



T.C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**KÜÇÜK HÜCRELİ DIŞI AKCİĞER KANSERİNDE
REGÜLATÖR B HÜCRELERİNİN TANIMLANMASI VE ANTI-
TÜMÖRAL HÜCRESEL CEVABA ETKİLERİNİN MOLEKÜLER
MEKANİZMALARININ İNCELENMESİ**

OĞUZHAN KÖSE

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Dr. Öğr. Üyesi DENİZ DURALI

İSTANBUL- 2019

TEZ ONAY FORMU

Kurum : İstanbul Medipol Üniversitesi
Programın Seviyesi : Yüksek Lisans (X) Doktora ()
Anabilim Dalı : Tıbbi Mikrobiyoloji
Tez Sahibi : Oğuzhan KÖSE
Tez Başlığı : Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanserinde Regülatör B Hücrelerinin Tanımlanması ve Anti-Tümöral Hücreyel Cevaba Etkilerinin Moleküler Mekanizmalarının Araştırılması
Sınav Yeri : İstanbul Medipol Üniversite Güney Kampüs
Sınav Tarihi : 09.08.2019

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve nitelik yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman

Dr.Öğr.Üyesi Deniz DURALI

Kurumu

İstanbul Medipol Üniversitesi

İmza



Sınav Jüri Üyeleri

Prof.Dr. Akif TURNA

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa

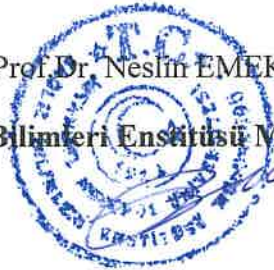
Dr.Öğr.Üye. Fay Celeste MAGNUSSON İstanbul Medipol Üniversitesi



Yukarıdaki jüri kararıyla kabul edilen bu Yüksek Lisans tezi, Enstitü Yönetim Kurulu'nun 26./08./2019. tarih ve 2019.../...27... - .04.. sayılı kararı ile şekil yönünden Tez Yazım Kılavuzuna uygun olduğu onaylanmıştır.

Prof.Dr. Neslin EMEKLİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü V.



BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içerisinde elde ettiğimi, bu tez çalışması ile elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Oğuzhan KÖSE



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince çalışmalarını örnek aldığım, değerli bilgi ve deneyimlerini aktararak yetişmemi ve akademik kimliğimin oluşmasını sağlayan, tecrübeleriyle bundan sonraki yaşamım için ışık tutan, yanında çalışmaktan gurur ve mutluluk duyduğum sayın hocam ve tez danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Deniz DURALI'ya;

Azmi, bilimselliği, disiplini ve çalışkanlığı ile örnek aldığım ve her zaman örnek alacağım, tıp eğitiminin gerektirdiği olanakları, fırsatları ve tüm yardımları bana hoşgörüsüyle sağlayan, emeklerinin karşılığını asla ödeyemeyeceğim Prof. Dr. Akif TURNA'ya;

Bilgisi, anlayışı ve teşvik edici yardımlarıyla yetişmemde büyük emeği geçen, tezimin her aşamasında desteğini sunan, paniklediğimde sakinleşmemi sağlayan değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Özlem GÜVEN'e;

Tez çalışmamın bütün akım sitometri deneylerini yapan, sonuçları analiz etmeyi basite indirgeyerek öğreten, akademik desteğinin yanında manevi desteğini de esirgemeyen, abim bildiğim M.Sc. Emre VATANDAŞLAR'a;

Eğitim sürem boyunca kendileri ile çalışmaktan büyük mutluluk duyduğum, birlikte çok güzel vakit geçirdiğim, yardımlarını ve bilgilerini esirgemeyen bütün meslektaşlarıma ve iş arkadaşlarıma;

Akademi dışında hayatıma dokunan, birlikte eğlendiğim, maddi manevi desteğini esirgemeyen, başta birlikte büyüdüğüm çocukluk arkadaşlarım olmak üzere bütün dostlarıma;

Bugünlere gelmemde desteklerini esirgemeyen, hayallerimin peşinden koşmamı öğreten, sonsuz sevgisiyle her daim ayakta kalmamı sağlayan biricik anneme ve canım kardeşlerime;

Sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI FORMU	i
BEYAN.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
KISALTMALAR LİSTESİ.....	vi
TABLOLAR LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ	x
1 ÖZET.....	1
2 ABSTRACT.....	2
3 GİRİŞ VE AMAÇ.....	3
4 GENEL BİLGİLER	5
4.1 Akciğer Kanseri.....	5
4.2 Epidemiyoloji ve Etiyoloji	5
4.2.1 Epidemiyoloji.....	5
4.2.2 Etiyoloji.....	6
4.3 Sınıflandırma	7
4.4 Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri	9
4.4.1 Tanı	9
4.4.2 TNM Sınıflandırması	10
4.4.3 Evrelendirme	11
4.4.4 Mevcut tedavi.....	16
4.5 İmmün sistem ve edinsel immünite.....	18
4.6 B lenfositleri ve akciğer kanserindeki rolü.....	19
4.7 Regülatör B lenfositler ve akciğer kanserindeki rolü	26
5 MATERYAL METOD	32
5.1 Deney Dizaynı	32
5.2 Materyal.....	32
5.3 Dokulardan Hücre İzolasyonu.....	34
5.3.1 Tümör ve Sağlıklı Dokudan Hücre İzolasyonu.....	34
5.3.2 Lenf Nodu (LN) Hücre İzolasyonu	37
5.3.3 Periferik Kan Mononükleer Hücre İzolasyonu	37

5.4	Manyetikle Aktifleştirilmiş Hücre Ayırıştırılması (MACS)	38
5.5	Floresanla Aktifleştirilmiş Hücre Ayırıştırılması (FACS)	39
5.6	Hücre kültürü.....	40
5.6.1	B lenfosit aktivasyon deneyleri.....	40
5.6.2	Selektif MEK1/2 inhibitör deneyleri.....	42
5.6.3	Eşkültür deneyleri	43
6	BULGULAR.....	47
6.1	Tümör infiltre B lenfositlerinde PD-L1 ifadesi diğer dokulara kıyasla daha yüksek bulunmaktadır	47
6.2	PD-L1 ifadesi BCR/sCD40L uyarımı ile artmaktadır	56
6.3	PD-L1 ifadesi BCR-MEK1/2 yolu üzerinden gerçekleştirilir	60
6.4	Aktive B lenfositler, T lenfosit proliferasyonunu baskılamaktadır	63
7	TARTIŞMA ve SONUÇ	66
8	KAYNAKLAR	69
9	ETİK KURUL ONAYI.....	83
10	ÖZGEÇMİŞ	86

KISALTMALAR LİSTESİ

APC: Allophycocyanin

APC/CY7: Allophycocyanin/Cyanin7

BCR: B Hücre Reseptörü

Breg: Regülatör B Lenfosit

BT: Bilgisayarlı Tomografi

CLP: Ortak Lenfoid Progenitör

CTLA4: Sitotoksik T Lenfosit İlişkili Antijen 4

DAPI: 4',6-Diamidino-2-Phenylindole

EAE: Deneysel Otoimmün Ensefalit

EGFR: Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü

EtOH: Etanol

FACS: Floresanla Aktifleştirilmiş Hücre Ayrıştırılması

FITC: Fluorescein İsothiocyanate

FO: Foliküler B Lenfosit

FOXP3: Forkhead Box Protein P3

FSC: Forward Scatter

GALT: Barsak İlişkili Lenfoid Doku

IARC: Uluslararası Kanser Araştırma Enstitüsü

IASLC: Uluslararası Akciğer Kanseri Çalışmaları Derneği

IFN- γ : İnterferon Gamma

IgM: İmmünoglobulin M

İİAB: İnce İğne Aspirasyon Biyopsisi

IL: İnterlökin

KHAK: Küçük Hücreli Akciğer Kanseri

KHDAK: Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri

LN: Lenf Nodu

LPS: Lipopolisakkarit

LUAD: Adenokarsinom

LUSC: Skuamöz Hücreli Karsinom

MACS: Manyetik Aktifleştirilmiş Hücre Ayrıştırılması

MZ: Marjinal Bölge B Lenfosit

PBMC: Periferik Kan Mononükleer Hücre

PBS: Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi

PD-1: Programlı Ölüm Proteini-1

PD-L1: Programlı Ölüm Ligandı-1

PE: Phycoerythrin

PE/CY7: Phycoerythrin/Cyanin7

PET: Pozitron Emisyon Tomografisi

RA: Romatoid Artrit

RPMI: Roswell Park Memorial Institute Kültür Ortamı

sCD40L: Solübl CD40 Ligandı

SLE: Sistemik Lupus Eritematozus

SSC: Side Scatter

Tfh: Foliküler T Hücre

TIL: Tümör İnfiltrate Lenfosit

TLR: Toll-Benzeri Reseptör

TLS: Üçüncül Lenfoid Yapı

Treg: Regülatör T Lenfosit

VAMLA: Video Yardımlı Mediastinoskopik Lenfadenektomi

VEGFR: Vasküler Endotelyal Büyüme Hormonu Reseptörü

WHO: Dünya Sağlık Örgütü

TABLolar LİSTESİ

Tablo 4.1 WHO akciğer tümörlerinin sınıflandırılması (epitelyal tümörler).....	7
Tablo 4.2 Uluslararası Akciğer Kanseri Çalışma Birliği, akciğer kanseri için T değeri sınıflandırma tablosu.....	12
Tablo 4.3 Uluslararası Akciğer Kanseri Çalışma Birliği, akciğer kanseri için N değeri sınıflandırma tablosu.....	13
Tablo 4.4 Uluslararası Akciğer Kanseri Çalışma Birliği, akciğer kanseri için M değeri sınıflandırma tablosu.....	13
Tablo 4.5 Evrelendirme çeşitleri.	14
Tablo 4.6 Uluslararası Akciğer Kanseri Çalışma Birliği (IASLC) sekizinci versiyonu, TNM sınıflandırmasına göre akciğer kanseri evrelendirmesi.....	15
Tablo 5.1 Kullanılan kimyasal ve biyolojik materyaller ve cihazlar.....	32
Tablo 5.2 Akan hücre ölçer için hazırlanan örnekler ve kullanılan immünofloresan boyalar.....	39

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 4.2.1 2014 yılında Türkiye'de en sık görülen ilk 6 kanser türü (T.C. Sağlık Bakanlığı, "Türkiye Kanser İstatistikleri" raporundan adapte edilmiştir).	6
Şekil 4.6.1 Hematopoietik hücre farklılaşmasının hiyerarşik modellenmesi.	20
Şekil 4.6.2 B lenfosit gelişimine odaklanılmış hematopoietik süreç.	21
Şekil 4.6.3 Germline üzerinde Immunoglobulin H lokusu (Igh) ve birleştirilmiş konfigürasyonu.....	21
Şekil 4.6.4 B hücre gelişimi, özet.	23
Şekil 4.6.5 Kök hücreden plazma hücrelerine B lenfosit gelişim yolu.....	23
Şekil 4.6.6 TIL-B lenfositlerin tümör immunitesine potansiyel katkısı.	25
Şekil 4.7.1 Breg hücrelerin BCR üzerinden aktivasyon yolağı.	28
Şekil 4.7.2 Breg hücrelerin BCR dışındaki aktivasyon yolları.	28
Şekil 4.7.3 Breg hücrelerin T lenfosit regülasyonu.	29
Şekil 4.7.4 Breg hücrelerin hücre-hücre etkileşimi ve apoptoz uyarımı.....	30
Şekil 4.7.5 Fonksiyonel Breg efektör hücre farklılaşması ve regülatör mekanizması	31
Şekil 4.7.6 Kontakt aracılı hücre inhibisyonu.....	31
Şekil 5.5.1 B lenfosit aktivasyon deneyleri için 24-kuyucuklu plaka organizasyonu.	41
Şekil 5.5.2 MEK-ERK inhibisyon deneyleri için 24-kuyucuklu plaka organizasyonu.	43
Şekil 5.5.3 Eşkültür deneyleri için 96-kuyucuklu plaka organizasyonu.....	46
Şekil 6.1.1 Akan hücre ölçer verileri kapılama stratejisi.	48
Şekil 6.1.2 Tümör infiltrate B lenfositlerinin PD-1, PD-L1 ve CD28 yönünden incelenmesi.....	49
Şekil 6.1.3 Distal akciğer doku B lenfositlerinin PD-1, PD-L1 ve CD28 yönünden incelenmesi.....	50
Şekil 6.1.4 Lenf nodu B lenfositlerinin PD-1, PD-L1 ve CD28 yönünden incelenmesi.	51
Şekil 6.1.5 Periferik kan B lenfositlerinin PD-1, PD-L1 ve CD28 yönünden incelenmesi.....	52

Şekil 6.1.6 CD19 kapısı altında bulunan hücrelerin koreseptör yüzdesi	54
Şekil 6.1.7 CD19 ⁺ B lenfositleri ve CD3 ⁺ T lenfositlerinde PD-L1 ifadesinin karşılaştırılması	54
Şekil 6.1.8 CD19 ⁺ B lenfositleri ve CD3 ⁺ T lenfositlerinde PD-1 ifadesinin karşılaştırılması	55
Şekil 6.1.9 CD19 ⁺ B lenfositleri ve CD3 ⁺ T lenfositlerinde CD28 ifadesinin karşılaştırılması	55
Şekil 6.2.1 Uyarılmış PBMC'lerde CD19 ⁺ B lenfositlerinin PD-1, PD-L1 ve CD28 ifadesi	58
Şekil 6.2.2 Uyarılmış PBMC'lerde CD3 ⁺ T lenfositlerinin PD-1, PD-L1 ve CD28 ifadesi	59
Şekil 6.3.1 Uyarılmamış CD19 ⁺ B lenfositlerde PD-1, PD-L1 ve CD28 ifadesi.....	61
Şekil 6.3.2 MEK1/2 inhibitörü yokluğunda BCR+sCD40L ile uyarılmış CD19 ⁺ B lenfositlerde PD-1, PD-L1 ve CD28 ifadesi.	61
Şekil 6.3.3 MEK1/2 inhibitörü varlığında BCR+sCD40L ile uyarılmış CD19 ⁺ B lenfositlerde PD-1, PD-L1 ve CD28 ifadesi.	62
Şekil 6.3.4 MEK1/2 inhibitörünün BCR+sCD40L ile uyarılmış CD19 ⁺ B lenfositlerinde PD-1, PD-L1 ve CD28 ifadesine etkisi.....	62
Şekil 6.3.5 MEK1/2 inhibitörü varlığında BCR+sCD40L ile uyarılmış CD19 ⁺ B lenfositlerinde PD-1, PD-L1 ve CD28 ifadesinin birbirlerine oransal değişimi.....	63
Şekil 6.4.1 Aktive B lenfositlerinin aktive T lenfositleri üzerine popülasyon bağımlı inhibitör etkisi.	64
Şekil 6.4.2 Aktive B lenfositlerinin T lenfositler üzerindeki inhibitör etkisinin oransal değişimi	65

1. ÖZET

KÜÇÜK HÜCRELİ DIŞI AKCIĞER KANSERİNDE REGÜLATÖR B HÜCRELERİNİN TANIMLANMASI VE ANTI-TÜMÖRAL HÜCRESEL CEVABA ETKİLERİNİN MOLEKÜLER MEKANİZMALARININ İNCELENMESİ

Küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) olgularında tümör infiltrate B lenfositlerinin (TIL) PD-L1 ifadesinin regülatör özelliklerinin araştırılması amaçlanmıştır. TNM evrelendirilmesine bağlı olarak T1c veT4 arasında değişen KHDAK olgularında Tümör İnfiltrate Lenfositlerin PD-L1 ekspresyonu akım sitometriyle analiz edilmiş olup, B hücre reseptörü sinyalizasyonunun ve *downstream* MEK-ERK yolağının PD-L1 ifadesine etkisi araştırılmıştır. Son olarak B lenfositlerinin T hücreleri üzerinde inhibitör etkisi olup olmadığına bakılmıştır. TIL-B lenfositlerinin PD-L1 ifadesinin, diğer dokulara kıyasla daha yüksek olduğu ve PD-L1 sinyalizasyonunun BCR-MEK-ERK yolağı üzerinden geçtiği bulunmuştur. BCR aktivasyonu ile B lenfositlerinin, T lenfosit proliferasyonunu baskıladığı gösterilmiştir.

Anahtar kelimeler: İmmünregülasyon, Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri, PD-L1, regülatör B lenfosit, Tümör immünolojisi.

Bu çalışma, TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir. Proje No: 117S046.

2. ABSTRACT

IDENTIFICATION OF REGULATORY B CELLS IN NON-SMALL CELL LUNG CANCER AND INVESTIGATION OF MOLECULAR MECHANISMS OF EFFECTS ON ANTI-TUMORAL CELLULAR RESPONSE

To investigate the regulatory effect of PD-L1 expression in tumor infiltrated B lymphocytes in patients with non-small cell lung cancer (NSCLC). PD-L1 expression of tumor infiltrating lymphocytes (TIL) was analyzed by flow cytometry in patients with NSCLC ranging from T1c and T4 according to TNM staging, and the effect of B cell receptor (BCR) signaling and downstream MEK-ERK pathway on PD-L1 expression was investigated. Finally, B lymphocytes were tested for inhibitory effects on T cells. PD-L1 expression of TIL B lymphocytes was higher than other tissues and PD-L1 signaling was transmitted from BCR-MEK-ERK pathway. B lymphocytes with BCR activation were shown to suppress the proliferation of activated T lymphocytes.

Keywords: Immunoregulation, non-small cell lung cancer, PD-L1, regulatory B lymphocyte, Tumor immunology.

This Project was granted by TUBITAK. Project number: 117S046.

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Akciğer kanseri, dünyada yıllık 1,8 milyon yeni vaka ve 1,6 milyon ölüm vakası ile kanser istatistiklerinde ilk sıralarda yer almaktadır (1). Ülkemizde de erkeklerde en sık görülen kanser olup, ölüm oranlarında da erkeklerde ve kadınlarda ilk sırada yer almaktadır (2). Akciğer kanseri, küçük hücreli (KHAK) ve küçük hücreli dışı (KHDAK) olmak üzere biyolojik özellikleri, klinik seyirleri ve tedavi yaklaşımları açısından birbirinden farklılıklar gösteren iki gruba ayrılmaktadır (2). Akciğer kanserlerinin yaklaşık %85'ini oluşturan KHDAK (Türkiye'de %80,3), bugüne kadar geliştirilmiş etkin bir tarama ve tanı testinin olmayışından dolayı genel olarak ileri evrelerde (evre IIIb/IV) tanısı konulan ve dolayısıyla etkin bir şekilde tedavi edilemeyen kötü prognozlu bir hastalıktır (2,3). Bu hastalar için cerrahi, kemoterapi ve radyoterapi dahil olmak üzere konvansiyonel tedavi seçeneklerinin terapötik etkileri sınırlı olmaktadır.

Kanserin ilerlemesiyle tümöral yapıda immün yanıtı baskılayan bir mikroçevre oluşmaktadır. Söz konusu mikroçevrelerde bulunan faktörler (sitokinler, hipoksik ortamda çıkan moleküller, apoptotik hücre artıkları, vs) immünbaskılayıcı etkileri olan regülatör T hücrelerinin (Treg), immatür dendritik hücrelerinin, tümör-assosiye makrofajların (tumor-associated macrophages-TAM) ve miyeloid kaynaklı baskılayıcı hücrelerinin (myeloid-derived suppressor cells-MDSC) farklılaşmasını ve birikimini sağlamaktadır (4). Benzer şekilde söz konusu tümör mikroçevresinin etkisiyle B hücrelerinin regülatör özellikler kazanabilecek şekilde etkilenebileceğini ve bunun sonucunda kendilerinin de immün baskılayıcı bir işlevlerinin olabileceği düşünülebilir. İmmün sistemin en önemli parçalarından olan B hücrelerinin çeşitli immün kontrol noktası ligand ve reseptör molekülleri ürettiği ve T lenfositlerini etkiledikleri gösterilmiştir (5,6).

Akciğer kanserleri yeni immün-temelli tedavilerin geliştirildiği önemli kanser türlerindedir (7-9). Akciğer kanserlerinde birçok immünoterapi stratejisi klinik çalışmalarda denenmektedir. İmmün kontrol noktası (*checkpoint*) inhibitörleri, terapötik aşı ve spesifik olmayan immün uyaranlar örnek olarak verilebilir (7-9).

İmmün kontrol noktası inhibitörleri olarak PD-1, PD-L1 ve CTLA4 moleküllerini inhibe eden veya antagonist etki gösteren antikorlar (*nivolumab, pembrolizumab, atezolizumab, durvalumab, avelumab, tremelimumab* ve *ipilimumab*) kullanıma girmiş olup ve en çok umut vadedenleridir (9). Bu tedavi stratejisinde amaç anti-tümöral immün yanıtta “frenleri” kaldırıp, immün yanıtın tümöre karşı etkisini arttırmaktır. Söz konusu tedaviler anti-tümöral T hücre aktivasyonunun artmasını sağlamaktadır (7-9). Söz konusu mevcut hedefli tedavilerin etkin kullanımı ve yeni terapötik moleküllerin bulunması anti-tümöral immün yanıtın mekanizmalarının iyi bilinmesini gerekli kılmaktadır.

Bu doğrultuda yapılan çalışmamızın amacı, tümör mikroçevresine bağlı olarak tümör infiltre B hücrelerinin inhibitör yüzey moleküllerinden biri olan PD-L1 ifade ettiği ve bu ifadenin immünosupresif yönde olacağını göstermektir.

4. GENEL BİLGİLER

4.1 Akciğer Kanseri

Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'ne bağlı bir kurum olan International Agency for Research on Cancer (IARC)'in son yayınladığı rapora göre 2012 yılında morbiditesi ve mortalitesi en yüksek olan kanser türü akciğer kanseridir (1). Erkekler ve kadınlar için veriler kombine edildiğinde akciğer kanseri hem yakalanma sıklığında hem de kansere bağlı ölüm sebeplerinde birinci sıradadır.

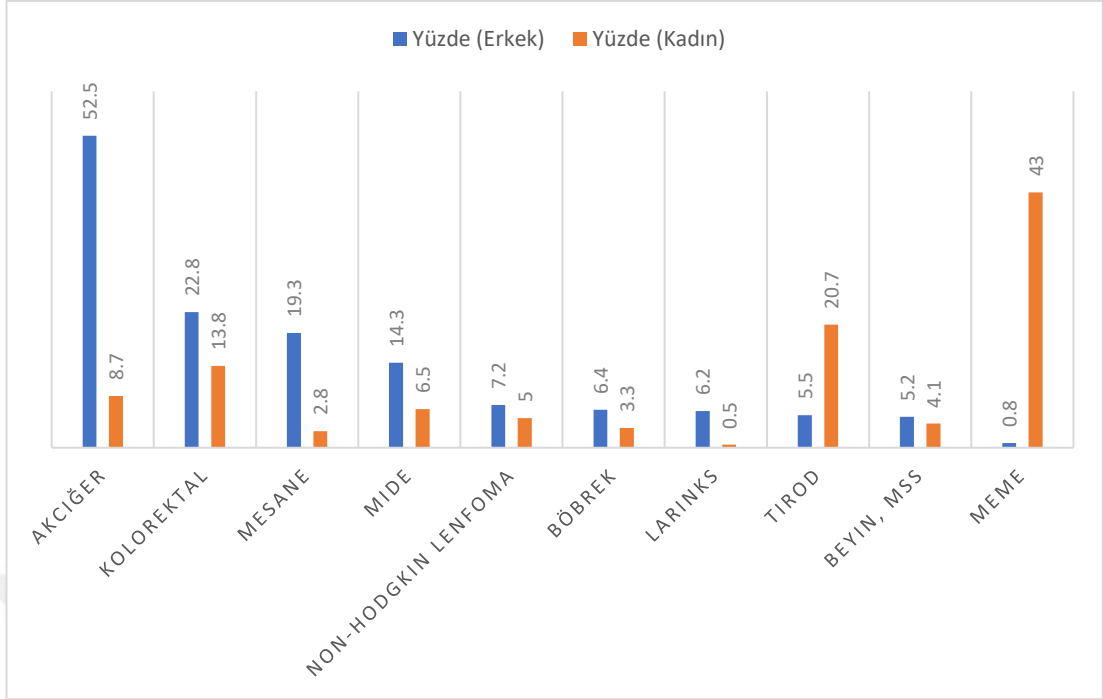
Akciğer kanseri tipik olarak geç evrelerde teşhis edilir ve bu gecikme nedeniyle 5 yıllık sağkalım oranının çok düşük olduğu tahmin edilmektedir. 5 yıllık prevalans oranlarına bakıldığında ise meme kanseri %19,2 oranıyla birinci sıradayken akciğer kanseri ise %5,8 hayatta kalan bireyi ile mortalite değerine kıyasla çok düşük bir prevalansa sahiptir (1).

4.2 Epidemiyoloji ve Etiyoloji

4.2.1 Epidemiyoloji

Akciğer kanseri, IARC'nin 2014 raporuna göre 1,8 milyondan fazla insidans (tüm kanser insidansının %13'ü) ve yaklaşık 1,6 milyon ölüm oranıyla (kansere bağlı tüm ölümlerin %20'si) dünyada birinci sırada yer almaktadır. 87 ülkede erkeklerde, 26 ülkede ise kadınlarda kanser ölümünün önde gelen nedeni olan akciğer kanseri gelişmiş ülkelerde 80 kata kadar daha fazla görülmektedir. Kuzey Amerika, Avrupa ve Doğu Asya; akciğer kanseri insidansının en yüksek olduğu bölgeler arasında olmasına karşın, Afrika kıtasının büyük bir çoğunluğu nispeten düşük olma eğilimindedir.

Ülkemizde ise akciğer kanseri, en baskın kanser türlerinden biridir (erkekler için %52,5, kadınlar için %8,7) (2). En sık görülen 10 kanser türüne ait istatistikler Şekil 4.2.1'de gösterilmiştir.



Şekil 4.2.1 2014 yılında Türkiye'de en sık görülen ilk 6 kanser türü (T.C. Sağlık Bakanlığı, “Türkiye Kanser İstatistikleri” raporundan adapte edilmiştir) (2).

4.2.2 Etiyoloji

Sigara ve tütün kullanımı Akciğer kanserinin en sık görülme sebepleri başında gelmekte iken radon, asbest, hava kirliliği gibi bazı özel sebepler ise ülkeden ülkeye değişmektedir.

4.2.2.1 Çevresel ve mesleki risk faktörleri

Sigara haricinde akciğer kanserine sebep olabilecek çevresel etmenlerin başında sigara dumanından pasif etkilenim (pasif içicilik) gelmektedir. Pasif içicilerin aldığı duman, doğrudan alınan dumana kıyasla 100 kat daha fazla karsinojen içermektedir (10).

Mesleki risk faktörlerinden olan silika (özellikle yeraltında çalışan işçilerde ve seramik-cam endüstrisinde (11,12)), arsenik (pestisit üreticileri, maden işletmecileri gibi meslekler (11,12)), ağır metaller (nikel, berilyum, kadmiyum gibi) de kansere sebep olan etkenlerdendir. Çevre, özellikle hava kirliliğinin ise akciğer kanserine sebep olduğu bildirilen bir diğer etkindir (13). Asbest ve radon, en büyük çevresel etkenlerdendir (10,12).

Aile ya da geçmiş öyküsünde akciğer kanseri olan bireylerde akciğer kanseri gelişme riski olmayan bireylere göre 2 kat daha fazladır. Birinci derece akrabalarında sigara öyküsü olan kişilerde bu oran 2.7 kata çıkmaktadır (12).

4.3 Sınıflandırma

Dünya Sağlık Örgütü'nün 2015 yılında yayınladığı "Akciğer, plevra, timüs ve kalp tümörlerinin sınıflandırılması" çalışmasına göre akciğer tümörleri; epitelyal tümörler, mezenkimal tümörler, lenfohistiyositik tümörler ve ektopik kökenli tümörler olmak üzere temel olarak 4 ana başlık altında sınıflandırılmıştır (14). Tablo 4.1 epitelyal akciğer tümörlerinin WHO sınıflandırmasını göstermektedir.

Tablo 4.1 WHO akciğer tümörlerinin sınıflandırılması (epitelyal tümörler) (14,15)

Adenokarsinom	Skvamöz hücreli karsinom
Lepidik adenokarsinom	Keratinize skuamöz hücreli karsinom
Asinar adenokarsinom	Keratinize-olmayan skuamöz hücreli karsinom
Papiller adenokarsinom	Bazaloid skuamöz hücreli karsinom
Mikropapiller adenokarsinom	Preinvazif lezyonlar
Solid adenokarsinom	Skvamöz hücreli karsinoma in situ
İnvazif müsinöz adenokarsinom	Nöroendokrin tümörler
Karışık invazif müsinöz ve müsinöz-olmayan adenokarsinom	Küçük hücreli karsinom
Kolloid adenokarsinom	Kombine küçük hücreli karsinom
Fetal adenokarsinom	Büyük hücreli nöroendokrin karsinom
Enterik adenokarsinom	Kombine büyük hücreli nöroendokrin karsinom
Minimal invazif adenokarsinom	Karsinoid tümörler
Müsinöz-olmayan	Tipik karsinoid
Müsinöz	

<p>Preinvazif lezyonlar</p> <p>Atipik adenomatöz hiperplazi</p> <p>Adenokarsinoma in situ</p> <p>Müsinöz-olmayan</p> <p>Müsinöz</p> <p>Büyük hücreli karsinom</p> <p>Adenoskuamöz karsinom</p> <p>Pleomorfik karsinom</p> <p>İğsi hücreli (spindle cell) karsinom</p> <p>Dev hücreli karsinom</p> <p>Karsinosarkom</p> <p>Pulmoner blastom</p> <p>Diğer ve sınıflandırılmamış karsinomlar</p> <p>Lenfoepitelyoma benzeri karsinom</p> <p>NUT karsinom</p> <p>Tükürük bezi tipi tümörleri</p> <p>Mukoepidermoid karsinom</p> <p>Adenoid kistik karsinom</p> <p>Epitelyal-miyoepitelyal karsinom</p> <p>Pleomorfik adenom</p>	<p>Atipik karsinoid</p> <p>Preinvazif lezyonlar</p> <p>Yaygın idiyopatik pulmoner nöroendokrin hücreli hiperplazi</p> <p>Papillomalar</p> <p>Skumöz hücreli papilloma</p> <p>Ekzofitik</p> <p>İçe dönmüş (inverted)</p> <p>Glandüler papilloma</p> <p>Karışık skumöz hücreli ve glandüler papilloma</p> <p>Adenomlar</p> <p>Sklerozan pnömositoma</p> <p>Alveoler adenom</p> <p>Papiller adenom</p> <p>Müsinöz kistadenom</p> <p>Mukoza bezi adenomu</p>
---	--

En yaygın akciğer kanseri türlerinden olan adenokarsinomlar ve skuamöz hücreli karsinomlar, genel olarak “Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri” olarak sınıflandırılmaktadır.

