

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
TEKİRDAĞ NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ADJUVAN KULLANARAK DENDRİTİK HÜCRE – SİTOKİN
İLE UYARILMIŞ ÖLDÜRÜCÜ HÜCRE KOMBİNE AŞILARIN
ETKİNLİĞİNİN ARTIRILMASI**

**Gülstan ÖNCÜ
1168209104**

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

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Dumrul GÜLEN**

**Bu Tez Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Komisyonu tarafından NKUBAP.02.YL.17.126 proje numarası ile
desteklenmiştir.**

Tez No: 2018/42

2018 – TEKİRDAĞ

KABUL ve ONAY

Namık Kemal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı

çerçevesinde Doç. Dr. Dumrul GÜLEN danışmanlığında yürütülmüş bu çalışma,
aşağıdaki jüri tarafından
Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.


Tez Savunma Tarihi

21.../12/2018



imza

Doç. Dr. Dumrul Gülen
Namık Kemal Üniversitesi
Jüri Başkanı



imza

Dr. Öğr. Üyesi Burak Aksu
Marmara Üniversitesi
Üye

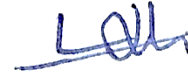


imza

Dr. Öğr. Üyesi Berna Erdal
Namık Kemal Üniversitesi
Üye

Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Gülistan ÖNCÜ'nün "Adjuvan Kullanarak Dendritik Hücre – Sitokin ile Uyarılmış Öldürücü Hücre Kombine Aşıların Etkinliğinin Artırılması" başlıklı tezi 21. Aralık... Cuma. günü saat 14:00'da Namık Kemal Üniversitesi Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Nilda TURGUT
Enstitü Müdürü



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca her konuda benden destek ve ilgisini esirgemeyen, bilgilerini ve tecrübelerini benimle paylaşan saygı değer danışman hocam Doç. Dr. Dumrul GÜLEN'e;

Bilimsel desteklerini esirgemeyen Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Burhan TURGUT'a;

Yüksek lisans eğitimim boyunca aldığım dersler aracılığıyla eğitimime katkıda bulunan Anabilim Dalımızın değerli tüm öğretim üyelerine ve bilhassa immünoloji alanında değerli bilgilerinden yararlandığım kıymetli hocam Dr. Öğr. Üyesi Berna ERDAL'a;

Tezimin her aşamasında büyük destek ve yardımlarını gördüğüm değerli hocam Araş. Gör. Dr. Mine AYDIN KURÇ'a;

Amaç edindiğim bu yolda bana güvenen, gerek maddi gerekse de manevi destekte bulunan sevgili annem Emine ÖNCÜ ve ablam Esra ÖNCÜ'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir (NKUBAP.02.YL.17.126).

ÖZET

Öncü, G. Adjuvan Kullanarak Dendritik Hücre – Sitokin ile Uyarılmış Öldürücü Hücre Kombine Aşıların Etkinliğinin Artırılması, Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Tekirdağ, 2018. İmmünoterapi, bireye spesifik ve daha az toksik olması ile diğer klasik kanser tedavileri arasında ön plana çıkmaktadır. Kanser immünoterapisinin amacı, hastaları tümörlere karşı aktif olarak bağışıklamak ve hastanın antitümör yanıtını uyarmaktır. Kanser hücrelerinin yok edilmesi için gerekli immün yanıtın oluşmasında rol oynayan dendritik hücreler (DH) ve sitokin ile uyarılmış öldürücü (CIK) hücreler, son yıllarda hakkında sıkça çalışma yapılan efektör immün hücre gruplarıdır.

Bu tez çalışmasında kombinasyonlu tedavi tercih edilerek; sağlıklı gönüllülerin tam kanlarından elde edilen DH ve CIK hücre kombinasyonunu, doğal bir adjuvan olan resveratrol (RSV) ile indükleyerek in vitro ortamda MCF-7 meme kanseri hücre hattına karşı antitümör etkinliğinin artırılması amaçlanmıştır.

Çalışmamızda 12,5 µM, 25 µM ve 50 µM konsantrasyonlarda RSV kullanılmıştır. RSV adjuvanı ile indüklenen DH-CIK kombinasyonunun MCF-7 hücrelerine karşı sitotoksik aktivitesi MTT hücre canlılık testi ile analiz edilmiştir. Ayrıca CIK hücrelerinin en yüksek oranda elde edilmesi için üç farklı yöntem uygulanmıştır.

Sonuç olarak; MACSxpress doğal öldürücü (NK) hücre izolasyon kiti ile CIK hücrelerinin diğer yöntemlere göre daha yüksek oranda elde edildiği, düşük doz RSV'nin MCF-7 hücrelerine karşı DH-CIK kombinasyonunun etkinliğini artırdığı, dozun artışına bağlı olarak RSV'nin DH-CIK kombinasyonunun etkinliğini azalttığı saptanmıştır. Resveratrolün bu etkileri göz önüne alındığında kanser immünoterapisi için ideal bir adjuvan olabileceği sonucuna varılabilir.

Anahtar kelimeler: Kanser, İmmünoterapi, Adjuvan, Aşı, Dendritik Hücre, Sitokin ile Uyarılmış Öldürücü Hücre

Destekleyen Kurumlar: Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu (NKUBAP.02.YL.17.126)

ABSTRACT

Öncü, G. Using Adjuvant to Increase the Efficacy of Dendritic Cell - Cytokine Induced Killer Cell Combined Vaccines, Tekirdağ Namık Kemal University, Institute of Health Sciences, Department of Tumor Biology and Immunology Postgraduate Thesis, Tekirdağ, 2018. Immunotherapy, stands out among other classical cancer treatments because the individual is specific and less toxic. The purpose of cancer immunotherapy is to actively immunize patients against tumors and to stimulate the antitumor response of the patient. Dendritic cells (DC) and cytokine induced killer (CIK) cells are the effector immune cell groups which have been involved in the formation of the immune response necessary for the destruction of cancer cells that have been studied frequently in recent years.

Combined therapy was preferred in this thesis study; it was aimed to increase the antitumor activity against MCF-7 breast cancer cell line in vitro by inducing DC and CIK cell combinations obtained from whole blood of healthy volunteers with a natural adjuvant resveratrol (RSV).

In our study, RSV were used at 12,5 μM , 25 μM and 50 μM concentrations. The cytotoxic activity of the RSV adjuvant-induced DC-CIK combination against MCF-7 cells was analyzed by the MTT cell viability assay. In addition, three different methods were applied to obtain the highest rate of CIK cells.

As a result; It was found that CIK cells were obtained higher rate than other techniques using MACSxpress natural killer (NK) cell isolation kit, that the low dose of RSV increased the efficacy of DC-CIK combination against MCF-7 cells, that RSV decreased the efficacy of DC-CIK combination depend on increased dose. Considering these effects of resveratrol, it can be concluded that it may be an ideal adjuvant for cancer immunotherapy.

Key words: Cancer, Immunotherapy, Adjuvant, Vaccine, Dendritic Cell, Cytokine Induced Killer Cell

Supporting Institutions: Tekirdağ Namık Kemal University Scientific Research Projects Commission (NKUBAP.02.YL.17.126)

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY SAYFASI	iv
TEŞEKKÜR	v
ÖZET	vi
ABSTRACT	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xvi
TABLOLAR DİZİNİ	xviii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Meme Kanseri	4
2.2. Kanser İmmünoterapisi	5
2.2.1. Kanser İmmünoterapisinin Tarihsel Gelişimi	9
2.2.2. Kanser İmmünoterapisinde Kullanılan Yöntemler	10
2.3. Dendritik Hücre (DH)	13
2.3.1. Dendritik Hücre Kökeni ve Fonksiyonu	14
2.3.1.1. İmmatür DH	14
2.3.1.2. Matür DH	15
2.3.1.3. Semi-Matür DH	16
2.3.2. Dendritik Hücrelerin Farklılaşması	16
2.3.3. Antijen Sunumu	18
2.3.4. İmmünoterapi ve DH'ler	19
2.4. Sitokin ile Uyarılmış Öldürücü (CIK) Hücre	21
2.4.1. CIK Hücre Tedavisinin Gelişimi	22
2.4.1.1. CIK- Ek Sitokinler Kombinasyonu	23
2.4.1.2. DH-CIK Kombinasyonu	24
2.4.1.3. CIK- İmmün Kontrol Noktası İnhibitörleri Kombinasyonu	26
2.4.1.4. CIK- Antikor Kombinasyonu	26
2.4.1.5. CIK- CAR Kombinasyonu	28
2.4.1.6. CIK- Kemoterapi Kombinasyonu	28

2.4.1.7. CIK- Nanotıp Kombinasyonu	29
2.5. Kanser Tedavilerinde Bitkisel Kökenli Maddelerin Kullanımı	29
2.5.1. Resveratrol (RSV)	31
2.5.1.1. Resveratrolün Yapısı ve Türevleri	32
2.5.1.2. Resveratrolün Antikanserojenik Etkisi	34
2.5.1.3. Resveratrol ve İmmün Sistem	36
3. GEREÇ VE YÖNTEM	37
3.1. Kullanılan Materyaller ve Kimyasallar	37
3.2. Gönüllü Seçimi	40
3.3. Periferik Kandan Mononükleer Hücre İzolasyonu	40
3.4. Mononükleer Hücrelerin Sayılması ve Canlılık Tayini	41
3.5. Mononükleer Hücrelerin Flow Sitometrik Analizi	41
3.6. DH Kültürü	41
3.7. CIK Hücre Kültürü	42
3.7.1. DH Kültürü Sonunda Toplanan PKMH'lerden CIK Hücrelerinin Elde Edilmesi	42
3.7.2. PKMH'ler 2 saat inkübe edildikten sonra DH ve CIK Hücre Kültürünün Yapılması	42
3.7.3. MACSxpress NK Hücre İzolasyon Kiti ile NK Hücrelerinin Elde Edilmesi	43
3.7.4. CIK Hücre Kültür Ortamının Hazırlanması	43
3.8. DH-CIK Ortak Hücre Kültürü	44
3.9. MCF-7 Hücre Kültürü	44
3.9.1. MCF-7 Hücrelerinin Pasajlanması	44
3.10. Resveratrolün Hazırlanması	45
3.11. MTT (3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)2,5-Difenil Tetrazolyum Bromür) Hücre Canlılık Testi	45
4. BULGULAR	47
4.1. Periferik Kandan İzole Edilen Mononükleer Hücrelerin Flow Sitometrik Analizi	47
4.2. DH'lerin Özelliklerinin Belirlenmesi	48
4.2.1. DH'lerin Morfolojisinin İncelenmesi	48

4.2.2. DH'lerin Canlılık ve Hücre Sayımının Yapılması	48
4.2.3. DH'lerin İmmünofenotipinin Belirlenmesi	48
4.3. CIK Hücrelerinin Özelliklerinin Belirlenmesi	49
4.3.1. CIK Hücrelerinin Morfolojisinin İncelenmesi	49
4.3.2. CIK Hücrelerinin Canlılık ve Hücre Sayımının Yapılması	49
4.3.3. CIK Hücrelerinin İmmünofenotipinin Belirlenmesi	50
4.4. DH-CIK Hücrelerinin Özelliklerinin Belirlenmesi	52
4.5. MCF-7 Hücrelerinin Özelliklerinin Belirlenmesi	52
4.6. MTT Hücre Canlılık Testinin Sonuçları	53
5. TARTIŞMA	56
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	62
KAYNAKLAR	63
ÖZGEÇMİŞ	76
EKLER	
EK 1- Etik Kurul Onayı	
EK 2- Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu	

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Anti	Antikor
AP-1	Aktivatör Protein-1
Apop1	Apoptoz Proteaz Aktive Edici Faktör-1
ASH	Antijen Sunucu Hücreler
ATP	Adenozin Trifosfat
Bax	Bcl-2 İlişkili X Proteini
BCG	Bacille Calmette-Guérin
Bcl-2	B hücre lenfoma-2
bcl-XL	B Hücre Lenfoma-Extra Large
BRCA1/2	Göğüs Kanseri Duyarlılık-1/2
BsAbs	Bispesifik Antikorlar
BTLA	B ve T Lenfosit Zayıflatıcı
C/EBP α	CCAAT/Enhansır Bağlama Proteini- Alfa
Ca ⁺²	Kalsiyum İyonu
CA-125	Kanser Antijeni-125
CAR	Kimerik Antijen Reseptörü
CD	Başkalaşım Kümesi
CDN	Siklik Dinükleotid
cDNA	Komplementer Deoksiriboz Nükleik Asit
CEA	Karsino-Embriyonik Antijen
CIK	Sİtokin ile Uyarılmış Öldürücü Hücre
cm ²	Santimetre Kare
CO ₂	Karbondioksit
COX-2	Siklooksijenaz-2
CsA	Siklosporin A
CTL	Sitotoksik T Lenfosit
CTLA4	Sitotoksik T-Lenfosit Antijen-4

CXCL /CCL	Kemokin Motifi Ligandları
DH	Dendritik Hücre
DH-LAMP	Dendritik Hücre Lizozom İlişkili Membran Proteini
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsülfoksit
E	Efektör Hücre
EGCG	Epigalokatekin-3-Galat
EGFR	Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
EGR1	Erken Büyüme Yanıt Proteini
ER	Endoplazmik Retikulum
ERK1/2	Ekstraselüler Sinyal Düzenleyici Kinaz ½
Fas/CD95	Hücre Ölüm Reseptörleri Yolağı
FasL	Fas Ligand
FBS	Fetal Bovin Serum
Fc	Antikorun gövde kısmı
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
FOXM1b	Çatal Baş Şeklindeki Kutu Proteinleri M1 b Formu
FOXO	Çatal Başı Proteinleri
g	Gram
GITR	Glukokortikoid Kaynaklı TNFR ailesi ile ilişkili gen
GM-CSF	Granülosit-Makrofaj Koloni Uyarıcı Faktör
H	Hedef Hücre
H22	Hepatokarsinoma Hücreleri
HBV	Hepatit B Virüs
HCC	Hepatoselüler Karsinom
HCl	Hidroklorik Asit
HCV	Hepatit C Virüs
HepG2	İnsan Karaciğer Kanseri Hücre Hattı
Her2	İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü-2

HIV	İnsan Bağışıklık Yetmezlik Virüsü
HLA-DM	İnsan Lökosit Antijeni-DM
HLA-DR	İnsan Lökosit Antijeni-DR
HMGB1	Yüksek Hareketlilik Grubu Protein B1
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
HPV	İnsan Papilloma Virüs
HVEM	Herpes Virüs Giriş Mediyatörü
ICAM1	Hücre İçi Adhezyon Molekülü-1
IDO	İndoleamin 2,3-Dioksijenaz
IFN	İnterferon
IGF	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
IGFBP	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü Bağlayıcı Protein
IgG	İmmüoglobulin G
IgM	İmmüoglobulin M
IL	İnterlökin
INOS	İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz Enzimi
KHDAK	İlerlemiş Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri
KIR	Öldürücü Hücre İmmüoglobulin Benzeri Reseptör
LAG	Langerhans Hücresi Granül Antijeni
LAG-3	Lenfosit Aktivasyon Geni-3
LFA1	Lenfosit Fonksiyonuna Bağlı Antijen-1
LPS	Lipopolisakkarit
mAb	Monoklonal Antikor
MAPK	Mitojen Aktive Protein Kinaz
MCF-7	Michigan Cancer Foundation-7
M-CSF	Makrofaj Koloni Uyarıcı Faktör
MDA-MB-231	İnsan Meme Kanseri Hücre Hattı
mDH	Miyeloid Dendritik Hücre
mg	Miligram

MHC	Majör Histokompatibilite Kompleksi
MIC	MHC Sınıf I Zinciri ile İlişkili Protein
MKBH	Miyeloid Kökenli Baskılayıcı Hücre
ml	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
MMP-9	Matriks Metalloproteinaz-9
mTOR	Rapamisin Protein Kompleksinin Memeli Hedefi
MTT	3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)2,5-Difenil Tetrazolyum Bromür)
NASH	Nonalkolik Steatohepatit
NFκB	Nükleer Faktör Kappa B
NK	Doğal Öldürücü Hücre
NKG2D	Doğal Öldürücü Grup 2D
nm	Nanometre
OD	Optik Yoğunluk
OKT3	Monoklonal CD3 Antikoru
OS	Genel Sağkalım
OX40	Başkalaşım Kümesi-134
P53	Tümör Protein 53
PBL	Periferik Kan Lenfositleri
PBS	Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
PD-1	Programlanmış Ölüm Proteini-1
pDH	Plazmasitoid Dendritik Hücre
PD-L1	Programlanmış Ölüm Ligand-1
PI3K	Fosfoinositid 3-Kinaz
PKMH	Periferik Kan Mononükleer Hücreleri
PMNL	Polimorfonükleer Lökositleri
rh	Rekombinant İnsan
rpm	Dakikadaki Devir Sayısı

SA	Sitotoksik Aktivite
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SERM	Selektif Östrojen Modülatörü
STAT	Sinyal Transdüseri Ve Transkripsiyon Aktivatörü
TAA	Tümör ile İlişkili Antijen
TCR	T Hücre Reseptörü
TGF- β	Transforme Edici Büyüme Faktörü- Beta
Th1	Yardımcı T Hücre-1
TIL	Tümör İnfiltrat Lenfosit
TIM-3	T Hücre İmmünoglobulin ve Musin Domaini-3
TLR-4	Toll Benzeri Reseptör-4
TNF	Tümör Nekroz Faktörü
TRAIL	Apoptozu İndükleyen Ligand
Treg	Düzenleyici T Hücre
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu
VEGF	Vasküler Endotelial Faktör
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
Wnt-4	Wnt Sinyal Yolu Aile Üyesi-4
XIAP	Apoptoz İnhibe Edici Protein
5-LOX	5-Lipoksijenaz
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat Derece
α	Alfa
β	Beta
γ	Gamma
ζ	Zeta
λ_{max}	Maksimum Dalga Boyu
μl	Mikrolitre
μm	Mikrometre
μM	Mikromolar

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa	
Şekil 2.1.	Kanser immün siklusunda stimülatörler ve inhibitörler	8
Şekil 2.2.	Kanser immün siklusunu etkileyebilecek tedaviler	9
Şekil 2.3.	DH matürasyonu esnasındaki değişimler	15
Şekil 2.4.	İmmatür, semi-matür ve matür DH'lerin mikroskop altındaki görüntüsü	16
Şekil 2.5.	DH'lerin orijini ve matürasyonu	17
Şekil 2.6.	Ex vivo ya da in vivo DH aşılama yolu ile tümör antijene spesifik T hücrelerinin indüklenmesi	21
Şekil 2.7.	CIK hücrelerinin MHC aracılığı olmadan sitotoksik aktivitesi	22
Şekil 2.8.	Şematik olarak CIK hücre tedavisinin gelişimi	23
Şekil 2.9.	Resveratrolün yapısı ve kaynakları	32
Şekil 2.10.	Resveratrolün cis ve trans formları	33
Şekil 2.11.	Resveratrolün piseid formu	33
Şekil 3.1.	(A) Santrifüj öncesi ve (B) santrifüj sonrası falkon tüpte oluşan görüntü	41
Şekil 4.1.	DH kültürü öncesi PKMH'lerdeki DH'lerin flow sitometrik analizi	47
Şekil 4.2.	(A) Kültür sonunda DH'lerin invert mikroskoptaki görüntüsü, (B) Kültür sonunda DH'lerin thoma lamındaki görüntüsü	48
Şekil 4.3.	Kültür sonrasında DH'lerin flow sitometrik analizi	49
Şekil 4.4.	(A) Kültür sonunda CIK hücrelerinin invert mikroskoptaki görüntüsü, (B) Kültür sonunda CIK hücrelerinin thoma lamındaki görüntüsü	50

Şekil 4.5.	CIK hücre kültürü için DH kültürü sonrasında toplanan PKMH'lerinin flow sitometrik analizi	50
Şekil 4.6.	CIK hücre kültürü için PKMH'ler 2 saat inkübe edildikten sonra hücrelerin flow sitometrik analizi	51
Şekil 4.7.	CIK hücre kültürü için MACSxpress NK hücre izolasyon kiti ile elde edilen hücrelerin flow sitometrik analizi	51
Şekil 4.8.	Kültür süresi sonunda proliferen olan CIK hücrelerinin flow sitometrik analizi	51
Şekil 4.9.	(A) Kültür sonunda DH-CIK hücrelerinin invert mikroskoptaki görüntüsü, (B) Kültür sonunda DH-CIK hücrelerinin thoma lamındaki görüntüsü	52
Şekil 4.10.	(A) MCF-7 hücrelerinin invert mikroskoptaki görüntüsü, (B) MCF-7 hücrelerinin thoma lamındaki görüntüsü	52
Şekil 4.11.	MTT analizi sonucunda mikropalakada oluşan görüntü	53
Şekil 4.12.	Kombine edilen deney gruplarında ilgili hücrelerin ve RSV'nin kombinasyona katkılarının % oranları	55

TABLOLAR DİZİNİ

		Sayfa
Tablo 4.1.	MTT hücre canlılık testi kurulununun tablo olarak gösterimi	53
Tablo 4.2.	İmmün hücreleri içeren deney gruplarının, MCF-7 hücrelerine karşı sitotoksik aktivite değerleri	54
Tablo 4.3.	MCF-7 hücrelerine karşı tek başına RSV uygulanan deney gruplarının hücre canlılık ve sitotoksik aktivite değerleri	54

1. GİRİŞ

Kanser, çağımızın en önemli sağlık sorunları arasında yer almakta olup, görülme sıklığının ve öldürücülüğünün yüksek olmasından dolayı da bir halk sağlığı sorunudur. Kanser, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) verilerine göre dünyadaki ölüm sıralamasında ikinci olarak yer almaktadır. Tüm dünyada akciğer kanserinden sonra en yaygın görülen ikinci kanser türü meme kanseridir (Akciğer %13, meme %11,9, kolon %9,7, prostat %7,9, mide %6,8 kanseri görülme sıklığı) (WHO 2012). Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK)'nun 2015 yılı verilerine göre Türkiye'de ölüm nedenleri sıralamasında kanser, kardiyovasküler sistem hastalıklarından sonra ikinci sırada bulunmaktadır. Kadınlarda görülme sıklığı en yüksek olan kanser türü meme kanseridir. 2013 yılında tanı konulan her 4 kadın kanseri içerisinde 1'i meme kanseridir. Veri tabanında yer alan meme kanseri invaziv vakaların yalnızca %10'u ileri evrededir (Türkiye Kanser İstatistikleri 2015).

Kanser hastalığının tedavisinde yaygın olarak cerrahi, radyoterapi ve kemoterapi yöntemleri kullanılmaktadır. Fakat bu yöntemler kanser tedavisi için yetersiz kalmıştır. Kanser, günümüz ve gelecek için büyük bir tehdit oluşturduğundan bilim insanları daha etkili ve hastaya daha az zarar verebilecek alternatif tedaviler üzerine yoğunlaşmışlardır.

İmmünoterapi, kanser tedavisinde yeni bir boyuttur. Kişiyeye özgü ve yan etkilerinin daha az olması sebebi ile bu tedavi yöntemi son yıllarda yükselen bir konuma sahip olmuştur. Kanser immünoterapisi ile hastanın immün yanıtı uyarılarak, immün hücrelerin tümör hücrelerini yok etmesi sağlanır.

DH'ler, profesyonel antijen sunucu hücreler olması nedeni ile kanser immünoterapisinde yer alan önemli hücre gruplarıdır. DH'ler, başarılı bir aşı uygulamasına esas teşkil etmek üzere kazanılmış immünitinin bir kolu olarak, hem CD4⁺ hem de CD8⁺ T hücrelere antijen epitoplarnı sunabilme kabiliyetine sahiptirler (Gülen ve diğ. 2010) . Bir DH aşısının ilk klinik çalışması 1996 yılında Nature Medicine dergisinde bildirilmiştir (Hsu ve diğ. 1996). Şu anda, kanser hastalarında antikanser immün yanıtını indüklemeye veya güçlendirmeye yönelik klinik aşılama denemelerinde DH temelli immünoterapi dünya çapında araştırılmaktadır (Bol ve diğ. 2013).

CIK hücreleri, T hücre ve NK hücre fenotiplerini gösteren kemokin ile uyarılmış immünoeffektör hücre grubudur (Zhang ve diğ. 2012). CIK hücreleri kanser için immünoterapide umut vaat eden gelişmeler göstermiştir. Bir taraftan, CIK hücrelerinin sitotoksitesi, siklosporin A (CsA) gibi immün inhibitörlerinden etkilenmez. Öte yandan, CIK hücre aracılı sitotoksite, majör histokompatibilite kompleksine (MHC) dayanmaz. Çoğu kanserde olduğu gibi bu hücreler MHC veya insan lökosit antijenini (HLA) ifade etmez; CIK hücrelerinin bu özelliği adoptif hücre tedavisinde diğer immün hücrelerine kıyasla büyük bir avantajdır (Zhu ve diğ. 2013).

Son yıllarda DH-CIK gibi kombine tedaviler tercih edilmeye başlanmıştır. DH'ler, CIK aktivasyonu, çoğalması, fenotip ifadesi ve sitokin sekresyonunda önemlidir (Mu ve diğ. 2016, Wei ve diğ. 2015, Li ve diğ.2005). CIK hücreleri DH'ler ile birlikte kültüre edildiği zaman; CIK hücrelerinin sitotoksitesi belirgin bir şekilde artmış ve interlökin-2 (IL-2), interferon- gamma (IFN- γ), IL-12 ve tümör nekroz faktör- alfa (TNF- α) gibi sitokinlerin seviyelerinin yükseldiği bildirilmiştir (Wei ve diğ. 2015, Zhou ve diğ. 2016). Ayrıca, CIK hücreleri ile birlikte kültürlenmiş DH'ler, transforme edici büyüme faktörü- beta (TGF- β) ve IL-10'un yanısıra, CIK hücrelerinin aktivasyonunu baskılayan düzenleyici T hücreleri (Treg'ler) gibi negatif düzenleyici faktörlerin ekspresyonunu aşağı regüle ettiği bildirilmiştir (Mu ve diğ. 2016, Li ve diğ. 2005). Birkaç araştırma raporunda DH-CIK kombinasyonunun, yalnız CIK tedavisinden daha etkin olması klinik için umut verici olarak gösterilmiştir (Zhou ve diğ. 2016). Diğer sitotoksik immün hücrelerin de DH-CIK gibi kombinasyonu ya da çeşitli adjuvanların sitotoksik immün hücreler ile kombinasyonu kanser tedavisinde umut vaat edici çalışmalardır.

İmmünoterapi gibi araştırılan bir başka tedavi yöntemi de kanserde bitkisel kökenli maddelerin kullanılmasıdır (Venugopal ve Liu 2012). Bu maddelerin antitümör aktivite gösterdikleri çeşitli çalışmalar ile desteklenmiştir (Yadav ve diğ. 2009). Bu tez çalışmasında da terapötik potansiyeli yüksek, doğal bir polifenol olan resveratrolün (RSV) kullanılması tercih edilmiştir (Paul ve diğ. 1999). RSV'nin insanlarda meme kanseri de dahil olmak üzere çeşitli kanser tiplerinde hücre proliferasyonunu baskıladığı bilinmektedir (Athar ve diğ. 2009).

Resveratrol, hücre farklılaşması ve aktivasyonu için önemli olan çoklu moleküler hedefleri etkileyen bir polifenoldür. Resveratrolün DH'lerde farklılaşma ve olgunlaşma esnasındaki etkilerinin araştırıldığı bir çalışma sonucunda, özellikle DH'lerin farklılaşması esnasında RSV'nin uygulanması DH ilişkili toleransı indüklediği bildirilmiştir (Svajger ve diğ. 2009). CIK hücreleri ile ilgili yapılan bir çalışmada, RSV'nin CIK hücrelerinin yüzeyinde apoptozu indükleyen ligand (TRAIL) reseptörlerinin aktivasyon yolağını indüklediği gösterilmiştir (Yan ve diğ. 2007). RSV'nin immün sistem negatif Treg hücrelerini inhibe ettiği ve CD8+ T hücrelerinde IFN- γ ekspresyonunu artırdığı da bilinmektedir (Hu ve diğ. 2007). Böylece Resveratrolün aşı temelli kanser tedavisinde adjuvan olarak kullanılabileceği desteklenmiştir.

Kanser immünoterapisine katkı sağlamak doğrultusunda, bu çalışmada sağlıklı gönüllülerin kanlarından elde edilen DH ve CIK hücrelerinin RSV adjuvanı ile indüklenmesi, in vitro ortamda MCF-7 meme kanseri hücre hattına karşı antitümör etkinliğini artırılması ve üç farklı teknik uygulanarak CIK hücrelerinin en yüksek oranda elde edilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Meme Kanseri

Meme kanseri, dünyadaki en yaygın ikinci kanser tipi olup, 2012 yılında teşhis edilen tüm yeni kanser vakalarının % 25'ini (yaklaşık 1.67 milyon) oluşturmaktadır (Torre ve diğ. 2012). Klinisyenler ve araştırmacılar meme kanseri için çeşitli tedavi yöntemlerini yıllardır araştırmaktadır. Fakat hastalık tam olarak çözülememekte ve tedavi arayışı halen devam etmektedir.

Bazı faktörler, meme kanseri için artan risk ile ilişkilidir. Bunlar; tümör supresör ve onkogenlerdeki mutasyonlar, meme kanseri aile öyküsü (genetik yatkınlık), hormonal durum, diyet, stres, ilaç alımı (hormon replasman tedavisi) ve yaşam tarzı faktörlerini içerir (Pascual 1982, Coyle 2004, Moysich ve diğ. 2008).

Genetik faktörlerin, meme kanseri gelişimi üzerinde güçlü bir etkisi vardır. Birçok çalışma Göğüs Kanseri Duyarlılık 1 (BRCA1) ve Göğüs Kanseri Duyarlılık 2 (BRCA2) genlerindeki mutasyonlar ile kanser gelişimi için artan risk arasında bir ilişki olduğunu göstermiştir (Proia ve diğ. 2011). Bu genlerin spesifik sık mutasyonları, aile kanser öyküsünü de içerir (Cianchetti ve diğ. 1985, Wolff 2006).

Meme kanseri gelişimi için genetik bir yatkınlığı bulunmayan kadınlarda, hormonal durum önemli bir risk faktörüdür. Özellikle, östrojen reseptörlerinin ekspresyonundaki artış, meme neoplazisinin gelişmesinde yüksek bir riskdir.

Psikolojik stres, hormonal durumu değiştirerek immün sistemi baskılayabilen ve kanserin gelişmesine izin veren bir başka faktördür. Algılanan stres, östrojen sentezinde kronik bozulma ile meme kanseri başlangıcı için risk faktörlerden biri olarak gösterilmiştir (Nielsen ve Grønbaek 2006). Modern dünyada yaşam tarzının sürekli stres ve artan kirlilikle dolu olduğu göz önüne alındığında, kanser vakalarının sayısının artması beklenmektedir.

Düzenli antibiyotik alımının meme kanseri riskini artırdığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Moysich ve diğ. 2008). Antibiyotik tüketiminden sonra prostaglandin ekspresyonu artar ve immün sistem baskılanır(Wei ve diğ. 2010).

Antidepresanların, doğal hücrel gelişim düzenleyicilerine benzeyen kimyasal yapıları sebebi ile kansere yakalanma riskini önemli ölçüde artırabileceğine dair raporlar vardır. Antidepresanlar bazı durumlarda immün sistemi baskılayabilir ve hücre içi östrojen seviyesini artırabilir (Moysich ve diğ. 2008).

