

**MEME KANSERİ DOKUSUNDAN ELDE EDİLEN TÜMÖR
İNFİLTRAN LENFOSİT (TIL)'LERİN İN VİTRO ORTAMDA
ÇOĞALTILMASI VE FENOTİPLERİNİN SAPTANMASI**

**Sinem BULUŞ
1168209103**

**TÜMÖR BİYOLOJİSİ VE İMMÜNOLOJİSİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Tarkan YETİŞYİİT**

Tez No:2019/54

2019 – TEKİRDAĞ

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
TEKİRDAĞ NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MEME KANSERİ DOKUSUNDAN ELDE EDİLEN TÜMÖR
İN FİLTRAN LENFOSİT (TIL)'LERİN İN VİTRO ORTAMDA
ÇOĞALTILMASI VE FENOTİPLERİNİN SAPTANMASI

Sinem BULUŞ
1168209103

TÜMÖR BİYOLOJİSİ VE İMMÜNOLOJİSİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Tarkan YETİŞYİĞİT

Tez No:2019/54

2019 – TEKİRDAĞ

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	i
ÇİZELGE LİSTESİ	iv
ŞEKİL LİSTESİ	v
KISALTMALAR	vi
ÖZET	ix
ABSTRACT	x
TEŞEKKÜR	xi
1. GİRİŞ	1
2. KANSER	4
3. MEME KANSERİ	6
3.1. Tedavi Yöntemleri	8
3.1.1. Cerrahi	8
3.1.2. Kemoterapi	10
3.1.3. Hormonal Terapi	11
3.1.4. Radyoterapi	12
3.1.5. Adjuvan Terapi	14
3.1.6. İmmünoterapi	14
3.2. Meme Kanserinin Moleküler Sınıflaması	15
4. İMMÜN SİSTEM	20
4.1. İmmün Yanıtın Özellikleri	20
4.2. İmmün Tolerans	21
4.3. İmmün Yanıt	22
4.3.1. Doğal İmmünite	22
4.3.2. Edinsel İmmünitinin Genel Özellikleri	23
5. TÜMÖR	25
5.1. Benign Tümörler	25

5.2. Malign Tümörler.....	25
5.3. Tümör Gelişimi ve Kişinin Bağışıklık Sistemi	25
5.4. Tümör Etrafındaki Bağışıklık Sistemi Hücreleri.....	26
5.4.1. T Hücreleri.....	26
6. KANSER GELİŞİMİNDE BAĞIŞIKLIK SİSTEMİ BAĞINTISININ MEKANİZMASI	28
6.1. Tümör Mikroçevresinin Oluşum Mekanizmaları.....	28
6.2. T Hücre Edinilmiş Bağışıklık Yanıtının Kullanılması	30
7. İMMÜNOTERAPİ	32
7.1. Kanser Aşıları.....	33
7.2. Spesifik Antikorların Hastaya Verilmesi	34
7.3. Terapi Amaçlı Hücre Transferi.....	34
8. TIL	35
8.1. TIL Tanımı	35
8.2. TIL'lerin İmmünofenotipleri.....	37
8.2.1. CD8	37
8.2.2. CD28	37
8.2.3. CD57	38
8.2.4. CD137	39
8.3. TIL'ler Tümör Hücrelerini Öldürebilir mi?	39
8.4. T Hücreleri Tümörü Nasıl Hedefler?.....	40
8.5. Çeşitli Malignitelerde Yapılan Çalışma Örnekleri	41
8.5.1. Meme Kanseri.....	41
8.5.2. Melanom Kanseri.....	42
9. MATERYAL VE METOD	43
9.1. Tümörün Mekanik Olarak Parçalanması	43
9.2. Akım Sitometri	44
9.3. CM (Besiyeri Hazırlığı)	45

10.	BULGULAR	46
11.	TARTIŞMA.....	53
12.	SONUÇ	58
	KAYNAKÇA.....	59
	ÖZGEÇMİŞ	63

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge 1 Meme kanseri tiplerinin major moleküler subtipleri (Eliyatkin ve diğ. 2015)'den alınmıştır).....	19
Çizelge 2 Doğal ve Edinsel immüitenin genel özellikleri (Düzgün 2014'ten alınmıştır)	22
Çizelge 3 Tümörün Klinik Bilgisi.....	46
Çizelge 4 Örneklerin Patolojik Tür Dağılımı ve başarı yüzdesi.....	47
Çizelge 5 Tümörlerin sitokinler ile genişletilmesiyle oluşan TIL kültürlerinin akım sitometrik sonuçları.....	48
Çizelge 6 Çalışma Sonuçları.....	49

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 6.1 Tümör hücrelerinin reseptör ekspresyon bozukluğu T hücre anerjisine yol açar (Bektaş 2015)'ten alınmıştır.	29
Şekil 8.1 TIL izolasyonu ve tümöre spesifik T hücre popülasyonunun çoğaltılması (Restifo ve diğ. 2012'den alınmıştır)	36
Şekil 10.1 Hasta 4'e ait tümörün alındığı günün flow sitometri sonucu	50
Şekil 10.2 Hasta 4'e ait TIL kültürünün IL-2 ile genişletilmesinden 7 gün sonraki flow sitometri sonuçları.....	51
Şekil 10.3 Hasta 4'e ait TIL kültürünün IL-2 ile genişletilmesinden 14 gün sonraki flow sitometri sonuçları	52

KISALTMALAR

A750	:Allophyocyanin-Alexa Fluor 750
ABD	:Amerika Birleşik Devletleri
AHT	:Adoptif Hücre Terapisi
AI	:Aromataz İnhibitörü
ALND	:Aksiller Lenf Nodu Diseksiyonu
ASH	:Antijen Sunan Hücreler
BC	:Beckman Coulter
BCS	:Göğüs Koruyucu Cerrahi
Ca	:Kanser
CAR	:Kimerik Antijen Reseptörü
CIK	:Sitokin İndüklenmiş Öldürücü
cm	:Santimetre
CM	:Tam Ortam
CO ₂	:Karbondiyoksit
CRS	:Sitokin Salınım Sendromu
CTL	:Sitotoksik T Hücreleri
CTLA-4	:Sitotoksik T Lenfosit Antijen-4
DH	:Dendritik Hücre
DNA	:Deoksiribo Nükleik Asit
EGFR	:Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü
EM	:Enzim Ortamı
ER	:Östrojen Reseptörü
FDA	:ABD Gıda ve İlaç Dairesi
FITC	: Fluorescein Isothiocyanate
gr	:Gram
Gy	:Gray
GZMB	:Granzim
HER2	:İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü 2
IFN	:İnterferon
IL-2	:İnterlökin – 2
IU	:İnterunit
İLK	:İnvaziv Lobüler Karsinom
KO	:Krome Orange

LAG3	:Lenfosit Aktivasyonu Gen 3 Proteini
LAK	:Lenfokin Aktive Öldürücü
MAGEA1	:Melanoma-İlişkili Antijen Geni 1
MDSC	:Myeloid Kökenli Baskılayıcı Hücre
MHC	:Temel Doku Uygunluğu Bileşeni
mm	:Milimetre
mmol	:Milimol
MÖ	:Milattan Önce
NCI	:Ulusal Kanser Enstitüsü
ng	:Nanogram
NK	:Doğal Öldürücü
OS	:Genel Hayatta Kalma
PAMP	:Patojenle İlişkili Moleküler Kalıp
PAP	:Prostatik Asit Fosfataz
PARP	:Poli(Adenozin difotfatriboz) polimeraz
PB	:Pacific Blue
PBS	:Fosfat Tampolnlu Tuzlu Su
PC5	:RPhycoerythrin-Cyanine5.1
PC7	:Phycoerythrin Cyanin 7
PD1	:Programlanmış Hücre Ölümü Proteini 1
PE	:RPhycoerythrin
PR	:Progesteron Reseptörü
PRF1	:Perforin
PRR	:Kodlanmış Kalıp Tanıma Reseptörü
RNI	:Reaktif Azot Ara Ürün
ROI	:Reaktif Oksijen Ara Ürün
Rpm	:Dakikadaki Devir Sayısı
RPMI	:Roswell Park Memorial Enstitüsü
SLNB	:Sentinel Lenf Nodu Biyopsisi
SSP	:Tek Örnek Tahmincisi
STL	:Öldürücü T Lenfosit
Th1	:T helper
THR	:T Hücre Reseptörü
TIL	:Tümör İnfiltran Lenfosit

TIM3	:T Hücresi İmmunoglobulini Müsin Alt Birimi İçeren Protein 3
TİA	:Tümörle İlişkili Antijen
TLR	:TOLL Benzeri Reseptör
TLS	:Tersiyer Lenfoid Yapılar
TNF	:Tümör Nekroz Faktörü
TRP2	:Tirozinazla İlgili Protein
VEGF	:Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
WHO	:Dünya Sağlık Örgütü
xg	:Relatif Santrifüj Kuvveti
μ g	:Mikrogram
μ l	:Mikrolitre
μ m	:Mikrometre

ÖZET

Bu çalışma Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde metastazik olmayan, erken evre meme kanseri teşhisi konmuş hastalardan alınmış olan tümör dokusu üzerinde tümör infiltran lenfositlerin (TIL) in vitro ortamda IL-2 ile çoğaltılıp, flow sitometri testi ile immünofenotipik özelliklerini belirlemeyi amaçlamaktadır. Bu amaca ulaşabilmek için öncelikle Genel Cerrahi Bölümü tarafından alınan tümör taşıyan meme, mastektomi sonrası Patoloji Birimi'ne getirilir. Patolog tarafından tespit edilen tümörden alınan 2-3 mm çapında bir parça mekanik parçalama sonrasında, T hücre artışına neden olan bir sitokin olan rekombinant IL-2 ile besiyerinde kültüre edilmiştir. Tümörün çalışıldığı ilk günü takip eden 7. ve 14. günlerde tümörden genişleyen TIL'lerin genişleme oranı flow sitometrik yöntemlerle incelenmiştir. Sonuç olarak yapılan bu çalışma ile adoptif T hücre tedavisinin meme kanserli hastalarda ileriye yönelik bir immünoterapi yöntemi olarak kullanılabilirliği araştırılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Tümör, Meme, Kanser, Lenfosit, İnfiltrat, Tedavi

ABSTRACT

It is aimed to expand tumor infiltrating lymphocytes (TILs) with IL-2 in vitro on tumors which have been resected from patients who were diagnosed with early non-metastatic breast cancer in Tekirdağ Namık Kemal University Health Research and Application Center and to determine immunophenotypic features of expanded TILs. In order to achieve this aim, the tumor carrying breast taken by the Department of General Surgery is brought to the Pathology Unit after mastectomy. A piece of 2-3 mm diameter from the tumor detected by the pathologist was cultured on media with recombinant IL-2, a cytokine which caused T cell increase after mechanical disruption. On the 7th and 14th days following the first day of the study of the tumor, the expansion rate of TILs expanding from the tumor was examined by flow cytometric methods. In conclusion, this study has investigated the use of adoptive T cell therapy as a forward immunotherapy method in breast cancer patients.

Key Words: Tumor, Breast, Cancer, Lymphocyte, Infiltrating, Therapy

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimimde desteğini benden esirgemeyen değerli danışman hocam Sayın Doç Dr. Tarkan YETİŞYİĞİT'e, önerilerini paylaşmaktan kaçınmayan Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Burhan TURGUT'a, tezimin başlangıcından bitimine kadar yardımını esirgemeyen, her zaman bilgi ve tecrübelerini paylaşan, kendisine ne zaman danışsam bana kıymetli zamanını ayırıp, sorun yaşadığımda yanına çekinmeden gidebildiğim Sayın Dr. Öğr. Üyesi Erdoğan Selçuk ŞEBER'e, tez çalışmam süresince tecrübe ve değerli vakitlerini bana ayıran hocalarım Sayın Doç. Dr. Sibel Özkan GÜRDAL ve Sayın Dr. Öğr. Üyesi Meltem ÖZNUR ve ekiplerine, çalışmamda desteğini, zamanını ve tecrübelerini esirgemeyen Biyolog Hülya DÖNMEZ ve Biyolog Melise YILMAZ'a, yüksek lisans eğitimim süresince her türlü fedakârlığı yapan arkadaşım Öznur GÜNGÖR'e, yazım aşamasında tüm zorlukları benimle göğüsleyen ve hayatımın her evresinde bana destek olan değerli eşim Halil Nusret BULUŞ'a teşekkürü bir borç bilirim.

1. GİRİŞ

Kelime anlamı olarak kanser, doku veya hücre gruplarının kontrolsüz bir bölünme beraberinde çoğalması ile oluşan, buldukları organ ve dokuların dışına yayılma özelliği gösteren, ölüme sebep olabilen kötücül urdur. Kanser genel anlamına bakıldığında ise kontrolsüz hücre çoğalmasına bağlı olarak oluşan 100'den fazla hastalığın oluşturduğu gruptur. Kanser tiplerinin hepsi kontrolsüz hücre çoğalması ile başlar ve ciddi rahatsızlıklar hatta ölüm gibi sonuçlar doğurur.

Kanser, ilk defa Hippocrates (MÖ 460 - 370) tarafından ortaya konulmuş bir terimdir. Hippocrates, carcinos ve carcinoma terimlerini ülser oluşturan ve ülser oluşturmayan tümörler için kullanmıştır. (Kanser Nedir 2018)

Tüm kanser tiplerinde, vücuttaki hücreler durmaksızın çoğalır ve çevreleyen dokulara yayılırlar. Kanser trilyonlarca hücreden oluşan insan vücudunun herhangi bir yerinden başlamaktadır. Normalde, insan hücreleri yaşlanınca veya zarar görünce ölümlerine yerlerine yeni hücreler oluşmaktadır.

Kanser geliştiği zaman, aslında bu sırasal düzen bozulmaktadır. Hücreler anormalleştiğinde, yaşlanmış veya zarar görmüş hücreler ölmeleri gerektiği zaman ölmezler ve yeni hücreler de ihtiyaç duyulmadan üretilmeye başlar. Bu fazladan hücreler durmaksızın bölünürler ve tümör adı verilen dokuları oluştururlar. (National Cancer Institute 2018a)

2012 yılında yapılmış olan çalışmalara dayanan raporlarda, en sık görülen kanser çeşidi 1.7 milyon vaka ile meme kanseri olmuştur. Bu da kadınlarda görülen kanserlerin %25'ini oluşturmaktadır. (World Cancer Research Fund 2018)

Görülme sıklığı baz alındığında meme kanserini takip eden kanser türleri sırasıyla akciğer kanseri, kolorektal kanser, rahim ağzı kanseri ve prostat kanseridir. (World Cancer Research Fund 2018)

Günümüzde kanser vakalarının tedavisi için birçok yöntem uygulanmaktadır. En sık kullanılan yöntemler cerrahi operasyon, kemoterapi, radyasyon terapisi, hedefli terapi ve immünoterapidir. Bunların yanı sıra kök hücre transplasyonu, hipertermi, fotodinamik terapi, kan transfüzyonu ve lazer ile tedavi yöntemleri de sıklıkla kullanılan yöntemler arasındadır. (American Cancer Society 2018a)

İmmünoterapide ulaşılacak istenen amaç T-lenfositlerin tümör antijenlerini tanımlayabilmesi ve tümörü yok etmesidir. Solid tümörlerin birçoğunda mevcut

bulunan tümör antijenleri, buldukları tümör dokusunun yok edilebilmesini kendilerine karşı geliştirilmiş olan antikor ve bu antikorlara bağlanmış olan sitotoksik ajanlarla sağlamayı mümkün kılar. Üner (2003) TIL'ler tümörde bulunan heterojen T hücresi popülasyonunun bir üyesidir. TIL'ler fenotip çeşitliliği, antijen spesifikliğı, avidite ve fonksiyonel özellikleri ile karakterizedirler.(Restifo ve diğ. 2013)

Ulusal Kanser Enstitüsü (NCI) Cerrahi Dalı, hastaların tümörlerinden beyaz kan hücrelerini almayı, bunları laboratuvarında çok sayıda büyütmeyi ve daha sonra hücreleri hastaya geri vermeyi içeren deneysel bir tedavi geliştirdi. Bu hücreler Tümör İnfiltran Lenfositler olarak adlandırıldılar. TIL'lerin, sindirim sistemi, ürotelyal, meme veya yumurtalık/endometriyal kanser teşhisi konmuş hastaların tümörlerinde küçültmeye ya da daraltmaya sebep olup olamayacakları araştırmaların temelini oluşturmaktadır.(National Cancer Institute 2010)

Adoptif hücre terapisi (AHT), tümöre özgü T hücresine dayanan ve kanser tedavisinde potansiyel olarak güçlü bir yöntem olacak bir yaklaşımdır. AHT, T hücresi popülasyonunu, ex vivo stimülasyon, genişleme ve T hücrelerinin aktivasyonu gerçekleştirerek hastalara aktaran ve sonunda tümör hücrelerini hedef alan bir tür pasif immünoterapidir. Tümör immünoterapisindeki ilk AHT, infiltre edici tümör spesifik T hücresinin ex vivo genişlemesini ve daha sonra konakçı immünitesini hızlı bir şekilde yeniden oluşturmak için hastalara yeniden enjekte edilmesini içermektedir. Son gelişmeler, işlenmiş T hücrelerinin kullanılmasının kanseri hedeflemede çarpıcı potansiyel strateji olabileceğini göstermiştir. Bugüne kadar, AHT'de lenfokin aktive edilmiş öldürücü hücreler (LAK), TIL'ler, sitokinle indüklenmiş öldürücü hücreler (CIK), $\gamma\delta$ T hücreleri ve işlenmiş T hücreleri (THR T hücreleri ve kimerik antijen reseptörü (CAR) T hücreleri) içeren birçok strateji geliştirilmiştir.(Yang ve diğ. 2013)

Son yıllarda, immünoterapi, kanseri anatomik konumu veya bölünme eğilimi ile değil, aynı zamanda sağlıklı ve patolojik dokuları ayırt etmek için kullanılan bağışıklık sistemindeki doğal mekanizmalar ile hedefleyen olası bir kanser tedavisi olarak ortaya çıkmıştır. Bu yöntemin önemli bir bileşeni, tümöre özgü öldürücü hücrelerin infüzyonuna dayanan kanser tedavisine güçlü bir yaklaşım olan AHT bilinmektedir. AHT, tümör taşıyan konağa doğrudan antitümör yanıtı immün hücrelerin uygulanmasıyla yüksek derecede kişiselleştirilmiş olan kanser tedavisidir. Diğer kanser immünoterapi formları ile karşılaştırıldığında AHT, in vivo olarak kanser

ilerlemesini hafifletme kapasitesine sahip yeterli antitümör T hücrelerinin gelişimini yansıtan birçok avantaja sahiptir. AHT'de kullanım için, çok sayıda antitümör lenfosit, in vitro olarak hızlı bir şekilde çoğaltılabilir ve tümörlerin tanınması için seçilebilir. (Yang ve diğ. 2013)

Sonuç olarak AHT, doğrudan tümör hücrelerini öldürme ve tümör büyümesini hafifletme yeteneğine sahip olmakla birlikte, immün sistemin diğer bölümleri tarafından geç adaptif tepkiler başlatabilir. Artık optimum koşullar altında ve bazı kanser türleri için AHT'nin tümörlerin ilerlemesini azaltma kapasitesine sahip olduğundan şüphe yoktur. Bu, melanomdan bazı lösemi tiplerine ve prostat kanserine kadar değişen bazı malignitelerde gösterilmiştir. Ne yazık ki, bu tedavilerle sıklıkla sitokin salınım sendromu (CRS) gibi ciddi klinik toksisiteler ortaya çıkmaktadır. Son klinik denemeler umut verici olmakla birlikte, AHT'nin yaygın olarak uygulanması muhtemelen tümör reaktif TIL'lerin veya genetiği değiştirilmiş lenfositlerin elde edilmesine yönelik yaklaşımların geliştirilmesine bağlı olacaktır. (Yang ve diğ. 2013)

Çeşitli T lenfosit alt gruplarını içerirler ve son zamanlarda birçok kanser türünde prognostik bir belirteç olarak kullanım için öne çıkmışlardır. CD8 + TIL'ler sitotoksik aktiviteyi üretirler, doğrudan TAA tanımaya aracılık eder ve çeşitli tümör tiplerinde klinik anlamlılıkla pozitif korelasyon gösterirler. Bununla birlikte, tümör oyuklarındaki CD4+ TIL'lerin biyolojik özellikleri dönüştürülebilir ve belirsizdir. CD4+ TIL'lerin yardım fonksiyonunun, TAA-reaktif CD8 + TIL'lerin etkinliğini arttırıp koruyabildiği bildirilmiştir. Ayrıca, CD4+ TIL'ler, sırasıyla MHC-II-pozitif veya MHC-II-negatif koşullarda, CD8+ TIL'lerin yokluğunda tümör hücrelerini PRF1/GZMB- veya Th1/M1 benzeri makrofaj-bağımlı mekanizmalar yoluyla yok edebilmektedir. Bu nedenle, hangi tümör içi T hücrelerinin alt kümesinin aktif ve etkili olduğunun ve ayrıca antijen özelliklerini belirleyen faktörlerin anlaşılması AHT gelişiminde önemli özelliklerdir. (Yang ve diğ. 2013)