2015 öncesinde sınıflandırmalar bölgesel ve cemiyetlerle sınırlı iken Dünya Sağlık Örgütü sınıflandırması, yeni tanımlanan moleküler profillere ve akciğer kanserinde hedeflenebilir genetik değişikliklere dayanarak bütün sınıflandırmaları küresel tek çatı altında birleştirdi ve güncelledi. Özellikle adenokarsinom için 2011 yılında yayınlanan

“International Association for the Study of Lung Cancer, American Thoracic Society, and European Respiratory Society classification (16)” sınıflandırması çok fazla değişiklik yapılmadan kabul edilmiş olsa da; diğer türlerde ihtiyaç olan sınıflandırma karmaşası bu kılavuz ile giderilmiştir (17).

4.4 Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri

Küçük hücreli dışı akciğer kanseri kendi içinde Adenokarsinom (LUAD), Skuamöz hücreli karsinom (LUSC) ve büyük hücreli akciğer kanseri olmak üzere alt gruplara ayrılmaktadır (18).

Tüm akciğer kanseri vakaları göz önüne alındığında KHDAK, vakaların yaklaşık %90’ını oluşturmaktadır (19). Bu oran, kendi içinde %50 adenokarsinom, %40 skuamöz hücreli karsinom, geri kalan %10 ise pleiomorfik karsinom, büyük hücreli akciğer kanseri veya nadir hücreli (*rare cell*) akciğer kanseri olarak dağılmaktadır (19). KHAK ile karşılaştırıldığında KHDAK, daha yavaş ilerleyen ve daha az metastaz yapan (20) fakat tedaviye daha az yanıt veren (21) bir kanser türüdür. Buna bağlı olarak KHDAK, erken evrede tespit edilmesi zor olan ve günümüzde hastalar için cerrahi, kemoterapi ve radyoterapi dahil olmak üzere konvansiyonel tedavi seçeneklerinin terapötik etkilerinin sınırlı olduğu bir kanser türüdür.

4.4.1 Tanı

Akciğer kanseri olgularının çoğu metastaz yapmadan önce belirti göstermemektedir, fakat düşük oranda bir popülasyonda metastaz öncesi belirtiler de görülebilmektedir. Olguların büyük kısmı yerel metastatik yayılım gösterdiği için belirti ve semptomlar da akciğer ile ilgili beklenmektedir.

Klinik ve radyolojik tanı yöntemleri ise ne yazık ki akciğer kanseri tanısında tek başına yeterli değildir. Konvansiyonel sputum sitolojisi ve akciğer grafisi gibi teknikler birincil yöntemlerdir. Akciğerdeki çoğu kitle, posteroanterior ve lateral grafide beyaz-gri kitle olarak görünse de akciğer grafisi, kanser ile diğer durumları birbirinden ayıracak duyarlılıkta değildir (11,22).

İkincil görüntüleme tekniği olarak genellikle bilgisayarlı tomografi (BT) kullanılmaktadır. BT ile akciğer grafisine göre çok daha yüksek çözünürlüklü görüntüler elde edilir ve tümör çapı, tutulum yaptığı bölge (mediastinum, kalp, damarlar, göğüs duvarı vb) açıkça ayırt edilebilir. Tutulum yaptığı bölgeye bağlı olarak cerrahi müdahale şansı olup olmadığı değerlendirilebilir (10,22,23).

BT ile kitle tespit edilmesi halinde PET/PET-BT görüntülemesi ile metabolik aktif tümör hücrelerinin yeri, hatta diğer şüpheli kitlelerin yeri (lenfadenopati, distal metastazlar vb.) kesin olarak belirlenebilir (10,22).

Eğer BT ile tümör varlığı santral bölgede tespit edilirse bronkoskopi; periferik bölgede tespit edilirse İnce İğne Aspirasyon Biyopsisi (İİAB) gibi girişimsel yöntemlerle tümör tanısı, operasyona uygunluğu, patolojik örnekleme gibi amaçlarla biyopsi alınması gerekebilir. Bu yöntemlere alternatif olarak, tümörün yerine ve durumuna göre mediastinoskopi, torakotomi, video-yardımlı mediastinoskopik lenfadenektomi (VAMLA) gibi girişimsel yöntemler de kullanılmaktadır (11,23).

4.4.2 TNM Sınıflandırması

Günümüzde; tanı ve seçilecek tedavi yaklaşımı, kanseri temel olarak 4 farklı evreye bölen TNM sistemine dayanır. TNM sistemine göre primer tümör (T), bölgesel lenf nodu (N) ve uzak metastaz (M) skorlarına göre temellendirilmektedir (24) (Tablo 4.2-Tablo 4.4).

T değeri; tümör lokasyonu, tümör büyüklüğü, etkilenen yapılar ya da tümör büyümesinin etkileri gibi kriterlerce değerlendirilerek kendi içinde 7 farklı kategoriye ayrılmıştır (Tx, T0, Tis, T1, T2, T3, T4). T1 ve T2 kategorileri ise kendi içlerinde T1a ve T1b, T2a ve T2b olmak üzere alt gruplara ayrılmıştır (14) (Tablo 4.2).

N değeri, etkilenen lenf nodu yokluğuna veya varlığına, var ise lokasyonuna göre 5 farklı kategoriye ayrılmıştır (NX, N0, N1, N2, N3) (14) (Tablo 4.3). M değeri ise metastaz yokluğuna veya varlığına göre iki alt kategoriye ayrılmıştır (M0 ve M1) (14) (Tablo 4.4).

TNM sınıflandırması; küçük hücreli akciğer kanserine, küçük hücreli dışı akciğer kanserine ve bronkopulmoner karsinoidlere uygulanabilmektedir ve benzer TNM sınıfları, aynı evrede gruplandırılmaktadır (14). Bununla birlikte, bireysel sonuçlar oldukça değişkendir (19).

Son 20 yıldaki çalışmalar, tümör dokusunun histolojik kompozisyonunun, aynı TNM evresi için bile hastalar arasında farklılık gösterdiğini bildirmektedir (25,26). Bu nedenle, bireysel tümörlerin immünolojik karakterizasyonu, TNM evreleme sisteminden ayrı fakat tamamlayıcı bir yöntem olarak önerilmektedir (27). Bu ilerlemenin bir sonucu olarak, anti-PD-1, anti-PD-L1 gibi immün kontrol noktası tedavileri ortaya çıkmaktadır (28–30).

4.4.3 Evrelendirme

Uluslararası Akciğer Kanseri Çalışma Birliği (IASLC)'nin sekizinci ve güncel versiyonu olan “Akciğer Kanseri TNM sınıflandırması” raporunda belirtilen kriterler, evrelendirme için dünya çapında kabul görmektedir. Yapılan güncellemeler doğrultusunda, bir önceki versiyon kılavuzun lenf nodu metastaz (N) yönlendirmelerinin günümüzde de geçerli olduğu fakat primer tümör (T) ve metastaz (M) yönlendirmelerinin güncellenmesi gerektiği anlaşılmıştır (31,32).

Tablo 4.2 Uluslararası Akciğer Kanseri Çalışma Birliği, akciğer kanseri için T değeri sınıflandırma tablosu, 8. versiyon (14,15,31,33).

T-Primer tümör	
Tx	Primer tümör değerlendirilemiyor veya malign hücrelerin balgam ya da bronşiyal yıkama sıvısında gösterildiği ancak tümörün bronkoskopi veya görüntüleme yöntemleri ile saptanamadığı durumlar
T0	Primer tümör kanıtı yoktur
Tis	Karsinoma in situ
T1	Ana bronş tutulumu olmadan akciğer veya viseral plevra ile çevrili, en geniş çapı ≤ 3 cm, bronkopik olarak lob bronşundan daha proksimalde invazyon bulgusu olmayan tümör (örn. ana bronşta olmayan) ¹
	T1a (mi) Minimal invaziv adenokarsinom ²
	T1a Tümörün en geniş çapı ≤ 1 cm ²
	T1b Tümörün en geniş çapı >1 cm, ≤ 2 cm
	T1c Tümörün en geniş çapı >2 cm, ≤ 3 cm
T2	Tümörün en geniş çapı >3 cm, ≤ 5 cm veya aşağıdaki özelliklerden en az birine sahip olan tümör * Karinayı invaze etmeden, karinaya uzaklığına bakılmaksızın ana bronşu tutan tümör * Viseral plevra invazyonu * Atektazi veya obstrüktif pnömoni ile asosiy ve hiler bölgeye uzanan tümör (atektazi/pnömoni akciğerin bir bölümünü veya tümünü kapsayabilir)
	T2a Tümörün en geniş çapı >3 cm, ≤ 4 cm
	T2b Tümörün en geniş çapı >4 cm, ≤ 5 cm
T3	Tümörün en geniş çapı >5 cm, ≤ 7 cm ya da primer tümörle aynı lobda nodül(ler) ile asosiy ya da Göğüs duvarı (parietal plevra ve superior sulkus tümörleri dahil), frenik sinir, parietal perikardın en az birinin doğrudan invazyonu
T4	Tümörün en geniş çapı >7 cm veya aşağıdaki yapılardan birine invazyon; * Diyafram, mediastinum, kalp, büyük damarlar, trakea, rekürren laringeal sinir, özefagus, vertebra gövdesi, karina * Primer tümörle aynı akciğerde fakat ipsilateral lobda nodül(ler)
<p>¹ Ana bronşun proksimaline uzanan, bronşiyal duvara sınırlı invazyon gösteren herhangi bir büyüklükteki nadir yüzeysel tümör yayımı da T1a olarak sınıflandırılır.</p> <p>² Soliter adenokarsinom (3 cm'den daha büyük boyutta olmayan), daha baskın olarak lepidik paternli ve herhangi bir odakta 5 mm'den daha büyük boyutta invazyona sahip olmayan</p> <p>³ Bu özellikleri ile T2 tümör; eğer ≤ 4 cm veya büyüklüğü belirlenemiyor ise T2a; eğer >4 cm fakat ≤ 5 cm ise T2b olarak sınıflandırılır.</p>	

Tablo 4.3 Uluslararası Akciğer Kanseri Çalışma Birliği, akciğer kanseri için N değeri sınıflandırma tablosu, 8. versiyon (14,31,33).

N- Bölgesel lenf bezi tutulumu	
Nx	Bölgesel lenf bezleri değerlendirilemiyor
N0	Bölgesel lenf bezi metastazı yok
N1	İpsilateral peribronşiyal ve/veya ipsilateral hiler lenf bezlerine ve intrapulmoner lenf bezlerine metastaz veya direkt invazyon
N2	İpsilateral mediastinal ve/veya subkarinal lenf bezlerine metastaz
N3	Kontralateral mediastinal, kontralateral hiler, ipsilateral veya kontralateral skalen veya supraklavikuler lenf bezlerine metastaz

Tablo 4.4 Uluslararası Akciğer Kanseri Çalışma Birliği, akciğer kanseri için M değeri sınıflandırma tablosu, 8. versiyon (14,31,33).

M- Uzak metastaz	
M0	Uzak metastaz yok
M1	Uzak metastaz var
	M1a Kontralateral lobda metastatik nodül(ler), plevral veya perikardiyal metastatik nodüller veya malign plevral veya perikardiyal efüzyon ⁵
	M1b Tek bir ekstratorasik organda, tek metastaz ⁶
	M1c Bir veya birden çok organda multipl ekstratorasik metastaz
⁵ Akciğer kanseriyle birlikte olan çoğu plevral (perikardiyal) efüzyonlar tümöre bağlı gelişir. Bazı hastalarda multipl mikroskopik incelemelerde plevral (perikardiyal) sıvı tümör açısından negatiftir ve sıvı hemorajik ve eksudatif değildir. Bu bulgular varsa ve klinik değerlendirme efüzyonun tümörle ilgili olmadığı yönündeyse, efüzyon evreleme belirleyicisi olmaktan çıkarılmalıdır.	
⁶ Bu durum bölgesel olmayan tek bir uzak lenf bezi metastazını kapsar.	

Radyolojik bulgularla başlayan evrelendirme süreci, histopatolojik olarak kesinleştirilmelidir. İlk evreleme olan klinik evreleme ile tedavi planlaması yapılırken patolojik evrelendirme ile kesin tanı konulup tedavi nihai halini alır. 4.3.2 Tanı kesitinde bahsedildiği üzere invazif yöntemlerle biyopsi sonrası kesin tanı konulmaktadır. Evrelendirme çeşitleri Tablo 4.5'te gösterilmektedir.

Tablo 4.5 Evrelendirme çeşitleri (10,34).

cTNM	Klinik -diagnostik evrelendirme. Radyolojik bulgular ışığında yapılan ilk evrelendirmedir. Tedavinin ilk planlaması ve başlangıcı bu adımda gerçekleştirilir.
sTNM	Cerrahi evrelendirme. Operasyon sırasında cerrah tarafından yapılan evrelendirmedir.
pTNM	Patolojik-postcerrahi evrelendirme. Biyopsi ve/veya operasyon sırasında alınan parça sonrası histopatolojik boyama/incelemeler sonrası yapılan nihai evrelendirmedir.
rTNM	Yeniden tedavi evrelendirmesi. Ek ya da ikincil bir tedavi gerektiği zaman yeniden yapılan cTNM evrelendirmesidir.
aTNM	Otopsi evrelendirmesi. Postmortem yapılan evrelendirmedir.

Son olarak elde edilen bilgiler ışığında, nihai evrelendirme 2016 yılında Uluslararası Akciğer Kanseri Çalışma Birliği (IASLC)'nin sekizinci ve güncel versiyonu olan "Akciğer Kanseri TNM sınıflandırması" raporunda belirtilen kriterler eşliğinde yapılır. Tablo 4.6'da TNM sınıflandırmasına göre yapılacak olan evrelendirmeler gösterilmiştir.

Tablo 4.6 Uluslararası Akciğer Kanseri Çalışma Birliği (IASLC) sekizinci versiyonuna, TNM sınıflandırmasına göre akciğer kanseri evrelendirmesi (31).

Evre grupları				
Evre		T	N	M
Gizli (occult) karsinom		Tx	N0	M0
Evre 0		Tis	N0	M0
Evre I	IA1	T1mi	N0	M0
		T1a	N0	
	IA2	T1b	N0	M0
	IA3	T1c	N0	M0
	IB	T2a	N0	M0
Evre II	IIA	T2b	N0	M0
	IIB	T1a	N1	M0
		T1b	N1	
		T1c	N1	
Evre II	IIB	T2a	N1	M0
		T2b	N1	
		T3	N0	
Evre III	IIIA	T1a	N2	M0
		T1b	N2	
		T1c	N2	
		T2a	N2	
		T2b	N2	
		T3	N1	
		T4	N0	
		T4	N0	
	IIIB	T1a	N3	M0
		T1b	N3	
		T1c	N3	
		T2a	N3	
		T2b	N3	
		T3	N2	
T4		N2		
IIIC	T3	N3	M0	
	T4	N3		
Evre IV	IVA	Herhangi bir T	Herhangi bir N	M1a
		Herhangi bir T	Herhangi bir N	M1b
	IVB	Herhangi bir T	Herhangi bir N	M1c

4.4.4 Mevcut tedavi

Akciğer kanseri, özellikle KHDAK erken tanısı çok zor; buna bağlı olarak tedavisi de güç olan bir kanser türüdür. Günümüz teknikleriyle kesin etkili tek tedavi yaklaşımı cerrahi rezeksiyondur. Cerrahi kararı hem hasta hem de mevcut kaynakların kullanımı açısından çok iyi yönetilmesi gereken bir problemi beraberinde getirmektedir ve buna bağlı olarak sınırları uluslararası kılavuzlarla kesin bir şekilde çizilmiştir ve bu kılavuzlar belirli periyotlarda güncellenmektedir.

Evre 0 olgularda tümör doku henüz hava yollarının yüzeyindedir ve derin dokulara invaze olmamış durumdadır. Bu durumda ek bir tedavi uygulamadan cerrahi tedavi uygulamak kür için yeterli olacaktır. Wedge rezeksiyon veya segmentektomi gibi küçük çaplı yaklaşımlar, lobektomi gibi görece büyük operasyonlara kıyasla yeterli olacaktır. Cerrahi tedaviye alternatif olarak fotodinamik terapi, lazer terapi ya da brakiterapi tercih edilebilir fakat kemoterapi/radyoterapi/immünoterapiye ihtiyaç yoktur (10,35).

Evre I-II olgularda birincil yaklaşım cerrahi lobektomidir. Son yıllarda sublobar (wedge rezeksiyon ya da segmentektomi gibi) rezeksiyonun da yüksek oranda sağkalım şansı olduğu gösterilmiştir. T1N0 olgularda cerrahi sonrası %80 civarı sağkalım oranları elde edilmiştir (10–12,35).

Evre IIIA lokal-ileri olgularda immünoterapi düşünölmeye başlanmalıdır. Standart tedavi planı tümörün lokasyonuna, metastaz yaptığı lenf noduna ve hastanın operasyonu tolere etme kapasitesine göre tanımlanır. Eğer genel sağlık durumu iyi ise kemoterapi ile tedaviye başlanır ve genellikle radyoterapiyle kombine edilir (kemoradyoterapi). Kemoradyoterapi sonrası eğer rezidü şüphesi var ise cerrahi tedavi uygulanabilir. Bir diğere yaklaşım ise önce cerrahi olarak tümör doku uzaklaştırılması ve kalan tümör dokunun eliminasyonu için kemoradyoterapi uygulanmasıdır. Sağlık durumu elvermeyen hastalar için *pembrolizumab* (anti-PD-1) gibi immünoterapi düşünölebilir (10,11,35)

Evre IIIB olgularda ise tümör genel olarak kontralateral lobdaki lenf nodlarına veya bu loba yakın lenf nodlarına, boyundaki lenf nodlarına ya da toraks içerisindeki diğere

önemli yapılara (plevra gibi) metastaz yapmış durumdadır. Eğer lenf nodu metastazı yoksa (N0) cerrahi rezeksiyon önerilmekte, aksi takdirde cerrahi yaklaşım yerine kemoradyoterapi tercih edilmektedir (10,11,35). Kemoradyoterapi uygun sınırlara indirilen olgularda cerrahi olarak tümör rezeke edilebilmektedir (11). Eğer hastanın genel sağlığı cerrahi veya kemoterapiyi/radyoterapiyi kaldıramayacak durumdaysa immünoterapi düşünülmektedir (35).

Evre IV olgularda tümör uzak metastaz yapmış durumdadır ve sistemik tedavi yaklaşımları tercih edilmektedir. Tedavi seçimi histolojik alt tipe göre, tümör mutasyon yüküne göre, tümör sayısına göre, metastaz yapılan yere göre ve genel sağlık durumuna göre kişiselleştirilir. Cerrahi müdahale şansı genellikle yoktur, bu yüzden uygulanacak tedavinin kür amaçlı değil hastanın yaşam kalitesini yükseltmeye yönelik olduğu genel olarak kabul edilmektedir. Uygulanabilecek tedaviler arasında hastanın sağlık durumuna göre kemoterapi, radyoterapi, hedefli terapiler (EGFR, VEGFR inhibitörleri gibi) ve immünoterapi bulunmaktadır. Nadir de olsa bazı olgularda tümör doku rezektabl konumda olduğu için cerrahi yaklaşım da mümkün olabilmektedir (10–12,35).

Akciğer kanserinin mevcut durumu göz önünde bulundurulduğunda, erken aşamada tespit edilen olguların kanser ilişkili semptomlarının iyileştirilmesi, yaşam kalitesinin artırılması ve sağ kalım oranının yükseltilmesi için yeni yöntemler geliştirilmesi gerektiği sonucuna varılmaktadır. Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) inhibitörleri (36–38), vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) (39) ve reseptörü (VEGFR) inhibitörleri (40), fosfatidil serin [41] [42]; ALK (43,44), ROS1 (45), BRAF (46) gibi hedeflere karşı küçük molekül inhibitörleri geliştirilmiş ve denenmiştir . Geliştirilen yöntemlerden biri ise immünoterapidir.

İmmün kontrol noktaları, bağışıklık üzerindeki eş uyaran (*costimulatory*) ve inhibitör etkiler arasındaki dengeyi düzenleyen ligandlar ve reseptörleri içeren çeşitli proteinler grubudur. İmmünoterapide kullanılan immün kontrol noktası inhibitörleri ise immün hücrelerin apoptoz veya anerjiye gitmesine yol açan sinyalleri ileten yüzey reseptörlerinin bloklanmasını amaçlayan hedefli bir tedavi çeşididir (47,48).

İmmün sistemin önemli özelliklerinden biri olan kendinden olanı ayırt etme (*self-recognition*), immün hücrelerin yüzeyinde bulunan kontrol noktası (*checkpoint*) molekülleri ile sağlanmaktadır. Bu proteinler sadece self-toleransı sağlayarak otoimmün reaksiyon gelişimini önlemekle kalmaz, patojen enfeksiyonları sırasında immün hücrelerin fizyolojik yanıtlarını sınırlayarak doku hasarı oluşmasını da engeller. Kanser hücreleri de bazen bu molekülleri kullanarak immün sistem tarafından saldırıya uğramaktan kaçmaktadır. İmmünoterapi ile hastanın kendi immün sisteminin kamçılanması (*boost*) ve tümör dokuya karşı efektif bir şekilde savaşması amaçlanmaktadır (49).

Programlı hücre ölüm proteini – 1 (PD-1), en çok aktive T ve B lenfositlerinde, ek olarak myeloid hücrelerde ifadesi olan bir hücre yüzey reseptörüdür. PD-1 sinyalizasyonu, regülatör T (Treg) hücre gelişimini uyarır ve sonucunda anti-inflamatuvar yanıtı tetikler. Programlı ölüm ligandı – 1 (PD-L1), PD-1'e spesifik bir ligandır. Yüksek seviye PD-L1 ifadesi, T lenfosit infiltrasyonu ve IFN- γ senteziyle yakından ilişkilidir; ayrıca edinsel immün direnç mekanizmalarında da rol almaktadır. Antikor tabanlı PD-L1 blokajı, Th1 tipi hücrelerin aktifleşmesini sağlamıştır, bundan hareketle PD-1/PD-L1 sinyalizasyonunun tümör mikroçevresindeki hem doğal hem edinsel immünite üzerinde kritik inhibitör rolü olduğu düşünülmektedir (49).

Metastatik KHDAK vakalarında immünoterapi çalışmalarının büyük çoğunluğu PD-1 ve birincil ligandı PD-L1 sinyal yolağını bloklamaya yoğunlaşmış durumda (48,50) olsa da CTLA-4 (51–53), TIM-3 (54–56), LAG-3 (57,58) gibi moleküller de immün kontrol noktası araştırmalarının hedeflerindedir.

4.5 İmmün sistem ve edinsel immünite

İmmün sistem, temel olarak doğal (*innate*) ve edinsel (*adaptive*) olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Edinsel immünitenin temel elemanları olan lenfositler, karşılaşılan antijene özgü, kuvvetli ve anamnestic yanıt verebilen özel hücrelerdir (59–62). Lenfositler sadece enfeksiyon durumunda vücudu istila eden patojenlere karşı değil,

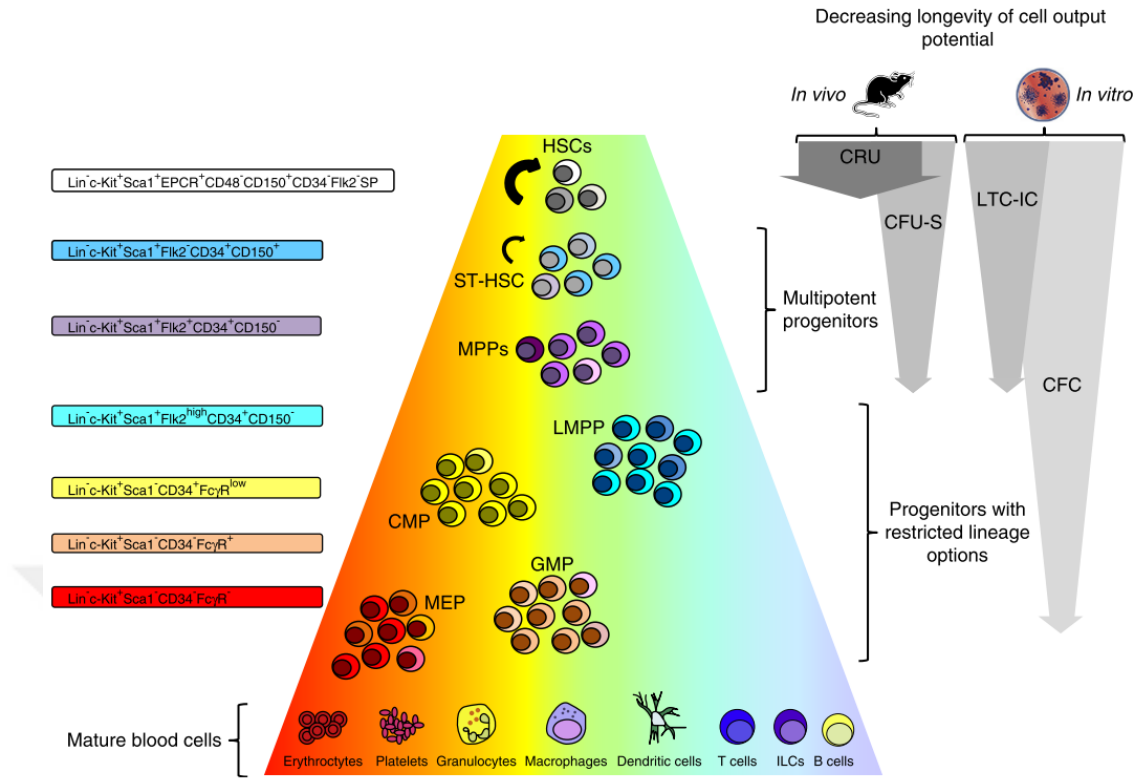
kişinin kendi vücudundan köken alan kanser gibi anomalilere karşı da yanıt oluşturmaktadır (50,59).

Edinsel immüitenin başlıca elemanları olan lenfositler, gerçekleştirdikleri efektör fonksiyonlara göre temel olarak iki gruba ayrılır. Timüste olgunlaşıp sitotoksik aktivite gösteren hücreler ve bu hücrelerin homeostazına yardımcı (*helper*) hücreler T lenfositleri, kemik iliğinde olgunlaşıp antikor sentezi görevini üstlenen hücreler ise B lenfositleri olarak adlandırılırlar.

Antijen spesifik reseptörler vasıtasıyla T ve B lenfositleri, iki aşamada efektör yanıtını gerçekleştirir. Öncelikle T veya B lenfositinin antijen spesifik reseptörüyle, sunulan antijeni tanınmasına bağlı olarak *priming* denilen olay gerçekleşir; hücre aktifleşir ve farklılaşmaya başlar. Bu olaylar genellikle özel mikro-çevrelerde gerçekleşir (lenfoid organlar gibi). İkincil olarak aktive olan *naïve* hücre, lenfoid organdan çıkarak efektör fonksiyonlarını gerçekleştirir. T lenfositleri için bu efektör fonksiyon, lenfoid organdan ayrılıp enfeksiyon bölgesine göç etmek iken B lenfositleri için lenfoid organdan ayrılıp kana ve doku sıvılarına antikor sentezlemektir (59).

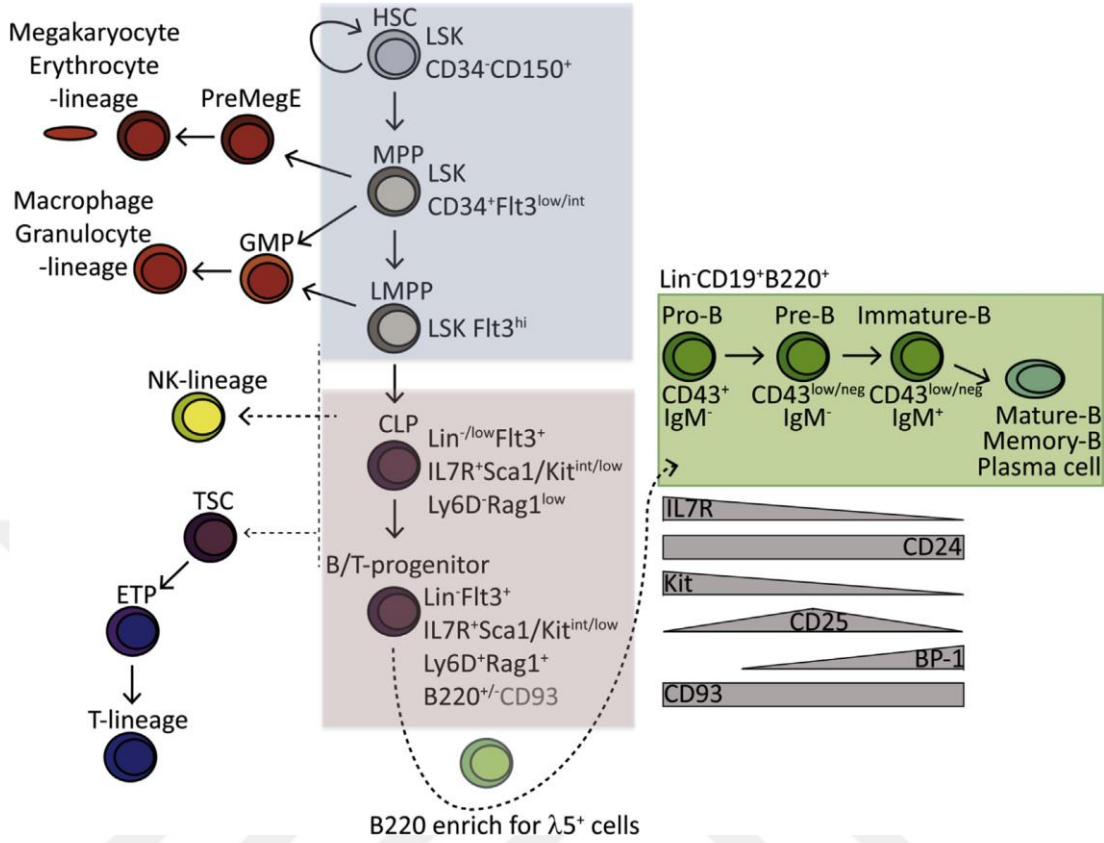
4.6 B lenfositleri ve akciğer kanserindeki rolü

Ortak lenfoid progenitör hücreden köken alan B ve T lenfositleri, birbirlerinden farklılaşarak hematopoezi tamamlarlar. T ve B lenfositleri morfolojik olarak birbirlerine çok benzedikleri için bu ayrım yüzey belirteçleri ile yapılmaktadır (63). Şekil 4.6.1’de bu ayrım kabaca gösterilmiştir.

