

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ

**NÖROBLASTOMDA KANSER KÖK
HÜCRELERİNE MEZENKİMAL KÖK HÜCRE
VE TÜMÖR İNFİLTRE EDİCİ LENFOSİTLERİN
ETKİSİ**

Zübeyde YILDIRIM EKİN

**TEMEL ONKOLOJİ
DOKTORA TEZİ**

İZMİR – 2017

TEZ KODU: DEU.HSI.PhD-2014970084

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ

**NÖROBLASTOMDA KANSER KÖK
HÜCRELERİNE MEZENKİMAL KÖK HÜCRE
VE TÜMÖR İNFİLTRE EDİCİ LENFOSİTLERİN
ETKİSİ**

Zübeyde YILDIRIM EKİN

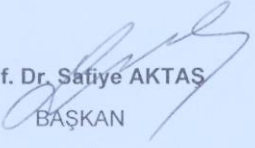
Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. Safiye Aktaş

Bu araştırma DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından 2015. KB. SAG. 021 sayı ile desteklenmiştir

TEZ KODU: DEU.HSI.PhD-2014970084

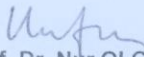
JÜRİ İMZALARI

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Onkoloji Anabilim Dalı, Temel Onkoloji Doktora programı öğrencisi Zübeyde Yıldırım Ekin "NÖROBLASTOMDA KANSER KÖK HÜCRELERİNE MEZENKİMAL KÖK HÜCRE VE TÜMÖR İNFİLTRE EDİCİ LENFOSİTLERİN ETKİSİ" konulu Doktora tezini 10.07.2017 tarihinde başarı ile tamamlamıştır.


Prof. Dr. Safiye AKTAS

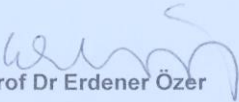
BAŞKAN

Dokuz Eylül Üniversitesi
Temel Onkoloji Anabilim Dalı


Prof. Dr. Nur OLGUN

ÜYE

Dokuz Eylül Üniversitesi
Onkoloji Enstitüsü
Pediatrik Onkoloji Anabilim Dalı


Prof. Dr. Erdener Özer

ÜYE

Dokuz Eylül Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Patoloji Anabilim Dalı

Prof. Dr. Deniz NART

ÜYE

Ege Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Patoloji Anabilim Dalı


Doç. Dr. Yeşim ERTAN

ÜYE

Ege Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Patoloji Anabilim Dalı

Prof. Dr. Zekiye ALTUN
YEDEK ÜYE

Dokuz Eylül Üniversitesi
Onkoloji Enstitüsü
Temel Onkoloji Bilim Dalı

Doç. Dr. Gülden DİNİZ
YEDEK ÜYE

Tepecik Eğitim Araştırma Hastanesi
Patoloji Kliniği

İçindekiler

TABLO LİSTESİ.....	vi
ŞEKİL LİSTESİ.....	vii
KISALTMALAR.....	viii
TEŞEKKÜR	ix
ÖZET	1
ABSTRACT	3
1. GİRİŞ VE AMAÇ	5
1.1 Problemin Tanımı ve Önemi	5
1.2 Araştırmanın Amacı	7
1.3 Araştırmanın Hipotezleri	7
2. GENEL BİLGİLER	8
2.1 Nöroblastom ve Epidemiyolojisi.....	8
2.2 Nöroblastomda Genetik Yatkınlık	9
o Ailesel Nöroblastom	9
o Sporadik Nöroblastom	10
2.3 Patogenez ve Patoloji	10
2.4 Nöroblastomda Moleküler Patogenez	13
2.5 Nöroblastom Gelişiminde Genetik Modeller	15
2.6 Risk Sınıflandırması.....	16
2.7 Kanseri Kök Hücreleri	18
2.8 Mezodermal Kök Hücreleri	19
2.9 Tümör İnfiltrat Edici Lenfositler	21
2.10 Sispatin	22
3. GEREK VE YÖNTEM.....	23
3.1 Araştırmanın Tipi	23
3.2 Araştırmanın Yeri ve Zamanı	23
3.3 Araştırmanın Evreni ve Örneklemi	23
3.4 Çalışma Materyali	23
3.5 Araştırmanın Değişkenleri	23
3.6 Veri Toplama Araçları	24
o Mevcut Olanaklar	24
o Kullanılan Sarf Malzemeler.....	24

○ Kullanılan Kimyasal Maddeler	26
○ Doku örneklerinin Toplanması ve Saklanması.....	26
○ Nöroblastom Hücrelerinin Çoğaltılması	26
○ Nöroblastom Hücrelerinin Pasajlanması	26
○ Death Cell Removal Kit ile Ölü Hücrelerin Uzaklaştırılması	27
○ CD133+ Nöroblastom Kanseri Kök Hücre İzolasyonu.....	27
○ Anti-MSCA-1 (W8B2) Mikrobeat Kiti Kullanarak Mezenkimal Kök Hücre İzolasyonu	28
○ Tümör Örneklerinden TIL İzolasyonu ve Çoğaltılması	28
○ 96 Well Plate Hücre Kombinasyonları	29
○ Flow Sitometrik Annexin V-FITC/PI Boyaması	30
○ Hücre Canlılığının Ölçümü	30
○ Nöroblastom Dokularının Histopatolojik İncelenmesi	31
○ İmmünohistokimyasal Boyama	31
○ İmmünohistokimyasal Değerlendirme	32
3.7 Araştırma Planı ve Takvimi	33
3.8 Verilerin Değerlendirilmesi	34
3.9 Araştırmanın Sınırlılıkları	34
3.10 Etik Kurul Onayı	35
4. BULGULAR	36
4.1 Hücre Kültürü Çalışmaları Bulguları.....	40
4.2 Nöroblastom Hücre Canlılık Değerleri.....	41
4.3 CD133 Kök Hücre Kombinasyonlarının Hücre Canlılık Değerleri	42
4.4 Annexin V- PI bulguları.....	42
○ Apoptoz Bulguları	42
○ Nekroz Bulguları	43
4.5 Treg Flow Sitometri Bulguları	45
4.6 Parafin Kesit Bulguları	45
4.7 Korelasyon Bulguları.....	47
5. TARTIŞMA.....	48
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	54
7. KAYNAKLAR	55
8. EKLER.....	64
8.1 Etik kurul onayı	65

8.2	Tezle İlgili Makaleler.....	67
8.3	Özgeçmiş	71
8.4	Ödüller.....	79



TABLO LİSTESİ

SAYFA NO

Tablo 1: Uluslararası Nöroblastom Patoloji Sınıflandırması	12
Tablo 2: Türk Pediatrik Onkoloji Grubu (TPOG) Nöroblastom 2009 Protokolü Risk Sınıflaması.....	17
Tablo 3: Nöroblastom Hasta Karakteristikleri	39
Tablo 4: Hücrelerin Canlılık, Apoptoz ve Nekroz Oranları	43
Tablo 5: Parafin Kesitteki CD25 Oranı ile Flow Sitometrik Treg Sonuçları.....	45



ŞEKİL LİSTESİ

SAYFA NO

Şekil 1: Nöral Krest Hücreleri ve Farklılaştıkları Hücreler.....	10
Şekil 2: Nöroblastik Tümörlere Ait Histopatolojik Paternler	11
Şekil 3: MYCN Genomik Amplifikasyonu; Homojen Boyanan Bölgeler (HSR) ve Double Minute'lar.....	14
Şekil 4: Nöroblastom Gelişiminde Genetik Modeller	16
Şekil 5: AIM-V Mediumda TIL'lerin Üretilmesi.....	29
Şekil 6: 96 Well Plate'de Hücre Kombinasyonları	29
Şekil 7: EVE Otomatik Canlılık Ölçme Aleti	30
Şekil 8: Araştırma Planı... ..	34
Şekil 9: Nöroblastom İmprintinin Toludin Mavi Boyası ile Boyanmış Görüntüsü....	36
Şekil 10: Hastaların Sağkalım Eğrisi.....	37
Şekil 11: Düşük ve Yüksek Risk Arasındaki Sağkalım Farkı ($p=0.043$).....	38
Şekil 12: NB Hücre Kombinasyonunda Hücre Canlılık Değerleri	41
Şekil 13: CD133 Kök Hücre Kombinasyonlarının Canlılık Değerleri.....	42
Şekil 14: Anneksin V- PI Flow Sitometri Sonuçları... ..	44
Şekil 15: Parafin Blok HE Kesitleri	46
Şekil 16: Nöroblastom Tümör infiltre edici lenfositlerdeki Treg oranları (Flow Sitometri).....	46

KISALTMALAR

NB: Nöroblastom

TMÇ: Tümör mikro çevre

TIL: Tümör infiltre edici lenfositler

NK: Natural killer hücreler

Treg: Düzenleyici T hücreler

MKH: Mezenkimal kök hücresi

KKH: Kanser kök hücresi



TEŞEKKÜR

Bu çalışma Dokuz Eylül Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi (BAP) kapsamında sağlanan maddi desteklerle yapılmıştır. Dokuz Eylül Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi (BAP) komisyonuna, Türk Pediatrik Onkoloji Grubu (TPOG)'na, desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, bize her zaman yol gösterici olan Onkoloji Enstitüsü Müdürü Prof. Dr. H. Nur OLGUN'a, Doktora eğitimim sırasında bilgi ve deneyimlerini aktaran, bana her konuda destek veren, tezimin hazırlanmasında büyük katkıları olan, değerli hocam Prof. Dr. Safiye AKTAŞ'a, Görüşleriyle tezime önemli katlıları bulunan saygıdeğer hocam Prof. Dr. Erdener Özer'e Doktoraya başlamada ve devam ettirmemde emeği olan sayın hocam Doç. Dr. Gülden DİNİZ'e, Birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum Temel Onkoloji çalışanlarına, Sevgi ve desteği ile her zaman yanımda olan; sabır, disiplin ve azim konusunda örnek aldığım, ve bana en büyük desteği veren değerli eşim Uzm Dr. Gökhan EKİN'e ve beni bu günlere getirmek için büyük özveri gösteren, ideallerimi gerçekleştirmede beni her zaman yüreklendiren anneme babama ve kardeşlerime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

NÖROBLASTOMDA KANSER KÖK HÜCRELERİNE MEZENKİMAL KÖK HÜCRE VE TÜMÖR İNFİLTRE EDİCİ LENFOSİTLERİN ETKİSİ

Dr. Zübeyde Yıldırım Ekin

Yazışma Adresi: Dokuz Eylül Üniversitesi, Onkoloji Enstitüsü, Temel Onkoloji
Anabilim Dalı, İzmir

Amaç

Bu çalışmanın amacı; nöroblastom hücreleri, nöroblastom ve KKH'leri ile tümör infiltre edici lenfositler (TIL'ler) ve mezenkimal kök hücreler (MKH) olan tümör mikro çevre elemanları arasındaki etkileşimi ilk defa ex vivo araştırmaktır.

Yöntem

Nöroblastom ameliyat materyali taze dokularından tek hücre süspansiyonu yapıp kültüre edildi. CD133+KKH, nöroblastom tümör dokusundan manyetik izolasyon kullanılarak izole edildi. TIL'ler, AIMV ortamı göç yöntemi MKH ile izole edildi ve CD54+, CD90+ manyetik izolasyon ile izole edildi. İzole edilen hücreler, TIL'ler ve CDDP çok kuyucuklu platelere ekildi. Sonra hücrelerin canlılığı 24 ve 48 saatte ölçüldü. TIL'lerin fenotipi flow sitometri ve immünohistokimyasal yöntemle belirlendi. Nonparametrik sonuçların karşılaştırılması için Mann-Whitney U testi kullanıldı. $P<0.05$ anlamlı kabul edildi.

Bulgular

MKH'ler, CDDP+NB ortamına eklendiğinde canlılık istatistiksel anlamlı artar. TIL'ler, CDDP+NB ortamına eklendiğinde canlılık istatistiksel anlamlı değişmez.

TIL'ler CDDP'in NB hücrelerine apoptotik etkisini istatistiksel anlamlı arttırırken nekrotik etkisini değiştirmez. TIL ve MKH'lerin birlikte CDDP+NB ortamına eklendiğinde canlılık istatistiksel anlamlı değişmez. TIL ve MKH'ler birlikte iken CDDP'in nöroblastom hücrelerine apoptotik ve nekrotik etkisini istatistiksel anlamlı olarak değiştirmez. MKH'ler, CDDP+KKH'si ortamına eklendiğinde canlılık istatistiksel anlamlı artar. TIL'ler, CDDP+KKH'si ortamına eklendiğinde canlılık istatistiksel anlamlı değişmez. TIL'ler CDDP'in KKH'lerine apoptotik etkisini istatistiksel anlamlı değiştirmezken nekrotik etkisini arttırır. TIL ve MKH'lerin birlikte CDDP+KKH'si ortamına eklendiğinde canlılık istatistiksel anlamlı değişmez. TIL ve MKH'ler birlikte iken CDDP'in KKH'lerine apoptotik etkisini istatistiksel anlamlı azaltırken nekrotik etkisini değiştirmez.

Sonuç

MKH'lerin; TIL, NB ve CDDP içeren ortama eklenmesi hücrelerin canlılık, apoptoz ve nekroz oranlarını değiştirmezken TIL, KKH ve sisplatin içeren ortama eklendiğinde canlılık ve nekroz oranını değiştirmediğini ancak apoptoz oranını arttırdiğını bulduk. Bu etkileşimin kanıtlanması, nöroblastom ve KKH'sini hedef alan tedavilerin planlanmasında mikroçevrenin rolü hakkında yararlı bilgiler sunmaktadır.

Anahtar Sözcükler: Nöroblastom, Kanser Kök Hücresi, Mezenkimal Kök Hücre, Mikroçevre, Tümör İnfiltratör Lenfosit

ABSTRACT

EFFECT OF MESENCHYMAL STEM CELLS, TUMOUR INFILTRATING LYMPHOCYTES AND CANCER STEM CELLS IN NEUROBLASTOMA

Dr. Zubeyde Yildirim Ekin

Correspondence Address: Dokuz Eylül University, Institute of Oncology,
Department of Basic Oncology, Izmir

Purpose

The aim of this study is to investigate the interaction between neuroblastoma cells, CSCs and the elements of tumor microenvironment which is tumor infiltrating lymphocytes(TILs) and mesenchymal stem cells(MSC) ex vivo for the first time.

Material Method

CD133+CSC and MSC were isolated using magnetic isolation from cultured neuroblastoma cancer cells. TILs were isolated by AIMV medium migration method. The isolated cells, tumor infiltrating lymphocytes and cisplatin were seeded in multi-well plates. Then the viability of cells measured at 24 and 48 hours. Also phenotype of TILs were identified by flow cytometry and immunohistochemistry. Result were analysed by nonparametric tests at $p<0.05$ level.

Result

When MSCs are added to the CDDP+NB containing medium, the viability increases statistically. When TILs are added to the CDDP+NB containing medium, the viability doesn't change. TILs doesn't alter the necrotic effect of CDDP but increase the apoptotic effect on NB cells. TIL and MSCs together don't alter the apoptotic and

necrotic effects of CDDP on NB. When MSCs are added to CDDP+CSC containing medium, the viability increases. TILs increase the necrotic effect of CDDP. When TIL and MSCs are added together in the CDDP containing medium, the viability doesn't change statistically. While TIL and MSCs are co-administered, the necrotic effect of CDDP isn't altered while the apoptotic effect on CSC.

Conclusion

It was observed that TILs and MSCs together protect neuroblastoma cells from the effect of cisplatin. TILs alone had no effect on CSCs; however MSCs protected CSCs from the effect of cisplatin. Proving this interaction offers useful information to consider microenvironment in planning neuroblastoma and CSC-targeted therapies.

Keywords: Neuroblastoma Cancer Stem Cell, Mesenchymal Stem Cells, Microenvironment, Tumor Infiltrating Lymphocytes

1. GİRİŞ VE AMAÇ

1.1 Problemin Tanımı ve Önemi

Nöroblastom (NB), periferik sempatik sinir sisteminin nöral krest türevli hücrelerinden kaynaklanan, çocukluk çağında görülen en yaygın ekstrakraniyal solid tümördür. NB daha çok adrenal medullada ortaya çıkar ve pediatrik olguların %70'i tanıda metastatik durumdadır (1,2). NB spontan regresyon, iyi huylu bir tümöre matürasyon ve hayatı tehdit eden agresiflik gibi değişken klinik davranışlara sahiptir (3). Ne yazık ki, agresif tedavilere rağmen, NB'lu hastaların uzun vadeli prognozu halen kötüdür ve çocukluk çağı kanseri ile ilişkili ölümlerin %15'inin sebebidir. Bu yüzden NB'nin tedavi yönetimi bir sorun olmaya devam etmektedir. NB'daki tedavi başarısızlığının başlıca nedeni tedavilere karşı direnç gelişmesidir (4). Hastaların prognozlarını iyileştirmek için, tümör progresyonunun ve tedavi direncinin altında yatan mekanizmaların aydınlatılması gerekir.

Tümör mikro çevresi (TMÇ), hücre dışı matriks, sinyal molekülleri ve tümör infiltrate edici inflamatuvar hücreler, tümör ilişkili fibroblastlar, endotel hücreleri gibi tümör dışı hücreleri içerir (5). Kanser hücreleri ile TMÇ arasındaki etkileşim ve iletişim, tümörün gelişimi, büyümesi, invazyonu, metastazı ve ilaç direncinin gelişmesinde kritik rol oynamaktadır (6). Şu anki bilgilerimize göre, her tümör kendi TMÇ'sine sahip olsa da, tümör progresyonundan sorumlu kritik bileşenler kanserler arasında benzerdir (6).

Tümör infiltrate edici lenfositler (TIL), TMÇ'nin önemli bir parçası olarak tümör büyümesinin kontrolünde kritik bir rolü vardır (7). TIL'ler, efektör T hücreleri, T düzenleyici hücreler, natural killer (NK) hücreler, B hücreleri ve diğer immün hücreleri içeren heterojen bir hücre grubudur (7). Bununla birlikte, TIL'lerin başlıca alt popülasyonları, in vitro kültürde CD8+ T hücreleri ve CD4+ T hücreleridir (8). CD8+ sitotoksik T hücrelerinin, CD45RO+ bellek T hücrelerinin ve CD4+ Th1 T hücrelerinin varlığı ve yüksek oranda bulunmaları NB'da dahil birçok solid tümörde iyi prognoz ile koreledir (7,9-11). Kolorektal kanserlerde TNM evresine ve histopatolojik bulgulara göre TIL'lerin tipi, dansitesi ve lokalizasyonları hastalık prognozunu ön görmeye daha başarılıdır (12). TIL'ler ile

ilgili birçok çalışma olmasına rağmen literatürde CD4+ Th2 T hücrelerinin ve düzenleyici T (Treg) hücrelerinin prognoz üzerine etkileri çelişkilidir (7). Olumlu immünolojik bulguların varlığı birçok tümörde kemoterapiye iyi yanıt ile ilişkilidir (7,9,10,13). NB'de T hücre infiltrasyonunun iyi prognoz ile ilişkili olduğu 50 yıl önce yapılan klinikopatolojik çalışmalarda gösterilmiş olmasına rağmen, TIL'lerin NB'de sisplatin kemoterapisine yanıtına olan etkisi araştırılmamıştır (10).

TMÇ'deki tümör stromal hücreleri, inflamatuvar hücrelerin fonksiyonlarının düzenlenmesine birçok aşamada katılır (7,16). Tümör stromal hücreleri morfolojik olarak MKH'lere benzer özelliktedir. MKH'ler, fibroblastlara, perisitlere, adipositlere, miyofibroblastlara ve endotel hücrelerine transformasyon yeteneğine sahiptir (17). MKH'ler perivasküler nişlerde bulunur ve kemik iliği, yağ dokusu, yaralanma alanları ve TMÇ'de dahil olmak üzere hemen hemen her türlü insan dokusunda bulunurlar (18,19). Uygun bir TMÇ sağlamak için interlökin (IL) -6, IL-8, IL-10, CCL-5, CXCR4, CXCL12, dönüştürücü büyüme faktörü (TGF) - β , vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) ve diğer faktörler gereklidir. MKH, tümör büyümesi ve invazyonu için gerekli sinyalleri üretirler (17). Bununla birlikte MKH'ler genotoksik hasara karşı dirençlidir ve malign transformasyon göstermezler (19-22). Ayrıca MKH'ler birkaç solid tümörde doğrudan hücresele etkileşimler ve parakrin faktörlerle kemoterapötik duyarlılığı değiştirirler (18). Karsinom ile ilişkili MKH'ler ve platin ile aktive olan MKH'ler, over, NB, meme ve birçok kanser hücrelerini, karboplatin dahil olmak üzere birçok kemoterapötik ajandan korurlar (18,23-25). MKH'lerinin bu gibi etkilerine rağmen, NB supresyonunda veya progresyonundaki rolü tartışmalıdır (26,27). MKH'lerinin NB supresyonu etkisi, MKH'lerinden büyüme faktörlerinin salgılanması ile NB hücrelerinin nöronal fenotipe doğru farklılaşması aracılığı ile olmaktadır (28). Bunun dışında, MKH'lerinin intratümöral enjeksiyonu, NB hücrelerinin büyümesini azalttığı gösterilmiştir (29). Sonuç olarak literatürde MKH'lerinin NB supresyonu ve progresyonu ile ilgili çalışmalar olmakla beraber bundan sorumlu olan mekanizmalar net olarak anlaşılmamıştır.

Tedavi üzerine TMÇ'nin etkisini araştıran az sayıda çalışma bulunmaktadır. Bugüne kadar hiçbir çalışma, hem TIL'lerin hem de MKH'lerinin NB hücrelerine ve kanser kök hücrelerine (KKH) sisplatin cevabı üzerindeki etkilerini değerlendirmemiştir. Bu çalışmanın amacı, NB olgularında TIL'lerin ve MKH'lerin prognostik değerini belirlemek ve insan NB hücrelerinde sisplatin ile etkileşimi tanımlamaktır.

1.2 Araştırmanın Amacı

Bu çalışmada NB ve KKH'lerinin, mikroçevre elemanlarından olan TIL'ler ve MKH'ler ile etkileşimi, NB ve KKH'lerinin canlılığı, apoptozu ve nekrozu üzerinden araştırılacaktır. NB ve KKH'lerinin mikroçevredeki hücrelerle etkileşiminin kanıtlanması NB ve KKH hedeflenmiş tedavi planlamada mikroçevreyi de göz önüne alıp almama kararında yardımcı bilgiler sunabilir. Planladığımız şekilde yayınlanmış bir çalışma yoktur. MKH ile KKH'leri arasındaki etkileşimin kanser başlatılmasına ilişkin veya kanser tedavisinde KKH'lerinin öldürülmesine ilişkin mekanizmaların öğrenilmesi, NB hücreleri ile baş etmede yeni tedavi stratejileri geliştirilmesinde önemli rol oynayacağı öngörülmüştür.

1.3 Araştırmanın Hipotezleri

KKH, malignitesi yüksek olan, tümörde metastaz ve rekürrensten sorumlu tutulan, tümör başlatıcı hücreler olarak bilinen tümör hücreleri içinde düşük yüzdede kök hücreye benzer özellikler taşıyan hücrelerdir. Bu hücrelerin tümör içinde artmış düzeyleri kötü prognozla ilişkilidir.