2. KANSER

Kanser, vücudun belirli bir kısmındaki normal hücrelerin kontrolden çıkmaya başladığında gelişir. Kanser farklı türleri olmasının yanı sıra tümünün ortak özelliği vakti gelen hücrelerin ölmek yerine büyümeye, bölünmeye devam etmesi ve sonucunda da anormal hücreler oluşmasıdır. Bazı kanser hücreleri, genellikle kan dolaşimleri veya lenf damarları (metastaz) yoluyla büyümeye başladıkları yerlerden vücudun diğer bölgelerine taşınırlar. Örneğin bir meme kanseri hücresi kan dolaşımı yolu ile karaciğere taşındığı zaman karaciğer kanseri değil hala meme kanseri olarak adlandırılır. Genellikle kanser hücreleri, DNA'nın hasarı nedeniyle normal hücrelerden gelişir. Çoğu zaman DNA hasar gördüğü zaman, vücut normal hücrelerde bu hasarı tamir edebilirken, kanser hücrelerinde hasar görmüş DNA tamir edilemez. İnsanlar ayrıca kalıtsal kansere sahip ebeveynlerden hasarlı DNA alabilirler. Bunun yanında bir kişinin DNA'sı sigara içmek gibi çevresel etkenlere de bağlı olarak zarar görebilmektedir. (Sudhakar 2009)

Kanser genellikle solid tümör olarak oluşur. Bazı kanserler lösemi (kan kanseri) gibi tümörler oluşturmaz. Lösemi hücreleri kan ve kan oluşturan organları içerir ve büyüdükleri dokulardan diğer dokularda dolaşırlar. Tüm tümörler kanser değildir, bazı tümörler benigndir. Benign tümörler büyümmez ve yaşamı tehdit etmez. Farklı kanser hücreleri türleri farklı davranabilir. Birçok kanser türünü geliştirme riski, sigarayı bırakmak ve düşük yağlı diyet yapmak suretiyle yaşam tarzındaki değişikliklerle azaltılabilir. Kanser erken evrede tanımlanmışsa tedavi etmek kolaydır ve uzun yıllar yaşamak için daha iyi şansa sahip olunabilir. (Sudhakar 2009)

Kanser, dünyadaki kardiyovasküler hastalıklar sonrası ikinci en önemli ölüm nedenidir. Bugün milyonlarca kanser teşhisi konmuş insan erken teşhis ve tedaviye bağlı olarak yaşamlarını uzatmaktadır. Kanser yeni bir hastalık değildir ve dünya çapında insanları etkilemiştir. Kanser kelimesi, Yunanca bir kelime olan Karkinos'dan bir hekim olan Hipokrat (M.Ö. 460–370) tarafından karsinom tümörlerini tanımlamak için üretilmiştir, ancak Hipokrat bu hastalığı ilk bulan kişi değildir. İnsan kemiği kanserinin en eski kanıtlarından bir kısmı eski Mısır'daki mumyalarda ve M.Ö. 1600'lü yıllara ait eski el yazmalarında bulunmuştur. Dünyadaki en eski meme kanseri vakası M.Ö. 1500 yıllarında eski Mısır'dan gelmektedir ve palyatif tedavi hariç olmak üzere

kanser tedavisi görmediği kaydedilmiştir. Yazmalara göre, yüzey tümörleri, bugün çıkarıldıkları şekle benzer şekilde cerrahi olarak çıkarılmıştır. (Sudhakar 2009)

3. MEME KANSERİ

Meme kanseri, kontrolsüz bir meme hücresi büyümesidir. Bir tümör iyi huylu (sağlığa zararlı olmayan) veya malign olabilir (tehlikeli olma potansiyeline sahip). Benign tümörler kanserli olarak kabul edilmez, hücrelerin görünümde normal hücrelerden farkı yoktur, büyümeleri hızlı değildir. Hücreleri görünüşte normaldir, yavaş büyürler ve yakın dokulara veya vücudun diğer bölgelerine sıçramazlar. Malign tümörler, kontrolsüz büyür ve çoğalırlar, diğer bölgelere yayılabilir.

“Meme kanseri” terimi, memedeki hücrelerden gelişen malign bir tümör anlamına gelir. Genellikle meme kanseri ya süt üreten bezler olan lobüllerin hücrelerinde ya da kanallarda, sütü loblardan meme başlarına boşaltan pasajlar ile başlar. Meme kanserinin, memenin yağlı ve lifli bağ dokularını içeren stromal dokularda başlama olasılığı daha düşüktür.(Anonim 2018a)

Kanser hücreleri yakın olarak yer alan meme dokusuna sıçrayabilir ve koltuk altında yer almakta olan lenf düğümlerine girebilir. Kanser hücrelerinin lenf düğümlerine girmesi, vücudun diğer kısımlarına da kolaylıkla erişebilmesi anlamına gelmektedir. Kanser hücrelerinin tümörün dışına yayılma miktarı kanserin derecesini belirlemektedir. (Anonim 2018a)

Meme kanseri her zaman genetik bir anormallikten (genetik materyalde bir “hata”) kaynaklanır. Bununla birlikte, kanserlerin sadece %5-10'u ebeveynden miras kalan anormalliğe bağlıdır. Bunun yerine, meme kanserlerinin %85-90'ı, yaşlanma sürecinin ve genel olarak yaşamın “aşınma ve yıpranması” sonucunda ortaya çıkan genetik anormalliklerden kaynaklanmaktadır. (Anonim 2018a)

Meme kanserinin evresi, kanserin ne kadar büyük olduğu ve hormon reseptörleri olup olmadığı gibi kanser özellikleri ile belirlenir. Kanser evresi, prognoz, hastalığın olası sonucunun anlaşılmasına, en iyi tedavi seçeneklerine karar verilmesine, belirli klinik çalışmaların iyi bir seçenek olup olmadığını belirlemesine yardımcı olur.

Meme kanseri aşaması genellikle 0 ile IV arasında bir ölçekte bir sayı olarak ifade edilir - evre 0, orijinal konumu içinde kalan invazif olmayan kanserleri ve evre IV göğsün diğer bölgelerine yayılan invazif kanserleri tanımlar. (Anonim 2018a)

Erkeklerde meme kanseri nadir görülen bir hastalıktır. Tüm meme kanserlerinin %1'inden azı erkeklerde görülür. 2018'de, yaklaşık 2,550 erkeğin hastalık teşhisi konması beklenmektedir. (Anonim 2018b)

Kadınlarda en sık görülen kanser tiplerinin birincisi meme kanseridir. Kadınlarda meme kanserine yakalanma olasılığı 8'de 1'dir. Meme kanserinin geliştiği lokasyon meme doku hücreleridir ve bu doku hücreleri meme dokusunun herhangi bir yerinde olabilmektedir. En sık görülen meme kanseri ise “duktal” kanserlerdir. “Lobüler” kanserler olarak adlandırılan ve süt üreten bezlerden kaynaklanan kanser tipleri de sığa görülmektedir. Medüller, tübüler, müsinöz gibi tipleri de mevcut olup, bu tipler diğer dokulardan kaynaklanmaktadır.(Kanser Türleri 2018)

- Meme kanseri gelişiminde bilinen en önemli risk faktörleri şunlardır;
- Obezite veya aşırı kilolu olmak
- Fiziksel aktivite yetersizliği
- Alkol tüketimi
- Hiç doğum yapmamış olanlar
- İlk doğum yaşı 30'dan sonra olanlar
- Erken yaşta ilk adet görülmesi, östrojen hormonuna maruz kalma süresi daha uzun olması riski artırmaktadır.

- Menopoz yaşı: Menopoz geç yaşta girme de erken adet görme gibi östrojen hormonuna maruz kalma süresini uzatacağından riski artırmaktadır.

- Cinsiyetin kadın olması ve yaşın ilerlemiş olması
- BRCA-1, BRCA-2 mutasyonlarına benzer genetik mutasyonlar
- Geçmişinde meme kanseri öyküsü bulunması
- Göğüse radyoterapi almış olmak
- Bazı kanser olmayan meme hastalıkları (fibroadenom, papillomatosis, gibi)
- Kalıtsallık: Kız kardeş, anne veya anne tarafı akrabalarında meme kanseri öyküsü bulunan kadınlarda risk normalden fazladır.

Amerikan Kanser Topluluğuna göre, memede aşağıdaki sıra dışı değişikliklerden herhangi biri meme kanseri belirtisi olabilir:

- Memenin tümünün veya bir kısmının şişmesi
- Cilt tahrişi veya çukurlaşma
- Meme ağrısı

- Meme başı ağzı veya içe doğru dönen meme ucu
- Meme başı veya meme derisinde kızarıklık, pullaşma veya kalınlaşma
- Anne sütü dışında bir meme akıntısı
- Koltukaltı bölgesinde bir yumru

Bu değişiklikler aynı zamanda enfeksiyon veya kist gibi kanserli olmayan daha az ciddi rahatsızlıkların belirtileri olabilir. Yine, herhangi bir meme değişikliği hemen doktor tarafından kontrol edilmek önemlidir. (Anonim 2018a)

3.1. Tedavi Yöntemleri

3.1.1. Cerrahi

Meme kanserli kadınların çoğu, tedavilerinin bir parçası olarak bir tür ameliyat geçirir. Farklı tipte meme cerrahisi vardır ve duruma bağlı olarak farklı nedenlerle yapılabilir. Bu nedenler:

- Mümkün olduğunca kanseri ortadan kaldırmak için (meme koruyucu cerrahi veya mastektomi),
- Kanserın kol altındaki lenf bezlerine yayılıp yayılmadığını bulmak için (sentinel lenf bezi biyopsisi veya aksiller lenf bezi diseksiyonu),
- Kanser giderildikten sonra memenin şeklini eski haline getirmek için (meme rekonstrüksiyonu),
- İlerlemiş kanser belirtilerini gidermek için.

Meme kanseri özelliklerine ve tıbbi geçmişe bağlı olarak belirli bir ameliyat önerilebilir veya hangi tipte olacağı konusunda bir seçim yapılabilmektedir. (American Cancer Society 2018b)

3.1.1.1. Meme kanserini giderici cerrahi

Meme kanseri tedavisinde iki ana ameliyat türü vardır:

- Meme koruyucu cerrahi (BCS) (ayrıca lumpektomi, kuadrantektomi, parsiyel mastektomi veya segmental mastektomi olarak da bilinmektedir.) - Sadece kanser içeren parçanın alındığı ameliyattır. Amaç, kanserli bölgeyi çevreleyen bazı normal dokularla beraber kanseri ortadan kaldırmaktır. Memenin ne kadarının alındığı, tümörün boyutuna ve konumuna ve diğer faktörlere bağlıdır.

- Mastektomi - Tüm meme dokusu ve bazen yakındaki diğer dokular da dahil olmak üzere, tüm göğsün alındığı bir ameliyattır. Birkaç farklı tipte mastektomi vardır. Bazı kadınlar ayrıca her iki memenin de çıkarıldığı çift mastektomi yapabilir.

Erken evre kanserli birçok kadın BCS ve mastektomi arasında seçim yapabilmektedir. BCS'nin ana avantajı, bir kadının memesinin çoğunu almamasıdır. Ancak çoğu durumda radyasyona da ihtiyacı olacaktır. Erken evre kanserlerde mastektomi yapılan kadınların radyasyona ihtiyacı daha düşüktür.

Bazı kadınlar için mastektomi, meme kanseri tipi, tümörün büyüklüğü, önceki tedavi öyküsü veya diğer bazı faktörler nedeniyle daha iyi bir seçenek olabilir.

Bazı kadınlar daha az kapsamlı bir ameliyat olmanın kanser riskini geri getirme riskini artıracığından endişe duyuyor olabilir. Fakat gerçek şu ki, çoğu durumda mastektomi daha uzun süreli hayatta kalma şansı ya da tedaviden daha iyi bir sonuç vermemektedir. 20 yıldan uzun bir süredir binlerce kadını takip eden araştırmalar, BCS'nin radyasyonla birlikte yapılabileceği zaman mastektomiye sahip olmanın daha iyi bir hayatta kalma şansı sağlamadığını göstermektedir. (American Cancer Society 2018b)

3.1.1.2. Yakındaki lenf bezlerini çıkarmak için cerrahi

Meme kanserinin aksiller (koltuk altı) lenf düğümlerine yayılıp yayılmadığını bulmak için, bu lenf düğümlerinden bir veya daha fazlası çıkarılır ve mikroskop altında incelenir. Bu, kanserin evresini (derecesini) belirlemenin önemli bir parçasıdır. Lenf bezleri, meme kanserini gidermek için yapılan ameliyatın bir parçası olarak veya ayrı bir ameliyat olarak çıkarılabilmektedir.

Lenf bezlerinin çıkarılması için iki ana cerrahi tip mevcuttur:

- Sentinel lenf nodu biyopsisi (SLNB) - Cerrahin, yalnızca kanserin muhtemelen ilk yayılacağı kolun altındaki lenf nodunu(larını) çıkardığı bir prosedürdür.

- Aksiller lenf nodu diseksiyonu (ALND) - Cerrahin kol altından birçok (genellikle 20'den az) lenf nodunu çıkardığı bir prosedürdür. ALND geçmişte olduğu kadar sık yapılmamakla birlikte, bazı durumlarda lenf düğümlerine bakmanın en iyi yolu olarak kabul edilmektedir. (American Cancer Society 2018b)

3.1.1.3. Ameliyat sonrası meme rekonstrüksiyonu

Meme kanseri nedeniyle ameliyat geçiren herhangi bir kadın meme rekonstrüksiyonu seçeneğine sahip olabilir. Bir mastektomi durumunda, bir kadın ameliyattan sonra göğsün görünüşünü eski haline getirmek için meme höyüğünün yeniden inşa edilmesini düşünmek isteyebilir. Bazı meme koruyucu ameliyatlarda, bir kadın ameliyattan kalan çukurları düzeltmek için etkilenen memede yağ grefti yapmayı düşünebilir.

Seçenekler tıbbi duruma ve kişisel tercihlere bağlı olsa da, birkaç rekonstrüktif cerrahi türü vardır. Meme kanseri ameliyatı ile aynı anda meme rekonstrüksiyonu (acil rekonstrüksiyon) veya daha sonra (gecikmeli rekonstrüksiyon) arasında seçim yapılabilmektedir. (American Cancer Society 2018b)

3.1.1.4. İleri meme kanseri cerrahisi

Cerrahinin vücudun diğer bölümlerine yayılmış meme kanserini tedavi etmesi pek mümkün olmamakla birlikte, bazı durumlarda, kanserin yayılmasını yavaşlatmanın bir yolu olarak ya da semptomların önlenmesinde veya giderilmesinde yardımcı tedavi olarak olabilmektedir. Aşağıda belirtilen durumlarda cerrahi yöntemi kullanılabilir.

- Meme tümörü memede (ya da göğüste) açık bir yaraya neden olduğunda,
- Beyin gibi vücudun belirli bir bölgesinde az sayıda kanser yayılımını (metastaz) tedavi etmek,
- Omurilik üzerinde bir kanser yayılımı alanı bastırıldığında,
- Karaciğerde bir tıkanıklığı tedavi etmek için,
- Ağrının veya diğer semptomların giderilmesini sağlamak, (American Cancer Society 2018b)

3.1.2. Kemoterapi

Meme kanserinde kullanılan kemoterapi ilaçları sitotoksik (hücreleri öldüren) özellik taşımaktadır çünkü sadece memede değil, vücudun diğer bölgelerinde yer almakta olan meme kanseri hücrelerini de etkilemektedir. Bu ilaçların alım şekli oral (tablet) ya da intravenöz yolla olabilmektedir. (Anonim 2018c)

- Adjuvan Kemoterapi (Cerrahi Sonrası Kemoterapi): Meme ameliyatından sonra uygulanır. Cerrahiden sonra vücutta kalmış olan ya da halihazırda vücutta

yayılmış ve görüntüleme teknikleri ile tespit edilememiş kanser hücrelerinin yok edilmesi amacıyla kullanılmaktadır. Kanser nüksünü ve metastaz oluşumunu engeller.

- Neoadjuvan Kemoterapi (Cerrahi Öncesi Kemoterapi): Ameliyattan önce uygulanmaktadır. Özellikle tümörün küçülmesi ve ameliyatın kolaylaştırılması amacıyla lokal ileri kanserlerde uygulanmaktadır. (Anonim 2018c)

Kemoterapi ilaçlarının verilme süreleri değişiklik göstermektedir. Bu süreler dakikalar içinde olabileceği gibi daha uzun süre de olabilmektedir. İntravenöz olarak uygulanan bu ilaçlar hastane ortamında ya da kliniklerde verilmektedir. İlaçları 1-3 haftalık döngüler (aralar) ile verilmesi yan etkilerin azalması için vücuda zaman kazandırmaktadır. Bazı ilaçların uygulanması kemoterapi döngüsünün ilk gününde, bazıları ise birkaç gün üst üste verilmektedir. Adjuvan ve neoadjuvan terapi genelde 3-6 ay sürmektedir. Bu süreç kullanılan ilaçlara bağlıdır. Tedavi süreci etkileyen başka faktörler de yan etkiler ve tedaviye alınan yanıtıdır. (Anonim 2018c)

3.1.3. Hormonal Terapi

Östrojen ve progesteron, meme dokusunun büyümesi ve farklılaşmasının birincil düzenleyicileridir. Her iki steroid hormonu öncelikle yumurtalıklarda üretilir. Hücrel etkilerini, spesifik nükleer reseptörlere, östrojen reseptörlerine (ER'ler) ve progesteron reseptörlerine (PR'ler) bağlanarak ve aktive ederek gösterirler. Aktive edildiğinde, reseptörler transkripsiyonel ve membran lokalize sinyal aktiviteleri sergiler. ER α ve ER β , 2 ana ER'dir. Meme kanserlerinin çoğunluğu ER α 'yı (% 70) ifade ederken, ER β daha iyi karakterize edilir.(Tremont ve diğ. 2017)

Östrojenin meme dokusundaki potansiyel rolü ilk önce tavşanlarda ooferektominin laktasyon kaybıyla sonuçlandığı George T. Beatson tarafından ortaya çıkarılmıştır. Bu sonuçlara dayanarak, Beatson, 15 Haziran 1895'te, resekte edilemeyen premenopozal bir meme kanseri hastasında ooferektomi yapmıştır. Tamamen remisyona girmiş ve 4 yıl daha hayatta kalmıştır. Beatson'un erken çalışması, hormonal terapinin temelini oluşturmuştur. Stanley N. Boyd, premenopozal kadınlarda oofrektomi ile tedavi edilen 46 dizi geri dönüşümsüz meme kanseri vakasında bu tedavinin faydasını doğrulamıştır. 1923'te Edgar Allen ve Edward Doisy, meme dokusunu düzenleyen bir yumurtalık hormonu olan östrojeni keşfetmiştir. Takip eden yıllarda, 1967'de Harper ve Walpole tarafından tamoksifenin keşfedilmesine yol

açan geniş bir dizi ablatif hormonal tedavi araştırılmış ve geliştirilmiştir. (Tremont ve diğ. 2017)

Tamoksifen, erken meme kanserini tedavi etmek için kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır ve adjuvan endokrin tedavisi olarak kullanımını destekleyen güçlü kanıtlara sahiptir. Tamoksifen, ABD Gıda ve İlaç İdaresi'nin (FDA), 1970'lerde postmenopozal kadınlarda metastatik meme kanseri tedavisi için onayladığı, steroid olmayan bir antiöstrojendir. (Tremont ve diğ. 2017)

Menopoz sonrası dişilerde östrojen artık yumurtalık dokusu tarafından üretilmez ve ağırlıklı olarak aromataz enzimi yoluyla nonglandüler kaynaklardan sentezlenir. Aromataz, subkutan yağ, karaciğer ve kas dahil olmak üzere birçok dokuda bulunabilir; enzim aynı zamanda meme kanseri hücrelerinde de izole edilmiştir. Östrojen inhibisyonu ile olan önceki başarıdan dolayı, aromatazın inhibisyonu, meme kanseri için bir tedavi yöntemi olarak kapsamlı şekilde araştırılmıştır.

İlk 2 kuşak aromataz inhibitörü (AI) meme kanserinin tedavisinde etkiliydi, ancak kortizol ve aldosteron gibi diğer steroid hormonlarını inhibe ettiği için önemli yan etkilere neden oldu. Üçüncü kuşak AI'ler, aromataz için özgüllüğü arttırmıştır ve steroidal (tip I) veya nonsteroidal (tip II) olarak kategorize edilmiştir. Steroidal inhibitörler, enzimatik aktivitenin geri dönüşümsüz inhibisyonuna yol açarken, nonsteroidal inhibitörler geri dönüşümlü rekabetçi inhibitörlerdir. (Tremont ve diğ. 2017)

3.1.4. Radyoterapi

Işın tedavisi ya da diğer adıyla radyoterapinin temeli radyasyon ışınları ile hücre DNA yapısını bozarak, kanser hücrelerinin ölümünü sağlamaktır. Kanser hücrelerinin bu şekilde ölümünü sağlamak bazı sağlıklı hücrelerin de ölümüne neden olacağından bazı zararlı yan etkiler ortaya çıkabilmektedir. Cerrahi tedaviye benzer olarak radyoterapi de uygulanan bölgeye etki eder.

Radyoterapi ışınlarının elde edilmesinin birinci yolu Kobalt-60 gibi radyoaktif maddeler kullanmaktır. Buna alternatif olan diğer bir yöntem de lineer akseleratör cihaz kullanmaktır.

Cerrahi operasyondan sonra bölgede kanser hücresi kalmış olması olasılığı her zaman vardır. Bu sebeple kalan hücrelerin yok edilmesi amacıyla radyoterapi uygulanmaktadır. Bu yöntem de adjuvan radyoterapi denmektedir.

Eğer cerrahi müdahale mümkün değilse ya da başka bir organa yayılma söz konusu ise, radyoterapi tedavi amaçlı olarak da kullanılabilen bir yöntemdir. Buna ilaveten kanserli bölgenin küçültülmesi için de radyoterapi kullanılan bir yöntemdir.

Eğer koruyucu meme ameliyatı gerçekleştirilmiş bir durum söz konusu ise, ameliyat sonrası radyoterapi uygulanması gerekmektedir. Bu kanserin tekrarını önleyen bir uygulamadır.