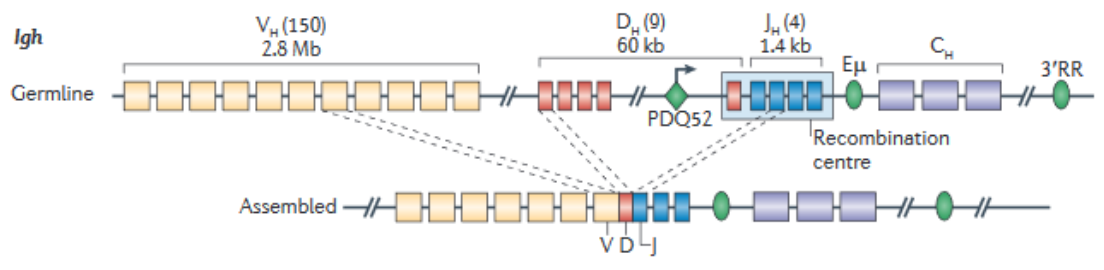


Şekil 4.6.1 Hematopoietik hücre farklılaşmasının hiyerarşik modellenmesi. HSC: Hematopoietik kök hücre, ST-HSC: Kısa dönemli hematopoietik kök hücre, MPP: Multipotent progenitor, LMPP: Lenfoid multipotent progenitor, CMP: Common myeloid progenitor, MEP: Megakaryosit/eritrosit progenitor, GMP: Granülosit/Monosit progenitor (63).

Myeloid potansiyelin tamamen kaybedilmesini takiben, B/T/NK ve DC hücrelerine farklılaşabilen ortak lenfoid progenitor (CLP) hücreler ortaya çıkmaktadır. Bu hücrelerden, farklı genlerin aktifleşmesiyle farklı hücreler köken almaktadır. B ve T lenfositlerine farklılaşan CLP alt grubu için *Rag* geninin yüksek olduğu gösterilmiştir (64,65). Yüksek seviye *Rag* aktivasyonu ise Ly6D ekspresyonuna sebep olmakta ve bu durum, CLP hücrelerin sadece B lenfositlerine farklılaşmasını sağlamaktadır (65). B lenfositine farklılaşmaya kilitlenen CLP hücrelerde, T ve B lenfositlerine karakteristik olan bir dizi genetik rekombinasyon gerçekleşir. Farklı kromozomlarda bulunan *variable* (V), *diversity* (D), *joining* (J) ve *constant* (C) segmentleri nükleazlarla kırılıp aktif olan RAG1/2 proteinleri ile yeniden aranje edilir (*rearrangement*). Bu yöntemle her bir B lenfositine özel bir hücre reseptörü (BCR) tanımlanır (59,66–69). Bütün bu farklılaşma ve genetik rekombinasyon Şekil 4.6.2 ve Şekil 4.6.3'te gösterilmiştir.



Şekil 4.6.2 B lenfosit gelişimine odaklanılmış hematopoietik süreç. Şekil üzerinde, stabil B lenfosit adanmışlığına yönlendiren soy kısıtlama olayları (*lineage restriction events*) ve tanımlanan B hücre progenitorlerini belirlemek için kullanılan yüzey belirteçleri görülmektedir. Gri olarak evrelendirilen bölge aktif *priming*i, kırmızı evre aktif özelleşmeyi, yeşil evre ise geri dönüşü olmayan farklılaşmayı göstermektedir. LSK, lineage negatif Sca1^{High} cKit^{High}, HSC, hematopoietik kök hücre; MPP, multipotent progenitor; LMPP, lenfoid *primed* multipotent progenitor; CLP, ortak lenfoid progenitor; PreMegE, megakaryosit/eritroid progenitor; GMP, granülosit/monosit progenitor; TSC, timüs besleyici hücre; ETP, erken timik progenitor; NK, natural killer; T, T lenfosit; B, B lenfosit. (70).



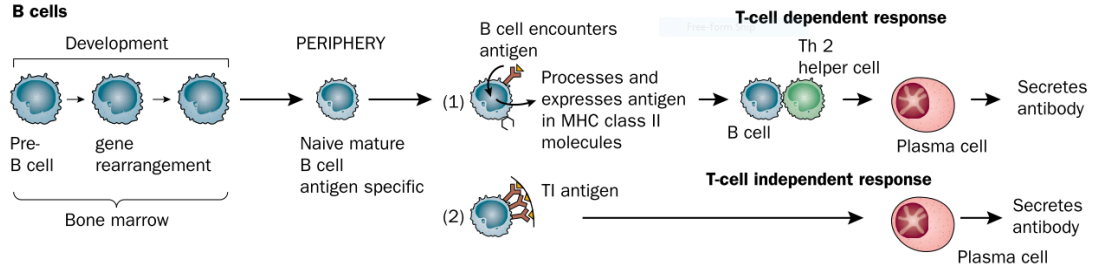
Şekil 4.6.3 Germline üzerinde Immunoglobulin H lokusu (*Igh*) ve birleştirilmiş konfigürasyonu (71).

BCR gelişimini başarıyla tamamlayan hücreler kemik iliğinden ayrılarak dalağa göç ederler (72). Burada antijeniyle karşılaşmayı bekleyen *naïve* B lenfositler, uygun antijenle karşılaştıklarında 2 farklı yolla aktive olabilirler. İlk yol olan T lenfositlerine bağlı olmayan yolda, BCR ile tanınan antijenler vasıtasıyla hücre aktive olur, B lenfositini doğrudan IgM üreten plazma hücresine farklılaşmaya yönlendirir. Bu aktivasyonu sağlayan “tip 1” antijenler genellikle çok sayıda tekrarlayan epitopa sahip antijenlerdir (karbonhidratlar gibi), fakat bunun yanında bitkisel lektinler, tekrarlı epitoplara sahip bazı proteinler ve makromoleküller; LPS, CpG, dsRNA gibi patojen ilişkili moleküller; hasarlı hücrelerden dağılan moleküller gibi TLR aktivatörü antijenler de sayılabilir (59,73). Germinal merkez oluşumuna yol açmadığı için affinite maturasyonu (somatik hipermutasyon) gerçekleşmez, buna bağlı olarak da sadece IgM tipi antikör üreten plazma hücreleri elde edilir (*class-switching* olayı da görülmez). T lenfositten bağımsız yolla aktive olan B lenfositleri için denilebilir ki, IgM-sınırlı, çok spesifik olmayan ve kısa ömürlü bir yanıtıdır (59,60,73).

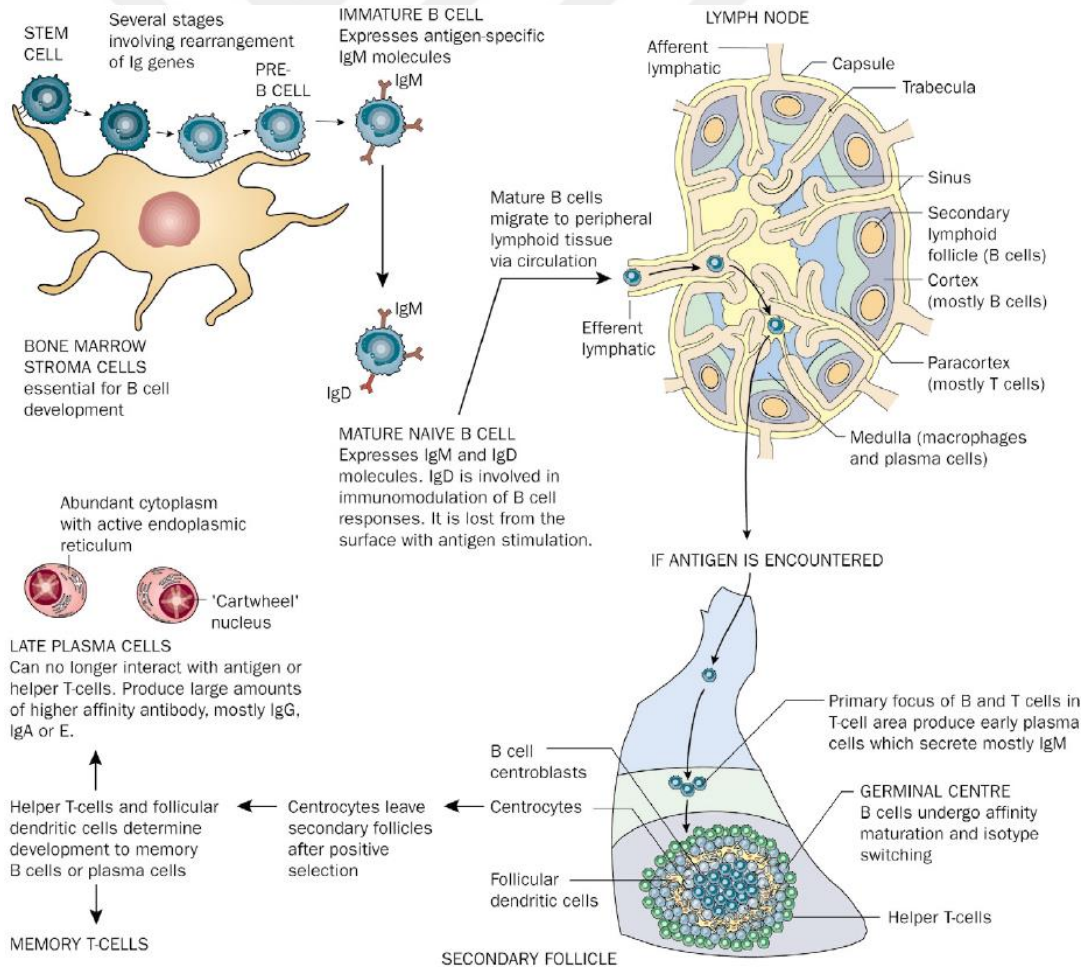
T lenfositine bağımlı yolda ise antijeniyle karşılaşan B lenfosit, BCR aracılığıyla uygun antijenini tanır, internalize eder, işler ve MHC-II üzerinde germinal merkez T lenfositlerine sunar. T lenfositine sunulan antijen eğer hiçbir T lenfosit tarafından tanınmazsa B lenfosit apoptoza yönelir, T lenfosit tarafından tanınırsa tanıyan T lenfositini aktive eder. Aynı antijenle birlikte aktive olma işlemine *cognate* ya da *linked* etkileşim ismi verilir. *Cognate* T_{FH} hücreler tarafından sentezlenen CD40L, IL-4, IL-21, IFN- γ gibi sitokinler yardımıyla B lenfosit de aktive olur (59,60,73,74).

CD40-CD40L etkileşimini sağlayan B lenfositlerinin bir kısmı lenfoid organı terk ederek kısa ömürlü plasmablast hücrelere farklılaşır ve IgM sentezine başlar fakat foliküler bölgede (germinal merkez) kalan B lenfositleri *Bcl6* ifadesinin artmasıyla *class-switching* denilen olayı gerçekleştirir (73). Germinal merkezde kalan B lenfositleri aynı zamanda somatik hipermutasyon adı verilen bir aşamadan da geçer. Aktive olan hücreler, proliferasyon oldukça hücre reseptörlerinin VJ bölgesinde DNA mutasyonu geçirerek her bir yavru hücrede yeni bir BCR oluşturur. Atasal hücre ile aradaki fark birkaç baz olsa da BCR-antijen bağlanma affinitesini etkiler. Olgunlaşma sürecinde IgM olarak üretilen BCR, *class-switching* ile IgG, IgA, IgE gibi diğer

antikor türlerine dönüşür fakat antijen bağlanma bölgesi (ağır zincir için V(D)J bölgesi, hafif zincir için VJ bölgesi) değişmez. Tamamen olgunlaşan B lenfositlerinden bir kısmı hafıza B hücresi olarak hayatına devam eder. (60,74). B lenfositinin geçirdiği bütün süreç Şekil 4.6.4 ve Şekil 4.6.5 ile gösterilmiştir.



Şekil 4.6.4 B hücre gelişimi, özet (59).



Şekil 4.6.5 Kök hücreden plazma hücrelerine B lenfosit gelişim yolu (59)

B lenfositleri gelişimsel süreçte gösterdikleri ekspresyon profiline ve efektör profillerine göre bazı alt gruplara ayrılmaktadır. İmmatür B hücreleri olan bu hücreler T lenfositine bağımlı olmayan yolla uyarılır ve tip 1 antijenlere yanıt veren IgM⁺ sentezleyen kısa ömürlü plazma hücrelerine farklılaşır. Barsak-ilişkili lenfoid doku (GALT) dışında bulunan bütün olgun B hücreleri ise T lenfositine bağımlı, MHC-II sınırlı yolak ile aktive olur. Bu hücreler sekonder lenfoid organlarda ve özellikle dalakta uygun antijenleriyle karşılaşmayı bekler (74,75).

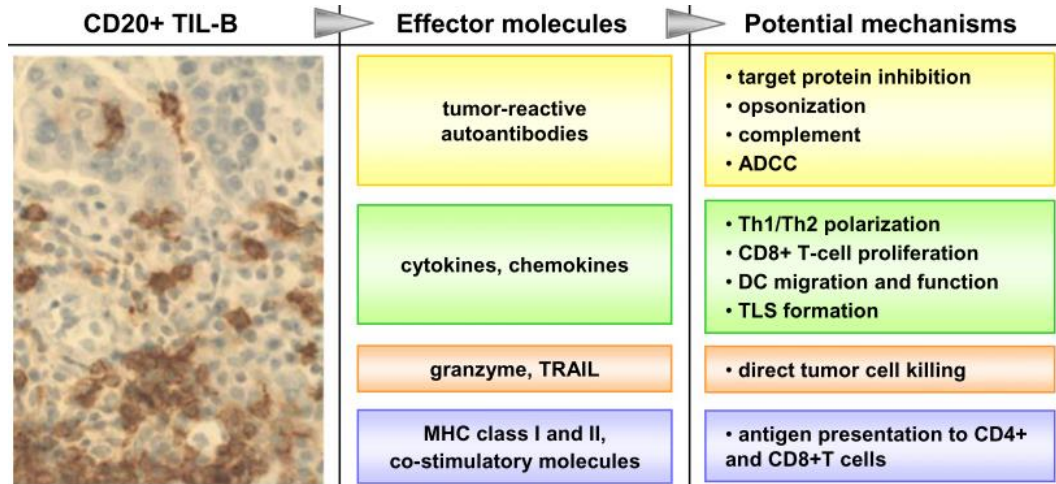
Gelişimsel aşamalarına göre immatür B hücreleri *transitional 1* (T1) ve *transitional 2* (T2) olarak gruplandırılır. Kemik iliğinden dalağa göç eden olgun *transitional* hücreler, BCR spesifitesine ve uygun survival sinyaline göre foliküler B lenfosit (FO) veya marjinal bölge (MZ) B lenfositine farklılaşırlar (72,75,76). MZ lenfositler germinal bölgeye giriş yapmaz ve somatik hipermutasyon geçirmeden doğrudan IgM sentezleyen kısa ömürlü plazma hücrelerine farklılaşır. FO lenfositler ise germinal bölgeye girer. *Class-switching* ve affinite matürasyonunu tamamlayan hücreler germinal bölgeden ayrılarak uzun ömürlü plazma hücrelerine veya hafıza hücrelerine farklılaşır (72).

Farelerde B lenfositleri CD5 ifadesine göre keskin sınırlarla ayrılmış durumdadır. CD5⁺ B lenfositleri B1 hücreler olarak adlandırılır ve polispesifik IgM üretirler. Daha çok fetal dönemde üretilen bu hücreler somatik hipermutasyon geçirmez ve doğal bağışıklık hücrelerine benzeyen hücrelerdir (60,75,77). B1 hücreleri daha çok peritoneal ve plevral kavitelerde bulunur ve evrimsel olarak seçilmiş bazı BCR moleküllerini taşırlar ve buna bağlı olarak tanıdıkları antijenler sınırlıdır. Henüz immün yanıtın yeterince gelişmediği fetal dönemde bu hücrelerden üretilen doğal antikorlar, ilk savunma hattını oluşturur, apoptotik hücrelerin temizliğine ve okside olmuş moleküllerin ortadan kaldırılmasına yardımcı olur (78). İnsanda bu hücre grubunun tam karşılığı henüz tanımlanamamıştır fakat benzer özelliklere sahip CD5⁺ B lenfositlerinin varlığı gösterilmiştir (60). B2 lenfositler ise yabancı antijenlere karşı spesifik antikor yanıtının gelişmesinden sorumlu MZ ve FO hücreleridir (78).

Yakın zamanda B lenfositlerinin sadece antikor sentezinden sorumlu olmadığı; bunun yanında T lenfositlerine antijen sunumu, eş-uyarım ve sitokin sentezi gibi görevlerinin de olduğu gösterilmeye başlanmıştır (73).

B lenfositleri, gelişimsel efektör özelliklerinden bağımsız olarak sentezledikleri sitokin gruplarına göre de iki alt gruba ayrılmaktadır. Aktive T_H1 lenfositlerle ya da bu tip yanıtı uyaran antijenlerle aktifleşen B lenfositleri; IL12, $TNF\alpha$, $IFN\gamma$ gibi sitokinler sentezleyen B efektör 1 (Be1) hücrelere farklılaşırken, T_H2 tipi lenfositlerle aktifleşen B lenfositler IL2, IL4, IL6, IL13, $TNF\alpha$ sentezleyen B efektör 2 (Be2) hücrelere farklılaşır (79–83). Bunun yanında, BCR/Antijen yolağından bağımsız olarak CD40 sinyaliyle aktive olan B lenfositlerinde ise proinflamatuvar sitokinlerin aksine yüksek miktarda IL10 sentezi görülmektedir (84).

Son yıllarda $CD8^+$ T lenfositlerin tümör dokuyu infiltre etmesiyle prognoz arasında doğru orantı olduğunu gösteren çalışmalar ortaya koyulmaktadır (83,85). $CD8^+$ T lenfositlerle birlikte infiltrasyon sağlayan B lenfositleri; üçüncül lenfoid yapıların (TLS) kurulması, tümör reaktif antikor sentezi, stimülatör sitokin ve kemokin sentezi, lokal APC (antijen sunan hücre) olarak rol alma gibi değişik konularda T hücrelerini asiste etmektedir (83) (Şekil 4.6.6).



Şekil 4.6.6 TIL-B lenfositlerin tümör immunitesine potansiyel katkısı. Solda, insan over kanserindeki anti-CD20+ TIL-B boyaması (kahverengi); ortada, TIL-B lenfositler tarafından üretilen efektör moleküller; sağda, potansiyel TIL-B mekanizması (83).

Tümör-infiltrate B lenfositlerin (TIL-B) T lenfosit aktivasyonunu sağladığı, B lenfosit yokluğunda otoreaktif CD4⁺ T lenfositlerin aktive olamadığı (86), buna bağlı olarak TIL-B lenfositlerin anti-tümör yanıtta T lenfositlerinin üzerinde düzenleyici bir rolü olduğu bilinmektedir. Tümör çevresinde oluşturulan TLS içinde de TIL-B lenfositlerin klonal ekspansiyon, *class-switching*, affinite matürasyonu gibi süreçlerden geçip anti-tümöral antikor sentezinde görev aldığı bildirilmiştir (87,88). Tümörü destekleyici (*tumor-promoting*) rolü olabileceği gibi anti-tümöral antikorların tümör temizlenmesinde etkili olabileceği de göz önünde bulundurulmalıdır (89–91).

B lenfositlerin indirekt etkilerinden biri ise proinflamatuvar sitokin sentezi ile TLS ve ikincil lenfoid dokulara, efektör bölgelere ve buldukları dokuya diğer immün hücrelerin göç etmesini sağlamalarıdır (92–94). Bu durum, göç eden immün hücrelerin sadece antikor-antijen immün komplekslerini değil, aktive olan kompleman proteinlerini ve komplekslerini de temizlemesini sağlar (95).

B lenfositler akciğer kanseri olgularında, distal dokuya kıyasla tümör ve tümör çevresini daha fazla infiltrate etmektedir. B lenfosit infiltrasyonunun fazla olması hayatta kalım süresini uzattığını gösteren çalışmalar da vardır (96,97). TLS infiltrasyonunun da sağkalım ve prognoz ile doğru orantılı olduğunu gösteren çalışmalar yayınlanmıştır (98,99).

4.7 Regülatör B lenfositler ve akciğer kanserindeki rolü

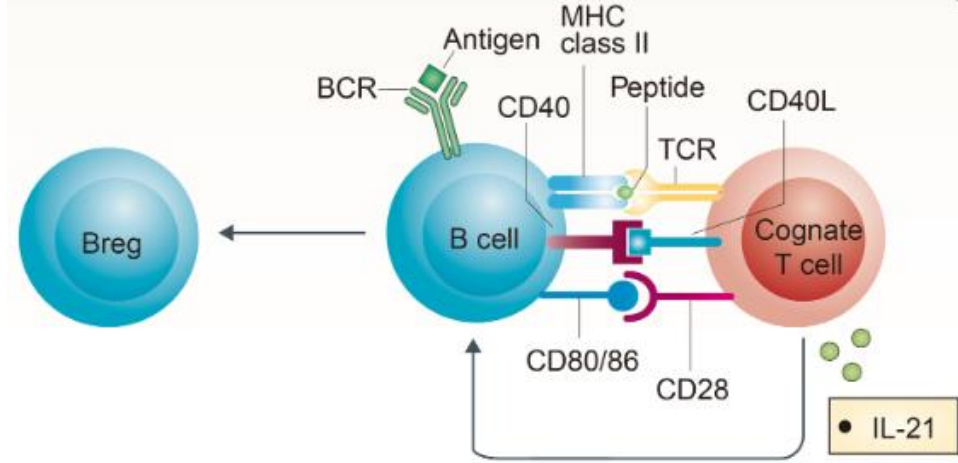
Regülatör B lenfositler, T lenfosit mevkidaşları (Treg) gibi immün yanıtı modüle eden hücrelerdir. Kanser, otoimmün hastalıklar, kronik enfeksiyonlar, solid organ transplantasyonu gibi immüniteyle ilişkili durumlarda immün homeostazın sağlanmasında önemli rolü olan hücre gruplarından biri olan Breg hücreler (100), genel olarak IL10 üzerinden işlevlerini gerçekleştirirler (101)(102). Bahsedilen durumlarda immün kontrol gerçekleşmez ise proinflamatuvar mediatörlerin ortamda birikmesi ile geri dönüşü olmayan doku hasarlarına ve romatoid artrit (RA) ve sistemik lupus eritematozus (SLE) gibi inflamatuvar otoimmün hastalıklara sebep olabilirler (102). Regülatör hücrelerin yokluğunda ise hastalık prognozunun kötüleştiği daha önceden deneysel çalışmalarla gösterilmiştir (103,104).

Regülatör B lenfositler, ilk kez fare çalışmalarında kronik barsak iltihabı (105) ve deneysel otoimmün ensefalit (EAE) (106) çalışmalarıyla tanımlanan hücrelerdir. Yapılan çalışmalar, inflamatuvar mikroçevrenin IL10 sentezleyen ve immün baskılayıcı özelliği olan B lenfositlerinin ortaya çıktığını göstermiştir (105,106).

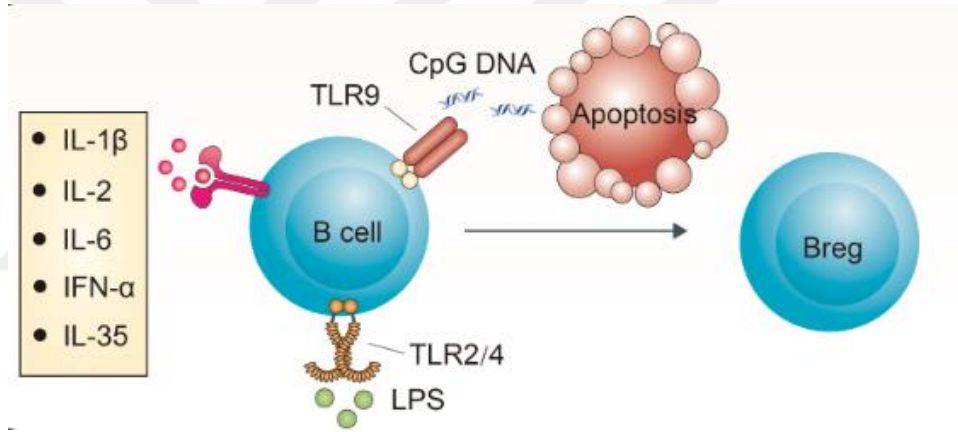
Breg hücrelerin aktivasyon mekanizması için şimdiye kadar iki farklı öneri sunulmuş durumdadır. İlk yol olan inflamasyon bağımlı yolda, inflamasyonun olduğu dokudaki T hücrelerinin yardımıyla Breg hücreler aktifleşir. Antikor sentezi için gereken Ag-BCR sinyal yolağının bu aktivasyon mekanizması için de önemli bir rol aldığı düşünülmektedir. Antijenle kontakt sonrası internalize edilip işlenen antijen, MHC-II üzerinde T lenfositlere sunulur ve bu sırada IL21 sinyali ile birlikte CD40-CD40L ve CD28-CD80/CD86 etkileşimi gerçekleşir ve Breg hücresi aktive olur (106–108) (Şekil 4.7.1).

İkinci önerilen yol ise TLR yanıtı üzerinden, doğal bağışıklık benzeri bir sinyal mekanizması ile aktivasyondur (109). Örneğin, bakteriyel CpG DNA ve apoptotik hücrelerden salınan DNA moleküllerinin TLR9 yanıtını uyararak Breg hücrelerde IL10 sentezini tetiklediği gösterilmiştir (110,111) (Şekil 4.7.2).

İlginç olarak inhibitör bir sitokin olmasına rağmen IL35'in Breg hücrelerini aktive ettiği ve IL35 sentezini artırdığı, IL10 sentezleyen Breg hücrelerin ise IL10'a ek olarak IL35 eşifadesini (*coexpression*) indüklediği gösterilmiştir. Yapılan daha ileri araştırmalarda ise IL35 sinyalinin IL12R β 2 ve IL27R α üzerinden iletildiği gösterilmiştir (112).



Şekil 4.7.1 Breg hücrelerin BCR üzerinden aktivasyon yolağı. B lenfositini BCR ile antijene bağlanır; *cognate* CD4+ T lenfositine sunar; CD40-CD40L, CD80/86-CD28, IL21 sinyalizasyonu ile aktifleşir ve Breg hücrelerine farklılaşır. (100).



Şekil 4.7.2 Breg hücrelerin BCR dışındaki aktivasyon yolları. LPS ve CpG gibi TLR sinyalleri Breg hücreleri MyD88 sinyal yolağı üzerinden uyarır. IL1 β , IL2, IL6, IFN α gibi proinflamatuvar sitokinlere ek olarak anti inflamatuvar IL35 de Breg aktivasyonunu uyarır (100).

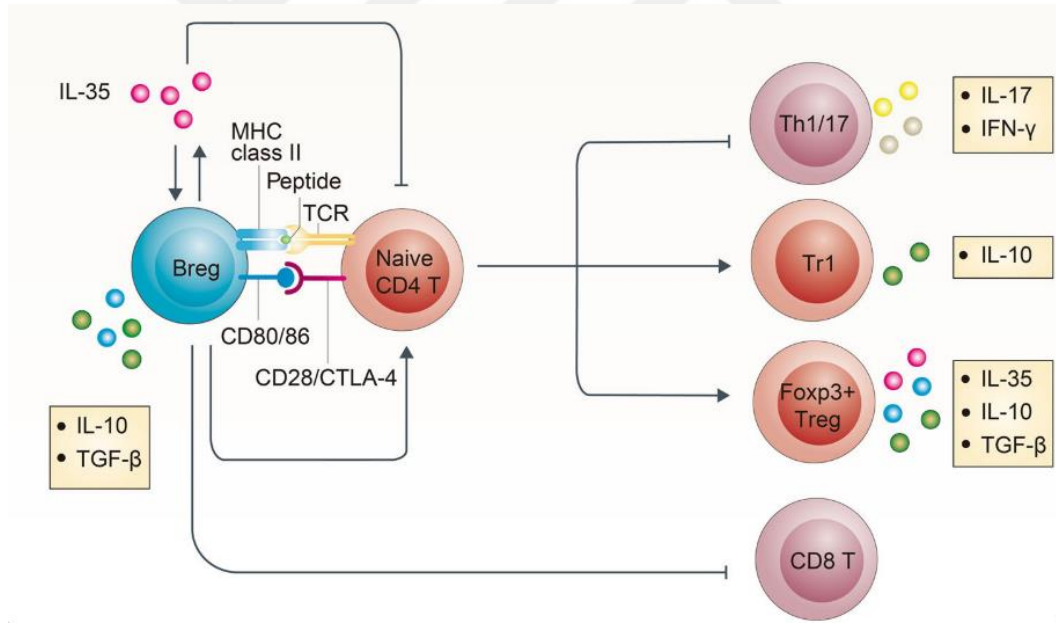
Breg hücreler, immün sistemin “kapatma düğmesi” olarak görev almaktadır ve immün homeostazın sürekliliği için önemli bir rol üstlenmektedir. *Cognate* T hücre inhibisyonu, kontakt-aracılı hücre inhibisyonu, bystander inhibisyon ve indirekt inhibisyon gibi farklı yollarla bu inhibisyonu gerçekleştiren Breg hücrelerin efektör mekanizması, IL10-bağımlı ve IL10-bağımsız olarak ikiye ayrılmaktadır (113) (Şekil 4.7.3 ve Şekil 4.7.4).

Farelerde yapılan deneylerde IL10⁺ B lenfositlerin yokluğunda tümör dokunun reddi (104) ve kontakt hipersensitivitenin ilerlemesi (114) gibi durumlar gözlemlenmekte,

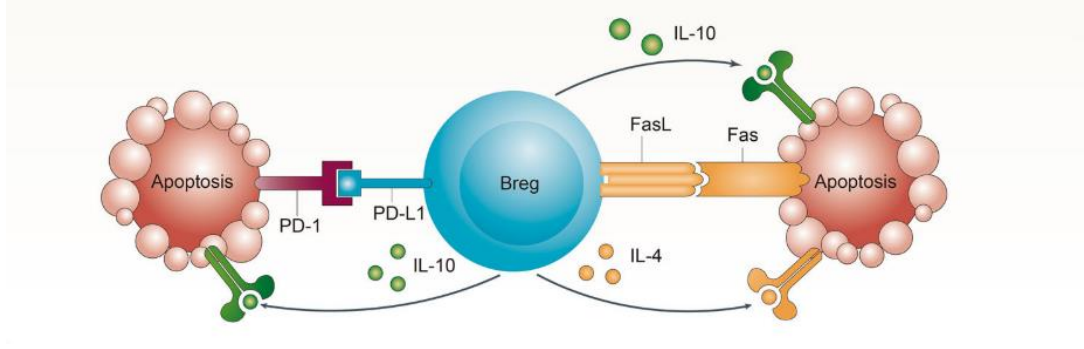
IL10⁺ Breg hücrelerin efektör immün hücreler üzerinde etkisi olduğunu işaret etmektedir.

IL10-bağımsız yolda ise birden fazla mekanizma etkilidir. İlk olarak IL35'in immün baskılayıcı bir sitokin olduğu ve Breg hücreler tarafından kullanıldığı, bunun yanında pozitif feedback ile daha fazla IL35 sentezini indüklediği de bilinmektedir (112,115–117).

TGF- β mekanizması ise Breg hücreler tarafından kullanılan bir diğer mekanizmadır. TGF- β sentezleyen Breg hücrelerin Treg hücreleri aktive ettiği ve bu aktivasyonun IL10 sinyalizasyonundan bağımsız olduğu gösterilmiştir. Ayrıca hücre-hücre etkileşimiyle Treg hücrelerde FoxP3 ve CTLA-4 sentezini indüklediği de bildirilmiştir (100,118).

