DUYGU İLKE ÇIKMAN

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

DOKTORA TEZİ

İSTANBUL-2023

← Adınızı soyadınızı giriniz

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

↓

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

← Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

İLERİ EVRE OVER KANSERİNDE PERİFERİK KAN VE TÜMÖR İNFİLTRE EDEN LENFOSİTLERDE İMMÜN KONTROL NOKTASI RESEPTÖR EKSPRESYONLARININ BELİRLENMESİ

DUYGU İLKE ÇIKMAN

DANIŞMAN
PROF. DR. ESİN ÇETİN

İMMÜNOLOJİ

İSTANBUL-2023

İTHAF

Bu tezi biricik oğlum Özgür Ulaş Çıkman'a ithaf ediyorum

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim ve tez çalışmam sürecinde gerek akademik gerekse manevi desteğini esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Esin Çetin'e, sağladığı imkanlar ve uyumlu çalışma ortamı için İmmünoloji Anabilim Dalı başkanı Prof. Dr. Günnur Deniz'e teşekkürlerimi sunuyorum. Çalışmamın her aşamasında destekleri ve tecrübeleri ile bana yardımcı olan DETAE İmmünoloji Laboratuvarımızın çok sevdiğim çalışanlarına ayrıca teşekkürü borç bilirim.

Eğitim sürecimizde tanıştığımız ve akademik ve sosyal birçok anıyla süreci tamamladığımız canım arkadaşım ve kardeşim Ayşe Engin'e teşekkür ederim. Doktora çalışmam sırasında tanıştığım arkadaşım Ayşenur Kökoğlu'na deney sürecindeki yardımları ve güzel kalbi için teşekkür ederim.

Hayatım boyunca desteğini benden bir an bile esirgemeyen ve beni özgür bir birey olarak yetiştiren anne ve babama teşekkür ediyorum.

Doktora sürecimin başından sonuna dek her aşamasında desteğini yanımda hissettiren hayat arkadaşım Seyhan Çıkman'a ve onunla geçiremediğim zamanları sabırla tolere eden canım oğlum Özgür Ulaş Çıkman'a teşekkür ediyorum. Sizler olmadan başaramazdım.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 35641

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI .....**ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.**
BEYAN ..... İİİ
İTHAF ..... İV
TEŞEKKÜR..... V
İÇİNDEKİLER ..... Vİ
TABLOLAR LİSTESİ X
ŞEKİLLER LİSTESİ..... Xİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ ..... Xİİİ
ÖZET XV
ABSTRACT..... XVİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER..... 4
2.1. Over Kanseri..... 4
2.1.1. Over Kanseri Epidemiyolojisi ve Risk Faktörleri..... 4
2.1.2. Over Kanserinde Evreleme..... 5
2.2. Over Kanserinde Tedavi Modaliteleri 7
2.2.1. Over Kanserinde Cerrahi Tedavi 7
2.2.1.1. Primer cerrahi tedavi 8
2.2.1.2. Interval Debulking Cerrahisi..... 8
2.2.2. Over Kanserinde Onkolojik Tedaviler 8
2.2.2.1. Adjuvan Tedaviler..... 9
2.2.2.2. Neoadjuvan Tedaviler 9
2.2.2.3. Palyatif Tedaviler 9
2.2.2.4. Hipertermik İntraperitoneal Kemoterapi 10
2.3. İmmun kontrol noktası reseptörleri 10
2.3.1. PD-1 11
2.3.2. CTLA-4 12
2.3.3. TIM-3 13
2.3.4. TIGIT 13
2.3.5. LAG-3 15

2.4. Solubil İmmün Kontrol Noktası Reseptörleri 16
2.4.1. sCTLA-4 16
2.4.2. sPD-1 & sPD-L1 16
2.4.3. sTIM-3 17
2.4.4. sLAG-3 17
2.5. Anti-tümöral immün yanıt 18
2.5.1. Doğal Öldürücü (NK) hücreler 19
2.5.2. Yardımcı T hücreler 25
2.5.3. Sitotoksik T hücreler 26
2.5.3.1. Efektör Tc hücre: 27
2.5.3.2. Hafıza Tc hücre: 27
2.5.3.3. Tükenmiş Tc hücre: 27
2.5.3.4. Anerjik Tc hücre: 28
2.5.3.5. Yaşlanmış Tc hücre: 28
2.5.3.6. Regülatör Tc hücre: 28
2.5.4. Tümör immünitesinde sitokinlerin yeri 29
2.6. Kanser ve immün kontrol noktası reseptörleri 31
3. GEREÇ VE YÖNTEM 35
3.1. Hasta Grubu 35
3.1.1. Dahil edilme kriterleri 35
3.1.2. Dışlama kriterleri 35
3.2. Tümör Dokusu ve Periferik Kan Örneklerinin Patoloji ve İmmünoloji Laboratuvarına Transferi 36
3.3. Yüksek Dereceli Seröz Over Kanseri Tümör Dokusundan Lenfosit İzolasyonu .. 38
3.4. Periferik Kan ve Tümör İnfiltre Lenfositlerde T Hücre Alt Gruplarının Analizi 39
3.5. Tümör Dokusu ve Periferik Kanda T Lenfosit Alt Grupları ve NK Hücrelerinde İmmün Kontrol Noktası Reseptör Ekspresyonlarının Belirlenmesi 41
3.6. Plazma Örneklerinde Solubil CTLA-4, PD-1, TIM-3, TIGIT ve LAG-3 Düzeylerinin Tayini 42
3.7. Plazma Örneklerinde Solubil Sitokin Düzeylerinin Tayini 43
3.7.1. Ön hazırlık: Kutu içeriği kontrol edilmiş ve oda ısısına gelmesi sağlanmıştır. 44
3.7.2. Deney prosedürü 44
3.8. İstatistiksel analiz 45

4. BULGULAR 47
4.1. Kontrol ve Çalışma Grubunun Demografik Özellikleri 47
4.2. Lenfosit Alt Gruplarının Belirlenmesi 48
4.2.1. T Lenfosit ve NKT Hücre Oranlarının Belirlenmesi 48
4.2.2. NK Hücre Alt Gruplarının Periferik Kan ve Tümör Dokusundaki Oranları 49
4.2.3. Yardımcı T Lenfosit Alt grupları ve Regulatör T Hücre Oranlarının Belirlenmesi 51
4.3. Lenfosit Alt Gruplarında İmmun Kontrol Noktası Reseptör Ekspresyonlarının Over Kanseri ve Sağlıklı Olgularda Karşılaştırılması 53
4.3.1. $CD4^+$ Th lenfositlerinde İmmun Kontrol Reseptörlerinin Gruplar Arası Dağılımı 53
4.3.2. $CD8^+$ T lenfositlerinde İmmun Kontrol Noktası Reseptörlerinin Gruplar Arası Dağılımı 55
4.3.3. Total NK Hücreleri, $CD8^+$ ve $CD8^-$ NK Hücre Alt Gruplarında İmmun Kontrol Reseptörlerinin Ekspresyonu 57
4.4. Plazma Örneklerinde Solubil Sitokin ve Reseptör Düzeyleri ile Gruplar Arası Farklılıklar 60
4.4.1. Tümörigenezde Rol Oynayan NK Hücre ve Tc Hücre Kökenli Sitokin Düzeylerinin Saptanması 60
4.4.2. Solubil İmmun Kontrol Reseptörlerinin Düzeylerinin Saptanması ve Gruplar Arası Karşılaştırması 60
4.5. Korelasyon Analiz Sonuçları 61
4.5.1. Over Kanseri olguların Lenfosit ve NK hücrelerinde ekprese edilen yüzey immun kontrol reseptörlerinin oranı ile solubil reseptör düzeylerinin korelasyon analizi 61
4.5.2. Hasta Grubu Plazma CA125 Düzeyleri ile İmmun Kontrol Noktası Reseptörlerinin Ekspresyon Korelasyon Analizleri 63
4.5.3. Over Kanseri Hastaların Plazma Sitokin Düzeyleri ile T Lenfosit ve NK hücre Oranlarının Korelasyon Analizleri 64
4.5.4. Kontrol grubunda sitokin düzeyleri ile lenfosit ve NK hücrelerin korelasyon analizi 66
5. TARTIŞMA 67
KAYNAKLAR 74
ETİK KURUL KARARI 98

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI 99
ÖZGEÇMİŞ 100

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Over, fallop tüpü ve primer periton karsinomu TNM evrelemesi, AJCC UICC 8. Basım.....5
Tablo 2-2: Over, fallop tüpü ve primer periton karsinomu prognostik evreleme gruplaması.....7
Tablo 3-1: Cihaz listesi.....37
Tablo 3-2: Monoklonal antikor listesi.....38
Tablo 3-3: Lenfosit alt grupları ve yüzey belirteçleri.....41
Tablo 3-4: Solubil PD-1, CTLA-4, TIM-3, LAG-3 ve TIGIT ELISA ölçüm aralıkları.43
Tablo 3-5: Standartların hazırlanması ve dilüsyon oranları.....45
Tablo 3-6: CD8/NK Panel Kitinde bulunan sitokinlerin minimum tespit edilebilir konsantrasyon düzeyleri.....46
Tablo 4-1: Çalışmaya dahil edilen hasta ve kontrol grubunun demografik özellikleri...47
Tablo 4-2: Hasta grubunda solubil immun kontrol reseptörleri ile bağlı formdaki eşdeğerlerinin ekspresyonlarının korelasyon analizi.....62
Tablo 4-3 Hasta Grubunda Plazma Sitokin Düzeyleri ile T Lenfosit Alt Gruplarının Oranlarının Korelasyon Analizi.....66

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: T hücre fonksiyonlarının negatif regülasyonundan sorumlu reseptörler- Nguyen (36) 11
Şekil 2-2: TIGIT ve koinhibitör reseptör olan CD96 ile aktivatör reseptör olan CD226'nın T hücre ve antijen sunan hücre etkileşimindeki rolü- Kraus (53).....14
Şekil 2-3: NK hücrelerinin aktivatör ve inhibitör reseptörleri ve ligandları A. HLA-I dışı spesifik reseptörler ve ligandları B. HLA-I spesifik reseptörler ve ligandları- Quatrini (98) 22
Şekil 2-4: Doğal öldürücü hücre tükenmişliği- Bi (115).....24
Şekil 2-5: Sitokinler- Dranoff (143).....29
Şekil 3-1: Deneysel aşamalar ve kullanılan teknikler 37
Şekil 4-1: Tümör dokusu, hasta kanı ve sağlıklı kontrollerin kan örneklerinde lenfosit alt gruplarının dağılımı. 49
Şekil 4-2: NK hücre alt gruplarının akan hücre ölçer analiz sonuçları. 50
Şekil 4-3: Treg, Th1, Th2 ve Th17 hücre alt gruplarının akan hücre ölçer analizleri 52
Şekil 4-4: İleri evre over kanseri hasta, sağlıklı periferik kan ve tümör dokusu $CD3^+CD4^+$yardımcı T lenfositlerinde PD-1, CTLA-4, LAG-3, TIGIT ve TIM-3 ekspresyonları 54
Şekil 4-5: $CD3^+CD8^+$ sitotoksik T lenfositlerinde immün kontrol noktası reseptörlerinin ekspresyonları ve gruplar arası karşılaştırılması. 56
Şekil 4-6: $CD3^-CD16^+CD56^+$ NK hücre alt gruplarında immün kontrol noktası reseptörlerinin ekspresyonları ve gruplar arası karşılaştırılması. 58
Şekil 4-7: $CD8^+$ ve $CD8^-$ NK hücre alt gruplarında PD-1, CTLA-4, LAG-3, TIGIT ve TIM-3 ekspresyon analizleri 59
Şekil 4-8: Hasta ve sağlıklı grup plazma örneklerinde NK ve Tc hücre kökenli solubil sitokin ve reseptör analizleri 60
Şekil 4-9: İmmün kontrol reseptörlerinin solubil formlarının hasta kanı ve sağlıklı kontrol kanlarındaki dağılımı.....61
Şekil 4-10: $CD8^+$ $PD\text{-}1^+$NK ve $CD8^+$ $TIM3^+$ NK Hücrelerin Plazma CA125 düzeyi ile korelasyonu 64
Şekil 4-11:sFasL düzeylerinin $CD8^-$ ve $CD8^+$ NK hücreleri ile korelasyonu 65

Şekil 4-12: $CD8^-$ NK hücreleri ile IFN-γ ve IL-10 düzeylerinin korelasyonu.....65

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

ADAM10: A Disintegrin and Metalloproteinase Domain-containing Protein 10

ADAM17: A Disintegrin and Metalloproteinase Domain-containing Protein 17

ADCC: Antikor Bağımlı Hücre Aracılı Sitotoksisite

aKIR: İmmünglobulin-benzeri Aktivatör Reseptörü

BT: Bilgisayarlı Tomografi

BTLA: B ve T Hücre Fonksiyon Azaltıcısı

CA125: Kanser Antijeni 125 (Cancer Antigen 125)

CTLA-4: Sitotoksik T lenfosit Antijen 4

EOK: Epitelyal Over Kanseri

FASL: Fas Ligandı

FGL1: Fibrinojen Benzeri Protein-1

FGL2: Fibrinojen Benzeri Protein-2

FIGO: Uluslararası Jinekoloji ve Obstetri Federasyonu

GM-CSF: Granülosit Monosit Koloni Stimüle Eden Faktör

HIPEC: Hipertermik Intraperitoneal Kemoterapi

HIV: İnsan İmmünyetmezlik Virüsü

HLA: İnsan Lökosit Antijeni

IFN: Interferon

iKIR: Öldürücü İmmünglobulin-benzeri İnhibitör Reseptörü

IL: Interlökin

ILC: Doğal Lenfoid Hücre (Innate lymphoid cell)

ITIM: İmmünreseptör Triozin Bazlı İnhibitör Motif

LAG-3: Lenfosit Aktivasyon Geni-3

MHC: Major Histokompatibilite Kompleksi

MICA/B: MHC Sınıf I İlişkili Molekül A/B

NCR: Doğal Sitotoksisite Reseptörü

NK: Doğal Öldürücü Hücre

NKT: Doğal Öldürücü T Hücre

OD: Optik Yoğunluk

PARP: Poli ADP Riboz Polimeraz

PBS: Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi

PD-1: Programlanmış Ölüm -1

PD-L1: Programlanmış Ölüm -Ligand 1

PET-BT: Pozitron Emisyon Tomografisi- Bilgisayarlı Tomografi

Tc: Sitotoksik T Hücre

Tfh: Foliküler Yardımcı T Hücre

Th: Yardımcı T Hücre

TIGIT: T-Hücre İmmünoglobulin ve ITIM Domeni

TIL: Tümör İnfiltre Eden Lenfositler

TIM-3: T Hücre İmmünoglobulin ve Müsin Domeni İçeren Molekül-3

TNF: Tümor Nekrotize Edici Faktör

TNM: Tümör, Nod, Metastaz

TRAIL: TNF Aracılı Apoptoz İndükleyici Ligand

TRAILR: TRAIL Reseptörü

Treg: Regülatör T Hücre

ULBP: UL16 Bağlayıcı Protein

VEGF: Vasküler Endotel Büyüme Faktörü (Vascular Endothelial Growh Factor)

YDSOK: Yüksek Dereceli Seröz Over kanseri

ÖZET

Çıkman Dİ. İleri Evre Over Kanserinde Periferik Kan ve Tümör İnfiltre Eden Lenfositlerde İmmün Kontrol Noktası Reseptör Ekspresyonlarının Belirlenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İmmünoloji ABD. Doktora Tezi. İstanbul. 2023.

İmmün kontrol noktası reseptörleri tümör immünitesinin baskılanmasında önemli rol oynamaktadır. Birçok kanser türünde PD-1 ve CTLA-4 gibi reseptörlerin inhibisyonu ile sağkalımda başarı sağlanmasına karşın over kanserinde immünoterapinin sağkalımda etkisi henüz gösterilememiştir. Bu amaçla çalışmamızda over kanserli olgular ve sağlıklı bireylerde lenfosit alt gruplarında immün kontrol noktası reseptör ekspresyonları incelenmiştir. Periferik kan ve tümörü infiltre eden NK hücre ve T lenfosit alt gruplarında akan hücre ölçer ile TIGIT, TIM-3, PD-1, LAG-3 ve CTLA-4 ekspresyonları saptanmıştır. Plazma örneklerinde solubil PD-1, CTLA-4, TIM-3, LAG-3 ve TIGIT reseptör düzeyleri ELISA yöntemi, NK ve $CD8^+$ T hücre kökenli solubil sitokin ve sitotoksik aktiviteden sorumlu molekül düzeyleri ise akan hücre ölçerde analiz edilmiştir. Tümör dokusunda periferik kana göre Tc ve yardımcı Th hücrelerinde TIM-3, LAG-3 ve TIGIT reseptör ekspresyonları artmış bulunmuştur. Periferik kan $CTLA4^+TIGIT^+$ ve $PD1^+TIGIT^+$ koekspresyonu Tc ve Th lenfosit alt gruplarında over kanserinde sağlıklılara göre anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur. Over kanserli olguların tümör dokusunda $CD8^-$ NK ve Th2 hücre oranları artış saptanırken periferik kanda ise $CD8^+$ NK ve Th1 hücrelerinde artış gözlenmiştir. Çalışmamızda CA125'in tümör spesifik marker olmasının yanı sıra anti-tümöral immünitenin regülasyonunda da rol oynayabileceğine dair bulgular da tespit edilmiştir. Sonuç olarak anti-tümöral immünitenin baskılanmasında önemli bir mekanizma olan lenfosit tükenmişliğinin over kanserli olgularda Tc ve Th hücrelerinde eksprese edilen TIGIT, TIM-3 ve LAG-3 immün kontrol noktası reseptörleri ile ilişkisinin ortaya konması, gelecekte bu reseptörlerin inhibisyonu ile over kanserinde etkin bir tedavinin sağlanabileceği düşünülmektedir. $CD8^-$ NK ve $CD8^+$ NK hücre alt gruplarının fenotipik özellikleri ve fonksiyonlarıyla ile ilgili detaylı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Tümör immünolojisi, İmmün Kontrol Noktası Reseptörleri, Over kanseri, T lenfositler, NK hücreleri

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 35641

ABSTRACT

Cikman, D.I. (2023). Determination of Immune Checkpoint Receptor Expressions in Peripheral Blood and Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Advanced Stage Ovarian Cancer. Istanbul University, Institute of Health Science, Department of Immunology. Doctoral Thesis. Istanbul.

Immune checkpoint receptors play a crucial role in the suppression of tumor immunity. Inhibition of receptors such as PD-1 and CTLA-4 has demonstrated important survival benefits in the treatment of various solid cancers whereas the impact of immunotherapy in ovarian cancer remains inconclusive. For this purpose, the expression of immune checkpoint receptors on lymphocyte subsets in ovarian cancer patients and healthy controls were investigated. The expressions of TIGIT, TIM-3, PD-1, LAG-3, and CTLA-4 on NK cell and T lymphocyte subgroups in peripheral blood and tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) were determined by flow cytometry. Soluble plasma levels of PD-1, CTLA-4, TIM-3, LAG-3, and TIGIT receptors were measured using ELISA method. NK and $CD8^+$T cells associated cytotoxic molecule levels and cytokines were analysed in plasma by flow cytometry. We showed increased TIM-3, LAG-3, and TIGIT expressions in cytotoxic and helper T cells. Coexpressions of peripheral blood $CTLA4^+TIGIT^+$ and $PD1^+TIGIT^+$ Tc and Th lymphocytes were also found significantly higher in ovarian cancer patients compared to healthy individuals. Furthermore, we demonstrated increased ratio of $CD8^-$ NK and Th2 cells in tumor microenvironement whereas Th1 and $CD8^+$ NK cells were increased in peripheral blood of the ovarian cancer patients. Our findings suggest CA125, besides a tumor-specific marker, may regulate anti-tumoral immunity. In conclusion, investigating the relation between lymphocyte exhaustion and expression of TIGIT, TIM-3, and LAG-3 in cytotoxic and helper T cells offers potential target for new immunotherapies in ovarian cancer. Further studies are required to understand the functions of $CD8^-$ NK and $CD8^+$ NK cells.

Key Words: Tumor immunology, Immune checkpoint inhibitors, Ovarian cancer, T lymphoctes, NK cells

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. 35641

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Yüksek dereceli seröz over kanseri (YDSOK), epitelyal over kanserinin en sık görülen histolojik alt tipidir. Oldukça kötü prognozlu bir tümör olan YDSOK olgularının %75'i FIGO evre III ya da IV iken tanı almaktadır. Bu nedenle 5 yıllık sağkalımı yaklaşık %40'tır. Uzun yıllardır YDSOK'nin standart tedavisi platin bazlı iki ajanlı kemoterapi ile yapılmaktadır. Ne yazık ki olguların çoğunda izlemde kemoterapiye direnç görülmektedir [1]. Hedefe yönelik ajanların over kanserinde kullanıma girmesi ile sağkalımda artış olmasına karşın halen yüksek mortalite oranı over kanserinde ciddi bir problem yaratmaktadır [2,3]. Bu sorunun üstesinden gelmek için son yıllarda üzerinde çok fazla çalışma yapılan immün kontrol noktası inhibitörleri gündeme gelmiştir. Bu yolağın en çok çalışılan üyesi PD-1 (Programmed Death-1, Programlanmış Ölüm-1), CD28 kostimülatör reseptör süperailesinin bir üyesidir. T hücre reseptörü aracılı aktivasyon sinyallerinin inhibe edilmesine yol açmakta ve sonuç olarak antijen aracılı T hücre aktivasyonu inhibe olmaktadır. Bu mekanizmada PD-1'e bağlanan ligandlardan tümör dokusunda en fazla bulunanı PD-L1 (Programlanmış Ölüm-Ligand 1)'dir. Birçok solid tümörde yüksek düzeyde PD-L1 ekspresyonu gösterilmiştir [4,5]. Bu yolak üzerine klinik ve preklinik çok sayıda çalışma yapılmıştır.

Bu ilişkinin özellikle ileri evre kanserlerde anti-tümöral immünite aracılı tedavilerde etkin olduğunun gösterilmesinin ardından bu yanıtta görev alan tümör infiltre lenfosit (TIL) alt grupları araştırılmaya başlanmıştır [6,7]. TIL'ler tümör adacığı ve stromasında bulunan tümör hücresini tanıyan ve yanıt veren beyaz kan hücreleridir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda ileri evre over kanseri olgularından TIL alt grupları izole edilmiş ve prognoza etkisi incelenmiştir. Sonuçlar farklılık göstermekle birlikte genel anlamda $CD3^+$ T hücre ve $CD8^+$ sitotoksik T (Tc) lenfosit varlığının over kanseri prognozu üzerine olumlu etkisi olduğu gösterilmiştir [8-11]. Ancak bazı çalışmalarda TIL ile over kanseri prognozu arasında ilişki gösterilemediği için daha detaylı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır [12]. Bu hücrelerin anti-tümöral immün yanıt üzerine etkisini hangi reseptörler aracılığı ile gösterdiği hala immünolojinin araştırılmakta olan bir konusudur. PD-1/PD-L1 ilişkisi dışında pek çok inhibitör reseptör ve ligandı tümörün immün sistemden kaçışında önemlidir. PD-1 dışında hücrelerin immün modülasyonunda görev alan birçok inhibitör reseptörler mevcuttur. Bu inhibitör

reseptörlerin dağılımı her hücrede farklılık göstermekte ve aynı zamanda bu reseptörlerin farklı hücrelerde farklı fonksiyonları olduğu da bilinmektedir [13]. Bu reseptörlerin kronik enfeksiyonlarda ve neoplastik hücrelerde T hücre tükenmişliği ve fonksiyon kaybından sorumlu olduğu gösterilmiştir. İnhibitör reseptörlerin varlığı kötü prognoz göstergesi olarak karşımıza çıkmaktadır [14]; ancak inhibitör reseptörlerin inhibisyonu sağlandığında klinik sonlanımın olumlu olarak değiştiği görülmektedir. PD-1 dışında sıklıkla preklinik düzeyde çalışılan inhibitör immün kontrol noktası reseptörleri TIGIT (T-hücre immünoglobulin ve ITIM domeni), LAG-3 (Lenfosit aktivasyon geni), CTLA-4 (Sitotoksik T lenfosit antijen 4) ve TIM-3 (T hücre immünoglobulin ve müsin domeni içeren molekül-3)'tür.

İmmünoonkolojinin gelişmesi ile anti-PD-1/PD-L1 tedavileri kullanıma girmesine rağmen diğer inhibitör reseptörlerin YDSOK seyrine etkisi bilinmemektedir. Melanom olgularında yapılan bir çalışmada $CD8^+$ T lenfositlerde TIGIT' in PD-1 ile birlikte eksprese edilebildiği ve bu durumun immünsupresyona katkıda bulunduğu gösterilmiştir. Araştırmacılar aynı zamanda her iki yolağın birlikte inhibisyonunun etkin anti-tümöral yanıt oluşturabileceğini öne sürmüşlerdir [15]. Over kanserinde bu reseptörlerin birlikteliğini gösteren bir çalışma henüz bulunmamaktadır. İnhibitör immün kontrol noktası reseptör düzeylerinin ve blokajları sonucu görülen etkinin incelendiği bir hayvan çalışmasında $CD8^+$ T lenfositlerde LAG-3/PD-1'in birlikte eksprese olduğu durumlarda her iki reseptörün de bloke edilmesi sonucu anti-tümoral etkinliğin arttığı saptanmıştır. Bu hayvan modeli çalışması da bizim çalışmamızın bilimsel açıdan önemini ve gerekliliğini arttırmaktadır [16]. Bu reseptörlerin birlikteliğinin araştırıldığı insan çalışmalarında $CD8^+$ T lenfositlerde yalnızca LAG-3 ve PD-1 birlikteliği araştırılmış, diğer reseptörlerin düzeyi sorgulanmamıştır. LAG-3 ve PD-1 birlikte eksprese olduğunda inhibitör etkinin belirgin düzeyde arttığı saptanmıştır [17]. TIGIT, LAG-3, CTLA-4 ve TIM-3 gibi diğer inhibitör reseptörlerin over kanserinde sıklığını gösteren ve tüm bu reseptörlerin birlikte değerlendirildiği bir insan çalışması henüz bulunmamaktadır.

Bu amaçla çalışmamızda ileri evre ve hiç tedavi almamış YDSOK olgularının hem periferik kanlarından hem de tümör dokularından izole edilen T lenfosit ve Doğal öldürücü (NK) hücre alt grup analizleri ve immün kontrol noktası reseptörlerinin (PD-1, CTLA-4, TIM-3, TIGIT, LAG-3) ekspresyonları akan hücre ölçer ile karşılaştırılarak aralarındaki ilişki saptanmıştır. Lenfosit alt gruplarında saptanan immün kontrol noktası

reseptörlerinin yüzey ekspresyon oranlarının yanı sıra hasta ve sağlıklılarda plazmada solubil PD-1, CTLA-4, TIM-3, TIGIT ve LAG-3 düzeyleri de saptanmıştır. Bu araştırmamız ile over kanserinde PD-1/PD-L1 dışında etkili olan inhibitör yolakların ve hastalığın seyriyle olan ilişkisi ortaya konmuştur. Her geçen gün tetkik aşamasında daha az invaziv seçeneklerin tercih edildiği günümüz tıbbında periferik kan T lenfosit ve NK hücre analizi sonuçları ile TIL sonuçlarının korele olması durumunda gelecekte daha az invaziv yöntemler kullanılarak tümörün immünolojik yapısı hakkında bilgi sahibi olmak mümkün olacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Over Kanseri

2.1.1. Over Kanseri Epidemiyolojisi ve Risk Faktörleri

Over kanseri gelişmiş ülkelerdeki en sık ikinci, gelişmekte olan ülkelerde en sık üçüncü jinekolojik malignitedir [1]. Over malignitelerinin %95'i epitelyal tümörlerdir, kalan %5'i ise diğer over hücre tiplerinden (germ hücre tümörleri ve seks kord-stromal tümörler) köken almaktadır. Epitelyal over kanserinin en sık histolojik alt tipi yüksek dereceli seröz karsinomudur [2]. Over kanserinin ABD'de ortalama tanı yaşı 63'tür. Ülkemizde de tanı yaşı benzerdir. Daha genç yaşlarda tanı alan hastalarda herediter over kanserlerini akla getirmek gerekir. Yaşam boyu over kanseri gelişme riski yüzde 1,3'tür. Epitelyal over kanseri (EOK) riskini arttıran faktörler; ileri yaş, infertilite, endometriozis, polikistik over sendromu, rahim içi araç ve sigara kullanımı olarak sıralanabilir. EOK gelişme riskini azaltan faktörler ise başlıca geçmiş gebelik sayısı, emzirme süresi, oral kontraseptifler ve tüp ligasyonudur. EOK'nin klinik prezentasyonu akut ya da subakut olabilir. EOK olgularının çoğu evre 3 (periton boşluğuna yayılmış hastalık ± lenf nodu tutulumu) iken tanı almaktadır [3]. EOK genellikle subakut seyir göstermektedir. Bu seyir sırasında erken ya da ileri evre olarak tanı almaktadır. Hastalar karın ağrısı, gastrointestinal semptomlar ve şişkinlik gibi şikayetler ile ayaktan hasta polikliniklerine başvurmaktadır. Bunun dışında sıklıkla başka bir sebeple yapılan cerrahi sırasında insidental olarak adneksiyal kitle saptanabilmektedir. Akut bir tablo ile başvuran hastalarda genellikle ivedilikle değerlendirilmesi gereken bir klinik mevcuttur ve bu hastalar çoğunlukla ileri evredir. EOK tanısı histolojik bir tanıdır ve cerrahi olarak over ve fallop tüplerinin çıkarılması ve peritondan biyopsi alınmasını takiben yapılan patolojik değerlendirmeye göre konmaktadır. Daha az sıklıkla görüntüleme eşliğinde biyopsi, parasentez ya da torasentez ile alınan doku biyopsisi ya da vücut sıvısı incelenmesi ile tanı konmaktadır.

2.1.2. Over Kanserinde Evreleme

EOK'nin evrelemesi cerrahi bir evreleme olup Uluslararası Jinekoloji ve Obstetri Federasyonu'nun (FIGO) 2014 yılında yayımladığı Tümör, Nod ve Metastaz (TNM) sınıflama sistemine göre yapılmaktadır [18]. TNM 8. Basım'a göre over kanseri evrelemesi Tablo 2-1 ve evreleme gruplaması Tablo 2-2'de özetlenmiştir.

Tablo 2-1: Over, fallop tüpü ve primer periton karsinomu TNM evrelemesi, AJCC UICC 8. Basım

Primer tümör (T)		
T	**FIGO evresi**	**T kriteri**
TX		Primer tümör değerlendirilemiyor
T0		Primer tümöre dair bulgu yok
T1	I	Tümör overlere (biri ya da her ikisine) veya fallop tüplerine sınırlı
T1a	IA	Tümör bir overe ya da fallop tüpüne sınırlı (kapsül intakt); over ya tüp yüzeyinde tümör yok, asit sıvısında ya da periton yıkama sıvısında malign hücre yok
T1b	IB	Tümör her iki overe ya da fallop tüpüne sınırlı (kapsül intakt); over ya tüp yüzeyinde tümör yok, asit sıvısında ya da periton yıkama sıvısında malign hücre yok
T1c	IC	Tümör overlere (biri ya da her ikisine) veya fallop tüplerine sınırlı ve aşağıdaki durumlardan biri eşlik ediyor:
T1c1	IC1	• Cerrahi yayılım
T1c2	IC2	• Kapsül cerrahi öncesi yırtılmış ya da tümör over veya tüp yüzeyinde mevcut
T1c3	IC3	• Asit ya da periton yıkama sıvısında malign hücreler mevcut.
T2	II	Tümör bir ya da her iki over veya fallop tüpünde mevcut; eşlik eden pelvik yayılımı ya da primer periton kanseri mevcut
T2a	IIA	Uterusa ve/veya tüp(lere) ve/ veya over(lere) yayılım ya da implant mevcut
T2b	IIB	Diğer pelvik yapılarda yayılım ve/veya implant varlığı

T3	III	Tümör bir ya da her iki over veya fallop tüpünde mevcut veya primer periton kanseri (+) iken beraberinde pelvis dışı mikroskobik periton metastazı ve/veya retroperitoneal (pelvik ve/veya paraaortik) lenf nodu metastazı mevcut
T3a	IIIA2	Mikroskopik ekstrapelvik periton tutulumu ± retroperitoneal lenf nodu metastazı varlığı
T3b	IIIB	2 cm ya da altında makroskopik ekstrapelvik periton tutulumu ± retroperitoneal lenf nodu metastazı
T3c	IIIC	Makroskopik (>2cm) ekstrapelvik periton tutulumu ± retroperitoneal lenf nodu metastazı (karaciğer ve dalak kapsül tutulumu dahil, herhangi bir organın parankim tutulumu olmaksızın)
Bölgesel lenf nodları (N)		
N	**FIGO evresi**	**N kriteri**
NX		Bölgesel lenf nodları değerlendirilemiyor
N0		Bölgesel lenf nodlarında metastaz yok
N0(i+)		0,2 mm'den büyük olmayan izole tümör hücrelerinin bölgesel lenf nodunda/nodlarında bulunması
N1	IIIA1	Yalnızca retroperitoneal lenf nodlarında histolojik olarak konfirme tutulum olması
N1a	IIIA1i	10 mm ya da daha küçük metastaz varlığı
N1b	IIIA1ii	10 mm'den büyük metastaz
Distant metastasis (M)		
M	**FIGO evresi**	**M kriteri**
M0		Uzak metastaz yok
M1	IV	Uzak metastaz varlığı (aşağıda sıralanan tutulumlardan bir ya da daha fazlasının varlığında) Pozitif malign sitoloji ile plevral efüzyon; karaciğer ya da dalak parankim metastazı, inguinal lenf nodları ve karın boşluğu dışındaki lenf nodlarının metastazı da dahil olmak üzere karın dışındaki parenkimal organların metastazı; Bağırsakların transmural tutulumu
M1a	IVA	Pozitif sitoloji sonucu dokümente edilmiş plevral efüzyon
M1b	IVB	Karaciğer ve dalak parankim metastazları; ekstraabdominal organ metastazları (inguinal lenf nodları ve batın dışı lenf nodları dahil); bağırsakların transmural tutulumu

Tablo 2-2: Over, fallop tüpü ve primer periton karsinomu prognostik evreleme gruplaması

Prognostik Evreleme gruplaması.			
T	**N**	**M**	**Evre**
T1	N0	M0	I
T1a	N0	M0	IA
T1b	N0	M0	IB
T1c	N0	M0	IC
T2	N0	M0	II
T2a	N0	M0	IIA
T2b	N0	M0	IIB
T1/T2	N1	M0	IIIA1
T3a	Nx, N0, N1	M0	IIIA2
T3b	Nx, N0, N1	M0	IIIB
T3c	Nx, N0, N1	M0	IIIC
Herhangi bir T	Herhangi bir N	M1	IV
Herhangi bir T	Herhangi bir N	M1a	IVA
Herhangi bir T	Herhangi bir N	M1b	IVB

2.2. Over Kanserinde Tedavi Modaliteleri

2.2.1. Over Kanserinde Cerrahi Tedavi

Over kanserinde primer tedavi genellikle uygun cerrahi evreleme ve debulking cerrahisini takiben genellikle sistemik kemoterapi verilmesi şeklindedir [19]. Erken evre over kanserlerinde yalnızca cerrahi, adjuvan kemoterapi vermeksizin yeterli olmaktadır. Bunun aksine ileri evre over kanseri olan bazı hastalar ileri yaş, kötü performans durumu, eşlik eden hastalıklar ve cerrahi ile yeterli sitoredüksiyonun sağlanamaması gibi risk faktörleri nedeni ile neoadjuvan kemoterapinin ardından interval debulking cerrahisi ile ameliyat edilmektedirler [20]. Over kanseri cerrahisinde amaç tedavinin hangi aşamasında yapılırsa yapılsın geride hiç tümör bırakmamaktır.

