

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

**SOLID VE HEMATOLOJİK NEOPLAZİLERDE DOĞAL**  
**ÖLDÜRÜCÜ (NK) HÜCRE AKTİVİTESİNİN**  
**DEĞERLENDİRİLMESİ**

**MELİSE YILMAZ**  
**1168209105**

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

**DANIŞMAN**  
**Prof. Dr. BURHAN TURGUT**

**Tez No: 2019 / 55**

**2019 – TEKİRDAĞ**

**İÇİNDEKİLER**

İÇİNDEKİLER.....	i
ÇİZELGE DİZİNİ .....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	v
KISALTMALAR .....	vi
TEŞEKKÜRLER.....	vii
ÖZET .....	ix
ABSTRACT .....	x
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. İmmün Sistem ve Kansere İlişkisi.....	3
2.1.1. İmmün Sistem .....	3
2.1.2. Tümör.....	3
2.1.3. Tümör Oluşum Mekanizmaları.....	4
2.1.4. Tümör Oluşumunun Moleküler Mekanizması.....	4
2.1.5. Kanserde İmmün Gözetim .....	5
2.1.6. Kanser İmmün Düzenlenmesi.....	6
2.1.7. Tümör Antijenleri .....	9
2.1.8. Tümörlere Karşı İmmün Sistemin Efektör Mekanizmaları .....	9
2.1.8.1. Makrofajlar .....	9
2.1.8.2. NK Hücreler .....	10
2.1.8.3. Dendritik Hücreler .....	10
2.1.8.4. T Lenfositler .....	11
2.1.8.5. B Lenfositler .....	11
2.2. İmmünoterapi.....	12
2.2.1. Kanser İmmünoterapisinin Tarihsel Gelişimi.....	12
2.2.2. Kanser immünoterapisinde kullanılan tedavi yöntemleri .....	14

2.2.2.1. Monoklonal antikorlar .....	14
2.2.2.2. Adoptif İmmünoterapi .....	15
2.2.2.3. Aşılar .....	15
2.2.2.4. Sitokinler .....	16
2.2.2.5. İmmün Sistemi Destekleyici Tedaviler .....	17
2.3. Doğal Öldürücü (NK) Hücreler .....	18
2.3.1. NK Hücrelerinin Gelişimi.....	18
2.3.2. NK Hücrelerinin Fonksiyonları .....	19
2.3.2.1. Sitotoksosite .....	19
2.3.2.2. Sitokin ve kemokin sekresyonu.....	23
2.3.2.3. Temasa bağlı hücre eş uyarımı .....	23
2.3.3. NKT Hücreler .....	23
2.3.4. NKG2D Hücre Reseptörleri.....	25
2.3.4.1. NKG2D ligandlarının kanser immünoterapisindeki rolleri.....	26
3. MATERYAL ve METOT .....	28
3.1. Kullanılan Materyaller.....	28
3.1.1. Kullanılan Kimyasallar .....	28
3.1.2. Kullanılan Cihazlar .....	28
3.2. Kullanılan Yöntemler .....	29
3.2.1. Lösemi Hücre Hattı ve Hücre Kültürü.....	29
3.2.1.1. K562 Hücre Hattının Özellikleri .....	29
3.2.1.2. K562 Hücre Hattında Kullanılan Besiyeri ve Kültür İşlemleri .....	30
3.2.1.3. K562 Hücre Hattının Çözdürülmesi.....	30
3.2.1.4. K562 Hücre Hattının Pasajlanması .....	30
3.2.2. Örneklerin temin edilmesi, hazırlanması, immünofenotipleme ve hücre kültür çalışmaları.....	31
3.2.2.1. Örneklerin Temin Edilmesi .....	31

3.2.2.2. Akım sitometrisi ile immünofenotipik analiz.....	31
3.2.2.3. Ficoll-Hypaque ile PBMC'lerin İzole Edilmesi .....	31
3.2.3. Hücre canlılık testi .....	32
3.2.4. Kullanılan kimyasalların uygun konsantrasyonlarda hazırlanması .....	32
3.2.4.1. DİO konsantrasyonu hazırlama .....	32
3.2.4.2. PI konsantrasyonu hazırlama.....	33
3.2.4.3. Ionomycin konsantrasyonu hazırlama.....	33
3.2.4.4. PMA Konsantrasyonu Hazırlama.....	33
3.2.4.5. Monensin Konsantrasyonunun Hazırlanması.....	34
3.3. NK Hücre Aktivitesi İçin Kullanılan Yöntemler.....	34
3.3.1. DİO / PI yöntemi ile NK hücre aktivitesinin değerlendirilmesi .....	34
3.3.1.1. DIO-PI yöntemi ile NK hücre aktivitesinin akım sitometrisinde ölçülmesi	35
3.3.2. PMA /Ionomycin yöntemi ile NK Hücre aktivitesinin değerlendirilmesi	35
3.3.2.1. PMA/ Ionomycin yöntemi ile NK hücre aktivitesinin akım sitometrisinde ölçülmesi.....	35
3.4. İstatistiksel Analiz .....	36
4. BULGULAR .....	37
4.1. Hasta ve Kontrol Gruplarının Demografik ve Klinik Özellikleri.....	37
4.2. Akım Sitometrisi ile NK Hücrelerinin Belirlenmesi .....	39
4.3. Hücre Canlılık Testi.....	40
4.4. NK Hücre Aktivitesinin Ölçülmesi .....	43
4.4.1. DİO-PI Yöntemi .....	43
4.5. CD107a ekspresyon yöntemi.....	44
5. TARTIŞMA ve SONUÇ .....	49
KAYNAKLAR.....	54
ÖZGEÇMİŞ.....	60
EKLER .....	62



## ÇİZELGE DİZİNİ

<b>Çizelge 1</b> Kanser Tedavisinde Kullanılan Bazı Temel Monoklonal Antikorlar (Şakalar ve ark., 2013; Han J, 2010). .....	15
<b>Çizelge 2</b> Hasta grupları ve kontrol grubunun yaş ve cinsiyetleri ve hasta gruplarının rutin laboratuvar bulguları .....	37
<b>Çizelge 3</b> Myelom hastalarının hastalık ve tedavi özellikleri .....	38
<b>Çizelge 4</b> Meme Ca'lı hastaların hastalık evresi .....	38
<b>Çizelge 5</b> Akciğer Ca'lı hastaların hastalık evresi.....	38
<b>Çizelge 6</b> Hastaların laboratuvar sonuçları .....	38
<b>Çizelge 7</b> Canlı hücre sayılarının inkübasyona bağlı % değişimleri oranları .....	41
<b>Çizelge 8</b> Hasta grupları ve kontrol grubu arasındaki NK hücre aktivite ve CD107a ekspresyon analizi .....	47
<b>Çizelge 9</b> Myelom hastalarında hastalık durumu ve alınan tedavi ile NK hücre aktivitesi arasındaki ilişki .....	47
<b>Çizelge 10</b> Akciğer Ca'lı hastaların hastalık evresi ile NK hücre aktivitesi arasındaki ilişki .	48
<b>Çizelge 11</b> Meme Ca'lı hastaların hastalık evresi ile NK hücre aktivitesi arasındaki ilişki.....	48

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Kanser Oluşumunda İmmün Gözetim Etkinliği (Chimal-Ramirez ve ark., 2013) .....	6
Şekil 2.2 Kanserin immün düzenlenmesinin üç fazı (Şahin, 2014) .....	8
Şekil 2.3 Çapraz sunum (Abbas ve ark., 2015).....	11
Şekil 2.4 Sitokinlerin biyolojik etkileri (Judith, Owen, Jenni Punt, Sharon ve Stranford 2007) .....	16
Şekil 2.5 CD56parlak CD16soluk ve CD56soluk CD16parlak işlevleri (Seydel ve Aksoy 2011).....	19
Şekil 2.6 NK hücre cevabının düzenlenmesi (Seydel ve Aksoy, 2011). .....	20
Şekil 2.7 NK hücre reseptörleri (Seydel ve Aksoy, 2011).....	22
Şekil 2.8 İnhibitör ve Aktivatör reseptörler (Deniz,2007). .....	22
Şekil 2.9 NK, T ve NKT hücrelerinin ortak ve farklı özellikleri (Deniz,2007).....	24
Şekil 2.10 NKT hücrelerin fonksiyonları (Deniz, 2007).....	25
Şekil 2.11 MIC, DAP10 ve NKG2D adaptör protein ilişkisi (Seydel ve Aksoy,2011).....	26
Şekil 4.1 Akım sitometrisi ile NK hücrelerin T lenfositlerin belirlenmesi .....	40
Şekil 4.2 K562 hücre hattının mikroskopik görüntüsü (inverted mikroskop büyütme: 10X) .	41
Şekil 4.3 Multiple Myelom sahip bir hastanın PBMC'lerin inverted mikroskopta görüntüsü (Büyütme: 10X).....	42
Şekil 4.4 Meme Ca'lı hastaya ait olan PBMC'lerin inverted mikroskopta görüntüsü (Büyütme: 10X).....	42
Şekil 4.5 Akciğer Ca'lı hastanın inverted mikroskopta PBMC'lerin görüntüsü (Büyütme:10x) .....	43
Şekil 4.6 DİO- PI yöntemi ile NK hücre aktivitesinin ölçülmesi .....	44
Şekil 4.7 PMA-Ionomycin ile NK hücre aktivitesi (CD107a ekspresyon yüzdesi).....	45
Şekil 4.8 Uyarısız NK hücre aktivitesi ve CD107a ekspresyonu.....	46
Şekil 4.9 K562 ile NK hücre aktivitesi ve CD107a ekspresyonu .....	46

**KISALTMALAR**

**µg** : Mikrogram

**µl** : Mikrolitre

**ADCC**: Antikor Bağımlı Hücre Aracılı Sitotoksosite

**Anti** : Antikor

**APC /ASH** : Antijen Sunucu Hücre

**CD**: Cluster of Differentiation

**CD8+T**: Sitotoksik T lenfositleri

**CDC**: Kompleman Bağımlı Sitotoksosite

**CM**: Complete Medium

**CTL** : Sitotoksik T Lenfosit

**DAPI10**: DNAX Activating Protein of 10 kDa (DNAX Aktive Edici Protein 10 kDa)

**DH** : Dendritik Hücre

**DİO**: Diocetadecyloxacarbocyanine perchlorate

**DMSO**: Dimetil Sülfoksit

**DR** : HLA Antijen Çifti

**DTH** : Gecikmeli Tip Aşırı Duyarlılık Testi

**EGFR**: Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü

**FBS**: Fetal Bovine Serum

**Fc** : Antikorum gövde kısmı

**GM-CSF** : Granülosit-Makrofaj Koloni Uyarıcı Faktör

**GPI**: Glikozil Fosfat İdilinozitol

**HLA** : Doku Uyumu

**HLA**: İnsan Lökosit Antijenleri)

**ICAM**: Gecikmeli Tip Aşırı Duyarlılık Testi

**IFN** : İnterferon

**Ig** : İmmünoglobulin

**IL** : İnterlökin

**IMiD**: İmmün Modülatör İlaç

**ITAM**: İmmünoresptör Tirozin Bazlı Aktivasyon Reseptörü

**ITiM**: İmmünoresptör Tirozin Bazlı İnhibisyon Reseptörü

**KAR**: Katil Aktivatör Reseptör



- KIR:** Katil İnhibitör Reseptör
- LAMP-1:** Lizozomal İlişkili Membran Proteini
- LFA** : T Hücre Reseptörü
- mAb** : Monoklonal Antikor
- MAC:** Mebran Saldırı Mekanizması
- MAF:** Makrofaj Aktive Edici Faktör
- MHC** : Majör Histokompabilite Kompleksi
- ml** : Mililitre
- mm** : Milimetre
- ng** : Nanogram
- NK** : Doğal Öldürücü Hücre
- NKG2:** Natural Killer Group 2
- NKR:** Natural Killer Reseptör
- P** : İstatistiksel Anlam
- PBMC:** Periferik Kan Mononükleer Hücreleri
- PBMC:** Periferik Kan Mononükleer Hücre
- PBS:** Phosphate Buffered Saline
- PE** : Fikoeritrin
- PGE2** : Prostaglandin E2
- PI:** Propidum Iodide
- PMA:** Phorbol 12-myristate 13-acetate
- PTK:** Protein Tirozin Kinaz
- RPMI:** Roswell Park Memorial Institute (RPMI)
- TCR** : T Hücre Reseptörü
- TCR** : T Hücre Reseptörü
- TGF** : Tümör Büyüme Faktörü
- Th** : Yardımcı T hücreleri
- TLR** : Toll Benzeri Reseptör
- TNF** : Tümör Nekroz Faktör
- U** : Unit
- $\alpha$**  : Alfa
- $\beta$**  : Beta
- $\gamma$**  : Gama

## TEŞEKKÜRLER

Yüksek Lisans eğitimim süresince bilgi ve desteğini esirgemeyen, bana bu konuda çalışma olanağı sağlayan, tez çalışmamın her aşamasında yol gösterici olan danışman hocam **Sayın Prof. Dr. Burhan TURGUT'a**, çalışmam boyunca bana hep destek olan, bilgilerini benimle paylaşan, çalışmam için gerekli hasta gruplarının temin edilmesinde bana yardımcı olan, Sayın Hocalarım **Doç. Dr. Tarkan YETİŞYİĞİT'e**, **Dr. Öğr. Üyesi Erdoğan Selçuk ŞEBER'e** ve **Arş. Gör. Dr. Okan AVCI'ya**

Laboratuvar çalışmalarım boyunca yanımda olan, gerektiği zaman bana yardımcı olan, bilgilerini benimle paylaşan, beni sürekli motive eden ve desteklerini benden hiç esirgemeyen **Öznur GÜNGÖR'e**, **Sinem BULUŞ'a**, **Hülya DÖNMEZ'e** ve **Pınar NACAĞ'a** tez çalışmamın yazım aşamasında bana destek olan **Dr. Öğr. Üyesi Sayın Halil Nusret BULUŞ'a**.

Özellikle hayatım boyunca her zaman yanımda olan, hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan canım aileme ve hep yanımda olan tüm arkadaşlarıma

Sonsuz

Teşekkürlerimi

sunarım.

## ÖZET

Son yıllarda yapılan çalışmalarda immünoterapik ajanların güncel kanser tedavilerinde kullanımları umut verici bir yöntem olmuştur. İmmün sistem kansere karşı etkinliğini bir bütün olarak gösterse de kanser hücrelerinin değişik mekanizmalarla yok edilmesinde, bazı immün sistem hücreleri ön plana çıkmaktadır. Bu hücrelerden biri olan doğal öldürücü (NK) hücreler virüs ile enfekte olmuş hücreleri ve tümör hücrelerini direkt olarak öldürebilme yeteneğine sahiptir. Kanser hastalarında yapılan çalışmalarda NK hücrelerinin fonksiyonlarında değişimlerin olabileceğini göstermiştir. NK hücrelerinin fonksiyonlarındaki bu değişimler bu hücrelerinin değişik kanser tiplerinin prognozunda ve tedavi yanıtlarında önemli olduğunu düşündürmektedir. Bu bilgilerden yola çıkarak çalışmamızda NK hücre aktivitesinin kanser tipleri ve evresi ile ilişkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmamızda; akciğer kanseri, meme kanseri, hematolojik neoplazmlı hastalar (multiple myelom) ve sağlıklı gönüllüler olmak üzere üç hasta bir kontrol grubu oluşturuldu. Hastalardan ve sağlıklı deneklerden ortalama 5 ml kan heparinli tüplere alındı. Alınan kan örneklerinde immüfeneotipleme ve NK hücre aktivitesi ölçümü yapıldı. İmmüfeneotiplemede CD3-FITC, CD16-PE CD56-PC5 ve CD45-KO'dan oluşan monoklonal antikorlar kullanıldı. NK aktivitesi ölçümü için alınan kan örneklerinden ficoll-hypaque yöntemi ile periferik kan mononükleer hücreler (PBMC) elde edildi. İki ayrı yöntemle NK hücre aktivitesi ölçüldü. Birinci yöntemde NK hücrelerini K562 lösemi hücrelerini öldürme yüzdesi (Dio-PI yöntemi), ikinci yöntemde uyarılan NK hücrelerinin üzerindeki CD107a ekspresyonu ölçüldü.

Çalışmamızda kanser türleri arasında ve kanser türleri ile sağlıklı kontroller arasında NK hücre yüzdesi ve iki ayrı yöntem ile bakılan NK hücre aktivitesi açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilememiştir. Ancak özellikle CD107a ekspresyonu ile değerlendirilen NK hücre aktivitesi akciğer kanserli hastalarda oldukça yüksek tespit edildi. NK hücre yüzdesi multiple myelomlu hastalarda diğer gruplara göre yüksek olmasına rağmen diğer iki kanser grubuna göre aktiviteleri daha düşük saptandı. Gruplara arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmaması gruplardaki denek sayısının azlığı ve dağılımın heterojen oluşu ile ilişkili olduğu düşünüldü.

**Anahtar Kelimeler:** Kanser, Doğal Öldürücü Hücreler, CD107a,K562

## ABSTRACT

In recent years, the use of immunotherapeutic agents in current cancer therapies has been a promising method. Although the immune system shows its effectiveness against cancer as a whole, some immune system cells come to the forefront in the destruction of cancer cells by different mechanisms. Natural killer (NK) cells, one of these cells, have the ability to directly kill virus infected cells and tumor cells.

It has been shown that changes in the functions of NK cells may be observed in cancer patients. These changes in the functions of NK cells suggest that these cells are important in the prognosis and treatment responses of different types of cancer. In this study, we aimed to investigate the relationship between NK cell activity and cancer types and stage.

In our study; Three patients (lung cancer, breast cancer, hematological neoplasm) and healthy volunteers were included in the study. An average of 5 ml blood and heparin tubes were obtained from patients and healthy subjects. Immunophenotyping and NK cell activity were measured in blood samples. In immunophenotyping, monoclonal antibodies composed of CD3-FITC, CD16-PE CD56-PC5 and CD45-KO were used. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were obtained from the blood samples taken for measurement of NK activity by the ficoll-hypaque method. NK cell activity was measured by two separate methods. The first method involves the killing of NK cells K562 leukemia cells (Dio-PI method), n the second method, expression of CD107a on the stimulated NK cells was measured.

In our study, no statistically significant difference was found between the types of cancer and the types of cancer and NK cell activity by using two different methods. However, NK cell activity, which was evaluated by CD107a expression, was found to be quite high in lung cancer patients. NK cell activity was significantly higher in lung cancer patients. NK cell percentage was higher in patients with multiple myeloma than in the other groups, but the activities were lower than those in the other two cancer groups. There were no statistically significant differences between the groups and it was thought that the number of subjects in the groups was low and the distribution was heterogeneous. The results of our study need to be confirmed by working with larger and homogenous patient and control groups.

**Key Words:** Cancer, Natural Killer Cell, CD107a, K562

## 1. GİRİŞ

Kanser, normal özelliklerini kaybetmiş bir takım hücrelerin anormal bir şekilde artışı ve bunların vücuda yayılması ile meydana gelmektedir. Kanser hücrelerinin oluşumu genellikle intrinsik veya eksojen faktörlerden kaynaklanan gen mutasyonlarının bir sonucudur. Giderek dünya çapında ciddi bir sorun haline gelen kanserin gelecekte de artarak bu konumunu sürdürmesi beklenmektedir (Zhou, 2014).

Kanser tedavisinde, kemoterapi, cerrahi yöntemler ve radyoterapi ile her ne kadar tümörlerin yok edilmesinde belli bir başarı sağlansa bile, bazı kanserli hücre kalıntıları ve metastaza bağlı hastalık tekrarları önemli bir sorun olarak varlığını sürdürmektedir. Bunun dışında kemoterapi ve radyoterapinin kanserli hücrelerin yanında vücudun sağlıklı hücrelerine verdiği zarar da ayrı bir sorun olarak durmaktadır. Bütün bu nedenlerden dolayı, bireysel özelliğe sahip, tümöre spesifik tedavilere olan ilgi giderek artmaktadır (Wayteck, 2013).

İmmün sistem ile kanser arasındaki ilişki son yıllarda daha bilinir hale gelmiştir. İmmün sistem hücrelerinin kanser üzerindeki etkileri üzerine çok sayıda çalışmalar mevcuttur. Her ne kadar kanser hücrelerinin kontrolünde CD8 T Lenfositleri (Sitotoksik T Lenfositler) ön planda rol aldığı düşünülmekte ise son yıllarda Doğal Öldürücü (NK) hücrelerinde kanser kontrolünde önemli rol oynadığı yönünde yayınlar mevcuttur.

Doğal öldürücü (NK) hücreler sadece viral ve bakteriyel enfeksiyonlara karşı ilk savunma basamağında değil, aynı zamanda malign hücrelerin immün gözetiminde de önemli bir role sahiptir. Bu nedenle NK hücre sitotoksitesi bağışıklık fonksiyonunun en önemli göstergelerinden biridir. Tüm NK hücreleri doğrudan kanser hücreleri ya da virüs bulaşmış hücrelerle savaşma yeteneğine sahip değildir. Fakat aktivitesi yüksek olan NK hücreleri bu savaşı gerçekleştirebilir. NK hücrelerinin vücuttaki sayılarının çokluğundan ziyade vücutta bulunan NK hücrelerinin çoğunluğunun aktif olması güçlü bağışıklık sistemi için oldukça önemlidir.

NK hücrelerinin aktivitesi değişik yöntemlerle ölçülebilmektedir. Kanser dahil çeşitli hastalıklarla ilgili çalışmalarda NK hücrelerinin aktivasyonunda değişiklikler olduğu gösterilmiştir. Bu durum NK hücrelerinin anormal hücreleri tanıyıp, yok etme yeteneklerinin de azalmasına sebep olmaktadır. Ancak NK

hücrelerinin aktivitelerinin kanser türleri arasındaki farklılığı ve hastalığın evresine göre aktivitesini gösteren çalışmalar literatürde yeterli düzeyde mevcut değildir.

Çalışmamızda çeşitli kanser türlerinde NK hücre aktivitesinin farklı yöntemlerle değerlendirilmesi suretiyle farklı kanserlerde NK aktivitesinin rolünün belirlenmesi amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. İmmün Sistem ve Kanser İlişkisi

#### 2.1.1. İmmün Sistem

Bağışıklık (immünite), hastalara özellikle enfeksiyon hastalıklarına karşı direnç olarak tanımlanır. Enfeksiyonlara karşı savunmayı sağlayan hücreler, dokular ve moleküllerin toplamına immün sistem adı verilir. Bu hücrelerin ve moleküllerin enfeksiyona yol açan mikroorganizmalara karşı eşzamanlı ve düzenli olarak verdikleri tepkiye de immün yanıt denir. (Abbas ve ark. 2015)

İmmün sistem, bir canlıdaki hastalıklara karşı koruma yapan, patojenleri ve tümör hücrelerini tanıyıp, onları yok eden işleyişlerin toplamıdır. Sistem, vücuda giren veya vücutla temasta bulunan her yabancı maddeyi tarar ve onları, canlının sağlıklı vücut hücrelerinden ve dokularından ayırt eder. Vücutta belli aralıklarla ortaya çıkan anormal hücre ve molekülleri saptayıp bunlara yanıt vermek suretiyle kanser gibi hastalıkların gelişmesine engel olmak da immün sisteminin görevlerindedir. (Paul WE. 2003)

#### 2.1.2. Tümör

Genellikle tümör ve kanser terimleri aynı sanılmakta ve birbirlerinin yerine kullanılmaktadır. Tümör ve kanser kelimelerinin aynı anlamlarda kullanılması oldukça yanıltıcıdır. Her tümör kanser değildir. Neoplazinin tıp dilinde olağan kullanımı “tümör” dür. Tümör, vücutta şişkinliklere neden olan neoplastik kitleler için kullanılan bir terimdir.