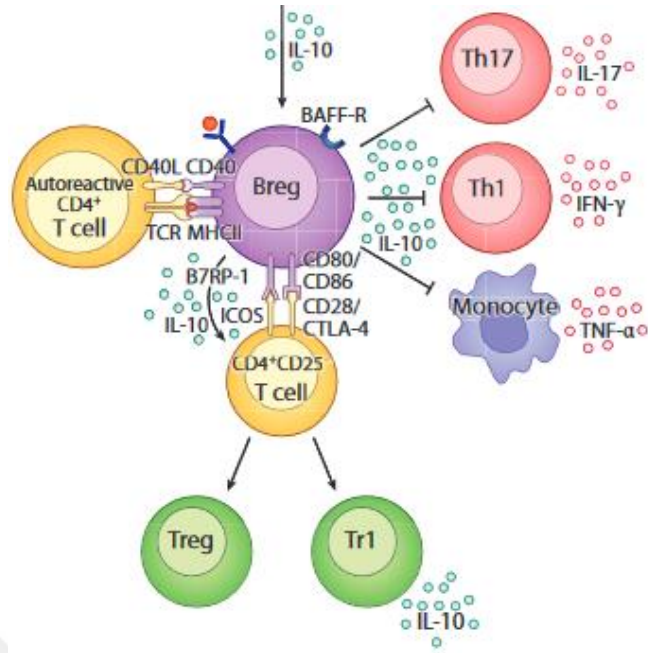


Şekil 4.7.3 Breg hücrelerin T lenfosit regülasyonu. Hücre-hücre etkileşimi ve anti-inflamatuvar sitokinler vasıtasıyla Breg hücreler; CD4⁺ T hücre proliferasyonunu ve T_H1/T_H17 farklılaşmasını baskılar. FoxP3⁺ Treg Tr1 hücreleri indükler, CD8⁺ efektör T lenfositleri baskılar (100).

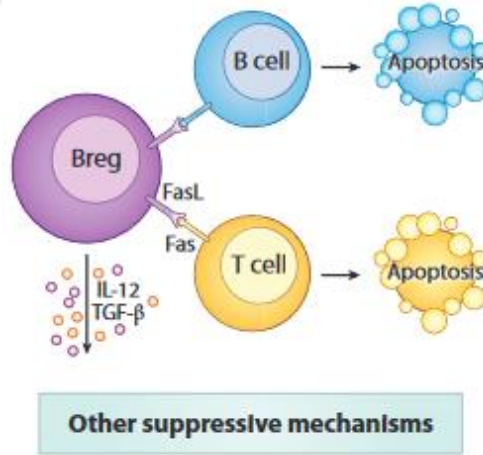


Şekil 4.7.4 Breg hücrelerin hücre-hücre etkileşimi ve apoptoz uyarımı. PD-L1 ve FasL ekspresyonu olan Breg hücreler, hedef T lenfositlerle etkileşime girdiklerinde hedef hücreyi apoptoza indükler (100).

IL10, IL35, TGF β gibi inhibitör sitokinler aracılığıyla inhibisyondan farklı olarak Breg hücrelerinin kontakt aracılı inhibisyon gerçekleştirdiği de bilinmektedir (6) (Şekil 4.7.5 ve Şekil 4.7.6). İleri evre (evre III ve evre IV) KHDAK vakalarında PD-1⁺ Tfh hücrelerinin B lenfositlerini Breg farklılaşmasına indüklediği gösterilmiştir (119). Buna ek olarak tümör mutasyon yükü (TMB) ve inflamatuvar belirteçlerin yüksek olduğu tümörlerde PD-1 ve TIM-3 gibi inhibitör yüzey reseptörlerinin ifadesinin yüksek olduğu, CD8⁺ T lenfositlerinin infiltrasyonunun arttığı, ancak bu profilin bir süre sonra (örneğin anti-PD-1 tedavisi sonrası) FoxP3⁺ Treg hücreler tarafından infiltre edildiği ve tümör ve immün hücrelerin PD-L1 ifadesinin arttığı gösterilmiştir (120). CD80/CD86-CTLA-4 ve CD40-CD40L etkileşimlerine ek olarak PD-L1-PD-1 etkileşiminin de Breg hücrelerinin kullandığı bir inhibitör yolak olduğu bilinmektedir (121–123). B hücrelerinde PD-L1 ekspresyonu Tfh hücrelerinin foliküllere çekilmesinde ve yerleşmelerinde etkin olmaktadır (124). Tümörlerde, gözlemlenen üçüncül lenfoid yapıların (*tertiary lymphoid structures*) orginazyonunda ve anti-tümoral immün yanıtta B lenfositlerinin belirleyici rol oynadığı gösterilmiştir (125). Dolayısıyla anti-tümoral immün yanıtta PD-L1⁺ B hücrelerinin müspet veya menfi etkilerinin olabileceği düşünülebilir.



Şekil 4.7.5 Fonksiyonel Breg efektör hücre farklılaşması ve regülatör mekanizması (101).



Şekil 4.7.6 Kontakt aracılı hücre inhibisyonu (101).

5. MATERYAL METOD

5.1 Deney Dizayını

1. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Göğüs Cerrahisi ABD’da ameliyat olan KHDAK hastalarından elde edilen tümöral dokulardan (ayrıca mediastinal lenf düğümlerinden ve periferik kandan) B lenfositlerinin saflaştırılması (kontrol olarak kanser dışı akciğer dokudan ve periferik venöz kandan elde edilecek hücreler ile sağlıklı bireylerden elde edilen periferik kan mononükleer hücreleri (PBMC) kullanılmıştır.

2. Tümör infiltrate B lenfositlerinin yüzey inhibitör molekül ekspresyonu için Floresanla Aktifleştirilmiş Hücre Ayırıştırılması (FACS) deneyleri kullanılmıştır.

3. B lenfositlerinin T hücre yanıtına etkilerinin belirlenmesi (B hücrelerinin T hücre işlevlerine etkisi ve etkilerde tespit edilen moleküllerin katkısının incelenmesi) için hücre kültürü deneyleri yapılmıştır.

5.2 Materyal

Tez kapsamında kullanılan materyal ve cihazlar Tablo 5.1’de verilmiştir.

Tablo 5.1 Kullanılan kimyasal ve biyolojik materyaller ve cihazlar.

Materyal/Cihaz	Marka	Katalog No.
70 µm Cell Strainer	Falcon	352350
12x75mm 5 mL, snap cap, Round-Bottom Polypropylene Tüp	Falcon	352063
5 mL Serolojik Pipet	Sarstedt	86.1253001-500
10 mL Serolojik Pipet	Sarstedt	86.1254001-500
25 mL Serolojik Pipet	Sarstedt	86.1685001-200
Stericup-GP 500mL Express Plus PES .22µm	Millipore	S2GPU05RE
F(ab') ₂ -Goat anti-Human IgG, IgM (H+L) Secondary Antibody, Functional Grade	Invitrogen	16-5099-85

Animal-Free Recombinant Human sCD40 Ligand	Peprotech	AF-310-02
U0126		
Tumor Dissociation Kit, human	Miltenyi Biotec	130-095-929
MidiMACS Starting Kit (LS)	Miltenyi Biotec	130-042-301
APC anti-human CD19 Antibody	BioLegend	302212
APC/Cyanine7 anti-human CD3	BioLegend	300426
PE anti-human CD274 (B7-H1, PD-L1) Antibody	BioLegend	393608
PE Mouse IgG1, κ Isotype Ctrl (FC) Antibody	BioLegend	400114
FITC anti-human CD28 Antibody	BioLegend	302906
FITC Mouse IgG1, κ Isotype Ctrl Antibody	BioLegend	400108
PE/Cy7 anti-human CD279 (PD-1) Antibody	BioLegend	329918
PE/Cy7 Mouse IgG1, κ Isotype Ctrl Antibody	BioLegend	400126
CD45 MicroBeads, human	Miltenyi Biotec	130-045-801
LS Column	Miltenyi Biotec	130-042-401
gentleMACS C Tubes 25 tubes	Miltenyi Biotec	130-093-237
CFSE Cell Division Tracker Kit	BioLegend	423801
Ultra-LEAF™ Purified anti-human CD3	BioLegend	300438
Bistüri ucu, No:10	Beybi	U2500
BluCapp centrifuge tubes 15ml, pre-sterile	CAPP	5100015C
BluCapp 50ml, pre-sterile	CAPP	5100050C
TC Plate 24 Well, Standard, Flat	Sarstedt	83.3922-50
TC Plate 96 Well, Standard, Flat	Sarstedt	83.3924-50

TC Dish 100x20mm	Sarstedt	83.3902-300
25cm ² Rectangular Canted Neck Cell Culture Flask with Vent Cap	Corning	3289
Enjektör 3 parça 2 CC, yeşil	Set Medikal	TIP-0132Y
Plastik kan tüpü, K2EDTA püskürtülmüş	BD	366643
Fetal Bovine Serum, heat inactivated, E.U.-approved, South America Origin	Gibco	10500-064
RPMI 1640 Medium. HEPES.	Gibco	22400-089
PBS Tablet	BioShop	PBS404.100
UltraPure DNaz/RNase-free Distile Su	Gibco	10977035
Trypan Blue Solution, 0.4%	Gibco	15250061
gentleMACS Dissociator	Miltenyi Biotec	130-093-235
inFlux Cell Sorter	BD	
Class II Airstream	ESCO	
Forma Steri-Cult CO2 İnkübatör	Thermo-Scientific	
Heraus Labofuge 400 R	Thermo-Scientific	

5.3 Dokulardan Hücre İzolasyonu

Tümör ve sağlıklı doku için *Tumor dissociation kit, human (Miltenyi Biotec)* talimatlarına uyarak ayrı ayrı enzim karışımı hazırlandı (4.7mL RPMI-1640, 200µL Enzim H, 100µL Enzim R, 25µL Enzim A). Tümör, lenf nodu ve akciğer dokuları, kendi isimlerini taşıyan boş steril petrilere alınarak tartıldı.

5.3.1 Tümör ve Sağlıklı Dokudan Hücre İzolasyonu

Tümör dokusunun bulunduğu petrideki tümör dokunun üzerine hazırlanan enzim karışımından 500 µL eklendi. 5 dakika boyunca 2 adet steril bistüri ile kesildi. P1000 pipet ucunun uç kısmı, makasla kesilerek daha büyük bir hale getirildi. Bu uç kullanılarak kesilen doku parçaları toplandı ve “T” işaretli, mor kapaklı gentleMACS

C tüp içine transfer edildi. Bistüriler, enzim içeren tüpe daldırılıp iyice yıkanarak bistüri üzerindeki hücrelerin geri kazanımı sağlandı. Bıçaklar atıldıktan sonra bistüri sapları önce 70% EtOH, sonra dH₂O tüpüne daldırılıp kurulandı.

Pipet ucu değiştirilmeden, 15 mL konik tüpte hazırlanan enzim karışımı, her defasında 500 µL alınarak petri yıkaması için kullanıldı ve doku kalıntıları toplanmaya çalışıldı. Konik tüpteki bütün enzim bitene kadar petri yıkanmaya devam edildi. Yıkama için kullanılan bütün enzim ve kesilen dokunun kendisi, mor kapaklı gentleMACS C tüp içine transfer edilmiş oldu (toplam 5 mL enzim + doku).

Akciğer dokusunun bulunduğu petrideki akciğer dokunun üzerine hazırlanan enzim karışımından 500 µL eklendi. Bistüri uçları yenileriyle değiştirilerek 5 dakika boyunca 2 adet steril bistüri ile doku kesildi. P1000 pipet ucunun uç kısmı, makasla kesilerek daha büyük bir hale getirildi. Bu uç kullanılarak kesilen doku parçaları toplandı ve “L” işaretli, mor kapaklı gentleMACS C tüp içine transfer edildi. Bistüriler, enzim içeren tüpe daldırılıp iyice yıkanarak bistüri üzerindeki hücrelerin geri kazanımı sağlandı. Bıçaklar atıldıktan sonra bistüri sapları önce 70% EtOH, sonra dH₂O tüpüne daldırılıp kurulandı.

Pipet ucu değiştirilmeden, 15 mL konik tüpte hazırlanan enzim karışımı, her defasında 500 µL alınarak petri yıkaması için kullanıldı ve doku kalıntıları toplanmaya çalışıldı. Konik tüpteki bütün enzim bitene kadar petri yıkanmaya devam edildi. Yıkama için kullanılan bütün enzim ve kesilen dokunun kendisi, mor kapaklı gentleMACS C tüp içine transfer edilmiş oldu (toplam 5 mL enzim + doku).

Dokuların toplanması ve petrilerin enzim karışımı ile yıkanması bittikten sonra gentleMACS C tüpleri, gentleMACS Dissociator cihazına yerleştirildi ve h_tumor_01.01 programı çalıştırıldı. Program sonunda tüpler, 37 °C’a ayarlı inkübatör içinde bulunan çalkalayıcı (tilt-shaker) üzerine yerleştirildi ve 30 dakika boyunca enzim karışımı içinde ilk inkübasyon gerçekleştirildi.

30 dakika sonunda C tüpler inkübatörden alınıp tekrar gentleMACS Dissociator cihazına yerleştirildi ve h_tumor_01.01 programı çalıştırıldı. Program sonunda tüpler, 37 °C'a ayarlı inkübatör içinde bulunan çalkalayıcı (tilt-shaker) üzerine yerleştirildi ve 30 dakika boyunca enzim karışımı içinde ikinci inkübasyon gerçekleştirildi.

İkinci inkübasyon sonrası C tüpler inkübatörden alınıp tekrar gentleMACS Dissociator cihazına yerleştirildi ve h_tumor_01.01 programı çalıştırıldı. Program sonunda C tüpler 70% EtOH ile silindikten sonra laminar akımlı kabine alınarak kapakları açıldı. Her bir C tüp için ayrı ayrı 50 mL konik tüp ve 70 µm süzgeç (*strainer*) açıldı. Konik tüpler "TÜMÖR" ve "AKCİĞER" olarak isimlendirildi. Süzgeçlere temas etmeden konik tüplerin üzerine oturtuldu.

21G iğneli şırıngaya TÜMÖR etiketli C tüpten alınan örnek, TÜMÖR etiketli 50 mL konik tüpe süzgeçten geçirilerek transfer edildi. TÜMÖR etiketli C tüpteki bütün materyal bitince, süzgeçin alt kısmında asılı kalan damlacıklar P1000 pipetle toplanıp konik tüpün içine bırakıldı.

21G iğneli 2 mL şırıngaya AKCİĞER etiketli C tüpten alınan örnek, AKCİĞER etiketli 50 mL konik tüpe süzgeçten geçirilerek transfer edildi. AKCİĞER etiketli C tüpteki bütün materyal bitince, süzgeçin alt kısmında asılı kalan damlacıklar P1000 pipetle toplanıp konik tüpün içine bırakıldı.

C tüplere 5 mL 1X PBS eklenip 1 kez h_tumor_01.01 programı uygulanarak tüpte ve kapakta kalan hücreler temizlenmiş oldu. AKCİĞER etiketli C tüpteki tampon çözelti kendi şırıngasıyla, TÜMÖR etiketli C tüpteki tampon çözelti kendi şırıngasıyla alınıp, süzgeçten geçirilerek ilgili 50 mL konik tüplerde toplanan dokuların üzerine eklendi. 1600 rpm, 10 dakika 22 °C'ta her iki konik tüp santrifüj edildi ve santrifüj sonunda sıvı fazlar atılarak akciğer örneği 10 mL 1X PBS ile çözüldü ve 20 µL örnek alınıp 5 µL tripan mavisini ile karıştırılarak hücre sayımı yapıldı. Tümör örneğine ise eritrosit lizis protokolü uygulandı.

5.3.1.1 Tümör Dokusu Eritrosit Lizisi

TÜMÖR tüpüne eritrositlerden kurtulmak amacıyla, sıvı faz uzaklaştırıldıktan sonra 50 mL eritrosit lizis tamponu uygulandı (Eritrosit lizis tamponu: 0,15M NH₄Cl, 10mM KHCO₃, 0.1mM Na₂EDTA. pH 7.2). Tüp 20 dakika karanlıkta ve oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası 1600 rpm, 10 dakika 22 °C'ta santrifüj edildi. Santrifüj sonrası sıvı faz uzaklaştırıldı ve hücre pelleti 10 mL 1X PBS ile süspanse edildi. Süspanse edilen pelletten 20 µL örnek alınıp 5 µL tripan mavisi ile karıştırılarak hücre sayımı yapıldı. Sayım sırasında konik tüp 1600 rpm, 10 dakika 20 °C'ta santrifüj edildi.

5.3.2 Lenf Nodu (LN) Hücre İzolasyonu

Lenf nodu, tartım yapıldığı steril petriye alınmadan önce steril RPMI-1640 besiyeri ortamı ile yıkandı. Petriye 1 adet 70 µm süzgeç yerleştirilip içerisine lenf nodu dokusu yerleştirildi. 2 mL şırınga pistonunun ters tarafıyla (lastiksiz ve tırtıklı taraf) lenf doku, strainer içinde iyice ezildi. Ezme işlemi 5 dakika boyunca devam ettirildi. Strainer, LN etiketli konik tüpün üzerine yerleştirilip petrideki sıvı kısım P1000 pipet yardımıyla toplandı ve süzgeçten geçirilerek konik tüpte toplandı. Süzgeçte kalan hücrelerin geri kazanımı için 10 mL 1X PBS ile süzgeç yıkandı. Toplanan hücre süspanسیونundan 20 µL örnek alınıp 5 µL tripan mavisi ile karıştırılarak hücre sayımı yapıldı.

5.3.3 Periferik Kan Mononükleer Hücre İzolasyonu

EDTA'lı tüp içine alınan kan, 50 mL konik tüp içine toplandı. EDTA'lı tüpler eritrosit lizis tamponu ile yıkanarak 50 mL tüp üzerine eklendi. Konik tüp kan hacminin 10 katı kadar eritrosit lizis tamponu ile tamamlanıp 15 dakika, oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyon sonrası 1600 rpm, 10 dakika 22 °C'ta santrifüj yapıldı. Santrifüjden sonra sıvı faz uzaklaştırılıp hücreler 10mL 1X PBS ile çözüldü. Hücre süspanسیونundan 20 µL örnek alınarak 5 µL tripan mavisi ile karıştırılıp sayım yapıldı. Bu sırada hücrelerin bulunduğu tüp ise 1600 rpm, 10 dakika 22 °C'ta santrifüj edildi.

5.4 Manyetik Aktifleştirilmiş Hücre Ayırılması (MACS)

Tümör dokusu eritrosit lizisi sonrası santrifüj edilen tümör tütünün santrifüj sonrasında sıvı fazı tamamen uzaklaştırılıp, pellet 160 µL buzda soğutulmuş MACS tamponu içinde çözüldü. (MACS tamponu: 0.5% BSA, 2mM EDTA içeren de-gassed steril Ca⁺⁺/Mg⁺⁺ içermeyen 1X PBS. pH 7.2).

Üreticinin talimatlarına göre her bir 10.10⁶ hücre için 20 µL buzda soğutulmuş CD45 MicroBead eklenip iyice karıştırıldı. 15 dakika buzdolabında inkübe edildi. İnkübasyon sonunda her bir 10.10⁶ hücre için 2 mL MACS tamponu eklenip 1300 rpm, 10 dakika +4 °C'ta santrifüj edildi. Santrifüj sonunda sıvı faz pipetle sonuna kadar uzaklaştırıldı. Pellet 500 µL buzda soğutulmuş MACS tamponu içinde çözüldü.

Manyetik stand, kolon ve kolondan geçenlerin toplanacağı "CD45-" etiketli 15 mL konik tüp, kolonun altına yerleştirilerek sistem hazırlandı. Bütün işlem kabinde, steril koşullarda devam etti.

Kolona 3 mL buzda soğutulmuş MACS tamponu eklendi. Tampon, hava kabarcığı oluşmasını engellemek için, kolonun duvarına serolojik pipetin ucu yaslanarak bırakıldı. Manyetik ayırıcı kısım (sünger benzeri kısım) üzerindeki geniş toplama bölgesinde bulunan tampon tamamen sünger kısma geçene kadar beklenildi. (10,126).

MACS tamponu koyulan haznedeki tampon tamamen manyetik ayırıcı kısma (sünger benzeri kısım) geçtiği an hücreler kolon duvarından bırakılarak kolon üzerine eklendi. Bütün hücre solüsyonu manyetik ayırıcı kısma (sünger benzeri kısım) geçtiği an 3 mL MACS tamponu kolon duvarına yaslanan serolojik pipet ile kolona eklendi.

3 mL MACS tamponu yıkaması bitince 2. kez 3 mL MACS tamponu aynı şekilde kolona eklendi. 2. kolon yıkaması bitince 3. kez 3 mL MACS tamponu aynı şekilde kolona eklendi.

Kolon haznesindeki tampon tamamen manyetik ayırıcı kısma geçtiği zaman, kolon manyetik stand üzerinden alınıp, buz içerisinde bekleyen "CD45+" etiketli 15 mL

konik tüpün ağzına oturtuldu. Üzerine 5 mL MACS tamponu eklenip piston kolona yerleştirildi ve güçlüce ittirildi. Kolonda takılan CD45 manyetik antikolar ile işaretlenen hücreler 5 mL MACS tamponu içinde saflaştırıldı.

Hem CD45- hem de CD45+ hücreler için 20 µL hücre solüsyonu alınıp 5 µL tripan mavisi ile karıştırılarak sayım yapıldı.

5.5 Floresanla Aktifleştirilmiş Hücre Ayrıştırılması (FACS)

Hücrelerin fenotipik analizleri ile saflaştırmalar BD Influx Cell Sorting cihazında gerçekleştirildi. Bütün örneklerden eşit sayıda hücre olacak şekilde 15x75mm yuvarlak tabanlı polipropilen tüplere (FACS tüpü) hücreler paylaştırıldı ve 1600 rpm, 5 dakika 20 °C'ta santrifüj edildi. Santrifüj sonrası sıvı fazlar uzaklaştırıldı. Örnekler, tüplerin dibinde kalan hacimde çözülerek süspansiyon haline getirildi ve Tablo 5.2'de belirtilen immünofloresan boya ile boyandı. Her bir immünofloresan boyadan 3 µL eklendi. 15 dakika boyunca oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübe edildi.

İnkübasyon sonunda her bir tüpe 2 mL 1X PBS eklenerek 1600 rpm, 5 dakika 20 °C'ta santrifüj edildi. Sıvı fazlar uzaklaştırıldı ve 500 µL FACS tamponu içinde çözülen örneklerin üzerine tüp başına 10 µL DAPI eklendi. Buz içerisinde taşınan örneklerden BD Influx Cell Sorting cihazı ile CD19+ hücreler ve CD3+ hücreler, içerisinde 1 mL 100% FBS bulunan 50 mL konik tüplerine ayrıştırıldı.

Tablo 5.2 Akan hücre ölçer için hazırlanan örnekler ve kullanılan immünofloresan boyalar.

Sıra No.	Örnek	Antikor
1	Tümör – Antikor	CD3, CD19, PD1, PDL1, CD28, DAPI
2	Tümör – İzotip	CD3, CD19, isoPD1, isoPDL1, isoCD28, DAPI
3	Lenf Nodu – Antikor	CD3, CD19, PD1, PDL1, CD28, DAPI
4	Lenf Nodu – İzotip	CD3, CD19, isoPD1, isoPDL1, isoCD28, DAPI
5	Akciğer – Antikor	CD3, CD19, PD1, PDL1, CD28, DAPI

6	Akciğer – İzotip	CD3, CD19, isoPD1, isoPDL1, isoCD28, DAPI
7	PBMC – Antikor	CD3, CD19, PD1, PDL1, CD28, DAPI
8	PBMC – İzotip	CD3, CD19, isoPD1, isoPDL1, isoCD28, DAPI
9	PBMC – İzotip karışımı	isoCD3, isoCD19, isoPD1, isoPDL1, isoCD28, DAPI
10	PBMC – Boyanmamış	DAPI

5.6 Hücre kültürü

B lenfosit aktivasyonu ve MEK1/2 inhibitörü için hücre kültürü deneyleri gerçekleştirildi.

5.6.1 B lenfosit aktivasyon deneyleri

Şekil 5.6.1’de gösterildiği üzere 24-kuyucuklu plakalar deney öncesinde organize edildi. α CD3 işaretli kuyucuklar, deneye başlamadan önce kaplama için hazırlandı.

Ultra-LEAF™ Purified anti-human CD3 antikordan 25 μ L, 2475 μ L 1X PBS içinde çözülerek 2.5mL 1X PBS – α CD3 Ab coating solution hazırlanmış oldu.

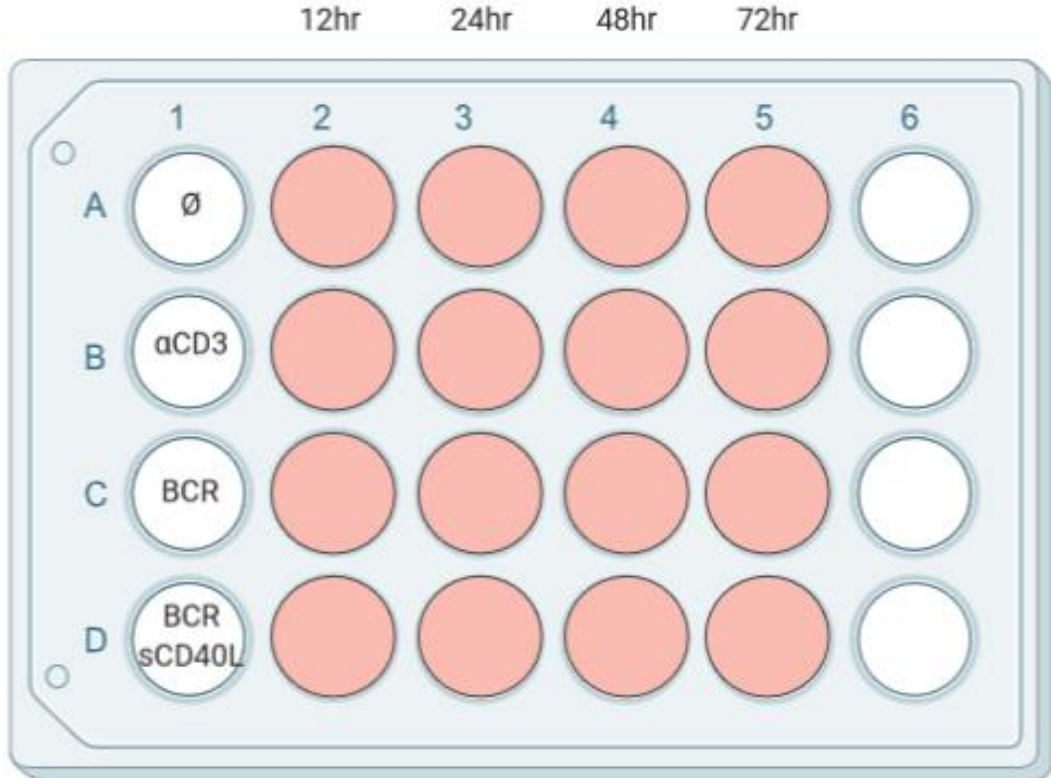
24-kuyucuklu plate için her bir kuyucuğa 500 μ L Ab coating solüsyonu eklendi. 1 saat boyunca 37°C’de inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon sonunda antikor solüsyonu tekrar kullanılmak üzere falkonuna toplanıp, kuyucuklar 3 kez, 2 mL 1X PBS ile yıkandı.

Sağlıklı donörden EDTA’lı tüp içine alınan kan, 50 mL konik tüp içine toplandı. EDTA’lı tüpler eritrosit lizis tamponu ile yıkanarak 50mL tüp üzerine eklendi. Konik tüp kan hacminin 10 katı kadar eritrosit lizis tamponu ile tamamlanıp 15 dakika, oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübasyona bırakıldı.

Inkübasyon sonrası 1600 rpm, 10 dakika 22 °C’ta santrifüj yapıldı. Santrifüjden sonra sıvı faz uzaklaştırılıp hücreler 10mL 1X PBS ile çözüldü. Hücre süspansiyonundan 20

μL örnek alınarak $5 \mu\text{L}$ tripan mavisi ile karıştırılıp sayım yapıldı. Bu sırada hücrelerin bulunduğu tüp ise 1600 rpm , 10 dakika $22 \text{ }^\circ\text{C}$ 'ta santrifüj edildi. Elde edilen hücre miktarına göre hücreler complete RPMI-1640 besiyeri içinde çözülüp kuyucuklara homojen olarak pay edildi. \emptyset işaretli kuyucuklar uyarılmamış PBMC kontrol olarak kullanılırken BCR işaretli kuyucuklara $10\mu\text{g/mL}$ anti-Human [IgG + IgM] (anti-BCR), BCR/sCD40L işaretli kuyucuklara $10\mu\text{g/mL}$ anti-Human [IgG + IgM] (anti-BCR)'a ek olarak $1\mu\text{g/mL}$ sCD40L eklendi.

12 , 24 , 48 ve 72 saatler sonunda ilgili kuyucuklardaki hücreler homojenize edilerek toplandı ve 10 mL 1X PBS ile 1600 rpm , 5dk 22°C 'de santrifüj edilerek yıkandı. Hücreler daha sonra $200 \mu\text{L}$ 1X PBS ile çözülerek eşit miktarda iki ayrı FACS tüpüne pay edildi. Tablo 5.2'de belirtilen antikorlar ile tüplerden biri izotip boyama için kullanılırken diğeri antikor boyama için kullanıldı. BD Influx Cell Sorting cihazıyla analizler gerçekleştirildi.



Şekil 5.6.1 B lenfosit aktivasyon deneyleri için 24-kuyucuklu plaka organizasyonu.

