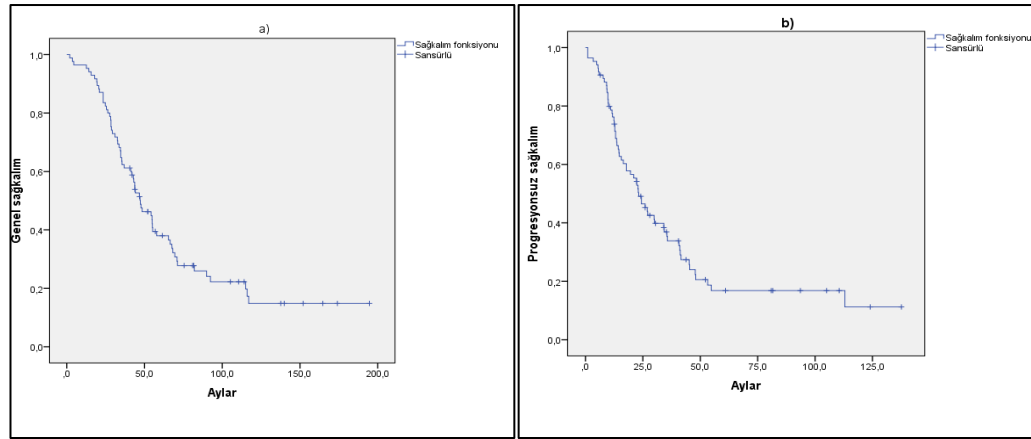
4.5. İstatistik

Benzer çalışmadan (Zhang et al., 2003) elde edilen sonuçlar kullanılarak Minitab programı ile yapılan güç hesaplamalarında Tip I hata %5 ve çalışmanın gücü %80 alındığında beklenen prevalans ile bilinen prevalans arasındaki farkın anlamlı olarak gösterilmesi için, alınması gerekli kişi sayısı en az 86 olarak hesaplandı ($43 \times 2 = 86$). İstatistiksel analizde SPSS 21.0 programı kullanılmıştır. İmmün alt grupta ve immün olmayan alt gruptaki CXCL12 ekspresyonu ve CXCR4-CXCR7 reseptör pozitifliği ilişkisi analizi için Pearson korelasyon testi kullanıldı. Gruplar arasındaki sağkalım farkı Kaplan-Meier ve log-rank metodu ile karşılaştırıldı. Hastalısız ve genel sağkalıma etki eden faktörler için Cox regresyon analizi yapıldı. Cox orantılı tehlike oranı (hazard ratio) modeli ile yapılan çok değişkenli analizlerde, tehlike oranları (HR'ler) ve %95 güven aralıkları (CI'ler) olarak rapor edildi. TIL kuvvetli pozitif (immün) ve TIL zayıf pozitif veya negatif (non-immün) gruplarda lojistik regresyon analizi yapıldı ve immünojenik tümörlerde kemokin reseptör pozitivitesinin ilişkisi araştırıldı. $P < 0,05$ olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

5. BULGULAR

Çalışmaya 86 hasta dahil edildi. Tüm hastaların demografik bilgilerine ulaşıldı. Bir hastanın nüks ve sağkalım verilerine ulaşılamadı. Hastaların ortalama yaşı 57 (84-35, standart sapma:10,8) olarak hesaplandı. Hastaların ortalama Ca125 değeri 1020 (109-9311, standart sapma:1749) bulundu. Altmış üç hastaya (%73) başlangıçta (primer) cerrahi uygulanmış ve sonrasında kemoterapi verilmiştir. Yirmi üç hastaya (%27) ise neo-adjuvan kemoterapi verilip sonrasında cerrahi uygulanmıştır. Her hastaya hastalık başlangıcında paklitaksel ve karboplatin kemoterapisi başlanmıştır. On sekiz hasta (%21), paklitaksel-karboplatin kemoterapisine dirençli kabul edilip ikinci-sıra kemoterapötik ajanlar başlanmıştır.

Ortalama progresyonsuz sağkalım süresi 30,3 ay (1-137 ay, standart sapma: 39,6) ortalama genel sağkalım süresi de 56,2 ay olarak bulundu (1,9-194 ay standart sapma: 39,6) (Şekil 5.1). Çalışma sonlanım tarihinde 22 hasta halen yaşamaktadır. 64 hasta ise çalışma sonlandığında eksitus olmuştur. Yetmiş iki hastanın tümörü tedavi tamamlandıktan sonra 60 aydan daha kısa sürede nüks etmiştir, 13 hastanın tümörü ise 60 ayın üzerinde lüks etmiştir. 34 hasta 60 ayın üzerinde eksitus olmuştur. 51 hasta ise 60 ayın altında eksitus olmuştur.



Şekil 0.1. Tüm vakalar için a) Genel sağkalım b) Progresyonsuz sağkalım

Tümör örneklerinin İHK boyanması sonucunda, tüm boyanma parametrelerinde hastaliksız ve genel sağkalım için Cox regresyon analizi yapılmıştır (kombine skor).

TIL kuvvetli pozitif (immün) ve TIL zayıf pozitif veya negatif (non-immün) gruplarda lojistik regresyon analizi yapıldı ve immünojenik tümörlerde kemokin reseptör pozitivitesinin ilişkisi araştırıldı (Tablo 5.1). Tümörde CXCR7'nin kuvvetli

eksprese edilmesi, TIL sayısını azaltmaktadır ($P<0,01$ binary logistic regression, OR:0.17 (0,05-0,56) %95 CI).

Tablo 0.1. Tümörde TIL sayısına etki etmesi olası faktörler (binary logistic regression)

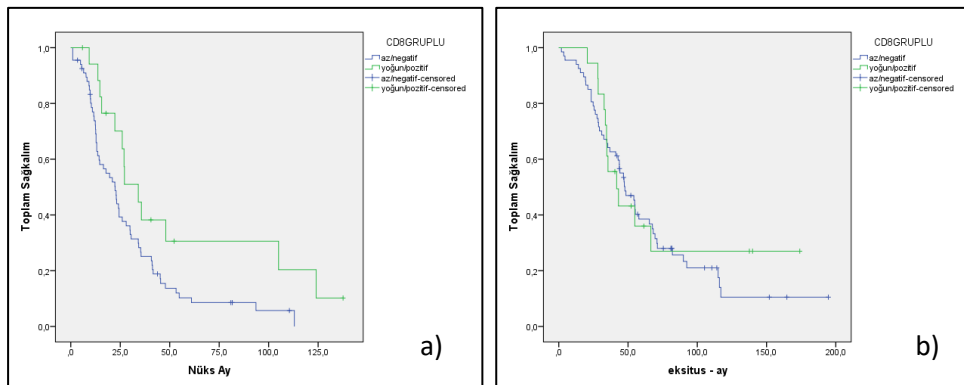
Bağımsız Değişkenler	P değeri	Olasılık Oranı (OR)	%95 Güven Aralığı	
			Düşük	Yüksek
Tümörde CXCR7	0,004	0,17	0,05	0,56
Stromada SDF-1	0,375	1,62	0,56	4,75
Tümörde SDF-1	0,121	5,37	0,64	44,82
Tümörde CXCR4	0,141	0,18	0,02	1,77

CD8+ sitotoksik T lenfosit yoğun ve CD8+ sitotoksik T lenfosit seyrek veya negatif gruplarda lojistik regresyon analizi yapıldı ve CD8+ yoğun tümörlerde kemokin reseptör pozitivitesinin ilişkisi araştırıldı (Tablo 5.2). Tümörde CXCR4 kuvvetli ifade edilmesi, CD8+ lenfosit sayısını azalttığı görüldü [$P<0,05$ binary logistic regression, OR:0,033 (0,02-0,66) %95 CI]

Tablo 0.2. Tümörde CD8+ T lenfosit sayısına etki etmesi olası faktörler (binary logistic regression)

Bağımsız Değişkenler	P değeri	Olasılık Oranı (OR)	%95 Güven Aralığı	
			Düşük	Yüksek
Tümörde CXCR7	0,2	0,14	0,007	2,83
Stromada SDF-1	0,83	1,06	0,6	1,9
Tümörde SDF-1	0,09	5,37	0,88	5,47
Tümörde CXCR4	0,03	0,33	0,002	0,66
Neo-adjuvan kemoterapi	0,02	7,23	1,5	34,96

CD8+ hastalarda hastalıksız sağkalım ($p<0,05$, log-rank test) uzun bulundu, diğer parametreler için anlamlı fark saptanmadı (Şekil 5.2). Neo-adjuvan kemoterapi, tümörde CD8+ lenfosit sayısını arttırmaktadır [$(P<0,05$ binary logistic regression, OR:7,23 (1,50-34,96)] (Tablo 5.2).

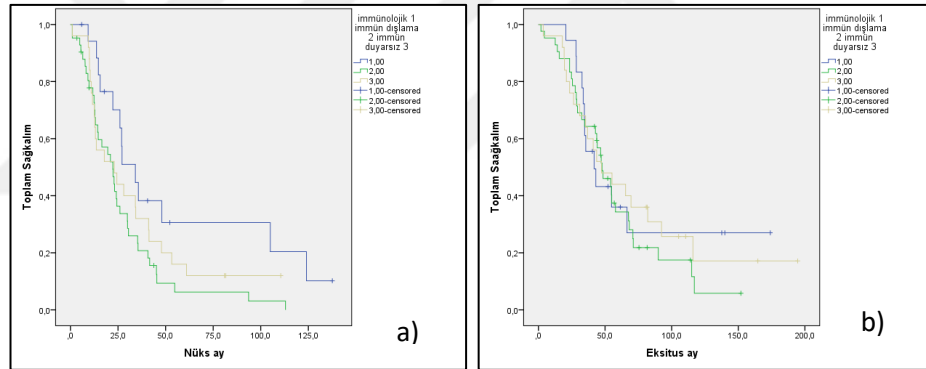


Şekil 0.2 CD8 + hastalarda a) hastalıksız sağkalım b) genel sağkalım

Tümörler CD8+ T lenfositler ve tüm TIL'lerin tümörde bulunmasına göre şu şekilde sınıflandırıldı:

- CD8+ yoğun (İHK ile +3): immünojen
- CD8+ orta/az yoğun (İHK ile +1 ya da +2) ve TIL orta/çok yoğun (İHK ile +2 ya da +3): immün dışlama (exclusion)
- CD8+ orta/az yoğun (İHK ile +1 ya da 2+) ve TIL az yoğun (İHK ile +1): immün duyarsız (ignorant)

Buna göre immünojen tümörler ile immünojen olmayan (immün dışlama ve immün duyarsız) tümörler arasında hastalıksız sağkalım ($p<0.05$, log-rank test) uzun bulundu, genel sağkalım açısından anlamlı fark saptanmadı. Hastalıksız sağkalım için ortalama sağkalım değerleri ile immünojen, immün dışlama ve immün duyarsız tümörlerde sırasıyla 34 ay (standart hata 7 ay), 22,3 ay (standart hata 4 ay) ve 23 ay (standart hata 9 aydır) (Şekil 5.3).