Nöroblastom dokusu ve bu dokudan geliştirilmiş hücre hatlarının, kanser kök hücresi içerdiği kanıtlanmıştır. NB mikroçevresinde bulunan MKH'ler ve TIL'ler, KKH'leri üzerine etkilidir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Nöroblastom ve Epidemiyolojisi

NB nöral krest hücrelerinden gelişen bir çocukluk kanseridir. Sıklıkla adrenal medulladan başlamakla birlikte diğer alanlarda ve omurgaya yakın nöral hücrelerden de başlayabilir. Nöroblastom sıklıkla 5 yaş altı çocuklarda gelişir ve hatta bazı kaynaklarda doğumdan öncede başladığı düşünülmektedir. Genelde tümör büyüyerek belirtiler oluşturmaya başladığı zaman saptanmaktadır (30-39). NB, çocukluk çağındaki kanserlerinin %8-10'unu oluşturur (30,33). NB insidansı 7000 canlı doğumda bir olup ABD'de her yıl 800 yeni vaka bildirilmektedir (30,31). Çocukluk çağı kanserleri içerisinde en sık görülen üçüncü kanser olup, ekstrasraniyal tümörlerde ise en sık görülen kanser türüdür (34). Aynı zamanda bir yaş altı çocuklarda görülen kanserlerin en sık nedenidir (34). Pediatrik onkoloji grubu (TPOG)'na göre 1986-2001 arası tanı alan hastaların yaş ortalaması 19 ay'dır (40). Aynı zamanda hastaların %98'i 10 yaşının ve %89'u 5 yaşının altındadır (33). NB'un etyolojisi net olarak bilinmemektedir ancak çevresel maruziyetin kanser oluşmasındaki önemi ile ilgili net bir bilgi yoktur (35,40). Buna karşın ise ürogenital ve kardiyak anomaliler gibi bir kısım konjenital anomaliler ile NB birlikteliği gösterilmiştir (40). Nöroblastik tümörler nöral krest hücrelerinden köken aldıkları için en sık olarak adrenal medullada, daha sonra ise abdomen, pelviste ve daha az sıklıkla mediastende yerleşmektedir (36, 40). NB'lar; Ewing sarkomu, non-hodgkin lenfoma ve rabdomyosarkomların da bulunduğu küçük, mavi, yuvarlak hücreli tümörler grubundandır (39). Aynı zamanda nöroblastom yüksek seviyede katekolamin ve metabolitlerini (VMA, HVA) salgırlar (36).

Genetik olarak, NB heterojen bir gruptur ancak iyi tanımlanmış bir hastalıktır. NB'da MYCN amplifikasyonu kötü prognostik göstergedir (31). NB hücrelerindeki MYCN overekspresyonun olması, proliferasyonu ve DNA sentezini artırır, mitojenik stimülasyon sonrası erken S-fazına ilerlemeyi G1 yolunun progresyonu için hız sınırlayıcı olarak artırır. 17q23-qter kazancı NB'nin %50'den fazlasında görülür (33).

NB diferansiyasyon dereceleri değişkenlik gösterirler; diferansiyasyonu fazla olan tümörler daha iyi prognoza sahiptirler (36-38). İyi diferansiye NB sıklıkla

fokaldır ve cerrahi şansları mevcuttur. Buna karşın az diferansiye NB ise genellikle hızlı yayılım gösterirler ve daha agresiftirler. Bu sebeple diferansiyasyona neden olan tedaviler yaşamı uzatırlar. Bununla birlikte bazı hastalarda spontan yani tedavi olmadan diferansiyasyon ve hatta regresyon gözlenmektedir (36-38). İleri evre nöroblastomlar ciddi tedavilere rağmen kötü prognoz göstermektedir ve gen tedavileri gibi alternatif yeni tedavi yaklaşımlarını gündeme getirmektedir.

2.2 Nöroblastomda Genetik Yatkınlık

○ Ailesel Nöroblastom

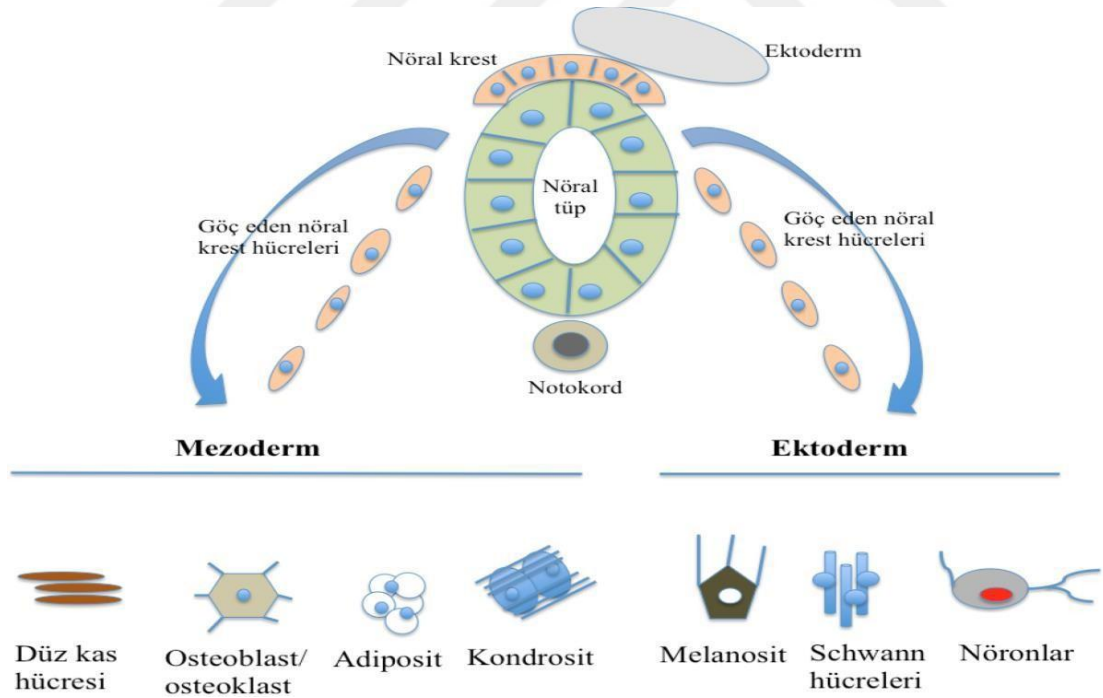
NB olgularının % 1-2'sinde aile öyküsü mevcuttur (40,41). Genetik olarak hastaların çoğunda (%60-70) otozomal dominant (OD) geçiş gösterilmiştir (40,41). Ailesel NB oldukça heterojen bir gruptur spontan regresyonlar olduğu kadar hızlıca metastaz yapan olgular da bildirilmiştir. Diğer nöral krest kökenli anomaliler ile (örn; Hirschsprung hastalığı, santral hipoventilasyon sendromu, nörofibromatozis, feokromasitoma) birlikteliği sıktır. Nörofibromatozis sendromunda görülen NF1, Hirschsprung hastalığında görülen RET, ECE1, ZFH1B, EDNRB, EDN3, GDNF, santral hipoventilasyon sendromunda görülen RET, BDNF, PHOX2B GDNF, EDN3 gibi gen anomalileri nöroblastomun başlamasında ve/veya ilerlemesinde de rol oynamaktadır (42). Net bir şekilde anaplastik lenfoma kinaz (ALK)'deki mutasyonların ve homeodomain (HOX) transkripsiyon faktörü olan paired-like homeobox 2B (PHOX2B)'deki mutasyonların ailesel nöroblastoma neden oldukları belirtilmektedir (43,44). Özellikle PHOX2B'nin, embriyonik gelişim aşamasının erken evrelerinde sinir sisteminin gelişimi ve diferansiyasyonunda oldukça önemli bir rolü olduğu bilinmektedir (45). Yine ALK'daki mutasyonlar ailesel nöroblastomda sık karşılaşılmaktadır. Yapılan fare deneylerinde ALK genindeki F1174L mutasyonunun (en agresif ALK mutasyonudur) nöroblastom oluşumunu başlattığı bildirilmiştir (46). Ayrıca ALK ve MYCN'in birlikte eksprese olduğu nöroblastom tümörlerinde, hastalığın agresifliğini arttırıcı etki yaratmaktadır (46).

○ Sporadik Nöroblastom

Nöroblastomların %98'i sporadik olarak gelişir (40). Çoklu ve düşük frekanslı polimorfizmle birlikte MYCN ve bununla birlikte BARD1 (BRCA-1 ilişkili Ring Domain-1) ve LMO1 (Lim Domain only 1) genetik değişiklikleri eşlik etmektedir ve özellikle BARD1- BRCA1 ile heterodimerizasyonuna neden olabilmektedir (40). LMO1 duplikasyonu ise nöroblastomların %17'sinde bildirilmiştir. Bununla birlikte LMO1 siRNA knockdown çalışmaları sonrası hücre proliferasyonu durmuştur. Ailesel formlarda izlenen ALK mutasyonu sporadik nöroblastomlarda %16 oranında gözlenmektedir (40).

2.3 Patogenez ve Patoloji

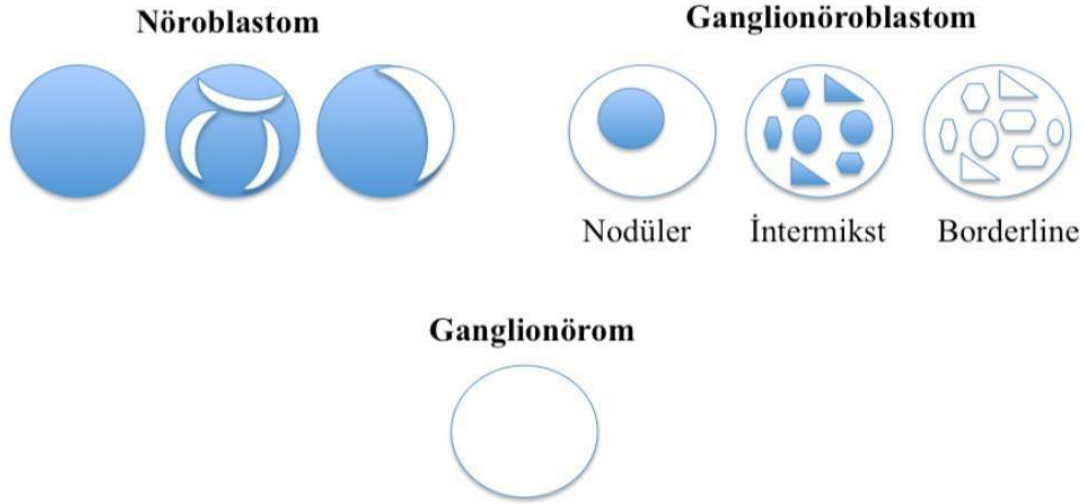
Köken: Nöroblastom, adrenal medulla veya sempatik nöronlardaki nöronal krest kökenli hücrelerin diferansiyasyon un bozulmasına bağlı oluşur (Şekil 1) (36).



Şekil 1: Nöral Krest Hücreleri ve Farklılaştıkları Hücreler.

Olgunlaşma ve diferansiyasyon spektrumu açısından klasik olarak üç adet histopatolojik pattern görülmektedir (Şekil 2):

- 1) Nöroblastom
- 2) Ganglionöroblastom
- 3) Ganglionörom (34).



Şekil 2: Nöroblastik Tümörlere Ait Histopatolojik Paternler.

1) Nöroblastom: Nöroblastomlar küçük mavi yuvarlak hücreli tümörler grubundadır. Dar sitoplazmalı dens hiperkromatik nükleusludur. Nöropil bulunabilir. Homer Wright rozetleri, eozinofilik nöropilin nöroblastom hücrelerini halka gibi sarmasıyla oluşan aslında bir psödorozet olan bir oluşumdur (48).

Nöroblastomlar diferansiyasyon durumuna göre üç tipe ayrılmaktadır.

- a) **Andiferansiye (diferansiye olmamış) nöroblastom:** Küçük yuvarlak, poligonal şekilli, hiperkromatik nükleuslu, dar sitoplazmalıdır ve nöropil içermez.
- b) **Az diferansiye nöroblastom:** Nöropilik bir zemin vardır. İri nükleolleri belirgin hücreleri içerebilir (49).
- c) **Diferansiye nöroblastom:** Gangliyonik diferansiyasyon ile schwannian stroma mevcuttur. Nöropili yoğun bir şekilde içermektedir. Homer-Wright psödorozetleri en sık burda görülür.

2) Ganglionörom: Oldukça diferansiye olan ve benign gidiş gösteren tipteki tümörler ganglionöromadır. En sık posterior mediasten yerleşimlidir. Matür gangliyon hücreleri, Schwann hücreleri ve bol nöropil ve içerirler. Makroskobik olarak iyi sınırlı olup, fibröz bir kapsül içermektedir. Mikroskobik olarak ise uniform görünümlü irregüler yerleşmiş Schwann hücreleri ve bunların arasında dağılmış matür gangliyon hücreleri görülmektedir (34,50-52).

3) Ganglionöroblastom: Nöroblastom ve ganglionöromların diferansiyasyon bulguları dahil olmak üzere histopatolojik özelliklerini de içeren heterojen bir grup tümörü betimlemektedir. Genelde olgun gangliyon hücreleri boyunca ilkel nöroblastlardan oluşmaktadır (34). Çok sayıda araştırmacı histolojik özellikleri temel alarak prognostik sınıflandırmalar yapmıştır. “**Shimada sınıflandırması**” günümüzde en fazla kullanılan sistemdir. Yaş, schwann stroma varlığı veya yokluğu, diferansiyasyon derecesi ve mitotik karyotik indeks (MKI) değerlendirmelerini içermektedir ve tümörün iyi (favorable) ve kötü (unfavorable) olarak sınıflandırır (Tablo 1). Son zamanlarda Shimada dahil bir grup önemli çocuk patoloğu Uluslararası Nöroblastom Patolojik Sınıflamasını (INPC) geliştirmiştir (Tablo 2) (34). POG tarafından kullanılan risk şemasında hastalık evresi, hasta yaşı, INPC histopatoloji sınıflandırması, MYCN amplifikasyon durumu, ploidi ve 1p veya 11q’da allelik kayıp bulunmaktadır (52, 53).

Tablo 1: Uluslararası Nöroblastom Patoloji Sınıflandırması (53).

Shimada	Yaş	Diferansiasyon	Mitoz Karyoreksis İndeksi (MKI)
Prognostik sınıfı			
KÖTÜ	< 18 ay	Andiferansiye	Herhangi
İYİ	< 18 ay	Az diferansiye veya Diferansiye	Düşük (<%2) veya Orta (%2-4)
KÖTÜ	< 18 ay	Herhangi	Yüksek (>%4)
KÖTÜ	18 ay – 5 yıl	Andiferansiye veya Az diferansiye	Herhangi
İYİ	18 ay – 5 yıl	Diferansiye	Düşük (<%2)
KÖTÜ	18 ay – 5 yıl	Diferansiye	Orta (%2-4) veya Yüksek (>%4)
KÖTÜ	> 5 yıl	Herhangi	Herhangi

2.4 Nöroblastomda Moleküler Patogenez

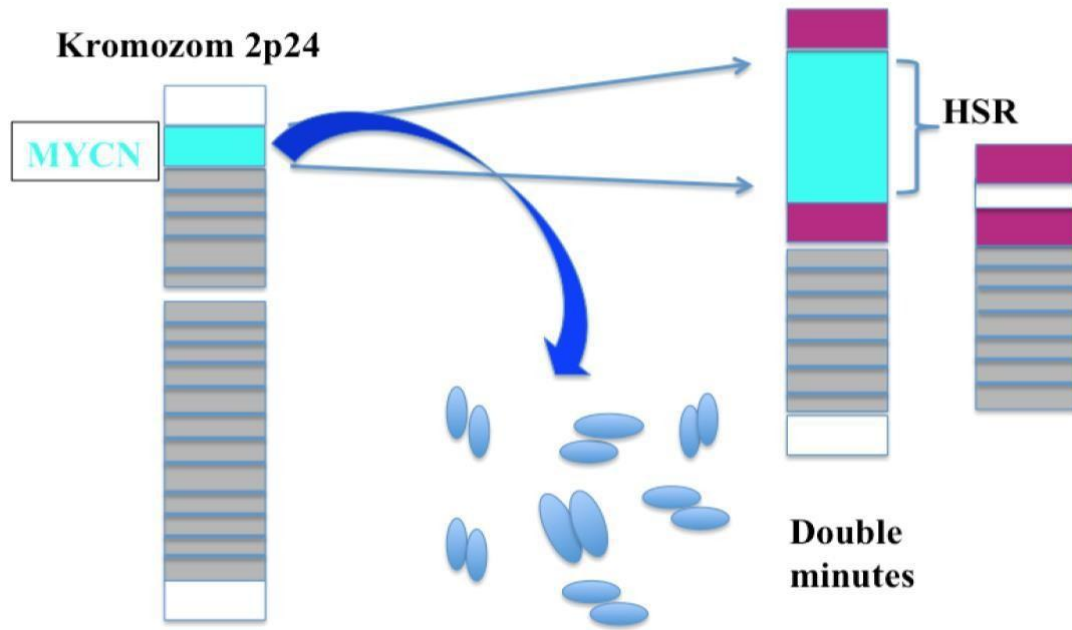
- MYCN (N-myc) amplifikasyonu
- 1p36 delesyonu (LOH)
- 11q delesyonu (LOH)
- 17q25 kazanımı (gain)
- Bazı genlerin (Trka Trkb, NGF, BDNF) ekspresyonundaki değişiklikler (54).

MYCN (N-MYC) Amplifikasyonu

MYCN 2. kromozomun distal, kısa kolunda yerleşmektedir (2p24) (54). MYCN gen ürünü Max proteini ile dimerize olduktan sonra aktif olarak transkripsiyonda görev yapabilmektedir (55). Bu genin amplifikasyonu (kopya sayısının artması) iki şekilde gerçekleşir:

- a) Double minutes kromatin cisimcikleri: Minik kromozom parçaları aracılığı ile olur.
- b) HSR (homojen boyanan bölgeler): Aynı kromozomdaki bazı bölgelerin tekrar etmesi aracılığı ile olur (Şekil 3).

Double minute kromatin cisimcikleri primer tümörlerde daha çok görülürken HSR'ler ise hücre hatlarında daha sık görülmektedir (31,57-60). MYCN overekspresyonu olmasıyla tümörün proliferasyonu, DNA sentezi artar (60). Ayrıca kötü prognostik bir faktör olup anjiyoogenez ve metastazla ilişkilidir (61-63). MYCN geni amplifikasyonu erken evre nöroblastom tümörlerinde yaklaşık %25-30 oranında gözlenir iken metastatik olguların %50'sinde görülmektedir (63).



Şekil 3: MYCN Genomik Amplifikasyonu, Homojen Boyanan Bölgeler (HSR) ve Double Minutelar.

1p36 delesyonu (1p36 LOH: loss of heterozygosity)

Birinci kromozomun kısa kolunda delesyon hastaların %25-35'inde saptanabilmektedir (64). Genellikle MYCN gen amplifikasyonu ile birlikte görülür (53). Mental retardasyon ile ilişkili belirtiler görülebilmektedir (55). TPOG Nöroblastom 2009 protokolünde düşük risk evre 4S olgularda yada evre 2A-2B olup yaşı 18 aydan büyük olanlarda kromozom 1 aberrasyonları dikkate alınmaktadır (30,52).

11q delesyonu (11qLOH)

Olguların %35-45'inde bulunabilmektedir ve kötü prognostik bir belirteçtir (30,52). Farklı olarak bu genomik değişiklik MYCN pozitifliğine sahip tümörlerde genellikle saptanmamaktadır (31). Ancak yüksek riskli özelliklerle (ileri evre, kötü patoloji, ileri yaş) ilişkili olarak bulunmuştur (31).

17q25 kazanımı (17q25 gain)

Hastaların yarısından çoğunda görülmektedir. Genellikle t(1;17) ve t(11;17) şeklinde görülmektedir (30,52). Kötü prognostik bir belirteçtir (30,52). Dengesiz 17q trizomileri ise nöroblastomlarda sık görülmektedir (31).

Bazı genlerin ekspresyonundaki değişiklikler

Nörotrofin reseptörlerinden NTRK1 (TrkA), NTRK2 (TrkB) ve ligandları NGF ve BDNF'nı içeren yolaklarının nöroblastomda maligniteye neden olduğu belirtilmektedir. TrkA/NGF yolağının aktivasyonu apoptozise ve regresyona neden olurken nöroblastomların ise ganglion hücrelerine dönüşümünü uyarmaktadır. TrkB/BDNF yolağı ise daha çok ilaç direnci oluşumu ile ilgilidir. TrkA'nın ekspresyonun yüksek olması iyi prognoz ve iyi klinik bulgular (düşük evre gibi) ile ilişkili iken TrkB'nin ekspresyonun yüksek olması kötü prognoz ve ileri tümör özellikleri ile ilişkilidir (56).

2.5 Nöroblastom Gelişiminde Genetik Modeller

Tip 1:

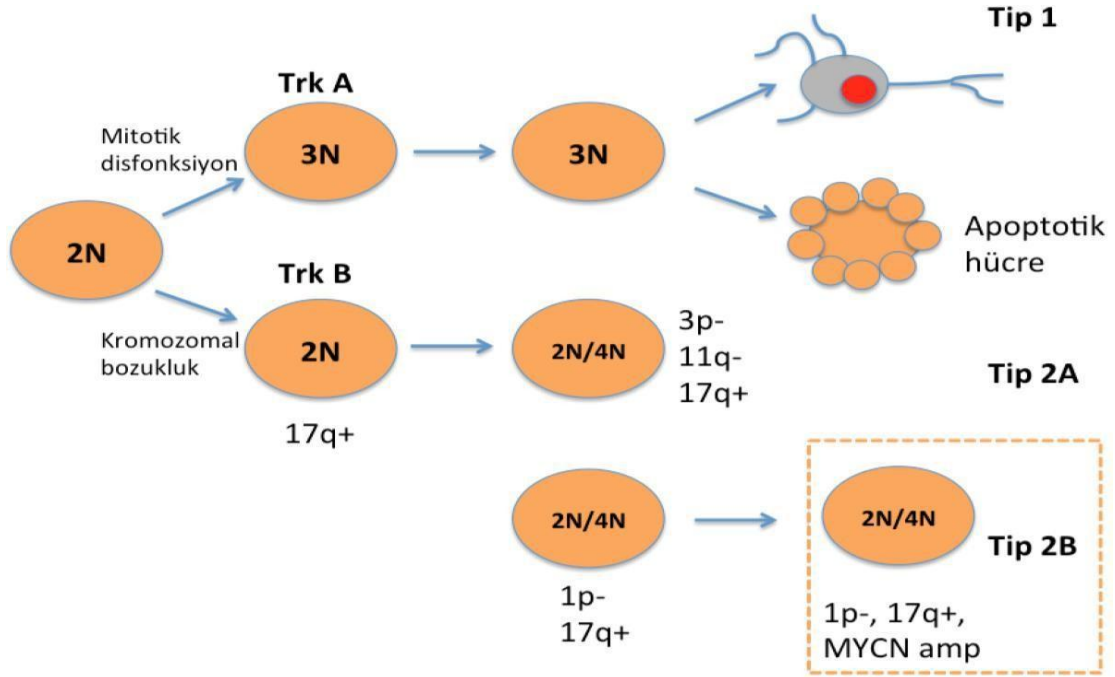
Sıklıkla 1 yaşın altında, hiperdiploid/triploide yakın karyotipli, TrkA yüksek ekspresyonu göstermektedirler. Düşük evre olup iyi prognoz gösterirler (Şekil 4) (22).