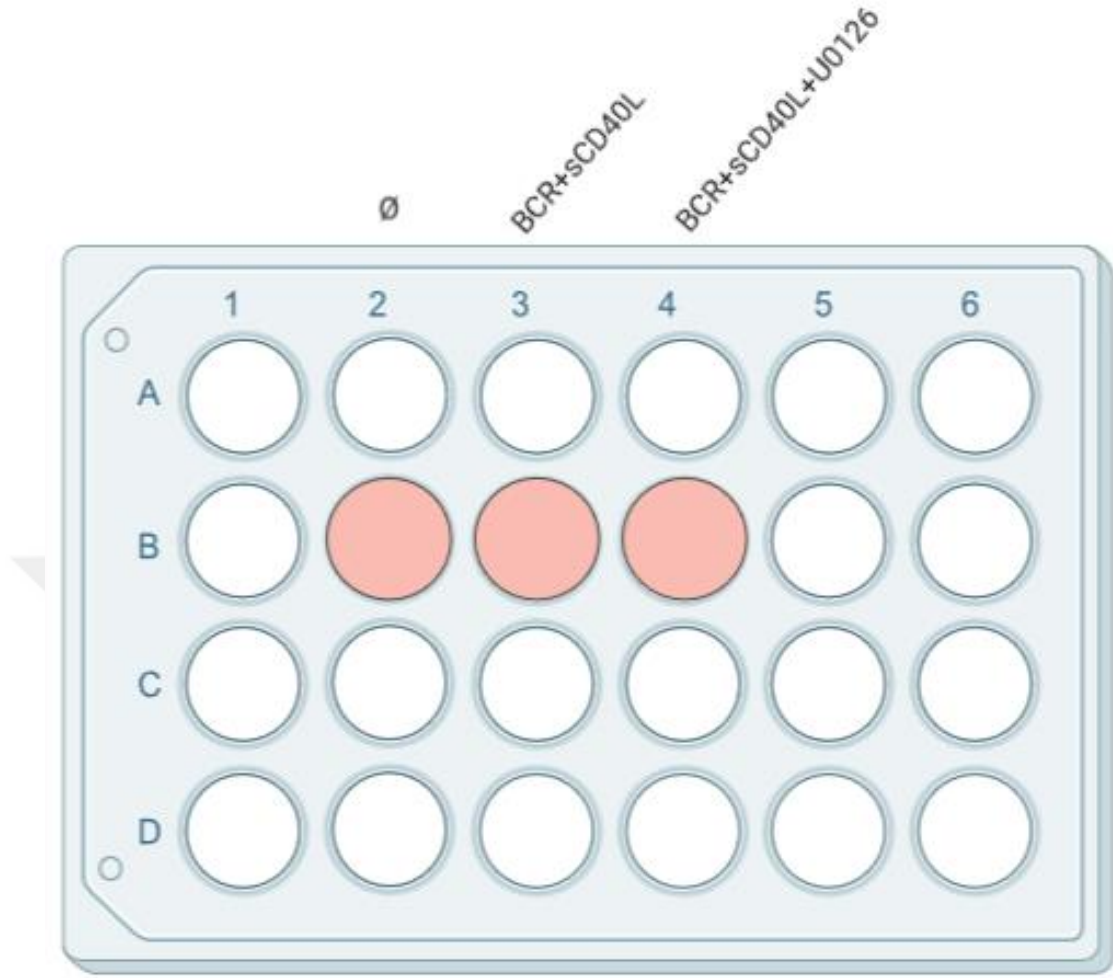
5.6.2 Selektif MEK1/2 inhibitör deneyleri

Sağlıklı donörden EDTA'lı tüp içine alınan kan, 50 mL konik tüp içine toplandı. EDTA'lı tüpler eritrosit lizis tamponu ile yıkanarak 50mL tüp üzerine eklendi. Konik tüp kan hacminin 10 katı kadar eritrosit lizis tamponu ile tamamlanıp 15 dakika, oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyon sonrası 1600 rpm, 10 dakika 22 °C'ta santrifüj yapıldı. Santrifüjden sonra sıvı faz uzaklaştırılıp hücreler 10mL 1X PBS ile çözüldü. Hücre süspansiyonundan 20 µL örnek alınarak 5 µL tripan mavisi ile karıştırılıp sayım yapıldı. Bu sırada hücrelerin bulunduğu tüp ise 1600 rpm, 10 dakika 22 °C'ta santrifüj edildi. Elde edilen hücre miktarına göre hücreler uygun miktarda anti-CD3-APC/Cy7 ve anti-CD19-APC antikorlarıyla 15 dakika, karanlıkta ve oda sıcaklığında inkübe edilerek boyandı.

İnkübasyon sonunda her bir tüpe 2 mL 1X PBS eklenerek 1600 rpm, 5 dakika 20 °C'ta santrifüj edildi. Sıvı fazlar uzaklaştırıldı ve 500 µL FACS tamponu içinde çözülen örneklerin üzerine tüp başına 10 µL DAPI eklendi. Buz içerisinde taşınan örneklerden BD Influx Cell Sorting cihazı ile CD19+ hücreler ve CD3+ hücreler, içerisinde 1 mL 100% FBS bulunan 50 mL konik tüpler içine ayrıştırıldı.

Hücre ayrıştırması sonucunda elde edilen saf CD19+ B lenfositleri 1600 rpm, 5dk 22°C'de santrifüj edildikten sonra complete RPMI-1640 besiyeri ile süspanse edildi ve Şekil 5.6.2 ile gösterilen düzende 24-kuyucuklu plakalara ekim yapıldı. Ø işaretli kuyucuklar uyarılmamış kontrol olarak kullanılırken BCR+sCD40L işaretli kuyucuklara 10µg/mL anti-Human [IgG + IgM] (anti-BCR)'a ek olarak 1µg/mL sCD40L eklendi, BCR+sCD40L+U0126 işaretli kuyucuklara 10µg/mL anti-Human [IgG + IgM] (anti-BCR)'a ek olarak 1µg/mL sCD40L ve son konsantrasyonu 10µM olacak şekilde U0126 selektif MEK1/2 inhibitörü eklendi.



Şekil 5.6.2 MEK-ERK inhibisyon deneyleri için 24-kuyucuklu plaka organizasyonu.

24 saat sonunda ilgili kuyucuklardaki hücreler homojenize edilerek toplandı ve 10 mL 1X PBS ile seyreltilerek 1600 rpm, 5dk 22°C’de santrifüj edilerek yıkandı. Hücreler daha sonra 200 µL 1X PBS ile çözülerek eşit miktarda iki ayrı FACS tüpüne pay edildi. Tablo 5.2’de belirtilen antikorlar ile tüplerden biri izotip boyama için kullanılırken diğeri antikor boyama için kullanıldı. BD Influx Cell Sorting cihazıyla analizler gerçekleştirildi.

5.6.3 Eşkültür deneyleri

Sağlıklı donörden EDTA’lı tüp içine alınan kan, 50 mL konik tüp içine toplandı. EDTA’lı tüpler eritrosit lizis tamponu ile yıkanarak 50mL tüp üzerine eklendi. Konik

tüp kan hacminin 10 katı kadar eritrosit lizis tamponu ile tamamlanıp 15 dakika, oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyon sonrası 1600 rpm, 10 dakika 22 °C'ta santrifüj yapıldı. Santrifüjden sonra sıvı faz uzaklaştırılıp hücreler 10mL 1X PBS ile çözüldü. Hücre süspansiyonundan 20 µL örnek alınarak 5 µL tripan mavisi ile karıştırılıp sayım yapıldı. Bu sırada hücrelerin bulunduğu tüp ise 1600 rpm, 10 dakika 22 °C'ta santrifüj edildi. Elde edilen hücre miktarına göre hücreler uygun miktarda anti-CD3-APC/Cy7 ve anti-CD19-APC antikorlarıyla 15 dakika, karanlıkta ve oda sıcaklığında inkübe edilerek boyandı.

İnkübasyon sonunda her bir tüpe 2 mL 1X PBS eklenerek 1600 rpm, 5 dakika 20 °C'ta santrifüj edildi. Sıvı fazlar uzaklaştırıldı ve 500 µL FACS tamponu içinde çözülen örneklerin üzerine tüp başına 10 µL DAPI eklendi. Buz içerisinde taşınan örneklerden BD Influx Cell Sorting cihazı ile CD19+ hücreler ve CD3+ hücreler, içerisinde 1 mL 100% FBS bulunan 50 mL konik tüpler içine ayrıştırıldı.

Hücre ayrıştırması sonucunda elde edilen saf CD19+ B lenfositleri 1600 rpm, 5dk 22°C'de santrifüj edildikten sonra complete RPMI-1640 besiyeri ile süspanse edildi ve 96-kuyucuklu plakalara ekildi. Bir grup hücre uyarılmazken diğer grup için kuyucuklara 10µg/mL anti-Human [IgG + IgM] (anti-BCR) eklenerek gece boyunca 37°C inkübatörde aktivasyona bırakıldı.

CD3+ T lenfositleri ise 1600 rpm, 5dk 22°C'de santrifüj edildikten sonra complete RPMI-1640 besiyeri ile süspanse edildi ve T25 flask içinde gece boyu 37°C inkübatörde kültür edildi.

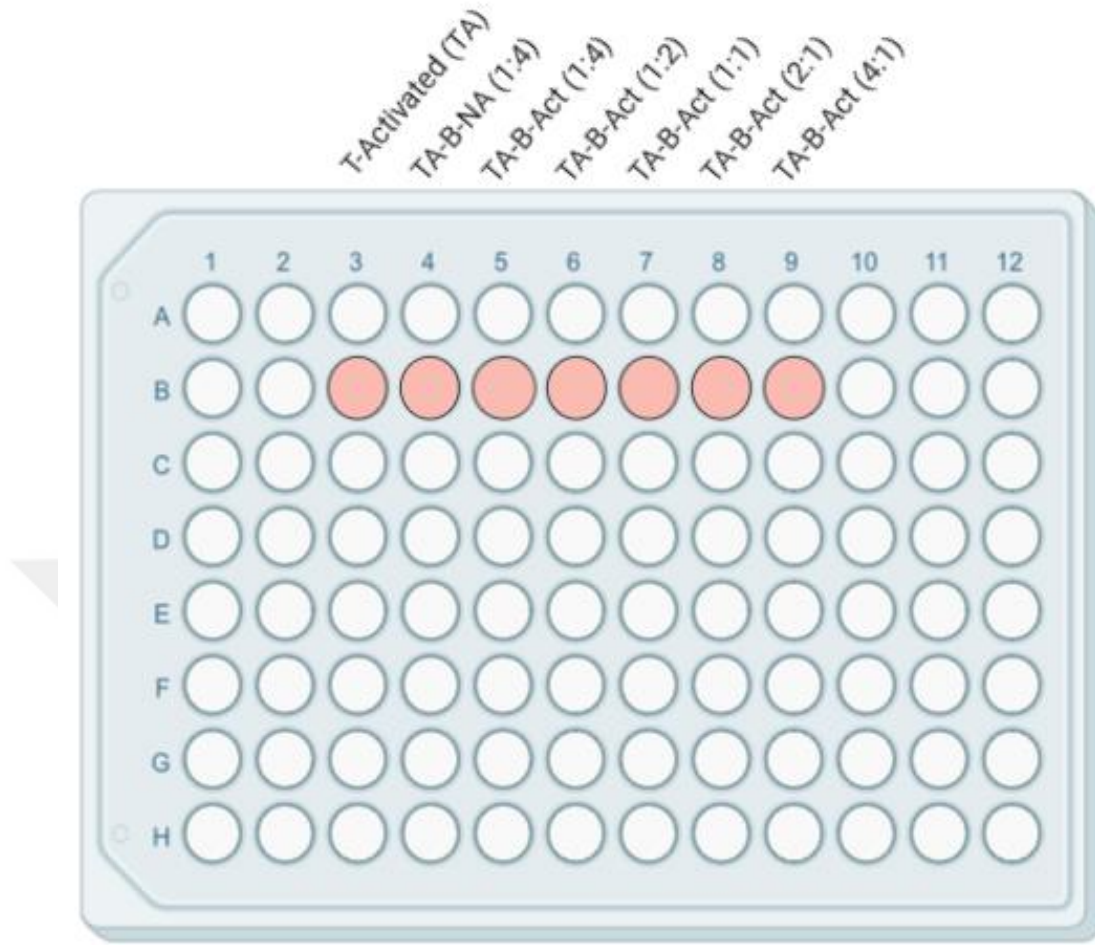
Takip eden günün sabahında ayrı bir 96-kuyucuklu plate kuyucukları, daha önce açıklandığı şekilde Ultra-LEAF™ Purified anti-human CD3 antikoruyla kaplandı (96-kuyucuklu plate için kuyucuk başına 200µL solüsyon kullanıldı).

Gece boyu hücre kültüründe bulunan T lenfositleri 1600 rpm, 5 dakika 20 °C'ta santrifüj edildi. Sıvı faz uzaklaştırıldı ve her $10 \cdot 10^6$ hücre için 1 mL 5 μ M CFSE solüsyonu hazırlandı (1 μ L CFSE, 999 μ L H₂O ile karıştırılıp dilüe edildi).

Hücre pelleti 20 dk oda sıcaklığında ve karanlıkta 1 mL CFSE-H₂O ile boyanıp inkübasyon sonunda 5mL complete RPMI ile seyreltildi (başlangıçta kullanılan CFSE hacminin 5 katı complete medium).

1600 rpm, 10 dk oda sıcaklığında santrifüj edildi. Santrifüj sonrası supernatant dökülüp önceden ısıtılmış 10 mL complete RPMI-1640 içinde pellet çözüldü. Asetat hidrolizi için en az 10 dk oda sıcaklığında beklettikten sonra deneye devam edildi.

CD3+ T lenfositleri Şekil 5.6.3'te gösterildiği gibi her kuyucuğa sabit miktarda ekilirken CD19+ B lenfositleri değişen miktarlarda T lenfositleriyle aynı kuyucuğa ekilerek 7 günlük eşkültür deneyi başlatıldı. 7 gün sonunda hücreler kuyucuklardan toplanarak 2 mL 1X PBS ile seyreltildi ve 1600 rpm, 5dk 22°C'ta santrifüj edildi. Santrifüj sonrası supernatant uzaklaştırıldı ve örnek başına 3 μ L CD3-APC/Cy7 ve 3 μ L CD19-APC immünfloresan boyaları eklenerek 15dk, karanlıkta ve oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon sonunda tüplere 2mL 1X PBS eklenerek seyreltildi ve 1600 rpm, 5dk 22°C'ta santrifüj edildi. Santrifüj sonunda hücre pelletleri 500 μ L 1X PBS ile çözüldü ve BD Influx Cell Sorting cihazıyla analizler gerçekleştirildi.



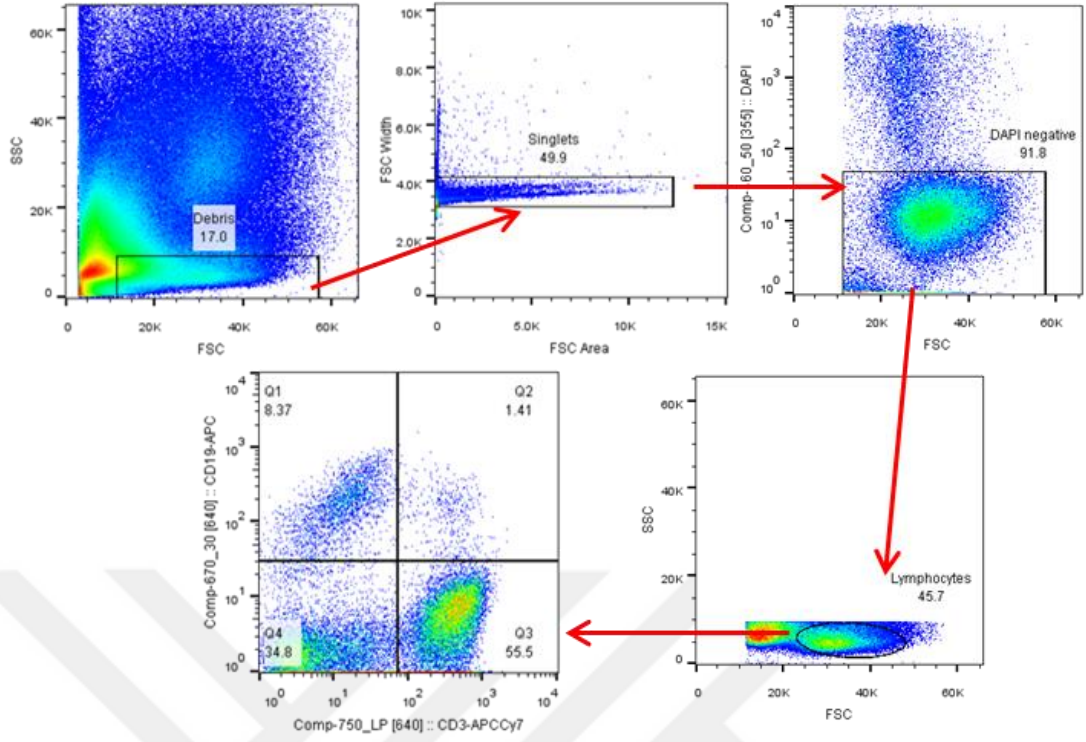
Şekil 5.6.3 Eşikültür deneyleri için 96-kuyucuklu plaka organizasyonu.

6. BULGULAR

6.1 Tümör infiltrate B lenfositlerinde PD-L1 ifadesi diğer dokulara kıyasla daha yüksek bulunmaktadır

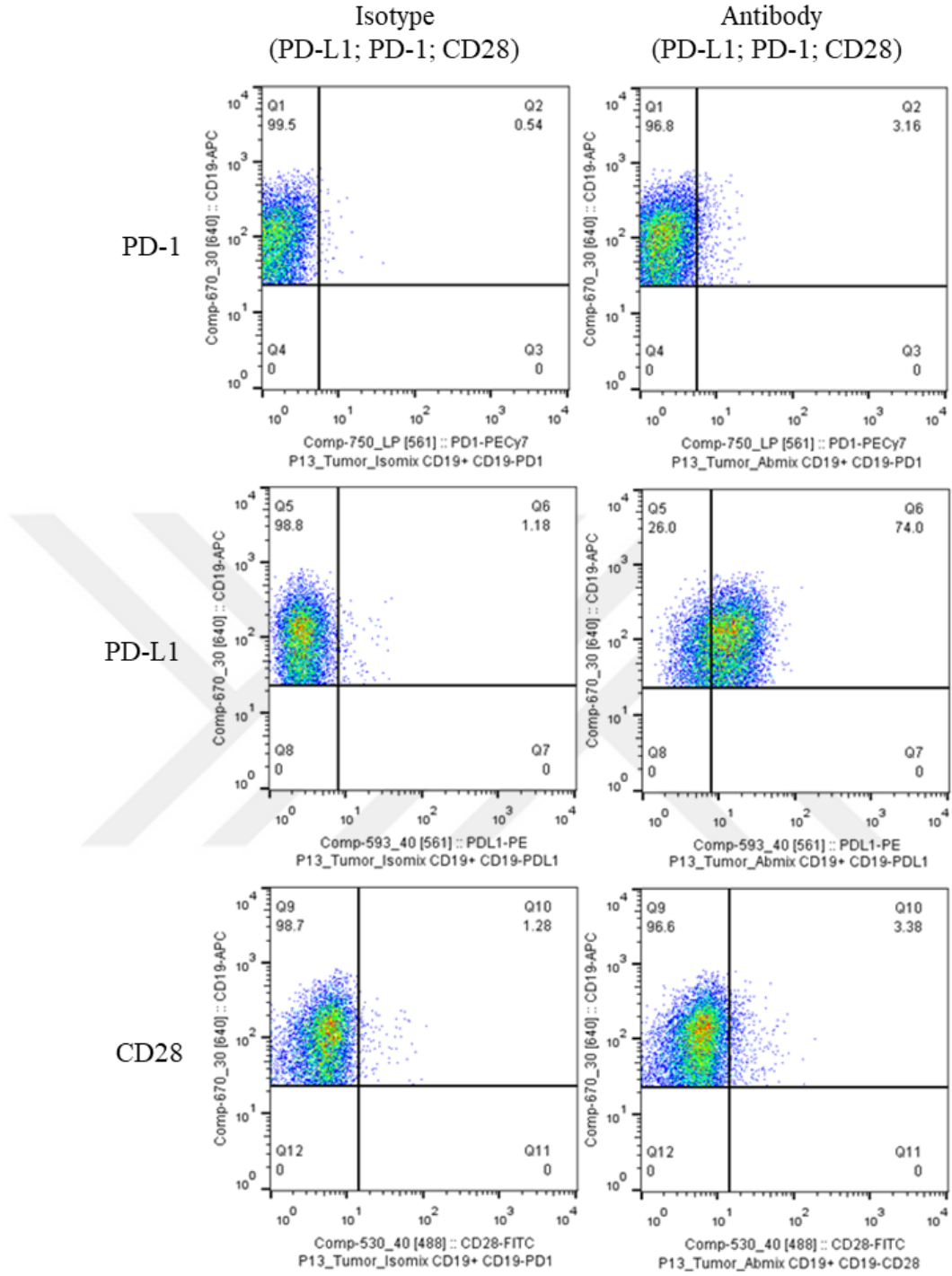
Tümör infiltrate B lenfositlerinin PD-L1 ve PD-1 aracılığıyla regülatör özellik gösterdiğini düşünmekteyiz. Bu nedenle tümör doku, sağlıklı distal akciğer doku, lenf nodu ve periferik kan kaynaklı B lenfositleri PD-1, PD-L1 ve CD28 ifadeleri bakımından incelendi. Dokulardan elde edilen hücreler anti-CD3-APC/Cy7, anti-CD19-APC, anti-CD28-FITC, anti-PD-1-PE/Cy7, anti-PD-L1-PE ve DAPI boyalarıyla boyandı (Bkz. Metodlar Floresanla Aktifleştirilmiş Hücre Ayırıştırılması (FACS)) ve akan hücre ölçer cihazında analiz edildiler.

Akan hücre ölçer sonrası elde edilen verilerde izlenen kapılama stratejisi Şekil 6.1.1’de gösterilmiştir. Analizde hücreler SSC/FSC kriterlerine göre debrilerden ayırıştırılarak kapılandılar. Belirlenen grup FSC Area/FSC Width parametreleriyle tekrar analize tabi tutularak “singlet” hücreler belirlendi. Sonuçların sağlıklı analiz edilebilmesi ve yanlış pozitiflik olasılığını azaltmak için belirlenen “singlet” hücrelerde DAPI boyamasıyla ölü/canlı hücre ayırımı yapıp, DAPI negatif hücreler kapılandı. En son olarak DAPI negatif canlı hücreler üzerinde fenotipik analizler gerçekleştirildi. Bu yöntem tüm dokulardan elde edilen hücrelerde gerçekleştirildi.

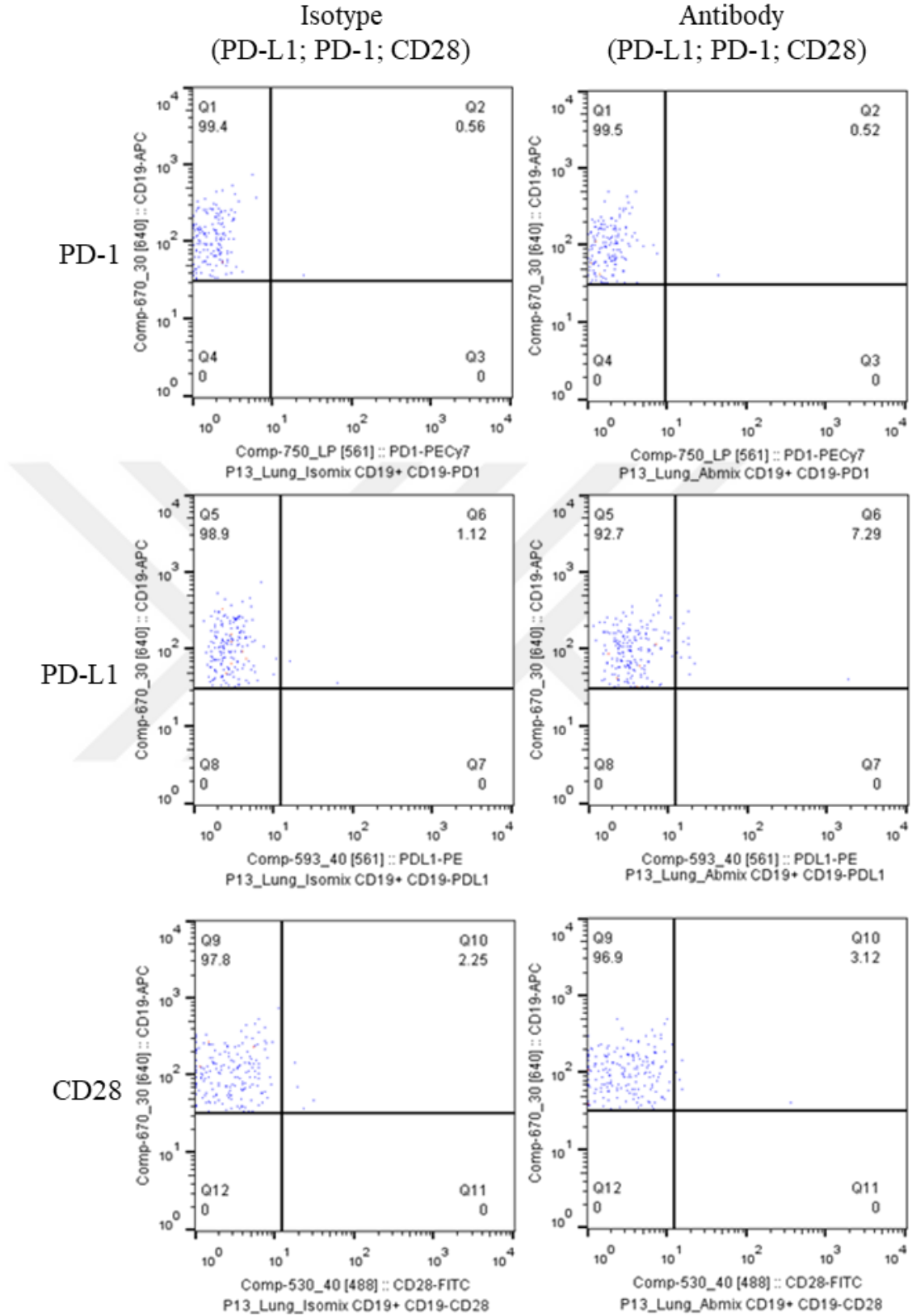


Şekil 6.1.1 Akan hücre ölçer verileri kapılama stratejisi.

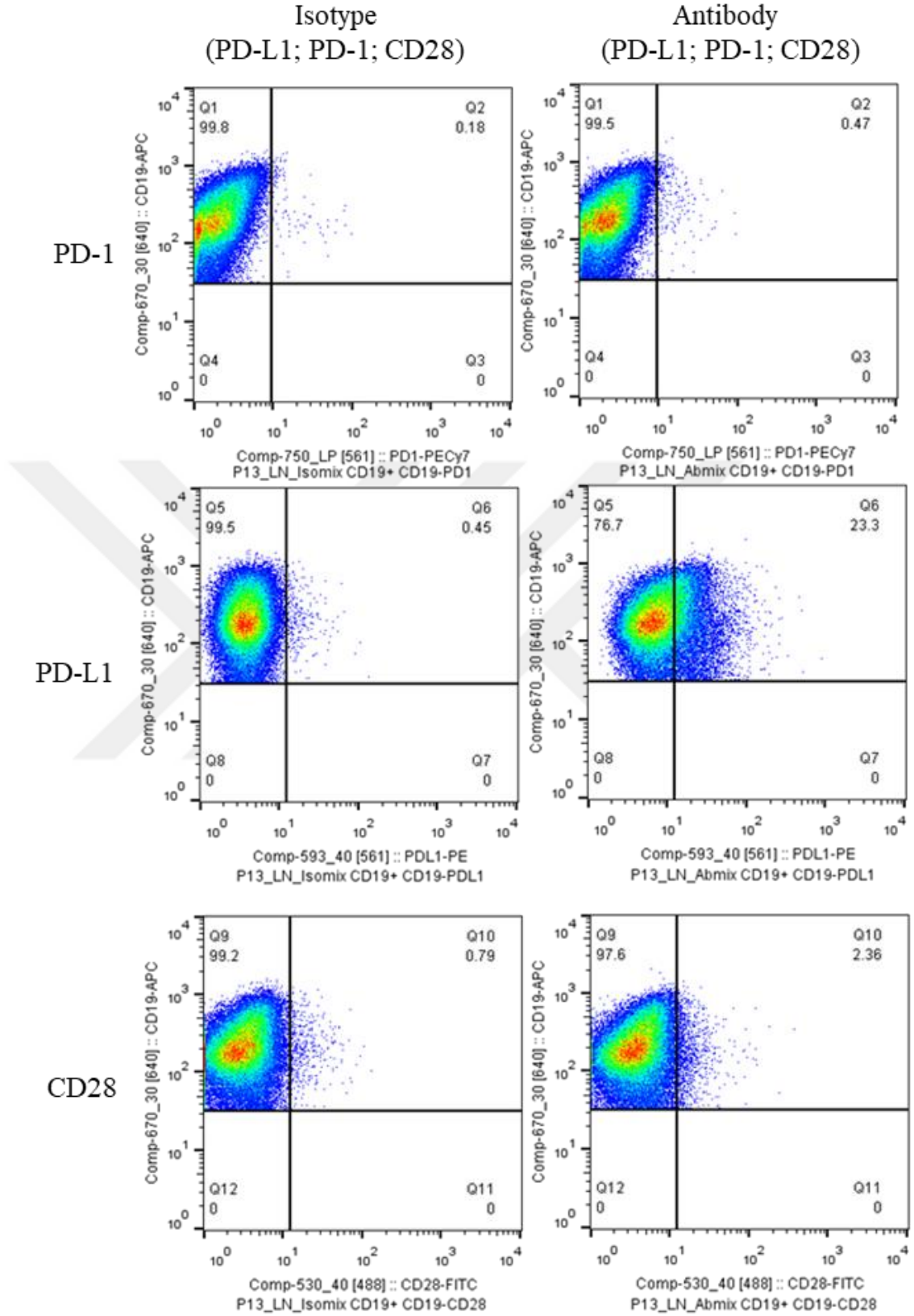
Şekil 6.1.1 de görüldüğü üzere hücreler CD19⁺ ve CD3⁺ olarak tespit edildi. Dört farklı dokudan elde edilen hücrelerde CD19⁺ B lenfositleri kapılanarak PD-1, PD-L1 ve CD28 analizleri gerçekleştirildi. B lenfositlerinin PD-1, PD-L1 ve CD28 yönünden incelenmesiyle ilgili sonuçlar; Tümör infiltrate (Şekil 6.1.2), distal akciğer doku (Şekil 6.1.3), lenf nodu (Şekil 6.1.4) ve periferel kan (Şekil 6.1.5) ile birer örnek olarak sunulmuştur.