Onkolojide neoplazmlar “benign” ve “malign” olarak gruplandırılır ve bu ayırım, neoplazmin klinik davranışları ve mikroskobik görünümleri ile yapılmaktadır (Ünal T, 2012).

#### **Benign Tümörler**

İyi huylu tümörler malign olmayan/kanserli olmayan tümörlerdir. İyi huylu bir tümör genellikle lokalizedir ve vücudun diğer bölgelerine yayılmaz. Çoğu benign tümör tedaviye iyi yanıt verir. Bununla birlikte, tedavi edilmediği takdirde, bazı benign tümörler büyüyebilir ve boyutlarından dolayı ciddi hastalıklara neden



olabilirler. İyi huylu tümörler de malign tümörleri taklit edebilir ve bu nedenle bazen tedavi edilirler. ([<http://pathology.jhu.edu/pc/BasicTypes1.php?area=ba>])

### **Malign Tümörler**

Malign tümörler kanserli büyümelerdir. Genellikle tedaviye dirençlidir, vücudun diğer bölgelerine yayılabilir ve çıkarıldıktan sonra bazen tekrarlarlar.

#### **2.1.3. Tümör Oluşum Mekanizmaları**

Normal hücrelerin bölünmeleri kontrol altındadır. Normal hücreler bölünmelerini gerektiği zaman durdurabilirler ve dokularda bulunmaları gerektiği yerde bulunurlar. Kanserli hücrelerin ise bölünmeleri kontrol altında değildir. Buldukları yerden vücudun bir başka bölgesine göç ederler (metastaz) ve canlılıklarını sürdürürler (Aslan, 2010). Monoklonal orjinli olan kanser hücreleri normal hücrelerden farklı fenotipik özellikler gösterirler (Greenberg, 2001).

Malign bir hücreye transformasyonunu gerçekleştiren normal hücre gen değişimlerinin etkisiyle, hücre bölünmesi sırasında meydana gelen mutasyonlarla ve karsinojenlerin etkisiyle çeşitli mekanizmaları etkin etmektedir. Herpesviruslar, retroviruslar, adenoviruslar normal hücrelere onkojenik virüslerin onkogenlerini aktarmasıyla oluşmaktadır (Greenberg, 2001).

Faktörlerdeki bu değişimler normal hücrelerin gen dizilerinde değişikliklere yol açarlar ve tümör süpresör genlerin inaktive olmasına, proto-onkogenlerin ise kansere neden olan onkogenlere dönüşmesine, sebep olurlar. Bu durumda hücre değişime uğrar ve kontrolsüz çoğalır (Aslan, 2010). Hücrelerde meydana gelen mutasyona uğramış proteinler genlerin onkogenlere dönüşmesiyle başlamaktadır. Tümör oluşumunu engelleyen genler tümör süpresör genlerdir ve tümör oluşumunu engelleyen proteinler üretirler fakat bu genlerden birinde genin mutasyona uğraması tümör oluşumuna neden olmaktadır (Dzivenu, 2009).

#### **2.1.4. Tümör Oluşumunun Moleküler Mekanizması**

Normal hücrelerin kendi özelliklerini kaybetmeleri ve gen ekspresyonlarındaki değişikliklere neden olan mutasyonlar sonucu kanser oluşmaktadır (Sutherland, 1999). Hücrelerin anormal bir şekilde çoğalmasıyla meydana gelen mutasyonlar genellikle, somatik hücrelerden meydana gelmekte ve yaşa bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Fakat bazı kişilerin eşey hücrelerinde

genetik mutasyonlar oluşmaktadır. 1997 yılında Kinzler ve Vogelstein tarafından hücrelerin üremesini ya da hücrelerin apoptozundan sorumlu olan genlerdeki mutasyonlar sonucu meydana gelen genler “bekçi genler” olarak adlandırılmıştır (Laloo, 2002).

Hücrelerin çoğalmalarını kontrol eden iki farklı gen tipi vardır. Bu genler; anti-onkogenler (tümör süpresör genler) ve proto-onkogenler’dir (Sutherland, 1999).

**a. Proto-onkogenler:** Hücrelerin çoğalmalarını kontrol eden genler proto-onkogenlerdir. Bu genler farklılaşarak başkalaşım geçirdiklerinde onkogenlere dönüşürler. Hücrelerin çoğalmalarını ise hızlandıran genler onkogenlerdir. Fakat hücrelerde meydana gelen aşırı çoğalma hızı ile kansere neden olabilmektedirler (Willett, Hunter, Colditz, 2000).

**b. Anti-onkogenler (tümör süpresör genler):** Hücre çoğalmasını durduran ya da geciktiren genlerdir. Anti-onkogenler etkisini kaybettiği zaman kanser oluşumuna neden olmaktadır (Willett ve ark. 2000).

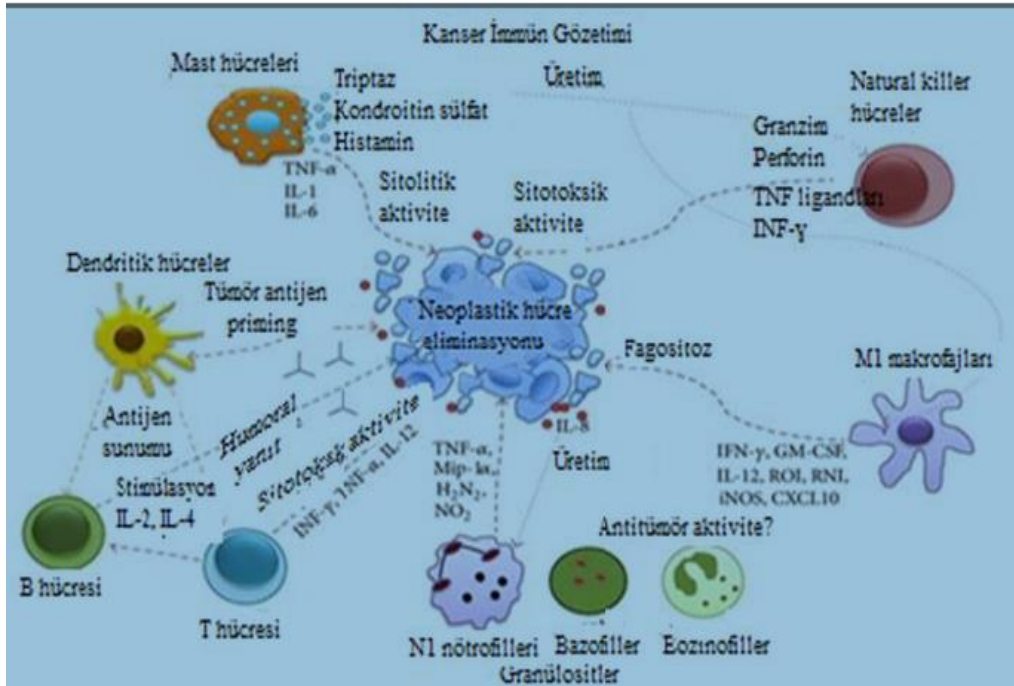
Kanserlerde tümör süpresör genlerdeki mutasyonlar ile fonksiyon kaybının olması veya onkogenlerde mutasyonların fonksiyon kazanması, uygun hücre proliferasyonundaki dengenin bozulmasına sebep olur (Sutherland, 1999). Kanser gelişimi birçok basamağı içinde barındırır, farklı tümör tiplerine göre değişiklik gösteren, tümör süpresör genler ve farklı onkogenlerde gelişen mutasyonların toplamı ile ilişkilidir (Aslan,2010).

Proto-onkogenlerin onkogene dönüşmesi sonucunda yeni fonksiyonlar meydana gelmektedir. Mutasyonlara neden olan bu fonksiyonlar, gen amplifikasyonu (dublikasyon gibi), gen transdüksiyonları, delesyonlar, kromozomal translokasyonlar, rearajmanlar ve kromozomal nokta mutasyonlarıdır. Bu moleküler mekanizmalar transforme proteinler ya da onkoproteinler üretilmektedir (Sutherland, 1999; Laloo, 2002).

### 2.1.5. Kanserde İmmün Gözetim

Edinsel immün sistemin en önemli fonksiyonları, değişime uğramış hücrelerin gelişimlerini engellemek ve yok etmektir. Edinsel immün sistemin bu fonksiyonuna kanserde immün gözetim denilmektedir. Ehrlich ilk kez 1909 yılında yaptığı bir araştırmada insan vücudunda bulunan hücrelerin başkalaşım geçiren hücreler oluşturduğunu ve bu hücreleri immün sistemin etkisiz hale getirip, yok

ettiğini öne sürmesiyle immün gözetim kavramını ortaya koymuştur. Daha sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda ise tümör hücrelerinin immün sistem hücreleri tarafından yok edildiği gösterilmiştir (Şekil 2.1) (Dunn, 2002; Kim, Emi, Tanabe, 2007).



**Şekil 2.1** Kanser Oluşumunda İmmün Gözetim Etkinliği (Chimal-Ramirez ve ark., 2013)

### 2.1.6. Kanser İmmün Düzenlenmesi

İmmün sistemin neoplastik hastalıkları şekillendiren ve kanser oluşumunu engelleyici işlevlerine kanser immün düzenlenmesi denmektedir. İmmün sistem, tümörlerin bazılarının oluşumunu engellerken bazılarını da tepkisiz kalabilir veya tolerans oluşuma sebep olabilmektedir (Dunn, 2002; Kim ve ark., 2007).

Kanserin immün düzenlenmesi, immün sistemin immünojenik tümör hücrelerini elemine ederek tümörlerin somatik evrimine neden olduğu ve konağı tümör gelişiminden koruduğu bir süreçtir. İmmün düzenleme, immünojenik olan tümör antijenleriyle indüklenebilir ve tümör hücrelerinin CD8+ T hücre aracılı eliminasyonunu içermektedir. Bu sürecin sonucunda T hücre aracılı immün yanıtları uyarmayan tümör hücreleri seçilmektedir (Zitvogel, Tesniere, Kroemer, 2006)

Üç farklı fazdan oluşan kanserin immün düzenlenmesine ‘’kanserin üç E’’si adı verilmiştir. Bu adı üç fazın baş harflerinden almıştır (Dunn, Old, Schreiber, 2004).

**Eliminasyon;** immün gözetime karşılık gelmektedir ve dört fazdan oluşur.

**Equilibrium;** Eliminasyon fazından kaçan tümör hücreleri ile immün sistem hücreleri dinamik bir denge içerisindedir.

**Escape;** Tümör hücreleri bu süreçte kontrolsüz bir şekilde çoğalmaya ve hızla diğer dokulara yayılmaya başlar (Şekil 2.2) (Dunn ve ark., 2004).

Eliminasyonun birinci fazında; tümör hücreleri büyümelerini sürdürürler. Anjiyojenik ve stromajenik proteinlerin üretimleri başlamaktadır. Tümör hücrelerinin gelişmesi ile birlikte dokulara göç başlar ve dokularda hasarların meydana gelmesiyle birlikte immün cevap oluşturulur (Grivennikov, Greten, Karin, 2010). İmmün sistemin hücreleri olan doğal öldürücü (NK) hücreler, makrofojlar, dendritik hücreler ve T hücreler burada toplanarak interferon gama (IFN- $\gamma$ ) üretimine başlarlar (Aslan, 2010).

İkinci fazında; IFN- $\gamma$ , apoptotik ve antiproliferatif etkileri ile bazı tümör hücrelerinin yok edilmesine ve etrafındaki dokularda da bazı kemokinlerin salınmasına neden olur. Bu kemokinlerden bazıları yeni damar oluşumlarını engeller ve daha çok tümör hücrelerinin yok edilmesini sağlarlar. IFN- $\gamma$  ile oluşan hücre atıkları yakın lenf düğümlerine dendritik hücreler tarafından taşınır ve artan inflamasyon ile beraber ortama salınan kemokinler daha fazla makrofaj hücrelerinin ve NK hücrelerinin ortama gelmesini sağlarlar (Balkwill, 2004; Tanaka ve ark., 2005).

Üçüncü fazında ise tümörleri yok eden makrofajlar ve NK hücreler birbirleri ile etkileşime girip, birbirlerini uyararak ortamda daha çok IFN- $\gamma$  ve interlökin-12 (IL-12) salınmasına sebep olurlar. Ortamda tümör nekroz edici faktör (TNF)’lerin salınmasıyla beraber perforin, apoptozu arttıran ligand, nitrojen aracılı ve reaktif oksijen açığa çıkar. Bu da daha fazla tümör hücrelerinin yok edilmesine neden olur (Aslan, 2010).

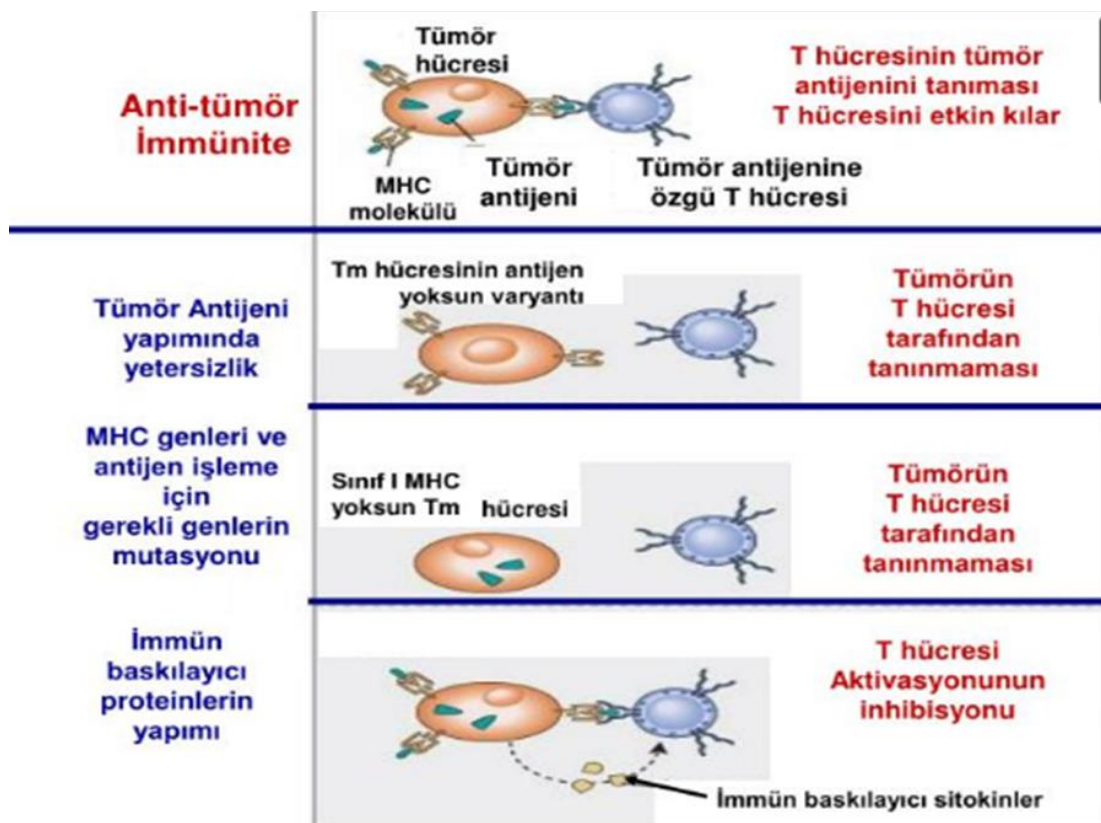
Eliminasyonun dördüncü fazda ise; T helper 1 (CD4+) hücreler ve sitotoksik T hücreler (CD8+) tümörün olduğu alana giderek IFN- $\gamma$  aracılığı ile tümör hücrelerini yok ederler (Dunn, 2002; Kim ve ark. 2007).

Equilibrium (denge) fazında, eliminasyon fazından ve immün sistem hücrelerinden kaçan tümör hücresi denge fazına ulaşır. IFN- $\gamma$  ve lenfositler aracılığı ile normal olmayan ve mutasyona uğrayan tümör hücreleri üzerine baskı oluşturulur. Bu fazda birçok tümör hücresi yok edilebilir fakat kalan tümör hücrelerinde ise saldırılara karşı direnç oluşmaktadır (Dunn, 2002; Kim ve ark. 2007).

Denge süreci üç şekilde sonuçlanabilir:

- (i) immün sistem tümörü yok eder
- (ii) tümör ve immün sistem uzun bir süre hücresel dengede kalır
- (iii) tümör immün sistemden kaçarak ilerler

Escape (kaçış) fazında; denge fazından kaçış fazına ulaşan tümör hücreleri kontrolsüz bir şekilde çoğalmaya başlarlar. Moleküler ve hücrel faktörlerin etkisi ile tümör hücresi immün sistem hücrelerini baskılayarak hızla çoğalıp metastaz yapmaya devam etmektedir. Böylelikle bu durum malign hastalıkların oluşmasına sebep olmaktadır (Dunn, 2002; Kim ve ark. 2007).



**Şekil 2.2** Kanserın immün düzenlenmesinin üç fazı (Şahin, 2014)

### 2.1.7. Tümör Antijenleri

Tümör antijenleri tümör hücrelerine karşı organizmada immün yanıtı uyaran ve tümör hücreleri tarafından üretilmiş maddelerdir. Tümör antijenleri, tümör hücrelerini tanımlamada kullanılır. Tümör antijeni terimi 1990'lı yıllarda özellikle antijen sunumu ve antijen tanımı başta olmak üzere immünoloji bilimindeki önemli gelişmelerin ışığında yeni ve kesin bir nitelik kazanmıştır. Bir maddenin tümör antijeni olabilmesi için immün sistem hücreleri veya normal hücreler tarafından değil tümör hücreleri tarafından tanınması gerekir (Olivera, 1991).

Son yıllarda tümör antijenleri antijenlerin yapısına göre şu şekilde sınıflandırılır.

- (i) Konağa ait ve aşırı ekprese olan gen ürünleri
- (ii) Çoğu normal dokuda sessiz olan gen ürünleri
- (iii) Başkalaşım geçirmiş konak proteinleri
- (iv) Tümör baskılayıcı gen ya da onkogene gen ürünleri
- (v) Glikoproteinler ve glikolipitler
- (vi) Onkofetal proteinler (Aslan,2010).

Bu antijenleri tanımlamaya yönelik çalışmalar bunlara karşı monoklonal antikorlar oluşturmak suretiyle yapılmıştır. Bir tümöre karşı en büyük immün savunma sitotoksik T hücreleri tarafından tanınan tümör antijenlerini ortaya koymak olmuştur. Sitotoksik T hücreleri sınıf I doku uygunluk kompleksi (MHC) moleküllerine bağımlı biçimde ifade edilen sitoplazmik proteinlerden farklılaşan peptidleri tanıyarak immün savunmayı başlatırlar (Chen, Scanlan, Obata ve Old, 1995).

### 2.1.8. Tümörlere Karşı İmmün Sistemin Efektör Mekanizmaları

#### 2.1.8.1. Makrofajlar

Monositler damar dışı dokulara yerleşerek makrofaj adını almışlardır. Makrofajlar immün sistemin en önemli hücrelerinden biri olup, enflamasyonu başlatan ve düzenleyen sitokinler üretirler. (Abbas, Lichtman ve Pillai, 2015). Antijen Sunan Hücre (ASH / APC) olarak görev yapan makrofajlar aynı zamanda tümör hücrelerinin lizisinde rol alan efektör mekanizmaları uyarırlar. Makrofajlar Th1 hücrelerine tümör antijenlerini MHC Sınıf II molekülleri ile sunarlar.

Makrofajlar Th1 hücrelerinden salınan IFN- $\gamma$ , Tümör Nekroz Faktör (TNF), Makrofaj Aktive Edici Faktörler (MAF), İnterlokün 4 (IL-4) ve Granülosit-Makrofaj Koloni Uyarıcı Faktör (GM-CSF) ile aktive olur.

Tümör hücreleri sitolitik olarak NO, TNF, O<sub>2</sub>, proteazlar gibi inflamatuvar mediyatörlerin ortama salınmasıyla makrofajlar ile elimine edilirler. Ayrıca makrofajlar, Antikor Bağımlı Hücre Aracılı Sitotoksikite (ADCC) mekanizmasıyla kompleman reseptörleri ya da Fc reseptörleri yardımı ile antikor tarafından bağlanmış tümör hücrelerini yakalayarak yok ederler (Greenberg, 2001).

### **2.1.8.2. NK Hücreler**

İmmün sistemin diğer önemli hücrelerinden biri olan NK hücreleri, virüs ile enfekte olmuş hücreleri ve bazı tümör hücrelerini tanıır ve direkt olarak yok eder. NK hücrelerini diğer doğal immün sistemden hücrelerinden ayıran en önemli özelliği hafızalarının olmamasıdır. Bu yüzden tümör hücrelerinin MHC moleküllerine bağlanmazlar ve MHC Sınıf I molekülleri olmayan tümör hücrelerini tanırlar. NK hücreleri tümör hücrelerinin yüzeyindeki Fas reseptörü ile NK hücrelerinin yüzeyindeki Fas Ligantının bağlanmasıyla aktive olurlar ve granül ekzositozu gerçekleşir. (Greenberg, 2001).

### **2.1.8.3. Dendritik Hücreler**

Dendritik hücreler (DH) testis, göz ve beyin dışındaki tüm dokularda bulunan ve immün sistemin en önemli ASH'lerinden biridir. Dendritik hücreler farklılaşmamış T lenfositleri uyararak primer immün yanıtın oluşmasına neden olurlar. DH'ler bu fonksiyonu yerine getirebilmek için antijenleri yakalar, işler ve onlara uygun moleküller ile birlikte hücre yüzeyine sunarlar. B lenfositlerin fonksiyonlarında önemli rol oynayan DH'ler humoral immünitinin gelişmesinde de önemli rol oynamaktadırlar. DH'ler bu özelliklerinden dolayı doğal ve edinsel immünitide köprü görevi görmektedirler (Hoffbrand, 1994; Paraskevas, 2004; Ross ve ark., 2003).

DH'lerin 3 önemli fonksiyonu

- (i) T lenfosit aktivasyonu ve antijen sunumu
- (ii) İmmün toleransın oluşumu ve devamı

(iii) B lenfositler aracılığı ile humoral immünitinin oluşturulması (Yeşilyurt ve ark., 2011).

#### 2.1.8.4. T Lenfositler

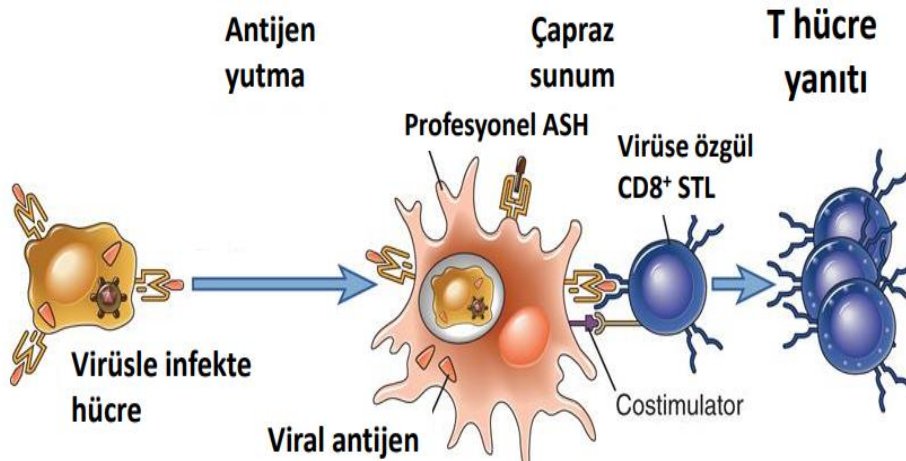
T lenfositler immün sistemin tümör hücreleriyle olan savaşında en önemli yetkinliğe sahip hücrelerinden biridir. T lenfositlerin iki önemli fonksiyonları vardır.