2.2.1.1. Primer cerrahi tedavi

Tip 1 histerektomi ve bilateral salpingo-ooferektomiye pelvik ve paraaortik lenf nodu disseksiyonunun eklenmesi EOK'nin standart evrelemesi için gereken cerrahi prosedürdür. Pelvik yıkama sıvısının eldesi sonucu sitolojik değerlendirme ve omentektomi de mutlaka yapılmaktadır. Makroskopik metastazlar görüldüğünde bağırsak, dalak, diyafram, parsiyel sistektomi, parsiyel pankreatektomi ve parsiyel hepatik rezeksiyonu da içeren sitoredüksiyon gerçekleştirilmektedir [3,4].

2.2.1.2. Interval Debulking Cerrahisi

Primer cerrahi tedaviye uygun olmayan hastalar öncelikle neoadjuvan kemoterapi ile tedavi edildikten sonra açık cerrahi debulking ya da minival invaziv cerrahi yöntemi ile tam evreleme ve tüm periton yüzeylerinin incelenmesi şartıyla opere edilir. Bu vakaların hem neoadjuvan kemoterapi öncesi hem de sonrası jinekolojik onkoloji uzmanı tarafından değerlendirilmesi ve operasyonun da bu hekim tarafından yapılması cerrahi başarıyı artırır [21,22]. Neoadjuvan kemoterapi sırasında radyolojik yanıt alınmaması ya da persistan Kanser antiijeni 125 (CA125) yüksekliği olması durumunda cerrahiden kaçınılmalıdır.

2.2.2. Over Kanserinde Onkolojik Tedaviler

EOK'de onkolojik tedaviler öncelikle küratif ve palyatif olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Küratif tedaviler hastanın cerrahi tedavisinden önce ya da sonra verilen ve kanserin nüks etme riskini azaltan tedavilerdir. Palyatif tedaviler ise hastanın tanı anında operasyon şansının olmaması veya primer cerrahi ya da onkolojik tedavi sonrası nüks etmiş olması durumlarında verilen hastayı iyileştirme amacıyla değil hastanın semptomlarını azaltmak, yaşamını uzatmak ve yaşam kalitesini düzeltmek amacıyla verilen tedavilerdir. Son yıllara dek tüm bu tedavilerin alt gruplarını kemoterapi ajanları oluşturmakta iken özellikle son 5 yılda yapılan çalışmalar ile gerek küratif gerekse palyatif tedavilerde kemoterapilerin yanı sıra hedefe yönelik ajanlar da kullanılmaya başlanmıştır. İmmünoterapinin henüz over kanserinde kanıtlanmış etkisi gösterilememiş olmakla birlikte devam eden faz 2 ve faz 3 çalışmalar bulunmaktadır [23].

2.2.2.1. Adjuvan Tedaviler

EOK'nin cerrahi tedavisini takiben nüks riskini azaltmak için verilen tedavilere adjuvan tedaviler adı verilir. Hastanın genel durumuna, yaşına ve altta yatan hastalıklarına göre farklı tedaviler uygulanmakla birlikte genel olarak adjuvan tedavinin temelini kemoterapi ajanları oluşturmaktadır. Evre IA ve IB olan EOK olgularının bir kısmı risk faktörlerini içermemesi durumunda cerrahi sonrası adjuvan tedavi almadan izlenebilmektedir [24]. Son yıllarda yapılan çalışmalar uygun hasta gruplarında adjuvan kemoterapiye Bevacizumab ve tümörün yeni damar oluşumunu inhibe eden anti-Vasküler Endotel Büyüme Faktörü (anti-VEGF) moleküllerinin eklenmesinin kanserin nüks etme olasılığını azalttığı gösterilmiştir [25,26].

2.2.2.2. Neoadjuvan Tedaviler

İleri evre EOK olgularında en iyi sonuçlar sıralamasından bağımsız tüm görünür hastalığın cerrahi rezeksiyonu ve kemoterapinin birlikte kullanılması ile elde edilmektedir [27]. Bu nedenle primer debulking cerrahisine uygun olmayan olgular için öncelikle neoadjuvan kemoterapi verilmesi sonrası interval debulking cerrahisi yapılması önerilmektedir. Bu olgular genellikle ileri yaş, kötü genel durum, eşlik eden hastalıkların çok olması ve cerrahi olarak tüm görünür hastalığın çıkarılabilir olmaması gibi risk faktörlerini taşımaktadır. Neoadjuvan tedavi ile hastaların ileri dönemde opere olma olasılığının artırılması amaçlanmaktadır. Bu olguların neoadjuvan tedavi ve primer debulking cerrahisi sonrası postoperatif adjuvan tedavisi alması da önerilmektedir [28].

2.2.2.3. Palyatif Tedaviler

Cerrahiye uygun olmayan ya da cerrahi sonrası rezidü kalan hastaların yanı sıra, primer cerrahi ve onkolojik tedavi sonrası nüks eden hastaların yaşam süresini uzatmak ve kansere bağlı semptomlarını azaltmak amacıyla verilen tedavilere palyatif tedaviler adı verilir. Bu tedaviler esas olarak kemoterapilerden oluşmakla birlikte hedefe yönelik ajanlar da kullanılmaktadır. Adjuvan tedavilerde de yeri olan Bevacizumab palyatif amaçla da kemoterapiye ek olarak kullanılmaktadır. Ayrıca idame tedavisinde PARP (Poli ADP riboz polimeraz) enzimi inhibitörleri de kullanılmaktadır [29,30].

2.2.2.4. Hipertermik İntraperitoneal Kemoterapi

Hipertermik intraperitoneal kemoterapi (HIPEC) tekniği kemoterapinin ısıtılmış bir solüsyon içersinde periton boşluğuna perfüze edilmesidir. Bu tekniğin geliştirilmesinin amacı ısının peritoneal yüzeylerdeki kemoterapi geçirgenliğini artırması ve DNA onarım mekanizmalarının inhibe edilmesi ile kanser hücrelerinin tedaviye olan yanıtının artırılmasıdır [31]. Son yıllarda over kanseri olguların tedavisinde HIPEC'in yerinin araştırıldığı çok sayıda randomize çalışma yapılmıştır [32,33]. Yapılan çalışmalarda enfeksiyon, apse oluşumu, bağırsak perforasyonu, ileus, kanama, venöz tromboembolizm, miyokardiyal enfarktüs, plevral efüzyon, pnömotoraks ve böbrek yetmezliği gibi çok sayıda komplikasyon gelişimi gözlenmiştir [34]. Komplikasyonların çok ve ciddi olması nedeniyle HIPEC tedavisinin yüksek volümlü hastalarda (evre III-IV) ve özellikle cerrahi sonrası mikroskobik hastalık riski yüksek olan peritoneal karsinomatozlu olgularda yapılması üzerine yeni çalışmalara odaklanılmıştır.

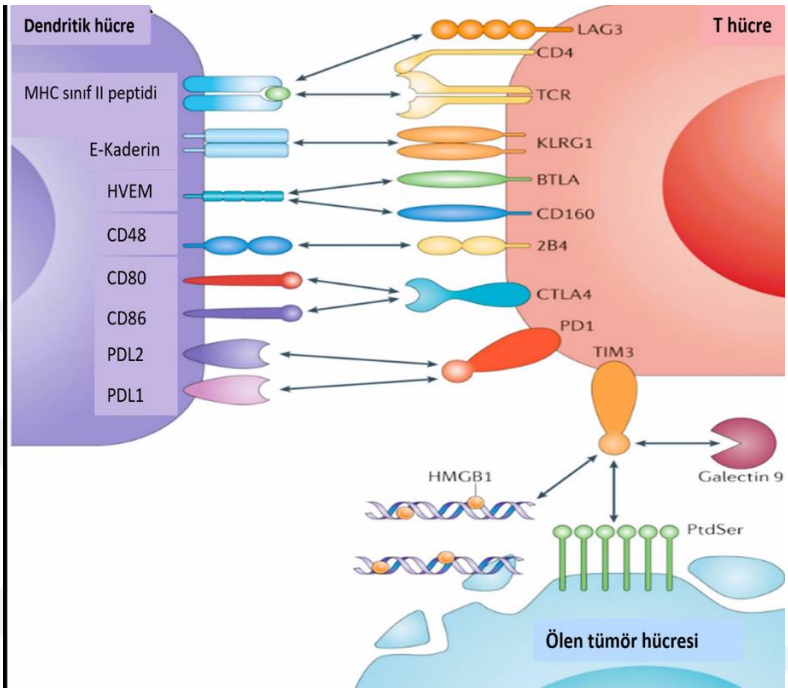
2.3. İmmun kontrol noktası reseptörleri

İmmün kontrol noktası reseptörleri, T hücre aktivasyonunu ya da fonksiyonunu negatif yönde etkileyen ko-inhibitör moleküllerdir. İnhibisyon hücre içi ya da hücre dışı olabildiği gibi immünolojik yanıtın pek çok farklı aşamasında da oluşabilmektedir. İmmün kontrol noktası reseptörlerinin inhibitör etki basamaklarını özetleyecek olursak;

1. Ko-stimulatör reseptörlerle yarışmalı olarak bağlanmalarını önler
2. Ko-aktivatör ya da T hücre reseptörü alt sinyal yolaklarını önler
3. T hücre fonksiyon kaybına yol açacak genlerin ekspresyonunu arttırır.

Bu reseptörlerin immünolojik öneminin yanı sıra aktivasyonu ile otoimmünitenin önlenebileceği, inhibisyonunun ise kanser tedavisinde çığır açacağı hipotezi ile ilgili çok sayıda çalışmalar yapılmış ve günümüzde çok sayıda araştırma halen devam etmektedir. Bu reseptörlerden en iyi bilinenleri olan CTLA-4 ve PD-1 gibi immün kontrol noktası reseptörlerinin keşfi ile kanser tedavisinde yeni bir dönem başlamıştır [35]. İnhibitör reseptörlerin kanser tedavisinde klinik kullanıma girmesinin ardından yeni inhibitör reseptörlerin keşfi ve inhibisyonlarının kanser tedavisindeki rolü ile ilgili çok sayıda çalışmalar yapılmaya başlanmıştır. PD-1 ve CTLA-4 inhibisyonuna yanıt veren hasta gruplarını seçmek için yeterli biyobelirteçlerin bulunmaması ve yüksek düzeyde PD-1 eksprese eden olguların dahi anti-PD-1 tedavilere yanıt vermemesi farklı

kontrol noktası reseptörlerinin eş zamanlı ekspresyonunu gündeme getirmektedir [36]. Şekil 2-1'de T hücre fonksiyonlarını negatif yönde etkileyen, diğer deyişle inhibitör fonksiyonları olan reseptörler ve ligandları görülmektedir. Sonraki bölümlerde bu reseptörler ile ilgili ayrıntılı bilgiye yer verilecektir.



Şekil 2-1: T hücre fonksiyonlarının negatif regülasyonundan sorumlu reseptörler- Nguyen (36)

2.3.1. PD-1

Programlı Ölüm-1 (PD-1) reseptörü regülatör T (Treg) hücrelerde ve aktivasyonu takiben NK hücreler, Doğal öldürücü T (NKT) hücreleri, efektör T hücreleri ve B hücrelerinde eksprese edilmektedir. PD-1'in major ligandı olan PD-L1 ise T lenfositler, B hücreleri makrofajlar, dendritik hücreler ve birçok nonhematopoietik hücrede, PD-1'in diğer bir ligandı olan PD-L2 ise PD-L1 kadar yaygın olmamakla birlikte dendritik hücreler ve NK hücrelerinde eksprese edilmektedir [37]. PD-1 fizyolojik olarak T hücre yanıtlarının düzenlenmesinde önemli rol oynayan ve bunun sonucu olarak da self-antijenlere tolerans gelişmesinden sorumlu moleküllerden biridir [38]. Kronik enfeksiyonlarda ortaya çıkan T hücre tükenmişliğinin PD-1 blokajı ile ortadan kaldırıldığı gösterilmiştir [39,40]. Bu bulguların ardından, yapılan klinik

çalışmalarda PD-1 inhibisyonunun anti-tümöral immünite üzerine olumlu etkisi öncelikle solid tümörlerde ardından da hematolojik malignitelerde gösterilmiştir [41]. PD-1/PD-L1 yolağını inhibe eden tedavilerde tümörün artmış mutasyon yükü ve PD-L1 ekspresyon düzeyinin tedaviye yanıtı belirleyen faktörler arasında olduğu gösterilmesine karşın; bu faktörlerin varlığında da çok sayıda vakada yanıtsızlık gözlenmesi araştırmacıları PD-1 temelli tedavilere direnç mekanizmalarını araştırmaya yönlendirmiştir. Anti PD-1 tedavi direnci primer ve kazanılmış direnç olarak iki gruba ayrılmaktadır. PD-1 ekspresyonu yüksek ($PD\text{-}1^{yüksek}$) T hücreleri ileri derecede tükenmişlik fenotipine sahip olup anti-PD-1 tedavilerine dirençli oldukları, buna karşın PD-1 ekspresyonu düşük olan gruplarda bu tedavilere yanıt verdiği gösterilmiştir [42]. $PD\text{-}1^{yüksek}$ $CD8^+$ T lenfositlerinin primer direnç mekanizmasından sorumlu olduğu, bu sürecin tetiklediği artmış tükenmişlik hücre fenotipinin ise kazanılmış direncin başlıca mekanizması olduğu öne sürülmektedir [43].

2.3.2. CTLA-4

Sitotoksik T lenfosit antijen 4 (CTLA-4) (CD152) ve CD28 hem $CD4^+$ hem de $CD8^+$ T hücreleri üzerinde eksprese edilen birbirlerine zıt işlevleri olan homolog reseptörlerdir. Her iki reseptör de antijen sunan hücrelerin yüzeyinde eksprese edilen CD80 ve CD86'ya bağlanır. CD28, CD80/CD86'ya bağlanarak T hücre aktivasyonunda kostimülatör rol oynayan bir moleküldür. CD28 sinyal yolakları hem efektör T hücre aktivasyonu hem de Treg fonksiyonu için önemli role sahiptir. CD28 yüksek afinite ile CD80'e ve düşük afinite ile CD86 monomerine bağlanarak T hücre reseptör sinyali ile birlikte T hücre kostimulasyonuna aracılık eder. Buna karşın, ligandların CTLA-4 ile etkileşimi tam mekanizması net olarak bilinmemekle birlikte T hücre yanıtlarını inhibe ettiği gösterilmiştir. CTLA-4 her iki liganda da CD28'den daha yüksek afinite ve avidite ile bağlanır [44]. CTLA-4, CD28 ile yarışmalı olarak ligandına bağlandığında CD28 aracılı kostimulasyonun antagonisti olarak görev yapar [45]. Bu etkileşimler immün sinapsta T hücreler ve antijen sunan hücreler arasında gerçekleşir [46]. CTLA-4'ün ligandı olan CD80 ve CD86 çok iyi tanımlanmış reseptörler olmakla birlikte fonksiyonel farklılıkları henüz belirlenmemiştir. Bu nedenle bu ligandlar birlikte B7 molekülü ya da CD80/86 olarak adlandırılır. Bu ligandlar B lenfositler ve dendritik hücreler gibi antijen sunan hücrelerde de bulunur [47].

CD28/CTLA-4 yolağını hedef alan antikorlar geliştirmek hem kanser hem de otoimmün hastalıkların tedavisinde oldukça popülerdir. CTLA-4 kendi dokularımıza karşı olan immün yanıtı kontrol altına almaktadır, bu nedenle bu yolağın güçlendirilmesi ya da aktivasyonu otoimmün hastalıkların tedavisinde bir seçenek olabilirken, aynı yolağın inhibe edilmesi anti-tümöral immünitenin güçlenmesine ve tümörün yabancı olarak algılanmasına zemin hazırlamaktadır [48]. CTLA-4 molekülü de otoimmünite ile tümör gelişimi arasındaki dengeyi sağlayan önemli bir immünolojik mekanizma olarak karşımıza çıkmaktadır.

2.3.3. TIM-3

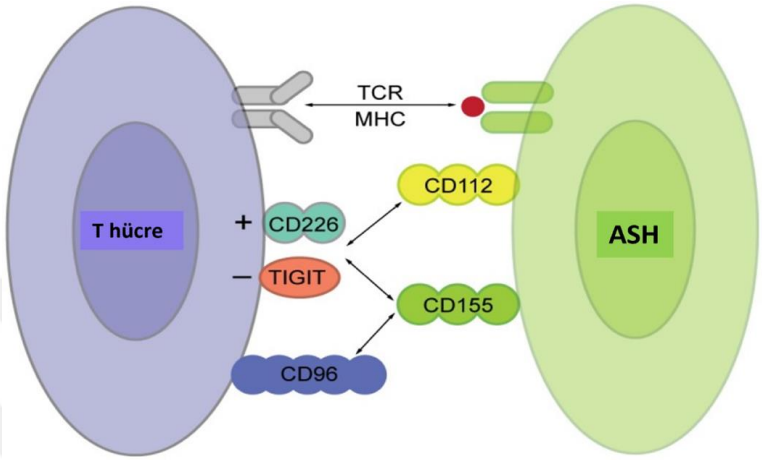
T hücre immünoglobulin ve müsin domeni içeren molekül-3 (TIM-3) çoğunlukla yardımcı T (Th) hücreler, sitotoksik T lenfositler ve Treg hücrelerde eksprese edilmektedir [49]. Treg lenfositlerinde TIM-3 ekspresyonu arttıkça baskılayıcı hücre popülayonunun arttığı ve CTLA-4 ve FOXP3 düzeylerinin de beraberinde artış gösterdiği bulunmuştur [50]. TIM-3'ün adaptif immün sistem hücrelerinin yanısıra NK hücrelerinde de eksprese olduğu gösterilmiştir. TIM-3^+ NK hücrelerinin sitotoksik aktivite ve proliferasyon kapasitelerinde azalma görülmekle birlikte sitokin salınımlarında da sağlıklı kontrollere kıyasla düşüş bulunmuştur [51].

TIM-3 diğer immün kontrol noktası reseptörleri ile birlikte eksprese edilebilmektedir. En sık PD-1 inhibitör reseptörü ile birlikte eksprese edildiği ve $CD8^+$ sitotoksik T lenfositlerde TIM-3 ve PD-1 birlikte ekspresyonunun tükenmişlik fenotipine neden olduğu bulunmuştur. Bu reseptörlerin blokajının ise tükenmiş T hücre fenotipini azaltarak anti-tümöral etkiyi artırdığı gösterilmiştir [52].

2.3.4. TIGIT

TIGIT (T-cell immunoglobulin and ITIM domain) ve CD96 koinhibitör reseptörlerdir ve etkilerini antijen sunan hücreler üzerindeki CD155 etkileşimi aracılığı ile göstermektedir. Kostimülatör bir reseptör olan CD226 ise CD155 için TIGIT ve CD96 ile yarışarak antijen sunan hücre aktivasyonunu sağlamaktadır. Bu yolak CTLA-4/CD28 yolağı ile homoloji oluşturmaktadır (Şekil 2-2) [53]. TIGIT yapısal olarak immünglobülin süperailesinin bir üyesidir, tüm inhibitör reseptörlerde ortak özellik olmamakla birlikte pek çoğunda bulunan immünreseptör triozin bazlı inhibitör motif (ITIM) TIGIT'te de bulunmakta ve TIGIT aracılı inhibitör fonksiyonlardan sorumlu

tutulmaktadır [54]. TIGIT hafıza T hücreleri, αβ T hücreleri, Treg hücreler, NKT hücreleri, foliküler yardımcı T (Tfh) hücrelerinde ve NK hücrelerinde eksprese edilir. [55,56]



Şekil 2-2: TIGIT ve koinhibitör reseptör olan CD96 ile aktivatör reseptör olan CD226'nın T hücre ve antijen sunan hücre etkileşimindeki rolü- Kraus (53)

TIGIT inhibibitör etkisini intrinsik ve ekstrinsik mekanizmalar aracılığıyla ile göstermektedir. İntrinsik mekanizmada TIGIT CD155 aracılığı $TIGIT^+$ T hücrelerinde interferon (IFN)-γ salınımını inhibe etmektedir. Bu etki hem $CD4^+$ hem de $CD8^+$ T lenfositlerinde gösterilmiştir [57,58]. Ayrıca Treg hücrelerinin TIGIT agonistleri ile uyarıldıklarında intrinsik etki ile hem IL-10 hem de Fibrinojen benzeri protein-2 (FGL2) düzeylerinde artış görülmüştür [59]. Bir diğer inhibisyon mekanizması olan CD155 aracılı ekstrinsik mekanizmada ise TIGIT ile CD155 bağlanması sonrası dendritik hücrelerde Erk aktivasyonu inhibe olmakta ve IL-12 üretimi azalarak IL-10 üretimi artmaktadır [60]. $TIGIT^+$ Treg hücreler Th1/Th17 ile Th2 tip immünite arasındaki dengenin bozulmasından sorumlu tutulmaktadır. Selektif olarak Th1/Th17 immünitesinin baskılanması ve Th2 immünite fonksiyonlarının korunması $TIGIT^+$ Treg hücrelerin spesifik görevlerinden biridir. Bu etki $TIGIT^+$ Treg hücrelerinin $TIGIT^-$ Treg hücrelerine kıyasla daha fazla FGL2 üretmesine bağlanmaktadır [59]. T lenfositlerin yanı sıra NK hücrelerinde de TIGIT önemli rol oynamaktadır. Genel olarak TIGIT'in NK hücreleri üzerindeki etkisi CD155 bağımlı ekstrinsik yolak aracılığı ile olmaktadır

[56]. TIGIT ekspresyonu ile IFN-γ salınımı ve sitotoksik aktivite arasında negatif korelasyon saptanmıştır [61].

2.3.5. LAG-3

Lenfosit aktivasyon geni (LAG)-3 1990'larda keşfedilen CD4 molekülü ile yapısal homoloji gösteren bir transmembran proteindir [62]. LAG-3 proteini genel olarak aktive T hücreleri ve NK hücreleri üzerinde eksprese edilir. Bu nedenle ilk keşfedildiği yıllarda $CD4^+$ ve $CD8^+$ T hücrelerinin aktivasyon belirteci olarak tanımlanmıştır [63]. LAG-3'ün $CD4^+$ T lenfositleri ile etkileşiminin Majör histokompatibilite kompleksi (MHC) sınıf II molekül aracılı olabileceğinin gösterilmesi üzerine yapılan araştırmalar MHC sınıf II molekülüne yoğunlaşmıştır. LAG-3 molekülünün MHC sınıf II molekülüne bağlandığı ancak $CD4^+$ T hücrelerinden farklı bir bağlanma noktası kullandığı bulunmuştur [64]. Yapılan çalışmalar LAG-3'ün MHC sınıf II molekülünün yanı sıra Fibrinojen benzeri protein-1 (FGL1), α-sinüklein, Galektin-3 ve karaciğer ve lenf nodu sinüzodial C-tipi lektin (LSECtin/CLEC4G) ile bağlanabildiğini göstermiştir [65-67]. LAG-3'ün PD-1, TIGIT, TIM-3 ve 2B4 (CD244) gibi diğer inhibitör moleküller ile birlikte eksprese edilmesi immün hücre tükenmişliğine yol açmakta ve sonuç olarak sitokin salınımında azalmaya yol açmaktadır [68,69].

LAG-3'ün birçok hücrede eksprese edilmesi ve çok sayıda ligandının belirlenmiş olmasına rağmen molekül yapısı ve fonksiyonu hakkında bilinmeyen birçok nokta vardır. Buna karşın son yıllarda artan immunoonkolojik çalışmalar LAG-3 molekülünün bloke edilmesinin anti-tümöral immüniteye etkisini araştırmaktadır. İlk yapılan preklinik ve hayvan çalışmaları LAG-3 molekülünün inhibe edilmesinin/blokajının T hücre tükenmişliğini hafif düzeyde ortadan kaldırabileceğini göstermiştir; buna karşın LAG-3 molekülünün PD-1 molekülü ile birlikte kullanımının LAG-3 ve PD-1 knock out farelerde anlamlı biçimde T hücre tükenmişliğini geri çevirdiğini ortaya koymuştur [70]. Over kanseri ve melanom gibi solid tümörlerde anti-PD1 tedavilerinin kısıtlı etkilerine LAG-3 inhibisyonunun eklenmesinin anti-tümöral etkiyi anlamlı şekilde artırdığı ile ilgili çalışmalar da bulunmaktadır [70,71].

2.4. Solubil İmmün Kontrol Noktası Reseptörleri

İmmün kontrol noktası inhibitörleri immün sistemin baskılanmasında önemli fonksiyonları olan ve çok çeşitli fonksiyonları olan moleküllerden oluşmaktadır. Bu reseptörlerin en önemli ve tümör immünolojisinde en etkin rol oynayanları PD-1, CTLA-4, TIM-3, LAG-3 ve TIGIT'tir. Bu reseptörlerin etkilerinin ve prognostik önemlerinin değerlendirilmesi için biyobelirteç araştırmaları sırasında bu kontrol noktası inhibitörlerinin solubil izoformlarının dolaşımda bulunduğu gösterilmiştir [72].

2.4.1. sCTLA-4

Solubil CTLA-4 (sCTLA-4) yüzeyde eksprese edilen CTLA-4'ün alternatif mekanizmalarla bölünmesi ile oluşan transmembran parçasını içermeyen şeklidir. Bu nedenle hücre yüzeyine bağlanmak yerine hücre yüzeyinden salgılanmaktadır [73]. *In vitro* çalışmalar sCTLA-4'ün T hücre fonksiyonunu kuvvetli biçimde inhibe ettiğini göstermiştir. Treg hücrelerin de sCTLA-4 salgılamakta ve bu mekanizma ile Treg hücrelerinin immüniteyi baskılayıcı etkisi daha da belirgin hale gelmektedir. sCTLA-4 hem kanser hem de otoimmün hastalıklar gibi immün systemin dengesinin bozulduğu pek çok hastalıkta önemli rollere sahiptir [74]. Kolorektal kanser olgularında sCTLA-4 düzeylerinin membran bağlı CTLA-4'e benzer şekilde kötü prognoz ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [75].

2.4.2. sPD-1 & sPD-L1

Solubil PD-1 (sPD-1) ve PD-L1 (sPD-L1), son yıllarda özellikle kanser şiddeti ile yakından ilişkili bulunan solubil immün kontrol noktası reseptörleridir. Hem sPD-L1 hem de sPD-1, sCTLA-4 gibi alternatif bölünme mekanizması ile oluşmakta ve transmembran domeni içermeyen salgılanan formlarıdır [76,77]. sPD-1 ekstrasellüler parçası aracılığı ile PD1:PD-L1 bağlanmasını engellemekte ve T hücre baskılanmasını önleyerek anti-tümöral immün yanıtı aktive etmektedir. Bu mekanizma kanser immünolojisi açısından düşünüldüğünde olumlu olmakla birlikte sağlıklılarda sPD-1 düzeyinin artması otoimmünite ile sonuçlanabilmektedir [78]. sPD-L1 düzeylerinin serumda artışı ilginç olarak anti-PD-1 tedaviler sonrası gözlenmekte ve tedavi sonrası sPD-L1 düzeyleri düşük bulunan grubun daha iyi prognoza sahip olduğu gösterilmiştir

[79]. Over kanserinde sPD-1 düzeylerinin benign over lezyonları ile karşılaştırıldığı bir çalışmada sPD-1 düzeyinin over kanserinde anlamlı olarak yüksek bulunduğu saptanmıştır [80]. Prognostik ve tanısal açıdan önemi henüz gösterilememiş olmakla birlikte bulgular yeni çalışmalara ilham vermektedir.

2.4.3. sTIM-3

TIM-3'ün solubil formu (sTIM-3) da diğer immün kontrol noktası reseptörlerinin solubil formları gibi alternatif bölünme ile meydana gelmektedir. Bir diğer mekanizma ise matriks metalloproteinaz enzimleri olan ADAM10 (A Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10) ve ADAM17 **(**A Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 17) aracılığı ile hücre yüzeyinden kesilmesidir [81]. sTIM-3 hafıza T hücre gelişimini engelleyerek $CD8^+$ T lenfosit tükenmişlik fenotipini artırmaktadır [82]. Bununla birlikte $CD8^+$ T hücre tükenmişliğinde sTIM-3'ün rolü henüz net olarak aydınlatılamamıştır. Ancak sTIM-3'ün tükenmişlik fenotipi haricinde de T lenfositlerin antijen spesifik immün yanıtlarını inhibe ettiği de bilinmektedir [83]. Over kanserinde sTIM-3'ün yeri ve önemi ile ilgili çalışma bulunmamakla birlikte sTIM-3 düzeyleri gastrik kanser olgularında sağlıklılara kıyasla daha yüksek saptanmıştır. Ayrıca operasyon sonrası sTIM-3 düzeylerinin takiplerde artışının da rekürensi saptanmasında önemli olduğu gösterilmiştir [84].

2.4.4. sLAG-3

Solubil immün kontrol noktası reseptör oluşumuna benzer şekilde solubil LAG-3 (sLAG-3)'te alternatif bölünme ya da ADAM10 ve ADAM 17 isimli metalloproteinaz enzimleri aracılığı ile hücre yüzeyinden kesilmesi ile oluşmaktadır [85,86]. sLAG-3 salgılanmasından sorumlu esas hücre grubu plazma dendritik hücreleridir [87]; ancak T hücrelerinin de aktivasyon sonrası sLAG-3 düzeylerinde artışa önemli ölçüde katkıda bulunduğu gösterilmiştir [86]. Yapılan çalışmalar henüz sLAG-3'ün düzeylerindeki artışın kanıtlanmış bir biyolojik etkisini gösterememiştir. Fonksiyonel olarak görevi henüz gösterilememiş olsa da prognostik bir belirteç olarak

kanserde kullanılabileceği düşünülmektedir. Akciğer kanseri ve meme kanseri gibi pek çok solid tümörde sLAG-3 düzeylerinin artışının daha iyi prognoz ve daha iyi sağkalım ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [88,89].

2.5. Anti-tümöral immün yanıt

T hücreleri adaptif immün cevabın düzenlenmesinde ve hastalıkların patogenezinde anahtar rol oynamakta aynı zamanda tümör hücrelerinin yok edilmesine aracılık etmektedir [5]. T hücreleri fenotipik ve fonksiyonel olarak esas olarak $CD3^+CD4^+$ Th ve $CD3^+CD8^+$ sitotoksik (Tc) hücrelerinden oluşmaktadır [6,7]. CD8 eksprese eden Tc hücreler hücresel immün sistemin kritik bir komponentidir ve hücre aracılı anti-tümöral immünitede önemli rollere sahiptir [8,9]. $CD8^+$ Tc hücrelerinin başlıca fonksiyonları enfeksiyonları kontrol altına almak ve tümör gelişimini engellemektir ve bu hücrelerin eksprese ettiği özgün T hücre reseptörleri ile antijen sunan hücreler tarafından sunulan peptid/MHC sınıf I moleküllerini tanımaktadır. T hücre reseptör uyarımı sonrası bu hücreler aktive olmakta ve fonksiyonel hale gelmektedir. Fonksiyonel Tc lenfositleri IFN-γ ve tümor nekrotize edici faktör (TNF)-α gibi proenflamatuar sitokinler salgılamakta ve T hücre reseptörü tarafından MHC sınıf I molekülü aracılı sunulan yabancı peptitleri tanıyarak hedef hücrenin lizisine yol açmaktadır. $CD8^+$ Tc hücreler çoğalma, aktivasyon ve farklılaşma döneminde sitotoksik efektör fonksiyonlarını kazanırlar. Patojenik sürecin çözülmesini takiben efektör $CD8^+$ T hücrelerinin çoğu apoptoza uğrarken küçük bir alt grubu uzun ömürlü bellek hücreleri halini alır. Tc hücrelerinin CCR7 ve CD45RA ekspresyonlarına göre $CCR7^+CD45RA^+$ naif hücre, $CCR7^+CD45RA^-$ santral hafıza, $CCR7^-CD45RA^-$ efektör hafıza ve $CCR7^-CD45RA^+$ efektör hücreler olmak üzere 4 alt grubu bulunmaktadır. Fonksiyonel açıdan $CD8^+CD28^-$ fenotipteki hücrelerin baskılayıcı fonksiyona sahip oldukları ve tümör bölgelerinde lokalize oldukları gösterilmiştir [10-12]. Tc hücreleri hedef hücre ile immünolojik sinaps oluşturdukları zaman sitolitik efektör proteinler salgılayarak tümör hücre ve hücre içi patojenleri granül ya da reseptör aracılı mekanizmalarla yok ederler [13,14]. Bu hücrelerin esas öldürme mekanizması hedefi tanımayı takiben ekzositozla salınan perforin ve granzim gibi litik proteinler içeren hazır granüllerin salınması yoluyla olmaktadır. İkinci yolakta ise hedef hücre yüzeyinde reseptör birleşmesi rol oynamakta ve bu olayda Fas-Fas Ligand gibi reseptörler klasik olarak kaspaz bağlı

apoptozu başlatmaktadır. Sitolitik granüller özelleşmiş sekretuvar lizozomlardır ve bu granüller perforin ve granzim olarak adlandırılan serin proteazlar içermektedir. Efektör $CD8^+$ Tc hücreler yüksek oranda IFN-γ, TNF-α ve IL-2 salgılamakta ve sitotoksik fonksiyonlarını en yüksek düzeyde sergilemektedir [15]. Kolorektal kanser veya bazı solid kanser türlerinde tümöral alanda bulunan hafıza Tc hücrelerinin hastaların yaşam süresini belirleyen faktör olabileceği ve klonal olarak çoğalan tümöre spesifik $CD4^+$ Th ve $CD8^+$ Tc hücrelerin bu bölgelerde artış gösteren temel lenfosit alt grupları olduğu gösterilmiştir. Immünohistokimyasal teknikler kullanılarak yapılan çalışmalar tümör biyopsilerinde T lenfositlerinin bulunmasının önemini açığa çıkarmıştır [16]. TIL olarak T lenfositleri özellikle tümörlerde çok sık çalışılan bir konudur. Son yıllarda yapılan bir derlemede over kanseri olgularında $CD4^+$ ve $CD8^+$ T lenfosit alt gruplarının tümör mikroçevresindeki varlığının iyi klinik yanıt ve daha uzun sağkalım ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [90].

