

HATİCE KÜBRA AKAY

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

DOKTORA TEZİ

İSTANBUL-2023



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

AKCİĞER KANSERLİ HASTALARDA MUKOZA İLİŞKİLİ
İNVARİANT (MAİT) T HÜCRELERİ

HATİCE KÜBRA AKAY

DANIŞMAN
PROF. DR. GÜNNUR DENİZ

AZİZ SANCAR
DENEYSEL TIP ARAŞTIRMA ENSTİTÜSÜ
İMMÜNOLOJİ ANABİLİM DALI

İSTANBUL-2023

TEZ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İÜ Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, İmmünoloji Anabilim Dalı Doktora öğrencisi **Hatice Kübra Akay** tarafından **Prof Dr. Günnur Deniz** danışmanlığında hazırlanan “**Akciğer Kanserli Hastalarda Mukoza İlişkili İnvariant T (MAİT) Hücreleri**” başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 28/08/2023 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.



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 içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Hatice Kübra Akay
(İmza)

İTHAF

Ebediyete uğurladığım sevgili babacığma ve en kıymetli hazinem anneme...



TEŞEKKÜR

Öncelikle doktora eğitimim boyunca bana daima sabır, nezaket ve gayret içinde örnek ve destek olan kıymetli danışman hocam Prof. Dr. Günnur Deniz'e,

Tez projem ve laboratuvar çalışmaları sürecinde güler yüzünü ve yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Esin Aktaş Çetin'e, Doç. Dr. Metin Yusuf Gelmez'e ve Doç. Dr. Umut Can Küçüksezere'e,

Doktora ders döneminden başlayarak bize misafirperverlik gösteren ve materyal teminini sağlayıp tezimin ilerlemesinde yol gösteren kıymetli hocam Prof. Dr. Akif Turna'ya ve asistanlarına,

Manevi olarak desteğini hep hissettiğim Prof. Dr. Ali Osman Gürol'a,

Doktora eğitimim boyunca hem hocam hem arkadaşım hem ailem olan Dr. Öğr. Üyesi Deniz Duralı'ya ve Dr. Öğr. Üyesi Özlem Güven'e,

Dostluğu, maddi ve manevi her türlü yardımı için Dr. Öğr. Üyesi Nagihan Mantar'a,

Çalışmalarım boyunca bana gereken ortamı sağlayan tüm Medipol Üniversitesi SHMYO mensuplarına, bilhassa Prof. Dr. Elvan Tercan ve anestezi teknikeri Ayşe Kurt'a,

Doktora eğitimine beraber başladığımız, tecrübelerini benimle paylaşıp maddi manevi yardımını her zaman yanımda hissettiğim dostum PhD İlhan Tahralı'ya

Başım sıkıştığında yardımına koşan arkadaşlarım Msc Bio. Ayşe Engin, Msc Bio. Fatma Betül Öktelik, Msc Bio. Ayşenur Kökoğlu, Msc Bio. Fatih Akboğa ve Msc Bio. Farhad Kohansal'a,

Laboratuvar çalışmalarındaki teknik desteklerinden ötürü başta Abdullah Yılmaz'a, Kutluhan Ünal ve Selim Kürşat Kargı'ya,

Sağlıklı kontrol grubu örneklerini teminde beni rahatlatan başta hemşire Pakize Aygün ve tüm CTF hemşirelerine,

Üzerimdeki emeği ve desteği ifade edemeyeceğim kadar fazla olan çok kıymetli anneciğime ve bütün aile üyelerine,

Duasını benden esirgemeyen büyüklerime, dost, kardeş ve öğrencilerime teşekkürü bir borç bilirim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 34769

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	Vİİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ	İX
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	X
ÖZET	XİV
ABSTRACT.....	XV
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Akciğer Kanseri	3
2.1.1. Etiyoloji ve Patogenez	3
2.1.2. Akciğer Kanserinin Patolojik Olarak Tiplendirilmesi	5
2.1.2.1. Adenokarsinom	5
2.1.2.2. Yassı Hücreli Karsinom	5
2.1.2.3. Büyük Hücreli Karsinom	6
2.1.2.4. Küçük Hücreli Karsinom	6
2.1.3. Akciğer Kanserinde Tümör Nod Metastaz Evrelemesi	6
2.1.4. Akciğer Kanserinin Evrelemesinde Kullanılan Teknikler	8
2.1.5. Akciğer Kanserinde Tedavi	8
2.1.6. Akciğer Kanserinde İmmün Yanıtta Genel Bakış.....	8
2.2. Doğal Benzeri T hücreler ve Bağışıklığımızdaki Rollerini	9
2.2.1. iNKT Hücreleri	9
2.2.2. $\gamma\delta$ T Hücreleri	10
2.2.3. MHC ilişkili Molekül 1 (MR1).....	10
2.2.3.1. MAİT Hücreleri	11
2.2.3.2. MAİT Hücrelerinin Gelişimleri	12
2.2.3.3. MAİT Hücrelerinin Vücutta Yerleşimleri.....	12
2.2.3.4. MAİT Hücre Yüzey Reseptörleri.....	13

<i>IL-18R1 ve Etkileri</i>	13
<i>CD161 Molekülü ve Etkileri</i>	14
<i>Çoklu İlaç Direnci Proteini 1 (MDR1)</i>	15
2.2.3.5. Sitokinler	15
<i>TNF ve Etkileri</i>	15
<i>IFN-γ ve Etkileri</i>	16
<i>IL-17 ve Etkileri</i>	16
2.2.3.6. MAİT Hücrelerinin Tanımlanması	17
2.3. MAİT Hücreleri ve Kansere Patogenezinde Rollerini	17
3. GEREÇ VE YÖNTEM	20
3.1. Çalışma Grubu ve Tasarımı	20
3.2. Periferik Kandan Mononükleer Hücre Eldesi	21
3.3. Solid Dokuların Ayırıştırılması	22
3.3.1. Mononükleer Hücrelerin Uyarımı	24
3.3.2. Akan Hücre Ölçer Deneyleri	25
3.3.2.1. Hücre Yüzey Molekül Ekspresyonu	25
3.3.2.2. Hücre İçi Boyama	25
3.3.3. Akan Hücre Ölçer Analizleri	26
3.4. İstatistiksel Yöntem	27
3.5. Çalışmada Kullanılan Cihazlar	27
4. BULGULAR	29
4.1. Klinik ve Demografik Özellikler	29
4.2. MAİT ve Lenfosit Alt Gruplarının Akan Hücre Ölçer ile Değerlendirilmesi	31
4.2.1. Periferik Kan MAİT ve Lenfosit Alt Grupları	31
4.2.2. Sağlıklı ve Hasta Periferik Kan Lenfosit Gruplarının Korelasyonu	37
4.2.3. KHDAK Hasta Doku Örneklerinde Lenfosit Alt Grupları	39
4.2.4. Sağlıklı Periferik Kan Mononükleer Hücrelerinde Hücre İçi Sitokin Analizi ..	40
5. TARTIŞMA	43
KAYNAKLAR	50
ETİK KURUL KARARI	55
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI	56
ÖZGEÇMİŞ	57

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 2-1 Akciğer tümör ve öncüllerinin sınıflandırması	7
Tablo 3-1 Yüzey boyamada kullanılan antikorlar ve özellikleri	25
Tablo 3-2 Hücre içi boyamada kullanılan antikorlar	26
Tablo 3-3 Çalışmada kullanılan teçizat	27
Tablo 4-1 Hasta bilgileri	30
Tablo 4-2 Hasta ve sağlıklı kontrol grubu tanımlayıcı istatistiği.....	31



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1 GLOBOCAN (Küresel Kanseri Gözlemevi-DSÖ) 2020 verilerine göre ülkeler genelinde kadınlarda ve erkeklerde en yüksek ölüm gözlenen kanser tipleri.....	3
Şekil 2-2: Mait hücrelerinin sahip olduğu reseptörler ve transkripsiyon faktörleri.....	13
Şekil 2-3 İnsan vücudunda MAİT hücre oranlarının dağılımı.....	13
Şekil 3-1 Çalışma sürecinde izlenen yol.....	21
Şekil 3-2 Fikol içeren lenfosit ayırma ortamı (LSM) kullanarak periferik kan mononükleer hücre (PKMH) ayrıştırılması	22
Şekil 3-3 Tüplerin tümör ayrıştırma cihazı ve tüp rotatörüne yerleştirilmesi.....	23
Şekil 3-4 Tümör ve akciğer dokusundan tek hücre süspansiyonu eldesi	24
Şekil 4-1 Sağlıklı periferik kan örneğinde MAİT hücre kapılama stratejisi.....	32
Şekil 4-2 Hasta periferik kan örneğinde MAİT hücre kapılama stratejisi	33
Şekil 4-3 Sağlıklı ve hasta grupları arasında CD3 ⁻ ve $\alpha\beta^+$ T hücreleri	34
Şekil 4-4 A. MAİT dışı T hücre alt gruplarının kapılama stratejisi. B. Sağlıklı ve hasta grupları arasında MAİT ve T hücre alt gruplarının karşılaştırılması.	35
Şekil 4-5 A. MAİT hücre alt gruplarının kapılama stratejisi. B. Sağlıklı ve hasta grupları arasında MAİT alt gruplarının karşılaştırılması.	36
Şekil 4-6 Sağlıklı, erken, ileri evre periferik kan lenfosit alt gruplarının karşılaştırılması	37
Şekil 4-7 Periferik kan CD3 ⁺ , CD3 ⁻ lenfositler, MAİT ve T hücre alt gruplarının korelasyon matrisi . A. Hasta grupta periferik kan hücreleri arasındaki korelasyon B. Sağlıklı grupta periferik kan hücreleri arasındaki korelasyon.	38
Şekil 4-8 Tümör dokusu MAİT hücrelerinin kapılama stratejisi.....	39
Şekil 4-9 Hasta periferik kan ve doku örneklerinde MAİT hücreleri.....	40
Şekil 4-10 A. IFN- γ pozitif lenfosit alt gruplarının akan hücre ölçer ile gösterilmesi B. Sağlıklı periferik kan örneklerinde hücre içi IFN- γ seviyeleri.	41
Şekil 4-11 A. CD3 antikoru yalnızca hücre yüzey boyama için kullanıldığında B. CD3 antikoru hem hücre yüzey hem de hücre içi boyamada kullanıldığında MAİT kapısı... ..	42

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

α	Alfa
ALK	Anaplastik lenfoma kinaz
ASH	Antijen sunan hücre
ATS	Avrupa Göğüs Derneği
B2	Riboflavin
B9	Folik asit
5-OP-RU	5-(2-oksopropildenamino)-6-D-ribitilaminourasil
β	Beta
BRAF	Raf murin sarkomu viral onkojen homologu B
BT	Bilgisayarlı tomografi
CEA	Karsinoembriyonik antijen
CCL	C-C motifli kemokin ligandı
CCR	C-C kemokin reseptör
CD	Farklılaşma kümesi (<i>cluster of differentiation</i>)
CXCR	C-X-C kemokin reseptör
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
EGFR	Epitelyal büyüme faktörü reseptörü
ERS	Avrupa Solunum Derneği
EBUS	Endobronşiyal ultrasonografi
EUS	Endoskopik ultrasonografi
FasL	Ölüm reseptörü ligandı
FBS	Fetal sığır serumu
FMO	Floresan eksi bir (<i>Fluorescence minus one</i>)

$\gamma\delta$ T	Gama-delta T (hücreler)
G2M	Büyüme 2 mitotik fazı
GFR	Büyüme faktörü reseptörü
GLOBOCAN	Küresel Kanser Gözlemevi
HBV	Hepatit B virüsü
HCT116	İnsan kolon kanseri hücre hattı tipi
HCV	Hepatit C virüsü
HIV	İnsan immünyetmezlik virüsü
IASLC	Uluslararası Akciğer Kanseri Araştırmaları Derneği
IL-	İnterlökin
IL-18R	İnterlökin 18 reseptörü
IFN- γ	İnterferon gama
IFNR	İnterferon reseptör
IM	İyonomisin
iNKT	İnvaryant doğal katil-T (hücreler)
K-562	Kronik miyeloid lösemi lenfoblast hücre hattı
KAH	Koroner arter hastalığı
KHAK	Küçük hücreli akciğer kanseri
KHDAK	Küçük hücreli dışı akciğer kanseri
KLK	Kolorektal kanser
KLRB1	Öldürücü hücre lektin-benzeri reseptör B alt ailesi üye 1
KOAH	Kronik obstrüktif akciğer hastalığı
KRAS	Kirsten sıçan sarkomaviral onkojeni
LAMP-1	Lizozomla ilişkili membran protein 1
LLT-1	Lektin benzeri transkript 1
LSM	Lenfosit ayırma ortamı (<i>Lymphocyte separation medium</i>)

MAİT	Mukoza ile ilişkili invaryant (değişmez) T hücreleri
MDR1	Çoklu ilaç direnci proteini 1
MET	Mezenkimal epitelyal geçiş geni (Hepatosit büyüme faktör reseptörü geni)
MHC	Genel doku uyumluluğu kompleksi
MR1	MHC ilişkili molekül 1
MM	Multipl (çoklu) miyeloma
NH ₄ Cl	Amonyum klorür
NK	Doğal katil (hücreler)
NKR-PA	NK reseptör P1A (CD161)
PBS	Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
PD-L1	Programlı hücre ölümü ligandı 1
PET-BT	Pozitron emisyon tomografisi-bilgisayarlı tomografi
Pgp	P glikoprotein
PI3K	Fosfatidilinositol 3-kinaz
PKMH	Periferik kan mononükleer hücreleri
PLZF	Promiyelositik çinko parmak proteini
PMA	Forbol 12-miristat 13-asetat (<i>Phorbol 12-myristate 13-acetate</i>)
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu (<i>PCR</i>)
RET	GDNF ailesi üyeleri için reseptör tirozin kinaz (<i>Rearranged during transfection</i> , transfeksiyon sırasında yeniden düzenlenmiş)
ROR-γt	Retinoid orphan receptor-gamma t
ROS1	Proto-onkojen tirozin-protein kinaz 1
Rpm	Dakikadaki dönme sayısı
RPMI	Hücre kültürü besi yeri tipi (<i>Roswell Park Memorial Institute</i>)
RPMI 8226	Multipl miyeloma B lenfosit hücre hattı

SARS-CoV-2	Şiddetli akut solunum yolu sendromu-Koronavirüs-2
SMARCA-4	SWI/SNF ile ilgili, matrisle ilişkili, aktin bağımlı kromatin düzenleyicisi, alt aile a, üye 4, BRG1
TAM	Tümörle ilişkili makrofajlar
T-bet	T-kutusu transkripsiyon faktörü
TBİA	Transbronşiyal iğne aspirasyonu
TEMLA	Transservikal ilerletilmiş mediastinal lenfadenektomi
Th	Yardımcı T (hücre)
THR	T hücre reseptörü
TLR	Toll benzeri reseptör
TNF (TNF- α)	Tümör nekroz faktörü
TNM	Tümör-nod-metastaz
Treg	Düzenleyici (regülatör) T (hücre)
U266	Multipl miyeloma B lenfosit hücre hattı
VAMLA	Video-yardımlı mediastinoskopik lenfadenektomi
V α 7.2	THR alfa zincirinin değişken kısmının bir varyantı, TRAV 1-2 gen ürünü
V-D-J	Değişken-çeşitlilik-katılma (<i>variable-diversity-joining</i>) reseptör gen bölgeleri
VYTC	Video yardımlı torakoskopik cerrahi

ÖZET

Akay, H.K. Akciğer Kanseri Hastalarında Mukoza İlişkili İnvariant T (MAİT) Hücreleri. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İmmünoloji ABD. Doktora Tezi. İstanbul. 2023

Akciğer kanseri Türkiye’de ve dünyada mortalitesi yüksek malinitelerden biridir. Yapılan sınıflandırma ve evrelendirme, tedavinin gidişatında oldukça önemlidir. Klasik tedavi yöntemleriyle uzun süreli sağkalım sağlanamamaktadır. Son yıllarda, kansere karşı immün yanıtlarda önemli rol oynayan sitotoksik invaryant T hücrelerinin immünoterapide kullanımı üzerine çalışmalar artmıştır. Mukozayla ilişkili invaryant T (MAİT) hücreleri de sahip oldukları semi-invaryant reseptörlerle ve rol aldıkları immün yanıtlarla dikkati çekmektedir. Özellikle mukozal bölgelerde ve karaciğerde baskın olan bu hücre grubu gelişimleri için mikrobiyotaya ihtiyaç duymaktadır. Bakteriyel ve viral enfeksiyonlarda etkin rol almakla birlikte kanser hücrelerini de öldürebilmektedir. Çalışmamız insanda akciğer kanserli hastalarda dokularda ve periferik kanda MAİT hücrelerinin oranlarını ve etkinliklerini belirlemek için yapıldı. Bu çalışmaya küçük hücreli dışı akciğer kanserli hastalardan 15 periferik kan (erken ve geç evre), 5 tümör, 5 tümöre komşu akciğer dokusu ve 6 lenf nodu örneği, sağlıklı kontrollerden ise 10 periferik kan örneği dahil edildi. Tek hücre süspansiyonu hâline getirilen örnekler akan hücre ölçek ile analiz edildi. Sonuçta periferik kanda MAİT hücre yüzdesi total hasta grubunda sağlıklılarınkine kıyasla anlamlı derecede daha az tespit edildi ($p=0,036$). Hastalık evreleri arasında ise yüzde oran olarak anlamlı farklılık görülmedi. Hasta periferik kan örneklerinde diğer doku örneklerine kıyasla MAİT hücre yüzdesi daha fazla bulunmasına karşılık anlamlı bir fark saptanmadı. Sağlıklı periferik kan mononükleer hücrelerinin uyarım sonrası MAİT hücrelerinde anlamlı IFN-gama artışı tespit edildi ($p=0,016$). Çalışmamız akciğer kanserinde MAİT hücrelerinin diğer kanser türlerinde olduğu gibi sağlıklılara kıyasla periferik kanda azaldığını doğrulamaktadır.

Anahtar Kelimeler: MAIT, invaryant T hücreler, akciğer neoplazmları, karsinoma-küçük hücreli olmayan, akan hücre ölçek

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 34769

ABSTRACT

Akay, H.K. Mucosa Associated Invariant T (MAIT) Cells in Patients with Lung Cancer. Istanbul University, Institute of Health Science, Department of Immunology, PhD thesis. İstanbul. 2023.

Lung cancer is one of the malignancies with high mortality in Turkey and worldwide. Both classification and staging of lung cancer are crucial during the treatment. Long-term survival cannot be achieved with conventional therapies. In recent years, studies on the use of cytotoxic invariant T cells, which play an important role against cancer, in immunotherapy, have increased. These cells draw attention with their semi-invariant receptors and the immune responses they function in. Mucosa-associated invariant T (MAIT) cells predominate in mucosal regions, liver and they require microbiota for their development. They play a protective role against bacterial and viral infections and can kill cancer cells. Our study was accomplished to determine the proportions and functions of MAIT cells in different tissues in lung cancer. This study included 15 peripheral blood (early and late stage), 5 tumor, 5 adjacent lung tissue, 6 lymph node samples from patients with non-small cell lung cancer (NSCLC), and 10 peripheral blood from healthy controls. Single cell suspensions of clinical samples were analyzed by flow cytometry. As a result the percentage of MAIT cells in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) was found to be significantly lower in the patient group compared to the healthy ones ($p=0.036$). There was no significant difference in ratios of MAITs between disease stages. Although the percentage of MAIT cells found to be higher in patient PBMC compared to other tissues, no significant difference was detected. A significant increase in IFN-gamma was detected in MAIT cells after stimulation of healthy PBMCs ($p=0.016$). Our study confirms that MAIT cells in lung cancer are decreased in PBMC compared to healthy ones as in other cancer types.

Key Words: MAIT, invariant T cells, lung neoplasms, carcinoma-non small cell-lung, flow cytometry

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. 34769

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Akciğer kanseri dünyada ve ülkemizde hem erkek nüfus içinde hem de genelde en önde gelen malinitelerden biri olarak yüksek insidans ve ölüm oranına sahiptir. Hastalığın ortaya çıkmasında büyüme faktörü reseptörü (GFR), epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) ve anaplastik lenfoma kinazın (ALK) zararlı etkilerine yol açan kazanılmış mutasyonlar gibi genetik faktörler; akciğerin enflamatuvar/enfeksiyon hastalıkları, tütün ürünlerinin kullanımı yahut sigara dumanına maruziyet, alkol kullanımı, uygunsuz beslenme veya toksik gaz kimyasallara maruziyet gibi çevresel faktörler etkili olmaktadır^{1,2}.

Akciğer kanserinin tanımlanması, sınıflandırılması ve evrelendirilmesi, tedavinin uygun şekilde yapılabilmesi ve hasta sağkalımının uzatılması için oldukça önemlidir. Bu sebeple ilk etapta cerrahi müdahaleye uygunluğu da gösteren Küçük hücreli (KHAK) veya Küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) şeklinde histolojik bir sınıflandırma yapılmaktadır. Bunun yanı sıra Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından kabul gören ve multidisipliner bir yaklaşımla hazırlanan daha detaylı bir sınıflandırma mevcuttur. Kanserın evrelenmesi daha önce belirtildiği gibi hasta için en doğru tedavinin tespit edilmesi, hastalık seyrinin öngörülebilmesi ve adjuvan (yardımcı) tedavilerin ilave olarak uygulanabilirliğinin belirlenmesi açısından yine önem taşımaktadır. Bu sebeple diğer kanser tiplerine benzer şekilde akciğer kanserinin tümör, nod ve metastaz açısından sınıflandırılması esastır^{3,4}.

Akciğer kanserinin tedavisinde KHAK ve KHDAK için farklı bir yol izlenmektedir. KHDAK tedavisinde cerrahi, radyoterapi ve sistemik kemoterapi tek başına ya da kombine olarak kullanılabilirken KHAK için kemoterapi ve radyoterapi tercih edilir⁵. Bunlara ek olarak geliştirilen immünoterapötik ajanların hem immünojenik hem de non-immünojenik malinitelerde son on yılda klinik kullanımları artmıştır. Bu yaklaşımlarda genel olarak sitotoksik T hücrelerinin aktivasyonunu artırmak ve tümörün immün kontrol noktasını aktif hale getirmesini engellemek amaçlanmıştır⁶. Geleneksel ve yenilikçi bu tedavi yaklaşımlarına rağmen akciğer kanseri hâlâ diğer kanser türleri arasında ölüm oranı açısından başı çekmektedir. Bu sebeple özellikle immün-temelli tedaviler için çalışmalar hız kazanmıştır. Ancak söz konusu

immünoterapilerin etkin kullanımı anti-tümöral immün yanıtın mekanizmalarının iyi bilinmesini mecburi kılmaktadır.