(i) T lenfositler tümör hücrelerine ait antijenleri tanırlar ve immün sistemin diğer mekanizmalarını etkinleştirirler

(ii) T lenfositler tümör hücrelerini direkt olarak öldürürler

ASH'ler aracılığı ile tümör hücrelerine ait antijenler, MHC sınıf II ile CD4+ Th hücrelerine sunulur ve Th hücreler aktive olur. Böylelikle Th2 ya da Th1 hücrelerin cevap oluşturmasını sağlar ve B lenfositleri aktive ederler.

Tümör hücrelerine ait antijenler MHC sınıf I ile CD8+ T lenfositlere sunulur ve Sitotoksik T lenfositler (CTL) aktive olur. CTL'lerin aktive olmasıyla tümör hücreleri direkt öldürülür. Gerçekleşen bu antijen sunum olayına 'çapraz sunum' denilmektedir (Şekil 2.3).Endojen antijenler tümör hücresinin yüzeyinde yer alan MHC sınıf I aracılığı ile direkt olarak CD8+ CTL'lere sunulurlar. Ekzojen antijenler ise ASH'lerin MHC sınıf I molekülleri ile CD8+ CTL'lere sunulmaktadır (Aslan,2010).



Şekil 2.3 Çapraz sunum (Abbas ve ark., 2015)

#### 2.1.8.5. B Lenfositler

B lenfositler antikorların üretilmesinden ve humoral immün sistemden sorumlu olan hücrelerdir (Diker,1998). B lenfositler ekstraselüler matriks, büyüme



faktörleri, stromal hücreler ve sitokinler aracılığı ile gelişmekte ve farklılaşmaktadır (Virella, 2007). B lenfositlerin yüzeylerinde adezyon molekülleri, antijen reseptörleri, MHC molekülleri ve immunoglobulin reseptörleri bulunmaktadır. B lenfositler her antijne özgü olan antikolar oluştururlar (Diker,1998). Tümörlerin yıkıma uğratılmasında 2 mekanizma görev yapmaktadır. Antikor Bağımlı Hücrel Sitotoksiste (ADCC) ve Kompleman Bağımlı Sitotoksiste (CDC). ADCC’ de granüositler, NK hücreler, fagositik hücreler ve makrofajlar hücre yıkımına aracılık ederler. Bu mekanizma CDC’ye kıyasla daha etkilidir. CDC mekanizmasında tümör hücresinin yüzeyinde yer alan Fc reseptörlerine kompleman sistemi sabitleyen antikolar bağlanır. Kompleman sistemin aktive olmasıyla birlikte ‘ Membran Saldırı Mekanizması’ (MAC) tümör hücre yüzeyinde oluşur. Böylelikle tümör hücre yüzeyinde delikler meydana gelir ve hücrelerin yıkımı gerçekleştirilir (Aslan,2010).

## **2.2. İmmünoterapi**

İmmünoterapi temel olarak, bireyin bağışıklık sisteminde yer alan hücrelerin belirli bir kısmının kullanılarak kanser vb. hastalıkların tedavisinde kullanılan spesifik bir yöntemdir. Son yıllarda giderek artan kanser vb. hastalıkların tedavi yöntemleri non-spesifik yöntemlerden spesifik yöntemlere doğru ilerleme göstermektedir. Genellikle cerrahi yöntemler ve radyoterapi ile tümörlerin yok edilmesi sağlansa bile metastasa bağlı olarak hastalığın diğer dokulara yayılması ile hastalığın tekrar nüks etmesi önemli bir sorun olarak varlığını sürdürmektedir. Bu tedavi yöntemleri ile kombine bir şekilde uygulanan kemoterapi her ne kadar kanser hücrelerine zarar verse bile aynı zamanda sağlıklı hücrelere de zarar vermektedir. Bu nedenle immünoterapiye olan ilgi daha da artmaktadır (Wayteck, 2013). İmmünoterapi ile tümöre etki etmesi için dışarıdan verilen maddelerle oluşturulan yanıt, vücudun kendi bağışıklık hücreleri ile de oluşturulabilir ve doğrudan kanserli hücrelere yönlendirilebilir. (Dikmen, 2015).

### **2.2.1. Kanser İmmünoterapisinin Tarihsel Gelişimi**

İlk tümör immünoterapi girişimlerinden biri olan 1866 yılında Wilhem Busch’ın Streptococcus bakterilerinin sebep olduğu bir hastalık sonrasında tümör baskılanması gerçekleştirdiklerini gözlemlemiş ve sonrasında 1868 yılında tekrar

sarkomalı bir hastasını aynı enfeksiyonla enfekte ederek tümör baskılanmasını görmek istemesidir (Cruiel, 2013).

William Bradley Coley 1891 yılında New York Şehri Memorial Hastanesi'nde cerrah olarak görev yaptığı sırada bu araştırma tekrar denemek için canlı ve inaktif *Streptococcus pyogenes* ve *Serratia marcescens* bakterilerinin intratümöral enjeksiyonlarını yapmaya başlamıştır. Coley bu denemesini cerrahi müdahale olanağı olmayan ve malign bir tümöre sahip hastasına uygulamıştır. Coley'in uyguladığı bu tedavi sonrasında hastası tamamen iyileşerek uzun yıllar yaşamanı sürdürmüştür (Eskander ve Tewari, 2015).

İlerleyen yıllarda Coley'in geliştirdiği bu çalışmalar Bacille Calmette-Guérin (BCG)'in kanser immünoterapisinde kullanılmasını sağlamıştır. Kullanılan bu aşı günümüze kadar mesane kanserine karşı hala en etkili tedavi olarak önemini korumaktadır (Parish, 2003).

1900 yılında ilerleyen zamanlarda antikor aracılı pasif immünoterapi olarak sınıflandırılacak olan tedavinin ilk bulgularını tümörlerle etkileşen moleküllerin kanser tedavisinde önemli bir yere sahip olabileceği Paul Ehrlich tarafından belirtilmiştir. Monoklonal antikor üretimi için hibridoma teknolojisi 1975 yılında Cesar Milstein ve George Köhler tarafından geliştirilmiştir. 1982 yılında monoklonal antikorlar insan neoplazisinde başarılı bir şekilde kullanılmış ve 1986 yılında muromonab-CD3 (Orthoclone OKT3)'ü FDA tarafından onaylanmıştır. İlk hümanize monoklonal antikor olan daclizumab (Zenapax)'ın FDA tarafından onaylanması ve rituximab (Rituxan)'ın malignite için onaylanan ilk monoklonal antikor olması 1997 yılında gerçekleşmiştir. 2000 yılında ilk toksin bağlı monoklonal antikor olan gemtuzumab ozogamicin (Mylotarg)'in ve 2002 yılında radyonüklid bağlı ilk monoklonal antikor olan ibritumomab tiuxetan (Zevalin)'in FDA'den onay almıştır (Waldmann, 2003).

Daha sonraki yıllarda kanser immünoterapisi hastanın kendi vücut hücrelerini kullanarak yürütülen çalışmalar ile ilerlemiştir. Son yıllarda teknolojinin büyüyüp gelişmesi ile birlikte tümör antijenlerinin saflaştırılması, tanınması ve lenfosit izolasyonu, sitokinlerle immün sistemin etkinliğinin artırılması, antijene özgü T lenfositlerin üretilmesi tümörlerin immünoterapi ile ortadan kaldırılması için umut verici olmaktadır (Aslan, 2010).

## **2.2.2. Kanser immünoterapisinde kullanılan tedavi yöntemleri**

### **2.2.2.1. Monoklonal antikorlar**

Monoklonal antikorlar, en fazla klinik çalışmaların yapıldığı immünoterapötik yöntemlerin başında gelmektedir (Çizelge 1) (Waldmann, 2003).

Hücre yüzeyindeki reseptörleri ile bağlantı kurarak aktiviteye neden olurlar ve ortaya çıkan sinyalizasyon farklı biçimlerde gelişebilir. Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (EGFR) bağlayan antikor doğal ligandların bağlanmasını engelleyerek reseptörlerin bloke olmasına sebep olurken, Anti CD-20 monoklonal antikor ise apoptozu indükler. Mononükleer hücreler ve lökositler antikorla kaplı hücreleri sitotoksik granüllerini boşaltarak ya da fagositoz yoluyla monoklonal antikorun sahip olduğu Fc reseptörü sayesinde yok edeler. İmmüoglobülin G (Ig G) yapısında olan monoklonal antikorlar klasik kompleman kaskadı yoluyla inflamasyon cevap meydana getirebilirler ve bu moleküle özgül olanlar FcγR olarak tanımlanır.

Oluşan bu inflamasyon cevap ile birlikte fagositik lökositler kemotaktik etki yaparlar bu sayede sekonder sitokinlerin salınmasına neden olarak vasküler geçirgenliği arttırırlar ve monoklonal antikorların hücre içine daha kolay nüfuz etmelerini sağlarlar (Demirelli, 2005).

Ayrıca daha etkili bir tedavi sağlayabilmek için toksinler veya radonüklidlere konjuge halde bulunan monoklonal antikorlar da vardır. Bu antikorlar kanser hücresine hedeflenerek yaydıkları radyasyon veya içerdikleri toksinler ile hedef hücreyi öldürürler (Waldmann, 2003).

**Çizelge 1** Kanser Tedavisinde Kullanılan Bazı Temel Monoklonal Antikorlar (Şakalar ve ark., 2013; Han J, 2010).

Monoklonal Antikor	Hedef Antijen	Antikoru Tipi	Kullanıldığı Başlıca Kanseler
Rituximab	Cluster of Differentiation Antijen 20 (CD20)	Kimerik, IgG1	B hücre non-Hodgkin lenfoma
Trastuzumab	İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2)	Humanize, IgG1	Meme kanseri
Alemtuzumab	Cluster of Differentiation Antijen 52 (CD52)	Humanize, IgG1	B hücre lösemisi
Cetuximab	EGFR	Kimerik, IgG1	Metastatik kolorektal kanser ve skuamöz hücre kanserleri
Bevacizumab	Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü	Humanize, IgG1	Metastatik kolorektal kanser, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri ve over kanseri
Panitumumab	Epidermal büyüme faktörü reseptörü(EGFR)	İnsan, IgG2	Metastatik kolorektal kanser
Ofatumumab	CD20	İnsan, IgG1	Kronik lenfositik lösemi (KLL)
İpililumab	Sitotoksik T lenfosit Antijen-4 (CTLA-4)	İnsan, IgG1	Metastatik melanoma, küçük hücreli ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri

#### 2.2.2.2. Adoptif İmmünoterapi

İmmünolojik olarak aktif olan hücrelerin kanser tedavisi ve tümörlerin oluşumlarının engellenmesi amacı ile hastaya verilmesine adoptif immünoterapi denir (Özet ve ark., 1996). Adoptif immünoterapide T hücreleri kullanılır. Bunlar; tümör spesifik TCR (T hücre reseptörü) ekspresyonu için düzenlenmiş T hücreleri, TIL (tümör infiltre edici lenfositler), antikoru ekstraselüler kısmı ile T hücresi reseptörünün sinyal mekanizmasını bir araya getiren kimerik antijen reseptörü (CAR) ekspresyonu için düzenlenmiş T hücrelerdir (Dikmen, 2015).

#### 2.2.2.3. Aşılar

Tümör immünoterapisinde oldukça ilgi gören aşilar adjuvanlarla beraber verilen rekombinant proteinler şeklinde olabilir. Tümörlerle mücadele etmek için yapılan aşı çalışmalarının en büyük avantajı monoklonal antikoların kanserde kullanılmasına yönelik çalışmalara temel oluşturmasıdır (Barbaros ve Dikmen 2015). Bir diğer yöntem olarak hastanın kendisinden alınan dendritik hücrelerin tümör hücreleri veya antijenleriyle muamele edilerek hastaya uygulanmasıdır. Bu yöntemin asıl amacı; tümör hücrelerine karşı CTL oluşumunu, tümör antijenlerini taşıyan ve tümör antijenlerini sunan dendritik hücrelerin çapraz sunumlarının klasik

yolaklarının taklidiyle sağlanmaktadır. Bir diğer yöntem ise hastanın kendi hücrelerinde ve antijen sunan hücrelerinde T hücre cevabının oluşmasını sağlamaktır (Aslan,2010).

#### 2.2.2.4. Sitokinler

Sitokinler kan hücreleri ve immün sistem hücrelerinin üretimi ve aktivitesinde önemli rol alan, bazı immün sistem hücreleri tarafından üretilen kimyasallardır. Sitokinlerle yapılan tedavilerin en büyük dezavantajları hastada pek çok yan etki gözlemlenmesidir. (Barbaros ve Dikmen 2015).

Sitokinlerin genel özellikleri;

I. Sinir sisteminin ve embriyogenezin gelişmesine yardımcı olurlar  
II. İnflamasyonda rol oynayan hücreleri aktive ederler. Böylelikle hücreler reaksiyon bölgesine doğru ilerler.

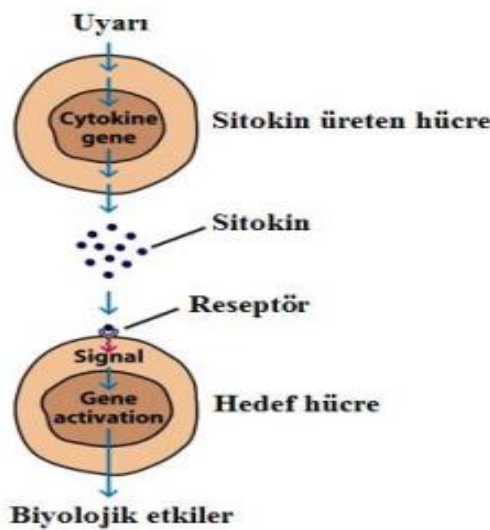
III. Hematopoietik düzenlemeye kemik iliğine etki ederek katılırlar.

IV. Hipofiz hormonlarından bazılarının düzenlenmesine ve salınmasına neden olurlar.

V. Yaraları iyileştirirler

VI. Düşük konsantrasyonlarda baş ağrısı, ateş gibi genel enfeksiyonlara, yüksek konsantrasyonlarda ise ölüme neden olurlar

VII. Lenfoid sistemde dahil olmak üzere hücrelerin farklılaşmalarını ve çoğalmalarını sağlarlar (Şekil 2.4)



Şekil 2.4 Sitokinlerin biyolojik etkileri (Judith, Owen, Jenni Punt, Sharon ve Stranford 2007)

Sitokinlerin çok farklı çeşitleri olmasına rağmen en yaygın olarak kullanılanları interferonlar, interlökinler ve GM-CSF (Granülosit Makrofaj Koloni Uyarıcı Faktör)'dür. İnterlökinlerden en çok kullanılan IL-2 immün sistem hücrelerinin yardımcı olmaktadır. İnterferonlar içerisinde en çok kullanılan IFN- $\alpha$  (İnterferon- $\alpha$ ) ise doğrudan kanser hücrelerinin gelişmesini ya da tümörlerin beslenmesi için gerekli kan damarlarının gelişimini yavaşlatır. GM-CSF ise kemik iliğinin kan hücreleri ve bazı immün sistem hücrelerini daha fazla üretmesini sağlar (American Cancer Society, 2014).

Sitokinler bazı immün sistem hücreleri tarafından üretilen kimyasallardır. İmmün sistem hücreleri ve kan hücrelerinin üretimi ve aktivitesinde önemli role sahiptirler. Sitokinlerle tedavi sırasında hastada pek çok yan etki gözlenir. Pek çok farklı çeşidi olmasına rağmen en yaygın olarak kullanılanları interlökinler, interferonlar ve GM-CSF (Granulocytemacrophage colony-stimulating factor)'dür. İnterlökinler arasında en çok kullanılanı IL-2'dir. İmmün sistem hücrelerinin hızlı bir şekilde bölünmesine yardımcı olur. Tek başına ya da kemoterapi ve IFN- $\alpha$  (İnterferon- $\alpha$ ) gibi diğer sitokinlerle bir arada kullanılabilir. İlerlemiş renal kanser ve metastatik melanoma için onay almıştır. IL-7, IL-12 ve IL-21 gibi sitokinler de kanserde kullanılmak üzere araştırılmaktadır. İnterferonlar içinde IFN- $\alpha$  kanser tedavisinde kullanılmaktadır. IFN- $\alpha$  doğrudan kanser hücrelerinin gelişmesini ya da tümörlerin beslenmesi için gerekli kan damarlarının gelişimini yavaşlatır. Bazı immün sistem hücrelerinin kanser hücreleriyle mücadele yeteneğini artırır. GM-CSF ise kemik iliğinin bazı immün sistem hücreleri ve kan hücrelerinin daha fazla üretmesini sağlar. Sentetik bir türü olan sargramostim (Leukine) kemoterapi sonrası lökosit sayısını artırmak için kullanılır. GM-CSF'nin çeşitli kanser türleri için kullanımına yönelik araştırmalar halen sürmektedir (American Cancer Society, 2014).

#### **2.2.2.5. İmmün Sistemi Destekleyici Tedaviler**

İmmün destekleyici tedaviler tümörün doğrudan yok edilmesinden ziyade, vücudun tümörle mücadelesinde ona destek veren tedavileri içerir. Örneğin lenalidomit, pomalidomit ve talidomit gibi immün sistemi stimüle eden ilaçlar, bazı melanomlarda kullanılan bakteriyel tedaviler, bazı cilt kanserlerinin tedavisinde

tropikal olarak kullanılan Imiquimod örnek olarak verilebilir (American Cancer Society, 2014).

### 2.3. Doğal Öldürücü (NK) Hücreler

#### 2.3.1. NK Hücrelerinin Gelişimi

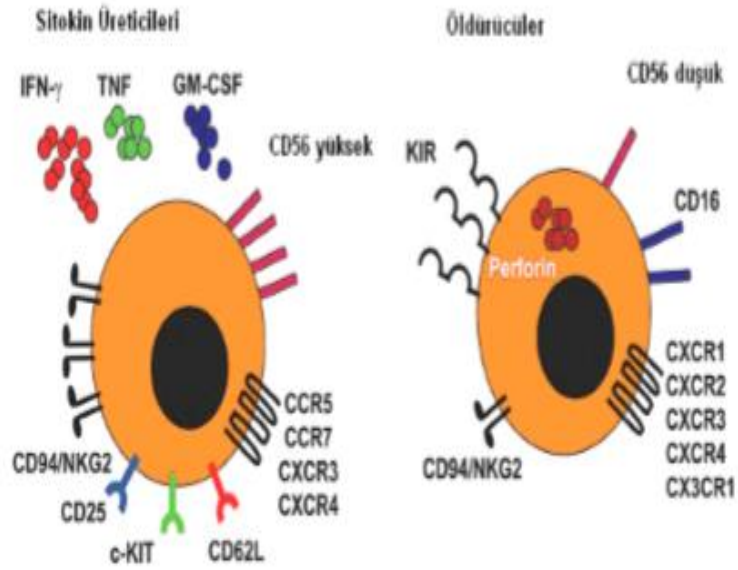
İmmün sistemin en önemli hücrelerinden biri olan NK hücreleri; kemik iliğinden köken alan, timustan bağımsız gelişim gösteren büyük granüllü lenfositlerdir ve CD3-CD56+16+ fenotipik özelliğine sahiptirler. NK hücreleri yoğun olarak periferik kan, dalak ve peritoneal sıvılarda bulunurlar. NK hücreler her ne kadar lenfosit sınıfında ve edinsel immünitede yer alsalar da aslında doğal immünite de rol oynamaktadırlar. NK hücrelerini T ve B hücrelerinden ayıran en önemli özellikleri, virüs ile enfekte olmuş hücreleri daha önceden bir uyarı olmadan tanıyıp yok etme yeteneğine sahip olmaları, hafızalarının olmaması ve MHC'den yoksun olmalarıdır.

NK hücrelerinin yüzey molekküllerinden olan CD2 molekülü ve Ig G'nin Fc parçasına düşük afinite gösteren FcRIII (CD16) NK hücrelerinin identifikasyonu için oldukça önemlidir. CD16 yüzey molekülü sadece NK hücre yüzeyinde değil aynı zamanda bazı makrofajlarda, nötrofillerde ve muhtemel T hücrelerinde de bulunmaktadır. CD16 yüzey molekülü NK hücrelerinde transmembranöz formdayken, granüositlerde fosfotidil inozitol glikan bağı ile membran yüzeyine bağlanır

NK hücrelerinin diğer önemli yüzey molekküllerinden olan “nöral hücre yapışma molekülü-1” (CD56)'dür. NK hücreleri CD56 yüzey molekküllerinin fonksiyonlarının yoğunluğa bağlı olarak “CD56parlak CD16soluk ve CD56soluk CD16parlak” olmak üzere iki ana gruba ayrılmaktadır (Deniz,2007).

CD56soluk CD16parlak NK hücreleri periferik kan NK hücrelerinin %95'ni oluştururlar ve büyük oranda Fc- $\gamma$  reseptör CD16 ve perforin ekspres ederler. CD56soluk CD16parlak NK hücreleri düşük düzeyde sitokin salgırlar ve etkili bir biçimde hedef hücreleri yok ederler. CD56parlak CD16soluk NK hücreleri, ikincil lenfoid organlarda yerleşmiş şekilde bulunurlar ve TNF, GM-CSF ve IFN- $\gamma$ , içeren pek çok sitokin üretmektedir. CD56parlak CD16soluk NK hücreleri uzun süreli

aktivasyondan sonra sitotoksiste özelliği kazanmaktadırlar (Şekil 2.5) (Lünemann, Lünemann JD ve Münz, 2009).



**Şekil 2.5** CD56parlak CD16soluk ve CD56soluk CD16parlak işlevleri (Seydel ve Aksoy 2011)

CD56<sup>parlak</sup> CD16<sup>soluk</sup> ve CD56<sup>soluk</sup> CD16<sup>parlak</sup> NK hücreleri, aktive edici ve inhibe edici NK hücre reseptörleri, taşıdıkları kemokin reseptörleri ve adezyon molekülleri açısından da farklılık göstermektedirler. Bu farklılıklar NK hücrelerinin enflamasyon bölgesine göçünü ve dokulara yerleşimini kolaylaştırmaktadır.

CD56<sup>parlak</sup> CD16<sup>soluk</sup> ve CD56<sup>soluk</sup> CD16<sup>parlak</sup> NK hücreleri arasındaki diğer farklılıklardan biri de farklı yüzey reseptörlerini eksprese etmeleridir. CD56<sup>soluk</sup> CD16<sup>parlak</sup> NK hücreleri C tipi Lektin reseptörlerini ve KIR reseptörlerini daha fazla miktarda eksprese ederken CD56<sup>parlak</sup> CD16<sup>soluk</sup> NK hücreleri az miktarda KIR reseptörlerini ve yüksek miktarda C tipi lektin reseptörlerini eksprese ederler (Lünemann ve ark. 2009).