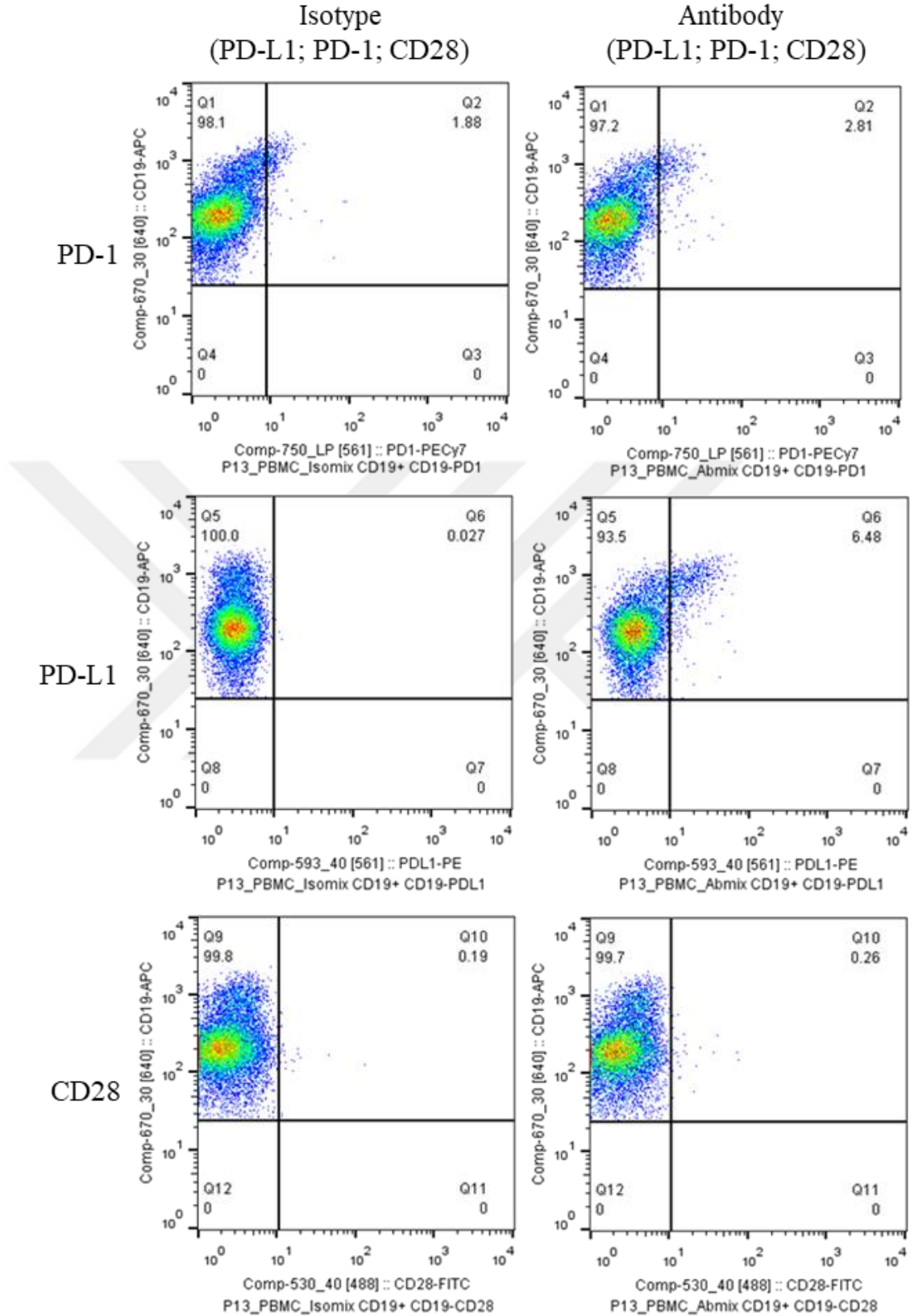
Şekil 6.1.2 Tümör infiltrate B lenfositlerinin PD-1, PD-L1 ve CD28 yönünden incelenmesi. Solda izotip kontrol boyamaları; sağda anti-PD-1, anti-PD-L1 ve anti-CD28 boyamaları.



Şekil 6.1.3 Distal akciğer doku B lenfositlerinin PD-1, PD-L1 ve CD28 yönünden incelenmesi. Solda izotip kontrol boyamaları; sağda anti-PD-1, anti-PD-L1 ve anti-CD28 boyamaları.

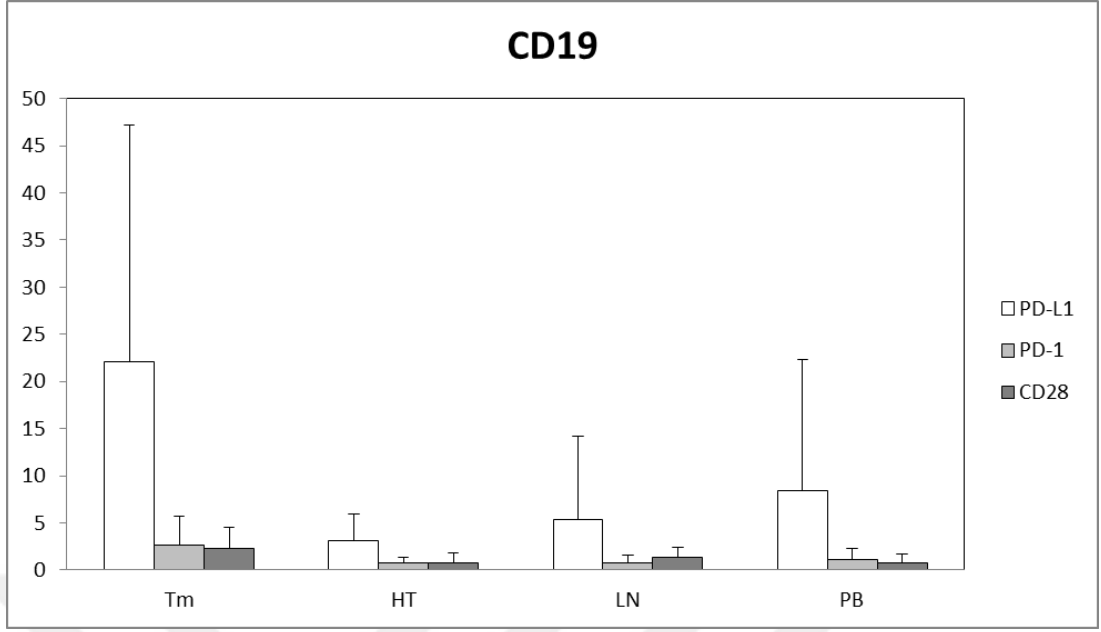


Şekil 6.1.4 Lenf nodu B lenfositlerinin PD-1, PD-L1 ve CD28 yönünden incelenmesi. Solda izotip kontrol boyamaları; sağda anti-PD-1, anti-PD-L1 ve anti-CD28 boyamaları.

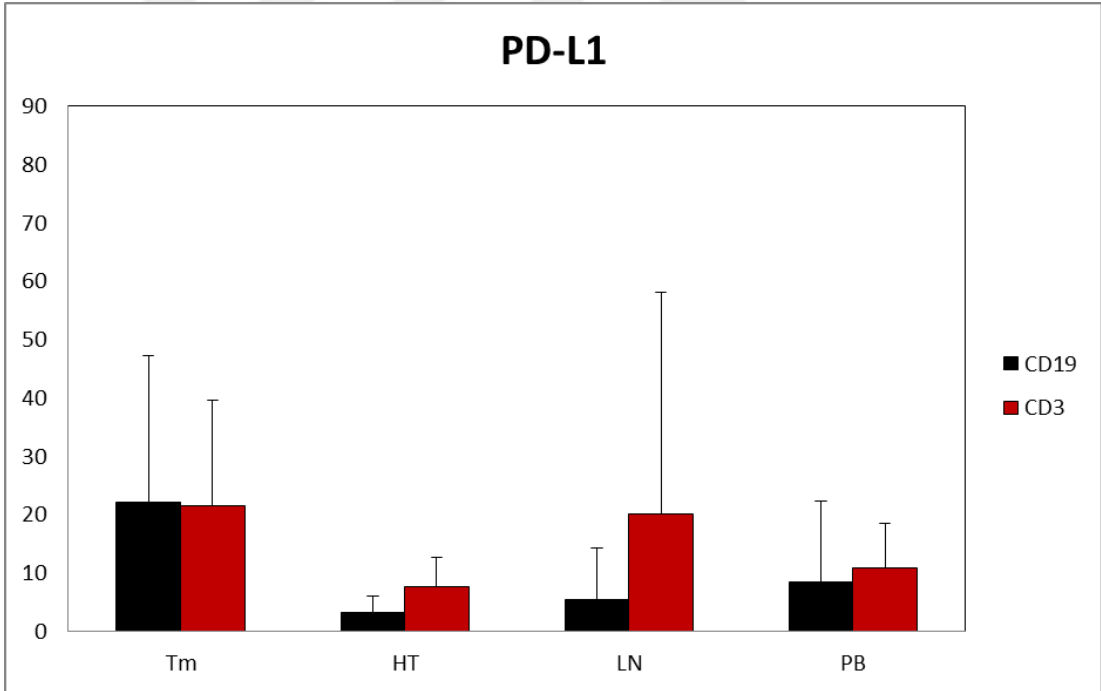


Şekil 6.1.5 Periferik kan B lenfositlerinin PD-1, PD-L1 ve CD28 yönünden incelenmesi. Solda izotip kontrol boyamaları; sağda anti-PD-1, anti-PD-L1 ve anti-CD28 boyamaları.

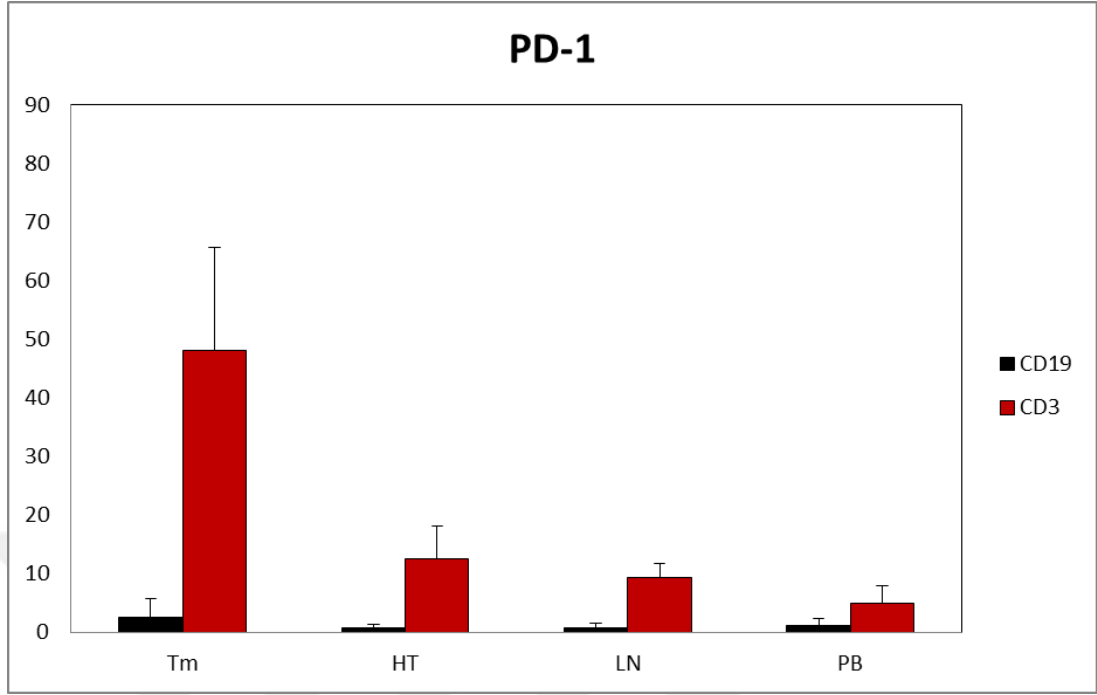
Sonuçlar B lenfositlerinde, her dört dokuda da PD-L1'in PD-1 ve CD28'e göre daha baskın bir ekspresyonu olduğunu göstermektedir (Şekil 6.1.6). Tümör infiltrate B lenfositlerinin yaklaşık %22,1'i PD-L1 pozitif bulunurken, PD-1 %2,6 ve CD28 %2,3 tespit edilmiştir (Şekil 6.1.6). Diğer dokularda (sağlıklı akciğer, lenf nodu ve periferel kan) B lenfositlerinde anlamlı bir PD-1 ve CD28 ekspresyonu gözlenememiştir. Hasta verilerinin analizleri sonucunda PD-L1 ifadesinin tümör infiltrate B lenfositlerde; lenf nodu, distal sağlıklı akciğer doku ve PBMC kaynaklı B lenfositlerine göre daha fazla olduğu bulunmuştur (sırasıyla %22,1, %3,1, %5,4 ve %8,4; Şekil 6.1.6). Her üç molekülün ekspresyon düzeyleri hastalar arasında büyük bir varyasyon göstermektedir. Sağlıklı sonuçlar için daha fazla sayıda hasta analiz edilmelidir. Dokulara göre CD3⁺ T ve CD19⁺ B lenfositlerinde PD-1, PD-L1 ve CD28 ifadeleri karşılaştırılmıştır (Şekil 6.1.7 – Şekil 6.1.9). Tümör infiltrate B ve T lenfositlerinde benzer düzeyde PD-L1 ekspresyonu bulunmuştur (sırasıyla %22,1 ile %21,5; Şekil 6.1.7). Distal sağlıklı akciğer dokusu ile lenf nodunda T lenfositlerinde (%7,7 ve %20,1) PD-L1 ekspresyonu B lenfositlerinden (%3,1 ve %5,4) yüksek gözlemlendi (Şekil 6.1.7). PD-1 ekspresyonu T lenfositlerinde tümör infiltrate hücrelerde (%48,2) yüksek tespit edildi (Şekil 6.1.8). Diğer her üç dokuda, tümöre nispetle daha az olmakla, PD-1+ T lenfositleri gözlenmiştir (distal sağlıklı akciğer doku %12,5, lenf nodu %9,4 ve periferel kan %5; Şekil 6.1.8). CD28 ekspresyonu her dört dokuda da B lenfositlerinde tespit edilememesine karşın, T lenfositlerinde yüksek oranda bulunmuştur (tümör %50,8, distal sağlıklı akciğer dokusu %37,5, lenf nodu %80,2 ve periferel kanda %57,8; Şekil 6.1.9). Sonuç olarak B lenfositleri her dört dokuda, PD-1 ve CD28 moleküllerine kıyasla, baskın olarak PD-L1 eksprese etmektedirler. Bu ekspresyon özellikle tümör infiltrate B hücrelerinde yüksek oranda bulunmaktadır.



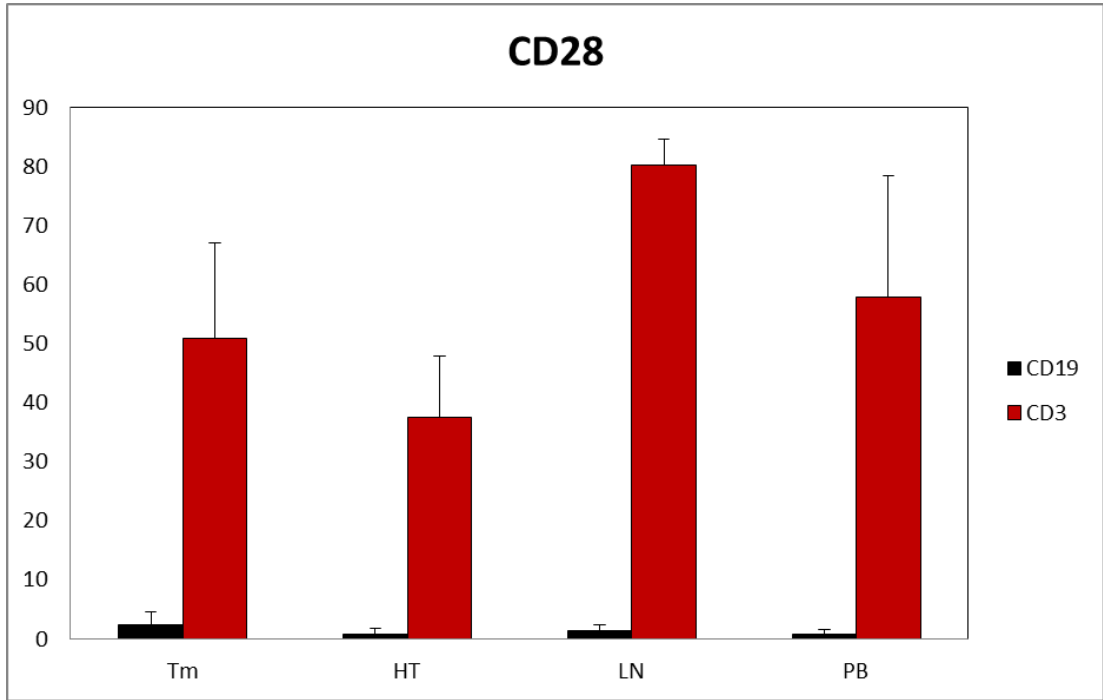
Şekil 6.1.6 CD19 kapısı altında bulunan hücrelerin koreseptör yüzdesi. Tm: Tümör, HT: Sağlıklı distal akciğer doku, LN: Lenf Nodu, PB: Periferik kan.



Şekil 6.1.7 CD19⁺ B lenfositleri ve CD3⁺ T lenfositlerinde PD-L1 ifadesinin karşılaştırılması. Tm: Tümör, HT: Sağlıklı distal akciğer doku, LN: Lenf Nodu, PB: Periferik kan.



Şekil 6.1.8 CD19⁺ B lenfositleri ve CD3⁺ T lenfositlerinde PD-1 ifadesinin karşılaştırılması. Tm: Tümör, HT: Sağlıklı distal akciğer doku, LN: Lenf Nodu, PB: Periferal kan.



Şekil 6.1.9 CD19⁺ B lenfositleri ve CD3⁺ T lenfositlerinde CD28 ifadesinin karşılaştırılması. Tm: Tümör, HT: Sağlıklı distal akciğer doku, LN: Lenf Nodu, PB: Periferal kan.

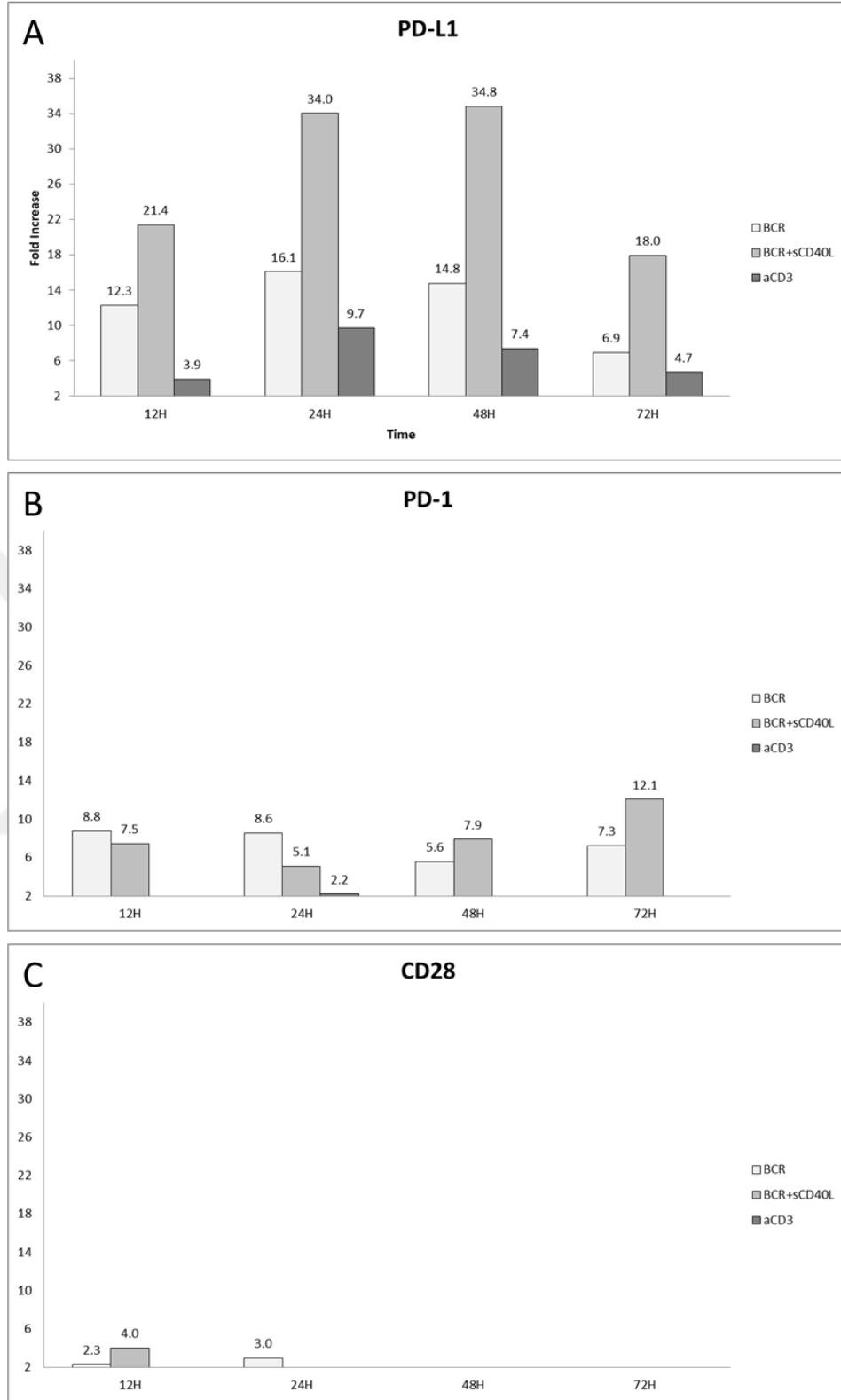
6.2 PD-L1 ifadesi BCR/sCD40L uyarımı ile artmaktadır

B lenfositlerinde, özellikle tümör infiltrate hücrelerde, yüksek PD-L1 ekspresyonu tespit edilmesi üzerine bu ekspresyonu hangi uyarıların tetiklediği incelenmiştir. T lenfositlerinde T hücre reseptör uyarımı PD-L1 ekspresyonunu indüklediği için B hücrelerinde de benzer bir uyarımın (B hücre reseptörü -BCR) etkisi incelenmiştir. Sağlıklı donörlerden elde edilen periferik lökositler ile yapılan *in vitro* hücre kültürü deneylerinde, hücreler yalnızca anti-CD3, yalnızca anti-Human [IgG + IgM] (anti-BCR) veya anti-BCR+sCD40L ile kombine uyarıldı. Negatif kontrol olarak uyarılmamış hücreler kullanıldı. Hücreler 72 saat boyunca kültüre edildiler.

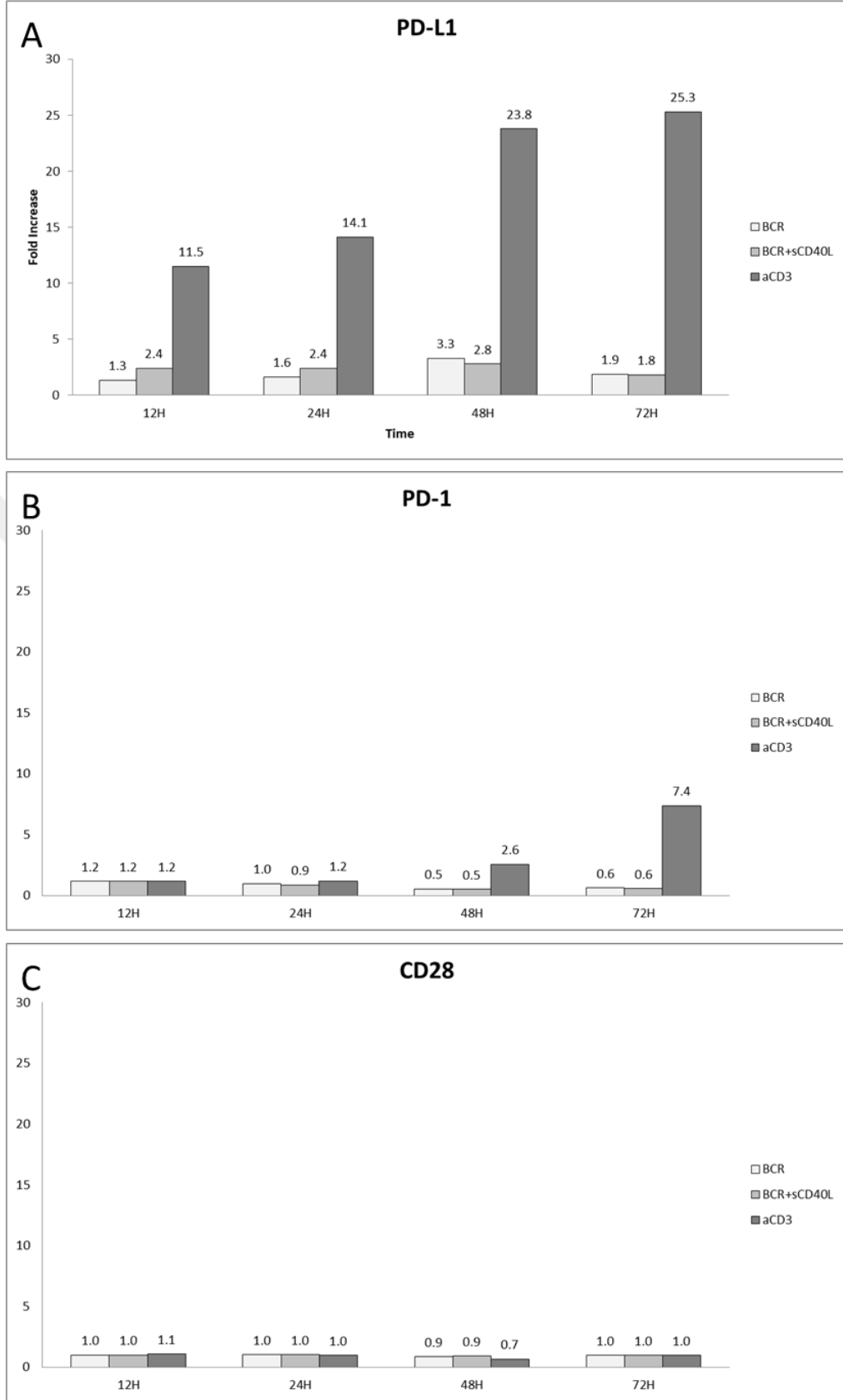
Aktive PBMC'lerde aktive edilmeyen PBMC'lere göre B lenfositlerinde (CD19+ kapı) PD-L1 ve PD-1 ifadelerinde artış gözlemlendi (Şekil 6.2.1.A ve B). Uyarılmış PBMC-B hücrelerinde CD28 ifadesinde anlamlı bir artış tespit edilemedi (Şekil 6.2.1. C). PBMC'lerin BCR ve BCR/sCD40L uyarımları sonucu ilk 12 saatten itibaren PD-L1 ekspresyonu, B lenfositlerinde bazal seviyeye göre sırasıyla 12,3 ve 21,4 kat artmıştır (Şekil 6.2.1.A). PD-L1 ekspresyon artışları 24 saatten itibaren bir platoya ulaşmakta ve 72. saate doğru azalma göstermektedir (Şekil 6.2.1.A). BCR/sCD40L kombinasyonu tek başına BCR uyarımından daha güçlü bir ekspresyonu indüklemektedir (Şekil 6.2.1.A). İlginç olarak PBMC'lerin anti-CD3 ile uyarımı sonucu B lenfositlerinde PD-L1 ekspresyon artışı meydana geldiği gözlenmiştir (bazal seviyeye göre maksimal 9,7 kat -24 saat; Şekil 6.2.1A). Bu sonuç anti-CD3 uyarımı sonucu ortamda bulunan T lenfositlerinin B hücrelerinde sitokin veya yüzey molekülleri aracılığıyla PD-L1 ekspresyonunu indüklediğini düşündürmektedir. BCR ve BCR/sCD40L uyarımları B hücrelerinde ilk 12 saatten itibaren, PD-L1'e göre nispeten daha az olmakla beraber, PD-1 ekspresyonunu arttırmaktadır (bazal seviyeye göre sırasıyla 8,8 ve 7,5 kat artış, Şekil 6.2.1.B). Bu artış 72 saat boyunca bir plato oluşturmaktadır (Şekil 6.2.1.B). Anti-CD3 uyarımı B hücrelerinde PD-1 ekspresyonuna etki etmemektedir (Şekil 6.2.1.B). B hücrelerinin BCR ve BCR/sCD40L uyarımları CD28 ekspresyonuna anlamlı bir etkisi gözlenmemiştir, sadece ilk 12 saatte ufak bir artış tespit edilmiştir (sırasıyla 2,3 ve 4,0 kat, Şekil 6.2.1.C).

T lenfositlerinde (CD3+ kapı) anti-CD3 uyarımı sonucu PD-L1 ifadesinde 12 saatten itibaren sürekli artan bir ekspresyon gözlemlendi (Şekil 6.2.2.A). Uyarılmış PBMC-T lenfositlerinde PD-1 ekspresyonunda 72. saatte bir artış tespit edildi (Şekil 6.2.2.B). CD28 ifadesinde anlamlı bir artış tespit edilemedi (Şekil 6.2.2.C). Ancak PD-L1 ve PD-1'in tersine bazal seviyede bile CD3+ T lenfositlerinin yaklaşık %80 ila 90 arasında bir yüzdesi CD28 ekspresyonu bulunmaktaydı (gösterilmeyen data). Bu nedenle CD28 ekspresyonu açısından anti-CD3 uyarımı ile bazal seviye arasında bir fark görülmedi. PBMC'lerin BCR ve BCR/sCD40L ile uyarımları T hücrelerinde anlamlı bir PD-L1 ve PD-1 ekspresyon artışına neden olmadı (Şekil 6.2.2.A ve B).





Şekil 6.2.1 Uyarılmış PBMC'lerde CD19⁺ B lenfositlerinin PD-1, PD-L1 ve CD28 ifadesi. Sonuçlar bazal seviyeye göre fold increase olarak gösterilmiştir.