Meme kanseri, terminal kanal lobüler ünitesinde başlayarak adım adım ilerleyen bağlantılı ve kompleks sinyal yolları tarafından sürdürülen heterojen bir hastalıktır. Farklı genetik ve epigenetik değişiklikler bu karsinogenez için çok önemlidir (Khan ve diğ. 2012, Parise ve diğ. 2009). Böylece tek bir gen ürünü veya hücre sinyal yolunu hedeflemek, meme kanserini önlemek veya tedavi etmek için olası değildir. Meme kanseri için güncel tedavi seçenekleri (cerrahi rezeksiyon, radyasyon ve kemoterapötik maddeler) hem pahalı hem de birçok normal gen fonksiyonunu değiştirmektedir (Arslan ve diğ. 2014, Van Rooijen ve diğ. 2015).

Günümüzde meme kanseri tedavisi ve önleme stratejisi, bir dizi ilacın veya birden fazla hedefi modüle eden bir ilacın kombinasyonudur. Kanser büyümesini kontrol etmek için kaç hedefin karşılanması gerektiği henüz keşfedilmemiştir. Bu bağlamda doğal ürünler ve immünoterapi, meme kanseri önleme ve tedavisinde önemli bir seçenek haline gelmişlerdir. Bunların kanser tedavisinde iyi bilinen kullanımları, daha az yan etkilerinden ve özellikle çeşitli sinyal yollarını hedef alma yeteneklerinden kaynaklanmaktadır. Ayrıca doğal ürünler, nispeten düşük maliyette olup meme kanseri için yeni ve güçlü antitümör ajan olma umudu taşıyan moleküllerdir (Banik ve diğ. 2017).

Bu tez çalışmasında, elde edilen kombinasyonun etkinliğini denemek için 1970 yılında 69 yaşında Kafkasyalı bir kadından izole edilen meme kanseri hücre dizisi olan MCF-7 tercih edilmiştir. Açılımı Michigan Cancer Foundation-7 olan bu kanser hücre dizisi 1973 yılında Herbert Soule ve diğ. tarafından belirlenmiştir.

2.2. Kanser İmmünoterapisi

Dünya çapında ciddi bir sorun haline gelen kanserin gelecekte artarak bu konumunu sürdürmesi beklenmektedir (Zhou 2014). Bu durum kanser tedavisi için efektif yöntemlerin kullanımını zorunlu hale getirmektedir.

Günümüzde kanser tedavisi non-spesifik yöntemlerden spesifik yöntemlere doğru ilerlemektedir. Cerrahi yöntemler ve radyoterapi ile tümörlerin yok edilmesinde başarı sağlansa da, bazı kanserli hücre kalıntıları ve metastaza bağlı hastalığın nüksetmesi önemli bir sorundur. Bu yüzden bu yöntemler ile kombine olarak kemoterapi de tedavi sürecinde yer almaktadır. Fakat kemoterapinin kanserli hücrelerin yanı sıra vücudun sağlıklı hücrelerine de verdiği zarar göz önüne alınarak bireysel özelliğe sahip, tümöre spesifik tedavilere olan ilgi artmaktadır (Wayteck 2013).

İmmünoterapi, spesifik terapiler arasında yer alan bir yöntemdir. Kelime anlamı olarak bireyin immün sisteminin belirli kısımlarını kullanarak, kanser gibi çeşitli hastalıklarla savaşmayı sağlayan terapidir. “Biyolojik terapi” ve “Biyoterapi” olarak da adlandırılmaktadır (American Cancer Society 2014).

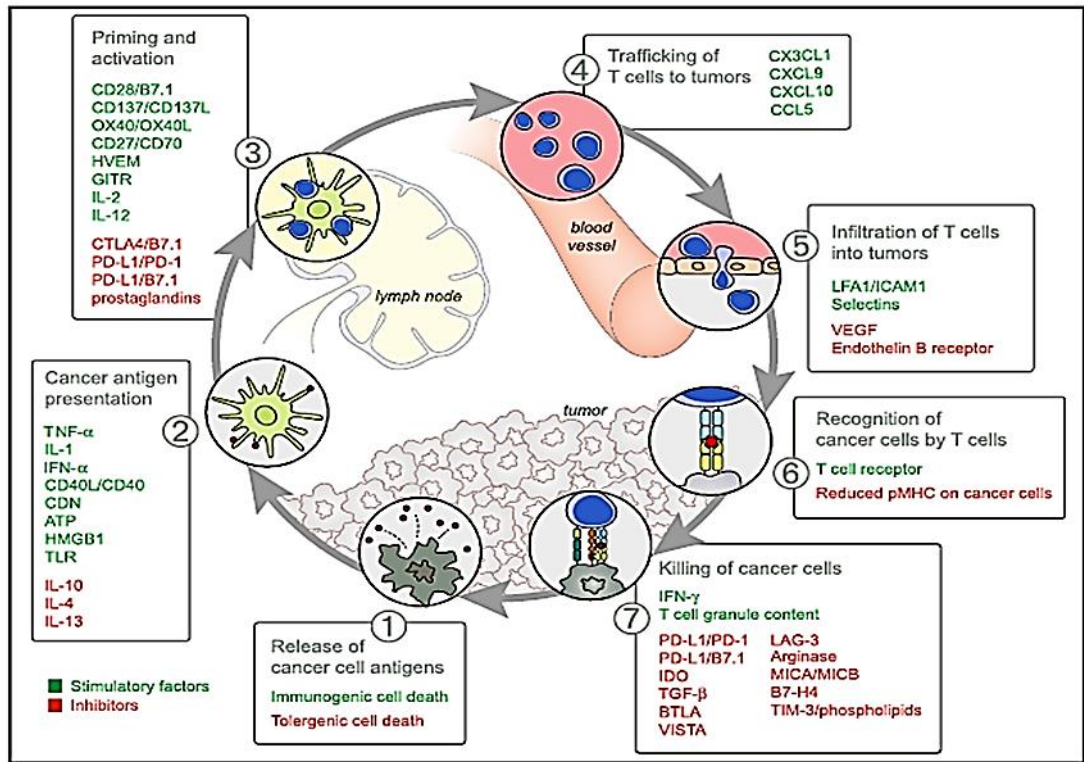
İmmünoterapide dışarıdan verilen maddeler ile tümörlere karşı immün yanıt geliştirilebileceği gibi, vücudun kendi hücreleri ile de bu yanıt oluşturulabilir. Örneğin makrofajlar, NK hücreler, DH’ler, T lenfositler ve B lenfositler çeşitli yollar aracılığı ile tümörlerin yok edilmesine yardımcı olabilir veya doğrudan yok edebilirler. Tümörlere karşı efektör mekanizma olarak kullanılan bu hücreler kemoterapötiklerin aksine direkt olarak kanser hücrelerine yönlendirilebilir. Tedavi bireye özgü olduğundan daha az toksik ve yan etki görülür (Aslan 2010). Bu özelliklerinden dolayı immünoterapi kanser tedavisinde yeni bir boyut olarak öne çıkmaktadır.

Kanser immün siklusu; immün sistemin kanseri nasıl tanıdığını ve yok ettiğini açıklayan, genel olarak CD8⁺ sitotoksik T lenfositlerin (CTL) aracılık ettiği 7 basamaktan oluşan bir döngüdür (Şekil 2.1). Birinci basamakta, onkogen tarafından oluşturulan neoantijenler serbest bırakılır ve işlem için DH’ler tarafından yakalanır (1. aşama). Bu adımda bir antikanser T hücre yanıtı için tümör antijenlerinin indüklenmesine bazı immünojenik sinyaller eşlik etmelidir. Bu tür immünojenik sinyaller, proenflamatuar sitokinleri ve ölmekte olan tümör hücreleri veya bağırsak mikrobiyotası tarafından salınan faktörleri içerebilir. Daha sonra DH’ler, majör histokompatibilite kompleksi-I (MHC-I) ve majör histokompatibilite kompleksi-II (MHC-II) molekülleri üzerinde yakalanan antijenleri T hücrelerine (2. aşama) sunar. Bu işlem kansere özgü antijenlere karşı efektör T hücre yanıtının başlatılması ve

aktivasyonu ile sonuçlanır (3. aşama). Son olarak, aktive edilmiş efektör T hücreleri (4. Aşama) tümör trafiğine girer ve tümör içerisine infiltre olur (5. aşama), T hücre reseptörü (TCR) ve onun MHC-I'e bağlanan kognat antijeni aracılığı ile kanser hücrelerine spesifik olarak bağlanır ve tanır (6. aşama). Nihayetinde hedef kanser hücreleri öldürülür (7. Aşama). Kanser hücresinin öldürülmesi, siklusun sonraki devirlerinde yanıtın genişliğini ve derinliğini artırmak için tümörle ilişkili ilave antijenler (tekrar 1. aşama) açığa çıkarır (Chen ve Mellman 2013).

Kanser hastalarında kanser immün siklusu optimum şekilde gerçekleştirilemez. Tümör antijenleri tespit edilemeyebilir. Dendritik ve T hücreler antijenleri yabancıdan ziyade öz olarak değerlendirebilir. Böylece efektör tepkilerinden ziyade Treg hücre tepkileri oluşabilir, T hücreleri tümörlere uygun şekilde yerleşemeyebilir, tümörü infiltre edebilir veya en önemlisi tümör mikroçevresindeki faktörler üretilen efektör hücreleri baskılayabilir (Motz ve Coukos 2013).

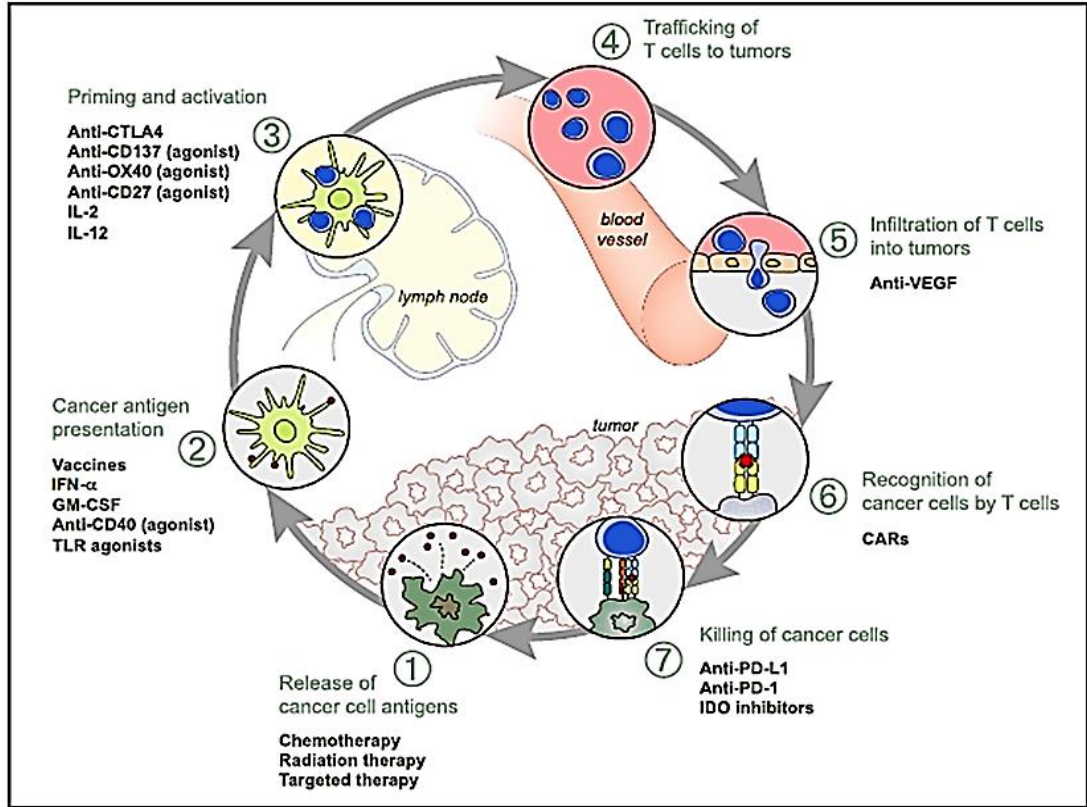
Kanser immünoterapisinin amacı, kendi kendini idame ettiren bir kanser bağışıklığı döngüsünü başlatabilmektir; ancak sınırlandırılmamış otoimmün enflamatuar yanıtlar üretecek kadar değil. Bu nedenle kanser immünoterapileri, negatif geri besleme mekanizmalarını önlemek için dikkatli bir şekilde konfigüre edilmelidir. Sürekli amplifikasyona karşı antitümör immün yanıtını azaltan veya durduran kontrol noktaları ve inhibitörler her basamakta oluşturulsa da, hastalarda hız sınırlama adımının seçici olarak hedeflenmesi gerekir (Şekil 2.1). Tüm siklusu amplifiye etmek antikanser aktivitesi sağlayabilir, ancak normal hücreler ve dokularda istenmeyen hasara da yol açabilir (Predina ve diğ. 2013, Wang ve diğ. 2013).



Şekil 2.1. Kanser immün siklusunda stimülatörler ve inhibitörler. Kanser immün döngüsünün her adımı hem uyarıcı hem de inhibitör olmak üzere çeşitli faktörlerin koordinasyonunu gerektirir. Yeşil renkte gösterilen stimülatör faktörler, bağışıklığı desteklerken; kırmızı renkte gösterilen inhibitörler, işlemi kontrol altında tutar ve bağışıklık aktivitesini azaltır ve/veya otoimmüniteyi önler. Şekilde gösterilmemesine rağmen, intratümöral Treg'ler, makrofajlar ve miyeloid kökenli baskılayıcı hücreler (MKBH) inhibitör faktörlerin çoğunun temel kaynaklarıdır (Chen ve Mellman 2013).

Kanser immün siklusunda ortaya çıkan sayısız faktör, çok çeşitli potansiyel terapötik hedefler sunmaktadır. Şekil 2.2'de, klinik öncesi veya klinik değerlendirme altında olan bazı tedavilerin örnekleri gösterilmektedir. En önemli vurgular, aşuların esas olarak siklusta 2. aşamayı, sitotoksik T lenfosit antijen-4 (CTLA4) 'ün 3. aşamayı ve programlanmış ölüm ligand-1 (PD-L1) veya programlanmış ölüm proteini-1 (PD-1) antikörlerinin 7. aşamayı desteklemesini içerir. İmmünoterapi; kemoterapi, radyoterapi ve hedefe yönelik tedaviler kadar geliştirilmemesine rağmen esas olarak

siklusta 1. aşamayı destekleyebilir ve vasküler endotelial faktör (VEGF) inhibitörleri potansiyel olarak tümörlere T hücre infiltrasyonunu teşvik edebilir (Chen ve Mellman 2013).



Şekil 2.2. Kanser immün siklusunu etkileyebilecek tedaviler (Chen ve Mellman 2013).

2.2.1. Kanser İmmünoterapisinin Tarihsel Gelişimi

Wilhelm Busch 1866 yılında yaptığı çalışmada, *Streptococcus* türü bakterilerden kaynaklı postoperatif erizipel geçirdikten sonra tümör baskılanması geliştirdiklerini incelemiştir. 1868 yılında, sarkomalı bir hastasını operasyon sonrasında aynı enfeksiyonla enfekte ederek tümör baskılanmasını gözlemlemek istemiştir. Bu fenomen bilinen ilk tümör immünoterapisi girişimlerindedir (Cruiel 2013). 1891 yılında New York'ta bir cerrah olan William Bradley Coley bu olayı yeniden denemek amacı ile canlı ve inaktif *Streptococcus pyogenes* ve *Serratia marcescens* bakterilerinin intratümöral enjeksiyonlarını yapmaya başladı. Coley ilk

defa cerrahi müdahale edilemeyen malign tümöre sahip bir hastasına bu tedaviyi uyguladı ve hasta tamamen iyileşerek uzun yıllar yaşamına devam etti (Eskander ve Tewari 2015).

Coley'in çalışmaları, Bacille Calmette-Guérin (BCG)'in kanser immünoterapisinde kullanımında öncülük etmiştir. Bu aşı, ilk kullanıldığı günden beri yüzeysel mesane kanserine karşı en etkili tedavi olarak halen önemini korumaktadır (Parish 2003).

Paul Ehrlich 1900 yılında, günümüzde antikör aracılı pasif immünoterapi olarak adlandırılan tedavinin ilk bulgularını tümörlerle etkileşen moleküllerin kanser terapisinde önemli rol alacağını belirtmiştir. 1975 yılında George Köhler ve Cesar Milstein hibridoma teknolojisini geliştirerek monoklonal antikör üretmişlerdir. Bu buluş ile 1982 yılında monoklonal antikörler insan neoplazisinde ilk defa başarılı olarak uygulanmış ve 1986 yılında muromonab-başkalaşım kümesi 3 (CD3/OKT3) Gıda ve ilaç uygulama (FDA) tarafından onaylanmıştır. FDA tarafından 1997 yılında peş peşe ilk hümanize monoklonal antikör olan daclizumab (Zenapax) ve malignite için ilk monoklonal antikör olan rituximab (Rituxan) onaylanmıştır. 2000 yılında ilk toksin bağlı monoklonal antikör olan gemtuzumab ozogamicin (Mylotarg) ve 2002 yılında radyonüklid bağlı ilk monoklonal antikör olan ibritumomab tiuxetan (Zevalin) FDA'dan onay almıştır (Waldmann 2003).

Kanser immünoterapisinin geliştiği önemli bir başka alan da, hasta bireyin kendi vücut hücrelerinin kullanılması ile ilgili çalışmalar olmuştur. Burnet tarafından 1960 yılında tümör immün sürveyans hipotezi ileri sürülmüştür. 1995 yılından beri etkili tümör spesifik immüniteye yönelik yapılan ikna edici çalışmalar büyük ilgi çekmiştir. Özellikle DH'lerin tümör spesifik T hücrelerine antijen sunma yetenekleri ile ilgili pek çok çalışma bu duruma ön ayak olmuştur. Preklinik çalışmaları takiben hastalarda da çok sayıda çalışma yapılmıştır (Parish 2003).

2.2.2. Kanser İmmünoterapisinde Kullanılan Yöntemler

Kanser immünoterapisinde kullanılan yöntemler arasında en fazla klinik çalışma yapılan ve onaylanan yöntem monoklonal antikörlerdir (Waldmann 2003). Monoklonal antikörler hücre yüzeyindeki reseptörler ile kontak kurarak aktiviteyi

sağlarlar. Bu şekilde ortaya farklı biçimlerde sinyalizasyonlar çıkar. CD20 antikorunu (Anti-CD20) apoptozu uyarır, epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) bağlayan antikor ise doğal ligandların bağlanmasını engelleyerek reseptörleri bloke eder. Monoklonal antikorun gövde kısmı (Fc) reseptörü sayesinde mononükleer hücreler ve lökositler antikorla kaplı hücreleri fagositoz yoluyla veya sitotoksik granüllerini boşaltarak imha ederler. İmmünoglobülin G (IgG) ve immünoglobulin M (IgM) yapısında olan antikorlar kompleman sistemini klasik yoldan aktive ederek inflamasyon yanıtı meydana getirebilirler. Gelişen enflamatuar yanıt, fagositik lökositlerin kemotaktik etki yapmasını, ayrıca ikincil sitokinlerin üretilmesini sağlayarak vasküler geçirgenliği artırır ve bununla birlikte monoklonal antikorlar hücre içine kolay bir şekilde infiltre olabilirler (Demirelli 2005). Tedavi etkinliğini artırmak için toksinler veya radyonüklidlere konjuge olan monoklonal antikorlar da vardır. Bunlar monoklonal antikorlar ile kanser hücresine hedeflenir ve içerdiği toksinler ya da dağıttığı radyasyon ile hedef hücreyi yok ederler (Waldmann 2003).

Kanser terapisinde immünolojik olarak aktif hücreler, hastalığın oluşumunu önlemek ve hastalığı tedavi etmek amacı ile hastaya verildiği yöntem adoptif immünoterapi olarak adlandırılır (Özet ve diğ. 1996). Bu yöntemde; tümör infiltre lenfositler (TIL), TCR ekspresyonu için düzenlenmiş T hücreleri ve antikorun ekstraselüler kısmı ile T hücresi reseptörünün sinyal mekanizmasını bir araya getiren kimerik antijen reseptörü (CAR) ekspresyonu için düzenlenmiş T hücreler kullanılır. En kolay hazırlananı TIL'lerdir, ancak tedavi invazif işlemler gerektirir. TIL'lerin transferden sonra desteklenmesi için yüksek dozda interlökin-2 (IL-2)'ye ihtiyaç vardır. Bu da önemli toksisitelere neden olur. Bu yaklaşım ile yapılan çalışmalarda başarılı sonuçlar alınmıştır. CAR ekspresyonu yapan T hücreleri ile ilgili birçok çalışma mevcuttur. Bu yöntemde başarılı sonuçlar alınsa da aktarımdaki etkinliğe bağlı sıkıntılar ve olası toksisite nedeni ile klinik uygulanması hâlen kısıtlıdır. Başka bir yaklaşım da endojen tümör spesifik T hücrelerinin kullanılmasıdır. Bu yaklaşım en fizyolojik ve en çok işlem gerektirendir. Bütün bu çalışmalara olan ilgi günden güne artmaktadır (Harris ve Drake 2013).

Kanser immünoterapisindeki yeni tekniklerden biri de hastayı kendi tümör hücreleri veya antijenleri ile aşılmasıdır. Aşılar, adjuvanlar ile birlikte uygulanan

rekombinant proteinler halinde olabilir. Hastanın kendi dendritik hücrelerinin alınıp in vitro ortamda tümör hücreleri ya da antijenleriyle kültüre edilerek hastaya uygulanması ise başka bir yöntemdir. Bu yöntemde amaç, tümör antijenlerini taşıyan ve sunan dendritik hücrelerin, çapraz sunumun normal yolağının taklidi ile tümöre karşı CTL oluşumunu sağlamaktır. Prostat kanserli hastalarda Sipuleucel-T (Provenge) kanser aşısı FDA'dan onay aldıktan sonra DH temelli kanser aşısı çalışmaları hız kazanmıştır (Kantoff ve diğ. 2010). Başka bir metot da tümör antijenlerini kodlayan komplementer deoksiribonükleik asitleri (cDNA) içeren plazmidlerin hastaya verilmesi ile hastanın kendi hücrelerinde ve antijen sunan hücrelerinde bu antijenleri eksprese etmeye başlayarak bunlara karşı bir T hücre yanıtının oluşmasını sağlamaktır (Aslan 2010). Fare modellerinde yapılan çalışmalarda olumlu sonuçlar alınmış olsa da hâlen klinikte kullanılan bir otoimmün aşı mevcut değildir. Yapılan kanser aşı çalışmaları, monoklonal antikorların kanser tedavisinde kullanılmasına yönelik çalışmalara temel oluşturmaktadır (Şakalar ve diğ. 2013).

Sitokinler de kanser immünoterapisindeki yöntemlerden biridir. Sitokinler, bir kısım bağışıklık sistemi hücreleri tarafından salınan kimyasallardır. İmmün hücrelerinin, kan hücrelerinin üretilmesinde ve etkinliğinde önemli rol oynarlar. Subkutan, intramuskuler ve intravenöz teknikleri ile uygulanırlar. Sitokinler ile tedavi esnasında hastada birçok yan etki oluşur. Farklı çeşitleri olmasına karşın en fazla kullanılanları interlökinler, interferonlar ve granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktörler (GM-CSF)'dir. İnterlökinler içerisinde en yaygın kullanılan ise IL-2'dir. İmmün sistem hücrelerinin hızlıca bölünmesine yardım ederler. Tek başına veya kemoterapi ve IFN- α gibi sitokinler ile kombine edilerek kullanılabilir. İleri renal kanseri ve metastatik melanoma tedavisinde kullanım onayı almıştır. Kanser tedavisinde kullanılmak için IL-7, IL-12 ve IL-21 gibi sitokinler de araştırılmaktadır. IFN- α direkt olarak kanser hücrelerinin gelişmesini veya anjiyogenezi yavaşlatır ve bir kısım immün sistem hücrelerinin kanser hücreleri ile savaşma yeteneğini artırır (Barbaros ve Dikmen 2015). GM-CSF ise kemik iliği ve kanda granülosit, makrofaj ve eozinofil gibi kan hücrelerinin daha fazla üretimesini sağlar (Cantürk ve diğ. 1999). GM-CSF'nin sentetik bir türü olan lökin, kemoterapi sonrasında azalan lökosit sayısını artırmak amacı ile kullanılır. GM-CSF'nin çeşitli kanser tiplerinde uygulanabilmesi

için yapılan çalışmalar halen sürmektedir (American Cancer Society 2014). Sitokinlerin tedavide aktif olarak kullanımı henüz tam olarak sağlanamamış olsa da lenfosit aktivasyon düzenlenmesinin daha net anlaşılması ile beraber daha etkin antitümör yaklaşımları oluşacaktır (Aslan 2010).

İmmün sistemi destekleyici tedaviler, non-spesifik bir şekilde tedaviye katkı sağlayarak tümörün direkt imha edilmesinden ziyade, vücudun tümörle mücadelesinde ona destek veren tedavilerdir. Talidomit, lenalidomit ve pomalidomit gibi immün sistemi uyaran ilaçlar, BCG gibi mesane kanseri ve bazı melanomlarda kullanılan bakteriyel tedaviler bunlara örnek gösterilebilir (American Cancer Society 2014). Bunların yanısıra mantarlarda bulunan polisakkarit yapılı bazı maddelerin de kansere karşı etkili olduğu saptanmıştır. Örnek olarak bir beta-glukan olan lentinanın makrofajlar, NK hücreler, T hücreleri ve sitokinleri uyardığını belirten çalışmalar vardır ve bu alanda araştırmalar devam etmektedir (Chen ve diğ. 2013).

2.3. Dendritik Hücre (DH)

İlk olarak 1868 yılında Paul Langerhans, DH'leri insan derisinden izole ederek tanımlamıştır (Langerhans 1868). Yaklaşık bir yüzyıl sonra Steinman ve Cohn tarafından bu hücreler rat dalaklarında yeniden keşfedilmiş ve morfolojilerine dayanarak “dendritik hücreler” olarak adlandırılmıştır (Steinman ve Cohn 1973). Bu tespitten kısa bir süre sonra dendritik hücrelerin yalnızca dalakta değil birçok lenfoid ve lenfoid olmayan dokuda da bulunduğu tespit edilmiştir (Reid 1998).

Dendritik hücreler, immün yanıtın düzenlenmesinde önemli rol oynayan beyin, testis ve göz haricinde bütün dokularda yer alan, T hücrelerine antijen sunan hücrelerdir (Lehrer ve Ganz 2001, Avigan 1999). DH'lerin esas işlevi antijen sunmak olduğundan bu hücreler profesyonel antijen sunucu hücreler olarak adlandırılmakta ve bilhassa henüz farklılaşmamış T lenfositleri stimüle ederek primer immün cevabın oluşmasını sağlamaktadırlar. Bu işlevlerini gerçekleştirebilmek için antijeni yakalama, işleme tabi tutma ve uygun kostimulan moleküller ile hücre yüzeyinde sunma kabiliyetleri mevcuttur. Bununla birlikte DH'ler B hücre fonksiyonlarının oluşumunda etkili oldukları için humoral immünitinin gelişmesinde de önemli yere sahiptirler (Lehrer ve Ganz 2001, Avigan 1999, Satthapom ve Eremin 2001).

2.3.1. Dendritik Hücre Kökeni ve Fonksiyonu

Dendritik hücrelerin yaşam döngüsü oldukça karmaşıktır ve birçok matürasyon aşaması içermektedir (Knight ve diğ. 1997). Langerhans hücreler, dermal DH'ler ve interstitial DH'ler periferik dokuda yer alırlar (Caux ve diğ. 1996). Lenfoid kökenli DH'ler primer ve sekonder lenfoid organlarda bulunur ve primer periferik T hücre cevabının oluşumunda rol alırlar (Suess ve Shortman 1996). DH'ler doğrudan deriden veya periferik kandan izole edilir. Alternatif olarak, DH'ler in vitroda CD14⁺ periferik kan monositlerinden veya CD34⁺ kordon kanı kök hücrelerinden GM-CSF, IL-4 ve TNF- α gibi ilgili sitokinler kullanılarak elde edilir. DH'ler immatür, matür ve semi-matür olarak bulunurlar (Şekil 2.4) (Caux ve diğ. 1997, Bender ve diğ. 1996, Sallusta ve diğ. 1995).

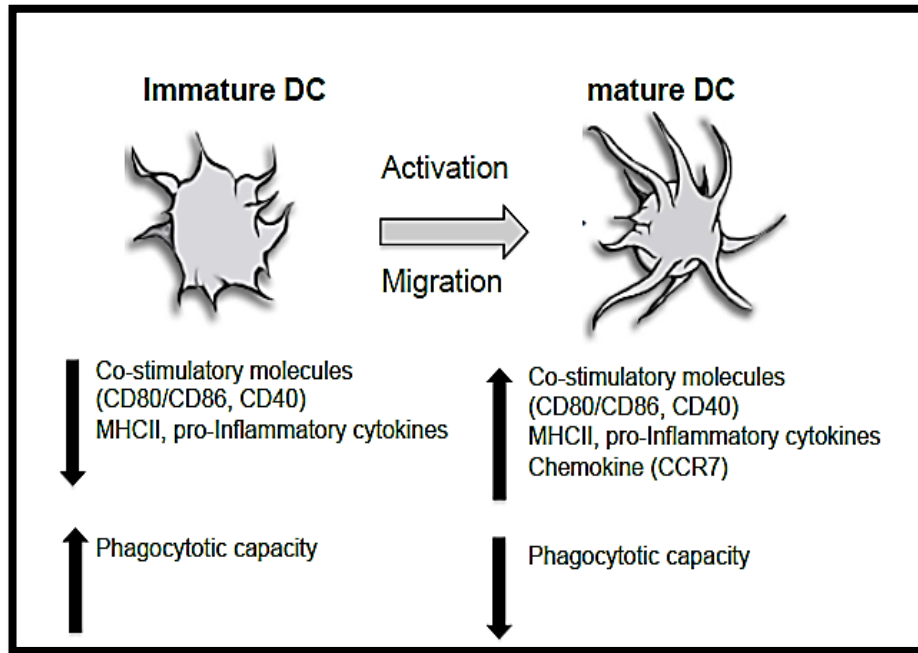
2.3.1.1. İmmatür Dendritik Hücre

İmmatür DH'ler, vücut yüzeyinde ve çoğu dokuların intertisyel alanlarında yer alırlar. DH'ler, antijenleri yakalamak için makropinositoz ve reseptörler aracılığıyla endositoz ile teçhiz edilmişlerdir (Sallusta ve diğ. 1995). İmmatür DH'ler, MHC sınıf II moleküllerinin orta seviyeleri, CD80 ve CD86 gibi kostimulatör moleküllerin düşük seviyeleri, CD1a'nın orta seviyeleri ve yalnızca matür DH'ler ve olgunlaşmamış B hücreleri tarafından salgılanan CD83'ün yokluğu ile karakterize edilirler (Zhou ve Tedder 1995, Zhou ve Tedder 1996).

DH'ler antijen işlemesine alternatif olarak yüzeylerinde bulunan reseptörler aracılığı ile dokuda bulunabilecek çeşitli sinyalleri algılayabilir haldedirler. Bu reseptörler tehlike sinyalleri ve apoptotik doku hücreleri tarafından salınan güvenlik sinyallerine karşı hassastırlar (Lutz ve Schuler 2002). DH'ler dokulardaki inflamasyon düzeyine karşı da hassastır. Farklı sinyallerin yoğunluğu ve gücü immatür DH'lerin değişiminin son halini belirlemektedir. Uyarı alınması ile birlikte immatür DH'lerin fonksiyon, morfoloji ve davranışları değişmektedir. İmmatür DH'ler gerekli sitokin uyarılarını alamaz ise T hücrelerine antijen sunumunu yapamaz ve T hücre aktivasyonunu gerçekleştirmez (Sporri ve Caetano 2005).