### 2.3.2. NK Hücrelerinin Fonksiyonları

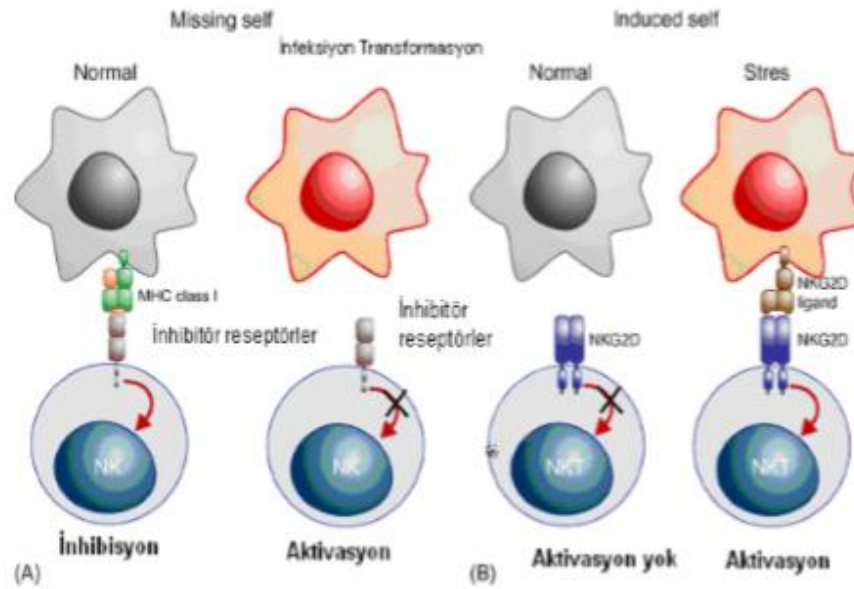
#### 2.3.2.1. Sitotoksiste

NK hücreleri MHC aracılığı olmadan virüs ile enfekte olmuş hücreleri ve tümör hücrelerini direkt olarak öldürebilen hücrelerdir. NK hücreleri sitoplazmalarında perforin, çok sayıda sitoplazmik granüller ve çeşitli enzimler



içermektedir. NK hücreleri ilk aşamada hedef hücreyi putatif NK reseptörleri aracılığı ile tanımaktadırlar. Diğer aşamada ise belli organeller sitoplazmada meydana gelen değişiklikler sonucunda efektör hücrelerin sitoplazmalarında parçalanır. Bu aşama tamamlandıktan hemen sonra efektör hücre tarafından salgılanan moleküllerin bir kısmı hedef hücre için toksik etki gösterir. Hedef hücre membranını deformasyona uğratan ana mekanizma "perforin bağımlı " sitotoksik mekanizmadır. Perforin bağımsız mekanizmalar ise; TNF, TNF- ilişkili apoptoz indükleyen ligand (TNF-Tümör Nekrozis Faktör) veya Fas Ligand aracılı sitotoksiste daha düşük ve yavaş etki göstermektedir. (Hokland'tan aktaran Deniz, 2007).

NK hücre yüzeyindeki reseptörler ile aktive ve inhibe edici sinyaller arasındaki denge NK hücre aktivitesinin regülasyonunu sağlamaktadır. NK hücrelerinin sitotoksik etki mekanizmalarıyla ilgili iki hipotez ortaya konmuştur. İki reseptör" hipotezine göre ise NK hücrelerinin öldürme yetenekleri, farklı reseptör tipleri tarafından üretilen inhibisyon ve aktivasyon sinyalleri arasındaki denge ile sağlanır. "Missing-self" hipotezine göre NK hücresi MHC sınıf I negatif otolog hücreleri tanır ve yok eder. " (Şekil 2.6) (Ljunggren ve Kärre, 1990; Raulat, 1992).



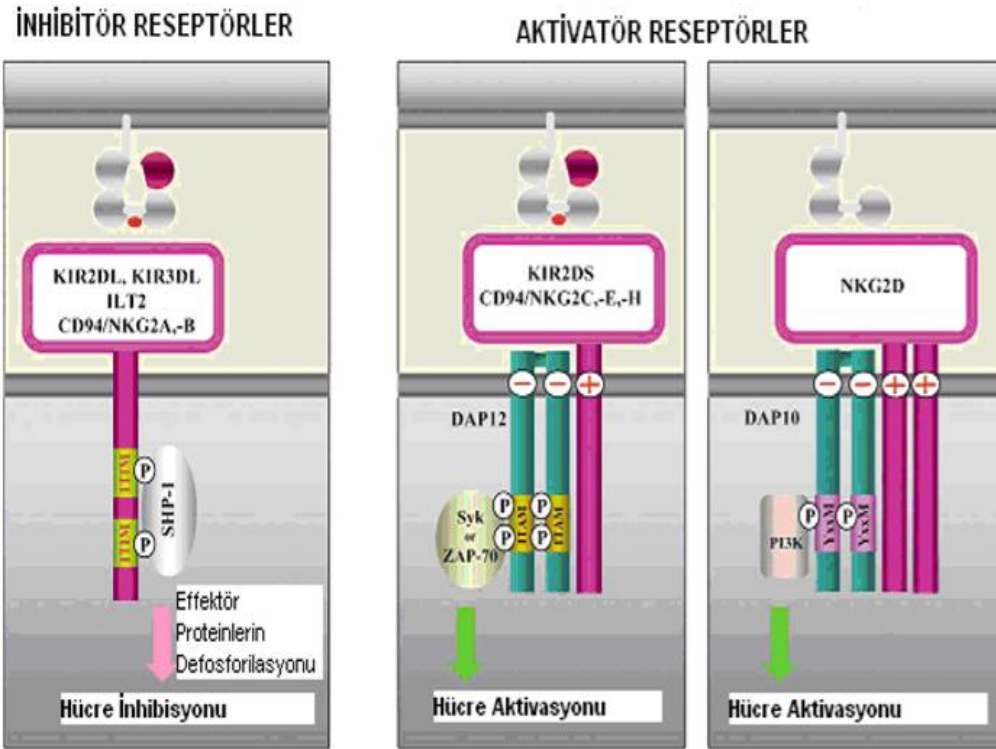
**Şekil 2.6** NK hücre cevabının düzenlenmesi (Seydel ve Aksoy, 2011).

Hedef hücre ligandlarını tanıyan aktivatör sinyaller, PTK (Protein Tirozin Kinaz)'ları aktive ederler. Böylelikle PTK aktivitesi sınıf I MHC molekülerini

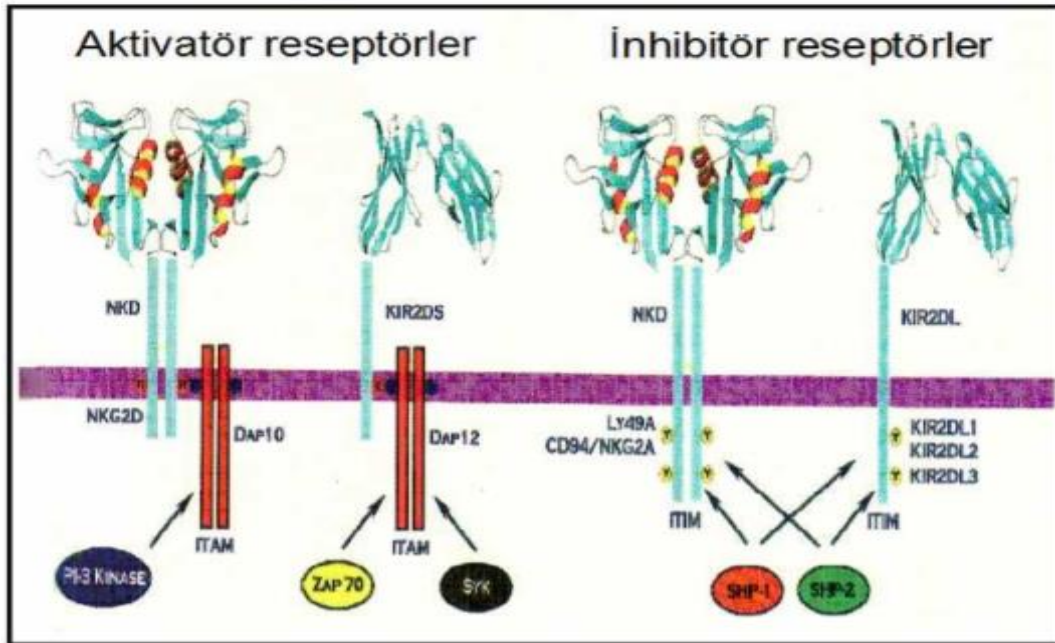
tanıyan inhibitör reseptörlerin PTK'ları uyararak aktive etmesi ile inhibe olur. Sonuç olarak ise MHC sınıf I taşıyan hücreleri NK hücreleri lizise etmez. MHC sınıf I ekspresyonunu virüs enfeksiyonu inhibe ettiği için aktivatör sinyaller NK hücre lizisini tetikler ve aktive olan NK hücreleri enfekte hücreleri lizise eder (Deniz, 2007)

Klasik HLA antijenleri HLA-A, B, C ve HLA-G, E gibi non-klasik HLA antijenleri, stres ile indüklenen molekül Majör Histokompatibilite -I zincir ilişkili antijen (MICA) moleküllerinin hepsi için ayrı bir reseptör NK hücreleri eksprese ederler. NK hücrelerinin ‘‘Natural killer- reseptörler’’(NKR) olarak adlandırılan iki reseptörü vardır. Bunlar aktive ve inhibe edici reseptörlerdir. Bu reseptörlerden sinyal iletimine yol açan ve sitokin üretimini inhibe eden reseptörler KIR'lar ve sitokin üretimi ile yok etme gibi efektör fonksiyonları harekete geçiren reseptörler ise KAR (Katil Aktivatör Reseptör) olarak adlandırılmaktadırlar. KIR'lar bazı T hücre alt gruplarında, NKT hücrelerinde ve NK hücrelerinde bulunmaktadırlar. Aktivatör reseptörler yani KAR'lar ise yalnızca NK hücrelerinin değil T hücre aktivasyonunun regülasyonunda da rol oynamaktadırlar (Biassoni ve ark. 2001; Young ve ark. 2002).

Aktivatör reseptörlerde sitoplazmik bölüküm kısa veya hiç yoktur ve bu reseptörler, transmembran bölükümünde (domain) pozitif yüklü uçta ‘‘immünoreseptör tirozin bazlı aktivasyon motifi’’ (ITAM) taşıyan DAP-10 veya DAP-12 iletim proteinlerini taşımaktadırlar. İnhibitör reseptörler sitoplazmik kuyrukta tirozin fosfataz bağlayan hücre içi tirozin bazlı inhibisyon motifi (ITIM) taşırlar ve pozitif yüklü bölüküm içermezler. KIR molekülleri sitoplazmik bölükümün uzunluğuna ve hücre dışı segmentlerindeki immünoglobülin bölüküm sayısına göre adlandırılmaktadır (Şekil 2.7, Şekil 2.8) (Raulet, Vance ve McMahon 2001).



Şekil 2.7 NK hücre reseptörleri (Seydel ve Aksoy, 2011).



Şekil 2.8 İnhibitör ve Aktivatör reseptörler (Deniz,2007).

### 2.3.2.2. Sitokin ve kemokin sekresyonu

NK hücrelerinin önemli bir diğer fonksiyonu ise sitokin üretimidir. NK hücrelerinin de Th1 ve TH2 hücreleri gibi insan NK hücrelerinin de NK1 ve NK2 hücre alt grupları vardır. NK1 hücreleri TNF- $\alpha$  ve IFN- $\gamma$  salgımlarken, NK2 hücrelerin ise IL-13, IL-4 ve IL-5 salgıladığı gösterilmiştir (Deniz,2007).

NK hücrelerini akım sitometride CD56, CD16 yüzey molekülleri ile tayin etmem mümkündür. Cr-51 salınımı NK hücrelerinin sitotoksik etkisini saptamada kullanılır. Bununla birlikte floresan işaretli, hedef hücrelerle efektör hücrelerin inkübasyonu sonucu oluşan lizis de akım sitometride saptanmaktadır. ADCC' de Fc reseptörü taşıyan hücreler tarafından antikor kaplı hedef hücreler MHC'den bağımsız olarak yok edilmektedir. Hedef hücre yıkımının mekanizması tam olarak aydınlatılmamakla beraber, granzimler ve perforinler aracılığı ile yıkımın gerçekleştiği kabul edilmektedir (Moretta, Biassoni, Bottino, Mingari ve Moretta, 2000).

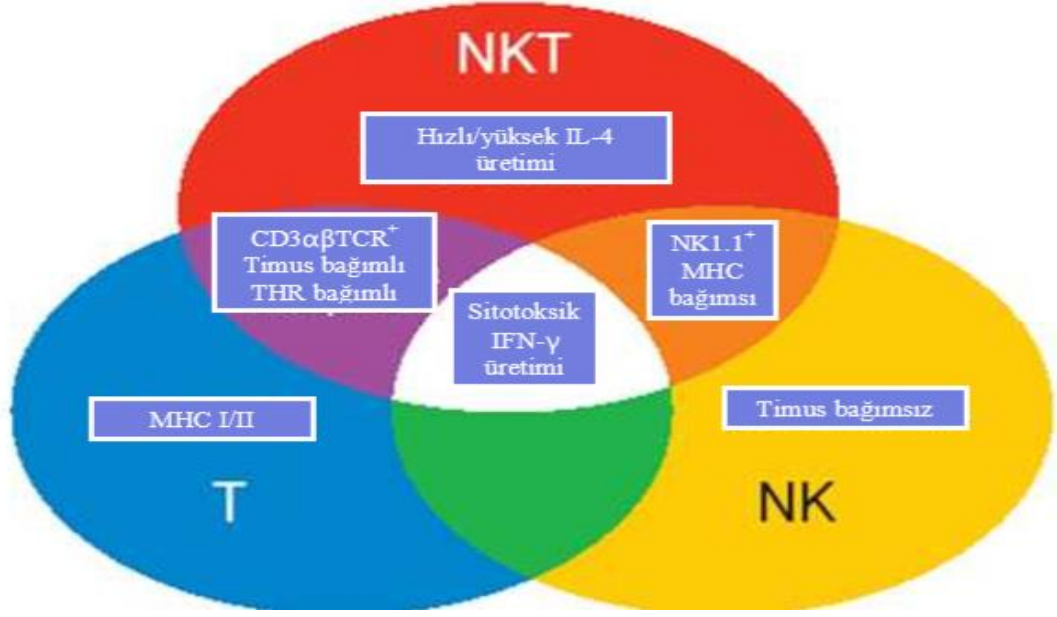
### 2.3.2.3. Temasa bağlı hücre eş uyarımı

T ve B hücreleri ile iletişimde rol oynayan CD40L (CD154) ve OX40L gibi eş-uyaran ligandları NK hücreleri eksprese ederler. Bu durum NK hücrelerinin doğal ve edinsel immünite arasında bir köprü görevi gördüğünü düşündürmektedir (Deniz,2007).

NK hücreleri farklı fonksiyonları ile sitokin üretimi, allograft rejeksiyonu gibi immünoregülatör fonksiyonlarda, hematopoetik sistem hücre büyüme ve farklılaşması, aplastik anemi, diyabet, tümör immünoloji ve virüs, bakteri, parazit, mantar gibi mikrobiyal enfeksiyonların kontrolünde rol oynamaktadır (Orange ve Ballas, 2006).

### 2.3.3. NKT Hücreler

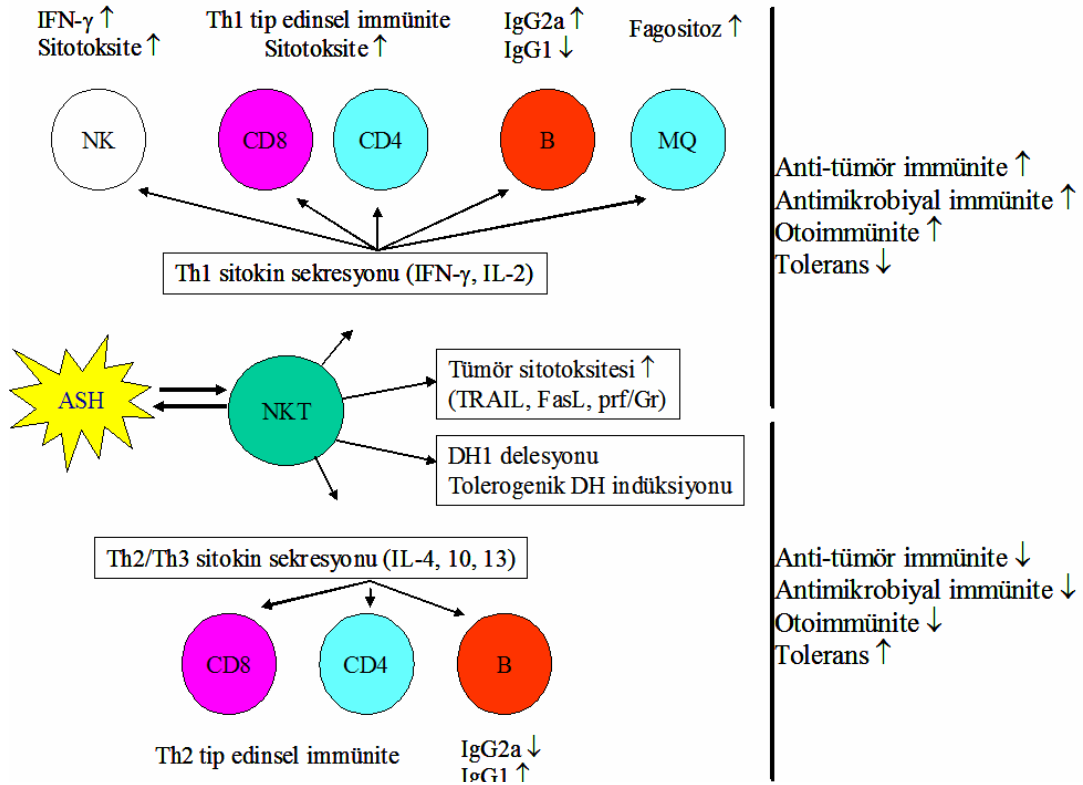
NK hücreleri CD3 antijenini eksprese etmezken, NKT hücreler CD3 antijenini ve NK hücrelerinde bulunan reseptörlerin çoğunu eksprese eden hücreler "NKT" hücreleridir. Bu hücreler NK hücreleri ve klasik T hücrelerinin alt gruplarıdır ve ilk kez fare sisteminde NK1.1 olarak adlandırılmıştır (Şekil 2.9) (Loza, Metelitsa ve Perussia, 2002).



**Şekil 2.9** NK, T ve NKT hücrelerinin ortak ve farklı özellikleri (Deniz,2007).

NKT hücreleri otoimmün hastalıkların kontrolünde, tümör rejeksiyonunda ve immediate immün yanıtta rol oynamaktadırlar ve bu hücreler T hücre antijen reseptörü ve NK hücre reseptörü ekspres ederler (Şekil 2.10). NKT hücreleri NK hücrelerine benzer sitotoksik aktivite gösterirler ve T hücre aracılığı ile yüksek miktarda IL-4, IL-2, IFN- $\gamma$  ve TNF- $\alpha$ , gibi sitokinleri üretirler. CD4-CD8- NKT hücreleri, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , gibi sitokinlerin sekresyonunda Th1, CD4+ NKT hücreleri ise IL-4, IL-13 gibi sitokinlerin TH2 tip yanıtta etkilidir.

Sitokinlerin salınımında mikroçevre önemli rol oynamaktadır çünkü IL-12 salınımı IFN- $\gamma$  salınımında, IL-7 salınımı IL-4 salınımında artışa neden olmaktadır (Blanca, Bere, Young ve Ortaldo, 2001).



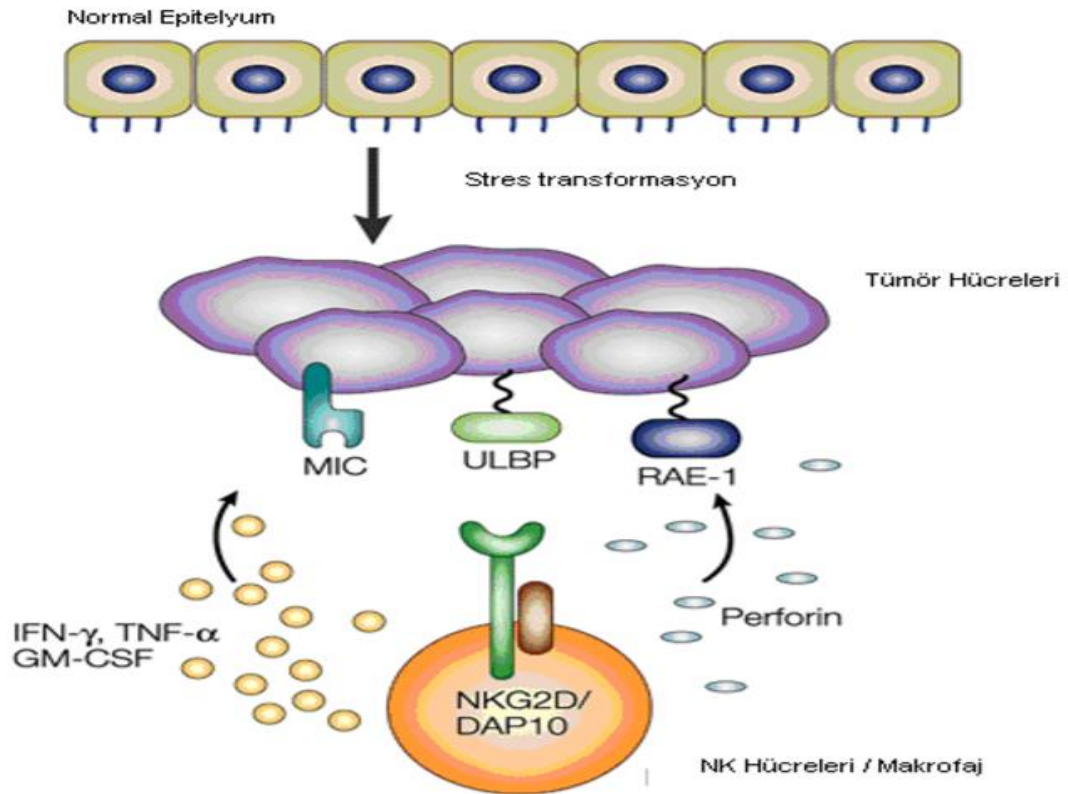
Şekil 2.10 NKT hücrelerin fonksiyonları (Deniz, 2007).

### 2.3.4. NKG2D Hücre Reseptörleri

NK hücrelerinin en önemli yüzey reseptörlerinden biri olan, tip II lektin benzeri proteinleri olarak bilinen NKG2 gen ailesidir. Bunlar NKG2A, D, C, E, B ve F'dir. NKG2D hücre reseptörleri %21 oranında aminoasit homolojisi gösterirken NKG2A, C, B ve E %94-95 düzeyinde aminoasit homolojisi göstermektedir. NKG2C, D, ile E aktive edici özelliğe sahiptir. NK hücre aktivasyonuna katılan en önemli hücre yüzey reseptörleri NKG2D (Doğal öldürücü grup 2, D üyesi-CD314)'dir. NK hücreleri ve bazı T hücreleri tarafından eksprese edilen reseptör olarak ilk defa 1991 yılında insan NKG2D hücre yüzey reseptörü tanımlanmıştır (Bauer ve ark. 1999; Borrego ve ark. 2002).

NKG2D hücre ligandları insanlarda HLA sınıf I (MHC Class I) genleri HLA-A ile HLA-B olan UL-16 ve GPI (glikozil-fosfat-idilinozitol) bağlayan ULBP'dir. Toplamda 7 tane MIC geni (MICG- MICA) yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur. Bu genlerden fonksiyonel olarak eksprese edilen genler MIC-B ile MIC-A genleridir. MIC-D, F, C, E genleri ise yalancı genler olarak adlandırılmaktadır (Petersdorf, Schuler, Longton, 1999; Bahram, Inoko, Shiina, 2005).

Aktive edici sinyaller genellikle NK hücrelerinin içerisinde belirli özellik kazanmış kinazların ATP üretimini indüklemektedir. NKG2D hücre ligandlarının reseptörlerinin sinyalleri için gerekli protein DAP10'dur. Çünkü bu proteinler NK hücrelerindeki NKG2D'nin bağlanarak sitolitik aktiviteyi tetiklemekte böylelikle de sitokin (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  gibi) üretimi sağlanmaktadır (Şekil 2.11) (Seydel ve Aksoy2011).



Şekil 2.11 MIC, DAP10 ve NKG2D adaptör protein ilişkisi (Seydel ve Aksoy,2011).