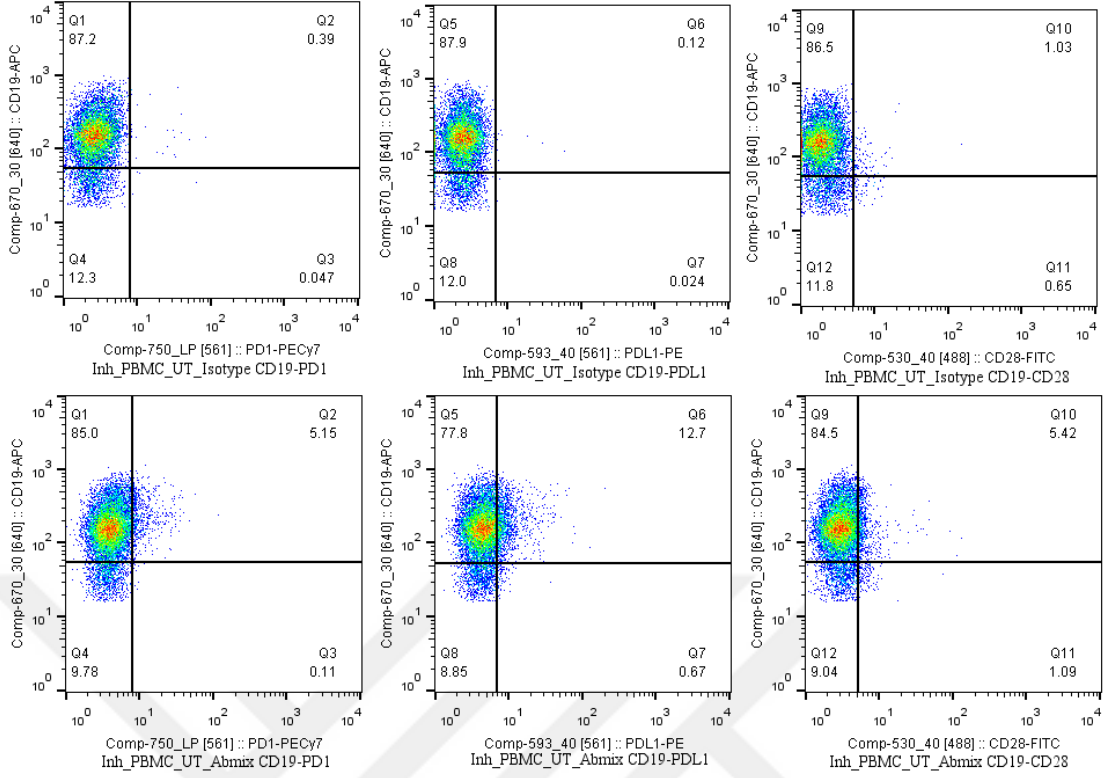
Şekil 6.2.2 Uyarılmış PBMC'lerde CD3⁺ T lenfositlerinin PD-1, PD-L1 ve CD28 ifadesi. Sonuçlar bazal seviyeye göre fold increase olarak gösterilmiştir

6.3 PD-L1 ifadesi BCR-MEK1/2 yolağı üzerinden gerçekleştirilir

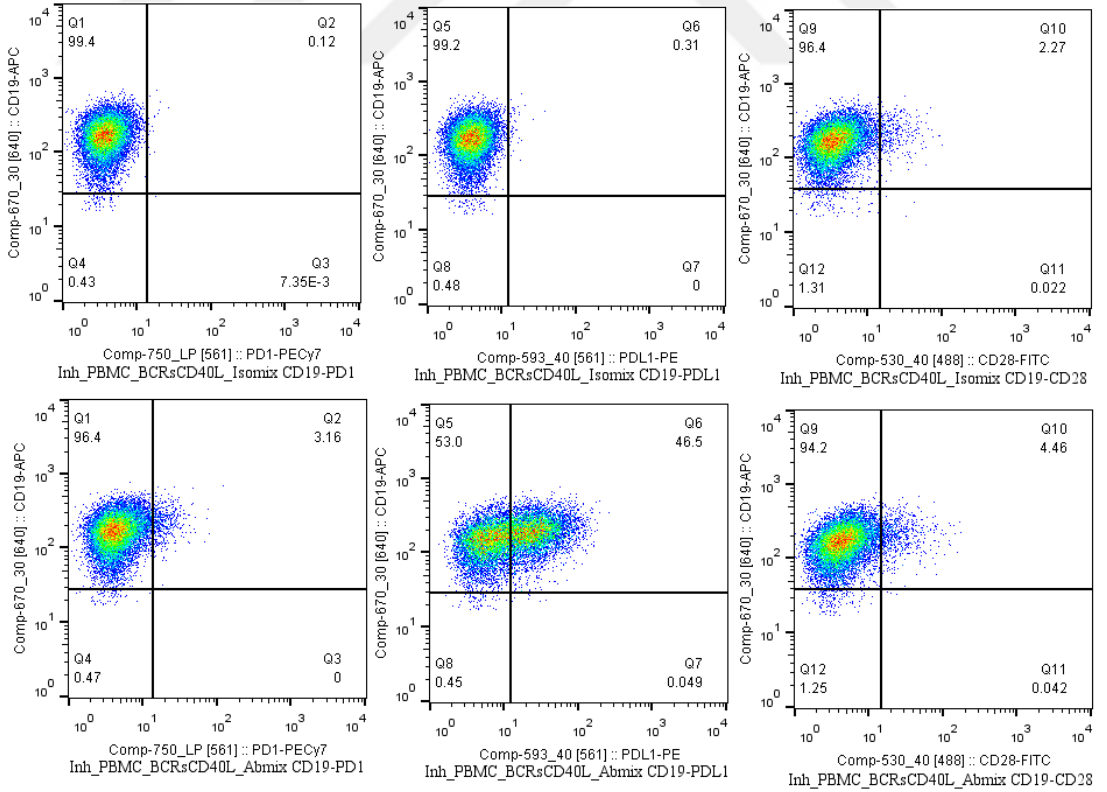
Deneysel sonuçlarımız PD-L1 ekspresyonunun B hücrelerinin B hücre reseptörü (BCR) ile uyarımı sonucu meydana geldiğini, CD40L'in bu uyarımı arttırdığını göstermiştir. B hücre reseptörünün PD-L1 artışına hangi sinyalizasyon yolağını kullandığını araştırmak için sağlıklı bireylerden elde edilen PBMC'lerden B hücreleri Influx BD cell sorting yöntemiyle saflaştırıldı. Literatürde T hücrelerinde gerçekleştirilen deneysel çalışmalarda MEK1/2 yolağının PD-L1 ekspresyonunda etkili olduğu gösterilmiştir. MEK1/2 yolağı aynı zamanda BCR sinyal iletiminde de görev almaktadır.

BCR uyarımı sonrası B lenfositlerindeki PD-L1 ifadesinin artışından sonra hücre içi sinyal yolağının tespit edilmesi için BCR-MEK1/2-ERK yolağı incelendi (127). Sağlıklı donörlerden elde edilen CD19+ B lenfositlerinden bir grup hücre BCR+sCD40L ile aktive edilirken diğer grup hücre aktivasyon öncesi selektif MEK1/2 inhibitörü U0126 ile muamele edilerek *in vitro* hücre kültürü yapıldı.

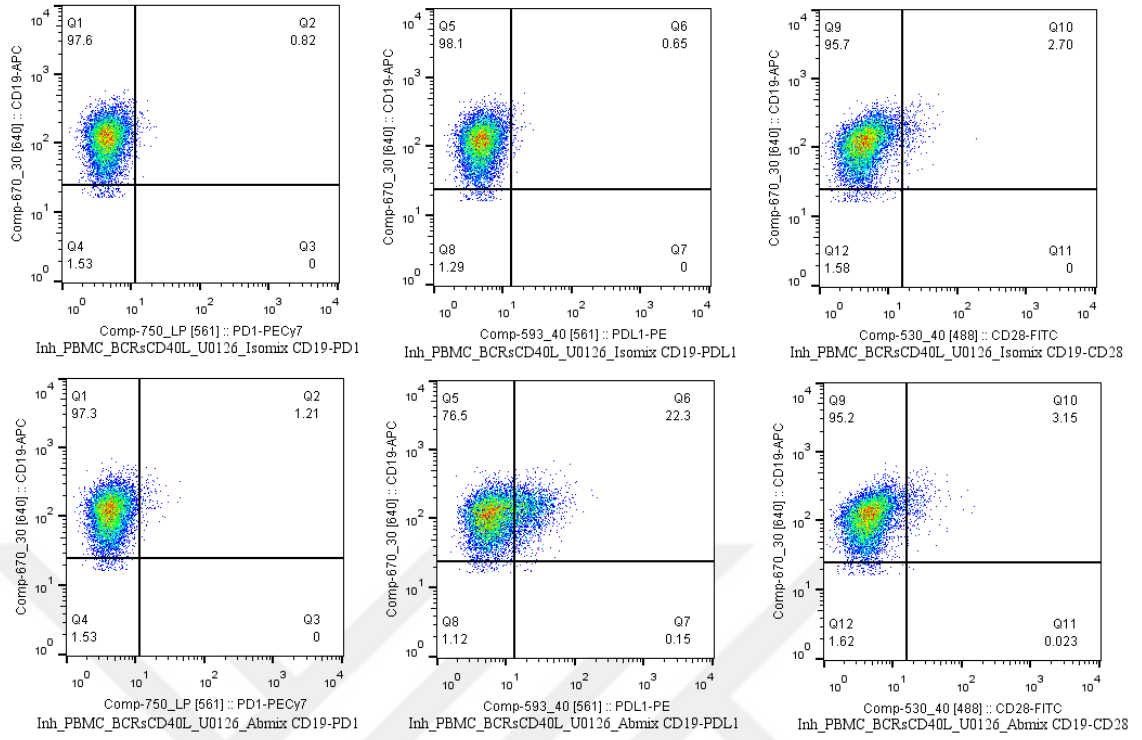
24 saatlik hücre kültürü sonunda hücreler anti-PD-1-PE/Cy7, anti-PD-L1-PE, anti-CD28-FITC ve anti-CD19-APC boyalarıyla boyanarak akım sitometri deneyleri yapıldı. İnhibitör varlığında ve yokluğunda PD-1, PD-L1 ve CD28 koreseptör ifadesi değişimleri Şekil 6.3.1 – Şekil 6.3.3 ile gösterilmiştir.



Şekil 6.3.1 Uyarılmamış CD19+ B lenfositlerde PD-1, PD-L1 ve CD28 ifadesi.

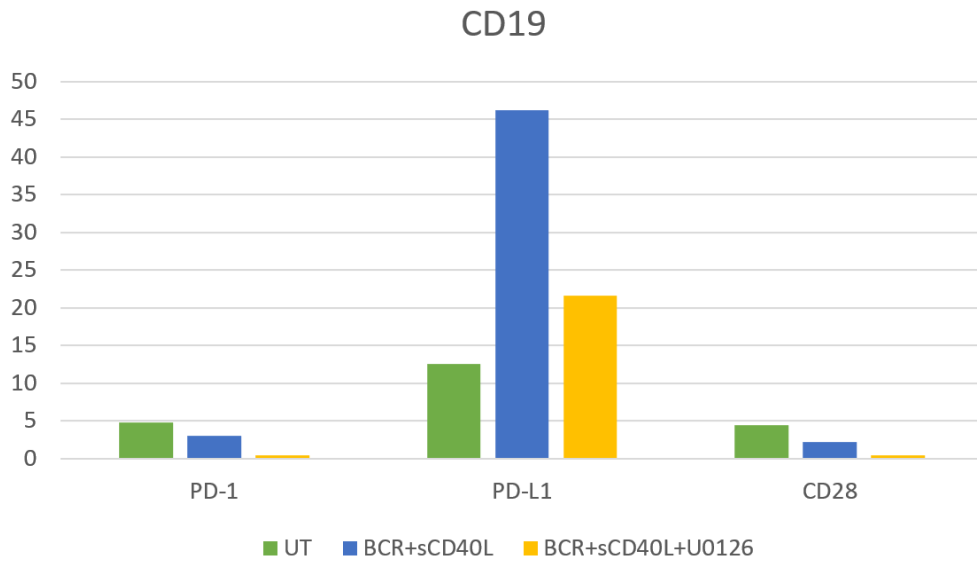


Şekil 6.3.2 MEK1/2 inhibitörü yokluğunda BCR+sCD40L ile uyarılmış CD19+ B lenfositlerde PD-1, PD-L1 ve CD28 ifadesi.

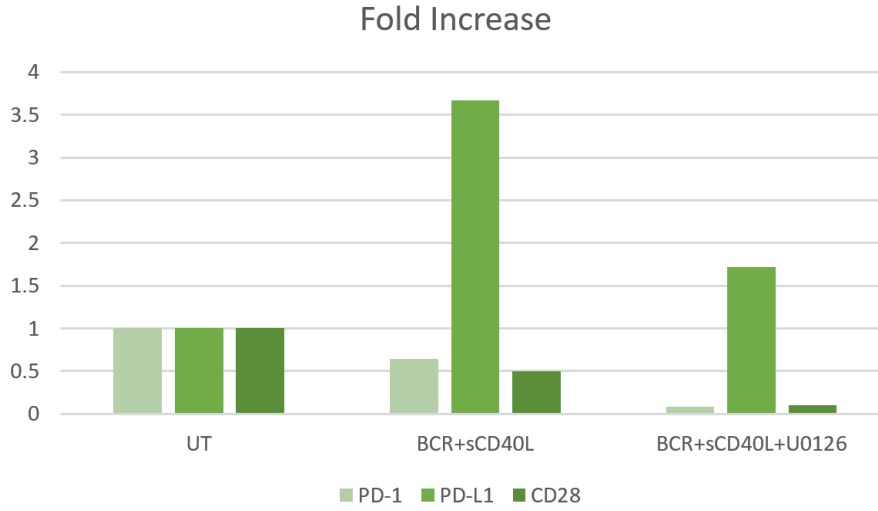


Şekil 6.3.3 MEK1/2 inhibitörü varlığında BCR+sCD40L ile uyarılmış CD19+ B lenfositlerde PD-1, PD-L1 ve CD28 ifadesi.

Yapılan analiz sonucu MEK1/2 inhibitörünün PD-L1 ifadesini 2 kat azalttığı bulunmuştur (Şekil 6.3.4 ve Şekil 6.3.5).



Şekil 6.3.4 MEK1/2 inhibitörünün BCR+sCD40L ile uyarılmış CD19+ B lenfositlerinde PD-1, PD-L1 ve CD28 ifadesine etkisi.

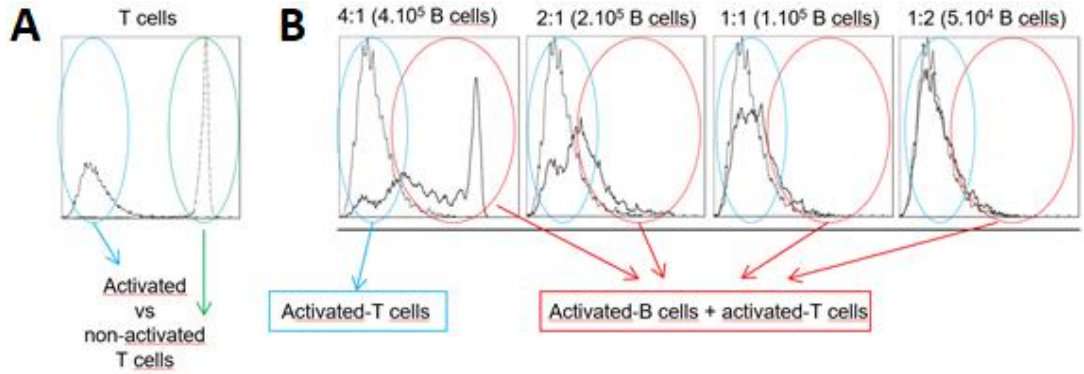


Şekil 6.3.5 MEK1/2 inhibitörü varlığında BCR+sCD40L ile uyarılmış CD19+ B lenfositlerinde PD-1, PD-L1 ve CD28 ifadesinin birbirlerine oransal değişimi.

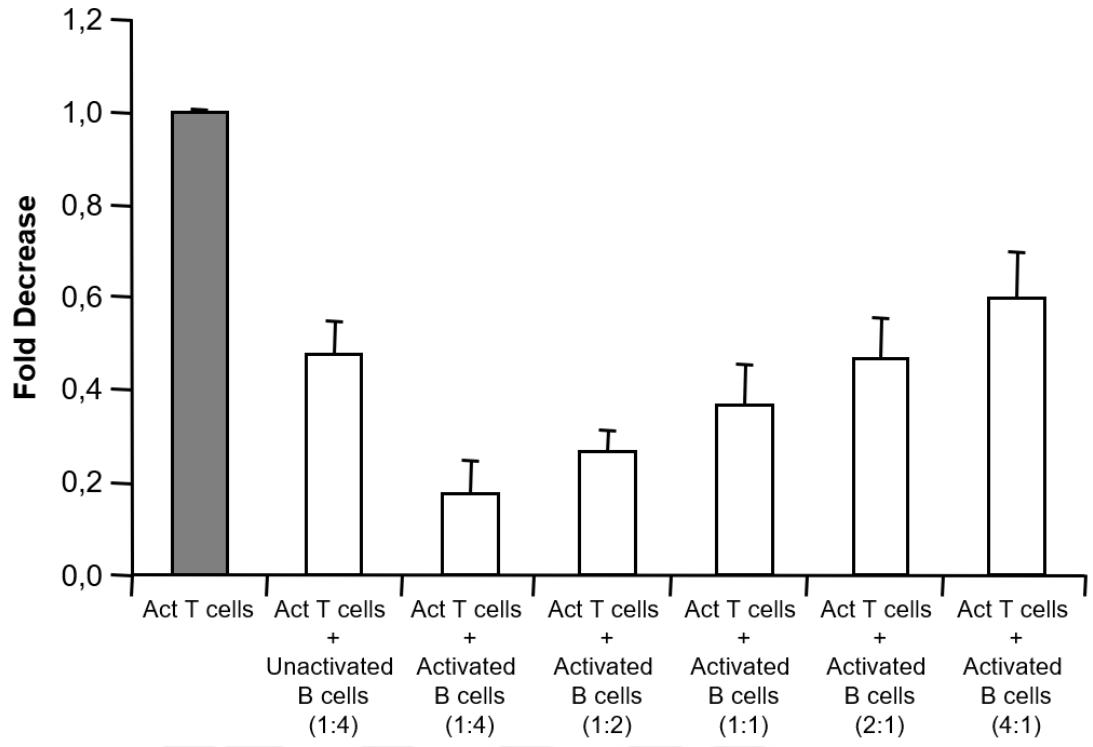
6.4 Aktive B lenfositler, T lenfosit proliferasyonunu baskılamaktadır

Aktive olan B lenfositlerinde PD-L1 ifadesinin arttığı bulunduğundan sonra B hücrelerinin düzenleyici etkilerinin anlaşılması için uyarılmış B hücrelerinin T hücre proliferasyonuna olan etkileri incelendi. Sağlıklı bireylerin periferal kanlarından cell sorting ile B ve T hücreleri saflaştırıldı. Proliferasyonun ölçümü için T hücreleri CFSE ile işaretlendiler. Saflaştırılan B hücreleri gece boyunca [IgG + IgM] ile uyarıldılar. Bu uyarımın akabinde aktive olmuş B hücreleri CFSE işaretli ve anti-CD3+IL-2 ile uyarılmış T hücreleriyle farklı oranlarda (4B:1T; 2B:1T; 1B:1T; 1B:2T) eşkültüre alındılar. Eşkültürün başlamasından bir hafta sonra ortamda B lenfositleri olmadan aktive edilmiş (pozitif kontrol) ve edilmemiş (negatif kontrol) T hücrelerinde ki CFSE değişimi ölçüldü (Şekil 6.4.1.A). Şekil 6.4.1.A'da tek başına uyarılmış ve uyarılmamış T hücrelerinin CFSE değişimleri gösterilmiştir. Hücre bölünmesi arttıkça sitoplazmayı boyayan CFSE dilüe olmaktadır (Şekil 6.4.1). Tek başına uyarılmış T hücreleri CFSE boyanmasını kaybetmiş olup (Şekil 6.4.1.A), fold decrease analizleri için temel birim olarak kabul edilmiştir (Şekil 6.4.2). Buna mukabil şekil 6.4.1.A'da görüldüğü üzere uyarılmamış T hücreleri (negatif kontrol) CFSE pozitif kalmıştır. Farklı eşkültür deneylerinden örnek olabilecek bir çalışmanın sonuçları şekil 6.4.1.B'de histogram olarak gösterilmiştir. Aktive olmamış B hücrelerinin uyarılmış T hücreleriyle (4B:1T oranında) eş-kültürü sonucunda, T hücrelerinin proliferasyonu pozitif kontrole göre

yaklaşık 2 kat azaldığı gözlenmiştir (Şekil 6.4.2). Aynı B:T hücre oranına sahip (4B:1T) uyarılmış B hücreleriyle gerçekleştirilen deneylerde ise T hücre proliferasyonu yaklaşık 5 kat azalmıştır (Şekil 6.4.2). Eşkültürdeki uyarılmış B hücre oranı azaldıkça aktive olmuş T hücrelerindeki proliferasyon doğru orantılı olarak artmaktadır (Şekil 6.4.2). Sonuçlar proliferasyon inhibisyonunun ortamdaki mutlak hücre sayısından bağımsız olduğunu, ancak B hücrelerinin aktivasyon durumlarına bağlı olduğunu göstermektedir. Çünkü benzer oranda (4B:1T) uyarılmamış ile uyarılmış B hücrelerinin eşkültürleri karşılaştırıldığında uyarılmış B hücreleri T hücre proliferasyonunu inhibe etmektedir. Ortamda aktive olmuş B hücre oranı T hücrelerine kıyasla azalmasıyla proliferasyon inhibisyonu anlamlı olarak azalmaktadır (Şekil 6.4.2). Uyarılmış B hücrelerinin inhibitör etkisinde PD-L1/PD-1 ilişkisinin rolünü anlamak için eşkültür deneyleri nötralizan/inhibitör anti-PD-L1 antikoru veya siRNA tekniğiyle tekrarlanması planlanmaktadır. Ayrıca söz konusu proliferasyon inhibisyonu hücre-hücre kontağı haricinde (veya her ikisi birlikte) çözünmüş moleküller (IL-10, IL-35) aracılığıyla mı gerçekleştirildiğini anlamak için B ve T hücreleri yarı geçirgen bir membran ile ayrılmış olarak eşkültür deneyleri gerçekleştirilecektir.



Şekil 6.4.1 Aktive B lenfositlerinin aktive T lenfositleri üzerine popülasyon bağımlı inhibitör etkisi.



Şekil 6.4.2 Aktive B lenfositlerinin T lenfositler üzerindeki inhibitör etkisinin oransal değişimi

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

B lenfositlerin antikor sentezi dışında sitokin üretimi (73,79–83) ve regülatör özelliklerinin (6,101) olduğu son zamanlarda yapılan çalışmalarda keşfedilmiştir. Kronik inflamasyon sonucu artan inflamatuvar yanıtın durdurulması için ortaya çıkan Breg hücrelerin sadece otoimmün (115) ve persistan enfeksiyon (105) tablolarında değil kanserde (128) de etkili olduğuna dair yapılan yayınlar bulunmaktadır. PD-1/PD-L1 yolağının keşfi (129) ve bu konuda yapılan analitik çalışmalar (49) sonrası immünoterapi çalışmaları gündemde kendine önemli bir yer bulmuştur. Pembrolizumab (130) ve atezolizumab (131) gibi immün kontrol noktası inhibitörlerinin yüksek başarı göstermesi ve FDA tarafından onaylanması ise bu konuda yapılan çalışmaları daha da teşvik edici hale getirmiştir.

PD-L1 ifadesi %50 ve üzerinde olan tümörlerde, pembrolizumab tedavisinin platin tabanlı kemoterapiye kıyasla çok daha yüksek sağkalım sağladığı bulunmuştur (130). PD-L1 blokajının kanıtlanmış etkisinden hareketle çalışmamızda, tümör hücrelerinden ziyade tümör infiltrate B lenfositlerindeki PD-L1 ifadesinin immün baskılayıcı rolünün olup olmadığı araştırıldı ve TIL CD19⁺ B lenfositlerde PD-L1 ifadesinin yüksek olduğu gösterildi (Şekil 6.1.6 ve Şekil 6.1.7).

Literatürde PD-L1 ifadesinin yüksek olması tümör lehine bir durum olarak kabul edilmektedir (132). PD-1 reseptörünün, ligandı olan PD-L1 ile etkileşmesi sonucu efektör CD8⁺ T lenfositleri *exhaustion* denilen bir evreye girer; buna bağlı olarak sitotoksik yetenekleri azalır, inhibitör yüzey moleküllerinin sentezleri yavaşlar ve proliferatif yeteneklerini kaybetmeye başlarlar (133). Tümör mikroçevresinde CD8⁺ T lenfositlerinin kronik olarak *cognate* antijenlerine maruz kalmasının PD-1 ifadesini artırdığı bilinmektedir (133). PD-L1⁺ lenfositlerin ortama göç etmesiyle CD8⁺ lenfositlerin efektör yetenekleri baskılanmaktadır. Bir diğer yandan ise tümör infiltrate CD8⁺ T lenfositlerinde zamana bağlı PD-1 artışı göz önüne alındığında, işlev görmeyen/anerjik hücrelerin ortadan kaldırılması adına PD-L1⁺ B hücrelerinin ortama göçü tetikleniyor olabilir.

Fizyolojik açıdan TLS organizasyonunun kanser üzerine etkisine bakıldığında bu etkilerin, genel olarak prognostik açıdan iyi olarak yorumlanmaktadır (98,99,125,134) fakat T2-MZP gibi Breg fenotipi gösteren hücrelerin drene lenf nodunda birikmesi (135) gibi bazı durumlarda tam tersi olarak da bildirilmektedir (134). Diğer yandan Tfh hücrelerinin PD-1+ oldukları ve naïve B hücrelerini aktive ederek Breg farklılaşmasına indüklediği bilinmektedir (119). Bununla birlikte, PD-L1 ifadesi yüksek olan tümörlerde PD-1+ cTfh infiltrasyonunun yüksek olduğu bulunmuştur (119). Bütün bu bilgiler ışığında TLS yapısının anti tümöral yapıdan protümörijenik yapıya evrilmesinde PD-L1+ B lenfositlerinin varlığı rol oynuyor olabilir. PD-L1+ B lenfositlerinin IFN sinyaline bağlı bir inhibitör etkisi de olabilir. IFN sinyalizasyonunun PD-L1 sentezini uyardığı (127) ve uzun süreli IFN sinyali sonrası Tfh fonksiyon kaybı yaşadığı bilinmektedir (47). PD-L1+ B lenfositlerinin IFN sinyaline bağlı olarak kronik enfeksiyonlarda ortaya çıkması, Tfh supresyonunun sebebi olabilir.

Örnek havuzunun geniş olmaması ve biyopsi miktarının küçük olması gibi sorunlardan dolayı sonuçlarımızda standart sapma ve varyasyon yüksek çıkmakta fakat çalışmanın devamında daha yüksek hasta sayısı ve daha büyük biyopsi örneğiyle standart sapma ve değişkenliğin önüne geçilmesi hedeflenmektedir.

TIL CD19+ B lenfositlerinde PD-L1 ifadesinin yüksek olduğunu bulduktan sonra PD-L1 ifadesinin BCR uyarımıyla bağlantısı araştırıldı. BCR ve koreseptör CD40 eşuyarımının B hücrelerinde PD-L1 ifadesini artırdığı gösterildi (Şekil 6.2.1) (136). T lenfositlerinde gerçekleştirilen çalışmalarda MEK1/2 moleküllerinin PD-L1 ekspresyonunda rol oynadığı gösterilmiştir. Literatürde MEK1/2 sinyalizasyon moleküllerinin B hücre reseptör sinyalizasyon yolağında da etkili oldukları gösterilmiştir. Bu nedenle BCR uyarımıyla meydana gelen PD-L1 ekspresyon artışında hücre içi sinyal yolağının belirlenmesi için MEK1/2 inhibisyonu ile PD-L1 ifadesi arasındaki ilişki araştırıldı. İnhibitör varlığında BCR-aracılı PD-L1 ifade artışının azaldığı bulundu (Şekil 6.3.4 ve Şekil 6.3.5). Literatüre bakıldığında PD-L1 sinyalizasyonunun STAT1, PI3K/AKT/mTOR veya MyD88/TRAF6 üzerinden de gerçekleştiğine dair bulgular yayınlanmıştır (127,137). Elde ettiğimiz bulgularda PD-

L1 ifadesinin tamamen inhibe edilememesinin sebebi, sinyal iletiminde görevli tek yolağın MEK-ERK yolağı olmaması olabilir.

BCR ile aktive edilen B hücrelerinin PD-L1 ifadesinin yükseldiği kanıtlandıktan sonra PD-L1+ B hücrelerinin T lenfositler üzerine immün baskılayıcı etkilerinin olup olmadığı araştırıldı. α CD3 ve IL2 ile kombine uyarılan T lenfositler, değişen sayıda olmak üzere aktive B lenfositleriyle eşkültüre edildi. B lenfosit sayısı ile doğru orantılı olarak T lenfositlerin inhibe edildiği görüldü. Gerçekleştirilen deneyler T proliferasyon inhibisyonunun PD-1/PD-L1 etkileşiminden mi yoksa IL10 ya da IL35 gibi inhibitör bir sitokin yüzünden mi olduğunu göstermemektedir. Gelecek çalışmalarımızda bu inhibitör etkinin sitokinler üzerinden mi, hücre-hücre etkileşimi üzerinden mi yoksa kombine bir şekilde mi olduğu araştırılacaktır.

8. KAYNAKLAR

1. International Agency for Research on Cancer. World Cancer Report 2014. 2014.
2. Hacıkamiloğlu E, Gültekin M, Boztaş G, Dündar S, Utku EŞ, Kavak Ergün A, et al. Türkiye Kanser İstatistikleri. Türkiye Halk Sağlığı Kurumu. 2017;
3. SEER Stat Fact Sheets: Lung and Bronchus Cancer 2016 [Internet]. Available from: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/lungb.html>
4. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer : The Next Generation. Cell. 2011;144(5):646–74.
5. Sun X, Zhang T, Li M, Yin L, Xue J. Immunosuppressive B cells expressing PD-1/PD-L1 in solid tumors: A mini review. QJM An Int J Med. 2019;(June):1–6.
6. Khan AR, Hams E, Floudas A, Sparwasser T, Weaver CT, Fallon PG. PD-L1hi B cells are critical regulators of humoral immunity. Nat Commun [Internet]. 2015;6:1–16. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms6997>
7. Anagnostou VK, Brahmer JR. Cancer immunotherapy: A future paradigm shift in the treatment of non-small cell lung cancer. Clin Cancer Res. 2015;21(5):976–84.
8. Jakopovic M, Bitar L, Krpina K, Mursic D, Seiwerth F, Jankovic M, et al. Immunotherapy in the treatment of non-small cell lung cancer. Libr Oncol. 2017;45(2–3):60–4.
9. Brahmer JR, Pardoll DM. Immune checkpoint inhibitors: making immunotherapy a reality for the treatment of lung cancer. Cancer Immunol Res. 2013;1(2):85–91.
10. Tosun GY. Rezeksiyon Yapılan Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanser (KHDAK)' Li Hastalarda Pozitron Emisyon Tomografi (PET)'sindeki Standart Uptake Value (SUV) Değerinin Sağ Kalım ile İlişkisinin Karşılaştırılması. Necmettin Erbakan Üniversitesi; 2012.
11. Ünal M. KHDAK'de Tümör Lokalizasyonuna Göre Diseke Edilen Lenf Bezi İstasyonlarında Metastaz Saptanma Oranlarının Retrospektif Analizi. Sağlık Bilimleri Üniversitesi; 2017.

12. Akciğer kanseri yol haritası. 2016.
13. Eckel SP, Cockburn M, Shu Y-H, Deng H, Lurmann FW, Liu L, et al. Air Pollution Affects Lung Cancer Survival. *Thorax*. 2016;71(10):891–8.
14. Travis WD, Brambilla E, Burke AP, Marx A, Nicholson AG, editors. WHO Classifications of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart. 4th ed. International Agency for Research on Cancer; 2015. 413 p.
15. Tumors L, Travis WD, Brambilla E, Nicholson AG, Yatabe Y, Austin JHM, et al. The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors. *J Thorac Oncol* [Internet]. 2015;10(9):1243–60. Available from: <http://dx.doi.org/10.1097/JTO.0000000000000630>
16. Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson AG, Geisinger KR, Yatabe Y, et al. International Association for the Study of Lung Cancer / American Thoracic Society / European Respiratory Society International Multidisciplinary Classification of Lung Adenocarcinoma. *J Thorac Oncol* [Internet]. 2011;6(2):244–85. Available from: <http://dx.doi.org/10.1097/JTO.0b013e318206a221>
17. Inamura K. Lung Cancer : Understanding its Molecular Pathology and the 2015 WHO Classification. 2017;7(August):1–7.
18. Herbst RS, Heymach J V., Lippman SM. Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2008;359(13):1367–80.
19. Bækkevold ES, Corthay A, Bjørhovde HAK, Øynebråten I, Helland Å, Woldbæk PR, et al. Immune Cell Composition in Human Non-small Cell Lung Cancer. *Front Immunol*. 2019;9(February):1–21.
20. Dayen C, Debieuvre D, Molinier O, Raffy O, Paganin F, Virally J, et al. New insights into stage and prognosis in small cell lung cancer : an analysis of 968 cases. *J Thorac Dis*. 2017;9(12):5101–11.
21. Akciğer Kanseri [Internet]. p. 11–4. Available from: <https://www.toraks.org.tr/halk/Page.aspx?d=11>
22. Diagnosis Lung cancer [Internet]. 2015 [cited 2019 Jun 5]. p. 5–11. Available from: <https://www.nhs.uk/conditions/lung-cancer/diagnosis/>
23. Hammerschmidt S, Wirtz H. Lung Cancer : Current Diagnosis and Treatment. *Dtsch Arztebl Int*. 2009;106(49):809–20.