Şekil 0.3. İmmünojen tümörler ile immünojen olmayan (immün dışlama ve immün duyarsız) tümörler arasında a) hastalıksız sağkalım b) genel sağkalım

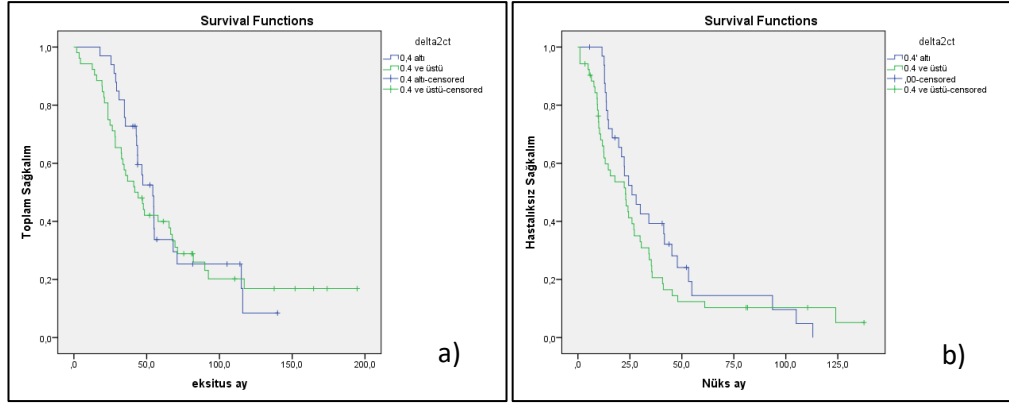
Tüm İHK parametreleri kombine skorlar ile karşılaştırıldı ve anlamlı olarak şu sonuçlara ulaşıldı:

- TIL ile CXCL12 stroma boyanma şiddeti ve kombine skoru arasında pozitif korelasyon
- TIL ve tümörde CXCR7 arasında negatif korelasyon
- Tümörde CXCR7 kuvvetli ifade edilmesi, TIL sayısını azaltmaktadır [$P<0,1$ binary logistic regression, OR:0,17 (0,05-0,56) %95 CI].
- CD8 + T lenfositler ve CXCR7 arasında kuvvetli negatif korelasyon
- Tümörde CXCR4 ve CXCR7 arasında kuvvetli pozitif korelasyon
- TIL ile CD8+ lenfositler arasında kuvvetli pozitif korelasyon

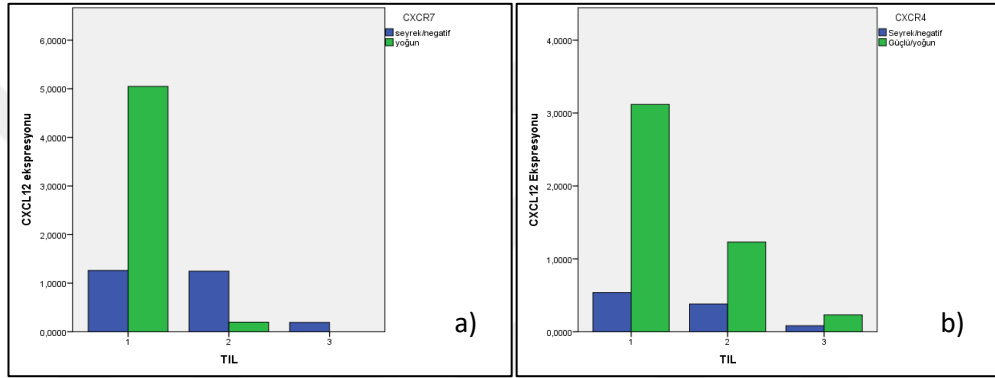
- Stromada ve tümörde CXCL12 ile tümörde CXCR7 arasında pozitif korelasyon
- Tümör dokusunda CXCL12 ile CXCR4 ile kuvvetli pozitif korelasyon saptanmıştır.
- Neo-adjuvan kemoterapi, tümörde CD-8 pozitif T lenfosit sayısını arttırmaktadır ($P<0.05$ binary logistic regression, OR:7,23 (1,50-34,96) %95 CI).

CXCL12 ifadesini belirleyen eden kat değişim değeri ile ilgili şu sonuçlara ulaşıldı:

- Yüzde 12 hastada CXCL12 kat değişim değeri 5'in üzerindedir (çok yüksekifade). Hastaların %29'da ise çok düşüktür (0,1'in altı).
- CXCL12'nin kat değişim değerinin 5 ve üzerinde olması ile TIL + arasında pozitif korelasyon (Pearson Correlation)
- İmmünojen, immün dışlama ve immün duyarsız olarak sınıflandırılan tümörler arasında CXCL12 geni ifadesindeki kat değişim değeri açısından anlamlı farklılık saptanmamıştır (Kruskal Wallis Test $p:0,078$).
- CXCL12 geni ifadesinin kat değişim değerinin 0,4 ve üzerinde olması ile tümörde CXCL12 İHK kombine skoru arasında pozitif korelasyon (Pearson Correlation) (Stromadaki İHK boyaması ile bu korelasyon bulunamamıştır)
- Neo-adjuvan kemoterapi, CXCL12 ifadesini değiştirmemektedir. (binary logistic regression OR:1,37, 0,35-5,34 %95CI)
- Hastalısız sağkalımı CXCL12 kat değişim değerinin 0,4 ve üzerinde olması (ortalama 22,9 ay standart hata 4,9) ya da altında olması (ortalama 26,0 ay standart hata 5,2) değiştirmemektedir (log-rank test, $p: 0,25$) (Şekil 5.4).
- Genel sağkalımı, CXCL12 kat değişim değerinin 0,4 ve üzerinde olması (ortalama: 68,9 ay standart hata: 9,2) ya da altında olması (ortalama: 64,5 ay standart hata: 7,0) değiştirmemektedir (log-rank test $p:0,65$) (Şekil 5.4).
- CXCL12 ifadesindeki kat değişim değeri ile TIL arasındaki ilişkiyi moderatör olarak CXCR7 ya da CXCR4 ifadesi değiştirmemektedir (Her iki durum için $p>0,05$, multivariate logistic regression) [(CXCR7 ifadesi TIL miktarını bağımsız olarak etkilemektedir ($p<0.05$))] (Şekil 5.5).



Şekil 0.4. CXCL12 kat değişim değerinin 0,4 altında ve üstünde olan hastalarda a) genel sağkalım b) hastalıksız sağkalım



Şekil 0.5. CXCL12 kat değişiminin (y aksı) ortalama değişimine göre artan TIL miktarının (x aksı) a) CXCR7 ifadesine (İHK) göre dağılımı. B) CXCR4 ekspresyonuna (İHK) göre dağılımı (Yoğun boyanan: yeşil seyrek/negatif boyanan: mavi) (CXCL12 kat değişim değeri ile TIL arasındaki ilişkiyi moderatör olarak CXCR7 ya da CXCR4 ifadesi değiştirmemektedir (Her iki durum için $p > 0.05$, multivariate logistic regression). CXCR7 ekspresyonu TIL miktarını bağımsız olarak etkilemektedir ($p < 0.05$)).

6. TARTIŞMA

Tümör mikro çevresi ve özellikle de TIL'nin, SEOK'nin evrimi ve tedaviye yanıtı üzerinde belirleyici bir etkiye sahip olduğu görülmektedir. CD8+ lenfositlerden zengin tümörlerdeki hastalıksız sağkalım ($p<0,05$, log-rank test) uzun bulunmuştur ve tümörde CD8 + lenfosit yoğun olan hastalarda, 60 ayın üstünde nüks görülme olasılığı artmaktadır ($P<0,01$, binary logistic regression OR:17,1 2,01-141,1 %95CI). Bu bulgular mevcut literatür ile uyumludur (Sato et al., 2005).

Bulgularımız, TIL'lerin ve özellikle CD8+ T hücrelerinin, tümör mikro çevresindeki immün yanıtın düzenlenmesinde ve sağkalımda önemli bir rol oynadığını düşündüren bir dizi çalışma ile tutarlıdır (Fridman, Pages, Sautes-Fridman, and Galon, 2012; Gooden, de Bock, Leffers, Daemen, and Nijman, 2011). TIL'lerin artışı genellikle kanser prognozunda daha iyi sonuçlarla ilişkilidir ve bunun CD8+ T hücrelerinin tümör hücrelerini doğrudan hedefleme yeteneğine bağlı olduğu düşünülmektedir (Galon et al., 2006).

EOK'ler bol miktarda CXCL12 eksprese ederler (Zou et al., 2001) CXCL12 T hücreleri için kemo-çekicidir ve T hücrelerinin üzerindeki CXCR4 reseptörüne selektif olarak bağlanır (Balkwill, 2004b; Kryczek, Wei, Keller, Liu, and Zou, 2007). Melanoma ve over kanseri üzerine yapılan belirli fare modelleri, CXCL12'nin tümör bağışıklık yanıtı üzerindeki etkisinin doza bağlı olduğunu göstermektedir. Düşük düzeylerde CXCL12 ifadesi, tümöre T hücrelerinin tümör dokusuna infiltrasyonuna, tümör büyümesinde gecikmeye ve tümör-spesifik T hücre aracılı bağışıklık yanıtının (CD8+ T hücre) gelişmesine yol açar. Buna karşıt olarak, yüksek düzeylerde CXCL12 ifadesi, tümör antijen-spesifik T hücrelerinin tümöre sızmasının azalmasına ve Treg'lerin tümör içi birikimi de dahil olmak üzere çeşitli mekanizmalar aracılığıyla antitümör bağışıklık yanıtlarının baskılanmasına yol açtığı gösterilmiştir (Curiel et al., 2004; Jaafar et al., 2009; Vianello et al., 2006). Çalışmamızda bulunan CXCL12 ifadesinin belirli bir eşikten daha yüksek olması (kat değişim değeri 5 ve üzerinde olması) ile TIL miktarı arasında pozitif korelasyon ve bu değişimle CD8+ hücrelerin artmaması, EOK'de de CXCL12'nin fazla ifadesinin Treg'leri oransal olarak daha çok çekip bağışıklık baskılayıcı bir ortam oluşturduğunu düşündürmektedir. Ayrıca, tümörde CXCR7 ifadesinin (İHK) total TIL sayısını azaltması [$P<0,01$ binary logistic regression, OR:0,17 (0,05-0,56) %95 CI] ve tümörde CXCR4 (İHK) ifadesinin CD8 + lenfosit sayısını azaltması ($P<0,05$ binary logistic regression, OR:0,033 (0,02-0,66)

%95 CI], TMÇ’de T lenfositlerin CXCR4 reseptörleri için serbest ligandın (CXCL12) bulunurluğunun azalmasına neden olduğu sonucu çıkarılabilir.

Yine çalışmamızda TIL’ler ve CXCR7 arasında güçlü bir negatif korelasyon, tümörde CXCR7’in kuvvetli ifadesinin TIL sayısını azalttığı [$P<0,01$ binary logistic regression, OR:0,17 (0,05-0,56) %95 CI] bulunmuş ve CD8+ T lenfositler ve CXCR7 arasında da güçlü bir negatif korelasyon olduğu görülmüştür. Her ne kadar CXCR7’nin insan ve fare lökositlerinde ifadesinin olmadığı ve bu nedenle bu reseptörün doğrudan T hücre infiltrasyonunu inhibe edemeyeceği gösterilmiş olsa da aynı çalışmada CXCR7 ifadesinin, daha çok tümör hücrelerinin damarlanması, proliferasyonu ve göçü üzerinde etkili olduğu belirtilmiştir (Berahovich et al., 2010; Miao et al., 2007). CXCR7, insan glioma hücrelerinde yüksek oranda ifade edilmektedir ve anti-apoptotik etkileri olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada ayrıca, tümör kök hücrelerinin daha çok CXCR4 ifade ettiğini, tümörün farklılaşması sırasında CXCR4’ün azalıp CXCR7 oranının arttığı ve CXCR7’nin tümör hücrelerinin mikro çevreye yanıtını düzenleyebileceği gösterilmiştir (Hattermann et al., 2010). CXCR7’nin meme kanseri hücrelerinin çoğalmasını ve invazyonunu ERK1/2 yoluyla indüklediği gösterilmiştir (Sun et al., 2010).