Tip 2:

Sıklıkla 1 yaşın üstünde, 11q delesyonu, 3p delesyonu veya 17q kazanımının eşlik edebildiği, TrkB yüksek ekspresyonu gösteren tümörlerdir. İleri evre hastalık grubundadır (Şekil 4) (53).

Tip 3:

Genellikle 1-5 yaş arasında, 1q delesyonu veya 17q kazanımı eşlik edebilen ve MYCN amplifikasyonu bulunabilen tümörlerdir. Ayrıca TrkB ekspresyonu yüksektir. İleri evre hastalık grubundan olup hızlı progresyon gösterirler (53).



Şekil 4: Nöroblastom Gelişiminde Genetik Modeller (52,66).

2.6 Risk Sınıflandırması

INSS evresi, N-myc, yaş ve Shimada histolojisi parametreleri kullanılarak olgular düşük, orta ve yüksek risk grupları olarak değerlendirilmektedir (Tablo 2) (68).

Tablo 2: Türk Pediatrik Onkoloji Grubu (TPOG) Nöroblastom 2009 Protokolü Risk Sınıflaması (53).

Risk Grubu	INSS Evre	Yaş	MYCN	1p veya 11q veya 17q aberasyonu	Shimada	DNA indeks
Düşük risk	1	0-21 yaş	herhangi	herhangi	herhangi	herhangi
	2A-2B	<18ay	herhangi	herhangi	herhangi	herhangi
	2A-2B	≥18ay	(-)	(-)	herhangi	herhangi
asemptomatik	4S	<12 ay	(-)	(-)	iyi	> 1
Orta risk iyi histoloji	2A-2B	≥18ay	(-)	(+)	herhangi	herhangi
	3	herhangi	(-)	(-)	iyi	>1
	4	<18ay	(-)	(-)	iyi	>1
	4S	<12ay	(-)	herhangi	iyi	> 1
Orta risk kötü histoloji	4	<18ay	(-)	herhangi	iyi	1
	3-4	<18ay	(-)	herhangi	kötü	herhangi
	3	herhangi	(-)	(+)	iyi	herhangi
	4S	<12ay	(-)	herhangi	iyi	1
	4S	<12ay	(-)	herhangi	kötü	herhangi
Yüksek risk grubu	2A-2B	≥18ay	amplifiye	herhangi	herhangi	herhangi
	3	0-21 yaş	amplifiye	herhangi	herhangi	herhangi
	3	≥18ay	(-)	herhangi	kötü	herhangi
	4	≥18ay	herhangi	herhangi	herhangi	herhangi
	4	<18ay	amplifiye	herhangi	herhangi	herhangi
	4S	<12ay	amplifiye	herhangi	herhangi	herhangi

2.7 Kanser Kök Hücresi

Kanser kök hücresi farklılaşmamış, kendini yenileyebilen, özelleşmiş hücrelere farklılaşabilen hücrelerdir ve bir solid tümördeki küçük bir popülasyonu tanımlar. Bu hücrelerin büyüme kapasitesi sınırsızdır.

Kanser kök hücresi (KKH) ile ilgili ilk direk kanıt, 1997’de Dick J. ve arkadaşlarının yayımladıkları makale ile gelmiştir. Dick J. ve arkadaşları, akut myeloid lösemili (AML) hastaların kanlarından izole ettikleri malign hücrelerin küçük bir grubunun (yaklaşık 10.000 hücrede <1 hücrenin), diyabetik olmayan ağır immünoşüpresif (NOD/SCID) farelerde orjinal tümörü oluşturabildiğini göstermişlerdir. Araştırmacılar, bu hücre grubunun farklı olarak normal hematopoetik kök hücrelerin fenotipinde olduğunu (CD 34+/CD 38-) belirlemiştir ve kanserin normal kök hücrelerden kaynaklandığı görüşünü ileri sürmüşlerdir (61).

Daha sonraki yıllarda ise, Dick J. ve arkadaşlarının açtığı yoldan diğer araştırmacılar da ilerleyerek, bu grubun “lösemik kök hücrelerini” izole ettiği ve bu hücrelerin kök hücre özelliklerini test ettiği yöntemleri, solid tümörlerde de çalışmışlardır. Bu bağlamda meme kanseri ve glioblastomlarda yapılan araştırmalar başta olmak üzere (2003 ve 2004), kolon kanseri, akciğer kanseri ve prostat kanseri gibi birçok solid tümörde “kanser kök hücreleri” gösterilmiştir (62).

Bir tümör içindeki hücreler görece homojendir. Tümörün oluşmasına ve ilerlemesine yol açan genetik değişiklikler tüm hücrelerde oluşur. Bu nedenle bu yolakların anlaşılması ve tümörün erdike edilmesini sağlayacak tedaviler, tümördeki bu hücreleri kapsamalıdır. Ancak KKH’leri tümörü başlatan küçük bir hücre popülasyonu olup biyolojik ve fonksiyonel olarak diğer hücrelerden farklıdır. Tümördeki hücrelerin büyük çoğunluğuyla karşılaştırıldığında, bu hücrelerde farklı tümörojenik yolaklar işleyecektir. Dolayısıyla, kanser relapsını ve progresyonunu etkili bir şekilde önleyebilecek tedavilerin geliştirilebilmesi için araştırmalar KKH’leri

üzerinde yoğunlaştırılmalıdır. İn-vivo olarak tümör oluşumunu başlatabilecek ve ilerletebilecek kapasiteye sahip olan kök hücrelerin tümörün geri kalan büyük kısmından izole edilmesiyle KKH'lerinin moleküler ve biyolojik temelleri araştırılabilmektedir (61-62).

KKH'lerinin tanımlandığı birçok belirteç bulunmaktadır. Lösemiler için CD34+CD38-, meme kanserinde CD44+CD24-/düşük, beyin, kolon ve akciğer kanserlerinde CD133+, karaciğer kanserinde CD90+CD45- fenotipleri ile tanımlanan kanser tipine özgü çeşitli KKH'leri tanımlanmıştır.

Nöroblastom ve bu tümörden gelişen hücre hatlarının kanser kök hücresi içerdiği kanıtlanmıştır. Nöroblastom hücreleri, kültür ortamında iken iki farklı morfolojide gözlenirler. Bunlardan nöroblastik tipte olanlar daha küçük ve yuvarlak olup sitoplazmik nöritleri bulunmaktadır. Hücre kültür materyaline tutunma oranı azdır. Aralarındaki tutunan hücreler daha sınırlı yaşam gösterirler. Ara hücreler olarak tanımlanan bir üçüncü grup olup, her iki grubun özelliklerini taşır ve bu hücrelerin nöroblastom kök hücresi olduğu gösterilmiştir. Bu hücrelerin malignite potansiyelleri oldukça yüksek olup, tümör içindeki düzeyleri ne kadar çok ise prognoz o kadar kötüdür (60).

2.8 Mezenkimal Kök Hücresi

Kök hücreler erişkin ve embriyonik olmak üzere 2'ye ayrılırlar. Embriyonik kök hücreler, diferansiye olarak herhangi bir organa spesifite gösterebilirler. Erişkin kök hücreler ise daha sınırlı bir proliferasyon ve diferansiyasyon kapasitesine sahiptirler (63).

Mezenkimal stroma hücreleri olarak da bilinen mezenkimal kök hücreler (MSC), andiferansiye erişkin kök hücrelerdir ve en çok kemik iliğinden, göbek bağından,

adipoz dokudan, plasentadan, sinovyumdan ve iskelet kasından olmak üzere birçok dokudan izole edilebilirler.

Mezenkimal kök hücreler, 3 ana kriter olan; in vitro olarak osteoblastlara, adipositlere ve kondroblastlara diferansiye olma yeteneklerine, CD73, CD105, CD90, gibi tipik yüzey markerlarının ekspresyonuna; CD45 ve CD34 gibi hematopoetik markerların eksprese etmemelerine ve kültürde plastik yüzeye tutunmalarına göre tanımlanırlar.

Mezenkimal kök hücrelerden salgılanan insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1), hepatosit büyüme faktörü (HGF), vasküler endotelyal büyüme faktörü(VEGF), interlökin-1 (IL-1), IL-4, IL-5, IL-6, CCL3, CX3CL1, KC, CXCL16, CCL2 ve CCL5 gibi 40'ın üzerinde büyüme faktörü, sitokin ve kemokinlerle tanınırlar (64,65).

Çok sayıda yeni çalışmaya göre mezenkimal kök hücreleri; sadece mezoderm değil mezodermin dışında kalan endotel, nöroektoderm ve endoderm gibi çok çeşitli hücrelerin karakterlerini kazanabilecekleri bildirilmektedir.

Mezenkimal kök hücrelerin kullanıldığı tüm çalışmalarda in vitro olarak çok sayıda pasajdan geçirilerek kültürü yapılmış hücreler kullanıldığı için bu çalışmalar, plastisitesi olan hücrelerde kendini yenileme özelliğinin de olduğunu göstermektedir (65).

Bu çalışmada nöroblastom kanser kök hücrelerinin mikroçevre elemanlarından olan tümör infiltre eden lenfositler ve mezenkimal kök hücreler ile etkileşimi, nöroblastom kanser kök hücrelerinin canlılığı üzerinden araştırılacaktır.

Nöroblastomda kanser kök hücrelerinin mikroçevredeki hücrelerle etkileşiminin kanıtlanması kanser kök hücre hedeflenmiş tedavi planlamada mikroçevreyi de göz önüne alıp almama kararında yardımcı bilgiler sunacaktır. Bu alanda planladığımız şekilde yayınlanmış bir çalışma yoktur. Mezenkimal kök hücreler ile kanser kök hücreleri arasındaki etkileşimin kanser başlatılmasına ilişkin veya kanser tedavisinde kanser kök hücrelerinin öldürülmesine ilişkin mekanizmaların öğrenilmesi, nöroblastomla baş etmede yeni tedavi stratejileri geliştirilmesinde önemli rol oynayacaktır.

2.9 Tümör İnfiltrate Edici Lenfositler

Tümör infiltrate edici lenfositlerin (TIL), TMÇ'nin bir parçası olarak tümör büyümesinin kontrolünde aracılık etmede kritik bir rolü vardır (63). TIL'ler, efektör T hücreleri, T düzenleyici hücreler, doğal öldürücü hücreler, B hücreleri ve diğer immün hücreleri içeren heterojen bir hücre grubudur (7). Bununla birlikte, TIL'lerin başlıca alt popülasyonları, in vitro kültürde CD8+ T hücreleri ve CD4+ T hücreleridir (65). CD8+ sitotoksik T hücrelerinin, CD45RO+ bellek T hücrelerinin ve CD4+ Th1 T hücrelerinin varlığı ve yüksek oranda bulunmaları NB'da dahil birçok solid tümörde iyi prognoz ile koreledir (63,65-67).

Kolorektal kanserlerde TNM evresine ve histopatolojik bulgulara göre TIL'lerin tipi, dansitesi ve lokalizasyonları hastalık prognozunu ön görmede daha başarılıdır (68). TIL'ler ile ilgili birçok çalışma olmasına rağmen literatürde CD4+ Th2 T hücrelerinin ve düzenleyici T (Treg) hücrelerinin prognoz üzerine etkileri çelişkilidir (7). Olumlu immünolojik bulguların varlığı birçok tümörde kemoterapiye iyi yanıt ile ilişkilidir (63,65,66,69). NB'de T hücre infiltrasyonunun iyi prognoz ile ilişkili olduğu 50 yıl önce yapılan klinikopatolojik çalışmalarda gösterilmiş olmasına rağmen, TIL'lerin NB'de sisplatin kemoterapisine yanıtına olan etkisi araştırılmamıştır (65,66,69).

2.10 Sispatin

Güçlü bir antineoplastik ilaç olan sisplatin (cis-diamminedchloroplatinum II), neoplastik hastalıkların tedavisinde kullanılan alkilleyiciler grubundan antineoplastik bir ilaçtır. Erişkinlerde solid tümörlerde, küçük hücreli dışı akciğer kanserinde, baş boyuna ait tümörlerde, over tümörlerinde, mesane tümörlerinde ve serviks tümörlerinde kullanılır. Çocukluk çağı kanserlerinde ise başta nöroblastom olmak üzere Wilms tümörü, germ hücreli tümör, hepatoblastoma, beyin tümörleri, osteosarkoma gibi birçok tümörün tedavisinde kullanılan kemoterapötik bir ajandır. Tedavide kullanılırken ototoksisite, mielosüpresyon, nefrotoksisite, nörotoksisite, gastrointestinal toksisite, kardiyovasküler hasar gibi sınırlayıcı yan etkileri göz önünde bulundurmak gereklidir (64,65).

Kolon ve küçük hücreli dışı akciğer kanseri sisplatine direnç gösterirken, nöroblastom, over, testis, baş boyun tümörleri gibi tümörler sisplatine duyarlıdır. Ancak sisplatinle tedavi edilebilen tümörlerin çoğu tedaviden bir süre sonra direnç geliştirmektedirler. Sisplatin direncine sebep olabilecek nedenler arasında hücrelerdeki ilaç birikiminin azalması, sülfür içeren bileşiklerin inaktivasyonu, apoptoz proteinlerinin ekspresyon değişiklikleri sıralanırken nükleotid eksizyon onarım genlerindeki değişiklikler de önemlidir. Örneğin sisplatine duyarlı testis tümörlerinde ve dirençli mesane tümörlerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada sisplatine duyarlı testis tümörlerinde NER kapasitesinin daha düşük olduğu bildirilmektedir (68).

Bu çalışmanın amacı nöroblastom kanser kök hücrelerinin mikroçevre elemanlarından olan tümör infiltre eden lenfositler ve mezenkimal kök hücreler ile etkileşimini araştırmaktır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Araştırmanın Tipi

Bu araştırma, ilaç dışı girişimsel olmayan bir klinik araştırmadır. Araştırma, kontrollü ve tek kör bir çalışma olarak tasarlanmış ve gerçekleştirilmiştir.

3.2 Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Bu araştırma **21.03.2014** tarihinde literatür taraması ile başlamış olup, **10.07.2017** tarihinde tez savunması ile sonlandırılmıştır. Araştırma, gerekli olan biyogüvenlik düzeylerine uygun donanımına sahip Dokuz Eylül Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

3.3 Araştırmanın Evreni ve Örneklemi

Bu çalışmanın evreni olarak, Türkiye'nin çeşitli hastanelerinde nöroblastom tanısı almış 18 yaş altı hastalar seçilmiştir. Bu dokular içerisinde seçilen, 10'u kız ve 10'u erkek olmak üzere düşük risk grubuna giren 8 hasta ve yüksek risk grubuna giren 12 hasta olmak üzere toplam 20 hasta çalışmanın örneklemi oluşturmuştur.

3.4 Çalışma Materyali

Bu araştırmada, Türkiye'de çeşitli hastanelerde nöroblastom patolojik tanısı almış olan hastalardan gönderilen taze nöroblastom tümör doku örnekleri kullanılmıştır.

3.5 Araştırmanın Değişkenleri

Apoptozis ve proliferasyon değerleri kantitatif olarak değerlendirilecek ve student t-test ile analiz edilecektir. Ayrıca bu değişkenler kategorik olarak da değerlendirilecek ve bulgular ki-kare ve Mann-Whitney U testiyle analiz edilecektir.

Bağımlı değişken: nöroblastom hücrelerindeki apoptoz nekroz ve canlılık

Bağımsız değişken: kanser kök hücresi, mezenkimal kök hücre ve tümör infiltratör lenfositler

3.6 Veri Toplama Araçları

- **Mevcut Olanaklar**

Akım Sitometri (BD Accury C6)
Hassas Terazı (Sartorius BP221S)
ELISA Reader (Thermo)
Real time PCR
Vorteks(Velp Scientifica ZX3)
Saf su sistemi
Mikroskop olympus bx50
Derin dondurucu (Sanyo)
Sıvı azot tankı
Laminar Flow
Mikrosantrifüj (Thermo)
CO2 inkübatörü (Thermo)
Pastör fırın (Thermo)
Soğutmalı santrifüj (Heraeus)
ELISA Reader (Thermo)
-80 °C dondurucu (Nüve)
Manyetik İzolasyon Cihazı
İnverted mikroskop
-80°C derin dondurucu

- **Kullanılan Sarf Malzemeler**

CD133 manyetik izolasyon boncuğu (25 testlik)
CD133 monoklonal antikoru (50 testlik)
CD54 manyetik izolasyon boncuğu
CD54 monoklonal antikoru
CD90 manyetik izolasyon boncuğu
CD90 monoklonal antikoru
Annexin V (100 testlik)
Propidium İyodide
WST-1 hücre canlılığı reaktifi (25 ml)
Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)

DMEM
RPMI 1640
Penisilin/Streptomisin
L-Glutamin
Antimikotik
Tripsin/EDTA
Steril PBS
Heat activated FBS
DMSO
Tek hücre süspansiyonu oluşturmak için filtre
İnsülin enjektörü
İnkübatör sterilizasyonu için farmasidal solüsyon
Vakumlu filtre sistemi (500 ve 1000 ml'lik)
Mr. Frosty
Otomatik üçlü pipet seti (1-10 μ l, 10-100 μ l, 100-1000 μ l)
Pipet tabancası
İnkübatör içi su küveti (4 adet)
Steril pipet 2 ml'lik
Steril pipet 5 ml'lik
Steril pipet 10 ml'lik
Steril pipet 25 ml'lik
Steril pastör pipeti
Ependorf (0.5 ml'lik, 1.5 ml'lik ve 2 ml'lik)
6 kuyucuklu pipet
96 kuyucuklu pipet
75 cm² lik flask
25 cm² lik flask
Kriyoviyal
Kriyoviyal saklama kutusu
Lizinli lam
Lamel
Lam saklama kutusu (50'lik)

Savlon

Filtreli kapaklı 5 ml'lik polistren flow sitometri tüpü

Sarı pipet ucu

Mavi pipet ucu

○ **Kullanılan Kimyasal Maddeler**

Sisplatin (Koçak) medium içinde çözülerek çalışma öncesi taze olarak hazırlanmıştır. Çalışma sırasında 96 well plate içerisinde belirlenen yerlere insülin enjektörü yardımıyla uygulandı.

○ **Doku örneklerinin Toplanması ve Saklanması**

TPOG 2009 rutin analizler için gönderilen doku örneklerinden nöroblastom patolojik tanısı olan örnekler kullanılmıştır.

○ **Nöroblastom Hücrelerinin Çoğaltılması**

Yapılmış olan bu çalışmada, nöroblastom ameliyat materyali taze dokularından tek hücre süspansiyonu oluşturmak için filtre kullanılarak tek hücre süspansiyonu yapıldı. Steril pipet kullanılarak 75 cm²'lik flasklara alındı. Hücreler inkübatöre konulmadan önce inkübatör farmasidal solüsyon ile silindi. Tümör hücreleri, %10 heat activated FBS, %1 L-Glutamin ve %1 penisilin/streptomisin ve %1 antimikotik içeren ortamda 33°C'de, %10 CO₂ ve %95 nemli DMEM ortamında inkübatör içi su kuvetinde kültüre edildi ve vakumlu filtre sistemi kullanıldı. Hücreler %95 konfluent olduğunda 1/2 oranında pasajlandı ve steril pastör pipeti kullanılarak 25 cm²'lik flasklara alındı. Mezenkimal kök hücre, CD133+ kök hücre izolasyonu için uygun miktarda hücre popülasyonuna ulaşana dek kültür süreci devam ettirildi. Kök hücre izolasyonundan önce ölü hücreleri ortamdan ayırmak için death cell removal kiti uygulandı.

○ **Nöroblastom Hücrelerinin Pasajlanması**

Hücreler %95 konfluent olduğunda kültür ortamı uzaklaştırıldı ve PBS (5 ml) ile yıkandı. Ardından ortamdan PBS uzaklaştırıldı, tripsin (5 ml) eklendi ve 33°C'de %10 CO₂ ile 3 dakika inkübasyona bırakıldı. Ortamdaki tripsini inaktive etmek için 10 ml eklenerek 1200 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant otomatik üçlü pipet

seti kullanılarak uzaklaştırıldı ve pellet kısmı daha önceden belirlenen flasklara aktarıldı. Flaskların dışı savlonla silinerek DMSO ortamında yeterli yoğunluğa ulaşıncaya kadar kültüre edildi.

○ **Death Cell Removal Kit ile Ölü Hücrelerin Uzaklaştırılması**

Kültüre edilen hücrelerin ortamları uzaklaştırılıp steril PBS ile yıkandı. Daha sonra tripsin-EDTA solüsyonu ile muamele edilerek hücrelerin kalkması sağlandı. 1:1 oranda ortamlar eklenip hücreler falkon tüpler içinde 300g 10 dk santrifüj edildi. Elde edilen hücre pelleti üzerindeki süpernatant uzaklaştırıldı. Kitte belirtildiği gibi hücre pelletini 60 mikrolitre buffer ile resüspanse edildi. Kitin içinden çıkan 20 mikrolitre FcR blocking reagent ve 20 mikrolitre Death Cell Removal mikrobeat, pipet tabancası ve steril pipet kullanılarak ortama eklendi. 15 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra hücreler 1-2 ml buffer ile yıkandı. 300g 10 dakika santifüj edildi. Kolonu manyetik alana yerleştirip önce 500 mikrolitre ile yıkandı ve daha sonra hücreler manyetik alandan geçirilip 3x500 mikrolitre buffer ile tekrar yıkandı. Böylece ölü hücreler manyetik alanda takıldı ve elimizde ependorfa aldığımız sadece canlı hücreler kaldı. Kalan hücreler 6 kuyucuklu well plate içerisine alındı ve Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) içerisinde kültüre edildi.

○ **CD133+ Nöroblastom Kanser Kök Hücre İzolasyonu**

Kültüre edilen hücrelerin ortamları uzaklaştırılıp ve PBS ile yıkandı. Daha sonra tripsin-EDTA solüsyonu ile muamele edilerek hücrelerin kalkması sağlandı. 1:1 oranda ortamlar eklenip hücreler falkon tüpler içinde 300g 10 dakika santrifüj edildi. Elde edilen hücre pelleti üzerindeki süpernatant uzaklaştırıldı. Kitte belirtildiği gibi hücre pelleti 60 mikrolitre buffer ile resuspanse edildi. Kitin içinden çıkan 20 mikrolitre FcR blocking (CD133 monoklonal antikoru) reagent ve 20 mikrolitre CD133 manyetik izolasyon boncuğu eklendi. Soğuk odada tube rotator ile 15 dk yavaş bir şekilde çalkalandı. Daha sonra hücreler 1-2 ml buffer ile yıkandı. 300g 10 dakika santifüj edildi. Kolonu manyetik alana yerleştirip önce 500 mikrolitre ile yıkandı daha sonra hücreler manyetik alandan geçirilip 3x500 mikrolitre buffer ile tekrar yıkandı. Manyetik alanda tutulan CD133+ hücreler kolonun pistonu itilerek toplama tüpünde toplandı. Böylece CD133+ nöroblastom kanser kök hücreleri izole edilmiş oldu.