Mastektomi uygulanan hastaların bazılarında radyoterapi gerekmekte, bazılarında ise gerekmemektedir. Işın tedavisi gerektiren durumlar:

- 5 cm'den büyük tümör oldularında,
- 4 veya fazla lenf noduna yayılmış olan kanser durumlarında,
- Kanser yayıldığı koltuk altı lenf düğümlerinin dışına çıkmışsa,
- Kötü özellikte kanser tipi ve yapısı gösteren kriterler varsa,
- Meme derisine veya göğüs duvarına yayılma varsa.

Ameliyattan sonra radyoterapiye başlama süreci 1-2 haftadır. Ancak bu süreç yaraların iyileşmesini takiben başlamaktadır.(Meme Vakfı 2018) Tüm meme radyoterapisi tüm meme dokusunu hedef alır. Tüm memeye konvensiyonel 45 Gy ile 50 Gy doz verilir, ardından lumpektomi yatağına ilave 10 Gy ile 16 Gy ek bir destek verilir. Konvensiyonel fraksiyonlama tipik olarak 6 hafta boyunca verilir. Nüks riskine bağlı olarak, radyasyon tedavisi de bölgesel düğümlere 45 Gy - 50 Gy arasında verilir. Nodal ışınlama, klinik olarak belirtilmişse supraklaviküler, aksiller ve iç meme bölgelerini içerir. Hipofraksiyonlama, 50 yaş ve üstü, kemoterapi görmeyen ve 25 cm veya daha az bir ayrılık olan düşük riskli düğüm negatif hastalar için düşünülmektedir.

Önerilen hipofraksiyonasyon programı 16 fraksiyonda 42.56 Gy artı lumpektomi yatağı artışıdır (konvensiyonel fraksiyonlamadan yaklaşık 2 hafta daha az). Kısmi meme irradyasyonu sadece lumpektomi yatağını hedef alır ve unicentric/unifokal tümörleri 3 cm veya daha az olan 50 yaş ve üstü düşük riskli hastalarda, negatif sınırlar ve negatif düğümler olarak kabul edilir. Kısmi meme irradyasyonu 1 haftada günde iki kez 10 fraksiyonda verilir. Adjuvan tedavi ayrıca hormon pozitif tümörleri olan hastalarda endokrin tedavisi içerir. (Kim ve Algan 2018)

3.1.5. Adjuvan Terapi

Adjuvan tedavi, primer cerrahi sonrası mikrometastazları öldürmek veya inhibe etmek için ek terapi uygulanmasıdır. Meme kanseri için primer cerrahi, lumpektomi, ardından tüm meme ışınlanması veya mastektomi ile gerçekleştirilir. Adjuvan tedavi, mastektomi sonrası lokal ışınlama, sitotoksik kemoterapi ile sistemik tedavi veya endokrin tedavisi içerebilir. İlk defa, Birleşik Devletler ve Birleşik Krallık'ta meme kanseri mortalite eğiliminde, adjuvan tedavilerin kullanımına bağlı olarak bir azalma kaydedilmiştir.

Adjuvan tedavide son gelişmeler standart kemoterapiye daha yeni ajanlar eklemeyi, endokrin terapisinin rolünü tanımlamayı ve mikroskobik hastalığı saptamak için yeni teknolojilerin uygulanmasını içerir. Kasım 2000'de Ulusal Sağlık Enstitüleri, meme kanserinde adjuvan tedavinin kullanımı konusunda doktorlar, hastalar ve halk için bir rehber olarak fikir birliği beyanı yayınladı. Bu ifade özellikle, adjuvan tedavi alması gerektiğini, bu kararı verirken hangi faktörleri göz önünde bulundurması gerektiğini ve ne tür bir adjuvan tedavisi önerilmesi gerektiğini ele almaktadır. (Chew 2001)

3.1.6. İmmünoterapi

Meme kanseri immünolojisi alanında son on yılda muazzam bir ilerleme kaydedilmiştir. Meme kanseri immünojenik olarak kabul edilmediğinden yirmi yıl önce immünoterapi meme kanserlerinin tedavisi için düşünülmemiştir. Bugün meme kanserli hastalarının çoğunun tümöre karşı uyarlanabilir bir bağışıklık tepkisi gösterdiği bilinmektedir. Son kanıtlar, meme kanserlerine sızan ve tümör stromasında bulunan lenfositlerin, güçlü prognostik göstergeleri olduğunu göstermektedir. Bu gözlemler, immünomodülasyonun, göğüs kanseri tedavisi için standart tedavisine entegrasyonunun yolunu açmıştır.(Disis ve Stanton 2018)

İmmün kontrol noktası inhibitör tedavisinin melanom gibi immünojenik kanserlerde başarısı, adaptif immün sistemin kanser eradikasyonundaki önemini vurgulamıştır. Adaptif bağışıklık sistemi, hem T-hücreleri hem de B-hücreleri olan lenfositlerden oluşur ve bu hücrelerin immünojenik, yani kanserde eksprese edilen proteinlere spesifik olarak cevap verebilme yeteneği ile tanımlanır. İmmün kontrol noktası inhibitör ajanları, tümörün eğitilmiş T hücrelerinin kanseri tanımasını, çoğalmasını ve tümör büyümesini sınırlamasını sağlar. Adaptif immün yanıt, aynı

zamanda tümör hücrelerine maruz kalması durumunda, lenfositlerin uzak bir zaman noktasında tekrar cevap verebilme özelliği olan immünolojik belleğin gelişimi ile de ilişkilidir. Ayrıca, tümör hücrelerini öldürebilen T hücreleri Tip I fenotiptedir; Tümör mikro-ortamındaki CD4 T hücreleri, interferon-gama (IFN- γ) ve antijen sunan hücreleri aktive eden ve kanser ölümünü indüklemek için gereken sitotoksik CD8 T-hücrelerinin gelişimini destekleyen tümör nekroz faktörü-alfa gibi Tip I sitokinleri salgılar. (Disis ve Stanton 2018)

3.2. Meme Kanserinin Moleküler Sınıflaması

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) raporlarına göre meme kanserinin çok sayıda çeşidi vardır. Bu çeşitler 20 major tip ve 18 minör subtip olarak sınıflandırılmıştır. Meme kanserinin önemli özellikleri arasında çok farklı sayıda histolojik ve biyolojik özelliklere, farklı klinik bulgulara sahip olması, tedavi yanıtlarının farklılığı ve bunun yanında multipl antiteler içeren heterojen bir hastalık olması gösterilebilmektedir. Bu özelliklerin ortaya çıkmasındaki ana neden meme kanserinin genetik, transkriptomik ve epigenetik değişikliklere sahip olmasıdır.

İnvaziv meme kanserinin 2 temel sınıfı vardır. Bunlar özel olmayan duktal karsinom ve özel subtiplerdir. Belirli tanımlamalara sahip olan meme kanserleri özel subtipler sınıfını oluşturmaktadır. Özel subtipler dışındaki karsinomların tamamı da özel olmayan tiplere ait sınıfı oluşturmaktadır. Bu sınıfların meme kanserlerindeki oranı da sırasıyla %20-25 ve %60-75 olarak belirlenmiştir. Özel subtiplerin en yaygın tipleri de lobüler, tübüler, papiller ve müsinöz tümörlerdir. “Histolojik Derece” patoloji raporu içinde yer alan önemli bir bileşendir. Bu derece tümörde, nükleer pleomorfizm/derece ve proliferasyonun (mitoz oranı) değerlendirilmesi diferansiyasyon derecesinin (tübül formasyonu) belirlenmesinde rol oynamaktadır.

“Moleküler Sınıflama” ilk olarak Perou ve Sorlie nin 2000 yılında yaptıkları çalışmada ortaya çıkmış bir terminolojidir. Bu çalışmada moleküler sınıflama önerisinin temelinde gen ekspresyon farklılıkları yer almaktadır. Bu çalışmaya göre, gen ekspresyonları farklılıklarına dayanarak meme kanseri; “Lüminal” (genelde iki ya da üç alt gruba ayrılan, ER, ER düzenleyici genlerin ve normalde lüminal epitelial hücrelerden eksprese edilen genlerin ekspresyonunu yansıtan), “HER-2 pozitif” (ERBB2/HER-2 amplifikasyonu ve overekspresyonu gösteren), “bazal” (ER, PR ve HER-2 negatif olan ve memenin normal bazal/myoepitelial hücreleri tarafından

eksprese edilen gen ekspresyonu gösteren) olmak üzere 3 sınıfa ayrılmıştır. Bu 3 sınıfa ilave olarak bir de “Normal Benzeri” alt grup da tanımlanmıştır. Bu alt grubun tanımının ve getireceği sonuçlar belirsizdir. Bu grup içerik olarak daha çok normal doku bileşeninden oluşmaktadır. Bu grupta tümör hücre içeriği daha az gözükmektedir. Bu tarz alt grupların oluşması için intrinsik genlerin (farklı tümörlerde çok yüksek, aynı tümörün tekrarlanan örneklerinde çok az farklılıklara sahip olan) ayrımlaşmasıyla, hastaların da hiyerarşik bir biçimde kümelenmesiyle oluşmaktadır. Bu kümelenmenin temel mantığı hastaların transkripsiyonel olarak farklı gruplara ayrılmasıdır. Bu yöntem retrospektif değerlendirmeye dayanır ve bunun yapılabilmesi için çok sayıda örneğe ihtiyaç vardır. Bu yüzden “Single Sample Predictor (SSP)” tanımlaması yapılmıştır. SSP’de tümör, bir alt gruba dahil edilmek için tümöre en yakın merkezi sınıf kullanılır. İlk SSP (SSP2003) 500 adet gen ekspresyonu içermektedir. Sadece ER ve HER-2 fenotipi ile ilişkili genler kullanılarak üç temel alt grubun tanımlanması stabil bir şekilde yapılabilmektedir. Bu, yüzlerce gen kullanımına olan gereksinimi ortadan kaldırmaktadır. 3 temel alt grup ise ER-/HER2- (bazal benzeri), HER2+ (HER2-zenginleştirilmiş) ve ER+/HER2- (kombine lüminal A ve B)’dir. (Eliyatkin ve diğ. 2015)

Lüminal A, lüminal B, HER2, bazal ve normal benzeri moleküler alt gruplar farklı prognostik alt grupları temsil etmektedir. Meme kanseri için üretilmiş olan moleküler subtipleme yöntemlerinin hangisinin daha üstün bir yöntem olduğu hala tartışılmaktadır. Buna rağmen önerilen sınıflama sistemi klinik kullanıma sunulmuştur. (Eliyatkin ve diğ. 2015)

Sonuçta, hedeflenen meme kanseri hastasının hangi sınıfa girdiği ve bu ait olduğu sınıfa özgü, uygun ve hedef yönelik tedavi yönteminin uygulanmasıdır. Çünkü meme kanseri de dahil olmak üzere tüm kanser tiplerinde kişiye özel ve hasta tümörüne göre hedefe yönelik tedavi uygulaması amacı gittikçe önem kazanmaktadır. (Eliyatkin ve diğ. 2015)

Mem kanserleri moleküler sınıflama tekniği ile 5 gruba ayrılır. Bunlar lüminal A, lüminal B, HER-2, bazal ve normal benzeridir. HER-2 alt grubu 3 gruba ayrılır ve her biri farklı davranış örnekleri göstermektedir. Bu 3 gruptan bir tanesi ise oldukça agresif bir karakteristiğe sahiptir. HER-2 hastalarının prognozlarında oluşan bu farklılıkları açıklamak için çalışmalar halen yapılmaktadır ve bu çalışmaların

merkezinde de farklılıkları açıklayabilecek belirleyicilerin geliştirilmesi vardır. (Eliyatkin ve diğ. 2015)

Kötü prognoza sahip bazı HER-2 pozitif meme kanseri hastaları HER2 karboksi-terminal fragmanlarının heterojen bir grubunu (p95HER2) eksprese eder. HER2'nin onkogeni olan 611-CTF bu fragmanlardan biridir. 611-CTF muhtemelen p95HER2 pozitif tümörlerin progresyonunda etkilidir. Ayrıca 16HER2 ekson 16 içermeyen bir reseptörü kodlayan HER2 izoformunun ekspresyonudur. (Eliyatkin ve diğ. 2015)

Özel olmayan duktal karsinom üzerinde birçok moleküler alt gruplama çalışması vardır. Bu heterojen grup üzerinde immunohistokimyasal belirleyicinin kullanımı ile moleküler alt gruplama yapılabilir. ER, PR, HER2, Ki-67, epidermal büyüme faktör reseptörü (EGFR) ve bazal sitokeratinlerden (CK14 ve CK5/6 gibi) oluşan bir panel "lüminal", HER2 ve triple negatif tümörleri ayırt etmek için kullanılabilir. "Bazal" tümörleri tanımlayan belirleyiciler konusu net değildir. Ancak EGFR ve CK5/6 kullanımının, bu subgrubu tanımlama ve prognozu öngörebilmeyi sağlayacağı düşünülmektedir. (Eliyatkin ve diğ. 2015)

Meme kanserinin histopatolojik özel tipleri, yaklaşık olarak %25'ini oluşturur, farklı mimari kalıplara sahiptir, klinik özelliklerle daha az ilişkilidir, özel olmayan tipte duktal karsinomdan daha iyi prognozludur. (Eliyatkin ve diğ. 2015)

Bazı özel tipler, hem özel gelişim paternini, hem de özel davranışını açıklayan spesifik genetik değişiklikler taşımaktadır. Lobüler karsinomların en tanımlayıcı moleküler özelliği, E-kadherin kaybıdır. (Eliyatkin ve diğ. 2015)

En yaygın "özel tip" invaziv lobüler karsinomdur (İLK) ve meme kanserleri içerisindeki oranı %5-15'tir.

İLK hücrelerinin temel özellikleri karakteristik sitolojik özelliklere ve diffüz bir gelişim paternine sahip olması, çoğunlukla histolojik derecesinin 2 olması ve lenfovasküler invazyonun olmamasıdır. Genellikle ER ve PR pozitifdir; HER2, p53, EGFR ve bazal sitokeratinleri ise nadiren eksprese ederler. (Eliyatkin ve diğ. 2015)

Lobüler kanserlerin ve düşük dereceli duktal kanserlerin benzer genomik profile sahip oldukları genomik analizlerde gösterilmektedir. Yüksek dereceli duktal karsinomlar ise çok farklı bir genomik profile sahiptir. Bu, ER pozitif ve düşük dereceli duktal ve lobüler tümör tiplerinin arasındaki gelişimsel ilişkinin çok yakın

olduğunu göstermektedir. Duktal ve lobüler karsinomlar arasındaki ayrımın belirsizliği ilk genomik çalışmalar sonucunda ortaya çıkmıştır. Duktal, lobüler ve tübüler gibi düşük dereceli kanserlerin, kolumnar hücre lezyonları gibi genel bir prekürsör lezyondan başlayan düşük dereceli tümör ailesi sınıfına girdiği fikri de ortaya atılmıştır. (Eliyatkin ve diğ. 2015)

Çizelge 1 Meme kanseri tiplerinin major moleküler subtipleri (Eliyatkin ve diğ. 2015)'den alınmıştır).

	Moleküler Subtip			
	Lüminal A	Lüminal B	HER2/neu	Basal benzeri*
Gen ekspresyon paterni	Lüminal (düşük moleküler ağırlıklı) sitokeratinlerin ekspresyonu ve hormon reseptörleri ile ilişkili genlerin yüksek ekspresyonu	Lüminal (düşük moleküler ağırlıklı) sitokeratinlerin ekspresyonu ve hormon reseptörleri ile ilişkili genlerin orta-düşük ekspresyonu	HER2/neu yüksek ekspresyonu, ER ve ilişkili genlerin düşük ekspresyonu	Bazal ephitelial genlerin ve bazal sitokinlerin yüksek ekspresyonu, ER ve ilişkili genlerin düşük ekspresyonu, HER2/neu düşük ekspresyonu
Klinik ve biyolojik özellikler	İnvaziv meme kanserlerinin ~%50'si, ER/PR pozitif, ER2/neu negatif	İnvaziv meme kanserlerinin ~%20'si, ER/PR pozitif, HER2/neu ekspresyonu değişken (+ ya da -), Lüminal A'dan daha yüksek proliferasyon, Lüminal A'dan daha yüksek histolojik dereceli	İnvaziv meme kanserlerinin ~%15'i, ER/PR negatif, HER2/neu pozitif, Yüksek proliferasyon, yaygın TP53 mutasyonu, yüksek histolojik derece ve nodal pozitiflik oranı	İnvaziv meme kanserlerinin ~15'i, çoğu ER/PR ve HER2/neu negatif (triple negatif), yüksek proliferasyon, yaygın TP53 mutasyonu, BRCA1 disfonksiyonu (germline, sporadic)
Histolojik kolerasyon	Tübüler karsinom, kribriform karsinom, düşük dereceli invaziv duktal karsinom, NOS Klasik lobüler karsinom**	İnvaziv duktal karsinom, NOS mikropapiller karsinom	Yüksek dereceli invaziv duktal karsinom, NOS	Yüksek dereceli invaziv duktal karsinom, NOS metaplastik karsinom, medüller karsinom
Tedaviye cevap ve seyir	Endokrin tedaviye cevap	Endokrin tedaviye cevap (tamoksifen ve aromataz inhibitörleri) Lüminal A kadar iyi olmayabilir	Trastuzumaba (Herceptin) cevap	Endokrin tedaviye ya da trastuzumaba (herceptin) cevap yok
	Kemoterapiye değişken cevap daha iyi	Kemoterapiye cevap değişken	Antrasiklin grubu kemoterapiye cevap	Platinum grubu kemoterapiye ve PARP inhibitörlerine duyarlı
	İyi prognoz	Prognoz, Lüminal A kadar iyi değil	Genellikle kötü prognoz	Tümü değil ama genellikle kötü prognoz

* Bazal benzeri tümörlerin grubunda bazal tip (yüksek moleküler ağırlıklı) sitokeratin eksprese eden ve triple negatif fenotip gösteren, fakat düşük proliferasyonlu low-grade bir grup (adenoid kistik karsinom gibi) bulunmaktadır.

** Klasik lobüler karsinom genellikle lüminal A özellikleri gösterir, pleomorfik lobiler karsinom ise sıklıkla diğer subtiplerin özelliklerini gösterir.

4. İMMÜN SİSTEM

Bağışıklığın (immünite) genel tanımı bireyin hastalıklara özellikle enfeksiyon hastalıklarına gösterdiği direnci kapsamaktadır. İmmün sistem bağışıklığı sağlayan hücre, doku ve moleküllerin bütünüdür. İmmün yanıt ise immün sistemi oluşturan bileşenlerin enfeksiyona yol açan mikroorganizmalara verdiği düzenli ve eşzamanlı tepkidir. İmmünoloji, immün sistemin patojenlere ve zedelenmiş dokulara karşı verdiği immün yanıtlarının araştırıldığı bir daldır. İmmün sistemin en önemli fizyolojik işlevi, enfeksiyonları engellemek ve yerleşen enfeksiyonları ortadan kaldırmaktır. (Abbas ve diğ. 2014)

İmmünite tanımının altında yatan gerçek, organizmanın yabancı ve zararlı olan her türlü maddeye (mikroorganizma, protein ve polisakkarid gibi) verdiği tepkidir. İmmün sistem bileşeni olan hücre ve moleküller karşılık ve düzenli etkileşimleri ile bir savunma ortaya koyarlar. Buna immün yanıt adı verilir. Antijen ve immünojenler immün yanıtın başlatılmasında rol oynayan yabancı maddelerdir.

4.1. İmmün Yanıtın Özellikleri

Özgüllük (spesifite): Özgüllük, antijenlerin lenfositler tarafından tanınmasına dayanmaktadır. Lenfositler antijenlerin belirli kısımlarını tanır ve bu kısımlara “antijenik determinant” ya da “epitop” adı verilir. İmmün yanıtın özgül olmasını sağlayan iki yanıt vardır. Bunlardan ilki “primer immün yanıt”tır. Primer immün yanıt, konakçıda yer alan antijen spesifik lenfosit klonların daha önce spesifik antijen ile karşılaşmamış olduğu için, her türlü antijene reaksiyon vermesiyle başlar. Organizmaya yabancı antijen girdiğinde, antijene özgü yüzey reseptörü bulunduran klon aktive olur ve çoğalır. Çoğalan lenfositlerin bir kısmı bellek hücresi olarak farklılaşır. Primer immün yanıt bu şekilde oluşmuş olur.

Aynı antijenin organizmaya tekrar girmesi sonucu, daha önce bir o antijene özgü immünizasyon oluştuğundan, antijen spesifik lenfositler klonal bir biçimde genişler. Bu yüzden oluşan immün yanıtın süresi düşük ancak daha kuvvetli olduğu gözlemlenir. Aynı antijenin ikinci kez karşılaşılması ile oluşan bu sürece de “sekonder immün yanıt” adı verilir.(Düzgün 2014)

Çeşitlilik (Diversity): Antijen, bir klondaki lenfositlerin reseptörleri ile tanınmaktadır. Birçok farklı antijen, memeli immün sistem tarafından tanınabilmektedir. Buna “Lenfosit Repertuarı” adı verilmektedir. Repertuarın genişliği

ise lenfosit klonundaki antijen reseptörleri üzerinde antijen bağlanma yerinin farklılaşmasına bağlıdır.

Hafıza (Bellek): İmmün sistemin, sekonder immün yanıt olarak da bilinen, antijenle tekrar karşılaşmasında ortaya çıkan daha hızlı ve daha kuvvetli bir tepkisi vardır. Bu tepkinin hızlı ve kuvvetli olması özelliğine immünolojik bellek (hafıza) denmektedir. Antijenle her karşılaşma, organizmadaki antijene özgü lenfosit klonlarının artmasına neden olur. Bellek hücreleri uzun ömürlüdür.