2.3.1.2. Matür Dendritik Hücre

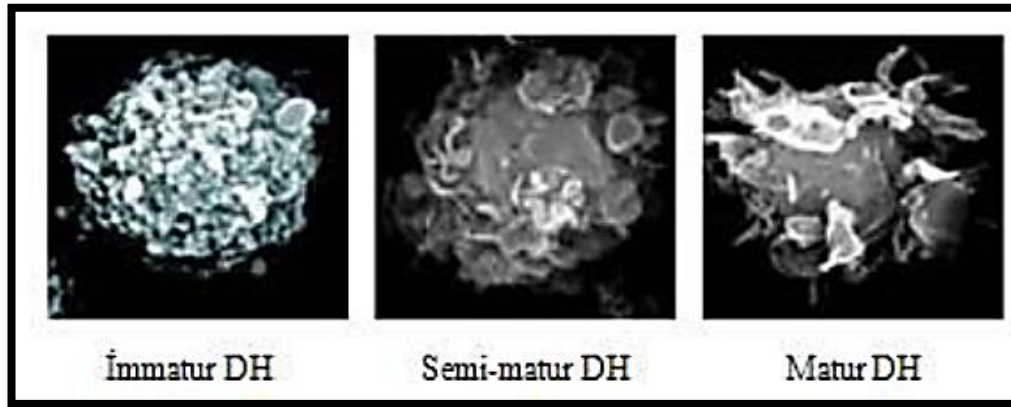
Matür DH'ler, Antijen sunabilen ve T hücrelerini indükleyebilen CD83⁺ DH'lerdir. İmmatür DH'nin matür hale gelmesi için tehlike sinyalleri ile indüklenmesine ihtiyaç vardır. DH'ler tehlike sinyallerinin etkisiyle antijen toplar ve lenf düğümüne erişir. Lenf düğümlerinde yüksek seviyede T hücre bulunması, başarılı bir dendritik hücre ve T hücre eşleşmesini kolaylaştırmaktadır. Göç sırasında matür halde olmayan DH'lerin morfolojileri farklılaşarak, daha geniş yüzey alanına sahip olmalarını sağlayan sitoplazmik çıkıntılar oluştururlar (Şekil 2.3). Bu uzantılar, T hücrelerin bağlanması için bir diğer etkidir (Mosmann ve Livingstone 2004). Ayrıca matür DH'lerin en önemli özellikleri T hücre aktivasyonunu indükleyen, enflamatuar bir sitokin olan IL-12'yi salgılamalarıdır. Matür DH'ler antijen sunumunun gerçekleşmesinde bir diğer faktör olan kostimülatör molekülleri de üretebilmektedirler (Medzhitov ve Janeway 2002).



Şekil 2.3. DH matürasyonu esnasındaki değişimler (Hopp ve diğ. 2014, Hubo ve diğ. 2013). İmmatür dendritik hücrelerin yüksek endositoz, Matür dendritik hücrelerin ise düşük endositoz yeteneği vardır.

2.3.1.3. Semi-Matür Dendritik Hücre

Apoptotik koşullarda, güvenlik sinyallerine maruz kalan immatür DH'ler semi-matür DH'lere farklılaşmaktadır. Morfolojik olarak matür DH'lere çok benzerler, onlar gibi antijen sunabilme yeteneğine de sahiptirler ama T hücrelerini uyaramazlar. Matür DH'ler gibi IL-12 salgılamak yerine güvenlik sinyallerinin alınmasından sorumlu IL-10 sitokinini salgılamaktadır. IL-10, sunulan antijen ile eşleşen T hücrelerini represyon yeteneğine sahiptir. Güvenlik sinyalleri ile birlikte birikmiş antijenler tolerans olarak sunulduklarından, T hücreleri tarafından bu antijenlere cevapsızlık oluşur. Bu mekanizma, antijenlere karşı fazla reaksiyonu engellemek için meydana gelen doğal bir mekanizmadır (Williams ve diğ. 2007).



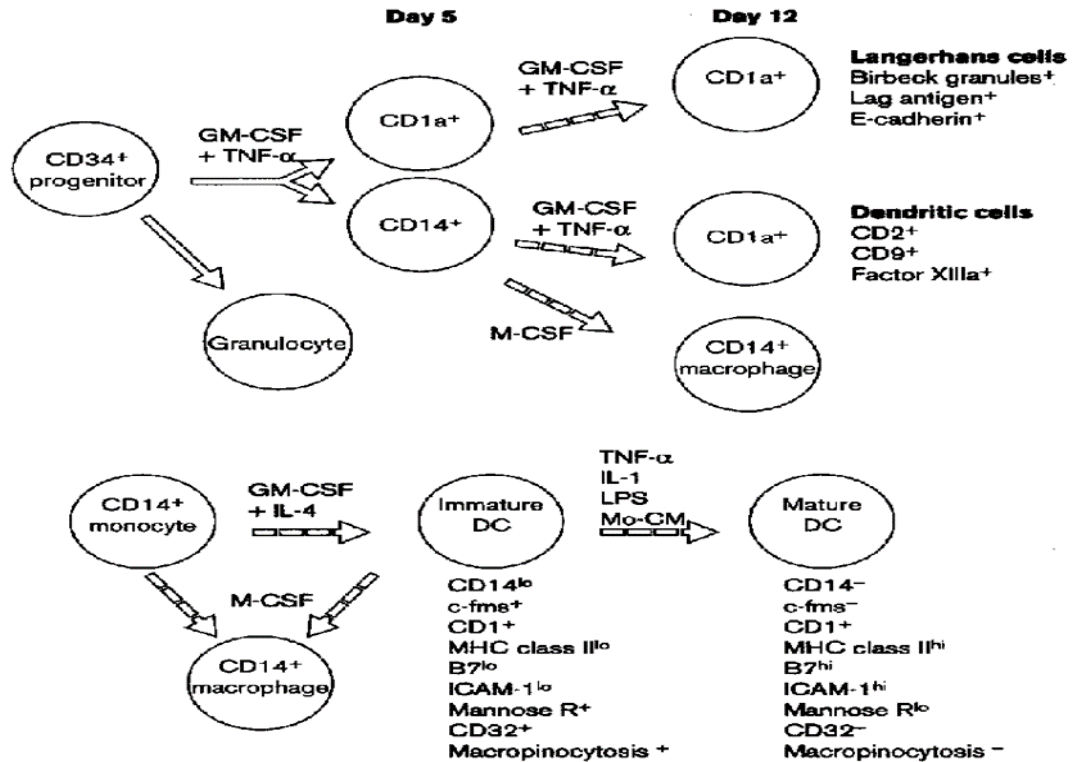
Şekil 2.4. İmmatür, semi-matür ve matür DH'lerin mikroskop altındaki görüntüsü (Greensmith 2007).

2.3.2. Dendritik Hücrelerin Farklılaşması

İnsan kordon hücresi CD34⁺ hematopoetik progenitörleri, GM-CSF ve TNF- α ile kültüre edilerek, DH'lerin farklı tiplerini kapsayan karma hücreleri üretir (Şekil 2.5a) (Caux ve diğ. 1992, Caux ve diğ. 1996, Szabolcs ve diğ. 1996). Kültürün 5. gününde CD1a ve CD14'ün eksprese edilmesi ile, DH'lerin öncüleri belirlenebilir. DH'nin iki alt tipi de, kültürün 12. Gününde matüre olarak tipik DH'leri oluştururlar. CD1a⁺ öncüleri, epidermal Langerhans hücrelerine özgü olarak bulunan Birbeck granülleri, CD207 olarak da bilinen langerhans hücresi granül antijeni (LAG) ve E-kaderin markerlarını eksprese eden hücreleri üretirler. Bununla birlikte, CD14 öncüleri matüre olarak CD14, CD1a DH'lerine, eksik olan Birbeck granüllerini, E-kaderin ve

Lag antijenini oluşturur, fakat CD2, CD9, CD68 ve dermal DH'lere özgü olan marker XIIIa faktörünü eksprese eder. İlginç olarak, CD1a⁺ öncüleri hariç CD14⁺ öncüleri halen bipotenttir. Bunun sebebi makrofaj koloni uyarıcı faktörüne (M-CSF) yanıt esnasında makrofajlara başkalaşabilmektedirler (Sallusto ve Lanzavecchia 1994, Romani ve diğ. 1996).

DH'ler, GM-CSF ve IL-4 ile birlikte kültüre edildiğinde CD14⁺ PKMH'lerinde gelişebilmektedir (Şekil 2.5b). Bu hücreler immatür özelliğe sahiptir ve daha ileride TNF- α , IL-2 veya lipopolisakkarit (LPS) (Bender ve diğ. 1996) gibi enflamatuar stimülatörler ya da monositler tarafından indüklenerek matür hale gelebilirler (Palucka ve diğ. 1998). İlginçtir ki, monositlerden üretilen immatür dendritik hücreler kaybettikleri halde bir sonraki matürasyonda hala M-CSF reseptörüne sahiptirler. Böylece ortaya çıkan ifade, monositlerin dış uyarılara bağlı olarak DH'lere ya da makrofajlara polarize olabilen, zengin öncü kaynakları olmalarıdır. İn vitro ortamda uygun sitokinin (GM-CSF + IL-4 ya da M-CSF) eklenmesiyle bu polarizasyon gerçekleştirilebilir (Caracciola ve diğ. 1987).



Şekil 2.5. DH'lerin orijini ve matürasyonu (Herzenberg ve diğ. 2007).

2.3.3. Antijen Sunumu

DH'ler, hem eksojenik hem de endojenik antijen türlerini işleme ve diğer MHC sınıf I ya da II moleküllerinin bağlamına peptid sunma yeteneğine sahiptirler. DH'ler matüre olduğunda, peptid yüklü MHC sınıf I ve II moleküllerinin oluşması ve hücre yüzeyine taşınması için elzem niteliklere sahip olurlar (Cella ve diğ. 1997). Antijen hücre yüzeyine taşındığı zaman, CD80 ve CD86 gibi stimülatörlerin artırılmış ekspresyonu ile karşılaşılırlar. Bu moleküller, TCR iletişim gücünü artırır ve T hücrelerinin aktive olmasına öncülük eder (De Saint-Vis ve diğ. 1998).

Dendritik hücre lizozom ilişkili membran proteini olan DH-LAMP (CD208), belirli bir biçimde lizozomal MHC sınıf II kompleksine eksprese edilir ve DH'ler üzerine CD40 ligasyonundan sonra yukarı regüle olurlar. Bu antijenlerin işlenmesinin indüklenmesi ya da antijen yüklü MHC sınıf II komplekslerinin hücre yüzeyine taşınmasına asist etmesinde görev alıyor olabilir (De Saint-Vis ve diğ. 1998). Katepsin S gibi proteazların, DH'ler içindeki MHC sınıf II moleküllerin hücre içi trafiğinin regüle edilmesine katkı sağladığı da gösterilmiştir (Driessen ve diğ. 1999). İmmatür DH'ler, hücre yüzeyine, matürasyon esnasında yok olan serbest MHC sınıf II ve insan lökosit antijeni-DM (HLA-DM) ekspresyonu yapabilirler (Santambrogio ve diğ. 1999). Salgılanmış DH proteazları antijenik peptidleri işleyebilir ve hücre yüzeyi HLA-DM ve serbest MHC sınıf II molekülleri ile beraber antijen işleme ve yükleme faaliyetleri immatür DH'lerdeki hücre içine ek olarak hücre dışı da gerçekleştirebilmektedir. DH'ler, sitotoksik hücreler üretmek için, MHC sınıf I kompleksleri ile karıştırılmış antijenik peptidleri, CD8⁺ T hücrelerine sunarlar. DH'lerin kendilerinin virüsle enfekte olduğu hallerde, proteazomlar basitçe viral proteinlerin yapısını bozarak onları sitozoldan endoplazmik retikuluma (ER) transfer ederler (Yewdell ve diğ. 1999). Protein işlemeden sorumlu taşıyıcı, sitozolik peptidlerin MHC sınıf I komplekslerine bağlanabildiği ER'ye taşınmayı kolaylaştıran peptid taşıyıcısıdır. İmmatür DH'ler tarafından eksprese edilen hücre yüzeyi reseptörlerinin bir çeşidi, antijen çekiminde ve MHC sınıf I ile beraber antijen sunumunda işlev gösterebilmektedir (Albert ve diğ. 1998).

2.3.4. İmmünoterapi ve DH'ler

İmmün sistem, tümöre karşı savunmada önemli bir role sahiptir. İmmün sistem hücreleri, mutasyona uğramış hücreleri tespit etmek için devamlı olarak vücutta dolaşmaktadırlar. Bir anormallik ya da tümör ile karşılaşma halinde immün sistem, malign hücreleri genellikle imha etmektedir (Euvrard 2008). Bu sebep ile, immün sistem baskılayıcı ilaç kullanan hastalarda, kanser görülme sıklığı artış göstermektedir. Lakin immün sistemi baskılayan tek şey ilaçlar değildir. Çoğu kanser çeşitleri immün sistemden kaçış mekanizmalarına sahiptir. Diğer bazı kanser çeşitleri ise immün baskılayıcı ürünler salgılayarak, malign hücreleri yok edebilen immün sistem hücrelerini susturabilmektedir. Nihayetinde, kanser hücreleri immün sistemden kaçarak tümör dokularını meydana getirmektedir (Fraser ve diğ. 2003, Kim ve diğ. 2007). Baskılanmış olan immün sistemi tekrar aktive ederek kalan kanser hücrelerini ortadan kaldıracak bir terapi yöntemi geliştirmek için birçok çalışma yapılmıştır (Rolinski ve Hus, 2010).

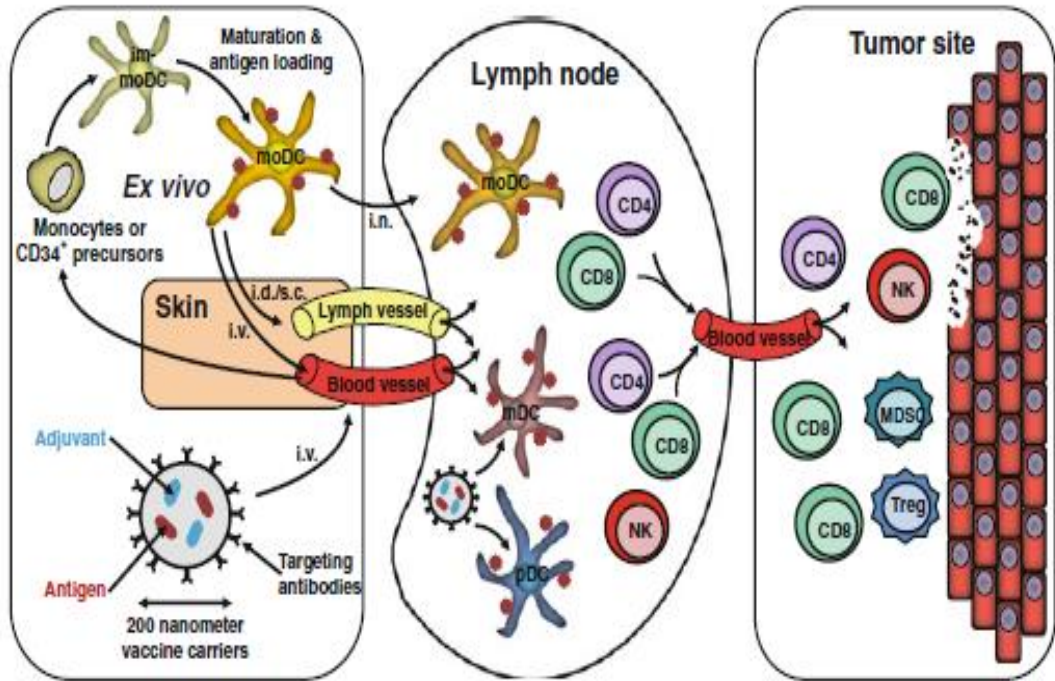
Hastaların kendi immün cevabını yöneterek, kanserin önlenmesi ya da savaşıması esasına dayalı bir tedavi yöntemi olan aşı tedavisi, uzun zamandan beri kanser hastalarına uygulanmaktadır. Aşı uygulamasının biyolojik prensibi, aşının hastalığa sebep olan molekülün benzerini bulundurmasıdır. Böylelikle aşı, immün sistem hücrelerini bu antijenik yapıyı yabancı olarak anlamaları için eğitmektedir. Sonuçta, eğitilen bu hücreler daha sonra antijen ile karşılaştıklarında, bu antijeni taşıyan hücreleri vücuttan temizlemek için mücadele başlatmaktadır (Kindt ve diğ. 2007). Çiçek hastalığı, grip ve çocuk felci gibi birçok hastalıkla mücadele etmede geliştirilen koruyucu ve tedavi edici aşılar, bulaşıcı hastalıklara karşı aşı tedavisinin oldukça başarılı olduğunu göstermektedir. Ancak bulaşıcı olmayan hastalıklarda bu başarı henüz istenilen seviyelerde değildir. (Kalinski ve Okada 2010).

DH'lerin uyku halinde T hücre aktivasyonu potansiyelleri kanser gibi durumlarda aşı terapisinde kullanılabilir. Bu durumda, tümöre özgül antijenler ile duyarlı hale getirilen DH'ler kanser hastasına enjekte edilmekte ve T hücreleri spesifik olarak aktive olmaktadır. Bu şekilde kanser hücreleri ve hepatit C, persistan serviks displazilerinde görülen insan papilloma virüsü (HPV) enfeksiyonu ve insan

başıklık yetmezlik virüsü (HIV) gibi kronik viral enfeksiyonlar da tedavi edilebilmektedir (Ovalı ve diğ. 2007).

Geçtiğimiz on yıl boyunca, ağırlıklı olarak kanser hastalarında yapılan klinik aşılama çalışmalarında DH temelli immünoterapi dünya çapında araştırılmaktadır (Lesterhuis ve diğ. 2004). Çoğu klinik çalışmada, tümör kütesini spesifik olarak azaltabilen ve tümör nüksetmesini kontrol etmek için immünolojik belleği uyarabilen tümöre özgü efektör T hücrelerini indüklemek amacıyla hastalara uygulanan otolog ex vivo kültürlenmiş, antijen yüklü monosit türevli DH'ler veya CD34⁺ progenitor türevli DH'leri kullanılır (Şekil 2.6) (Bol ve diğ. 2013). Monositlerden veya CD34⁺ progenitor hücrelerinden kültürlenmiş DH'ler, ex vivo tümör antijeni ile yüklenebilir ve proenflamatuar sitokinler gibi matürasyon stimülatörlerinin varlığı ile kültüre edildikten sonra, farklı yollarla kanser hastalarına uygulanabilir. Lenf nodu içinde, DH'ler, immün yanıtı başlatmak için kostimülatör sinyalle antijenleri T hücrelerine sunar. Aktive edilmiş tümör antijene spesifik T hücreleri, lenf nodundan dışarı çıkarak antijenin yeri olan tümör bölgesine doğru göç eder. Tümör bölgesinde, MKBH ve Treg'ler, T hücreleri tarafından tümör temizliğini komplike ederek ve periferal toleransı uyararak, immünosüpresif bir mikro çevre oluşturabilirler. Doğal DH alt tiplerinin açığa çıkarılması iki şekilde gerçekleşir. Birincisi, plazmasitoid dendritik hücrelerin (pDH) ya da miyeloid dendritik hücrelerin (mDH) izole edilmesi ve bunların adjuvan ya da antijen ile ex vivo olarak uyarılması (şekilde gösterilmemiştir) ile gerçekleşir. İkincisi ise, Antijen ve adjuvan taşıyan, DH'ye spesifik yüzey reseptörlerine karşı antikorlarla kaplanmış nanopartiküllerin in vivo olarak hedeflenmesi ile gerçekleşir. Hem pDH'ler hem de mDH'ler T hücrelerini uyarabilir. Her iki DH alt tipi aralarındaki çapraz konuşma ile NK hücreleri gibi diğer immün hücrelerini de uyarabilir (Bol ve diğ. 2013).

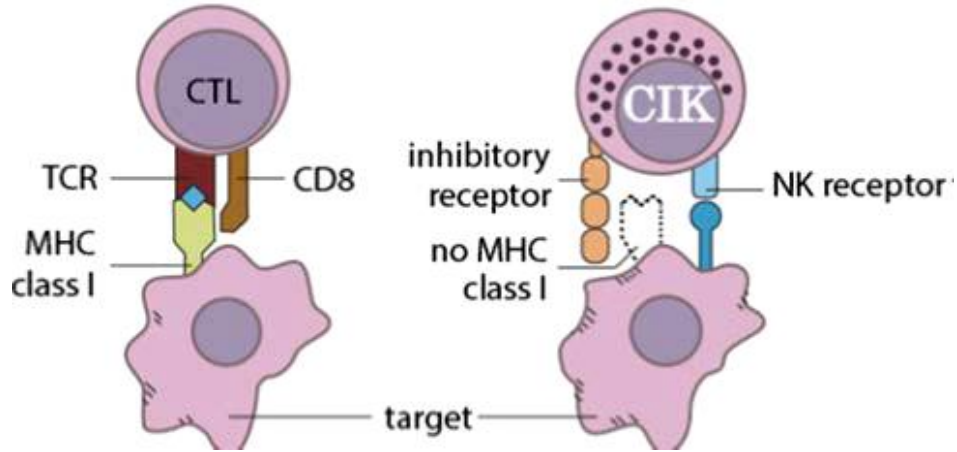
Son yıllarda, kanser hastalarında 100'ün üzerinde klinik çalışma yürütülmüştür ya da halen yürütülmektedir. Yapılan çalışmaların çoğu, aşılamanın optimize edilmesine ve immün yanıtının ölçülmesine yönelik küçük keşif çalışmalarıdır. Kısacası, DH immünoterapisinin klinikte de yer aldığı, özellikle de uygun şekilde matüre olan DH'nin güçlü immünolojik yanıt oluşumunu teşvik ederek uygulanabilir ve güvenli olduğunun kanıtlandığı sonucuna ulaşabiliriz. Bununla birlikte, şimdiye kadar çok sınırlı sayıda uzun süreli klinik yanıt gözlenmiştir (Bol ve diğ. 2013).



Şekil 2.6. Ex vivo ya da in vivo DH aşılama yolu ile tümör antijene spesifik T hücrelerinin indüklenmesi (Bol ve diğ. 2013).

2.4. Sitokin ile Uyarılmış Öldürücü (CIK) Hücre

CIK hücreleri ilk olarak 1991 yılında keşfedilmiştir (Schmidt-Wolf ve diğ. 1991) ve insan periferik kan lenfositlerinden (PBL) üretilen $CD8^+$ T hücrelerinin heterojen bir popülasyonudur. Anti-CD3, IFN- γ ve IL-2 ile in vitro ya da ex vivo inkübasyonu yapılarak elde edilirler. Fas ligand (FasL) ve perforinin aracılık ettiği tümör hücrelerini öldürebilirler (Lee ve diğ. 2016). Hücre yüzey molekülü CD56 varlığına göre, CIK hücreleri iki ana alt gruba ayrılır: $CD3^+ CD56^+$ T hücreleri ve $CD3^+ CD56^-$ T hücreleri. Doğal öldürücü T hücreleri olarak da adlandırılan $CD3^+ CD56^+$ T hücreleri, CIK hücrelerinin başlıca efektör hücreleri olarak kabul edilir (Linn ve diğ. 2002). Dolayısıyla CIK hücreleri, CD335, doğal öldürücü grup 2D (NKG2D) ve CD337 gibi NK hücre reseptörlerini aktive ederek MHC aracılığı olmadan kanser hücrelerini parçalayabilir (Şekil 2.7) (Schmidt ve diğ. 2004, Pievani ve diğ. 2011, Verneris ve diğ. 2004).

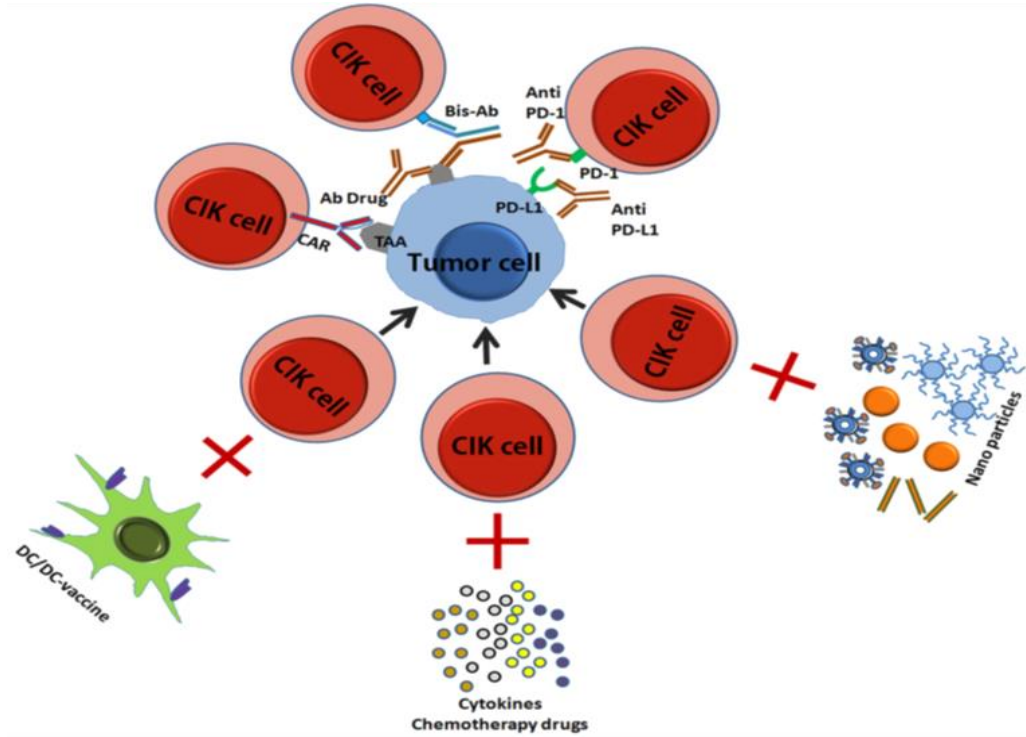


Şekil 2.7. CIK hücrelerinin MHC aracılığı olmadan sitotoksik aktivitesi (Zhang ve diğ. 2012).

CIK hücreleri kanser hücrelerini doğrudan öldürebildiği gibi, çeşitli sitokinleri salgılayarak bağışıklık fonksiyonunu da düzenleyebilir. Tümör hücreleri ile uyarıldıktan sonra CIK hücreleri tarafından salgılanan TNF- α , IFN- γ ve IL-2 gibi pro-enflamatuar sitokinlerin düzeylerinin önemli ölçüde yukarı regüle edildiği birçok çalışmada gösterilmiştir. Ayrıca bu sitokinler, sistemik antitümör aktivitesini artırır ve yardımcı T hücre-1 (Th1) immün yanıtını indükler (Linn ve diğ. 2005).

2.4.1. CIK Hücre Tedavisinin Gelişimi

Son on yıldır, CIK hücreleri klinik tedavide başarılı bir şekilde uygulanmaktadır. Bu hücrelerin sitotoksitesi ve güvenliğini geliştirmek için çok sayıda araştırma yapılmıştır. CIK hücre tedavisinin gelişimi şekil 2.8’de özetlenmiştir (Thanendrarajan ve diğ. 2012, Jakel ve Schmidt-Wolf 2014).



Şekil 2.8. Şematik olarak CIK hücre tedavisinin gelişimi (Gao ve diğ. 2017).

2.4.1.1. CIK-Ek Sitokinler Kombinasyonu

CIK hücreleri, IFN- γ , anti-CD3 ve IL-2 ilavesi ile PKMH'lerden elde edilen heterojen bir hücre popülasyonudur. Aslında, CIK antitümör aktivitesini geliştirmek için birçok ek sitokin vardır. Bu sitokinler, antitümör immünesini inhibe ettiği bilinen Treg hücrelerinin üretimini baskılayarak kısmen hücre proliferasyonunu ve sitotoksitesini geliştirebilir (Gao ve diğ. 2017).

Lu ve diğ. (1994), IL-1 α ilavesi ile periferik kan lenfositlerini (PBL) kültüre ederek yüksek verimli sitotoksik CIK hücrelerinin elde edilmesi için yeni bir protokol rapor etmiştir.

Başka bir araştırma, IL-6 ilavesinin negatif Treg hücrelerinin yüzdesini önemli ölçüde azalttığını ve aynı zamanda CIK hücrelerinin hepatoselüler karsinomaya (HCC) karşı in vitro proliferasyon kabiliyetini ve sitotoksitesini artırdığını göstermiştir (Lin ve diğ. 2012).

Finke ve diğ. (1998), IL-7 gen ekspresyon vektörünü CIK hücrelerine transfekte ederek, CIK hücrelerinin antitümör sitotoksitesinin ve proliferasyon

oranının arttığını göstermişlerdir. Daha ileri bir çalışmada, CIK sitotoksik aktivitesi için gerekli olan ve T hücresi aktivasyonunda önemli bir uyarıcı rol oynayan ekzojen IL-7 eklenmesi ile CIK hücrelerinde lenfosit fonksiyonuna bağlı antijen-1 (LFA-1) ve CD28'in yukarı regüle olduğu gösterilmiştir (Zoll ve diğ. 2000).

IL-12; Th1 yanıtını uyarabilen, NK ve CTL aktivasyonunu sağlayan en güçlü antitümör etkinliğine sahip sitokindir (Yang ve diğ. 2012). IL-2 yerine IL-12 ile üretilen CIK hücreleri benzer sitotoksitesite göstermiştir. IL-12'nin yüksek toksisitesi nedeni ile, klinik uygulamada CIK ile kombinasyon halinde düşük dozda IL-12 kullanılmalıdır (Zoll ve diğ. 1998).

Birçok çalışmada, IL-15 ile uyarılan CIK hücrelerinin hematolojik ve solid malignitelere karşı yüksek proliferasyon kapasitesi ve hücre sitotoksitesite gösterdiği belirtilmiştir (Rettinger ve diğ. 2012, Tao ve diğ. 2013, Iudicone ve diğ. 2016). Bu fonksiyonun olası mekanizması Treg hücrelerinin düzenlenmesi ve toll benzeri reseptör-4 (TLR-4), Wnt aile üyesi-4 (Wnt-4) ve IL-35 ekspresyonundan kaynaklabildiği düşünülmektedir (Tao ve diğ. 2013, Cai ve diğ. 2014, Wang ve diğ. 2014).

IL-21'in uygulanması, CIK hücrelerinin proliferasyon oranını artırmamış fakat IFN- γ , TNF- α , perforin ve granzim B'nin ekspresyonunu artırarak hücre sitotoksitesitesini önemli ölçüde artırmıştır (Rajbhandary ve diğ. 2013, Zhao ve diğ. 2013).

2.4.1.2. DH-CIK Kombinasyonu

Dendritik hücreler, tümörle ilişkili antijenleri (TAA) yakalayıp işleyebilen profesyonel antijen sunan hücrelerdir (Banchereau ve Steinman. 1998). Hem adaptif hem de doğuştan gelen antitümör immün yanıtlarını uyarma yetenekleri göz önüne alındığında, DH'ler kanser immünoterapisi için güçlü bir farmakolojik araç olarak kullanılmaktadır (Anguille ve diğ. 2015). Birçok araştırma, DH'lerin hücre-hücre temas yolu ile NK hücrelerine bağlı antitümör etkisini destekleyebileceğini göstermiştir (Fernandez ve diğ. 1999, Nicol ve diğ. 2000).