2.5.1. Doğal Öldürücü (NK) hücreler

NK hücreler 1970'li yılların başlarından beri bilinmekle birlikte diğer doğal lenfoid hücreler (ILC) ile aynı lenfoid öncülü paylaştıkları son yıllarda bulunmuştur [91]. Ayrıca yapılan çalışmalar NK hücrelerin ILC1 ailesine ait olan sitotoksik bir alt grup olduğunu göstermiştir [92]. Bir başka yaklaşıma güre insan NK hücreleri kemik iliğindeki multipotent kök hücreden köken almaktadır. Bu basamağın ardından her hücrenin ayrı bir yüzey spesifik belirteç aracılığı ile belirgin bir lenfoid/NK hücre alt grubuna farklılaştığı öne sürülmektedir [93]. Periferik kanda NK hücreler yüzeylerinde eksprese ettikleri CD56 molekül ekspresyon yoğunluğuna göre iki alt gruba ayrılmaktadır. NK hücrelerinin büyük çoğunluğu $CD56^{dim}$ hücrelerden (%90) oluşmaktadır. $CD56^{dim}$ NK hücreler esas olarak sitotoksisiteden sorumludur. Ancak $CD56^{dim}$ ve $CD56^{bright}$ ayrımı NK hücrelerinin çeşitli immünolojik fonksiyonlarının açıklanmasında yetersiz kalmaktadır. NK hücreleri CD56 dışında çok sayıda hücre yüzeyi molekülü eksprese etmektedir [94,95]. Güncel sınıflandırmaya göre NK hücreleri CD56 ve CD16 ekspresyon paternlerine göre $CD56^{bright}CD16^{-}$, $CD56b^{bright}CD16^{dim}$, $CD56^{dim}CD16^{-}$, $CD56^{dim}CD16^{dim}$, $CD56^{dim}CD16^{bright}$ ve $CD56^{-}$

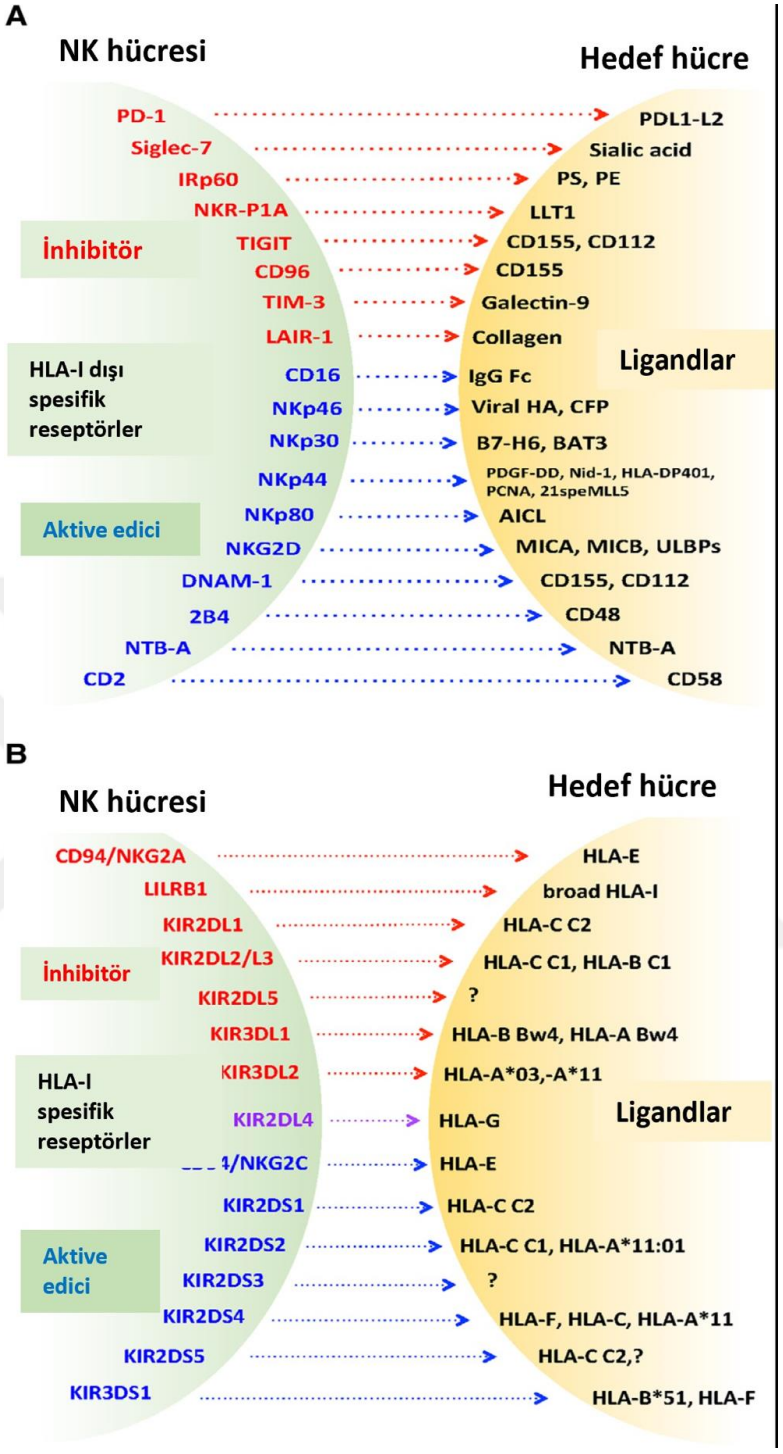
$CD16^{bright}$ NK hücreleri olarak altı altgruba ayrılmaktadır [96]. $CD56^{dim}CD16^{bright}$ NK hücrelerinin efektör fonksiyonlara sahip olduğu bilinirken, $CD56^{dim}CD16^{-}$ NK hücrelerinin ise tükenmişlik fenotipine sahip NK hücre alt grubu olduğu gösterilmiştir [97].

NK hücrelerinin fonksiyonları taşıdıkları özel reseptörler aracılığı ile kontrol edilmektedir. NK hücre reseptörleri doğal sitotoksisite reseptörleri (NCR) ve C tipi lektinler ve immunoglobulin benzeri reseptörler olmak üzere üç farklı grupta sınıflandırılmaktadır. Bu reseptörlerin aktive edici ve inhibe edici fonksiyonları bulumaktadır [98]. Aktive edici reseptörler antijene bağımlı hücresel sitotoksisiteden (ADCC)'den sorumlu olan CD16 /FcγRIIIA'nın yanı sıra NCR ve C tip lektinlerden NKG2C ile NKG2D'dir [99]. NCR grubunda NKp46, NKp44 ve NKp30 gibi Immünglobulin-benzeri proteinler yer almaktadır. NCR, NK hücre aracılı sitotoksisiteyi indüklemektedir ve pek çok farklı tümöre karşı antitümör immüniteden sorumludur [100]. NKG2D ise tümör hücreleri ve virüs ile enfekte hücreler tarafından eksprese edilen MHC sınıf I ilişkili molekül A/B (MICA/B) ve UL16 bağlayıcı proteini (ULBP) tanıyarak NK hücreleri aktive edici sinyaller göndermektedir [101]. İnsan lökosit antijenine (HLA) spesifik olan NK reseptörlerinin en çok bilineni öldürücü immünglobulin-benzeri aktivatör reseptörü (aKIR) ve öldürücü immünglobulin-benzeri inhibitör reseptörüdür (iKIR) [102]. (Şekil 2-3) Bu reseptörlerin etkileri oldukça kompleks olup genlerin aktivasyonu ve ifadesi polimorfizm nedeniyle çok değişkenlik göstermektedir [103]. NK hücrelerinin eğitimi sırasındaki 'missing self' hipotezine göre HLA sınıf I moleküllerinin ekspresyonunu kaybeden hedef hücreler NK hücreleri tarafından aktivatör reseptörler aracılığı ile tanınmakta, hedef hücrede HLA sınıf I ekspresyonu mevcut ise iKIR molekülleri tarafından NK hücrelerinin sitotoksik fonksiyonları inhibe edilmektedir [104]. NK hücre aktivasyonunun inhibisyonunda iKIR reseptörlerinin yanı sıra bir C tipi lektin olan NKG2A, CD94 ile heterodimer oluşturarak inhibitör rol oynamaktadır [105]. NKG2A/CD94 heterodimeri HLA-E ile bağlanma sonrası NK hücre inhibisyonu için gerekli sinyalleri gönderir [106]. Meme kanserinde tümör infiltre eden NK hücrelerinde NKG2A ekspresyonunda artış NK hücre disfonksiyonu ve kanser progresyonu ile ilişkilendirilmiştir [107].

Periferik kan NK hücreleri CD8 ekspresyonuna göre iki alt gruba ayrılmaktadır. CD8 molekülü hücre yüzeyinde eksprese edilen bir yüzey glikoproteinidir. CD8a ve CD8b proteinleri CD8ab heterodimeri ya da CD8aa

homodimerini oluşturmaktadır. NK hücreleri esas olarak CD8aa alt tipini eksprese etmektedir. Naif T hücreleri ise CD8ab heterodimeri eksprese etmekte ve bu nedenle periferik kan analizlerinde $CD8^+$ NK hücreleri belirlemek kolay olmaktadır [108]. NK hücrelerinin büyük çoğunluğu CD8 eksprese etmektedir. $CD8^+$ NK hücreler hedef hücreyi sitotoksik fonksiyonlar sergileyerek öldürebilmekte ve sonrasında hedef hücre apoptozu minimal düzeyde iken $CD8^-$ NK hücrelerin hedef hücre lizisi sonucunda çok sayıda hedef hücreyi apoptoza götürmektedir [109].

Çalışmaların çoğu periferik kan NK hücreleri ile yapılsa da akciğer, karaciğer, dalak, bağırsaklar ve böbrekler gibi pekçok organda dokuya infiltre olan NK hücreleri bulunmaktadır [110]. Doku NK hücrelerinin farklı bir gelişim basamakları olabileceği hipotezi ile ilgili çok sayıda çalışmalar bulunmaktadır. Kemik iliği, dalak ve akciğerdeki doku NK hücrelerinin çoğunluğunu $CD56^{dim}CD16^+$ alt grubunun oluşturduğu ve lenf nodu, tonsil ve bağırsaklarda ise baskın alt grubun $CD56^{bright}$ fenotipindeki regülatör NK hücreleri olduğu gösterilmiştir [111]. NK farklılaşması üzerine NK hücrelerinin bulunduğu dokunun mikroçevresinin de önemli etkisi bulunmaktadır. Örneğin, uterusun içerisindeki desidua mikroçevresi NK hücrelerini immünsupresif bir fenotipe farklılaşmasını tetiklemektedir. Desidua mikroçevresinde azalmış immün sistem hücre oranları göze çarpmakta iken mevcut hücrelerin yaklaşık yarısını özelleşmiş desidua NK hücreleri oluşturmaktadır [112].



Şekil 2-3: NK hücrelerinin aktivatör ve inhibitör reseptörleri ve ligandları A. HLA-I dışı spesifik reseptörler ve ligandları B. HLA-I spesifik reseptörler ve ligandları- Quatrini (98)

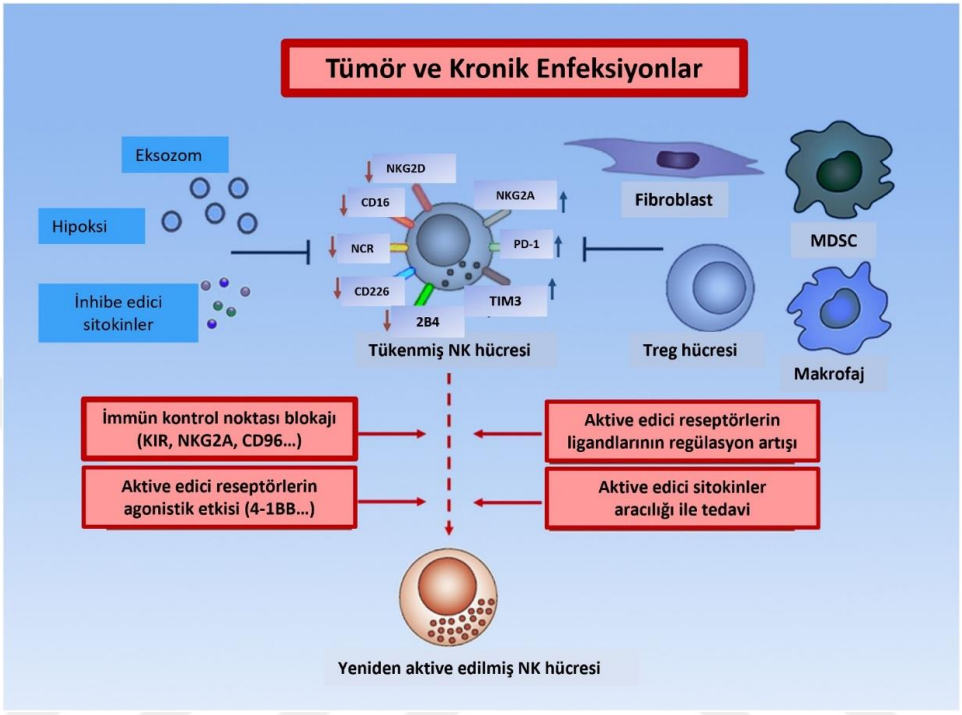
NK hücreleri sitotoksik fonksiyonlarını 4 farklı mekanizma ile yaparlar. Bu mekanizmalar;

1. NK hücreleri; IL-10, IFN-γ, TNF-α ve granülosit monosit koloni stimüle eden faktör (GM-CSF) gibi sitokin ve büyüme faktörleri aracılığı ile dentritik hücre, T lenfositler ve makrofajlarla etkileşime girerek immün yanıtı düzenlemektedir.
2. NK hücreleri perforin, granzim A, granzim B ve granülizin gibi litik granüller salgılayarak hedef hücrenin apoptoza uğramasına neden olur.
3. NK hücreleri, ADCC mekanizmasında CD16 molekülü vasıtasıyla (FcγRIIIA) hedef hücreyi tanıması sonucu hücrenin ölümüne yol açar.
4. NK hücreleri eksprese ettiği TNF süperailesine ait Fas Ligandı (FasL) ve TNF aracılı apoptoz indükleyici ligand (TRAIL) aracılığı ile hedef hücre üzerinde bulunan Fas ve TRAIL reseptörü (TRAILR) reseptörlerine bağlanarak hedef hücrede ölüm reseptörleri aracılı hücre ölümünü gerçekleştirir [113,114].

NK hücrelerinin kanser ve enfeksiyonda gösterdikleri efektör sitotoksik aktivitelerinin yanı sıra, bu fonksiyonlarındaki bozukluklar tümör progresyonuna ya da enfeksiyonların kronikleşmesine zemin hazırlamaktadır. NK hücrelerinde tanımlanan bu azalmış efektör fonksiyonlar NK hücre tükenmişliği ile açıklanmaktadır [115]. Tükenmişlik fenotipindeki NK hücrelerinde görülen fenotipik değişikliklerin başında aktive edici reseptörlerinin ekspresyonunun azalması gelmektedir. Mide ve kolorektal kanser gibi birçok solid tümörde NK hücrelerinde NKG2D ekspresyon azalması ve/veya kaybı gözlenmiştir [116]. Ayrıca aktivatör reseptör ekspresyonundaki azalma da NK hücre tükenmişliğine katkıda bulunan önemli bir değişikliktir. Over kanserinde NK hücrelerinde PD-1 ekspresyonunda artış saptanmış ve bu artışın azalmış sitotoksik aktivite ve sitokin salınımı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [117]. Ayrıca TIM-3 ve NKG2A gibi inhibitör reseptörlerdeki artış ve buna paralel olarak doğal öldürücü reseptör ve CD16 ekspresyonundaki azalma NK hücre tükenmişliğinde saptanan fenotipik değişimlerdir [115] (Şekil 2-4).

NK hücrelerinin anti-tümöral fonksiyonları son yıllarda yapılan çalışmalarla daha da netlik kazanmıştır. NK hücrelerinin tümör mikroçevresindeki sitotoksik fonksiyonlarının azalması ve tükenmişlik fenotipine sahip NK hücre oranlarındaki artışın kanser gelişim riskini arttırdığı gösterilmiştir [118]. NK hücreleri ayrıca indirekt yolla T lenfositlerini aktive ederek anti-tümöral immüniteyi güçlendirmektedir. Ayrıca TNF-α ve IFN-γ salgılayarak tükenmişlik fenotipi belirteci olan immün kontrol noktası

reseptörlerinden PD-1'in $CD8^+$ T lenfositlerindeki ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir [119].



Şekil 2-4: Doğal öldürücü hücre tükenmişliği- Bi (115)

İmmün kontrol noktası reseptörleri kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılmakta ve T hücreler üzerindeki reseptörleri hedef almaktadırlar. NK hücrelerinin T hücre temelli immün tedavilerde yardımcı rol oynadıkları ve aynı zamanda tümöre infiltre olan NK hücre oranının anti-PD-1 tedavilere yanıt ve hastaların genel sağkalımı ile korele olduğu gösterilmiştir [120]. NK hücreleri HLA sınıf I ekspresyon kaybı olan ve bu nedenle T lenfositler tarafından tanınmayan tümör hücrelerini tanıyarak immün kontrol noktası reseptör inhibitörlerinin etki edemediği hedef hücreleri ortadan kaldırabildiğinden önemli bir tedavi alternatifi olarak karşımıza çıkmaktadır [98]. Ayrıca NK hücrelerinin IL-12, IL-15 ve IL-18 gibi sitokinler tarafından uyarımları sitokin aracılı hafıza benzeri yanıt gelişmesine neden olmaktadır. Antijen spesifik olmayan bu yanıtın kanseri immünoterapi yanıtlarında önemli rol oynayan mekanizmalardan biri olduğu düşünülmektedir [121,122].

2.5.2. Yardımcı T hücreler

$CD4^+$ T (Th) lenfositler, diğer adı ile yardımcı T hücreleri adaptif immün yanıtın orkestra şefi olarak da tanımlanmakta ve diğer immün sistem hücrelerinin aktivitelerini düzenlenmesine yardımcı olmaktadır [123]. Th hücreler fonksiyonları, sitokin salınımları ve dokularda yerleşim göstermelerine göre farklı alt gruplara ayrılmaktadır. Temel olarak bu alt gruplar Th1, Th2, Th17, Th9, Tfh, Th22 ve Treg hücrelerdir. Th1 hücreler IFN-γ ve IL-2 gibi sitokinler salgılayarak inflamatuvar yanıtın regülasyonu intrasellüler patojenler ve virüslere karşı immün yanıtın sağlanması, immün sistem hücrelerinin aktivasyonu ve anti-tümöral immün yanıttan sorumludurlar. Th2 hücrelerinin B hücre proliferasyonu, nötralize edici antikor üretiminin artırılması gibi fonksiyonları bulunmaktadır. IL-4 üretimi ile Th2 yanıtından sorumlu sitokinlerin salınımı artmakta iken; IL-10 salınımı ile IFN-γ ve IL-2 gibi Th1 yanıtta önemli olan sitokinlerin salınımı inhibe edilmektedir [124].

Th17 hücreler, mukozal immünitede önemli rol oynayan ve IL-17 salgılayan hücre alt grubudur. Th17 hücrelerindeki fonksiyon kaybı ya da sayısal azalma mukozalarda kronik inflamasyona yol açmaktadır. Ayrıca Arthus reaksiyonu ve romatoid artrit patofizyolojisinde önemli rol oynayan tip 3 immün kompleks ilişkili hipersensitivite reaksiyonlarında Th17 hücreleri aşırı şekilde aktive olmaktadır [125].

Anti-tümöral immünitede, kronik enflamasyon ve enfeksiyonlarda Th hücreler oldukça önemli rol oynamaktadır. Th hücrelerin anti-tümöral etkileri özetlenecek olursa;

- Tümör antijenlerine spesifik Th hücreler doğrudan MHC sınıf II molekülü eksprese eden tümör hücreleri tarafından ya da indirekt olarak antijen sunan hücreler tarafından aktive edilirler. İmmün yanıtın erken evresinde Th lenfositlerin aktivasyonu için tümör antijenlerinin antijen sunan hücreler tarafından tümörü drene eden lenf nodlarına taşınması gerekmektedir. Lenf nodu metastazı yapmamış pek çok tümörde erken dönemde dendritik hücre invazyonu görülmektedir. Dendritik hücre invazyon oranı lenf nodu negatif meme kanserlerinde %30'a kadar çıkabilmektedir [126].
- Yalnızca MHC sınıf II molekülü aracılı değil, MHC molekülü eksprese etmeyen tümörlerde de Th aracılı anti-tümöral aktivite gösterilmiştir. Th1 hücrelerin

salgıladığı IFN-γ aracılığı ile makrofajlar aktive olmaktadır. Makrofajlar süperoksit ve nitrik oksit üreterek anti-tümöral immün yanıtı arttırmaktadır [124] Bu mekanizma Th lenfositlerin doğal immüniteyi aktive ederek anti-tümöral immüniteyi arttırdığını önemli bir örnektir.

- Th lenfositler direkt olarak tümör antijeni spesifik T lenfositlerini aktive etmektedir.
- Th hücreleri tümör antijeni spesifik B hücrelerini de doğrudan aktive edebilmektedir.
- Th hücrelerinin Fas/FasL ya da TRAIL yolağını aktive ederek tümör hücrelerinde doğrudan apoptozu indükleyebildikleri ve doğrudan tümör hücrelerini öldürebildiği gösterilmiştir. Bu mekanizmanın diğer mekanizmalar kadar iyi aydınlatılmamış olmasına rağmen melanom hücrelerinin öldürülmesinde TRAIL yolağının, Burkitt lenfomalarda ise Fas/FasL yolağının apoptozu indüklemesinde temel yolaklardan biri olduğu gösterilmiştir [127].

2.5.3. Sitotoksik T hücreler

$CD8^+$ sitotoksik T hücreler hem tümör antijenlerini tanımaları hem de tümör hücresini öldürebilmeleri sebebiyle tümör immünolojisinde çok önemli rol oynamaktadırlar. Çok sayıda klinik çalışma $CD8^+$ T lenfosit oranının tümör dokusunda artmasının daha uzun kansersiz sağ kalım ile ilişkilendirmiştir. [128,129]. $CD8^+$ T hücrelerinin aktivitesini arttırmayı amaçlayan çok farklı güncel immunoterapiler mevcuttur. Bunlardan en yaygın kullanılanları şimerik antijen reseptör tedavileri, immün kontrol noktası inhibitörleri, sitokin tedavileri ve son yıllarda oldukça popüler olan adaptif T hücre transferidir. [130]. Ancak adaptif T hücre transferi sonrası elde edilen tümör yanıtını takiben hızlı nüks gelişmesi tümöre karşı T hücresinin ilk yanıtının yetersiz olabileceği ve $CD8^+$ T hücrelerinin gelişim sürecinde farklı alt tiplere dönüşerek fonksiyonlarını azaldığı öne sürülmektedir [131]. Gerek kanser modellerinde gerekse deneysel kanser modellerinde tanımlanmış altı farklı Tc lenfosit alt grupları bulunmaktadır. Bunlar efektör T hücre, hafıza T hücre, tükenmiş T hücre, anerjik T hücre, yaşlanmış T hücre ve regülatör T hücrelerdir.

2.5.3.1. Efektör Tc hücre:

Naif T hücre, antijen sunan hücreler tarafından antijen sunulması ve kostimülasyon sinyaller sonrası efektör T hücreye dönüşür. Bu hücreler aktivasyonun ardından yüksek düzeyde granzim, IFN-γ, perforin ve TNF-α salgılarlar. [132]. Bu hücreler akut immün yanıtlarda hızlı ve etkin anti-tümöral yanıt sergilerken kronik yanıtta ya da tümör aşıları sonrası uzun süreli yanıtı indükleyen durumlarda diğer alt tiplere dönüşerek fonksiyonlarını azaltırlar [11].

2.5.3.2. Hafıza Tc hücre:

Efektör T hücre antijen sunumunun tamamlanması ve antijenlerin ortadan kalkması sonrası hızlı bir biçimde programlı hücre ölümü ile ortadan kaldırılmaktadır [133]. Akut enfeksiyonlarda bu durum geçerli olmakla birlikte kanser gibi kronik antijen maruziyeti durumlarında efektör hafıza ya da santral hafıza hücrelerine dönüşürler. Bu hücreler daha düşük sitotoksik kapasiteye sahiplerdir; ancak adaptif hücre transferi ya da yüksek düzeyde IL-2 salgılanması gibi uygun uyarıların sağlanması ile yeniden efektör T hücreye dönüşerek anti-tümöral aktivite gösterebilirler [134].

2.5.3.3. Tükenmiş Tc hücre:

Uzun süreli antijen uyarısı sonrası düşük düzeyde IL-2 ve IFN-γ üretimi efektör T hücrelerinin tükenmesine yol açmaktadır [135, 136]. Kanser gibi kronik antijen maruziyetinin olduğu durumlarda $CD8^+$ T hücre tükenmesi bu hücrelerde çok farklı immün kontrol noktası reseptörlerinin varlığı ile kanıtlanmıştır. Bu reseptörler CTLA-4, TIM-3, PD-1, TIGIT, B ve T hücre fonksiyon azaltıcısı (BTLA) ve LAG-3'tür [135, 137]. Bu bulguların ardından immün kontrol noktası reseptörlerinin inhibisyonu ile T hücre tükenmişliğini geri çevirmek ve efektör T hücre yanıtları oluşturmak için çok sayıda *in vitro* ve *in vivo* çalışma yapılmıştır. Hayvan çalışmasında PD-1 ve CTLA-4'ün birlikte blokajının over ve kolon kanseri olgularında Treg hücre baskılanmasını ortadan kaldırdığı, sitokin salınımı arttırdığı ve sonuç olarak tümör rejeksiyonu oluşturduğu gözlenmiştir [138].

2.5.3.4. Anerjik Tc hücre:

Self-antijen spesifik T lenfositleri santral toleranstan kaçıp perifere çıktığında anerjik olarak tolerans kazanmaktadır. Bu otoimmünitenin önlenmesi için önemli bir basamak olmakla beraber söz konusu self-antijen eksprese eden tümör hücreleri olunca sorun olarak karşımıza çıkmaktadır [139]. *In vitro* olarak anerjik T hücreleri tanımlamak kolay olmakla beraber *in vivo* çalışmalarda spesifik bir ekspresyon profilinin olmaması nedeniyle anerjik T hücreler, diğer toleran T hücreler ve tükenmiş T hücrelerden kolaylıkla ayırt edilememektedir. Zamansal bir sınıflama ile anerjik T hücreler ile tükenmiş T hücreleri sınıflamak mümkün olabilmektedir. Anerjik T hücreler tümör gelişiminin erken aşamalarında daha çok bulunmakla beraber [140], kronik antijen maruziyeti ve efektör T hücre aktivitesini takiben yerini baskın hücre grubu olarak tükenmiş T hücrelerine bırakmaktadır [135].

2.5.3.5. Yaşlanmış Tc hücre:

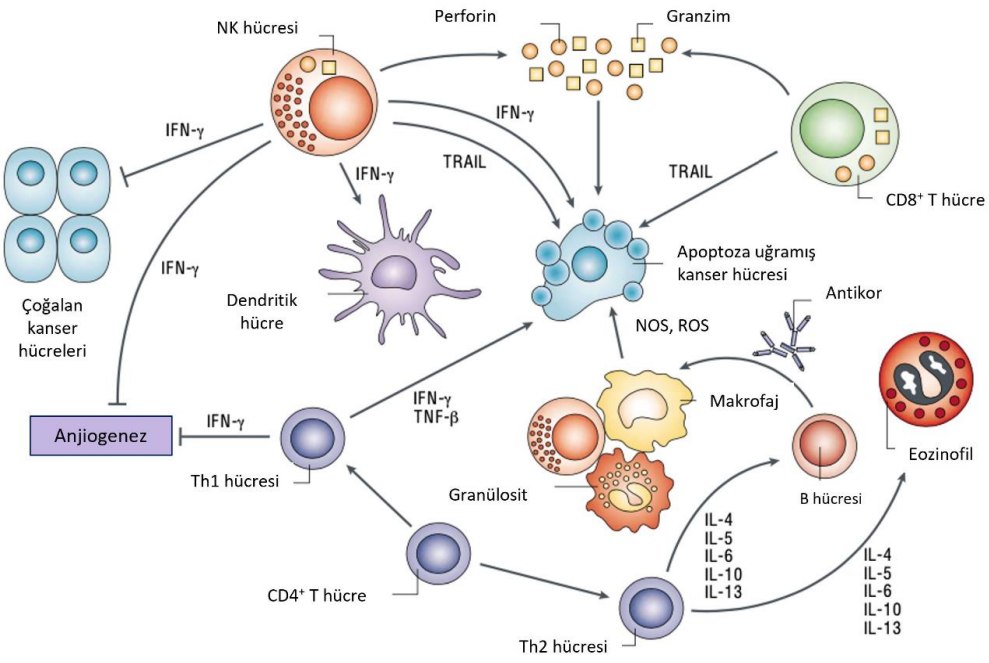
Yaşlanmış T hücreyi diğer T hücre alt gruplarından ayıran telomerlerinin kısalması, hücre bölünmesinin olmaması ve CD28 ekspresyon kaybıdır. Bu hücreler esas olarak insanın yaşlanması ile sayıca artış göstermekle birlikte ve kanserle ilişkisi henüz net olarak gösterilememiştir [141].

2.5.3.6. Regülatör Tc hücre:

$CD8^+$ regülatör T hücreler genellikle CD28 eksprese etmemekte ve $CD4^+FOXP3^+$ regülatör T hücrelerinden fenotipik olarak oldukça farklı özelliklere sahiptir. Birçok kanserin lenf nodu metastazlarında $CD8^+CD28^-$ Treg hücreler saptanmış, bu hücreler efektör T hücrelerden azalmış sitotoksik aktivite ve IL-10 salgılanması ile ayırt edilmiştir [142].

2.5.4. Tümör immünitesinde sitokinlerin yeri

Sitokinler immün sistemin işlevselliğinde önemli rol oynayan, farklı immün sistem hücrelerinin birbiri ile iletişimi sağlayan aracı moleküllerdir. Bir sitokin farklı hücrelerden salgılanabileceği gibi, aynı sitokinin farklı hücreler üzerine farklı etkileri de olabilmektedir. Bu mekanizma immün sistemin çeşitliliğini ve kendi içerisinde otokontrolünü sağlayan önemli bir mekanizmadır [143]. Sitokinlerin tümör immünitesindeki yeri Şekil 2-5'te şematik olarak özetlenmiştir. Sitokinler sağlıklı bir organizmanın işlevsel immün yanıtlarından sorumlu olduğu gibi; kanser, enfeksiyon veya kronik inflamasyon gibi durumlarda patolojik durumları tetikleyebilme özelliğindedir. Tümör mikroçevresindeki sağlıklı dokulardan salgılanan bazı sitokinler tümörün erken evrelerinde tümör büyüme ve farklılaşmasını kolaylaştırırken; tümörün ileri aşamalarında ise hücre invazyonu ve metastazı kolaylaştırmaya yönelik etkileri olduğunu gösterilmiştir [144, 145].



Şekil 2-5: Sitokinler- Dranoff (143)

Kanser gelişiminde lenfoid hücrelerin yanı sıra sitokinlerin de anahtar rol oynadığının gösterilmesini takiben kanser immünoterapisi kapsamında pek çok sitokin tedavisi gündeme geliştirilmiştir. Bu kapsamda kullanılan ilk sitokinler IFN-α ve

IL-2'dir. IFN-α pek çok hematolojik malignitenin tedavisinde kullanılmıştır. Etki mekanizması tam olarak aydınlatılmamış olmakla birlikte hem tümör hücrelerinde direkt etkisi olduğu hem de immün sistemi stimüle ederek anti-tümöral etki oluşturduğu düşünülmektedir [146]. IL-2 ise yüksek dozlarda renal hücreli kanser ve malign melanom tedavisinde kullanılmıştır [147, 148]. IL-2 tedavisinin anti-tümöral etkisinin tümöral kan akımında değişikliğe yol açması ve sitotoksisiteyi arttırması aracılığı ile oluştuğu öne sürülmektedir. Yüksek doz IL-2 tedavisinin yan etkilerinin fazla olması nedeniyle IL-2'nin düşük dozlarda da kanser tedavisinde etkinliği araştırılmıştır. Ancak anti-tümöral etkinin düşük dozlarda beklenenin altında olduğu gösterilmiştir. Bunun sebebinin paradoksal olarak regülatör T hücrelerinin artması sonucu anti-tümöral immün yanıtın baskılaması olduğu düşünülmektedir [149].

IFN-γ, $CD4^+$ ve $CD8^+$ T lenfosit alt grupları, NK hücreleri, NKT hücreleri, B hücreleri ve antijen sunan hücreler tarafından üretilir [150]. IFN-γ $CD4^+$ T hücrelerinin Th1 yönüne farklılaşması sonucu proteozom aktivasyonuna bağlı antijen sunumunda artış, makrofaj aktivasyonu ve MHC sınıf I ve II molekül ekspresyonlarının uyarılması gibi birçok immünolojik mekanizma ile immün sistem aktive olmaktadır [151, 152] IFN-γ'nın klinik kullanımının ve öneminin araştırıldığı çok sayıda çalışma vardır. Fare modellerinde IFN-γ ve tip 2 IFN reseptörlerini taşımayan farelerin hem spontan hem de kimyasal indüklenen tümör gelişimi açısından büyük risk taşıdığı gösterilmiştir [153, 154]. Ancak IFN-γ terapötik indeksinin sınırlı olması ve baskılayıcı lenfoid hücreler üzerinde aktivatör etkilere sahip olması sebebiyle klinik kullanıma girememiştir.

IL-2, IFN-γ ve TNF-α gibi proinflamatuar sitokinlerin anti-tümöral etkileri uzun yıllardan beri bilinmektedir [155, 156]. Buna karşın tümör immünitesinin supresyonundan sorumlu çok sayıda sitokin bulunmaktadır. IL-6 salınımının akciğer ve meme kanseri gibi solid tümörlerde tümör büyümesini desteklediği gösterilmiştir [157, 158]. Benzer şekilde IL-4 ve IL-10 gibi sitokinler çok farklı hücrelerden salgılanmakla birlikte tümör immünitesini baskılamakta ve tümör büyümesini hızlandırmaktır [159, 160]. Kolorektal kanser olgularında plazma granzim A düzeylerindeki artışın hem inflamatuar yanıtı hem de makrofajlar tarafından salgılanan IL-6 düzeylerini artırarak tümörijenik etki gösterdiği bulunmuştur [161]. Bununla birlikte farklı çalışmalarda granzim A'nın direk tümör öldürme etkisi olmadığı; buna karşın insan gasdermin B

üzerinden piroptoz ile tümör hücrelerini öldürebildiği gösterilmiştir [162]. Granzim B ise genel olarak anti-tümöral etkisi kanıtlanmış bir sitokindir. Treg düzeylerindeki azalmayı takiben granzim B salgılayan $CD4^+$ T lenfosit düzeylerinin arttığı ve buna bağlı olarak da anti-tümöral etkinin arttığı bulunmuştur [163]. A20 lenfoma hücrelerinin $CD4^+$ T lenfositler aracılı öldürülmesinde granzim B'nin önemli rol oynadığını gösteren yayınlar mevcuttur [164].

Tümör hücresinin apoptoza uğratılmasındaki en önemlileri yolaklar perforin/granzim B ve Fas/FasL yolaklarıdır [165]. Melanom, foliküler lenfoma gibi kanser türlerinde perforin/granzim B ve Fas/FasL aracılı apoptozun indüklenerek anti-tümöral etkinlik sağlandığı gözlenmiştir [166, 167]. Bu yolakların aktivitelerindeki azalma tahmin edilebileceği gibi apoptozisin azalması ve sonuç olarak da tümör immünitesinin zayıflamasına ve tümörün büyümesine yol açmaktadır. İmmün kontrol noktası inhibitörlerinden TIM-3'ün kolon kanseri olgularda γδ T hücrelerinde ekspresyonunda artışın tümörisidal etkinin azalması ile ilişkili olduğu gösterilmiş, bu etkinin Vγ9Vδ2 T hücrelerinde perforin/granzim B üretiminin azalması ile açıklanabileceği öne sürülmüştür [168]. Granzime benzer şekilde granülizin de anti-tümöral etkileri olan bir moleküldür. Yapılan çalışmalar artan plazma granülizin düzeyleri ile tümör prognozu arasında anlamlı bir ilişki olduğunu göstermektedir. Mide kanseri olgularda granülizin düzeyleri yüksek olan grubun anlamlı şekilde daha erken evre hastalığa sahip olduğu bulunmuştur [169]. Bunun yanı sıra granülizinin 9 kDa izoformunun tümör hücrelerinin öldürebilmesine ragmen 15 kDa izoformunun immün sistem hücrelerinin olgunlaşması ve tümör mikroçevresine immün system hücrelerinin göçünde rolü olduğu gösterilmiştir [170].