Otoregülasyon: İmmün yanıtın tamamlanması için antijenik uyarının ortadan kalkması gerekmektedir. Antijenik uyarı, antijenin ve onu taşıyan hücrenin yok edilmesi ile ortadan kalkar. İmmün yanıtın uyarının kalkması ile tamamlanması kendi kendini sınırlaması anlamına gelmektedir. (Düzgün 2014)

Kendini yabancı olandan ayırt etme: “Self – non-self ayrımı” olarak bilinen bu özellik, immün sistemin yapısında bulunan antijenlerin diğer antijenlerden ayırt etme özelliğidir. Bu özellik primer lenfoid organlarda, lenfositlerin gelişmesi esnasında kazanılır. İmmün yanıt kendi bünyesindeki antijenlere karşı oluşmaz. Buna immün tolerans (self tolerans) denilir. Otoimmün hastalıkların gelişme nedeni de immün toleransın bozulmasıdır. (Düzgün 2014)

4.2. İmmün Tolerans

İmmün toleransın oluşmasını sağlayan antijenlere tolerojen denmektedir. Buna karşılık immün yanıt oluşmasını sağlayan antijenlere ise immünojen adı verilmektedir. Self antijenler, besin maddeleri ve kommensal bakteriler immün tolerans gösterilmekte olan başlıca antijenlerdir. İmmün tolerans iki şekilde gerçekleşmektedir; (Düzgün 2014)

- Santral tolerans; self antijenlere tepki oluşturan lenfositler yok edilir. Bu işlem T lenfositler timusta olgunlaşma süreci içerisindeyken gerçekleşir. Buna klonal delesyon denilir. Kemik iliğinde B hücre toleransını sağlamak için immatür B lenfositlerin delesyonu ve reseptör kurgulama gerçekleştirilir.

- Periferik tolerans; timusta delasyona uğramayan self lenfositler kontrol altında tutulur. Kontrol altında tutuldukları yer lenfoid organlardır. Lenfositlerin kontrol altında tutulmasını, klonal anerji, klonal ihmal, regülatör T hücreleri ve süpresör sitokinlerin gibi mekanizmalar sağlar. Periferik lenfoid organlarda periferik B hücre toleransı gerçekleşmesi için anerji, delesyon gibi mekanizmalar mevcuttur.

Travma, infeksiyon, inflamasyon veya iskemi, immün sistemle hiç karşılaşmamış self antijenlerin (sekestre antijenler) ortaya çıkma işaretleridir. İmmün yanıtın oluşması bu antijenlerin ilk defa immün sistem ile karşılaşması ile oluşmaktadır. Bu da sempatik oftalmi, orşit veya deneysel ensefalit gibi klinik patolojilerin ortaya çıkmasına neden olur.

Vücudun kendi yapılarına karşı kontrol edilemeyen yanıtı, otoimmün reaksiyonlar ve doku/organ hasarı ile sistemik veya organa özgü “otoimmün hastalıklar”ın ortaya çıkma nedeni olarak tolerans mekanizmasındaki bozukluklar gösterilebilir. (Düzgün 2014)

4.3. İmmün Yanıt

İmmün yanıtı oluşturan savunma sistemi iki gruptan oluşmaktadır ve bu gruplar birbirinden bağımsız değildir. Doğal (innate) ve edinsel (adaptif) immünite bu iki grubu oluşturmaktadır. İki grubun temel özellikleri Tablo 3’te verilmiştir. (Düzgün 2014)

Çizelge 2 Doğal ve Edinsel immünitenin genel özellikleri (Düzgün 2014’ten alınmıştır)

Doğal (Innate) İmmünite	Edinsel (Adaptif) İmmünite
Fizik Bariyerler	
Deri ve mukoza epiteli	-
Hücreler	
Nötrofil Monosit/makrofaj Doğal öldürücü hücre (NK)	T ve B Lenfositler
Solubl Faktörler	
Kompleman proteinleri Akut faz proteinleri Sitokinler Enzimler	İmmünglobulinler Sitokinler
Gelişme Süreci	
Hızlı gelişir (saatler içinde)	Yavaş gelişir (günler içinde)
Antijene Spesifik Oluşu	
Antijene spesifik olmayan immünite	Antijene spesifik immünite
Hafıza	
Yok	Var

4.3.1. Doğal İmmünite

İnsanlar temas, yutma ve inhalasyon yoluyla günlük olarak milyonlarca potansiyel patojene maruz kalmaktadır. Enfeksiyonu önleme kabiliyetimiz kısmen

belirli patojenlerle önceki karşılaşmaları hatırlayan ve tekrar saldırı düzenledikçe onları yok eden uyarlanabilir bağışıklık sistemine bağlıdır. Bununla birlikte, adaptif immün yanıtlar, yeni bir patojene ilk maruz kalınması üzerine yavaştır, çünkü B ve T hücrelerinin spesifik klonları aktive edilmeli ve genişlemelidir. Bu nedenle, yanıtların etkili olabilmesi bir hafta kadar sürebilir. Buna karşın, bir saatte ikiye katlanan tek bir bakteri, tek bir günde yaklaşık 20 milyon yavru, tam şişmiş bir enfeksiyon üretebilir. Bu nedenle, ilk kritik saatler ve yeni patojenlere maruz kalma günlerinde, enfeksiyondan korunmak için doğal bağışıklık sistemine güvenilmektedir.(Alberts ve diğ. 2015)

Doğal bağışıklık tepkileri, adaptif bağışıklık yanıtlarının olduğu şekilde belirli bir patojene spesifik değildir. Patojenlerin korunmuş özelliklerini tanıyan ve istilacıların yok edilmesine yardım etmek için çabucak harekete geçirilen bir grup protein ve fagositik hücreden yararlanırlar. Uyarlanabilir bağışıklık sistemi, 500 milyon yıldan daha kısa bir süre önce evrim geçirmiş ve omurgalılarla sınırlıyken, hem omurgalıların hem de omurgasızların yanı sıra bitkilerde doğal immün yanıtlar bulunmuştur ve bunları düzenleyen temel mekanizmalar korunmaktadır. Omurgalılarda doğuştan gelen bağışık yanıtlar, adaptif immün yanıtları aktive etmek için de gereklidir. (Alberts ve diğ. 2015)

Doğal immünite, ilk savunmadır, spesifik değildir ve özgül olmayan yanittir. Doğal immüntenin en önemli elemanları arasında doğal öldürücü hücreler, akut faz proteinleri, fagositik hücreler, eozinofiller, makrofajlar, nötrofiller, sitokinler ve kompleman sistemidir. Bunların organizmayı koruma yolu yabancı ve zararlı maddeleri ayırım yapmaksızın elemine etmesi ya da engellemsidir. Doğal immün yanıt uzun süreli bağışıklık sağlamamasına rağmen, ilk 0-4 saat içinde gelişmeye başlar. Ancak yabancı ile her karşılaştıklarında aynı şiddette karşılık verirler çünkü hafızaları yoktur. Görevi edinsel immün sisteme yabancı antijenlerin tanıtımını ve uyarısını yapmaktır. (Düzgün 2014)

4.3.2. Edinsel İmmüntenin Genel Özellikleri

B ve T lenfositleri aracılı olan uyarlanabilir immünite, yeniden düzenlenmiş yüksek afiniteli reseptörler vasıtasıyla patojenleri tanır. Bununla birlikte, adaptif bağışıklığın kurulması, hücre proliferasyonunu, gen aktivasyonunu ve protein sentezini içerdiğinden mikroorganizmaları yok edecek kadar hızlı değildir. Germline

çizgisi tarafından kodlanmış kalıp tanıma reseptörleri (PRR) tarafından işgalci patojenlere tanınan doğal immünite sayesinde daha hızlı savunma mekanizmaları sağlanmaktadır. Son yıllardaki kanıtlar, bu tanımın esas olarak TOLL benzeri reseptör ailesine (TLR) bağlanabileceğini göstermektedir. Patojenle ilişkili moleküler kalıpların (PAMP) TLR'ye bağlanması reaktif oksijen ve azot ara ürünleri (ROI ve RNI), pro-inflamatuar sitokinlerin üretimini indükler ve birlikte uyarıcı moleküllerin ekspresyonunu yukarı düzenler ve ardından adaptif bağışıklığı başlatır. (Werling ve Jungi 2003)

Antijene spesifik oluşu ve hafıza oluşturması edinsel immüntenin en belirgin iki özelliğidir. Antikor ve hafıza T hücreleri yardımıyla uzun süreli bağışıklık sağlamaktadır. Sistemin ana özelliği bir ajanla ilk karşılaşmasında uyarılması sebebiyle spesifik yanıt veren ve hafıza kullandığından sonraki karşılaşmalarda daha kuvvetli yanıt oluşturmasıdır. Antikorlar, sitokinler ve B ile T lenfositleri en önemli elemanlarıdır. Spesifik immünite pasif veya aktif yollarla gelişir. Aktif immünite, hücreleri ve humoral maddeleri ile yabancı antijene karşı oluşturduğu yanıtıdır. Enfeksiyon ile oluşan immünite ya da aşılardan sağlanan immünite buna örnek olarak verilebilir. Pasif immünite ise immün olmayan bireye spesifik olarak immünize olmuş bireyden hücrelerin veya serum aktarılması ile oluşur. (Düzgün 2014)

5. TÜMÖR

Tümör ve kanser terimleri bazen birbirinin yerine kullanılır ve yanıltıcı olabilir. Bir tümör mutlaka bir kanser değildir. Tümör kelimesi basitçe bir kütleyle işaret eder. Örneğin, bir sıvı kümesi bir tümörün tanımını karşılayabilmektedir. Bir tümör, yaygın olarak kullanılan, ancak spesifik olmayan, bir neoplazm terimidir. Bir kanser, özellikle tehdit edici bir tümör türüdür. Olası bir kanser teşhisi konusunu tartışırken bu ayrımların açıkça görülmesi faydalıdır. Bu, iyi huylu (genellikle zararsız) veya habis (kanserli) büyümeleri ifade edebilen genel bir terimdir.(Johns Hopkins University 2018)

5.1. Benign Tümörler

İyi huylu tümörler malign olmayan/kanserli olmayan tümörlerdir. İyi huylu bir tümör genellikle lokalizedir ve vücudun diğer bölgelerine yayılmaz. Çoğu benign tümör tedaviye iyi yanıt verir. Bununla birlikte, tedavi edilmediği takdirde, bazı benign tümörler büyüyebilir ve boyutlarından dolayı ciddi hastalıklara neden olabilirler. İyi huylu tümörler de malign tümörleri taklit edebilir ve bu nedenle bazen tedavi edilirler. (Johns Hopkins University 2018)

5.2. Malign Tümörler

Malign tümörler kanserli büyümelerdir. Genellikle tedaviye dirençlidir, vücudun diğer bölgelerine yayılabilir ve çıkarıldıktan sonra bazen tekrarlarlar. (Johns Hopkins University 2018)

5.3. Tümör Gelişimi ve Kişinin Bağışıklık Sistemi

Bağışıklık sisteminde gerçekleşen değişimler tümör gelişimi sırasında göze çarpmaktadır. Makrofaj, lenfosit, granülosit gibi hücreler bağışıklık sisteminin önemli hücreleridir ve kanser öncüsü odaklar gibi erken lezyonları kuşatırlar. (Kornstein ve diğ. 1983) TIL'in ileri tümör evrelerinde (kalın bağırsak, ağız içi, meme gibi tümörlerde) hasta yaşam süresini uzattığı yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur. (Kırmaz 2018)

TIL hücreleri kanserli hasta kanlarından elde edilmiştir. Elde edilen bu hücreler olgunlaştırılıp çoğaltılarak anti-tümör fonksiyonları denenmiştir. Yapılan laboratuvar deneyleri öncül STL'lerin dolaşımında ya da tümör bölgesinde görüldüğünü işaret etmektedir. Bunun yanında dolaşımında görülen diğer hücreler de tümörün protein

parçacıklarına özgül cevap veren T hücreleridir. Bu çalışmalar sonucunda aslında organizmanın tümörü tanıyarak, genel ve bölgesel bir immün yanıtın oluşturulduğu ortaya çıkmıştır. (Kırmaz 2018)

Bağışıklık sisteminin kanseri tanınmasına rağmen, kanser ilerlemesinin neden durdurulmadığına dair sorunun cevabı olarak; bağışıklık sisteminin enfeksiyonu tehlike olarak görerek bakteri ve virüsler için antikor üretiyor olması ve tümörle ilişkili yapıların (antijenler) (TİA) vücut antijeni gibi kabul edilip verdiği yanıtın yetersiz kalması söylenebilir. TİA'e karşı immünolojik bir tolerans vardır çünkü kanser otoimmün bir fenomen gibi görülmektedir. Bu da TİA'e karşı etkili bir immün yanıtın oluşmasını engellemektedir. Buna ilaveten tümörün saldıdığı ve bağışıklık sistemini baskılayan bazı faktörler de etkin bir immün yanıtın gelişmesine engel olan önemli bir etkidir. (Kırmaz 2018) Malign tümör hücrelerine karşı gelişen immün yanıt, lokal (bölgesel) ve sistemik (genel) olarak sınıflandırılabilir. (Kırmaz 2018)

5.4. Tümör Etrafındaki Bağışıklık Sistemi Hücreleri

5.4.1. T Hücreleri

T hücreleri antijene spesifik yanıtları veren hücrelerdir. İki tip T hücre yanıtı vardır. Bunlardan birincisi antijeni ekspres eden hücrelerin etkisizleştirilmesi yani sitotoksitedir. Sitotoksitede Tc etki göstermektedir. İkinci tip yanıt eflamasyonları etkileyen sitokinlerin salgılanmasıdır. Buna gecikmiş hipersensitivite adı verilmektedir. Gecikmiş hipersensitivitede etkin hücre Th'tir. Hücre içi patojenlerin (bazı bakteri ve parazitler, tüm virüsler) yok edilmesi işlemini bu iki tip hücre gerçekleştirmektedir. CD4+ ve CD8+ T hücrelerinin yanıt verdiği antijenler ASH tarafından peptidlere dönüştürülmüş olan protein antijenlerdir ve bunlar sırasıyla MHC-II ve MHC-I molekülleri olduğunda sunulmaktadır. Bazı bakteriler fagosite edildikten sonra, fagozomdan kaçabilirler ya da fagozomdan sitozole taşındıklarında fagositik hücrelerin mikrobisidal etkisinden kurtulabilirler. Bu durum CD8+ T hücrelerinin uyarılması ile takip edilir. Tc enfekte olan bu hücelere saldırı ve onların yıkılmasını sağlar. Bu durum hücre içi bakterilerin yıkımında hücrel immünitenin rolünü göstermektedir. Hücrel immünite CD8+ T hücreleri ve CD4+ T hücreleri tarafından aktive edilen makrofajların ortak çalışması sonucunda oluşmaktadır. (Deniz 2007)

Yardımcı T hücre reseptörleri antijenlerin tanınmasında doğrudan etkilidir. Sitokin üretimi, proliferasyon ve belirli hücre yüzey molekül ekspresyonu, T hücre aktivasyonunu karakterize etmektedir. Yüksek afiniteli interlökin-2 (IL-2) reseptörü, HLA-DR ve CD38, fenotipik aktivasyon moleküllerini oluşturmaktadır. İlaveten, bellek lenfositlerini CD45RA taşıyan naif T hücre popülasyonundan ayıran CD45RO ekspresyonudur.(Deniz 2007)

TIL'ler tümör bölgesinde en fazla görülen bağışıklık sistemi hücreleridir. Tümörün ilerlemesi bu hücrelerin fonksiyonlarının değişmesine neden olmaktadır. Örneğin, metastatik hastalığı olan bireylerde TIL fonksiyonları, erken evre tümörlü bireylerinkinden daha bozuktur. Tümörün evresi ilerledikçe bağışıklık sistemi hücreleri üzerindeki baskının arttığı bu şekilde ortaya çıkmaktadır. Yani tümörler de kişilerde bir bağışıklık sistemi yetmezliği yaratmaktadır. Tümör çevresinde yer alan CD4+ ve CD8+ T hücrelerinin fonksiyonlarının bozuk olduğu yapılan çalışmalarla bulunmuştur. Fonksiyonlardaki bozuklukların derecesi saptanarak, hastalığın gidişatı ve yaşam süresi tahmini yapmak mümkün olabilmektedir. (Deniz 2007)

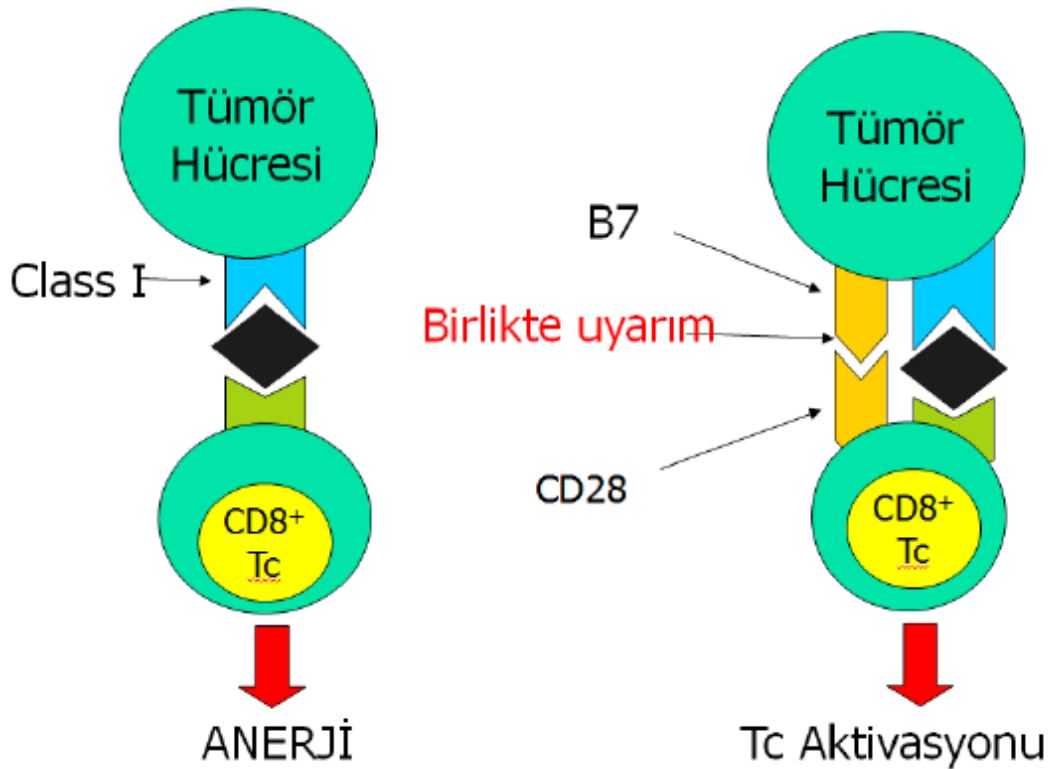
6. KANSER GELİŞİMİNDE BAĞIŞIKLIK SİSTEMİ BAĞINTISININ MEKANİZMASI

6.1. Tümör Mikroçevresinin Oluşum Mekanizmaları

CD8 T hücrelerinin gerekli antineoplazik cevabı oluşturamaması selim başlangıçlı neoplazilerin maligneye dönüşmesine neden olur.

CD8 T hücreleri dokularda gezerken ASH'lerden aldığı antijenik raporlara göre, MHC-1 reseptörlerini tarayarak tüm hücrelerdeki biyokimyasal durumu kontrol eder, tehditleri arar. Tehdidi algılayınca sitotoksik saldırı yapar ve IL2 IFN γ gibi mediatörleri yüksek konsantrasyonda salgılayarak immün sistemi bölgeye çağırır. Bu işlemlerle tümör bir odakta sınırlanır veya yok edilir. Tümörün selim durumdan malign forma geçmesi onun immün sistemden kaçma becerisi kazanması demektir bu da immün sistemce iyi algılanamayıp yıkılamaması anlamına gelir.

Kanser immunoterapisine cevap hastanın immün geribildirim mekanizmalarının durumuna bağlıdır ve öznedir.(Bektaş 2015)



Şekil 6.1 Tümör hücrenin reseptör ekspresyon bozukluğu T hücre anerjisine yol açar (Bektaş 2015)'ten alınmıştır.

Sitotoksik T hücrelerinin herhangi bir sitotoksik saldırı yapması için herhangi bir zararlı hücreyle bağlantı kurmasını sağlayan reseptörler vardır. B7 koduyla ifade edilen CD28 monoklonal tümör hücre reseptörlerinin kötü diferansiyel ileri evre tümör mikroçevresi hücrelerinde kaybolduğu gözlenmiştir. Bu durum T hücrelerini anerjiye sokmakta maligniteye neden olmaktadır.

Kanserin olası çözümü CD8 T hücrelerini tümör mikroçevresine karşı uyarmak üzerine geliştirilebilecek etkin immünoterapiden geçmektedir (Bektaş 2015)

Buradaki sorunu çözmek için teorik olarak oluşturabileceğimiz bir tedavi yönteminde; Sitotoksik T hücrelerini kanser antijenlerini iyi algılaması-yapışması için tümör hücrelerindeki kötü diferansiasyondan dolayı kaybolan tümör mikroçevresi antijenlerinin tekrar oluşturmasını sağlamak, kanser eradikasyonunda etkili olabilir.