Son yıllarda yapılan çalışmalar, DH ve CIK hücrelerinin kombinasyon tedavisi üzerinde yoğunlaşmış, kanser terapisi için yeni ve etkili bir immün terapötik strateji sağladığını kanıtlamıştır. DH'ler; CIK hücrelerinin aktivasyonu, çoğalması, fenotip ifadesi ve sitokin sekresyonunda önemlidir (Mu ve diğ. 2016, Wei ve diğ. 2015, Li ve diğ.2005). CIK hücreleri DH'ler ile birlikte kültüre edildiği zaman; CIK hücrelerinin sitotoksitesi belirgin bir şekilde artmış ve IL-2, IFN- γ , IL-12 ve TNF- α gibi sitokinlerin seviyelerinin yükseldiği bildirilmiştir (Wei ve diğ. 2015, Zhou ve diğ. 2016). Ayrıca, CIK hücreleri ile birlikte kültürlenmiş DH'ler, TGF- β ve IL-10'un yanı sıra, CIK hücrelerinin aktivasyonunu baskılayan CD4⁺ CD25⁺ Treg'ler gibi negatif düzenleyici faktörlerin ekspresyonunu aşağı regüle ettiği bildirilmiştir (Mu ve diğ. 2016, Li ve diğ. 2005).

Cao ve diğ. (2016), CIK hücrelerinin DH'ler ile birlikte in vitro kokültürünün, CIK hücrelerinin proliferasyon oranını ve antitümör aktivitesini artırdığını belirtmiştir. Daha ileri çalışmalarda, CIK hücreleri ve DH'ler arasındaki hücreler etkileşimlerin, her iki popülasyonun yüzey molekülü ekspresyonunda değişikliklere ve IL-12 salgılanmasında önemli bir artışa yol açtığı, sonuç olarak CIK hücrelerinin sitotoksik aktivitesinde artış olduğu gösterilmiştir (Marten ve diğ. 2001).

DH temelli aşılardan, çeşitli malignitelerin tedavisi için etkili bir yöntem olduğu bilinmektedir. CIK hücreleri doğrudan tümör hücrelerini öldürebilir, ancak çok kısa süreli anti kanser etkinliğine sahiptir ve uzun vadede tümör büyümesini kontrol etme olasılığı daha düşüktür. Buna karşılık, DH aşılardan tümöre özgü efektör ve bellek T hücrelerini indüklediği gösterilmiştir. Dolayısıyla, DH-CIK kombinasyonlu aşı, efektör T hücrelerinde potansiyel olarak daha yüksek sitotoksik etkinlik ve özgünlüğe sahip olabilir ve bu da hem kısa hem de uzun vadeli antitümör etkinliğini gösterir. DH-CIK kombinasyonlu aşılardan üzerine yapılan çalışmalar, daha güçlü antitümör aktivitesi ve daha az yan etki göstermiştir (Lee ve diğ. 2016, Cui ve diğ. 2013, Liu ve diğ. 2016). Jung ve diğ. (2016), bir in vivo hayvan modelinde, DH-CIK aşılama tedavisinin hepatokarsinoma tümör hücrelerinin tedavisi için tek başına CIK veya DH aşılama tedavisinden daha etkili olduğunu göstermiştir. Yakın zamanlarda, Lin ve diğ. (2017) DH-CIK tedavisinin, IV. evre meme kanseri hastalarında hastalık progresyon riskini azaltarak sağkalımı artırdığını bildirmişlerdir.

2.4.1.3. CIK- İmmün Kontrol Noktası İnhibitörleri Kombinasyonu

İmmün kontrol noktaları, immün sistemde sinyalleri artıran veya azaltan moleküllerdir. CTL'ler apoptozu indükleyerek tümör hücresi ölümünü tanıyıp tetiklediğinde, antijen sunucu hücreleri (ASH) ya da tümör hücreleri ve T hücreleri arasında çeşitli kontrol noktası yolları T hücre aktivasyonu için aktive edilir (Chen ve Mellman. 2013, Preusser ve diğ. 2015). CTL'lerin aktivasyonunu veya inhibisyonunu düzenleyen en az iki sinyal yolağı vardır: Birinci sinyal, ASH'ler ve T hücre reseptörleri tarafından sunulan peptit-MHC arasındaki bağlanmadır. İkinci sinyal, T hücre aktivasyonunu düzenleyen kostimulatör ya da koinhibitör sinyaldir (Driessens ve diğ. 2009, Pardoll 2012). CD28, CD134/OX40, CD58, CD40L, CD80, CD86 ve CD137 immün aktivasyonunu destekleyebilen stimulatörler iken; PD-1, CTLA-4, lenfosit aktivasyon geni-3 (LAG-3), T hücresi immünoglobulin ve musin domaini-3 (TIM-3) immün aktivasyonu baskılayan inhibitörlerdir. CTLA-4 ve PD-1, birçok malignanside T hücre immün kaçışında rol oynarlar, böylece kanser immünoterapileri için hedef olarak tasarlanırlar (Vinay ve diğ. 2015, Dai ve diğ. 2016). CIK hücrelerindeki CTLA-4 hariç PD-1, öldürücü hücre immünoglobulin benzeri reseptör (KIR), TIM-3 ve LAG-3 gibi inhibitör reseptörlerin bloke edilmesi, hematolojik malignitelere karşı antitümör potansiyelini önemli ölçüde artırabilir. Bununla birlikte, iki reseptöre karşı kombine edilen inhibitörler, tek olan ile karşılaştırıldığında artmış sitotoksite göstermemiştir (Poh ve Linn 2016). Yapılan bir çalışmada, PD-L1 / PD-1 blokajının gastrik ve kolorektal kanser hücrelerine karşı CIK sitotoksitesini artırdığı bildirilmiştir. Ayrıca, mide kanserli fare modellerinde yapılan çalışmada, kontrol noktası inhibitörleri (PD-L1/PD-1 blokajı) ile CIK hücre kombine tedavisinin tümör büyümesini inhibe edebildiği ve tedavi edilmeyen farelere kıyasla sağ kalma süresini uzatabildiği ispatlanmıştır (Dai ve diğ. 2016). Bütün bunlar, kontrol noktası inhibitörleri ile CIK hücrelerinin kombinasyonunun kanser terapisi için önemli bir yöntem olacağını öne sürmektedir.

2.4.1.4. CIK-Antikor Kombinasyonu

Spesifik antikorları olan tümörlerin immünoterapisi, son 20 yılda en başarılı terapötik stratejilerden biri olmuştur. Antikor temelli tümör hücresi öldürme mekanizmaları şu şekildedir:

(1) Antikor, hücre yüzey reseptörüne doğrudan bağlanabilir; tümör hücrelerini hedeflemek, hücre apoptozunu indüklemek ve proliferasyonu azaltmak için ilaç veya toksin sağlar.

(2) Antikor, aktive edici kompleman, antikor bağımlı hücrel sitotoksisite ve T hücre fonksiyonunun düzenlenmesi gibi immün aracılı öldürme mekanizmaları ile tümör hücrelerini öldürebilir.

(3) Antikor, vaskülatür reseptör antagonizması ya da ligand yakalaması ile tümör anjiyogenezini düzenleyebilir (Sievers ve Senter 2013, Scott ve Wolchok 2012). Birçok çalışmada, antikor ile kombine CIK hücrelerinin, sitolitik aktivitelerini artırabildiği gösterilmiştir (Pievani ve diğ. 2011).

Deng ve diğ. (2015), anti-CD20 monoklonal antikor (mAb) tarafından indüklenen geliştirilmiş CIK sitotoksitesinin kısmen mitojen aktive protein kinaz (MAPK) ve sinyal transdüseri ve transkripsiyon aktivatörü (STAT) sinyal yollarının bileşenlerinin artan ekspresyonuna bağlı olduğunu kanıtlamıştır. Esser ve diğ. (2016), CIK hücrelerinin anti-CD30 mAb Brentuximab Vedotin ile kombinasyon tedavisinin CD30⁺ lenfomada daha iyi etkinlik sağladığını ve CIK hücrelerinin işlevini etkilemediğini bildirmiştir. Ayrıca, iki farklı antijen bağlanma bölgesine sahip bispesifik antikorlar (BsAbs), CIK hücrelerinin malign tümör hücreleri ile çapraz bağlanma yoluyla adoptif immünoterapi etkisini geliştirebilir (Fan ve diğ. 2015). Kanseri antijen-125 (CA-125) ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü-2 (Her2)'ye karşı BsAb'ler, hem in vitro hem de in vivo modellerde birincil yumurtalık kanserinde CIK hücrelerinin sitotoksitesini önemli ölçüde artırmıştır. BsAb EGFR/CD3, CIK hücrelerinin gastrik kanser hücrelerine karşı sitotoksik aktivitesini artırabilir. Anti-CD3/anti-CD133 BsAb ile kombine CIK hücreleri, CD133 yüksek pankreatik ve hepatik kanser hücrelerine tek başına CIK, CD3-CIK veya BsAb'den daha güçlü sitotoksisite göstermiştir (Huang ve diğ. 2013). Son zamanlarda, Ma ve diğ. (2015), CIK hücrelerinin BsAb CD3 / EGFR ile kombinasyonu in vivo ve in vitro olarak glioblastoma tümörlerinin büyümesini inhibe ettiği gösterilmiştir.

Tüm bu veriler; CIK hücreleri ile antikor kombinasyonlarının in vitro ve in vivo daha güçlü antitümör etkinliği gösterdiğini ve CIK hücreleri için yeni ve yararlı bir yöntem olabileceğini düşündürmektedir.

2.4.1.5. CIK-CAR Kombinasyonu

Hedef hücre tanımayı desteklemek ve CIK hücrelerinin spesifik sitotoksitesini geliştirmek için, CIK hücreleri her zaman spesifik antijene hedeflenen bir CAR ile yapılandırılır. Karsino-embriyonik antijene (CEA) karşı doğrudan hedeflenen CAR ile kombine CIK hücreleri, CEA⁺ kolon karsinoma hücreleri ile CEA⁻ hücreler karşılaştırıldığında CEA⁺ hücrelerine karşı güçlü aktivasyon gösterdi (Schlimper ve diğ. 2012). Oelsner ve diğ. (2016), CD19 CAR ile kombine edilen CIK hücrelerinin antilösemik aktivitesinin önemli ölçüde arttığını kanıtlamıştır. Hombach ve diğ. (2013), tarafından CD28- CD3zita (CD3ζ) CAR ile kombine edilen CIK hücrelerinin daha güçlü sitotoksite gösterdiğini; ancak CD28-CD3ζ-OX40 CAR ile kombine edilen CIK hücrelerinin hücre ölümü aktivasyonunun artmasına bağlı olarak daha az antitümör etkinliği sergilediği ispatlanmıştır.

Tüm bu veriler, CAR tarafından modifiye edilen CIK hücrelerinin, daha güçlü tümör hücresi öldürme aktivitesine sahip olduğunu ve CAR için uygun tasarımın, CAR aracılı CIK yanıtının başarılı bir şekilde uygulanması için çok önemli olduğunu göstermektedir.

2.4.1.6. CIK-Kemoterapi Kombinasyonu

Birçok çalışma, CIK/DH-CIK kombine kanser tedavisinin farklı kemoterapi rejimleri ile kombine edildiği zaman, yalnızca kemoterapi uygulamasından daha iyi etkinlik gösterdiği kanıtlanmıştır. Wu ve diğ. (2008), CIK hücreleri ile kemoterapinin (dosetaksi ve sisplatin) kombine olarak, ilerlemiş küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (KHDAK) hastalarına uygulandığında progresyonsuz sağkalımı ve genel sağkalımı (OS) anlamlı olarak uzatabildiğini göstermiştir. Bilindiği üzere, kemoresistans kanserlerin tedavisinde önemli bir sorundur. İlginçtir ki, birçok çalışma CIK hücrelerinin kemoterapi ile kombinasyonunun immün sistemi aktive ederek kemoterapi direncinin üstesinden gelebileceğini göstermiştir. Zheng (2015) ve Han (2015), meta-analiz kullanarak KHDAK tedavisinde CIK hücreleri ile kombine edilmiş kemoterapinin etkinliğini ve güvenliğini analiz etmişlerdir. DH-CIK immünoterapisi ile kombine kemoterapinin 1 yıllık OS ve hastalık kontrol oranı bakımından daha üstün olduğunu bulmuşlardır. Bütün bunlar ile, kombinasyon

tedavisinin ileri evre KHDAK hastaları için daha güvenli ve etkin olduğu ileri sürüldü (Zheng ve diğ. 2015, Han ve diğ. 2015). Aynı sonuçlar Mu ve diğ. (2016)'nin mide kanserli hastalarda yaptığı çalışmalarda da bulunmuştur. Ayrıca, CIK/DH-CIK terapisinden sonra mide kanseri hastalarının immün fonksiyonunun önemli ölçüde iyileştiğini kanıtlayan IL-2 haricinde IFN- γ ve IL-12 seviyeleri önemli ölçüde artmıştır. Bir başka meta-analiz, kemoterapi ile kombine edilen DH-CIK'ın kolon kanserinde 1, 2 ve 3 yıllık OS'yi uzatabildiğini göstermiştir (Wang ve diğ. 2014).

Tüm bu veriler, tek başına kemoterapinin veya CIK hücrelerinin kullanımına kıyasla CIK ile kemoterapi kombinasyonunun daha yüksek antitümör etki gösterdiğini kanıtlamaktadır.

2.4.1.7. CIK-Nanotıp Kombinasyonu

Nanoteknoloji ve nanotıpın hızlı gelişimi ile nanomateryaller, başta insan sağlığı olmak üzere çeşitli alanlarda uygulanmaktadır. Son yıllarda, nanoteknoloji kanser tedavisi için birçok yeni yöntem getirmiştir (Liang ve diğ. 2016, Ferrari 2005, Jin ve Cui 2016). Nanometre boyutlu parçacıklar (1–100 nm); antikorlar ve membran reseptörleri dahil olmak üzere biyomakromoleküller ile aynı boyut aralığındadır (Sanvicens ve Marco 2008). Düşük toksisiteli nanomateryaller, hücre alımı artırarak, enzim bozulmasını önleyerek ve immün hücre fonksiyonlarını düzenleyerek antijenlerin immünojenitesini geliştirmek için aşı taşıyıcı/adjuvan madde olarak kullanılabilir (Irvine ve diğ. 2015, Xu ve diğ. 2016). Birçok araştırmacı; kuantum noktaları (Cambi ve diğ. 2007), manyetik nanopartiküller (Lim ve diğ. 2008, Cruz ve diğ. 2011) ve üst enerji dönüşümlü nanopartiküller (Xiang ve diğ. 2015) gibi DH temelli kanser aşısının etkinliğini artıran nano malzemelerin potansiyel uygulamalarını araştırmıştır (Park ve diğ. 2013). CIK/DH-CIK hücrelerinin nanomateryaller ile kombinasyonunun kanser immünoterapisinde büyük bir potansiyele sahip olabileceği önerilmektedir (Gao ve diğ. 2017).

2.5. Kanser Tedavilerinde Bitkisel Kökenli Maddelerin Kullanımı

Son zamanlarda, konvansiyonel kanser terapilerinde başarı oranının düşük olması, çoğunlukla kanserin nüksetmesi ve çeşitli yan etkilerin meydana gelmesinden

dolayı sağlıklı bir besin diyeti uygulanarak destek terapisi yolları aranmaktadır (Venugopal ve Liu 2012).

Besin maddelerinin bir kısmının insan sağlığı üzerindeki etkileri yapılan çalışmalar ile kesin olarak saptanmıştır. Bu maddeler, oksidatif süreci inhibe ettiği, antiinflamatuvar ve antitümör aktivite gösterdiği yapılan in vitro çalışmalar ile desteklenmiştir (Yadav ve diğ. 2009). Antitümör özellik gösteren, bitkilerde kendiliğinden doğal olarak oluşan kemopreventif maddeler, insanlar tarafından yaygın bir şekilde takviye edici gıda olarak kullanılmaktadır. Bu maddelerden bazıları; kateşin, likopen, soya izoflavonu, nar fenolikleri, selenyum, D vitamini, kurkumin, silibinin ve resveratrol'dür (Athar ve diğ. 2007).

Çeşitli bitki ve sebzelerde yüksek miktarda bulunan antioksidan maddeler fitokimyasal olarak adlandırılmaktadır. Meyve, sebze ve tahıllarda 5000'den fazla fitokimyasal saptanmıştır. En yaygın kullanıma sahip sınıflandırma; polifenoller, karotenoidler, alkaloidler, nitrojen içeren bileşikler ve organosülfür bileşikleridir. Fitokimyasalların diyeteye eklenmesi ile kanser ilerlemesi yavaşlatılabilir ya da durdurulabilir (Liu 2004).

Fitokimyasallar ile ilgili yapılan çalışmalarda, serbest radikalleri tuttuğu; gen ifadesini, hücre farklılaşmasını, onkogenleri, tümör supresör genleri düzenlediği; hücre döngüsünde tutuklanmayı ve apoptozu indüklediği; detoksifikasyon, oksidasyon ve redüksiyonda enzim aktivitesini düzenlediği, immün sistemi indüklediği, hormon bağımlı karsinogenezi düzenlediği ve antibakteriyel, antiviral etkileri gösterdikleri bildirilmektedir (Liu 2004).

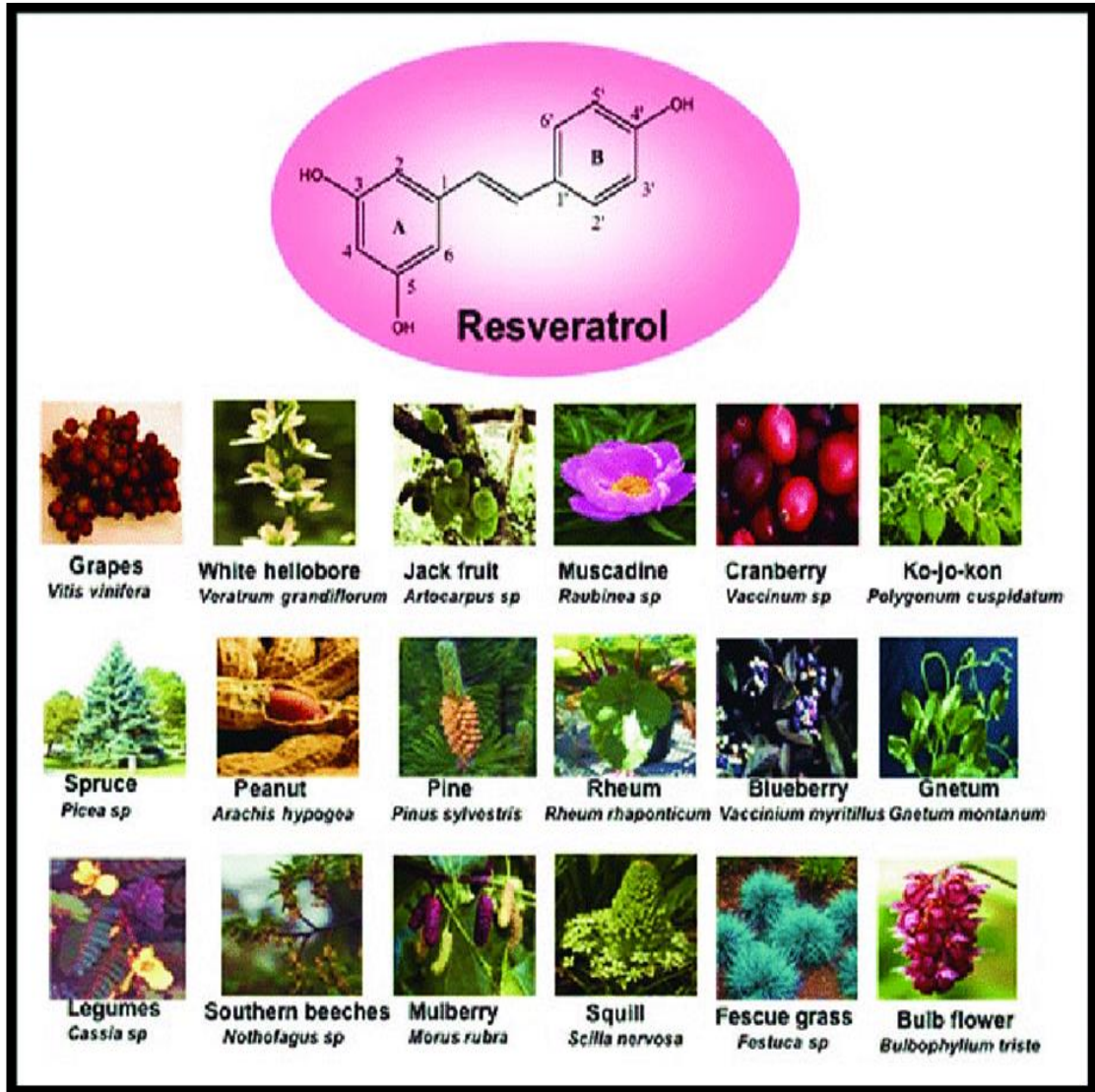
En çok çalışılan flavonoid grubu fitokimyasallar, yeşil çayda bulunan epigalatlara, kurkumin ve resveratrol'dür. Örneğin; yeşil çayda bulunan aktif maddelerin %50'sini oluşturan epigalokatekin-3-galat (EGCG), uzun zamandır antikanserojen ajan olarak araştırılmaktadır. Çok sayıda yapılan çalışmalarda; EGCG tüketimi ile oral, meme, prostat, mide, yumurtalık, özofagus, cilt, kolon, pankreas, baş ve boyun kanserlerin inhibisyonu arasında pozitif bir ilişki olduğu belirtilmiştir (Mak 2012).

2.5.1. Resveratrol (RSV)

İnsan popülasyonunu etkileyen çeşitli rahatsızlıklara karşı kimyasal tedavilerin başarısızlığı nedeni ile doğal ürünlerin olası terapötik potansiyeline olan ilgi artmaktadır. Bu amaç ile birçok potansiyel bileşik izole edilmiştir ve bunların bazıları şu anda klinik çalışmaların farklı fazlarındadır. RSV, hakkında 2000'den fazla makalenin yayınlandığı bir polifenoldür (Paul ve diğ. 1999).

Resveratrol kelimesi Latince bir kelime olan “Res” kelimesinden türetilmiştir, “veratrum” ve “bitkiden gelen”, “ol” yapıdaki alkol parçasının varlığını gösterir (Nonomura ve Makimoto 1963). RSV (3, 4', 5-trihidroksistilben), bileşiklerin stilben sınıfına ait bir fitoaleksindir (Langcake 1979). RSV'nin prekürsörü, fenilalanindir ve enzim stilben sintaz, reaksiyonu katalize eder. 32 cinse yayılan 70'den fazla bitki türünde RSV varlığı bildirilmiştir (Şekil 2.9) (Nonomura ve Makimoto 1963).

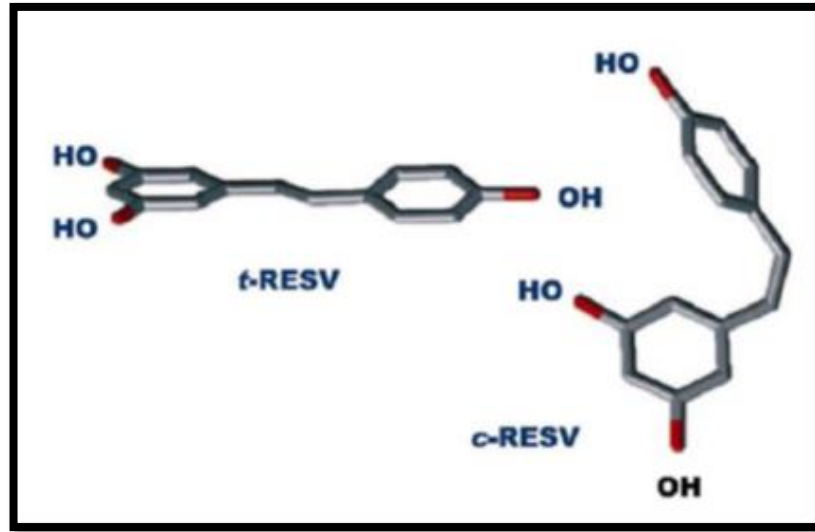
Bileşik ilk olarak 1940'da akçöpleme (*Veratrum grandifolium* O.Loos) bitkisinin köklerinden ve Nonomura ve Makimoto (1963) tarafından geleneksel bir Japon ve Çin bitkisi olan *Polygonum cuspidatum*'un köklerinden izole edilmiştir. RSV; üzüm, dut, erik, limon, kiraz, yer fıstığı, fındık gibi birçok meyve türünde, çerezlerde ve okaliptüs, zambak, ladin, yaban mersini ve akasya benzeri bitkilerde yüksek oranda bulunur (Dong 2003). Taze üzüm kabuğu gram ıslak ağırlık başına yaklaşık 50-100 mg resveratrol içerir ve böylece kırmızı şarapta ve üzüm suyunda nispeten yüksek bir resveratrol konsantrasyonu bulunur (Aggarwal ve diğ. 2004, Shishodia ve diğ. 2006).



Şekil 2.9. Resveratrolün yapısı ve kaynakları (Aggarwal ve diğ. 2004, Shishodia ve diğ. 2006).

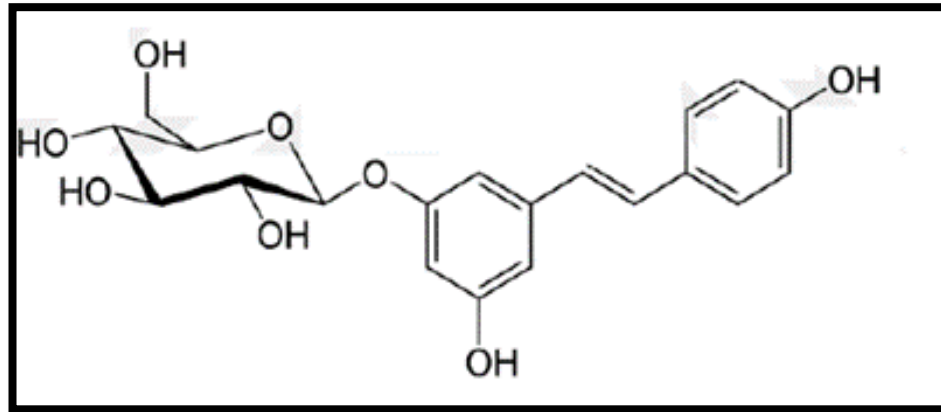
2.5.1.1. Resveratrolün Yapısı ve Türevleri

3,4,5-trihidroksi-trans-stilben kimyasal adı ile bilinen RSV'nin sembolü $C_{14}H_{12}O_3$ 'dür. Ağırlığı 228,25 g/mol olup; kaynama noktası 253-255 °C'dir (Haneke 2012). RSV hafif sarı renkli beyaz bir tozdur (Lin ve diğ. 2007). Etanol ve dimetilsülfoksit (DMSO) içinde çok iyi çözünür, suda ise az çözünür (Seeram ve diğ. 2006). RSV'nin trans ve cis izomerleri vardır (Şekil 2.10), ayrıca glikolize olmuş piseid formu (Şekil 2.11) da vardır. Resveratrolün trans formu, biyolojik aktivite gösteren formudur (Haneke 2002).



Şekil 2.10. Resveratrolün cis ve trans formları (Haneke 2002).

RSV bitkilerde genellikle piseid (glikozitlenmiş) formdadır. RSV oksidatif parçalamada glikozitlenerek korunur (Ather ve diğ. 2007). Glikolize RSV çok istikrarlı ve suda eriyebilir özelliktedir. Böylece, gastrointestinal sistemden kolay ve yüksek oranda emilir. Daha sonra karaciğerde trans-resveratrol-3-O-glukuronit ve trans-resveratrol-3-O-sülfata metabolize olur (Signorelli ve Ghidoni 2005).



Şekil 2.11. Resveratrolün piseid formu (Anonim 2014).

Cis ve trans formları, absorpsiyon maksimumlarına dayalı olarak yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile ayrılabilir. Cis formunun maksimum dalga boyu (λ_{max}) 280 nm ve trans formun ise 308 nm'dir. UV'ye maruz kaldığında trans form cis formuna dönüştürülür, bu yüzden izolasyon genellikle karanlık

koşullarda gerçekleştirilir (Lin ve diğ. 2007). Çeşitli koşullar altında yürütülen birkaç çalışma, trans-resveratrolün ışıktan tamamen korunduğunda birkaç ay boyunca (yüksek pH tamponları hariç) stabil kaldığını göstermiştir (Dominguez ve diğ. 2001).

2.5.1.2. Resveratrolün Antikanserojenik Etkisi

Resveratrolün insanlarda meme, kolon, pankreas, mide, prostat, ovaryum, karaciğer, serviks kanseri ve melanom gibi kanser tiplerinde hücre proliferasyonunu baskıladığı bilinmektedir (Athar ve diğ. 2009). RSV, tümör hücrelerinde DNA sentezinde rol oynayan bir enzim olan ribonükleotid redüktazı inhibe ederek kanser gelişimini engeller (Fontecave ve diğ. 1998). Resveratrolün antikanserojenik etkisinin, antioksidan aktivitesi ile ilişkili olduğu görülmektedir. Hidroksiperoksidaz, protein kinaz C, B hücre lenfoma-2 (Bcl-2) fosforilasyonu, nükleer faktör kappa B (NFκB), rapamisin protein kompleksinin memeli hedefi (mTOR), matriks metalloproteinaz-9 (MMP-9), hücre döngüsü düzenleyicileri ve siklooksijenazı inhibe ettiğini gösteren çalışmalar mevcuttur (Athar ve diğ. 2007). Ayrıca, mitojen ile MAPK ekspresyonunu da inhibe eder (El-Mowaf ve White 1999).

RSV, hücre ölüm reseptörleri yolağı (Fas/CD95)'ni aktive ederek ve p53 ile p21'i düzenleyerek mitokondriye bağımlı yolak ile apoptozu etkinleştirmektedir. TNF'nin bir üyesi olan Fas ligandlarının aktive olması hücreyi apoptoza sürükler (Cucciolla ve diğ. 2007). RSV, p53-bağımlı bir apoptoza da neden olmaktadır. RSV çoğu kanser hücre hatlarında p53'ün amino terminal (N-terminal) ve karboksil terminal (C-terminal) serin bölgelerini fosforlamakta ve p53'ün asetilasyonunu sağlamaktadır (Fulda ve Debatin 2004, Vallianou ve diğ. 2015). RSV, mitokondride bazı yolakların aktifleştirilmesi ya da durdurulması yolu ile de hücreyi apoptoza sürükler. Mitokondri membranında depolarizasyon ile bazı apoptoz yolakları aktifleştirilir. RSV, bcl-2 ilişkili x proteini (bax), bak gibi proapoptotik proteinler ile apoptoz proteaz aktive edici faktör-1 (Apop-1) proteinlerinin ekspresyonunu artırır, antiapoptotik proteinler olan bcl-2 ve B hücre lenfoma-extra large (bcl-XL)'nin ekspresyonunu azaltır. Resveratrol, apoptoz inhibe edici protein (XIAP) yardımı ile bax'ın mitokondriye taşınmasını sağlayarak apoptozu uyarabilir. RSV, sitoplazma ve mitokondride bax-XIAP arasındaki etkileşimi oluşturarak bu proteinlerin

mitokondriye taşınmalarında ve aktive olmalarında etkinlik gösterir (Cucciolla ve diğ. 2007).

RSV, sentetik bir östrojen olan dietilstilbesterol ile yapısal benzerliğinden dolayı bir fitoöstrojen olarak kabul edilir. Fitoöstrojenlerin tip I sınıfında yer alır. Ayrıca resveratrol, bir selektif östrojen modülatörü (SERM) olarak kabul edilir. Epidemiyolojik çalışmalar, günlük SERM alımı ile meme ve prostat gibi hormona bağlı tümörlerin önlenmesi arasında bir korelasyon olduğunu göstermektedir (Jordan 2003).