#### 2.3.4.1. NKG2D ligandlarının kanser immünoterapisindeki rolleri

Hücre döngüsü kontrol kaybı, apoptoza karşı gösterilen direnç ve kendini yenileme kapasitesi, tümörlerin transformasyon ve büyüme olayı mutasyon oluşumunu içeren birçok aşamayı içinde barındıran bir süreçtir. İmmün sistem tümör hücrelerinin büyümesi ve gelişmesinin kontrolünde oldukça önemli bir rol üstlenmektedir. NK hücreleri TNF- $\beta$ , IL-10, TNF- $\alpha$ , IL-13, GM-CSF ve IFN- $\gamma$  gibi sitokinleri hedef hücreler temas hallerinde ve sitotoksik özelliklerin sergilendiği durumlarda salgıladıkları gösterilmiştir. NK hücrelerinin tümörleri yok etmesinde NKG2D reseptörlerinin rolleri oldukça yüksektir. Çünkü NKG2D reseptörleri farklı

tümörler üzerinde eksprese olan belirli antijenleri tanımaktadır. Yapılan çalışmalarda birçok tümörün NK hücrelerinin saldırısından korunmak için NKG2D aracılı reseptörleri etkisiz hale getirdiği gösterilmiştir (Coudert, Held, 2006; Zwirner, Fuertes, Giart, 2007).

İnsanlarda kökenleri farklı epitelyum tümörlerinden eksprese olan MICA ve MICB proteinleri, hematopoetik kökenli malignitelerde daha az eksprese olmaktadır. Tümör hücrelerinde gözlenen immün kaçış mekanizmaları NKG2D yüzey reseptörleri aracılığı ile olmaktadır. Tümör hücreleri immün yanıtta kaçarlarken NKG2D ligandlarının işlevlerini ve ekspresyonlarını baskılayarak kontrol etmektedirler. NKG2D ve NKG2DL etkileşiminin immün kaçış mekanizmasında önemli etkisi vardır. (Coudert ve ark. 2006; Zwirner ve ark. 2007; Örnek, 2007).

Virüs ile enfekte olmuş hücrelerde, transforme olmuş hücrelerde MIC proteinlerinin upregülasyonu NKG2D hücre yüzey reseptörleri aracılığı ile bir cevap oluşturmaktadır. NK hücrelerinin direkt olarak stres sinyallerine yanıt verdikleri ve çeşitli NKGD liganlarının dağılımlarının ve ekspresyonlarının doğal immün sistemde önemli rol oynadıkları gösterilmiştir (Seydel ve Aksoy, 2011).



### 3. MATERYAL ve METOT

#### 3.1. Kullanılan Materyaller

##### 3.1.1. Kullanılan Kimyasallar

Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (Sigma),  
Dioctadecyloxycarbocyanine perchlorate (DIO) (Sigma),  
Propidium Iodide (PI) (Sigma),  
Monensin (Sigma)  
Fetal Bovine Serum (FBS) (Sigma)  
RPMI-1640 (Sigma)  
Dimetil Sülfoksit (DMSO) (Sigma)  
Penicilin Streptomycin (Sigma)  
Ficoll Hypaque (Sigma)  
Phosphate Buffered Saline (PBS) (Sigma)  
Optylise (Beckman Coulter)  
Ionomycin Calcium Salt (Sigma)  
Isoflow (Beckman Coulter)  
Trypan Blue (Sigma)  
CD3-FITC (Beckman Coulter)  
CD16-PE (Beckman Coulter)  
CD56-PC5 (Beckman Coulter)  
CD107a-APC (Beckman Coulter)  
CD45-KO (Beckman Coulter)  
CD57 (Beckman Coulter)

##### 3.1.2. Kullanılan Cihazlar

Sınıf 2 Biyolojik güvenlik kabini (Scanlaf)  
Vorteks (IKA)  
Otoklav (Sanyo)  
Masaüstü soğutmalı tüp santrifüj (Ortoalresa)  
Santrifüj (Nüve)  
Hassas terazi (Denver)

Floresans mikroskop (Leica)

Inverted mikroskop (Olympus CKX53)

Akım Sitometrisi (Beckman Coulter, USA)

Buzdolabı (Arçelik)

CO2 inkübatör (Sanyo)

Azot Tankı (LYBGA&OCA)

### 3.1.3 Hasta Grupları ve Örnekler

Bu çalışmada; akciğer kanseri, meme kanseri, hematolojik neoplazmlı hastalar (multiple myelom) ve sağlıklı gönüllüler olmak üzere üç hasta bir kontrol grubu oluşturuldu. Her bireyden daha önceden bilgilendirilmiş onam formu ile onayları alındı. Gruplar için denek seçerken aşağıdaki kriterler baz alındı.

Çalışmaya alınma kriterleri:

-18 yaşından büyük olmak

-Hastanın akciğer kanseri, meme kanseri veya multipl myelom tanısı almış olması

-Hastanın bir ay boyunca kemoterapi almamış olması

-Lökosit sayısının 3500/micL, lenfosit sayısının 1500'ün üzerinde olması

Çalışmaya alınmama kriterleri

Hastanın gebe olması

Aktif enfeksiyonu olması

Yazılı bilgilendirilmiş onam vermemesi

## 3.2. Kullanılan Yöntemler

### 3.2.1. Lösemi Hücre Hattı ve Hücre Kültürü

#### 3.2.1.1. K562 Hücre Hattının Özellikleri

K562 hücreleri kronik myeloid lösemnin blastik kriz evresi orjinli myeloid seri hücre dizileridir. Eritriod farklılaşma, glutatyon sistemi, oksidatif stres, antikanser tedavilerinin geliştirilmesi ve sitotoksiste çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır. K562 hücreleri düzgün şekilli, kısa mikrovilluslu ve kolay bağlantıları olan hücrelerdir. Giemsa ile hazırlanmış preparatlarda K562 hücreleri yaklaşık 20 µM çapında iki ya da daha fazla parçalı nükleuslu farklılaşmamış blast hücreleri olarak tanımlanabilir.

Bu çalışmada K562 hücre dizilerinin kullanılmasının en önemli nedeni; NK hücre aktivitesini inhibe etmek için gerekli olan MHC kompleksinden yoksun olmaları ve NK hücreleri tarafından kolaylıkla yok edilebilmeleridir.

### **3.2.1.2. K562 Hücre Hattında Kullanılan Besiyeri ve Kültür İşlemleri**

Bu çalışmada Acıbadem Üniversitesi Araştırma Laboratuvarından K562 (kronik myeloid lösemi) hücre hattı donmuş olarak temin edildi. Besiyeri, RPMI-1640 (fenol redsiz) içerisine %10 FBS (50 ml), 5 ml L-Glutamin ve 5 ml Penstreptomisin eklenerek hazırlandı. Hücreler, besiyerinde 37°C'de %5CO<sub>2</sub> içeren ortamda çoğaltıldı.

### **3.2.1.3. K562 Hücre Hattının Çözdürülmesi**

Cryo tüpler içerisinde azot tankında saklanan besiyeri ve %10 dimetil sülfoksit (DMSO) ile dondurulmuş olan K562 hücre hattı, azot tankından çıkarıldıktan sonra 37°C'de %5 CO<sub>2</sub>'li ortamda çözdürüldü. Çözünen hücreler 15 ml'lik falkona alındı ve üzerlerine 5 ml taze hazırlanan besiyeri ilave edildi. 4 °C'de 1500 xg'de 5 dakika soğutmalı masaüstü santrifüjü ile santrifüj edildi. Süpernatant atıldı pelletin üzerine 5 ml besiyeri eklenerek homojenize işlemi yapıldı ve herhangi bir kontaminasyon oluşmaması için tekrar 4°C'de 1500 xg'de 5 dakika santrifüj edildi. Ardından süpernatant tekrar atıldı ve pelletin üzerine 15 ml taze besiyerinden eklenerek homojenize edildi. 75 cm<sup>2</sup>'lik flaskalara steril bir şekilde aktarılarak 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> içeren ortamda inkübasyona bırakıldı. Herhangi bir kontaminasyon oluşmaması için yapılan tüm basamakların steril bir şekilde çalışılmasına özen gösterildi.

### **3.2.1.4. K562 Hücre Hattının Pasajlanması**

İnkübasyona bırakılan flaskalar hücre hattının canlılığını koruması ve çoğalmasının sağlanması amacıyla 24-48 saatte bir pasajlama işlemi yapıldı. Bunun için ilk olarak hücreler hücre kazıyıcısı ile flaskalardan kaldırıldı. Hücreler yüzen hücreler olduğu için ve yüzeye tam olarak yapışmadığı için tripsin kullanılmadı. Kaldırılan hücreler 15 ml'lik falkona aktarıldı ve 4°C'de 1500 xg'de 5 dakika santrifüj edildi. Daha sonra süpernatant atıldı ve pellet 1xPBS ile iki defa yıkandı. Süpernatant tekrar atıldı ve pelletin üzerine 15 ml taze besiyeri eklenerek homojenize

halde getirildi. 75'lik flaska ekimi yapılan hücreler 37°C'de % 5CO<sub>2</sub> içeren inkübatöre yerleştirilerek çoğalmaya bırakıldı.

### **3.2.2. Örneklerin temin edilmesi, hazırlanması, immünfenotipleme ve hücre kültür çalışmaları**

#### **3.2.2.1. Örneklerin Temin Edilmesi**

Bu çalışmada hasta grubu için Namık Kemal Üniversitesi Onkoloji ve Hematoloji Bölümünden hasta deneklerle ve kontrol grubu için sağlıklı deneklerle önceden görüşüldü ve bilgilendirilmiş onam formları ile onayları alındı Hastalardan ve sağlıklı deneklerden ortalama 5 ml kan heparinli tüplere alındı. Alınan kan örneklerinin 100µl'si Hematoloji Laboratuvarında immünfenotipleme için ayrıldı. Kalan örneklerden Ficoll-Hypaque gradyan santrifüj yöntemi ile periferik kan mononükleer hücreleri izole edildi.

#### **3.2.2.2. Akım sitometrisi ile immünfenotipik analiz**

İmmünfenotipik analiz için, tüplere alınan 100µl'lik kan örneklerinin her birine floresan madde ile işaretli monoklonal antikordardan (CD3-FITC, CD16-PE CD56-PC5 ve CD45-KO) 5µl eklendi, 15 dakika karanlık ortamda inkübasyona bırakıldı. Daha sonra eritrositleri uzaklaştırmak için 500 ml Optilyse eklendi ve 10 dakika inkübasyona bırakıldı. Ardından 500 ml IsoFlow eklendi ve tekrar 10 dakika inkübasyona bırakıldı. Bu işlemlerin ardından tüpler 1300 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi, süpernatant atıldı ve üzerine 2 ml isoflow ile tekrar yıkama işlemi yapıldı. Süpernatant tekrar atıldı ve tüplerin üzerine 500 ml isoflow eklendi ve akım sitometrisinde tüpler sırasıyla çekildi.

#### **3.2.2.3. Ficoll-Hypaque ile PBMC'lerin İzole Edilmesi**

Alınan kan örnekleri 15 ml'lik falkona aktarıldı. Bir başka 15'lik falkona ise 5 ml fikol alındı. Ardından fikolün bulunduğu falkona +- 5 ml kan örneği pipetör ile yavaş yavaş üzerinden yayıldı (1:1/ v: v oranı kullanıldı). Soğutmalı masaüstü santrifüj ile 21°C'de 1500 xg'de 30 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası eritrositler dibe çöktüğünden dolayı üst kısım yavaşça toplandı ve 4°C'de 1500 xg'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve pellet 1xPBS ile yıkandı ve 50'lik falkona aktarıldı. Hücrelerin üzerine 20 ml taze besiyeri eklendi ve homojenize hale

getirildikten sonra 75 ml'lik flaska ekimi yapıldı. Flasklar 37°C'de % 5CO<sub>2</sub> içeren ortamda 24 saat inkübasyona bırakıldı.

### 3.2.3. Hücre canlılık testi

Canlı hücre sayımı Thoma lamı kullanılarak gerçekleştirildi. Bu işlem için hücreler 1xPBS içinde hazırlanmış %0,5 tripan mavisi ile 1:1 (v/v) oranında karıştırılarak 1 dakika bekletildi. Hazırlanan karışım lam üzerindeki uygun bölgelere 10µl tripan mavisi ile 10µl hücre olacak şekilde uygulandı. Hücre süspansiyonu tripan mavisi gibi bir canlılık boyası ile seyreltiğinde, canlı hücreler boyayı metabolize edip hücre dışına attıklarından beyaz, küçük ve yuvarlak olarak görünürler. Ölü hücreler ise membranları boyaya geçirgen olduğundan büyük ve koyu mavi hale gelirler. Bu özellikler doğrultusunda hücreler, inverted mikroskop kullanılarak canlılık ve çoğalma yönünden değerlendirildi. Ardından hücreler mikroskop altında sayıldı ve kültürün bir milimetresindeki canlı hücre sayısı aşağıdaki formüle göre hesaplandı. Canlı hücre sayısına göre hedef hücre: efektör hücre (E: T) oranı 5:1 olarak belirlendi.

$$\text{Canlı hücre sayısı/ml} = N \times 2 \times 10^4$$

N=lam üzerindeki sayma alanındaki hücre sayısı.

### 3.2.4. Kullanılan kimyasalların uygun konsantrasyonlarda hazırlanması

#### 3.2.4.1. DİO konsantrasyonu hazırlama

Bu çalışmada satın alınan Dioctadecyloxacarboyanine perchlorate DİO (Sigma-D4292) 20 mg / 7.5 ml'lik konsantrasyonda hazırlamak için ilk olarak 15 tane steril 2 ml'lik eppendorflar ayrıldı. DİO'nun içerisine 4 ml DMSO eklendi ve homojenize hale getirildi. Ardından 3.5 ml DMSO tekrar eklendi ve homojen hale geldiğinde 15'lik falkona aktarıldı. 15 tane steril eppendorflara 500 µl olacak şekilde her birine eklendi, etrafları karanlık ortam yaratmak için alüminyum folyo ile sarıldı ve -20°C'de saklandı.

Çalışma esnasında DİO kullanıldığında -20°C'den 2 ml'lik bir tane eppendorf alındı. Buradan 2.5 µl DİO alındı ve 18 µl PBS ile karıştırıldı. Bu karışımdan ise 2 µl alındı ve çalışmada kullanıldı.

#### **3.2.4.2. PI konsantrasyonu hazırlama**

Bu çalışmada satın alınan Propidium Iodide (PI) (Sigma-P4170) 25 mg / 10 ml konsantrasyonda hazırlamak için 20 tane steril eppendorflar hazırlandı. PI içerisine 5 ml steril DMSO eklendi ve homojenize edildi. Daha sonra tekrar karışım 15 ml'lik falkona aktarıldı ve içerisine tekrar 5 ml DMSO eklendi, homojenize hale getirildi. Ardından 20 tane steril eppendorflara 500 ml olacak şekilde aktarıldı. Kullanılan boyanın özelliğini yitirmemesi için etrafı alüminyum folyo ile sarıldı ve -20°C'de saklandı.

Çalışma esnasında PI kullanıldığı zaman -20°C'den bir tane eppendorf çıkarıldı. İçerisinden 500 µl PI alındı ve 9.5 µl 1x PBS ile karıştırıldı.

#### **3.2.4.3. Ionomycin konsantrasyonu hazırlama**

Bu çalışmada satın alınan Ionomycin calcium salt (Sigma-I0634) 5 mg / 5 ml konsantrasyonda hazırlamak için 10 tane steril eppendorflar hazırlandı. Ionomycin içerisine 1 ml steril DMSO eklendi ve homojenize edildi. Daha sonra tekrar karışım 15 ml'lik falkona aktarıldı ve içerisine tekrar 4 ml DMSO eklendi, homojenize hale getirildi. Ardından 10 tane steril eppendorflara 500 ml olacak şekilde aktarıldı. Kullanılan kimyasalın özelliğini yitirmemesi için etrafı alüminyum folyo ile sarıldı ve -20°C'de saklandı.

Çalışma esnasında Ionomycin kullanıldığı zaman -20°C'den bir tane eppendorf çıkarıldı. İçerisinden 3 µl PI alındı ve 1 ml 1x PBS ile karıştırıldı.

#### **3.2.4.4. PMA Konsantrasyonu Hazırlama**

Bu çalışmada satın alınan Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (Sigma-P8189) 5 mg / 5 ml konsantrasyonda hazırlamak için 5 tane steril eppendorflar hazırlandı. PMA içerisine 5 ml steril DMSO enjektör yardımıyla eklendi ve homojenize edildi. Daha sonra tekrar karışım 15 ml'lik falkona aktarıldı ve içerisine tekrar 5 ml DMSO eklendi, homojenize hale getirildi. Ardından 5 tane steril eppendorflara 500 ml olacak şekilde aktarıldı ve -20°C'de saklandı.

Çalışma esnasında PMA kullanıldığı zaman -20°C'den bir tane eppendorf çıkarıldı. İçerisinden 10 µl PMA alındı ve 990 µl 1x PBS ile karıştırıldı.

### 3.2.4.5. Monensin Konsantrasyonunun Hazırlanması

Bu çalışmada satın alınan monensin (Sigma-M5273) içerisinde 0.0007 gramı hassas terazi yardımıyla tartıldı ve alındı. Daha sonra alınan miktarda ki monensin 100 ml distile su içerisinde çözdürüldü ve 50 ml'lik falkona aktarıldı. Bu karışımdan 1 ml alındı, 15 ml'lik falkona aktarıldı ve 9 ml distile su ile karıştırılarak çalışmalarda kullanıldı.

### 3.3. NK Hücre Aktivitesi İçin Kullanılan Yöntemler

Çalışmaya başlamadan önce ilk olarak 24 saat inkübasyona bırakılan K562 hücreleri ve PBMC'ler flasklardan hücre kazıyıcı ile kaldırıldı ve her ikisi de 50 ml'lik falkonlara aktarıldı. 4°C'de 1500 xg'de 5 dakika santrifüj edildiler, süpernatantları atıldı ve pelletleri 1x PBS ile yıkandı. Ardından tekrar 4°C'de 1500 xg'de 5 dakika santrifüj edildiler. Süpernatantlar atıldı ve hasta grupları, sağlıklı gönüllüler ve K562 hücrelerinin pelletlerine 2 ml taze besiyeri eklendi.

(Çalışma süresince haftada tek bir gruptan 2 örnek çalışıldı.)

#### 3.3.1. DİO / PI yöntemi ile NK hücre aktivitesinin değerlendirilmesi

Çalışmanın bu aşamasında ilk olarak 4 tüp oluşturuldu. Bunlar sırasıyla DİO/PI, sadece DİO, sadece PI ve hiçbir boyanın olmadığı sadece K562 / PBMC 'lerin olduğu tüp olmak üzere ayrıldı. Her tüpe 100 µl K562 hücrelerinden eklendi. DİO bulundurmeyen tüpler haricinde ki tüm tüpler 1 ml taze besiyeri ve 2 µl DİO boyasından eklenerek homojenize hale getirildi ardından 20 dakika 37°C'de % 5CO2 ortamda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında tüpler 4°C'de 1500 xg'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve pellet 1x PBS ile iki defa yıkama işlemine tabi tutuldu.

İnkübasyon sonrasında elimizde olan tüm tüplere sırasıyla 300 µl PBMC ve 1 ml taze besiyeri eklendi ve 37°C'de % 5CO2 ortamda 2 saat inkübasyona bırakıldı. Ardından tüm tüpler 4°C'de 1500 xg'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatantlar atıldı, pelletler ise 1x PBS ile iki defa yıkama işlemine tabi tutulduktan sonra son kez 4°C'de 1500 xg'de 5 dakika santrifüj edildi. Daha sonra sadece PI bulunduran tüplere 1 ml taze besiyeri, 130 µl PI eklendi ve homojenize hale getirildi. Tüpler ardından 4°C'de 1000 xg' de 1 dakika santrifüj edildi. Süpernatantlar atıldı,

pelletler ise 10x PBS ile yıkama işleminin yapılmasının ardından akım sitometrisi için gerekli basamaklara hazır hale getirildi.

### **3.3.1.1. DIO-PI yöntemi ile NK hücre aktivitesinin akım sitometrisinde ölçülmesi**

Akım sitometrisi için hazır hale gelen örnekler 500 ml isoflow eklenerek 10 dakika karanlık ortamda inkübasyona bırakıldı. Daha sonra 1300 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi, süpernatant atıldı. Pellete ise 500 ml isoflow eklendi ve akım sitometride çekilmeye bırakıldı.

### **3.3.2. PMA /Ionomycin yöntemi ile NK Hücre aktivitesinin değerlendirilmesi**

Çalışmanın bu kısmında ise 3 tüp oluşturuldu. Tüpler sırasıyla uyarısız, PMA-Ionomycin, K562 olmak üzere isimlendirildi. Uyarısız olan tüpe 300 µl PBMC, 10 µl CD107a- APC, 50 µl monensin ve 200 µl taze besiyeri konuldu. PMA-Ionomycin olan tüpe 300 µl PBMC, 10 µl CD107a-APC, 50 µl monensin, 100 µl PMA, 100 µl Ionomycin eklendi. K562 olan tüpe ise 300 µl PBMC, 100 µl K562 hücreleri, 10 µl CD107a-APC eklendi. Tüm tüpler en düşük devirde vortekste homojenize edildikten sonra 37°C'de % 5CO<sub>2</sub> ortamda 4 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası tüpler 4°C'de 1500 xg'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatantlar atıldı ve pelletler 1x PBS ile iki defa yıkama işlemine tabi tutuldu. Ardından akım sitometrisinde çekilmeye hazır hale getirildi.

### **3.3.2.1. PMA/ Ionomycin yöntemi ile NK hücre aktivitesinin akım sitometrisinde ölçülmesi**

Akım sitometrisi için hazır hale gelen örnekler 5 µl sırasıyla CD3-FITC, CD56-PC5 ve CD45-KO monoklonal antikor boyaları eklenerek 15 dakika karanlık ortamda inkübasyona bırakıldı. Ardından 500 ml isoflow eklenerek 10 dakika tekrar karanlık ortamda inkübasyona bırakıldı. Daha sonra 1300 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi, süpernatant atıldı. Pellete ise 500 ml isoflow eklendi ve akım sitometride çekilmeye bırakıldı.



### 3.4. İstatistiksel Analiz

Bu çalışmanın istatistiksel analizleri IBM-SPSS-24 programı kullanılarak yapılmıştır. İstatistiksel anlamlılık sınırı  $p < 0.05$  olarak alınmıştır. Değerler ortalama  $\pm$  standart sapma olarak gösterilmiştir

## 4. BULGULAR

### 4.1. Hasta ve Kontrol Gruplarının Demografik ve Klinik Özellikleri

Hasta grupları ve kontrol grubunun yaş ve cinsiyetleri ve hasta gruplarının rutin laboratuvar bulguları karşılaştırılmalı olarak Çizelge 2’de verilmiştir. Myelom hastalarının yaş ortalamaları  $63,6\pm 9,95$  meme Ca’lı hastaların yaş ortalamaları  $\pm 52$  ve akciğer Ca’lı hastaların yaş ortalamaları ise  $\pm 55$  idi. Meme Ca’lı hastalardan çalışmaya alınan deneklerin iki tanesi erkekti. Hasta gruplarındaki deneklerin yaşları ve cinsiyet dağılımları oldukça heterojen olduğu için kontrol grubu ile hasta grupları arasında bu iki parametre açısından eşitlik sağlanamadı.

Meme Ca ve akciğer CA hastalarının hastalık evreleri, myelom hastalarının hastalık durumu ve tedavi özellikleri sırasıyla Çizelge 3, Çizelge 4 ve Çizelge 5’te verilmiştir. Çalışmaya alınan myelom hastalarından 11 tanesi ilk basamak tedavi almakta iken, 4 tanesi ise nüks/dirençli myelom idi. Yine myelom hastalarından 9 tanesi immün modülatör ilaç (IMiD) tedavisi, 10 tanesi ise proteozom inhibitörü tedavisi almıştı. Meme Ca’lı hastaların 7’si lokal, 8’i ileri lokal ve 1 tanesi metastatik evrede idi. Akciğer Ca’lı hastaların 2’si erken evre 9 tanesi ise ileri evredeydi.