Genetik mühendisliği sayesinde retrovirüslerin boşaltılan genetik materyal kısmına istenen gen eklenmiş, retrovirüslerin yüzey antijenleriyle oynanarak istenen dokuyu invaze etmeleri sağlanmıştır. Retrovirüsler özellik olarak taşıdığı materyali direkt olarak konağın DNA'sına ekler. Yapay transgenik retrovirüslere eklenen B7 reseptörü ve IL-2 geni retrovirüslere eklenerek malign tümör dokusu hedeflenerek

retroviral invazyonu sağlanırsa, neoplastik doku B7 ve IL-2 gibi T hücrelerinin antitümoral saldırısını artıran faktörler üretecektir; zaten immunoterapilerin temel hedefi de T hücrelerini kansere karşı "uyandırmaktır". (Bektaş 2015)

Immünoterapilerde prensip olarak; hastadan alınan biyopside tümör mikroçevresi dokusunda etkin sitotoksik saldırıda bulunan T lenfositler ayıklanır. Bunlar hücre kültürlerinde sitokinlerle çoğaltılır. Genetik mühendisliği işleviyle retrovirusler kullanılarak T lenfosit genlerine kanserli hücre antijenlerine daha iyi tutunmalarını sağlayacak reseptörler eklenir. Sonuçta tümoral dokuya daha şiddetli bir saldırı yapacak T hücreleri hastaya nakledilerek tümör eradikasyonu sağlanır. (Bektaş 2015)

6.2. T Hücre Edinilmiş Bağışıklık Yanıtının Kullanılması

T hücreleri dokularda gezerken MHC-1 reseptörlerini tarayarak tüm hücrelerdeki biyokimyasal durumu kontrol eder, bir sorun algılayınca sorunlu dokuya sitotoksik saldırı başlatır ve tümörü sınırlar. Malignleşen tümör ise, selim dönemlerinde sahip olduğu, kendi dokusuna özgün antijenlerini (farklılaşma faktörlerini) özellikle MHC-1 sunum reseptörlerini kaybettiği için MHC-1 reseptörlerini tarayan T lenfositler tarafından CD8 bağımlı sitotoksikiteye uğrayamaz, böylece T hücreleri "uyuşturulmuş" olur. Bu nedenle selim tümör dokusu, immün saldırı sayesinde bir odakta sınırlandırılıyorken, malignleşince artık bu olamaz ve odaktan yayılan kanser hücreleri, multisistemik metastaz yaparak öldürücü onkolojik döngüyü başlatır.

ASH ise burada devreye girer ve malignleşen tümör dokusunda sergilenen çok çeşitli tümör mikroçevresi antijenlerini fagosite eder işler ve MHC-2 reseptörlerine ekleyerek T hücre reseptörlerine sunar. ASH'ler dolaylı olarak malignleşmiş tümör dokusunun immün saldırıyla kısmen sınırlandırılmasında çok önemli bir yere sahip olmuş olur. Bu sayede ASH'ler tarafından spesifik tümör mikroçevresi antijenlere karşı uyarılan T lenfositler, malignleşmiş tümör dokusuna saldırıya geçebilme yetisi kazanır. Bu nedenle malign bir tümör odağından alınan biyopsi incelenince bu tümörü sınırlamaya çalışan T hücre grupları azınlıkta olmak üzere büyük çoğunlukta "uyuşturulmuş ve immünolojik olarak susturulmuş" T hücrelerine rastlanır. Kanser immünokemoterapisi de; işte bu "uyuşturulmuş ve susturulmuş" T hücre grupları yerine; tümörü sınırlamaya çalışan T hücre gruplarını koyma üzerine bir yöntem olarak

devreye girer. Kanser immünokemoterapisi yapay otoimmünite oluşturarak çoğu malign tümör tiplerinin tedavisinde oldukça önemli başarılar elde etmiştir. Malign tümör mikroçevresi hücrelerini öldürmüş metastazları belirgin şekilde engelleyebilmiştir.

7. İMMÜNÖTERAPİ

İmmün sistemin kanser tedavisinde uygun yöntemlerle aktive edilip kullanılması immünoterapiyi oluşturmaktadır. İmmünoterapide kanser hücrelerinin immün sisteme ait hücreler vasıtasıyla yok edilmesi amaçlanmaktadır.(Şakalar ve diğ. 2013)

Geleneksel kanser terapileri üzerindeki avantajlar: Bağışıklık sistemi, çok seçici olduğu için enfeksiyona karşı korumada mükemmeldir ve yalnızca hedef hücrelere saldırılmaktadır. Kanser immünoterapisinin benzer bir avantajı vardır, kanser hücreleri için oldukça seçicidir ve kişiselleştirilmiş tıbbın bir formu olan hastanın bireysel kanserine potansiyel olarak uyarlanabilir. (British Society for Immunology 2013)

İmmünoterapinin avantajları şunları içerir:

- Bazı durumlarda geleneksel terapilere göre daha az yan etki görülür. Kemoterapi ve radyoterapi, kanserli olmayan hücrelere zarar veren ve genellikle hoş olmayan yan etkilerle (örn., Saç dökülmesi, bulantı vb.) ilişkili spesifik olmayan tedavilerdir. İmmünoterapilerin yan etkileri yoktur.

- Uzun süreli kanser remisyonu olasılığı vardır ve kansere karşı uzun süre dayanabilen bir bağışıklık sistemini uyararak nüks riskini azaltır.

- Birçok farklı kanser türünün tedavisinde etkili bir yol olabilir - bilindiği kadarıyla, bağışıklık sistemi tüm kanser türlerini doğru koşullar altında yok edebilir. Sorun, bağışıklık sisteminin çalışmasına izin veren tedavilerin tasarlanmasıdır. (British Society for Immunology 2013)

Zorluklar: Kanser immünoterapisi geliştirmekte olan bir alandır ve kanser immünoterapisinin tam potansiyelinin gerçekleştirilmesi için halen üstesinden gelinmesi gereken bir takım zorluklar bulunmaktadır. Kanser immünoterapisi, "hepsi uyan tek bir boyut" değildir. Yani, bir tedavinin belirli bir hasta için geçerli olabileceği başka bir hasta için çalışmayabilir. Muhtemelen kanser tedavisinin geleceği, muhtemelen konvansiyonel tedavilerle birlikte kullanılan ve uzun süreli hatta yaşam boyu kullanım için potansiyel olan birkaç bireysel immünoterapiyi içerecektir. (British Society for Immunology 2013)

Hâlihazırdaki ana zorluklar şunları içermektedir:

- Özellikle hastanın bireysel bağışıklık hücrelerinin mühendisliğini içeren tedaviler için emek yoğun ve yüksek maliyet.

- Hastaları, kanserlerin moleküler/immün karakterizasyonu ile tanımlanan çok özel alt gruplara ayırmayı gerektirir; Bu şu an çok zayıf bir şekilde anlaşılacak bir alan.

- Şu anda uzun vadeli etkiler ve etkililik bilinmemektedir. (British Society for Immunology 2013)

İmmünoterapinin amacına ulaşması temelde 3 metotla sağlanabilir. Bunlar Kanser aşılı kullanımı, spesifik antikörlerin hastaya verilmesi ve tedavi amaçlı hücre transferi yöntemleridir.

7.1. Kanser Aşılı

Yapılan çalışmalarda birinci yöntem olan aşılama yöntemi birçok farklı kanser türünde denenmiştir. Peptid, DNA ya da protein aşılı reseptörleri ya da kanser oluşumunda üretimi artmakta olan büyüme faktörlerini hedef alırlar. Bu aşılıların denenmesi farklı adjuvantlarla beraber olmuştur. Aşılama denemeleri farklı antijen grupları üzerinde gerçekleştirilmiştir. Örneğin bu gruplardan biri dokulara özel farklılaşma antijenleri içeren bir gruptur. Bu gruba örnek olarak hedeflenen protein melanoma için TRP2 proteindir. Buna benzer olarak tümör büyümesini destekleyen ve tümörde üretimi anormal derecede artmış faktörleri kapsamaktadır. Bu antijenlere örnek olarak da meme kanserinde kötü prognozla ilişkilendirilen HER2 verilebilir. EGFR üzerine odaklanmış olan çalışmalar da kolon kanseri için yapılmaktadır. Aşılama yönteminde çalışmalara konu olan üçüncü grup ise germ hücrelerini ve kanser-testis antijenlerini kapsamaktadır. Kanser-testis antijenleri kanser hücrelerinde üretilir ve normal dokularda yer almaz. NY-ESO-1 kanser antijeni de aşı çalışmalarında çeşitli kanser türleri için hedef alınmıştır. Aşı modelleri klinik çalışmalarda denenmektedir çünkü prelinik fare modellerinde olumlu sonuçlar elde edilmiştir. Ancak klinikte uygulanacak şekilde üretilmiş bir kanser aşısı elde edilememiştir. Kanser aşılı çalışmaları monoklonal antikörlerle ilgili çalışmaların tabanını oluşturur. Kanser aşısı henüz üretilmemesine rağmen aşı çalışmalarının sağladığı en önemli faydalardan biri de budur. (Şakalar ve diğ. 2013)

7.2. Spesifik Antikorların Hastaya Verilmesi

İmmünoterapide yer alan ikinci yöntem, belirli antikorların hastaya verilmesine dayanmaktadır. İmmün terapi yöntemlerinde klinik uygulamalarda en çok kullanılmış olan ve onaylanan antikorlar monoklonal antikorlardır. Trastuzumab, Cetuximab, Bevacizumab, Alemtuzumab, Rituximab gibi monoklonal antikorlar ilaç olarak üretilmiş olan en önemli antikorlardır. Bu antikorlar başlıca olarak kolon, meme kanseri ve çeşitli lösemileri hedef almaktadır. VEGF, EGFR, HER2 gibi kanseri destekleyen büyüme faktörlerini veya CD52 ve CD20 gibi kanser hücrelerinde üretilen antijenler bu antikorların hedefindedir. İleri melanom hastalarında Ipilimumab monoklonal antikorunu kullanılarak bazı başarılar elde edilmiştir. Bu antikor çok yenidir ve sitotoksik T lenfosit antijen-4 (CTLA-4) adlı antijeni bloke ederek kanserin immün sistemi inhibe etmesini engeller. (Şakalar ve diğ. 2013)

7.3. Terapi Amaçlı Hücre Transferi

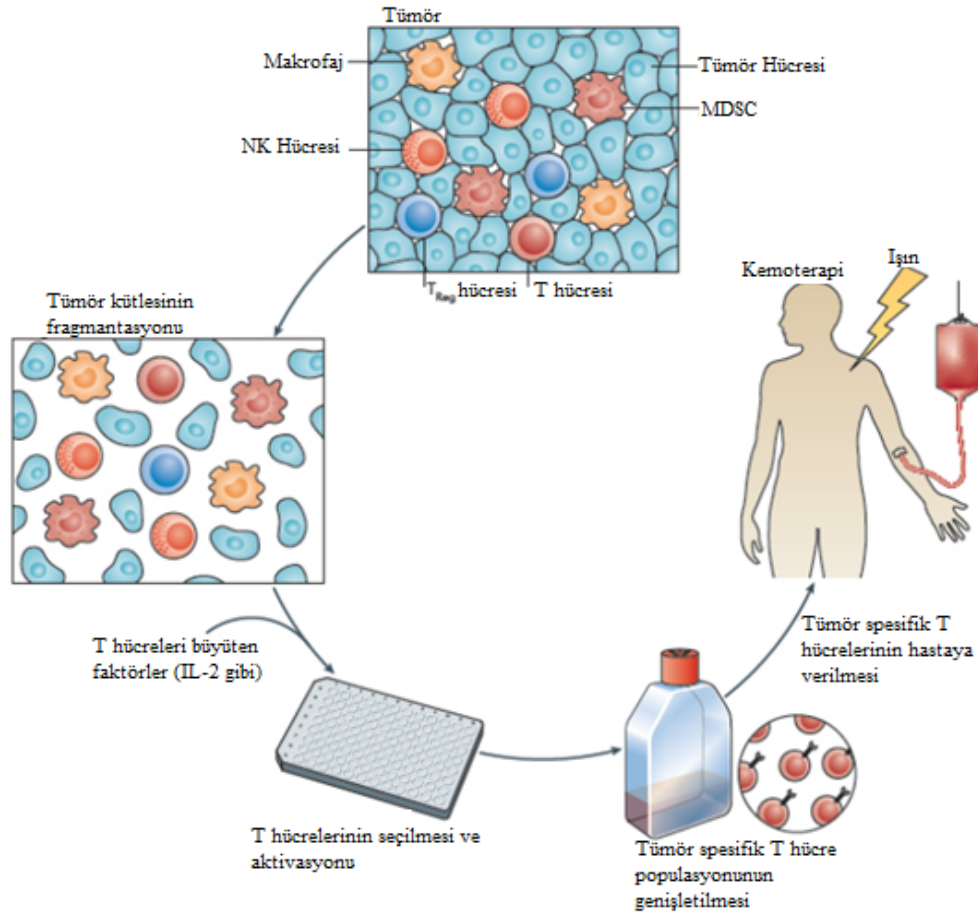
İmmün sistem hücrelerinin hastaya transferi üçüncü yöntemdir. Bu immün sistem hücrelerine sitotoksik T lenfosit ya da DH örnek olarak gösterilebilir. T lenfosit ya da DH aktarımı yakın zamanda klinik onay almıştır. Bu aktarım prelinik çalışmalarda yaygın olarak kullanılmıştır. Klinik onay DH kullanılan yaklaşım için alınmıştır. İnkübasyon işlemi hastadan alınan DH'in hedef antijenin birlikte hücre kültür ortamında inkübe edilmesiyle gerçekleşir. Kültür ortamı tasarlanırken DH'in aktive edilmesini, antijeni alarak sunuma hazır hale getirmesini ve T lenfositleri uyarmaya uygun olgunlaşmayı gerçekleştirmesini sağlayacak biçimde olmasına dikkat edilmiştir. Prostat kanserlerinin yaklaşık %95'inde DH aşısı, üretilen protatik asit fosfataz (PAP) antijeni ile hazırlanır. İleri evre metastatik prostat kanserli hastalarda Sipuleucel-T adlı hücre aşısı kullanılmıştır. Bu aşı hayatta kalma oranını artırmayı başarmış ancak bu artış çok dikkat çekecek düzeye çıkmamıştır. Sipuleucel-T, PAP adlı farklılaşma antijenini hedef almak için DH'lerin kültür ortamında uyarılarak hastaya verilmesini içeren bir aşıdır. Bu hayatta kalım süresinin uzaması tedaviye zor yanıt veren ileri evre metastatik prostat kanserlerinde gerçekleşebildiğinden dolayı ileriki çalışmalara bir umut ışığı tutmaktadır. (Şakalar ve diğ. 2013)

8. TIL

8.1. TIL Tanımı

TIL'ler fenotip çeşitliliği, antijen spesifikliği, avidite ve fonksiyonel özellikleri ile karakterizedirler. TIL popülasyonu organizma dışı (ex vivo) aktive edilip çoğaltılarak tümör taşıyan konağa tekrar nüfuz edilebilir. (Restifo ve diğ. 2013)

Tümör spesifik T hücrelerinin aktivasyonu için özel ASH'ler tarafından sunulan tümörle ilişkili antijenlerle karşılaşması gerekmektedir. İlaveten, aktif T hücreleri tümörün hücre yüzeyinde sunulan antijenleri tanıyabilir. Tümör spesifik T hücrelerinin göçünün aynı kökene sahip antijenlerle karşılaştığında durduğu organizma içi (intravital) görüntüleme teknikleri ile gösterilmiştir. Bu gözlemler melanomalı hastalarda TIL popülasyonunun izole edilip çoğaltılabileceğini göstermiştir. TIL popülasyonunun izolasyonu ve çoğaltılması için tümörün kesilip çıkarıldıktan sonra hücreleri tek hücreli süspansiyonlara veya tümör parçacıklarına ayırmak, sonrasında büyüme faktörü olan IL-2 eklenmesi gerekmektedir (Şekil 8.1). Genetiği değiştirilmiş olan T hücreleri, çeşitli tümör histolojilerinin tedavisinde kullanılabilir. (Restifo ve diğ. 2013)



Şekil 8.1 TIL izolasyonu ve tümöre spesifik T hücre popülasyonunun çoğaltılması (Restifo ve diğ. 2012’den alınmıştır)

TIL, tümör hücreleri ile en yakından etkileşime giren ve tümör ana etkileşimlerini daha doğru bir şekilde yansıtan lenfositlerdir. (Holmes 1985) Otolog TIL içeren, *in vitro* olarak manipüle edilen ve *in vivo* uygulama sonrasında tümör hücresi lizisini başlatmak için tümöre yeniden infiltrasyon yapmak üzere hücrelerin hazırlanması şeklinde gösterilmiştir. *In vitro* olarak, terapötik TIL’ler tümör dokusundan izole edilir ve IL-2 gibi lenfokinler ile kültürlenir; Terapötik TIL’ler daha sonra hastaya verilir; burada tümöre tekrar infiltrasyonundan sonra tümör hücrelerinin parçalanmasına ve tümör gerilemesine neden olabilirler. Tedavi edici TIL’lerin kullanımı, adoptif immünoterapinin bir formu olarak düşünülür. (National Cancer Institute 2018b)

Kırk yıl önce, Murray ve ark. 148 hastayı inceledi ve tümörlerinde yüksek düzeyde inflamatuvar hücre bulunan bireylerin, tümör infiltrasyonu olmayan hastalara göre daha iyi bir prognoza sahip olduğunu buldular. Bu rapordan bu yana çok sayıda

tümör tipi (uterin servikal, kolorektal, özofageal, meme, ovarian, böbrek), TIL'leri karakterize etmek ve verileri hasta prognozuyla ilişkilendirmek için kullandı. Bu çalışmaların mantığı, konak tarafından kullanılan tümör kontrol mekanizmalarına ilişkin bilgiler verilmesi idi; bu doğal olarak oluşan kontrol mekanizmalarından istifade ederek etkili immünoterapiler geliştirilebilir. Ne yazık ki, bu çalışmaların verilerinin gerçeği, erken çalışmaların öngördüğünden daha az netti. Artmış TIL sayısına sahip hastaların sıklıkla sağkalım oranlarının artmasına rağmen, bu her zaman geçerli değildir. Bu bulgulara, tümörün antijenitesi, antijen sunumunun etkisizliği ve tümör mikro ortamında ifade edilen çözünebilir araçlar dahil olmak üzere çeşitli açıklamalar önerilmiştir. Belirli bir kanserin altında yatan etiyolojinin, bir prioriden, insan kanserlerinin farklı kökenleri göz önüne alındığında tümör sızmasını etkilemesi beklenir. Bu nedenle, optimum tümör kontrolü için gerekli olan hücre tipleri veya ürünleriyle ilgili fikir birliğinin bulunamaması şartıca değildir.(Drescher ve Lynch 2005)

8.2. TIL'lerin İmmünofenotipleri

8.2.1. CD8

Malign dönüşüme uğramış konak hücreleri CD8+ sitotoksik T hücreleri (CTL) tarafından yok edilir. İmmünolojik sinaps yapı, CTL ile hedef hücre arasında oluşmaktadır. CTL hücre teması ile ortama salınan granüller içermektedir. Bu granüller modifiye olmuş lizozomlardır. Perforin, Granzim ve Granzim gibi efektör proteinler bu granüllerin içerisinde bulunmaktadır. Perforin hedef hücre sitozole granzimlerin geçişini kolaylaştırır. CTL IFN- γ , TNF- α ve IL-2 gibi sitokinleri üretir. IFN- γ , viral replikasyonu baskılar ve MHC I ekspresyonu tetikler. CTL üzerinde THR uyarımı kabiliyetini arttırır. IFN- γ , makrofaj aktivasyonu için TNF- α ile sinerjik etki gösterir. CD8+ T hücre farklılaşması için önemli transkripsiyon faktörleri T-bet veomesodermindir.

8.2.2. CD28

Antijen sunan hücrelerde B7.1 (CD80) ve B7.2 (CD86) ligandları ile etkileşime giren CD28, THR-aracılı T-hücresi çoğalmasını, farklılaşmasını ve aktivasyonunu arttırır. B7-CD28 kostimülatör molekül ailesi, T hücresi reseptör sinyallerini modüle eder ve T hücresi aracılı immün yanıtın kontrolünde temel rol oynar. En kapsamlı

çalışılan kosignalizasyon reseptörü olan CD28, B7-1 (CD80) veya B7-2'den (CD86, B70) bir uyarıcı sinyal kabul eder ve bir T hücresi reseptör sinyalinin varlığında saf T hücrelerinin aktivasyonunu destekler. CD28, T hücrelerinin büyümesini, hayatta kalmasını ve farklılaşmasını ve ayrıca antikor yanıtı gereksinimini uyarır. CD28, interlökin-4 (IL-4), interlökin-5 (IL-5), interferon- γ (IFN- γ) ve tümör nekroz faktörü- α (TNF- α) dahil olmak üzere sitokin dizisini uyarır. CD28, yüksek miktarlarda IL-2'yi indükler ve hayatta kalma faktörü Bcl-xL'yi yükseltir. CD28, Ig süper ailesinin bir homodimerik uyarıcı hücre yüzeyi reseptörüdür. T-hücre yanıtlarının CD28 ko-stimülasyonu ile kontrolü, istenmeyen önlenmesi ve istenen (antimikrobiyal) immünitinin tetiklenmesi için bir yol sağlar. Çok güçlü CD28 sinyalleri, T hücresi aktivasyonunu tetiklemek için antijen arama işlemi tarafından üretilen zayıf tonik sinyallerle sinerjize edilebilir. CD28'in uyarılmamış T-hücreleri üzerinde bile temel ifadesi, T-hücresi aktivasyonundaki merkezi ve belirgin rolünü açıklar. CD28, benzersiz fosforilasyon ve transkripsiyonel sinyalleşme, metabolizma ve T hücrelerinin uzun süreli genişlemesi ve farklılaşması için gerekli olan önemli sitokinlerin, kemokinlerin ve hayatta kalma sinyallerinin üretimi de dahil olmak üzere kritik hücre içi biyokimyasal olayları yönlendirir.