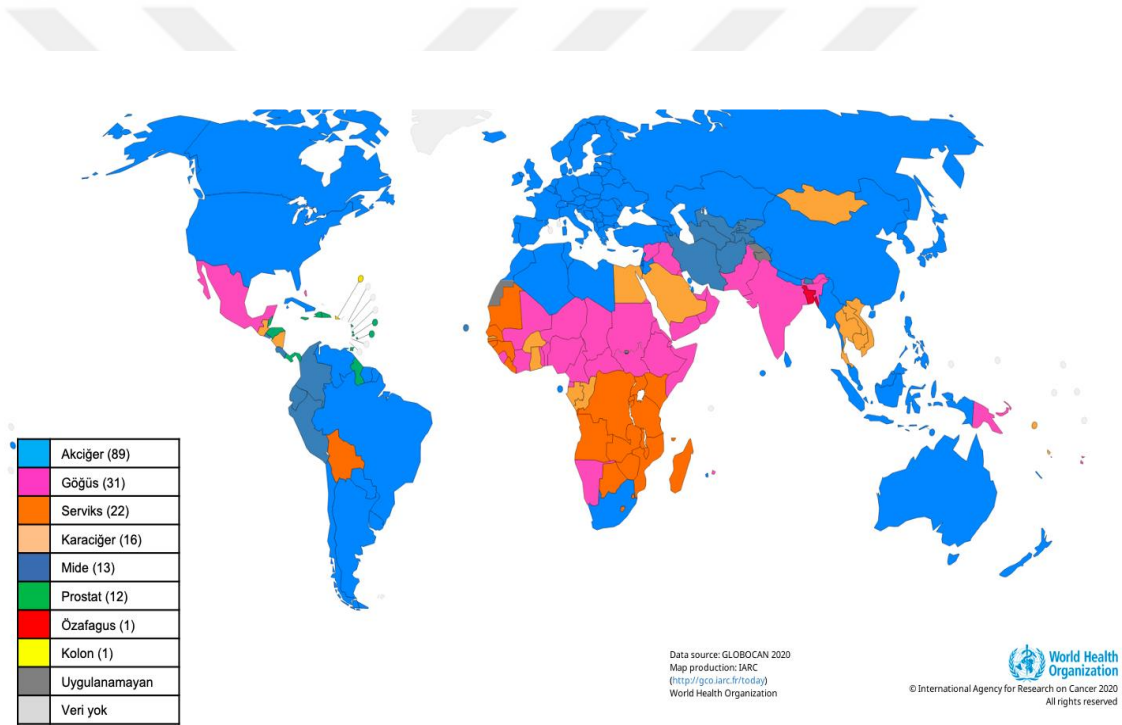
Kanserli hücreleri yok etmede etkin, immün sistemdeki iki önemli hücreden biri doğal immünitinin elemanlarından doğal katil (NK) hücreler diğeri ise edinsel immün yanıtta benzer göreve sahip sitotoksik “farklılaşma kümesi” (*cluster of differentiation*, CD) 8⁺ T hücrelerdir. Bunun yanı sıra son yıllarda doğal ve edinsel immün yanıtta hücreler arasında kalan ve doğal benzeri T hücreler olarak adlandırılan hücre grupları üzerinde çalışmalar hızla artmaktadır. Bunlardan mukoza ile ilişkili invaryant T (MAİT) hücrelerinin özellikle bazı enfeksiyonlarda önemli rolleri gösterilmiştir⁷. Ayrıca enfeksiyon dışındaki diğer klinik tablolardaki rollerinin aydınlatılması ile ilgili çalışmalar içinde kanser başta yer almaktadır. MAİT hücrelerinin aktivasyon sonrası ürettikleri sitokinler sebebiyle kanserde immünolojik tabloyu oldukça etkiledikleri anlaşılmakla birlikte elde edilen sonuçlar hâlâ bu hücre grubunun rolünü bütünüyle anlamamız için yetersizdir ve farklı hasta grupları ile doğrulamayı gerektirmektedir^{8, 9, 10}.

Çalışmamızda, akciğer kanseri özelinde kanser patogenezinde MAİT hücrelerinin diğer lenfositlere oranla nasıl değişiklik gösterdiğinin ve bu hücrelerin salgıladığı sitokin içeriğinin saptanması amaçlanmıştır. Sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında akciğer kanserli hasta grubunda kanser progresyonunu etkileyebilecek oransal ya da fonksiyonel farklılıkların saptanması MAİT hücrelerinin buradaki rolünü anlamaya dair bir veri sağlayacaktır. Literatürdeki veriler ışığında da MAİT hücrelerinin iddia edildiği gibi kanser sürveyansında immün belirteç olarak kullanılıp kullanılmayacağı hem de immünoterapiler için uygun bir sitotoksik hücre olup olmadığı tartışılacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Akciğer Kanseri

Akciğer kanseri, basit bir tabirle akciğerde başlayan malin (malign, kötü huylu) neoplazmlar olarak ifade edilir. 20. yüzyıldan önce 400'ü bulmayan vaka ile bilinen akciğer kanseri, geçen yüzyılın ortalarından itibaren her yıl dünya genelinde artan insidans ve ölüm oranlarıyla kanser istatistiklerinde ön sıraları tutan bir hastalık hâline gelmiştir¹¹. Küresel Kanser Gözlemevi (GLOBOCAN) 2020 verilerine göre dünya çapında 2 milyonu geçen yeni vaka ve yine 1,8 milyon civarında ölüm vakasıyla seyreden akciğer kanseri insidans ve ölüm oranları, Türkiye’de de diğer kanser türleri arasında hem erkek nüfus özelinde hem de genelde ilk sırada yer almaktadır (Şekil 2.1)².



Şekil 2-1 GLOBOCAN (Küresel Kanser Gözlemevi-DSÖ) 2020 verilerine göre ülkeler genelinde kadınlarda ve erkeklerde en yüksek ölüm gözlenen kanser tipleri².

Haritada parantez içindeki sayılar bütün kanser tipleri içinde ölüm yüzdelerini, açık mavi renk akciğer kanseri kaynaklı ölümleri temsil etmektedir.

2.1.1. Etiyoloji ve Patogenez

Akciğer kanseri oluşumunda risk faktörleri arasında başta aktif veya pasif sigara/tütün ürünleri kullanımı, akciğerin enflamatuvar/enfeksiyon hastalıkları (fibrozis, kronik obstrüktif akciğer hastalığı, pnömoni, tüberküloz vb.), insan immünyetmezlik

virüsü (HIV) enfeksiyonu, alkol tüketimi, beslenme ve diyet, çevresel ve mesleki ajanlara maruziyet (kirli hava, radon, asbest, kömür vb.) ve genetik faktörler sıralanmaktadır⁵.

Sayılan etkenler arasında başı çekenlerden biri tütün ürünleri kullanımıdır. Hasta bireylerin yaklaşık %80'inin, aktif sigara/tütün kullanıcıları ya da yakın zamanda bırakmış kişilerden oluştuğu, sigara kullananların ise %10-15'inin akciğer kanserine yakalandığı bilinmektedir. Buna ilaveten sigara içiciliğinin düzeyini belirtmek için kullanılan paket/yıl sayısı ile akciğer kanseri geliştirme yüzdesi hemen hemen doğru orantılı kabul edilmektedir¹.

Kazanılmış mutasyonlar

Epitel hücrelerinde neoplastik transformasyona sebep olan onkojenik sürücü (*driver*) mutasyonların aşamalı birikmesi, diğer organların sigara ile ilişkili karsinomlarında olduğu gibi akciğerin de sigara ile ilişkili karsinomlarında önemli bir etkidir. Kanserle ilişkili genetik değişikliklerden bazıları sigara içtiği halde henüz kanser gözlenmeyen kişilerde bile bronş epitelinde karşımıza çıkmaktadır.

Adenokarsinomlar sigara içmeyenlerde en çok görülen histolojik alt tiptir. Bunların üçte birinde GFR sinyalizasyon yolağının bileşenlerinde onkojenik fonksiyon kazandırıcı mutasyonlar görülmektedir. Bunlar özellikle Kafkas ırklarının %10-15 kadarında ve daha fazla oranda sigara içmeyen Asyalı kadınlarda gözlenen EGFR; %3-5 oranda ALK, %1 oranda proto-onkojen tirozin ROS1 (Reseptör tirozin kinaz, ROS1), %2-5 oranda metiltransferaz 1 (MET 1), %1-2 oranda çoğul endokrin neoplazisi ve medullar tiroid karsinoması 1 (*rearranged during transfection* - transfeksiyon sırasında yeniden düzenlenmiş, RET tirozin kinaz, RET) gibi çok sayıda tirozin kinaz reseptörünü kodlayan genlerde ortaya çıkmaktadır. Yine GFR sinyalizasyon yolağında reseptör tirozin kinazların akış aşağı (*downstream*) tarafında kalan Raf murin sarkomu viral onkojen homoloğu B (BRAF) (%2); Fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K) (%2) gibi serin/treonin kinaz reseptör genlerinde ve nerdeyse %30 oranda Kirsten sıçan sarkomaviral onkojen (KRAS) geninde fonksiyon kazandırıcı mutasyonlar görülmektedir.

Yassı hücreli karsinom sigara dumanı maruziyetiyle yakından ilişkilidir ve bu tipte çoğunlukla tümör baskılayıcı lokustaki kromozom delesyonlarını içeren çeşitli genetik anormallikler gözlenmektedir.

2.1.2. Akciğer Kanserinin Patolojik Olarak Tiplendirilmesi

Akciğer kanserinin histopatolojik olarak sınıflandırılması hastalığın evrelendirilmesi ve tedavi açısından oldukça önem arz etmektedir. Bu yüzden akciğer kanseri, tümör dokusunun mikroskopik görüntüsünden yola çıkarak ilk etapta, cerrahi rezeksiyona çok uygun olmayan KHAK ve erken evrede daha uygun olan KHDAK olarak gruplandırılmaktadır⁵. Bununla birlikte 2011 yılında Amerikan Göğüs Derneği (ATS), Uluslararası Akciğer Kanseri Araştırmaları Derneği (IASLC), Avrupa Solunum Derneği (ERS) tarafından tanımlanan ve 2015'te DSÖ tarafından kabul gören; sadece histolojik değil patogeneze, radyolojik bulgular, klinik seyir, tedavi ve moleküler testleri de içine alan multidisipliner bir yaklaşımla hazırlanan bir sınıflandırma mevcuttur^{3, 4}. En son 2021'de DSÖ tarafından güncellenen bu sınıflandırma preinvazif ve invazif olarak çok sayıda alt grubu içermekte olup (Tablo 2.1) tedavinin doğru ilerlemesinde oldukça önemlidir¹². Bu bölümde yukarıda bahsedilen sınıflandırmadan bağımsız olarak, en sık karşılaşılan akciğer kanseri histopatolojik tipleri olarak kabul edilen adenokarsinom (%50 sıklıkta), yassı (skuamöz) hücreli karsinom (%20), büyük hücreli karsinom (%2) ve küçük hücreli karsinomdan kısaca bahsedilecektir¹.

2.1.2.1. Adenokarsinom

Mevcut akciğer kanserlerinin çoğunluğunu oluşturan adenokarsinomların sigara ile ilişkisi yassı hücreli karsinoma göre daha azdır ve kadınlarda daha sık rastlanmaktadır. Genellikle akciğerin periferinde ortaya çıkarlar ve yassı hücreli karsinoma göre daha küçük olma eğilimindedirler. Tümör hücrelerinin müsin ürettiği ve glandüler farklılaşma gözlenebilen invazif, malin, epitelial tümörler olan adenokarsinomda asinar, lepidik, papiller, mikropapiller ve solid gibi büyüme şekilleri yaygın olarak görülür^{1, 5, 12}.

2.1.2.2. Yassı Hücreli Karsinom

En sık erkeklerde gözlenen yassı hücreli karsinomun sigara kullanımı ile yakından ilişkili olduğu bilinmektedir. Tümörün santral bronşlardan lümen içine doğru büyümesi sık görülür ayrıca ana bronşlar içine ve komşu akciğer içi lenf nodlarına santral olarak yayılma ve santral kaviteye yaygındır. Diğer akciğer kanserlerine göre balgam, bronkoalveolar lavaj ve bronşiyal fırçalama gibi örneklerin sitolojik incelenmesi atipik hücrelerin saptanmasında erken tanıda önemlidir. Histolojik olarak yassı hücreli karsinom

keratinizasyon ve/veya hücreler arası köprülerin (dezmozom) varlığı ile karakterizedir^{1, 5, 12}.

2.1.2.3. Büyük Hücreli Karsinom

Diğer akciğer kanserlerinde görülen sitolojik özellikleri bulundurmayan, tipik olarak büyük çekirdek (nükleus), belirgin çekirdekçik (nükleolus) ve normal miktarda sitoplazma içeren, büyük ve poligonal şekilli, farklılaşmamış, malin epitelyal hücrelerdir. Akciğer çevresinde yerleşmeye eğilimli olup, subsegmental hava yollarını invaze ederler. Erken dönemde uzak bölgelere metastaz yapması sebebiyle kötü prognozlu (öngörümlü) olarak bilinirler⁵.

2.1.2.4. Küçük Hücreli Karsinom

Sigara ile yakından ilişkisi olan oldukça malin bir tümördür. Az miktarda sitoplazmaları olan, sınırları net olmayan göreceli olarak küçük yuvarlak veya oval şekilli hücrelerden oluşurlar. Tümörler ana bronşta veya akciğer periferinde ortaya çıkabilir. Bilinen preinvazif bir dönem yoktur, ayrıca çok geniş alanlara metastaz yapmaları ve hemen hemen ölümcül olmaları ile bilinirler^{1, 5, 12}.

2.1.3. Akciğer Kanseri Tümör Nod Metastaz Evrelemesi

Diğer kanser tiplerindeki gibi akciğer kanserinde de evreleme hasta için en doğru tedavinin tespit edilmesi, hastalık seyrinin öngörülebilmesi ve adjuvan tedavilerin ilave olarak uygulanabilirliğinin belirlenmesi açısından oldukça önemlidir. Bu sebeple akciğer kanserinin tümör, nod ve metastaz açısından sınıflandırılması genel kabul görmekte ve güncel hâli olan sekizinci versiyonu Uluslararası Kanser Kontrolü Birliği ve Amerikan Kanser Komitesi Ortaklığının fikir birliğiyle 2017 yılından itibaren kullanılmaktadır. Tümör-nod-metastaz (TNM) sınıflandırma yönteminde tümör faktörü primer tümöre ait özellikleri (boyut, bölgesel invazyon ve tümörle ilişkili nodüller) belirtirken, nod faktörü mediastinal lenf nodu tutulumunu, metastaz faktörü uzak metastaz varlığını ifade etmek için kullanılır³.

Tablo 2-1 Akciğer tümör ve öncüllerinin sınıflandırması¹³

Prekürsör (öncül) glandular lezyonlar Atipik adenomatöz hiperplazi Adenokarsinom <i>in situ</i> • Adenokarsinom <i>in situ</i>, non-müsinöz • Adenokarsinom <i>in situ</i>, müsinöz	Sarkomatoid karsinom Pleomorfik karsinom • Dev hücreli karsinom • İğ hücreli karsinom Pulmoner blastom Karsinosarkom
Adenokarsinomlar Minimal invazif adenokarsinom • Minimal invazif adenokarsinom, non-müsinöz • Minimal invazif adenokarsinom, müsinöz Invazif non-müsinöz adenokarsinom • Lepidik adenokarsinom • Asinar adenokarsinom • Papillar adenokarsinom • Mikropapillar adenokarsinom • Solid adenokarsinom İnvazif müsinöz adenokarsinom • Miks invazif müsinöz ve non-müsinöz adenokarsinom Kolloid adenokarsinom Fetal adenokarsinom Adenokarsinoma, enterik-tip Adenokarsinom, NOS	Diğer epitelial tümörler NUT karsinom Torasik SMARCA4-eksik farklılaşmamış tümör
Skumöz öncül lezyonlar Skumöz hücreli karsinom <i>in situ</i> Hafif skumöz hücreli displazi İlmli skumöz hücreli displazi Ağır skumöz hücreli displazi	Tükrüz bezi tipi tümörler Adenoid kistik karsinom Epitelial-miyoeptelial karsinom Mukoepidermoid karsinom Hyalinize şeffaf hücreli karsinom Miyoeptelial karsinom
Skumöz hücreli karsinomlar Skumöz hücreli karsinom, NOS • Skumöz hücreli karsinom, keratinize • Skumöz hücreli karsinom, non-keratinize • Bazaloid skumöz hücreli karsinom Lenfoepitelial karsinom	Akciğer nöroendokrin neoplazmi Öncül lezyon Yaygın idyopatik nöroendokrin hücre hiperplazisi
Büyük hücreli karsinomlar Büyük hücreli karsinom	Nöroendokrin tümörler Karsinoid tümör, NOS/nöroendokrin tümör, NOS • Tipik karsinoid/nöroendokrin tümör, derece 1 • Atipik karsinoid/nöroendokrin tümör, derece 2
Adenoskumöz karsinomlar Adenoskumöz karsinom	Nöroendokrin karsinomlar Küçük hücreli karsinom Kombine küçük hücreli karsinom Büyük hücreli nöroendokrin karsinom Kombine büyük hücreli nöroendokrin karsinom

NOS: Diğer şekilde belirtilmemiş, NUT: Testisteki Nükleer protein, SMARCA-4: SWI/SNF ile ilgili, matrisle ilişkili, aktin bağımlı kromatin düzenleyicisi, alt aile a, üye 4, BRG1.

2.1.4. Akciğer Kanserinin Evrelemesinde Kullanılan Teknikler

Akciğer kanserinin özellikle mediastinal evrelemesinde üç grup yöntem kullanılmaktadır: görüntüleme teknikleri, endoskopik teknikler ve cerrahi teknikler. Görüntüleme teknikleri içerisinde toraks bilgisayarlı tomografi (Toraks BT) ve pozitron emisyon tomografisi-bilgisayarlı tomografi (PET-BT) gibi radyolojik görüntüleme yöntemleri bulunurken, endoskopik yöntemler arasında endoskopik ultrasonografi (EUS) ile transbronşiyal iğne aspirasyonu (TBİA) ve endobronşiyal ultrasonografi (EBUS) ile TBİA yer almaktadır. Cerrahi teknikler, servikal mediastinoskopi veya video ile yapılan mediastinoskopi, duyarlılığı daha yüksek olan video-yardımlı mediastinoskopik lenfadenektomi (VAMLA) ve transservikal ilerletilmiş mediastinal lenfadenektominin (TEMLA) yanı sıra video yardımlı torakoskopik cerrahi (VYTC), mediastinostomi ve ilerletilmiş mediastinoskopi olarak sayılabilir. Cerrahi müdahaleden fayda görecekt hastaların operasyon öncesi evrelemesi için yukarıda sayılan yöntemler esas alınarak Avrupa Göğüs Cerrahisi Derneği tarafından bir algoritma oluşturulmuştur³.

2.1.5. Akciğer Kanserinde Tedavi

Akciğer kanserinde tedavinin şekli daha önceden belirtildiği üzere sınıflandırma ve evreleme neticesine göre belli olur. Genel olarak bakıldığında KHDAK tedavisinde cerrahi, radyoterapi ve sistemik kemoterapi yöntemleri tek başına ya da kombine olarak kullanılabilirken KHAK için kemoterapi ve radyoterapi esastır⁵.

Kemoterapi ve radyoterapilere ek olarak geliştirilen immünoterapötik ajanların hem immünojenik hem de non-immünojenik malinitelerde son on yılda klinik kullanımları artmıştır. Bu tedavilerle özellikle sitotoksik T hücrelerinin aktivasyonunu artırmak ve tümörün immün kontrol noktasını aktif hale getirmesini engellemek amaçlanmıştır⁶.

2.1.6. Akciğer Kanserinde İmmün Yanıt Genel Bakış

Diğer kanser türlerinde olduğu gibi akciğer kanserlerine karşı immün yanıtta, tümörün ortadan kaldırılmaya çalışıldığı hastalığın ilk (eliminasyon) evresinde sitotoksik etkisi olduğu bilinen CD8⁺ T hücreler tarafından oluşturulan edinsel hücre yanıtları başı çekmektedir. Bununla birlikte NK hücreleri ve tümörle ilişkili makrofajlar (TAM) tarafından oluşturulan doğal yanıtlar da kanser savunmasında etkilidir. Ayrıca edinsel ve doğal immün sistem arasında bağlantı sağlar nitelikte olan doğal benzeri T hücrelerden

invaryant doğal katil-T (iNKT) hücreler, gama-delta ($\gamma\delta$) T hücreler, MR1 [Genel doku uyumluluğu kompleksi (MHC) ilişkili molekül 1]-kısıtlı T hücreler ve MAİT hücrelerin tümör baskılayıcı özelliğini sorgulayan çalışmalar son on yılda artış göstermektedir. Ne var ki kanserin ilerlemesiyle tümöral mikroçevre içerisinde meydana gelen değişiklikler (hipoksi, kronik enflamasyon gibi) sonucu salgılanan çeşitli sitokinlerle anti-tümöral immün yanıtın hücresel bileşenleri (miyeloid ve dendritik hücreler, lenfositler) immünotolerans/immünoregülatör özellik kazanmakta ve immün yanıtın bu yöne evrilmesini sağlamaktadır⁶.

2.2. Doğal Benzeri T hücreler ve Bağışıklığımızdaki Roller

İmmün sistem doğal ve edinsel olmak üzere iki gruptan oluşur. Doğal immün sistemde fagositik hücreler önemli yer almakta, edinsel immün sistem elamanlarını ise lenfositler oluşturmaktadır. Bunlardan fagositik hücreler eşey hattında (*germline*) kodlanan, değişmez reseptörlere sahip olmaları, hızlı yanıt üretmeleri ve antijen sunmalarıyla bilinirken lenfositler rekombinasyonel yeniden düzenlenme ile sahip oldukları ve son derece çeşitlilik oluşturan reseptörleriyle bilinirler. Son çalışmalar ise immün yanıtın bahsi geçen güçlü esas elemanlarından başka her iki grup arasında, özellikle non-lenfoid dokularda önemli görevleri olan birtakım hücre grupları olduğunu göstermiştir^{14, 15}. Doğal benzeri (*innate like*) T hücreleri olarak adlandırılan bu gruba, hem doğal immün sistemde görevli lenfoid kökenli hücelere hem de edinsel immünitede görev alan T lenfositlere benzedikleri için bu isim verilmiştir. iNKT, MR1-kısıtlı (*restricted*) T, MAİT ve $\gamma\delta$ T hücrelerini içine alan bu gruptaki hücreler, sahip oldukları reseptörlerle, klasik T hücrelerden farklı olarak klasik olmayan MHC molekülleri aracılığıyla sunulan ve peptit olmayan antijenleri tanıyabilmektedir¹⁴.

2.2.1. iNKT Hücreleri

iNKT hücreleri, sahip oldukları değişmez T hücre reseptörü (THR) insanda V α 24-J α 18, farede V α 14-J α 18 ile eşleşmiş sınırlı çeşitliliğe sahip bir β zincirinden oluşur) ile polimorfik olmayan MHC-I benzeri moleküllerden CD1d ile sunulan lipidleri tanıyan doğal-benzeri T hücre alt grubudur ve çok sayıda sitokin üreterek farklı tipteki immün yanıtları etkilerler^{16, 17}. Yüksek oranda benzerlik gösteren reseptör özgüllüğüne rağmen iNKT hücreleri, timüste Th1 (yardımcı T hücre 1), Th2, Th17 hücreleri ile benzer nitelikte sitokin profiline sahip olan (analog) alt gruplara farklılaşırlar. Bir grup periferik

aktivasyon gerektiren iNKT hücresi de regülatör T hücreleri gibi (Treg) özellikle interlökin (IL)-10 üretmeleri ile dikkati çekmiştir. iNKT hücreleri dolaşımda olmayan, dokuda yerleşik lenfositler olarak bilinse de dokular arasında farklı alt grupların varlığı gösterilmiştir¹⁷. İnsan periferik iNKT hücrelerinin $\alpha\beta$ T (CD3⁺) hücrelerindeki yüzdesi 0,01-1 arasında değişmektedir¹⁸.

2.2.2. $\gamma\delta$ T Hücreleri

$\gamma\delta$ T hücreleri, klasik T hücreleri gibi reseptör zincirlerinde çeşitliliği sağlamak için değişken-çeşitlilik-katılma (*variable-diversity-joining*, V-D-J) rekombinasyon mekanizmalarını kullanmasına rağmen, alfa-beta yerine gama-delta zincir formlarına sahip olmasıyla bilinmektedir¹⁹. Çalışmalar bu hücrelerin periferik kanda T lenfositlerin %5'ini oluşturan küçük bir grup olmasına karşın deri, bağırsak, akciğer ve üreme sistemindeki epitelyal bariyerlerde sayıca fazla bulunduklarını hatta kolon intraepitelyal lenfositlerin %20 kadarını oluşturdıklarını göstermektedir²⁰.