Resveratrol'ün etkileri MCF-7 hücrelerinde iyi karakterize edilir. Basly ve diğ. (2000), farklı resveratrol konsantrasyonlarını kullandılar ve resveratrolün etkisinin yüksek doz bağımlı olduğunu buldular. Düşük konsantrasyon (1 μ M), östrojen reseptöründe herhangi bir etki göstermezken, orta konsantrasyonlar büyüme artırıcı olarak etki gösterir ve 50 μ M'nin üzerindeki dozlar ise sitotoksiktir. Resveratrol kaspaz 3/9, bax ve p53 ekspresyonunu indükler ve Stat3, Fosfoinositid 3-kinaz (PI3K), Bcl-2, NF κ B ve aromataz vb. ekspresyonlarını aşağı regüle eder (Pozo ve diğ. 2005, Kim ve diğ. 2004). Son zamanlarda, resveratrolün, meme kanseri hücrelerinde östrojen reseptör depolarının tükenmesi sonucu ortaya çıkan serbest hücre içi kalsiyum seviyelerinin konsantrasyonunda erken bifazik bir artışa neden olduğu canlı hücre mikroskobu yardımıyla gösterilmiştir. Apoptoza, MCF-7 hücrelerinde RSV aracılı apoptozda da rol oynayan, Ca⁺² düzenleyici bir protein olan kalpain ve mitokondriyal bağımlı bir yolak aracılık eder (Sareen ve diğ. 2007). Tang ve diğ. (2006), Resveratrol'ün insan meme kanseri MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre kültürlerinde siklooksijenaz-2 (COX-2) proteininin nükleer birikimini indüklediğini, MAPK-1'e bağımlı bir süreç ve aktivatör protein-1 (AP-1)'in sonunda bir p53-aracılı apoptoza yol açtığını bildirmiştir. Ayrıca, RSV in vitro ortamda telomeraz aktivitesini azaltır (Lanzilli ve diğ. 2006). Osteoporoz tedavisi için resveratrol potansiyelini destekleyen bazı yeni raporlar vardır. Hormon replasman tedavisi ile birlikte uygulananlarda eşdeğer kemik koruyucu etkiler sergilemektedir. Ayrıca in vivo ve in vitro modellerde meme kanseri riskinde azalma resveratrolün etkinliğini desteklemektedir (Liu ve diğ. 2005, Mizutani ve diğ. 2000). Resveratrol'ün çatal başı proteinlerini (FOXO) aktive ettiği ve böylece postmenopozal osteoporoz için tedavi edilen hastalarda kemik koruyucu rol oynadığı görülmüştür (Su ve diğ. 2007).

Yapılan birçok çalışmada, hepatik kanserlerde resveratrolün kanser engelleyici özellikleri saptanmıştır. HepG2 hücre hattında, RSV etkisi doza ve zamana bağlıdır ve esas olarak G1-S geçiş aşamasında hücre döngüsü tutukluğunu indüklemektedir (Kuo ve diğ. 2002, Stervbo ve diğ. 2006). Ayrıca RSV, indüklenebilir nitrik oksit sentaz enzimi (iNOS) aktivitesini artırır ve p53 aracılı apoptozu tetikler (Notas ve diğ. 2006, Gossiau ve diğ. 2005). Ayrıca H22 kanser hücrelerinin büyümesini inhibe eder (Sun ve diğ. 2002). Resveratrolün fare modellerindeki in vivo uygulamalarında da anti-tümör aktivitenin yüksek olduğu ve ratlarda karaciğer transplantasyonu sonrası allograft sağkalımını uzattığı bildirilmiştir (Wu ve diğ. 2004).

2.5.1.3. Resveratrol ve İmmün Sistem

Resveratrolün, önemli antiinflamatuar ve antioksidan aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir. RSV, siklooksijenaz enzimi olan COX-2 ve NFκB'nin güçlü bir inhibitörüdür. Aynı zamanda araşidonik asitlerin ve eikozanoidlerin metabolizmasına yol açan yollara müdahale eder. Kimura ve diğ. (1985), *Polygonum* spp'den izole edilen resveratrolün ve diğer stilbenlerin, rat periton sıvısı polimorfonükleer lökositlerinde (PMNL) 5-lipoksijenaz (5-LOX) ve COX ürünlerini inhibe ettiğini göstermişlerdir. İnsan PMNL'lerinde, resveratrolün 5-LOX enflamatuar ürünleri azalttığı, lizozom ve lizozomlardan beta-glukurondazın azalmasını inhibe ettiği saptanmıştır (Rachon ve diğ. 2006). RSV, enflamasyon ve immün yanıtlarda önemli rol oynayan G protein-bağlı reseptörlerin fonksiyonunu düzenler. Ayrıca, ekstraselüler sinyal düzenleyici kinaz 1/2 (ERK1/2)'nin fosforilasyonunu ve formilpeptid reseptör agonistleri tarafından uyarılan NFκB'nin aktivasyonunu azalttığı belirtilmiştir (Tao ve diğ. 2004). RSV'nin, CD8⁺ T hücrelerinde IFN-γ ekspresyonunu artırdığı, CD4⁺ CD25⁺ negatif Treg hücrelerini ve TGF-β ekspresyonunu inhibe ettiği, CIK hücrelerinin yüzeyinde TRAIL aktivasyon yolağını indüklediği, DH farklılaşma ve olgunlaşmasında DH ilişkili toleransı indüklediği bildirilmiştir (Hu ve diğ. 2012, Lee-Chang ve diğ. 2013, Svajger ve diğ. 2009, Yang ve diğ. 2008).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi binasında bulunan hematoloji laboratuvarında yapılmıştır. Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 28.09.2017 tarih ve 2017/78/08/02 protokol numaralı rapor ile onay alınmıştır. Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeler Birimi (BAP) tarafından NKUBAP.02.YL.17.126 nolu yüksek lisans projesi olarak desteklenmiştir.

3.1. Kullanılan Materyaller ve Kimyasallar

Sınıf II Biyolojik Güvenlik kabini (Biobase, Almanya)

Işık mikroskobu (Olympus, Japonya)

Invert mikroskop (Olympus, Japonya)

CO₂ inkübatör (Heal Force, Çin)

Soğutmalı santrifüj (Eppendorf, Almanya)

Su banyosu (Nüve, Türkiye)

Vorteks (Grant- Bio, İngiltere)

Hassas terazi (Denver Instrument, ABD)

Flow sitometri cihazı (Beckman Coulter, ABD)

Multiskan GO mikropipet okuyucu (Thermo Scientific, Finlandiya)

Şarjlı pipetör (Dragon-med, Almanya)

Çeşitli hacimlerde mikropipetler (Eppendorf, Almanya)

+4 °C buzdolabı (Arçelik, Türkiye)

-20 °C Derin dondurucu (Arçelik, Türkiye)

-80 °C Derin dondurucu (Thermo Scientific, ABD)

-196 °C Sıvı azot tankı (MVE Chart Industries, ABD)

- 75 cm² hücre kültür flaskları (VWR, Kanada)
- 25 cm² hücre kültür flaskları (VWR, Kanada)
- 96 Kuyucuklu steril plakalar (VWR, Kanada)
- 15 ml hacimli konik tabanlı santrifüj tüpleri (Isolab, Türkiye)
- 50 ml hacimli konik tabanlı santrifüj tüpleri (Isolab, Türkiye)
- 0,5 ve 1,5 ml hacimli kapaklı tüpler (Isolab, Türkiye)
- 5 ml hacimli flow sitometri tüpleri (Becton Dickinson Biosciences, ABD)
- 5, 10 ve 25 ml hacimli tek kullanımlık steril serolojik pipetler (SPL Life Sciences, Güney Kore)
- Çeşitli hacimlerde (0,1-1000 µl) steril pipet uçları (Eppendorf, Almanya)
- 3 ml hacimli steril pastör pipetleri (Isolab, Türkiye)
- 0,22 µm gözenek çaplı filtreler (TPP, İsviçre)
- Enjektörler
- Thoma lamı (Isolab, Türkiye)
- Lamel 22x22mm (Isolab, Türkiye)
- Deiyonize su (Gibco, ABD)
- PBS 1X (Fosfat tamponlu tuz çözeltisi) (Gibco, ABD)
- Histopaque (Sigma Aldrich, ABD)
- Tripan mavisi (Sigma Aldrich, ABD)
- AIM V medyum (Gibco, ABD)
- DMEM medyum (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Gibco, ABD)
- Penisilin/Streptomisin (Gibco, ABD)
- L-Glutamin (Gibco, ABD)
- FBS (Fetal Bovin Serum) (Gibco, ABD)

Esansiyel olmayan amino asit (100X) (Gibco, ABD)

Tripsin/EDTA % 0.25 (Gibco, ABD)

Rekombinant insan IFN- γ (Invitrogen, ABD)

Rekombinant insan IL-2 (Invitrogen, ABD)

Rekombinant insan IL-4 (Invitrogen, ABD)

Rekombinant insan GM-CSF (Invitrogen, ABD)

CD3 monoklonal antikor (Thermo Fisher Scientific, ABD)

Fitohemaglutinin (Invitrogen, ABD)

MTT (3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)2,5-Difenil Tetrazolyum Bromür) Hücre Canlılık Testi Kit (Invitrogen, ABD)

MACSxpress İnsan NK Hücre İzolasyon Kiti (Miltenyi Biotec, ABD)

HLA-DR (Beckman Coulter, ABD)

CD 11c monoklonal antikor (Beckman Coulter, ABD)

CD 3 monoklonal antikor (Beckman Coulter, ABD)

CD14 monoklonal antikor (Beckman Coulter, ABD)

CD 16 monoklonal antikor (Beckman Coulter, ABD)

CD 19 monoklonal antikor (Beckman Coulter, ABD)

CD 45 monoklonal antikor (Beckman Coulter, ABD)

CD 123 monoklonal antikor (Beckman Coulter, ABD)

CD 56 monoklonal antikor (Thermo Fisher Scientific, ABD)

CD 83 monoklonal antikor (Thermo Fisher Scientific, ABD)

Resveratrol (Santa Cruz, ABD)

DMSO (Dimetil sülfoksit) (Merck, ABD)

HCl (Hidroklorik asit) (Merck, ABD)

Asetik asit (Merck, ABD)

İzopropil alkol (Necm Kimya, Türkiye)

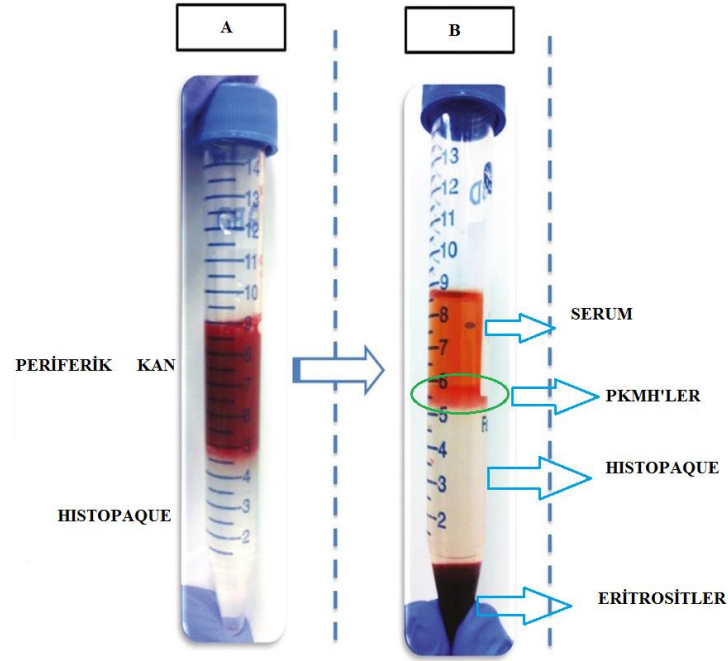
Steril Eldiven (Sterix, Türkiye)

3.2. Gönüllü Seçimi

Bu çalışmaya Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Kan Alma birimine gelen, herhangi bir kronik hastalığı bulunmayan, 18- 65 yaş arasında olan, 5 kadın ve 5 erkek birey dahil edilmiştir. Çalışmaya dahil edilen her gönüllüye, çalışma hakkında bilgi veren ve gönüllünün rızasının alındığını belgeleyen Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu imzalatılmıştır. Yapılan çalışma, Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 2017/78/08/02 protokol numarası ile onaylanmıştır.

3.3. Periferik Kandan Mononükleer Hücre İzolasyonu

Bu tez çalışması süresince periferik kan mononükleer hücreler (PKMH) 10 gönüllüden 20'şer ml alınan tam kandan elde edilmiştir. Alınan kan örnekleri steril 50 ml'lik falkon tüpüne aktarıldı. İzolasyon, standart yöntem olan yoğunluk tabakalandırma işlemi ile yapıldı. 50 ml'lik konik tabanlı 2 adet falkon tüpe 25'er ml Histopaque eklendi. Her bir tüpe Histopaque miktarı kadar, 25 ml kan örneği eklendi. İki sıvının birbirine karışmaması için kan örneği konik tüpün kenarından nazikçe sızdırılarak Histopaque üzerinde tabakalandırıldı. Tüpler 21 °C 1600 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası en altta eritrositleri içeren pellet, pelletin üzerinde Histopaque tabakası, en üstte plazma tabakası ve Histopaque ile plazma tabakası arasında mononükleer hücrelerin bulunduğu opak interfaz tabaka görüldü (Şekil 3.1). Bir pastör pipeti yardımı ile opak interfaz tabaka aspire edilerek başka bir konik tüp içerisine alındı. Hücrelerin bulunduğu tüpe fosfat tampon çözeltisi (PBS) eklendi ve 1200 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj edilerek hücreler yıkandı. Santrifüjleme sonrası süpernatant atılarak PBS ile ikinci bir yıkama işlemi yapıldı. Son yıkama işleminden sonra hücrelere AIM V kültür medyumu eklenerek hücre süspansiyonu hazırlandı.



Şekil 3.1. (A) Santrifüj öncesi ve (B) santrifüj sonrası falkon tüpte oluşan görüntü (düzeltmeler yapılmıştır) (García-Salido ve diğ. 2017).

3.4. Mononükleer Hücrelerin Sayılması ve Canlılık Tayini

1 ml'deki PKMH sayısını belirlemek için hazırlanan hücre süspansiyonundan 10 µl alınarak, 10 µl Tripan mavisi ile karıştırıldı ve yaklaşık 2-3 dk bekletildi. Boyayı içine almayan ve şişmeyen PKMH'ler canlı olarak nitelendirilerek thoma lamında 16 büyük kare 40x'lik objektif altında sayıldı. Çıkan sayı 2×10^4 ile çarpılarak izole edilen PKMH sayısı belirlendi.

3.5. Mononükleer Hücrelerin Flow Sitometrik Analizi

Elde edilen PKMH'lerdeki DH yüzdeliğini belirlemek için PKMH'ler HLA-DR, CD3, CD11c, CD14, CD19, CD45, CD56, CD123 antikorları ile işaretlendi ve flow sitometri cihazında çok renkli analiz yapılarak değerlendirildi.

3.6. DH Kültürü

Elde edilen PKMH'ler, 30 ng/ml rhGM-CSF, 25 ng/ml rhIL-4, AIM V(L-Glutamin, 10 µg/ml Gentamisin, 50 µg/ml Streptomisin içeren) medyumu içeren T75 flaskında 37 °C %5 CO₂'li ortamda inkübe edildi. Hücrelerin morfolojik durumu her

gün invert mikroskop ile takip edildi. Kùltürün 3.gününde medyumun yarısı, tüm sitokinleri içerecek şekilde tazelendi. Süpernatantdaki hücrelerin, DH kùltürü sonrası CIK hücre kùltüründe kullanılması planlandığı için, medyum tazeleme işlemi sırasında hücre kaybedilmemesine dikkat edildi. 7 günlük kùltür süresi sonunda, flaska yapışmayan hücreleri içeren süpernatant kısım serolojik pipet yardımıyla toplanıp 15 ml'lik konik tabanlı steril bir falkona aktarıldı. Adheziv olan hücreler, bir hücre kazıyıcısı yardımıyla kaldırıldı ve 15 ml'lik steril bir falkona aktarıldı. Elde edilen DH'ler, thoma lamında sayıldı ve canlılık tayini yapıldı; CD14 ve CD83 antikorları ile işaretlenerek flow sitometrik analiz yapıldı.

3.7. CIK Hücre Kùltürü

Bu çalışmada, CIK hücrelerini indükleyen sitokinlerin bulunduğu kùltür ortamı oluşturulmadan önce CIK hücrelerinin en yüksek oranda elde edilmesi için 3 farklı yöntem uygulandı.

3.7.1. DH Kùltürü Sonunda Toplanan PKMH'lerden CIK Hücrelerinin Elde Edilmesi

Bu yöntemde, 50 ml kandan elde edilen PKMH'ler öncelikle DH kùltürüne alındı ve bir haftalık DH kùltür süresinin sonunda flaskta adheziv olmayan hücreler, CIK hücre kùltürünün yapılması için toplanarak 15 ml'lik steril bir falkona aktarıldı. Hücreler, 4°C 1700 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant kısım atılarak üzerine 1 ml AIM V medyumunu eklendi ve hücreler pipetaj yapılarak homojen hale getirildi. CIK hücre kùltürü için hazır hale gelen hücreler, thoma lamında sayıldı, canlılığı tespit edildi ve CD3, CD16, CD56 antikorları ile işaretlenerek flow sitometrik analiz ile NK hücre yüzdeliği değerlendirildi.

3.7.2. PKMH'ler 2 saat inkübe edildikten sonra DH ve CIK Hücre Kùltürünün Yapılması

Bu yöntemde, 50 ml kandan elde edilen PKMH'ler sitokin içermeyen AIM V medyumunda 37 °C %5 CO₂'li ortamda 2 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda CIK hücre kùltürü için, süpernatant kısım bir serolojik pipet yardımıyla

toplanarak 15 ml'lik steril bir falkona aktarıldı. DH kültürü için adheziv olan hücreler, bir hücre kazıyıcısı yardımıyla kaldırıldı ve 15 ml'lik steril bir falkona aktarıldı. CIK kültürü için hücreler CD3, CD16, CD56 antikorları ile işaretlendi ve flow sitometrik analizi yapılarak NK hücre yüzdeliği değerlendirildi.

3.7.3. MACSxpress NK Hücre İzolasyon Kiti ile NK Hücresinin Elde Edilmesi

Bu yöntemde MACSxpress NK hücre İzolasyon kiti kullanıldı ve izolasyon üretici firmanın talimatlarına göre yapıldı. 30 ml tam kan 50 ml'lik steril bir falkon tüpüne alındı. Manyetik boncukları içeren tüpün içerisine serolojik pipet ile kittede bulunan A bileşeninden 7,5 ml eklendi ve 3-4 kez pipetaj yapılarak nazikçe karıştırıldı. 50 ml'lik steril bir falkona kittede bulunan B bileşeninden 7,5 ml eklendi ve üzerine manyetik boncuk ile A bileşeni karışımı eklenerek 3-4 kez pipetaj yapıldı. Hazırlanan karışım, tam kanı içeren falkona aktarıldı ve falkonun kapağı kapatılıp 3 kez alt-üst yapılarak karıştırıldı. Ardından falkon, MACS rotatoruna yerleştirildi ve oda sıcaklığında 12 rpm'de 5 dk santrifüj yapıldı. Santrifüjden sonra tüpün kapağı açılarak, tüp MACSxpress manyetik ayırıştırıcıya yerleştirildi ve 15 dk bekletildi. Manyetik ayırıştırma süresi sonunda tüp cihazdan çıkarılmadan serolojik pipet ile süpernatant dikkatlice toplandı ve 50 ml'lik steril bir falkona aktarıldı. Tüp 1700 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Pelletin üzerine 1 ml AIM V medyumunu eklendi ve hücreler pipetaj yapılarak homojenize edildi. NK hücre yüzdeliğini değerlendirmek için hücreler CD3, CD16, CD56 antikorları ile işaretlendi ve flow sitometrik analiz yapıldı.

3.7.4. CIK Hücre Kültür Ortamının Hazırlanması

MACSxpress NK hücre izolasyon kiti ile elde edilen NK hücreleri; 1000 U/ml rhIL-2, 2.5 µg/ml monoklonal anti-CD3, 25 µg/ml fitohemagglutinin, 1000 U/ml rhIFN-γ, AIM V medyumunu içeren T75 flaskında 37 °C %5 CO₂'li ortamda inkübe edildi. Hücrelerin morfolojik durumu her gün invert mikroskop ile takip edildi. Kültürün 3. gününde medyumun yarısı, tüm sitokinleri içerecek şekilde tazelendi. 7 günlük kültür süresi sonunda hücreler serolojik pipet yardımıyla 15 ml'lik steril bir

falkona aktarıldı. NK hücre yüzdeliğini belirlemek için hücreler CD3, CD16, CD56 antikorları ile işaretlenerek flow sitometrik analiz yapıldı.

3.8. DH-CIK Ortak Hücre Kültürü

Elde edilen DH'ler ve CIK hücreleri eşit sayılarda alınarak T25 flasklarında 400 U/ml IL-2 ve 0,5 µg/ml monoklonal anti-CD3 içeren AIM V medyumunda 37 °C %5 CO₂'li ortamda 48 saat inkübe edildi. Ayrıca kalan DH ve CIK hücreleri, her biri kendi uygun medyum koşullarında T25 flasklarında 37 °C %5 CO₂'li ortamda 48 saat inkübe edildi. Kültür süresi sonunda flasklardaki hücreler, hücre kazıyıcıları ile kaldırılıp toplanarak 15 ml'lik steril falkon tüplerine aktarıldı. 1700 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Pellet haldeki hücreler AIM V medyumunu ile süspanse edildi. Hücreler, thoma lamında sayılarak MTT testi için uygun sayıya getirildi. DH-CIK, DH ve CIK hücre gruplarının buldukları falkon tüplere kendi uygun medyum koşullarındaki sitokinler eklendi.

3.9. MCF-7 Hücre Kültürü

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi İmmünoloji Anabilim Dalı'ndan temin edilen MCF-7 hücreleri, %10 fetal bovin serum (FBS), %1 penisilin/streptomisin, 0.1 mM esansiyel olmayan amino asit içeren DMEM medyumunda T75 flaskları içerisinde 37 °C %5 CO₂'li ortamda inkübe edildi. Hücreler, %80 konfluent hale geldikçe haftada 2 kez düzenli olarak pasaj işlemi yapıldı.

3.9.1. MCF-7 Hücrelerinin Pasajlanması

MCF-7 hücre hattı, flasklarda çoğaltılıp %80 konfluent hale geldiğinde pasaj işlemi uygulandı. Öncelikle flasktan medyum uzaklaştırıldı. Hücreleri bulunduğu yüzeyden kaldırmak amacı ile tripsinizasyon işlemi yapıldı. Medyum içerisindeki serumu flasktan uzaklaştırmak için her bir flask 6 ml soğuk PBS ile yıkandı ve flasktan uzaklaştırıldı. Ardından her bir flaska 3 ml tripsin/EDTA eklenerek 3 dakika 37 °C %5 CO₂'li ortamda inkübe edildi. Flask yüzeyinden kaldırılan hücrelere, tripsinin inaktif hale gelmesi için serumlu medyum eklendi. Buldukları flaskta süspanse hale getirilen hücreler toplandı ve 15 ml'lik steril falkon tüpüne aktarıldı. Hücreler, 1500 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Hücreler deney planına

göre AIM V medyumunda süspansiyon edildi ve thoma lamında hücre sayımı yapılarak MTT testi için uygun sayıya getirildi.

3.10. Resveratrolün Hazırlanması

Firmadan temin edilen liyofilize haldeki RSV, DMSO içerisinde çözündürülerek 100 mM stok çözelti hazırlandı. Deneyde; 12,5 μ M, 25 μ M ve 50 μ M konsantrasyonlarında RSV kullanıldı.

3.11. MTT (3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)2,5-Difenil Tetrazolyum Bromür) Hücre Canlılık Testi

MTT (3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)2,5-Difenil Tetrazolyum Bromür) hücre canlılık testinde, sarı tetrazolyum tuzları canlı hücrelerin mitokondrilerindeki dehidrogenaz enzimleri aracılığı ile tetrazolyum halkasının kırılması sonucu formazan kristallerine dönüştürülür. Formazan kristallerinin oluşturduğu renk, spektrofotometrik yöntem ile ölçülür ve ölçülen absorbans değeri canlı hücrelerin sayısı ile ilişkilidir. Canlı hücreler mor renk oluştururken, ölü hücreler tetrazolyum tuzlarını indirgeme yeteneklerini kaybettikleri için herhangi bir renk değişimi gözlenmez.

DH, CIK, DH-CIK, DH-CIK+12,5 μ M RSV, DH-CIK+25 μ M RSV, DH-CIK+50 μ M RSV, DH+12,5 μ M RSV, DH+ 25 μ M RSV, DH+ 50 μ M RSV, CIK+12,5 μ M RSV, CIK+25 μ M RSV, CIK+50 μ M RSV, 12,5 μ M RSV, 25 μ M RSV, 50 μ M RSV deney gruplarının MCF-7 hücrelerine karşı in vitro ortamda sitotoksik aktivitelerini belirlemek için 96 kuyucuklu steril plakada MTT hücre canlılık testi uygulandı. Hedef (H) hücre olarak kullanılan MCF-7, Efektör (E) hücre olarak kullanılan DH, CIK, DH-CIK hücrelerinin konsantrasyonları E:H oranı 50:1 olacak şekilde ayarlandı. 5000 hücre/kuyucuk olacak şekilde hücreler üç gruba ayrıldı: E-H grubu sırasıyla 100 μ l efektör ve hedef hücrelerini içerdi; E hücre grubu ise 100 μ l efektör hücreleri ve AIM V kültür ortamını; H hücre grubu da 100 μ l hedef hücrelerini ve AIM V kültür ortamını içerdi. Mikroplaka 48 saat 37°C %5 CO₂'li ortamda inkübe edildi. İnkübasyon süresinden sonra kuyucuklardaki medyum uzaklaştırılarak taze AIM V medyumunu eklendi ve MTT test kiti uygulandı. Tüm kuyucuklara, kitte bulunan MTT solüsyonundan 10 μ l eklendi ve 37 °C'de 4 saat inkübasyona bırakıldı. Ardından

her bir kuyucuğa, kitte bulunan SDS-HCl solüsyonundan 100 µl eklendi ve pipetaj yapılarak karıştırıldı. Mikroplaka 37 °C’de 4 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda tüm kuyucuklar pipetaj yapılarak karıştırıldı ve 570 nm’de optik yoğunluğu (OD) okutuldu.

Tek başına RSV uygulanan kuyucuklardaki deney gruplarının hücre canlılığı şu formül ile hesaplandı:

$$\text{Hücre canlılığı (\%)} = (\text{OD}_{\text{test kuyucuğu}} / \text{OD}_{\text{kontrol}}) \times \% 100$$

Tek başına RSV uygulanan grupların dışındaki deney gruplarının sitotoksik aktivitesi ise şu formül ile hesaplandı:

$$\text{Sitotoksik aktivite (SA) (\%)} = [1 - (\text{OD}_{\text{E+H}} - \text{OD}_{\text{E}}) / \text{OD}_{\text{H}}] \times \% 100$$

Kombine edilen deney gruplarında (DH-CIK, DH-CIK+12,5 µM RSV, DH CIK+25 µM RSV, DH-CIK+50 µM RSV) ilgili hücrelerin kombinasyondaki etkinliklerinin % oranları şu formüller ile hesaplandı:

$$\text{DH-CIK kombinasyonundaki DH'nin sitotoksik aktivitesi (\%)} = (\text{SA}_{\text{kombinasyon}} \times \text{SA}_{\text{tek DH}}) / (\text{SA}_{\text{tek DH}} + \text{SA}_{\text{tek CIK}})$$

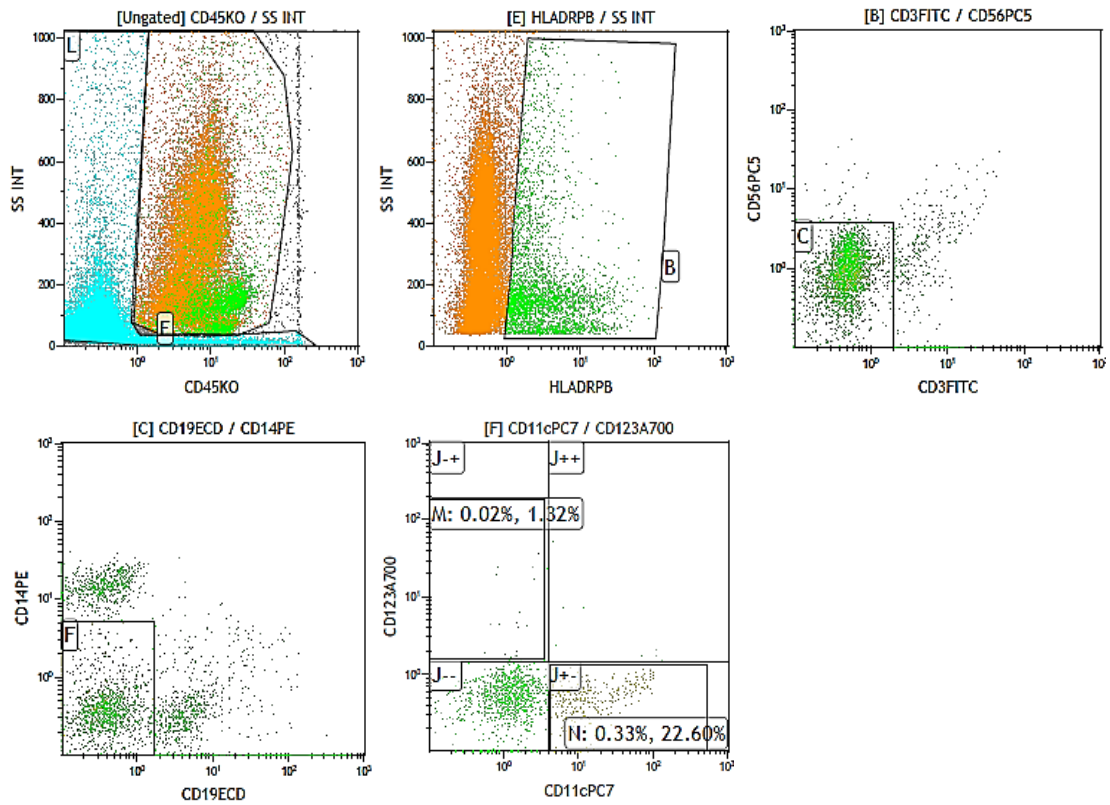
$$\begin{aligned} & \text{X } \mu\text{M (12,5 } \mu\text{M, 25 } \mu\text{M, 50 } \mu\text{M) RSV+DH-CIK kombinasyonundaki} \\ & \text{DH'nin sitotoksik aktivitesi (\%)} = \\ & [(\text{SA}_{\text{kombinasyon}} - \text{SA}_{\text{X } \mu\text{M RSV}}) \times \text{SA}_{\text{DH-CIK kombinasyonundaki DH}}] / \text{SA}_{\text{DH-CIK}} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} & \text{Kombinasyonlardaki CIK hücresinin sitotoksik aktivitesi (\%)} = \\ & \text{SA}_{\text{kombinasyon}} - (\text{SA}_{\text{kombinasyondaki DH}} + \text{SA}_{\text{X } \mu\text{M RSV}}) \end{aligned}$$

4. BULGULAR

4.1. Periferik Kandan İzole Edilen Mononükleer Hücrelerin Flow Sitometrik Analizi

DH'ler HLA-DR⁺, CD3⁻, CD19⁻, CD56⁻ ve CD14⁻ bölgelerde yer alır. CD11c⁺ ve CD123⁻ bölgesinde kalan hücreler miyeloid DH'lerdir. CD11c⁻ ve CD123⁺ alanda kalan hücreler ise plazmasitoid DH'lerdir. Verilere göre, izole edilen PKMH'lerde miyeloid DH'ler %0,33, plazmasitoid DH'ler %0,02 oranında bulunmuştur (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. DH kültürü öncesi PKMH'lerdeki DH'lerin flow sitometrik analizi.