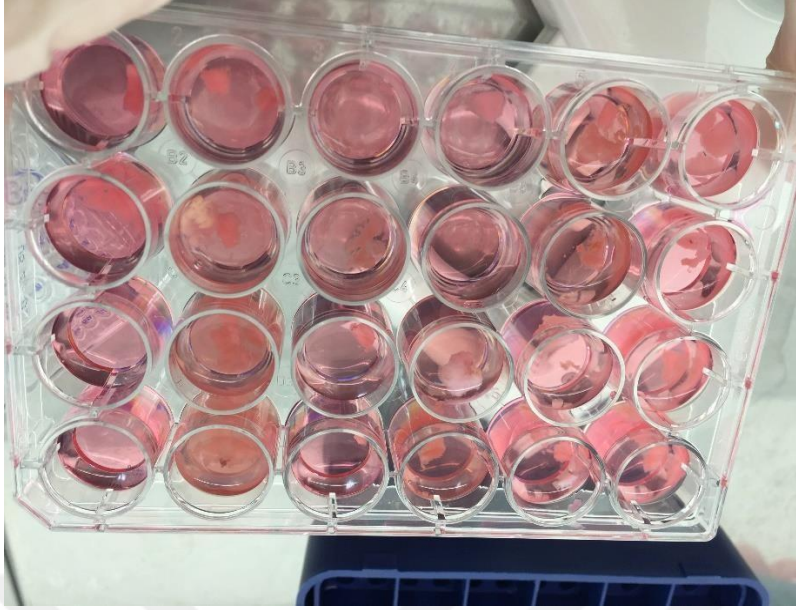
Manyetik alana takılmayan hücreler ise ayrı bir tüpte toplandı. Bu, CD133- olan hücreler mezenkimal kök hücre ayırımı için kullanıldı.

○ **Anti-MSCA-1 (W8B2) Mikrobeat Kiti Kullanarak Mezenkimal Kök Hücre İzolasyonu**

CD133 mikrobeat kiti kullanılarak CD133+ hücrelerin ayrıldığı, geride kalan hücre popülasyonu kullanıldı. Hücreler falkon tüpler içinde 300g 10 dakika santrifüj edildi. Elde edilen hücre pelleti üzerindeki süpernatant sarı pipet ucu kullanılarak uzaklaştırıldı. Mezenkimal kök hücreler, kültüre edilen hücrelerden CD54+, CD90+ önce monoklonal antikorları bağlanarak (CD54, CD90 monoklonal antikor) daha sonra CD54 ve CD90 manyetik izolasyon boncukları ile manyetik izolasyonla ayrıştırıldı. Kite belirtildiği gibi hücre pelleti 60 mikrolitre buffer ile resuspanse edildi. Kite içinden çıkan 20 mikrolitre FcR blocking reagent ve 20 mikrolitre Anti-MSCA-1 (W8B2) mikrobeat eklendi. İyi karıştırılıp 2-8°C de 15 dakika bekletildi. Daha sonra hücreler 1-2 ml buffer ile yıkandı. 300 g de 10 dakika santrifüj edildi. Kolonu manyetik alana yerleştirip önce 500 mikrolitre ile yıkandı daha sonra hücreler manyetik alandan geçirilip 3x500 mikrolitre buffer ile tekrar yıkandı. Manyetik alanda tutulan mezenkimal hücreler kolonun pistonunu itilerek toplama tüpünde toplandı. Manyetik alana takılmayan hücreler ise ayrı bir tüpte toplandı ve RPMI 1640 ortamında kültüre edildi.

○ **Tümör Örneklerinden TIL İzolasyonu ve Çoğaltılması**

Her tümör örneği çevresindeki normal doku ve nekrotik alandan tamamen ayrılarak klas 2 kabinet içinde steril ortamda çalışıldı. Tümör örneği, steril bir bisturi ile farklı kısımlarından yaklaşık 2-3 mm büyüklüğünde olacak şekilde parçalara ayrıldı. Tümör fragmanları, flasklara yerleştirildi ve üzerlerine lenfositleri çoğaltmaya uygun AİM-V, doku yüzeyini kaplayacak kadar ilave edildi. Flask nemli, 37°C, %5 CO₂ inkübatöre kondu. Lenfosit göç ve çoğalması gözleninceye kadar inkübe edildi. İnverted ışık mikroskopunda günde iki kere gözlem yapıldı. Tipik olarak yaklaşık 1 hafta sonra her fragmanın çevresinde yoğun lenfositik göç görünümünü alması gözlemlendi. Göç eden TIL varlığı gözlemlendiğinde tümör fragmanı mavi pipet ucu kullanılarak flasktan alınıp GM-CSF ve IL-2 eklenerek TIL'ler çoğaltmaya bırakıldı. İmmunhistokimya ile TIL'lerin lenfosit olduğu konfirme edildi.



Şekil 5: AIM-V Mediumda TIL'lerin Üretilmesi

İşi biten nöroblastom dokuları kriyoviyal tüpünde DMSO ortamına alınarak Mr Frosty yardımı ile yavaş yavaş -80°C olacak şekilde soğutuldu.

○ **96 Well Plate Hücre Kombinasyonları**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	(KKH) Kontrol											
B	TIL + Kanser Kök Hücreleri (CD133+)											
C	TIL + Mezenkimal Kök Hücre + KKH											
D	Mezenkimal Kök Hücre + KKH											
E	(KKH) + CDDP											
F	TIL + Kanser Kök Hücreleri (CD133+) + CDDP											
G	TIL + Mezenkimal Kök Hücre + KKH + CDDP											
H	Mezenkimal Kök Hücre + KKH + CDDP											

Şekil 6: 96 Well Plate Hücre Kombinasyonları

○ Flow Sitometrik Annexin V-FITC/PI Boyaması

Annexin V-FITC/Propidium Iodide (PI) boyaması apoptotik hücre ölüm oranını kantitatif olarak belirlemek için; kanser kök hücrelerine, tümör infiltre edici lenfosit hücreleri, mezenkimal kök hücreleri ve sisplatin kombinasyonlarının uygulanması sonrasında yapıldı. Kanser kök hücreleri lamlara yayıldı. Annexin V-FITC apoptoz deteksiyon kiti kullanılarak protokole uygun olarak boyandı. Ajan uygulamaları sonrasında hücreler PBS ile 3'er kez yıkandı ve ortam içinde resüspanse edildi. Daha sonra nöroblastom kanser kök hücreleri oda sıcaklığında 15 dakika Annexin V-FITC ve PI ile inkübe edildi. Daha sonra lameller kapatıldı. Flow sitometrik olarak ölçümler yapıldı.

○ Hücre Canlılığının Ölçümü

EVE™ otomatik hücre sayım cihazı kullanılarak canlı, ölü ve toplam hücre sayısı ve canlılık yüzdesini belirlendi. Bu cihaz standart tripan mavisi tekniği kullanılarak hücre sayısını ve yaşayabilirliğini (canlı, ölü ve toplam hücreleri) doğru ve hassas bir şekilde ölçmek için tasarlanmış sayacıdır.



Şekil 7: EVE Otomatik Canlılık Ölçme Aleti

Ayrıca hücreler tripsin ile kaldırılarak 200 µl'de 1×10^4 yoğunluğunda olacak şekilde hesaplanarak 96 kuyucuklu plaklara ekim yapıldı. Gece boyu 33°C %10 CO₂'de inkübasyona bırakılan hücreler ertesi gün %75-80 konfluent seviyesinde olduğunda hücrelerden süpernatant kısmı ortamdan uzaklaştırıldı. Hücre canlılığı için belirlenen saatlerde plaklara 10 µl/kuyucuk WST-1 eklenerek hücreler 2 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra ELISA okuyucuda 450/630 nm de okutuldu. Kontrol hücre canlılığı %100 kabul edilerek sisplatin uygulamaları ve diğer kombinasyonlardaki hücre canlılıkları yüzde olarak hesaplanarak sağlanması yapıldı.

○ **Nöroblastom Dokularının Histopatolojik İncelenmesi**

Hastalardan alınan nöroblastom dokuları 10 vaka 1 blokta olacak şekilde doku mikroyarray yöntemi ile parafin bloklara gömüldü. Daha sonra 4 mikronluk kesitler alınarak incelendi.

○ **İmmünohistokimyasal Boyama**

İmmünohistokimyasal değerlendirme streptavidin biotin peroksidaz methoduna göre yapıldı. Bu methodda, immünohistokimyasal inceleme için her hastanın H&E ile boyalı preparatlarından kanama ve nekroz içermeyen ve tümörü en iyi temsil eden blok seçilerek önce lamda, sonra blokta işaretlenerek, 2 mm çapında silindirik parafinize doku örnekleri donör bloklardan alınıp, haritalandırma, adresleme tekniği kullanılarak çoklu bloklar hazırlanmıştır.

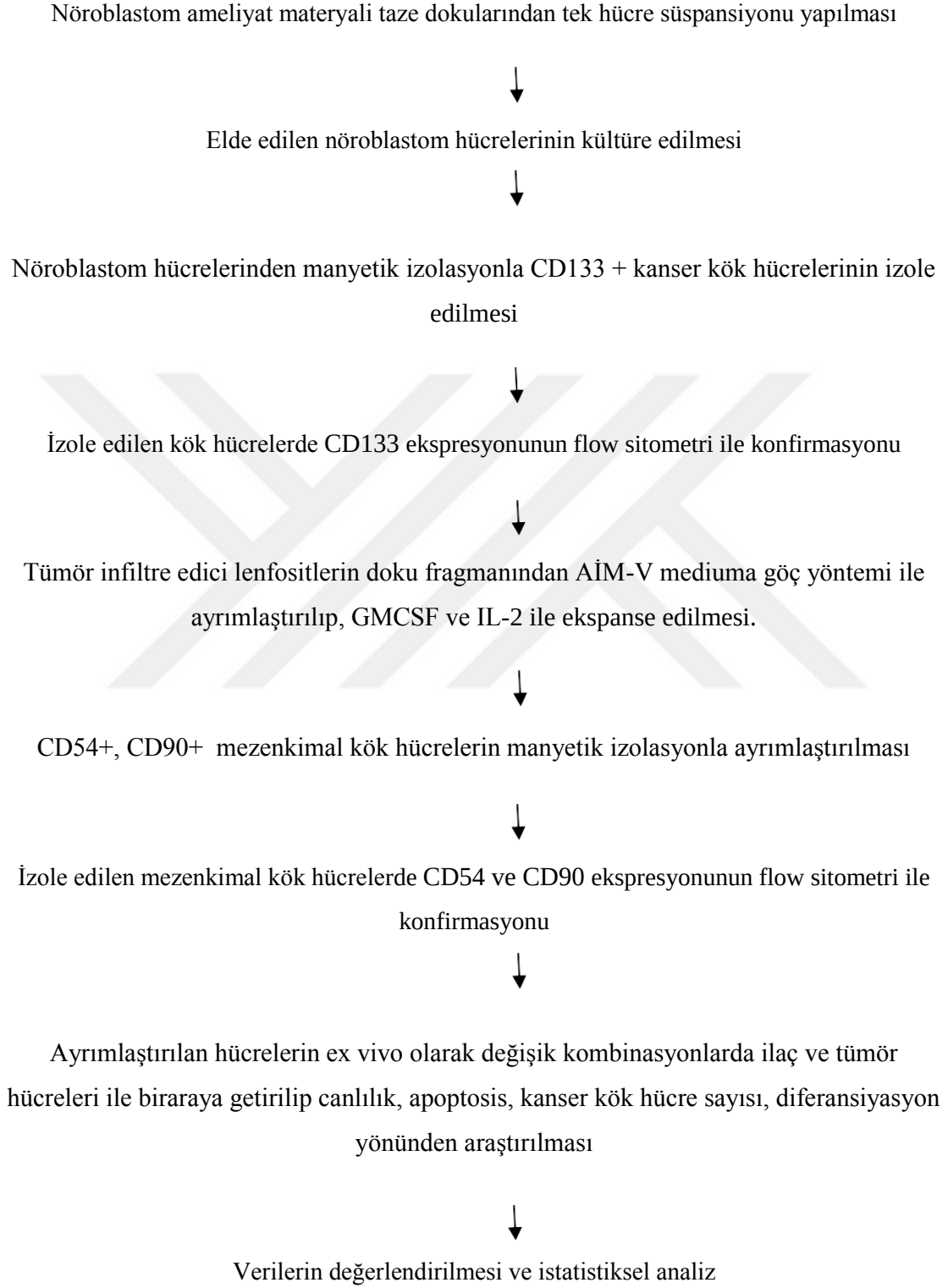
Hazırlanan bloklardan Ant marka lizinli lamlara 4 mikron kalınlığında kesitler alındı. Alınan kesitlerden CD4 (1:150 dilüsyon, Dako, Glostrup, Danimarka), CD8 (1:150 dilüsyon, Dako, Glostrup, Danimarka), CD25 (1:150 dilüsyon, Dako, Glostrup, Danimarka), CD3 (1:150 dilüsyon, Dako, Glostrup, Danimarka), CD20 (1:150 dilüsyon, Dako, Glostrup, Danimarka) ile boyama yapıldı. İHK boyama için Ant marka poly-L-lizin ile kaplı lamlara alınan kesitlere etüv içerisinde 60°C derecede 1

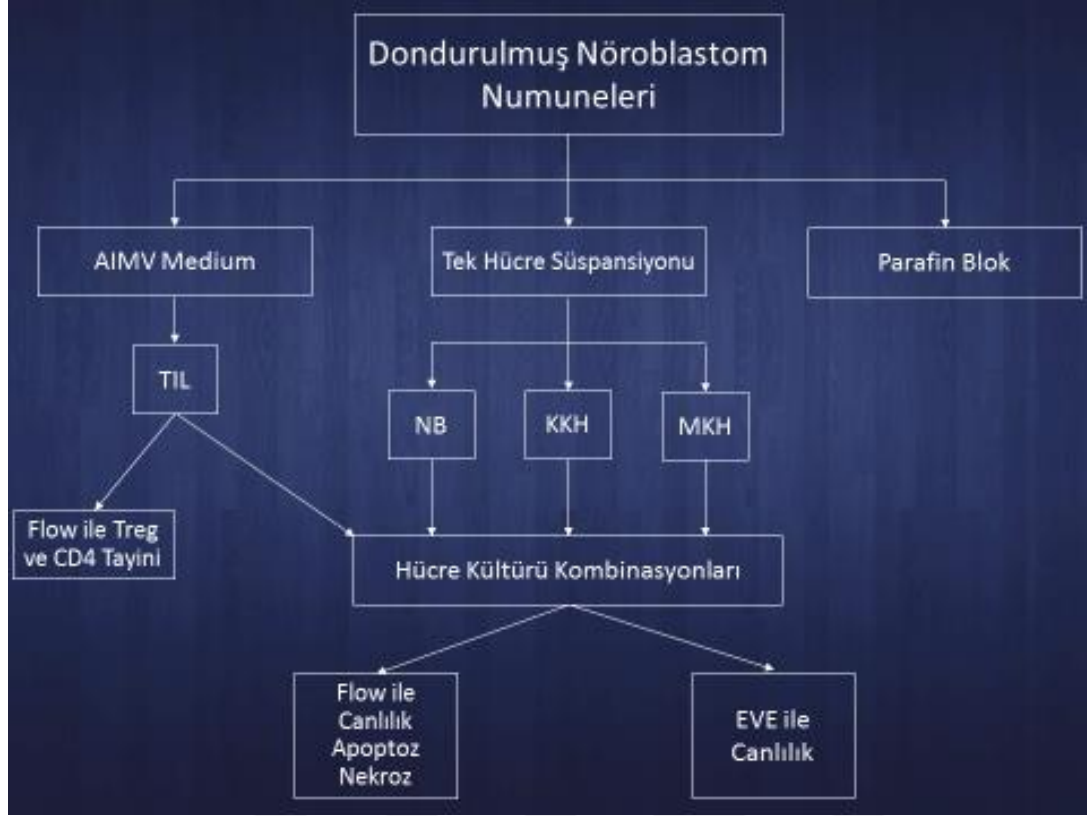
saat deparafinizasyon işleminden sonra DAKO PT LINK cihazında 65 derecede 20 dakika pH 6.0 sitrat solüsyonunda kaynatma işlemi yapıldı. Lamlar buffer solüsyonunda 5 dakika soğumaya bırakıldı. 1 saat boyunca biotin-avidin yöntemiyle 1/200 dilüsyondaki primer antikörle oda ısısında bekletildi, boyanan kesitler ışık mikroskopunda incelendi.

○ **İmmunohistokimyasal Değerlendirme**

İmmunohistokimyasal boyalı preperatlar iki patolog (SA, ZYE) tarafından değerlendirildi. Her vakada her immün için 10 büyük büyütme alanındaki boyanan hücre sayısı sayılarak 10'a bölündü. Sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildi.

3.7 Araştırma Planı ve Takvimi





Şekil 8: Araştırma Planı

3.8 Verilerin Değerlendirilmesi

Araştırma sonuçlarının istatistik analizi, SPSS için Windows istatistik programının 15.0 versiyonu kullanılarak $p < 0.05$ anlamlılık düzeyinde incelenmiştir. Canlılık testlerinde her bir koşul için 3 kuyucuk kullanıldı. Canlılıklar yüzde olarak hesaplandı. Non parametrik bağımsız iki grupta ortalamaların karşılaştırılması için Mann-Whitney U testi kullanıldı.

Apoptozis ve proliferasyon değerleri kantitatif olarak değerlendirildi ve student t-test ile analiz edildi. Ayrıca bu değişkenler kategorik olarak da değerlendirildi ve bulgular ki-kare ve Mann-Whitney U testi ile analiz edildi.

3.9 Araştırmanın Sınırlılıkları

Bu çalışmanın çeşitli sınırlamaları vardır. Bu araştırmanın sınırlılıkları arasında öncelikle hasta sayısı gelmektedir. Yaptığımız gruplamalarda hasta sayısı 30'un

altında kalmış olup, nonparametrik testler kullanılmak zorunda kalınmıştır. Grup sayısının 30'un üstüne çıkması daha sağlıklı sonuçlar verecektir.

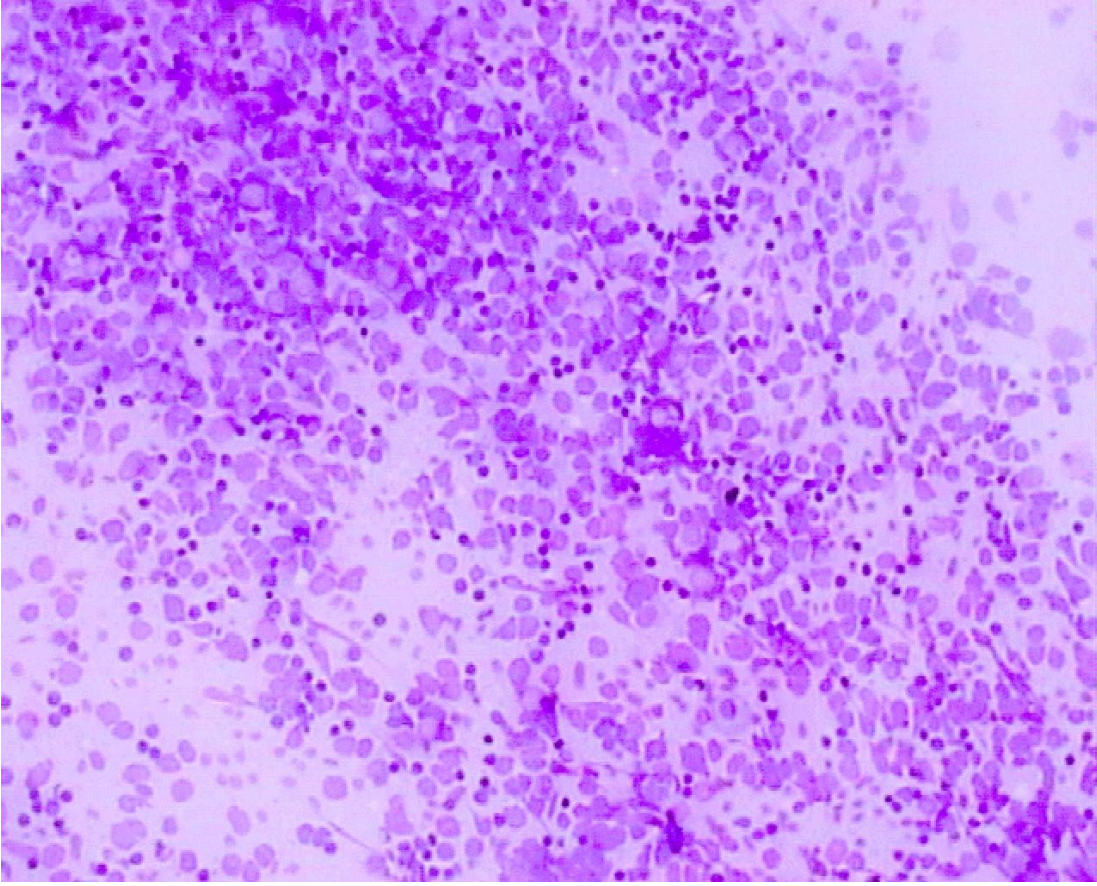
Ayrıca deneylerde NB hücreleri olarak CD133- ve Anti-MSCA-1- hücreleri kullandık. Bununla birlikte, CD133-Anti-MSCA-1- hücreleri sadece NB hücreleri içermemektedir. İkincisi, bu çalışmada MKH'lerin farklılaşma testi yapılmadı. MKH'lerin ve MKH'nin fibroblastlar, osteojenik, adipogenik, endotel hücreleri gibi farklılaşmış hücrelerin sayı ve dağılımı bilinmemektedir.

3.10 Etik Kurul Onayı

Çalışmaya Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Etik Kurul tarafından 1568-GOA protokol numarası ile etik kurul onayı alınmıştır (Ek 1).