2.6. Kanser ve immün kontrol noktası reseptörleri

Over kanserinde başta $CD8^+$ T lenfositleri olmak üzere artmış TIL bulunması iyi klinik sonlanım ile ilişkilidir. Ancak tek başına TIL varlığı aktif anti-tümöral immünite için yeterli değildir. İmmun sistemden kaçış mekanizmaları aracılığı ile tümör hücreleri, TIL fenotip ve fonksiyonlarını doğrudan ya da dolaylı olarak etkileyerek tümör mikroçevresini değiştirebilir [17, 171]. Antijene sürekli maruziyet ve baskılayıcı immün sistem hücrelerinin varlığı T hücre tükenmişliğine yol açarak fonksiyon kaybına yol açabilmekte bu hücreler genellikle çoklu inhibitör reseptörler (LAG-3, PD-1, TIM-

3, TIGIT ve CTLA-4), eksprese etmektedir. Bunun beraberinde bu inhibitör reseptörlerin ligandını eksprese eden baskılayıcı hücreler ve aynı zamanda tümör hücrelerinin de varlığı T lenfosit fonksiyonlarını bozarak bu hücrelerin tümör progresyonunu baskılamada yetersiz bırakmaktadır [135, 172]. Daha önemlisi, T lenfositlerinin tükenmişlik durumu kalıcı değildir. Son yıllarda yapılan birçok immünoterapi çalışması immün kontrol noktası reseptör blokajının T lenfositlerin yüzeylerinde bulunan inhibitör reseptörler ile baskılayıcı hücrelerdeki ligandı arasındaki bağlantının geçici ya da kalıcı olarak bloke edilmesi sonucunda T lenfositlerin anti-tümöral fonksiyonlarını tekrar kazanabildiğini göstermektedir. Bu veriler ışığında yapılan klinik ve preklinik çalışmalar giderek artmakta ve hemen hemen tüm solid tümörlerde başta anti-CTLA-4 ve anti-PD-1/PD-L1 tedavileri olmak üzere immün kontrol noktası inhibitörlerinin kullanımı araştırılmaktadır. Birçok kanser alt tipinde bu mekanizma aracılığı ile oluşan anti-tümöral immün yanıt sayesinde hastalarda olumlu sağ kalım verileri elde edilmiştir. Over kanserinde TIL fenotipinin daha ayrıntılı ortaya konması mevcut tümör yapısını daha iyi tanımayı sağlayacağı için ileri dönemde geliştirilmesi muhtemel tedavi seçenekleri açısından da yol gösterici olacaktır. Over kanserinin kan yolu ile yayılımı diğer tümörlere göre nadir görülmektedir. Bu nedenle periferik kandan elde edilen lenfositler ile TIL arasında yapılacak olan immünolojik karşılaştırmalar çok kıymetli olacaktır.

Tekli ve birlikte eksprese edilen inhibitör reseptör oranlarının akan hücre ölçer cihazında saptanmasının tümörlerin seyrine etkisi ile ilgili yapılan çalışmalar oldukça fazla olmakla birlikte bu reseptörlerin solubil formlarının araştırıldığı kısıtlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Over kanserinde ise hem solubil hem de lenfosit alt gruplarında eksprese edilen immün kontrol reseptörlerinin (tekli veya reseptörler birlikteliğinin) araştırıldığı bir çalışma henüz bulunmamaktadır. Bununla birlikte PD-L1 ve PD-L2'nin solubil formlarının incelendiği bir over kanseri ile ilgili bir çalışmada tümör dokusuna ulaşmanın her zaman mümkün olmadığı gerçeğinden yola çıkarak bu solubil ligandların plazmada kolaylıkla elde edilebilir olduğu saptanmıştır. Bunun yanı sıra PD-L1 ve PD-L2'nin solubil formlarının tedavi yanıtını ve sağ kalımı belirlemede önemli olduğu da gösterilmiştir [173]. Bunun dışındaki immün kontrol noktası reseptörlerinin over kanseri ile ilişkisinin araştırıldığı bir çalışma henüz bulunmamaktadır. PD-L1'den sonraki en popüler inhibitör reseptör olan LAG-3'e bakıldığında aktivasyon

mekanizmasında metalloproteaz enzimlerinin yer aldığı ve bu enzimler aracılığı ile aktive olarak solubil kısmının salgılandığı saptanmıştır [85]. sLAG-3'ün artışı ile T hücre aktivasyonu arasında ilişkili olduğu da yine bu çalışmada gösterilmiştir. LAG-3'ün solubil formunun solid tümörlerin klinik uygulamasında nasıl kullanılabileceğine dair kısıtlı veri bulunmaktadır. İmmünoterapi tedavisi alan metastatik hormon reseptörü pozitif meme kanserli olgularda bakılan solubil LAG-3 düzeylerinin serumda saptanabilir ölçüde olması durumunda vakaların daha uzun hastalıksız süre ve genel sağ kalıma sahip olduğu gösterilmiştir [174]. Hematolojik bir malignite olan kronik lenfositik lösemi vakalarında yapılan bir çalışmada ise sLAG-3'ün anti-apoptotik etki ve lösemik hücre aktivasyonuna neden olarak daha agresif seyirden sorumlu olabileceği öne sürülmüştür [175].

T lenfositlerde immün kontrol noktası reseptörlerinin çalışıldığı preklinik ve klinik çalışmalar bulunmasına rağmen NK hücrelerinde de bu inhibitör reseptörlerinin varlığı ve koekspresyonu ile ilgili bir yayın henüz bulunmamaktadır. Over kanserine bakıldığında NK hücrelerinin tümör mikroçevresinde ve asit sıvısında bol miktarda bulunduğuna dair yayınlar mevcuttur. Yapılan bir çalışmada inhibitör reseptör düzeylerine bakılmaksızın B lenfosit ve NK hücre infiltrasyonu olan over tümörlerinin daha agresif oldukları gösterilmiştir [176]. Bunun yanı sıra NK hücrelerinin immünolojik olarak kendilerine özgü aktivasyon ve inhibisyon yolaklarına sahip oldukları düşünüldüğünde NK hücre aktivasyonunun sistemik ya da immünolojik etkileri minimumda tutularak anti-tümöral tedavi amacıyla kullanılabileceği düşünülmektedir [177]. Yapılan çalışmalarda over kanseri olgularında NK hücrelerinde PD-L1 ekspresyonunun fazla olduğu gösterilmektedir. Ancak TIGIT, TIM-3, LAG-3, CTLA-4 gibi reseptörlerin over kanserinde saptanan NK hücrelerde varlığına ve ko-ekpresyonlarına dair bir yayın bulunmamaktadır [178].

Over kanserinde inhibitör kontrol noktası inhibitör reseptör ekspresyonunun ayrıntılı incelendiği çalışmalar ve bu çalışmalara dayalı veriler oldukça kısıtlıdır. 2019 yılında Rådestad ve arkadaşlarının yaptığı ve immün kontrol reseptörlerinin incelendiği bir çalışmada over kanserinde inhibitör reseptörlerden CTLA-4, LAG-3, PD-1 ve TIM-3 incelenmiştir. Bu çalışmada bakılan inhibitör reseptör düzeylerinin T lenfositlerde artmış ekspresyonunun over kanseri olgularında olumsuz sağkalım ile ilişkili olduğu ve

bu reseptörlerin koekpresyonlarının sanılanın aksine sık bulundağu gösterilmiştir [179]. Bulguların over kanserinin immünolojik yapısını ortaya koyma açısından yol gösterici olması bizim çalışmamızda elde edilecek verilerin de oldukça değerli olacağını düşündürmektedir. Bu çalışmalardaki vaka sayılarının genel olarak az olması göz önüne alındığında elde edeceğimiz veriler aydınlatılmayan pek çok soruya yanıt olacaktır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hasta Grubu

Çalışmamıza; aşağıda dahil etme ve dışlama kriterlerine uyan 10 hasta ve yaşları hasta grubuna benzer olan 10 sağlıklı kontrol dahil edilmiştir.

3.1.1. Dahil edilme kriterleri

- Asit sitolojisi, kitle biyopsisi, bilgisayarlı toraks bilgisayarlı tomografisi (Toraks BT) ve/veya Pozitron Emisyon Tomografisi- Bilgisayarlı Tomografi (PET-BT) ile evre 3 ya da evre 4 olduğu saptanan patolojik olarak yüksek dereceli seröz over kanseri tanısı olması,
- Çalışmaya katılan hasta ve kontrol grubu olguların 18 yaşından büyük olması,
- Daha önce kemoterapi ve/veya radyoterapi almamış olması,
- Altta yatan kronik hastalığı olmaması,
- Sigara içmemesi olarak çalışmamıza dahil edilme kriterleri olarak belirlenmiştir.

3.1.2. Dışlama kriterleri

- 18 yaş altı olgular
- Sigara kullanan olgular
- Kronik hastalığı olan kişiler
- Radyoterapi ve/veya kemoterapi almış/almakta olan vakalar
- İnoperabl hastalar
- Evre 3'ten erken evredeki olgular
- Daha önce over kanseri cerrahisi olmuş nüks tümörü olan hastalar dışlanma kriterleri olarak seçilmiştir.

Hastalar, doku ve kan örneklerinin alınması için anlaşılmış onamı vermelerinin ardından çalışmaya dahil edilmişlerdir. Hastaların biyokimyasal parametreleri ve tıbbi geçmişleri dosya olarak tutulmuştur. Over kanseri ön tanısı ile operasyon planlanan hastalardan operasyondan hemen önce 10 ml heparinize periferik kan örneği alınmıştır. Genel anestezi altında göbek altı median kesi ile batına girilen olgularda gözlenen

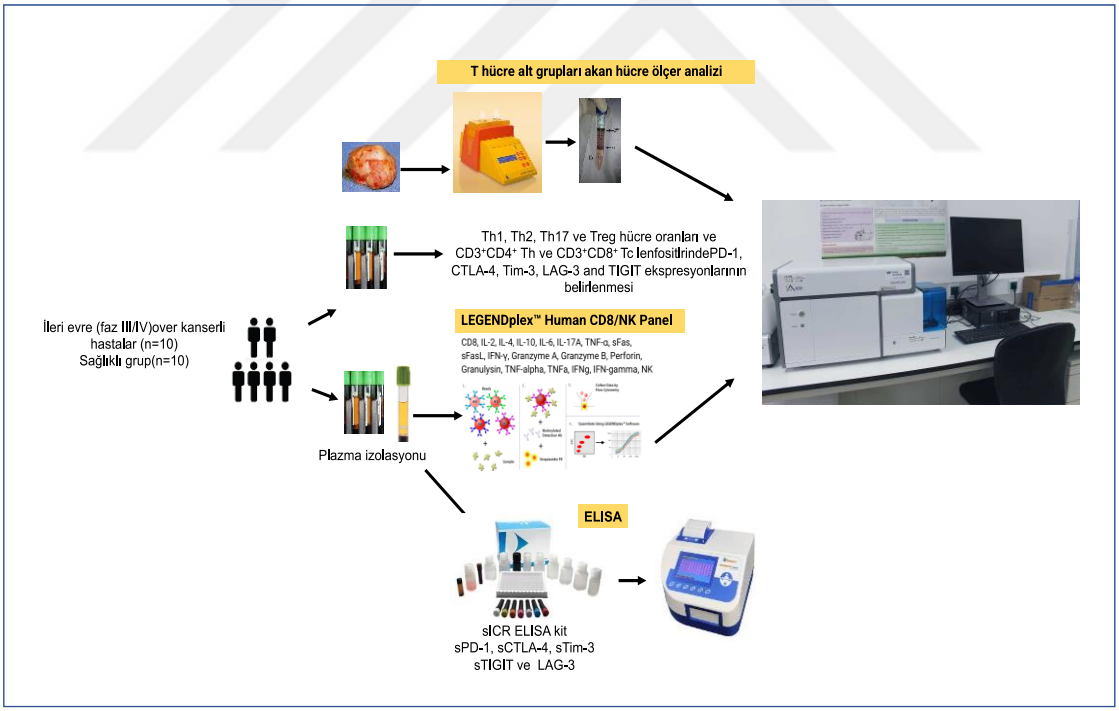
tümör dokusundan biyopsi yapılarak RPMI-1640 (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MA) kültür besiyeri içeren tüpe konulmuştur. Ameliyat sırasında yapılan patolojik değerlendirmedeki kitlenin malign olduğunun teyit edilmesi sonrasında kan ve doku örnekleri kısa sürede patoloji laboratuvarına ulaştırılmış ve rutin tanı işlemleri için örnek ayrıldıktan sonra geriye kalan tümör dokusu RPMI-1640 besiyeri içerisine konulmuştur. Sitoredüktif cerrahi işleminde alışılageldiği üzere tümör dokularının tamamı çıkarılarak batın katları anatomi ve usule uygun kapatılmıştır. Projemizde ek olarak hastaların demografik özellikleri (cinsiyet, yaş), sigara içimi miktarı, varsa ek hastalıkları, operasyon öncesi CA125 değerleri, PET-BT irdelemesi sonuçları, ameliyat öncesi ve sonrası tümöre ait T, N ve M belirleyicileri, yapılan ameliyat tipi ve ameliyat sonrası parametreleri de kaydedilmiştir. Çalışmamızda ayrıca hastaların yukarıda belirtilen klinikopatolojik parametreleri ile NK hücre ve sitotoksik T lenfosit alt grupları ve immün kontrol noktası reseptör ekspresyonları arasındaki ilişkiler de araştırılmıştır. Çalışmamızda kullanılan cihaz listesi (Tablo 3-1) ve monoklonal antikor listesi (Tablo 3-2) tablo şeklinde verilmiştir. Deneysel aşamaların şeması Şekil 3-1'de özetlenmiştir.

3.2. Tümör Dokusu ve Periferik Kan Örneklerinin Patoloji ve İmmünoloji Laboratuvarına Transferi

Sitoredüksiyon cerrahisi ile elde edilen materyalden alınan örnekler, ameliyat masasının hemen ardındaki bir masada patolojik incelemeyi bozmayacak şekilde disekte edilmiş ve hemen RPMI-1640 kültür besiyeri (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MA) içine aktarılmıştır. Patoloji laboratuvarında hastanın tanısı için çıkarılan tümör dokusunun patolojik ve immünohistokimyasal boya incelemeleri yapılmış ve diğer örnekler steril doku kültürü medyumu RPMI-1640 besiyeri içinde İstanbul Üniversitesi, Aziz Sancar DETAE İmmünoloji Anabilim Dalı laboratuvarına hızlıca ulaştırılmıştır.

Tablo 3-1: Cihaz listesi

Cihaz Listesi	Marka/Model
ACEA NovoCyte Flow Cytometer	ACEA Biosciences
FACSAria II	Becton Dickinson
Laminar kabin	Nüve LN 120, ESCO Class II BSC
Santrifüj cihazı	Nüve NF1000R, Nüve NF1200R
GentleMACS Dissociator	Miltenyi Biotec
MACSmix tüp rotatörü	Miltenyi Biotec
+4 ºC ve -20 ºC buzdolabı	Arçelik
Vorteks cihazı	Bio Vortex V1
Micro Pipet seti	Pipetman-Gilson



Şekil 3-1: Deneysel aşamalar ve kullanılan teknikler

Tablo 3-2: Monoklonal antikor listesi

Monoklonal Antikor/ Floresan İşaret	Marka/Model
Anti Human-CD3-FITC	BioLegend, San Diego, California
Anti Human-CD25-PerCp/Cy5.5	BioLegend, San Diego, California
Anti Human-CD127-APC/Cy7	BioLegend, San Diego, California
Anti Human-CD8-Brilliant Violet 570™	BioLegend, San Diego, California
Anti Human-CCR6-PE/Cy7	BioLegend, San Diego, California
Anti Human-CD16-Alexa Fluor® 700	BioLegend, San Diego, California
Anti Human-CD16-Brilliant Violet 570™	BioLegend, San Diego, California
Anti Human-CD8-PE-Dazzle™594	BioLegend, San Diego, California
Anti Human-CD8-Alexa Fluor ™ 700	BioLegend, San Diego, California
Anti Human-CD56-PE/Cy7	BioLegend, San Diego, California
Anti Human-CD56-Brilliant Violet 711 ™	BioLegend, San Diego, California
Anti human-CD45- Brilliant Violet 510™	BioLegend, San Diego, California
Anti Human-CD3-Pacific Blue	BioLegend, San Diego, California
Anti Human-CD3-Brilliant Violet 785 ™	BioLegend, San Diego, California
Anti Human- CD152(CTLA-4)-APC	BioLegend, San Diego, California
Anti Human-CXCR3-Brilliant Violet 711 ™	BioLegend, San Diego, California
Anti Human-CD223(LAG3)-FITC	BioLegend, San Diego, California
Anti Human-CD279(PD-1)-APC/Cy7	BioLegend, San Diego, California
Anti Human-CD366 (TIM-3)-PerCp/Cy5.5	BioLegend, San Diego, California
Anti Human-TIGIT-PE	BioLegend, San Diego, California

3.3. Yüksek Dereceli Seröz Over Kanseri Tümör Dokusundan Lenfosit İzolasyonu

Postoperatif tümör materyali patoloji laboratuvarında formole konulmadan tümörden 1 cm çaplı bir insizyonel doku parçası eksize edilerek hızla RPMI-1640 (Sigma-Aldrich Co., MA) besiyeri içerisine transfer edilen tümör doku parçası Aziz Sancar DETAE İmmünoloji laboratuvarına transfer edilmiştir. Steril şartlarda, penset yardımı ile tümör dokusu içinde fetal dana serumu içermeyen RPMI-1640 doku kültürü besiyeri içeren petri kabına aktarılarak tümör dokusunun etrafındaki yağ parçaları ve artık dokular 18 numaralı steril bistüri ucu (plusMED) yardımıyla uzaklaştırılmıştır.

Pens ve bistüri yardımıyla tümör dokusu küçük parçalara ayrılmıştır. Bunu takiben İnsan Tümör Hücre Ayırım Kiti (Miltenyi Biotec, Germany) içindeki farklı enzimatik solusyonlar ve sonrasında GentleMACS tümör ayırım cihazı (Miltenyi Biotec, Germany) kullanılarak tümöre infiltre olan lenfositlerin izolasyonu yapılmıştır. Bu cihaz yardımıyla tümör dokuları enzimatik etkiyle tek hücre süspansiyonu veya homojenize hale getirilmesinde kullanılmaktadır. MACS tümör ayırım cihazı ve tümör ayırım kiti kullanılarak yapılan TIL izolasyon aşamaları aşağıda özetlenmiştir;

1. C tüpü içinde enzim mix hazırlanmıştır (4,7 ml RPMI+200 µl Sol 1+100 µl Sol2+ 25 µl Sol 3).
2. Doku nekrotik alanlardan temizlenmiş ve 2-4 mm çapında parçalara ayrılarak enzim karışımı içine konulmuştur.
3. C tüpü cihaza baş aşağı yerleştirilip oturtulmuş ve program başlatılmıştır.
4. Program bitiminde C tüp cihazdan çıkarılıp MACSmix tüp rotatöründe 37ºC' de 30 dk sürekli rotasyona maruz bırakılmıştır.
5. Bitiminde C tüpü tekrar MACS tümör ayırım cihazına yerleştirilecek ve program çalıştırılmıştır (2.tur).
7. Program bitiminde C tüpü cihazdan çıkarılıp MACSmix tüp rotatöründe tekrar 37ºC' de 30 dk sürekli rotasyona konulmuştur.
8. Bitiminde C tüp tekrar MACS tümör ayırım cihazına yerleştirilmiş ve program çalıştırılmıştır (3.tur).
9. Elde edilen doku süspansiyonu cell strainer dan geçirilip ve fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) ile yıkanmıştır.
10. Elde edilen hücreler 1:2 (Ficoll:Hücre süspansiyonu) oranında Ficoll /Hypaque (Biochrom AG, Germany) üzerine yayılarak oda ısısında 1800 rpm'de 25 dakika santrifüj edilmiştir. Daha sonra interfazdan toplanan mononükleer hücreler 2 kez 2000 rpm'de soğutmalı santrifüjde 5 dakika PBS ile yıkanmıştır.

3.4. Periferik Kan ve Tümör İnfiltre Lenfositlerde T Hücre Alt Gruplarının Analizi

Tümör ayrım kiti kullanımı sonrası elde edilen hücre süspansiyonu 1:2 (Ficoll:Hücre süspansiyonu) oranında Ficoll/Hypaque (Biochrom AG, Germany) üzerine yayılarak oda ısısında 1800 rpm'de 25 dakika santrifüj edilmiştir. Daha sonra

interfazdan toplanan mononükleer hücreler 2 kez 2000 rpm'de soğutmalı santrifüjde 5 dakika PBS ile yıkanmıştır. Elde edilen TIL PBS içerisinde $1x10^5$ hücre/100µl olacak şekilde ayarlanmıştır. Ayrıca sitoredüksiyon cerrahisi öncesi hasta ve sağlıklılardan alınan 10 ml heparinli kan örneklerinden 100 µl kan örneği alınarak üzerine anti human-CD3-FITC, anti human-CD45- Brilliant Violet 510™, anti human-CD25-PerCp/Cy5.5, anti human-CD127-APC/Cy7, anti human-CD8-Brilliant Violet 570™, anti human-CCR6-PE/Cy7, anti human-CXCR3-Brilliant Violet 711™ monoklonal antikorları (tümü Biolegend, San Diego, California) (Tablo 3-2) eklenmiş ve oda ısısında 20 dk karanlıkta inkübe edilmiştir. Negatif kontrol tüpü olarak ise boyasız hücre süspansiyonu kullanılmış ve deney tüpleriyle aynı inkübasyon ve boyama aşamaları uygulanmıştır. İnkübasyonu takiben tüplere 2ml eritrosit lize edici solüsyon (BD Bioscience, San Jose, CA) eklenerek oda ısısında 20 dk karanlıkta inkübe edilmiştir. Antikorla boyama aşamalarını takiben tüplere PBS (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MA) eklenerek 1800 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası üst sıvı uzaklaştırılarak pellet üzerine tekrar 2 ml PBS solüsyonu eklenerek yıkama işlemi tekrarlanmıştır. Yıkama sonrası üst sıvı uzaklaştırıldıktan sonra hücre süspansiyonu üzerine %2 paraformaldehit içeren PBS eklenerek resüspanse hale getirilmiş, sonrasında akan hücre ölçer cihazı NovoCyte® (ACEA Biosciences, Inc.) ve FACSAria II (BD Bioscience, San Jose, CA) ile analiz edilmiştir. Veri analizleri FlowJoTM10.2 (Tree Star Inc., USA) kullanılarak yapılmıştır. Deneylerimizde bakılan lenfosit alt grupları ve eksprese ettikleri yüzey molekülleri Tablo 3-3'te gösterilmiştir.

Tablo 3-3: Lenfosit alt grupları ve yüzey belirteçleri

Lenfosit Alt grupları	Eksprese ettiği yüzey molekülleri
Yardımcı T lenfosit (Th)	$CD45^+CD3^+CD4^+$
Sitotoksik T lenfosit (Tc)	$CD45^+CD3^+CD8^+$
Th1 lenfosit	$CD45^+CD3^+CD4^+CXCR3^+CCR6^-$
Th2 lenfosit	$CD45^+CD3^+CD4^+$ $CXCR3^-CCR6^-$
Th17 lenfosit	$CD45^+CD3^+CD4^+CXCR3^-CCR6^+$
Regulatör T hücre	$CD45^+CD3^+CD4^+$ $CD127^-CD25^+$
NK Hücre	$CD45^+CD3^-CD16^+CD56^+$
$CD8^+$ NK hücre	$CD45^+CD3^-CD16^+CD56^+CD8^+$
$CD8^-$ NK hücre	$CD45^+CD3^-CD16^+CD56^+CD8^-$
NKT hücre	$CD45^+CD3^+CD56^+$

3.5. Tümör Dokusu ve Periferik Kanda T Lenfosit Alt Grupları ve NK Hücrelerinde İmmün Kontrol Noktası Reseptör Ekspresyonlarının Belirlenmesi

Seröz over kanseri tanılı hastalardan alınan tümör dokusundan izole edilen tümör infiltre lenfosit süspansiyonundan ve ayrıca hasta ve sağlıklılardan alınan periferik kan

örneklerinden 100µl hücre olacak şekilde tüplere pipetlenmiş ve anti human-CD8-PE-Dazzle^{TM}594, anti human-CD8-AlexaFluor^{TM}700, anti human-CD56-PE/Cy7, anti human-CD56-Brilliant Violet 711^{TM}, anti human-CD3 Pacific Blue, anti human CD3-Brilliant Violet 785^{TM}, anti human-CD45- Brilliant Violet 510^{TM}, anti human-CD152 (CTLA-4)-APC, anti human-CD16-AlexaFluor^{TM}700, anti human-CD16- Brilliant Violet 570^{TM}, anti human-CD223 (LAG3)-FITC, anti human-CD279 (PD-1)-APC/Cy7, anti human- CD366 (TIM-3)- PerCp/Cy5.5, anti human-TIGIT-PE monoklonal antikorları (Tablo 3-2) eklenmiş ve tüpler 30 dakika oda sıcaklığında, karanlıkta inkübe edilmiştir. Non-spesifik bağlanmaların gözardı edilmesi için her bir deneyde negatif kontrol tüpü olarak ise boyasız hücre süspansiyonu kullanılmış ve deney tüpleriyle aynı inkübasyon şartları uygulanmıştır. İnkübasyon sonrası hücrelere 2 ml eritrosit lizis solüsyonu (BD Bioscience, San Jose, CA) eklenerek 20 dk karanlıkta oda ısısında inkübe edilmiştir. Daha sonra 2 ml PBS eklenerek 5 dakika 1800 rpm'de santrifüj edilmiş ve sonrasında bu işlem iki kez tekrarlanmıştır. İnkübasyon sonrasında hücrelere %2 paraformaldehit içeren PBS ilave edilerek örnekler FACSAria II (BD Bioscience, San Jose, CA) ve NovoCyte® (ACEA Biosciences, Inc.) akan hücre ölçer cihazlarında analiz edilmiştir. Veri analizleri FlowJoTM10.2 (Tree Star Inc., USA) programı ile yapılmıştır.

3.6. Plazma Örneklerinde Solubil CTLA-4, PD-1, TIM-3, TIGIT ve LAG-3 Düzeylerinin Tayini

Seröz over kanseri tanılı hastalardan izole edilen plazma örnekleri ELISA tayinine kadar -80ºC'de muhafaza edilmiştir. ELISA kiti olarak insan solubil CTLA-4, PD-1, TIGIT, LAG-3 (Abbkine Inc, China) ve Tim-3 (BTLAB, China) ELISA kitleri kullanılmıştır. Antikorla kaplı plakların her bir kuyusuna 100 µl plazma örnekleri ve standart dilüsyonlar ELISA kuyularına pipetlenmiş ve plaklar 2 saat oda ısısında inkübe edilmiştir. İnkübasyonu takiben yıkama tamponu ile plaklar 4 kez ELX50 cihazında (Biotek Instruments, USA) yıkanarak bağlanmayan antikorlar uzaklaştırılmıştır. Yıkama aşamasının ardından her bir kuyucuğa 100 µl hazırlanacak olan biyotinli antikorlar pipetlenmiş ve plaklar 1 saat oda ısısında inkübe edilmiştir. Yıkama aşamasını takiben 100 µl streptavidin solusyonu her bir kuyucuğa pipetlenmiş ve oda ısısında 45 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyonu takiben plaklara 100 µl substrat solusyonu pipetlenmesini takiben plaklar karanlıkta oda ısısında 30 dakika bekletilmiştir. Plaklara

50 µl/kuyu oranında stop solüsyonu ilave edilip reaksiyon durdurulmuştur. Plaklardaki optik yoğunluk (OD) 450nm dalga boyunda ELX800 ELISA okuyucusunda (Biotek Instruments, USA) okunarak değerlendirilmiştir. ELISA kitlerinin ölçüm aralıkları Tablo 3-4'te gösterilmiştir.

Tablo 3-4: Solubil PD-1, CTLA-4, TIM-3, LAG-3 ve TIGIT ELISA ölçüm aralıkları

ELISA Kiti	Ölçüm Aralığı
PD-1	3.75 ng/ml – 60 ng/ml
CTLA-4	5 pg/ml-80 pg/ml
TIGIT	30 pg/ml-480 pg/ml
TIM-3	20 ng/ml-600 ng/ml
LAG-3	15 pg/ml-240 pg/ml

3.7. Plazma Örneklerinde Solubil Sitokin Düzeylerinin Tayini

Seröz over kanseri tanılı hastalardan izole edilen plazma örneklerinin akan hücre ölçer cihazında boncuk temelli solubil molekül düzeyi tayinine kadar -80^{o}C'de muhafaza edilmiştir. Bu işlem için LEGENDPlex Multi-Analyte Flow Assay Kit-Human CD8/NK Panel (Biolegend, San Diego, California) kiti kullanılmıştır. Bu yöntemle 2 farklı büyüklükte boncuk kullanılmaktadır. Bu boncuk setleri ileri analiz aşamalarında 6. kanalda izlenmekte ve internal floresan yoğunluklarına göre sınıflanmaktadırlar. Bu yöntem ile plazma IL-4, IL-2, IL-6, IL-10, sFAS, TNF-α, IFN-γ, IL-17α, sFAS ligand, Granzim A, Granzim B, Perforin, Granülizin düzeyleri değerlendirilmiştir.

3.7.1. <u>Ön hazırlık:</u> Kutu içeriği kontrol edilmiş ve oda ısısına gelmesi sağlanmıştır.

1. Kutu içerisinden çıkan 25 ml 20x yıkama solusyonu, 475 ml distile su ile 1x olacak sekilde dilue edilmiştir.
2. Kutu içerisinden çıkan kuru Matrix B4 üzerine, 5 ml Assay tamponu eklenerek 15 dakika beklenmiştir.
3. Kutu içerisindeki liyofilize standart kokteyl 250 µl Assay tamponu ile sulandırılarak 15 dakika inkübe edilmiştir.
4. Standartların hazırlanması için 8 adet mikrosantrifüj tüpü C7'den C0'a kadar işaretlenmiştir.

C7 tüpüne sadece 250 µl standart kokteyl, C6 tüpüne 25 µl standart kokteyl ve 75 µl assay tamponu konulmuştur. Her bir sonraki tüp bir öncesine göre 4 kat dilüe edilecek şekilde Tablo 3-5' teki gibi standartlar hazırlanmıştır.

3.7.2. Deney prosedürü

1. Plazma örnekleri 50 µl serum örneği ve 50 µl Assay tamponu olacak şekilde dilüe edilmiştir.
2. 96 kuyucuklu plakaların içerisine her bir kuyucuğa 25 µl standart örneği ve 25 µl Matrix B, 25 µl plazma örneği ve 25 µl assay tamponu ile 25 µl miks boncuk eklenmiştir.
3. Plak üzeri aliminyum folyo ile kapatılarak 500 rpm de 2 saat çalkalayıcıda inkübe edilmiştir.
4. Plaka 1050 rpm de 5 dakika santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırılmıştır.
5. Her kuyucuğa 200 µl 1x yıkama solusyonu eklenerek bir dakika inkübe edilmiş ve 1050 rpm de 5 dakika santrifüj edilerek ve süpernatant atılmıştır.
6. Her kuyucuga 25 µl kutu içerisinden çıkan deteksiyon antikoru eklenerek alüminyum folyo ile sarılarak 800 rpm de bir saat çalkalayıcıda inkübe edilmiştir.
7. Her kuyucuğa 25 µl kutu içerisinden çıkan SA-PE eklenerek deney plağı alüminyum folyo ile sarılarak 800 rpm de 30 dakika çalkalayıcıda inkübe edilmiştir.

Tablo 3-5: Standartların hazırlanması ve dilüsyon oranları

Tüp/Standart numarası	Dilüsyon	Eklenen Assay Buffer (µl)	Eklenen Standart
C7	--	--	250 µl
C6	1:4	75	C7'den 25 µl
C5	1:16	75	C6'dan 25 µl
C4	1:64	75	C5'ten 25 µl
C3	1:256	75	C4'ten 25 µl
C2	1:1024	75	C3'ten 25 µl
C1	1:4096	75	C2'den 25 µl
C0	---	75	---

8. Deney plağı 1050 rpm de 5 dakika santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırılmış ve her kuyucuğa 200 µl yıkama solüsyonu eklenerek bir dakika inkübe edilmiştir. Plakların 1050 rpm de 5 dakika santrifüj edilmesini takiben ve süpernatant uzaklaştırılmıştır.

9. Her kuyucuğa 150 µl 1x yıkama solusyonu eklenerek örnekler NovoCyte® (ACEABiosciences, Inc.) akan hücre ölçer cihazında LEGENDplex™ Data Analysis Software Version 8 kullanılarak analiz edilmiştir. Kit içeriğinde bulunan her bir sitokine ait minimum tespit edilebilir konsantrasyonlar Tablo 3-6'da gösterilmiştir.

3.8. İstatistiksel analiz

Çalışma grubumuzda periferik kan ve tümör dokusundan elde edilecek veriler ile, T hücre alt grupları ve NK hücre inhibitör reseptör ekspresyon oranları ile fonksiyonlarının gruplar arasında fark gösterip göstermediği Mann Whitney U testi ile analiz edildi. Over kanserli hastaların ameliyat sonrasında elde edilen klinikopatolojik parametreleri ile, periferik kan ve tümör dokusundaki NK ve sitotoksik T lenfositlerinin efektör fonksiyonları arasındaki bağıntı da irdelenmiştir. Niceliksel değişkenlerin

Tablo 3-6: CD8/NK Panel Kitinde bulunan sitokinlerin minimum tespit edilebilir konsantrasyon düzeyleri

Sitokin	Minimum tespit edilebilir düzey (pg/ml)
IL-4	0,9
IL-2	1,1
IL-6	1,0
IL-10	0,7
sFAS	3,6
TNF-α	0,6
IFN-γ	1,6
IL-17a	1,1
Fas Ligand	1,3
Granzim A	1,2
Granzim B	5,6
Perforin	2,1
Granülizin	5,2

davranışları merkezileştirme ve varyans ölçümleri kullanılarak belirtilmiştir. Grup ortalamalarının davranış, farklılıklarını göstermek için; normallik ve eşdağılımlık varsayımlarının karşılanmadığı durumlarda Mann-Whitney U-Test (grup sayısı=2) yöntemi kullanılmıştır. İki sayısal degişkenin birbiri arasındaki korelasyonu hesaplamada, veriler normal dağılıma sahip olmadığı için parametrik olmayan Spearman's Rank Correlation testi kullanılmış ve tüm olgular için istatistiksel anlamlılık p = 0,05 olarak belirlenmiştir. İstatistiksel analizler IBM SPSS (Windows için İstatistik Paketi, Sürüm 21.0, Armonk, NY, IBM Corp.) paket programı ile yapılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Kontrol ve Çalışma Grubunun Demografik Özellikleri

Hastalarımızın over kanseri olgular olması sebebi ile tüm vakalar ve sağlıklı kontroller kadındır. Hastaların ve sağlıklı kontrollerin yaşları benzer seçilmiştir. Bu nedenle istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. Ayrıca sağlıklı kontroller çalışmaya dahil edilirken sigara içmeyen, kronik inflamasyona yol açan sistemik hastalığı olmayan (diyabet, romatolojik hastalıklar, otoimmun hastalıklar ve kanser gibi) olgular seçilmiştir. Sağlıklı kontrollerden alınan kan örnekleri ile over kanseri olguların kan örnekleri karşılaştırılmış olup verinin analizini güçleştireceği için tümör dokusu örnekleri ile kontrollerin kan örnekleri karşılaştırılmamıştır. Tablo 4-1'de hastalarımızın demografik özellikleri belirtilmiştir.