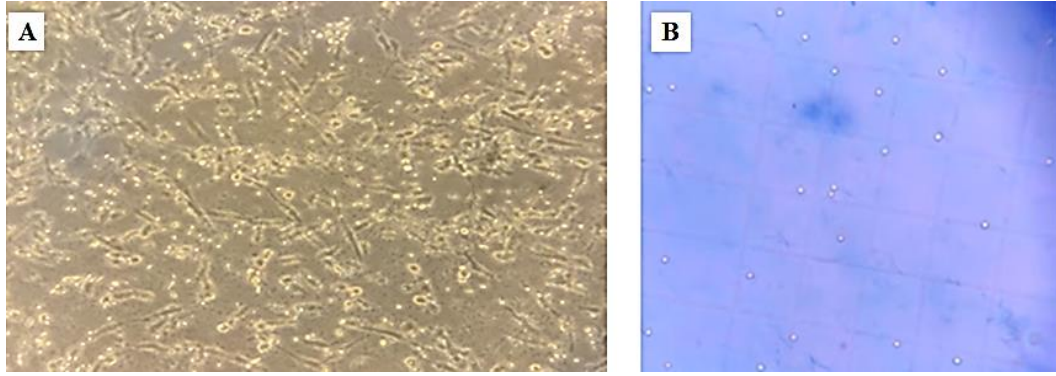
4.2. DH'lerin Özelliklerinin Belirlenmesi

4.2.1. DH'lerin Morfolojisinin incelenmesi

DH kültürünün 7. gününde hücrelerin flasklarda birçok sitoplazmik çıkıntı oluşturarak tipik DH morfolojisine sahip oldukları görülmüştür (Şekil 4.2A).

4.2.2. DH'lerin Canlılık ve Hücre Sayımının Yapılması

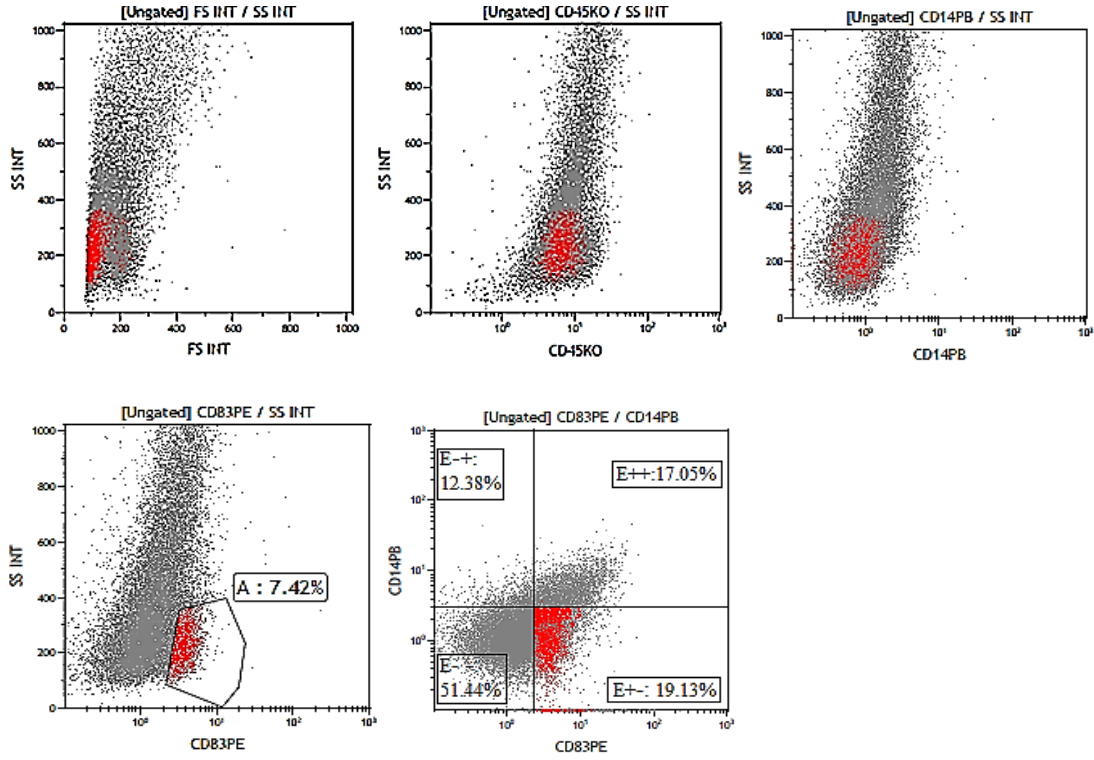
Elde edilen DH'ler Tripan mavisi ile boyanarak thoma lamında canlılık tayini ve hücre sayımı yapılmıştır (Şekil 4.2B).



Şekil 4.2. (A) Kültür sonunda DH'lerin invert mikroskoptaki görüntüsü (20x büyütme), (B) Kültür sonunda DH'lerin thoma lamındaki görüntüsü (40x büyütme).

4.2.3. DH'lerin İmmünofenotipinin Belirlenmesi

CD14⁻ CD83⁺ bölgede yer alan matür DH'ler yapılan flow sitometrik analiz ile %19,13 oranında bulunmuştur (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Kültür sonrasında DH'lerin flow sitometrik analizi.

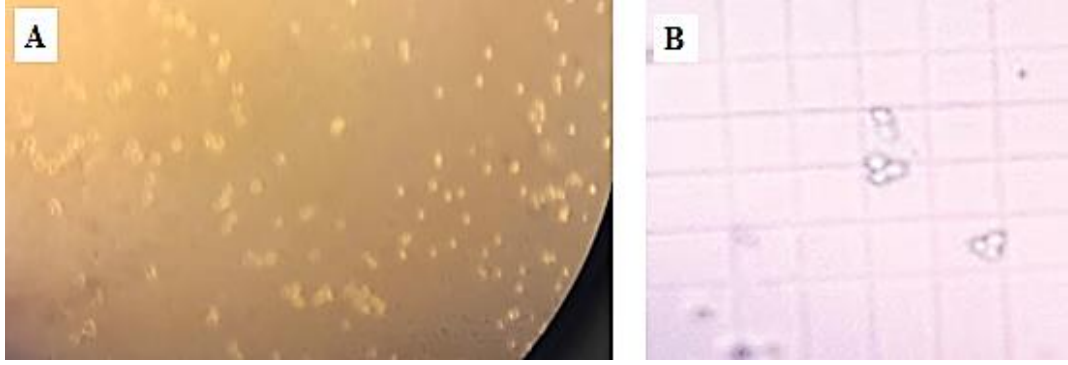
4.3. CIK Hücrelerin Özelliklerinin Belirlenmesi

4.3.1. CIK Hücrelerinin Morfolojisinin İncelenmesi

Kültür süresince morfolojileri takip edilen CIK hücrelerinin, 7 günlük kültür süresi sonunda düzensiz koloniler oluşturdukları görülmüştür (Şekil 4.4A).

4.3.2. CIK Hücrelerinin Canlılık ve Hücre Sayımının Yapılması

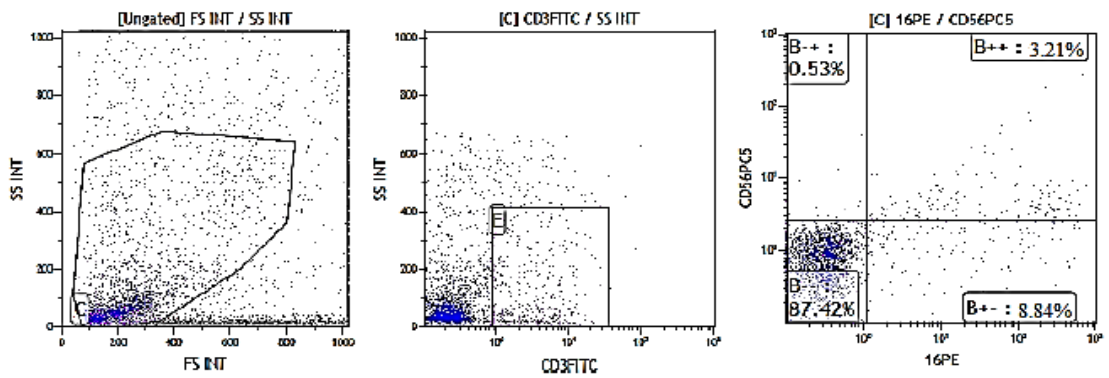
Elde edilen CIK hücreleri Tripan mavisi ile boyanarak thoma lamında canlılık tayini ve hücre sayımı yapılmıştır (Şekil 4.4B).



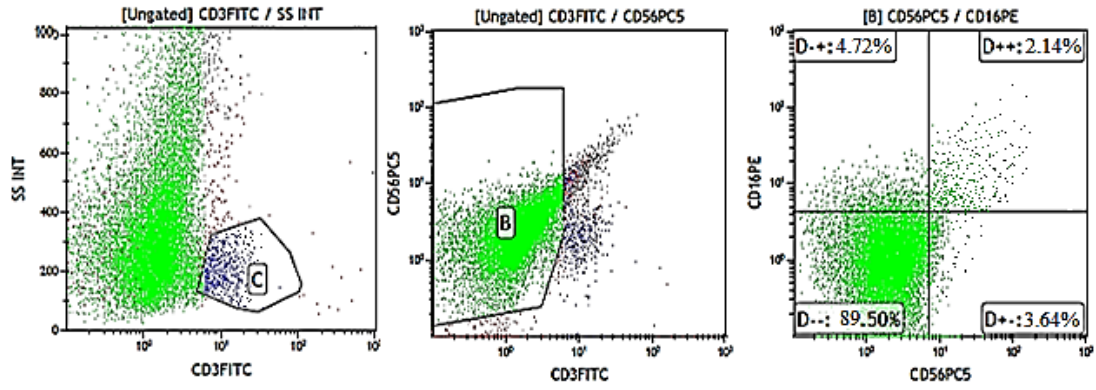
Şekil 4.4. (A) Kültür sonunda CIK hücrelerinin invert mikroskoptaki görüntüsü (20x büyütme), (B) Kültür sonunda CIK hücrelerinin thoma lamındaki görüntüsü (40x büyütme).

4.3.3. CIK Hücrelerinin İmmünofenotipinin Belirlenmesi

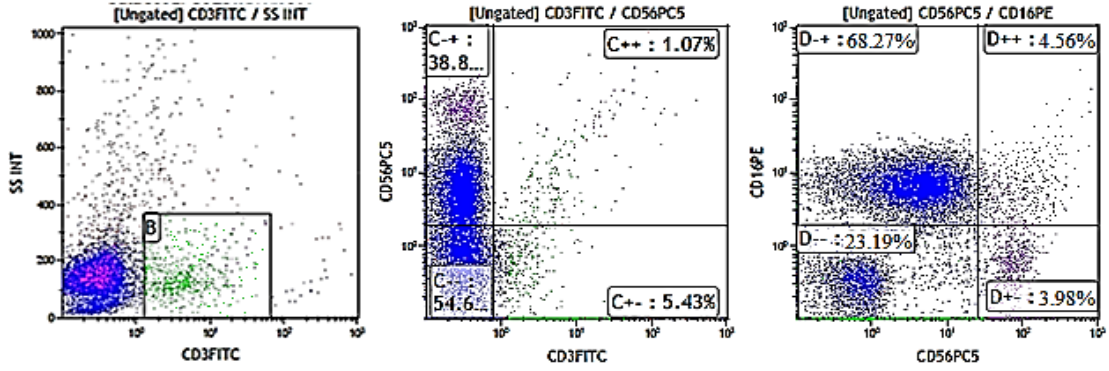
NK hücreleri $CD3^-$, $CD16^+$, $CD56^+$ bölgede yer alırlar. DH kültürü sonrasında toplanan PKMH'lerinde NK hücrelerinin oranı % 3.21 (Şekil 4.5), PKMH'ler 2 saat inkübe edildikten sonra CIK hücre kültürü için NK hücrelerinin oranı % 2.14 (Şekil 4.6), MACSxpress NK hücre izolasyon kiti ile elde edilen hücrelerin oranı ise % 4.56 (Şekil 4.7) olarak bulunmuştur. MACSxpress NK hücre izolasyon kiti ile elde edilen hücreler ilgili sitokinler ile indüklendikten sonra, proliferen olan hücrelerin NK hücre oranı flow sitometrik analiz ile % 8.24 olarak bulunmuştur (Şekil 4.8).



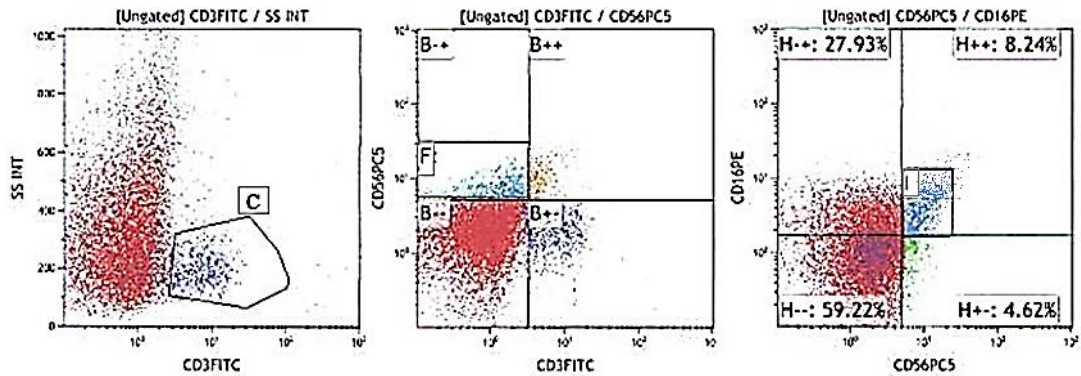
Şekil 4.5. CIK hücre kültürü için DH kültürü sonrasında toplanan PKMH'lerinin flow sitometrik analizi.



Şekil 4.6. CIK hücre kültürü için PKMH'ler 2 saat inkübe edildikten sonra hücrelerin flow sitometrik analizi.



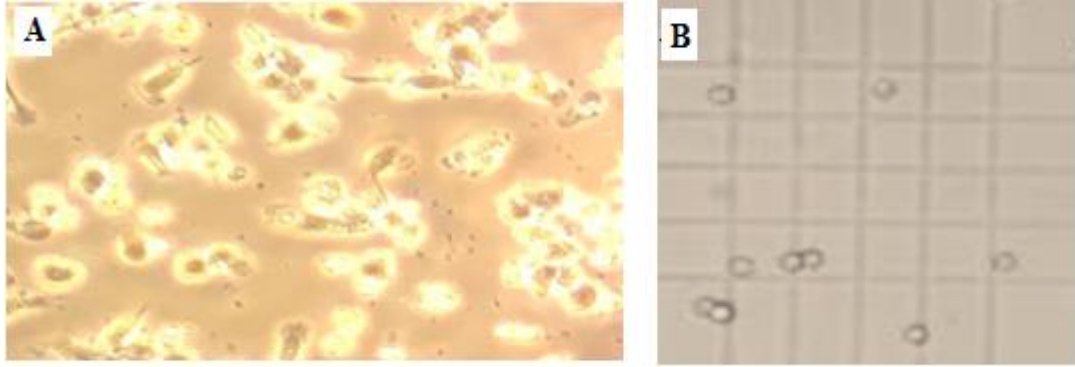
Şekil 4.7. CIK hücre kültürü için MACSxpress NK hücre izolasyon kiti ile elde edilen hücrelerin flow sitometrik analizi.



Şekil 4.8. Kültür süresi sonunda proliferen olan CIK hücrelerinin flow sitometrik analizi.

4.4. DH-CIK Hücrelerinin Özelliklerinin Belirlenmesi

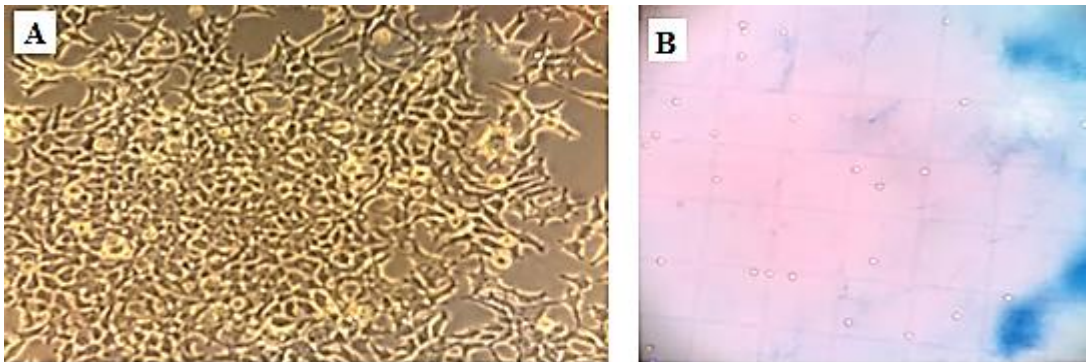
Kültür süresi sonunda DH-CIK hücreleri; yuvarlak, çeşitli büyüklüklerde ve kümeleşmiş yapıda görülmüştür (Şekil 4.9A). DH-CIK hücreleri Tripan mavisi ile boyanarak thoma lamında canlılık tayini ve hücre sayımı yapılmıştır (Şekil 4.9B).



Şekil 4.9. (A) Kültür sonunda DH-CIK hücrelerinin invert mikroskoptaki görüntüsü (40x büyütme), (B) Kültür sonunda DH-CIK hücrelerinin thoma lamındaki görüntüsü (40x büyütme).

4.5. MCF-7 Hücrelerinin Özelliklerinin Belirlenmesi

Kültürü yapılan MCF-7 hücrelerinin invert mikroskobundaki görüntüsü şekil 4.10A'da gösterilmiştir. MCF-7 hücreleri, MTT testinde kullanılmadan önce Tripan mavisi ile boyanarak thoma lamında canlılık tayini ve hücre sayımı yapılmıştır (Şekil 4.10B).



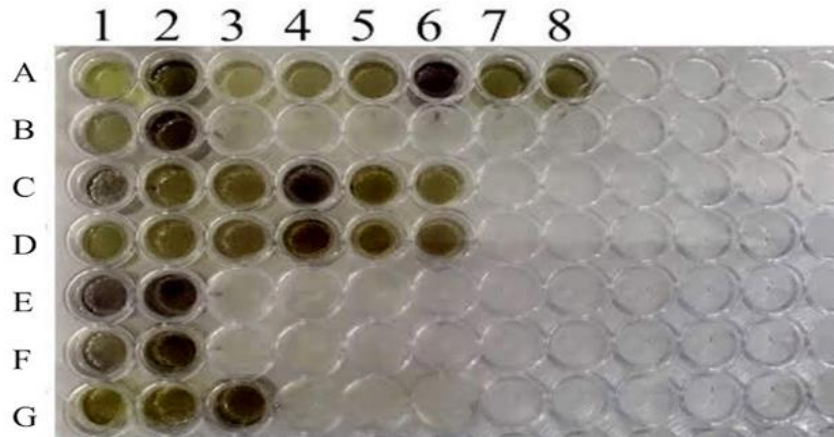
Şekil 4.10. (A) MCF-7 hücrelerinin invert mikroskoptaki görüntüsü (20x büyütme), (B) MCF-7 hücrelerinin thoma lamındaki görüntüsü (40x büyütme).

4.6. MTT Hücre Canlılık Testinin Sonuçları

Canlı hücreler tetrazolyum tuzlarını formazan kristallerine dönüştürdükleri için mor renk alırken, ölü hücreler bu yeteneklerini kaybettiklerinden dolayı renk değişimi göstermezler. Bu renk değişimlerine göre spektrofotometre ile optik yoğunlukları (OD) ölçülmüştür. MTT hücre canlılık testi kurulumu tablo 4.1’de ve MTT analizi sonucunda mikropalakada oluşan görüntü şekil 4.11’de gösterilmiştir.

Tablo 4.1. MTT hücre canlılık testi kurulumunun tablo olarak gösterimi.

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	Sadece medyum	MCF-7 +Medyum (kontrol)	DH-CIK +12,5 μ M RSV +MCF-7	DH-CIK +25 μ M RSV +MCF-7	DH-CIK +50 μ M RSV +MCF-7	DH-CIK +12,5 μ M RSV +Medyum	DH-CIK +25 μ M RSV +Medyum	DH-CIK +50 μ M RSV +Medyum
B	DH-CIK +MCF-7	DH-CIK +Medyum						
C	DH +12,5 μ M RSV +MCF-7	DH +25 μ M RSV +MCF-7	DH +50 μ M RSV +MCF-7	DH +12,5 μ M RSV +Medyum	DH +25 μ M RSV +Medyum	DH +50 μ M RSV +Medyum		
D	CIK +12,5 μ M RSV +MCF-7	CIK +25 μ M RSV +MCF-7	CIK +50 μ M RSV +MCF-7	CIK +12,5 μ M RSV +Medyum	CIK +25 μ M RSV +Medyum	CIK +50 μ M RSV +Medyum		
E	DH +MCF-7	DH +Medyum						
F	CIK +MCF-7	CIK +Medyum						
G	50 μ M RSV +MCF-7	25 μ M RSV +MCF-7	12,5 μ M RSV +MCF-7					



Şekil 4.11. MTT analizi sonucunda mikropalakada oluşan görüntü.

Cihazın okuduğu değerler, gerekli hesaplamalar yapılarak immün hücreleri içeren deney gruplarının MCF-7 hücrelerine karşı sitotoksik aktivite % oranları belirlenmiştir. Bu deney gruplarına ait etkinlik sonuçları tablo 4.2’de ayrıntılı şekilde verilmiştir. MCF-7 hücrelerine karşı tek başına RSV uygulanan deney gruplarının hücre canlılık % oranları belirlenmiş ve sonuçlar tablo 4.3’de ayrıntılı şekilde verilmiştir.

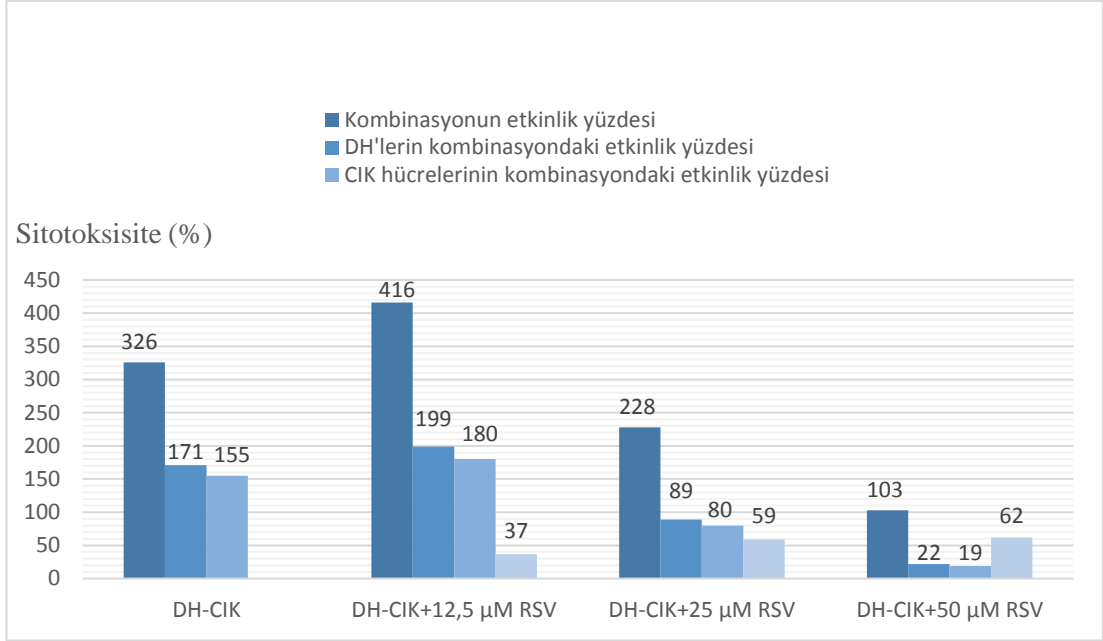
Tablo 4.2. İmmün hücreleri içeren deney gruplarının, MCF-7 hücrelerine karşı sitotoksik aktivite değerleri.

Deney Grupları	Etkinlik Yüzdesi
DH	%165
CIK	%150
DH-CIK	%326
DH-CIK+12,5 μ M RSV	%416
DH-CIK+25 μ M RSV	%228
DH-CIK+50 μ M RSV	%103
DH+12,5 μ M RSV	%286
DH+25 μ M RSV	%169
DH+50 μ M RSV	%141
CIK+12,5 μ M RSV	%171
CIK+25 μ M RSV	%156
CIK+50 μ M RSV	%155

Tablo 4.3. MCF-7 hücrelerine karşı tek başına RSV uygulanan deney gruplarının hücre canlılık ve sitotoksik aktivite değerleri.

Deney Grupları	MCF-7 Hücre Canlılık Yüzdesi	Sitotoksik Aktivite Yüzdesi
12,5 μ M RSV	%63	%37
25 μ M RSV	%41	%59
50 μ M RSV	%38	%62

DH-CIK ve 12,5 μ M, 25 μ M, 50 μ M konsantrasyonlarındaki RSV ile kombine edilen DH-CIK hücrelerinin etkinlik değerlerinde, ilgili hücrelerin ve RSV’nin kombinasyona katkılarının % oranları Şekil 4.12’de ayrıntılı şekilde verilmiştir.



Şekil 4.12. Kombine edilen deney gruplarında ilgili hücrelerin ve RSV'nin kombinasyona katkılarının % oranları.

5. TARTIŞMA

Günümüzde konvensiyonel kanser tedavileri dışında, bireye spesifik ve etkili bir yöntem olarak immünoterapi uygulanmakta ve geliştirmek için araştırmalar yapılmaktadır. Kanser immünoterapisinin hedefi, tümör hücrelerini tanımlamak ve imha etmek veya tümör büyümesini kontrol altına almak için, tümör hücre antijenlerine karşı immün cevap oluşturmaktır. Bu amaç ile geliştirilen bazı terapi yaklaşımları mevcuttur.

Bu yaklaşımlar içerisinde, bilim insanları DH aracılığıyla lenfositlerin tümör antijenlerine karşı etkili bir şekilde indüklenmesi esasına dayalı immünoterapi üzerine odaklanmıştır (Lombardi ve Yanira 2009). DH'ler immün sistemi regüle etme ve sayıları düşük olsalar dahi aktif halde iken antijenlere karşı yüksek oranda immün yanıtı oluşturabilme kabiliyetleri sayesinde, günümüze kadar kanser ve kronik hastalıkların tedavisi gibi çeşitli klinik uygulamalarda güvenli olarak kullanılmıştır (Steinman ve Banchereau 2007). DH'lerin terapötik yaklaşımlardaki etkin potansiyellerine rağmen, bugüne kadar yapılmış çoğu klinik çalışmalar yetersiz kalmıştır (Gülen ve diğ. 2010).

Başka bir yaklaşım da, son on yıldır klinikte başarı ile uygulanan CIK hücre tedavisidir. Bu hücreler, kanser hücrelerine karşı yüksek sitotoksosite gösterdikleri ve klinik tedavide güvenli bir şekilde uygulandığı yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (Thanendrarajan ve diğ. 2012, Jakel ve Schmidt-Wolf 2014).

Son yıllarda yapılan araştırmalarda, DH-CIK kombine tedavisi üzerine odaklanılmış, kanser terapisi için etkili bir immün terapötik strateji sağladığı kanıtlanmıştır (Mu ve diğ. 2016, Wei ve diğ. 2015, Li ve diğ. 2005). CIK hücreleri DH'ler ile birlikte kültüre edildiği zaman; CIK hücrelerinin sitotoksitesinin belirgin bir şekilde arttığı ve IL-2, IFN- γ , IL-12 ve TNF- α gibi sitokinlerin seviyelerinin yükseldiği bildirilmiştir (Wei ve diğ. 2015, Zhou ve diğ. 2016). Ayrıca, CIK hücreleri ile birlikte kültürlenmiş DH'ler, TGF- β ve IL-10'un yanısıra, CIK hücrelerinin aktivasyonunu baskılayan CD4⁺ CD25⁺ Treg'ler gibi negatif düzenleyici faktörlerin ekspresyonunu aşağı regüle ettiği bildirilmiştir (Mu ve diğ. 2016, Li ve diğ. 2005).

CIK hücreleri doğrudan tümör hücrelerini öldürebilme yeteneğine rağmen kısa süreli antikanser etkinliğine sahiptir ve uzun vadede tümör büyümesini kontrol etme olasılığı daha düşüktür. DH'ler ise tümöre özgü efektör ve bellek T hücrelerini indükleyebildikleri için uzun vadeli antikanser etkinliğine sahiptir. Dolayısıyla, DH-CIK kombine aşı, efektör T hücrelerinde potansiyel olarak daha yüksek sitotoksik etkinlik ve özgünlüğe sahip olabilir, bu da hem kısa hem de uzun vadeli antitümör etkinliğe neden olur. Yapılan çalışmalarda DH-CIK kombinasyonunun tek başına DH veya CIK tedavilerinden daha etkin ve daha az yan etki gösterdiği belirtilmiştir (Lee ve diğ. 2016, Cui ve diğ. 2013, Liu ve diğ. 2016, Jung ve diğ. 2016). Ayrıca, Lin ve diğ. (2017) yaptıkları çalışmada, DH-CIK kombine tedavinin ileri evre meme kanserinde sağkalım süresini uzattığını bildirmişlerdir. Çalışmamızın sonucunda, tek başına DH etkinliğinin % 165, tek başına CIK hücre etkinliğinin % 150 ve DH-CIK kombinasyonun etkinliği ise % 326 oranında bulunarak bu bilgileri destekleyen veriler saptanmıştır.

Tez çalışmamızda daha önceki araştırmalar ile etkinliği desteklenen DH-CIK kombinasyonunun, bitkisel kökenli bir adjuvan olan resveratrolün farklı dozları ile indüklenerek etkinliğinin artırılması amaçlanmıştır. Ayrıca, yapılan literatür taramasında CIK hücre kültürünün hazırlanması ile ilgili çeşitli metotlar olduğu belirlenmiş ve CIK hücrelerini en verimli şekilde elde edebilmek için üç farklı yöntemin kıyaslanması amaçlanmıştır. DH kültürü sonlandıktan sonra kalan PKMH'lerden CIK hücrelerinin elde edilmesi, PKMH'leri 2 saat inkübe ettikten sonra adheziv olan hücrelerden DH adheziv olmayan hücrelerden ise CIK hücrelerinin elde edilmesi ve MACSxpress NK hücre izolasyon kiti ile CIK hücrelerinin elde edilmesi yöntemleri karşılaştırılmıştır. Bu yöntemler flow sitometrik olarak NK hücre oranlarına göre değerlendirilmiştir. NK hücreleri, işlem görmemiş normal insan periferik kanının % 0.1-0.2'sini oluşturan lökositlerde yaklaşık % 2 oranında bulunur (Stem Cell Technologies 2018, Invitrogen 2018). Literatürde; DH kültürü sonlandıktan sonra kalan PKMH'lerden CIK hücrelerinin elde edildiği yöntemde kültür süresi sonunda NK hücre oranı % 9 (Lin ve diğ. 2017), PKMH'leri 2 saat inkübe ettikten sonra adheziv olan hücrelerden DH adheziv olmayan hücrelerden ise CIK hücrelerinin elde edildiği yöntemde kültür sonunda NK hücre oranı % 20, MACSxpress NK hücre izolasyon kiti ile % 80 (Novus Biologicals 2018) oranında NK

hücreleri elde edildiği belirtilmiştir. Literatürde, çalışılan kanın işlem görmesi ile ilgili detaylı bilgi verilmemiştir. Flow sitometrik analiz sonuçlarımıza göre, bu yöntemlerden elde edilen NK hücre oranları sırasıyla % 3.21, % 2.14 ve % 4,56'dır. Sonuçlar değerlendirildiğinde, MACSxpress NK hücre izolasyon kiti ile daha yüksek oranda CIK hücrelerinin elde edildiği tespit edilmiştir.