CD8+ T hücreleri, CXCR7 reseptörü ifade etmezler (Infantino, Moepps, and Thelen, 2006). CXCL12, CXCR7’ye, reseptörün diğer ligandı CXCL11’den 10-20 kat daha büyük afinite ile bağlanır (Burns et al., 2006). CXCR7 oranının yüksek olduğu tümör dokusunda, CXCL12’nin CXCR7 tarafından oransal olarak daha fazla bağlanıp, CXCR4-CXCL12 etkileşiminin bozulabileceği düşünülmüştür. Artan kanıtlar, CXCR7’nin bir aldatici (decoy) reseptör olarak işlev gördüğünü ve bir kemokin reseptörü olarak GTP hidrolizini veya kalsiyum mobilizasyonu yaparak Gi yollarını etkinleştirmedeğini öne sürmektedir (Burns et al., 2006) CXCR7’nin oynayabileceği rollerden biri, CXCL12’yi temizleyerek veya hapsederek CXCR4 tarafından farklı sinyallere yol açan CXCL12 gradyanları oluşturmak olabilir (Boldajipour et al., 2008; Dambly-Chaudiere, Cubedo, and Ghysen, 2007). Şekil 5.5a’daki grafikte ortalama CXCL12 ifadesinin fazla olmasına rağmen, dokuda CXCR7 yüksek miktarda bulunması durumunda (İHK), TIL sayısının az olduğu görülmektedir. Ayrıca, tümör dokusunda CXCR4 (İHK) kuvvetli ifade edilmesi, CD8+ lenfosit sayısını azaltmakta olduğu görülmüştür [$P<0,05$ binary logistic regression, OR:0,033 (0.02-0.66) %95 CI]. Bu bulgular, çalışmamızda CXCR7’nin TIL’ler için ve CXCR4’ün, CXCR4 reseptörlü

CD8+ T lenfositler için tümör dolusunda kemo-çekici olarak işlev gördüğü düşünülen CXCL12'yi bağlayıp, lenfositlerin tümör dokusuna infiltrasyonunu azalttığı düşünülmüştür. Yine CXCL12'nin yüksek ifadesi (CXCL12 kat değişim değeri >5) ile TIL miktarı arasında pozitif korelasyon bulundu. Bu lineer bir ilişki değildir ve belirli bir eşiğin üzerindeki CXCL12 ifadesinin yukarıda bahsedilen reseptörlerin bağlayıcı etkisinden kurtulup, TIL'ler için serbest olarak bulunma varsayımını yapabiliriz. Nitekim, pankreas kanserinde yapılan bir çalışmada tümöre CXCL12'nin ilave edilmesi tümördeki CD8+ T hücre sayısını arttırmış, tümöre karşı immünojenik yanıtı yeniden sağlamıştır. Dirençli pankreas kanseri alt klonlarda CXCL12'nin, CD8+ T hücresi sitotoksik aktivitesini CXCR4 reseptörü aracılığıyla etkilediğini ve bu durumun, T hücresi aktivasyonunda ve tümör dokusunda T hücresi infiltrasyonu artışına yol açtığı gösterilmiştir (Lin et al., 2022). Başka çalışmalarda ise CXCL12'nin pankreas kanserinde immün yanıtı kaçıması uyardığı dolaylı olarak, CXCR4'ün AMD3100 ile inhibe edilmesini kullanarak dolaylı olarak gösterilmekle beraber (Biasci et al., 2020; Feig et al., 2013), baştaki çalışmada bu ilişki gösterilememiştir (Lin et al., 2022). Fare sepsis modeliyle yapılan bir çalışmada ise, CXCR4'ün blokajı, dolaşımdaki CD8+ lenfosit sayısını arttırmaktadır (Ramonell et al., 2017). Hepatosellüler kanserde, CXCR4'ün AMD3100 kullanılarak inhibisyonu, bağışıklık baskılayıcı bir mikroçevresini azaltıp tümör büyümesini engellemiş, akciğer metastazını azaltmış ve hayatta kalma süresini uzatmıştır ancak CD8+ TIL sayısına etki etmemiştir (Y. Chen et al., 2015).

Tümör mikro çevresi CXCL12 ifade ederken, tümör hücreleri nadir olarak ifade ederler (Feig et al., 2013). Fakat CXCL12'nin ifadesinin sınırlı olmasına rağmen kanser hücrelerindeki paradoksal yerleşimi, metabolik strese uğramış kanser hücrelerinin yüksek hareketlilik grubu kutusu 1'in (HMGB1) CXCL12'yi yüksek afinite ile heterokompleks oluşturarak yakaladığı şeklinde hipotez edilir (Schiraldi et al., 2012; Tang et al., 2010). Bu durum, CXCL12'nin kanser hücrelerindeki paradoksal yerleşimini, CXCL12 ifadesinin eksik olmasına rağmen açıklamak için kullanılabilir.

Çalışmamızda EOK hastalarında CXCL12 ekspresyonunun hastalıksız ya da genel sağkalımla ilişkili olmadığı görülmüştür. Literatürde bir çalışmada daha az hastalıksız sağkalımla ilişkili bulunmuş, fakat daraltılmış bootstrap analizi ile çapraz doğrulama uygulandıktan sonra, anlamlılık kaybolmuştur. Ayrıca genel sağkalımla da ilişkisiz bulunmuştur (D'Alterio et al., 2022). Başka bir çalışmada da CXCL12'nin

bağımsız olarak zayıf sağkalımı öngördüğü gösterilmiştir (Popple et al., 2012). Çalışmamızda, hastaların %12'sinde *CXCL12* ifadesi yüksek (>5) bulunmuştur. Literatürde bir çalışmada bulgumuza yakın olarak, hastaların %20'sinde yüksek eksprese edildiği görülmüştür (Popple et al., 2012). EOK'de *CXCR4* ifadesi ile hastalıklı ya da genel sağkalım arasında ilişki bulunmamıştır. Bu bulgu literatürdeki diğer güncel çalışmalarla uyumludur (Walther et al., 2022, D'Alterio et al., 2022).

CXCR7, özellikle tümör damarlanması üzerinden tümör mikro çevresini modifiye edebilir ve tümör büyümesini hızlandırabilir (Miao et al., 2007). *CXCR7* sinyalinin prostat kanseri hücre hatlarında serin/treonin kinaz Akt'in fosforilasyonunu arttırdığı görülmüştür ve *CXCR7* fazla ifade eden prostat kanseri hücre hatları daha hızlı büyümekte ve yeni damarlanma fazla olmaktadır (Wang et al., 2008). EOK, moleküler alt grup olarak üçe ayrılabilir: yeni damarlanma ile ilgili genlerin daha fazla ifade edildiği “anjiyo”, bu genlerin ve immün yolaklardaki genlerin beraberce fazla ifade olduğu “anjiyo-immün” ve sadece immün yolaklardaki genlerin daha fazla ifade olduğu “immün” gruplar (Gourley et al., 2014). Yine aynı araştırmacılar, “immün” gruptaki hastaların sağkalımlarını daha uzun bulmuşlardır (Gourley et al., 2014). Çalışmamızdaki bulgular, tümör dokusunda *CXCR7*'nin daha fazla bulunması da bazı tümörlerin neden “anjiyo” grubunda olduğunu ve bu tümörlerin neden immünojenik olarak aktif olmadıklarını açıklayabilir.

CXCR7 inhibisyonu, son zamanlarda kanser tedavisinde de deneysel modellerde denenmeye başlamıştır (Walters et al., 2014). ACT-1004-1239 isimli molekül, insanlarda çalışılmaya başlanmış ilk *CXCR7* antagonistidir (Huynh et al., 2021). Birkaç ön klinik çalışmada, *CXCR7*'nin blokajının ardından *CXCL11* ve *CXCL12* konsantrasyon gradientlerinin bozulduğunu ve dolaylı olarak *CXCR3*- ve *CXCR4*-pozitif hücrelerin kan damarlarından inflamasyonlu dokulara göçünün etkilendiği öne sürülmüştür (Lewellis and Knaut, 2012; Tiveron and Cremer, 2008) Çalışmamız ışığında, *CXCL12* ekspresyonu düşük olan hastalarda *CXCR7* blokajının (ACT-1004-1239), tümörün immün profilini değiştirmek ve TIL sayısını arttırmak için kullanılması düşünülebilir.

CXCL12 ifadesi, önce neo-adjuvan kemoterapi alan hastalarla, başlangıçta cerrahi geçiren hastalar arasında değişmemektedir. Wu ve arkadaşlarının EOK'li hastalarda yaptığı çalışmada, neo-adjuvan kemoterapinin CD8+ hücreleri arttırdığı ve immün baskılayıcı Treg'leri azalttığı gösterilmiştir (Wu et al., 2010). Yine, Coleman

ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada neo-adjuvan kemoterapinin CD8+ T lenfositleri arttırdığı gösterilmiştir (Coleman et al., 2005). De Bruyn ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada neo-adjuvan kemoterapinin immün-süpresyonu azaltacağı gösterilmiş ve immün-ilişkili proteinlerde neo-adjuvan kemoterapi sonrasında artma gösterilmiştir. Fakat aynı çalışmada *CXCL12* düzeyinin tedavi öncesi ve tedavi sonrası değişmediği bulunmuştur (De Bruyn et al., 2021). Çalışmamızda öncelikli cerrahi ile rezeke edilebilen tümörler rezeke edilmiş, genellikle rezeke edilemeyen (ya da daha az olmakla beraber hasta morbiditesi yüksek olan durumlarda) tümörler neo-adjuvan kemoterapi almıştır. Dolaysı ile neo-adjuvan kemoterapi alan tümörler genellikle başlangıçta daha agresif davranmaktadır. Bu konuda daha sağlıklı bir analiz (neo-adjuvan kemoterapinin *CXCL12* ifadesine etki edip etmediği) yapılabilmesi için aynı hastadan tedavi öncesi ve sonrası tümör dokusu örneği alınıp bu dokularda *CXCL12* ifadesini değerlendirmek daha sağlıklı olacaktır. Yine de neo-adjuvan kemoterapi alan hastalarda *CXCL12* ekspresyonu değişmeden CD8+ T lenfosit sayısı (tümöre immün yanıt) artmakta olduğu görülmüştür.

Çalışmanın kısıtlı yanlarından bir tanesi, çalışmanın retrospektif bir çalışma olmasıdır. Özellikle hastaların hangi kriterlere göre neo-adjuvan kemoterapiye yönlendirildiği ve ameliyattaki gerçek rezidüsüz (R0) cerrahi oranı net değildir. Ayrıca, prospektif bir çalışmada sağlanacak taze dokudan ekspresyon çalışması daha sağlıklı olacaktır. Bir diğer kısıtlılık ise, TIL sayısı ile CXCR4-CXCR7 reseptör pozitifliğinin ve *CXCL12* ligand ifadesinin incelenmesi, yalnızca bu belirli moleküllerin rolüne odaklanarak diğer kemokin reseptörlerinin/ligandlarının (örneğin CXCR7 için *CXCL11* ligandı) ve halihazırda tedavide hedeflenen immün reseptörlerin (PD-1/PDL-1 gibi) ekspresyonlarının incelenip bir ilişki araştırılamaması, bir kısıtlılık olarak düşünülebilir. Son olarak, *CXCL12* ifadesinin epigenetik olarak nasıl kontrol edildiğinin incelenmesi, bütçe kısıtlılığı nedeni ile yapılamamıştır. Bu bilginin olmayışı da bir kısıtlılık olarak düşünülebilir.

7. SONUÇ

EOK'de *CXCL12* değişken oranda ifade edilmektedir. *CXCL12* ekspresyonu bağımsız bir prognostik faktör değildir. Tümörde kemokin reseptörleri *CXCR7* ve *CXCR4*'ün yoğun olarak bulunması, tümöre T lenfosit girişini serbest ligand azlığı nedeni ile azaltmaktadır. *CXCL12*'nin belirli bir eğiğın üstünde ekspresyonu, TIL sayısını arttırmakta ve bu ilişkiyi *CXCR7* ya da *CXCR4* ekspresyonu değiştirmemektedir. Neo-adjuvan kemoterapi, literatürle uyumlu olarak CD8+ T lenfosit sayısını, başka bir deyişle tümörün immünojenitesini, *CXCL12* ifadesini değiştirmeden arttırmaktadır. Çalışmamız, EOK'de bilgilerimize göre *CXCR4*-*CXCR7*-*CXCL12* aksının tümü ile tümörün immün durumu arasındaki ilişkiyi ve bunun prognostik önemini inceleyen ilk çalışmadır. Mevcut çalışma ışığında, *CXCL12* ifadesi düşük olan hastalarda *CXCR7* blokajının (ACT-1004-1239), tümörün immün profilini değiştirmede PD-1/PDL-1 antagonistleri ile beraber kullanılması düşünülebilir.