24. Goldstraw P, Ball D, Jett JR, Le Chevalier T, Lim E, Nicholson AG, et al. Non-small-cell lung cancer. *Lancet* [Internet]. 2011 Nov 12 [cited 2019 Mar 22];378:1727–40. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673610621010?via%3Dihub>
25. Ansell SM, Vonderheide RH. Cellular Composition of the Tumor Microenvironment. *Am Soc Clin Oncol Educ B*. 2013;33:e91–7.
26. Balkwill FR, Capasso M, Hagemann T. The extracellular matrix at a glance. *J Cell Sci* [Internet]. 2010 Dec 15 [cited 2019 Mar 22];125(23):5591–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21123617>
27. Galon J, Pagès F, Marincola FM, Angell HK, Thurin M, Lugli A, et al. Cancer classification using the Immunoscore: a worldwide task force. *J Transl Med*. 2012;10(1):1–9.
28. Brahmer JR, Drake CG, Wollner I, Powderly JD, Picus J, Sharfman WH, et al. Phase I study of single-agent anti-programmed death-1 (MDX-1106) in refractory solid tumors: safety, clinical activity, pharmacodynamics, and immunologic correlates. *J Clin Oncol* [Internet]. 2010 Jul 1 [cited 2019 Mar 22];28(19):3167–75. Available from: <http://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2009.26.7609>
29. Rolfo C, Rosell R, Giovannetti E, Karachaliou N, Altavilla G, González-Cao M, et al. Recent developments in the use of immunotherapy in non-small cell lung cancer. *Expert Rev Respir Med* [Internet]. 2016;10(7):781–98. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/17476348.2016.1182866>
30. Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, Gettinger SN, Smith DC, McDermott DF, et al. Safety, Activity, and Immune Correlates of Anti-PD-1 Antibody in Cancer. *N Engl J Med* [Internet]. 2012 Jun 28 [cited 2019 Mar 22];366(26):2443–54. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1200690>
31. Goldstraw P, Chansky K, Crowley J, Rami-porta R, Asamura H, Eberhardt WEE, et al. The IASLC Lung Cancer Staging Project : Proposals for Revision of the TNM Stage Groupings in the Forthcoming (Eighth) Edition of the TNM Classification for Lung Cancer. *J Thorac Oncol*. 2015;11(1):39–51.

32. Asamura H, Chansky K, Crowley J, Goldstraw P, Rusch VW, Johan F. The International Association for the Study of Lung Cancer Lung Cancer Staging Project. *J Thorac Oncol* [Internet]. 2015;10(12):1675–84. Available from: <http://dx.doi.org/10.1097/JTO.0000000000000678>
33. Turhan K. Akciğer Kanseri 8. TNM Evreleme Sistemi. 2017;(mi):30–5.
34. Wood DA, Robbins GF, Zippin C, Lum D, Stearns M. Staging of Cancer of the Colon and Cancer of the Rectum. *Cancer*. 1979;43:961–8.
35. Treatment Choices for Non-Small Cell Lung Cancer, by Stage [Internet]. 2016. p. 1–8. Available from: <https://www.cancer.org/cancer/non-small-cell-lung-cancer/treating/by-stage.html>
36. Chuang JC, Stehr H, Liang Y, Das M, Huang J, Maximillian D, et al. ERBB2-mutated metastatic non-small cell lung cancer: response and resistance to targeted therapies. *J Thorac Oncology*. 2017;12(5):833–42.
37. di Noia V, D'Argento E, Pilotto S, Grizzi G, Caccese M, Iacovelli R, et al. Necitumumab in the treatment of non-small-cell lung cancer: clinical controversies. *Expert Opin Biol Ther* [Internet]. 2018; Available from: <https://doi.org/10.1080/14712598.2018.1508445>
38. Diaz-Serrano A, Sanchez-Torre A, Paz-Ares L. Necitumumab for the treatment of advanced non-small-cell lung cancer. *Futur Oncol*. 2018;15(7).
39. Russo AE, Priolo D, Antonelli G, Libra M, McCubrey JA, Ferrà F. Bevacizumab in the treatment of NSCLC: patient selection and perspectives. *Lung Cancer Targets Ther*. 2017;8:259–69.
40. Garon EB, Ciuleanu T-E, Arrieta O, Prabhaskar K, Syrigos KN, Goksel T, et al. Ramucirumab plus docetaxel versus placebo plus docetaxel for second-line treatment of stage IV non-small-cell lung cancer after disease progression on platinum-based therapy (REVEL): a multicentre , double-blind , randomised phase 3 trial. *Lancet*. 2014;6736(14):1–9.
41. Gerber DE, Stopeck AT, Wong L, Rosen LS, Thorpe PE, Shan JS, et al. Phase I Safety and Pharmacokinetic Study of Baviximab , a Chimeric Phosphatidylserine-Targeting Monoclonal Antibody , in Patients with Advanced Solid Tumors. *Clinical Cancer Res*. 2011;17(21):6888–97.
42. Huang X, Bennett M, Thorpe PE. A Monoclonal Antibody that Binds Anionic

- Phospholipids on Tumor Blood Vessels Enhances the Antitumor Effect of Docetaxel on Human Breast Tumors in Mice. *Cancer Res.* 2005;65(10):4408–17.
43. Chen R, Zhao J, Zhang X, Lou N, Chen H, Yang X, et al. Crizotinib in advanced non-small-cell lung cancer with concomitant ALK rearrangement and c-Met overexpression. *BMC Cancer.* 2018;18(1171):1–9.
 44. Kim D-W, Mehra R, Tan DSW, Felip E, Chow LQM, Camidge DR, et al. Activity and safety of ceritinib in patients with ALK -rearranged non-small-cell lung cancer (ASCEND-1): updated results from the multicentre , open-label , phase 1 trial. *Lancet Oncol.* 2016;2045(15):1–12.
 45. Zou HY, Li Q, Engstrom LD, West M, Appleman V, Wong KA, et al. PF-06463922 is a potent and selective next-generation ROS1/ALK inhibitor capable of blocking crizotinib-resistant ROS1 mutations. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2015;112(11):3493–8.
 46. Hyman DM, Puzanov I, Subbiah V, Faris JE, Chau I, Blay JY, et al. Vemurafenib in Multiple Nonmelanoma Cancers with BRAF V600 Mutations. *N Engl J Med.* 2015;373(8):726–36.
 47. Wherry EJ, Kurachi M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat Publ Gr* [Internet]. 2015;15(8):486–99. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nri3862>
 48. Bansal P, Osman D, Gan GN, Simon GR, Bumber Y. Recent Advances in immunotherapy in Metastatic NSCLC. *Front Oncol.* 2016;6(November):1–8.
 49. Ho K-H, Chang C-J, Huang T-W, Shih C-M, Liu A-J, Chen P-H, et al. Gene landscape and correlation between B- cell infiltration and programmed death ligand 1 expression in lung adenocarcinoma patients from The Cancer Genome Atlas data set. *PLoS One.* 2018;13(12):1–17.
 50. Qin H, Wang F, Liu H, Zeng Z, Wang S, Pan X, et al. New advances in immunotherapy for non-small cell lung cancer. *Am J Transl Res.* 2018;10(8):2234–45.
 51. Valette CA, Minenza E, Linardou H, Burgers S, Salman P, Borghaei H. Nivolumab plus Ipilimumab in Lung Cancer with a High Tumor Mutational Burden. 2018;2093–104.

52. Hoos A, Ibrahim R, Korman A, Abdallah K, Berman D, Shahabi V. Development of Ipilimumab : Contribution to a New Paradigm for Cancer Immunotherapy. *Semin Oncol* [Internet]. 2010;37(5):533–46. Available from: <http://dx.doi.org/10.1053/j.seminoncol.2010.09.015>
53. Thomas A. Immunotherapies for non-small-cell lung cancer and mesothelioma. *Lancet Oncol*. 2012;13:301–10.
54. Koyama S, Akbay EA, Li YY, Herter-sprrie GS, Buczkowski KA, Richards WG, et al. Adaptive resistance to therapeutic PD-1 blockade is associated with upregulation of alternative immune checkpoints. *Nat Commun* [Internet]. 2016;7:1–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms10501>
55. He Y, Cao J, Zhao C, Li X, Zhou C, Hirsch FR. TIM-3, a promising target for cancer immunotherapy. *Onco Targets Ther*. 2018;11:7005–9.
56. Sakuishi K, Apetoh L, Sullivan JM, Blazar BR, Kuchroo VK, Anderson AC. Targeting Tim-3 and PD-1 pathways to reverse T cell exhaustion and restore anti-tumor immunity. *J Exp Med* [Internet]. 2010 Sep 27 [cited 2019 Mar 22];207(10):2187–94. Available from: <http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.20100643>
57. Huang C, Workman CJ, Flies D, Pan X, Marson AL, Zhou G, et al. Role of LAG-3 in Regulatory T Cells. 2004;21:503–13.
58. Woo S, Turnis ME, Goldberg M V, Bankoti J, Selby M, Nirschl CJ, et al. Immune Inhibitory Molecules LAG-3 and PD-1 Synergistically Regulate T-cell Function to Promote Tumoral Immune Escape. 2012;(20):917–28.
59. Parkin J, Cohen B. An overview of the immune system. *Lancet*. 2001;357:1777–89.
60. Bonilla FA, Oettgen HC. Adaptive immunity. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. 2010;125(2):S33–40. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2009.09.017>
61. Kurosaki T, Kometani K, Ise W. Memory B cells. *Nat Publ Gr* [Internet]. 2015;15(3):149–59. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nri3802>
62. Natoli G, Ostuni R. Adaptation and memory in immune responses. *Nat Immunol* [Internet]. 2019;20(July):783–92. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41590-019-0399-9>

63. Kent DG, Eaves CG. Adult Hematopoiesis. In: Guidos CJ, Rolink A, Hein W, Gordon JR, editors. *Encyclopedia of Immunobiology* [Internet]. 1st ed. Elsevier; 2016. p. 15–25. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-374279-7.01003-1>
64. Nutt SL, Kee BL. The Transcriptional Regulation of B Cell Lineage Commitment. *Immunity*. 2007;26(6):715–25.
65. Mansson R, Zandi S, Welinder E, Tsapogas P, Sakaguchi N, Bryder D, et al. Single-cell analysis of the common lymphoid progenitor compartment reveals functional and molecular heterogeneity. *Blood*. 2010;115(13):2601–10.
66. Müschen M, Lee S, Zhou G, Feldhahn N, Barath VS, Chen J, et al. Molecular portraits of B cell lineage commitment. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99(15):10014–9.
67. Jung D, Alt FW. Unraveling V(D)J Recombination: Insights into Gene Regulation V(D)J recombination assembles antigen receptor. *Cell*. 2004;116(2):299–311.
68. Bassing CH, Swat W, Alt FW. The Mechanism and Regulation of Chromosomal V(D)J Recombination. *Cell*. 2002;109(2):S45–55.
69. Gellert M. V(D)J RECOMBINATION: RAG PROTEINS, REPAIR FACTORS, AND REGULATION. *Annu Rev Biochem*. 2002;71:101–32.
70. Ahsberg J, Sigvardsson M. Molecular Mechanisms of Stable Lineage Identity in Early B-Lymphocyte Development. In: Guidos CJ, Rolink A, Hein W, Gordon JR, editors. *Encyclopedia of Immunobiology*. 1st ed. Elsevier; 2016. p. 38–45.
71. Schatz DG, Ji Y. Recombination centres and the orchestration of V(D)J recombination. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2011;11:251–63. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nri2941>
72. Pieper K, Grimbacher B, Eibel H. B-cell biology and development. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. 2013;131(4):959–71. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2013.01.046>
73. Hoffman W, Lakkis FG, Chalasani G. B Cells, Antibodies, and More. *Ren Immunol*. 2016;11:137–54.
74. Ratcliffe MJ, editor. *Encyclopedia of Immunobiology*. 1st ed. Academic Press;

- 2016.
75. LeBien TW, Tedder TF. B lymphocytes: how they develop and function. *Blood* [Internet]. 2008;112(5):1570–80. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18725575> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2518873>
 76. Newman R. B-cells [Internet]. [cited 2019 Jul 10]. Available from: <https://www.immunology.org/public-information/bitesized-immunology/células/b-cells>
 77. Dorshkind K, Montecino-Rodriguez E. Fetal B-cell lymphopoiesis and the emergence of B-1-cell potential. *Nat Rev Immunol*. 2007;7(3):213–9.
 78. Graf R, Seagal J, Otipoby KL, Lam K, Ayoub S, Zhang B, et al. BCR-dependent lineage plasticity in mature B cells. *Science* (80-). 2019;363(6428):748–53.
 79. de Goer de Herve M-G, Durali D, Dembele B, Giuliani M, Tran T-A, Azzarone B, et al. Interferon-Alpha Triggers B Cell Effector 1 (Be1) Commitment. *PLoS One*. 2011;6(4):1–7.
 80. Lund FE. Cytokine-producing B lymphocytes — key regulators of immunity. *Curr Opin Immunol*. 2008;20:332–8.
 81. Harris DP, Goodrich S, Gerth AJ, Peng SL, Lund FE, Harris DP, et al. Regulation of IFN- γ Production by B Effector 1 Cells: Essential Roles for T-bet and the IFN- γ Receptor 1. *J Immunol*. 2019;174:6781–90.
 82. Tobón GJ, Izquierdo JH, Cañas CA. B Lymphocytes : Development , Tolerance , and Their Role in Autoimmunity — Focus on Systemic Lupus Erythematosus. 2013;2013.
 83. Nelson BH. CD20+ B Cells: The Other Tumor-Infiltrating Lymphocytes. *J Immunol*. 2010;185(9):4977–82.
 84. Duddy ME, Alter A, Bar-or A. Distinct Profiles of Human B Cell Effector Cytokines: A Role in Immune Regulation? *J Immunol*. 2004;172:3422–7.
 85. Pagés F, Galon J, Dieu-Nosjean M-C, Tartour E, Sautés-Fridman C, Fridman W-H. Immune infiltration in human tumors : a prognostic factor that should not be ignored. *Oncogene*. 2010;29:1093–102.
 86. Bouaziz J-D, Yanaba K, Venturi GM, Wang Y, Tisch RM, Poe JC, et al. Therapeutic B cell depletion impairs adaptive and autoreactive CD4+ T cell

- activation in mice. 2007;
87. Simsa P, Teillaud J-L, Stott DI, Tóth J, Kotlan B. Tumor-Infiltrating B Cell Immunoglobulin Variable Region Gene Usage in Invasive Ductal Breast Carcinoma. *Pathol Oncol Res.* 2005;11(2):92–7.
 88. Nzula S, Going JJ, Stott DI. Antigen-driven Clonal Proliferation , Somatic Hypermutation , and Selection of B Lymphocytes Infiltrating Human Ductal Breast Carcinomas 1. *Cancer Res.* 2003;63:3275–80.
 89. Kumar S, Mohan A, Guleria R. Prognostic implications of circulating anti-p53 antibodies in lung cancer – a review. *Eur J Cancer Care (Engl).* 2009;18:248–54.
 90. Mizukami M, Hanagiri T, Shigematsu Y, Baba T, Fukuyuma T, Nagata Y, et al. Effect of IgG Produced by Tumor-infiltrating B Lymphocytes on Lung Tumor Growth. *Anticancer Res.* 2006;26:1827–31.
 91. Li Q, Grover AC, Donald EJ, Carr A, Yu J, Whitfield J, et al. Simultaneous Targeting of CD3 on T Cells and CD40 on B or Dendritic Cells Augments the Antitumor Reactivity of Tumor-Primed Lymph Node Cells. 2019;
 92. Yanaba K, Bouaziz J-D, Matsushita T, Magro CM, St.Clair EW, Tedder TF. B-lymphocyte contributions to human autoimmune disease. *Immunol Rev.* 2008;223:284–99.
 93. Bystry RS, Aluvihare V, Welch KA, Kallikourdis M, Betz AG. B cells and professional APCs recruit regulatory T cells via CCL4. *Nat Immunol.* 2001;2(12):1126–32.
 94. Menard LC, Minns LA, Darche S, Mielcarz DW, Foureau DM, Roos D, et al. B Cells Amplify IFN- γ Production By T Cells via a TNF- α -Mediated Mechanism. *J Immunol.* 2019;179:4857–66.
 95. Yuen GJ, Demissie E, Pillai S. B Lymphocytes and Cancer : A Love – Hate Relationship. *Trends in Cancer.* 2016;2(12):747–57.
 96. Al-shibli KI, Donnem T, Al-saad S, Persson M, Bremnes RM, Busund L-T. Prognostic Effect of Epithelial and Stromal Lymphocyte Infiltration in Non - Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res.* 2008;14(16):5220–8.
 97. Riemann D, Wenzel K, Schulz T, Hofmann S, Neef H, Lautenschläger C, et al. Phenotypic Analysis of T Lymphocytes Isolated from Non-Small-Cell Lung

- Cancer. *Int Arch Allergy Immunol*. 1997;114:38–45.
98. Pimenta EM, Barnes BJ. Role of Tertiary Lymphoid Structures (TLS) in Anti-Tumor Immunity: Potential Tumor-Induced Cytokines/Chemokines that Regulate TLS Formation in Epithelial-Derived Cancers. *Cancers (Basel)*. 2014;6:969–97.
 99. Germain C, Gnjjatic S, Tamzalit F, Knockaert S, Remark R, Goc J, et al. Presence of B Cells in Tertiary Lymphoid Structures Is Associated with a Protective Immunity in Patients with Lung Cancer. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014;189(7):832–44.
 100. Peng B, Ming Y, Yang C. Regulatory B cells: the cutting edge of immune tolerance in kidney transplantation. *Cell Death Dis* [Internet]. 2018;9(109):1–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41419-017-0152-y>
 101. Mauri C, Bosma A. Immune Regulatory Function of B Cells. *Annu Rev Immunol*. 2012;30:221–41.
 102. Mauri C, Menon M. Human regulatory B cells in health and disease : therapeutic potential. *J Clin Invest*. 2017;127(3):772–9.
 103. Carter NA, Vasconcellos R, Rosser EC, Tulone C, Muñoz-Suano A, Kamanaka M, et al. Mice Lacking Endogenous IL-10– Producing Regulatory B Cells Develop Exacerbated Disease and Present with an Increased Frequency of Th1/Th17 but a Decrease in Regulatory T Cells. *J Immunol*. 2019;186(10):5569–79.
 104. Shah S, Divekar AA, Hilchey SP, Cho H, Newman CL, Shin S, et al. Increased rejection of primary tumors in mice lacking B cells : Inhibition of anti-tumor CTL and TH1 cytokine responses by B cells. *Int J Cancer*. 2005;117:574–86.
 105. Mizoguchi A, Mizoguchi E, Takedatsu H, Blumberg RS, Bhan AK. Chronic Intestinal Inflammatory Condition Generates IL-10-Producing Regulatory B Cell Subset Characterized by CD1d Upregulation. *Immunity*. 2002;16:219–30.
 106. Fillatreau S, Sweenie CH, Mcgeachy MJ, Gray D, Anderton SM. B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nat Immunol*. 2002;3(10).
 107. Lemoine S, Morva A, Youinou P, Jamin C. Human T cells induce their own regulation through activation of B cells. *J Autoimmun* [Internet]. 2011;36(3–4):228–38. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaut.2011.01.005>

108. Yoshizaki A, Miyagaki T, Dilillo DJ, Matsushita T, Horikawa M, Kountikov EI, et al. Regulatory B cells control T-cell autoimmunity through IL-21-dependent cognate interactions. *Nature* [Internet]. 2012;491(7423):264–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nature11501>
109. Yanaba K, Bouaziz J-D, Matsushita T, Tsubata T, Tedder TF. The Development and Function of Regulatory B Cells Expressing IL-10 (B10 Cells) Requires Antigen Receptor Diversity and TLR Signals. *J Immunol*. 2019;182(12):7459–72.
110. Lampropoulou V, Hoehlig K, Roch T, Neves P, Gómez EC, Sweenie CH, et al. TLR-Activated B Cells Suppress T Cell-Mediated Autoimmunity. *J Immunol*. 2008;180(7):4763–73.
111. Gray M, Miles K, Salter D, Gray D, Savill J. Apoptotic cells protect mice from autoimmune inflammation by the induction of regulatory B cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;
112. Wang R-X, Yu C-R, Dambuza IM, Mahdi RM, Dolinska MB, Sergeev Y V, et al. Interleukin-35 induces regulatory B cells that suppress autoimmune disease. *Nat Med*. 2014;20(6).
113. Rosser EC, Mauri C. Regulatory B Cells: Origin, Phenotype, and Function. *Immunity*. 2015;42(4):607–12.
114. Yanaba K, Bouaziz J-D, Haas KM, Poe JC, Fujimoto M, Tedder TF. A Regulatory B Cell Subset with a Unique CD1dhi CD5+ Phenotype Controls T Cell-Dependent Inflammatory Responses. *Immunity*. 2008;28(5):639–50.
115. Ray A, Dittel BN. Mechanisms of Regulatory B cell Function in Autoimmune and Inflammatory Diseases beyond IL-10. *J Clin Med*. 2017;6(12):1–7.
116. Ray A, Wang L, Dittel BN. IL-10-independent regulatory B-cell subsets and mechanisms of action. *Int Immunol*. 2015;27(10):531–6.
117. Floudas A, Amu S, Fallon PG. New Insights into IL-10 Dependent and IL-10 Independent Mechanisms of Regulatory B Cell Immune Suppression. *J Clin Immunol* [Internet]. 2016;36:25–33. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s10875-016-0263-8>
118. Nouel A, Pochard P, Simon Q, Segalen I, Le Meur Y, Pers JO, et al. B-Cells induce regulatory T cells through TGF-B/IDO production in a CTLA-4

- dependent manner. *J Autoimmun.* 2015;59:53–60.
119. Qiu L, Yu Q, Zhou Y, Zheng S, Tao J, Jiang Q, et al. Functionally impaired follicular helper T cells induce regulatory B cells and CD14 + human leukocyte antigen-DR – cell differentiation in non- - small cell lung cancer. *Cancer Sci.* 2018;109(102):3751–61.
 120. Lizotte PH, Ivanova E V, Awad MM, Jones RE, Keogh L, Liu H, et al. Multiparametric profiling of non–small-cell lung cancers reveals distinct immunophenotypes. *J Clin Invest.* 2016;1(14):1–18.
 121. Sattler S, Vlugt LEPM Van Der, Hussaarts L, Smits HH, Huang F. Regulatory B Cells - Implications in Autoimmune and Allergic Disorders. In: Kanwar JR, editor. *Recent Advances in Immunology to Target Cancer, Inflammation and Infections* [Internet]. IntechOpen; 2012. Available from: <https://www.intechopen.com/books/recent-advances-in-immunology-to-target-cancer-inflammation-and-infections/regulatory-b-cells-implications-in-autoimmune-and-allergic-disorders>
 122. Kessel A, Haj T, Peri R, Snir A, Melamed D, Sabo E, et al. Human CD19+ CD25high B regulatory cells suppress proliferation of CD4+ T cells and enhance Foxp3 and CTLA-4 expression in T-regulatory cells. *Autoimmun Rev* [Internet]. 2012;11(9):670–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.autrev.2011.11.018>
 123. Wang S, Liu W, Ly D, Xu H, Qu L, Zhang L. Tumor-infiltrating B cells : their role and application in anti- tumor immunity in lung cancer. *Cell Mol Immunol* [Internet]. 2019;16:6–18. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41423-018-0027-x>
 124. Shi J, Hou S, Fang Q, Liu X, Liu X, Qi H. PD-1 Controls Follicular T Helper Cell Positioning and Function. *Immunity* [Internet]. 2018;1–11. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.06.012>
 125. Germain C, Gnjatic S. Tertiary lymphoid structure-associated B cells are key players in anti-tumor immunity. 2015;6(February):1–15.
 126. Erdoğan M, Oğuzkaya F. Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanserlerinde Tümör Çapının, Lokalizasyonunun ve Hücre Tipinin Mediastinal Lenf Nodları Metastazı İle İlişkisi. *Van Tıp Derg.* 2015;22(2):73–9.

127. Wang Q, Lin W, Tang X, Li S, Guo L, Lin Y. The Roles of microRNAs in Regulating the Expression of PD-1 / PD-L1 Immune Checkpoint. *Int J Mol Sci.* 2017;18(2540):1–11.
128. Zhang Y, Gallastegui N, Rosenblatt JD. Regulatory B cells in anti-tumor immunity. *Int Immunol.* 2017;27(10):521–30.
129. Freeman BGJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, et al. Engagement of the PD-1 Immunoinhibitory Receptor by a Novel B7 Family Member Leads to Negative Regulation of Lymphocyte Activation. *2000;192(7).*
130. Reck M, Rodriguez-Abreu D, Robinson AG, Hui R, Csőszi T, Fülöp A, et al. Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1–Positive Non–Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2016;375(19):1823–33.
131. Shames DS, Liu J, Ding B, Chavez AL, Kabbinavar F, Lin W, et al. First-Line Atezolizumab plus Chemotherapy in Extensive-Stage Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2018;379(23):2220–9.
132. Wei Y, Zheng L, Kuang D, Wei Y, Zhao Q, Gao Z, et al. The local immune landscape determines tumor PD-L1 heterogeneity and sensitivity to therapy Graphical abstract Find the latest version : The local immune landscape determines tumor PD-L1 heterogeneity and sensitivity to therapy. 2019;
133. Wang Q, Wu X. Primary and acquired resistance to PD-1 / PD-L1 blockade in cancer treatment. *Int Immunopharmacol [Internet].* 2017;46:210–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2017.03.015>
134. Engelhard VH, Rodriguez AB, Ileana S, Woods AN, Peske JD, Craig L. Immune Cell Infiltration and Tertiary Lymphoid Structures as Determinants of Antitumor Immunity. 2019;
135. Ganti SN, Albershardt TC, Iritani BM, Ruddell A. Regulatory B cells preferentially accumulate in tumor-draining lymph nodes and promote tumor growth. *Nat Sci Reports.* 2015;5(March):1–8.
136. Li L, Zhang J, Chen J, Xu-monette ZY, Miao Y, Xiao M, et al. B-cell receptor-mediated NFATc1 activation induces IL-10/STAT3/PD-L1 signaling in diffuse large B-cell lymphoma. 2018;
137. Liu J, Hamrouni A, Wolowiec D, Kuliczowski K, Hetuin D, Saudemont A, et

al. Plasma cells from multiple myeloma patients express B7-H1 (PD-L1) and increase expression after stimulation with IFN-g and TLR ligands via a MyD88- , TRAF6- , and MEK-dependent pathway. *Blood*. 2007;110(1):296–305.



9. ETİK KURUL ONAYI



T.C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanlığı

E-İmzalıdır

Sayı : 10840098-604.01.01-E.13148
Konu : Etik Kurulu Kararı

11/08/2016

Sayın Yrd. Doç. Dr. Deniz Duralı

Üniversitemiz Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kuruluna yapmış olduğunuz “Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri Dözenleyici B Hücrelerinin Tanımlanması Ve Anti-Tümöral Hücreyel Cevaba Etkilerinin Moleküler Mekanizmalarının İncelenmesi” isimli başvurunuz incelenmiş olup, etik kurulu kararı ekte sunulmuştur.

Bilgilerinize rica ederim.

Doç. Dr. Hanefi ÖZBEK
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar
Etik Kurulu Başkanı

EK:
-Karar Formu (2 sayfa)

Bu belge 5070 sayılı e-İmza Kanununa göre Doc. Dr. Hanefi ÖZBEK tarafından 11.08.2016 tarihinde e-imzalanmıştır.
Evrainızı <https://ebys.medipol.edu.tr/e-imza> linkinden 4397919EX5 kodu ile doğrulayabilirsiniz.

İstanbul Medipol Üniversitesi

Kavacık Mah. Ekinciler Cad.No:19 Kavacık Kavşağı 34810
Beykoz/İSTANBUL

Tel: 444 85 44
İnternet: www.medipol.edu.tr
Ayrıntılı Bilgi İçin : bilgi@medipol.edu.tr

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR
ETİK KURULU KARAR FORMU

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseriinde Regülatör B Hücrelerinin Tanımlanması Ve Anti-Tümöral Hücreyel Cevaba Etkilerinin Moleküler Mekanizmalarının İncelenmesi			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Yrd. Doç. Dr. Deniz Duralı			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Tıbbi Mikrobiyoloji			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	İstanbul			
	DESTEKLEYİCİ	-			
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input checked="" type="checkbox"/>	ULUSAL <input checked="" type="checkbox"/>	ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR
ETİK KURULU KARAR FORMU

Değerlendirilen Belgeler	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili		
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ/PLANI	01.08.2016		Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	01.08.2016		Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>	
Karar Bilgileri	Karar No: 416	Tarih: 10/08/2016				
	Yukarıda bilgileri verilen Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve araştırmanın etik ve bilimsel yönden uygun olduğuna "oybirliği" ile karar verilmiştir.					

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI Doç. Dr. Hanefi ÖZBEK

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki		Katılım *		İmza
Prof. Dr. Şeref DEMİRAYAK	Eczacılık	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Hanefi ÖZBEK	Farmakoloji	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	e.
Yrd. Doç. Dr. Sibel DOĞAN	Psiko-onkoloji	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	SD
Yrd. Doç. Dr. Devrim TARAKCI	Ergoterapi	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	D
Yrd. Doç. Dr. İlknur KESKİN	Histoloji ve Embriyoloji	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	İ
Öğr. Gör. Dr. Mehmet Hikmet ÜÇİŞİK	Biyoteknoloji	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	

* :Toplantıda Bulunma

10. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	OĞUZHAN	Soyadı	KÖSE
-----	---------	--------	------

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık		
Yüksek Lisans		
Lisans	Gebze Teknik Üniversitesi	2016
Lise	İstanbul Üsküdar Lisesi	2011

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*
İngilizce	Çok iyi	İyi	Çok iyi
İspanyolca	Başlangıç	Başlangıç	Başlangıç

* Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

Yabancı Dil Sınav Notu								
KPDS	YDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE
	78.75							

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	73,92595	75,13690	69,06168

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office	İyi
FlowJO	Orta