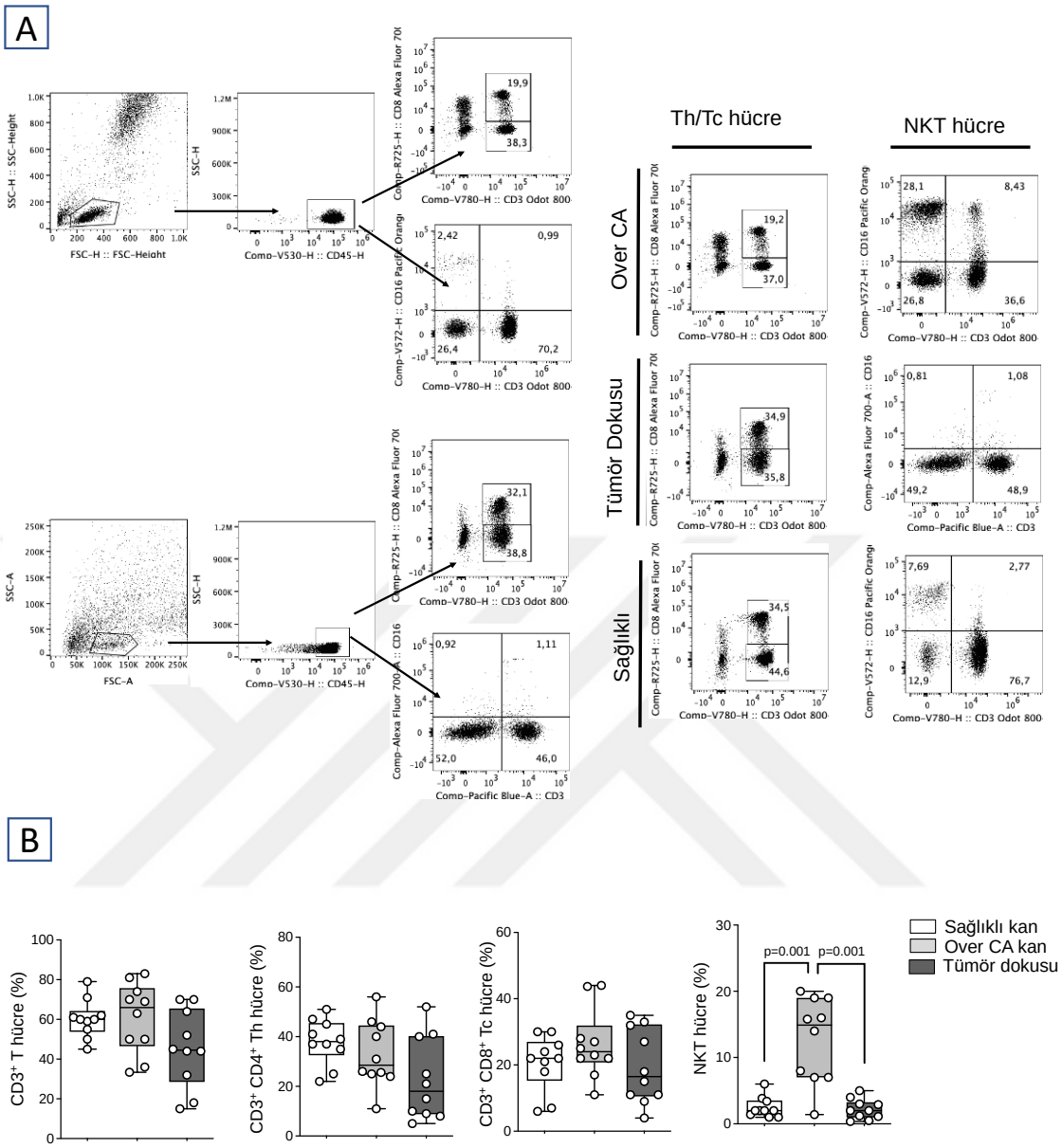
Tablo 4-1: Çalışmaya dahil edilen hasta ve kontrol grubunun demografik özellikleri

	Over kanserli olgular (n=10)	**Sağlıklı kontroller (n=10)**
Yaş (ortalama)	49,4	48,6
Kadın Cinsiyet	10 (%100)	10 (%100)
Sigara	0 (%0)	0 (%0)
Kronik Hastalık	0 (%0)	0 (%0)
Over kanseri evre 3	9 (%90)	-
Over kanseri evre 4	1 (%10)	-
Histolojik alttip- yüksek dereceli seröz over kanseri	10 (%100)	-

4.2. Lenfosit Alt Gruplarının Belirlenmesi

4.2.1. T Lenfosit ve NKT Hücre Oranlarının Belirlenmesi

Çalışmamızda immun kontrol reseptör düzeylerini incelediğimiz hücre alt grup oranlarının belirlenmesi deneylerimizin ilk aşamasını oluşturmuştur. $CD3^+CD4^+$ Th ve $CD3^+CD8^+$ Tc hücre oranları tümör dokusu, hasta kanı ve sağlıklı kanında benzer saptanmıştır. $CD3^+CD16^+CD56^+$ NKT hücre oranı over kanserli hastaların kan örneklerinde hem tümör dokusu hem de sağlıklı kana kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur (sırasıyla $p=0,001$ ve $p=0,001$) (Şekil 4-1 A ve B).



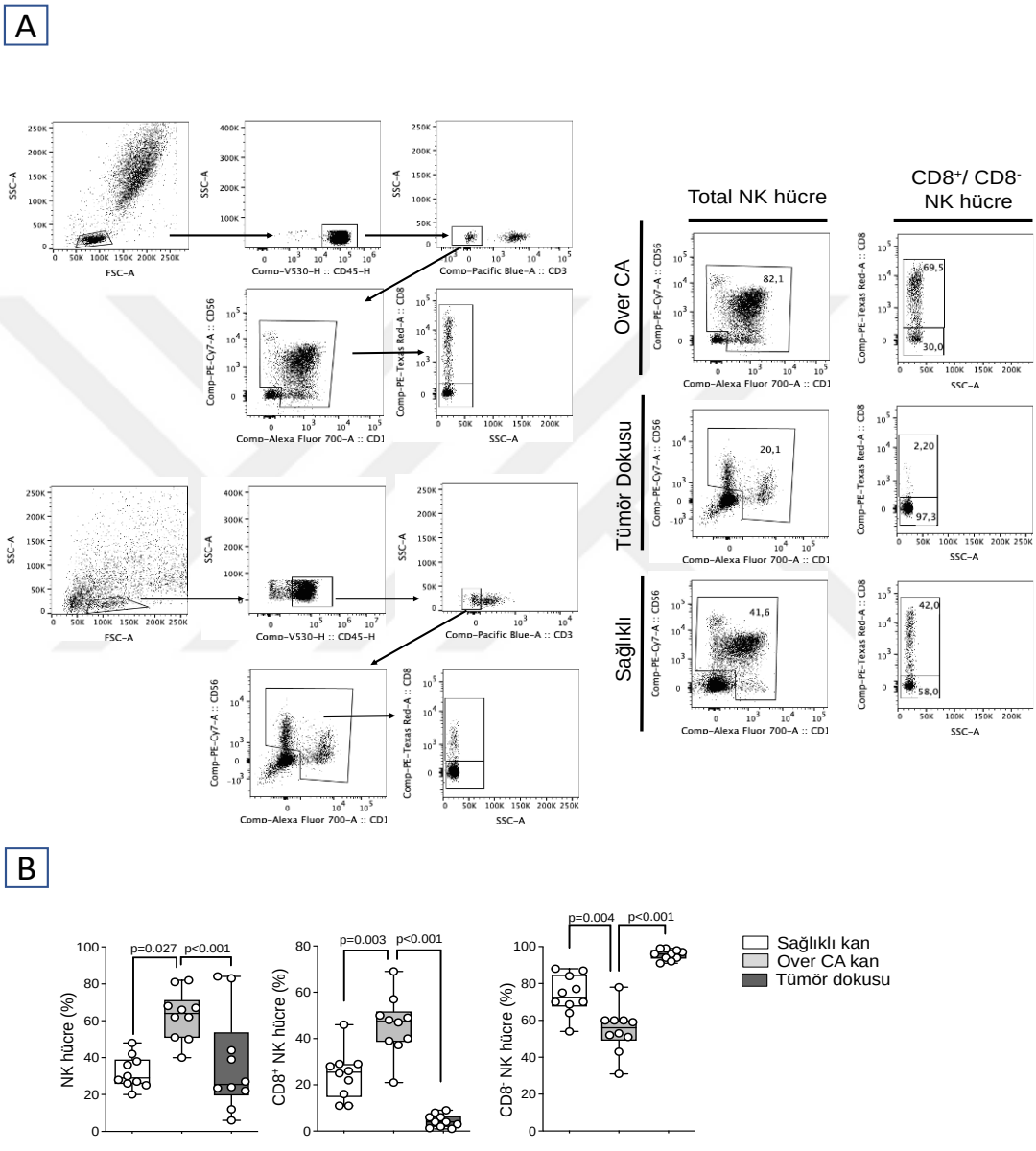
Şekil 4-1: Tümör dokusu, hasta kanı ve sağlıklı kontrollerin kan örneklerinde lenfosit alt gruplarının dağılımı.

(A) Periferik kan ve tümör dokusundaki lenfosit alt gruplarının akan hücre ölçer dot plot görüntüleri, (B) Th, Tc ve NKT Hücre Alt Grup Akan hücre ölçer sonuçları.

4.2.2. NK Hücre Alt Gruplarının Periferik Kan ve Tümör Dokusundaki Oranları

İmmun kontrol noktası reseptörlerinin analizleri öncesinde hücre alt grup dağılımlarını karşılaştırılması genel bakış sağlaması açısından özellikle önemlidir. Hasta kanında $CD3^{-}CD16^{+}CD56^{+}$ total NK hücre oranı hem tümör dokusu hem de sağlıklı kontrol kanından yüksek olarak saptanmıştır (sırasıyla $p<0,001$ ve $p=0,027$). $CD8^{-}CD3^{-}$

$CD16^{+}CD56^{+}$ NK hücreleri hem tümörde hem de kontrollerde hasta kanına kıyasla daha yüksek iken ($p<0,001$ ve $p=0,004$, sırasıyla) $CD8^{+}CD3^{-}CD16^{+}CD56^{+}$ NK hücre oranı hasta kanında hem tümör hem de sağlıklı kana göre istatistiksel olarak yüksek ($p<0,001$ ve $p=0,003$, sırasıyla) saptanmıştır (Şekil 4-2 A ve B).

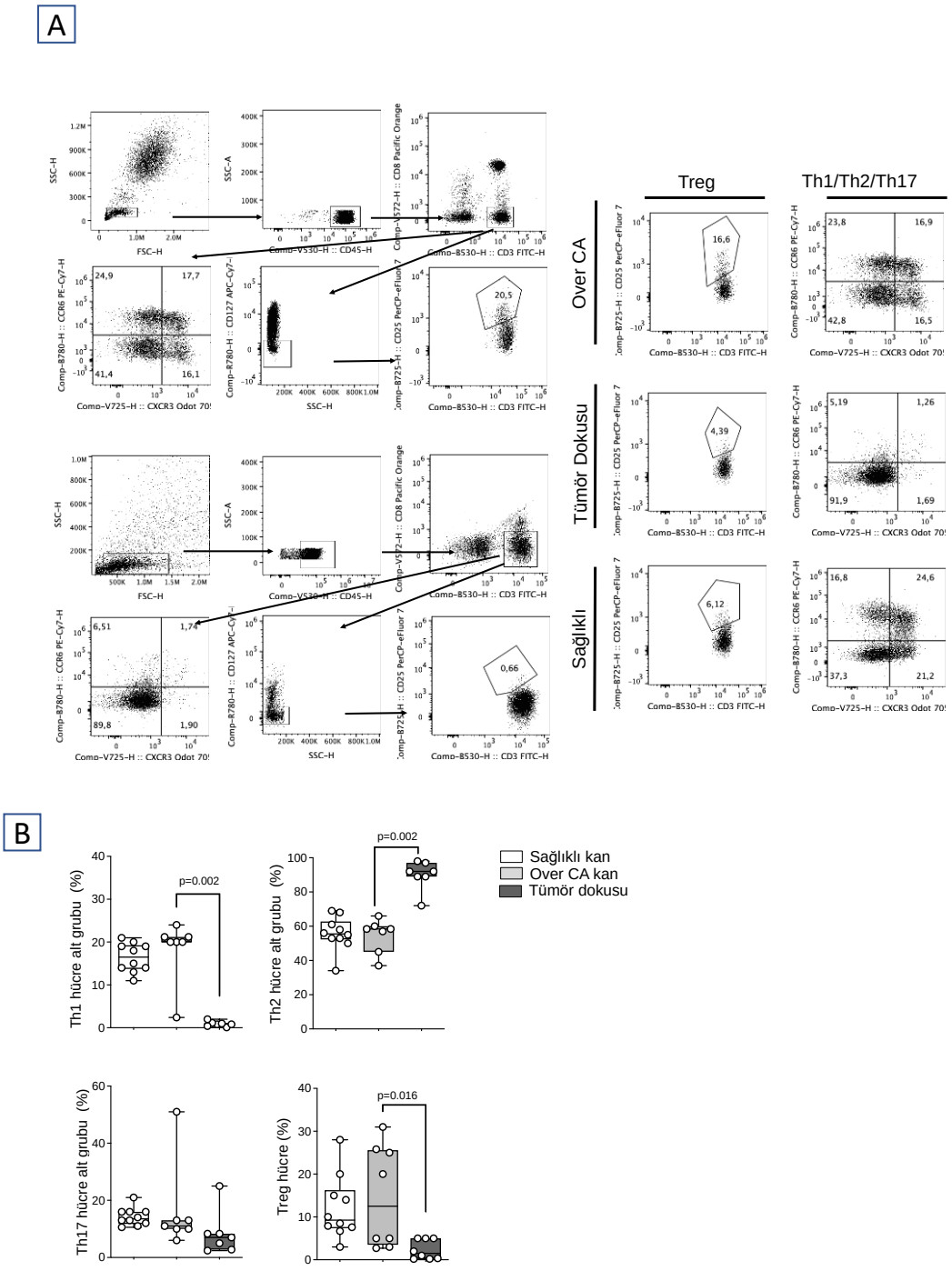


Şekil 4-2: NK hücre alt gruplarının akan hücre ölçer analiz sonuçları.

(A) Hasta kanı, tümör dokusu ve sağlıklı bireylerin periferik kan örneklerinde NK hücre alt grup analizlerinin akan hücre ölçer görüntüleri, (B) Total NK hücre, $CD8^{+}$ ve $CD8^{-}$ NK hücre alt grup oranları.

4.2.3. Yardımcı T Lenfosit Alt grupları ve Regulatör T Hücre Oranlarının Belirlenmesi

Yardımcı T lenfositlerinin alt grupları (Th1, Th2, Th17) ve Treg hücre oranları akan hücre ölçerde analiz edilmiştir. Fenotipik belirteç olarak Th1 hücreleri için $CD45^{+}CD3^{+}CD4^{+}CXCR3^{+}CCR6^{-}$, Th2 hücreleri için $CD45^{+}CD3^{+}CD4^{+}$ $CXCR3^{-}CCR6$, Th17 hücreler için $CD45^{+}CD3^{+}CD4^{+}CXCR5^{-}CCR6^{+}$ ve Treg hücreler için ise $CD45^{+}CD3^{+}CD4^{+}$ $CD127^{-}CD25^{+}$ yüzey antikorları kullanılmıştır. Hastaların periferik kanlarında Th1, Th2, Th17 ve Treg hücre oranları ile sağlıklıların kanları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır. Bununla birlikte Th2 hücre oranları tümör dokusunda hasta kanına kıyasla anlamlı şekilde yüksek olmasına rağmen ($p=0,002$) Th1 ve Treg hücre oranları tümör dokusunda anlamlı şekilde düşük bulunmuştur ($p=0,002$ ve $p=0,016$, sırasıyla). Th17 hücre oranı anlamlı düzeye ulaşmamakla birlikte tümör dokusunda belirgin düzeyde düşük saptanmıştır ($p=0,054$) (Şekil 4-3 A ve B).



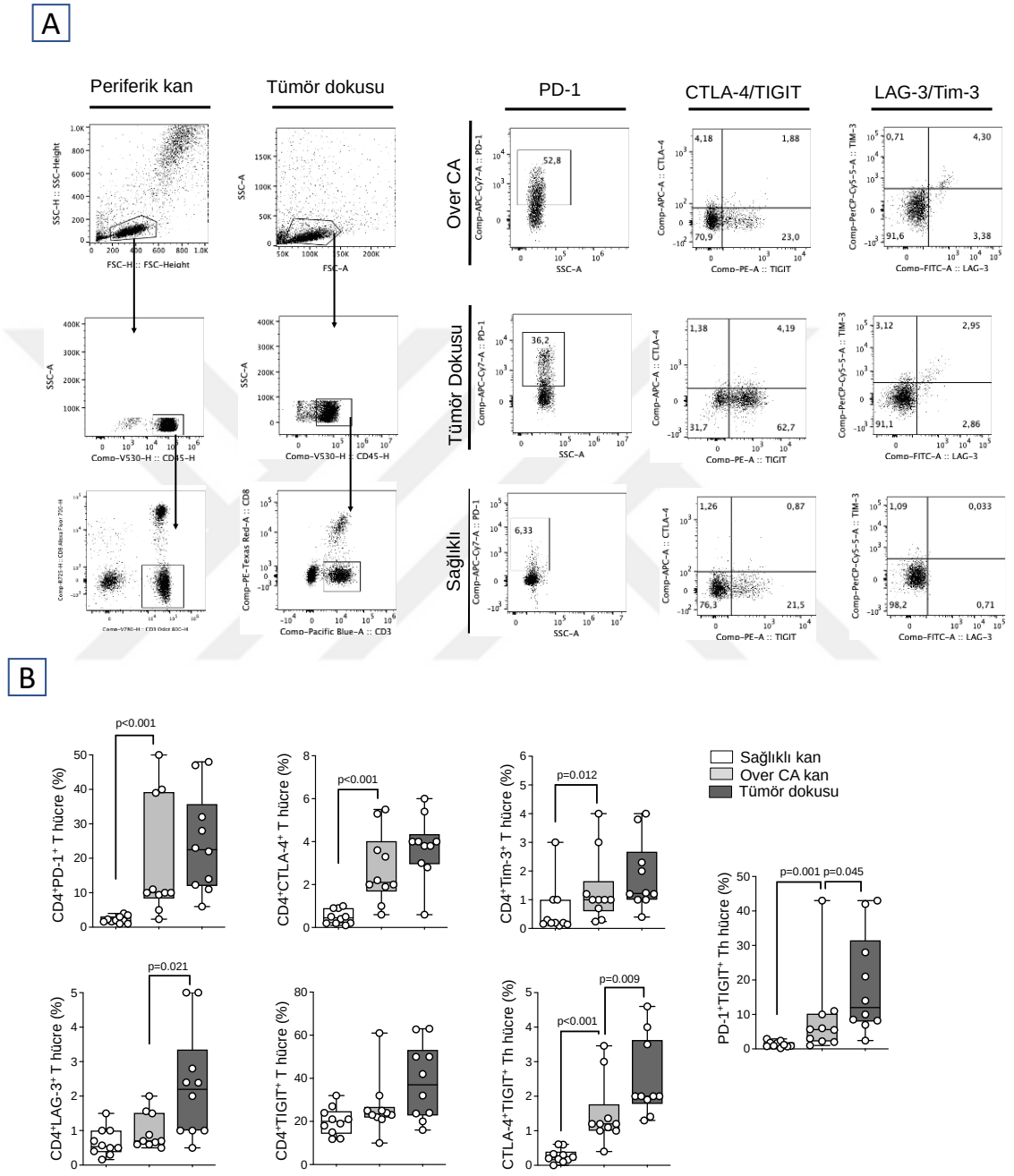
Şekil 4-3: Treg, Th1, Th2 ve Th17 hücre alt gruplarının akan hücre ölçer analizleri

4.3. Lenfosit Alt Gruplarında İmmun Kontrol Noktası Reseptör Ekspresyonlarının Over Kanseri ve Sağlıklı Olgularda Karşılaştırılması

4.3.1. $CD4^+$ Th lenfositlerinde İmmun Kontrol Reseptörlerinin Gruplar Arası Dağılımı

$CD3^+CD4^+$ T lenfositlerinde immün kontrol noktası reseptörlerinin ekspresyon paternleri tümör dokusu, hasta ve sağlıklı kontrollerin periferik kan örneklerinde araştırılmıştır (Şekil 4-4). $CD3^+CD4^+$ yardımcı T lenfosit alt grubunda CTLA-4 ekspresyonu tümör dokusunda hasta kanına göre daha fazla (sırasıyla 3,9 (medyan 0,6-6) ve 2,1 (medyan 0,6-5,5)) olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı düzeye ulaşmamıştır. Hasta kanında ise sağlıklılara kıyasla $CD3^+CD4^+CTLA\text{-}4^+$ Th hücre oranı yüksek saptanmıştır ($p<0,001$). $CD3^+CD4^+TIGIT^+$ T lenfosit oranı istatistiksel olarak gruplar arasında anlamlı fark göstermemesine rağmen en yüksek düzeyde TIL'de daha sonra hasta kanında, en düşük düzeyde de sağlıklı kontrollerde bulunmuştur (sırasıyla 37 (medyan 16-63) – 23,5 (medyan 10-61) – 20 (medyan 11,8-32)). $CD3^+CD4^+PD\text{-}1^+$ T hücrelerinin anlamlı düzeyde olmamakla birlikte tümör dokusunda hasta kanından oldukça yüksek düzeyde olduğu saptanmıştır (22,5 (medyan 6-48) – 10 (medyan 1-43)). Hasta kanı ile sağlıklı kontrollerde $CD3^+CD4^+$ T lenfositlerinde PD-1 ekspresyonu karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak anlamlı biçimde hastaların kanında ekspresyon yüksek bulunmuştur ($p<0,001$). LAG-3 molekülünün en yüksek oranda tümör infiltre eden $CD3^+CD4^+$ T hücrelerde eksprese edildiği ve bu farkın hastaların kan örnekleri ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur ($p=0,021$). Hasta kanı ile sağlıklı kanı kıyaslandığında ise $CD3^+CD4^+$ Th hücrelerinde LAG-3 ekspresyonu açısından anlamlı bir fark saptanmamıştır. $CD3^+CD4^+TIM\text{-}3^+$ T hücre oranı tümör dokusudan hasta kanından yüksek bulunmasına rağmen anlamlı bir fark saptanmamıştır. Bununla birlikte hasta kanı ile sağlıklı kanı karşılaştırıldığında hasta grubunda istatistiksel olarak artış saptanmıştır ($p=0,012$). $CD4^+$ T lenfositlerin CTLA-4 ve TIGIT koekspresyonlarına ($CD3^+CD4^+CTLA\text{-}4^+TIGIT^+$) baktığımızda tümörde anlamlı bir şekilde hastadan yüksek; hastalarda da sağlıklı kontrollerden yüksek bir koekspresyon paterni olduğu bulunmuştur ($p=0,009$ ve $p<0,001$, sırasıyla). Benzer şekilde aynı hücre grubunda PD-1 ve TIGIT koekspresyonu ($CD3^+CD4^+PD\text{-}1^+TIGIT^+$) analiz edildiğinde tümör dokusunda yüksek ekspresyon oranına ulaşıldığı ($p=0,045$), hasta kanında da

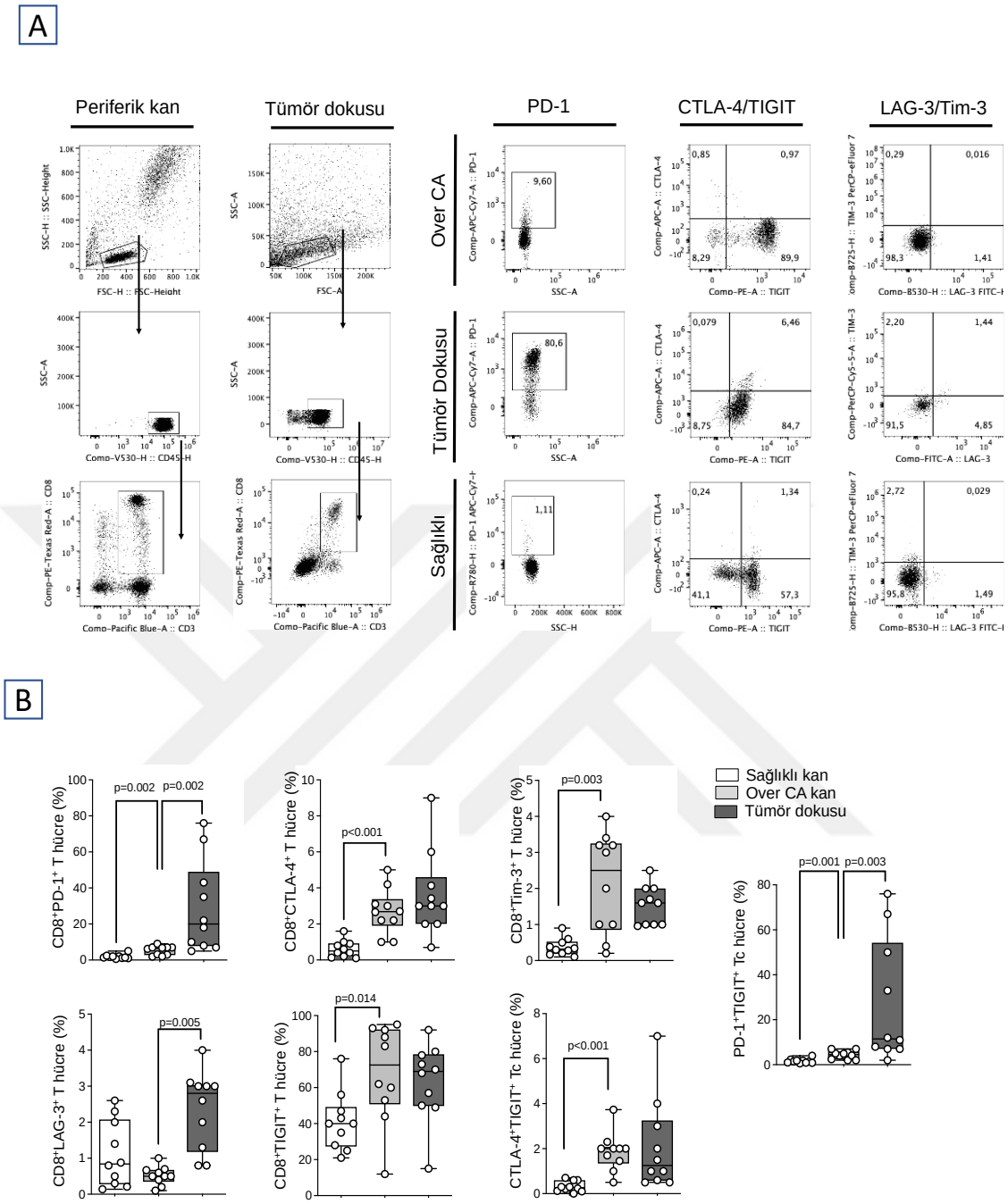
sağlıklıların kanına kıyasla yüksek oranda eksprese edildiği görülmektedir (p=0,001) (Şekil 4-4).



Şekil 4-4: İleri evre over kanseri hasta, sağlıklı periferik kan ve tümör dokusu $CD3^{+}CD4^{+}$yardımcı T lenfositlerinde PD-1, CTLA-4, LAG-3, TIGIT ve TIM-3 ekspresyonları

4.3.2. $CD8^+$ T lenfositlerinde İmmun Kontrol Noktası Reseptörlerinin Gruplar Arası Dağılımı

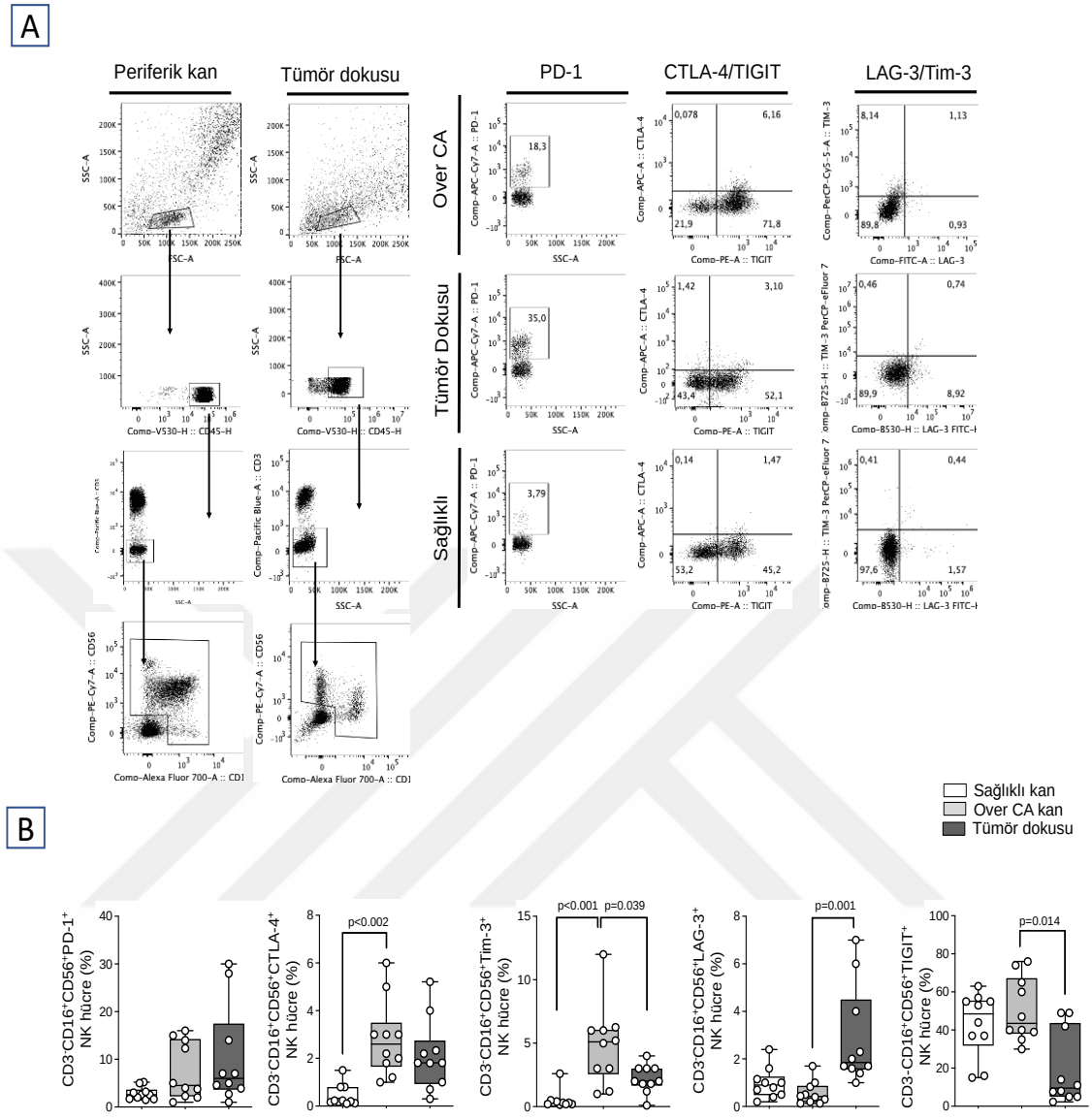
$CD3^+CD8^+$ sitotoksik T lenfosit immun kontrol reseptörlerinde ekspresyonunu incelediğimizde, $CD3^+CD8^+CTLA\text{-}4^+$, $CD3^+CD8^+TIGIT^+$ ve $CD3^+CD8^+TIM\text{-}3^+$ T lenfosit oranlarının tümör dokusunda ve hasta kanında benzer düzeyde olduğu, bununla birlikte sağlıklı olgulara göre yüksek olduğu saptanmıştır ($p<0,001$, $p=0,014$ ve $p=0,003$, sırasıyla). $CD3^+CD8^+PD\text{-}1^+$ sitotoksik T hücreler tümör dokusunda hasta kanına kıyasla istatistiksel anlamlı biçimde yüksek eksprese edilmekte ($p=0,002$) iken hasta kanında kontrol grubundan anlamlı şekilde yüksek saptanmıştır ($p=0,002$). $CD3^+CD8^+$ sitotoksik T lenfositlerde LAG-3 ekspresyonunun hasta kanı ve sağlıklı kanında benzer düzeyde olduğu, tümörde ise anlamlı bir şekilde yüksek olduğu bulunmuştur ($p=0,005$). Sitotoksik T lenfositlerinde CTLA-4 ve TIGIT koekspresyonu ($CD3^+CD8^+CTLA\text{-}4^+TIGIT^+$) incelendiğinde tümör ve hasta kanında benzer oranda eksprese olduğu, bununla birlilkte sağlıklı olgulara göre yüksek eksprese edildiği gösterilmiştir ($p=0,001$). PD-1 ve TIGIT koekspresyonu ($CD3^+CD8^+PD\text{-}1^+TIGIT^+$) en düşük sağlıklı kanında saptanmış ($p=0,001$), tümör dokusunda ise bu hücre alt grubunun hasta kanından anlamlı olarak daha yüksek olduğu bulunmuştur ($p=0,003$) (Şekil 4-5).



Şekil 4-5: CD3$^+$CD8$^+$ sitotoksik T lenfositlerinde immün kontrol noktası reseptörlerinin ekspresyonları ve gruplar arası karşılaştırılması.

4.3.3. Total NK Hücreleri, $CD8^+$ ve $CD8^-$ NK Hücre Alt Gruplarında İmmun Kontrol Reseptörlerinin Ekspresyonu

İmmün kontrol noktası reseptörlerinin NK hücrelerindeki ekspresyon paterni Şekil 4-6'de gösterilmiştir. $CD3^-CD16^+CD56^+CTLA\text{-}4^+$ NK hücrelerinin hasta kanı ve tümör dokusunda benzer oranlarda saptanmasına rağmen, sağlıklı kontroller ile kıyaslandığında anlamlı olarak yüksek saptanmıştır ($p<0,001$). LAG-3 eksprese eden NK hücrelerinin tümör dokusunda periferik kana kıyasla anlamlı düzeyde yüksek saptanmıştır ($p=0,001$). Hasta kanı ile sağlıklı kan arasında ise $CD3^-CD16^+CD56^+LAG\text{-}3^+$ NK hücrelerinde anlamlı bir fark saptanmamıştır. Bir diğer inhibitör reseptör olan TIGIT ekspresyonu ise $CD3^-CD16^+CD56^+$ NK hücrelerinde kontrol grubu ile hasta kanında benzer oranlarda iken tümör infiltre NK hücrelerine göre ise anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p=0,014$). $CD3^-CD16^+CD56^+TIM\text{-}3^+$ NK hücre oranının hasta kanında hem tümör dokusuna hem de sağlıklı kana kıyasla anlamlı şekilde yüksek olduğu gösterilmiştir (sırasıyla $p=0,039$ ve $p<0,001$) (Şekil 4.6. A ve B)

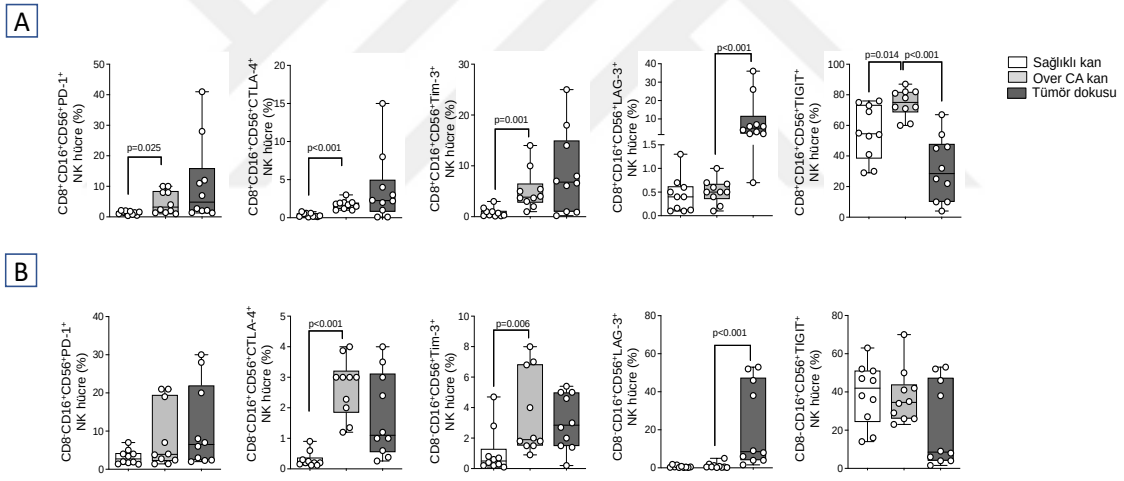


Şekil 4-6: $CD3^{-}CD16^{+}CD56^{+}$ NK hücre alt gruplarında immün kontrol noktası reseptörlerinin ekspresyonları ve gruplar arası karşılaştırılması.