KAYNAKLAR

- Ahmed, A. A., Etemadmoghadam, D., Temple, J., Lynch, A. G., Riad, M., Sharma, R., Stewart, C., Fereday, S., Caldas, C., Defazio, A., Bowtell, D., and Brenton, J. D. (2010). Driver mutations in TP53 are ubiquitous in high grade serous carcinoma of the ovary. *J Pathol*, 221(1), 49-56. doi:10.1002/path.2696
- Allinen, M., Beroukhi, R., Cai, L., Brennan, C., Lahti-Domenici, J., Huang, H., Porter, D., Hu, M., Chin, L., Richardson, A., Schnitt, S., Sellers, W. R., and Polyak, K. (2004). Molecular characterization of the tumor microenvironment in breast cancer. *Cancer Cell*, 6(1), 17-32. doi:10.1016/j.ccr.2004.06.010
- Alsop, K., Fereday, S., Meldrum, C., deFazio, A., Emmanuel, C., George, J., Dobrovic, A., Birrer, M. J., Webb, P. M., Stewart, C., Friedlander, M., Fox, S., Bowtell, D., and Mitchell, G. (2012). BRCA mutation frequency and patterns of treatment response in BRCA mutation-positive women with ovarian cancer: a report from the Australian Ovarian Cancer Study Group. *J Clin Oncol*, 30(21), 2654-2663. doi:10.1200/JCO.2011.39.8545
- Bachelier, F., Graham, G. J., Locati, M., Mantovani, A., Murphy, P. M., Nibbs, R., Rot, A., Sozzani, S., and Thelen, M. (2014). New nomenclature for atypical chemokine receptors. *Nat Immunol*, 15(3), 207-208. doi:10.1038/ni.2812
- Baggiolini, M. (1998). Chemokines and leukocyte traffic. *Nature*, 392(6676), 565-568. doi:10.1038/33340
- Balabanian, K., Lagane, B., Infantino, S., Chow, K. Y., Harriague, J., Moepps, B., Arenzana-Seisdedos, F., Thelen, M., and Bachelier, F. (2005). The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes. *J Biol Chem*, 280(42), 35760-35766. doi:10.1074/jbc.M508234200
- Balkwill, F. (2004a). Cancer and the chemokine network. *Nat Rev Cancer*, 4(7), 540-550. doi:10.1038/nrc1388
- Balkwill, F. (2004b). The significance of cancer cell expression of the chemokine receptor CXCR4. *Semin Cancer Biol*, 14(3), 171-179. doi:10.1016/j.semcancer.2003.10.003
- Bast, R. C., Jr., Hennessey, B., and Mills, G. B. (2009). The biology of ovarian cancer: new opportunities for translation. *Nat Rev Cancer*, 9(6), 415-428. doi:10.1038/nrc2644
- Bellora, F., Dondero, A., Corrias, M. V., Casu, B., Regis, S., Caliendo, F., Moretta, A., Cazzola, M., Elena, C., Vinti, L., Locatelli, F., Bottino, C., and Castriconi, R. (2017). Imatinib and Nilotinib Off-Target Effects on Human NK Cells, Monocytes, and M2 Macrophages. *J Immunol*, 199(4), 1516-1525. doi:10.4049/jimmunol.1601695
- Berahovich, R. D., Zabel, B. A., Penfold, M. E., Lewen, S., Wang, Y., Miao, Z., Gan, L., Pereda, J., Dias, J., Slukvin, I., McGrath, K. E., Jaen, J. C., and Schall, T. J. (2010). CXCR7 protein is not expressed on human or mouse leukocytes. *J Immunol*, 185(9), 5130-5139. doi:10.4049/jimmunol.1001660
- Berek, J. S., Kehoe, S. T., Kumar, L., and Friedlander, M. (2018). Cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum. *Int J Gynaecol Obstet*, 143 Suppl 2, 59-78. doi:10.1002/ijgo.12614
- Biasci, D., Smoragiewicz, M., Connell, C. M., Wang, Z., Gao, Y., Thaventhiran, J. E. D., Basu, B., Magiera, L., Johnson, T. I., Bax, L., Gopinathan, A., Isherwood, C., Gallagher, F. A., Pawula, M., Hudecova, I., Gale, D., Rosenfeld, N., Barmounakis, P., Popa, E. C., Brais, R., Godfrey, E., Mir, F., Richards, F. M., Fearon, D. T., Janowitz, T., and Jodrell, D. I. (2020). CXCR4 inhibition in human pancreatic and colorectal cancers induces an

- integrated immune response. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 117(46), 28960-28970. doi:10.1073/pnas.2013644117
- Bleul, C. C., Fuhlbrigge, R. C., Casasnovas, J. M., Aiuti, A., and Springer, T. A. (1996). A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1). *J Exp Med*, 184(3), 1101-1109. doi:10.1084/jem.184.3.1101
- Bleul, C. C., Wu, L., Hoxie, J. A., Springer, T. A., and Mackay, C. R. (1997). The HIV coreceptors CXCR4 and CCR5 are differentially expressed and regulated on human T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(5), 1925-1930. doi:10.1073/pnas.94.5.1925
- Bogani, G., Matteucci, L., Tamberi, S., Ditto, A., Sabatucci, I., Murgia, F., Arcangeli, V., Maltese, G., Commerci, G., Stefanetti, M., Sonetto, C., Calareso, G., Marchiano, A., Chiappa, V., Lorusso, D., and Raspagliesi, F. (2019). RECIST 1.1 criteria predict recurrence-free survival in advanced ovarian cancer submitted to neoadjuvant chemotherapy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 237, 93-99. doi:10.1016/j.ejogrb.2019.04.007
- Bohm, S., Montfort, A., Pearce, O. M., Topping, J., Chakravarty, P., Everitt, G. L., Clear, A., McDermott, J. R., Ennis, D., Dowe, T., Fitzpatrick, A., Brockbank, E. C., Lawrence, A. C., Jeyarajah, A., Faruqi, A. Z., McNeish, I. A., Singh, N., Lockley, M., and Balkwill, F. R. (2016). Neoadjuvant Chemotherapy Modulates the Immune Microenvironment in Metastases of Tubo-Ovarian High-Grade Serous Carcinoma. *Clin Cancer Res*, 22(12), 3025-3036. doi:10.1158/1078-0432.CCR-15-2657
- Boldajipour, B., Mahabaleswar, H., Kardash, E., Reichman-Fried, M., Blaser, H., Minina, S., Wilson, D., Xu, Q., and Raz, E. (2008). Control of chemokine-guided cell migration by ligand sequestration. *Cell*, 132(3), 463-473. doi:10.1016/j.cell.2007.12.034
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., and Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*, 68(6), 394-424. doi:10.3322/caac.21492
- Burns, J. M., Summers, B. C., Wang, Y., Melikian, A., Berahovich, R., Miao, Z., Penfold, M. E., Sunshine, M. J., Littman, D. R., Kuo, C. J., Wei, K., McMaster, B. E., Wright, K., Howard, M. C., and Schall, T. J. (2006). A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development. *J Exp Med*, 203(9), 2201-2213. doi:10.1084/jem.20052144
- Cancer Genome Atlas Research, N. (2011). Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature*, 474(7353), 609-615. doi:10.1038/nature10166
- Ceradini, D. J., Kulkarni, A. R., Callaghan, M. J., Tepper, O. M., Bastidas, N., Kleinman, M. E., Capla, J. M., Galiano, R. D., Levine, J. P., and Gurtner, G. C. (2004). Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nat Med*, 10(8), 858-864. doi:10.1038/nm1075
- Charo, I. F., and Ransohoff, R. M. (2006). The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med*, 354(6), 610-621. doi:10.1056/NEJMra052723
- Chen, D. S., and Mellman, I. (2013). Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity*, 39(1), 1-10. doi:10.1016/j.immuni.2013.07.012
- Chen, Y., Huang, Y., Reiberger, T., Duyverman, A. M., Huang, P., Samuel, R., Hiddingh, L., Roberge, S., Koppel, C., Lauwers, G. Y., Zhu, A. X., Jain, R. K., and Duda, D. G. (2014). Differential effects of sorafenib on liver versus tumor fibrosis mediated by stromal-derived factor 1 alpha/C-X-C receptor type 4 axis and myeloid differentiation antigen-

- positive myeloid cell infiltration in mice. *Hepatology*, 59(4), 1435-1447. doi:10.1002/hep.26790
- Chen, Y., Ramjiawan, R. R., Reiberger, T., Ng, M. R., Hato, T., Huang, Y., Ochiai, H., Kitahara, S., Unan, E. C., Reddy, T. P., Fan, C., Huang, P., Bardeesy, N., Zhu, A. X., Jain, R. K., and Duda, D. G. (2015). CXCR4 inhibition in tumor microenvironment facilitates anti-programmed death receptor-1 immunotherapy in sorafenib-treated hepatocellular carcinoma in mice. *Hepatology*, 61(5), 1591-1602. doi:10.1002/hep.27665
- Clatot, F., Cornic, M., Berghian, A., Marchand, V., Choussy, O., El Ouakif, F., Francois, A., Ruminy, P., Laberge-Le-Couteulx, S., Picquenot, J. M., and Jardin, F. (2015). CXCL12 and CXCR4, but not CXCR7, are primarily expressed by the stroma in head and neck squamous cell carcinoma. *Pathology*, 47(1), 45-50. doi:10.1097/PAT.0000000000000191
- Coleman, S., Clayton, A., Mason, M. D., Jasani, B., Adams, M., and Tabi, Z. (2005). Recovery of CD8+ T-cell function during systemic chemotherapy in advanced ovarian cancer. *Cancer Res*, 65(15), 7000-7006. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-3792
- Conrad, C., Gregorio, J., Wang, Y. H., Ito, T., Meller, S., Hanabuchi, S., Anderson, S., Atkinson, N., Ramirez, P. T., Liu, Y. J., Freedman, R., and Gilliet, M. (2012). Plasmacytoid dendritic cells promote immunosuppression in ovarian cancer via ICOS costimulation of Foxp3(+) T-regulatory cells. *Cancer Res*, 72(20), 5240-5249. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-2271
- Curiel, T. J., Coukos, G., Zou, L., Alvarez, X., Cheng, P., Mottram, P., Evdemon-Hogan, M., Conejo-Garcia, J. R., Zhang, L., Burow, M., Zhu, Y., Wei, S., Kryczek, I., Daniel, B., Gordon, A., Myers, L., Lackner, A., Disis, M. L., Knutson, K. L., Chen, L., and Zou, W. (2004). Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med*, 10(9), 942-949. doi:10.1038/nm1093
- D'Agostino, G., Cecchinato, V., and Uguccioni, M. (2018). Chemokine Heterocomplexes and Cancer: A Novel Chapter to Be Written in Tumor Immunity. *Front Immunol*, 9, 2185. doi:10.3389/fimmu.2018.02185
- D'Alterio, C., Spina, A., Arenare, L., Chiodini, P., Napolitano, M., Galdiero, F., Portella, L., Simeon, V., Signoriello, S., Raspagliesi, F., Lorusso, D., Pisano, C., Colombo, N., Zannoni, G. F., Losito, N. S., De Cecio, R., Scognamiglio, G., Califano, D., Russo, D., Tuninetti, V., Piccirillo, M. C., Gargiulo, P., Perrone, F., Pignata, S., and Scala, S. (2022). Biological Role of Tumor/Stromal CXCR4-CXCL12-CXCR7 in MITO16A/MaNGO-OV2 Advanced Ovarian Cancer Patients. *Cancers (Basel)*, 14(7). doi:10.3390/cancers14071849
- Dambly-Chaudiere, C., Cubedo, N., and Ghysen, A. (2007). Control of cell migration in the development of the posterior lateral line: antagonistic interactions between the chemokine receptors CXCR4 and CXCR7/RDC1. *BMC Dev Biol*, 7, 23. doi:10.1186/1471-213X-7-23
- De Bruyn, C., Ceusters, J., Landolfo, C., Baert, T., Thirion, G., Claes, S., Vankerckhoven, A., Wouters, R., Schols, D., Timmerman, D., Vergote, I., and Coosemans, A. (2021). Neo-Adjuvant Chemotherapy Reduces, and Surgery Increases Immunosuppression in First-Line Treatment for Ovarian Cancer. *Cancers (Basel)*, 13(23). doi:10.3390/cancers13235899
- Detin, M., Pasquato, A., Scarinci, C., Zanchetta, M., De Rossi, A., and Di Bello, C. (2004). Anti-HIV activity and conformational studies of peptides derived from the C-terminal sequence of SDF-1. *J Med Chem*, 47(12), 3058-3064. doi:10.1021/jm031067a