$\gamma\delta$ T hücrelerinin en önemli özelliklerinden biri gerek klasik MHC gerekse klasik olmayan MHC ile sunulan yapıları tanıyabilir olmalarıdır. Ayrıca MHC molekülleri olmadan da tıpkı B hücre reseptörleri gibi fikoeritrin ve haptenler gibi yapıları bağlayabilirler. Bu şekilde geniş yelpazedeki tanıma kapasiteleri onlara, mikrobiyal metabolitler, transforme hücreler, post-translasyonel değişiklikler (modifikasyon), peptitler ve konak ya da yabancı kaynaklı proteinler gibi farklı kaynaklardan gelen antijenik yapılara karşı tepkili olma yetisi kazandırmıştır¹⁹.

2.2.3. MHC ilişkili Molekül 1 (MR1)

MR1, klasik olmayan MHC-1 (MHC Ib) proteinleri ailesinin bir üyesidir. Bu ailedeki moleküller ya sınırlı seviyede polimorfizm gösterir ya da hiç polimorfizm göstermezler, ifadeleri de çoğunlukla doku sınırlıdır²¹. MR1 hem hidrofobik hem de yüklü bir çevre oluşturan büyükçe aromatik rezidüleriyle örtülmüştür. Bu sebeple MR1 molekülü tek ve çift halkalı küçük moleküllere bağlanabilme özelliğine sahiptir²². MR1 molekülünün, bazı mikroorganizmalarda bulunan riboflavin (B2) ve folik asit (B9) metabolizması ara ürünleri olan eşsiz antijenleri sunduğu bilinmektedir. MR1, memeli evrimi sürecinde güçlü bir şekilde genetik, yapısal ve fonksiyonel olarak korunmuştur²¹.

Çalışmalar insanda, MR1 molekülü ile yapılan sunumu tanıyan, klasik olmayan T hücreleri olduğunu göstermektedir²¹. Bu hücreler öz antijenleri tanıyabilen, kanser hücreleri ile de aktive olabilen ve heterojen hücre reseptör zincirlerine sahip olan “MR1 kısıtlı hücreler” ve özellikle mikrobiyal metabolizma ara ürünleri ile aktive olan ve doku yönelmesi ilk gruptan daha fazla olup hücre reseptörleri “yarı değişmez” kabul edilen MAİT hücreleri olarak sayılabilir²². Biz burada sadece MAİT hücreleriyle ilgili detaylı bilgi sunacağız.

2.2.3.1. MAİT Hücreleri

MAİT hücreleri ilk olarak yaklaşık 30 yıl önce sahip oldukları sıra dışı reseptör yapılarından dolayı dikkat çekmiştir²⁴. Bu hücreler, yarı değişmez THR’lerinin alfa zincirinde insanda V α 7.2 J α 33 (ya da J α 12 veya J α 20), farede V α 19-J α 33 ile ifade edilen bölgeleri ve yine kısıtlı (sınırlandırılmış) bir beta zincirinde insanda V β 2, V β 13 ya da V β 22’yi, farede ise V β 6 veya V β 8’i taşıyabilmektedirler. Bu hücreler MR1 molekülü aracılığıyla sunulan bakteriyel ve fungal B2 metabolizma ürünlerinden 5-(2-oxopropildeneamino)-6-D-ribitilaminourasil (5-OP-RU) gibi bazı molekülleri tanıyarak aktive olmaktadır^{9, 25}.

Klasik T hücrelerinde olduğu gibi MAİT hücrelerinde de antijen bağlanması ile MR1-THR sinyalizasyonu aktivasyon için tek başına yeterli olmamakta ve CD28, toll benzeri reseptör (TLR) agonistleri, bakteriyel ürünler ya da sitokinler gibi eş uyaran moleküller gerekmektedir. Bu sitokinler IL-7, tümör nekroz faktörü alfa (TNF), Tip 1 interferonlar, IL-1 β ve/veya IL-23’tür²⁶. MAİT hücrelerinin daha önce bahsi geçen antijenlere bağımlı aktivasyonlarının yanı sıra sitokin bağımlı aktivasyonları da mümkündür. Aktivasyon neticesinde ise diğer doğal benzeri T hücreler gibi hızlıca sitokin ve sitolitik ürünler üreterek cevap oluşturabilmektedirler. MAİT hücrelerinde MR1 bağımlı ya da bağımsız aktivasyon sonucu TNF- α , interferon gama (IFN- γ), perforin, granzim ve granülozin üretilmekte olup, hücre yüzeyinde lizozomla ilişkili membran protein-1 (LAMP-1, CD107a) ifadesi artmaktadır. Bunun yanı sıra THR sinyalizasyonundan bağımsız olarak IL-12 ve IL-18 gibi pro-enflamatuvar sitokinlerin bu hücreleri aktive etmesiyle bu hücrelerden yine TNF- α , IFN- γ başta olmak üzere IL-17’nin de içinde bulunduğu Th1 ve Th17 tipi güçlü sitokinler ortama salınmaktadır. Aynı

zamanda IL-7, IL-15 ve IL-23'ün de MAİT hücrelerinden sitokin ve sitolitik ürünlerin sentezine katkıda bulunduğu gösterilmiştir (Şekil 2.2)^{7, 27}.

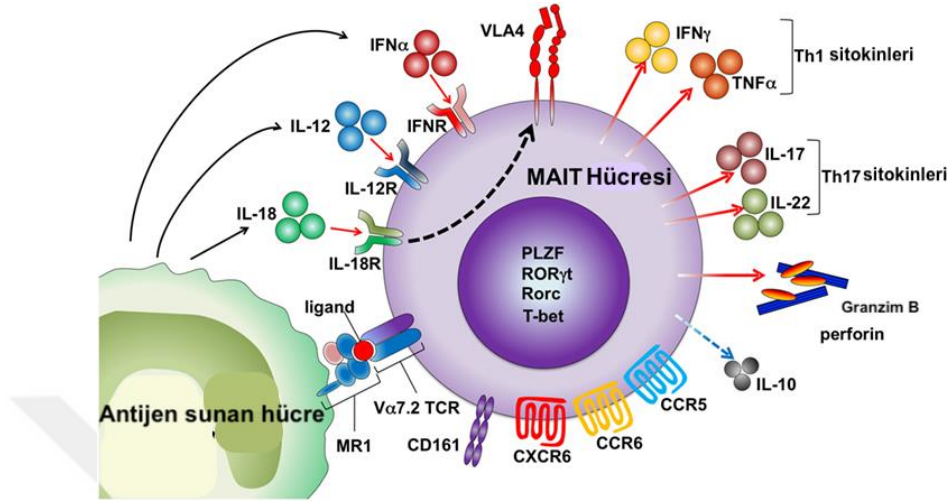
2.2.3.2. MAİT Hücrelerinin Gelişimleri

MAİT hücrelerin gelişimleri ile ilgili fare ve insan sistemindeki çalışmalardan edinilen kanı, diğer T hücreler gibi timüste gelişen bu hücrelerin burada MR1 ifade eden CD4⁺CD8⁺ timositler ile etkileşerek pozitif seçilime uğradığı ve gelişim sürecinin sonunda ise ancak “retinoid orphan receptor-gamma t” (ROR-γt) ve T-kutusu transkripsiyon faktörü (T-bet) ifadesine bağlı olarak işlevsel olabildiği ve timüsten periferik kana veya dokulara yönelebildiği yönündedir²⁸. Yine fare ve insan çalışmalarına göre gelişimlerinin farklı evrelerinde de promiyelositik çinko parmak proteini (PLZF), ROR-γt, T-bet gibi transkripsiyon faktörlerinin yanında IL-18 ifadesi, mikroflora ve mikroRNA gibi etkenler de rol almakta hatta eksiklikleri bu hücrelerin gelişimlerine tamamen engel olabilmektedir^{7, 29, 30}. Gelişimleri ile ilgili bir başka ilgi çekici durum ise iNKT hücre gelişimi için gerekli olan CD1-d molekülünün eksik olduğu farelerde normalden çok daha fazla MAİT hücre gelişiminin söz konusu olmasıdır²⁸.

2.2.3.3. MAİT Hücrelerinin Vücutta Yerleşimleri

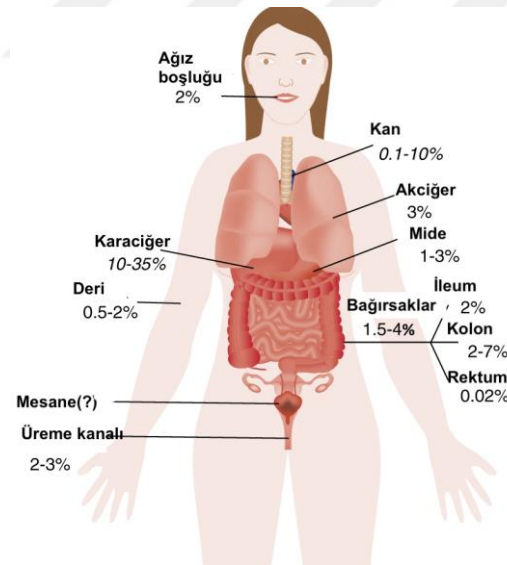
MAİT hücreleri lamina propriyada yerleşik olarak bulundukları için mukozayla ilişkilendirilmiş ancak yapılan çalışmalarla mukozal bölgelerin yanı sıra karaciğerde, lenf nodlarında, epidermiste ve kanda bulundukları; enfeksiyon hastalıklarında, solid kanserlerde, kronik enflamasyonda ve otoimmünitede sayılarının ve aktivitelerinin değiştiği anlaşılmıştır^{28, 30}. Çalışmalar sağlıklı bireylerde periferik kan T hücrelerinin %0,1-10 (mononükleer hücreler içinde yaklaşık %0,5-0,6), karaciğer T hücrelerinin %20-45, akciğer T hücrelerinin ise %2-4'ünün MAİT hücreleri olduğunu göstermektedir (Şekil 2.3)^{18, 31}. Kemokin ve reseptör ifadelerine göre periferik kan MAİT hücrelerinin klasik T hücrelerinden farklı olarak C-C kemokin reseptör tip 7 (CCR7) ve L-selektin (CD62L) ifade etmedikleri bunun yanı sıra kemokin (C-C motif) ligandı 20 (CCL20, CCR6 ligandı) ve CCL25 (CCR9 ligandı) gibi intestinal doku kemokinlerine yanıt olarak bu bölgelere yöneldikleri, aynı zamanda efektör hafıza fenotipinde oldukları saptanmıştır^{30, 32, 33}. Timüs ve kordon kanında bulunan MAİT hücreleri ise naif bir fenotip göstermekte ve oldukça az sayıda bulunmaktadır. Buna rağmen MAİT hücrelerinin timüste öldürücü hücre lektin-benzeri reseptör B alt ailesi üye 1 (KLRB1, CD161), kordon kanında da IL-

IL-18 ifade edebildiği ve *Mycobacterium tuberculosis* ile enfekte hücrelere karşı TNF- α üretebildiği anlaşılmaktadır¹⁸.



Şekil 2-2: Mait hücrelerinin sahip olduğu reseptörler ve transkripsiyon faktörleri¹⁸

VLA4: Çok geç aktivasyon antijeni-4 (*very late antigen-4*), CXCR: C-X-C kemokin reseptör, IFNR: İnterferon reseptörü, TCR: T hücre reseptörü, IL18R: İnterlökin 18 reseptörü



Şekil 2-3 İnsan vücudunda MAİT hücre oranlarının dağılımı “³⁴ten düzenlenerek”

2.2.3.4. MAİT Hücre Yüzey Reseptörleri

IL-18R1 ve Etkileri

IL-18R1 ya da IL-18RA, IL-1 reseptör ailesinden bir gen tarafından kodlanan bir sitokin reseptörüdür. Özgül olarak IL-18'e bağlanarak biyolojik fonksiyonlarını gösterir. IL-18 ise enflamatuvar sitokinlerin özellikle de IFN- γ 'nın güçlü bir uyarıcısı

olup Th1 hücre gelişimini destekler. Başlıca etkinleşmiş makrofajlar ve dendritik hücreler tarafından üretilmektedir. Ayrıca $CD8^+$ T ve NK hücrelerinin sitotoksik aktivitesini -hücre yüzey ölüm reseptörü ligandının (FasL) ifadesini çoğaltma (*upregulation*) yoluyla artırır³⁵. IFN- α ve IL-12'nin NK ve T hücrelerinde bu reseptörün ifadesini uyardığı bilinmektedir³⁶.

$CD8^+$ T hücrelerinde bulunan IL-18R1'in kanser progresyonunda önemli bir rolü olduğu bilinmekte, ancak farklı çalışmalar bu konuda birbirine zıt sonuçlar göstermektedir. Örneğin meme kanserinde IL-18R1'in yüksek oranda ifade edildiğini bildiren bir çalışmanın aksine, diğer bir çalışma bu reseptörün ifade seviyesini üçlü-negatif meme kanseri olan kişilerde hastalıksız sağkalım ile pozitif olarak ilişkilendirmektedir. Başlangıçta karaciğer fibrozisi olan farelerle yapılan bir çalışmada, IL-18R1 delesyonunun tümör büyümesini ve yükünü; yine farelerde kanserojenle uyarılan karaciğer kanseri modelinde ise yalnızca tümör yükünü artırabildiği anlaşılmaktadır³⁷. Flament ve ark. şiddetli akut solunum yolu sendromu-koronavirüs-2 (SARS-CoV-2) ile enfekte hastalarda dolaşımdaki MAİT hücrelerinde artmış aktivasyon ve sitotoksik fenotip ile dolaşımdaki pro-enflamatuvar sitokinler, özellikle de IL-18 arasındaki ilişkiyi göstermiştir³⁸.

CD161 Molekülü ve Etkileri

KLRB1 veya NK reseptör P1A (NKR-P1A) olarak da adlandırılabilen CD161 molekülü kemik iliğinde NK hücrelerinin $CD34^+$ hematopoietik kök hücre öncüllerinden gelişmesi sırasında ilk ortaya çıkan belirteçlerden biri olup ayrıca $CD4^+$ veya $CD8^+ \alpha\beta^+$ T, Treg, $\gamma\delta$ T, ILC ve MAİT hücrelerinde de ifade edilmektedir^{39, 40}. Ancak diğer hücre gruplarında az miktarda ($CD161^+$ veya $CD161^{int}$) eksprese edilebiliyorken MAİT hücrelerinde yüksek ($CD161^{++}$ veya $CD161^{high}$) oranda eksprese edilmektedir³². CD161 ifadesi $CD16^+$ NK hücrelerin sitotoksik fonksiyonu ile doğru orantılıdır ve ligandı olan lektin benzeri transkript 1 (LLT-1)'e bağlanması, NK hücrelerinin hücrel sitotoksitesini ve sitokin salınımını inhibe eder⁴¹. Bunun yanı sıra CD161, bulunduğu hücrelerde yüksek oranda ifade edildiğinde, THR özgülüğünden bağımsız olarak doğal yanıtta rol oynayan sitokinlere yanıt verebilme yeteneği kazandırmakta⁴² ve T hücreleri üzerinde hem kostimülatör hem inhibitör etkileri olduğu bilinmektedir³⁹.

Çoklu İlaç Direnci Proteini 1 (MDR1)

MDR1 ya da P glikoprotein (Pgp) ATP bağımlı olarak hücre ve membrandaki maddeleri dışarı atmak suretiyle hücreyi toksik madde ve metabolitlerden koruyan integral bir membran proteinidir. MDR-1 malin hücrelerin yanı sıra malin olmayan bağırsak veya kan-beyin bariyeri gibi çeşitli bölgelerde de ifade edilir. İnsan hastalıklarını tedavi etmek için geliştirilen çoğu ilaç Pgp'in substratıdır. Bu sebeple MDR1 geninin fonksiyonelliği ve ifadesinin derecesi kemoterapötik ajanların etkinliğini direkt etkiler. Bundan dolayı özellikle kanser tedavilerinde MDR1'in yüksek aktivitesi ve ifadesi kanser hücrelerini çoğu ajanla yapılan tedavilere karşı dirençli kılmaktadır⁴³.

Bu zamana kadar çok az sayıda veri immün infiltrat tarafından ifade edilen MDR1'in ve bu molekülün solid tümörlerdeki immün hücre sağkalımına muhtemel etkisinin değerlendirilmesine imkân vermiştir. İlerlemiş kolorektal kanser dokusunda MDR1 ifadesi yüksek saptanan MAİT hücrelerinin sağlıklı dokulara kıyasla anlamlı derecede fazla olduğu gösterilmiştir^{32, 44}.

2.2.3.5. Sitokinler

TNF ve Etkileri

TNF, kaşeksin veya kaşektin daha önce bilinen adıyla TNF- α ilk defa 1970'lerin sonuna doğru tanımlanmış, immün hücreler tarafından üretilen, bilinen iki reseptörüne bağlanarak biyolojik işlevini yerine getiren bir sitokin ve adipokindir. TNF, hücre sağkalımı, çoğalması, farklılaşması ve ölümü gibi farklı hücresel olaylarda önemli roller alan çok fonksiyonlu bir sitokindir. Enflamasyon uyarıcı sitokin olarak, enflamasyon-ilişkili karsinogeneze de dahil olabilen başta makrofajlar olmak üzere enflamatuvar hücreler tarafından salınır. Hücre metabolizmasındaki sayılan işlevlerinden ötürü kanser patogenezinde karmaşık rolleri olduğu fark edilmiştir. Antikanser etkisi, tedavide kullanılabilir olup, kanser hücre ölümünü uyarmasıyla, tümör gelişimine katkısı ise TNF aracılı sitotoksositeye dirençli çoğu kanser hücresinde çoğalma, sağkalım, göç ve damarlanmayı (anjiyogenez) uyarmasıyla gerçekleşmektedir⁴⁵.

TNF, MAİT hücrelerinde hem THR bağımlı hem de THR bağımsız aktivasyon için uyarıcı olabilen, ayrıca uyarım sonrasında tekrar üretilen bir sitokindir²⁶. Travması olan hastalardan alınan periferik kan örneklerinde MAİT hücre TNF üretiminin fonksiyonel olarak bozulduğu gösterilmiştir⁴⁶.

IFN- γ ve Etkileri

IFN- γ antiproliferatif, pro-apoptotik ve antitümör mekanizmalarla ilişkili olan çok fonksiyonlu bir moleküldür. NK ve nötrofilleri uyarmasının yanında makrofajların birincil aktivatörü olarak hem doğal hem edinsel immünite için kritik önemi olan bir sitokindir. Bu efektör sitokin, yan etkilerine rağmen çok sayıda hastalığın tedavisinde kullanılır ve bağışıklığın ana etkinleştiricisi olarak değerlendirilir. Tümör immün gözetiminde IFN- γ 'nın etkisinin olduğuna dair geniş çapta kanıtlar bulunsa da devam eden IFN- γ temelli terapiler sınırlı derecede başarıya ulaşmıştır. Ayrıca son veriler onun, IFN- γ sinyalizasyon duyarsızlığı, MHC akış aşağı düzenlenmesi (*downstream regulation*) ve indolamin 2,3-deoksijenaz, kontrol noktası inhibitörleri ve programlı hücre ölümü ligandı 1'in (PD-L1) akış yukarı düzenlenmesi (*upstream regulation*) yoluyla protümörjenik rolü olabileceğini belirtmektedir. Buna rağmen IFN- γ aracılı yanıtlar hâlâ çoğu kanserde hasta sağkalımı ile pozitif olarak ilişkili bulunmaktadır. Neticede tümör mikroçevresinde IFN- γ 'nın karmaşık ve hayli düzenlenmiş etkileri ile ortaya çıkardığı immün dokuyu anlamak için çok daha büyük çalışmalara ihtiyaç vardır⁴⁷.

MAİT hücrelerinde uyarım sonrası üretilen pro-enflamatuvar sitokinler arasında IFN- γ da bulunmaktadır. Ayrıca antijen sunan hücre (ASH)'lerden TLR ligandlarına yanıt olarak üretilen IL-18 ile birlikte IL-12 ya da IL-15, MAİT hücrelerini IFN- γ , granzim B ve perforin üretmeye yönlendirmektedir. Bunun yanı sıra tip 1 interferonların da IL-12 veya IL-18 varlığında MAİT hücrelerinden anlamlı seviyede IFN- γ ve granzim B üretimini tetiklediği gösterilmiştir²⁶.

IL-17 ve Etkileri

IL-17 ilk defa 1993 yılında tanımlanmış olan IL-17 ailesinden proenflamatuvar bir sitokin olarak IL-23 ile uyarılmış tip 17 yardımcı T hücreler (Th17) tarafından üretilmesi ile dikkati çekmiş ve bu hücrelerin Th17 adını almasına sebep olmuştur. Biyolojik olarak aktif IL-17 ancak tip 1 hücre yüzey reseptörü IL-17R'e bağlanabilmektedir. IL-17 ailesi altı tip sitokin (IL-17A-F) içermektedir; ancak çalışmaların çoğunluğu IL-17A üzerinde yoğunlaşmıştır. IL-17A çok çeşitli enfeksiyon hastalıklarında, enflamatuvar ve otoimmün hastalıklarda ayrıca kanserde önemli rol oynamaktadır⁴⁸.

İnsanda MAİT hücrelerinin IFN- γ ve IL-17 ürettiği bilinmekle birlikte; mukozal bölgelerdeki MAİT hücrelerinin dolaşımdaki MAİT'lere göre çok daha fazla IL-17 üretme potansiyeline sahip olduğu çalışmalarda vardır⁴⁹.

2.2.3.6. MAİT Hücrelerinin Tanımlanması

MAİT hücrelerinin tanımlanmasında ilk önceleri MR1-5-OP-RU tetramerleri kullanılmış, daha sonra ise akan hücre ölçer yöntemi ile özgül antikor kombinasyonunun (TCR $\gamma\delta$ -CD3⁺V α 7.2⁺CD161⁺⁺) kullanılmasının kabul görüp yaygınlaşması sayesinde çalışmalar oldukça artmıştır^{32, 33}. Bazı çalışmalarda ise hala tetramer kullanımı daha özgül bir tanımlama için kullanılmaya devam etmektedir²³. Bunun yanı sıra doku kesitlerinden uygun immünfloresan antikor kombinasyonları ile konfokal mikroskopunda hücreler tanımlanabilmekte⁵⁰, ayrıca MAİT hücre profillerini belirlemek için gerçek zamanlı-PZR (*real time-PCR*) ile mRNA transkripsiyonu⁵⁰ ya da tek-hücre RNA dizileme (*single-cell RNA sequencing*) yöntemi ile transkriptom analizi yapmak mümkündür⁵¹.