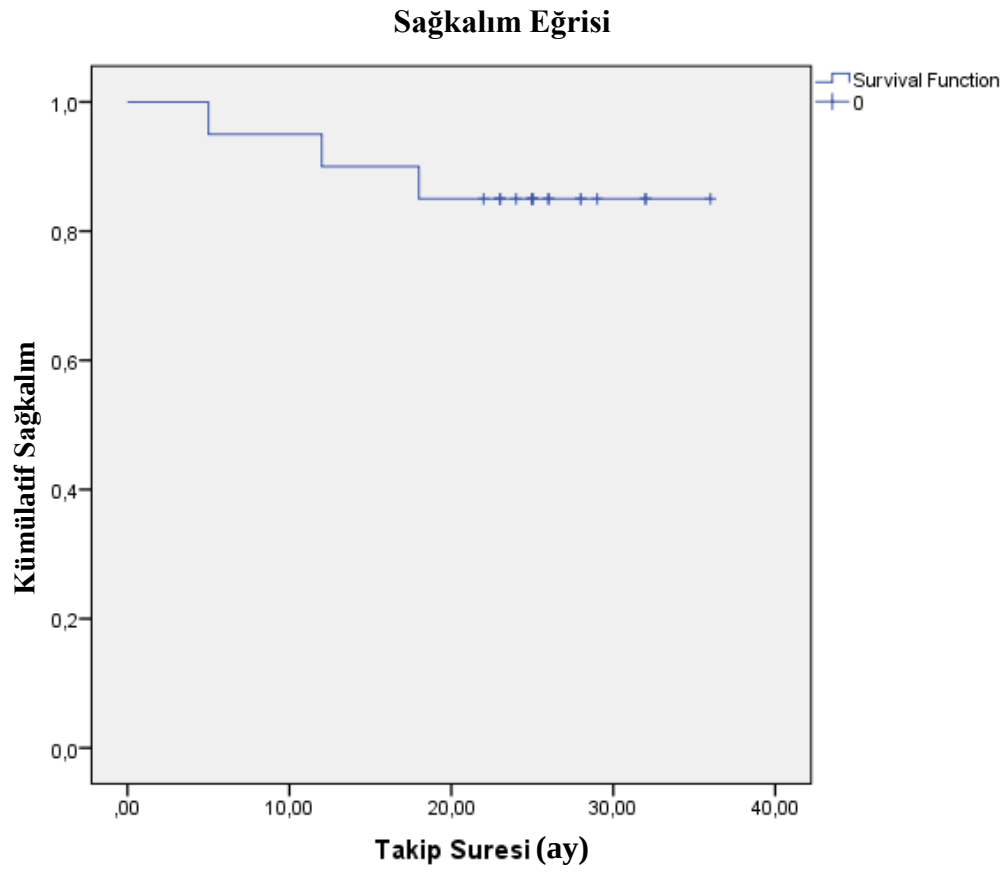
4. BULGULAR

TPOG (Türk Pediatrik Onkoloji Grubu) 2009-protokolü kapsamında gerçekleştirilen nöroblastom klinik ve moleküler analizlerin sonuçları değerlendirilerek, 20 hasta, 12'si yüksek 8'i düşük risk grubundan seçilmiş ve analiz edilmiştir. Gelen doku örneklerinden moleküler çalışmadan önce, örnekleri lamlara dokundurarak lamlara imprintleri yapılmıştır. Bu lamlar Toludin mavi boyası ile boyanmış ve tümör hücresi yeterliliği açısından değerlendirilmiştir.

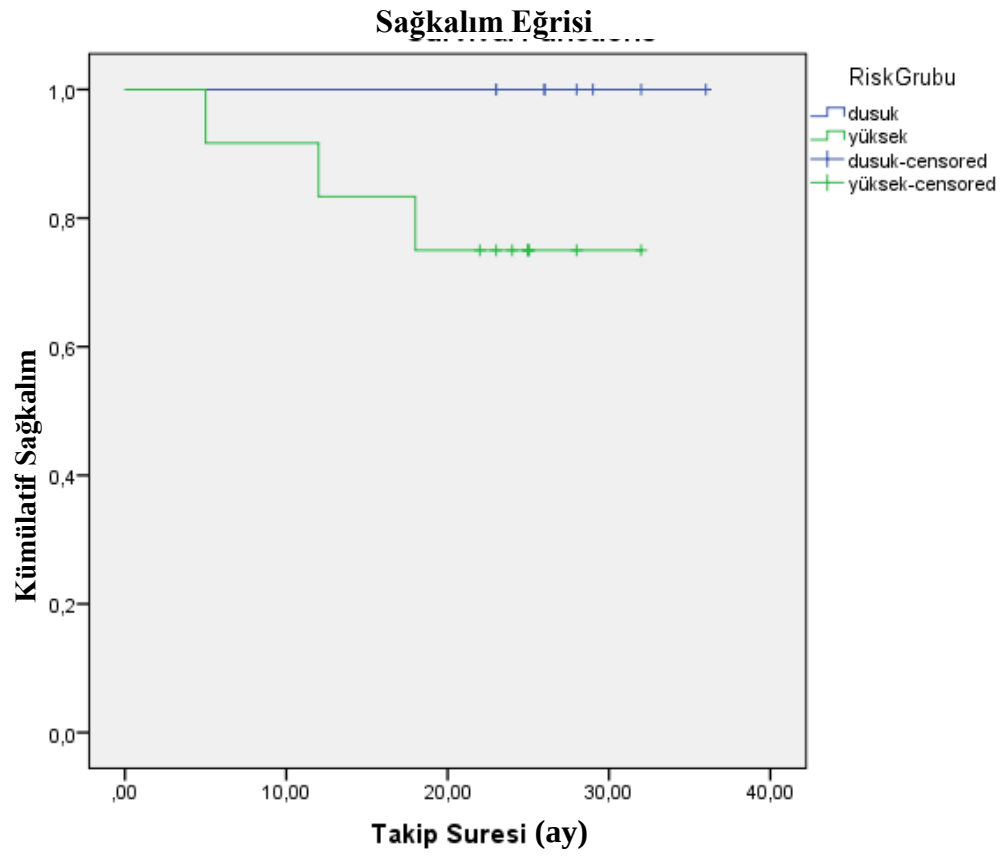


Şekil 9: Nöroblastom İmprintinin Toludin Mavi Boyası ile Boyanmış Görüntüsü.

Çalışmada yaşları 2-168 (ortalama 39) ay arası 20 hastanın materyali hücre kültürü ile değerlendirildi. Olguların onu kız onu erkek, 8'i düşük risk, 12'si yüksek risk grubunda idi. Hastalar ortalama 32,35 (28,4-36,2) ay takip edilmiştir. Bu takip süresince hastaların %15'i (3 hasta) ex olmuştur. Ex olan hastaların hepsi yüksek grubundaydı.



Şekil 10: Hastaların sağkalım eğrisi



Şekil 11: Düşük ve Yüksek Risk Arasındaki Sağkalım Farkı, Log Rank ($p=0.043$)

Tablo 3 Nöroblastom Hasta Karakteristikleri

No	Yaş (ay)	Cinsiyet	Genetik	Metastatik Alan	INSS Evre	Mycn Durumu	COG Risk Grubu
1	77	Erkek	-	-	1	-	Düşük
2	56	Erkek	11q-, 17q+	LN, K, Kİ, AC	4	+	Yüksek
3	48	Kız	17q+	LN, K, Kİ, AC	4	+	Yüksek
4	5	Kız	1pLOH	-	2B	-	Düşük
5	14	Kız	11q-, 17q+	-	2A	+	Yüksek
6	25	Erkek	-	-	1	-	Düşük
7	38	Kız	1pLOH, 11q-	-	1	+	Yüksek
8	15	Erkek	11q-, 17q+	-	2B	-	Düşük
9	21	Kız	17q+	-	2A	+	Yüksek
10	25	Erkek	-	-	1	-	Düşük
11	20	Kız	17q+	K,AC	4	-	Yüksek
12	56	Erkek	-	-	3	-	Düşük
13	108	Kız	17q+	K,Kİ,AC	4	+	Yüksek
14	21	Kız	17q+	K, Kİ	4	+	Yüksek
15	168	Erkek	17q+	-	2A	+	Yüksek
16	2	Erkek	17q+	Kİ, LN	4	+	Yüksek

17	13	Kız	1pLOH, 17q+	-	2B	-	Düşük
18	52	Erkek	17q+	Kİ	4	+	Yüksek
19	12	Kız	-	-	2B	-	Düşük
20	5	Erkek	1pLOH, 17q+	AC	4	+	Yüksek
LN: lenf nodu, K: kemik , Kİ:kemik iliği, KC: karaciğer, AC: akciğer							

4.1 Hücre Kültürü Çalışmaları Bulguları

Nöroblastom ve sisplatin kombinasyonuna, tümör infiltre edici lenfositlerin eklenmesi 24. saatte canlılığı istatistiksel olarak anlamlı arttırırken (%23.1 vs. %39.0, $p=0.024$), 48. saatte canlılıkta (%29.6 vs. %47.9, $p=0.164$) istatistiksel anlamlı farklılık tespit edilmedi.

Nöroblastom ve sisplatin kombinasyonuna, mezenkimal kök hücrelerin eklenmesi 24. (%23.1 vs. %37.7, $p=0.027$) ve 48. (%29.6 vs. %54.6, $p=0.018$) saatlerde hücrelerin canlılığını istatistiksel anlamlı arttırmakta idi.

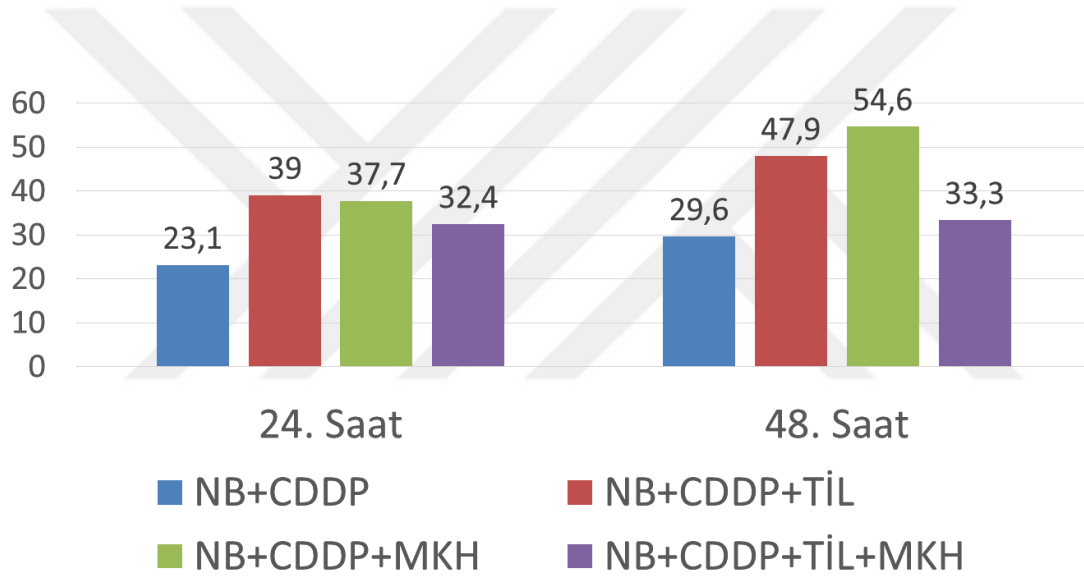
Nöroblastom ve sisplatin kombinasyonuna, tümör infiltre edici lenfositlerin ve mezenkimal kök hücrelerin birlikte eklenmesi 24. (%23.1 vs. %32.4, $p=0.136$) ve 48. (%26.3 vs. %33.3, $p=0.615$) saatlerde hücrelerin canlılığını arttırsada, bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı değildi.

CD 133+ nöroblastom kök hücresi ve sisplatin kombinasyonuna, tümör infiltre edici lenfositlerin eklenmesi 24. (%37.1 vs. %33.3, $p=0.748$) ve 48. (%44.9 vs. %77.0, $p=0.355$) saatlerde hücrelerin canlılığını istatistiksel olarak anlamlı değiştirmemekte idi.

CD 133+ nöroblastom kök hücresi ve sisplatin kombinasyonuna, mezenkimal kök hücrelerin eklenmesi 24. (%37.1 vs. %66.1, $p=0.006$) ve 48. (%44.9 vs. %74.2, $p=0.002$) saatlerde hücrelerin canlılığı istatistiksel anlamlı olarak arttırmakta idi.

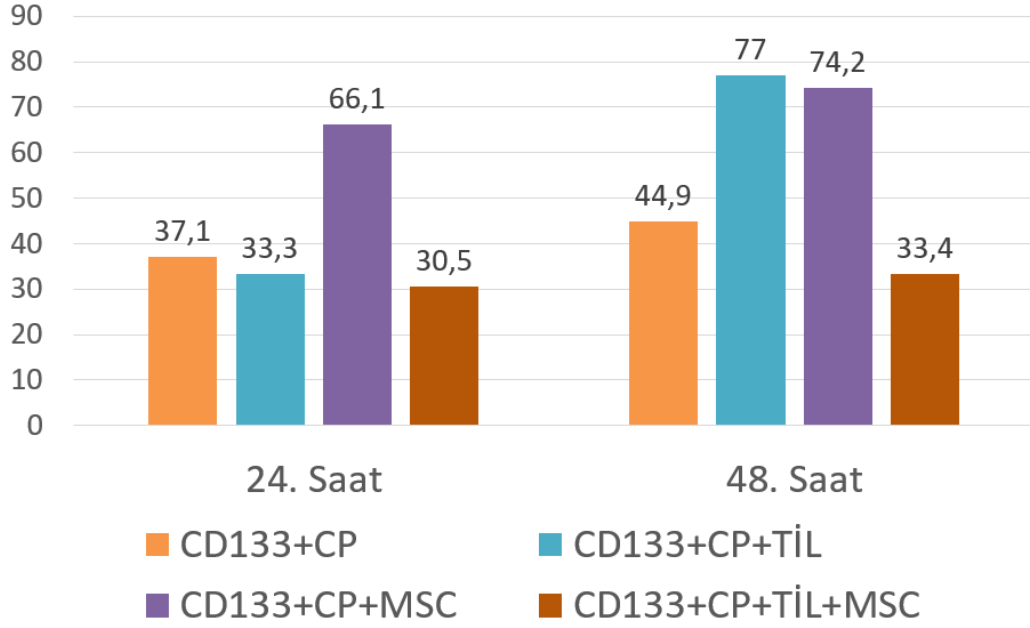
CD 133+ nöroblastom kök hücresi ve sisplatin kombinasyonuna, tümör infiltrate edici lenfositlerin ve mezenkimal kök hücrelerin birlikte eklenmesi 24. (%37.1 vs. %30.5, $p=0.231$) ve 48. (%44.9 vs. %33.4, $p=0.052$) saatlerde hücrelerin canlılığını istatistiksel olarak anlamlı olarak değiştirmemektedir.

4.2 Nöroblastom Hücre Canlılık Değerleri



Şekil 12: NB Hücre Kombinasyonunda Canlılık Değerleri

4.3 CD133 Kök Hücre Kombinasyonlarının Hücre Canlılık Değerleri



Şekil 13: CD133 Kök Hücre Kombinasyonlarının Canlılık Değerleri

4.4 Anneksin V- PI bulguları

○ Apoptoz Bulguları

Kontrol grubuna sisplatin (CDDP) eklendiğinde oluşan fark belirgindir ($p=0,0001$). Sisplatin yeterli dozda verilmiş ve deney modelimiz çalışmıştır. NB+CDDP ortamına TIL eklendiği zaman TIL'ler CDDP'nin apoptotik etkisini arttırmaktadır ($p=0,018$). NB+CDDP ortamına mezenkimal kök hücreler eklendiğinde CDDP'nin apoptotik öldürücülüğünün değişmediği bulunmuştur ($p=0,86$) (Tablo 4).

Kontrol grubuna sisplatin (CDDP) eklendiğinde oluşan fark belirgindir ($p=0,0001$). CDDP, KKH'lerini apoptoz üzerinden öldürebilmeyi başarmıştır. KKH+CDDP ortamına TIL eklediğimiz zaman etki değişmemiş olup MKH eklendiğinde apoptotik etki azalmaktadır ($p=0,005$) (Tablo 4).

○ **Nekroz Bulguları**

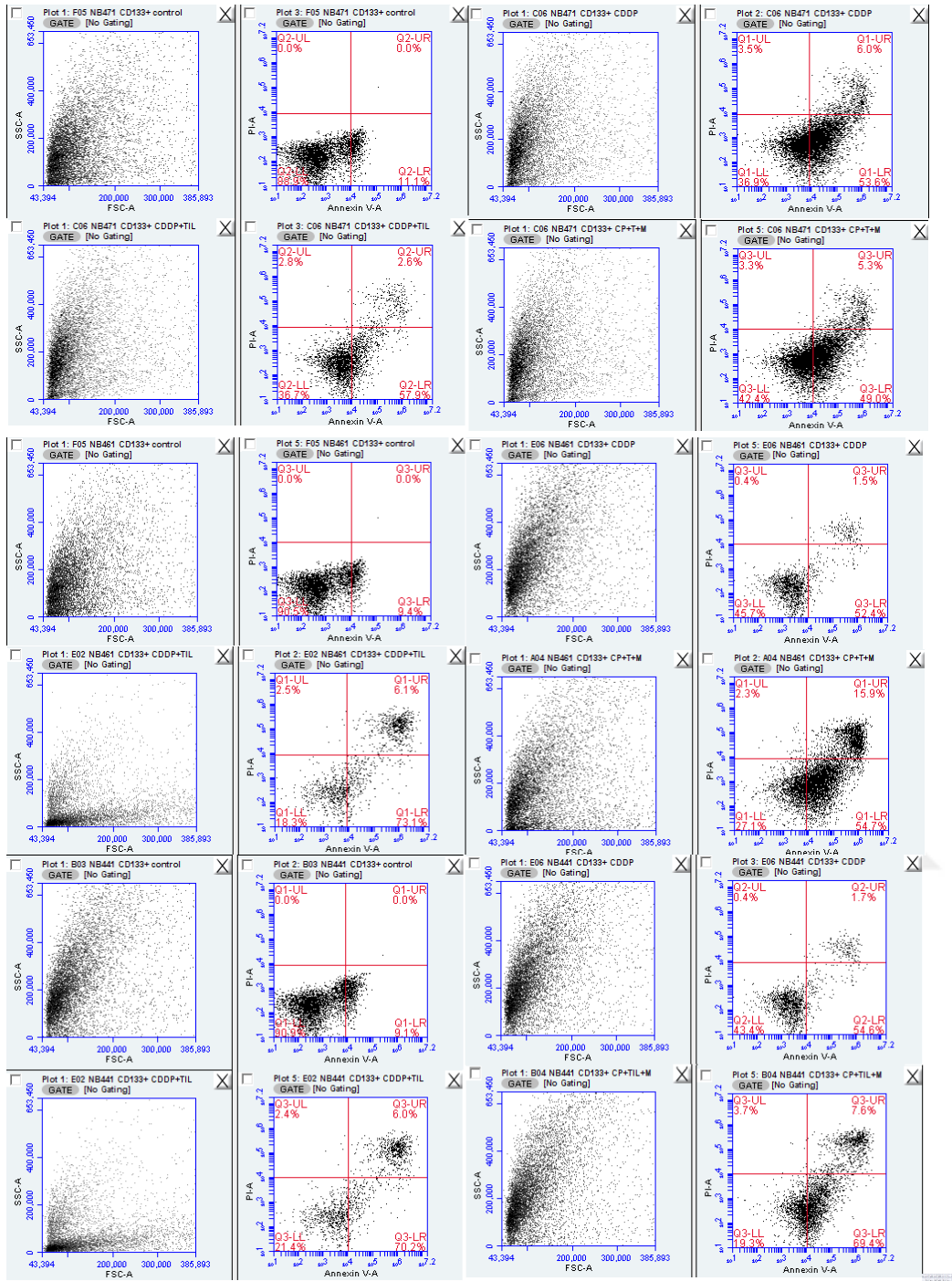
NB üzerine uyguladığımız CDDP belirgin nekrotik etki göstermiştir (p=0,009). TIL, CDDP'in nekrotik etkisini arttırmamıştır (p=0,094). Ortama MKH eklendiğinde yine etki değişmemiştir (p= 0,340) (Tablo 4).

KKH'leri üzerine uyguladığımız CDDP belirgin nekrotik etki göstermiştir (p=0,0001). Ortama TIL eklenmesi bu nekrotik etkiyi arttırmaktadır (p=0,003). Ancak ortama MKH eklenmesi bu etkiyi değiştirmemektedir (p=0,56) (Tablo 4).

Sonuç olarak NB hücrelerine TIL eklenmesi, sisplatinin tümör hücreleri üzerindeki apoptotik etkisini artırırken, KKH'lerine TIL eklenmesi sisplatinin nekrotik etkisini arttırmaktadır. Tedaviye katkısı nedeniyle TIL'lerin iyi prognostik literatür bilgisini desteklemektedir.

Tablo 4: Hücrelerin Canlılık, Apoptoz ve Nekroz Oranları

	CANLILIK (%)	APOPTOTİK HÜCRE (%)	NEKROTİK HÜCRE(%)
NB+Kontrol	91.53 ± 3.94	6.08 ± 3.71	0.83 ± 0.84
NB+CDDP	46.63 ± 17.92	41.54 ± 17.57	9.19 ± 12.52
NB+TIL+CDDP	34.40 ± 15.64	49.95 ± 18.86	13.82 ± 15.99
NB+TIL+MSC+CDDP	48.67 ± 11.81	42.31 ± 13.36	5.74 ± 7.83
KKK KONTROL	92.88 ± 2.96	6.36 ± 3.41	0.73 ± 0.85
KKH+CDDP	33.91 ± 11.46	57.94 ± 12.73	6.41 ± 5.34
KKH+TIL+CDDP	23.00± 12.50	61.94 ± 18.53	8.98± 5.43
KKH+TIL+MSC+CDDP	40.22 ± 18.49	48.34 ± 17.25	8.15 ± 6.19



Şekil 14: Anneksin V- PI Flow Sitometri Sonuçları

4.5 Treg Flow Sitometri Bulguları

Bu konuda literatürde çalışma olmadığı için median değerler cut off olarak kullanıldı ve istatistiksel değerlendirme buna göre yapıldı.

Treg median değeri %2.1 olarak bulundu. TIL'ler Treg içerme oranına göre 2 gruba ayrıldığında; Treg %2.1'den fazla olan grupta canlılığın 2 kat daha fazla olduğu tespit edildi ($p=0.043$). Buna göre, Treg oranının %2.1'den yüksek olması nöroblastom hücrelerinin CDDP direnciyle ilişkili olabilir. Tümör lehine çalıştığı kanıtlanmış olan Treg hücrelerinin bu etkisi literatür ile uyumlu bulunmuştur.

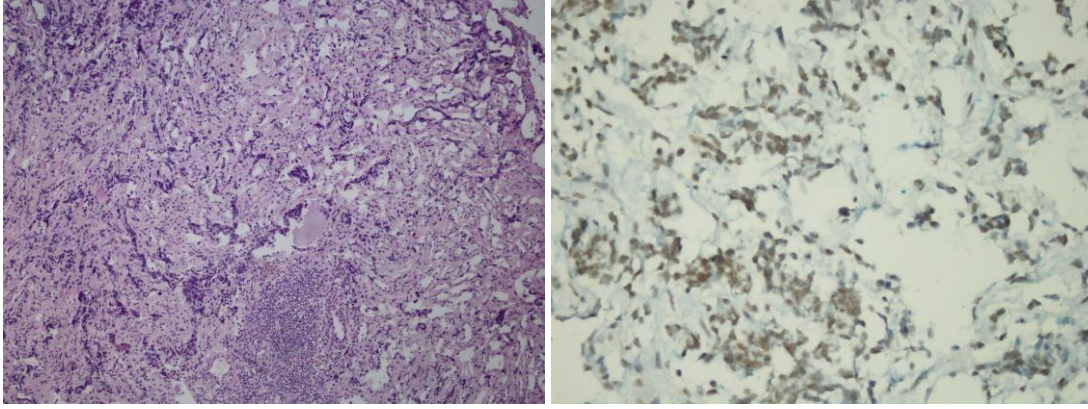
CD4 median değeri %11.5 olarak bulundu. TIL'ler CD4 içerme oranına göre 2 gruba ayrıldığında CD4+ T lenfositlerin CDDP'nin öldürücü etkisini değiştirmede bulunmuştur ($p=0.09$).