- Dunn, G. P., Bruce, A. T., Ikeda, H., Old, L. J., and Schreiber, R. D. (2002). Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol*, 3(11), 991-998. doi:10.1038/ni1102-991
- Feig, C., Jones, J. O., Kraman, M., Wells, R. J., Deonaraine, A., Chan, D. S., Connell, C. M., Roberts, E. W., Zhao, Q., Caballero, O. L., Teichmann, S. A., Janowitz, T., Jodrell, D. I., Tuveson, D. A., and Fearon, D. T. (2013). Targeting CXCL12 from FAP-expressing carcinoma-associated fibroblasts synergizes with anti-PD-L1 immunotherapy in pancreatic cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(50), 20212-20217. doi:10.1073/pnas.1320318110
- Flecken, T., Schmidt, N., Hild, S., Gostick, E., Drognitz, O., Zeiser, R., Schemmer, P., Bruns, H., Eiermann, T., Price, D. A., Blum, H. E., Neumann-Haefelin, C., and Thimme, R. (2014). Immunodominance and functional alterations of tumor-associated antigen-specific CD8+ T-cell responses in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 59(4), 1415-1426. doi:10.1002/hep.26731
- Fridman, W. H., Pages, F., Sautes-Fridman, C., and Galon, J. (2012). The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer*, 12(4), 298-306. doi:10.1038/nrc3245
- Galon, J., Costes, A., Sanchez-Cabo, F., Kirilovsky, A., Mlecnik, B., Lagorce-Pages, C., Tosolini, M., Camus, M., Berger, A., Wind, P., Zinzindohoue, F., Bruneval, P., Cugnenc, P. H., Trajanoski, Z., Fridman, W. H., and Pages, F. (2006). Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science*, 313(5795), 1960-1964. doi:10.1126/science.1129139
- Garg, B., Giri, B., Modi, S., Sethi, V., Castro, I., Umland, O., Ban, Y., Lavania, S., Dawra, R., Banerjee, S., Vickers, S., Merchant, N. B., Chen, S. X., Gilboa, E., Ramakrishnan, S., Saluja, A., and Dudeja, V. (2018). NFkappaB in Pancreatic Stellate Cells Reduces Infiltration of Tumors by Cytotoxic T Cells and Killing of Cancer Cells, via Up-regulation of CXCL12. *Gastroenterology*, 155(3), 880-891 e888. doi:10.1053/j.gastro.2018.05.051
- Gemignani, M. L., Schlaerth, A. C., Bogomolnii, F., Barakat, R. R., Lin, O., Soslow, R., Venkatraman, E., and Boyd, J. (2003). Role of KRAS and BRAF gene mutations in mucinous ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol*, 90(2), 378-381. doi:10.1016/s0090-8258(03)00264-6
- Germain, R. N. (2002). T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision. *Nat Rev Immunol*, 2(5), 309-322. doi:10.1038/nri798
- Gillette, J. M., Larochelle, A., Dunbar, C. E., and Lippincott-Schwartz, J. (2009). Intercellular transfer to signalling endosomes regulates an ex vivo bone marrow niche. *Nat Cell Biol*, 11(3), 303-311. doi:10.1038/ncb1838
- Gooden, M. J., de Bock, G. H., Leffers, N., Daemen, T., and Nijman, H. W. (2011). The prognostic influence of tumour-infiltrating lymphocytes in cancer: a systematic review with meta-analysis. *Br J Cancer*, 105(1), 93-103. doi:10.1038/bjc.2011.189
- Gourley, C., McCavigan, A., Perren, T., Paul, J., Michie, C. O., Churchman, M., Williams, A., McCluggage, W. G., Parmar, M., Kaplan, R. S., Hill, L. A., Halfpenny, I. A., O'Brien, E. J., Raji, O., Deharo, S., Davison, T., Johnston, P., Keating, K. E., Harkin, D. P., and Kennedy, R. D. (2014). Molecular subgroup of high-grade serous ovarian cancer (HGSOC) as a predictor of outcome following bevacizumab. *Journal of Clinical Oncology*, 32(15_suppl), 5502-5502. doi:10.1200/jco.2014.32.15_suppl.5502
- Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013

- Hattermann, K., Held-Feindt, J., Lucius, R., Muerkoster, S. S., Penfold, M. E., Schall, T. J., and Mentlein, R. (2010). The chemokine receptor CXCR7 is highly expressed in human glioma cells and mediates antiapoptotic effects. *Cancer Res*, 70(8), 3299-3308. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-3642
- Hinton, C. V., Avraham, S., and Avraham, H. K. (2010). Role of the CXCR4/CXCL12 signaling axis in breast cancer metastasis to the brain. *Clin Exp Metastasis*, 27(2), 97-105. doi:10.1007/s10585-008-9210-2
- Huang, Y., Goel, S., Duda, D. G., Fukumura, D., and Jain, R. K. (2013). Vascular normalization as an emerging strategy to enhance cancer immunotherapy. *Cancer Res*, 73(10), 2943-2948. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-4354
- Huynh, C., Brussee, J. M., Pouzol, L., Fonseca, M., Meyer Zu Schwabedissen, H. E., Dingemans, J., and Sidharta, P. N. (2021). Target engagement of the first-in-class CXCR7 antagonist ACT-1004-1239 following multiple-dose administration in mice and humans. *Biomed Pharmacother*, 144, 112363. doi:10.1016/j.biopha.2021.112363
- Hwang, W. T., Adams, S. F., Tahirovic, E., Hagemann, I. S., and Coukos, G. (2012). Prognostic significance of tumor-infiltrating T cells in ovarian cancer: a meta-analysis. *Gynecol Oncol*, 124(2), 192-198. doi:10.1016/j.ygyno.2011.09.039
- Infantino, S., Moepps, B., and Thelen, M. (2006). Expression and regulation of the orphan receptor RDC1 and its putative ligand in human dendritic and B cells. *J Immunol*, 176(4), 2197-2207. doi:10.4049/jimmunol.176.4.2197
- Jaafar, F., Righi, E., Lindstrom, V., Linton, C., Nohadani, M., Van Noorden, S., Lloyd, T., Poznansky, J., Stamp, G., Dina, R., Coleman, D. V., and Poznansky, M. C. (2009). Correlation of CXCL12 expression and FoxP3+ cell infiltration with human papillomavirus infection and clinicopathological progression of cervical cancer. *Am J Pathol*, 175(4), 1525-1535. doi:10.2353/ajpath.2009.090295
- Janowski, M. (2009). Functional diversity of SDF-1 splicing variants. *Cell Adh Migr*, 3(3), 243-249. doi:10.4161/cam.3.3.8260
- Janssens, R., Struyf, S., and Proost, P. (2018). The unique structural and functional features of CXCL12. *Cell Mol Immunol*, 15(4), 299-311. doi:10.1038/cmi.2017.107
- Jiang, Y. P., Wu, X. H., Shi, B., Wu, W. X., and Yin, G. R. (2006). Expression of chemokine CXCL12 and its receptor CXCR4 in human epithelial ovarian cancer: an independent prognostic factor for tumor progression. *Gynecol Oncol*, 103(1), 226-233. doi:10.1016/j.ygyno.2006.02.036
- Kaka, A. S., Shaffer, D. R., Hartmaier, R., Leen, A. M., Lu, A., Bear, A., Rooney, C. M., and Foster, A. E. (2009). Genetic modification of T cells with IL-21 enhances antigen presentation and generation of central memory tumor-specific cytotoxic T-lymphocytes. *J Immunother*, 32(7), 726-736. doi:10.1097/CJI.0b013e3181ad4071
- Keeley, E. C., Mehrad, B., and Strieter, R. M. (2010). CXC chemokines in cancer angiogenesis and metastases. *Adv Cancer Res*, 106, 91-111. doi:10.1016/S0065-230X(10)06003-3
- Kremer, K. N., Humphreys, T. D., Kumar, A., Qian, N. X., and Hedin, K. E. (2003). Distinct role of ZAP-70 and Src homology 2 domain-containing leukocyte protein of 76 kDa in the prolonged activation of extracellular signal-regulated protein kinase by the stromal cell-derived factor-1 alpha/CXCL12 chemokine. *J Immunol*, 171(1), 360-367. doi:10.4049/jimmunol.171.1.360

- Kruizinga, R. C., Bestebroer, J., Berghuis, P., de Haas, C. J., Links, T. P., de Vries, E. G., and Walenkamp, A. M. (2009). Role of chemokines and their receptors in cancer. *Curr Pharm Des*, 15(29), 3396-3416. doi:10.2174/138161209789105081
- Kryczek, I., Wei, S., Keller, E., Liu, R., and Zou, W. (2007). Stroma-derived factor (SDF-1/CXCL12) and human tumor pathogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol*, 292(3), C987-995. doi:10.1152/ajpcell.00406.2006
- Kucia, M., Wojakowski, W., Reza, R., Machalinski, B., Gozdzik, J., Majka, M., Baran, J., Ratajczak, J., and Ratajczak, M. Z. (2006). The migration of bone marrow-derived non-hematopoietic tissue-committed stem cells is regulated in an SDF-1-, HGF-, and LIF-dependent manner. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 54(2), 121-135. doi:10.1007/s00005-006-0015-1
- Kuhn, E., Kurman, R. J., Vang, R., Sehdev, A. S., Han, G., Soslow, R., Wang, T. L., and Shih Ie, M. (2012). TP53 mutations in serous tubal intraepithelial carcinoma and concurrent pelvic high-grade serous carcinoma--evidence supporting the clonal relationship of the two lesions. *J Pathol*, 226(3), 421-426. doi:10.1002/path.3023
- Kyriakou, C., Rabin, N., Pizzey, A., Nathwani, A., and Yong, K. (2008). Factors that influence short-term homing of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a xenogeneic animal model. *Haematologica*, 93(10), 1457-1465. doi:10.3324/haematol.12553
- Labidi-Galy, S. I., Papp, E., Hallberg, D., Niknafs, N., Adleff, V., Noe, M., Bhattacharya, R., Novak, M., Jones, S., Phallen, J., Hruban, C. A., Hirsch, M. S., Lin, D. I., Schwartz, L., Maire, C. L., Tille, J. C., Bowden, M., Ayhan, A., Wood, L. D., Scharpf, R. B., Kurman, R., Wang, T. L., Shih, I. M., Karchin, R., Drapkin, R., and Velculescu, V. E. (2017). High grade serous ovarian carcinomas originate in the fallopian tube. *Nat Commun*, 8(1), 1093. doi:10.1038/s41467-017-00962-1
- Lewellis, S. W., and Knaut, H. (2012). Attractive guidance: how the chemokine SDF1/CXCL12 guides different cells to different locations. *Semin Cell Dev Biol*, 23(3), 333-340. doi:10.1016/j.semcdb.2012.03.009
- Li, B., Wang, Z., Wu, H., Xue, M., Lin, P., Wang, S., Lin, N., Huang, X., Pan, W., Liu, M., Yan, X., Qu, H., Sun, L., Li, H., Wu, Y., Teng, W., Wang, Z., Zhou, X., Chen, H., Poznansky, M. C., and Ye, Z. (2018). Epigenetic Regulation of CXCL12 Plays a Critical Role in Mediating Tumor Progression and the Immune Response In Osteosarcoma. *Cancer Res*, 78(14), 3938-3953. doi:10.1158/0008-5472.CAN-17-3801
- Lin, Y. N., Schmidt, M. O., Sharif, G. M., Vietsch, E. E., Kiliti, A. J., Barefoot, M. E., Riegel, A. T., and Wellstein, A. (2022). Impaired CXCL12 signaling contributes to resistance of pancreatic cancer subpopulations to T cell-mediated cytotoxicity. *Oncoimmunology*, 11(1), 2027136. doi:10.1080/2162402X.2022.2027136
- Liu, S., Foulkes, W. D., Leung, S., Gao, D., Lau, S., Kos, Z., and Nielsen, T. O. (2014). Prognostic significance of FOXP3+ tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer depends on estrogen receptor and human epidermal growth factor receptor-2 expression status and concurrent cytotoxic T-cell infiltration. *Breast Cancer Res*, 16(5), 432. doi:10.1186/s13058-014-0432-8
- Liu, Y., Ren, C. C., Yang, L., Xu, Y. M., and Chen, Y. N. (2019). Role of CXCL12-CXCR4 axis in ovarian cancer metastasis and CXCL12-CXCR4 blockade with AMD3100 suppresses tumor cell migration and invasion in vitro. *J Cell Physiol*, 234(4), 3897-3909. doi:10.1002/jcp.27163

- Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25(4), 402-408. doi:10.1006/meth.2001.1262
- Lorente, C. M., Mackay, H., Laframboise, S., O'Brien, C., Butler, M. O., Dhani, N. C., Wilson, M. K., Lheureux, S., Rodriguez-Freixinos, V., Rosen, B., Murphy, J., Ferguson, S. E., Bernardini, M., Dodge, J., Lau, A., Wang, L., and Oza, A. M. (2015). An analysis of malignant bowel obstruction (MBO) outcomes in patients with epithelial ovarian carcinoma (EOC). *Journal of Clinical Oncology*, 33(15_suppl), e16586-e16586. doi:10.1200/jco.2015.33.15_suppl.e16586
- Mantia-Saldone, G. M., Corr, B., and Chu, C. S. (2012). Immunotherapy in ovarian cancer. *Hum Vaccin Immunother*, 8(9), 1179-1191. doi:10.4161/hv.20738
- Marechal, R., Demetter, P., Nagy, N., Berton, A., Decaestecker, C., Polus, M., Closset, J., Deviere, J., Salmon, I., and Van Laethem, J. L. (2009). High expression of CXCR4 may predict poor survival in resected pancreatic adenocarcinoma. *Br J Cancer*, 100(9), 1444-1451. doi:10.1038/sj.bjc.6605020
- McConechy, M. K., Ding, J., Senz, J., Yang, W., Melnyk, N., Tone, A. A., Prentice, L. M., Wiegand, K. C., McAlpine, J. N., Shah, S. P., Lee, C. H., Goodfellow, P. J., Gilks, C. B., and Huntsman, D. G. (2014). Ovarian and endometrial endometrioid carcinomas have distinct CTNNB1 and PTEN mutation profiles. *Mod Pathol*, 27(1), 128-134. doi:10.1038/modpathol.2013.107
- Mellado, M., Rodriguez-Frade, J. M., Manes, S., and Martinez, A. C. (2001). Chemokine signaling and functional responses: the role of receptor dimerization and TK pathway activation. *Annu Rev Immunol*, 19, 397-421. doi:10.1146/annurev.immunol.19.1.397
- Mesnage, S. J. L., Auguste, A., Genestie, C., Dunant, A., Pain, E., Drusch, F., Gouy, S., Morice, P., Bentivegna, E., Lhomme, C., Pautier, P., Michels, J., Le Formal, A., Cheaib, B., Adam, J., and Leary, A. F. (2017). Neoadjuvant chemotherapy (NACT) increases immune infiltration and programmed death-ligand 1 (PD-L1) expression in epithelial ovarian cancer (EOC). *Ann Oncol*, 28(3), 651-657. doi:10.1093/annonc/mdw625
- Miao, Z., Luker, K. E., Summers, B. C., Berahovich, R., Bhojani, M. S., Rehemtulla, A., Kleer, C. G., Essner, J. J., Nasevicius, A., Luker, G. D., Howard, M. C., and Schall, T. J. (2007). CXCR7 (RDC1) promotes breast and lung tumor growth in vivo and is expressed on tumor-associated vasculature. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(40), 15735-15740. doi:10.1073/pnas.0610444104
- Mollica Poeta, V., Massara, M., Capucetti, A., and Bonecchi, R. (2019). Chemokines and Chemokine Receptors: New Targets for Cancer Immunotherapy. *Front Immunol*, 10, 379. doi:10.3389/fimmu.2019.00379
- Moreno, M. J., Gallardo, A., Novelli, S., Mozos, A., Arago, M., Pavon, M. A., Cespedes, M. V., Pallares, V., Falgas, A., Alcoceba, M., Blanco, O., Gonzalez-Diaz, M., Sierra, J., Mangues, R., and Casanova, I. (2018). CXCR7 expression in diffuse large B-cell lymphoma identifies a subgroup of CXCR4+ patients with good prognosis. *PLoS One*, 13(6), e0198789. doi:10.1371/journal.pone.0198789
- Motz, G. T., and Coukos, G. (2011). The parallel lives of angiogenesis and immunosuppression: cancer and other tales. *Nat Rev Immunol*, 11(10), 702-711. doi:10.1038/nri3064
- Muller, A., Homey, B., Soto, H., Ge, N., Catron, D., Buchanan, M. E., McClanahan, T., Murphy, E., Yuan, W., Wagner, S. N., Barrera, J. L., Mohar, A., Verastegui, E., and Zlotnik, A.

- (2001). Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature*, 410(6824), 50-56. doi:10.1038/35065016
- Naumann, U., Cameroni, E., Pruenster, M., Mahabaleswar, H., Raz, E., Zerwes, H. G., Rot, A., and Thelen, M. (2010). CXCR7 functions as a scavenger for CXCL12 and CXCL11. *PLoS One*, 5(2), e9175. doi:10.1371/journal.pone.0009175
- New, D. C., and Wong, Y. H. (2003). CC chemokine receptor-coupled signalling pathways. *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai)*, 35(9), 779-788. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12958648>
- Nomenclature, I. W. S. o. C. (2003). Chemokine/chemokine receptor nomenclature. *Cytokine*, 21(1), 48-49. doi:10.1016/s1043-4666(02)00493-3
- Norquist, B. M., Harrell, M. I., Brady, M. F., Walsh, T., Lee, M. K., Gulsuner, S., Bernards, S. S., Casadei, S., Yi, Q., Burger, R. A., Chan, J. K., Davidson, S. A., Mannel, R. S., DiSilvestro, P. A., Lankes, H. A., Ramirez, N. C., King, M. C., Swisher, E. M., and Birrer, M. J. (2016). Inherited Mutations in Women With Ovarian Carcinoma. *JAMA Oncol*, 2(4), 482-490. doi:10.1001/jamaoncol.2015.5495
- Olivier, R. I., Lubsen-Brandsma, M. A., Verhoef, S., and van Beurden, M. (2006). CA125 and transvaginal ultrasound monitoring in high-risk women cannot prevent the diagnosis of advanced ovarian cancer. *Gynecol Oncol*, 100(1), 20-26. doi:10.1016/j.ygyno.2005.08.038
- Orimo, A., Gupta, P. B., Sgroi, D. C., Arenzana-Seisdedos, F., Delaunay, T., Naeem, R., Carey, V. J., Richardson, A. L., and Weinberg, R. A. (2005). Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell*, 121(3), 335-348. doi:10.1016/j.cell.2005.02.034
- Oronsky, B., Ray, C. M., Spira, A. I., Trepel, J. B., Carter, C. A., and Cottrill, H. M. (2017). A brief review of the management of platinum-resistant-platinum-refractory ovarian cancer. *Med Oncol*, 34(6), 103. doi:10.1007/s12032-017-0960-z
- Peng, S. B., Peek, V., Zhai, Y., Paul, D. C., Lou, Q., Xia, X., Eessalu, T., Kohn, W., and Tang, S. (2005). Akt activation, but not extracellular signal-regulated kinase activation, is required for SDF-1alpha/CXCR4-mediated migration of epitheloid carcinoma cells. *Mol Cancer Res*, 3(4), 227-236. doi:10.1158/1541-7786.MCR-04-0193
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 29(9), e45. doi:10.1093/nar/29.9.e45
- Popple, A., Durrant, L. G., Spendlove, I., Rolland, P., Scott, I. V., Deen, S., and Ramage, J. M. (2012). The chemokine, CXCL12, is an independent predictor of poor survival in ovarian cancer. *Br J Cancer*, 106(7), 1306-1313. doi:10.1038/bjc.2012.49
- Prat, J., and Oncology, F. C. o. G. (2014). Staging classification for cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum. *Int J Gynaecol Obstet*, 124(1), 1-5. doi:10.1016/j.ijgo.2013.10.001
- Quirk, J. T., Natarajan, N., and Mettlin, C. J. (2005). Age-specific ovarian cancer incidence rate patterns in the United States. *Gynecol Oncol*, 99(1), 248-250. doi:10.1016/j.ygyno.2005.06.052
- Ramonell, K. M., Zhang, W., Hadley, A., Chen, C. W., Fay, K. T., Lyons, J. D., Klingensmith, N. J., McConnell, K. W., Coopersmith, C. M., and Ford, M. L. (2017). CXCR4 blockade decreases CD4+ T cell exhaustion and improves survival in a murine model of polymicrobial sepsis. *PLoS One*, 12(12), e0188882. doi:10.1371/journal.pone.0188882

- Rao, X., Huang, X., Zhou, Z., and Lin, X. (2013). An improvement of the $2^{-(\Delta\Delta CT)}$ method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostat Bioinforma Biomath*, 3(3), 71-85. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25558171>
- Reid, B. M., Permuth, J. B., and Sellers, T. A. (2017). Epidemiology of ovarian cancer: a review. *Cancer Biol Med*, 14(1), 9-32. doi:10.20892/j.issn.2095-3941.2016.0084
- Rizvi, N. A., Hellmann, M. D., Snyder, A., Kvistborg, P., Makarov, V., Havel, J. J., Lee, W., Yuan, J., Wong, P., Ho, T. S., Miller, M. L., Rekhtman, N., Moreira, A. L., Ibrahim, F., Bruggeman, C., Gasmi, B., Zappasodi, R., Maeda, Y., Sander, C., Garon, E. B., Merghoub, T., Wolchok, J. D., Schumacher, T. N., and Chan, T. A. (2015). Cancer immunology. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science*, 348(6230), 124-128. doi:10.1126/science.aaa1348
- Romain, B., Hachet-Haas, M., Rohr, S., Brigand, C., Galzi, J. L., Gaub, M. P., Pencreach, E., and Guenot, D. (2014). Hypoxia differentially regulated CXCR4 and CXCR7 signaling in colon cancer. *Mol Cancer*, 13, 58. doi:10.1186/1476-4598-13-58
- Salmaggi, A., Maderna, E., Calatozzolo, C., Gaviani, P., Canazza, A., Milanese, I., Silvani, A., DiMeco, F., Carbone, A., and Pollo, B. (2009). CXCL12, CXCR4 and CXCR7 expression in brain metastases. *Cancer Biol Ther*, 8(17), 1608-1614. doi:10.4161/cbt.8.17.9202
- Sarosy, G. A., Hussain, M. M., Seiden, M. V., Fuller, A. F., Nikrui, N., Goodman, A., Minasian, L., Reed, E., Steinberg, S. M., and Kohn, E. C. (2010). Ten-year follow-up of a phase 2 study of dose-intense paclitaxel with cisplatin and cyclophosphamide as initial therapy for poor-prognosis, advanced-stage epithelial ovarian cancer. *Cancer*, 116(6), 1476-1484. doi:10.1002/cncr.24861
- Sato, E., Olson, S. H., Ahn, J., Bundy, B., Nishikawa, H., Qian, F., Jungbluth, A. A., Frosina, D., Gnjjatic, S., Ambrosone, C., Kepner, J., Odunsi, T., Ritter, G., Lele, S., Chen, Y. T., Ohtani, H., Old, L. J., and Odunsi, K. (2005). Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(51), 18538-18543. doi:10.1073/pnas.0509182102
- Schiraldi, M., Raucci, A., Munoz, L. M., Livoti, E., Celona, B., Venereau, E., Apuzzo, T., De Marchis, F., Pedotti, M., Bachi, A., Thelen, M., Varani, L., Mellado, M., Proudfoot, A., Bianchi, M. E., and Uguccioni, M. (2012). HMGB1 promotes recruitment of inflammatory cells to damaged tissues by forming a complex with CXCL12 and signaling via CXCR4. *J Exp Med*, 209(3), 551-563. doi:10.1084/jem.20111739
- Schrader, A. J., Lechner, O., Templin, M., Dittmar, K. E., Machtens, S., Mengel, M., Probst-Keppler, M., Franzke, A., Wollensak, T., Gatzlaff, P., Atzpodien, J., Buer, J., and Lauber, J. (2002). CXCR4/CXCL12 expression and signalling in kidney cancer. *Br J Cancer*, 86(8), 1250-1256. doi:10.1038/sj.bjc.6600221
- Secchiero, P., Celeghini, C., Cutroneo, G., Di Baldassarre, A., Rana, R., and Zauli, G. (2000). Differential effects of stromal derived factor-1 alpha (SDF-1 alpha) on early and late stages of human megakaryocytic development. *Anat Rec*, 260(2), 141-147. doi:10.1002/1097-0185(20001001)260:2<141::AID-AR40>3.0.CO;2-I
- Sharpe, A. H., and Freeman, G. J. (2002). The B7-CD28 superfamily. *Nat Rev Immunol*, 2(2), 116-126. doi:10.1038/nri727
- Smith, M. C., Luker, K. E., Garbow, J. R., Prior, J. L., Jackson, E., Piwnicka-Worms, D., and Luker, G. D. (2004). CXCR4 regulates growth of both primary and metastatic breast cancer. *Cancer Res*, 64(23), 8604-8612. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-1844