**Çizelge 2** Hasta grupları ve kontrol grubunun yaş ve cinsiyetleri ve hasta gruplarının rutin laboratuvar bulguları

	<b>M.Myelom N:16</b>	<b>Meme Ca N:16</b>	<b>Akciğer Ca N:11</b>
<b>Yaş</b>	63,6±9,95	52±8,19	55±10,50
<b>Cinsiyet K/E</b>	6/10	14/2	0/11
<b>HGB, gr/dl</b>	10,2±2,42	11,73±1,72	11,81±2,57
<b>HCT, %</b>	33,8±5,37	35,5±4,81	35,49±6,80
<b>WBC, µl</b>	6.1±3,48	7,04±3,29	8,07± 5,51
<b>PLT, µl</b>	170.500±2	236 ±92,51	258,25±112
<b>#NE, µl</b>	3.8±2,54	4,2±2,26	5,04±1,78
<b>#LY, µl</b>	1.7±0,952	2±0,94	2,64±1,02
<b>Albümin, gr/dl</b>	4,5±2,32	4,3±0,4	3,94±1,23

<b>Kreatinin, mg/dl</b>	1,5±1,12	0,7±0,18	0,69±0,57
<b>CRP; mg/L</b>	3±2,60	5,5±6,13	6,44±5,47

*Cinsiyet dışındaki bütün parametreler ort±SD olarak verilmiştir.*

**Çizelge 3** Myelom hastalarının hastalık ve tedavi özellikleri

<b>Özellikler</b>	<b>Total hasta N:16</b>
<b>İlk basamak n (%)</b>	<b>11 (73,3)</b>
<b>Nüks/dirençli n(%)</b>	<b>4 (26,7)</b>
<b>IMiD alan n,(%)</b>	<b>9 (%60)</b>
<b>Protezeom inh. Alan n,(%)</b>	<b>10 (%66,7)</b>

**Çizelge 4** Meme Ca'lı hastaların hastalık evresi

<b>Özellikler</b>	<b>Total hasta N:16</b>
Lokal n (%)	7 (69,8)
Lokal ileri n (%)	8 (31)
Metastatik n (%)	1

**Çizelge 5** Akciğer Ca'lı hastaların hastalık evresi

<b>Özellikler</b>	<b>Total Hasta N:16</b>
Erken evre n (%)	2 (16,7)
İleri evre n (%)	9 (75)

Bütün hastaların laboratuvar sonuçları her bir hasta için ayrı ayrı olarak Çizelge 6'da verilmiştir.

**Çizelge 6** Hastaların laboratuvar sonuçları

	<b>YAŞ</b>	<b>CİNS.</b>	<b>HGB</b>	<b>HCT</b>	<b>WBC</b>	<b>PLT</b>	<b>#NE</b>	<b>#LY</b>	<b>ALB.</b>	<b>KREA.</b>	<b>CRP</b>
<b>MM1</b>	66	E	9,17	27,6	5,98	41	3,57	0,3	12,7	3,62	1
<b>MM2</b>	63	E	11,99	37,1	5	88	2,29	1,62	2,9	0,69	2,7
<b>MM3</b>	63	K	10,79	32,4	10,4	264	6,42	0,79	4,4	0,79	6,3
<b>MM4</b>	77	K	8,84	27,9	2,51	188	1,42	0,41	4,3	0,92	2,8
<b>MM5</b>	61	E	12,1	36,6	3,8	179	1,3	2,52	2,9	0,6	7,7
<b>MM6</b>	73	E	10,44	32,5	5,41	109	3,76	1,53	4,2	1,7	1

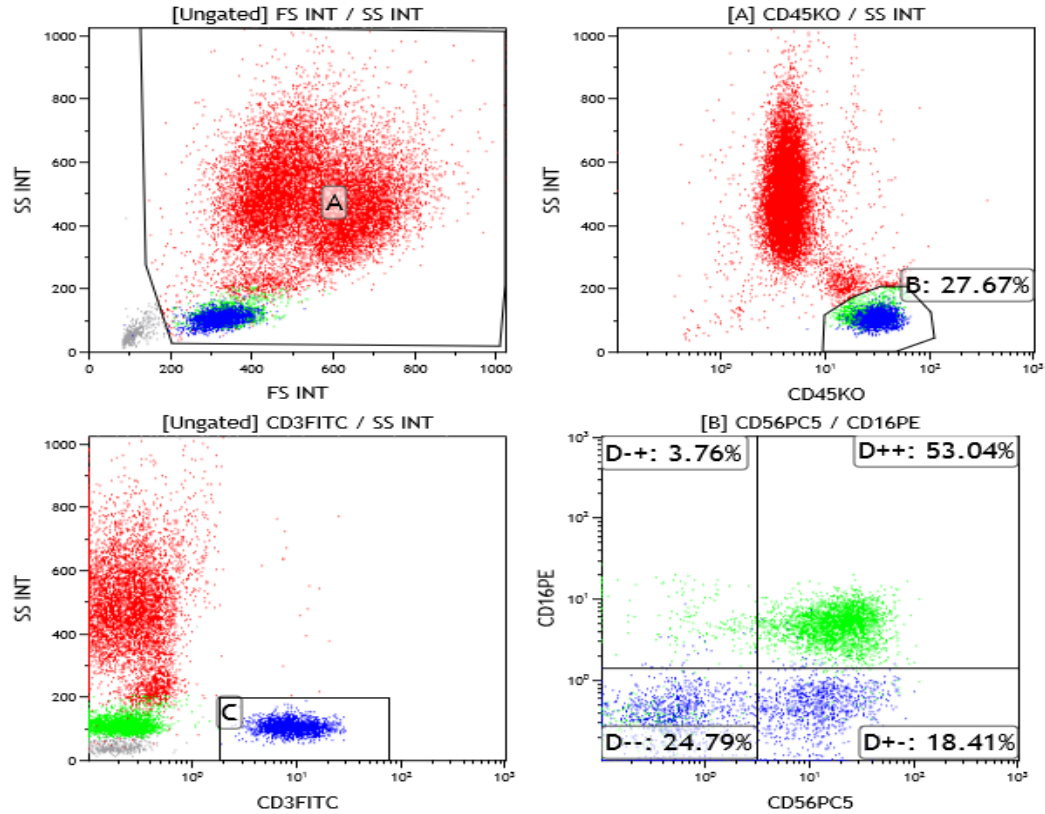
MM7	44	K	13,82	41	13,3	283	5,31	3,78	4,4	0,34	11
MM8	58	E	7,11	21,6	3,8	296	6,34	1,27	4,3	3,97	4,8
MM9	69	E	12,44	37,1	6,8	239	4,96	2,16	4,6	1,05	1,9
MM10	76	E	12,45	37,7	2,54	129	2,13	0,79	4	1,17	5,4
MM11	76	E	11,44	38	3,6	130	2,3	1,24	5	1,7	2,4
MM12	55	K	10,32	35,5	2,6	144	0,87	1,25	4,3	0,89	3,4
MM13	67	K	12,56	33	2,54	174	3,46	2,69	4,6	2,2	2,3
MM14	56	K	9,52	40	7,09	262	3,7	2,8	4,5	0,74	2,1
MM15	50	E	12,11	29	12,5	159	10,4	1,21	3,1	2,74	4,5
M1	55	K	13,8	39,80	7	54	3,8	2,47	--	0,56	----
M2	41	K	9,64	29,30	3,3	209	2,2	0,82	--	2,1	1
M3	47	K	8,58	28,30	6,22	252	3,84	1,8	--	0,72	4,1
M4	53	K	12,59	37,80	6,9	218	4,4	1,81	--	0,88	2,6
M5	49	K	10,83	33	9,01	352	6,36	1,62	4,1	0,53	2,8
M6	49	K	14,07	42	4,86	198	3,14	1,2	3,6	0,46	3,4
M7	48	K	12,92	37,80	9,76	239	6,19	2,8	4,2	0,84	1
M8	34	K	11,58	34,40	4,8	320	3,22	1,08	4,3	0,80	1
M9	47	K	12,13	35,40	5,24	182	2,66	1,92	4,7	0,91	----
M10	52	K	13,09	39,40	3,8	179	1,59	1,87	----	0,63	2,2
M11	48	K	12,94	39	8,4	319	5,11	2,35	----	0,69	9,3
M12	50	K	9	26	2,22	188	1,42	0,41	---	0,59	1,4
M13	65	K	10,03	31,06	5,11	245	1,88	2,73	---	0,73	1,5
M14	63	K	12,35	38,60	14,69	274	3,56	3,7	4,9	0,92	---
M15	45	E	12,64	38	10,74	217	7,5	3,89	4,6	0,67	1
M16	52	E	11,87	41,5	8,58	189	4,34	2,41	4,3	1,13	12,8
A1	57	E	13,2	39,5	7,35	269	3,12	2,35	----	0,71	1
A2	45	E	12,6	38	10,34	217	7,37	2,42	2,6	0,68	12,9
A3	54	E	12,82	39,2	6,92	280	3,81	1,5	3,5	0,57	2,2
A4	56	E	11,87	36,20	9,04	220	5,09	3,76	4,14	0,66	----
A5	64	E	8,5	27	7,61	397	7,61	0,78	4,2	0,71	19,3
A6	58	E	13,25	40	14,12	370	8,73	4,34	5	1,18	3,6
A7	67	E	12,25	37	4,9	190	3,65	4,2	3,4	0,03	105

(MM: Multiple Myelom, M: Meme Ca, A: Akciğer Ca) (HGB: g/dL, HCT: %, WBC: uL, #Ne: 10<sup>3</sup>/uL, #Ly: 10<sup>3</sup>/uL, Albümin: g/dL, Kreatinin: mg/dL, CRP: uL, PLT: 10<sup>3</sup>/uL,)

#### 4.2. Akım Sitometrisi ile NK Hücrelerinin Belirlenmesi

Akım sitometri ile yapılan immünofenotipik analiz ile NK hücrelerinin yüzdeleri kontrol ve hasta gruplarında belirlendi. Şekil 4.1’de CD3-/CD56+/CD16+ ile belirlenmiş NK hücre yüzdesini ve CD3 pozitifliği ile belirlenmiş T lenfosit yüzdesini gösteren bir örnek çalışma sunulmuştur. Kontrol ve hasta gruplarındaki NK hücre yüzdeleri karşılaştırılmalı olarak Çizelge 8’de verilmiştir. NK hücre yüzdesi açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu. Ancak NK hücre yüzdesi en yüksek %17,1 ile myelom hastalarında, en düşük ise %9,5 ile

kontrol grubunda saptandı. CD3 pozitifliği ile belirlenen T lenfosit yüzdeleri karşılaştırmalı olarak Çizelge 8’de verilmiştir. Akciğer ve meme kanserli hastalarda T lenfosit yüzdeleri daha düşük gözlene de gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu.



**Şekil 4.1** Akım sitometrisi ile NK hücrelerin T lenfositlerin belirlenmesi

### 4.3. Hücre Canlılık Testi

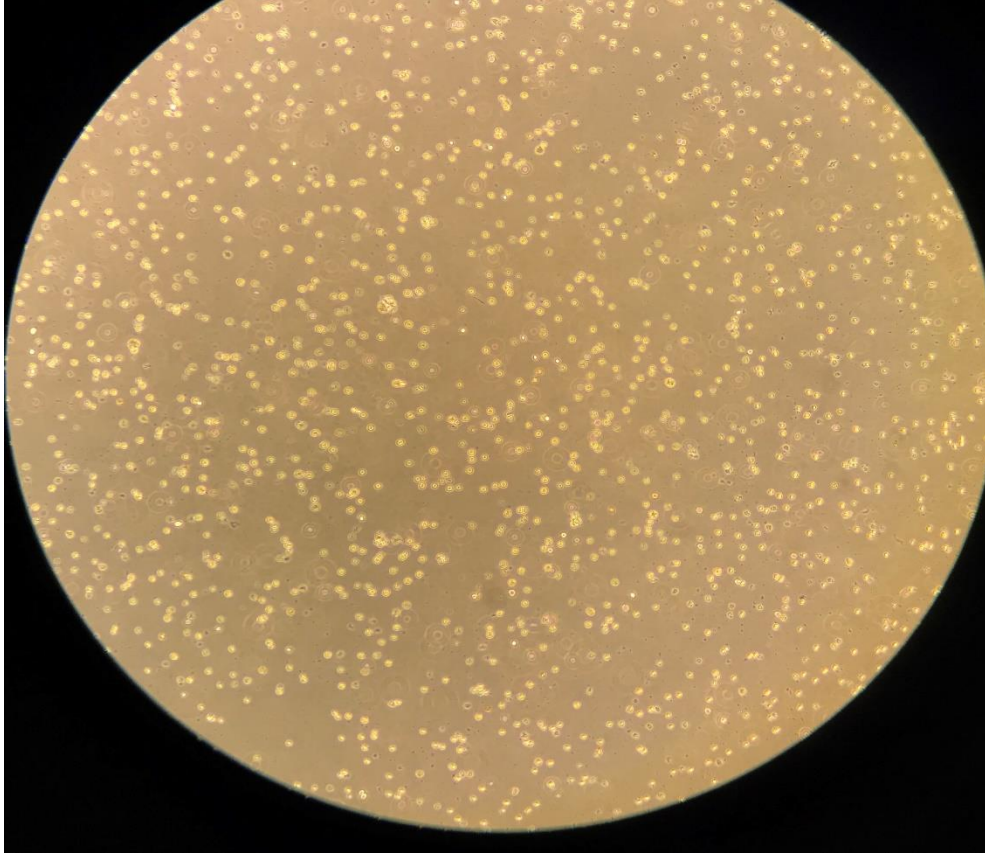
Çalışmamızın bu kısmında Ficoll-Hypaque yöntemi ile izole edilen PBMC’leri ile K562 hücreleri Thoma lamı ile sayıldı ve canlı hücre sayılarını belirlendi. Ardından K562 hücreleri ve PBMC’leri 24 saat besiyeri ile 37°C’de % 5CO<sub>2</sub> ortamda inkübasyona bırakılıp tekrar canlı hücre sayımı yapıldı. İlk yapılan sayım ile inkübe edilip çoğaltılan hücrelerin sayımı arasındaki değişim oranları incelendi (Çizelge 7). Elde edilen sonuçlarda canlılığın 24 saat inkübe edilip çoğaltıldıktan sonra arttığı için çalışmanın diğer basamaklarına geçmeden önce PBMC’ler 24 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra çalışmaya devam edildi. İnkübasyon sonrası hücrelerin görüntüleri Şekil 4.2’de verilmiştir (Şekil4.2-K562, Şekil 4.3-Myelom, Şekil 4.4-meme Ca, Şekil 4.5, akciğer Ca).

$$\text{Canlı hücre sayısı/ml} = N \times 2 \times 10^4$$

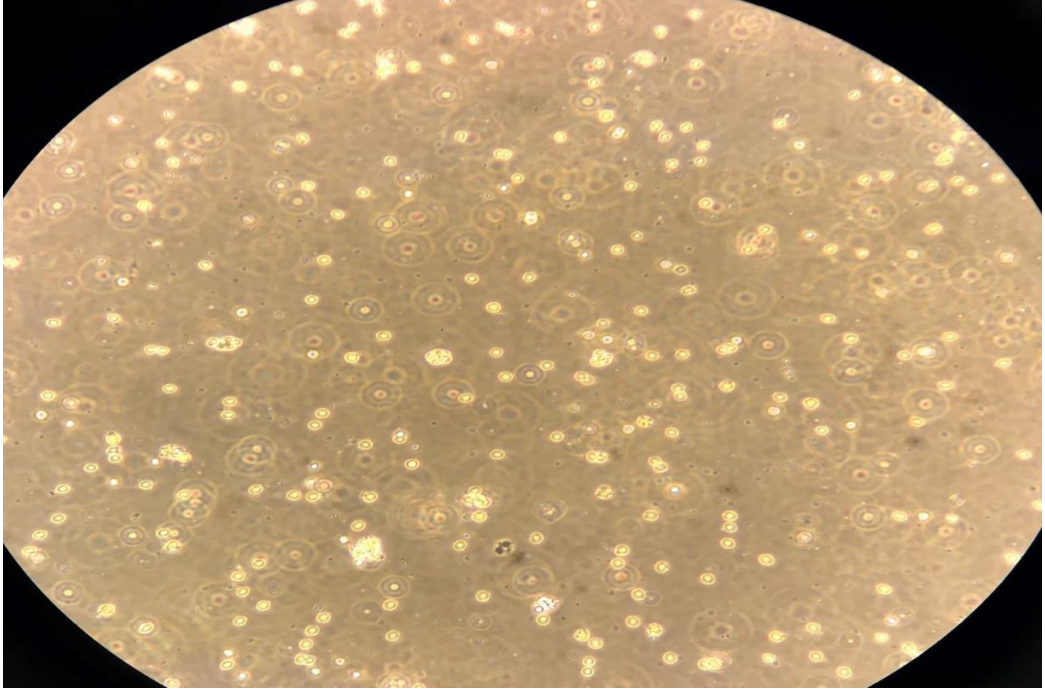
**N=lam üzerindeki sayma alanındaki hücre sayısı.**

**Çizelge 7** Canlı hücre sayılarının inkübasyona bağlı % değişimleri oranları

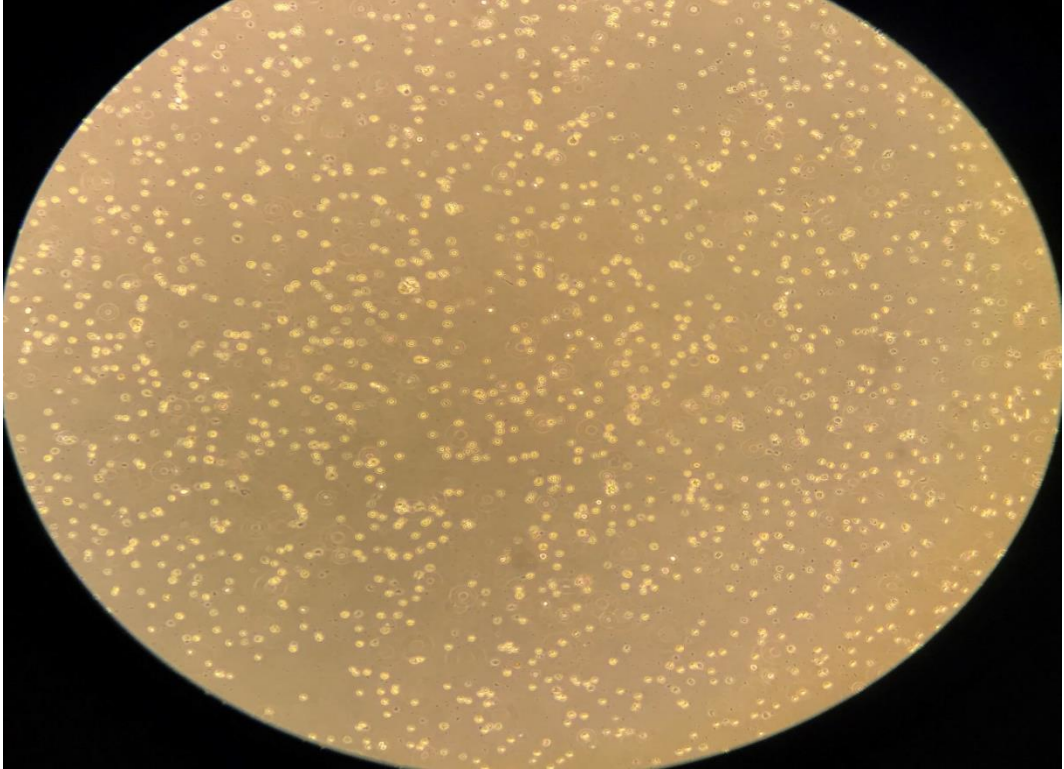
<b>İnkübasyon zamanı</b>	<b>K562</b>	<b>PBMC</b>
<b>0-1 saat</b>	%65	%52
<b>24 saat</b>	%72	%75



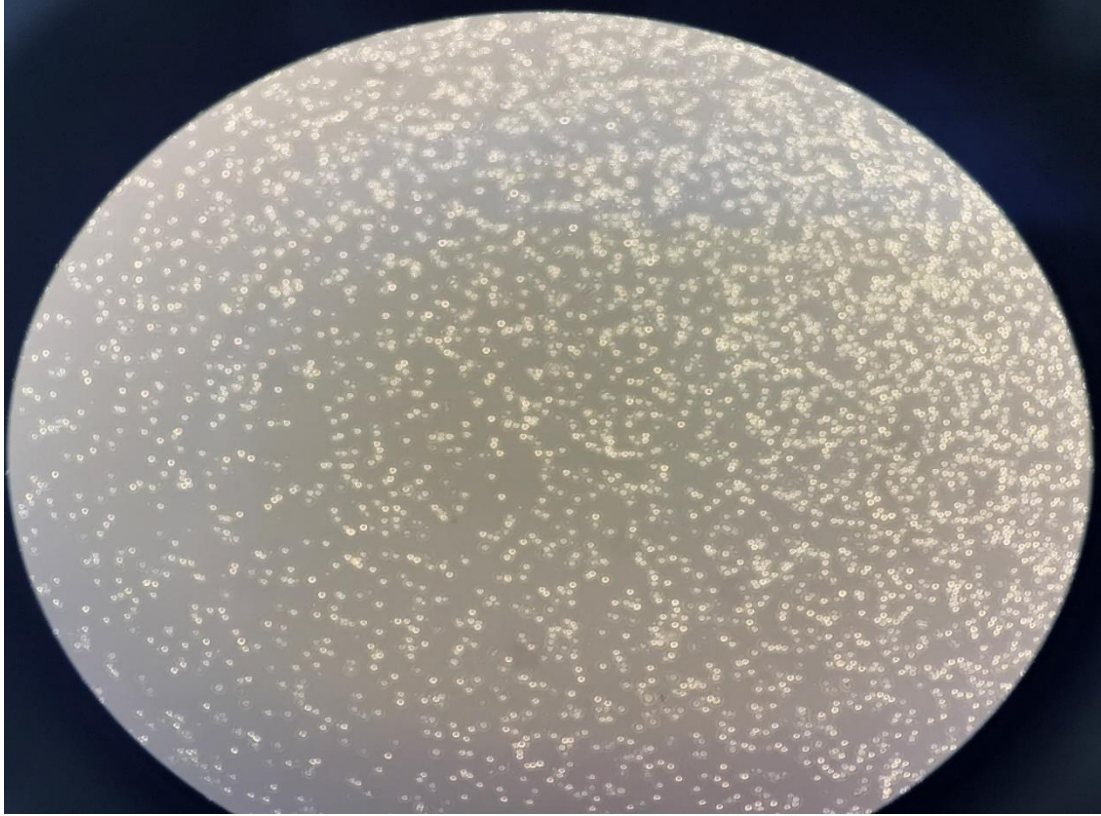
**Şekil 4.2** K562 hücre hattının mikroskobik görüntüsü (inverted mikroskop büyütme: 10X)



**Şekil 4.3** Multiple Myelom sahip bir hastanın PBMC'lerin inverted mikroskopta görüntüsü (Büyütme: 10X)



**Şekil 4.4** Meme Ca'lı hastaya ait olan PBMC'lerin inverted mikroskopta görüntüsü (Büyütme: 10X)



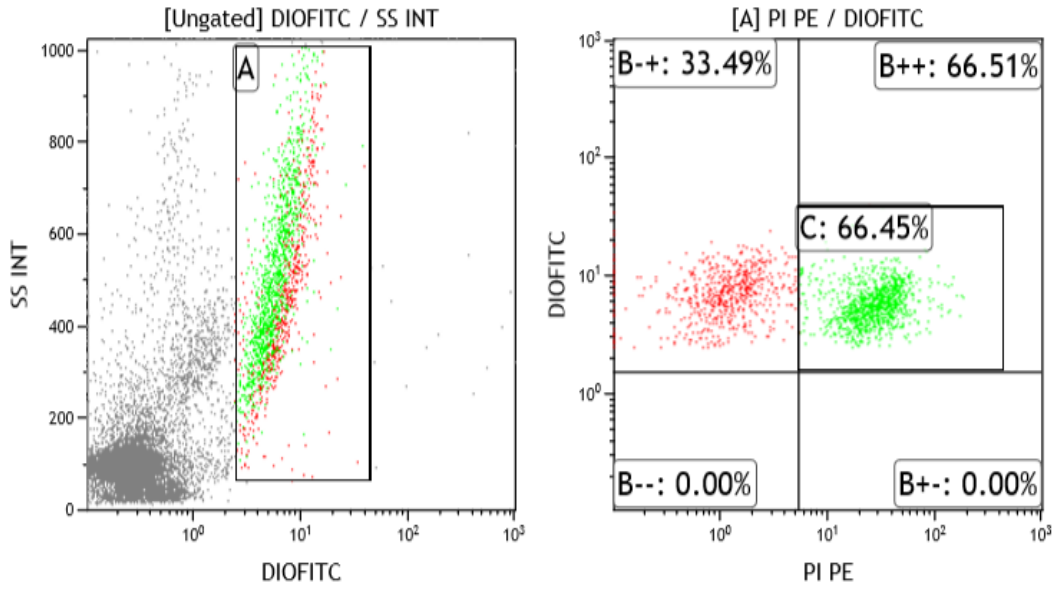
**Şekil 4.5** Akciğer Ca'lı hastanın inverted mikroskopta PBMC'lerin görüntüsü (Büyütme:10x)

#### **4.4. NK Hücre Aktivitesinin Ölçülmesi**

##### **4.4.1. DİO-PI Yöntemi**

DİO-PI yöntemi ile NK hücre aktivitesinin belirlendiği bir hasta örneği Şekil 4.6'da verilmiştir. DİO-PI ortak boyanan hücre yüzdeleri (NK hücre aktivitesi) gruplar arasında karşılaştırmalı olarak Çizelge 8'de verilmiştir. Bu yöntemle NK hücre aktivitesi en yüksek akciğer Ca'lı hastalarda (%47,9) tespit edilmiştir. En düşük aktivite kontrol grubunda (%42,4) mevcuttu. Saptanan farklılıklara rağmen muhtemelen grupların denek sayısının düşük olması nedeniyle gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark bulunamadı.