2.3. MAİT Hücreleri ve Kanser Patogenezinde Roller

Enfeksiyon hastalıklarındaki anlamlı rolleriyle birlikte çeşitli sitokinler yoluyla da aktive edilebiliyor olmaları, gelişimleri için mikrobiyota varlığı gereksinimleri ayrıca mikrobiyota dengesizliği ve bozulan integrite sonucunda mukozal bölgelerde farklı davranışları, MAİT hücrelerine olan ilgiyi artırmış ve çok farklı hastalık patogenezinde MAİT hücreleri sorgulanan grup hâline gelmiştir. Tümör immün gözetiminde sitotoksik hücreler önemli rol oynadığı için, hem CD161 hem de çoğunlukla CD8 ifade eden ve görece yeni tanımlanan bu hücre grubu özellikle son on yılda araştırmacıların ilgi odağı olmuştur. Farklı tip kanserlere sahip hastalardan alınan örneklerle yapılan farklı çalışmalara göre MAİT hücre yüzdesi kanser hastalarının periferik kanında sağlıklı insanlarınkine nazaran hastalığın evresine bakılmaksızın yüzdece azalmaktadır^{32, 33, 50}. Ling ve ark. kolon kanserli hasta örneklerinde MAİT hücrelerinin, sağlıklı dokuya nazaran tümör dokusunda daha yüksek olduğunu hem akan hücre ölçer yöntemiyle hem de immünohistokimyasal yöntemlerle göstermişlerdir. Tümör dokusundaki bu durum MAİT hücrelerinin tümöre infiltrasyonu olarak değerlendirilmektedir. Üstelik hasta grubundaki tümöral dokuda artış gösteren bu MAİT hücre yüzdesinin serum karsinoembriyonik antijen (CEA) seviyeleri ile doğru orantılı olduğu anlaşılmıştır. Bu tablonun aksine karaciğer metastazı olan kolorektal kanserli (KLK) hasta karaciğer örneklerinde, tümöre infiltre olan MAİT hücre yüzdesi tümöre komşu sağlıklı karaciğer dokusuna göre anlamlı derecede düşük saptanmıştır⁹.

Ling³² ve arkadaşlarının MAİT hücre konsantrasyonu ile kanser patogenezinin evrelendirilmesi arasında ilişkinin varlığını sorguladıkları çalışmada, erken ve geç evre

olarak gruplandırılan KKK hastalarda dolaşımdaki MAİT hücre yüzdelерinin erken evreye göre geç evrede anlamlı derecede düştüğü, yine tümöre komşu olan sağlıklı dokudaki MAİT hücre yüzdelерinin erken veya geç evre olduğuna bakılmaksızın tümöre infiltrе olan MAİT hücre yüzdesine göre anlamlı derecede azaldığı saptanmıştır. Aynı çalışmada yalnızca ileri evredeki hastaların serum CEA seviyeleri ile tümöre infiltrе olan MAİT hücre yüzdelерinin birbirleri ile doğru orantılı olarak artış göstermesi dikkati çeken bir başka bulgu olarak kaydedilmiştir. Buna ilaveten ameliyat sonrası kemoterapi alan hastalarda kemoterapi kürüne paralel olarak dolaşımdaki MAİT hücre yüzdesindeki kademeli artış, kanser patogenezi sürecinde kandaki MAİT hücre azalması ve buna karşılık tümör dokusundaki MAİT hücre artışı hesaba katılırsa, KKK hastalarında hastalığın seyri açısından bu hücre grubunun bir biyobelirteç olarak kullanılabileceği fikrini doğurmuştur³².

MAİT hücrelerinin tümör hücreleri üzerindeki etkisinin değеrlendirmesi ile ilgili Won ve ark.⁵⁰ forbol 12-miristat 13-asetat (PMA) ve iyonomisin (IM) uyarımına bağılı olarak aktive olan MAİT hücrelerinin kültür ortamından alınan üst sıvısının başka bir kültür ortamında, NK hedef hücresi olan K562 hücrelerine karşı periferik kan mononükleer hücrelerin sitotoksik aktivitesini artırdığını; ama uyarılmamış olan MAİT hücrelerinin kültür ortamından alınan üst sıvısının bu farkı oluşturmadığını bildirmiştir. Won ve ark. bu farklılığın MAİT hücre kaynaklı IFN- γ salınımına bağılı olarak NK hücrelerinin aktivasyonundan kaynaklanabileceği sonucuna ulaşmıştır⁵⁰. Ling ve ark. sağlıklı donörlerin kan örneklerinden izole edilen MAİT hücrelerini, insan kolon kanseri hücre hattı (HCT116) hücreleriyle birlikte kültüre aldıkları çalışmalarında, aktive MAİT hücrelerinin temasa bağımlı olarak HCT116 hücrelerini büyüme 2/mitotik (G2/M) fazında hücre döngüsü tutulumuna soktuğunu bunu da MR1 bağımlı olarak gerçekleşen sunum neticesinde yaptığını tespit etmişlerdir. Bu sonuçla MAİT hücrelerinin henüz bilinmeyen endojen ligandlar tarafından aktive edilebilme olasılığı akıllara gelmiştir³². Multipl miyelom (MM) hücre hatları ile yapılan bir başka çalışmada ise MM hücre hatlarının B9 türevleri ile uyarıldıklarında yüksek seviyede MR1 ifade edebildikleri tespit edilmiştir. Aynı çalışmanın devamında MR1 ifadesi yükselen bu hücrelerin MAİT hücrelerine antijen sunarak onları aktive edip edemeyeceği araştırılmış ve sağlıklı insanların kanından saflaştırılan MAİT ve MAİT olmayan CD8⁺ T hücreleri ayrı ayrı 2 farklı MM hücre hattıyla (RPMI- 8226 ve U266) birlikte en iyi bilinen MR1 ligandı olan 5-OP-RU varlığında kültüre alınmıştır. Sonuç olarak, MAİT hücrelerinin MM hücre

hatlarını apoptoza gönderdiği aksine MAİT olmayan CD8⁺ T hücrelerin bunu yapamadığı tespit edilmiştir³⁰.

Bütün bu çalışmalardan elde edilen veriler insanda MAİT hücrelerinin kanser patogenezindeki rollerinin hâlâ net olarak anlaşılmadığını göstermektedir. Özellikle akciğer kanseri gibi dünya genelinde mortalitesi yüksek olan bir tabloda bu hücrelerin varsa aldığı koruyucu rolün açıklık kazanması oldukça önemlidir. Bu tez çalışmasında akciğer kanserli hastaların özellikle periferik kan örneklerinde MAİT hücre oranlarının sağlıklı kontrollere ve kendi tümör dokularına göre farklılıkları, ayrıca sağlıklı periferik kan örneklerinde MAİT hücre içi sitokin seviyeleri incelenmiştir.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

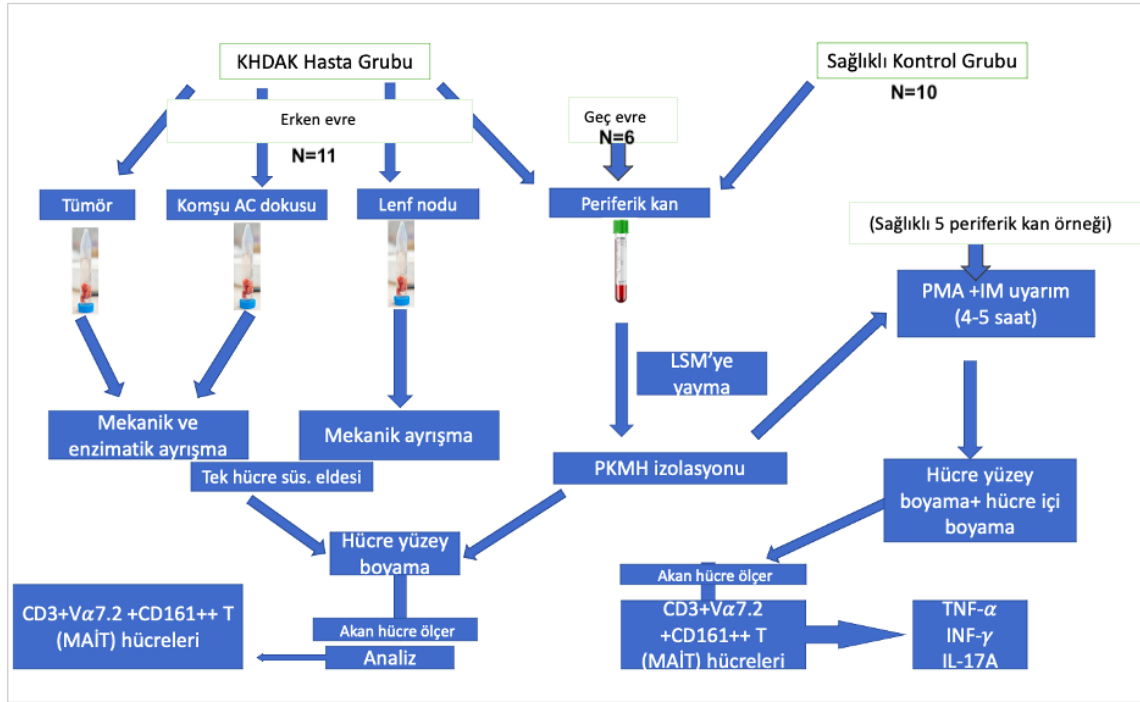
3.1. Çalışma Grubu ve Tasarımı

Çalışmamız Temmuz 2021- Temmuz 2022 tarihleri arasında İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa / Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Göğüs Cerrahisi Servisi'nde yatan KHKAK tanısı almış, akut veya kronik enfeksiyon hastalığı taşımayan (HIV, HCV, HBV negatif) hastalardan ve yine herhangi bir enfeksiyon hastalığı ya da metabolik bir hastalığı da bulunmayan yaş olarak eşleşmiş sağlıklı gönüllülerden alınan örneklerle yapıldı. Opere edilebilen hastalardan elde edilen tümör, tümöre bitişik akciğer dokusu, lenf nodu ve periferik kan örneği ya da opere edilemeyecek ileri evre hastalardan ve sağlıklı kontrollerden ise periferik kan örneği alındı. Bu süreçte erken evre için (evre IA-IIIB) 13 hastadan, ileri evre [III A (lokal ileri evre)-IVB] için 6 hastadan, kontrol grubu için 10 sağlıklı gönüllüden alınan örnekler çalışılırken, 2 hastanın daha sonra primer olarak akciğer kanseri olmadığı anlaşıldığından örnekleri çalışmadan çıkarıldı.

Hasta gruplarının sınıflandırılması ve evrelendirilmesi İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa/Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Göğüs Cerrahisi Anabilim Dalı ve Patoloji Laboratuvarının teşhis ve tanımlamasıyla 2015 DSÖ Akciğer kanseri sınıflandırma ve 8. TNM evrelendirme sistemine göre yapıldı.

Hastalardan ve sağlıklı gönüllülerden alınan numuneler İstanbul Medipol Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu ve 11/01/2019 tarih ve 03 karar no, 10840098-604.01.01-E.1672 sayılı izin ile, ayrıca bilgilendirilmiş onay formu doldurularak temin edildi.

Çalışmamızda hasta grubu ve sağlıklı gönüllülerden alınan numuneler tek hücre süspansiyonları hâline getirilerek, MAİT hücreleri akan hücre ölçer cihazı ile saptandı. Ayrıca MAİT hücrelerinin hücre kültürü ortamında uyarılmasıyla ürettiği sitokinlerin saptanması için yine sağlıklı gönüllülerden alınan periferik kan örnekleri kullanıldı. Çalışma sürecinde yapılan deneyler aşağıda özetlenmiştir (Şekil 3.1).



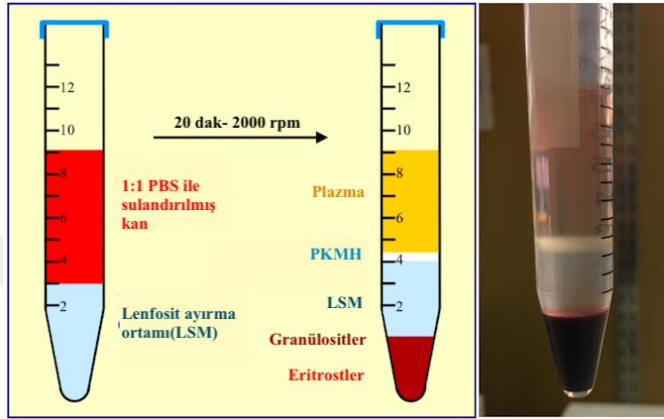
Şekil 3-1 Çalışma sürecinde izlenen yol

AC: Akciğer, IM: İyonomisin, LSM: Lenfosit ayırma ortamı (fikol), PMA: Forbol 12-miristat 13-asetat, PKMH: Periferik kan mononükleer hücreleri.

3.2. Periferik Kandan Mononükleer Hücre Eldesi

Sağlıklı gönüllülere ve hasta grubuna ait heparinli periferik kan örnekleri (8-10 ml) gradyan-santrifü tekniği ile mononükleer hücrelere ayrıştırıldı. Bunun için kanlar oda sıcaklığında laboratuvara getirildikten sonra 1/1 oranda fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) (Sigma-Aldrich/Missouri, ABD) ile dilüe edilerek kan ile aynı hacimde fikol içeren lenfosit ayırma ortamı [LSM-A, Lymphocyte Separation Medium, (1,077 gr/ml) Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Almanya] üzerine iki ayrı faz oluşturacak biçimde yayıldı (Şekil 3.1). Tüpler 2000 dönüş/dakika (rpm) ile 20 dakika oda sıcaklığında (0 hızlanma, 0 yavaşlama ayarında) çevrildikten sonra, oluşan ara fazdaki bulutsu tabakadan dikkatlice 15ml'lik santrifüj tüplerine toplanan mononükleer hücreler, PBS ile yıkanmak üzere 1750 rpm'de 10 dakika tekrar çevrildi. Üst sıvı uzaklaştırıldıktan sonra pellette kalan hücreler yine 1750 rpm'de 5 dakika çevrilerek yıkama yapıldı. Ardından pellette kalan hücreler üzerine 5 ml alyuvarları patlatmak için FACS Lysing solüsyonu (BD Biosciences, San Jose, ABD) eklenerek karanlık ortamda, oda sıcaklığında 5 dakika bekletildi. Son kez hücreler 1750 rpm'de 5 dakika yıkandı, pellette kalan hücreler %10 (Fetal sığır serumu)

FBS (Gibco/Paisley, İngiltere), %2 Penisilin-Streptomisin (Gibco/Paisley, İngiltere) içeren RPMI (Capricorn Scientific, Almanya) içinde süspanse edildi. Daha sonra 20µl kadar süspansiyondan alındı, otomatik kan sayım cihazında (Rayto RT-7600, Çin) ve/veya ışık mikroskobu altında canlılık tayini için tripan mavisi ile 1/1 oranda karıştırılarak Thoma lamı ile sayım yapıldı.



Şekil 3-2 Fikol içeren lenfosit ayırma ortamı (LSM) kullanarak periferik kan mononükleer hücre (PKMH) ayrıştırılması

3.3. Solid Dokuların Ayrıştırılması

Akciğer kanser dokusu ile tümör bulunduran bölgeye yakın normal akciğer doku örnekleri tümörlerin cerrahi rezeksiyonu sonrasında piyesten, piyesin bütünlüğü ve patolojik değerlendirmeyi bozmayacak şekilde alındı. Rutin patolojik incelemeye gönderilen dokular haricinde kalan ameliyat sırasında rezekte edilmiş doku örnekleri hemen steril bir şekilde %10 FBS, %2 Penisilin-Streptomisin içeren RPMI'lı kültür ortamına alınarak +4°C'de 2 saat içerisinde laboratuvara ulaştırıldı. Güvenlik kabininde numunelerin önce hassas terazi ile ölçümü yapıldı, takiben doku örnekleri eş zamanlı olarak mekanik ve enzimatik yöntemlerle aşağıda anlatıldığı şekilde ayrıştırıldı.

Doku ayrıştırıcı GentleMACS dissociator (Miltenyi, Biotec, Almanya) cihazında örnekleri ayrıştırmak için dokuların büyüklüğüne ve ağırlığına göre kit (Tumor Dissociation Kit, Human, Miltenyi, Almanya) içeriğinde belirtildiği oranlarda enzim karışımları (kit içeriğinde A, R, H olarak etiketlenen karışımlar) hazırlandı. Ardından önce steril PBS ile yıkanan tümör ve akciğer doku örnekleri yine steril petri içersine alındı. On veya yirmi bir numaralı bistüri uçları (bistüri saplarına takılarak) kullanılarak

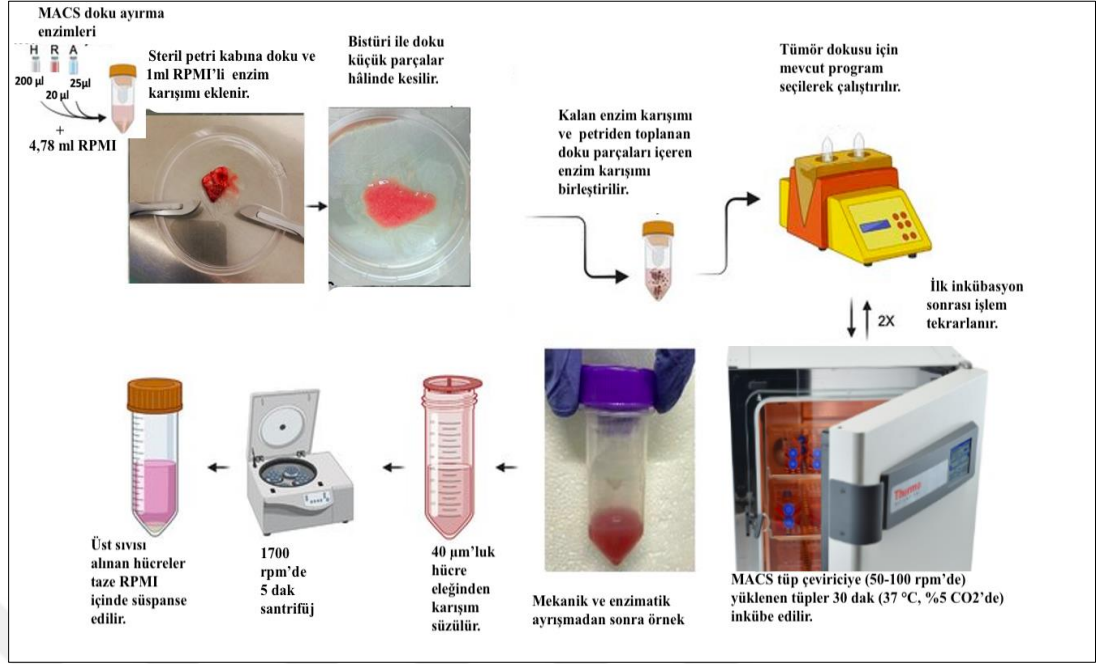
öncesinde enzim karışımıyla yumuşatılan dokular 2-4 mm boyutlara sahip parçalar hâlinde kesildi. Kesilen dokunun parçaları 1000 µl'lik mikropipet uçlarının uç kısımlarından yaklaşık 1 cm kesilip genişletilmesiyle elde edilen uçlarla toplandı ve gentleMACS dissociator cihazına yerleştirilebilen uygun tüpler içerisine alınarak (gentleMACS C tubes, Miltenyi, Almanya) ayrıştırma işleminin ikinci adımı gerçekleştirildi. Bu aşamada tüpler cihaza yerleştirildi ve (h_tumor_01) programı seçilerek cihaz çalıştırıldı (Şekil 3-2). Bu adımın arkasından C tüpler rotatör (MACSmix tube rotator, Miltenyi, Almanya) üzerine sabitlenerek hücre kültürü koşullarında enzimatik ayrıştırma için 30 dakika inkübe edildi. Sonrasında bir önceki basamaktaki cihazın mekanik ayrıştırma işlemi (h_tumor_02) programı ile tekrarlanarak 30 dakikalık inkübasyon yinelendi. Bu işlem sonrası son kez cihazla doku ayrıştırma işlemi yapıldı (h_tumor_02). Nihai olarak kalan doku parçaları steril bir şırınganın (5ml) piston tutma ucu tarafı ile nazikçe ezilerek steril, 40 µm por çapı olan eleklerden (Cell strainer, Nest, Çin) geçirilerek tek hücre süspansiyonları elde edildi (Şekil 3.3).

Lenf nodu örnekleri de steril petri içerisinde bistüri ile diğer dokular gibi kesildikten sonra şırınganın piston tutma ucu tarafı ile nazikçe ezilerek 40 µm por çapı olan hücre eleklerinden geçirildi ve hücre süspansiyonları elde edildi.



Şekil 3-3 Tüplerin tümör ayrıştırma cihazı ve tüp rotatörüne yerleştirilmesi

Elde edilen hücre süspansiyonlarındaki eritrositleri uzaklaştırmak için kan örneğinde olduğu gibi RBC lizis tampon uygulaması sonrası elde edilen hücreler sayıldı, hücre kültüründe veya doğrudan akan hücre ölçer deneylerinde kullanıldı.



Şekil 3-4 Tümör ve akciğer dokusundan tek hücre süspansiyonu eldesi “⁵²”den değiştirilerek”

3.3.1. Mononükleer Hücrelerin Uyarımı

Sağlıklılara ait periferik kan ve hastalara ait tümör, akciğer dokusu ve PKMH örnekleri ile hazırlanan tek hücre süspansiyonları [RPMI 1640 (%10 FBS, %2 Penisilin-Streptomisin) besiyeri içerisinde, 1×10^6 hücre/ml olarak hazırlandı] 2'şer ml besiyeri içerisinde her tüpe 2×10^6 hücre içerecek şekilde akan hücre ölçer tüplerine alındı. Uyarılmak istenen hücrelerin bulunduğu tüplere son konsantrasyon sırasıyla 20 ng/ml ve 1 µg/ml olacak şekilde PMA (Abcam, Massachusetts, ABD) ve IM (Abcam, Massachusetts, ABD) eklendi ve 5 saatlik inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun son bir saatinde ise son konsantrasyon 10 µg/ml olacak şekilde Brefeldin-A (Biolegend, Kaliforniya, ABD) ilave edildi (37°C, %5 CO₂). Uyarımsız kontrol tüplerine de aynı sayıda hücre ve aynı besiyeri içerisinde PMA ve IM olmaksızın son 1 saat yine aynı konsantrasyonda Brefeldin-A ilave edilerek inkübe edildi.

Çalışmanın başlangıcında sağlıklılara ait periferik kan ve hastalara ait tümör, akciğer dokusu ve PKMH örneklerinin hepsi için uyarım (stimülasyon) deneyleri yapıyordu. Daha sonra hasta örneklerinden elde edilen MAİT hücre sayısının bu deneyler için yeterli olmadığı anlaşıldı ve uyarım deneylerine sadece sınırlı sayıda sağlıklı kanı ile devam edildi.

3.3.2. Akan Hücre Ölçer Deneyleri

3.3.2.1. Hücre Yüzey Molekül Ekspresyonu

Doku ayırıştırma işlemi ya da uyarım sonrası elde edilen tek hücre süspansiyonlarının 1750 rpm’de 5 dak PBS ile yıkanmasını takiben, hücreler üzerine yüzey boyama için aşağıda belirtilen özelliklerde ve oranlarda 100 µl PBS içinde hazırlanan antikor karışımları eklendi (Tablo 3.2).

Tablo 3-1 Yüzey boyamada kullanılan antikorlar ve özellikleri

Antikor	Floresan	Klon	Marka	Son Konsantrasyon
anti-human CD3	APC	UCHT1	Biolegend*	1/50
anti-human CD3	APC	OKT3	BD**	1/50
anti-human TCR Vα7.2	Brilliant Violet 785	3C10	Biolegend	1/40
anti-human CD8a	PE	RPA-T8	Biolegend	1/50
anti-human CD45RO	FITC	UCHL1	Biolegend	1/50
anti-human CD161	Brilliant Violet 421	HP-3G10	Biolegend	1/50
anti-human TCR γ/δ	PerCP/Cyanine5.5	B1	Biolegend	1/30
mouse IgG1, κ Isotype	Brilliant Violet 785	MOPC-21	Biolegend	1/40

*Biolegend, Kaliforniya, ABD; ** BD Biosciences, San Jose, Kaliforniya, ABD

20 dakika oda sıcaklığında karanlık ortamda uygun konsantrasyonlarda inkübe edilen hücreler (1×10^6 /ml) işlem sonrasında yine 1750 rpm’de 5 dak PBS ile yıkanarak bağlanmayan antikorlar uzaklaştırıldı. Bu aşamadan sonra hücre içi boyanmayacak olan hücreler 300µl PBS eklenerek akan hücre ölçer cihazından geçirildi. Akan hücre ölçer deneylerinin tamamı için Novocyte flow cytometer 3500 (ACEA, Agilent Technologies, CA, ABD) cihazı kullanıldı.