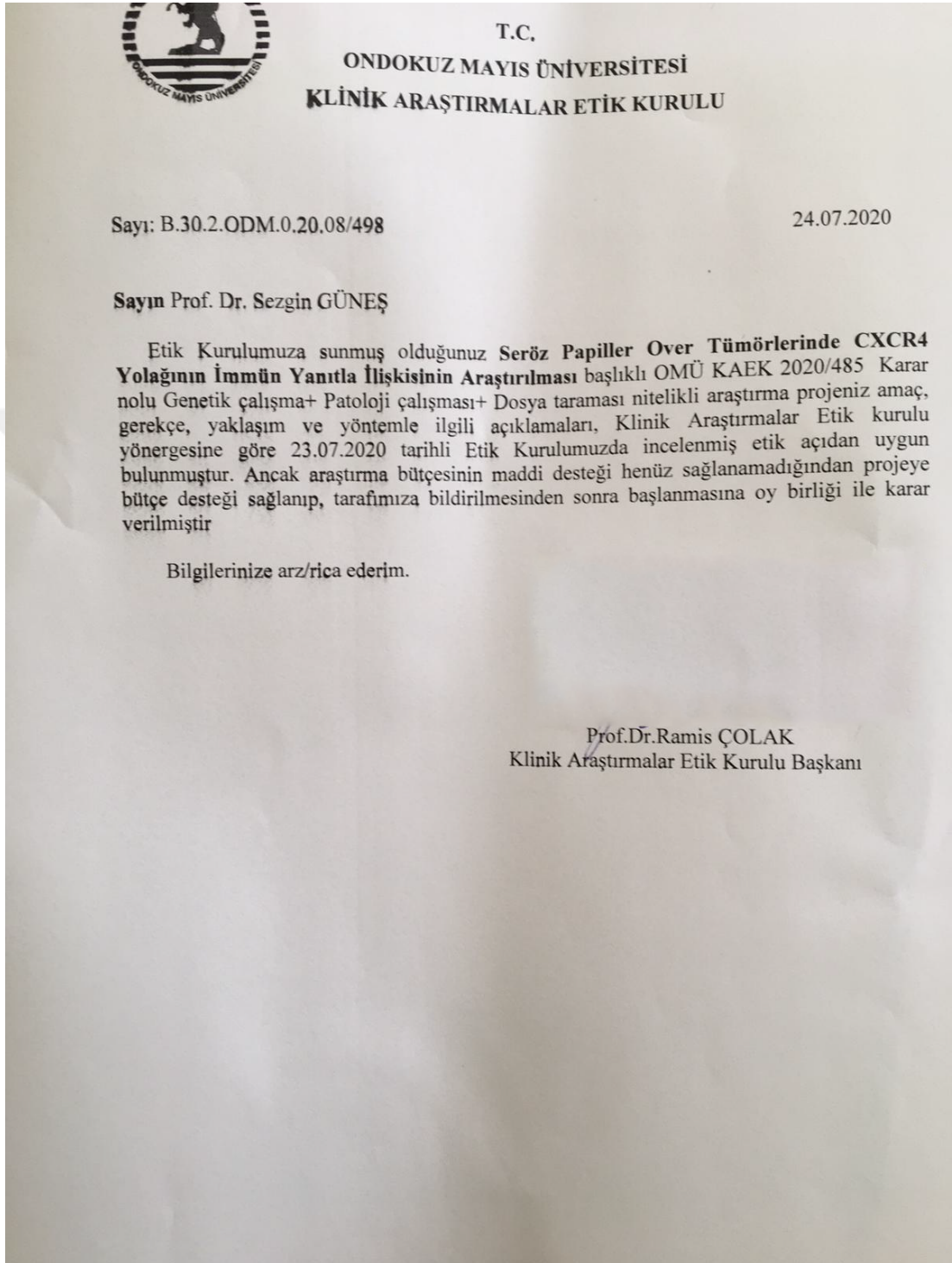
- Snyder, A., Makarov, V., Merghoub, T., Yuan, J., Zaretsky, J. M., Desrichard, A., Walsh, L. A., Postow, M. A., Wong, P., Ho, T. S., Hollmann, T. J., Bruggeman, C., Kannan, K., Li, Y., Elipenahli, C., Liu, C., Harbison, C. T., Wang, L., Ribas, A., Wolchok, J. D., and Chan, T. A. (2014). Genetic basis for clinical response to CTLA-4 blockade in melanoma. *N Engl J Med*, 371(23), 2189-2199. doi:10.1056/NEJMoa1406498
- Soldevila, G., Licona, I., Salgado, A., Ramirez, M., Chavez, R., and Garcia-Zepeda, E. (2004). Impaired chemokine-induced migration during T-cell development in the absence of Jak 3. *Immunology*, 112(2), 191-200. doi:10.1111/j.1365-2567.2004.01863.x
- Stewart, L., and Advanced Ovarian Cancer Trialists, G. (2000). Chemotherapy for advanced ovarian cancer. Advanced Ovarian Cancer Trialists Group. *Cochrane Database Syst Rev*(2), CD001418. doi:10.1002/14651858.CD001418
- Sun, X., Cheng, G., Hao, M., Zheng, J., Zhou, X., Zhang, J., Taichman, R. S., Pienta, K. J., and Wang, J. (2010). CXCL12 / CXCR4 / CXCR7 chemokine axis and cancer progression. *Cancer Metastasis Rev*, 29(4), 709-722. doi:10.1007/s10555-010-9256-x
- Suzuki, Y., Rahman, M., and Mitsuya, H. (2001). Diverse transcriptional response of CD4+ T cells to stromal cell-derived factor SDF-1: cell survival promotion and priming effects of SDF-1 on CD4+ T cells. *J Immunol*, 167(6), 3064-3073. doi:10.4049/jimmunol.167.6.3064
- Tafe, L. J., Muller, K. E., Ananda, G., Mitchell, T., Spotlow, V., Patterson, S. E., Tsongalis, G. J., and Mockus, S. M. (2016). Molecular Genetic Analysis of Ovarian Brenner Tumors and Associated Mucinous Epithelial Neoplasms: High Variant Concordance and Identification of Mutually Exclusive RAS Driver Mutations and MYC Amplification. *Am J Pathol*, 186(3), 671-677. doi:10.1016/j.ajpath.2015.11.008
- Tang, D., Kang, R., Cheh, C. W., Livesey, K. M., Liang, X., Schapiro, N. E., Benschop, R., Sparvero, L. J., Amoscato, A. A., Tracey, K. J., Zeh, H. J., and Lotze, M. T. (2010). HMGB1 release and redox regulates autophagy and apoptosis in cancer cells. *Oncogene*, 29(38), 5299-5310. doi:10.1038/onc.2010.261
- Tiveron, M. C., and Cremer, H. (2008). CXCL12/CXCR4 signalling in neuronal cell migration. *Curr Opin Neurobiol*, 18(3), 237-244. doi:10.1016/j.conb.2008.06.004
- Vianello, F., Papeta, N., Chen, T., Kraft, P., White, N., Hart, W. K., Kircher, M. F., Swart, E., Rhee, S., Palù, G., Irimia, D., Toner, M., Weissleder, R., and Poznansky, M. C. (2006). Murine B16 melanomas expressing high levels of the chemokine stromal-derived factor-1/CXCL12 induce tumor-specific T cell chemorepulsion and escape from immune control. *The Journal of Immunology*, 176(9), 5683-5683. doi:10.4049/jimmunol.176.9.5683-a
- Vila-Coro, A. J., Rodriguez-Frade, J. M., Martin De Ana, A., Moreno-Ortiz, M. C., Martinez, A. C., and Mellado, M. (1999). The chemokine SDF-1alpha triggers CXCR4 receptor dimerization and activates the JAK/STAT pathway. *FASEB J*, 13(13), 1699-1710. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10506573>
- Wald, O., Izhar, U., Amir, G., Avniel, S., Bar-Shavit, Y., Wald, H., Weiss, I. D., Galun, E., and Peled, A. (2006). CD4+CXCR4highCD69+ T cells accumulate in lung adenocarcinoma. *J Immunol*, 177(10), 6983-6990. doi:10.4049/jimmunol.177.10.6983
- Walters, M. J., Ebsworth, K., Berahovich, R. D., Penfold, M. E., Liu, S. C., Al Omran, R., Kioi, M., Chernikova, S. B., Tseng, D., Mulkearns-Hubert, E. E., Sinyuk, M., Ransohoff, R. M., Lathia, J. D., Karamchandani, J., Kohrt, H. E., Zhang, P., Powers, J. P., Jaen, J. C., Schall, T. J., Merchant, M., Recht, L., and Brown, J. M. (2014). Inhibition of CXCR7 extends

- survival following irradiation of brain tumours in mice and rats. *Br J Cancer*, 110(5), 1179-1188. doi:10.1038/bjc.2013.830
- Walther, F., Berther, J. L., Lalos, A., Ramser, M., Eichelberger, S., Mechera, R., Soysal, S., Muenst, S., Posabella, A., Guth, U., Stadlmann, S., Terracciano, L., Drosner, R. A., Zeindler, J., and Singer, G. (2022). High ratio of pCXCR4/CXCR4 tumor infiltrating immune cells in primary high grade ovarian cancer is indicative for response to chemotherapy. *BMC Cancer*, 22(1), 376. doi:10.1186/s12885-022-09374-x
- Wang, J., Shiozawa, Y., Wang, J., Wang, Y., Jung, Y., Pienta, K. J., Mehra, R., Loberg, R., and Taichman, R. S. (2008). The role of CXCR7/RDC1 as a chemokine receptor for CXCL12/SDF-1 in prostate cancer. *J Biol Chem*, 283(7), 4283-4294. doi:10.1074/jbc.M707465200
- Webb, J. R., Milne, K., and Nelson, B. H. (2015). PD-1 and CD133 Are Widely Coexpressed on Prognostically Favorable Intraepithelial CD8 T Cells in Human Ovarian Cancer. *Cancer Immunol Res*, 3(8), 926-935. doi:10.1158/2326-6066.CIR-14-0239
- Webb, P. M., and Jordan, S. J. (2017). Epidemiology of epithelial ovarian cancer. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 41, 3-14. doi:10.1016/j.bpobgyn.2016.08.006
- Wentzensen, N., Poole, E. M., Trabert, B., White, E., Arslan, A. A., Patel, A. V., Setiawan, V. W., Visvanathan, K., Weiderpass, E., Adami, H. O., Black, A., Bernstein, L., Brinton, L. A., Buring, J., Butler, L. M., Chamosa, S., Clendenen, T. V., Dossus, L., Fortner, R., Gapstur, S. M., Gaudet, M. M., Gram, I. T., Hartge, P., Hoffman-Bolton, J., Idahl, A., Jones, M., Kaaks, R., Kirsh, V., Koh, W. P., Lacey, J. V., Jr., Lee, I. M., Lundin, E., Merritt, M. A., Onland-Moret, N. C., Peters, U., Poynter, J. N., Rinaldi, S., Robien, K., Rohan, T., Sandler, D. P., Schairer, C., Schouten, L. J., Sjöholm, L. K., Sieri, S., Swerdlow, A., Tjønneland, A., Travis, R., Trichopoulos, A., van den Brandt, P. A., Wilkens, L., Wolk, A., Yang, H. P., Zeleniuch-Jacquotte, A., and Tworoger, S. S. (2016). Ovarian Cancer Risk Factors by Histologic Subtype: An Analysis From the Ovarian Cancer Cohort Consortium. *J Clin Oncol*, 34(24), 2888-2898. doi:10.1200/JCO.2016.66.8178
- Wiegand, K. C., Shah, S. P., Al-Agha, O. M., Zhao, Y., Tse, K., Zeng, T., Senz, J., McConechy, M. K., Anglesio, M. S., Kaloger, S. E., Yang, W., Heravi-Moussavi, A., Giuliany, R., Chow, C., Fee, J., Zayed, A., Prentice, L., Melnyk, N., Turashvili, G., Delaney, A. D., Madore, J., Yip, S., McPherson, A. W., Ha, G., Bell, L., Fereday, S., Tam, A., Galletta, L., Tonin, P. N., Provencher, D., Miller, D., Jones, S. J., Moore, R. A., Morin, G. B., Oloumi, A., Boyd, N., Aparicio, S. A., Shih, I. M., Mes-Masson, A. M., Bowtell, D. D., Hirst, M., Gilks, B., Marra, M. A., and Huntsman, D. G. (2010). ARID1A mutations in endometriosis-associated ovarian carcinomas. *N Engl J Med*, 363(16), 1532-1543. doi:10.1056/NEJMoa1008433
- Wilson, W. R., and Hay, M. P. (2011). Targeting hypoxia in cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 11(6), 393-410. doi:10.1038/nrc3064
- Wright, L. M., Maloney, W., Yu, X., Kindle, L., Collin-Osdoby, P., and Osdoby, P. (2005). Stromal cell-derived factor-1 binding to its chemokine receptor CXCR4 on precursor cells promotes the chemotactic recruitment, development and survival of human osteoclasts. *Bone*, 36(5), 840-853. doi:10.1016/j.bone.2005.01.021
- Wu, X., Feng, Q. M., Wang, Y., Shi, J., Ge, H. L., and Di, W. (2010). The immunologic aspects in advanced ovarian cancer patients treated with paclitaxel and carboplatin chemotherapy. *Cancer Immunol Immunother*, 59(2), 279-291. doi:10.1007/s00262-009-0749-9
- Young, R. C., Walton, L. A., Ellenberg, S. S., Homesley, H. D., Wilbanks, G. D., Decker, D. G., Miller, A., Park, R., and Major, F., Jr. (1990). Adjuvant therapy in stage I and stage II