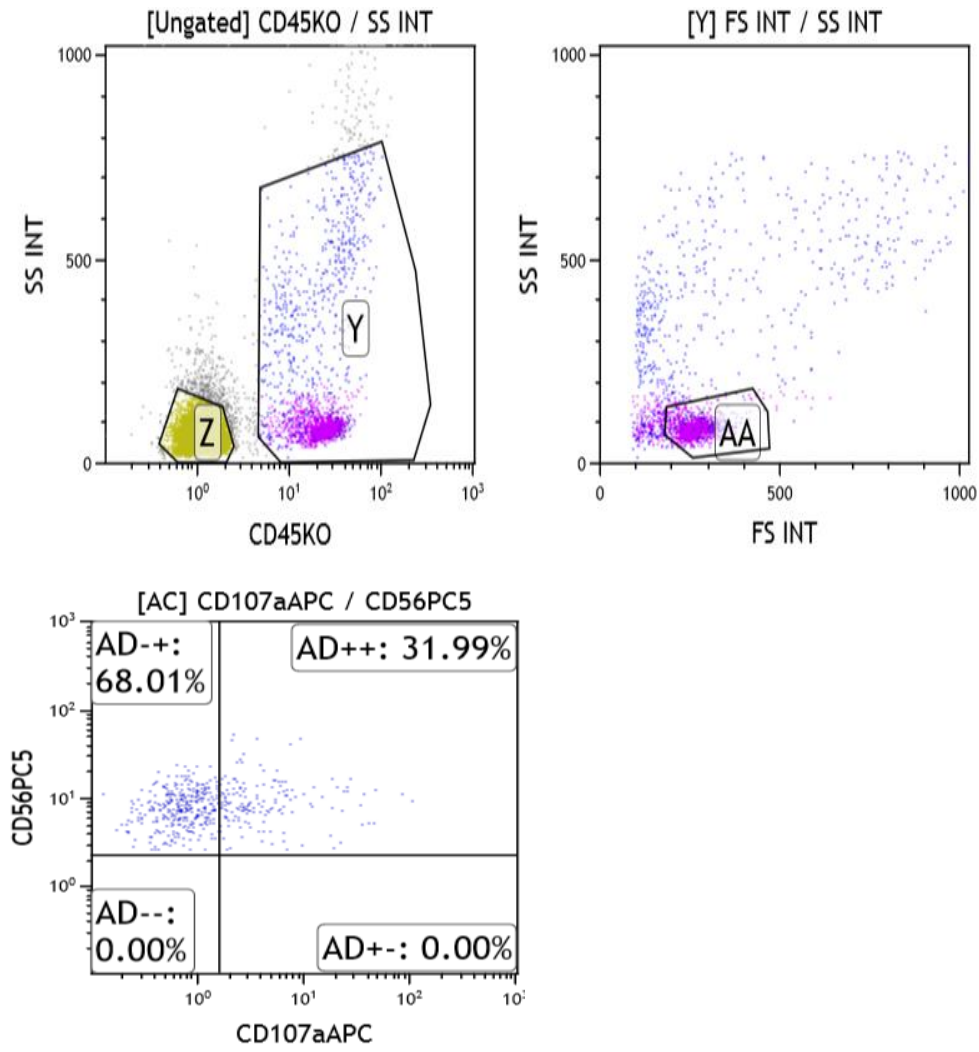




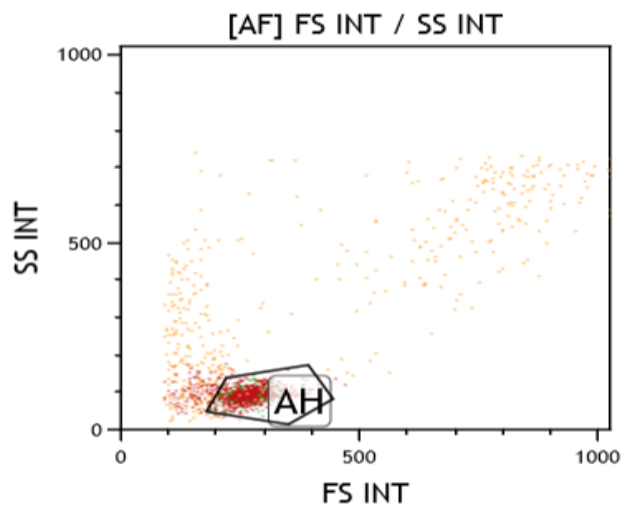
Şekil 4.6 DİO- PI yöntemi ile NK hücre aktivitesinin ölçülmesi

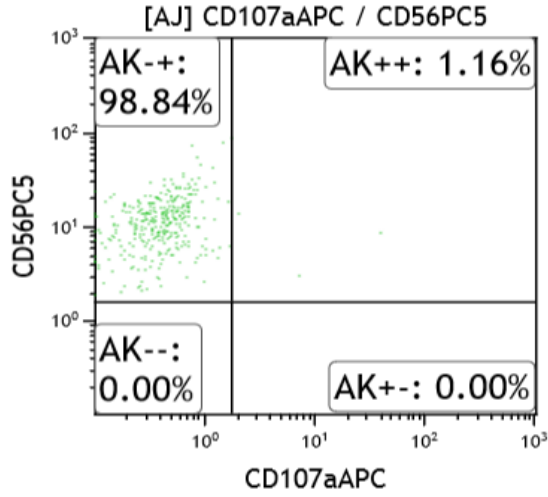
#### 4.5. CD107a ekspresyon yöntemi

Bu yöntemde CD107a ekspresyonu ile NK hücre aktivitesi, NK hücrelerinin PMA-Ionomycin veya K562 hücreleri ile uyarılması ve hiçbir uyarının kullanılmadığı durumda akım sitometride ölçüldü. (Şekil 4.7, 4.8, 4.9) Her üç durumdaki NK hücre aktivitesi (CD107a ekspresyon yüzdesi) Çizelge 8'de karşılaştırılmalı olarak verilmiştir. CD107a ekspresyonu PMA-Ionomycin uyarınları ile K562 hücrelerine kıyasla daha yüksek gözlemlendi. CD107a ekspresyonu (NK hücre aktivitesi), hem PMA/ionomisin hem de K562'nin uyarın olarak kullanılması durumunda en yüksek akciğer Ca'lı hastalarda (sırasıyla %16,2 ve %4,8) gözlemlendi. Ancak bu yükseklik muhtemelen grupların küçük olması nedeni ile istatistiksel öneme ulaşmadı.

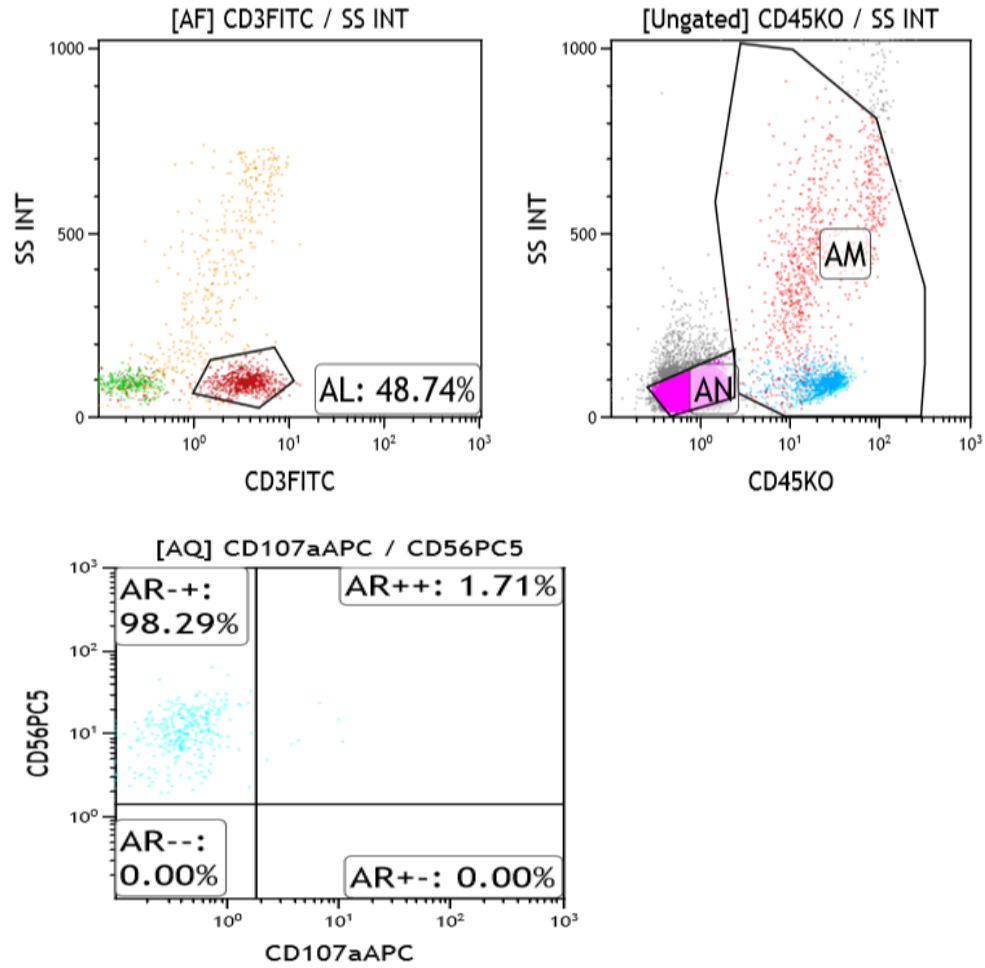


Şekil 4.7 PMA-Ionomycin ile NK hücre aktivitesi (CD107a ekspresyon yüzdesi)





Şekil 4.8 Uyarısız NK hücre aktivitesi ve CD107a ekspresyonu



Şekil 4.9 K562 ile NK hücre aktivitesi ve CD107a ekspresyonu

**Çizelge 8** Hasta grupları ve kontrol grubu arasındaki NK hücre aktivite ve CD107a ekspresyon analizi

	NK- Kontrol	NK- Akciğer	NK- Meme	NK- M.Myelom	P
<b>DİO-PI</b>	42,4	47,9	47,1	42,6	0,892
<b>CD107a-PMA</b>	9,3	16,2	11,4	10,5	0,679
<b>CD107a-K562</b>	1,9	4,8	1,9	2,2	0,789
<b>CD107aUyarısız</b>	1,4	2,6	1,2	1,3	0,982
<b>NK hücre</b>	9,5	12,3	14,6	17,1	0,264
<b>T-LENFOSİT</b>	60	51,1	56	59,2	0.231

#### **Korelasyon analizleri:**

Myelom hastalarında hastalık durumu ve alınan tedavi ile NK hücre sayısı ve aktivitesi, meme ve akciğer Ca'lı hastalarda hastalık evresi ile NK hücre sayısı ve aktivitesi arasındaki ilişki araştırıldı. Çizelge 9, Çizelge 10, Çizelge 11'de korelasyonları gösteren tablolar verilmiştir. Evre ve alınan tedavi ile NK hücre sayısı veya aktivitesi arasında hiçbir gruptan istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanamadı. Bunun en büyük sebebi çalışılan gruplarda bulunan deneklerin sayıca yetersiz olmasıyla ilişkilidir.

**Çizelge 9** Myelom hastalarında hastalık durumu ve alınan tedavi ile NK hücre aktivitesi arasındaki ilişki

Hastalar	Dio/PI	CD107a- PMA	CD107a-Uy.	CD107a- K562
<b>IMID alan(n:9)</b>	34,9 ±23,47	12,4 ±7,02	1,5 ±1,23	3 ±3
<b>IMID almayan (n:6)</b>	54,2 ±15,1	7,8 ±2,49	1,1 ±0,47	1,1 ±1,21
<b>P değeri</b>	0,088	0,224	0,181	0,955
<b>Protezom inh alan (n:10)</b>	42,5 ±21,16	10,1 ±5,94	1,3 ±0,74	1,76 ±1,77
<b>Protezom inh almayan (n:5)</b>	42,9 ±26,7	11,4 ±6,66	1,4 ±1,46	3,2 ±3,70
<b>P değeri</b>	0,953	0,768	0,440	0,768
<b>İlk basmak (n:11)</b>	42,5 ±24,24	10,7 ±6,74	1,5 ±1,08	2,6 ±288
<b>Nüks/dirençi (n:14)</b>	42,9 ±18,34	10,1 ±3,92	0,9 ±0,50	1,1 ±0,64
<b>P değeri</b>	0,949	1	0,417	0,571

(Bütün parametreler ort±SD olarak verilmiştir.)

**Çizelge 10** Akciğer Ca'lı hastaların hastalık evresi ile NK hücre aktivitesi arasındaki ilişki

Hastalar	DİO/PI	CD107a-PMA	CD107a-Uy.	CD107a-K562
<b>Akciğer Ca Evre-1 (n:2)</b>	35,3 ±29,9	14,9±9,40	1,9±0,10	4,2±4,0
<b>Akciğer Ca Evre -2 (n:9)</b>	50,4±15,37	14,5±12,80	0,7±0,57	0,9±0,73
<b>P</b>	1	0,480	0,059	0,239

Cinsiyet dışındaki bütün parametreler ort±SD olarak verilmiştir.

**Çizelge 11** Meme Ca'lı hastaların hastalık evresi ile NK hücre aktivitesi arasındaki ilişki

Hastalar	DİO/PI	CD107a-PMA	CD107a-Uy.	CD107a-K562
<b>Akciğer Ca Evre-1 (n:2)</b>	35,3 ±29,9	14,9±9,40	1,9±0,10	4,2±4,0
<b>Akciğer Ca Evre -2 (n:9)</b>	50,4±15,37	14,5±12,80	0,7±0,57	0,9±0,73
<b>P</b>	1	0,480	0,059	0,239

Cinsiyet dışındaki bütün parametreler ort±SD olarak verilmiştir.

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

İmmün sistemin vücudumuzu sadece mikroplara karşı değil kansere karşı da koruduğu anlaşıldıktan sonra kansere karşı immünterapi yöntemleri gündeme gelmiştir ve son yıllarda hızla ilerleyerek güncel kanser tedavisinde yerini almaya başlamıştır. Hiç kuşkusuz halen bu alanda kat edilmesi gereken uzun bir yol bulunmaktadır. İmmün sistem kansere karşı etkinliğini bir bütün olarak gösterse de kanser hücrelerinin değişik mekanizmalarla yok edilmesinde, bazı immün sistem hücreleri ön plana çıkmaktadır. Bu hücrelerden biri olan doğal öldürücü (NK) hücreler primer olarak (doğal) innate immünitede rol almakta ancak edinsel immüniteyi de etkilemekte ve ondan etkilenmektedir. NK hücreleri CD3-CD16+CD56+ fenotipine sahiptirler ve periferik kanda akım sitometri ile kolayca tespit edilebilmektedirler (Stites,1994).

NK hücreleri virüsle enfekte olmuş hücreleri hiçbir uyarı olmadan doğrudan tanıyıp, yok etme özelliğine sahiptir. NK hücrelerinin bu fonksiyonu gerçekleştirmek için sayılarının çokluğundan ziyade hedef hücreyi yok ederken aktif olanlarının sayısı önemlidir. NK hücrelerinin sadece virüs ile enfekte olmuş hücreleri değil aynı zamanda bazı HLA sınıf I antijenlerini kaybetmiş kanser hücrelerini de yok edebildiği çok sayıda çalışmada gösterilmiştir. Hiç kuşkusuz NK hücre aktivitesinin yüksek olması kansere karşı savaşta konağa avantaj sağlayacaktır.

NK hücrelerinin aktivitelerini değerlendirmek üzere birçok yöntem araştırılmıştır. Bu yöntemlerden sıklıkla kullanılan ve NK aktivitesini değerlendirmede ‘altın standart’ olarak kabul edilen, Chromium-51 (CR-51) salınım yöntemidir (Valiathan, Lewis, Melillo, Leonard, Alis ve Asthana, 2011).

Cr-51 salınım yöntemi her ne kadar altın standart olarak görülse bile rutin olarak kullanılması zor bir yöntemdir. Bu yöntem radyoaktif maddeler ile çalışıldığı, maliyet olarak pahalı olduğu ve üst düzey laboratuvar şartları gerektirmektedir.

Son yıllarda NK hücre aktivitesi ile ilgili alternatif birçok yöntem araştırılmıştır. Bu yöntemler genellikle akım sitometri temellidir. NK hücrelerinin aktivitelerini değerlendirmek için yapılan çalışmalarda genellikle K562 lösemi hücre hattı kullanılmaktadır. Bu hücre hattının kullanılmasının nedeni, NK hücre aktivitesini inhibe etmek için gerekli olan HLA sınıf I antijenlerinden yoksun

olmaları ve NK hücreleri tarafından kolaylıkla yok edilebilmeleridir. Bu amaçla en sık kullanılan yöntemde, metot kısmında ayrıntıları ile açıklandığı üzere, K562 hücreleri periferik kan mononükleer hücreleri ile belli süre inkübe edildikten sonra, DİO ve PI ile boyama yapılmaktadır. K562 hücreleri Dio ile ölü hücreler ise PI ile boyanmakta, DIO ve PI ile ortak pozitif boyanan hücreler NK hücrelerinin öldürdüğü K562 hücreleri olarak değerlendirilmekte ve NK hücre aktivitesi olarak ifade edilmektedir. Son yıllarda NK hücre aktivitesini değerlendirmekte, bu hücrelerin yüzeyinde CD107a antijeninin ekspresyonunun gösterilmesi pratik bir yöntem olarak ileri sürülmüştür. Şöyle ki, NK hücreleri önce yine K562 hücreleri veya Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) /Ionomycin ile uyarılmakta ardından CD107a ekspresyonu ölçülmektedir. Biz çalışmamızda her iki akım sitometrik temelli yöntemi de kullandık.

Bu yöntemlerin sağlıklı kişilerde ve kanser dışı durumlarda kullanılarak geçerliliklerinin ortaya konduğu bazı çalışmalar aşağıda verilmiştir.

Valiathan ve ark. 20 sağlıklı gönüllüde DİO/PI yöntemi ile NK hücre aktivitesini akım sitometri ile ölçmüşlerdir. Hücreler K562 hücre hattı ile uyarılmıştır. NK hücre aktivitesini arttırmak için kişilere uygun diyet verilmiş ve 1 ile 4 hafta arasında kişiler takibe alınmışlardır. Ortalama NK hücre aktivite yüzdesi (ort=%21.5; SD = 9.3), 1 haftada (ort=% 31.3; SD = 7.9; P = 0.007) önemli ölçüde artmış ve daha sonra 4 haftada (21.5; SD = 8.3) başlangıç seviyesine dönmüştür. Valiathan ve ark. yaptıkları bu çalışma immün sistemi etkileyen çeşitli hastalıkların NK hücre aktivitesini değerlendirmek için kullanılabileceğini vurgulamışlardır. (Valiathan ve ark. 2011).

Shabrish ve ark. yaptıkları bir çalışmada lizozomal ilişkili zar proteini-1' in (LAMP-1, CD107a) degranülasyonu ve ekspresyonunun NK hücrelerinin aktivitelerini belirlemede önemli bir belirteç olduklarını göstermişlerdir. Shabrish ve ark. FHL hasta grupları ve sağlıklı kişilerden oluşan iki grup oluşturmuşlardır. Bu çalışmada NK hücrelerini uyarmak için forbol-12-miristat-13-asetat (PMA) ve Ionomycin (Ca<sup>2+</sup> + -iyonofor) kullanılmıştır. Kişilerin tam kanlarından Ficoll-Hypaque gradyan yöntemi ile PBMC'ler izole edilmiş, hücreler kültüre edilip, uyarıldıktan sonra akım sitometri yöntemiyle analiz edilmişlerdir. Shabrish ve ark. çalışmalarında K562 hücre hattı yerine forbol-12-miristat-13-asetat (PMA) ve

Ionomycin (Ca<sup>2+</sup> + -iyonofor) kullanılmasının aynı uyarıyı sağladığını ve FHL tanısı olan hastalarda NK hücre degranülasyonunun arttığını tespit etmişlerdir. Biz çalışmamızda bu çalışmadan farklı olarak MNH 2 saat değil 4 saat inkübe ederek CD107a ekspresyonunun değerlendirilerek daha iyi sonuçlar aldık. Kullandıkları bu yöntem NK hücre aktivitesi değerlendirmek için uygun maliyetli ve üst düzey laboratuvar koşulları gerektirmediklerinden NK hücre aktivitesini değerlendirmek için alternatif bir yöntem olmuştur (Shabrish ve ark. 2016).

Aktaş ve ark. yaptıkları bir çalışmada NK hücre ve CD8<sup>+</sup> T hücreleri aktivasyonunda CD107a ekspresyonunu değerlendirmişlerdir. Sağlıklı kişilerin Ficoll-Hypaque gradyan yöntemi PBMC'lerini izole etmişler hedef hücre olarak K562 hücre hattını kullanmışlardır. CD107a ekspresyonunu arttırmak için IL-2 kullanan Aktaş ve ark. yaptıkları çalışmanın sonunda CD107a'nın NK hücre ve +CD8 T hücre aktivitesinde belirteç olabileceğini ileri sürmüşlerdir. (Aktaş ve ark. 2009).

Tıbbi literatürde kanserli hastalarda NK hücre sayısı ve aktivitesinin değerlendirildiği az sayıda çalışma mevcuttur. Bu çalışmalardan bazıları aşağıda sunulmuş ve sonuçları çalışmamızdaki bulgularla karşılaştırılmıştır.