3.3.2.2. Hücre İçi Boyama

Hücre içi sitokin seviyelerini tespit etmek için Cytofix/Cytoperm™ Fixation/Permeabilization Solution Kit (BD Biosciences, San Jose, CA, ABD) üretici firmanın protokolüne uygun olarak kullanıldı. Bu protokole göre hücreler önce vortekslendi, daha sonra kit içeriğindeki fiksasyon/permeabilizasyon solüsyonundan (1X) hücrelerin üzerine 250 µl fiksasyon solüsyonu eklenerek 20 dakika +4°C’de inkübasyon gerçekleştirildi. Ardından perm/wash tamponundan (1X) her tüpe 1 ml ilave edilerek 1750 rpm devirde yapılan santrifüj sonrası üst sıvılar uzaklaştırıldı. Bu

işlem iki kez uygulandıktan sonra tespit edilmek istenen hücre içi antikorların (Tablo 3.3) daha önceden uygun miktarlarıyla 50 µL perm/wash tampon içinde hazırlanmış süspansiyonları içine hücreler alınarak +4°C’de, karanlık ortamda 30 dakika inkübe edildi. İşlem sonrası yine kit içeriğindeki perm/wash tamponundan (1X) her tüpe 1 ml ilave edilerek 1750 rpm’de 2 kez yapılan yıkamanın ardından üst sıvılar uzaklaştırıldı ve pelletin üzerine 300 µl PBS eklendi. En son hücreler 300 µl boyama tamponu içinde süspanse edilerek akan hücre ölçer cihazında değerlendirildi.

Tablo 3-2 Hücre içi boyamada kullanılan antikorlar

Antikor	Floresan	Klon	Marka	Son Konsantrasyon
anti-human TNF-α	Brilliant Violet 510	MAB11	Biolegend	1/30
anti-human IFN-γ	PE/Cy7	B27	Biolegend	1/50
anti-human Perforin	Brilliant Violet 711	dG	Biolegend	1/30
anti-human/mouse Granzyme B	Alexa Fluor® 700	QA16A02	Biolegend	1/50
anti-human IL-17A	APC/Cyanine7	BL168	Biolegend	1/30
anti-human CD3*	APC	UCHT1	Biolegend	1/50

*CD3 molekülü normalde hücre yüzeyinde bulunmasına rağmen uyarımla downregüle olduğu anlaşıldığından tek bir deneyde hücre içi antikorlara ilave edilmiştir.

3.3.3. Akan Hücre Ölçer Analizleri

Çalışmada kullanılacak tüm antikorların uygulanacak konsantrasyon miktarı için kompenzasyon boncukları kullanıldı (CompbBeads compensation particles Set, Anti-Mouse Ig,κ/Negative Control, BD Biosciences, ABD). Her bir florokrom için birer tüp hazırlanarak 200 µl PBS, 2 µl florokrom işaretli antikor ve firmanın belirttiği üzere 1 damla “negatif kontrol” ve pozitif kontrol olarak kabul edilen “anti-Mouse Ig, κ” boncuk içeren kit içeriği ilave edildi. Ayrıca otofloresansı, boyanma hatalarını saptamak için sırasıyla boyanmamış tüpler, mouse IgG1-κ Isotype (Brilliant Violet 785) kontrolleri kullanıldı.

Tüm analizler NovoExpress (version 1.6.0, Agilent, Kaliforniya, ABD) analiz programı kullanılarak yapıldı.

3.4. İstatistiksel Yöntem

Verilerin istatistiksel analizi ve grafiksel çizimleri için GraphPad 8.4.2 ve IBM SPSS Statistics 21 programları kullanıldı. Sağlıklı ve hasta grubun klinik ve demografik özelliklerini değerlendirmek için sırasıyla Ki-kare ve Mann whitney U kullanılmıştır. Sağlıklı ve hasta grubu arasındaki karşılaştırmalar için non-parametrik-Mann-Whitney U testi; sağlıklı, erken evre, ileri evre kan hücre yüzdeleri arasındaki karşılaştırmalar için non parametrik, Kruskal Wallis H testi kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık sınırı ($p<0,05$) kabul edildi. İkili gruplar (sağlıklı-erken evre, sağlıklı-ileri evre, erken evre-ileri evre) arasındaki karşılaştırmalar için post-hoc Mann-Whitney U testi uygulandı ve Bonferroni düzeltmesi yapılarak $p<0,017$ ise anlamlı kabul edildi. Erken evre hasta periferik kan, doku, tümör ve lenf nodu örnekleri arasındaki karşılaştırmalar için Kruskal Wallis H testi kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık sınırı ($p<0,05$) kabul edildi.

Sağlıklı ve hasta periferik kanlarından ayrı ayrı analiz edilen bütün lenfosit gruplarının hücre yüzdelerinin korelasyonu non-parametrik Spearman-rank iki yönlü korelasyon testi ile değerlendirildi ($p<0,05$ değeri anlamlı olarak kabul edildi). Sağlıklı periferik kan örneklerinde yapılan stimülasyon deneyleri sonucu tespit edilen sitokin değişimi için nonparametrik Willcoxon testi kullanıldı ($p<0,05$).

3.5. Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Deneyler süresince kullanılan makine ve techizat tabloda verilmiştir (Tablo 3.3).

Tablo 3-3 Çalışmada kullanılan techizat

Teçhizat	Kullanım Amacı	Marka/Model
Otomatik kan sayım cihazı	PKMH ve diğer tek hücre süspansiyonlarında hücre sayımı	Rayto / RT-7600
Otomatik pipetler (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Mikro hacimli sıvıların aktarımı	Axypet, Pipetmen
Laminar güvenlik kabini	Dokuların ayrıştırılması ve kültür öncesi steril ortam oluşturulması	Nüve LN 120
İnkübatör	Satandart hücre kültürü şartlarının (37°C ve %5 CO_2 , %90-95 nem) oluşturulması	Thermo Scientific
Vorteks	Mikrotüplerin çalkalanması	DigitMex

Santrifüj	Hücrelerin yıkanması ve çöktürülmesi	Nüve NF 800R
Doku ayırıştırma cihazı	Enzimatik ve mekanik ayrışmayı kolaylaştırma	Miltenyi, Gentle Macs
Tüp rotatörü	C tüplerin dairesel hareketle çevrilmesi	Miltenyi, MACSmix tube rotator
NovoCyte	Akan hücre ölçer cihazı	ACEA Biosciences



4. BULGULAR

4.1. Klinik ve Demografik Özellikler

Temmuz 2021 ile Temmuz 2022 tarihleri arasında Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Göğüs Cerrahisi servisinde KHDAK tanısı nedeniyle 19 hastadan alınan örneklerin 2 tanesi çalışmaya dahil etme kriterlerini sağlamadığı için çalışmadan çıkarılmıştır. Geriye kalan 17 hastadan erken evre olan 11'ine ait doku ve kan örneklerinin bazılarında yetersiz sayıda lenfosit elde edilebildiği için -örnek yetersizliği veya deney süreci hatası kabul edilip- yalnızca 9 periferik kan, 5 tümör, 5 akciğer ve 6 lenf nodu örneği, istatistiksel analize dahil edildi. İleri evre 6 hastadan ise sadece periferik kan örneği çalışmaya alındı. Tablo 4.1'de hasta grubunun genel karakteristik özellikleri verilmiştir. Hastaların evrelendirilmesi patoloji ve radyoloji biriminden gelen sonuçlar doğrultusunda Göğüs Cerrahisi Ana Bilim Dalı tarafından değerlendirildi. Hastaların demografik, cerrahi ve patoloji bilgileri hastane veri tabanından sorumlu hekimler tarafından alındığında, hasta grubunun ortalama yaşı 66 olup yaşları 48 ile 76 yaşları arasında değişmektedir. Hastaların %70,6'sı erkek olmakla birlikte sigara kullanımı (paket/yıl) ortalama değeri 44,50 ve aktif içicilik oranı %29,4'tür. Hastaların %47,1'inde kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH) veya koroner arter hastalığı (KAH) izlenirken %47,1'inde ikincil bir metabolik hastalık mevcuttur. Örnekler temin edildiği esnada hastaların çoğunluğu radyoterapi ya da kemoterapi almamıştır; ancak üç hasta (%20) cerrahi rezeksiyon öncesi neoadjuvan kemoterapi almıştır ve cerrahi yöntem ile hastaların %58,8'sine lobektomi yapılmıştır. Akciğer kanseri alt tipi belirlenebilen hastalardan 8'i (%53,33) histolojik olarak adenokarsinom tanısı alırken 7'si (%46,66) skuamöz hücreli karsinom tanısı almıştır.

Kontrol grubu olarak sağlıklı kişilerden (n=10) kan örneği alındı. Sağlıklı kişilerin ortalama yaşı 56 olup yaşları 34 ile 60 arasında değişmektedir. Sağlıklıların %50'si erkek olmakla birlikte sigara kullanımı (paket/yıl) ortalama değeri 4,50'dir ve aktif içicilik oranı %30'dur. Sağlıklı kişilerde KOAH, KAH veya metabolik hastalık mevcut değildir.

Tablo 4-1 Hasta bilgileri

Hasta	Cinsiyet	Yaş	Sigara (Pkt/Yıl)	KOAH/KAH	Metabolik Hastalık	Tedavi	Lobektomi	Histopatoloji	TNM	Evre
1	E	66	100	E	H	H	E	SHK	T1CN0M0	IA3
2	K	75	0	E	E	H	E	AK	T1BN0M0	IA2
3	E	76	N/A	N/A	N/A	H	E	N/A	N/A	N/A
4	E	68	52	H	H	H	H	SHK	T4N2M0	IIIB
5	E	66	30	H	H	H	E	AK	T4N0M0	IIIA
6	K	66	45	H	H	H	H	AK	T2AN2M0	IIIA
7	E	56	50	H	H	H	H	SHK	T3N0M0	IIB
8	E	48	45	H	H	E	H	AK	T3N0M0	IIB
9	E	70	100	E	E	H	E	AK	T1CN0M0	IA3
10	K	69	60	E	E	H	E	SHK	T2BN0M0	IIA
11	K	48	25	H	E	E	E	AK	N/A	N/A
12	E	62	40	E	H	H	H	N/A	N/A	N/A
13	E	62	50	E	E	H	E	AK	T2N0M0	IIA
14	E	58	25	E	E	E	H	SHK	T4N0M0	IIIA
15	E	71	30	E	E	H	H	SHK	T4N0M0	IIIA
16	E	71	60	E	E	H	E	SHK	T1CN0M0	IA3
17	K	74	0	H	H	H	E	AK	T2AN0M0	IB

K: Kadın; E: Erkek; KOAH: Kronik obstrüktif akciğer hastalığı; KAH: Koroner arter hastalığı; E: Evet; H: Hayır; SHK: Skuamöz hücreli karsinom; AK: Adenokarsinom; N/A: Mevcut değil.

Hasta ve sağlıklı bireyler demografik ve klinik açıdan karşılaştırıldığında cinsiyet ($X^2=1,144$; $p=0,285$) ve aktif sigara içiciliği ($X^2=0,615$; $p=0,735$) açısından anlamlı fark saptanmazken; KOAH ve KAH tanısı alma ($X^2=7,222$; $p=0,007$), metabolik hastalığı bulunma ($X^2=7,222$; $p=0,007$), yaş ($U=25,00$; $p=0,002$) ve sigara kullanımı ($U=16,00$; $p=0,000$) açısından hasta grubunda sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek saptanmıştır. Tablo 4.2’de hasta ve sağlıklı grubu tanımlayıcı istatistik bilgileri paylaşılmaktadır.

Tablo 4-2 Hasta ve sağlıklı kontrol grubu tanımlayıcı istatistiği

	Hasta	Sağlıklı Kontrol	<i>p</i>
Yaş, S.O.	16,33	8,00	0.002*
Sigara kullanımı, S.O.	16,82	6,45	<0.001*
Cinsiyet, E:K	12:5	5:5	0.285**
KOAH/KAH, E:H	9:7	0:0	0.007**
Metabolik hastalık, E:H	8:8	0:0	0.007**
Aktif içicilik, E:H	5:12	3:7	0.735**
<i>N</i> (% toplam)	17 (%63)	10 (%37)	

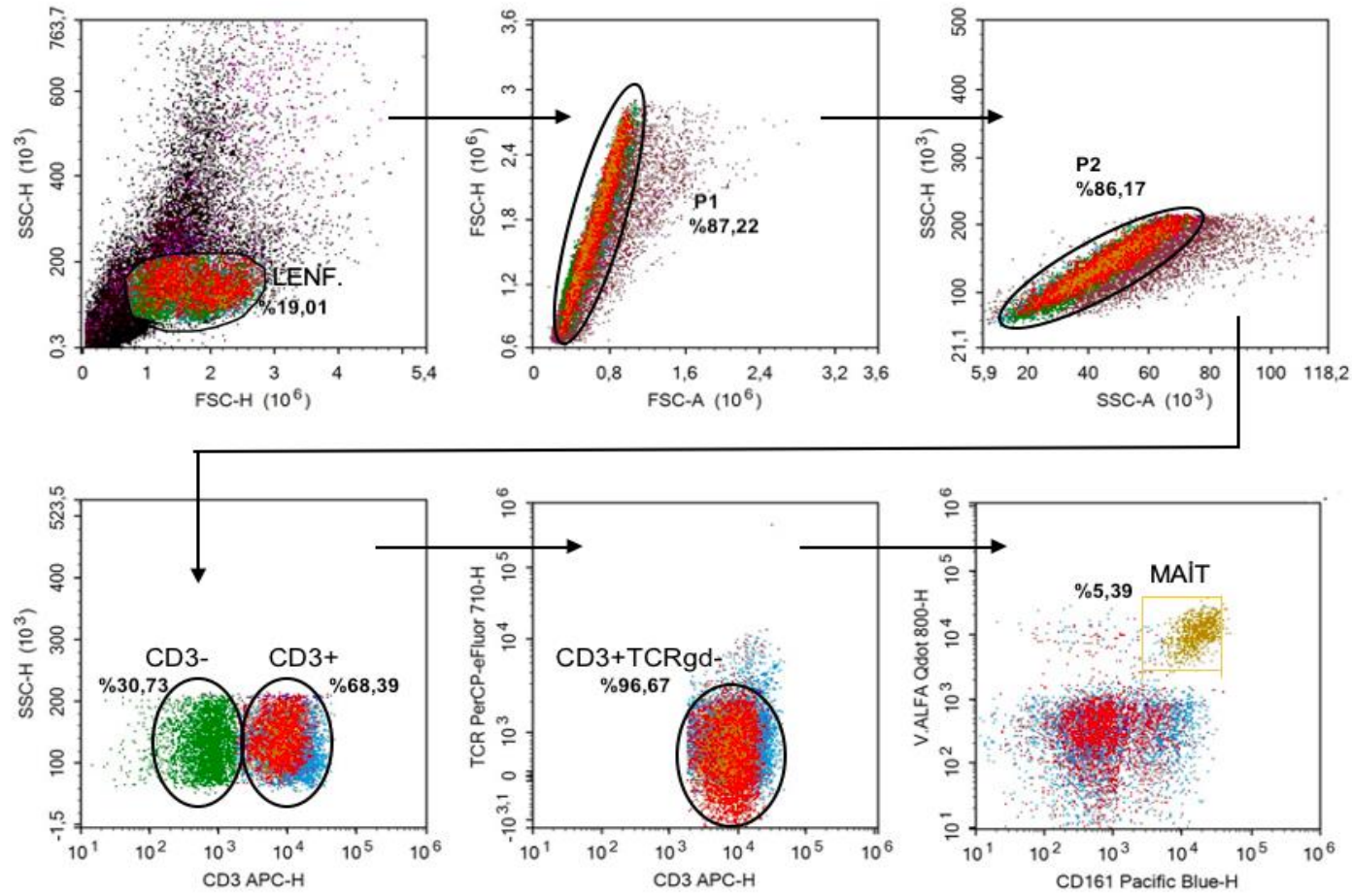
*Mann whitney U testi; **Ki-kare testi; S.O. Sıra ortalaması E:K Erkek: Kadın; E:H Evet: Hayır

4.2. MAİT ve Lenfosit Alt Gruplarının Akan Hücre Ölçer ile Değerlendirilmesi

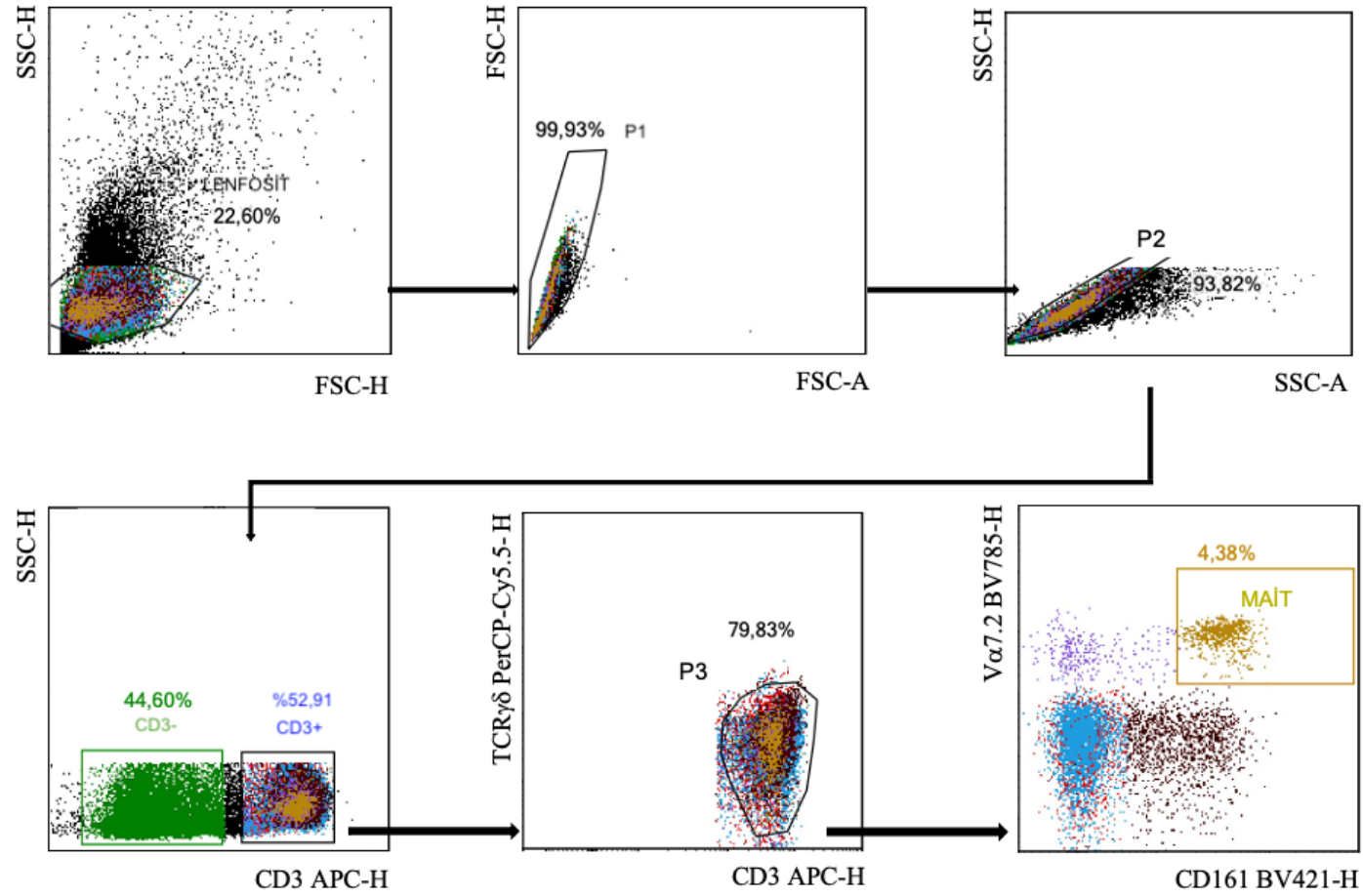
Çalışmada kullanılan bütün örnekler tek hücre süspansiyonu hâline getirildikten sonra florokrom işaretli antikorlarla boyanarak akan hücre ölçer sisteminde değerlendirilmiştir.

4.2.1. Periferik Kan MAİT ve Lenfosit Alt Grupları

Sağlıklı ve hasta periferik kan MAİT ve lenfosit alt gruplarının ($\alpha\beta^+CD3^+$ T ve $CD3^-$) değerlendirilmesinde sırasıyla Şekil 4.1 ve Şekil 4.2’de gösterilen kapılama stratejisi kullanılmıştır. Önden saçılım (forward scatter – FSC) ve yandan saçılım (side scatter – SSC) parametreleri kullanılarak oluşturulan histogramda hücre debris dışlanmak suretiyle lenfositler kapılanarak en az 2×10^5 hücre sayımı yapılmıştır.