4.6 Parafin Kesit Bulguları

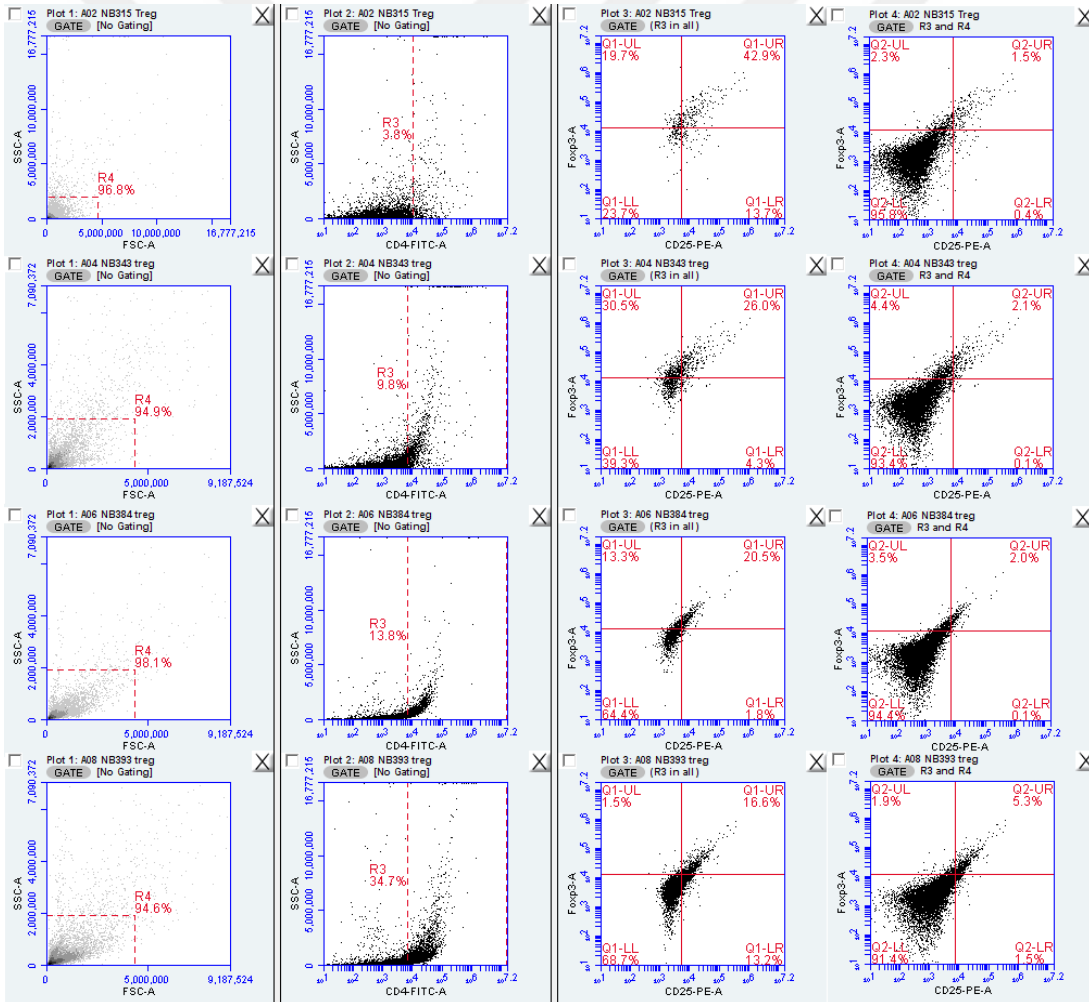
Evre arttıkça nöroblastom içindeki CD25 pozitif Treg yüzdesinin arttığı bulundu ($p=0,023$).

Tablo 5: Parafin Kesitteki CD25 Oranı ile Flow Sitometrik Treg Sonuçları

Evre	Treg yüzdesi (%)	CD25 yüzdesi (%)
Evre 1	1,63	2,64
Evre 2A	3,1	16,71
Evre 2B	3,35	22,68
Evre 3	3,4	29,11
Evre 4	7,14	37,31



Şekil 15: Parafin Blok HE kesiti ve CD25 İHK Boyanması.



Şekil 16: Nöroblastom Tümör İnfiltrate Edici Lenfostilerdeki Treg Oranları

4.7 Korelasyon Bulguları

CD3, CD20 ($r=0.593$, $p=0.006$) ve CD4 ($r=0.536$, $p=0.015$) ile doğru korele bulundu. CD3, CD25 ($r=-0.476$, $p=0.034$) ile ters korele bulundu.

CD25, evre ($r=0.531$, $p=0.023$), kemik metastazı ($r=0.525$, $p=0.021$) ve karaciğer metastazı ($r=0.510$, $p=0.008$) ile doğru korele bulundu.

CD4, NB+CDDP24 ($r=0.470$, $p=0.037$) ve KKH+CDDP48 ($r=0.510$, $p=0.06$) ile doğru korele bulundu.

Toplam inflamatuvar hücre sayısı, 11qdel ($r=0.667$, $p=0.034$) ile doğru korele bulundu.

5. TARTIŞMA

Nöroblastom, adrenal medulla ya da sempatik nöronlardaki nöronal krest kökenli hücrelerin diferansiasyonun bozulmasına bağlı oluşan en sık rastlanan ekstrakraniyal çocukluk çağı solid tümörüdür (57,58). NB tüm çocukluk çağı kanserlerinin %8-10'unu oluşturur. NB'nin kötü prognozu MYCN amplifikasyonu ile karakterize edilmiştir (57).

NB'daki tedaviye yanıtın heterojenliği, matür diferansiasyon veya spontan regresyon, metastatik yayılım ve kötü prognoza kadar değişmektedir. NB'nin farklı klinik davranışları moleküler ve biyokimyasal analizlerle anlaşılmaya başlanmıştır (32). Onkogen amplifikasyonu, allelik kaybı veya kazanımı, DNA ploidi durumu NB'nin genetik özellikleri olarak bilinmektedir (1).

CD133+ KKH'leri bağımsız olarak kötü prognoz ile ilişkilidir (32). KKH'leri hücreleri düzenleyebilir, kanser dokusunun heterojenliğine ve kemoterapötik direncine katkıda bulunurlar (33). Bu önemli rolleri nedeniyle CD133+ KKH bu çalışmada MKH'ler ile etkileşimini sorgulamak için dahil edildi.

TMÇ, kanser hücresinin konakçı ile etkileşimi sonucu tümör progresyonu sırasında ortaya çıkan özelleşmiş bir ortamdır. Tümör mikroçevresi, proliferen olan tümör hücrelerini, tümör stromasını, kan damarlarını ve TIL'leri içerir. Bu mikroçevre, tümör oluşturun bir fenotip elde etmek için kanser hücresi tarafından şekillendirilir (77).

TIL'ler birçok kanserde tanımlanmış, iyi prognostik olarak öngörülen ancak bazen tümör lehine çalışan hücreleri de içeren TMÇ ilişkisinin önemli bir komponentidir. Daha önce yapılan çalışmalarda, NB dokusuna eşlik eden, tümör

içinde bulunan lenfositlerin varlığı gösterilmiştir. Bu TIL'lerin olgudan olguya değişen oranda CD4, CD8, Treg hücreler içerdiği saptanmıştır (78).

TIL'ler heterojen bir hücre grubudur. Effektör T hücreleri, T düzenleyici hücreler, NK hücreler, B hücreleri ve diğer bağışıklık hücreleri TIL'leri oluşturur (7). T hücrelerinin infiltrasyonunun, NB'de iyi prognozla ilişkili olduğu 50 yıl önceki çalışmalarda gösterilmiştir (10,14,15). TIL'lerin alt popülasyonu incelendiğinde, daha yüksek yoğunluklu T hücre alt tiplerinin daha iyi onkolojik sonuç ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (10). T hücrelerinin yoğunluğunun yanı sıra, birbirleri ve çevre dokular ile olan etkileşimleri de etkili bir immünitinin geliştirilmesi ve sürdürülmesi için önemlidir (4,10). NB hastalarında “yüksek CD3+” veya “düşük CD3+ ve yüksek CD4+/CD8+ oranı” iyi prognoz ile ilişkilidir (10). Düşük riskli NB'de T hücre infiltrasyonu spontan regresyonda anahtar rol oynamaktadır. Bu hastalar, spontan regresyon sırasında CD8+ T hücreleri tarafından granül ekzositozu yoluyla serbest bırakılan bir efektör molekül aracılığıyla granülizat seviyelerinde geçici bir artış göstermiştir (1,2,10). Tümör dokularında güçlü bir T hücre birikimi, TIL'lerin potansiyel selektif zenginleştirilmesinden kaynaklanan TIL'lerin oligoklonal genişlemesi ile ilişkilidir (10). Bununla birlikte, bir diğer çalışmada aynı tümörün farklı bölgelerindeki T hücre klonlarının heterojen ve kompleks olduğu gösterilmiştir (34). TIL'lerin fonksiyonel aktivitesi salınmış efektör sitokinleri ile izlenebilir.

Kemoterapötik ajanların bağışıklık hücreleri üzerindeki etkisi iyi bilinmemektedir. Kemoterapötik ajanların immün sistem hücreleri üzerine olan etkisi “immunosurveillance teorisi ve immünomodülasyon teorisi” ile açıklanabilir. Bu mekanizmalarda inhibitör immün hücrelerin bastırılması ve sonuç efektör T hücrelerinin kanser hücrelerine infiltre olmasına izin veren mekanizmalardır (35,36). İmmün gözetim ve immün düzenlenmenin hangi yollar aracılığı ile olduğu günümüzde tam olarak bilinmemektedir. Kemoterapötik ilaçların uygulanması, dendritik hücre fonksiyonunu ve düzenleyici T hücrelerini seçici bir şekilde tüketerek immün sistemi düzenler (37). Ayrıca, efektör T hücre yanıt vermeme ve miyeloid

kökenli süpresör hücrelere bağlı immün sistemden kaçışı, kemoterapötik ilaçlarda etkileyebilir (38,39). Diğer çalışmaların tersine, canlılık testimizde 24. saatte TIL'lerin sisplatinin NB hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisini azalttığını, ancak TIL'lerin ve MKH'lerin kombinasyonunun, sisplatinin antiproliferatif etkisini değiştirmedğini bulduk. Bu bulguların muhtemel bir açıklaması, bu çalışmada kullanılan sisplatine dirençli NB hücrelerinden oluşabileceği için bu hücrelerin beklenenden daha az öldüğü düşünülmektedir. Bir başka açıklama, NB hücrelerinin İDO aktivitesini arttırarak, FasL, TNF'ye bağlı apoptozu indükleyen ligand ve hipoksik koşullar yoluyla ile TIL'lerin erken dönemde immünsüprese olması ve sonrasında kemoterapötik ajanlar aracılığı ile düzelmesi olabilir (40). Ayrıca, çalışmada NB hücreleri olarak CD133- ve Anti-MSCA-1- olan hücreler kullanıldı. Bu nedenle, bazı kemoterapötik ilaçlara ve T hücre yanıtlarına aracılık eden tümör ilişkili makrofajlar ve miyeloidden türetilen süpresör hücreler deneylerde bulunabilir ve sonuçları etkileyebilirler (39). Bu bulguları aydınlatmak için daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

MKH'ler, TMC'nin bir başka bileşeni olup, tümör stroma hücrelerinden biridir (41). MKH'ler ve tümör stromal hücreleri kan damarlarına yakın yerleşmektedir ve direkt olarak bağışıklık hücreleri ile temas eder durumdadır. MKH'ler, farklı sinyaller veya nişler tarafından tetiklenebilen çoklu farklılaşma potansiyeline sahiptir. Birkaç hücre popülasyonu üzerinde güçlü immünomodülatör etkileri olduğu gösterilmiştir (16,17). Tümör stroma hücrelerindeki artış, pankreas adenokarsinomunda T hücreleri üzerine anti-proliferatif bir etki yoluyla immün kaçış mekanizmasının bir parçası olabileceği düşünülmektedir (42). Ayrıca MKH'ler B hücrelerinin ve dendritik hücrelerin işlevlerini modüle etmektedir (43). Ek olarak MKH gibi immünosupresif hücrelerin varlığı, akciğer ve renal hücreli karsinomlarda aktive edici reseptörlerin downregülasyonu nedeniyle immün hücrelerin sitolitik fonksiyonunu tehlikeye atabilir (16,42). Üstelik, kanser ilişkili fibroblastların ortamdaki uzaklaştırılmasının meme kanserinde Th2'den Th1 kutuplaşmasına neden olduğu gösterilmiştir (16,17). MKH'lerin, büyüme faktörleri ve kemokinler gibi birkaç çözünür sinyal molekülü saldığı bilinmektedir (41,44). Benzer şekilde, kansere bağlı fibroblastlar, Wnt, BMP,

Ephrin gibi sinyal moleküllerini salgılar (41,44). Bu faktörler, artmış tümör büyümesi ve metastazı olan kanser hücreleri için destekleyici stromal nişe katkıda bulunur (44). Ayrıca, MKH'lerden salınan VEGF ve TGF- β ve kanser ilişkili fibroblastlar, tümör büyümesini destekler (41,44).

MKH'lerin TMC ile ilişkili özellikler sergilediğini ve çalışılan tümör türüne göre malign hücre büyümesini desteklediği veya engellediğinin anlaşılmasından beri MKH'ler onkolojide ilgi çekici konulardan biri olmuştur (78). Mezenkimal stroma hücreleri olarak da bilinen MKH'ler, andiferansiye erişkin kök hücrelerdir ve kemik iliğinden, göbek bağından, adipoz dokudan, plasentadan, sinovyumdan ve iskelet kasından izole edilebilirler (64). MKH'lerin kullanıldığı tüm çalışmalarda in vitro olarak çok sayıda pasajdan geçirilerek kültürü yapılmış hücreler kullanıldığı için bu çalışmalar, plastisitesi olan hücrelerde kendini yenileme özelliğinin de olduğunu göstermektedir (65).

MKH'lerin kemoterapötik ilaç direncine katkı rolü vardır. Platin grubu kemoterapötik ilaçlar ile yapılan bir çalışmada, endojen MKH'lerinin, birçok kemoterapötik ajana karşı kanser hücrelerini koruyan yağ asitlerini salgıladığı gösterilmiştir (23). Başka bir çalışmada, karsinom ile ilişkili MKH'lerin PI3K/Akt sinyal yolunu aktive ederek over kanseri hücrelerinde efektör kaspaz aktivasyonunu ve apoptozu inhibe ederek karboplatin direncini indüklediği gösterilmiştir (24). Bununla birlikte, MKH'lerin kemoterapötik ajanların yanıtı üzerindeki etkisi NB hücrelerinde yeteri kadar çalışılmamıştır. IL-6 ve diğer sitokinlerin önemi bilinmektedir. NB hücreleri ile kemik iliğinden türetilen MKH'ler arasındaki IL-6/sIL-6R/STAT3 yolu, ilaç direncine katkıda bulunmaktadır (25).

KKH'lerinin keşfi çok basamaklı tümöröenez mekanizmaları hakkındaki düşüncelerimizi büyük ölçüde değiştirmiştir. Kendini yenileme özelliğindeki bu hücreler kanser hücre popülasyonuna göre genetik değişim ve klonal seçimde önemli

bir hedef olmaktadır (76,71). KKH hakkındaki ilk direkt kanıt, 1997’de Dick J. ve arkadaşlarının yayımladıkları makale ile gelmiştir. Dick J. ve grubu, akut myeloid lösemili (AML) hastaların kanlarından izole ettikleri lösemik hücrelerin küçük bir grubunun (yaklaşık 10.000 hücrede <1 hücrenin), diyabetik, obez olmayan ağır immünsupresif (NOD/SCID) farelerde orijinal tümörü oluşturduğunu göstermişlerdir. Araştırmacılar, bu hücre grubunun normal hematopoetik kök hücrelerin fenotipinde olduğunu (CD 34+/CD 38-) tespit etmiştir. Bu nedenle kanserin hücrelerinin, normal kök hücrelerden kaynaklandığını ileri sürmüşlerdir (61). Daha sonraki yıllarda başka araştırmacılar, Dick J. ve arkadaşlarının açtığı yoldan ilerleyerek, bu grubun “lösemik kök hücreleri” izole ettiği ve bu hücrelerin kök hücre özelliklerini test ettiği yöntemleri, solid tümörlere adapte etmişlerdir. Bu bağlamda meme kanseri ve glioblastomlarda yapılan araştırmalar başı çekmiş (2003 ve 2004) ve ardarda kolon kanseri, akciğer kanseri ve prostat kanseri gibi birçok solid tümörde “kanseri kök hücreleri” gösterilmiştir (62).

Yapılan bir çalışmada agresif bir NB hücre hattı olan Kelly hücre hattında metastaz ilişkili genlerde belirgin ekspresyon artışı olduğu bulunmuştur. Bu nedenle NB hücre hatlarının kök hücrelerinde metastaz karakterizasyonunda farklılıklar olduğu gözlenmiştir (77). KKH’lerinin özelliklerinin aydınlatılması yeni tedavi moleküllerinin geliştirilmesini sağlayabilecektir.

Sisplatin, platin grubu içeren bir kemoterapötik ajandır. İnflamasyon sisplatinin etkililiğini etkiler. PI3K-AKT sinyal yolağının PTEN indirilmesi ile aktivasyonu, özellikle sisplatin ve oksaliplatin gibi DNA hasarı oluşturan ilaçlara karşı gelişen kemoterapötik ilaç direncinin merkezinde olabilir (4,45). Yakın tarihli bir çalışmada, NB hücreleri ve monositler arasındaki çapraz etkileşimde eksosomik miR-21 ve miR-155’in, eksosomik miR-21/TLR8-NF-κB/eksosomik miR-155/TERF1 sinyal yolağı aracılığı ile sisplatin direnci gelişimine yol açtığı gösterilmiştir (46). Spesifik ATP bağlayıcı ilaç taşıyıcılarının ve epidermal büyüme faktörü reseptörünün artmış ekspresyonu, CD133+ KKH’leri tarafından geliştirilen kemoterapötik direncinden

sorumlu yollardır (4,32). Ayrıca, AKT yolu CD133+ KKH'lerinin kemoterapötik ilaç direnci gelişiminde rol oynamaktadır (32). Bu çalışmada, CD133+ KKH'leri izole edilip NB hücrelerinden ayrı olarak deneye tabi tutuldu. CD133+ KKH ve sisplatin kombinasyonuna, TIL eklenmesi 24. (%37.1 vs. %33.3, $p=0.748$) ve 48. (%44.9 vs. %77.0, $p=0.355$) saatlerde hücrelerin canlılığını istatistiksel olarak anlamlı değiştirmemekte olduğunu bulundu. CD133+ KKH'si ve sisplatin kombinasyonuna, mezenkimal kök hücrelerin eklenmesi 24. (%37.1 vs. %66.1, $p=0.006$) ve 48. (%44.9 vs. %74.2, $p=0.002$) saatte hücrelerin canlılığını istatistiksel olarak anlamlı arttırdığı bulundu. Buna karşılık, CD133+ KKH ve sisplatin kombinasyonuna, TIL'lerin ve MKH'lerin birlikte eklenmesi 24. (%37.1 vs. %30.5, $p=0.231$) ve 48. (%44.9 vs. %33.4, $p=0.052$) saatte hücrelerin canlılığını istatistiksel olarak değiştirmemekte olduğunu bulduk. Bu bulgularımız literatür ile uyumlu idi (55-69).

Birçok çalışmada ölümsüzleştirilmiş hücre hatları kullanılmaktadır. Ne yazık ki, bu hücre dizilerinin kültürü fenotipleri ve genetik ekspresyon profilleri değiştirildiği için in vivo ortam özelliklerinden uzaklaşmaktadır. İn vitro çalışmaların hastalığın gerçek ortamını yansıtan kısıtlılıkları vardır. Çalışmamızdaki ex vivo modelimiz, TMC'nin NB hücrelerinin kemoterapötik yanıtı üzerindeki etkisini değerlendirmek için NB'un gerçek koşullarını daha fazla temsil etmektedir. Öte yandan, bu çalışmanın çeşitli sınırlamaları vardır. Birincisi, deneylerde NB hücreleri olarak CD133-Anti-MSCA-1 hücreleri kullandık. Bununla birlikte, CD133-Anti-MSCA-1- hücreleri sadece NB hücreleri dışında birçok hücre popülasyonunda içermektedir. İkincisi, bu çalışmada MKH'lerin farklılaşma testi yapılmadı. MKH'lerin ve MKH'nin fibroblastlar, osteojenik, adipogenik, endotel hücreleri gibi farklılaşmış hücrelerin sayı ve dağılımı bilinmemektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

NB’da KKH’lerin MKH’ler ve TIL’lerle etkileşimini araştıran yayınlanmış bir çalışma yoktur. Bu nedenle, MKH ile KKH’leri arasındaki etkileşimi öğrenmek NB ile baş etmede yeni tedavi stratejileri geliştirilmesinde önemli rol oynayacaktır.

NB’da TIL’ler NB hücrelerinde sisplatinin apoptotik etkisini arttırırken KKH’lerine eklendiğinde sisplatinin nekrotik etkisini arttırmaktadır. Tedaviye katkısı nedeniyle iyi prognostik literatür bilgisini desteklemektedir. Ayrıca NB’da TIL’lerin ekspansiyonu ve tedavi destekleyicisi rolünü in vivo araştırmak faydalı olacaktır.

MKH’ler, CDDP+KKH’si ortamına eklendiğinde canlılık istatistiksel anlamlı artar ancak TIL ve MKH’lerin birlikte CDDP+KKH’si ortamına eklendiğinde canlılık istatistiksel anlamlı değişmez. MKH’ler, CDDP+NB ortamına eklendiğinde canlılık istatistiksel anlamlı artar ancak TIL ve MKH’ler birlikte iken CDDP’in nöroblastom hücrelerine apoptotik ve nekrotik etkisini istatistiksel anlamlı olarak değiştirmez.

İn vivo modellerde TIL’ler doku içinden ayrılması mümkün olmamasından dolayı MKH’lerin, sisplatinin etkisini hem NB hücrelerinde hem de KKH’lerinde değiştirmediği kabul edilebilir. Bu bulgumuz MKH’lerinin NB’da yan etkilerini azaltma ve onarma amaçlı in vitro ve prelinik in vivo aşamalarında denenebileceğini göstermektedir.