8.2.3. CD57

CD57'nin, CD8+ T'de ve farklılaşmanın geç aşamalarında NK hücrelerde mevcut olduğu gösterilmiştir. CD57+ lenfositler katı tümörlerde sıklıkla artmaktadır. Son zamanlarda yapılan çalışmalar tümör infiltrasyonlu CD57+ lenfositleri ve kanser prognozunu ilişkilendirmiştir, ancak sonuçları tartışmalıdır. Bu nedenle, immünoterapi için bir biyobelirteç olarak değeri daha fazla değerlendirmeye ihtiyaç duymaktadır. Son yıllarda, birçok çalışmada tümör infiltrasyonlu CD57+ lenfositleri ve katı tümörlerin prognozu ile ilişkili olmasına rağmen, sonuçları tartışmalı olsa bile tutarlı değildir. CD57+ lenfositlerin, tümörün ilerlemesini geciktiren insan solid tümörlerinde antitümör immünitelerinin kurulmasında önemli aktörlerden biri olduğunu göstermektedir. İlk olarak, CD8+ T ve NK hücreleri gibi lenfositlerdeki CD57 ekspresyonu, granzim A, granzim B gibi sitolitik enzimlerin ekspresyonunun artmasıyla ilişkilidir ve performans göstermesi, CD57+ lenfositlerinin tümör hücreleri de dahil olmak üzere hedef hücreleri sitoliz yapma kabiliyetine sahip olduğunu öne sürmektedir. İkincisi, CD57+ T, CD8+ T ve CD57 antijenini ifade eden NK hücreleri,

uyarıldığında tümörün büyümesini engellemek için daha fazla IFN- γ üretebilir. CD8+ CTL, GZMB gibi granzimlerin etkisiyle tümör hücrelerinin antijen-spesifik sitolizine aracılık ettiği bilinen anti-tümör tepkilerinde kritik efektör hücrelerdir. CD8+ CD57+ CTL, tümör hücrelerinin etkili sitotoksik öldürülmesinin yanı sıra, kronik viral enfeksiyonla mücadelede en güçlü hücreler olarak tanımlanmıştır.

8.2.4. CD137

CD137 sinyalleşmesi, özellikle T hücresi hafıza havuzu içinde T hücresi çoğalmasını ve sağkalımını düzenler, Bcl-XL anti-apoptotik protein ifadesini artırabilir ve CD8 + T hücresi genişlemesini destekler. Bulgular CD137'nin tümör reaktif TIL'lerin biyolojisinde yeni bir rol oynadığını göstermektedir. TIL alt kümesinin, tümörlerde CD137'yi seçici bir şekilde eksprese ettiği gözlem, kısmen, prelinik çalışmalarda agonistik anti-CD137 antikorlarının prelinik çalışmalarda gösterilen anti-tümör etkilerini ve CD137 sinyalinin insan TIL'lerini koruduğu gözlemini açıklamaya yardımcı olur. TIL'ler tarafından CD137 ekspresyonunu, CD137 hedefli immünoterapi için katı tümörde bir fırsat ortaya çıkardığını göstermektedir. Anti-CD137 agonistlerinin pro-T-hücresi hayatta kalma fonksiyonu ve antitümör aktivitesi, kendi başına antitümör aktivitesine aracılık eden PD-1 ve CTLA-4 gibi negatif immüno-regülatör moleküllere yönelik bloke edici antikorlarından bağımsız mekanizmalar tarafından ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle, CD137 agonistleri, anti-PD-1 ve/veya anti-CTLA-4 terapisi veya aşılar, sitokinler, immünojenik kemoterapi, diğer agonistik antikorlar ve adaptif T gibi diğer immün artırıcı immünoterapiler ile kombinasyon halinde kullanım için güçlü bir aday gibi görünmektedir. Anti-tümör yanıtında CD8+ TIL'ler için daha belirgin bir rol ifade eder.

8.3. TIL'ler Tümör Hücrelerini Öldürebilir mi?

AHT ex vivo çoğaltılmış hücre popülasyonları kullanılan tedavi yöntemidir. Tümör, ex vivo çoğaltılıp hastaya tekrar aşılacak hücreler tarafından yok edilebilir. Kanserli hastalarda immün sistemin geçici olarak devre dışı bırakılmasına "hazırlanmış lenfotükenim" denmektedir. Hazırlanmış lenfotükenim, kemoterapinin tek başına ya da tüm vücuda uygulanan ışın tedavisiyle beraber kullanılması ile sağlanır. Bu işlem transfer edilmiş olan T hücrelerinin kalıcı olmasını sağlamaktadır.

Metastatik melanomalı veya diğer tedavi alternatiflerine cevap vermemiş olan lösemi ve sinoviyal hücre sarkomu gibi bazı tümör histolojisine sahip hastalarda IL-2 verilmesi ve lenfotükenimi hazırlayıcı bir uygulamanın AHT ile beraber uygulanması tümör eradikasyonunun uzamasına neden olabilmektedir. Spesifik T hücre sayısının tümör hücreleri tarafından eksprese edilen antijenler için artmasına rağmen, tümörün yok edilememiş olması bir soru işaretidir. Bunun nedenleri arasında tümördeki tümör spesifik T hücrelerinin kronik aktivasyona uğraması veya immün baskılayıcı faktörlerle çevrilmiş olması gösterilebilmektedir. TIL'leri engelleyen moleküller, organizma içindeki T hücresi immunoglobulini, müsin alt birimi (mucin domain) içeren protein 3 (TIM3), lenfosit aktivasyonu gen 3 proteini (LAG3), programlanmış hücre ölümü proteini 1 (PD1) ve CTLA4 gibi bağışıklık baskılayıcı moleküllerdir. Ancak T hücrelerinin aktivasyonu ve klonal çoğalabilmesi için bağışıklık baskılayıcı tümör çevresinden uzaklaştırılmaları gerekmektedir. TIL'lerin daha düşük miktarda bağışıklık baskılayıcı sitokinlere maruz kalması için, TIL'ler, myeloid kökenli baskılayıcı hücreler (MDSC'ler) gibi bağışıklık baskılayıcı hücre popülasyonlarından ayrılır. TIL popülasyonları uygun sayılara ulaşana kadar organizma dışı çoğaltılır. Uygun sayılara ulaştıktan sonra konakçıya yeniden nakledilir. Bu işlem yerleşmiş kanserlerde dayanıklı ve tam remisyonu sağlayarak tümörün tamamen yok edilmesini ve hatta 'iyileşmesini' sağlayabilir. (Restifo ve diğ. 2013)

8.4. T Hücreleri Tümörü Nasıl Hedefler?

Tümör antijenlerinin saptanması bu alanda çalışanların karşılaştıkları en büyük zorluklardan biridir. Tümöre özgü olan ve mutasyon geçirmiş genler antijenleri kodlamaktadır. Tümör hücreleri ve vazgeçilebilir normal doku hücrelerinin sahip olduğu ortak antijenlerin olup olmadığı, T hücrelerin sadece tümör hücrelerini tanıdığı bir pencerenin varlığı cevaplanması gereken sorulardandır. Bunlara ilave olarak, tümördeki malign hücrelerin ne kadarının aday antijenleri stabil olarak açığa çıkardığı ve bu durumun seviyesinin ne olduğu da merak edilen noktalardandır. Araştırmalara konu olan diğer önemli bir soruda tümörü yok etmek için tüm kanser hücrelerini mi yoksa tümörü besleyen ve onu çevreleyen stromal hücreleri yok etmek yeterli midir sorusudur. Aday bir antijenik molekül, bir kısmı CD8+ T hücrelerini uyaran diğer kısmı da CD4+ T hücrelerini uyaran diğışik antijenik epitoplara sağlayan aday bir antijenik molekül var mıdır? Organizmadaki her çekirdeği olan hücre MHC-I

oluşturmaktadır. Bu sebeple tümöre özgü MHC-I sınırlı T hücreleri birçok hücre tipini tanıyabilir. Fakat, neoplastik hücreler MHC-I ekspresyonlarını baskılayarak düzenledikleri için stabil olmayan hedefler olarak kabul edilir. ASH'ler MHC-II ile ekzojen antijenleri işler ve T hücrelerine sunar. MHC ekspresyonu kaybolmuş tümörler ile ilişkili antijenler bu şekilde T hücrelerine tanıtılabilir. Böylece doğal bağışıklık ve vasküler yıkım tetiklenerek bu kitleler hedeflenebilir. Birçok mikroskobik tümör belirginleşmeden immün denetleme vasıtasıyla yok ediliyor olabilir. Araştırmacılar, tümörün 'immuneditleme (immunoediting)' mekanizmasından geçtiğini prelinik çalışmalarda aldıkları sonuçlara dayanarak öne sürmüşlerdir. Fakat kontrolsüz olarak büyümekte olan ve konaklarını mutlaka öldüren tümör kitleleri tanınmaktan sadece kendi ürettikleri antijenik hedefleri yok ederek değil, aynı zamanda adaptif immün sisteminin yetersizliğinden faydalanarak ya da daha da yetersiz hale getirerek kaçarlar. Çünkü bu kitleler immünolojik hedef antijenlerini açık bir şekilde eksprese ederler.

Melanoma-İlişkili Antijen Geni 1 (MAGEA1) MZ2E genini kodlar ve MAGEA1 insanda tanımlanan ilk tümör ilişkili antijen genidir. Yüzlerce farklı antijen o zamandan beri bulunmuştur. "Cancer Immunity Peptide Database" hücreleri tarafından tanınan yüzlerce epitoptan birkaçını listelemektedir.(Cancer Research Institute 2018)

8.5. Çeşitli Malignitelerde Yapılan Çalışma Örnekleri

8.5.1. Meme Kanseri

TIL'lerin yararlı prognostik veriler sağlayıp sağlamayacağını araştırmak için mevcut literatürü gözden geçirilmiş ve klinik uygulamada kullanımları için kısıtlamaları belirlemek amaçlanmıştır. Tüm verilerin toplanması yüksek TIL seviyeleri ile genel hayatta kalma (OS) arasında bir ilişki göstermediği fikrine varılmasına sebep olmuştur. Bununla birlikte, TIL'lerin elde edildiği bölgeler dikkate alınarak değerlendirildiğinde önemli farklılıklar gözlenmiştir.(Ocaña ve diğ. 2015)

Buna göre, Peritümör stromada TIL varlığı bildiren çalışmalar için, yüksek TIL seviyelerinin varlığı iyileştirilmiş OS ile ilişkilidir. Stromal TIL'lerin analizi anlamlı heterojenliği göstermemiştir. Üçlü negatif meme kanseri içeren çalışmalar dahil edildiğinde TIL'ler ve OS arasındaki ilişki benzerdir. İntratümöral TIL'leri bildiren

çalışmaları değerlendirirken bir kez daha belirgin bir heterojenite vardır ve yüksek TIL seviyeleri ile OS arasında herhangi bir ilişki saptanmamıştır. Stromal TIL'lerin varlığı hem üçlü negatif tümörlerde hem de seçilmemiş meme kanserlerinde iyileştirilmiş sonuç ile ilişkilidir. Tersine, intratümöral TIL'lerin varlığı, oldukça heterojen sonuçlar ile ilişkilendirilir, bu da yayınlanan verilerin yorumlanmasına ilişkin belirsizliğin yüksek seviyesine neden olur. Erken meme kanserinde prognostik biyolojik belirteç olarak TIL'lerin kullanımı yeni bir ışık olarak değerlendirilebilir. (Ocaña ve diğ. 2015)

8.5.2. Melanom Kanseri

Melanomdaki TIL tedavisinin mevcut durumu, etkinliğini artırma stratejileri, mevcut engeller ve TIL'in varlığını genel hasta popülasyonuna yaymak için gelecekteki yönergeler gözden geçirilmiştir. TIL tedavisi diğer tedavileri başarısız olan metastatik melanomalı hastalarda %50'nin üzerinde yanıt oranları ve %20'lik dayanıklı tam cevap oranları ile tartışmasız daha başarılıdır. Melanomda TIL tedavisi kullanımı ile ilgili ilk çalışmalarda yüzde kırklara yakın başarı elde edilmiştir. O zamandan bu yana TIL üretimi ve seçimi ile ilgili metod değişiklikleri ve TIL alımından önce hastaları buna hazırlayıcı rejim değişiklikler sonuçların iyileşmesine sebep olmuştur.(Lee 2013)

2011 yılında Radvanyi ve meslektaşlarının başarılı TIL oluşumunu sağlayan faktörleri araştırmak için yaptıkları çalışmada kullandıkları hastalardan elde etikleri sonuçlara göre gençlerin ve kadın hastaların TIL üretimi için daha yüksek bir başarı oranı taşıdıklarını bulmuşlardır. TIL üretimi oranı, 30 yaşın altındaki hastalar için %94 iken, 60 yaş üzerindeki hastalar için %46 başarı oranıdır. Kadın hastalar erkeklerde %71, erkeklerde ise %57 daha yüksek orandadır. TIL alımından 30 gün önce sistemik tedavi alan hastalar, son terapi alımından 90 gün önce meydana geldiğinde %66'lık bir oranla karşılaştırıldığında %47'lik bir başarı oranına sahiptir. (Lee 2013)

9. MATERYAL VE METOD

Bu çalışmanın amacı meme kanserinde adoptif immünoterapinin kullanılabilirliğinin potansiyeli olduğunu araştırmaktır. Bu çalışmada meme tümörü çevresinde yer alan TIL'lerin flow sitometri cihazı kullanarak antikorlar yardımı ile tespit edilmesi ve lenfositleri uyarıcı etkiye sahip bir sitokin olan IL2 ile sayılarının artırılması denemeleri gerçekleştirilmiştir. Bu denemelerden sonuç elde edebilmek için bu bölümde belirtilen aşamalar sırasıyla yapılmıştır.

9.1. Tümörün Mekanik Olarak Parçalanması

Bu çalışmada kullanılan hasta popülasyonunun tamamı metazatik olmayan erken evre meme CA'dır. 22 meme kanserli hastada yapılan bu çalışmada ameliyathanede cerrahi yöntemlerle alınan tümör dokusu, steril şartlar bozulmadan patoloji laboratuvarına getirilmiştir. Patoloji uzmanının yardımı ile sterilite bozulmadan, stereril falkon tüpe yağ dokusundan sıyrılmış 2-3 mm çapında bir parça tümör aktarılmıştır.

Tümör dokusundan alınan örnek, tümör laboratuvarına serum fizyolojik içeren steril falkon tüp (Isolab, Türkiye) ile getirilmiştir. Bunu takiben, örnek sınıf II biyolojik güvenlik kabinde (Biobase, Almanya) petri kabı içerisinde önce bistüri ve iğne ucu yardımı ile tümör küçük parçalara bölünmüştür. Petri içindeki örnek, fosfat tamponlu tuzlu su (PBS) (Thermo Fisher) ile iyice temizlenerek, hiç içinde örnek kalmayacak şekilde pipet yardımı ile 50 ml'lik falkon tüpe (Isolab) aktarılmıştır. Daha sonra falkon tüp içerisindeki tümör parçaları önce düşük sonra yüksek devirde homojenizatör (Tissue Disposable Probes) (QIAGEN) ile 15-30 saniye kadar parçalanmıştır. Elde edilen tümör süspansiyonu 40µm'lik hücre süzgecinden (Falcon) yeni bir 50 ml'lik falkon tüpe aktarılmıştır. Örnek, santrifüjde 1500 xg'de 10 dakika 4°C'de soğutmali santrifüj (Eppendorf, Almanya) ile santrifüj edilmiştir.

Santrifüj işlemi tamamlandıktan sonra, süpernatant atılmıştır. 5 ml PBS eklenerek pipetaj hareketi ile resüspanse edilmiştir.

Steril 15 ml'lik yeni bir falkon tüp alınıp, içerisine 10 ml Ficoll-Hypaque 1077 (Sigma-Aldrich) eklenmiştir. Fikolün üzerine 5 ml besiyeri CM ile resüspanse edilen TIL solüsyonu, 10 ml'lik steril, tek kullanımlık serolojik pipet (SPL Life Sciences, Güney Kore) ile kenardan yavaş yavaş yayılmıştır. Örneğimiz, 21°C'de 1500

xg'de 30 dakika santrifüj edilmiştir. Fikol aşamasında santrifüjün 21°C olması önemlidir. Fikol 21°C'de lökositlerin yüzeye çıkmasını sağlamaktadır.

Santrifüj işlemi bittikten sonra falkon tüpte fikol ile lökositlerin ayrımı belirgindir. Hücreler fikolün üzerine çıktığı için tüpü çok sarımadan pipet yardımı ile üst kısım yeni bir falkon tüpe alınmıştır. Alt kısım ve pellet ise atılmıştır.

Hazırlanmış olan CM'den 2200 µl alınarak hücreler üzerine eklenmiş, pipetaj yapılarak tüpteki hücreler çözündürülmüştür. TIL'ler ve CM'den oluşan süspansiyondan 200 µl akım sitometri çalışılmak üzere alınmıştır.

9.2. Akım Sitometri

Çalışmanın akım sitometri aşaması Beckman Coulter firmasına ait Navios 500 marka, 3 lazer, 10 renkli cihazında yapılmıştır.

CD57 (FITC - Fluorescein isothiocyanate), CD4 (PE - RPhycoerythrin), CD8 (PC5 - RPhycoerythrin-Cyanine5.1), CD56 (PC7 - Phycoerythrin Cyanin 7), CD137 (APC Biolegend), CD28 (A750 Allophyocyanin-Alexa Fluor750 BC Beckman Coulter), CD3 (PB - Pacific Blue-BC), CD45 (KO - Krome Orange) akım sitometri tüpüne 5 µl pipetlenmiştir. Akım sitometri için ayrılmış olan TIL hücre süspansiyonundan 200 µl, antikorların üzerine pipetlenmiş ve 15 dakika inkübasyona bırakılmıştır. 15 dakikanın sonunda 500µl PBS (Beckman Coulter) (Isoflow) pipetlenerek, yıkama amaçlı 10 dakika inkübe edilmiştir. Bu işlem sonunda hücreler 1300 rpm 5 dakika (Nüve) santrifüj edilmiştir. Üstteki süpernatant atılmıştır. Dipteki hücrelerin üzerine 500 µl PBS (Isoflow) konulup vortekslenerek akım cihazında okutulmuştur. Akım sitometri sonuçlarına göre, örnekte var olan T lenfosit hücre popülasyonu CD3, CD4, CD8 ile, var olan T lenfositlerin NK oranları tüpe pipetlenen CD56 ve CD57 antikorları ile tespit edilerek, yardımcı T hücresi ile sitotoksit T lenfositlerin aktivasyonları CD28 ve CD137 yüzey antikorları ile belirlenmiştir.

Hücre süspansiyonunda tümör etrafında görülmesi beklenen T lenfositler yani Tümör İnfiltrat Lenfositlerin varlığını akım sitometri sonucu belirlemektedir. Cihazdaki Side Scatter'a (SS) karşı CD3 pozitif hücre varlığı elde edildiği takdirde, kalan 2000 µl TIL hücre süspansiyonu IL-2 ile CM 24 kuyucuklu steril plağa (VWR,Kanada) ekimi gerçekleştirilir. IL-2 lenfositlerin çoğalmasını sağlayan bir sitokindir.

2000 µl besiyeri ve TIL'den oluşan süspansiyon, 6000 IU IL-2 (Biolegend) karşılık gelecek şekilde 15 µl IL-2 ile kültüre edilmiştir. 24'lük plağın tek bir kuyucuğuna ekilir. CO₂ inkübatör (Heal Force, Çin) 25 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. Her iki günde bir hücrelere inverse mikroskop (Olympus, Japonya) ile bakılmıştır.

Yedinci günün sonunda pasaj işlemi yapılmıştır. İnkübasyondan alınan hücreler kuyucuğa pipetaj yapılarak kaldırılmıştır. 15 ml'lik falkon tüpe alınan hücreler 1500 xg'de 5 dakika santrifüj edilerek, 2200 µl CM ile çözdürülür. 200 µl'si akım sitometri çalışması için ayrılır. Akım sitometri sonucuna göre bırakılan antikolar içerisinde T lenfosit tespit edilmiş ise 2000 µl besiyerli TIL üzerine 6000 IU IL-2'ye karşılık gelecek şekilde 15µl IL-2 ilave edilip 24'lük plakta tek bir kuyucuğa ekilir. Akım sitometri sonuçları neticesinde çalışma ya sonlandırılır ya da TIL hücre süspansiyonu -196°C sıvı azot tankı (MVE Chart Industries) dondurulur.

9.3. CM (Besiyeri Hazırlığı)

10 ml besiyeri hazırlamak için;

- %10'luk FBS'den (Fetal Bovine Serum) 1 ml (Thermo Fisher)
- Hepes 250 µl (4-(2-hidroksietil)-1-piperazineetansulfonik asit) (Thermo Fisher)
- Penstrep 100 µl (Thermo Fisher)
- β-Mercaptoethanol 9 µl (Thermo Fisher)
- L glutamin 100 µl (Thermo Fisher)
- RPMI 1640 8,54 ml (Thermo Fisher)

kullanılmaktadır.

10. BULGULAR

Çalışmada kullanılan hasta tümör örnekleri Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi Patoloji Bölümü'nden alınmıştır. TNKÜ Klinik ve Laboratuvar Araştırmaları Etik Kurulunun 28.03.2019 tarih ve 2017.38.03.09 sayılı izni (EK.1) ile hastalardan aydınlatılmış onayı (EK.2 ve EK.3) alındıktan sonra standart protokollere göre “Meme Kanseri Dokusundan Elede Edilen Tümör İnfiltran Lenfositlerin (TIL) In Vitro Ortamda Çoğaltılması ve Fenotiplerinin Saptanması” çalışması yapılmıştır. Çalışmaya 22 malign meme tümörü olgusu dahil edilmiştir. Tümörlerin cinsi patolojik değerlendirmeden geçirilmiş olup, çalışma için patoloji raporları referans alınmıştır.

Örnek kümesine göre çalışmaya katılan hastaların yaş ortalaması 51,45 yıldır. Bu 22 hastanın 7'sinde (%31,82'sinde) TIL'leri izole etmeyi başarırken, 15'inde lenfosit genişlemesi sağlanamamıştır.