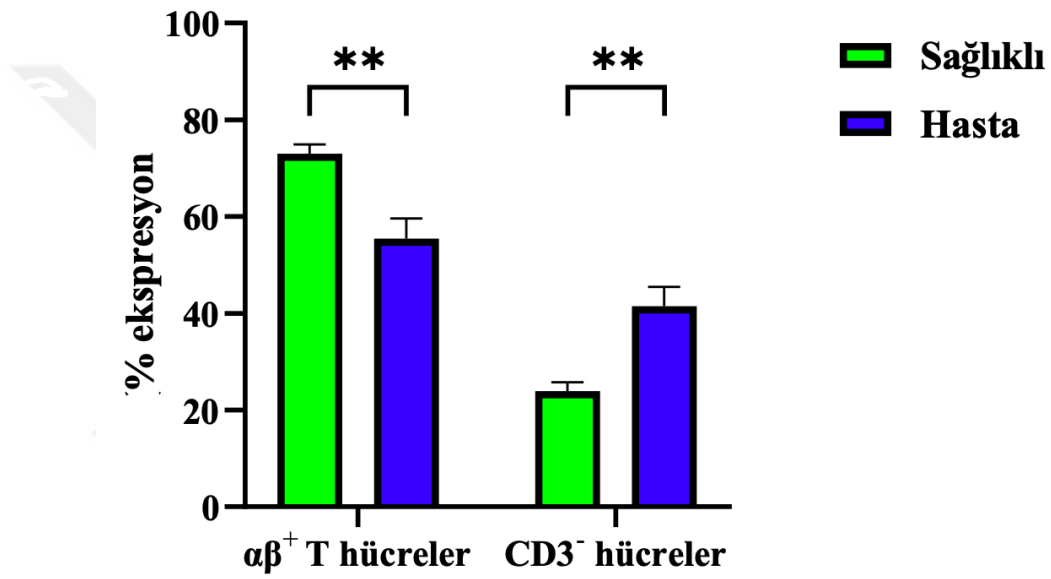


Şekil 4-1 Sağlıklı periferik kan örneğinde MAİT hücre kapılama stratejisi



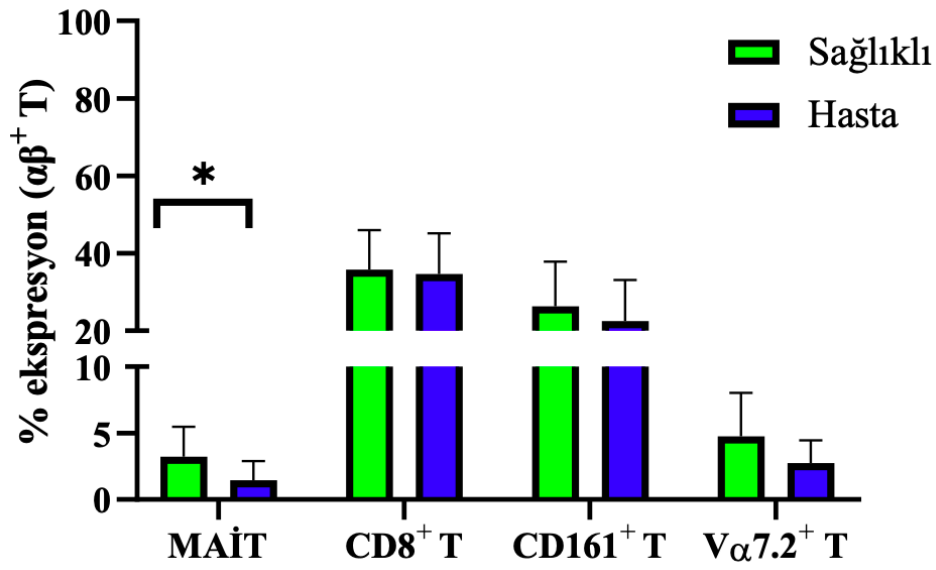
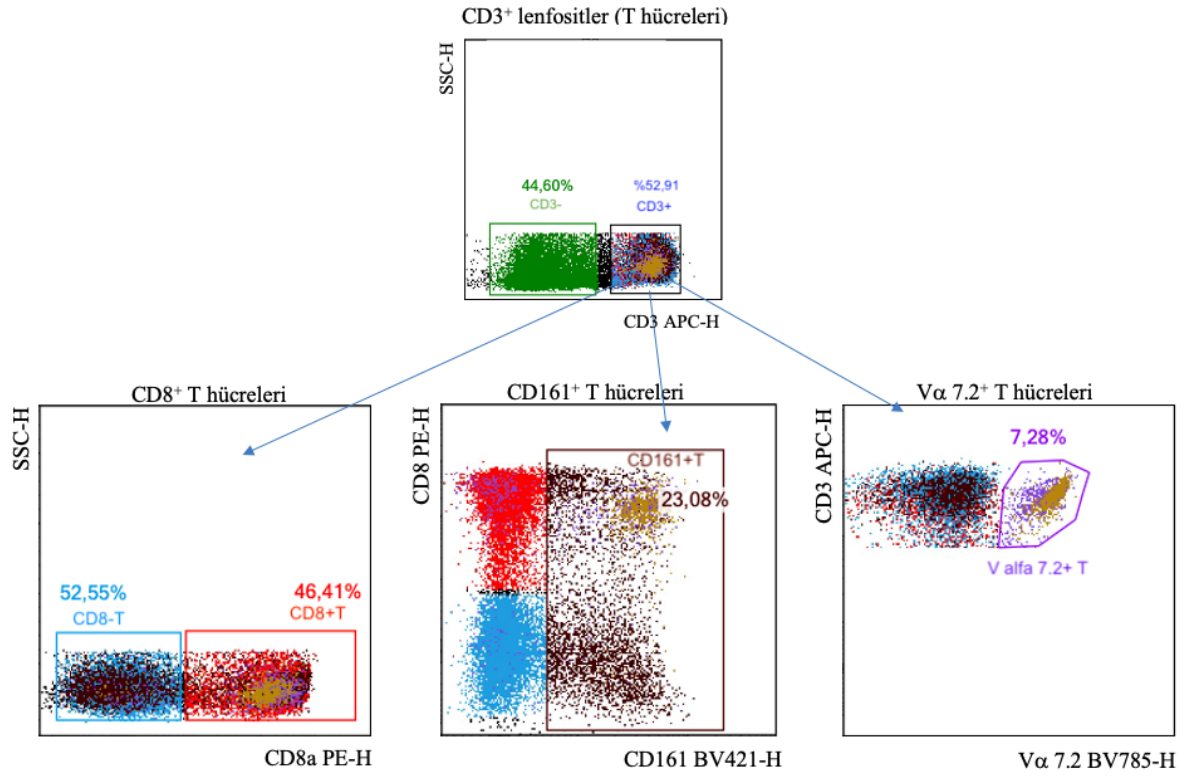
Şekil 4-2 Hasta periferik kan örneğinde MAİT hücre kapılama stratejisi

$\alpha\beta^+$ T ve $CD3^-$ lenfosit hücre oranları sağlıklı ve hasta gruplarında karşılaştırıldığında, lenfosit kapısında $\alpha\beta^+$ T hücre ekspresyonunun kanserli grupta evreye bakılmaksızın sağlıklı gruba göre anlamlı olarak düştüğü ($p=0,015$), buna karşılık B, NK ve ILC hücrelerini içeren $CD3^-$ lenfosit popülasyonunun hasta periferik kan örneklerinde sağlıklı bireylere göre anlamlı olarak arttığı saptandı ($p=0,003$) (Şekil 4.3).



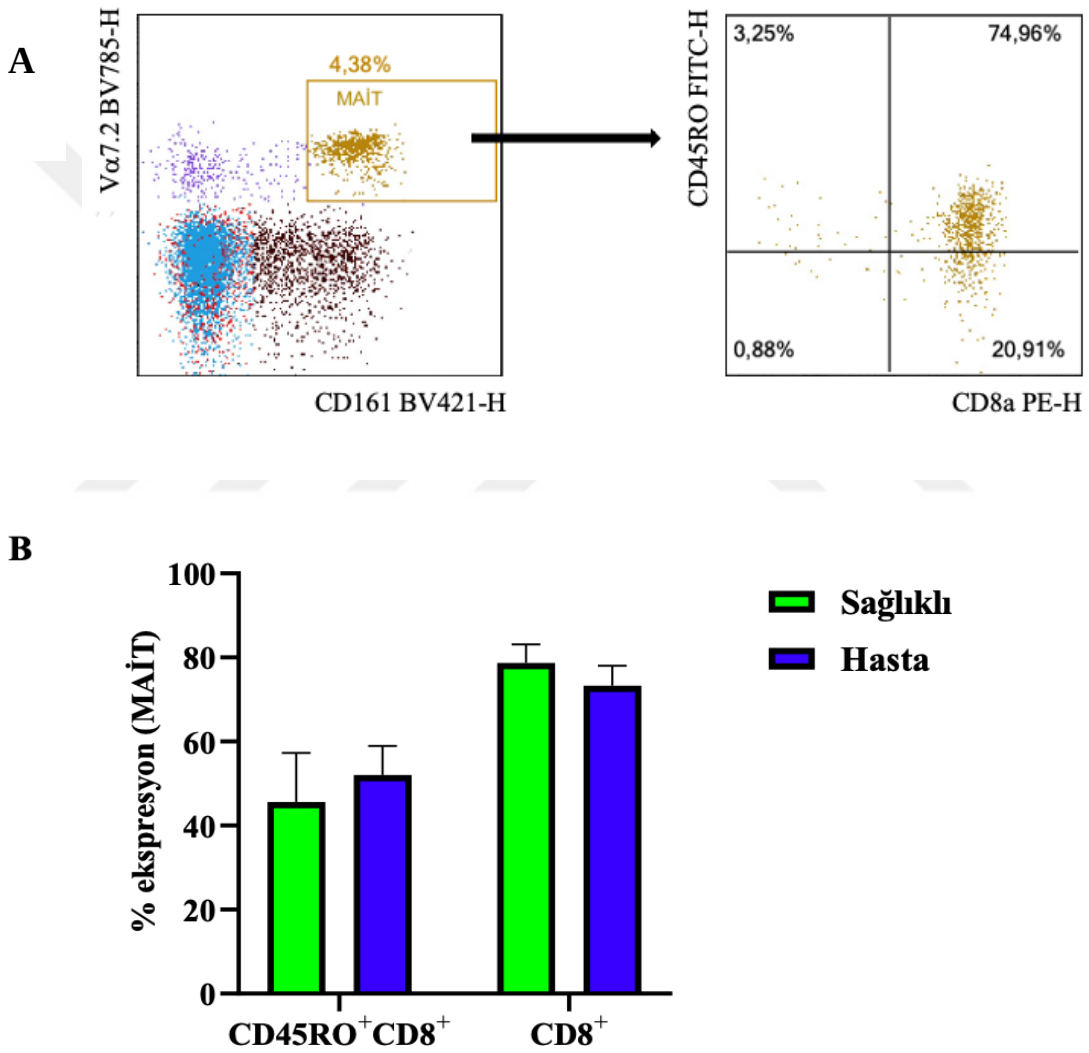
Şekil 4-3 Sağlıklı ve hasta grupları arasında $CD3^-$ ve $\alpha\beta^+$ T hücreleri

Sağlıklı ve hasta gruplarında periferik kan MAİT, $CD8^+$ T, $CD161^+$ T ve $V\alpha 7.2^+$ T hücre popülasyonlarının değerlendirilmesine ait kapılama stratejisi Şekil 4.4’de açıklanmıştır. KHDAK’lı grupta periferik kan MAİT hücre ekspresyonunun sağlıklı grup ile karşılaştırıldığında anlamlı derecede düşük olduğu ($p= 0,036$), iki grup arasında MAİT dışındaki üç farklı T hücre alt grubu açısından ise anlamlı bir farklılık olmadığı saptandı. $V\alpha 7.2^+$ T hücrelerinin ise hasta grubunda sağlıklı bireylerle karşılaştırıldığında anlamlı farklılık olmamasına rağmen ekspresyon oranlarının azaldığı görüldü (Şekil 4.4).



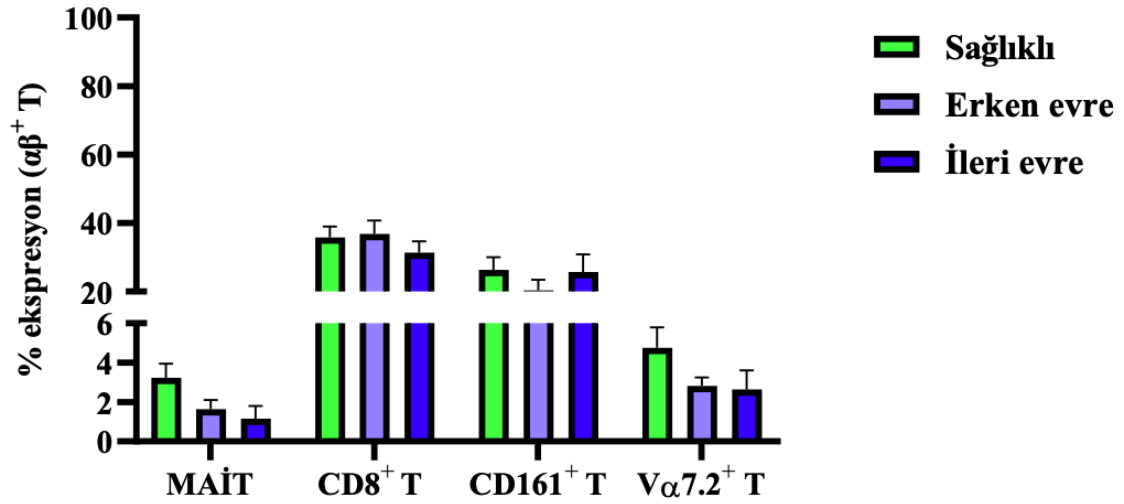
Şekil 4-4 A. MAİT dışı T hücre alt gruplarının kapılama stratejisi. B. Sağlıklı ve hasta grupları arasında MAİT ve T hücre alt gruplarının karşılaştırılması.

CD8 ve CD45RO ekspresyonuna göre MAİT hücre alt grupları incelendiğinde, sağlıklı bireylerde CD8⁺ MAİT hücreleri ortalama %83,81, CD8⁺CD45RO⁺ hücreler ise %56,75 olarak saptandı. Hasta ve sağlıklı gruplar karşılaştırıldığında ise sadece CD8⁺ veya sadece CD45RO⁺CD8⁺ ifadesi (ekspresyonu) açısından MAİT hücre alt grupları arasında anlamlı bir fark saptanmadı (Şekil 4.5). CD45RO⁻CD8⁺ hücreler açısından hasta ve sağlıklı gruplar incelendiğinde ise KHDAK hasta grubunda sağlıklı gruba göre anlamlı derecede düşük olduğu görüldü (p=0,047).



Şekil 4-5 A. MAİT hücre alt gruplarının kapılama stratejisi. B. Sağlıklı ve hasta grupları arasında MAİT alt gruplarının karşılaştırılması.

Hasta grubu erken ve ileri evre olarak ayrılarak değerlendirildiğinde, hücre grupları arasında açısından sağlıklı-erken evre-ileri evre arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır (Şekil 4.6).



Şekil 4-6 Sağıklı, erken, ileri evre periferik kan lenfosit alt gruplarının karşılaştırılması

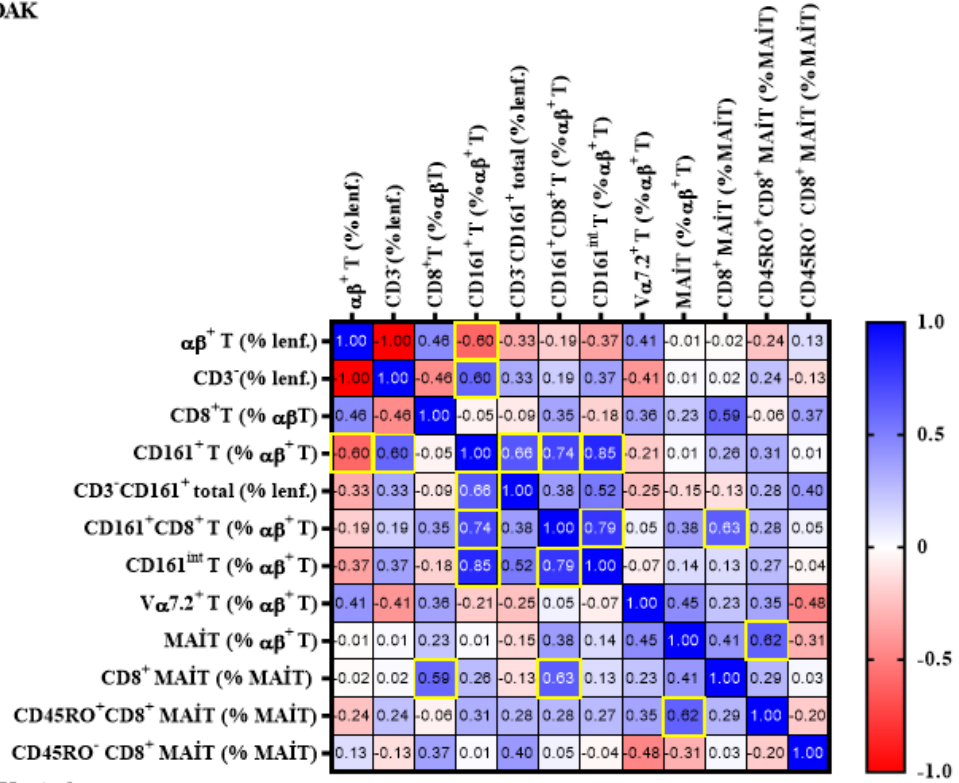
4.2.2. Sağıklı ve Hasta Periferik Kan Lenfosit Gruplarının Korelasyonu

KHDAK ve sağıklı grup periferik kan MAİT ve lenfosit alt grupları arasında korelasyon ölçümleri sonucunda MAİT, CD3⁻ ve lenfosit alt grupları arasında anlamlı korelasyonlar saptanmıştır (Şekil 4.7).

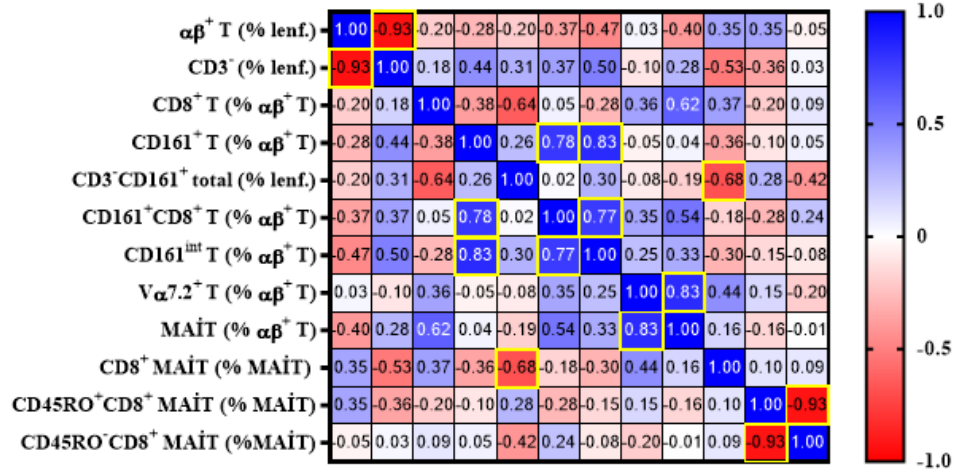
Sağıklı kontrollerde pozitif korelasyonlar CD161⁺ T (% αβ⁺ T) ve CD161⁺CD8⁺ T (% αβ⁺ T) (p=0,001), CD161⁺ T (% αβ⁺ T) ve CD161^{int} T (% αβ⁺ T) (p=0,000), CD161⁺CD8⁺ T (% αβ⁺ T) ve CD161^{int} T (% αβ⁺ T) (p=0,002) ve Vα7.2⁺ T (% αβ⁺ T) ve MAİT (% αβ⁺ T) (p=0,000) arasında bulunurken, en belirgin negatif korelasyonlar αβ⁺ T (% lenf.) ve CD3⁻ (% lenf.) (p=0,000), CD3⁻ CD161⁺ (% lenf.) ve CD8⁺ MAİT (% MAİT) (p=0,003) ve CD45RO⁺CD8⁺ MAİT (% MAİT) ve CD45RO⁻CD8⁺ MAİT (% MAİT) (p=0,000) arasında görülmüştür.

KHDAK grubu periferik kan örneklerinde ise pozitif korelasyonlar CD3⁻ (% lenf.) ve CD161⁺ T (% αβ⁺ T) (p=0,020), CD8⁺ T (% αβ⁺ T) ve CD8⁺ MAİT (% MAİT) (p=0,023), CD161⁺ T (% αβ⁺ T) ve CD3⁻ CD161⁺ (% lenfositler) (p=0,000), CD161⁺ T (% αβ⁺ T) ve CD161⁺CD8⁺ T (% αβ⁺ T) (p=0,000), CD161⁺ T (% αβ⁺ T) ve CD161^{int} T (% αβ⁺ T) (p=0,000), CD161⁺CD8⁺ T (% αβ⁺ T) ve CD161^{int} T (% αβ⁺ T) (p=0,000),

A. KHDAK



B. Sağlıklı Kontrol



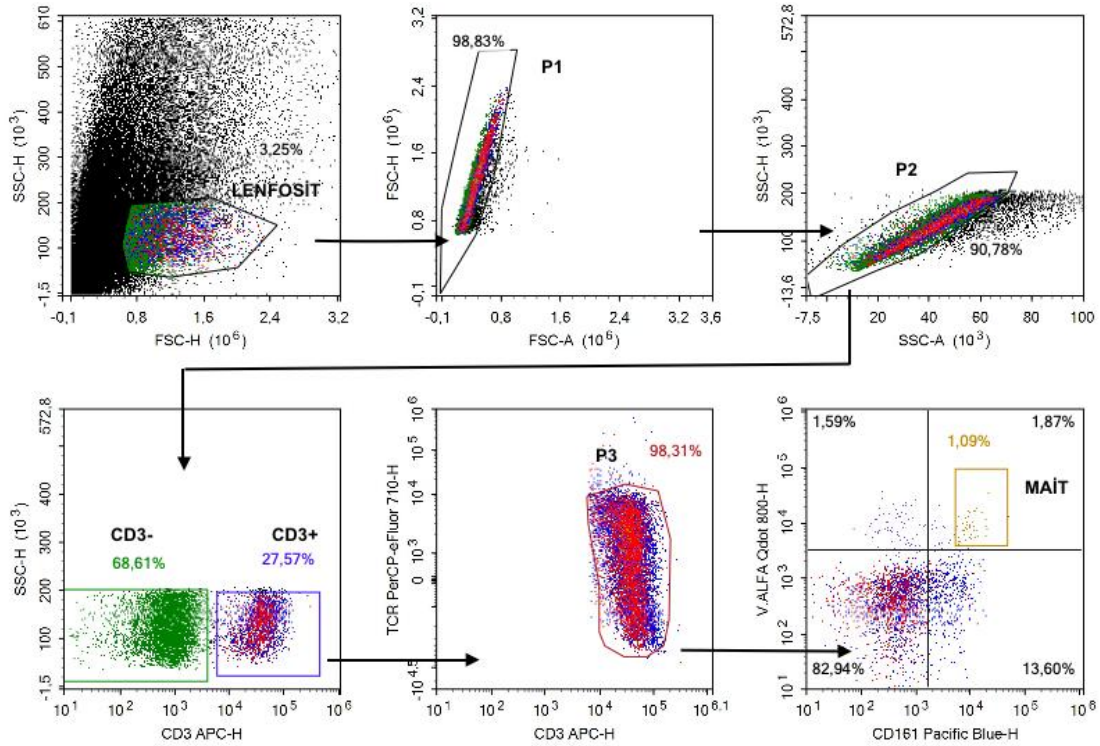
Şekil 4-7 Periferik kan CD3⁺, CD3⁻ lenfositler, MAIT ve T hücre alt gruplarının korelasyon matrisi . A. Hasta grupta periferik kan hücreleri arasındaki korelasyon B. Sağlıklı grupta periferik kan hücreleri arasındaki korelasyon.

Renkler koyu maviden koyu kırmızıya kadar değişiklik gösterir. Koyu mavi pozitif korelasyonu, 1'lik bir r değerini ifade ederken; koyu kırmızı negatif korelasyonu, -1'lik bir r değerini gösterir. Sarı ile çerçeve içerisine alınmış kutular anlamlı korelasyonları göstermektedir.

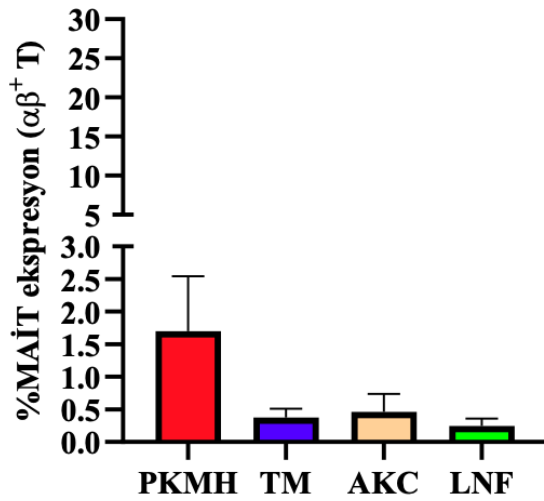
CD161⁺CD8⁺T (% $\alpha\beta^+$ T) ve CD8⁺ MAİT (% MAİT) (p=0,001) ve MAİT (% $\alpha\beta^+$ T) ve CD45RO⁺CD8⁺ MAİT (% MAİT) (p=0,001) arasında, negatif korelasyon $\alpha\beta^+$ T (% lenfositler) ve CD161⁺T (% $\alpha\beta^+$ T) (p=0,020) arasında saptanmıştır.

4.2.3. KHDAK Hasta Doku Örneklerinde Lenfosit Alt Grupları

Hasta doku (tümör, bitişik akciğer, lenf) ve periferik kan örneklerindeki CD3⁻ lenfositler, $\alpha\beta^+$ T hücreleri, MAİT ve diğer T lenfosit alt gruplarının oranları karşılaştırıldı. Tümör doku MAİT hücre kapılama stratejisi Şekil 4.8. de açıklanmıştır. Hasta periferik kan örneklerinde diğer doku örneklerine kıyasla oransal olarak MAİT hücreleri daha fazla bulunmasına karşılık anlamlı bir fark saptanmadı (Şekil 4. 8).