Bu bulgular ex vivo in vitro MKH’lerinin nöroblastom tedavisinde, tedavi edici etkisi olmadığı ve sisplatinin etkisini değiştirmediği görülmüştür. Ancak daha ileri yorum yapabilmek için in vitro veya in vivo nude-fare çalışması yapılması gerekmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Cheung N-K V, Dyer MA. Neuroblastoma: developmental biology, cancer genomics and immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 2013; 13:397–411. doi:10.1038/nrc3526.
2. Modak S, Cheung N-K V. Neuroblastoma: Therapeutic strategies for a clinical enigma. *Cancer Treat Rev* 2010; 36:307–17. doi:10.1016/j.ctrv.2010.02.006.
3. Hashimoto O, Yoshida M, Koma Y-I, Yanai T, Hasegawa D, Kosaka Y, et al. Collaboration of cancer-associated fibroblasts and tumour-associated macrophages for neuroblastoma development. *J Pathol* 2016; 240:211–23. doi:10.1002/path.4769.
4. Szakács G, Paterson JK, Ludwig JA, Booth-Genthe C, Gottesman MM. Targeting multidrug resistance in cancer. *Nat Rev Drug Discov* 2006; 5:219–34. doi:10.1038/nrd1984.
5. Komohara Y, Takeya M. CAFs and TAMs: maestros of the tumour microenvironment. *J Pathol* 2017; 241:313–5. doi:10.1002/path.4824.
6. Relation T, Dominici M, Horwitz EM. An (Im)Penetrable Shield- How the Tumor Microenvironment Protects Cancer Stem Cells. *Stem Cells* 2017; 1–10. doi:10.1002/stem.2596.
7. Fridman WH, Pagès F, Sautès-Fridman C, Galon J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer* 2012; 12:298–306. doi:10.1038/nrc3245.
8. Rosenberg SA, Restifo NP. Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer. *Science* 2015; 348:62–8. doi:10.1126/science.aaa4967.
9. Lee N, Zakka LR, Mihm MC, Schatton T. Tumour-infiltrating lymphocytes in melanoma prognosis and cancer immunotherapy. *Pathology* 2016; 48:177–87. doi:10.1016/j.pathol.2015.12.006.
- 10) Mina M, Boldrini R, Citti A, Romania P, D'Alicandro V, De Ioris M, et al. Tumor-infiltrating T lymphocytes improve clinical outcome of therapy-resistant

neuroblastoma. Oncoimmunology 2015; 4:e1019981. doi:10.1080/2162402X.2015.1019981.

11) Sheng SY, Gu Y, Lu CG, Tang YY, Zou JY, Zhang YQ, et al. The Characteristics of Naive-like T Cells in Tumor-infiltrating Lymphocytes From Human Lung Cancer. *J Immunother* 2017; 40:1–10. doi:10.1097/CJI.0000000000000147.

12. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pagès C, et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 2006; 313:1960–4. doi:10.1126/science.1129139.

13. Halama N, Michel S, Kloor M, Zoernig I, Benner A, Spille A, et al. Localization and Density of Immune Cells in the Invasive Margin of Human Colorectal Cancer Liver Metastases Are Prognostic for Response to Chemotherapy. *Cancer Res* 2011; 71:5670–7. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-0268.

14. Lauder I, Aherne W. The significance of lymphocytic infiltration in neuroblastoma. *Br J Cancer* 1972; 26:321–30.

15. Carlson L-M, De Geer A, Sveinbjørnsson B, Orrego A, Martinsson T, Kogner P, et al. The microenvironment of human neuroblastoma supports the activation of tumor-associated T lymphocytes. *Oncoimmunology* 2013; 2:e23618. doi:10.4161/onci.23618.

16. Johann P-D, Vaegler M, Gieseke F, Mang P, Armeanu-Ebinger S, Kluba T, et al. Tumour stromal cells derived from paediatric malignancies display MSC-like properties and impair NK cell cytotoxicity. *BMC Cancer* 2010; 10:501. doi:10.1186/1471-2407-10-501.

17. Modiano JF, Lindborg BA, McElmurry RT, Lewellen M, Forster CL, Zamora EA, et al. Mesenchymal stromal cells inhibit murine syngeneic anti-tumor immune responses by attenuating inflammation and reorganizing the tumor microenvironment. *Cancer Immunol Immunother* 2015; 64:1449–60. doi:10.1007/s00262-015-1749-6.

18. Skolekova S, Matuskova M, Bohac M, Toro L, Demkova L, Gursky J, et al. Cisplatin-induced mesenchymal stromal cells-mediated mechanism contributing to

decreased antitumor effect in breast cancer cells. *Cell Commun Signal* 2016; 14:4. doi:10.1186/s12964-016-0127-0.

19. Lützkendorf J, Wieduwild E, Nerger K, Lambrecht N, Schmoll H-J, Müller-Tidow C, et al. Resistance for Genotoxic Damage in Mesenchymal Stromal Cells Is Increased by Hypoxia but Not Generally Dependent on p53-Regulated Cell Cycle Arrest. *PLoS One* 2017; 12:e0169921. doi:10.1371/journal.pone.0169921.

20. Li J, Law HKW, Lau YL, Chan GCF. Differential damage and recovery of human mesenchymal stem cells after exposure to chemotherapeutic agents. *Br J Haematol* 2004; 127:326–34. doi:10.1111/j.1365-2141.2004.05200.x.

21. Mueller LP, Luetzkendorf J, Mueller T, Reichelt K, Simon H, Schmoll H-J. Presence of mesenchymal stem cells in human bone marrow after exposure to chemotherapy: evidence of resistance to apoptosis induction. *Stem Cells* 2006; 24:2753–65. doi:10.1634/stemcells.2006-0108.

22. Bernardo ME, Zaffaroni N, Novara F, Cometa AM, Avanzini MA, Moretta A, et al. Human bone marrow derived mesenchymal stem cells do not undergo transformation after long-term in vitro culture and do not exhibit telomere maintenance mechanisms. *Cancer Res* 2007; 67:9142–9. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-4690.

23. Roodhart JML, Daenen LGM, Stigter ECA, Prins HJ, Gerrits J, Houthuijzen JM, et al. Mesenchymal stem cells induce resistance to chemotherapy through the release of platinum-induced fatty acids. *Cancer Cell* 2011; 20:370–83. doi:10.1016/j.ccr.2011.08.010.

24. Castells M, Milhas D, Gandy C, Thibault B, Rafii A, Delord J-P, et al. Microenvironment mesenchymal cells protect ovarian cancer cell lines from apoptosis by inhibiting XIAP inactivation. *Cell Death Dis* 2013; 4:e887. doi:10.1038/cddis.2013.384.

25. Ara T, Nakata R, Sheard MA, Shimada H, Buettner R, Groshen SG, et al. Critical role of STAT3 in IL-6-mediated drug resistance in human neuroblastoma. *Cancer Res* 2013; 73:3852–64. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-2353.

26. Shankar V, Hori H, Kihira K, Lei Q, Toyoda H, Iwamoto S, et al. Mesenchymal stromal cell secretome Up-regulates 47 kDa CXCR4 expression, and induce invasiveness in neuroblastoma cell lines. *PLoS One* 2015; 10:1–21. doi:10.1371/journal.pone.0120069.
27. Melen GJ, Franco-Luzón L, Ruano D, González-Murillo Á, Alfranca A, Casco F, et al. Influence of carrier cells on the clinical outcome of children with neuroblastoma treated with high dose of oncolytic adenovirus delivered in mesenchymal stem cells. *Cancer Lett* 2016; 371:161–70. doi:10.1016/j.canlet.2015.11.036.
28. Pires AO, Neves-Carvalho A, Sousa N, Salgado AJ. The Secretome of Bone Marrow and Wharton Jelly Derived Mesenchymal Stem Cells Induces Differentiation and Neurite Outgrowth in SH-SY5Y Cells. *Stem Cells Int* 2014; 2014:438352. doi:10.1155/2014/438352.
29. Bianchi G, Morandi F, Cilli M, Daga A, Bocelli-Tyndall C, Gambini C, et al. Close Interactions between Mesenchymal Stem Cells and Neuroblastoma Cell Lines Lead to Tumor Growth Inhibition. *PLoS One* 2012; 7. doi:10.1371/journal.pone.0048654.
30. Gurney JG, Davis S, Severson RK, Fang JY, Ross JA, Robison LL. Trends in cancer incidence among children in the U.S. *Cancer* 1996; 78:532-41. doi: 10.1002/(SICI)1097-0142(19960801)78:3<532::AID-CNCR22>3.0.CO;2-Z
31. Gurney JG, Ross JA, Wall DA, Bleyer WA, Severson RK, Robison LL. Infant cancer in the U.S.: histology-specific incidence and trends, 1973 to 1992. *J Pediatr Hematol Oncol* 1997; 19:428-32.
32. Aksoylar S, Nöroblastom. *Klinik Gelişim*, 2007; 20 (2): 62-72.
33. Gurney JG, Ross JA, Wall DA, et al. Infant cancer in the U.S.: histology-specific incidence and trends, 1973 to 1992. *J Pediatr Hematol Oncol* 1997; 19:428.
34. Demirkaya M, Sevinir B. Nöroblastom. *Güncel Pediatri* 2006; 3: 128-132.
35. <http://www.cancer.gov/types/neuroblastoma/hp/neuroblastoma-treatment-pdq>
(National Cancer Institute (NCI) Neuroblastoma Treatment for health professionals)

36. Maris JM, Hogarty MD, Bagatell R, Cohn SL. Neuroblastoma. *Lancet*. 2007; 369(9579):2106-20. doi: 10.1016/S0140-6736(07)60983-0
37. Shimada H, Ambros IM, Dehner LP, Hata J, Joshi VV, Roald B. Terminology and morphologic criteria of neuroblastic tumors. *Cancer*. 1999; 86(2):349-63.
38. Gregorio A, Corrias MV, Castriconi R, Dondero A, Mosconi M, Gambini C, Moretta A, Moretta L, Bottino C. Small round blue cell tumours: diagnostic and prognostic usefulness of the expression of B7-H3 surface molecule. *Histopathology*. 2008; (1):73-80. doi: 10.1111/j.1365-2559.2008.03070.x
39. Brodeur GM, Maris JM. Neuroblastoma. In: Pizzo PA, Poplack DG eds. *Principles and Practice of Pediatric Oncology*. 5th ed, Philadelphia: Lippincott-Roven, 2006; p. 933-970.
40. Maris JM, Weiss MJ, Mosse Y, Hii G, Guo C, White PS, Hogarty MD, Mirensky T, Brodeur GM, Rebbeck TR, Urbanek M, Shusterman S. Evidence for a hereditary neuroblastoma predisposition locus at chromosome 16p12-13. *Cancer Res*. 2002; 62(22):6651-8.
41. Cheung NV and Cohn SL, eds. Heidelberg: Springer-Verlag; 2005, 298 pages.
42. American Society of Clinical Oncology, Cancer.Net, Neuroblastoma-Childhood: Risk Factors (<http://www.cancer.net/cancer-types/neuroblastoma-childhood/risk-factors>)
43. Mosse YP, Laudenslager M, Khazi D, Carlisle AJ, Winter CL, Rappaport E, Maris JM. Germline PHOX2B mutation in hereditary neuroblastoma. *Am J Hum Genet*. 2004; (4):727-30. doi: 10.1086/424530
44. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=PHOX2B> 74
45. Berry T, Luther W, Bhatnagar N, Jamin Y, Poon E, Sanda T, Pei D, Sharma B, Vetharoy WR, Hallsworth A, Ahmad Z, Barker K, Moreau L, Webber H, Wang W, Liu Q, Perez-Atayde A, Rodig S, Cheung NK, Raynaud F, Hallberg B, Robinson SP, Gray NS, Pearson AD, Eccles SA, Chesler L, George RE. The ALK(F1174L) mutation

potentiates the oncogenic activity of MYCN in neuroblastoma. Cancer Cell 2012; 22(1):117-30. doi: 10.1016/j.ccr.2012.06.001

46. Lonergan GJ, Schwab CM, Suarez ES, Carlson CL. Neuroblastoma, ganglioneuroblastoma, and ganglioneuroma: radiologic-pathologic correlation. Radiographics 2002; 22(4):911-34. doi: 10.1148/radiographics.22.4.g02jl15911

47. Patoloji Dernekleri Federasyonu Pediatrik ve perinatal patoloji grubu Değerlendirme Standartları ve Kılavuzları, 2010, 31- 36 (<http://www.turkpath.org.tr/>).

48. Lonergan GJ, Schwab CM, Suarez ES, Carlson CL. Neuroblastoma, ganglioneuroblastoma, and ganglioneuroma: radiologic-pathologic correlation. Radiographics 2002; 22(4):911-34. doi: 10.1148/radiographics.22.4.g02jl15911

49. Stanford University, Surgical Pathology Criteria, Neuroblastoma, Ganglioneuroblastoma and Ganglioneuroma <http://surgpathcriteria.stanford.edu/srbc/neuroblastomaganglioneuroblastomanglioneuroma/printable.html>

50. Dogan G, Ocalan K, Solak O. Mediastinal Ganglionöroma: Olgu Sunumu. Kocatepe Tıp Dergisi Kocatepe Medical Journal 2012; 13: 37-41.

51. Türk Pediatrik Onkoloji Grubu (TPOG) NÖROBLASTOM-2009 Tedavi Protokolü (http://www.tpog.org.tr/pdf/15_09_2009.pdf)

52. Van Roy N, De Preter K, Hoebeeck J, Van Maerken T, Pattyn F, Mestdagh P, Vermeulen J, Vandesompele J, Speleman F. The emerging molecular pathogenesis of neuroblastoma: implications for improved risk assessment and targeted therapy. Genome Med. 2009; 1(7):74. doi: 10.1186/gm74.

53. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MYCN>

54. Blackwood EM, Eisenman RN. Max: a helix-loop-helix zipper protein that forms a sequence-specific DNA-binding complex with Myc. Science 1991; 251(4998):1211-7

55. Bown N. Neuroblastoma tumour genetics: clinical and biological aspects. *J Clin Pathol.* 2001; 54(12):897-910.
56. Altungoz O, Aygun N, Tumer S, Ozer E, Olgun N, Sakizli M. Correlation of modified Shimada classification with MYCN and 1p36 status detected by fluorescence in situ hybridization in neuroblastoma. *Cancer Genet Cytogenet* 2007; 172(2):113-119. doi: 10.1016/j.cancergencyto.2006.10.005
57. Olgun N, Kansoy S, Aksoylar S et al Experience of the 436 Izmir Pediatric Oncology Group on neuroblastoma: IPOG-NBL- 437 92 Protocol. *Pediatr Hematol Oncol* 2003; 20:211–218.
58. Castleberry RP. Biology and treatment of neuroblastoma. *Pediatr Clin North Am.* 1997; 44:919-37.
59. Park JR, Eggert A, Caron H. Neuroblastoma: biology, prognosis, and treatment. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2010; 24:65-86. doi: 10.1016/j.hoc.2009.11.011
60. Bradeur GM, Maris JM. Neuroblastoma In: Pizzo PA, Poplack DG eds. *Principles and Practice of Pediatric Oncology* 5th ed. Philadelphia: Lippincott-Roven. 2006; 233-970.
61. Wicha MS, Liu S, Dontu G. Cancer stem cells: an old idea--a paradigm shift. *Cancer Res* 2006; 66 (4):1883-90. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-3153
62. Molyneux G, Regan J, Smalley MJ. Mammary stem cells and breast cancer. *Cell Mol Life Sci* 2007; 64 (24):3248-60. doi: 10.1007/s00018-007-7391-5
63. Lee HK, Lim SH, Han SB. Preclinical Efficacy and Mechanisms of Mesenchymal Stem Cells in Animal Models of Autoimmune Diseases. *Immune Netw* 2014; 14(2):81-8. doi: 10.4110/in.2014.14.2.81.
64. Du T, Zhu YJ. The Regulation of Inflammatory Mediators in Acute Kidney Injury via Exogenous Mesenchymal Stem Cells. *Mediators Inflamm* 2014; 2014:261697. doi: 10.1155/2014/261697.

65. Sahin F, Saydam G, Omay SB. Kök Hücre Plastisitesi ve Klinik Pratikte Kök Hücre Tedavisi. UHOD 2005; 15:48-56.
66. Teranishi MA, Nakashima T. Effects of trolox, locally applied on round windows, on cisplatin-induced ototoxicity in guinea pigs. Int J Pediatr Otorhinolaryngol 2003; 67(2):133-9.
67. Daldal A, Odabasi O, Serbetcioglu B. The protective effect of intratympanic dexamethasone on cisplatin-induced ototoxicity in guinea pigs. Otolaryngol Head Neck Surg 2007; 137(5):747-52. doi: 10.1016/j.otohns.2007.05.068
68. Rybak LP, Whitworth CA, Mukherjea D, Ramkumar V. Mechanisms of cisplatin induced ototoxicity and prevention. Hear Res 2007; 226(1-2):157-67. doi: 10.1016/j.heares.2006.09.015
69. Fetoni AR, Quaranta N, Marchese R, Cadoni G, Paludetti G, Sergi B. The protective role of tiopronin in cisplatin ototoxicity in Wistar rats. Int J Audiol 2004; 43(8):465-70.
70. van den Berg JH, Beijnen JH, Balm AJ, Schellens JH. Future opportunities in preventing cisplatin induced ototoxicity. Cancer Treat Rev 2006; 32(5):390-7. doi: 10.1016/j.ctrv.2006.04.011
71. Ho YP, Au-Yeung SC, To KK. Platinum-based anticancer agents: innovative design strategies and biological perspectives. Med Res Rev 2003; 23(5):633-55. doi: 10.1002/med.10038
72. Siddik Z H. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. Oncogene 2003; 22(47):7265-79. doi: 10.1038/sj.onc.1206933
73. Bose RN. Biomolecular targets for platinum antitumor drugs. Mini Rev Med Chem 2002; 2(2):103-11.
74. Ormerod MG, Orr RM, Peacock JH. The role of apoptosis in cell killing by cisplatin: a flow cytometric study. Br J Cancer 1994; 69:93-100.
75. Nguyen HN, Sevin BU, Averette HE, Perras J, Ramos R, Donato D, Ochiai K, Penalver. Cell cycle perturbations of platinum derivatives on two ovarian cancer cell lines. Cancer Invest 1993; 11(3):264-75.
76. Pannetier C, Levraud J-P, Lim A, et al. The Immunoscope approach for the analysis of T cell repertoires. In: The Human T Cell Antigen Receptor: Selected

Protocols and Applications. (Oksenberg JR, ed), Chapman & Hall, New York, NY 1997: 287–325.

77. Bianchi G, Morandi F, Cilli M, Daga A, Tyndall CB, Gambini C, Pistoia V, Raffaghello L. Close Interactions between Mesenchymal Stem Cells and Neuroblastoma Cell Lines Lead to Tumor Growth Inhibition. PLoS One 2012; 7(10):e48654. doi: 10.1371/journal.pone.0048654.

78. Pistoia V, Morandi F, Bianchi G, Pezzolo A, Prigione I, Raffaghello L. Immunosuppressive microenvironment in neuroblastoma. Front Oncol. 2013; 3:167. doi: 10.3389/fonc.2013.00167.



8. EKLER
ETİK KURUL ONAYI
ÖZGEÇMİŞ
TEZİN YAYIN HALİ
ÖDÜLLER



8.1 Etik kurul onayı

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2014/24-31	Tarih: 10.07.2014				
	Prof.Dr.Safiye AKTAŞ'ın sorumlusu olduğu "Nöroblastomda Kanser Kök Hücrelerine Mezenkimal Kök Hücre ve Tümör İnfiltrat Edici Lenfositlerin Etkisi" isimli klinik araştırmaya ait başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, etik açıdan çalışmanın gerçekleştirilmesinin uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.					
ETİK KURUL BİLGİLERİ						
ÇALIŞMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi İy Klinik Uygulamaları Kılavuzu					
ETİK KURUL ÜYELERİ						
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsi yet	Araştırma ile ilişkili mi?		İmza
Prof.Dr.Banu ÖNVURAL (Başkan)	Tıbbi Biyokimya	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Ş.Reyhan UÇKU (Başkan Yardımcısı)	Halk Sağlığı	DEU Tıp Fakültesi Halk Sağlığı A.D.	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Nejat SARIOSMANOĞLU	Kalp Damar Cerrahisi	DEU Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	Katılmadı
Prof.Dr.Ece BÖBER	Pediyatrik Endokrinoloji	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Hüseyin BASKIN	Tıbbi Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Vesile ÖZTÜRK	Nöroloji	DEU Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Bilgin CÖMERT	İç Hastalıkları (Yoğun Bakım B.D)	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Mukaddes GÜNELİ	Tıbbi Farmakoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	Katılmadı
Prof.Dr.Ayşe Aydan ÖZKÜTÜK	Tıbbi Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	Katılmadı
Prof.Dr.Nihal GELECEK	Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEU Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksek Okulu	Kadın	E ☐	H ☒	Katılmadı
Prof.Dr.Işıl TEKMEK	Histoloji ve Embriyoloji	DEU Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Müge KIRAY	Fizyoloji	DEU Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Şeyda Seren İNTEPELER	Hemşirelik Yönetimi	DEU Hemşirelik Fakültesi Hemşirelik Yönetimi A.D	Kadın	E ☐	H ☒	
Uzm.Dr.Ahmet Can BİLGİN	Hukuk	DEU Tıp Tarihi ve Etik A.D	Erkek	E ☐	H ☒	
Mehmet Erhan ÖZKUL	Sağlık mensubu olmayan üye	D.E.U Tıp Fakültesi İdari Mali İşler	Erkek	E ☐	H ☒	



TC.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
Onkoloji Enstitüsü Müdürlüğü
Temel Onkoloji Anabilim Dalı Başkanlığı

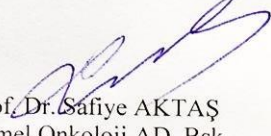


Sayı : 51202101 /
Konu : 38/15

04.08.2015

İLGİLİ MAKAMA;

Prof. Dr. Safiye AKTAŞ'ın yöneticisi olduğu Dr.Zübeyde YILDIRIM EKİN'in 'Nöroblastom'da Kanser Kök Hücrelerine Mezenkimal Kök Hücre ve Tümör İnfitre Edici Lenfositlerin Etkisi' isimli doktora tezinin Temel Onkoloji Anabilim Dalı Labarotuarlarında uygulanması uygun bulunmuştur.


Prof. Dr. Safiye AKTAŞ
Temel Onkoloji AD. Bşk.

Mithatpaşa Caddesi No:1606 İnciraltı 35340 İzmir
Tel: 0(232) 412 8201 Fax: 0(232) 278 9495
e-posta: temelonkoloji@deu.edu.tr

Ayrıntılı bilgi için
Gülperi ÇANKAYA
Tel.: 412 8201



8.2 Tezle İlgili Makaleler

İzmir Dr. Behçet Uz Çocuk Hast. Dergisi 2016; 6(2):109-112
doi:10.5222/buchd.2016.109

Klinik Araştırma

Nöroblastom olgularımızın dökümantasyonu (49 olgu, retrospektif çalışma)

Documentation of our neuroblastoma cases (49 cases, retrospective study)

Zübeyde YILDIRIM EKİN¹, Hülya TOSUN YILDIRIM², Bengü DEMİRAĞ³, Ceren SAYAR¹,
Rahmi Gökhan EKİN¹, Safiye AKTAŞ³, Gülden DİNİZ¹, Canan VERGİN²

¹Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İzmir

²Dr. Behçet Uz Çocuk Hastalıkları ve Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İzmir

³Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, İzmir

ÖZ

Amaç: Nöroblastom çocukluk çağında en sık görülen ekstrakraniyal solid tümör ve infantlarda görülen en sık tümördür. Olguların yaklaşık yarısı 2 yaşından önce görülmektedir. Nöroblastom nöral krestten köken alan nöroendokrin bir tümördür. En sık görüldüğü yer adrenal medulla olmakla birlikte, boyun gövde abdomen ve pelvisteki nöral dokulardan da gelişebilir. Bu çalışmada, Shimada sınıflaması temeline dayanarak nöroblastom olgularının yine yeniden gözden geçirilmesi amaçlanmıştır.