Çizelge 3 Tümörün Klinik Bilgisi

Örnek No	Cerb-B2 Aşırı Salınımı	Östrojen Reseptörü	Progesteron Reseptörü
Hasta 1	Mevcut Değil	+1	Nükleer Boyanma İzlenmemiştir
Hasta 2	+1	Nükleer Boyanma İzlenmemiştir	Nükleer Boyanma İzlenmemiştir
Hasta 3	Mevcut Değil	+3	Nükleer Boyanma İzlenmemiştir
Hasta 4	+1	+1	Nükleer Boyanma İzlenmemiştir
Hasta 5	+1	Nükleer Boyanma İzlenmemiştir	Nükleer Boyanma İzlenmemiştir
Hasta 6	+1	+3	+3
Hasta 7	Mevcut Değil	+2	Nükleer Boyanma İzlenmemiştir

Çizelge 3'te çalışmaya alınan ve TIL izole etmenin başarıldığı 7 malign meme kanseri hastası tümör örneklerinin patolojik klinik bilgileri verilmiştir. Bu çizelgeye göre 3 örnekte Cerb-B2 aşırı salınımı (tümör hücrelerinde sitoplazmik boyanma) gözlemlenmemiştir ve skor +0 olarak izlenmiştir. 7 örneğin 4 tanesinde ise östrojen reseptörü ile tümör hücrelerinde nükleer boyanma izlenmemiştir. 7 örneğin 6'sında ise progesteron reseptörü ile tümör hücrelerinde nükleer boyanma izlenmemiştir.

Çizelge 4 Örneklerin Patolojik Tür Dağılımı ve başarı yüzdesi

Patolojik Sınıf	Adet
Triple -	2
Her2 +	0
Hormon+	5

Bu çalışmada elde edilen sonuçlara göre kültürlenmiş TIL'lerin fenotipik özellikleri şu şekilde ifade edilebilir: toplam 7 hastaya TIL kültürlerinde total lenfosit oranı ortancası %6,80'dır (ortalama %18,52) (Çizelge 5). Lenfositler içerisinde CD3+ hücrelerin ortancası %83,25 (ortalama %83,28) gibi yüksek bir değere sahiptir. CD3+ hücreler üzerinde CD8+ hücre ortancası %34,22 (ortalama %35,12) olarak bulunmuştur. CD8+ (sitotoksit T lenfositler) üzerindeki CD28 ekspresyonunun ortancası %0,36 (ortalama %1,18) olup, CD8+ hücreler üzerindeki CD137 ekspresyonunun ortancası %58,68'dir (ortalama %47,40). Lenfositler içerisinde CD3-CD56+ hücrelerin ortancası %2,05 (ortalama %5,51) olarak hesaplanmıştır. Bu değer bize TIL kültüründeki NK değerinin düşük olduğunu göstermektedir. TIL kültürlerindeki akım sitometrik sonuçlara göre CD3+ hücreler üzerinde CD4+ hücre ortancası %39,79'dır (ortalama %44,54). Benzer şekilde sitotoksit T hücreler üzerinde CD57 pozitif hücre varlığının ortancası %9,78 (ortalama %11,40) olup, NK hücreleri üzerinde CD57 ekspresyonunun ortancası %0,45 (ortalama %3,79) olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 5 Tümörlerin sitokinler ile genişletilmesiyle oluşan TIL kültürlerinin akım sitometrik sonuçları

Örnek No	Tarih	Sitokin Çeşidi	Total Lenfosit	Tüm Lenfositler Üzerinde CD3	Tüm Lenfositler Üzerinde CD56	CD3 Üzerinde CD4	CD3 Üzerinde CD8	CD8 Üzerinde CD28	CD8 Üzerinde CD57	CD8 Üzerinde CD137	CD56 Üzerinde CD57
Hasta 1	26.09.2017	6000 IU IL-2	21,66%	84,66%		58,59%	32,66%				
	11.10.2017	6000 IU IL-2	74,09%	66,19%	18,9%	37,56%	27,73%	0,35%	15,72%	96,18%	9,71%
	27.10.2017	6000 IU IL-2	38,24%	73,35%	12,53%	38,77%	49,97%	0,07%	16,69%	79,03%	16,61%
Hasta 2	6.10.2017	6000 IU IL-2	10,46%	67,62%	1,23%	34,77%	63,31%	2,34%	18,2%	3,08%	9,09%
	18.10.2017	6000 IU IL-2	6,79%	83,25%	0,70%	37,26%	47,28%	0,36%	9,78%	1,09%	
Hasta 3	26.10.2017	6000 IU IL-2	3,75%	69,81%	1,06%	53,71%	24,0%	7,02%	14,04%	64,9%	9,09%
	1.11.2017	6000 IU IL-2	6,8%	70,47%	9,8%	60,0%	39,0%	0,01%	22,0%	95,59%	5,2%
Hasta 4	21.11.2017	6000 IU IL2	23,58%	75,16%	9,36%	58,95%	36,93%	55,49%	9,73%	73,41%	1,22%
	28.11.2017	6000 IU IL2	18,95%	51,63%	16,77%	63,79%	20,0%	42,14%	1,25%	68,58%	2,84%
	5.12.2017	6000 IU IL-2	38,44%	82,11%	12,59%	48,14%	22,21%	1,93%	0,93%	58,68%	0,88%
Hasta 5	5.12.2017	6000 IU IL2	6,78%	67,88%	1,02%	64,88%	31,26%	3,03%	10,6%	82,58%	12,5%
	12.12.2017	6000 IU IL2	9,34%	60,42%	7,08%	62,3%	19,66%	2,66%	7,45%	69,15%	45,71%
	20.12.2017	6000 IU IL2	5,61%	87,96%	0,01%	49,3%	22,13%	0,9%	16,2%	76,58%	0,01%
Hasta 6	12.12.2017	6000 IU IL-2	3,88%	76,96%	3,23%	43,71%	50,90%	18,82%	24,71%	96,47%	28,57%
	20.12.2017	6000 IU IL-2	6,52%	96,67%	2,05%	39,79%	34,22%	4,80%	8,80%	13,60%	0,01%
Hasta 7	26.12.2017	6000 IU IL-2	13,30%	73,61%	5,20%	60,26%	30,59%	0,45%	1,35%	73,58%	6,31%
	3.01.2018	6000 IU IL-2	1,95%	1,38%	0,90%	16,30%	6,16%	6,25%	0,01%	6,25%	0,01%
	15.01.2018	6000 IU IL-2	27,21%	89,15%	0,90%	38,53%	31,04%	0,18%	5,42%	7,20%	0,01%

Hastalarda IL-2 ile TIL'lerde genişleme sağlanmıştır. Bu 7 hastanın %57,14'ünde genişleme devam ettiğinden dolayı 2 pasajlama yapılmışken, geri kalan hastalarda 1 pasajlama yapılmıştır. 2 pasajlama yapılan hastaların %50,0'sinde ilk pasajlama sonrası tüm hücreler üzerindeki toplam lenfosit yüzdesi artmış, ikinci pasajlama sonrasında ise bu yüzde azalmıştır. Geri kalan %50'sinde ise ilk pasajlama sonrasında tüm hücreler üzerindeki toplam lenfosit yüzdesi azalmış ve ikinci pasajlama sonrasında bu yüzde artmıştır.

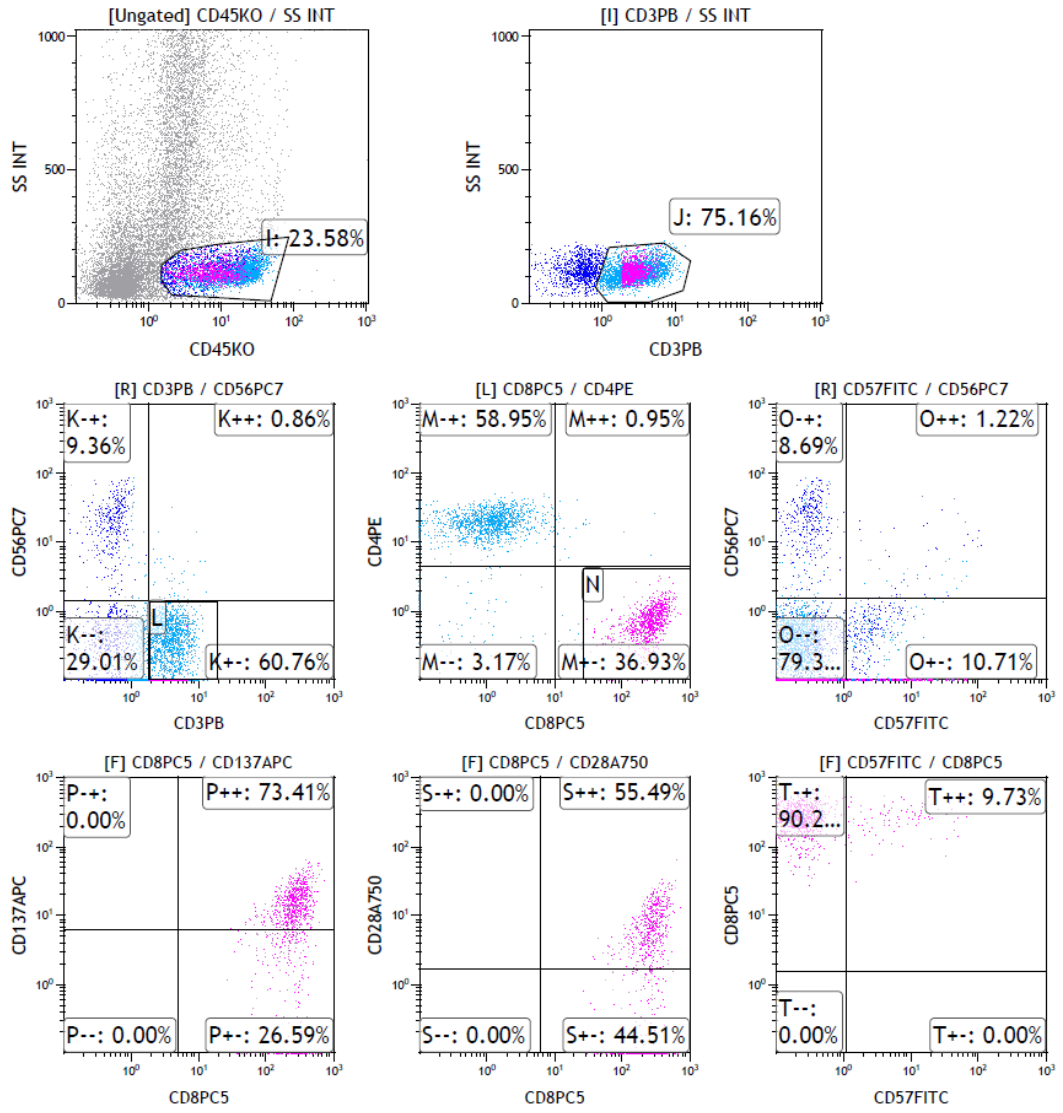
Ayrıca CD3+ üzerinde CD4+ popülasyonu 7 örneğin %28,57'sinde ekimler sonucunda artış gözlemlenmişken, geri kalanında azalma görülmüştür. CD3+ üzerinde CD4+ popülasyonunun artış gösterdiği hastalarda artış oranı ortalama %4,29, azalma gösteren hastalarda azalma oranı ise ortalama %10,61'dir.

CD3+ üzerinde CD8+ popülasyonu 7 örneğin %42,86'sında ekimler sonucunda artış gözlemlenmişken, geri kalanında azalma görülmüştür. CD3+ üzerinde CD8+ popülasyonunun artış gösterdiği hastalarda artış oranı ortalama %10,92, azalma gösteren hastalarda azalma oranı ise ortalama %14,14'tür.

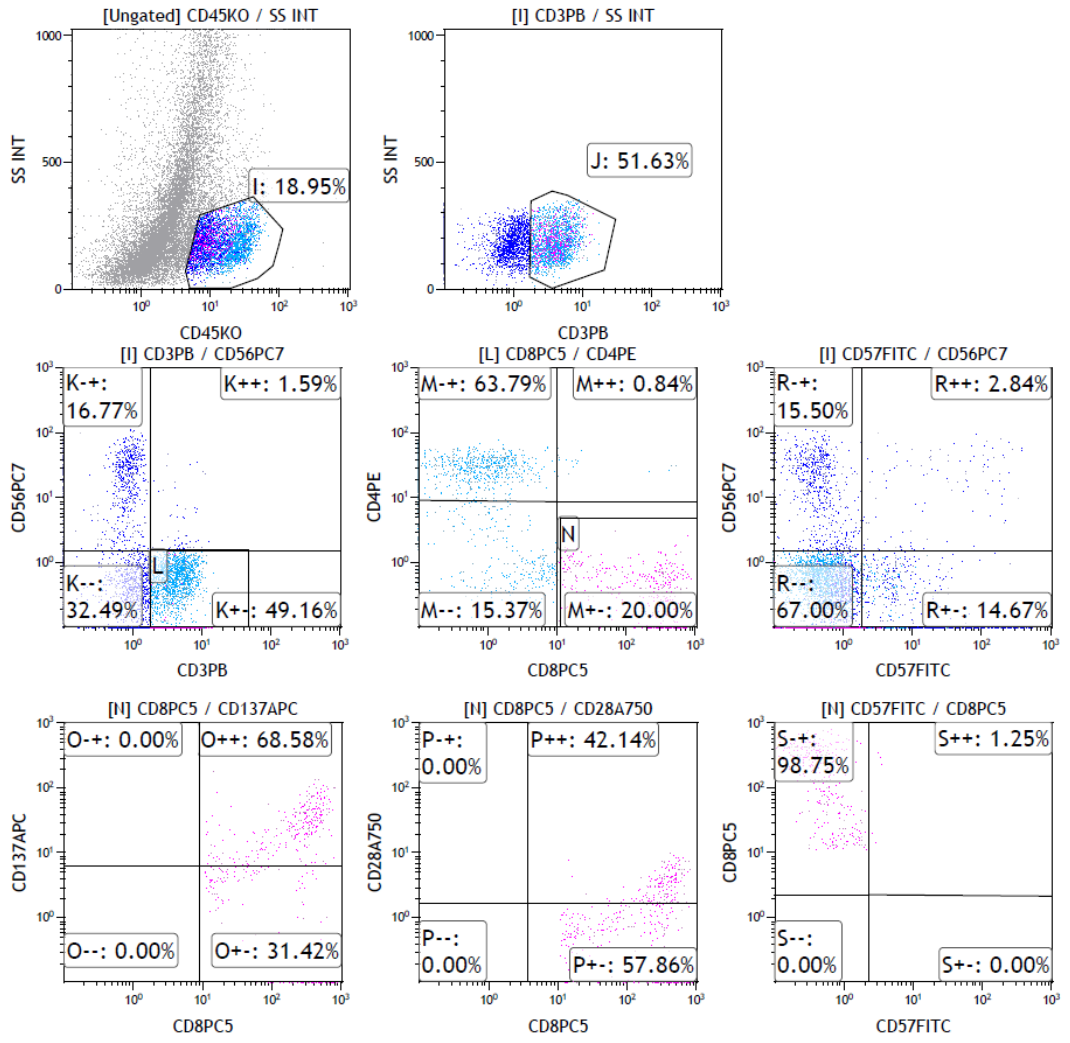
Çizelge 6 Çalışma Sonuçları

Örnek No	Açıklama
Hasta 1	27.10.2017'de donduruldu. Azot tankına alındı.
Hasta 2	CD56 düşük olduğu için hesaplanamadı. 24.10.2017'de sonlandırıldı
Hasta 3	CD3lerde artış olmadığı için 01.11.2017'de sonlandırıldı
Hasta 4	06.12.2017'de donduruldu. Azot tankına alındı.
Hasta 5	20.12.2017'de donduruldu. Azot tankına alındı.
Hasta 6	Lenfosit miktarı az olduğu için 21.12.2017'de sonlandırıldı
Hasta 7	15.01.2018'de donduruldu. Azot tankına alındı.

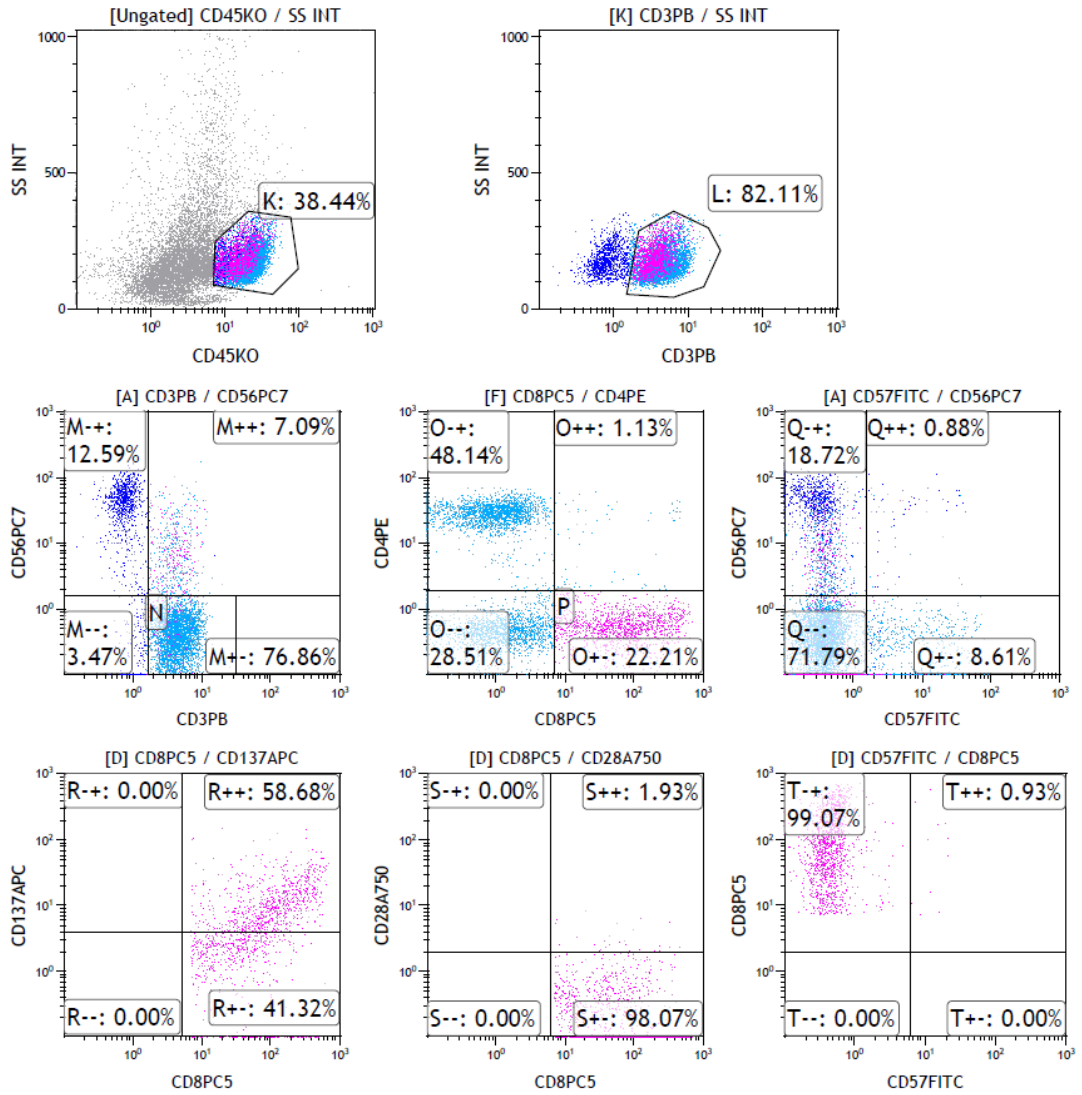
Çizelge 6 çalışılan 7 hasta malign meme tümörü üzerinde sitokinler ile yapılmış olan kültürleme sonucunda elde edilen akım sitometrik değişimlere bağlı olarak çalışmanın nihai durumunu göstermektedir.



Şekil 10.1 Hasta 4'e ait tümörün alındığı günün akım sitometri sonucu



Şekil 10.2 Hasta 4'e ait TIL kültürünün IL-2 ile genişletilmesinden 7 gün sonraki akım sitometri sonuçları



Şekil 10.3 Hasta 4'e ait TIL kültürünün IL-2 ile genişletilmesinden 14 gün sonraki akım sitometri sonuçları

Şekil 10.1, 10.2 ve 10.3'te gösterildiği gibi IL-2 aracılığı ile TIL genişlemesinin sağlandığı olumlu örnekler vardır. Bunlar akım sitometrik görüntülerle desteklenmiştir.

11. TARTIŞMA

Kadınlarda en sık görülen kanser türü meme kanseridir. Hayat boyu her 8 kadından birinin meme kanserine yakalanma riski vardır. Kadınlarda mortalitesi en yüksek olan kanser türü yaklaşık %15,7 ile meme kanseridir. Meme kanseri, meme dokusundaki hücrelerden gelişen kanserlerdir. Meme dokusunun herhangi bir yerinden kaynaklanabilir.(Kanser Türleri 2018)

Meme kanserinde erken tanı konulmasının hastanın yaşam kalitesini ve yaşam süresi olumlu yönde etkilediği bilinmektedir. Meme kanseri denilince en önemli risk grubunun kadınlar olarak belirlenmesinin yanısıra bu tip kanser yaklaşık %1 oranında erkeklerde de görülmektedir.

Malign melanom gibi kanser türlerinde immünoterapi üzerine oldukça fazla sayıda çalışma yapılmış olmasına karşın, meme kanserinde yapılmış immünoterapi çalışmalarının sayısı daha azdır.