Şekil 4-8 Tümör dokusu MAİT hücrelerinin kapılama stratejisi

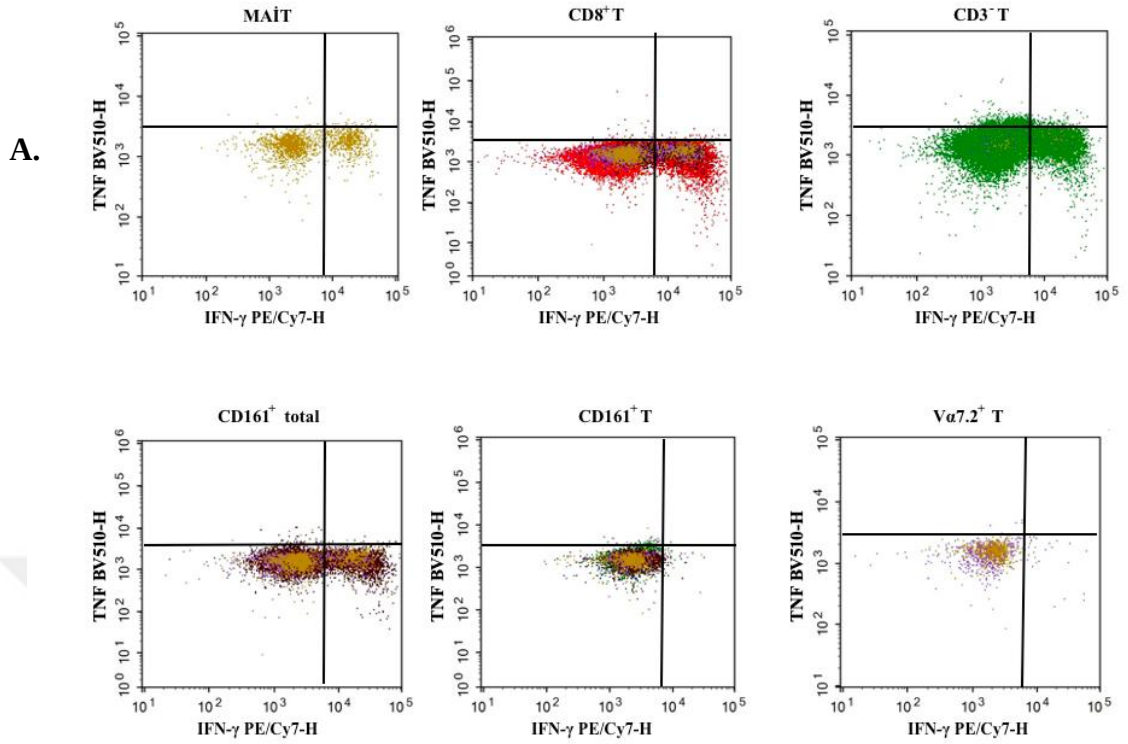


Şekil 4-9 Hasta periferik kan ve doku örneklerinde MAİT hücreleri

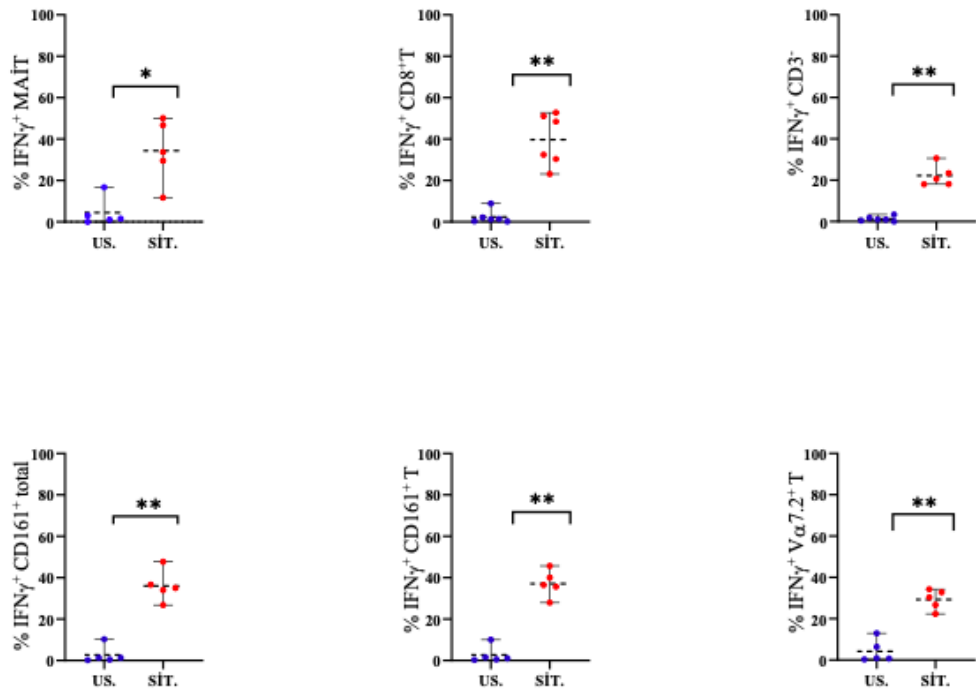
4.2.4. Sağlıklı Periferik Kan Mononükleer Hücrelerinde Hücre İçi Sitokin Analizi

Hasta gruplarından elde edilen kan ve doku örnekleri sınırlı miktarda olduğu için bu örneklerde hücre içi sitokin ölçümü için yeterli sayıda MAİT hücresi elde edilememiştir. Bu sebeple 5 sağlıklı kişinin PKMH de hücre içi sitokin (IFN- γ , TNF, IL-17A) ve perforin, granzim seviyeleri akan hücre ölçer sistemi ile analiz edilmiştir. Uyarım sonrası farklı lenfosit alt gruplarında ve MAİT hücrelerinde IFN- γ seviyelerinde anlamlı değişiklik saptanırken diğer TNF, IL-17A, perforin ve granzim seviyelerinde anlamlı bir değişiklik saptanamamıştır. Sırasıyla MAİT, CD8⁺, CD3⁺, CD161⁺ total, CD161⁺ T ve V α 7.2⁺ T hücrelerindeki değişim için p değerleri sırasıyla 0,016; 0,002; 0,004; 0,008; 0,008 ve 0,008'dir (Şekil 4. 10).

PMA/IM uyarısını takiben akan hücre ölçer analizlerinde saptanabilen MAİT hücrelerinde IFN- γ pozitifliği açısından anlamlı değişim gözlenmesine karşılık, T hücreleri popülasyonu tam olarak seçilemediği için MAİT hücrelerinin yüzdesi düşük saptandı. CD3 ekspresyonunun ve dolayısıyla MAİT hücrelerinin uyarımsız tüplerde olduğu gibi uyarımlı tüplerde de saptanabilmesi için ikinci bir boyama stratejisi kullanıldı. CD3 antikoru hem hücre yüzey antikorlarına hem de hücre içi antikorlarına eklendi. Sonuçta hem IFN- γ ⁺ hücreler hem de T hücre popülasyonları saptandı. Şekil 4.11'de aynı sağlıklı kontrole ait uyarım sonrası iki farklı hücre içi antikor kombinasyonu kullanılan deneylerin analizinde T ve MAİT hücre kapıları gösterilmiştir.

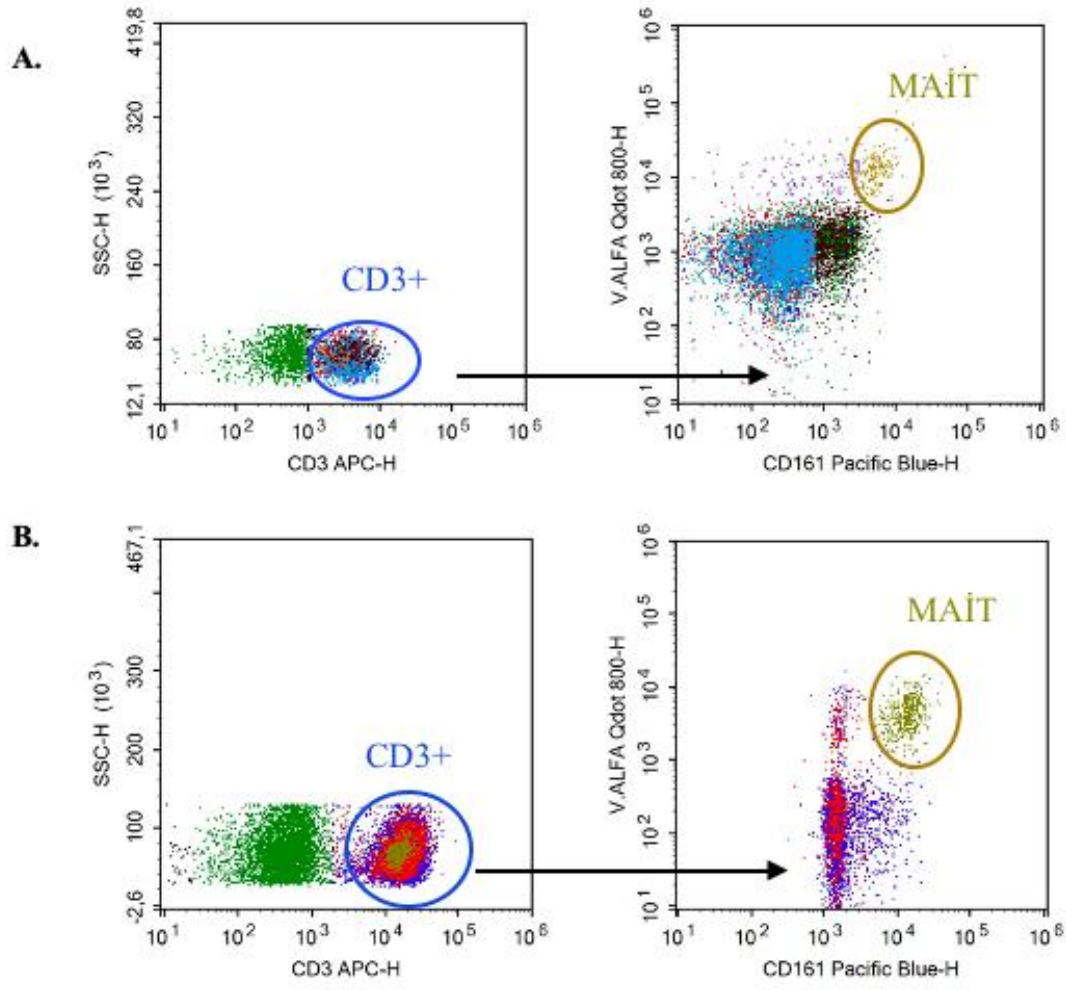


B.



Şekil 4-10 A. IFN-γ pozitif lenfosit alt gruplarının akan hücre ölçer ile gösterilmesi
B. Sağlıklı periferik kan örneklerinde hücre içi IFN-γ seviyeleri.

US: uyarımsız, SİT: PMA/IM uyarımı



Şekil 4-11 A. CD3 antikorunu yalnızca hücre yüzey boyama için kullanıldığında B. CD3 antikorunu hem hücre yüzey hem de hücre içi boyamada kullanıldığında MAİT kapısı.

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda akciğer özelinde kanser hastalarında MAİT hücrelerinin yüzde oranlarının ve sitokin fenotiplerinin nasıl değiştiğinin belirlenmesi amaçlandı. Bu amaçla KHDAK tanısı almış hastaların opere edilebilir olanlarından tümör dokusu, tümöre komşu akciğer dokusu, lenf nodu ve periferik kan örneği; opere edilemeyenlerden ve sağlıklı kontrol grubundan da yine periferik kan örneği alınarak tek hücre süspansiyonu hâline getirildi. Ardından bu süspansiyonlar floresanlı antikorlarla hücre yüzeyleri boyanarak ve akan hücre ölçer cihazından geçirilerek analiz edildi. Elde edilen veriler ise gerek hasta-sağlıklı gerekse erken evre-geç evre-sağlıklı karşılaştırması yapılarak istatistiksel olarak analiz edildi. Ayrıca hasta ve sağlıklı periferik kan ve doku MAİT hücre sitokin salınımları saptanarak hem sitotoksik hem de direk fonksiyonel farklılıkları saptandı. Hasta periferik kan ve doku örneklerinde hücreiçi sitokin protokolü için yeterli miktarda MAİT hücresi elde edilemediği için hücreiçi sitokinler sağlıklı periferik kan örneklerinde çalışıldı.

Türkiye ve dünya genelinde erkeklerde akciğer kanseri insidansı kadınlardan daha yüksektir². Benzer şekilde çalışmamızda da erkeklerin baskın olduğu görülürken (%70,6), sağlıklı grup erkek oranı %50 dir. Yaş olarak baktığımızda da hasta grubu ortalama yaşı 66 sağlıklı grup ortalama yaşı 56'dır. Husain çalışmasında akciğer kanseri hastalarının %80'nin ya aktif sigara içicisi ya da yakın zamanda bırakmış; sigara kullananların ise %10-15'nin akciğer kanserine yakalandığını göstermiştir¹. Çalışmamızda hastaların sigara kullanımı (paket/yıl) ortalama değeri 44,50 ve aktif içicilik oranı %29,4; sağlıklı grupta ise sigara kullanımı (paket/yıl) ortalama değeri 4,5 ve aktif içicilik oranı %30'dur. Aktif içicilik oranı gruplarımız arasında fark göstermese de paket/yıl oranları açısından verilerimiz akciğer kanserinde sigara/tütün ürünleri kullanımının önemli bir yeri olduğunu doğrulamaktadır.

Zhang ve ark. 35 KHDAK ve 35 eşleşmiş sağlıklı kontrolle yaptıkları çalışmalarında %17,2 oranında erken evre, %82,5 oranda geç evre hasta periferik kan örneklerini kullanmışlardır⁵³. Ouyang ve ark. nın çalışmasında 30 KHDAK hastasının yaklaşık %56'sı erken evre %44'ü geç evredir⁵⁴. Shi ve ark. nın çalışmasında ise 105 KHDAK'lı hastanın yaklaşık %90,5'i ileri evre iken sadece yaklaşık %9'u erken evrededir⁵⁵. Çalışmamızda ise periferik kan örneklerinin %60'ı erken evre, %40'ı ileri

evre hastalara aittir. Sınırlı sayıda örnekle yapılan çalışmamızda erken ve ileri evre gruplar arası dağılım Zhang ve Shi'nin çalışmalarına göre daha dengelidir^{53, 55}.

Kanserin histolojik alt tipi açısından bakıldığında, Ouyang ve ark. nın çalışmalarına dahil ettikleri 30 KHDAK'lı hastanın yaklaşık %73'ünün adenokarsinom geri kalanın skuamöz hücreli karsinom tanısı aldığı görülmektedir⁵⁴. Shi ve ark. nın yakın tarihli ve farklı tip kanser hasta örneklerini dahil ettikleri çalışmalarında, immünoterapi öncesi KHDAK (35 kişi) grubunun %65,7'ni adenokarsinom, %28,6'nı ise skuamöz hücreli karsinom olarak bildirmişlerdir⁵⁵. Amerikan Kanser Derneği'nin paylaştığı bilgilere göre ABD'de erkeklerde akciğer kanserlerinin %82'sini KHDAK oluşturmaktadır. Bunların %52'si adenokarsinom iken %35'i skuamöz hücreli karsinomdur⁵⁶. Husain'in verilerine göre KHDAK tanısı alanların %61'i adenokarsinom, %24'ü skuamöz hücreli karsinomdur¹. Çalışmamızda KHDAK'lı grupta histolojik alt tipi belirlenebilen 15 hastadan %53,33'ü adenokarsinom, %46,66'sı ise skuamöz hücreli karsinom tanısı almıştır ve skuamöz hücreli kanserli hasta oranı genel verilere ve diğer çalışmalara göre daha yüksek bulunmaktadır.

Özellikle hızlı sonuç vermesi ve periferik kandan kolay olarak tespit edilebilmesi sebebiyle MAİT hücrelerinin tanımlanması, oran olarak tespit edilmesi ve fonksiyonlarının ölçülmesi ile ilgili çalışmalarda ilk tercih çoğunlukla akan hücre ölçer yöntemi olmaktadır. İlk çalışmalarda MR1 tetramerleri antikor kombinasyonlarıyla birlikte kullanılmasına rağmen sonraki çalışmalar tetramerler olmadan yapılan kombinasyonların yeterince doğru tanımlama sağladığını göstermiştir. Ayrıca tetramer kullanımı daha zahmetli ve temini zor olduğundan kullanımları son derece azalma göstermiştir^{9, 32, 50}. Çalışmamızda T hücrelerinin farklı alt gruplarıyla birlikte MAİT hücrelerinin tanısı ve yüzde oranlarının tespiti için akan hücre ölçer yöntemi kullanılarak CD3⁺TCR $\gamma\delta$ ⁻V α 7.2⁺CD161⁺⁺ olan hücreler "MAİT hücresi" olarak değerlendirilmiştir.

Lozano ve ark. sağlıklı periferik kan T hücrelerini %45-70 oranında, Kleiveland ve ark. %70-85, Autissier ve ark. ise %60 olarak saptamışlardır^{57, 58, 59}. Riazı Rad ve ark.⁶⁰ göğüs kanserli hastalarla, Krijgsman ve ark.⁶¹ ise kolorektal kanserli hastalarla yaptıkları çalışmalarında periferik kan T hücre yüzdesi açısından hasta ve sağlıklı grup arasında anlamlı bir farklılık olmadığını belirtmişlerdir. Çalışmamızda sağlıklı periferik kan örneklerinden yapılan akan hücre ölçer analizleri sonucunda, kanserli grupta $\alpha\beta$ ⁺

CD3⁺ T hücre yüzdesi sağlıklı gruba göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Çalışma grubumuzda yer alan hastaların birçoğu kansere eşlik eden içinde diyabetin de yer aldığı metabolik hastalıklara sahip olduğu için hasta gruptaki total T hücre yüzdesinin sağlıklı gruba göre düşük olması sebebinin eşlik eden klinik tablolar olduğunu düşündürmektedir.

Autissier ve ark.⁵⁹ sağlıklı kişilerin periferik kan örneklerinde CD8⁺ hücre oranlarının T hücreleri içinde yaklaşık %35 olduğunu saptamışlardır. Kleiveland ve ark.⁵⁸ ise CD8⁺/CD4⁺ T hücre oranını yaklaşık 1/2 olarak göstermişlerdir. Ling ve ark.³² ayrıca Krijgsman ve ark.⁶¹ kolorektal kanserli, Riazi Rad ve ark.⁶⁰ göğüs kanserli hastalarla yaptıkları çalışmalarında CD8⁺ ve CD4⁺ hücreler açısından sağlıklı ve hasta periferik kanları arasında anlamlı bir farklılık olmadığını belirtmişlerdir. Çalışmamızda da hasta ve sağlıklı gruplar arasında periferik kan CD8⁺ T hücre oranları birbirine oldukça yakın olup aralarında anlamlı bir farklılık saptanmamıştır. Bu açıdan sonuçlarımız daha önceki kanser çalışmalarıyla uyumlu görünmektedir.

Ling ve ark.³² kanserli hastalarla yaptıkları çalışmalarında sağlıklı ve hasta bireylerden alınan periferik kan örneklerinde saptanan MAİT hücre yüzdesinin sağlıklı donörlere (%2,45) göre KLK'lı hasta grubunda (%0,98) anlamlı olarak azaldığını tespit etmiş ve bu değişim farklı kanser gruplarıyla yapılan çalışmalarla doğrulanmıştır^{31, 32, 33}. Zhang ve ark.⁵³ ise akciğer kanserli hastaların periferik kanında MAİT hücre yüzdesinin sağlıklı gruba kıyasla anlamlı derecede arttığını bulmuşlardır. Çalışmamızda ise KHKDAK'lı grupta periferik kan MAİT hücreleri sağlıklı grup ile karşılaştırıldığında anlamlı derecede düşük saptanmıştır. Bulgularımız mevcut çalışma sonuçları ile uyumludur. Zhang ve ark.'nın farklı sonuç bulmasında hasta grubu örneklerinin büyük bir çoğunluğunun (29/35) ileri evre hatta IV. evre hasta olmasından kaynaklanabileceği düşünülebilir.

Shao ve ark.⁶² gastrik kanserli hasta periferik kan MAİT hücre alt gruplarını inceledikleri çalışmada en fazla CD8⁺, daha sonra CD4⁺CD8⁻ (çift negatif), en az ise CD4⁺ hücreler olarak saptamışlardır. Yine Ling ve ark.³² KLK hasta doku ve periferik kan örneklerinde MAİT alt grupları içinde en fazla CD8⁺ hücrelerinin; ayrıca hasta grupta dolaşımda hem CD8⁺ MAİT hem de CD8⁺CD45RO⁺ MAİT hücrelerinin sağlıklı gruba göre anlamlı olarak azaldığını göstermişlerdir. Bununla birlikte periferik kan CD4⁺ MAİT hücrelerinin hasta grupta sağlıklı gruba kıyasla anlamlı olarak fazla olduğunu saptamışlardır. Ouyang ve ark.⁵⁴ akciğer kanserli hastalarda dolaşımdaki MAİT

hücrelerinin büyük çoğunlukla $CD8^+$ olduğunu belirtmiştir. Ayrıca dolaşımdaki $CD8^+$ MAİT hücrelerinin hasta grupta sağlıklı gruba göre anlamlı olarak azaldığını; ancak çift negatif ya da $CD4^+$ MAİT açısından anlamlı bir farklılık olmadığını göstermişlerdir. Çalışmamızda sadece $CD8$ ve $CD45RO$ pozitifliği açısından MAİT hücreleri incelendiğinde, sağlıklı ve hasta periferik kan MAİT hücrelerinin çoğunluğunun $CD8^+$ olduğu saptanmıştır. Hasta periferik kan $CD8^+$ MAİT hücrelerinin sağlıklılara göre daha az, $CD45RO^+CD8^+$ MAİT hücrelerinin ise daha fazla olmasına karşılık istatistiksel olarak anlamlılık görülmemiştir. Sağlıklı gruba kıyasla hasta grupta saptanan oransal total MAİT farklılığının sağlıklı gruptaki $CD8^+$ MAİT hücrelerinden kaynaklı olabileceği düşünülmektedir.

Ling ve ark.³² KKK hastalarında erken evrede dolaşımdaki MAİT hücre yüzdesini ileri evre KKK hastalarınınkine göre anlamlı derecede yüksek bulmuşlardır. Ouyang ve ark.⁵⁴ ise evreler arasında dolaşımdaki MAİT hücreleri açısından anlamlı bir fark saptamamışlardır. Çalışmamızda da periferik kanda sağlıklıdan geç evreye doğru MAİT hücre yüzdeleri açısından kademeli bir azalma olmasına karşılık, ileri evredeki örnek sayımız az olması nedeniyle anlamlı bir farklılık tespit edilememiştir.