Lin ve ark. 1987'de yaptıkları eski bir çalışmada, 50 akciğer kanserli hastada Cr-51 salınım yöntemi ile NK hücre aktivitesini değerlendirmiş ve 20 sağlıklı gönüllü ile karşılaştırmışlardır. İleri evre akciğer kanserli hastalarda (EvreIII-M1) NK hücre sitotoksitesini bozulmuş olarak bulan bu çalışmanın sonuçları bizim çalışma ile uyumsuzdur. Bu çalışmada bizim çalışmamızdan farklı bir yöntem kullanılmıştır. (Lin, Kuo, Huang ve Lin, 1987).

Konjevic ve ark. meme kanserli hastalarda CR51 salınım yöntemi ile periferik kan NK hücre aktivitesini çalışmış ve sağlıklı kontrollerle karşılaştırmışlardır. Aynı çalışmada akım sitometri ile lenfositlerdeki IFN- $\gamma$  seviyeleri ve western blot yöntemi ile pSTAT proteinlerinin ekspresyonu da ölçülmüştür. Araştırmacılar, meme kanserli hastalarda NK hücre aktivitesinin azaldığını ve yine IFN- $\gamma$  düzeylerinin ve T ve NK hücrelerinin pSTAT1,3,5 protein ekspresyonlarının kontrol grubuna göre azaldığını tespit etmişlerdir. Bunların ötesinde meme kanserli hastalarda hastalığın evresinin artışı ile NK hücre aktivitesinin ve pSTAT proteinlerinin ekspresyonunun azaldığını bildirmişlerdir.



(Konjevic ve ark. 2011). Konjevic ve arkadaşlarının NK hücre aktivitesinin fonksiyonel ve yapısal (protein ekspresyon değişiklikleri) olarak azaldığını gösterdikleri bu çalışma NK aktivitesinde azalmanın ortaya konulmadığı bizim çalışmamız ile uyumlu değildir. Çalışmamızda meme kanserli hastalarımızın tamamına yakını, adjuvan tedavi alacak olan erken evre (lokal ve lokal ileri) hastalardı. Bu nedenle, NK hücre aktivitelerini bozacak bir immün sistem değişikliğinin hastalarımızda henüz oluşmamış olması ile bu uyumsuzluk açıklanabilir. Yine yöntem farklılığı iki çalışmanın sonuçlarının karşılaştırılmasında dikkate alınması gereken bir faktördür.

Bizim yaptığımız çalışmada farklı kanser tiplerinde periferik kanda NK hücre yüzdesi ve NK hücre aktivitesi ölçülmüştür. Normal sağlıklı kişilerde de bu parametreler karşılaştırmak amacıyla çalışılmıştır. NK hücre yüzdesi ve aktivitesinin kanser türleri arasındaki farklılıkların yanı sıra kanserin türünün kendi klinik özellikleri ile NK hücre aktivitesi arasındaki ilişki de çalışmamızda araştırılmıştır. NK hücre aktivite ölçümünde yukarıda ayrıntıları ifade edilmiş olan DİO/PI ve CD107a ekspresyonunu ölçümüne dayanan iki farklı akım sitometrik yöntem kullanılmıştır.

Çalışmamızda kanser türleri arasında ve kanser türleri ile sağlıklı kontroller arasında NK hücre yüzdesi ve iki ayrı yöntem ile bakılan NK hücre aktivitesi açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilememiştir. Ancak özellikle CD107a ekspresyonu ile değerlendirilen NK hücre aktivitesi akciğer kanserli hastalarda oldukça yüksek tespit edildi.

NK hücre yüzdesi multiple myelomlu hastalarda diğer gruplara göre yüksek olmasına rağmen diğer iki kanser grubuna göre aktiviteleri daha düşük saptandı. Gruplara arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmaması gruplardaki denek sayısının azlığı ve dağılımın heterojen oluşu ile ilişkili olduğu düşünüldü.

Birkaç çalışmada farklı klinik evrelerdeki myelom hastalarında NK hücrelerinin sayı, fenotip ve fonksiyonel özellikleri değerlendirilmiş ve multiple myelomun ilerlemesi ile bu parametrelerdeki değişim arasında ilişki olduğu belirlenmiştir (Fionda ve ark. 2018). Myelomun erken evresinde çevresel kan NK hücre sayısının normal olduğu hatta arttığı ancak ileri evrelerde NK hücre sayısının azaldığı bildirilmiştir (Garcia ve ark. 1996; Dosani ve ark. 2017). NK hücre

fonksiyonunun myelomun ilerlemesi ile beraber belirgin olarak değişime uğradığı ve ileri evre hastalarda azaldığı ve NK hücre aktivitesi ile myelom hastalarının hastaliksız yaşam süreleri arasında pozitif bir korelasyon bulunduğu bildirilmiştir (Jurisic ve ark., 2007; Fionda ve ark. 2018) IMID'ler Cereblon (CRBN) ile etkileşerek IKZF1 ve IKZF3 gibi myelom hücrelerinin çoğalması ve hayatta kalması için elzem olan transkripsiyon faktörlerinin yıkımına yol açarlar (Kronke ve ark., 2014). Bu transkripsiyon faktörleri ayrıca NK hücre yanıtı için önemli olan IL2 ve NK hücre aktive edici ligandların güçlü baskılayıcıları olduğu için IMID'ler tarafından yıkılmaları NK hücre aktivitesini artırmaktadır (Bandyopadhyay ve ark., 2007). Sonuç olarak lenalidomid başta olmak üzere IMID'lerin NK hücre sayısı ve fonksiyonlarını arttırdığı gösterilmiştir (Fionda ve ark., 2018). Çalışmamızda myelom hastalarının çoğunluğu ilk basamak tedavide olan IMID almakta idi. NK hücre sayısı kontrol grubuna göre belirgin yüksekti, NK hücre aktivitesi diğer kanser gruplarına göre düşük olsa da kontrol grubuna göre hafif yüksekti.

Sonuç olarak, çalışmamızda NK hücre aktivitesi, solid organ tümörlerinde daha belirgin olmak üzere, kanser hastalarında kontrol grubuna göre yüksek bulunmuştur. NK hücre sayısı en yüksek multiple myelom hastalarında bulunmuş ve IMID kullanımı ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür. Gruplar arasındaki farklılıklar, muhtemelen, gruplarda az hasta olması ve grupların istatistiki karşılaştırma için uyumlu olmaması nedeni ile istatistiksel anlamlılığa ulaşmamıştır. Çalışmamızdaki sonuçların daha geniş ve homojen hasta ve kontrol grupları ile çalışılarak teyit edilmesi gereği vardır.

## KAYNAKLAR

Abbas AK, Lichtman AH, Pillaı S. Basic Immunology: Functions and Disorders of The Immune System. 4th Ed. Philadelphia, PA: W.B Saunders Co, 2015.

Aktaş E., Küçüksezer C., Bilgiç S., Erten G., Deniz G. Relationship between CD107a expression and cytotoxic activity. Cellular Immunology 254(2):149-154, 2009.

American Cancer Society, Cancer Immunotherapy, Copyright American Cancer Society. Erişim tarihi:24.05.2015

Aslan G., Tümör İmmünolojisi, Turk. J. Immunol., 15(1), 7-13, 2010.

Badur S. Doğal bağışıklık: Enfeksiyonlara karşı erken savunma sistemi. Temel immünoloji: İmmün sistemin işlev ve bozuklukları. Camcıoğlu Y, Deniz G, Çeviri editörleri.1. baskı. İstanbul: İstanbul medikal yayıncılık; 2007. p.21-41.

Bahram S, Inoko H, Shiina T, et al. MIC and other NKG2D ligands: from none to too many. Curr Opin Immunol. 2005;17:505-509.

Balkwill F. Cancer and the chemokine network. Nat Rev Cancer 2004;4(7):540-50.

Bandyopadhyay S, Dure M, Paroder M, Soto-Nieves N, Puga I, Macian F. Interleukin 2 gene transcription is regulated by Ikaros-induced changes in histone acetylation in anergic T cells. Blood 2007;109:2878–86

Barbaros ve Dikmen, Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 31(4):177-181 2018.

Bauer S, Groh V, Wu J, et al. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. Science. 1999;285:727-729.

Bendelac A, Savage PB, Teyton L. The biology of NKT cells. Annu Rev Immunol 2007;25:297-336.

Biassoni R, Cantoni C, Pende D, Sivori S, Parolini S, Vitale M, Bottino C, Moretta A. Human natural killer cell receptors and co-receptors. Immunol Rev 2001;181:203-14.

Borrego F, Kabat J, Kim DK, et al. Structure and function of major histocompatibility complex (MHC) class I specific receptors expressed on human natural killer (NK) cells. Mol Immunol.;38:637-660.

C. Fionda et al. Cancer Treatment Reviews 70 (2018) 255–264

C. Fionda et al. *Cancer Treatment Reviews* 70 (2018) 255–264

Chimal-Ramirez G. K., Espinoza-Sanchez N. A., Fuentes-Panana E. M., Protumor Activities of the Immune Response: Insights in the Mechanisms of Immunological Shift, Oncotraining and Oncopromotion, *Journal of Oncology*, 2013, 1-16, 2013.

Chinen J, Finkelman F, Shearer WT. Advances in basic and clinical immunology. *J Allergy Clin Immunol* 2006;118:489-95.

Coudert JD, Held W. The role of the NKG2D receptor for tumor immunity. *Sem Can Biol.* 2006;16:333-343.

Curiel T. J., *Cancer Immunotherapy: Paradigms, Practice and Promise*, s. 5, Springer Science+Business Media, New York, 2013.

Demirelli F. H., Hedefe Yönelik Kanser Tedavisi ve Monoklonal Antikorlar,” *ANKEM Derg.*, 19(Suppl 2), 123-125, 2005.

Deniz G., NK ve NKT Hücreler: Türkiye Klinikleri. 2007, 3(43): 18-25

Diker KS. 1998. İmmoloji. Medisan Yayınevi. ANKARA Philadelphia, 2001; 183-199.

Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nature Immunol*, 2002; 3: 991-998.

Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The Immunobiology of Cancer Immunosurveillance and Immunoediting. *Immunity*, 2004; 21: 137-148

Dzivenu OK, O'Donnell-Tormey P., O'Donnell-Tormey J. *Cancer and the Immune System: The Vital Connection*. Cancer Research Institute, Resources and Publications. (2009). <http://www.cancerresearch.org/Resources.aspx?id=572>

Eskander R. M., Tewari K. S., Immunotherapy: An Evolving Paradigm in the Treatment of Advanced Cervical Cancer, *Clinical Therapeutics*, 37(1), 20-38, 2015.

Garcia-Sanz R, *Br J Haematol* 1996;93:81; Dosani T, *Leuk Lymphoma* 2017:1–6.

Greenberg PD. Mechanism of Tumor Immunology. In: Parslow TG, Stites DP, Terr AI, Imboden JB, eds. *Medical Immunology*. 10th ed. New York, NY: McGraw-Hill, 2001; 568-57

Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* 2010; 140(6):883-99.

Han J., Monoclonal Antibodies as Cancer Therapeutics, N.A.J.Med Sci.,3(3), 146-151, 2010.

Harris T. J., Drake C. G., Primer on Tumor Immunology and Cancer Immunotherapy, Journal for ImmunoTherapy of Cancer, 1(12), 1-9, 2013.

Hoffbrand AV, Pettit JE. Normal haemopoiesis and blood cells.. In: Hoffbrand AV, Pettit JE, eds. Clinical Haematology, 2nd edn. London: Hardcover, 1994:26.

Hokland M, Kuppen PJ. Natural killer cells: from "disturbing" background to central players of immune responses.Mol Immunol 2005;42:381-3.

[http://www.floradergisi.org/getFileContent.aspx?op=html&ref\\_id=56&file\\_name=1997-2-2-138-145.htm&\\_pk=7fba34f2-c36c-42b9-a997-b710b3597412](http://www.floradergisi.org/getFileContent.aspx?op=html&ref_id=56&file_name=1997-2-2-138-145.htm&_pk=7fba34f2-c36c-42b9-a997-b710b3597412)

[http://www.rndsystems.com/mini\\_review\\_detail\\_objectname\\_MR02\\_NKG2D.aspx](http://www.rndsystems.com/mini_review_detail_objectname_MR02_NKG2D.aspx)

[http://www.rndsystems.com/mini\\_review\\_detail\\_objectname\\_MR02\\_NKG2D.aspx](http://www.rndsystems.com/mini_review_detail_objectname_MR02_NKG2D.aspx)

<https://www.newsmedical.net/health/Cytokine-Classification.aspx>

(<http://pathology.jhu.edu/pc/BasicTypes1.php?area=ba>)

Jamieson AM, Diefenbach A, McMahan CW, et al. The role of the NKG2D immunoreceptor in immune cell activation and natural killing. Immunity. 2002;17:19-29

Judith A. Owen, Jenni Punt, Sharon A. Stranford. Kuby Immunology, 7th Edition. Macmillan, USA, 2007.

Jurisc V, Med Oncol 2007;24:312–7; C. Fionda et al. Cancer Treatment Reviews 70 (2018) 255–264)

Kırmaz C., Özentürk Ö., Malignitelere Karşı Gelişen İmmün Yanıt, Astım Allerji İmmünoloji, 2(3), 167-174, 2004.

Kim R, Emi M, Tanabe K. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. J Immunol, 2007 ; 121; 1-14

Kim R., Emi M., Tanabe K., Cancer Immunoediting from Immune surveillance to Immune Escape, Immunology, 121, 1-14, 2007.

Kronke J, Udeshi ND, Narla A, Grauman P, Hurst SN, McConkey M, Svinkina T, Heckl D, Comer E, Li X, Ciarlo C, Hartman E, Munshi N, Schenone M,

Schreiber SL, Carr SA, Ebert BL. Lenalidomide causes selective degradation of IKZF1 and IKZF3 in multiple myeloma cells. *Science* 2014;343:301–5

Laloo F (ed). *Genetics for Oncologists: The Molecular Genetic Basis of Oncologic Disorders*. Oxford: Remedica Publishing, 2002.

Ljunggren HG, Kärre K. In search of the 'missing self' MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today* 1990;11:237-44.

Loza MJ, Metelitsa LS, Perussia B. NKT and T cells: coordinate regulation of NK-like phenotype and cytokine production. *Europ J Immunol* 2002;32:3453-62.

Luster AD, Leder P. IP-10, a C-X-C chemokine, elicits a potent thymus-dependent antitumor response in vivo. *J Exp Med* 1993;178(3):1057-65.

Moretta A, Biassoni R, Bottino C, Mingari MC, Moretta L. Natural cytotoxicity receptors that trigger human NK cell-mediated cytotoxicity. *Immunol Today* 2000;21:228-34.

Orange JS, Ballas ZK. Natural killer cells in human disease. *Clin Immunol* 2006;118:1-10.

Örnek O. IL-12 ve IL-15 ile uyarılmış insan NK hücrelerinin kolon karsinomuna yönelik antitümöral etkileri. Doktora Tezi; İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 2007.

Özet G., Baykal Y., Özet A., Alanoğlu G., Adoptif İmmünoterapi, *T. Klin. Tıp Bilimleri*, 16(5), 329-332, 1996.

Paraskevas F. Effector Mechanisms in Immunity. In: Greer JP, Foerster J, Lukens JN, Rodgers GM, Paraskevas F, eds. *Wintrobe's Clinical Hematology*, 11th edn. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, A Wolter Kluwer Co, 2004: 544-548.

Parish C. R., *Cancer Immunotherapy: The Past, the Present and the Future*, *Immunology and Cell Biology*, 81, 106-113, 2003.

Paul WE. *Fundamental Immunology*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2003.

Petersdorf EW, Schuler KB, Longton GM, et al. Population study of allelic diversity in the human MHC class-I related MIC-A gene. *Immunogenetics*. 1999;49:605-612.

Porth CM. Essentials of Pathophysiology: Concepts of Altered Health States. Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins; 2004. p. 134-149.

Raulet DH. Immunology. A sense of something missing. Nature 1992;358:21-2.

Rosenberg SA. Progress in human tumor immunology and immunotherapy. Nature, 2001; 411: 380-384.

Ross MH, Gordon IK, Powlina W. Histology Text and Atlas, 4th edn. Philadelphia, Lippincott-Williams&Wilkins, A Wolter Kluwer Co, 2003: 375-377.

Shabrish S, Gupta M, Madkaikar ., A Modified NK Cell Degranulation Assay Applicable for Routine Evaluation of NK Cell Function. 2016;376-590 (6)

Srivastava P.K. Kansere Karşı İmmunite. In: Male D, Brostoff J, Roth D.B, Roitt I (Ed.). İmir T. (Ceviri Ed.). İmmunoloji. İstanbul: Palme Yayıncılık, 2008; 401-419.

Stephens HA. MICA and MICB genes: can the enigma of their polymorphism be resolved. Trends Immunol. 2001;22:378-385.

Sutherland RL. Molecular basis of carcinogenesis. In: Bishop JF, ed. Cancer Facts: A Concise Oncology Text. London, UK: CRC Press, 1999.

Şakalar Ç., İzgi K., Canatan H., Kanser İmmün Terapi ve Monoklonal Antikorlar, F. Ü. Sağ. Bil. Tıp Derg., 27(2), 105-110, 2013.

Tanaka T, Bai Z, Srinoulprasert Y, Yang BG, Hayasaka H, Miyasaka M. Chemokines in tumor progression and metastasis. Cancer Sci 2005;96(6):317-22.

Valiathan R, Lewis J.E, Melillo A.B, Leonard S, Alis H.K, Asthana D., Evaluation of Flow Cytometry-Based Assay for Natural Killer Cell Activity in Clinical Settings. 2011;365-660.

Virella G. 2007. Medical immunology /edited by Gabriel Virella, 6th ed. New York, Informa Healthcare USA, Inc.

Waldmann T., Immunotherapy: Past, Present and Future, Nature Medicine, 9(3), 269-277, 2003.

Wayteck L., Breckpot K., Demeester J., De Smedt S. C., Raemdonck K., A Personalized View on Cancer Immunotherapy, Cancer Letters, 352(2014), 113-125, 2013.

Willett WC, Hunter D, Colditz GA. Causes of Cancer. In: Graham A, Hingham MA, eds. Cancer Prevention. The Causes and Prevention of Cancer. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2000; 161-172.

Yeşilyurt E, Fidan I: Dendritik hücreler ve enfeksiyonlardaki rolü: Türk Mikrobiyol Cem Derg 41(3):91-102, 2011

Yiğitbaştürk E. Türk popülasyonunda yüksek rezolusyon MHC class-I related chain a (MICA) genotipleme, HLA-B – MICA haplotiplerinin incelenmesi ve yeni MICA alellerinin araştırılması. Doktora Tezi; Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara,2006.

Young NT, Uhrberg M. KIR expression shapes cytotoxic repertoires: A developmental program of survival. *Trend Immunol* 2002;23:71-5.

ZHON R., HAN B and ZHONG H : A PROSPECTIVE STUDY OF THE EFFICACY OF A COMBINATION OF SCIENCE, 2014; 1-13 2014

Zhou J., Advances and Prospects in Cancer Immunotherapy, *New Journal of Science*, 2014, 1-13, 2014.

Zitvogel L, Tesniere A, Kroemer G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat Rev Immunol* 2006;7:15-27.

Zwirner NW, Fuertes MB, Giart MV, et al. Cytokine-driven regulation of NK cell functions in tumor immunity: Role of the MICA-NKG2D system. *Cytokine Growth Fact.* 2007;18:159-170.



## ÖZGEÇMİŞ

Melise YILMAZ

**Adres :** Hürriyet Mahallesi Fikret Hakan Sokak Yeşilköy Sitesi

3.Kısım E Blok Kat:3 Daire: 5 Süleymanpaşa/TEKİRDAĞ

E-mail / Web Site : meliseylmaz@gmail.com

Doğum tarihi : 26.06.1992

Medeni durum : Bekar

Sürücü Belgesi : B Sınıfı

### EĞİTİM BİLGİLERİ

2016- ..... Namık Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi-Tümör  
Biyolojisi ve İmmünolojisi Yüksek Lisans

(Solid ve Hematolojik Neoplazilerde Hücre kültürü çalışması ve Flow  
Sitometri)

2014-2015 Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Eğitim Fakültesi /  
Biyoloji Öğretmenliği

Pedagojik Formasyon

2011-2016 Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Edebiyat  
Fakültesi / Biyoloji Bölümü

Lisans

2006-2010 Tekirdağ Lisesi / Fen-Matematik Alanı

### İŞ DENEYİMİ

16/09/2016 – 31/01/2017 Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi  
Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi-Tıbbi Genetik Laboratuvarı

29/07/2017 – 01.06.2018 Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi  
Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi- Kan Transfüzyon Merkezi

### BİLGİSAYAR BİLGİSİ

Microsoft Office: Word,Excel,Powerpoint,Access,Logo Gold,Eta,Mikro.

### YABANCI DİLLER

İngilizce İYİ

**STAJ-BİLİMSEL Çalışmalar****Staj Deneyimi**

2013-Tekirdağ Devlet Hastanesi-Biyokimya Laboratuvarı

01.02.2017-01.06.2017 – Namık Kemal Üniversitesi Sağlık Uygulama ve  
Araştırma Merkezi –Hematoloji Laboratuvarı

**Bilimsel Çalışmalar**

2015-TÜBİTAK 2209 A Lisans Proje Programı-Proje Yürütücülüğü

2013-Eskişehir Anadolu Üniversitesi Öğrenci Kongresi-Bilimsel Poster

**EKLER****EK-I Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu****ÇALIŞMANIN ADI**

Solid ve Hematolojik Neoplazilerde Doğal Öldürücü Hücre Aktivitesinin Değerlendirilmesi

**Sorumlu Araştırmacı: Prof. Dr. Burhan TURGUT**

**Araştırmanın Amacı:**

Bu çalışma, akciğer kanseri, meme kanseri, kan kanseri hastalarından ve sağlıklı kişilerden alınan çevresel kan hücrelerinde yer alan bağışıklık sisteminin önemli hücrelerinden doğal öldürücü hücrelerin laboratuvar şartlarında aktivitelerinin değerlendirilmesini amaçlamaktadır.

**Araştırmada İzlenecek Yöntem:**

Bu çalışma için sizden EDTA'lı tüplere kan örnekleri alınacaktır. Bunun dışında herhangi bir işlem uygulanmayacaktır.

Bu araştırmanın protokolü, 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:**

Çalışmamızda bir tedavi uygulanmayacaktır.

**Araştırma Sırasında Karşılaşılabilecek Riskler:**

Bu çalışma kan örnekleri ile yapılacak olan hücre kültürü çalışması olup hasta ve sağlıklı bireyler için herhangi bir risk oluşturacak yöntem içermemektedir.

**Araştırma İlacının Olası Yan Etkileri:**

Bu çalışma kan örnekleri ile yapılan hücre kültürü çalışması olduğu için ilaç kullanılmamaktadır.

**Araştırma Süresince 24 Saat Ulaşılabilir Kişi Adı / Soyadı / Telefonu:**

Melise YILMAZ : 05449114312

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 müfettişleri araştırmanın geçerli yasalar ve sağlık makamları mevzuatına uygun olarak yürütülmesini garantilemek üzere araştırmaya ilişkin kayıtlarınızı incelemekle yükümlü olabilirler. Kayıtlarınızdaki 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 araştırmacıya 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 ayrılabileceğimi 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 yürütücüsüne 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**

**Gerekliyse Olur İşlemine Tanık Olan Kişinin Adı / Soyadı / İmzası / Tarih**

**Gerekliyse Yasal Temsilcinin Adı / Soyadı / İmzası / Tarih**

## EK-II

## Etik Kurul Onay Raporu

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

30/11/2017

Sayı: 2017/

Sayın Prof. Dr. Burhan TURGUT

Namık Kemal Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kuruluna sunmuş olduğunuz **"Solid Ve Hematolojik Neoplazilerde Doğal Öldürücü Hücre Aktivitesinin Değerlendirilmesi"** başlıklı ve 2017/107/11/07 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 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 09 28

Ayrıntılı Bilgi İçin: Engin Deniz RENÇBER