Son yıllarda, kanser immünoterapisi, ilave bir tedavi alternatifi olarak ortaya çıkmıştır. Popüler kanser immünoterapötik yöntemleri, immün kontrol noktalarını hedef alan monoklonal antikörlerin uygulanmasını, tümör aşılmasını ve kimerik antijen reseptörlerine (CAR-T hücreleri) veya tümör hücrelerini hedef alan TIL'lere sahip olmak üzere tasarlanan T hücrelerinin uyarıcı transferini içerir. (Bang 2017).

İmmün cevabı başlatan antijene spesifik efektör yanıtı, periferik kandaki T lenfositleri oluşturmaktadırlar. Lenfositlerin düzenleyici ve etki edici olmak üzere iki ayrı fonksiyonu vardır.Çeşitli çözünür maddeler üreterek diğer lökositaktivitelerini de düzenlerler. T lenfositleri, etkili bir tümör immün yanıtın gelişmesinde en önemli hücrelerdir. Bu sebeple, malign tümörlü olgularda T hücre yanıtı immün tedavide önemli bir rol oynar. (Akhisaroğlu 2009)

Bu çalışmanın amacı, meme tümörü hastalarındaki TIL'lerin akım sitometri yöntemi ile immünofenotipik özelliklerinin belirlenmesidir. Bununla beraber, çalışmanın odaklandığı noktalardan biri de lenfositleri uyarıcı etkiye sahip olan IL-2 sitokini ile kültüre ederek lenfosit miktarını artırarak akım sitometri yöntemi ile T hücre oranındaki değişiminin saptanmasıdır. Değişimin olumlu yönde ilerlemesi ile beraber ileriki yıllarda meme tümöründe immünoterapik bir tedavinin uygulanabilirliğinin çıkarımına ulaşmayı hedeflemektedir.

Bu nedenle 22 meme tümörlü hastadan cerrahi operasyonla tümörlü meme alınmıştır. Alınan tümör dokusundan verilen örnek mekanik yollarla parçalanmıştır. Mekanik parçalamanın sonunda fikor yöntemi ile mononükleer hücrelerin ayrılması gerçekleştirilmiştir. Ayrılan hücrelerde akım sitometri ile CD57, CD3, CD4, CD8, CD28, CD137 ve CD56 monoklonal antikorların ekspresyonlarının belirlenmesi işlemi yapılmıştır. Akım sitometri analizi sonucu TIL'lerin oranına bağlı olarak IL-2 ile genişletme amacıyla kültüre edilmiştir. TIL oranının değişimini gösterir tablolar oluşturulmuştur.

Çalışmadaki patoloğ tarafından verilen tümör parçalarında yağ dokusunun tam ayrılamadığı örneklerde ya da kıkırdaklı yapıya sahip tümör parçalarında akım sitometri sonuçları lenfosit oranındaki düşüşü göstermektedir.

Literatürde birçok kanser türü için TIL genişletmesi protokolü kullanılarak adoptif immünoterapinin yer aldığı çalışmalar vardır. Nguyen ve diğ. (2019)'ın yapmış olduğu çalışmada metatazık melanomda düşük doz IL-2'nin intravenöz uygulaması ile hastalar tedavi sürecine alınmış ve önemli bir ilerleme kaydedilmiştir. Nguyen ve diğ. (2019)'ta yapılan çalışma kanser türü ve uygulama şekli bakımından bu çalışmadan farklılıklar göstermektedir.

Wickström ve Lövgren (2019)'ın yaptığı çalışma melanomda tümör kültürü üzerine yapılmış olup T lenfosit artışını IL-2 ile gerçekleştirmeyi amaçlamıştır. Bunun için yöntemimize benzer şekilde tümör parçalara ayrılmış, kontaminasyon engellenmeye çalışılmış ve TIL genişletmesi 6000 IU IL-2 ile sağlanmıştır. Wickström ve Lövgren (2019)'de her pasajda TIL'ler inverse mikroskopta takip edilmişken, çalışmamızda akım sitometri testinde T lenfosit monoklonal antikorları kullanılmıştır.

Uterus, serviks, akciğör ve gastrointestinal sistem de dahil olmak üzere diğör solid tümörlere adoptif TIL tedavisi uygulandığında, bazı hastalar da mükemmel klinik tepkiler göstermiştir. Bu sonuçlar, meme kanseri gibi diğör katı kanserlerin AHT uygulaması için uygun hedefler olabileceği anlamına gelir; Bununla birlikte, meme kanserinde, TIL kültürünün meme kanserinde mümkün olduğu bildirilse de, geniş TIL kültürleri ve adoptif TIL tedavisinin terapötik potansiyelinin değerlendirilmesi bildirilmemiştir. Ayrıca, uzun ömürlü bellek T hücresi alt gruplarının ex vivo olarak genişletilmiş TIL'lerin klinik önemi, bir dizi kanserde iyi tanımlanmış olmasına rağmen, meme kanserinde, bellek T hücresi alt gruplarının bileşimi, doğrudan kanser

dokularından türetilmiş ve ex vivo olarak genişletilmiş taze TIL'ler arasında oluşturulmuştur. TIL'ler hiç tanımlanmamıştır. (Bang 2017)

Her durumda başarılı olmamakla birlikte, bu tür immünoterapilerle tedavi edilen hastaların önemli bir kısmında iyi bir klinik fayda sağlamıştır. TIL'ler kullanılarak AHT böyle bir immünoterapidir. TIL'lerin kanserli hastalardan ex vivo genişlemesine ve TIL'lerin hastalara yeniden infüzyonuna dayanır; Başlangıçta ileri melanomalı hastaların tedavisi için geliştirilmiştir. Etkileyici olarak, adoptif TIL tedavisinden sonra metastatik melanomalı hastalarda %50'nin üzerinde objektif cevap oranları gözlemlendi ve tam remisyon oranı %24'e ulaştı. (Bang 2017)

Bu çalışmada, meme tümör örneklerinden TIL'leri başarıyla genişlettik ve merkezi bellek fenotip T hücreleri içeren genişletilmiş TIL'lerin bir AHT kaynağı olarak faydalı olabileceğini gösterdik. Buna göre Adoptif T hücre tedavisi meme CA'lı hastalarda da ileriki yıllarda kullanılacak bir tedavi yöntemi olarak öngörülmektedir.

Meme kanseri ile ilgili olarak, birkaç rapor ilk TIL kültürlerini tanımlamıştır; bununla birlikte, bu çalışmalardaki vaka sayıları küçüktü (<20) ve TIL'lerin otolog tümörlere reaktivitesi ve hafıza T hücresi ile oranı, terapötik etkinliği öngörmek için kritik parametreler açıklanmamıştır. (Bang 2017)

Bu olasılık göz önünde bulundurularak, ex vivo kültürden sonra yeterli sayıda TIL elde etmenin başarı oranı, bu çalışmada elde edilenden çok daha yüksek olacaktır ve T_{CM} oranının, başlangıçtaki TIL ve REP kültürleri, daha uzun kültürlenmiş hücrelerin in vivo olarak hayatta kalma ve daha kısa kültürlü hücrelere benzer şekilde işlev görme kabiliyetine sahip olmaları muhtemeldir. (Bang 2017)

Meme tümörü numunelerinden TIL'lerin in vitro ortamda genişlemesinin CD137 varlığında gerçekleştiği saptanmıştır. (Bang 2017)

Tümör dokularında yapılan rutin histolojik analizler, ex vivo olarak genişlemesi muhtemel TIL sayısı hakkında iyi bilgi verebilse de, AHT'nin planlanması çok yararlı olacaktır. Buna rağmen, bu çalışmada, ilk 2 hafta kültüründen sonra elde edilen TIL'lerin sayısı, TIL'lerin yüzdesi ve doku kesitlerinde gözlenen TLS'nin (Tersiyer Lenfoid Yapılar) derecesi gibi TIL sayısına ilişkin doku parametreleri ile birlikte analizlere yer verilememiştir. (Bang 2017)

Bu çalışmada, TIL kültürü, T hücrelerini zenginleştirmiştir. T hücreleri arasında, CD4+ ve CD8+ T hücrelerinin oranları ilk 2 hafta kültürlenmiş TIL'lerde sonra CD8+ T hücrelerinin oranları bazı örneklerde artmıştır. (Bang 2017)

Ana kanser önleyici efektör T hücrelerinin CD8+ T hücreleri olduğu bilindiğinden, CD8+ T hücrelerinin anti-tümör reaktivitesine aracılık etmede önemli bir rol oynayacağı düşünülmektedir. (Bang 2017)

Meme kanseri üzerine yapılan bu çalışmada, T_{CM} oranının in vitro TIL kültürleri sırasında önemli ölçüde düşmediğini ve oranın in vitro kültürün başlamasından sonra bile arttığını gözlemlenmiştir. (Bang 2017)

TIL kültürünün başlatılmasından sonra T_{CM} popülasyonunun tercih edilen artışı, immünoşpresif tümör ortamı tarafından indüklenen T_{CM} proliferasyonu/hayatta kalma/farklılaşmanın baskılanmasından kurtuluştan kaynaklanabilir. (Bang 2017)

(Bang 2017) yaptıkları çalışmada TIL genişletmesi prosedürünü ele almışlardır. Bu genişletme araştırması ile TIL'lerin ileriki yıllarda meme kanseri tedavisinde alternatif bir tedavi yöntemi olarak sunulup sunulamayacağını belirlemeye değinmişlerdir. Bunu yaparken hastadan alınan TIL'leri ex vivo biçimde genişletmeye çalışmışlardır. Ancak bizim çalışmamızdan farklı olarak, tümör parçalarını besiyerine ekip, 14 gün boyunca 37 °C'de inkübe edip, 40 µm'lik gözenekli bir hücre eleğinden doku fragmanları ve TIL karışımının geçirilmesinden sonra 5 dakika boyunca 1.500 rpm'de santrifüjlenerek geri kazanılmıştır. Burada iki çalışma arasında yöntemlerin basamakları ve uygulamaları açısından farklılıklar göze çarpmaktadır. Buna örnek olarak tez çalışmasında hücre eleğinin tümörün mekanik parçalanmaya uğratılmasından sonra kullanılması, buna karşılık (Bang 2017)'de hücre eleğinin IL-2 ile inkübasyonundan önce kullanılması gösterilebilir. Bu farklılık T hücre kaybına yol açan etkenlerden biri olarak düşünülebilir. TIL genişlemesindeki oransal farkın da bu uygulamaların farklılığından kaynaklanmakta olabileceği göze çarpmaktadır. Buna ilaveten tez çalışmamızda uygulanan ficol yöntemi, T lenfosit miktarının azalmasına sebep olduğu düşünülmektedir. Çünkü ficol yöntemi kanı bileşenlerinden yani eritrosit ve lökositlerinden ayırmak için kullanılmaktadır. Çalışmanın kan yerine tümör dokusundan olması ficol ayırımında lenfosit kaybına neden olmuş olabilir. Bang (2017)'da ise ficol yöntemi kullanılmayıp doğrudan tümör parçası üzerinde çalışılmıştır.

Yapılan bu tez çalışmasını temel alarak bahsedilen yöntem ve parametrelerin değiştirilerek çalışmaların daha fazla örnek üzerinde gerçekleştirilecek olması da gelecek çalışmalar için bir yol haritası olabilecektir. Örneğin 14 günlük inkübasyon periyodu, tez çalışmasında 7 gün ilk inkübasyon ve ardından yapılan pasajlama ile uygun örneklerde IL-2 ile beslenerek tekrar 7 günlük bir inkübasyona tabi tutulması yöntemsel farklılıklardan en önemlilerinden biridir. İnkübasyon sürecinin değiştirilerek denemeler yapılması da sonuçlar üzerinde etkili olacaktır. Buradaki benzer noktalar ise inkübasyon ısısı ve hücre eleğinin gözenek genişliğidir. Her iki çalışmada da aynı değerlerin kullanılmış olması optimum sonuca yakın olduklarını göstermektedir.

Buna ilaveten TIL genişlemesi için besiyerine 1000 IU/ml IL-2 kullanılmıştır. Bu miktar yapılan tez çalışmasında kullanılan miktardan daha azdır. Yapılan tez çalışmasında bu değer 6000 IU/ml olarak belirlenmiştir. Yapılacak ileriki çalışmalarda bu IL-2 seviyesinin değişkenlik oranına göre TIL genişleme oranı ile arasında bir korelasyon kurulabileceği öngörülmüştür. (Bang 2017)

12. SONUÇ

Bu çalışmada, TIL'leri tüm meme kanseri alt tipleri başarıyla genişlettik. Sonuçlar in vitro olarak genişletilmiş TIL'lerin kullanıldığı AHT'nin meme kanserinde uygulanabilir olduğunu göstermektedir. Tümörün mekanik parçalanma işleminden sonra fikol ile mononükleer hücrelerin ayrılması yöntemi ile meme kanserinden TIL ekspansiyonunun mümkün olabileceğini göstermiş olduk. Daha yüksek sayıda TIL genişlemesi sağlayabilmek için farklı ekspansiyon yöntemleri ile daha fazla sayıda hasta üzerinde çalışma sayısı artırılması gelecek çalışmaların tabanını oluşturacaktır.

Meme kanseri dokusundan elde edilen tümör infiltran lenfosit (TIL)'lerin in vitro ortamda çoğaltılması ve fenotiplerinin saptanması ülkemizde yapılmış olan ilk çalışma olup, dünyada da yapılmış olan sayılı çalışmalardan biridir

Tez çalışmasında TIL'ler farklı meme kanseri alt tiplerinden örnekler alınarak yapılmıştır. Bu çalışma bize gelecekte meme kanserinde uygulanabilirlik açısından umut verici bir yöntem olarak kabul edilebileceğini göstermektedir. TIL elde edilen hasta oranını arttırabilmek için farklı ve daha etkin yöntemlerin oluşturulabilmesi daha fazla çalışmaya ihtiyaç duymaktadır.

KAYNAKÇA

- ABBAS AK, LICHTMAN AH, PILLAI S. 2014. Basic Immunology: Functions and Disorders of The Immune System (4th ed.). Philadelphia: Elsevier Ltd.
- AKHİSAROĞLU ST. 2009. Malign Melanomda Tümör İnfiltratör Lenfositlerin (TIL) İmmunohistolojik Karakterizasyonu ve Regülatör T Hücreleri'nin Tümör Dokusu ve Dolaşımında Değerlendirilip Prognoz ile İlişkisinin Saptanması. Doktora Tezi. İzmir: Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- ALBERTS B, ROBERTS K, LEWIS J, RAFF M, WALTER P, JOHNSON A. 2015. Molecular Biology of the Cell (6th ed.). Garland-Norton.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. 2018. <https://www.cancer.org/treatment/treatments-and-side-effects/treatment-types.html>. Erişim Tarihi: 07.11.2018
- AMERICAN CANCER SOCIETY. 2018. <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/treatment/surgery-for-breast-cancer.html>. Erişim Tarihi: 09.11.2018
- ANONİM. 2018. https://www.breastcancer.org/symptoms/understand_bc/what_is_bc Erişim Tarihi: 08.11.2018
- ANONİM. 2018. https://www.breastcancer.org/symptoms/types/male_bc. Erişim Tarihi: 08.11.2018
- ANONİM. 2018. <http://www.turkcerrahi.com/makaleler/meme/meme-kanseri/kemoterapi>. Erişim Tarihi: 12.11.2018
- BANG WS, KIM SY, CHANG S, LEE M, PARK SY, GONG G, JUNG J. 2017. Expansion of tumor-infiltrating lymphocytes and their potential for application as adoptive cell transfer therapy in human breast cancer. *Oncotarget*, 8(69):113345–113359.
- BEKTAŞ T. 2015. https://www.academia.edu/26692764/T%C4%B1bbi_Derleme_Kanser_%C4%B0mmunolojisi_%C4%B0mmunoterapi_2015_. Erişim Tarihi: 29.11.2018
- BRITISH SOCIETY FOR IMMUNOLOGY. 2013. Cancer Immunotherapy. (T. J. Curiel, Ed.). New York, NY: Springer New York.
- CANCER RESEARCH INSTITUTE. 2018. <https://www.cancerresearch.org/scientists/meetings-and-resources/peptide-database> Erişim Tarihi: 08.12.2018

- CHEW HK. 2001. Adjuvant therapy for breast cancer: who should get what? *Western Journal of Medicine*. 174(4): 284–287.
- DENİZ G. 2007. T, B, NK Hücrelerin Değerlendirilmesinde Pratik Yaklaşımlar. *J Int Med Sci*. 3(43):18-25.
- DISIS ML, STANTON SE. 2018. Immunotherapy in breast cancer: An introduction. *The Breast*, 37: 196–199.
- DRESCHER KM, LYNCH HT. 2005. Tumor infiltrating lymphocytes (TILs): Lessons learned in 30 years of study. *Clinical and Applied Immunology Reviews*. 5(3):149–166.
- DÜZGÜN N. 2014. İmmün Sistemin Tanıtımı. Ankara, Türkiye.
- ELİYATKIN N, YALÇIN E, ZENGEL B, AKTAŞ S, VARDAR E. 2015. Molecular Classification of Breast Carcinoma: From Traditional, Old-Fashioned Way to A New Age, and A New Way. *Journal of Breast Health*. 11(2): 59–66.
- HOLMES EC. 1985. *Annsurg*00108-0052. 158–163.
- JOHNS HOPKINS UNIVERSITY. 2018. <http://pathology.jhu.edu/pc/BasicTypes1.php?area=ba>. Erişim Tarihi: 22.11.2018
- KANSER NEDİR. 2018. <https://hsgm.saglik.gov.tr/tr/kanser-nedir-belirtileri>. Erişim Tarihi: 06.11.2018
- KANSER TÜRLERİ. 2018. <https://hsgm.saglik.gov.tr/tr/kanser-turleri/kanser-turleri/400-meme-kanseri.html>. Erişim Tarihi: 08.11.2018
- KIM CS, ALGAN O. 2019. Radiation Therapy, Breast Cancer Early Stage. *StatPearls* [Internet].
- KIRMAZ C. 2018. <http://www.alerjiklinigi.com/kanser-ve-bagisiklik-sistemi> Erişim Tarihi: 22.11.2018.
- KORNSTEIN MJ, BROOKS JSJ, ELDER DE. 1983. Immunoperoxidase localization of lymphocyte subsets in the host response to melanoma and nevi. *Cancer Res*. 43(6):2749-53.
- LEE S, MARGOLIN K. 2013. *Nihms*400005(1). 14(5):468–474.
- MEME VAKFI. 2018. <http://www.memekanseri.org.tr/meme-sagligi/meme-kanserinde-isin-tedavisi-radyoterapi>. Erişim Tarihi: 12.11.2018

- NATIONAL CANCER INSTITUTE. 2010. Immunotherapy using tumor infiltrating lymphocytes for patients with metastatic cancer. U.S. National Library of Medicine.
- NATIONAL CANCER INSTITUTE. 2018. <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>. Erişim Tarihi: 06.11.2018
- NATIONAL CANCER INSTITUTE. 2018. <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-drug/def/therapeutic-tumor-infiltrating-lymphocytes?redirect=true> Erişim Tarihi: 05.12.2018
- NGUYEN LT, SAIBIL SD, SOTOV V, LE MX, KHOJA L, GHAZARIAN D, BUTLER MO. 2019. Phase II clinical trial of adoptive cell therapy for patients with metastatic melanoma with autologous tumor-infiltrating lymphocytes and low-dose interleukin-2. *Cancer Immunology, Immunotherapy*,
- OCAÑA A, DIEZ-GÓNZÁLEZ L, ADROVER E, FERNÁNDEZ-ARAMBURO A, PANDIELLA A, AMIR E. 2015. Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Breast Cancer: Ready for Prime Time? *Journal of Clinical Oncology*, 33(11):1298–1299.
- RESTIFO NP, DUDLEY ME, ROSENBERG SA. 2013. Response. *Nature Immunology*, 12(4), 269–281.
- SUDHAKAR A. 2009. History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods. *Journal of Cancer Science & Therapy*, 01(02), i–iv.
- ŞAKALAR Ç, İZGİ K, CANATAN H. 2013. Kanser İmmün Terapi ve Monoklonal Antikorlar. *F.Ü.Sağ.Bil.Tıp Derg*, 27(2), 105–110.
- TREMONT A, LU J, COLE JT. 2017. Endocrine Therapy for Early Breast Cancer: Updated Review. *The Ochsner Journal*, 17(4), 405–411.
- ÜNER A. 2003. Akciğer kanserlerinde moleküler onkolojik hedefe yöneltilmiş tedaviler. *Solunum*. 5(3): 167-172.
- WERLING D, JUNGI TW. 2003. TOLL-like receptors linking innate and adaptive immune response. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 91(1):1–12.
- WICKSTRÖM S, LÖVGREN T. 2019. Expansion of Tumor-Infiltrating Lymphocytes from Melanoma Tumors. In *Methods in Molecular Biology* 1913:105–118.

WORLD CANCER RESEARCH FUND. 2018. <https://www.wcrf.org/dietandcancer/contents>. Erişim Tarihi: 06.11.2018.

YANG F, JIN H, WANG J, SUN Q, YAN C, WEI F. 2013. Adoptive Cellular Therapy (ACT) for Cancer Treatment. *Adv Exp Med Biol.* 909:169-239.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı – Soyadı: Sinem BULUŞ

Doğum Yeri: Giessen/Almanya

Doğum Tarihi: 07/02/1981

Uyruk: Türkiye Cumhuriyeti

e-mail: sinem_ulkumen@hotmail.com

Eğitim Bilgileri

Yüksek Lisans

Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi Anabilim Dalı (2016-2019)

Yüksek Lisans (Tezsiz)

Trakya Üniversitesi Eğitim Fakültesi Biyoloji Öğretmenliği Bölümü (2004 – 2006)

Lisans

Trakya Üniversitesi Fen – Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü (1999 – 2003)

Lise

Ankara Anıttepe Lisesi (1995 – 1998)

Yabancı Dil

İngilizce