MAİT hücrelerinin periferik kan dışında hangi organ ve dokularda bulunduğu ayrıca kanserli dokuya infiltre olup olmadığı ile ilgili çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Ling ve ark.³² KKK'lı hastaların kanserli ve kansere bitişik sağlıklı doku örneklerini akan hücre ölçer ile değerlendirdiklerinde tümör dokusunda ortalama %3,24 olarak buldukları MAİT hücrelerini tümöre bitişik sağlıklı dokuda ortalama %1,9 olarak tespit etmişlerdir. Ayrıca hem erken hem geç evre hastalardaki tümör ve bitişik doku MAİT hücre oranları ile periferik kan MAİT hücre oranlarının negatif korele olduğunu, bu sebeple hasta kişilerdeki periferik kan MAİT hücrelerinin tümör dokusuna infiltre olduğunu öne sürmüşlerdir. Ouyang ve ark.⁵⁴ KKK'lı hastalarda tümöre komşu sağlıklı dokuya nazaran tümör dokusunda total MAİT ve $CD8^+$ MAİT hücrelerinin anlamlı oranda daha az olduğunu, bunun aksine $CD4^+$ MAİT yüzdesinin anlamlı olarak fazla tespit edildiğini göstermişlerdir. Çalışmamızda MAİT hücre yüzdesi, örnek sayısının çok kısıtlı olmasıyla birlikte, tümöre bitişik sağlıklı dokuda tümör dokusuna kıyasla fazladır; ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı saptanmamıştır. Periferik kan, tümör dokusu, bitişik akciğer dokusu ve lenf dokusu MAİT hücre yüzdeleri arasında bir karşılaştırma yapıldığında periferik kan MAİT hücre yüzdesinin hepsinden fazla olduğu; ancak yine sayıca çok az

doku örneği olduğu için istatistiksel olarak anlam taşımadığı görülmüştür. Çalışmamızda elde edilen verilere göre Ling ve ark. çalışmalarına benzer şekilde kanserli hastalarda sağlıklı bireylere kıyasla periferik kan MAİT hücre yüzdesinin azaldığı saptanmasına karşılık bu MAİT hücrelerinin tümör veya diğer dokulara infiltre olduğu ile ilgili sonuca ulaşılamamaktadır .

Daha önce tümör ve diğer dokulardaki MAİT tanımlanması için yapılan çalışmalarda dokuları ayırtırmak için mekanik ve enzimatik yöntemler birlikte kullanılmıştır^{32, 55}. Ouyang ve ark.⁵⁴ çalışmalarında KHDAK'lı hastaların tümör ve tümöre bitişik akciğer dokusunu kullanmışlar, ancak tümör ve bitişik akciğer dokusunun tek hücre süspansiyonu hâline getirilmesi için mekanik ayırıştırma safhasında herhangi bir enzim kullanmamışlardır. Çalışmamızda ayırıştırma protokolünde GentleMACS ayırıştırıcı (Miltenyi, Biotec, Almanya) cihazı ile yine firmanın önerdiği 3 farklı tip enzim karışımı içeren Tumor Dissociation Kit (Miltenyi, Almanya) kullanılmıştır. Bu sayede özellikle bağ doku elemanlarının ve DNA'nın hücreler arası adezyonu artırıcı etkisini azaltmak ve hücreleri daha iyi tek hücre süspansiyonu hâline getirilmesi amaçlanmıştır. Ancak hücre içi sitokin deneyleri için yeterli MAİT hücresi elde edilememiştir. Mevcut çalışmalarda rezekte edilen daha büyük tümör dokularının kullanıldığı ve daha fazla hücre elde edilebildiği düşünülmektedir. Ayrıca çalışmamızdaki enzimatik ayırıştırma sürecinin hücreleri daha fazla strese maruz bırakarak apoptoza gitmelerine neden olması ve zaten az olan MAİT hücre sayısını çok daha azaltıyor olması durumu da söz konusudur.

Ling ve ark.'nın 6 hasta kanı ve 6 sağlıklı kanı ile yaptıkları çalışmada MAİT hücrelerinin PMA/IM uyarımı sonrası her iki grupta sitokin (TNF, IFN- γ , IL-2 ve IL-17A) seviyelerinde uyarılmamış kontrol grubuna göre anlamlı bir farklılık görülmüştür. Ayrıca KHK hastalarında MAİT hücrelerinin TNF ve IFN- γ seviyelerindeki artış sağlıklı kontrollere nazaran uyarımdan sonra düşük saptanırken IL-17A seviyeleri sağlıklılara kıyasla daha fazla saptanmıştır. Bulgular KHK hastalarında MAİT hücrelerinin Th17 yönlü bir yanıtı neden olduğunu düşündürmektedir. Buna ilaveten dokulardan mRNA transkripsiyonu yöntemi ile, tümör dokularını ve bitişik sağlıklı dokuları kontrol ettiklerinde, hasta bireylerde MAİT hücrelerinin hem IFN- γ hem IL-17A'yı daha fazla ifade ettiklerini tespit etmişler ve Th1 ve Th17 tipi sitokin üreten MAİT hücrelerinin KHK dokularına toplandığını iddia etmişlerdir. Ouyang ve ark.⁵⁴ çalışmalarında MAİT

hücrelerinin sitokin üretme potansiyellerinin anatomik bölgeye göre değiştiğini göstermiştir. PMA/IM uyarımı sonucu hastaların periferik kanlarından izole edilen MAİT hücrelerinin yüksek miktarda IFN- γ ve TNF, az miktarda IL-17A üretebildiğini bildirmişlerdir. Aksine tümör ve tümöre komşu çevre dokudaki MAİT hücrelerinin anlamlı olarak az miktarda IFN- γ ve TNF üretirken yine anlamlı olarak fazla miktarda IL-17A üretebildiğini göstermişlerdir. Sağlıklı ve hasta periferik kan sitokin seviyeleri açısından bir farklılık saptamamışlardır. Shi Lin ve ark.⁵⁵ ise çalışmalarında KHDAK'lı hastaların tümör lezyonlarında MAİT hücrelerinin periferik kan CCR6-CCL20 eksenine ile göç ederek sayıca arttığını belirtmişlerdir. Hem periferik hem tümöre infiltre MAİT hücrelerinin artmış PD-1, TIM-3 ve IL-17A ve azalmış IFN- γ ile tükenmiş fenotip gösterdiğini ileri sürmüşlerdir. Çalışmamızda sağlıklı periferik kan MAİT hücrelerinin sitokin (TNF, IFN- γ , IL-17A, perforin ve granzim içerisinden) ifadelerine bakıldığında uyarımsız kontrol grubuna göre yalnızca IFN- γ miktarlarında anlamlı farklılık olduğu görülmektedir. Özellikle Ouyang ve ark.'nın öne sürdükleri anatomik bölge farklılığı bu konuda etkili olabilir. Ayrıca Ouyang ve ark. sitokin tayini için akan hücre ölçer sistemini, Ling ve ark. ise izole MAİT hücre kültür süpernatantında sitometrik boncuk deneyi (CBA) ile saptamışlardır. Kullanılan yöntem farklılığı sonuçlardaki farklılığa sebep olmaktadır.

MAİT hücrelerinin çoğunluğunun CD8⁺ olduğu ayrıca hepsinin V α 7.2 ve yüksek oranda CD161 (CD161⁺⁺) ifade ettikleri bilinmektedir. Bu yüzden hasta ve sağlıklı grupta $\alpha\beta$ ⁺ T hücreler içinde, MAİT hücrelerinden ayrı olarak CD8⁺ T, CD161⁺ T ve V α 7.2⁺ T hücre popülasyonları değerlendirildiğinde, hasta ve sağlıklı periferik kan örneklerinde hücre alt grupları açısından anlamlı bir farklılık saptanmamıştır. Bununla birlikte MAİT alt grupları ile diğer lenfosit ve T hücre alt grupları değerlendirilerek kendi içlerinde korelasyon gösterip göstermedikleri araştırıldığında, sağlıklı grupta CD3⁺CD161⁺ total (lenfositler) ve CD8⁺ MAİT arasında negatif korelasyon saptandı. CD3⁺CD161⁺ total hücrelerin büyük oranda NK hücreleri olduğu düşünüldüğünde her iki hücre grubunun CD161⁺ olmasına rağmen aralarında negatif korelasyon olması ilginç bir bulgudur. Bunun aksine hasta grupta CD161⁺ T hücreleri (CD8⁺ T, NKT, MAİT ve $\gamma\delta$ ⁺ T) ile yine CD3⁺CD161⁺ total hücreler (NK) arasında pozitif korelasyon saptanması, CD161⁺ T ve NK hücreleri arasındaki ilişkinin sağlıklı ve hasta gruplarda farklılığı göstermektedir. Bu farklılık CD161 molekülünün sağlıklı ve hasta kişilerde ifadesinin değişimi ve fonksiyonuyla ilgili olabilir. Sağlıklı ve hasta grubu periferik kan lenfosit alt grupları

birlikte incelendiğinde MAİT hücreleri ile total CD8⁺ T hücreleri arasında saptanan pozitif korelasyon, periferik kan MAİT hücrelerinin büyük oranda CD8⁺ olduğunu doğrulamaktadır.

Her çalışmada olduğu gibi farklı MAİT hücre çalışma sonuçlarında çalışma grubunun özellikleri, hangi vücut örneğinin kullanıldığı, hangi teknik ile MAİT tanımlaması yapıldığı önemlidir. Bulgularımıza göre MAİT hücreleri sağlıklı kişilere kıyasla hasta periferik kan örneklerinde anlamlı olarak daha az saptanabilmektedir. Hastalık evrelerinin sayıca daha dengeli ve yeterli olduğu bir çalışma ile evreler arası farklılıkların saptanması mümkündür. Kemokin reseptörlerinin ve ligandlarının de tespit edilebildiği daha önceki çalışmalara ek çalışmalar ile özellikle akciğer kanserinde MAİT hücrelerinin tümör veya sağlıklı dokulara yönelmesi konusu daha net anlaşılabilecektir. Özellikle MAİT hücrelerinin sitokin içerikleri ile ilgili çok farklı görüşler bulunmakla birlikte, hücre uyarım metodlarına göre sitokin içerikleri de değişkenlik gösterdiği bilinmektedir. Herhangi bir hastalık patolojisi göstermeyen stimüle MAİT hücrelerinin anlamlı olarak fazla seviyede IFN- γ içerdiği çalışmamızda ve farklı çalışmalarda gösterilmiştir. Kanser sürveyansı için önemli bir husus tümör mikroçevresinde regülasyona neden olacak sitokinlerin üretimidir. Son çalışmalar immün hücreleri, immün kontrol noktası inhibitörleri kullanımı ile eğiterek kanser hücrelerinin öldürülmesi yönündedir ve MAİT hücreleri de bu alanda oldukça popüler bir aday hâline gelmiştir. Fare periferik kan MAİT hücre oranı insan ile karşılaştırıldığında düşük olmakla beraber akciğer MAİT hücre oranları insanla hemen hemen aynıdır⁶³. Özellikle akciğer kanserinde MAİT hücrelerinin *in vivo* ortamda rollerini açıklayacak çalışmalar bu konuda daha aydınlatıcı olacaktır.

Literatür verileri MAİT hücreleriyle ilgili çalışmaların son derece hızlı bir şekilde arttığını göstermektedir. Son yıllarda akciğer kanseri MAİT hücreleriyle ilgili literatürde üç farklı çalışma yer almaktadır. Bulgularımız bu alandaki çalışmalara katkı da bulunacaktır.

6. KAYNAKLAR

1. Husain A. The lung. In: Kumar, V., Abbas, A. & Aster, J. (eds). *Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease*. Elsevier, 2020, p 1392.
2. Global Cancer Observatory (International Agency for Research on Cancer). Estimated crude incidence and mortality rates in 2020, worldwide, both sexes, all ages (excl. NMSC). (2020).
3. Turna A, Yılmaz Ü, Ak G, Kömürçüoğlu Eren B & Yurt S. Küçük hücreli dışı akciğer kanserinde sekizinci evreleme ve uygulamadaki etkileri. *Türk Göğüs Kalp Damar Cerrahisi Dergisi* **25**, 484-498 (2017).
4. Gümrüdü D. & Nart D. Akciğer adenokarsinom sınıflamasındaki değişiklikler. *Güncel Patoloji Dergisi* **3**, 129-138 (2019).
5. Porth C. & Gaspard KJ. *Essentials of Pathophysiology: Concepts of Altered Health States*. Wolters Kluwer, 2015.
6. Jung CY & Antonia SJ. Tumor Immunology and Immune Checkpoint Inhibitors in Non-Small Cell Lung Cancer. *Tuberc Respir Dis (Seoul)* **81**, 29-41 (2018).
7. Salou M, Franciszkievicz K & Lantz O. MAIT cells in infectious diseases. *Curr Opin Immunol* **48**, 7-14 (2017).
8. Berzins SP, Wallace ME, Kannourakis G & Kelly JA Role for MAIT Cells in Colorectal Cancer. *Front Immunol* **11**, 949 (2020).
9. Shaler CR *et al.* Mucosa-associated invariant T cells infiltrate hepatic metastases in patients with colorectal carcinoma but are rendered dysfunctional within and adjacent to tumor microenvironment. *Cancer Immunol Immunother* **66**, 1563-1575 (2017).
10. Rodin W *et al.* Exhaustion in tumor-infiltrating Mucosal-Associated Invariant T (MAIT) cells from colon cancer patients. *Cancer Immunol Immunother* **70**, 3461-3475 (2021).
11. Horn L & Lovly C. Neoplasms of the Lung. In: Jameson, J. *et al.* (eds). *Harrison's Principles of Internal Medicine, 20e*. McGraw-Hill Education: New York, NY, 2018.
12. Tazelaar H. Pathology of lung malignancies. In: Nicholson A & Lilenbaum RC (eds). *UpToDate*, Aug 2022. edn: UpToDate, Waltham, MA. (Accessed on September 8, 2022.), 2021.

13. International Agency for Research on Cancer. WHO Classification of Tumours Editorial Board. Thoracic tumours. *WHO Classification of Tumours, 5th Edition*: World Health Organization; 2021.
14. Fan X & Rudensky AY. Hallmarks of Tissue-Resident Lymphocytes. *Cell* **164**, 1198-1211 (2016).
15. Park JH & Lee HK. Function of $\gamma\delta$ T cells in tumor immunology and their application to cancer therapy. *Exp Mol Med* **53**, 318-327 (2021).
16. Brennan PJ, Brigl, M & Brenner MB. Invariant natural killer T cells: an innate activation scheme linked to diverse effector functions. *Nat Rev Immunol* **13**, 101-117 (2013).
17. Crosby CM & Kronenberg M. Tissue-specific functions of invariant natural killer T cells. *Nat Rev Immunol* **18**, 559-574 (2018).
18. Chiba A, Murayama G & Miyake S. Mucosal-Associated Invariant T Cells in Autoimmune Diseases. *Front Immunol* **9**, 1333 (2018).
19. D'Souza MP. *et al.* Casting a wider net: Immunosurveillance by nonclassical MHC molecules. *PLoS Pathog* **15**, e1007567 (2019).
20. Wo J *et al.* The Role of Gamma-Delta T Cells in Diseases of the Central Nervous System. *Front Immunol* **11**, 580304 (2020).
21. Krovi SH & Gapin L. Structure and function of the non-classical major histocompatibility complex molecule MR1. *Immunogenetics* **68**, 549-559 (2016).
22. Vacchini A, Chancellor A, Spagnuolo J, Mori L & De Libero G. MR1-Restricted T Cells Are Unprecedented Cancer Fighters. *Front Immunol* **11**, 751 (2020).
23. Gherardin NA. *et al.* Diversity of T Cells Restricted by the MHC Class I-Related Molecule MR1 Facilitates Differential Antigen Recognition. *Immunity* **44**, 32-45 (2016).
24. Lantz O & Legoux F. MAIT cells: an historical and evolutionary perspective. *Immunol Cell Biol* **96**, 564-572 (2018).
25. Gherardin NA. *et al.* Human blood MAIT cell subsets defined using MR1 tetramers. *Immunol Cell Biol* **96**, 507-525 (2018).
26. Hinks TSC & Zhang XW. MAIT Cell Activation and Functions. *Front Immunol* **11**, 1014 (2020).
27. Wong EB, Ndung'u T & Kasprovicz VO. The role of mucosal-associated invariant T cells in infectious diseases. *Immunology* **150**, 45-54 (2017).

28. Koay HF *et al.* A three-stage intrathymic development pathway for the mucosal-associated invariant T cell lineage. *Nat Immunol* **17**, 1300-1311 (2016).
29. Gapin L. Check MAIT. *J Immunol* **192**, 4475-4480 (2014).
30. Gherardin NA *et al.* Enumeration, functional responses and cytotoxic capacity of MAIT cells in newly diagnosed and relapsed multiple myeloma. *Sci Rep* **8**, 4159 (2018).
31. Voillet V *et al.* Human MAIT cells exit peripheral tissues and recirculate via lymph in steady state conditions. *JCI Insight* **3** (2018).
32. Ling L *et al.* Circulating and tumor-infiltrating mucosal associated invariant T (MAIT) cells in colorectal cancer patients. *Sci Rep* **6**, 20358 (2016).
33. Sundström P *et al.* Human Mucosa-Associated Invariant T Cells Accumulate in Colon Adenocarcinomas but Produce Reduced Amounts of IFN- γ . *J Immunol* **195**, 3472-3481 (2015).
34. Nel I, Bertrand L, Toubal A & Lehen A. MAIT cells, guardians of skin and mucosa? *Mucosal Immunol* **14**, 803-814 (2021).
35. O'Shea JJ, Gadina M, Siegel RM & Farber J. Cytokines. In: Hochberg MC, Silman AJ, Smolen JS, Weinblatt ME & Weisman MH (eds). *Rheumatology (Sixth Edition)*. Mosby: Philadelphia, 2015, pp 99-112.
36. Sareneva T, Julkunen I & Matikainen S. IFN-alpha and IL-12 induce IL-18 receptor gene expression in human NK and T cells. *J Immunol* **165**, 1933-1938 (2000).
37. Guo Q *et al.* Downregulation of T-cell cytotoxic marker IL18R1 promotes cancer proliferation and migration and is associated with dismal prognosis and immunity in lung squamous cell carcinoma. *Front Immunol* **13**, 986447 (2022).
38. Flament H *et al.* Outcome of SARS-CoV-2 infection is linked to MAIT cell activation and cytotoxicity. *Nat Immunol* **22**, 322-335 (2021).
39. Fergusson JR *et al.* CD161 defines a transcriptional and functional phenotype across distinct human T cell lineages. *Cell Rep* **9**, 1075-1088 (2014).
40. Braud VM *et al.* LLT1-CD161 Interaction in Cancer: Promises and Challenges. *Front Immunol* **13**, 847576 (2022).
41. Kurioka A *et al.* CD161 Defines a Functionally Distinct Subset of Pro-Inflammatory Natural Killer Cells. *Front Immunol* **9**, 486 (2018).
42. Kurioka A *et al.* Shared and Distinct Phenotypes and Functions of Human CD161⁺⁺ V α 7.2⁺ T Cell Subsets. *Front Immunol* **8**, 1031 (2017).

43. Brinkmann U. Functional polymorphisms of the human multidrug resistance (MDR1) gene: correlation with P glycoprotein expression and activity in vivo. *Novartis Found Symp* **243**, 207-210; discussion 210-202, 231-205 (2002).
44. Bossemmec M, Di Roio A, Caux C & Ménétrier-Caux C. MDR1 in immunity: friend or foe? *Oncoimmunology* **7**, e1499388 (2018).
45. Wang X, & Lin Y. Tumor necrosis factor and cancer, buddies or foes? *Acta Pharmacol Sin* **29**, 1275-1288 (2008).
46. Jo YG *et al.* Activation and Impaired Tumor Necrosis Factor- α Production of Circulating Mucosal-Associated Invariant T Cells in Patients with Trauma. *J Innate Immun* **11**, 506-515 (2019).
47. Castro F, Cardoso AP, Gonçalves RM, Serre K & Oliveira MJ. Interferon-Gamma at the Crossroads of Tumor Immune Surveillance or Evasion. *Front Immunol* **9**, 847 (2018).
48. Ge Y, Huang M & Yao YM. Biology of Interleukin-17 and Its Pathophysiological Significance in Sepsis. *Front Immunol* **11**, 1558 (2020).
49. Lu B *et al.* IL-17 production by tissue-resident MAIT cells is locally induced in children with pneumonia. *Mucosal Immunol* **13**, 824-835 (2020).
50. Won EJ *et al.* Clinical relevance of circulating mucosal-associated invariant T cell levels and their anti-cancer activity in patients with mucosal-associated cancer. *Oncotarget* **7**, 76274-76290 (2016).
51. Shi J *et al.* Single-Cell Transcriptomic Profiling of MAIT Cells in Patients With COVID-19. *Front Immunol* **12**, 700152 (2021).
52. Talwelkar S *et al.* Protocol to utilize fresh uncultured human lung tumor cells for personalized functional diagnostics. *STAR Protocols* **3**, 101720 (2022).
53. Zhang Q, Li P, Zhou W, Fang S & Wang J. Participation of Increased Circulating MAIT Cells in Lung Cancer: a Pilot Study. *J Cancer* **13**, 1623-1629 (2022).
54. Ouyang L *et al.* Mucosal-associated invariant T cells reduce and display tissue-resident phenotype with elevated IL-17 producing capacity in non-small cell lung cancer. *Int Immunopharmacol* **113**, 109461 (2022).
55. Shi L *et al.* Clinicopathological and predictive value of MAIT cells in non-small cell lung cancer for immunotherapy. *J Immunother Cancer* **11** (2023).
56. American Cancer Society Cancer Facts & Figures 2023. Atlanta: American Cancer Society; 2023.
57. Lozano-Ojalvo D, López-Fandiño R & López-Expósito I. PBMC-Derived T Cells. In: Verhoeckx, K. *et al.* (eds). *The Impact of Food Bioactives on Health: in*

vitro and ex vivo models. Springer Copyright 2015, The Author(s). Cham (CH), 2015, pp 169-180.

58. Kleiveland CR. Peripheral Blood Mononuclear Cells. In: Verhoeckx, K. *et al.* (eds). *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models*: Cham (CH), 2015, pp 161-167.
59. Autissier P, Soulas C, Burdo TH & Williams KC. Evaluation of a 12-color flow cytometry panel to study lymphocyte, monocyte, and dendritic cell subsets in humans. *Cytometry A* **77**, 410-419 (2010).
60. Riazi Rad F, Ajdary S, Omranipour R, Alimohammadian MH & Hassa ZM. Comparative analysis of CD4+ and CD8+ T cells in tumor tissues, lymph nodes and the peripheral blood from patients with breast cancer. *Iran Biomed J* **19**, 35-44 (2015).
61. Krijgsman D *et al.* Characterization of circulating T-, NK-, and NKT cell subsets in patients with colorectal cancer: the peripheral blood immune cell profile. *Cancer Immunol Immunother* **68**, 1011-1024 (2019).
62. Shao C *et al.* Decrease of peripheral blood mucosal-associated invariant T cells and impaired serum Granzyme-B production in patients with gastric cancer. *Cell Biosci* **11**, 12 (2021).
63. Wen X *et al.* Title of article: Mucosal-associated invariant T cells in lung diseases. *Int Immunopharmacol* **94**, 107485-107485 (2021).

ETİK KURUL KARARI

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

AKCİĞER KANSERLİ HASTALARDA MUKOZA İLİŞKİLİ İNVARİANT (MAİT) T HÜCRELERİ

ORJİNALLİK RAPORU

%8

BENZERLİK ENDEKSİ

%8

İNTERNET KAYNAKLARI

%4

YAYINLAR

%2

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1

acikbilim.yok.gov.tr

İnternet Kaynağı

%4

2

nek.istanbul.edu.tr:4444

İnternet Kaynağı

<%1

3

acikerisim.erbakan.edu.tr

İnternet Kaynağı

<%1

4

dspace.gazi.edu.tr

İnternet Kaynağı

<%1

5

M.G. Harbour. "Exploiting precedence relations in the schedulability analysis of distributed real-time systems", Proceedings 20th IEEE Real-Time Systems Symposium (Cat No 99CB37054) REAL-99, 1999

Yayın

<%1

6

docplayer.biz.tr

İnternet Kaynağı

<%1

7

www.researchgate.net

İnternet Kaynağı

<%1

ÖZGEÇMİŞ