- epithelial ovarian cancer. Results of two prospective randomized trials. *N Engl J Med*, 322(15), 1021-1027. doi:10.1056/NEJM199004123221501
- Zagzag, D., Lukyanov, Y., Lan, L., Ali, M. A., Esencay, M., Mendez, O., Yee, H., Voura, E. B., and Newcomb, E. W. (2006). Hypoxia-inducible factor 1 and VEGF upregulate CXCR4 in glioblastoma: implications for angiogenesis and glioma cell invasion. *Lab Invest*, 86(12), 1221-1232. doi:10.1038/labinvest.3700482
- Zeng, Y., Li, B., Liang, Y., Reeves, P. M., Qu, X., Ran, C., Liu, Q., Callahan, M. V., Sluder, A. E., Gelfand, J. A., Chen, H., and Poznansky, M. C. (2019). Dual blockade of CXCL12-CXCR4 and PD-1-PD-L1 pathways prolongs survival of ovarian tumor-bearing mice by prevention of immunosuppression in the tumor microenvironment. *FASEB J*, 33(5), 6596-6608. doi:10.1096/fj.201802067RR
- Zhang, L., Conejo-Garcia, J. R., Katsaros, D., Gimotty, P. A., Massobrio, M., Regnani, G., Makrigiannakis, A., Gray, H., Schlienger, K., Liebman, M. N., Rubin, S. C., and Coukos, G. (2003). Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med*, 348(3), 203-213. doi:10.1056/NEJMoa020177
- Zhao, E., Wang, L., Dai, J., Kryczek, I., Wei, S., Vatan, L., Altuwaijri, S., Sparwasser, T., Wang, G., Keller, E. T., and Zou, W. (2012). Regulatory T cells in the bone marrow microenvironment in patients with prostate cancer. *Oncoimmunology*, 1(2), 152-161. doi:10.4161/onci.1.2.18480
- Zhao, H., Guo, L., Zhao, H., Zhao, J., Weng, H., and Zhao, B. (2015). CXCR4 over-expression and survival in cancer: a system review and meta-analysis. *Oncotarget*, 6(7), 5022-5040. doi:10.18632/oncotarget.3217
- Zou, W. (2005). Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. *Nat Rev Cancer*, 5(4), 263-274. doi:10.1038/nrc1586
- Zou, W. (2006). Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol*, 6(4), 295-307. doi:10.1038/nri1806
- Zou, W., Machelon, V., Coulomb-L'Hermin, A., Borvak, J., Nome, F., Isaeva, T., Wei, S., Krzysiek, R., Durand-Gasselin, I., Gordon, A., Pustilnik, T., Curiel, D. T., Galanaud, P., Capron, F., Emilie, D., and Curiel, T. J. (2001). Stromal-derived factor-1 in human tumors recruits and alters the function of plasmacytoid precursor dendritic cells. *Nat Med*, 7(12), 1339-1346. doi:10.1038/nm1201-1339

EKLER

EK 1. Etik Kurul Onayı



ÖZ GEÇMİŞ

Burak Tatar Ankara Atatürk Anadolu Lisesi'ni bitirdikten sonra Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden 06.2007 tarihinde mezun oldu. Aynı yıl Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı'nda Kadın Hastalıkları ve Doğum uzmanlık eğitimine başladı ve 05.2012'de tamamladı. 2014-2017 arasında, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı'nda jinekolojik onkoloji cerrahisi yan dal eğitimi aldı. Bu arada Avrupa Jinekoloji ve Obstetri Board'ı (EBCOG) klinik burs programı için seçildi ve 2012 yılında Torino Azienda Ospedaliera OIRM Üniversitesi'nde bu programı tamamladı. 2015 yılında Uluslararası Jinekolojik Kanser Derneği Traveling Fellowship Programını kazandı ve klinik gözlemci olarak New York, ABD - Memorial Sloan Kettering Kanser Merkezi'nde çalıştı. Bundan sonra, özellikle robotik cerrahi alanında misafir klinik fellow olarak Essen Üniversitesi Kliniği - Almanya'da çalıştı. 2017 yılında Avrupa Jinekolojik Onkoloji Derneği (ESGO) burs ödülünü kazandı ve Charité Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde -Berlin, Almanya- ziyaretçi klinik fellow olarak çalıştı. 2022 yılında Kadın Hastalıkları ve Doğum Branşında “doçent” ünvanı almıştır. Şu anda kendi kliniğinde çalışmakta olup 2018 yılından itibaren Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Moleküler Tıp doktora programına devam etmektedir. İleri derecede İngilizce (YDS:91), orta düzeyde İtalyanca ve orta düzeyde Almanca bilmektedir.

İletişim Bilgileri

ORCID ID : 0000-0002-6495-0174

Yayınlar:

1. Tatar Burak. Incorporating HPV 33 and cytology into HPV 16/18 screening may be feasible. A cross-sectional study Arch Gynecol Obstet 2022 Dec 13. Doi: 10.1007/s00404-022-06876-8.
2. Tatar Burak. Assessment of myometrial invasion of endometrial carcinoma with preoperative transvaginal sonography. European Journal of Gynaecological Oncology, 42(1), 85-89., Doi: 10.31083/j.ejgo.2021.01.2236

3. Tatar Burak. (2021). Risk of nodal metastasis associated with lymphovascular space invasion in endometrial cancer. *European Journal of Gynaecological Oncology*, 42(5), 850-854., Doi: 10.31083/j.ejgo4205130
4. Tatar Burak, Turhan Uğur (2021). Increased sulfiredoxin-1 levels as compensatory mechanism against reactive oxygen species in women with gestational diabetes mellitus. *Journal of Turkish Society of Obstetric and Gynecology*, 18(4), 267-271., Doi: 10.4274/tjod.galenos.2021.26053
5. Turhan Uğur, Tatar Burak (2021). The association between increased maternal PARK7 (DJ-1) levels and the occurrence of preterm premature rupture of membranes - A randomized prospective study. *Journal of Turkish Society of Obstetric and Gynecology*, 18(4), 279-284., Doi: 10.4274/tjod.galenos.2021.25588
6. Yalcin Y, Tatar B, Erdemoglu E, Erdemoglu E. The parameters to estimate postoperative severe complications classified through Clavien-Dindo after upper abdominal surgery in patients with primary and recurrent ovarian cancer. *Ginekol Pol.* 2019;90(10):557-564. Doi: 10.5603/GP.2019.0097.
7. Tatar B, Yalçın Y, Erdemoğlu E. Palliative pelvic exenteration using iliofemoral bypass with synthetic grafts for advanced cervical carcinoma *Turk J Obstet Gynecol.* 2019 Mar;16(1):80-83. doi: 10.4274/tjod.galenos.2018.66743. Epub 2019 Mar 27.
8. Erdemoğlu E, Çerçi SS, Erdemoğlu E, Yalçın Y, Tatar B. Role of positron emission tomography-computed tomography in endometrial cancer. *Turk J Obstet Gynecol.* 2017 Dec;14(4):203-209. doi: 10.4274/tjod.24572. Epub 2017 Dec 30.
9. Tatar B, Oksay T, Cebe F S, Soyupek S, Erdemoğlu E. Management of vesicovaginal fistulas after gynecologic surgery *Turk J Obstet Gynecol* 2017;14:45-51
10. Yalçın Y., Zihni I., Ozcelik C., Tatar B., Erdemoğlu E., Erdemoğlu E. Non-occlusive mesenteric ischemia after gynecological surgery *Cukurova Medical Journal*, vol.42, pp.584-586, 2017
11. Tatar B, Boyraz G, Selçuk İ, Doğan AK, Usubütün A, Tuncer ZS. In vitro chemosensitivity in ovarian carcinoma: Comparison of three leading assays. *J Turk Ger Gynecol Assoc.* 2016 Jan 12;17(1):35-40. doi: 10.5152/jtgga.2016.16017. eCollection 2016.

12. And Yavuz, Mehmet Özgür Akkurt, Burak Tatar, Gökhan Karakoç*, Yakup Yalçın Fetal Goiter was Resolved with Decreasing Maternal Propylthiouracil Dose Turk J Endocrinol Metab 2016;20:66-68 DOI: 10.4274/tjem.3092
13. Tiryakioğlu A.E. , Özkan M.N, Kayım S. , Bağcı Ö , Çeviker K, Tatar B , Yazkan R, Erdemoglu E. Kanser Tanı Ve Tedavisinde Dna'ya Yönelik Güncel Yaklaşımlar: Telomeraz/Tert Journal of Engineering Sciences and Design 4(2), 125-131, 2016 DOI: 10.21923/jesd.04365
14. Tatar B, Erdemoglu E, Soyupek S, Yalcin Y, Erdemoglu E. Vesicocutaneous fistula after cesarean section-a curious complication: Case report and review Turk J Obstet Gynecol 2016; 13: 46-49
15. Yalcin Y, Tatar B, Erdemoglu E, Akkurt M. O., Yavuz A, Erdemoglu E. Laparoscopic systemic devascularization of uterine cornu for cornual resection in interstitial pregnancy Turk J Obstet Gynecol 2015; 12: 182-184
16. And Yavuz , Mehmet Özgür Akkurt , Gökhan Karakoç, Mehmet Muammer Doğan, Yakup Yalçın, Burak Tatar. Serum Ca-125, Estradiol And Progesterone Levels In Histopathologically Confirmed Ectopic Pregnancy Cases Jinekoloji - Obstetrik ve Neonatoloji Tıp Dergisi 2015; Volum: 12, Sayı: 4, Sayfa: 140-143
17. Bozkurt KK, Yalçın Y, Erdemoğlu E, Tatar B, Erdemoğlu E, Çerçi SS, Çiriş İM, Başpınar Ş, Uğuz A, Kapucuoğlu N. The role of immunohistochemical adrenomedullin and Bcl-2 expression in development of type-1 endometrial adenocarcinoma: Adrenomedullin expression in endometrium. Pathol Res Pract. 2016 May;212(5):450-5. doi: 10.1016/j.prp.2016.02.021. Epub 2016 Feb 27
18. Akkurt MÖ, Yavuz A, Tatar B, Özkaya MO, Ekici Eİ. Utero-cutaneous Fistula after Multiple Abdominal Myomectomies: A Case Report. Balkan Med J. 2015 Oct;32(4):426-8. doi: 10.5152/balkanmedj.2015.151206. Epub 2015 Oct 1.
19. And YAVUZ, Mehmet Özgür AKKURT, Yakup YALÇIN, Burak TATAR, Gökhan KARAKOÇ. The Reproductive Results After Reversal of Tubal Sterilization Türkiye Klinikleri J Gynecol Obst. 2015;25(4):227-30 DOI: 10.5336/gynobstet.2015-44361
20. Akkurt MÖ, Yalçın SE, Akkurt İ, Tatar B, Yavuz A, Yalçın Y, Akgül MA, Kayıkçıoğlu F. The evaluation of risk factors for failed response to

- conservative treatment in tubo-ovarian abscesses. J Turk Ger Gynecol Assoc. 2015 Nov 2;16(4):226-30. doi: 10.5152/jtgga.2015.15123. eCollection 2015.
21. Cerci SS, Yalcin Y, Bozkurt KK, Erdemoglu E, Tatar B, Erdemoglu E. Hypoxia-inducible factor-1 α , adrenomedullin and Bcl-2 although expected are not related to increased uptake of fluorine-18-fluorodeoxyglucose in endometrial cancer. Hell J Nucl Med. 2015 Sep-Dec;18(3):228-32.
22. Günyeli I, Bozkurt KK, Yalçın Y, Tatar B, Cerçi SS, Erdemoğlu E. Granulosa cell tumor and concurrent endometrial cancer with (18)F-FDG uptake. Hell J Nucl Med. 2014 May-Aug;17(2):153-5.

Kitap Bölümleri

1. Epigenetics and Reproductive Health,

Bölüm adı: Ovarian & endometrial cancers

Tatar Burak, Sezgin Güneş

Academic PRESS ISBN :978-0-12-819753-0

2. Jinekolojik Tümörler,

Bölüm adı: Nüks veya Metastatik Over Tümörlerinde İmmünoterapi

Tatar Burak

Akademisyen Kitabevi ISBN :978-605-258-55-9

Kazanılan Ödüller, Teşvikler ve Burslar

1. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Prof. Dr. Şeref Zileli Ödülü (2005)
2. Avrupa Jinekoloji ve Obstetri Board'ı (EBCOG) klinik bursu: (2012) Torino Azienda Ospedaliera OIRM
3. Uluslararası Jinekolojik Kanser Derneği (IGCS) Traveling Fellowship bursu (2015) New York, ABD, Memorial Sloan Kettering Kanser Merkezi.
4. Avrupa Jinekolojik Onkoloji Derneği (ESGO) burs ödülü (2016) (Charité Üniversitesi Tıp Fakültesi Berlin, Almanya)