(A) NK hücrelerinde PD-1, CTLA-4, LAG-3, TIGIT ve TIM-3 ekspresyonlarının flow sitometrik görüntüleri, (B) PD-1, CTLA-4, LAG-3, TIGIT ve TIM-3 ekspresyon analizlerinin NK hücre alt grup sonuçları.

NK hücreleri CD8 ekspresyonlarına gruplara ayrılarak yapılan immun kontrol noktası reseptör analizleri Şekil 4-7'de gösterilmiştir. Periferik kan $CD3^{-}CD16^{+}CD56^{+}CD8^{+}$ NK hücrelerinin CTLA-4, PD-1 ve TIM-3 ekspresyonları hastalarda sağlıklı kontrollere göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0,001$, $p=0,025$ ve $p=0,001$, sırasıyla). LAG-3 eksprese eden $CD3^{-}$

$CD16^+CD56^+CD8^+$ NK hücre oranı hasta kanında ve kontrol grubunda benzer iken tümör dokusunda belirgin şekilde yüksek saptanmıştır (p>0,001). $CD3^-CD16^+CD56^+CD8^+TIGIT^+$ NK hücre oranı hasta kanında tümör dokusuna kıyasla yüksek eksprese edilmektedir (p<0,001). Aynı zamanda hasta kanındaki $CD3^-CD16^+CD56^+CD8^+TIGIT^+$ NK hücre oranı sağlıklı kanına kıyasla da anlamlı biçimde artmıştır (p=0,014). CD8 eksprese etmeyen NK hücrelerinde ise $CD3^-CD16^+CD56^+CTLA\text{-}4^+$ ve $CD3^-CD16^+CD56^+TIM\text{-}3^+$ hücre oranları tümör dokusunda ve hasta kanında benzer düzeyde saptanmakla birlikte sağlıklı kontrollerle kıyaslandığında ise istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek saptanmıştır (p<0,001). $CD3^-CD16^+CD56^+CD8^-LAG\text{-}3^+$, $CD3^-CD16^+CD56^+CD8^-PD\text{-}1^+$ ve $CD3^-CD16^+CD56^+CD8^-TIGIT^+$ hücre oranlarını incelediğimizde gruplar arası farklılık gösterilememiştir (Şekil 4.7)

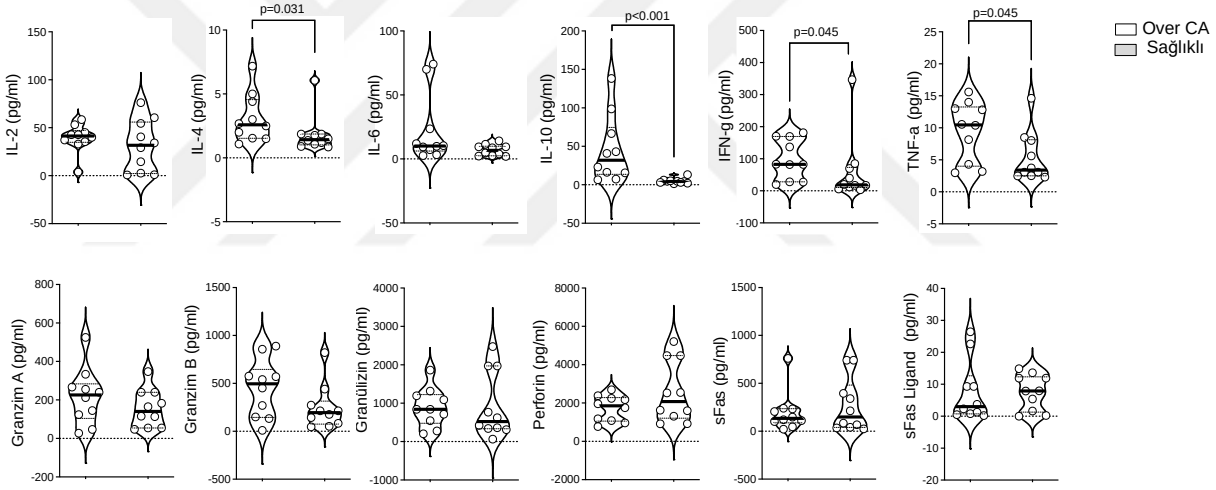


Şekil 4-7: $CD8^+$ ve $CD8^-$ NK hücre alt gruplarında PD-1, CTLA-4, LAG-3, TIGIT ve TIM-3 ekspresyon analizleri

4.4. Plazma Örneklerinde Solubil Sitokin ve Reseptör Düzeyleri ile Gruplar Arası Farklılıklar

4.4.1. Tümörigenezde Rol Oynayan NK Hücre ve Tc Hücre Kökenli Sitokin Düzeylerinin Saptanması

NK Hücre ve sitotoksik T lenfosit kökenli sitokin düzeyleri sağlıklılarda ve hastalarda boncuk bazlı akan hücre ölçer yöntemiyle analiz edilmiştir (Şekil 4-8). IFN-γ, (p=0,045), IL-10 (p<0,001), IL-4 (p=0,031) ve TNF-α (p=0,045) sitokin düzeyleri hasta grubunda sağlıklı bireylere göre istatistiksel olarak yüksek saptanmıştır. Bununla birlikte plazma IL-2, IL-6, granzim A, granzim B, granülizin, perforin, sFas ve sFas Ligand düzeylerinde ise gruplar arasında farklılık bulunmamıştır (Şekil 4-8)

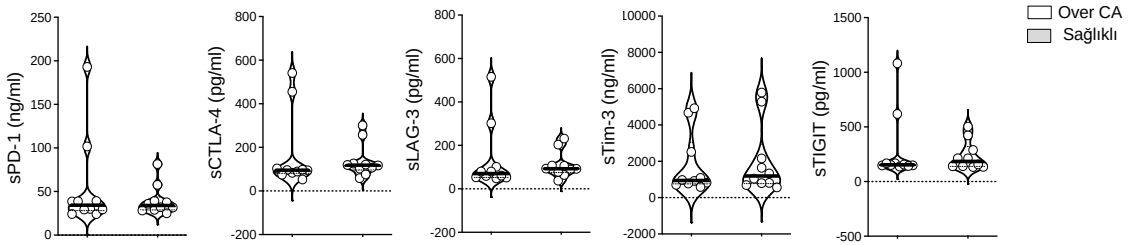


Şekil 4-8: Hasta ve sağlıklı grup plazma örneklerinde NK ve Tc hücre kökenli solubil sitokin ve reseptör analizleri

4.4.2. Solubil İmmun Kontrol Reseptörlerinin Düzeylerinin Saptanması ve Gruplar Arası Karşılaştırması

İmmun kontrol reseptörlerinin hücre yüzeylerindeki ekspresyonları dışında solubil formlarının da önemli immünolojik fonksiyonlarının olduğu bilinmektedir. Bu amaçla çalışmamızda immün kontrol noktası reseptörlerinin solubil formları ELISA metoduyla incelenmiştir. Over kanseri olgular ve sağlıklıların plazmalarında solubil

PD-1, CTLA-4, TIM-3, LAG-3 ve TIGIT reseptör düzeylerinin her iki grupta da benzer düzeylerde olduğu bulunmuştur (Şekil 4-9).



Şekil 4-9: İmmün kontrol reseptörlerinin solubil formlarının hasta kanı ve sağlıklı kontrol kanlarındaki dağılımı

4.5. Korelasyon Analiz Sonuçları

4.5.1. Over Kanseri olguların Lenfosit ve NK hücrelerinde ekprese edilen yüzey immun kontrol reseptörlerinin oranı ile solubil reseptör düzeylerinin korelasyon analizi

Çalışmamızda incelediğimiz hem solubil hem de hücre yüzey immun kontrol reseptör ekspresyonlarının korelasyon analiz sonuçları Tablo 4-2'de gösterilmiştir. Korelasyon katsayıları etkinin büyüklük derecesini ifade ederken, p değerleri ise gözlemlenen bu etkilerin varlığını test etmektedir. Negatif yönlü korelasyon katsayıları ters orantılı, pozitif yönlü katsayılar ise doğru orantılı değişen parametreleri ifade etmektedir. Korelasyon tablolarımızda koyu renkle belirtilen sonuçlar, parametreler arası anlamlı korelasyonu gösterirken, etki büyüklükleri (r) için genel kabul görmüş yorumlar şu şekildedir; **0 – 0.199** Çok Zayıf **0.2 – 0.399** Zayıf **0.4 – 0.499** Orta **0.5 – 0.799** Kuvvetli **0.8 - 1** Çok Kuvvetli.

Tablo 4-2: Hasta grubunda solubil immun kontrol reseptörleri ile bağlı formdaki eşdeğerlerinin ekspresyonlarının korelasyon analizi

	sPD-1		sTIM-3		sLAG-3		sTIGIT		sCTLA-4	
	r	p*	r	p*	r	p*	r	p*	r	p*
$CTLA4^+$ Th hücre	**-0.705**	**0.023**	**-0.638**	**0.047**	**-0.693**	**0.026**	-0.608	0.062	-0.541	0.106
$CTLA4^+TIGIT^+$ Th hücre	-0.455	0.186	-0.419	0.229	-0.609	0.061	-0.283	0.428	-0.591	0.072
$LAG\text{-}3^+$ Th hücre	-0.024	0.947	-0.287	0.422	-0.11	0.763	0.055	0.88	-0.287	0.422
$PD\text{-}1^+$ Th hücre	0.043	0.906	-0.276	0.44	-0.166	0.647	-0.018	0.96	-0.374	0.287
$PD\text{-}1^+TIGIT^+$ Th hücre	0.139	0.701	-0.212	0.556	-0.103	0.777	-0.055	0.881	-0.212	0.556
$TIGIT^+$ Th hücre	0.152	0.674	-0.195	0.589	-0.098	0.789	0.073	0.841	-0.195	0.589
$TIM\text{-}3^+$ Th hücre	-0.519	0.124	-0.288	0.42	**-0.65**	**0.042**	-0.463	0.178	-0.613	0.06
$CD8^+CTLA4^+$ NK hücre	-0.287	0.422	-0.482	0.159	-0.134	0.712	-0.323	0.362	-0.171	0.637
$CD8^+LAG3^+$ NK hücre	0.411	0.238	0.387	0.27	**0.669**	**0.034**	0.534	0.112	0.546	0.102
$CD8^+PD\text{-}1^+$ NK hücre	-0.037	0.92	0.207	0.565	0.214	0.552	-0.311	0.382	-0.03	0.933
$CD8^+TIGIT^+$ NK hücre	-0.25	0.486	-0.36	0.307	-0.476	0.165	-0.244	0.497	-0.354	0.316
$CD8^+TIM\text{-}3^+$ NK hücre	-0.517	0.126	-0.559	0.093	**-0.663**	**0.037**	-0.523	0.121	-0.462	0.179
$CTLA\text{-}4^+$ Tc hücre	-0.22	0.542	-0.232	0.519	-0.305	0.392	-0.055	0.88	-0.171	0.637
$CTLA4^+TIGIT^+$ Tc hücre	0.144	0.692	-0.269	0.453	-0.125	0.731	0.094	0.797	-0.188	0.604
$LAG\text{-}3^+$ Tc hücre	**0.799**	**0.006**	0.616	0.058	0.652	0.041	**0.89**	**0.001**	0.518	0.125
$PD\text{-}1^+$ Tc hücre	0.448	0.194	-0.067	0.853	0.362	0.304	0.35	0.322	0.252	0.483
$PD\text{-}1^+TIGIT^+$ Tc hücre	0.512	0.13	0.146	0.687	0.512	0.13	0.451	0.191	0.433	0.211
$TIGIT^+$ Tc hücre	-0.37	0.293	-0.576	0.082	-0.43	0.214	**-0.709**	**0.022**	-0.333	0.347
$TIM\text{-}3^+$ Tc hücre	-0.177	0.625	-0.317	0.372	-0.305	0.392	-0.427	0.219	-0.262	0.464
Not: Spearman Korelasyon Analizi										

Analiz sonuçlarımıza göre CD3+CD4+ Th hücrelerde CTLA-4 ekspresyonu ile solubil PD-1 (p=0,023), solubil LAG-3 (p=0,047) ve solubil TIM-3 düzeyleri (p=0,026) kuvvetli şekilde negatif korelasyon göstermektedir. CTLA-4 ekspresyonu CD3+CD4+ Th hücrelerinde arttıkça sLAG-3, sPD-1 ve sTIM-3 düzeyleri azalmaktadır.

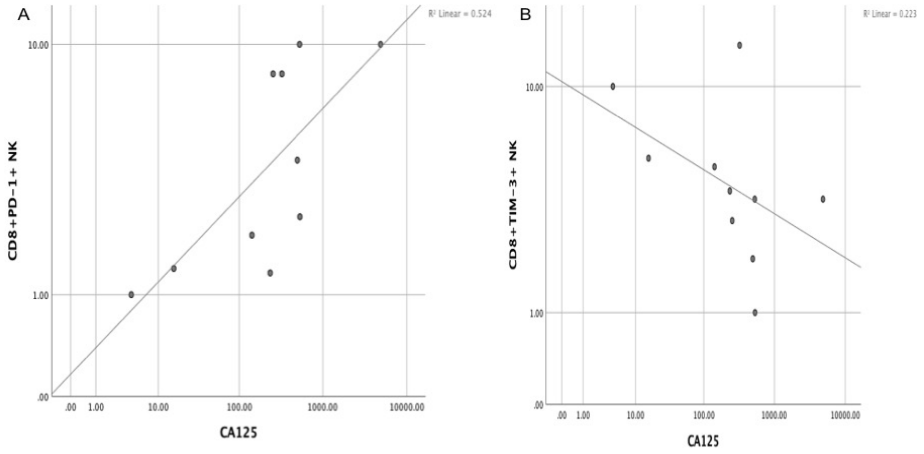
Yüzeyde eksprese edilen TIM-3 ekspresyonları ile solubil reseptör düzeyleri arasındaki ilişki incelediğinde ise $CD3^{+}CD4^{+}$ Th ve $CD3^{-}CD16^{+}CD56^{+}CD8^{+}$ NK hücrelerinin TIM-3 ekspresyonunun solubil LAG-3 düzeyleri ile kuvvetli biçimde negatif korele olduğu gösterilmiştir (sırasıyla p=0,042 ve p=0,037). Her iki hücre grubunda da TIM-3 ekspresyonu arttıkça hastaların kanında ölçülen sLAG-3 düzeyi anlamlı şekilde azalmaktadır. Bunun aksine $CD3^{-}CD16^{+}CD56^{+}CD8^{+}$ NK hücrelerinde LAG-3 ekspresyonu plazma solubil LAG-3 düzeyi ile kuvvetli olarak pozitif koreledir (p=0,034). Bir başka deyişle LAG-3 ekspresyonu $CD3^{-}CD16^{+}CD56^{+}CD8^{+}$ NK hücrelerinde arttıkça sLAG-3 düzeyi de anlamlı şekilde artmaktadır.

$CD3^{+}CD8^{+}$ T hücrelerinde LAG-3 ekspresyonu solubil PD-1 ve TIGIT ile çok kuvvetli şekilde pozitif korele iken aynı hücre grubunda TIGIT ekspresyonu solubil TIGIT ile kuvvetli negatif koreledir.

4.5.2. Hasta Grubu Plazma CA125 Düzeyleri ile İmmun Kontrol Noktası Reseptörlerinin Ekspresyon Korelasyon Analizleri

Over kanseri tanısı alan olgularda tanı, tedavi ve nüks takibinde önemli rol oynayan tümör belirteci CA125 düzeylerinin immun kontrol noktası reseptörleri ile korelasyonları incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte hem CD3+$CD4^{+}$ Th hem de CD3+$CD8^{+}$ Tc hücrelerinde CTLA-4 ekspresyonu ile kuvvetli şekilde negatif korele olduğu gösterilmiştir (sırasıyla r= -0,059 ve r= -0,604) ve TIM-3 eksprese eden $CD3^{-}CD16^{+}CD56^{+}CD8^{+}$ NK hücre oranları ile serum CA125 kuvvetli şekilde negatif korelasyonu saptanmış ve bu bulgu istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (r= -0,65 ve p=0,042). Benzer şekilde $CD3^{-}CD16^{+}CD56^{+}CD8^{+}$ $PD\text{-}1^{+}$ NK hücre oranları ise CA125 düzeyi ile kuvvetli olarak pozitif korele bulunmuştur (r=0,793 ve p=0,006). Bu verilerin logaritmik korelasyon analizi Şekil 4-10'da gösterilmiştir.

Sitokin düzeyleri ile CA125 düzeyi arasındaki korelasyon analizleri incelendiğinde ise yalnızca serum Fas düzeyi ile serum CA125 düzeyinin kuvvetli negatif korelasyon gösterilebilmiştir (r= -0,648 ve p=0,043).

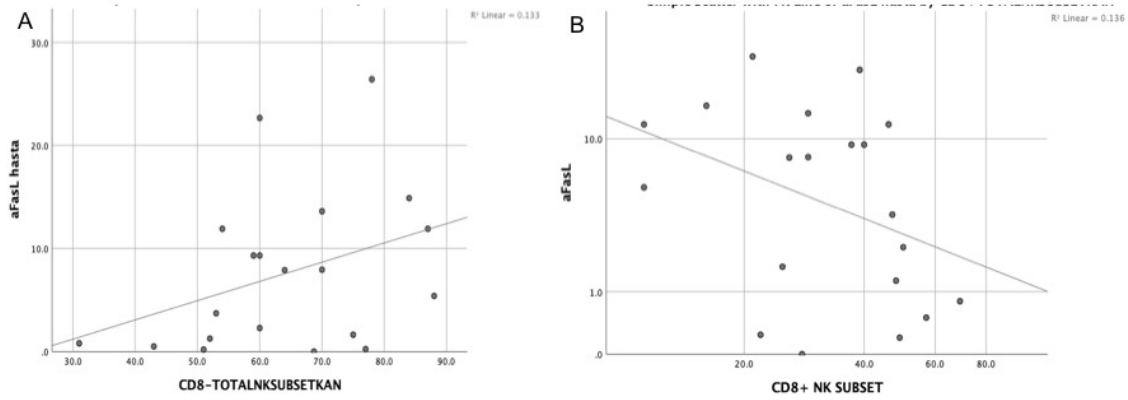


Şekil 4-10: $CD8^+$ $PD\text{-}1^+$NK ve $CD8^+$ $TIM3^+$ NK Hücrelerin Plazma CA125 düzeyi ile korelasyonu

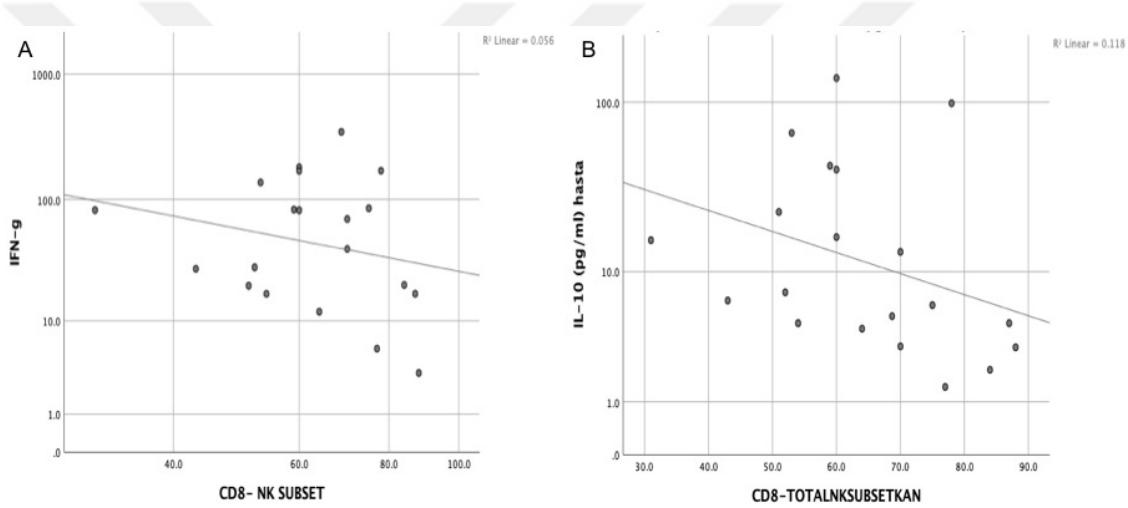
4.5.3. Over Kanseri Hastaların Plazma Sitokin Düzeyleri ile T Lenfosit ve NK hücre Oranlarının Korelasyon Analizleri

Hastalardan alınan periferik kan plazma örneklerinde çalışılan sitokin düzeyleri ile T lenfosit alt gruplarının korelasyon analizleri Tablo 4-3'te gösterilmiştir. $CD3^-CD16^+CD56^+CD8^-$ NK hücreler ile solubil fasL düzeyi arasında çok kuvvetli pozitif korelasyon olduğu saptanmıştır (r=0,868 ve p=0,001). CD8 eksprese eden $CD3^-CD16^+CD56^+$ NK hücrelerinin sayısı ile sFasL arasında çok kuvvetli negatif korelasyon bulunmuştur (r= -0,869 ve p=0,001). CD8+ ve CD8- NK hücrelerinin sFasL düzeyleri ile korelasyonu Şekil 4-11'de özetlenmiştir.

$CD3^-CD16^+CD56^+CD8^-$ NK hücre oranı ile plazma granzim B (r=0,681 ve p=0,03), IFN-γ (r=0,718 ve p=0,019), IL-10 (r=0,706 ve p=0,023), IL-6 (r=0,706 ve p=0,023) ve perforin (r=0,669 ve p=0,034) düzeyleri kuvvetli pozitif korele bulunmuştur (Şekil 4-12). Buna göre $CD3^-CD16^+CD56^+CD8^-$ NK hücre oranı arttıkça granzim B , IFN-γ, IL-10, IL-6 ve perforin düzeyleri belirgin şekilde artarken $CD3^-CD16^+CD56^+CD8^+$ NK hücre artışı ile sFasL düzeylerinin azaldığı bulunmuştur.



Şekil 4-11:sFasL düzeylerinin $CD8^-$ ve $CD8^+$ NK hücreleri ile korelasyonu



Şekil 4-12: $CD8^-$ NK hücreleri ile IFN-γ ve IL-10 düzeylerinin korelasyonu

Treg hücre oranları ile IL-2 sitokin düzeyleri arasında pozitif kuvvetli korelasyon (r=0,759 ve p=0,029) bulunurken, granulizin ile çok kuvvetli negatif korelasyon saptanmıştır (r= -0,826 ve p=0,011). Treg oranının artışı belirgin şekilde IL-2 düzeyinde artışa yol açarken granulizin düzeyleri belirgin olarak azalmaya yol açmıştır.

Th2 lenfosit oranlarındaki artış ise tam ters şekilde granulizin düzeyleri ile kuvvetli pozitif korelasyon göstermiştir (r=0,775 ve p=0,041). Th2 hücre oranının arttığı olgularda granulizin düzeylerinde belirgin artış saptanmaktadır.

Tablo 4-3 Hasta Grubunda Plazma Sitokin Düzeyleri ile T Lenfosit Alt Gruplarının Oranlarının Korelasyon Analizi

Tablo : Hasta Grubu										
Parametre	Treg		Th1		Th2		Th17		CXCR3CCR6	
	r	p*	r	p*	r	p*	r	p*	r	p*
SFasL	0.036	0.932	0.359	0.429	0.055	0.908	-0.275	0.55	-0.055	0.907
Granulysin	-0.826	**0.011**	0.43	0.335	0.775	**0.041**	-0.6	0.154	0	1
GranzymeA	0.156	0.713	0.056	0.905	-0.414	0.355	0	1	0.164	0.726
GranzymeB	-0.096	0.821	0.112	0.811	-0.18	0.699	-0.109	0.816	-0.109	0.816
IFNγ	0.311	0.453	-0.094	0.842	-0.27	0.558	0.164	0.726	-0.436	0.328
IL-10	0.419	0.301	-0.168	0.718	-0.523	0.229	0.273	0.554	-0.218	0.638
IL-2	0.759	**0.029**	-0.359	0.429	-0.709	0.074	0.495	0.258	0	1
IL-4	-0.06	0.888	0.168	0.718	-0.126	0.788	-0.164	0.726	0.655	0.111
IL-6	0.228	0.588	-0.524	0.227	-0.324	0.478	0.491	0.263	-0.6	0.154
Perforin	-0.323	0.435	0.393	0.383	0.054	0.908	-0.382	0.398	-0.109	0.816
S PD-1	0.06	0.888	-0.262	0.57	-0.432	0.333	0.273	0.554	0.218	0.638
SFas	0.383	0.349	-0.112	0.811	-0.505	0.248	0.218	0.638	-0.109	0.816
TNFα	0.455	0.257	0.15	0.749	-0.432	0.333	0	1	0.818	**0.024**
Not: Spearman's Correlation Test										

4.5.4. Kontrol grubunda sitokin düzeyleri ile lenfosit ve NK hücrelerin korelasyon analizi

Kontrol grubunda periferik kanda düzeyi ölçülen sitokinler ile lenfosit ve NK hücrelerin alt grupları arasında yapılan korelasyon analizine göre anlamlı düzeyde pozitif ya da negatif korelasyon saptanmamıştır. Çalışmamızda IL-17 deteksiyon limitinin altında çıktığı için analiz yapılamamıştır.

5. TARTIŞMA

Over kanseri mortalitesi en yüksek jinekolojik kanser olması sebebiyle son yıllarda pek çok araştırmanın konusu olmuştur. İmmün kontrol noktası reseptör inhibitörlerinin klinik kullanıma girmesinin ve tümör mikroçevresinin öneminin kavranmasının ardından anti-tümöral immün yanıtın mekanizmalarının aydınlatılmasına yönelik ayrıntılı çalışmalar yapılmaya başlanmıştır. Artmış TIL oranının over kanseri dahil birçok farklı tümör alt tipinde daha iyi prognoz ile ilişkili olabileceği gösterilmiştir [180]. Ancak TIL oranının yanı sıra tümörü infiltre eden immün sistem hücre alt gruplarının dağılımı ve fonksiyonlarının da önemi büyüktür. Çalışmamızda over kanserinde periferik kan ve tümör mikroçevresindeki lenfosit alt grupları, eksprese ettikleri immün kontrol noktası reseptör dağılımları, plazma solubil immün kontrol noktası reseptör ve sitokin düzeyleri araştırılmış ve veriler sağlıklı olgularla karşılaştırılmıştır.

$CD4^+$ ve $CD8^+$ T lenfosit infiltrasyonunun tümör mikroçevresinde artmasının over kanseri olgularında daha iyi progresyonsuz sağkalım ve genel sağkalım ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [90]. Çalışmamızda $CD4^+$ Th ve $CD8^+$ Tc hücre oranları over kanseri olguların tümör dokusunda, hasta ve sağlıklı periferik kanda benzer oranlarda bulunmuştur. Th1 ve Th2 arasındaki denge kanser mikroçevresinde önemli bir kavramdır. Hao ve ark. yaptığı bir çalışmada over kanserinde Th1/Th2 dengesinin Th1 yönüne doğru kaydığı gösterilmiştir [181]. Çalışmamızda bunun aksine Th2 hücre oranları tümör dokusunda periferik kan örneklerine göre yüksek saptanmış ve bunu destekler şekilde Th1 hücre oranı ise tümör dokusunda düşük bulunmuştur. Bu bulgular çalışmamızda over kanseri olguların tümör dokusunda Th1/Th2 dengesinin Th2 yönüne kaydığını göstermektedir. YDSOK olgularında Treg ve Th17 düzeylerinin sağkalım ile ilişkisi incelendiğinde Treg düzeylerinin hem tümör dokusunda hem de stromadaki artışının daha iyi sağkalım ile ilişkili olduğu ancak Th17'nin sağkalım üzerine bir etkisi olmadığı bulunmuştur [182]. Projemizde sağkalım analizlerinin over kanserli olgular içerisinde yapılmamış olması sebebi ile yukarıda belirtilen çalışma ile deneysel tasarımımız farklılık göstermektedir. Çalışmamızda ileri evre YDSOK'de tümör dokusunda hasta kanına kıyasla Treg hücre oranı anlamlı derecede düşük bulunmuştur.

Bu durum ileri evre YDSOK olgularında periferik kanda saptanan Treg oranındaki artışın kötü prognoza katkı oluşturabileceğini düşündürmüştür.

CD8 ekspresyonuna göre NK hücrelerinin rolleri ve dağılımı daha önce over kanserinde çalışılmamış olup multipl skleroz hastalarında yapılan bir çalışmada $CD8^+$ NK hücrelerinin $CD4^+$ T lenfositlerinin aktivasyonunu engelleyerek immün yanıtı baskıladığı gösterilmiştir [183]. Bu durum multipl skleroz gibi bir otoimmün hastalıkta olumlu bir yanıt olmakla birlikte tümör immünitesinde tam tersi durum olarak karşımıza çıkmaktadır. Ancak $CD8^+$ NK hücreler ile yapılan preklinik çalışmalar bu hücre grubunun $CD8^+$ T lenfositler gibi sitotoksik özelliklere sahip olduğunu ve perforin/granzim yolağı aracılığı ile hedef hücre apoptozunu indüklediğini ve sitolitik aktiviteyi arttırdığını göstermiştir [109, 184]. Ayrıca kronik bir enfeksiyon olan insan immünyetmezlik virüsünün (HIV) neden olduğu edinsel immünyetmezlik sendromunda $CD8^+$ NK hücrelerinin önemli rol oynadığı ve $CD8^+$ NK hücre oranının azalması durumunda HIV viral yükünün anlamlı şekilde arttığı bulunmuştur. Bu bulgular kanser gibi kronik antijen sunumuna yol açan HIV infeksiyonunda $CD8^+$ NK hücrelerin fonksiyonel olarak $CD8^-$ NK hücrelerden daha aktif olduğunu ortaya koymaktadır [185]. Çalışmamızda $CD8^+$ NK hücre oranı hasta kanında sağlıklı olgulara göre yüksek saptanırken, $CD8^-$ NK hücreleri YDSOK olguların periferik kanında sağlıklı kanına göre düşük saptanmıştır. Bu durum hedef hücre öldürme kapasitesinin yüksek olduğu belirtilen $CD8^+$ NK hücrelerinin artması lehine değerlendirildiğinde over kanserinde anti-tümöral immünitenin fonksiyonel olduğu ancak tümör mikroçevresinde bu etkinin gözlenmediği şeklinde yorumlanabilir. Ancak MS çalışmasındaki bulgulardan yola çıkılacak olursa $CD8^+$ NK hücrelerinin hem anti-tümöral immünitenin baskılanmasında hem de kanser progresyonunun önlenmesinde rol oynayabileceği düşünülmektedir.

İmmün kontrol noktası reseptörlerinin tümör mikroçevresindeki ekspresyonlarının tümör immünitesinde önemli rol oynayabileceği kanıtlandıktan sonra PD-1, CTLA-4, LAG-3, TIM-3 ve TIGIT ekspresyonlarının farklı kanser türlerindeki önemini araştıran çok sayıda çalışma yapılmıştır [186, 187]. Bizim çalışmamızda ise over kanserindeki immün kontrol noktası reseptörlerinin ekspresyonları Th, Tc ve NK hücrelerinde araştırılmıştır. Çalışmamızda over kanserli olgularda TIM-3 ve CTLA-4 ekspresyonu Th, Tc ve NK hücrelerinde sağlıklılara göre yüksek saptanmıştır. Yapılan bir araştırmada over kanserinde TIM-3 ekspresyon artışının kötü prognoz ve T hücre tükenmişliğinin temel mekanizmalarından biri olduğu gösterilmiş, CTLA-4, LAG-3 ve

PD-1 ekspresyonunun ise T hücre tükenmişlik fenotipi ile ilişkisi olmadığı öne sürülmüştür [188]. Wu ve arkadaşlarının yaptığı araştırmada bulgularımıza benzer şekilde Th ve Tc lenfosit alt gruplarında TIM-3 ekspresyonunun over kanseri olgularda sağlıklılardan daha yüksek olduğu ve bunun daha ileri tümör evresi ve daha kısa progresyonsuz sağkalım süresi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [189]. İnhibitör reseptörlerin gen ekspresyon paternlerinin ayrıntılı olarak incelendiği bir çalışmada ise over kanserinde TIM-3 ekspresyonunun tükenmiş fenotipinden sorumlu olmasının yanı sıra kötü prognozla ilişkili olduğu da ortaya konulmuştur [190].

Çalışmamızda Th, Tc ve $CD8^+$ NK hücrelerdeki PD-1 ekspresyonu ise hasta grubunda yüksek saptanmıştır. Over kanserinin araştırıldığı bir başka çalışmada hem tümör dokusu hem de asit sıvısında $CD4^+$ ve $CD8^+$ T lenfosit alt gruplarında eksprese edilen PD-1, TIM-3 ve LAG-3 moleküllerinin aynı hastaların periferik kan düzeylerine göre yüksek olduğu saptanmıştır. Ayrıca PD-1 ve TIM-3'ün birlikte ekspresyonu belirgin olarak tümör infiltre sitotoksik T lenfositlerinde saptanmıştır. Aynı çalışmada PD-1 ekspresyonunun, CTLA-4 ve LAG-3 ekspresyonuna benzer şekilde $CD8^+$ T hücrelerinde tükenmişlikten sorumlu olduğu da gösterilmiştir [179]. Projemizde LAG-3 ekspresyonunda diğer inhibitör reseptörlerden farklı olarak hasta kanı ile sağlıklı olguların periferik kan düzeyleri arasında farklılık saptanmamıştır. Buna karşın tümör dokusundaki Tc, Th ve NK hücrelerinde LAG-3 ekspresyonu hem over kanseri olguların kan örneklerinden hem de sağlıklı olgulardan anlamlı şekilde yüksek saptanmıştır. Otuzüç farklı kanserde immün kontrol noktası reseptör ekspresyonlarının incelendiği bir çalışmada LAG-3 ekspresyonunun over kanserinde kötü prognostik faktör olduğu gösterilmiştir [190]. Farklı kanser türlerinde immün kontrol noktası reseptörlerinin prognoz üzerine etkilerinin farklı olduğu bilinmekle birlikte over kanserinde LAG-3 ve TIM-3'ün kötü prognostik olduğu ve LAG-3'ün bu etkisini sitokin salınımını inhibe ederek ve T hücre aktivasyonunu engelleyerek gerçekleştirdiği gösterilmiştir. Bu da LAG-3'ün over kanseri hücrelerinin immün sistemden kaçışını kolaylaştırdığını ortaya koymaktadır. Bu nedenle LAG-3 inhibisyonunu hedef alan tedavi modaliteleri gelecekte umut vaat eden immunoterapötik ajanlardır [191].