Üzüm, dut, gibi birçok meyve türünde; çerezlerde, yaban mersini ve akasya benzeri bitkilerde yüksek oranda bulunan resveratrolün, insanlarda çeşitli kanser tiplerinde yüksek antikanser etkinliğe sahip olduğu bildirilmiştir (Dong 2003, Athar ve diğ. 2009). Basly ve diğ. (2000), in vitro MCF-7 hücre kanser hattında 0,1- 50 μM doz aralığında RSV'nin sitotoksik aktivitesini araştırmışlardır. Sonuçta; 0,1-1 μM düşük doz RSV'nin etki göstermediği, 25 μM orta doz RSV'nin MCF-7 kanser hücre hattının proliferasyonunu azalttığı ve RSV'nin en yüksek sitotoksik aktivite gösterdiği dozun ise 50 μM olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Karabekir ve diğ. (2017), 10-250 μM doz aralığında RSV'nin MCF-7 hücre hattında antitümöral etkisini araştırmışlardır. RSV'nin artan konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak hücre yoğunluğunun kontrol grubuna göre azaldığını ileri sürmüşlerdir. Sitotoksik doz; 12. saatte 250-500 μM arasında, 24. Saatte 100-250 μM arasında, 48. saatte ise 100 μM olarak belirlenmiştir.

Çalışmamızın MTT analizi sonucunda; bu çalışmalar ile benzer veriler elde edilmiş, MCF-7 hücre canlılığı 12,5 μM RSV'de %63, 25 μM RSV'de %41 ve 50 μM RSV'de ise %38 oranında olduğu tespit edilmiştir. 50 μM RSV'nin diğer dozlara göre MCF-7 hücrelerine karşı daha etkili olduğu görülmektedir.

Svajger ve diğ. (2009), matür DH'lerin T hücrelerine yanıt vermede proliferasyonu indüklemek için kayda değer bir kapasiteye sahip olmasından dolayı DH'lerde farklılaşma ve olgunlaşma esnasında 3-50 μM doz aralığında resveratrolün etkilerini araştırmışlardır. Çalışmanın sonucunda, RSV ile indüklenen DH'lerin, kontrollerle karşılaştırıldığında allojenik CD4⁺ T hücrelerini uyarma yeteneğinde dozun artışına bağlı bir azalma olmuştur. 50 μM RSV ile muamele edilen DH'lerin, kontrollere kıyasla T hücrelerine yanıt vermede proliferasyonu dört kat daha az uyurabildiği saptanmıştır. Yüksek dozda CD4⁺ CD25⁺ negatif Treg hücrelerinin inhibe

olduğu, 3-12,5 μM düşük doz resveratrol uygulandığında IL-10 üretiminin azaldığı ve IL-12 üretiminin arttığı bildirilmiştir.

Kim ve diğ. (2004) fareler üzerinde yaptıkları çalışmada, resveratrol ile indüklenen DH'lerin, mannoz reseptör aracılı endositoz yoluyla antijen yakalamada yüksek derecede verimli olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmanın sonucunda, $>20 \mu\text{M}$ RSV dozlarının DH'ler için toksik olduğu ve $\leq 10 \mu\text{M}$ RSV dozlarının ise etkili olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca düşük doz RSV'nin IL-10 seviyesini azalttığı ve IL-12 seviyesini artırdığı saptanmıştır. Bu sonuçlar, resveratrolün immünsüpresif özelliklerini göstermekte; kronik immün ve/veya enflamatuvar hastalıkların kontrol edilmesinde terapötik olarak faydalı olabileceğini düşündürmektedir.

MTT analizi sonuçlarımıza göre; Svajger ve diğ. (2009) ve Kim ve diğ. (2004)'nin yaptıkları çalışmaların bulgularına benzer olarak 12,5 μM RSV+DH kombinasyonunun etkinliği %286, 25 μM RSV+DH kombinasyonunun etkinliği %169 ve 50 μM RSV+DH kombinasyonunun etkinliği %141 olarak saptanmıştır. Sonuçlarımız değerlendirildiğinde, tek başına DH etkinliğine (% 165) göre düşük doz RSV'nin DH etkinliğini artırdığı, dozun artışına bağlı olarak etkinliğin azaldığı belirlenmiştir.

Yang ve diğ. (2008) 25-75 μM doz aralığında RSV'yi farelere uyguladıkları çalışmada, kontrol grubuna göre resveratrolün dozunun artışı ile immün sistemin negatif düzenleyicileri olan CD4^+ CD25^+ Treg hücrelerini inhibe ettiği ve CD8^+ T hücrelerinde IFN- γ ekspresyonunu artırdığını rapor etmişlerdir. RSV'nin en etkin dozunun 75 μM olduğunu bildirmişlerdir. Böylece resveratrolün aşı temelli kanser tedavisinde adjuvan olarak kullanılabileceği desteklenmiştir.

Lee-Chang ve diğ. (2013) yaptıkları çalışmada; 1,6- 25 μM doz aralığında RSV uygulamış, immün hücreler için sitotoksik olmayan düşük dozlardaki RSV'nin farelerde meme kanseri metastazını etkili bir şekilde önleyebileceğini ileri sürmüşlerdir. Ayrıca RSV'nin, TGF- β ekspresyonunu ve negatif Treg hücrelerinin fonksiyonunu ve üretimini de inhibe ettiğini rapor etmişlerdir. Sonuç olarak düşük doz resveratrolün kanser kaçışını teşvik eden Tregleri kontrol ederek kanser tedavisine fayda sağlayabileceği önerilmektedir.

Yang ve diğ. (2008)'nin yaptığı çalışma sonuçları yüksek doz RSV kullanımını desteklerken, Lee-Chang ve diğ. (2013)'nin yaptığı çalışma sonuçları düşük doz RSV kullanımını desteklemektedir. MTT analizi sonuçlarımıza göre; tek başına DH veya CIK ya da DH-CIK kombinasyonuna uygulanan düşük doz RSV'nin etkinliği artırdığı, dozun artışı ile etkinliğin azaldığı ve tek başına RSV uygulandığı zaman dozun artmasıyla etkinliğin arttığı belirlenmiştir.

Gao ve diğ. (2003), 6,25-50 μM doz aralığında RSV'nin fare dalak hücrelerindeki lenfosit proliferasyonunu araştırdıkları çalışmada; 25-50 μM RSV'nin mitojen, sitokin ve alloantijen kaynaklı splenik lenfositlerin proliferasyonunu önemli ölçüde inhibe ettiğini, 6,25 veya 12,5 μM RSV'de ise anlamlı olarak arttığını göstermişlerdir.

Feng ve diğ. (2002) farelere 3,12-50 μM doz aralığında RSV uyguladıkları çalışmada, düşük doz RSV'nin IL-2, IL-12, IFN- γ üretimini artırdığı, 25 μM ve üzeri konsantrasyonlardaki RSV'nin ise lenfosit proliferasyonunu ve proinflamatuvar sitokinlerin üretimini inhibe ettiğini saptamışlardır.

Lu ve Chen (2010) tarafından, HepG2 gibi solid tümörlere karşı 12,5 μM RSV ile indüklenen NK hücrelerinin antikanser etkinliğini artırdığı bildirilmiştir.

Hu ve diğ. (2012), RSV'nin 25-100 μM doz aralığında CIK hücre yüzeyinde apoptozu indükleyen ligand (TRAIL) reseptörlerine etkilerini araştırmışlar ve 25 μM resveratrolün TRAIL aktivasyon yolağını indüklediğini saptamışlardır. Bu sonuçlar CIK hücreleri ile kombine edilen resveratrolün, rezidüel lösemi kök hücrelerini yok etmek için yeni ve etkili immünoterapi stratejisi olabileceğini desteklemektedir.

Hem NK hem de T lenfosit özelliği gösteren CIK hücrelerine yönelik yapılan bu çalışmalar ile çalışmamızın verileri benzer sonuçlar içermektedir. MTT analizi sonuçlarımızda, 12,5 μM RSV+CIK kombinasyonunun etkinliği % 171, 25 μM RSV+CIK kombinasyonunun etkinliği % 156 ve 50 μM RSV+CIK kombinasyonunun etkinliği % 155 olarak saptanmıştır. Verilerimize göre, tek başına CIK hücre etkinliği (% 150) ile karşılaştırıldığında 12,5 μM düşük doz RSV'nin CIK hücre etkinliğini artırdığı, dozun artışıyla birlikte etkinliğin azaldığı belirlenmiştir.

Özet olarak, flow sitometrik sonuçlarımıza göre CIK hücrelerinin en yüksek oranda MACSxpress NK hücre izolasyon kiti ile elde edilebildiği, DH-CIK kombinasyon etkinliğinin (% 326) tek başına DH (% 165) veya CIK (% 150) tedavisine göre daha yüksek olduğu, 12,5 µM düşük doz RSV'nin hem tek başına DH (% 286) hem de tek başına CIK (% 171) etkinliğini artırdığı, RSV'nin CIK hücrelerine göre DH'lerin etkinliğini daha çok artırdığı, DH-CIK kombinasyonunun etkinliğine göre 12,5 µM RSV'nin DH-CIK kombinasyonunun etkinliğini (% 416) artırdığı, tekbaşına 50 µM yüksek doz RSV'nin diğer dozlara göre MCF-7 kanser hücre hattına karşı daha yüksek sitotoksosite gösterdiği saptanmıştır.

Yapılan çalışmalarda RSV'nin DH ve CIK hücreleri üzerindeki kanıtlanmış etkileri ve elde ettiğimiz veriler göz önünde bulundurulduğunda, bu tez çalışmasının etkin bir DH-CIK kombine aşı model adayı olabileceğini düşünmekteyiz.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamız, kanser immünoterapisinde kullanılan DH-CIK kombine aşuların etkinliğini artırmak için düşük doz uygulanan resveratrolün iyi bir adjuvan olabileceğini göstermektedir. Yine bu çalışma, denenen üç farklı yöntem içerisinde MACSxpress NK hücre izolasyon kiti ile daha yüksek oranda CIK hücrelerinin elde edilebileceğini göstermektedir. Bunların sonucunda, resveratrol ile indüklenen DH-CIK kombine aşular, muhtemel kanser tedavi alternatiflerinin arasında yer alabileceğini düşündürmektedir.

Daha ileriki çalışmalarda değişik hücre hatları üzerine bu kombinasyonun etkinliğinin araştırılması düşünülmektedir. Ayrıca hayvan modelleri üzerinde yapılacak çalışmalarda in vivo etkinliğinin gösterilmesi ve bu kombinasyonun uygulanabilecek güvenli bir terapötik aşı modeli olduğunu ortaya koyması beklenmektedir.

KAYNAKLAR

- AGGARWAL BB, BHARDWAJ A, AGGARWAL RS, SEERAM NP, SHISHODIA S, TAKADA Y. 2004. Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies. *Anticancer Res.* 24:2783-840
- ALBERT M.L. 1998. *J. Exp. Med.* 188:1359
- AMERICAN CANCER SOCIETY. *Cancer Immunotherapy*. Copyright American Cancer Society. Erişim tarihi:24.05.2015
- ANGUILLE S, SMITS EL, BRYANT C, VAN ACKER HH, GOOSSENS H, LION E. 2015. Dendritic cells as pharmacological tools for cancer immunotherapy. *Pharmacol Rev.* 67(4):731–53
- ANONİM. 2014. <http://en.wikipedia.org/wiki/File:Piceid.svg>. Erişim tarihi: Nisan 2014
- ARSLAN C, DİZDAR O, ALTUNDAG K. 2014. Chemotherapy and biological treatment options in breast cancer patients with brain metastasis: an update. *Expert Opin Pharmacother.* 15:1643–58.
- ASLAN G. 2010. Tümör İmmünolojisi. *Turk. J. Immunol.*15(1), 7-13
- ATHAR M., BACK J. H., KOPELOVICH L., BICKERS D. R., KIM A. L. 2009. Multiple molecular targets of resveratrol: Anti-carcinogenic mechanisms. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 486(2), 95-102
- ATHAR M., BACK J. H., TANG X., KIM K. H., KOPELOVICH L., BICKERS D. R., KIM A. L. 2007. Resveratrol: a review of preclinical studies for human cancer prevention. *Toxicology and Applied Pharmacology.* 224(3),274-83
- AVIGAN D. 1999. Dendritic cells: development, function and potential use for cancer immunotherapy. *BloodRev.* Mar;13(1):51-64
- BANCHEREAU J, STEINMAN RM. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature.* 392(6673):245–52
- BANIK U., PARASURAMAN S., ADHİKARY AK., OTHMAN NH. 2017. Curcumin: the spicy modulator of breast carcinogenesis. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research.* 36:98
- BARBAROS B., DİKMEN M. 2015. Kanser İmmünoterapisi. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi.* 31(4):177-181
- BASLY JP, MARRE FOURNIER F, LE BAIL JC, HABRIOUX G, CHULIA AJ. 2000. Estrogenic/antiestrogenic and scavenging properties of (E)- and (Z)-resveratrol. *Life Sci.* 66:769-77
- BENDER A., SAPP M., SCHULER G., STEINMAN R.M., BHARDWAJ N. 1996. Improved methods for the generation of dendritic cells from nonproliferating progenitors in human blood. *J. Immunol. Methods.* 196:121-135
- BENDER A., SAPP M., SCHULER G., STEINMAN R. M. , BHARDWAJ N. 1996. Improved methods for the generation of dendritic cells from nonproliferating progenitors in human blood. *Journal of Immunological Methods.* 196: 121- 135
- BOL K.F., SCHREIBELT G., AARNTZEN E.H.J.G., DE VRIES L.J.M. VE FIGDOR C.G. 2013. *Dendritic Cell-Based Cancer Immunotherapy: Achievements and Novel Concepts.* T.J. Curiel (ed.), *Cancer Immunotherapy.* Springer Science+Business Media New York

- CAI C, CHEN W, MIAO D, CHENG L, YANG G, ZHANG L. 2014. Toll-like receptor 4 is required for the cytotoxicity of cytokine-induced killer cells. *Acta Haematol.* 132(1):5–9
- CAMBI A, LIDKE DS, ARNDT-JOVIN DJ, FIGDOR CG, JOVIN TM. 2007. Ligand-conjugated quantum dots monitor antigen uptake and processing by dendritic cells. *Nano Lett.* 7(4):970–7
- CANTÜRK NZ, VURAL B, ESEN N, CANTÜRK Z, OKTAY G, KIRKALÌ G, SOLAKOĞLU S. 1999. Effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on incisional wound healing in an experimental diabetic rat model. *Endocrine Research.* 25(1): 105-116
- CAO J, CHEN C, WANG Y, CHEN X, CHEN Z, LUO X. 2016. Influence of autologous dendritic cells on cytokine-induced killer cell proliferation, cell phenotype and antitumor activity in vitro. *Oncol.* 12(3):2033–7
- CARACCILOLO D., SHIRSAT N., WONG G.G., LANGE B., CLARK S., ROVERA G. 1987. Recombinant human macrophage colonystimulating factor (M-CSF) requires subliminal concentrations of granulocyte/macrophage (GM)-CSF for optimal stimulation of human macrophage colony formation in vitro. *J. Exp. Med.* 166:1851-1860
- CAUX C., DEZUTTER-DAMBUYANT C., SCHMITT D., BANCHEREAU J. 1992. GMCSF and TNF-alpha cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells. *Nature.* 360,258-261
- CAUX C., MASSACRIER, C., VANBERVLIET B., DUBOIS B., DURAND I., CELLA M., LANZAVECCHIA A., BANCHEREAU J. 1997. CD34hematopoetic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF-TNF- α II. Functional analysis. *Blood* 90, 1458-1470
- CAUX C., VANBERVLIET B., MASSACRIER C., DEZUTTER-DAMBYANT C., DE SAINT-VIS B., JACQUET C., YONEDA S., IMAMURA S., SCHMITT D., BANCHEREAU J. 1996. CD34 hematopoetic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF-TNF- α . *Journal of Experimental Medicine.* 184, 695-706
- CELLA M., SALLUSTO F., LANZAVECCHIA A. 1997. Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. *Curr. Opin. Immunol.* 9, 10–16
- CHEN DS, MELLMAN I. 2013. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity.* 39(1):1–10
- CIANCHETTI E., COTELLESE R. 1985. Breast cancer. Epidemiology and other factors related to incidence in various populations. *Minerva Med.* 76((12)), 555-561
- COYLE Y. M. 2004. The effect of environment on breast cancer risk. *Breast cancer research and treatment.* 84(3), 273-88
- CRUZ LJ, TACKEN PJ, BONETTO F, BUSCHOW SI, CROES HJ, WĪJERS M. 2011. Multimodal imaging of nanovaccine carriers targeted to human dendritic cells. *Mol Pharm.* 8(2):520–31
- CUCCIOLLA V., BORRIELLO A., OLIVA A., GALLETTI P., ZAPPÌA V., DELLA RAGIONE F. 2007. Resveratrol: from basic science to the clinic. *Cell Cycle.* 6(20), 2495-2510
- CUI Y, YANG X, ZHU W, LI J, WU X, PANG Y. 2013. Immune response, clinical outcome and safety of dendritic cell vaccine in combination with cytokine-induced killer cell therapy in cancer patients. *Oncol Lett.* 6(2):537–41
- CURIEL T. J. 2013. *Cancer Immunotherapy: Paradigms, Practice and Promise.* syf.5, Springer Science+Business Media New York

- DAI C, LIN F, GENG R, GE X, TANG W, CHANG J. 2016. Implication of combined PD-L1/PD-1 blockade with cytokine-induced killer cells as a synergistic immunotherapy for gastrointestinal cancer. *Oncotarget*. 7(9):10332–44
- DE SAINT-VIS B. 1998. *Immunity*. 9:325
- DEMIRELLİ F. H. 2005. Hedefe Yönelik Kanser Tedavisi ve Monoklonal Antikorlar. *ANKEM Derg.* 19(Suppl 2), 123-125
- DENG QI, BAİ X, LV HR, XIAO X, ZHAO MF, Lİ YM. 2015. Anti-CD20 antibody induces the improvement of cytokine-induced killer cell activity via the STAT and MAPK/ERK signaling pathways. *Exp Ther Med*. 9(4):1215–22
- DOMINGUEZ C, GUILLEN DA, BARROSO CG. 2001. Automated solid-phase extraction for sample preparation followed by high-performance liquid chromatography with diode array and mass spectrometric detection for the analysis of resveratrol derivatives in wine. *J Chromatogr A*. 918:303-10.
- DONG Z. 2003. Molecular mechanism of the chemopreventive effect of resveratrol. *Mutat Res*. 523-524, 145-150
- DRIESSEN C, BRYANT, R. A., LENNON-DUMENİL, A. M., VİLLADANGOS, J. A., BRYANT, P. W., SHİ, G. P., CHAPMAN, H. A., AND PLOEGH, H. L. 1999. Cathepsin S controls the trafficking and maturation of MHC class II molecules in dendritic cells. *J. Cell Biol*. 147:775-790
- DRIESSENS G, KLİNE J, GAJEWSKİ TF. 2009. Costimulatory and coinhibitory receptors in anti-tumor immunity. *Immunol Rev*. 229(1):126–44
- EL-MOWAF A. M., WHİTE R. E. 1999. Resveratrol inhibits MAPK activity and nuclear translocation in coronary artery smooth muscle: reversal of endothelin1 stimulatory effects. *Febs Letters*. 451(1), 63-67
- ESKANDER R. M., TEWARİ K. S. 2015. Immunotherapy: An Evolving Paradigm in the Treatment of Advanced Cervical Cancer. *Clinical Therapeutics*. 37(1), 20-38
- ESSER L, WEİHER H, SCHMİDT-WOLF I. 2016. Increased efficacy of brentuximab vedotin (SGN-35) in combination with cytokine-induced killer cells in lymphoma. *Int J Mol Sci*. 17(7):E1056
- EUVRARD S. 2008. Skin cancers after organ transplants. *Presse Med*. 37, 1475-1479
- FAN G, WANG Z, HAO M, Lİ J. 2015. Bispecific antibodies and their applications. *J Hematol Oncol*. 8:130
- FENG YH, ZHOU WL, WU QL, LI XY, ZHAO WM, ZOU JP. 2002. Low dose of resveratrol enhanced immune response of mice. *Acta Pharmacol Sin*. 23:893–7
- FERNANDEZ NC, LOZİER A, FLAMENT C, RİCCIARDİ-CASTAGNOLİ P, BELLET D, SUTER M. 1999. Dendritic cells directly trigger NK cell functions: cross-talk relevant in innate anti-tumor immune responses in vivo. *Nat Med*. 5(4):405–11
- FERRARI M. 2005. Cancer nanotechnology: opportunities and challenges. *Nat Rev Cancer*. 161–71
- FINKE S, TROJANECK B, LEFTEROVA P, CSİPAİ M, WAGNER E, KİRÇHEİS R. 1998. Increase of proliferation rate and enhancement of antitumor cytotoxicity of expanded human CD3+ CD56+ immunologic effector cells by receptor-mediated transfection with the interleukin-7 gene. *Gene Ther*. 5(1):31–9

- FONTECAVE M., LEPOIVRE M., ELLEINGAND E., GEREZ C., GUÏTTET O. 1998. Resveratrol, a remarkable inhibitor of ribonucleotide reductase. *Febs Letters*. 421(3), 277-279
- FRASER C.K., BROWN M.P., DIENER K.R., HAYBALL J.D. 2010. Unravelling the complexity of cancer immune system interplay. *Expert Rev Anticancer Ther*. 10, 917-934
- FULDA S., DEBATIN K. M. 2004. Sensitization for anticancer drug-induced apoptosis by the chemopreventive agent resveratrol. *Oncogene*. 23(40), 6702-6711
- GAO X., DEEBA D., MEDIAA J, DIVINEB G. , JIANGC H. 2003. Immunomodulatory activity of resveratrol: discrepant in vitro and in vivo immunological effects. *Biochemical Pharmacology*. 2427-2435
- GAO X., MI Y., GUO N., XU H., XU L., GOU X., JIN W. 2017. Cytokine-induced Killer Cells As Pharmacological Tools for Cancer immunotherapy. *Frontiers in Immunology*. July, Volume 8, article 774
- GARCÍA-SALÍDO A., MELEN G., GÓMEZ-PIÑA V., OÑORO-OTERO G., SERRANO-GONZÁLEZ A., CASADO-FLORES J., RAMÍREZ M. 2017. Circulating soluble RAGE and cell surface RAGE on peripheral blood mononuclear cells in healthy children. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 31(6): 649-654
- GOSSLAU A, CHEN M, HO CT, CHEN KY. 2005. A methoxy derivative of resveratrol analogue selectively induced activation of the mitochondrial apoptotic pathway in transformed fibroblasts. *Br J Cancer*. 92:513-21
- GREENSMITH J. 2007. The Dendritic Cell Algorithm. Thesis (PhD). University of Nottingham
- GÜLEN D., COŞKUN U., TÜRKEN O., ABE F., WARKENTIN P., TALMADGE J.E. 2010. Dendritic Cell Vaccines. *Türkiye Klinikleri J Med Oncol-Special Topics*. 3(2):66-76
- HAN RX, LIU X, PAN P, JIA YJ, YU JC. 2014 Effectiveness and safety of chemotherapy combined with dendritic cells co-cultured with cytokine-induced killer cells in the treatment of advanced non-small-cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 9(9):e108958
- HANEKE KE. 2002. Review of Toxicological Literature, Trans-Resveratrol (501-36-0). Integrated Laboratory Systems. Research Triangle Park
- HARRIS T. J., DRAKE C. G. 2013. Primer on Tumor Immunology and Cancer Immunotherapy. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*. 1(12), 1-9
- HERZENBERG, T., HERZENBERG, J., HERZENBERG, L.A. 2007. Unraveling B-1 progenitors. *Current Opinion in Immunology*. 19(2):150-155
- HOMBACH AA, RAPPL G, ABKEN H. 2013. Arming cytokine-induced killer cells with chimeric antigen receptors: CD28 outperforms combined CD28-OX40 “super-stimulation”. *Mol Ther*. 21(12):2268-77
- HOPP, A. K., A. RUPP, AND V. LUKACS-KORNEK. 2014. Self-antigen presentation by dendritic cells in autoimmunity. *Front Immunol*. 5: 55
- HSU FJ VE DIĞ. 1996. Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigenpulsed dendritic cells. *Nat Med*. 2(1):52-58
- HU L., CAO D., LI Y., HE Y., GUO K. 2012. Resveratrol sensitized leukemia stem cell-like KG-1a cells to cytokine-induced killer cells-mediated cytolysis through NKG2D ligands and TRAIL receptors. *Cancer Biology & Therapy*. 13:7, 516-526

- HUANG J, LI C, WANG Y, LV H, GUO Y, DAI H. 2013. Cytokine-induced killer (CIK) cells bound with anti-CD3/anti-CD133 bispecific antibodies target CD133(high) cancer stem cells in vitro and in vivo. *Clin Immunol.* 149(1):156–68
- HUBO, M., B. TRINSCHEK, F. KRYCZANOWSKY, A. TUETTENBERG, K. STEINBRINK, AND H. JONULEIT. 2013. Costimulatory molecules on immunogenic versus tolerogenic human dendritic cells. *Front Immunol.* 4: 82
- INVITROGEN. 09.11.2018. [https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/brochures/I-076357%20cell%20count%20table%20topp_WEB.pdf]
- IRVINE DJ, HANSON MC, RAKHRA K, TOKATLIAN T. 2015. Synthetic nanoparticles for vaccines and immunotherapy. *Chem Rev.* 115(19):11109–46
- IUDICONE P, FIORAVANTI D, CICCETTI E, ZIZZARÌ IG, PANDOLFÌ A, SCOCCHERA R. 2016. Interleukin-15 enhances cytokine induced killer (CIK) cytotoxic potential against epithelial cancer cell lines via an innate pathway. *Hum Immunol.* 77(12):1239–47
- JAKEL CE, SCHMIDT-WOLF IG. 2014. An update on new adoptive immunotherapy strategies for solid tumors with cytokine-induced killer cells. *Expert Opin Biol Ther.* 14(7):905–16
- JIN W, CUI D. 2016. Cancer nano-immunoengineering: the marriage of immunoengineering and nanotechnology for cancer. *Nano Biomed Eng.* 8(2):105–6
- JORDAN VC. 2003. Antiestrogens and selective estrogen receptor modulators as multifunctional medicines. 2. Clinical considerations and new agents. *J Med Chem.* 46:1081-111
- JUNG NC, LEE JH, CHOİ HJ, HWANG SU, SONG JY, SEO HG. 2016. Dendritic cell immunotherapy combined with cytokine-induced killer cells effectively suppresses established hepatocellular carcinomas in mice. *Immunol Invest.* 45(6):553–65
- KALINSKI P., OKADA, H. 2010. Polarized dendritic cells as cancer vaccines: directing effector-type T cells to tumors. *Semin Immunol.* 22, 173-182
- KANTOFF PW., HIGANO CS., SHORE ND., BERGER ER., SMALL EJ., PENSON DF., REDFERN CH., FERRARİ AC., DREICER R., SIMS RB., XU Y., FROHLICH MW., SCHELLHAMMER PF. 2010. Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. *N Engl J Med.* 363(5):411-422
- KARABEKİR G., DEMİRCAN G., ÖZDAŞ Ş. 2017. Resveratrolün MCF-7 hücre soyunda apoptotik etkinin araştırılması. *FNG & Bilim Tıp Dergisi.* 3(1):27-34
- KHAN SI, AUMSUWAN P, KHAN IA, WALKER LA, DASMAHAPATRA AK. 2012. Epigenetic events associated with breast cancer and their prevention by dietary components targeting the epigenome. *Chem Res Toxicol.* 25:61–73
- KIM GY., CHOB H., AHN B SC., OH B YH., LEE B CM., PARK YM. 2004. Resveratrol inhibits phenotypic and functional maturation of murine bone marrow-derived dendritic cells. *International Immunopharmacology.* 4:245–253
- KIM YA, CHOI BT, LEE YT, PARK DI, RHEE SH, PARK KY, CHOI YH. 2004. Resveratrol inhibits cell proliferation and induces apoptosis of human breast carcinoma MCF-7 cells. *Oncol Rep.* 11:441-6
- KIM, R., EMI, M., TANABE K., 2007. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology.* 121, 1-14

- KIMURA Y, OKUDA H, ARICHI S. 1985. Effects of stilbenes on arachidonate metabolism in leukocytes. *Biochim Biophys Acta*. 834:275-8
- KINDT T.J., GOLDSBY R.A., OSBORNE B.A., KUBY J. 2007. *Kuby immunology* W.H. Freeman
- KNIGHT S. C., PATTERSON S. 1997. Bone marrow-derived dendritic cells, infection with human deficiency virus, and immunopathology. *Annual Review of Immunology*. 593-615.
- KUO PL, CHIANG LC, LIN CC. 2002. Resveratrol- induced apoptosis is mediated by p53-dependent pathway in HepG2 cells. *Life Sci*. 72:23-34
- LANGCAKE PM. 1979. The relationship of resveratrol production to infection of grapevine leaves by *Botrytis cinerea*. *Vitis*. 18:244-53
- LANGERHANS P. 1868. Ueber die Nerven der menschlichen Haut. *Virchows Archiv*. 44(2): 325-37
- LANZILLI G, FUGGETTA MP, TRICARICO M, COTTARELLI A, SERAFINO A, FALCHETTI R, RAVAGNAN G, TURRIZIANI M, ADAMO R, FRANZESE O, BONMASSAR E. 2006. Resveratrol downregulates the growth and telomerase activity of breast cancer cells in vitro. *Int J Oncol*. 28:641-8
- LEE HK, KIM YG, KIM JS, PARK EJ, KIM B, PARK KH. 2016. Cytokine-induced killer cells interact with tumor lysate-pulsed dendritic cells via CCR5 signaling. *Cancer Lett*. 378(2):142–9
- LEE-CHANG C., BODOGAÍ M., MARTÍN-MONTALVO A., WEJKSZA K., M. SANGHVI, R. MOADDEL, DE CABO R., BIRAGYN A. 2013. Inhibition of Breast Cancer Metastasis by Resveratrol-Mediated Inactivation of Tumor-Evoked Regulatory B Cells. *The Journal of Immunology*. 191: 4141–4151
- LEHRER RI, GANZ T. 2001. Biochemistry and function of monocytes and macrophages. Williams hematology sixty edition. 865-871
- LESTERHUIS WJ. 2004. Dendritic cell-based vaccines in cancer immunotherapy: an update on clinical and immunological results. *Ann Oncol*. 145–151
- LI H, REN XB, ZHANG P, AN XM, LIU H, HAO XS. 2005. Dendritic cells reduce the number and function of CD4+CD25+ cells in cytokine-induced killer cells]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 285(44):3134–3138
- LIANG C, XU L, SONG G, LIU Z. 2016. Emerging nanomedicine approaches fight-ing tumor metastasis: animal models, metastasis-targeted drug delivery, phototherapy, and immunotherapy. *Chem Soc Rev*. 45(22):6250–69
- LIM YT, NOH YW, HAN JH, CAI QY, YOON KH, CHUNG BH. 2008. Biocompatible polymer-nanoparticle-based bimodal imaging contrast agents for the label-ing and tracking of dendritic cells. *Small*.4(10):1640–5
- LIN G, WANG J, LAO X, LI L, LI S, ZHANG J. 2012. Interleukin-6 inhibits regulatory T cells and improves the proliferation and cytotoxic activity of cytokine-induced killer cells. *J Immunother*. 35(4):337–43
- LIN LL, LIEN CY, CHENG YC, KU KL. 2007. An effective sample preparation approach for screening the anticancer compound piceatannol using HPLC coupled with UV and fluorescence detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 853:175-82

- LIN M, LIANG S, JIANG F, XU J, ZHU W, QIAN W. 2017. 2003–2013, a valuable study: autologous tumor lysate-pulsed dendritic cell immunotherapy with cytokine-induced killer cells improves survival in stage IV breast cancer. *Immunol Lett.* 183:37–43
- LINN YC, LAU LC, HUI KM. 2002. Generation of cytokine-induced killer cells from leukaemic samples with in vitro cytotoxicity against autologous and allogeneic leukaemic blasts. *Br J Haematol.* 116(1):78–86
- LINN YC, WANG SM, HUI KM. 2005. Comparative gene expression profiling of cytokine-induced killer cells in response to acute myeloid leukemic and acute lymphoblastic leukemic stimulators using oligonucleotide arrays. *Exp Hematol.* 33(6):671–81
- LIU R. H. 2004. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *The Journal of Nutrition.* 134, 3479–3485
- LIU Y, LIU H, HE P, LI J, LIU X, CHEN L. 2016. Dendritic cell-activated cytokine-induced killer cell-mediated immunotherapy is safe and effective for cancer patients >65 years old. *Oncol Lett.* 12(6):5205–10
- LIU ZP, LI WX, YU B, HUANG J, SUN J, HUO JS, LIU CX. 2005. Effects of trans-resveratrol from *Polygonum cuspidatum* on bone loss using the ovariectomized rat model. *J Med Food.* 8:14-9
- LU C-C, CHEN J-K. 2010. Resveratrol enhances perforin expression and NK cell cytotoxicity through NKG2D-dependent pathways. *J Cell Physiol.* 223(2):343–51
- LU PH, NEGRIN RS. 1994. A novel population of expanded human CD3+CD56+ cells derived from T cells with potent in vivo antitumor activity in mice with severe combined immunodeficiency. *J Immunol.* 153(4):1687–96
- LUTZ M.B., SCHULER G. 2002. Immature, semi-mature, fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity?. *TRENDS in Immunology.* 23(9):445-449
- MA P, HE Q, LI W, LI X, HAN H, JIN M. 2015. Anti-CD3 x EGFR bispecific antibody redirects cytokine-induced killer cells to glioblastoma in vitro and in vivo. *Oncol Rep.* 34(5):2567–75
- MAK JC. 2012. Potential role of green tea catechins in various disease therapies: progress and promise. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 39(3):265-73
- MARTEN A, ZISKE C, SCHOTTKER B, RENOTH S, WEINECK S, BUTTGEREIT P. 2001. Interactions between dendritic cells and cytokine-induced killer cells lead to an activation of both populations. *J Immunother.* 24(6):502–10
- MEDZHITOV R., JANEWAY C. 2002. Decoding the patterns of self, nonself by the innate immune system. *Science.* 296:298–300
- MIZUTANI K, IKEDA K, KAWAI Y, YAMORI Y. 2000. Resveratrol attenuates ovariectomy-induced hypertension and bone loss in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo).* 46:78-83
- MOSMANN T., LIVINGSTONE A. 2004. Dendritic cells: the immune information management experts. *Nature Immunology.* 5(6):564–566
- MOTZ, G.T., AND COUKOS, G. (2013). Deciphering and Reversing Tumor Immune Suppression. *Immunity* 39, this issue, 61–73.