TIGIT ekspresyonu ise Th hücrelerde anlamlı düzeye ulaşmamakla birlikte hem Th hem de Tc lenfositlerinde YDSOK olgularında sağlıklı kontrollere göre yüksek saptanmıştır. Çalışmamızda ise Treg hücre grubunda TIGIT düzeyleri bakılmamıştır. Cehn ve arkadaşları over kanseri modelinde TIGIT ekspresyonunu Treg hücrelerde Th

ve Tc lenfositlerden yüksek saptamıştır. Ayrıca anti-TIGIT tedavilerle oluşturulan TIGIT inhibisyonunun lenfosit tükenmişliğini geri çeviren etkisinin ise Treg aracılı olduğu gösterilmiştir [192]. Bu da yalnızca PD-1 ve CTLA-4'ün değil diğer inhibitör reseptörlerin de tümör immünitesinde oynadıkları kritik rolün bir göstergesi olarak karşımıza çıkmaktadır.

İmmün kontrol noktası reseptör inhibitörlerine karşı diğer kanserlere oranla daha dirençli olan over kanseri ile baş boyun kanseri gibi tümörlerde yapılan bir araştırmada T lenfosit tükenmişliği ile inhibitör immün kontrol noktası reseptör ekspresyonları arasında bir ilişki saptanmıştır. Bu çalışmaya göre over kanserinde kronik tümör antijeni maruziyetini takiben tümör antijenine spesifik $CD8^+$ T lenfositlerinde öncelikle PD-1 ve TIGIT ekspresyonunun olduğu, ardından aynı hücrelerde CTLA-4 ve TIM-3 ekspresyonlarının da arttığı gösterilmiştir. Dört farklı inhibitör immün kontrol noktası reseptörünün aynı hücrede eksprese edilmesi dörtlü ekspresyon paterni olarak isimlendirilmiştir [193]. Çalışmamızda da benzer şekilde TIGIT ve PD-1 ile TIGIT ve CTLA-4'ün koekspresyonunun over kanserinde sağlıklı kontrollere göre yüksek olduğu gösterilmiştir.

İmmün kontrol noktası reseptörlerinin tümör immünolojisindeki öneminin yanı sıra bu reseptörlerin solubil formları da son yıllarda çok sayıda araştırmaya konu olmuştur. Literatürde over kanserindeki sCTLA-4 ve sPD-1 düzeylerinin benign over hastalıklarına kıyasla yüksek olduğu ve bu solubil reseptör düzeylerinin tanısal ve prognostik açıdan önemi olabileceği öne sürülmüştür [194, 195]. Ancak çalışmamızda sPD-1, sCTLA-4, sTIM-3, sTIGIT ve sLAG-3 düzeyleri sağlıklı kontroller ve over kanseri olgularda benzer düzeylerde bulunmuştur. Bulgularımız immün kontrol noktası reseptörlerinin solubil formlarının over kanserinin fonksiyon ve klinik öneminin gösterilmesi için yeterli olmayacağını düşündürmektedir. Solubil reseptör düzeylerinin tanı ve takipteki öneminin yanı sıra fonksiyonlarının keşfedilmesi de oldukça önemlidir. sLAG-3, tümör antijeni spesifik $CD8^+$ T lenfositlerinin aktivasyonunu arttırdığı ve sLAG-3'ün aşı çalışmalarında adjuvan olarak kullanılabileceğini gösteren bir çalışma da literatürde bulunmaktadır [196]. Fucikova ve arkadaşlarının çalışmasında ise RNA sekanslama ve immünhistokimya ile değerlendirilen tümör mikroçevresindeki PD-1 ekspresyonundaki artışın iyi prognoz ile ilişkisi olduğu ve yüksek PD-1 ekspresyonunun IFN-γ salınımındaki artış ile ilişkili olduğu öne sürülmüştür. PD-1 ekspresyonu yüksek olan tümör mikroçevresindeki immün hücrelerin dağılımına bakıldığında ise sitotoksik

T lenfositlerin, NK hücrelerin ve dendritik hücrelerin PD-1 düşük tümör mikroçevresine göre artmış oranda olduğu saptanmıştır [188]. Rådestad ve ark. çalışmasında ise $CD4^+$ Th hücrelerinde PD-1 ekspresyonundaki artışın aynı hücrelerde IFN-γ salınımındaki artıştan sorumlu olduğu bulunmuştur. Ancak bu etkinin $CD8^+$ Tc lenfositlerde görülmediği, aksine $CD8^+$ Tc lenfositlerde PD-1 ekspresyonundaki artışın tükenmiş fenotipe yol açtığı ve bu hücrelerden daha az IFN-γ salınımına yol açtığı gösterilmiştir [179]. Buna karşın over kanserinde $CD8^+$ T lenfositlerinden stimülasyon sonrası salgılanan hücre içi TNF-α ve IFN-γ ekspresyon artışının mekanizması henüz net olarak açıklanamamakla birlikte Sawada ve ark. yaptığı çalışmada Tc hücrelerinde PD-1 ve TIM-3 koekspresyonlarının tükenmişlik fenotipine yol açarak sitotoksik aktiviteyi belirgin biçimde azalttığı ve bununla birlikte $PD\text{-}1^+TIM3^+CD8^+$ T lenfositlerinden TNF-α ve IFN-γ ekspresyonunun yüksek düzeylerde devam ettiği bulunmuştur [197]. Çalışma verilerimizin yorumlanmasında göz önünde bulundurulması gereken bir nokta bizim çalışma dizaynımızda sitokin düzeylerinin hasta ve sağlıklı gruplarının plazmasında ölçülmüş olmasıdır. Bundan dolayı CD3/CD28 boncukları ile stimülasyon sonrası hücre içi sitokin düzeylerinin araştırıldığı çalışmalar ile bulgularımızı karşılaştırmak yanıltıcı sonuçlar verebilecektir. Bizim çalışmamızda da hücre içi sitokinlere benzer şekilde plazma IFN-γ, IL-10, IL-4 ve TNF-α sitokin düzeyleri hasta grubunda sağlıklı bireylere göre istatistiksel olarak yüksek saptanmıştır. Bunun yanı sıra çalışmamızda sitokin düzeylerinin farklı hücre grupları ile korelasyon analizine baktığımızda $CD8^-$ NK hücreleri ile IFN-γ, granzim B, IL-10, IL-6 ve perforin düzeylerinin kuvvetli pozitif korele olduğu saptanmıştır.

Fas/FasL yolağı bilindiği gibi NK hücrelerinin hedef hücrenin öldürülmesi için apoptozun indüklenmesinde önemli bir yolaktır. sFas düzeylerindeki artışın Fas/FasL etkileşimini azalttığı bilinmektedir. Ancak sFasL'nin ise membran bağlı FasL'dan daha az etkin olduğu için direkt olarak inhibitör etki yapamadığı gösterilmiştir. sFasL'nin bağlı formdaki FasL'nin dolaşıma dökülmesi sonucu oluştuğu düşünülürse sFasL düzeylerinin ölçülmesinin indirekt olarak bağlı formdaki FasL düzeylerini yansıtabileceği de öne sürülmektedir [198]. Çalışmamızda $CD8^+$ NK hücre artışı ile plazma sFasL düzeylerinin azaldığı bulunmuştur. Buna karşın CD8 eksprese etmeyen NK hücreleri ile solubil fasL düzeyi arasında çok kuvvetli pozitif korelasyon olduğu saptanmıştır. Literatürde $CD8^+$ ve $CD8^-$ NK hücrelerinin kanserdeki rolleri henüz net

olmamakla birikte çalışmamızda hasta grubunda azalan $CD8^-$ NK hücrelerinin efektör fonksiyonu olduğu varsayılırsa efektör aktivitenin artmış sFasL ile ilişkili olduğunu ve dolaylı olarak hedef hücre apoptozis artışının göstergesi olabileceğini öne sürebiliriz. Ancak bu konuda yeni çalışmalar yapılması gerektiği açıktır. Literatürde sFas düzeylerinin over kanserinin de arasında olduğu jinekolojik kanserlerde artışının kötü prognostik faktör olduğu gösterilmiş olmasına rağmen sFasL ile yapılmış kanser çalışması bulunmamaktadır [199]. Çalışmamızda ise hasta ve sağlıklılar arasında sFas düzeyleri benzer bulunmuştur.

IL-2, $CD4^+$ ve $CD8^+$ T lenfositlerinin farklılaşması, efektör fonksiyonların kazanılması ve Treg hücre farklılaşmasında önemli rollere sahip olan bir sitokindir [200]. Çalışmamızda over kanseri olgularda plazma IL-2 düzeyindeki artış ile $CD4^+$ ve $CD8^+$ T lenfosit alt grup oranları ile korelasyon bulunmazken Treg oranları ile belirgin kuvvetli şekilde korelasyon saptanmıştır. Bu bulgu, Treg'lerin diğer immün sistem hücrelerinden daha fazla sayıda ve daha yüksek afiniteli IL-2 reseptörleri olması nedeniyle IL-2 düzeyindeki küçük değişikliklere daha hızlı ve güçlü yanıt vermesi ile açıklanabilir [201].

Karbonhidrat antijen (CA)125 over kanserinde tanı, tedavi yanıtı ve nüksün değerlendirilmesinde tanısal önemi olan bir yüksek ağırlıklı glikoproteindir ve yapısal olarak Müsin 16 (MUC16) glikoproteininin bir epitopudur [202]. MUC16 ekspresyonu yüksek olan over kanseri hücrelerinde müsin yapısındaki MUC16'nın ILC ve NK hücrelerinin sitotoksik aktivitelerini engellediği bulunmuştur. MUC16 aynı zamanda NK hücrelerinin CD16 ekspresyonunda azalmaya yol açmakta ve NK hücrelerinin ADCC yolu ile bu hedef hücreleri öldürmesine de engel olmaktadır. MUC16 eksprese etmeyen hücrelerin NK hücreleri ile fazla sayıda aktive edici immün sinapslar oluşturduğu ortaya konulmuştur [203-205]. Bu da CA125'in yalnızca bir biyobelirteç olarak değil, tümör immünitesinde henüz net olarak fonksiyonu bilinmeyen kompleks etkileşimlere sahip olduğunu düşündürmektedir. Çalışmamızda bu amaçla hem immün kontrol noktası reseptörler ekspresyon düzeyleri ve CA125 arasındaki korelasyonlar araştırılmıştır. Fanale ve arkadaşları solubil immün kontrol noktası reseptör düzeylerinin CA125'in prognozu belirlemedeki değerini güçlendirebileceklerini öne sürmüş ve çalışmalarında plazma sPD-1 düzeylerinin CA125 ile korele olduğunu ve over kanseri olgularında sağkalımı belirlemede prognostik öneme sahip olabileceğini

göstermişlerdir [206]. Çalışmamızda Fanele ve ark. çalışmasına benzer şekilde $CD8^+$ NK hücrelerinde PD-1 ekspresyonunun CA125 düzeyleri ile pozitif korelasyon gösterdiği saptanmıştır. Bununla birlikte çalışmamızda CA125 ve solubil immün kontrol noktası reseptörleri arasında anlamlı bir korelasyon bulunamamıştır. Projemizde, $CTLA\text{-}4^+CD4^+$ ve $CTLA\text{-}4^+CD8^+$ T hücreleri ve $TIM\text{-}3^+CD8^+$ NK hücrelerinin CA125 düzeyleri ile negatif korele olduğu gösterilmiştir. Buna karşın 2018 yılında Rådestad ve ark. yaptığı çalışmada CA125 düzeyi yüksek olan olgularda $LAG3^+CD4^+$ ve $LAG3^+CD8^+$ T lenfosit oranlarının daha yüksek olduğu, immün kontrol noktası reseptör koekspresyonları ile CA125 ilişkisine bakıldığında ise yalnızca $CD4^+$ T lenfositlerdeki LAG-3, PD-1 ve TIM-3 koekspresyonunun yüksek CA125 düzeyleri ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Ancak $CD4^+$ ve $CD8^+$ T lenfositlerdeki TIM-3 ve CTLA-4'ün tek başına ekspresyonları ile CA125 arasında bir korelasyon olmadığı belirtilmiştir [179].

Sonuç olarak; over kanseri onkolojik gelişmelere karşın halen yüksek mortalite oranları olan bir jinekolojik kanserdir ve son yıllardaki immünoterapi çalışmaları ve yetersiz anti-PD-1 tedavi yanıtları bu yolağın dışında çok sayıda kompleks immünolojik mekanizmanın rol oynadığını düşündürmektedir. Çalışmamızda da bu hipotezi destekler şekilde lenfosit tükenmişlik fenotipinden sorumlu olan TIM-3, LAG-3 ve TIGIT gibi inhibitör reseptörlerin lenfosit alt gruplarında anlamlı artışı saptanmıştır. Ayrıca çalışmamız $CD8^-$ NK hücrelerinin over kanserinde sayıca azalmasının literatürde ilk kez gösterilen bir bulgu olması açısından önem arz etmektedir. Bu konuda literatürde yeterli veri bulunmamaktadır. $CD8^-$ NK hücreleri ile plazma perforin, granzim ve sFasL gibi solubil sitotoksik moleküller ile pozitif korele olması $CD8^-$ NK hücrelerin efektör fonksiyona sahip olabileceğini düşündürmektedir. $CD8^+$ ve $CD8^-$ NK hücrelerinin kanserdeki rolü ve önemi ile ilgili yeni çalışmalar yapılması gerekmektedir. CA125'in bir tümör belirteci olmasının ötesinde anti-tümöral immüniteyi baskılayan özellikleri olabileceğini öne sürmemiz ve lenfosit alt grupları ile inhibitör reseptörlerin CA125 ile ilişkisinin aydınlatılmaya ihtiyacı olan bir konu olduğuna ışık tutmamız gelecekte yapılacak çalışmalara ilham kaynağı olacaktır.

KAYNAKLAR

1. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 2015; **65(2)**: 87-108.
2. Lacey JV, Sherman ME. Ovarian neoplasia. Robboy SL, Mutter GL, Prat J, et al. editors. *Robboy's Pathology of the Female Reproductive Tract, 2nd ed*, Churchill Livingstone Elsevier, Oxford 2009. p.601.
3. Prat J, FIGO Committee on Gynecologic Oncology. Staging Classification for Cancer of the Ovary, Fallopian Tube, and Peritoneum: Abridged Republication of Guidelines From the International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO). *Obstet Gynecol* 2015; **126(1):** 171-174.
4. Lee JS, John EM, McGuire V, Felberg A, Ostrow KL, DiCioccio RA ve ark. Breast and ovarian cancer in relatives of cancer patients, with and without BRCA mutations. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006; **15(2)**: 359-363.
5. Kelderman S, Kvistborg P. Tumor antigens in human cancer control. *Biochim Biophys Acta* 2016; **1865**: 83–89.
6. Wang WJ, Tao Z, Gu W, Sun LH. Variation of blood T lymphocyte subgroups in patients with non-small cell lung cancer. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 2013; **14 (8)**, 4671-4673.
7. Newell EW, Lin W. High-dimensional analysis of human CD8(+) T cell phenotype, function, and antigen specificity. *Curr Top Microbiol Immunol* 2014; **377**: 61–84.
8. Barry M, Bleackley RC. Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nat Rev Immunol* 2002; **2(6)**: 401-409.
9. Fridman WH, Pages F, Sautes-Fridman C, Galon J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer* 2012; **12(4)**: 298-306.
10. Chen C, Chen D, Zhang Y, Chen Z, Zhu W, Zhang B ve ark. Changes of CD4+CD25+FOXP3+ and CD8+CD28− regulatory T cells in non-small cell lung cancer patients undergoing surgery. *Int Immunopharmacol* 2014; **18(2)**: 255–261.

11. Klebanoff CA, Gattinoni L, Restifo NP. CD8+ T-cell memory in tumor immunology and immunotherapy. *Immunol Rev* 2006; **211**: 214-224.

12. Restifo NP, Dudley ME, Rosenberg SA. Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response. *Nat Rev Immunol* 2012; **12(4)**: 269-281.

13. Hersperger AR, Makedonas G, Betts MR. Flow cytometric detection of perforin upregulation in human CD8 T cells. *Cytometry A* 2008; **73(11)**: 1050-1057.

14. Russell JH, Ley TJ. Lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol* 2002; **20**: 323-370.

15. Shiver JW, Henkart PA. A noncytotoxic mast cell tumor line exhibits potent IgE-dependent cytotoxicity after transfection with the cytolysin/perforin gene. *Cell* 1991; **64(6)**: 1175-1181.

16. Hadrup S, Donia M, Thor Straten P. Effector CD4 and CD8 T cells and their role in the tumor microenvironment. *Cancer Microenviron* 2013; **6(2)**: 123-133.

17. Zhang L, Conejo-Garcia JR, Katsaros D, Gimotty PA, Massobrio M, Regnani G ve ark. Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med* 2003; **348(3)**: 203-213.

18. Amin MB, Greene FL, Edge SB, Compton CC, Gershenwald JE, Brookland RK ve ark. The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more "personalized" approach to cancer staging. *CA Cancer J Clin* 2017; **67(2):** 93-99.

19. Bristow RE, Chang J, Ziogas A, Anton-Culver H. Adherence to treatment guidelines for ovarian cancer as a measure of quality care. *Obstet Gynecol* 2013; **121(6):** 1226-1234.

20. van Meurs HS, Tajik P, Hof MH, Vergote I, Kenter GG, Mol BW ve ark. Which patients benefit most from primary surgery or neoadjuvant chemotherapy in stage IIIC or IV ovarian cancer? An exploratory analysis of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer 55971 randomised trial. *Eur J Cancer* 2013; **49(15):** 3191-3201.

21. Onda T, Satoh T, Saito T, Kasamatsu T, Nakanishi T, Nakamura K ve ark. Comparison of treatment invasiveness between upfront debulking surgery versus

interval debulking surgery following neoadjuvant chemotherapy for stage III/IV ovarian, tubal, and peritoneal cancers in a phase III randomised trial: Japan Clinical Oncology Group Study JCOG0602. *Eur J Cancer* 2016; **64:** 22-31.

22. Vergote I, Tropé CG, Amant F, Kristensen GB, Ehlen T, Johnson N ve ark. Neoadjuvant chemotherapy or primary surgery in stage IIIC or IV ovarian cancer. *N Engl J Med* 2010; **363(10):** 943-953.

23. Porter R, Matulonis UA. Immunotherapy for ovarian cancer. *Clin Adv Hematol Oncol* 2022; **20(4):** 240-253.

24. Winter-Roach BA, Kitchener HC, Dickinson HO. Adjuvant (post-surgery) chemotherapy for early stage epithelial ovarian cancer. *Cochrane Database Syst Rev* 2009; **(3):** CD004706.

25. Oza AM, Cook AD, Pfisterer J, Embleton A, Ledermann JA, Pujade-Lauraine E ve ark. Standard chemotherapy with or without bevacizumab for women with newly diagnosed ovarian cancer (ICON7): overall survival results of a phase 3 randomised trial. *Lancet Oncol* 2015; **16(8):** 928-936.

26. Burger RA, Brady MF, Bookman MA, Fleming GF, Monk BJ, Huang H ve ark. Incorporation of bevacizumab in the primary treatment of ovarian cancer. *N Engl J Med* 2011; **365(26):** 2473-2483.

27. Landrum LM, Java J, Mathews CA, Lanneau GS Jr, Copeland LJ, Armstrong DK ve ark. Prognostic factors for stage III epithelial ovarian cancer treated with intraperitoneal chemotherapy: a Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol* 2013; **130(1):** 12-18.

28. Fagotti A, Ferrandina G, Vizzielli G, Fanfani F, Gallotta V, Chiantera V ve ark. Phase III randomised clinical trial comparing primary surgery versus neoadjuvant chemotherapy in advanced epithelial ovarian cancer with high tumour load (SCORPION trial): Final analysis of peri-operative outcome. *Eur J Cancer* 2016; **59:** 22-33.

29. Elit L, Hirte H. Palliative systemic therapy for women with recurrent epithelial ovarian cancer: current options. *Onco Targets Ther* 2013; **6:** 107-118.

30. Pujade-Lauraine E, Ledermann JA, Selle F, Gebski V, Penson RT, Oza AM ve ark. Olaparib tablets as maintenance therapy in patients with platinum-sensitive, relapsed ovarian cancer and a BRCA1/2 mutation (SOLO2/ENGOT-Ov21): a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial [published correction appears in Lancet Oncol. 2017 Sep; **18(9):** e510]. *Lancet Oncol* 2017; **18(9):** 1274-1284.

31. van de Vaart PJ, van der Vange N, Zoetmulder FA, van Goethem AR, van Tellingen O, ten Bokkel Huinink WW ve ark. Intraperitoneal cisplatin with regional hyperthermia in advanced ovarian cancer: pharmacokinetics and cisplatin-DNA adduct formation in patients and ovarian cancer cell lines. *Eur J Cancer* 1998; **34(1):** 148-154.

32. Spiliotis J, Vaxevanidou A, Sergouniotis F, Lambropoulou E, Datsis A, Christopoulou A. The role of cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy in the management of recurrent advanced ovarian cancer: a prospective study. *J BUON* 2011; **16(1):** 74-79.

33. van Driel WJ, Koole SN, Sikorska K, Schagen van Leeuwen JH, Schreuder HWR ve ark. Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy in Ovarian Cancer. *N Engl J Med* 2018; **378(3):** 230-240.

34. Ansaloni L, Agnoletti V, Amadori A, Catena F, Cavaliere D, Coccolini F ve ark Evaluation of extensive cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy (HIPEC) in patients with advanced epithelial ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer*. 2012; **22(5):** 778-785.

35. Sadeghi Rad H, Monkman J, Warkiani ME, Ladwa R, O'Byrne K, Rezaei N ve ark. Understanding the tumor microenvironment for effective immunotherapy. *Med Res Rev* 2021; **41(3):** 1474-1498.

36. Nguyen LT, Ohashi PS. Clinical blockade of PD1 and LAG3--potential mechanisms of action. *Nat Rev Immunol* 2015; **15(1):** 45-56.

37. Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol* 2008; **26:** 677-704.

38. Okazaki T, Honjo T. The PD-1-PD-L pathway in immunological tolerance. *Trends Immunol* 2006; **27(4):** 195-201.

39. Horne-Debets JM, Faleiro R, Karunarathne DS, Liu XQ, Lineburg KE, Poh CM ve ark. PD-1 dependent exhaustion of CD8+ T cells drives chronic malaria. *Cell Rep* 2013; **5(5):** 1204-1213.

40. Day CL, Kaufmann DE, Kiepiela P, Brown JA, Moodley ES, Reddy S ve ark. PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature* 2006; **443(7109):** 350-354.

41. Festino L, Botti G, Lorigan P, Masucci GV, Hipp JD, Horak CE ve ark. Cancer Treatment with Anti-PD-1/PD-L1 Agents: Is PD-L1 Expression a Biomarker for Patient Selection?. *Drugs* 2016; **76(9):** 925-945.

42. Sznol M, Chen L. Antagonist antibodies to PD-1 and B7-H1 (PD-L1) in the treatment of advanced human cancer. *Clin Cancer Res* 2013; **19(5):** 1021-1034.

43. Ngiow SF, Young A, Jacquelot N, Yamazaki T, Enot D, Zitvogel L ve ark. A Threshold Level of Intratumor CD8+ T-cell PD1 Expression Dictates Therapeutic Response to Anti-PD1. *Cancer Res* 2015; **75(18):** 3800-3811.

44. Stamper CC, Zhang Y, Tobin JF, Erbe DV, Ikemizu S, Davis SJ ve ark. Crystal structure of the B7-1/CTLA-4 complex that inhibits human immune responses [published correction appears in Nature 2001 May 31; **411(6837):** 617]. *Nature* 2001; **410(6828):** 608-611.

45. Walker LS, Sansom DM. The emerging role of CTLA4 as a cell-extrinsic regulator of T cell responses. *Nat Rev Immunol* 2011; **11(12):** 852-863.

46. Yokosuka T, Kobayashi W, Takamatsu M, Sakata-Sogawa K, Zeng H, Hashimoto-Tane A ve ark. Spatiotemporal basis of CTLA-4 costimulatory molecule-mediated negative regulation of T cell activation. *Immunity* 2010; **33(3):** 326-339.

47. Su KY, Watanabe A, Yeh CH, Kelsoe G, Kuraoka M. Efficient Culture of Human Naive and Memory B Cells for Use as APCs. *J Immunol* 2016; **197(10):** 4163-4176.

48. Sharma P, Allison JP. The future of immune checkpoint therapy. *Science* 2015; **348(6230):** 56-61.

49. Monney L, Sabatos CA, Gaglia JL, Ryu A, Waldner H, Chernova T ve ark. Th1-specific cell surface protein Tim-3 regulates macrophage activation and severity of an autoimmune disease. *Nature* 2002; **415(6871):** 536-541.

50. Gautron AS, Dominguez-Villar M, de Marcken M, Hafler DA. Enhanced suppressor function of TIM-3+ FoxP3+ regulatory T cells. *Eur J Immunol* 2014; **44(9):** 2703-2711.

51. da Silva IP, Gallois A, Jimenez-Baranda S, Khan S, Anderson AC, Kuchroo VK ve ark. Reversal of NK-cell exhaustion in advanced melanoma by Tim-3 blockade. *Cancer Immunol Res* 2014; **2(5):** 410-422.

52. Sakuishi K, Apetoh L, Sullivan JM, Blazar BR, Kuchroo VK, Anderson AC. Targeting Tim-3 and PD-1 pathways to reverse T cell exhaustion and restore anti-tumor immunity [published correction appears in J Exp Med 2011 Jun 6; **208(6):** 1331]. *J Exp Med* 2010; **207(10):** 2187-2194.

53. Kraus AK, Chen J, Edenhofer I, Ravens I, Gaspert A, Cippà PE ve ark. The role of T cell costimulation via DNAM-1 in kidney transplantation. *PLoS One* 2016; **11.2:** e0147951.

54. Yu X, Harden K, Gonzalez LC, Francesco M, Chiang E, Irving B ve ark. The surface protein TIGIT suppresses T cell activation by promoting the generation of mature immunoregulatory dendritic cells. *Nat Immunol* 2009; **10(1):** 48-57.

55. Boles KS, Vermi W, Facchetti F, Fuchs A, Wilson TJ, Diacovo TG ve ark. A novel molecular interaction for the adhesion of follicular CD4 T cells to follicular DC. *Eur J Immunol* 2009; **39(3):** 695-703.

56. Stanietsky N, Simic H, Arapovic J, Toporik A, Levy O, Novik A ve ark. The interaction of TIGIT with PVR and PVRL2 inhibits human NK cell cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; **106(42):** 17858-17863.

57. Lozano E, Dominguez-Villar M, Kuchroo V, Hafler DA. The TIGIT/CD226 axis regulates human T cell function. *J Immunol* 2012; **188(8):** 3869-3875.

58. Inozume T, Yaguchi T, Furuta J, Harada K, Kawakami Y, Shimada S. Melanoma Cells Control Antimelanoma CTL Responses via Interaction between TIGIT and CD155 in the Effector Phase. *J Invest Dermatol* 2016; **136(1):** 255-263.

59. Joller N, Lozano E, Burkett PR, Patel B, Xiao S, Zhu C ve ark. Treg cells expressing the coinhibitory molecule TIGIT selectively inhibit proinflammatory Th1 and Th17 cell responses. *Immunity* 2014; **40(4):** 569-581.

60. Coyne CB, Kim KS, Bergelson JM. Poliovirus entry into human brain microvascular cells requires receptor-induced activation of SHP-2. *EMBO J* 2007; **26(17):** 4016-4028.

61. Wang F, Hou H, Wu S, Tang Q, Liu W, Huang M ve ark. TIGIT expression levels on human NK cells correlate with functional heterogeneity among healthy individuals. *Eur J Immunol* 2015; **45(10):** 2886-2897.

62. Triebel F, Jitsukawa S, Baixeras E, Roman-Roman S, Genevee C, Viegas-Pequignot E ve ark. LAG-3, a novel lymphocyte activation gene closely related to CD4. *J Exp Med* 1990; **171(5):** 1393-1405.

63. Workman CJ, Rice DS, Dugger KJ, Kurschner C, Vignali DA. Phenotypic analysis of the murine CD4-related glycoprotein, CD223 (LAG-3). *Eur J Immunol* 2002; **32(8):** 2255-2263.

64. Baixeras E, Huard B, Miossec C, Jitsukawa S, Martin M, Hercend T ve ark. Characterization of the lymphocyte activation gene 3-encoded protein. A new ligand for human leukocyte antigen class II antigens. *J Exp Med* 1992; **176(2):** 327-337.

65. Wang J, Sanmamed MF, Datar I, Su TT, Ji L, Sun J ve ark. Fibrinogen-like Protein 1 Is a Major Immune Inhibitory Ligand of LAG-3. *Cell* 2019; **176(1-2):** 334-347.e12.

66. Xu F, Liu J, Liu D, Liu B, Wang M, Hu Z ve ark. LSECtin expressed on melanoma cells promotes tumor progression by inhibiting antitumor T-cell responses. *Cancer Res* 2014; **74(13):** 3418-3428.

67. Kouo T, Huang L, Pucsek AB, Cao M, Solt S, Armstrong T ve ark. Galectin-3 Shapes Antitumor Immune Responses by Suppressing CD8+ T Cells via LAG-3 and Inhibiting Expansion of Plasmacytoid Dendritic Cells. *Cancer Immunol Res* 2015; **3(4):** 412-423.

68. Baumeister SH, Freeman GJ, Dranoff G, Sharpe AH. Coinhibitory Pathways in Immunotherapy for Cancer. *Annu Rev Immunol* 2016; **34:** 539-573.

69. Anderson AC, Joller N, Kuchroo VK. Lag-3, Tim-3, and TIGIT: Co-inhibitory Receptors with Specialized Functions in Immune Regulation. *Immunity* 2016; **44(5):** 989-1004.

70. Woo SR, Turnis ME, Goldberg MV, Bankoti J, Selby M, Nirschl CJ ve ark. Immune inhibitory molecules LAG-3 and PD-1 synergistically regulate T-cell function to promote tumoral immune escape. *Cancer Res* 2012; **72(4):** 917-927.

71. Goding SR, Wilson KA, Xie Y, Harris KM, Baxi A, Akpinarli A ve ark. Restoring immune function of tumor-specific CD4+ T cells during recurrence of melanoma. *J Immunol* 2013; **190(9):** 4899-4909.

72. Chakrabarti R, Kapse B, Mukherjee G. Soluble immune checkpoint molecules: Serum markers for cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Rep (Hoboken)* 2019; **2(4):** e1160.

73. Oaks MK, Hallett KM, Penwell RT, Stauber EC, Warren SJ, Tector AJ. A native soluble form of CTLA-4. *Cell Immunol* 2000; **201(2):** 144-153.

74. Ward FJ, Dahal LN, Wijesekera SK, Abdul-Jawad SK, Kaewarpai T, Xu H ve ark. The soluble isoform of CTLA-4 as a regulator of T-cell responses. *Eur J Immunol* 2013; **43(5):** 1274-1285.

75. Omura Y, Toiyama Y, Okugawa Y, Yin C, Shigemori T, Kusunoki K ve ark. Prognostic impacts of tumoral expression and serum levels of PD-L1 and CTLA-4 in colorectal cancer patients. *Cancer Immunol Immunother* 2020; **69(12):** 2533-2546.

76. Frigola X, Inman BA, Lohse CM, Krco CJ, Cheville JC, Thompson RH ve ark. Identification of a soluble form of B7-H1 that retains immunosuppressive activity and is associated with aggressive renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2011; **17(7):** 1915-1923.

77. Nielsen C, Ohm-Laursen L, Barington T, Husby S, Lillevang ST. Alternative splice variants of the human PD-1 gene. *Cell Immunol* 2005; **235(2):** 109-116.

78. Greisen SR, Rasmussen TK, Stengaard-Pedersen K, Hetland ML, Hørslev-Petersen K, Hvid M ve ark. Increased soluble programmed death-1 (sPD-1) is associated with disease activity and radiographic progression in early rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol* 2014; **43(2):** 101-108.

79. Zhou J, Mahoney KM, Giobbie-Hurder A, Zhao F, Lee S, Liao X ve ark. Soluble PD-L1 as a Biomarker in Malignant Melanoma Treated with Checkpoint Blockade. *Cancer Immunol Res* 2017; **5(6):** 480-492.

80. Świderska J, Kozłowski M, Nowak K, Rychlicka M, Branecka-Woźniak D, Kwiatkowski S ve ark. Clinical Relevance of Soluble Forms of Immune Checkpoint Molecules sPD-1, sPD-L1, and sCTLA-4 in the Diagnosis and Prognosis of Ovarian Cancer. *Diagnostics (Basel)* 2022; **12(1):** 189. Published 2022 Jan 13.

81. Möller-Hackbarth K, Dewitz C, Schweigert O, Trad A, Garbers C, Rose-John S ve ark. A disintegrin and metalloprotease (ADAM) 10 and ADAM17 are major sheddases of T cell immunoglobulin and mucin domain 3 (Tim-3). *J Biol Chem* 2013; **288(48):** 34529-34544.

82. Avery L, Filderman J, Szymczak-Workman AL, Kane LP. Tim-3 co-stimulation promotes short-lived effector T cells, restricts memory precursors, and is dispensable for T cell exhaustion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2018; **115(10):** 2455-2460.

83. Geng H, Zhang GM, Li D, Zhang H, Yuan Y, Zhu HG ve ark. Soluble form of T cell Ig mucin 3 is an inhibitory molecule in T cell-mediated immune response. *J Immunol* 2006; **176(3):** 1411-1420.

84. Chen L, Hong J, Hu R, Yu X, Chen X, Zheng S ve ark. Clinical Value of Combined Detection of Serum sTim-3 and Pepsinogen for Gastric Cancer Diagnosis. *Cancer Manag Res* 2021; **13:** 7759-7769. Published 2021 Oct 9.

85. Li N, Wang Y, Forbes K, Vignali KM, Heale BS, Saftig P ve ark. Metalloproteases regulate T-cell proliferation and effector function via LAG-3. *EMBO J* 2007; **26(2):** 494-504.

86. Li N, Workman CJ, Martin SM, Vignali DA. Biochemical analysis of the regulatory T cell protein lymphocyte activation gene-3 (LAG-3; CD223). *J Immunol* 2004; **173(11):** 6806-6812.

87. Workman CJ, Wang Y, El Kasmi KC, Pardoll DM, Murray PJ, Drake CG ve ark. LAG-3 regulates plasmacytoid dendritic cell homeostasis. *J Immunol* 2009; **182(4):** 1885-1891.

88. He Y, Cao J, Zhao C, Li X, Zhou C, Hirsch FR. TIM-3, a promising target for cancer immunotherapy. *Onco Targets Ther* 2018; **11:** 7005-7009. Published 2018 Oct 16.

89. Triebel F, Hacene K, Pichon MF. A soluble lymphocyte activation gene-3 (sLAG-3) protein as a prognostic factor in human breast cancer expressing estrogen or progesterone receptors. *Cancer Lett* 2006; **235(1):** 147-153.

90. Hao J, Yu H, Zhang T, An R, Xue Y. Prognostic impact of tumor-infiltrating lymphocytes in high grade serous ovarian cancer: a systematic review and meta-analysis. *Ther Adv Med Oncol* 2020; **12:** 1758835920967241. Published 2020 Oct 31.

91. Vivier E, Artis D, Colonna M, Diefenbach A, Di Santo JP, Eberl G ve ark. Innate Lymphoid Cells: 10 Years On. *Cell* 2018; **174(5):** 1054-1066.

92. Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S. Functions of natural killer cells. *Nat Immunol* 2008; **9(5):** 503-510.

93. Freud AG, Caligiuri MA. Human natural killer cell development. *Immunol Rev* 2006; **214:** 56-72.

94. Lanier LL. Natural killer cell receptor signaling. *Curr Opin Immunol* 2003; **15(3):** 308-314.

95. Di Santo JP. Natural killer cell developmental pathways: a question of balance. *Annu Rev Immunol* 2006; **24:** 257-286.

96. Amand M, Iserentant G, Poli A, Sleiman M, Fievez V, Sanchez IP ve ark. Human $CD56^{dim}CD16^{dim}$ Cells As an Individualized Natural Killer Cell Subset. *Front Immunol* 2017; **8:** 699. Published 2017 Jun 19.

97. Esen F, Deniz G, Aktas EC. PD-1, CTLA-4, LAG-3, and TIGIT: The roles of immune checkpoint receptors on the regulation of human NK cell phenotype and functions. *Immunol Lett* 2021; 240: 15-23.

98. Quatrini L, Della Chiesa M, Sivori S, Mingari MC, Pende D, Moretta L. Human NK cells, their receptors and function. *Eur J Immunol* 2021; **51(7):** 1566-1579.

99. Bauer S, Groh V, Wu J, Steinle A, Phillips JH, Lanier LL ve ark. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. Science 1999 Jul 30; **285(5428):** 727-9.

100. Moretta A, Bottino C, Vitale M, Pende D, Cantoni C, Mingari MC ve ark. Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytolysis. *Annu Rev Immunol* 2001; **19:** 197-223.

101. Lanier LL. NKG2D Receptor and Its Ligands in Host Defense. *Cancer Immunol Res* 2015; **3(6):** 575-582.

102. Moretta A, Vitale M, Bottino C, Orengo AM, Morelli L, Augugliaro R ve ark. P58 molecules as putative receptors for major histocompatibility complex (MHC) class I molecules in human natural killer (NK) cells. Anti-p58 antibodies reconstitute lysis of MHC class I-protected cells in NK clones displaying different specificities. *J Exp Med* 1993; **178(2):** 597-604.

103. Parham P. MHC class I molecules and KIRs in human history, health and survival. *Nat Rev Immunol* 2005; **5(3):** 201-214.

104. Ljunggren HG, Kärre K. In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today* 1990; **11(7):** 237-244.

105. Borrego F, Masilamani M, Kabat J, Sanni TB, Coligan JE. The cell biology of the human natural killer cell CD94/NKG2A inhibitory receptor. *Mol Immunol* 2005; **42(4):** 485-488.

106. Braud VM, Allan DS, O'Callaghan CA, Söderström K, D'Andrea A, Ogg GS ve ark. HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature* 1998; **391(6669):** 795-799.

107. Mamessier E, Sylvain A, Thibult ML, Houvenaeghel G, Jacquemier J, Castellano R ve ark. Human breast cancer cells enhance self tolerance by promoting evasion from NK cell antitumor immunity. *J Clin Invest* 2011; **121(9):** 3609-3622.

108. Cawthon AG, Alexander-Miller MA. Optimal colocalization of TCR and CD8 as a novel mechanism for the control of functional avidity. *J Immunol* 2002; **169(7):** 3492-3498.

109. Addison EG, North J, Bakhsh I, Marden C, Haq S, Al-Sarraj S ve ark. Ligation of CD8alpha on human natural killer cells prevents activation-induced apoptosis and enhances cytolytic activity. *Immunology* 2005; **116(3):** 354-361.

110. Dogra P, Rancan C, Ma W, Toth M, Senda T, Carpenter DJ ve ark. Tissue Determinants of Human NK Cell Development, Function, and Residence. *Cell* 2020; **180(4):** 749-763.e13.

111. Seillet C, Brossay L, Vivier E. Natural killers or ILC1s? That is the question. *Curr Opin Immunol* 2021; **68:** 48-53.

112. Vacca P, Chiossone L, Mingari MC, Moretta L. Heterogeneity of NK Cells and Other Innate Lymphoid Cells in Human and Murine Decidua. *Front Immunol* 2019; **10:** 170. Published 2019 Feb 8.

113. Vivier E, Raulet DH, Moretta A, Caligiuri MA, Zitvogel L, Lanier LL ve ark. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science* 2011; **331(6013):** 44-49.

114. Crinier A, Narni-Mancinelli E, Ugolini S, Vivier E. SnapShot: Natural Killer Cells. *Cell* 2020; **180(6):** 1280-1280.e1.

115. Bi J, Tian Z. NK Cell Exhaustion. *Front Immunol* 2017; **8:** 760. Published 2017 Jun 28.

116. Long EO, Kim HS, Liu D, Peterson ME, Rajagopalan S. Controlling natural killer cell responses: integration of signals for activation and inhibition. *Annu Rev Immunol* 2013; **31:** 227-258.

117. Pesce S, Greppi M, Tabellini G, Rampinelli F, Parolini S, Olive D ve ark. Identification of a subset of human natural killer cells expressing high levels

of programmed death 1: A phenotypic and functional characterization. *J Allergy Clin Immunol* 2017; **139(1):** 335-346.e3.

118. Imai K, Matsuyama S, Miyake S, Suga K, Nakachi K. Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence: an 11-year follow-up study of a general population. *Lancet* 2000; **356(9244):** 1795-1799.

119. Zhang Q, Bi J, Zheng X, Chen Y, Wang H, Wu W ve ark. Blockade of the checkpoint receptor TIGIT prevents NK cell exhaustion and elicits potent anti-tumor immunity. *Nat Immunol* 2018; **19(7):** 723-732.

120. Barry KC, Hsu J, Broz ML, Cueto FJ, Binnewies M, Combes AJ ve ark. A natural killer-dendritic cell axis defines checkpoint therapy-responsive tumor microenvironments. *Nat Med* 2018; **24(8):** 1178-1191.

121. Berrien-Elliott MM, Cashen AF, Cubitt CC, Neal CC, Wong P, Wagner JA ve ark. Multidimensional Analyses of Donor Memory-Like NK Cells Reveal New Associations with Response after Adoptive Immunotherapy for Leukemia. *Cancer Discov* 2020; **10(12):** 1854-1871.

122. Romee R, Rosario M, Berrien-Elliott MM, Wagner JA, Jewell BA, Schappe T ve ark. Cytokine-induced memory-like natural killer cells exhibit enhanced responses against myeloid leukemia. *Sci Transl Med* 2016; **8(357):** 357ra123.

123. Burren OS, Rubio García A, Javierre BM, Rainbow DB, Cairns J, Cooper NJ ve ark. Chromosome contacts in activated T cells identify autoimmune disease candidate genes. *Genome Biol* 2017; **18(1):** 165. Published 2017 Sep 4.

124. Zhu J, Paul WE. CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood* 2008; **112(5):** 1557-1569.

125. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM ve ark. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a

lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* 2005; **6(11):** 1123-1132.

126. Lespagnard L, Gancberg D, Rouas G, Leclercq G, de Saint-Aubain Somerhausen N, Di Leo A, Piccart M ve ark. Tumor-infiltrating dendritic cells in adenocarcinomas of the breast: a study of 143 neoplasms with a correlation to usual prognostic factors and to clinical outcome. *Int J Cancer* 1999; **84(3):** 309-314.

127. Malyshkina A, Littwitz-Salomon E, Sutter K, Zelinskyy G, Windmann S, Schimmer S ve ark. Fas Ligand-mediated cytotoxicity of CD4+ T cells during chronic retrovirus infection. *Sci Rep* 2017; **7(1):** 7785. Published 2017 Aug 10.

128. Djenidi F, Adam J, Goubar A, Durgeau A, Meurice G, de Montpréville V ve ark. CD8+CD103+ tumor-infiltrating lymphocytes are tumor-specific tissue-resident memory T cells and a prognostic factor for survival in lung cancer patients. *J Immunol* 2015; **194(7):** 3475-3486.

129. Kmiecik J, Poli A, Brons NH, Waha A, Eide GE, Enger PØ ve ark. Elevated CD3+ and CD8+ tumor-infiltrating immune cells correlate with prolonged survival in glioblastoma patients despite integrated immunosuppressive mechanisms in the tumor microenvironment and at the systemic level. *J Neuroimmunol* 2013; **264(1-2):** 71-83.

130. Wang M, Yin B, Wang HY, Wang RF. Current advances in T-cell-based cancer immunotherapy. *Immunotherapy* 2014; **6(12):** 1265-1278.

131. Kaluza KM, Thompson JM, Kottke TJ, Flynn Gilmer HC, Knutson DL, Vile RG. Adoptive T cell therapy promotes the emergence of genomically altered tumor escape variants. *Int J Cancer* 2012; **131(4):** 844-854.

132. Pipkin ME, Sacks JA, Cruz-Guilloty F, Lichtenheld MG, Bevan MJ, Rao A. Interleukin-2 and inflammation induce distinct transcriptional programs that promote the differentiation of effector cytolytic T cells. *Immunity* 2010; **32(1):** 79-90.

133. Wherry EJ, Ahmed R. Memory CD8 T-cell differentiation during viral infection. *J Virol* 2004; **78(11):** 5535-5545.

134. Wang LX, Kjaergaard J, Cohen PA, Shu S, Plautz GE. Memory T cells originate from adoptively transferred effectors and reconstituting host cells after sequential lymphodepletion and adoptive immunotherapy. *J Immunol* 2004; **172(6):** 3462-3468.

135. Wherry EJ. T cell exhaustion. *Nat Immunol* 2011; **12(6):** 492-499.

136. Wherry EJ, Blattman JN, Murali-Krishna K, van der Most R, Ahmed R. Viral persistence alters CD8 T-cell immunodominance and tissue distribution and results in distinct stages of functional impairment. *J Virol* 2003; **77(8):** 4911-4927.

137. Fuertes Marraco SA, Neubert NJ, Verdeil G, Speiser DE. Inhibitory Receptors Beyond T Cell Exhaustion. *Front Immunol* 2015; **6:** 310. Published 2015 Jun 26.

138. Duraiswamy J, Kaluza KM, Freeman GJ, Coukos G. Dual blockade of PD-1 and CTLA-4 combined with tumor vaccine effectively restores T-cell rejection function in tumors. *Cancer Res* 2013; **73(12):** 3591-3603.

139. Houghton AN, Guevara-Patiño JA. Immune recognition of self in immunity against cancer. *J Clin Invest* 2004; **114(4):** 468-471.

140. Staveley-O'Carroll K, Sotomayor E, Montgomery J, Borrello I, Hwang L, Fein S ve ark. Induction of antigen-specific T cell anergy: An early event in the course of tumor progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; **95(3):** 1178-1183.

141. Effros RB, Dagarag M, Spaulding C, Man J. The role of CD8+ T-cell replicative senescence in human aging. *Immunol Rev* 2005; **205:** 147-157.

142. Filaci G, Fenoglio D, Fravega M, Ansaldo G, Borgonovo G, Traverso P ve ark. CD8+ CD28- T regulatory lymphocytes inhibiting T cell proliferative

and cytotoxic functions infiltrate human cancers. *J Immunol* 2007; **179(7):** 4323-4334.

143. Dranoff G. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2004; **4(1):** 11-22.

144. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; **100(1):** 57-70.

145. Liotta LA, Kohn EC. The microenvironment of the tumour-host interface. *Nature* 2001; **411(6835):** 375-379.

146. Interferon alfa versus chemotherapy for chronic myeloid leukemia: a meta-analysis of seven randomized trials: Chronic Myeloid Leukemia Trialists' Collaborative Group. *J Natl Cancer Inst* 1997; **89(21):** 1616-1620.

147. Fyfe G, Fisher RI, Rosenberg SA, Sznol M, Parkinson DR, Louie AC. Results of treatment of 255 patients with metastatic renal cell carcinoma who received high-dose recombinant interleukin-2 therapy. *J Clin Oncol* 1995; **13(3):** 688-696.

148. Rosenberg SA, Lotze MT, Yang JC, Topalian SL, Chang AE, Schwartzentruber DJ ve ark. Prospective randomized trial of high-dose interleukin-2 alone or in conjunction with lymphokine-activated killer cells for the treatment of patients with advanced cancer [published correction appears in J Natl Cancer Inst 1993 Jul 7; **85(13):** 1091]. *J Natl Cancer Inst* 1993; **85(8):** 622-632.

149. Furtado GC, Curotto de Lafaille MA, Kutchukhidze N, Lafaille JJ. Interleukin 2 signaling is required for CD4(+) regulatory T cell function. *J Exp Med* 2002; **196(6):** 851-857.

150. Lighvani AA, Frucht DM, Jankovic D, Yamane H, Aliberti J, Hissong BD ve ark. T-bet is rapidly induced by interferon-gamma in lymphoid and myeloid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; **98(26):** 15137-15142.

151. Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JC. Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol* 1997; **15:** 749-795.

152. Groettrup M, Khan S, Schwarz K, Schmidtke G. Interferon-gamma inducible exchanges of 20S proteasome active site subunits: why?. *Biochimie* 2001; **83(3-4):** 367-372.

153. Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ ve ark. IFNgamma and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 2001; **410(6832):** 1107-1111.

154. Kaplan DH, Shankaran V, Dighe AS, Stockert E, Aguet M, Old LJ ve ark. Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; **95(13):** 7556-7561.

155. Floros T, Tarhini AA. Anticancer Cytokines: Biology and Clinical Effects of Interferon-α2, Interleukin (IL)-2, IL-15, IL-21, and IL-12. *Semin Oncol* 2015; **42(4):** 539-548.

156. Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1975; **72(9):** 3666-3670.

157. Sansone P, Storci G, Tavolari S, Guarnieri T, Giovannini C, Taffurelli M ve ark. IL-6 triggers malignant features in mammospheres from human ductal breast carcinoma and normal mammary gland. *J Clin Invest* 2007; **117(12):** 3988-4002.

158. Gao SP, Mark KG, Leslie K, Pao W, Motoi N, Gerald WL ve ark. Mutations in the EGFR kinase domain mediate STAT3 activation via IL-6 production in human lung adenocarcinomas. *J Clin Invest* 2007; **117(12):** 3846-3856.

159. Stanic B, van de Veen W, Wirz OF, Rückert B, Morita H, Söllner S ve ark. IL-10-overexpressing B cells regulate innate and adaptive immune responses. *J Allergy Clin Immunol* 2015; **135(3):** 771-80.e8.

160. Mirlekar B. Tumor promoting roles of IL-10, TGF-β, IL-4, and IL-35: Its implications in cancer immunotherapy. *SAGE Open Med* 2022; **10:** 20503121211069012. Published 2022 Jan 25.

161. Santiago L, Castro M, Sanz-Pamplona R, Garzón M, Ramirez-Labrada A, Tapia E ve ark. Extracellular Granzyme A Promotes Colorectal Cancer Development by Enhancing Gut Inflammation. *Cell Rep* 2020; **32(1):** 107847.

162. Zhou Z, He H, Wang K, Shi X, Wang Y, Su Y ve ark. Granzyme A from cytotoxic lymphocytes cleaves GSDMB to trigger pyroptosis in target cells. *Science* 2020; **368(6494):** eaaz7548.

163. Akhmetzyanova I, Zelinskyy G, Schimmer S, Brandau S, Altenhoff P, Sparwasser T ve ark. Tumor-specific CD4+ T cells develop cytotoxic activity and eliminate virus-induced tumor cells in the absence of regulatory T cells. *Cancer Immunol Immunother* 2013; **62(2):** 257-271.

164. Du W, Leigh ND, Bian G, Alqassim E, O'Neill RE, Mei L ve ark. Granzyme B Contributes to the Optimal Graft-Versus-Tumor Effect Mediated by Conventional $CD4^+$ T Cells. *J Immunol Res Ther* 2016; **1(1):** 22-28.

165. Wajant H. CD95L/FasL and TRAIL in tumour surveillance and cancer therapy. *Cancer Treat Res* 2006; **130:** 141-165.

166. Yang S, Haluska FG. Treatment of melanoma with 5-fluorouracil or dacarbazine in vitro sensitizes cells to antigen-specific CTL lysis through perforin/granzyme- and Fas-mediated pathways. *J Immunol* 2004; **172(7):** 4599-4608.

167. Braza MS, Klein B, Fiol G, Rossi JF. γδ T-cell killing of primary follicular lymphoma cells is dramatically potentiated by GA101, a type II

glycoengineered anti-CD20 monoclonal antibody. *Haematologica* 2011; **96(3):** 400-407.

168. Li X, Lu H, Gu Y, Zhang X, Zhang G, Shi T ve ark. Tim-3 suppresses the killing effect of Vγ9Vδ2 T cells on colon cancer cells by reducing perforin and granzyme B expression. *Exp Cell Res* 2020; **386(1):** 111719.

169. Saigusa S, Ichikura T, Tsujimoto H, Sugasawa H, Majima T, Kawarabayashi N ve ark. Serum granulysin level as a novel prognostic marker in patients with gastric carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; **22(8):** 1322-1327.

170. Sparrow E, Bodman-Smith MD. Granulysin: The attractive side of a natural born killer. *Immunol Lett* 2020; **217:** 126-132.

171. Sato E, Olson SH, Ahn J, Bundy B, Nishikawa H, Qian F ve ark. 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* 2005; **102(51)**: 18538–18543.

172. Wherry EJ, Kurachi M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat Rev Immunol* 2015; 15(8): 486–499.

173. Buderath P, Schwich E, Jensen C, Horn PA, Kimmig R, Kasimir-Bauer S ve ark. Soluble Programmed Death Receptor ligands sPD-L1 and sPD-L2 as Liquid Biopsy Markers for Prognosis and Platinum Response in Epithelial Ovarian Cancer. *Front Oncol* 2019; **9**: 1015.

174. Puhr HC, Ilhan-Mutlu A. New emerging targets in cancer immunotherapy: the role of LAG3. *ESMO open* 2019; **4(2)**: e000482.

175. Shapiro M, Herishanu Y, Katz BZ, Dezorella N, Sun C, Kay S ve ark. Lymphocyte activation gene 3: a novel therapeutic target in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 2017; **102(5)**: 874-882.

176. Dong HP, Elstrand MB, Holth A, Silins I, Berner A, Trope CG ve ark. NK-and B-cell infiltration correlates with worse outcome in metastatic ovarian carcinoma. *Am J Clin Pathol* 2006; **125(3)**: 451-458.

177. Greppi M, Tabellini G, Patrizi O, Candiani S, Decensi A, Parolini S ve ark. Strengthening the AntiTumor NK cell function for the treatment of ovarian cancer. *Int J Mol Sci* 2019; **20(4)**: 890.

178. Nersesian S, Glazebrook H, Toulany J, Grantham SR, Boudreau JE. Naturally Killing the Silent Killer: NK Cell-Based Immunotherapy for Ovarian Cancer. *Front Immunol* 2019; **10**: 1782.

179. Rådestad E, Klynning C, Stikvoort A, Mogensen O, Nava S, Magalhaes I ve ark. Immune profiling and identification of prognostic immune-related risk factors in human ovarian cancer. *Oncoimmunology* 2018, **8(2)**: e1535730.

180. Goode EL, Block MS, Kalli KR, Vierkant RA, Chen W, Fogarty ZC ve ark. Dose-response association of CD8 + Tumor-infiltrating lymphocytes and survival time in high-grade serous ovarian cancer. *JAMA Oncol* 2017; **3(12)**: e173290.

181. Hao CJ, Li J, Liu P, Li XL, Hu YQ, Sun JC ve ark. Effects of the balance between type 1 and type 2 T helper cells on ovarian cancer. *Genet Mol Res* 2016; **15(2)**: 10.4238/gmr.15027936.

182. Marchenko S, Piwonski I, Hoffmann I, Sinn BV, Kunze CA, Monje N ve ark. Prognostic value of regulatory T cells and T helper 17 cells in high grade serous ovarian carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2023; **149(6)**: 2523-2536.

183. McKinney EF, Cuthbertson I, Harris KM, Smilek DE, Cannor C, Manferrani G ve ark. A $CD8^+$ NK cell transcriptomic signature associated with clinical outcome in relapsing remitting multiple sclerosis. *Nat Commun* 2021; **12(1)**: 635.

184. Perez OD, Mitchell D, Jager GC, Nolan GP. LFA-1 signaling through p44/42 is coupled to perforin degranulation in CD56+CD8+ natural killer cells. *Blood* 2004; **104(4)**: 1083-1093.

185. Ahmad F, Hong HS, Jäckel M, Jablonka A, Lun IN, Bhatnagar, N ve ark. High frequencies of polyfunctional CD8+ NK cells in chronic HIV-1 infection are associated with slower disease progression. *Journal of virology* 2014; **88(21)**: 12397-12408.

186. Mollavelioglu B, Cetin Aktas E, Cabioglub N, Abbasov A, Onder S, Emiroglu S *ve ark.* High co-expression of immune checkpoint receptors PD-1, CTLA-4, LAG-3, TIM-3, and TIGIT on tumor-infiltrating lymphocytes in early-stage breast cancer. *World J Surg Onc*ol 2022; **20(1)**, 349.

187. Jin S, Shang Z, Wang W, Gu C, Wei Y, Zhu Y ve ark. "Immune Co-inhibitory Receptors CTLA-4, PD-1, TIGIT, LAG-3, and TIM-3 in Upper Tract Urothelial Carcinomas: A Large Cohort Study." *J Immunother* 2023; **46(4)**: 154-159.

188. Fucikova J, Rakova J, Hensler M, Kasikova L, Belicova L, Hladikova K ve ark. TIM-3 Dictates Functional Orientation of the Immune Infiltrate in Ovarian Cancer. *Clin Cancer Res* 2019; **25(15)**: 4820-4831.

189. Wu JL, Zhao J, Zhang HB, Zuo WW, Li Y, Kang S. Genetic variants and expression of the TIM-3 gene are associated with clinical prognosis in patients with epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2020; **159(1)**: 270–276.

190. Tu L, Guan R, Yang H, Zhou Y, Hong W, Ma L ve ark. Assessment of the expression of the immune checkpoint molecules PD-1, CTLA4, TIM-3 and LAG-3 across different cancers in relation to treatment response, tumor-infiltrating immune cells and survival. *Int J Cancer 2020;* **147(2)**: 423-439.

191. Long L, Zhang X, Chen F, Pan Q, Phiphatwatchara P, Zeng Y ve ark. The promising immune checkpoint LAG-3: from tumor microenvironment to cancer immunotherapy. *Genes Cancer* 2018; **9(5-6)**: 176-189.

192. Chen F, Xu Y, Chen Y, Shan S. TIGIT enhances $CD4^+$ regulatory T-cell response and mediates immune suppression in a murine ovarian cancer model. *Cancer Med* 2020; **9(10)**: 3584-3591.

193. Balança CC, Scarlata CM, Michelas M, Devaud C, Sarradin V, Franchet C ve ark. Dual relief of T-lymphocyte proliferation and effector function underlies response to PD-1 blockade in epithelial malignancies. *Cancer Immunol Res* 2020; **8(7)**: 869-882.

194. Stewart C, Ralyea C, Lockwood S. Ovarian Cancer: An Integrated Review. *Semin Oncol Nurs* 2019; *35(2)*: 151–156.

195. Swiderska J, Kozłowski M, Nowak K, Rychlicka M, Branecka-Wozniak D, Kwiatkowski, S. Clinical Relevance of Soluble Forms of Immune Checkpoint Molecules sPD-1, sPD-L1, and sCTLA-4 in the Diagnosis and Prognosis of Ovarian Cancer. *Diagnostics* 2022; **12(1)**: 189.

196. Casati C, Camisaschi C, Rini F, Arienti F, Rivoltini L, Triebel F ve ark. Soluble human LAG-3 molecule amplifies the in vitro generation of type 1 tumor-specific immunity. *Cancer Res* 2006; ***66*(8)**, 4450-4460.

197. Sawada M, Goto K, Morimoto-Okazawa A, Haruna M, Yamamoto K, Yamamoto Y ve ark. PD-1+Tim3+tumor-infiltrating CD8 T cells sustain the potential for IFN-production, but lose cytotoxic activity in ovarian cancer. *Int Immunol* 2020; **32(6)**: 397-405.

198. Tanaka M, Itai T, Adachi M, Nagata S. Downregulation of Fas ligand by shedding. *Nat Med* 1998; **4(1)**: 31-36.

199. Konno R, Takano T, Sato S, Yajima A. Serum soluble fas level as a prognostic factor in patients with gynecological malignancies. *Clin Cancer Res* 2000; **6(9)**: 3576-3580.

200. Granucci F, Vizzardelli C, Pavelka N, Feau S, Persico M, Virzi E ve ark. Inducible il-2 production by dendritic cells revealed by global gene expression analysis. *Nat Immunol* 2001; **2(9)**: 882–888.

201. Xu L, Song X, Su L, Zheng Y, Li R, Sun J. New therapeutic strategies based on IL-2 to modulate Treg cells for autoimmune diseases. *Int Immunopharmacol* 2019; **72**: 322-329.

202. Felder M, Kapur A, Gonzalez-Bosquet J, Horibata S, Heintz J, Albrecht R ve ark. MUC16 (CA125): tumor biomarker to cancer therapy, a work in progress. *Mol Cancer* 2014; **13**: 129.

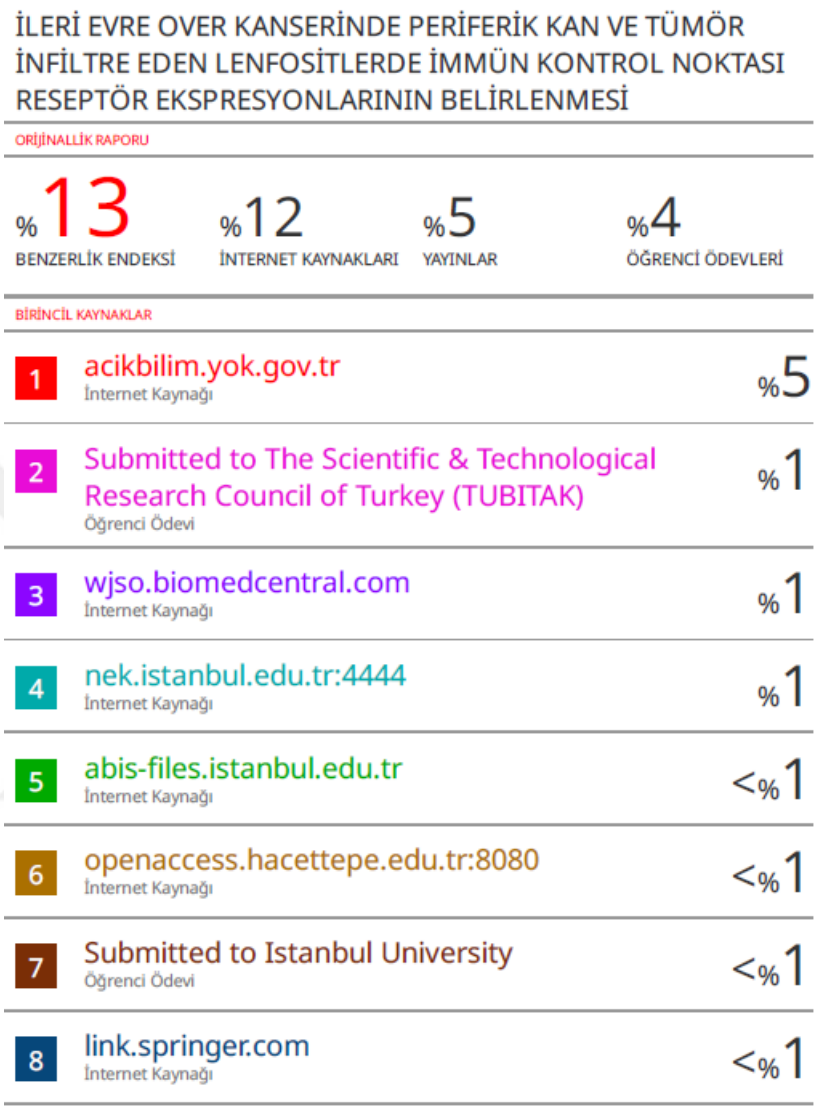
203. Belisle JA, Gubbels JA, Raphael CA, Migneault M, Rancourt C, Connor JP ve ark. Peritoneal natural killer cells from epithelial ovarian cancer patients show an altered phenotype and bind to the tumour marker MUC16 (CA125). *Immunology* 2007; **122(3)**: 418–429.

204. Gubbels JA, Felder M, Horibata S, Belisle JA, Kapur A, Holden H ve ark. MUC16 provides immune protection by inhibiting synapse formation between NK and ovarian tumor cells. *Mol Cancer* 2010; **9**: 11.

205. Madsen CB, Lavrsen K, Steentoft C, Vester-Christensen MB, Clausen H, Wandall HH ve ark. Glycan elongation beyond the mucin associated tn antigen protects tumor cells from immune-mediated killing. *PLoS One* 2013; **8(9)**: e72413.

206. Fanale D, Corsini LR, Brando C, Cutaia S, Di Donna MC, Filorizzo C ve ark. Can circulating PD-1, PD-L1, BTN3A1, pan-BTN3As, BTN2A1 and BTLA levels enhance prognostic power of CA125 in patients with advanced high-grade serous ovarian cancer?. *Front in Oncol* 2022; *12*: 946319.

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI



İLERİ EVRE OVER KANSERİNDE PERİFERİK KAN VE TÜMÖR İNFİLTRE EDEN LENFOSİTLERDE İMMÜN KONTROL NOKTASI RESEPTÖR EKSPRESYONLARININ BELİRLENMESİ

ORİJİNALLİK RAPORU

%13	%12	%5	%4
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	%5
2	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Öğrenci Ödevi	%1
3	wjso.biomedcentral.com İnternet Kaynağı	%1
4	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	%1
5	abis-files.istanbul.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
6	openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<%1
7	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	<%1
8	link.springer.com İnternet Kaynağı	<%1

Yayınları/Tebligleri Sertifikaları/Ödülleri

Yayınlar

- Cikman, D. I., Esen, F., Engin, A., Turna, A., Agkoc, M., Yilmaz, A., Saglam, O. F., Deniz, G., & Aktas, E. C. (2023). Mediastinal lymph node removal modulates natural killer cell exhaustion in patients with non-small cell lung cancer. Immunologic research, 10.1007/s12026-023-09410-3. Advance online publication. https://doi.org/10.1007/s12026-023-09410-3

- Cikman, D. I., AKTAŞ, E. Ç., Gelmez, M. Y., Fehim, E. S. E. N., ENGİN, A., Turna, A., & Deniz, G. (2023). The importance of alterations in innate lymphoid cell subsets in patients with non-small cell lung cancer and their role in tumorigenesis. Çukurova Anestezi ve Cerrahi Bilimler Dergisi, 6(2), 251-257.

- Engin, A., Turna, A., Esen, F., Agkoc, M., Cikman, D. I., Saglam, O. F., Deniz, G., & Aktas, E. C. (2023). Mediastinal lymph node removal ameliorates cytotoxic T-lymphocyte functions in patients with non-small cell lung cancer. Tumori, 109(1), 97–104. https://doi.org/10.1177/03008916211064643

- Sengul Samanci, N., Cikman, D. I., Oruc, K., Bedir, S., Çelik, E., Degerli, E., Derin, S., Demirelli, F. H., & Özgüroğlu, M. (2021). Immune-related adverse events associated with immune checkpoint inhibitors in patients with cancer. Tumori, 107(4), 304–310. https://doi.org/10.1177/0300891620953468

- Celik, E., Samanci, N. S., Karadag, M., Demirci, N. S., Cikman, D. I., Derin, S., Bedir, S., Degerli, E., Oruc, K., Oztas, N. S., & Demirelli, F. H. (2021). Classical versus non-classical EGFR mutations: Erlotinib response and impact of renal insufficiency. Journal of oncology pharmacy practice : official publication of the International Society of Oncology Pharmacy Practitioners, 27(7), 1665–1673. https://doi.org/10.1177/1078155220964895

- Demiray, A. G., Yumuk, P. F., Alan, Ö., Çikman, D. İ., Demirelli, F. H., … Yildirim, N. (2021). Efficacy and Safety of Trastuzumab Emtansine in Her2

Positive Metastatic Breast Cancer: Real-World Experience. Cancer investigation, 39(6-7), 473–481. https://doi.org/10.1080/07357907.2021.1933011

- Karakoc, M. D., & ÇIKMAN, D. İ. (2020). Metastatik Meme Kanserli Hastalarda Trastuzumab Emtansın Ve Pertuzumab Tedavilerinin Farmakoekonomik Değerlendirmesi. GEVHER NESIBE JOURNAL OF MEDICAL AND HEALTH SCIENCES, 5(8), 105-112.

- Cıkman, M. S., Seckin, K. D., Karslı, M. F., Baser, E., Cıkman, D. I., & Cicek, M. N. (2015). The effect of inherited thrombophilia on second trimester combined aneuploidy screening test markers. Archives of gynecology and obstetrics, 291(4), 787–790. https://doi.org/10.1007/s00404-014-3468-1

Ulusal ve Uluslararası Kongre Bildirileri

- TURNA, A., ÇETİN, E., ENGİN, A., ÇIKMAN, D. İ., AYAN, G., & DENİZ, G., (2018). The Importance of Suppressor and Cytotoxic T Lymphocyte subsets and Cytotoxic Mechanisms in Non-Small Cell Lung Cancer . 19th World Conference on Lung Cancer (WCLC 2018) of the International Association for the Study of LungCancer (IASCL) (pp.308). Toronto, Canada

- ÇETİN, E., TURNA, A., ENGİN, A., ÇIKMAN, D. İ., AYAN, G., & DENİZ, G., (2018). Immunophenotyping of suppressor and cytotoxic lymphocyte subsetsand cytotoxic mechanisms in non- small cell lung cancer . Abstracts of the 5th European Congress of Immunology-ECI 2018 (pp.283). Amsterdam, Netherlands

- ÇETİN, E., TURNA, A., ENGİN, A., ÇIKMAN, D. İ., AYAN, G., & DENİZ, G., (2017). Erken Evre Küçük Hücre Dışı Akciğer Kanserli Olgularda İmmünskorlamanın Yeri: Baskılayıcı ve Sitotoksik Hücre Alt Gruplarının Belirlenmesi . XXIV. Ulusal İmmünoloji Kongresi (pp.92). İstanbul, Turkey

- Ilke, C. D., Seyhan, C. M., Ali, K. M., & Dagdelen, S. (2016, May). Does IGF2BP2 gene polymorphism have an effect on the development of gestational diabetes mellitus?. In Endocrine Abstracts (Vol. 41). Bioscientifica.

- Cikman, D. I., Cikman, M. S., Erbas, T., Alikasifoglu, M., & Dagdelen, S. (2014, April). What is the contribution of MODY gene polymorphisms in the development of gestational diabetes mellitus?. In Endocrine Abstracts (Vol. 35). Bioscientifica.

Özel İlgi Alanları (Hobileri):

- Doğa yürüyüşü yapmak
- Dünya mutfaklarının yemeklerini yapmak
- Çiçek yetiştirmek
- Gitar çalmak
- Ailemle zaman geçirmek