- MOYSÍCH K. B., BEEHLER G. P., ZÍRPOLÍ G., CHOI J.Y., BAKER J. A. 2008. Use of common medications and breast cancer risk. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology.* 17(7), 1564-95
- MU Y, ZHOU CH, CHEN SF, DÍNG J, ZHANG YX, YANG YP. 2016. Effectiveness and safety of chemotherapy combined with cytokine-induced killer cell/dendritic cell-cytokine-induced killer cell therapy for treatment of gastric cancer in China: a systematic review and meta-analysis. *Cytotherapy.* 18(9):1162–1177
- NICOL A, NIEDA M, KOEZUKA Y, PORCELLÍ S, SUZUKÍ K, TADOKORO K. 2000. Human invariant valpha24+ natural killer T cells activated by alpha-galactosylceramide (KRN7000) have cytotoxic anti-tumour activity through mechanisms distinct from T cells and natural killer cells. *Immunology.* 99(2):229–34
- NIELSEN, N. R., GRØNBAEK, M. 2006. Stress and breast cancer: a systematic update on the current knowledge. *Nature clinical practice. Oncology.* 3(11), 612-20
- NONOMURA SK, H. MAKÍMOTO, A. 1963. Chemical constituents of polygonaceous plants. I. Studies on the components of Ko-jo-kon (*Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc.). *Yakugaku Zasshi.* 83:988-90
- NOTAS G, NIFLI AP, KAMPA M, VERCAUTEREN J, KOUROUMALIS E, CASTANAS E. 2006. Resveratrol exerts its antiproliferative effect on HepG2 hepatocellular carcinoma cells, by inducing cell cycle arrest, and NOS activation. *Biochim Biophys Acta.* 1760:1657-66
- NOVUS BIOGICALS. 09.11.2018. [https://www.novusbio.com/products/human-nk-cell-kit_magh109-nov]
- OELSNER S, WAGNER J, FRIEDE ME, PFIRRMANN V, GENSSLER S, RETTINGER E. 2016. CAR-engineered cytokine-induced killer cells overcome treatment resistance of pre-B-ALL and enhance survival. *Int J Cancer.* 139(8):1799–809
- OVALI E., DÍKMEN T., SONMEZ M., YÍLMAZ M., ÜNAL A., DALBASTÍ T., KUZEYLÍ K., ERTURK M., OMay S.B. 2007. Active Immunotherapy for Cancer Patients Using Tumor Lysate Pulsed Dendritic Cell Vaccine: a Safety Study. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 26, 2
- PALUCKA, K.A., TAQUET, N., SANCHEZ-CHAPUIS, F., GLUCKMAN, J.C. 1998. Dendritic cells as the terminal stage of monocyte differentiation. *J. Immunol.* 160:4587-4595
- PARDOLL DM. 2012. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer.* 12(4):252–64
- PARISE CA, BAUER KR, BROWN MM, CAGGIANO V. 2009. Breast cancer subtypes as defined by the estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), and the human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) among women with invasive breast cancer in California, 1999-2004. *Breast J.* 15:593–602
- PARISH C. R. 2003. Cancer Immunotherapy: The Past, the Present and the Future. *Immunology and Cell Biology.* 81, 106-113
- Park YM, Lee SJ, Kim YS, Lee MH, Cha GS, Jung ID, et al. Nanoparticle-based vaccine delivery for cancer immunotherapy. *Immune Netw* (2013) 13(5):177–83
- PASCUAL M. R. 1982. Clinical factors related to the presence of estrogen receptors in breast cancer: a prognostic stratification analysis. *Neoplasma.* 29(4), 453-461

- PAUL B, MASIH I, DEOPUJARI J, CHARPENTIER C. 1999. Occurrence of resveratrol and pterostilbene in age-old darakchasava, an ayurvedic medicine from India. *J Ethnopharmacol.* 68:71-6
- PIEVANI A, BELUSSI C, KLEIN C, RAMBALDI A, GOLAY J, INTRONA M. 2011. Enhanced killing of human B-cell lymphoma targets by combined use of cytokine-induced killer cell (CIK) cultures and anti-CD20 antibodies. *Blood.* 117(2):510–8
- POH SL, LINN YC. 2016. Immune checkpoint inhibitors enhance cytotoxicity of cytokine-induced killer cells against human myeloid leukaemic blasts. *Cancer Immunol Immunother.* 65(5):525–36
- POZO GUISTADO E, MERINO JM, MULERO NAVARRO S, LORENZO BENAYAS MJ, CENTENO F, ALVAREZ BARRIENTOS A, FERNANDEZ SALGUERO PM. 2005. Resveratrol-induced apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells involves a caspase-independent mechanism with downregulation of Bcl-2 and NFkappaB. *Int J Cancer.* 115:74-84
- PREDINA, J., ERUSLANOV, E., JUDY, B., KAPOOR, V., CHENG, G., WANG, L.C., SUN, J., MOON, E.K., FRIDLINDER, Z.G., ALBELDA, S., AND SINGHAL, S. 2013. Changes in the local tumor microenvironment in recurrent cancers may explain the failure of vaccines after surgery. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110, E415–E424
- PREUSSER M, LIM M, HAFLER DA, REARDON DA, SAMPSON JH. 2015. Prospects of immune checkpoint modulators in the treatment of glioblastoma. *Nat Rev Neurol.* 11(9):504–14
- PROIA, T. A, KELLER, P. J., GUPTA, P. B., KLEBBA, I., JONES, A. D., SEDIC, M. 2011. Genetic Predisposition Directs Breast Cancer Phenotype by Dictating Progenitor Cell Fate. *Cell Stem Cell.* 8(2), 149-163
- RACHON D, RIMOLDI G, WUTTKE W. 2006. In vitro effects of genistein and resveratrol on the production of interferon-gamma (IFN γ) and interleukin-10 (IL-10) by stimulated murine splenocytes. *Phytomedicine.* 13:419-24
- RAJBHANDARY S, ZHAO MF, ZHAO N, LU WY, ZHU HB, XIAO X. 2013. Multiple cytotoxic factors involved in IL-21 enhanced antitumor function of CIK cells signaled through STAT-3 and STAT5b pathways. *Asian Pac J Cancer Prev.* 14(10):5825–31
- REID CD. 1998. The biology and clinical applications of dendritic cells. *Transfus Med.* Jun;8(2):77-86
- RETTINGER E, KUCI S, NAUMANN I, BECKER P, KREYENBERG H, ANZAGHE M. 2012. The cytotoxic potential of interleukin-15-stimulated cytokine-induced killer cells against leukemia cells. *Cytotherapy.* 14(1):91–103
- ROLINSKI J., HUS I. 2010. Dendritic-cell tumor vaccines. *Transplant Proc* 42. 3306-3308
- ROMANI N., REIDER D., HEUER M., EBNER S., KAMPGEN E., EIBL B., NIEDERWIESER D., SCHULER G. 1996. Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability. *J Immunol/Methods.* 196:137-151
- SALLUSTO F., CELLA M., DANIELI C., LANZAVECCHIA A. 1995. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *Journal of Experimental Medicine.* 182: 389-400
- SALLUSTO F., LANZAVECCHIA A. 1994. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med.* 179:1109-1118

- SANTAMBROGIO L. 1999. Proc. Natl. Acad. Sci USA. 96:15050
- SANVICENS N, MARCO MP. 2008. Multifunctional nanoparticles – properties and prospects for their use in human medicine. Trends Biotechnol.26(8):425–33
- SAREEN D, DARJATMOKO SR, ALBERT DM, POLANS AS. 2007. Mitochondria, calcium, and calpain are key mediators of resveratrol-induced apoptosis in breast cancer. Mol Pharmacol. 72:1466-75
- SATTHAPOM S, EREMIN O. 2001. Dendritic cells(I): Biological functions. JR coll Surg Edinb. Feb;46(1):9-19
- SCHLIMPER C, HOMBACH AA, ABKEN H, SCHMIDT-WOLF IG. 2012. Improved activation toward primary colorectal cancer cells by antigen-specific targeting autologous cytokine-induced killer cells. Clin Dev Immunol. 2012:238924
- SCHMIDT TL, NEGRIN RS, CONTAG CH. 2014. A killer choice for cancer immunotherapy. Immunol Res. 58(2–3):300–6
- SCHMIDT-WOLF IG, NEGRIN RS, KIEM HP, BLUME KG, WEISSMAN IL. 1991. Use of a SCID mouse/human lymphoma model to evaluate cytokine-induced killer cells with potent antitumor cell activity. J Exp Med. 174(1):139–49
- SCOTT AM, WOLCHOK JD, OLD LJ. 2012. Antibody therapy of cancer. Nat Rev Cancer.12:278–87
- SEERAM NP, KULKARNI VV, PADHYE S. IN AGGARWAL BB, SHISHODIA S. 2006. Sources and chemistry of resveratrol. New York: Resveratrol in health and disease, CRC Press. 17-32
- SHISHODIA S, AGGARWAL BB. IN AGGARWAL BB, SHISHODIA S. 2006. Resveratrol: A polyphenol for all seasons. New York: Resveratrol in health and disease. CRC Press. 1-16
- SIEVERS EL, SENTER PD. 2013. Antibody-drug conjugates in cancer therapy. Annu Rev Med. 64:15–29
- SIGNORELLI P, GHIDONI R. 2005. Resveratrol as an anticancer nutrient: molecular basis, open questions and promises. J Nutr Biochem. 16, 449-466
- SOULE HD, VAZGUEZ J, LONG A, ALBERT S, BRENNAN M. 1973. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. J Natl Cancer Inst. 51(5):1409-16
- SPORRI R., CAETANO C. 2005. Inflammatory mediators are insufficient for full dendritic cell activation, promote expansion of cd4+ t cell populations lacking helper function. Nature Immunology. 6(2):163–170
- STEINMAN RM, COHN ZA. 1973. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. J Exp Med. 137(5):1142-62
- STEM CELL TECHNOLOGIES. 09.11.2018. [https://www.stemcell.com/media/files/wallchart/WA10006-Frequencies_Cell_Types_Human_Peripheral_Blood.pdf]
- STERVBO U, VANG O, BONNESEN C. 2006. Time- and concentration-dependent effects of resveratrol in HL-60 and HepG2 cells. Cell Prolif. 39:479-93
- SU JL, YANG CY, ZHAO M, KUO ML, YEN ML. 2007. Forkhead proteins are critical for bone morphogenetic protein-2 regulation and anti-tumor activity of resveratrol. J Biol Chem. 282:19385-98

- SUESS G., SHORTMAN K. 1996. A subclass of dendritic cells kills CD4 T cells via Fas/FasL-induced apoptosis. *Journal of Experimental Medicine*. 183,1789- 1796
- SUN ZJ, PAN CE, LIU HS, WANG GJ. 2002. Anti-hepatoma activity of resveratrol in vitro. *World J Gastroenterol*. 8:79-81
- SVAJGER U., OBERMAJER N., JERAS M. 2009. Dendritic cells treated with resveratrol during differentiation from monocytes gain substantial tolerogenic properties upon activation. *British Society for Immunology*
- SZABOLCS P., AVİGAN D., GEZELTER S., CİOCAN D.H., MOORE M.A., STEINMAN R.M., YOUNG, J.W. 1996. Dendritic cells and macrophages can mature independently from a human bone marrow-derived, post-colony-forming unit intermediate. 87:4520-4530
- ŞAKALAR Ç., İZGİ K., CANATAN H. 2013. Kanser İmmün Terapi ve Monoklonal Antikorlar. *F. Ü. Sağ. Bil. Tıp Derg.* 27(2), 105-110
- TANG HY, SHIH A, CAO HJ, DAVIS FB, DAVIS PJ, LIN HY. 2006. Resveratrol-induced cyclooxygenase-2 facilitates p53-dependent apoptosis in human breast cancer cells. *Mol Cancer Ther.* 5:2034-42
- TAO HY, WU CF, ZHOU Y, GONG WH, ZHANG X, IRIBARREN P, ZHAO YQ, LE YY, WANG JM. 2004. The grape component resveratrol interferes with the function of chemoattractant receptors on phagocytic leukocytes. *Cell Mol Immunol.* 1:50-6
- TAO Q, CHEN T, TAO L, WANG H, PAN Y, XIONG S. 2013. IL-15 improves the cyto-toxicity of cytokine-induced killer cells against leukemia cells by upregulating CD3+CD56+ cells and downregulating regulatory T cells as well as IL-35. *J Immunother.* 36(9):462-7
- THANENDRARAJAN S, KIM Y, SCHMİDT-WOLF I. 2012. New adoptive immunotherapy strategies for solid tumours with CIK cells. *Expert Opin Biol Ther.* 12(5):565-72
- TORRE LA, BRAY F, SIEGEL RL, FERLAY J, LORTET-TIEULENT J, JEMAL A. GLOBAL CANCER STATISTICS. 2012. *CA Cancer J Clin.* 2015;65:87-108
- TÜRKİYE KANSER İSTATİSTİKLERİ. 2015. https://hsqm.saglik.gov.tr/depo/birimler/kanser-db/istatistik/Turkiye_Kanser_Istatistikleri_2015.pdf. Erişim tarihi: 01.08.2018
- VALLIANOU N. G., EVANGELOPOULOS A., GELADARI E., KAZAZIS C. 2015. Resveratrol and Cancer. *Hospital Chronicles.* 10(3), 137-144
- VAN ROOIJEN JM, STUTVOET TS, SCHRODER CP, DE VRIES EGE. 2015. Immunotherapeutic options on the horizon in breast cancer treatment. *Pharmacol Ther.* 156:90-101
- VENUGOPAL R., LIU R. H. 2012. Phytochemicals in diets for breast cancer prevention: The importance of resveratrol and ursolic acid. *Food Science and Human Wellness.* 1(1), 1-13
- VERNERIS MR, KARIMI M, BAKER J, JAYASWAL A, NEGRİN RS. 2004. Role of NKG2D signaling in the cytotoxicity of activated and expanded CD8+ T cells. *Blood.* 103(8):3065-72
- VINAY DS, RYAN EP, PAWELEC G, TALİB WH, STAGG J, ELKORD E. 2015. Immune evasion in cancer: mechanistic basis and therapeutic strategies. *Semin Cancer Biol.* 35(Suppl):S185-98
- WALDMANN T. 2003. Immunotherapy: Past, Present and Future. *Nature Medicine.* 9(3), 269-277

- WANG L., QIAN, J., LU, Y., LI, H., BAO, H., HE, D., LIU, Z., ZHENG, Y., HE, J., LI, Y. 2013. Immune evasion evasion of mantle cell lymphoma: expression of B7-H1 leads to inhibited T-cell response to and killing of tumor cells. *Haematologica*
- WANG W, MENG M, ZHANG Y, WEI C, XIE Y, JIANG L. 2014. Global transcriptome-wide analysis of CIK cells identify distinct roles of IL-2 and IL-15 in acquisition of cytotoxic capacity against tumor. *BMC Med Genomics*. 7:49
- WANG ZX, CAO JX, LU ZP, CUI YX, LI CY, LI D. 2014. Combination of chemotherapy and immunotherapy for colon cancer in China: a meta-analysis. *World J Gastroenterol* . 20(4):1095–106
- WAYTECK L., BRECKPOT K., DEMEESTER J., DE SMEDT S. C., RAEMDONCKK. 2014. A Personalized View on Cancer Immunotherapy. *Cancer Letters*. 352:113-125, 2013
- WEI XC, YANG DD, HAN XR. 2015. Bioactivity of umbilical cord blood dendritic cells and anti-leukemia effect. *Int J Clin Exp Med*. 8(10): 19725–19730
- WEI, E. K., WOLIN, K. Y., COLDITZ, G. 2010. Time course of risk factors in cancer etiology and progression. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*.28(26), 4052-7
- WHO. 2012. http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx. Erişim tarihi: 05.06.2017
- WILLIAMS C., HARRY R., MCLEOD J. 2007. Mechanisms of apoptosis induced DC suppression. Submitted to the *Journal of Immunology*.
- WOLFF T. 2006. Genetic risk assessment and BRCA mutation testing for breast and ovarian cancer susceptibility. *Am Fam Physician*. 74(10), 1759-60
- WU C, JIANG J, SHI L, XU N. 2008. Prospective study of chemotherapy in combination with cytokine-induced killer cells in patients suffering from advanced non-small cell lung cancer. *Anticancer Res*. 28(6B):3997–4002
- WU SL, SUN ZJ, YU L, MENG KW, QIN XL, PAN CE. 2004. Effect of resveratrol and in combination with 5-FU on murine liver cancer. *World J Gastroenterol*. 10.3048-52
- XIANG J, XU LG, GONG H, ZHU WW, WANG C, XU J. 2015. Antigen-loaded upconversion nanoparticles for dendritic cell stimulation, tracking, and vaccination in dendritic cell-based immunotherapy. *ACS Nano*. 9(6):6401–11
- XU LG, XIANG J, PENG R, LIU Z. 2016. Recent advances in the development of nanomaterials for DC-based immunotherapy. *Sci Bull*. 61(7):514–23
- YADAV M., JAIN S., BHARDWAJ A., NAGPAL R., PUNIYA M., TOMAR R., SINGH V., PARKASH O., PRASAD G. B., MAROTTA F., YADAV H. 2009. Biological and medicinal properties of grapes and their bioactive constituents: an update. *Journal of Medicinal Food*. 12, 473–84
- YANG Y., PAİK J.H., CHO D., CHO J., KIM C. 2008. Resveratrol induces the suppression of tumor-derived CD4+CD25+ regulatory T cells. *International Immunopharmacology*. 542–547
- YANG Z, ZHANG Q, XU K, SHAN J, SHEN J, LIU L. 2012. Combined therapy with cytokine-induced killer cells and oncolytic adenovirus expressing IL-12 induce enhanced antitumor activity in liver tumor model. *PLoS One*. 7(9):e44802
- YEWDELL J.W. 1999. *Adv. Immunol*. 73:1

- ZHANG J, ZHU L, WEI J, LIU L, YIN Y, GU Y, SHU Y. 2012. The effects of cytokine-induced killer cells for the treatment of patients with solid tumors: A clinical retrospective study. *J Cancer Res Clin Oncol.* 138: 1057-1062
- ZHAO N, ZHAO MF, RAJBHANDARY S, LU WY, ZHU HB, MA L. 2013. Effects and mechanism on anti-leukemic activity of cytokine-induced killer cells with an endogenous expression of interleukin-21. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 93(4):293-9
- ZHAO P., Bu X., Wei X., Sun W., Xie X., Li C., Guo Q., Zhu D., Wei X., Gao D. 2015. Dendritic cell immunotherapy combined with cytokine-induced killer cells promotes skewing toward Th2 cytokine profile in patients with metastatic non-small cell lung cancer. *International Immunopharmacology.* 25(2):450-456
- ZHENG C, YU G, WANG H, TANG A, GENG P, ZHANG H. 2015. Meta-analysis of chemotherapy and dendritic cells with cytokine-induced killer cells in the treatment of non-small-cell lung cancer. *Int J Clin Exp Med.* 8(8):14527-37
- ZHOU CL, LiU DL, Li J. 2016. Chemotherapy plus dendritic cells co-cultured with cytokine-induced killer cells versus chemotherapy alone to treat advanced non-small-cell lung cancer: a meta-analysis. *Oncotarget.* 7(52):86500-86510
- ZHOU J. 2014. Advances and Prospects in Cancer Immunotherapy. *NewJournal of Science.* 1-13
- ZHOU L. J. AND TEDDER T. F. 1996. CD14 blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83 dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA.* 1993, 2588-2592
- ZHOU L. J., TEDDER F. T. 1995. Human blood dendritic cells selectively express CD83, a member of the immunoglobulin superfamily. *Journal of Immunology.* 154,3821-3835
- ZHU Y, ZHANG H, LI Y. 2013. Efficacy of postoperative adjuvant transfusion of cytokine-induced killer cells combined with chemotherapy in patients with colorectal cancer. *Cancer Immunol Immunother.* 62(10):1629-1635
- ZOLL B, LEFTEROVA P, CSÍPAI M, FİNKE S, TROJANECK B, EBERT O. 1998. Generation of cytokine-induced killer cells using exogenous interleukin-2, -7 or -12. *Cancer Immunol Immunother.* 47(4):221-6
- ZOLL B, LEFTEROVA P, EBERT O, HUHN D, VON RUECKER A, SCHMIDT-WOLF IG. 2000. Modulation of cell surface markers on NK-like T lymphocytes by using IL-2, IL-7 or IL-12 in vitro stimulation. *Cytokine.* 12(9):1385-90

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı-Soyadı: Gülistan ÖNCÜ

Doğum Yeri: Gemlik/BURSA

Doğum Tarihi: 07.02.1994

Uyruk: Türkiye Cumhuriyeti

E-mail: glstn.oncu@gmail.com

Eğitim Düzeyi

Yüksek Lisans:

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

Lisans:

Bartın Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü (2012-2016)
Lodz Üniversitesi (Polonya)- ERASMUS Programı (02.2014/06.2014)

Lise:

Tekirdağ Namık Kemal Anadolu Lisesi (2008-2012)

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler:

Öncü G., Yılmaz B., “Kanser Tedavisinde DH Aşıları ve DH – CIK Kombine Aşıların Başarı Oranlarının Değerlendirilmesi”, Trakya Üniversiteler Birliği II. Lisansüstü Öğrenci Kongresi, s.167, Edirne 2017 (Sözlü Sunum).

Yılmaz B., **Öncü G.**, “Kanserde Tamamlayıcı Tedavi: Fitoterapi”, Trakya Üniversiteler Birliği II. Lisansüstü Öğrenci Kongresi, s.168, Edirne 2017 (Sözlü Sunum).

Projeler

Adjuvan Kullanarak Dendritik Hücre- Sitokin ile Uyarılmış Öldürücü Hücre Kombine Aşıların Etkinliğinin Artırılması, BAP, NKUBAP.02.YL.17.126, 2018.

EKLER

EK 1- Etik Kurul Onayı



T.C
NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu



Sayı: 2017/

28/09/2017

Sayın Doç. Dr. Dumrul GÜLEN

Namık Kemal Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kuruluna sunmuş olduğunuz “Adjuvan Kullanarak Dendritik Hücre (DH) – Sitokin İle Uyarılmış Öldürücü Hücre (CIK) Kombine Aşıların Etkinliğinin Artırılması” başlıklı ve 2017/78/08/02 nolu araştırmanız incelenmiş olup, yürütülmesine etik açıdan herhangi bir sakınca olmadığına oybirliği/oyçokluğu ile karar verilmiştir.

NKÜ GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
ÇALIŞMA ESASI	Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu

Unvanı/Adı/Soyadı	Araştırma ile ilişki		Katılım		İmza
	Var	Yok	Evet	Hayır	
Prof. Dr. Ebru YEŞİLDAĞ	V <input type="checkbox"/>	Y <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. M. Metin DONMA	V <input type="checkbox"/>	Y <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Ali Rıza KIZILER	V <input type="checkbox"/>	Y <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Nicel TAŞDEMİR	V <input type="checkbox"/>	Y <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Savaş GÜZEL	V <input type="checkbox"/>	Y <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Yakup ALBAYRAK	V <input type="checkbox"/>	Y <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Gündüz YÜMÜN	V <input type="checkbox"/>	Y <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Berna ERDAL YILDIRIM	V <input type="checkbox"/>	Y <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Birol TOPÇU	V <input type="checkbox"/>	Y <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Demet ÖZKARAMANLI GÜR	V <input type="checkbox"/>	Y <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Sonat Pınar KARA	V <input type="checkbox"/>	Y <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Ufuk COŞKUNKAN	V <input type="checkbox"/>	Y <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Zeynep KURTULUŞ TOSUN	V <input type="checkbox"/>	Y <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	

Başkanın Unvanı /Adı/ Soyadı /İmza: Prof. Dr. Ebru YEŞİLDAĞ

Namık Kemal Mah. Kampüs Cad. No:1 59030
Telefon: (0 282) 250 59 04 - Faks: (0 282) 250 99 28
Elektronik Ağ: <http://tip.nku.edu.tr>

Ayrıntılı Bilgi İçin: Engin Deniz RENÇBER
e- posta: edrencber@nku.edu.tr

EK 2- Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu**ÇALIŞMANIN ADI****Adjuvan Kullanarak Dendritik Hücre- Sitokin ile Uyarılmış Öldürücü Hücre
Kombine Aşıların Etkinliğinin Artırılması****BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU****Sorumlu Araştırmacı: Doç. Dr. Dumrul GÜLEN**

Araştırmanın Amacı: Bireylerin kan örneklerinden belirli bağışıklık hücrelerinin elde edilmesi ile gelecekte kanser tedavisinde kullanılacak kişiye özgü aşı elde edilmesinin ilk basamağı olan laboratuvar deneyini gerçekleştirmektir.

Araştırmada İzlenecek Yöntem: Kan örneği alınıp hücreleri ayrıştırılacak ve deneyde kullanılacaktır.

Bu araştırmanın protokolü, Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi etik değerlendirme komitesi tarafından değerlendirilmiş ve onaylanmıştır. Helsinki beyannamesinde ortaya konan etik prensiplere riayet edilecektir. Bu formun bir kopyası size saklamanız için verilecektir.

Alternatif Tedavi veya Girişimler: -

Araştırma Sırasında Karşılaşılabilecek Riskler: -

Araştırma İlacının Olası Yan Etkileri: -

Araştırma Süresince 24 Saat Ulaşılabilecek Kişi Adı / Soyadı / Telefonu:

Doç. Dr. Dumrul GÜLEN

05xx xxx xx xx

Bu araştırmaya katılmanız tamamen gizli tutulacaktır. Sizin araştırmaya katılmanıza ilişkin bilgisi olan tek kişi doktorunuz olacaktır. Doktorunuza verdiğiniz bilgiler kadar klinik bilgilerde gizli tutulacaktır. Bununla birlikte yetkili kurumların mufettişleri araştırmanın geçerli yasalar ve sağlık makamları mevzuatına uygun olarak yurütulmesini garantilemek üzere araştırmaya ilişkin kayıtlarınızı incelemekle yükümlü olabilirler. Kayıtlarımızdaki bilgiler sadece bu araştırma amacıyla ve bu araştırmayı izleyen yayınlar için kullanılacaktır. Her durumda kimliğiniz saklanacaktır. Her durumda kimliğiniz diğer amaçlar için kullanılmayacak veya üçüncü şahıslara açıklanmayacaktır. Muayeneleriniz ve diğer işlemler için sizden ücret alınmayacaktır.

Yukarıda yer alan ve araştırmaya başlamadan önce gönüllüye verilmesi gereken bilgileri okudum ve sözlü olarak dinledim. Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formundaki tüm açıklamaları okudum. Bana, yukarıda konusu ve amacı belirtilen araştırma ile ilgili yazılı ve sözlü açıklama aşağıda adı belirtilen hekim tarafından yapıldı. Aklıma gelen tüm soruları araştırıcıya sordum, yazılı ve sözlü olarak bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Çalışmaya katılmayı isteyip istemediğime karar vermem için bana yeterli zaman tanındı. Araştırmaya gönüllü olarak katıldığımı, istediğim zaman gerekçeli veya gerekçesiz olarak araştırmadan ayrılabilceğimi ve kendi isteğime bakılmaksızın araştırmacı tarafından araştırma dışı bırakılabileceğimi biliyorum.

Söz konusu araştırmaya, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın kendi rızamla katılmayı kabul ediyorum, bana ait tıbbi bilgilerin gözden geçirilmesi, transfer edilmesi ve işlenmesi konusunda araştırma yurütücüsüne yetki veriyorum ve söz konusu araştırmaya ilişkin bana yapılan katılım davetini hiçbir zorlama ve baskı olmaksızın büyük bir gönüllülük içerisinde kabul ediyorum.

Gönüllünün Adı / Soyadı / İmzası / Tarih

Açıklamaları Yapan Kişinin Adı / Soyadı / İmzası / Tarih

Gerekilyorsa Olur İşlemine Tanık Olan Kişinin Adı / Soyadı / İmzası / Tarih

Gerekilyorsa Yasal Temsilcinin Adı / Soyadı / İmzası / Tarih