Yöntemler: Çalışmaya 2004-2015 yılları arasında nöroblastom tanısı konulan 49 hasta alındı. Tümör boyutu, yerleşimi, diferansiyasyon, mitotik karyorektik indeks (MKI) ve yaş parametreleri değerlendirildi. Shimada sınıflamasına göre iyi ve kötü prognostik olarak sınıflandırıldı. Shimada sınıflaması ile sağkalm arasındaki ilişki log-rank testi ile değerlendirildi.

Bulgular: Çalışmaya alınan 49 hasta ortalama 62,9±7,8 ay takip edildi. Hastaların 13'ü (%26,5) öldü. Shimada sınıflamasına göre 33 (%67,3) hasta kötü prognostik, 16 (%32,7) hasta iyi prognostik grupta yer aldı. İyi ve kötü prognostik grupta sağkalm oranları sırası ile %87,5 ve %66,7 olarak bulundu (p=0.011).

Sonuç: Shimada sınıflaması ile sağkalm ilişkili bulunmuştur.

Anahtar kelimeler: Nöroblastom, Shimada klasifikasyonu, nöral krest

ABSTRACT

Objective: Neuroblastoma (NB) is the most common extracranial solid cancer in childhood and the most common cancer in infancy. Nearly half of neuroblastoma cases occur in children younger than two years. It is a neuroendocrine tumor, arising from neural crest. It most frequently originates from one of the adrenal glands, but can also develop in neural tissues in the neck, chest, abdomen, or pelvis. In this study, neuroblastoma cases were reviewed and classified according to the Shimada classification.

Methods: Forty-nine patients who were diagnosed as neuroblastoma from 2004 to 2015 were included the study. Parameters as tumor size, location, differentiation, mitotic caryorrhectic index and age were evaluated. Tumors were categorized into favourable and unfavourable prognostic groups according to the Shimada classification. Log-rank test was used to assess interaction between the Shimada classification and survival.

Results: Forty-nine patients included in this study, were followed up for a mean period of 62.9±7.8 months. Thirteen (26.5%) patients died. According to the Shimada classification, 33 (67.3%) patients were in unfavourable while 16 (32.7%) patients in favourable prognostic group. Survival rates in favourable and unfavourable prognostic groups were 87.5% and 66.7%, respectively (p=0.011).

Conclusion: Shimada classification was found to be associated with survival.

Key words: Neuroblastoma, Shimada classification, neural crest

Alındığı tarih: 25.04.2016

Kabul tarihi: 21.06.2016

Yazışma adresi: Uz. Dr. Hülya Tosun Yıldırım,
İzmir Behçet Uz Çocuk Hastanesi, İzmir
e-mail: drhulyatosun@gmail.com

GİRİŞ

Nöroblastom, primitif nöral krest hücrelerinden köken alan ve sıklıkla adrenal medulla veya sempatik ganglionlarda yerleşen bir tümördür. Hastalığın klinik prezentasyonu çok geniştir. Tedavisi ise bazı klinik ve biyolojik faktörlerin varlığına veya yokluğuna göre değişmektedir ⁽¹⁾. Çok heterojen bir tümör grubu olması nedeni ile hastalığın sınıflandırılmasında birçok faktör rol oynamaktadır. International Neuroblastoma Pathology Committee (INPC) tarafından 1999 yılında iyi ve kötü histolojik özellikleri saptamada Shimada sınıflandırmasını geliştirilmiştir ⁽²⁾. 2004 yılında ise International Neuroblastoma Risk Group (INRG) tarafından yedi prognostik risk faktörünün kombinasyonlarına göre 16 tedavi öncesi grup oluşturulmuş ⁽³⁾. Tedavi grupları ise sağkalım ile ilişkisine göre çok düşük, düşük, orta ve yüksek olmak üzere 4 risk grubuna indirgenmiştir.

Bu çalışmada 2004-2015 yılları arasında Behçet Uz Çocuk Hastanesinde nöroblastom tanısı almış 49 hastanın histopatolojik ve klinik özelliklerinin gözden geçirilip, Shimada sınıflandırmalarına göre dökümanite edilmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmaya 2004-2015 yılları arasında nöroblastom tanısı konulan, tedavi ve izlemi yapılan 49 hasta alındı. Materyalin alınış şekli eksizyon, tru-cut veya konsültasyon olarak değerlendirildi. Tümörün boyutu ile tümör yerleşimi sürrenal, mediasten, lenf nodu ve diğer olarak sınıflandırıldı. Hastaların H&E boyalı histopatolojik kesitleri değerlendirildi. Tümör diferansiyasyonu indifferansiye, az diferansiye ve diferansiye olarak değerlendirildi. Hiç nöropil içermeyen, küçük yuvarlak veya pleomorfik büyük indifferansiye hücrelerden oluşan tümörler indifferansiye olarak değerlendirildi. Diferansiyasyon bulgusu göstermeyen ama zeminde nötropil içeren tümörler ile %5'in altında diferansiyasyon gösteren tümörler az diferansiye olarak değerlendirildi. Çok sayıda ara ya da ganglion hücresine benzer sayıca %5'ten fazla diferansiyasyon

gösteren nöroblastları içeren tümörler ise diferansiye olarak değerlendirildi. Histopatolojik bulgulara ek olarak hastanın tanı konulduğu andaki yaşı ve mitotik karyorektik indeksini (MKİ) içeren INPC Shimada sınıflaması kullanıldı ve hastalar iyi ve kötü olarak iki prognostik gruba ayrıldı (Tablo 1). MKİ düşük (<%2), orta (%2-4) ve yüksek (>%4) olarak değerlendirildi.

Tablo 1. Shimada sınıflandırması.

Prognostik Kategori	Diferansiyasyon	MKİ	Yaş (yıl)
İyi	Diferansiye	D / O	<1,5
İyi	Diferansiye	D	1,5-5
İyi	Az Diferansiye	D / O	<1,5
Kötü	Diferansiye	O / Y	1,5-5
Kötü	Az Diferansiye	D / O / Y	1,5-5
Kötü	İndifferansiye	D / O / Y	<1,5
Kötü	İndifferansiye	D / O / Y	1,5-5
Kötü	Herhangi	Y	<1,5
Kötü	Herhangi	D / O / Y	>5

D: Düşük, O: Orta, Y: Yüksek

Tablo 2. Hastaların tümör özellikleri.

Cinsiyet dağılımı	Sayı/Yüzde	
Kız	27 (%55,1)	
Erkek	22 (%44,9)	
Tümörün yerleşim yeri	Sayı/Yüzde	
Sağ sürrenal	16 (%32,6)	
Sol sürrenal	10 (%20,4)	
Mediasten	7 (%14,3)	
Lenf nodu	1 (%2)	
Diğer	15 (30,7)	
Histopatoloji derece	Sayı/Yüzde	
Diferansiye	20 (%40,9)	
Az diferansiye	24 (%48,9)	
İndifferansiye	5 (%10,2)	
Shimada sınıflaması	Sayı/Yüzde	Sağkalım oranı
İyi prognostik grup	16 (%32,7)	%87,5
Kötü prognostik grup	33 (%67,3)	%66,7

İstatistiksel değerlendirme için SPSS 19 programı kullanıldı. Tanımlayıcı ve dağılımsal değerlendirmeler yapıldı. Kaplan-Meier sağkalım analizi yapıldı ve gruplar arasındaki sağkalım farkı log-rank testi ile yapıldı.

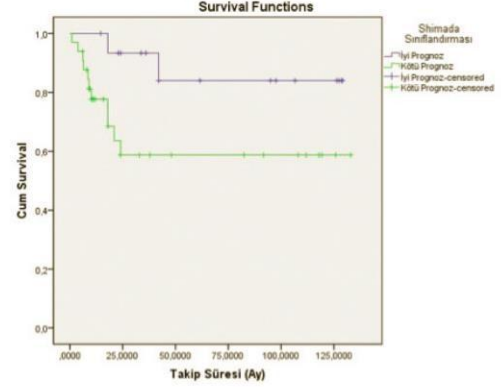
BULGULAR

Çalışmadaki 49 hastanın 27'si kız (%55,1) ve 22'si erkek (%44,9) idi. Hastaların ortalama yaşı $40,34 \pm 39,2$ (1-151) ay ve ortanca 25,6 ay idi. Hastaların 22'si (%44,9) 18 ay altında, 17'si (%34,7) 18 ay ile 5 yaş arasında, 10'u (%20,4) 5 yaş üstünde idi. Hastaların 4'ü (%8,1) evre 1, 3'ü (%6,1) evre 2, 20'si (%40,9) evre 3 iken, 22'si (%44,9) evre 4 idi.

Hastalar ortalama $62,98 \pm 7,8$ ay ve ortanca 45,1 ay takip edildi. Takip süresince hastaların 13'ü (%26,5) öldü. Tümör yerleşimi 10 hastada (%20,4) sağ sürrenalde, 16 hastada (%32,6) sol sürrenalde, 7 hastada (%14,3) mediastende, 1 hastada (%2,0) lenf nodunda ve 15 hastada (%30,7) ise çeşitli diğer alanlarda idi. Tümör çapı ortalama $5,2 \pm 0,4$ (1-13) cm idi. Materyalin temin edilme şekli 35 hastada (%71,4) eksizyon, 10 hastada (%20,4) tru-cut biyopsi ve 4 hastada (%8,2) konsültasyon blokları idi.

Histopatolojik değerlendirmede hastaların 20'si (%40,9) diferansiye, 24'ü (%48,9) az diferansiye ve 5'i (%10,2) indiferansiye idi. MKİ değerlendirmesinde 23 hastanın (%46,9) düşük, 10 hastanın (%20,4) orta ve 16 hastanın (%32,7) yüksek idi. Nekroz varlığı değerlendirildiğinde 31 hastada (%63,3) nekroz tespit edilmez iken, 11 hastada (%22,4) fokal nekroz odakları ve 7 hastada (%14,3) yaygın nekroz tespit edildi. Yirmi bir hastada (%42,8) hemoraji odakları vardı. Bir hastada kapsül rüptürü, 8 hastada kalsifikasyon, 18 hastada kemik iliği tutulumu tespit edildi. İmmunohistokimyasal değerlendirmede hastaların 48'i (%97,9) NSE pozitif, 48'i (%97,9) sinaptofizin pozitif idi. Tüm hastalarda CD99 ile boyanma negatif idi. Shimada sınıflamasına göre hastaların 16'sı (%32,7) iyi prognostik grupta iken, 33'ü (%67,3) kötü prognostik grupta yer almakta idi. Hastaların myc amplifikasyon verilerine ulaşamadığımız için değerlendirmede kullanılamamıştır.

Kaplan-Meier sağkalım analizinde Shimada risk sınıflamasına göre iyi prognostik gruptaki hastaların sağkalım oranı %87,5 iken, kötü prognostik grupta %66,7 olarak tespit edilmiştir ($p=0,011$) (Şekil 1).



Şekil 1. Shimada risk gruplarına göre Kaplan-Meier sağkalım eğrisi.

TARTIŞMA

Nöroblastom en sık görülen ekstrakraniyal solid tümör olup, çocukluk çağı malignitelerinin %8-10'unu oluşturur. Etiyolojisi net değildir. Embriyolojik olarak nöral krest gelişim bozukluğuna bağlı geliştiği düşünülmektedir ^(1,2). Tanı konulduğu anda hastaların %36'sı 1 yaşın altında iken %75'i 4 yaş altındadır ⁽⁴⁾. Çalışmamızda tanı anında hastaların %79,6'sı 5 yaş altında idi. Erkek kız oranı ise 1.2 idi ⁽⁴⁾. Çalışmamızda ise kızlarda daha sık olduğu tespit edilmiştir.

Nöroblastom, Ewing sarkomu, non-Hodgkin lenfoma, rabdomyosarkom ve periferik primitif nöroektodermal tümörlerinde bulunduğu küçük yuvarlak mavi hücreli tümörler grubundandır. Nöroblastom, sempatoadrenal yolu oluşturan nöral krest hücrelerinden köken alır. Tümörün diferansiasyon derecesi ile prognosis arasındaki ilişki net olarak Beckwith ve Martin ⁽⁵⁾ tarafından ortaya konulmuştur. Bu konuda çalışmalar devam etse de, Shimada ve ark. ⁽²⁾ tarafından histopatolojik bulgular ile yaşı birliktede değerlendirildiği sınıflandırma ile prognosis daha iyi gösterilmiştir. Bu sınıflamada nöroblast diferansiasyon bulgularına ek olarak Schwann hücresi, perinöral ve endonöral elemanlar gibi stromal bileşenler ve hücrelerin mitoz oranı da değerlendirilmiştir. Shimada ve ark. ⁽²⁾ çalışmalarında, indiferansiye tümörlerin sıklığı %88 bildirirken, iyi diferansiye tümörler sıklığı

%8,5'tir. Ayrıca, Shimada sınıflamasına göre kötü prognostik grupta 3-yıllık hastalıksız sağkalımı %41 tespit ederken, iyi prognostik grupta %85 bulmuşlardır. Ülkemizde yapılan bir çalışmada, sağkalım oranları ile Shimada sınıfı, MKİ ve diferansiasyon arasında ilişki bulunmamıştır⁽⁶⁾. Çalışmamızda, diferansiye tümör oranı %40,9 bulunurken, indiferansiye tümör oranı ise %10,2'dir. Çalışmamızda, iyi prognostik grupta sağkalım oranı %87,5 iken, kötü prognostik grupta %66,7 olarak bulunmuştur. Nöroblastomun uygun histolojik tanısı ve genetik incelemelerinin yapılabilmesi için belli boyutta bir doku gereklidir. Bunun içinde 5 adet perkutan iğne biyopsisi yeterli gelmektedir⁽⁷⁾.

Nöroblastom prognozunda önemli olan diferansiasyon, MKİ ve n-myc amplifikasyonu birbiri ile ilişkilidir^(1,3,8). N-myc amplifikasyonu ile fazla miktarda üretilen myc-n proteini, daha fazla myc-max protein kompleksi oluşmasına neden olur. Bu kompleks ise hücre çekirdeğinde, hücrenin diferansiasyonunu azaltır ve hücre proliferasyonunu uyarır. Bu nedenle N-myc amplifiye eden tümörlerin diferansiasyonu kötü ve proliferasyon indeksi yüksektir^(1,6,8). Bazı ailesel nöroblastom olgularında PHOX2B ve ALK gen mutasyonları tanımlanmıştır^(9,10,11).

SONUÇ

Bu çalışmada, nöroblastom hastalarımız değerlendirilmiş olup, Shimada sınıflamasına göre dağılımları ortaya konulmuştur. Shimada sınıflaması hastalarda prognozu öngörmektedir. İyi ve kötü prognostik gruplar arasındaki sağkalım farkı ve gözlemciler arası uyumun yüksek olması yanında terminoloji birliği açısından Shimada sınıflamasını rutin pratikte uygulamak oldukça yararlıdır.

KAYNAKLAR

1. Bagatell R, Cohn SL. Genetic discoveries and treatment advances in neuroblastoma. *Curr Opin Pediatr* 2016;28:19-25.
<http://dx.doi.org/10.1097/MOP.0000000000000296>
2. Shimada H, Ambros IM, Dehner LP, Hata J, Joshi V V, Roald B, et al. The international neuroblastoma pathology classification (the Shimada system). *Cancer* 1999;86:364-72.
[http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0142\(19990715\)86:2<364::AID-CNCR21>3.0.CO;2-7](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1097-0142(19990715)86:2<364::AID-CNCR21>3.0.CO;2-7)
3. Cohn SL, Pearson ADJ, London WB, Monclair T, Ambros PF, Brodeur GM, et al. The International neuroblastoma risk group (INRG) classification system: an INRG task force report. *J Clin Oncol* 2009;27:289-297.
<http://dx.doi.org/10.1200/JCO.2008.16.6785>
4. Navalkele P, O'Dorisio MS, O'Dorisio TM, Zamba GKD, Lynch CF. Incidence, survival, and prevalence of neuroendocrine tumors versus neuroblastoma in children and young adults: nine standard SEER registries, 1975-2006. *Pediatr Blood Cancer* 2011;56:50-57.
<http://dx.doi.org/10.1002/pbc.22559>
5. Beckwith JB, Martin RF. Observations on the histopathology of neuroblastomas. *J Pediatr Surg* 1968;3:106-110.
[http://dx.doi.org/10.1016/0022-3468\(68\)90989-5](http://dx.doi.org/10.1016/0022-3468(68)90989-5)
6. Aktaş S, Ortaç R, Diniz G, Erbay A, Karaca İ, Kızılay N, et al. Nöroblastom olgularımızın modifiye Shimada yöntemiyle histopatolojik sınıflandırılması (35 olgu, retrospektif çalışma). *Turkish J Pathol* 2001;17:7-10.
7. Hoffer FA, Chung T, Diller L, Kozakewich H, Fletcher JA, Shamberger RC. Percutaneous biopsy for prognostic testing of neuroblastoma. *Radiology* 1996;200:213-216.
<http://dx.doi.org/10.1148/radiology.200.1.8657913>
8. Pinto NR, Applebaum MA, Volchenboum SL, Matthay KK, London WB, Ambros PF, et al. Advances in risk classification and treatment strategies for neuroblastoma. *J Clin Oncol* 2015;33:3008-3017.
<http://dx.doi.org/10.1200/JCO.2014.59.4648>
9. Mosse YP, Laudenslager M, Khazi D, Carlisle AJ, Winter CL, Rappaport E, et al. Germline PHOX2B mutation in hereditary neuroblastoma. *Am J Hum Genet* 2004;75:727-730.
<http://dx.doi.org/10.1086/424530>
10. Mossé YP, Laudenslager M, Longo L, Cole KA, Wood A, Attiyeh EF, et al. Identification of ALK as a major familial neuroblastoma predisposition gene. *Nature* 2008;455:930-935.
<http://dx.doi.org/10.1038/nature07261>
11. Altun Z, Çecen E, Pamukoğlu A, Aktaş S, Olgun N. Silmarin nöroblastom hücrelerinde pro-inflamatuvar sitokin üretimini düzenleyerek sispaltin ile birlikte hücre ölümünü etkiler mi? *İzmir Dr Behçet Uz Çocuk Hast Derg* 2016;6:37-45.

8.3 Özgeçmiş

ÖZGEÇMİŞ

ADI SOYADI ZÜBEYDE YILDIRIM EKİN

TC Kimlik No / Pasaport No: 16466990304

Doğum Yılı: 1986

Yazışma Adresi : RAFETPAŞA MAH. 5182/1 SOK KENT BORNOVA EVLERİ
B BLOK 3. KAT D13. BORNOVA/İZMİR

Telefon : 5068524533

Faks : -

e-posta : Zubeyde.dr@hotmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Ülke	Üniversite	Fakülte/Enstitü	Öğrenim Alanı	Derece	Mezuniyet Yılı
TC	ZONGULDAK KARAEMLAS ÜNİVERSİTE Sİ	TIP FAKÜLTESİ	TIP BÖLÜMÜ		2011
TC	TEPECİK EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ	PATOLOJİ BÖLÜMÜ	PATOLOJİ		2016
TC	EGE ÜNİVERSİTE Sİ PATOLOJİ BÖLÜMÜ	PATOLOJİ BÖLÜMÜ	SİTOPATOLOJİ		

AKADEMİK/MESLEKTE DENEYİM

Kurum/Kuruluş	Ülke	Şehir	Bölüm/Birim	Görev Türü	Görev Dönemi
SAĞLIK BAKANLIĞI	TC	ZONGUD AK	3 NOLU ACİL SAĞLIK HİZMETLERİ	HEKİM	EYLÜL 2011- ŞUBAT2012
SAĞLIK BAKANLIĞI	TC	İZMİR	TEPECİK EAH	PATOLOJİ ASİSTANI	SUBAT 2012- MAYIS 2016
SAĞLIK BAKANLIĞI	TC	İZMİR	MENEMEN İLÇE HASTANESİ	.PATOLOJİ UZMANI	MAYIS 2016-

UZMANLIK ALANLARI

Uzmanlık Alanları

Tıbbi patoloji

Temel onkoloji

DİĞER AKADEMİK FAALİYETLER

Son Bir Yılda Uluslararası İndekslere Kayıtlı Makale/Derleme İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı			-
Son Bir Yılda Projeler İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı			-
Yayınlara Alınan Toplam Atıf Sayısı			
Danışmanlık Yapılan Öğrenci Sayısı		Tamamlanan	Devam Eden
	Yüksek Lisans		
	Doktora		
	Uzmanlık		
Diğer Faaliyetler (Eser/görev/faaliyet/sorumluluk/olay/üyelik vb.)			

ÖDÜLLER

Ödülün Adı	Alındığı Kuruluş	Yılı
☐ Poster ödülü	Türk kanser araştırma ve savaş kurumu	2016

YAYINLARI

SCI, SSCI, AHCI indekslerine giren dergilerde yayınlanan makaleler

- 1- Intraoperative squash cytology and histology of giant cell ependymoma: A diagnostic dilemma E Cakir, U Kucuk, A Ersen, EE Pala, M Senoglu, AO Binatli, Z Yildirim Journal of cytology 34 (1), 63
- 2- Expression of Stromal Caveolin-1 May Be a Predictor for Aggressive Behaviour of Breast Cancer. N Eliyatkin, S Aktas, G Diniz, HH Ozgur, ZY Ekin, A Kupelioglu Pathology oncology research: POR
- 3- Anterior Apical Cores in the Initial Prostate Biopsy do not Increase Detection Rate of Significant Prostate Cancer. Gokhan Ekin, F Zorlu, I Akarken, Z Yildirim, H Tarhan, G Koc, U Kucuk, .Urology Journal 12 (2)

- 4- Intravesical bacillus Calmette-Guérin versus chemohyperthermia for high-risk non-muscle-invasive bladder cancer
- 5- RG Ekin, I Akarken, F Zorlu, H Tarhan, U Kucuk, Z Yildirim, RT Divrik Canadian Urological Association Journal 9 (5-6), E278
- 6- Primary squamous cell carcinoma of the urethral diverticulum mimicking prostate cancer: Case report and review of the literature RG Ekin, Z Yildirim, U Bayol, G Diniz, C Karaca, F Zorlu Canadian Urological Association Journal 9 (5-6), E329

Diğer dergilerde yayımlanan makaleler

- 1- Endometriozis of bladder zubeyde yildirim ekin Journal of Urological Surgery 3 (2), 64
- 2- Saime Unluoglu, Ümit Bayol, İbrahim Çukurova, Kerem Karaman **Zubeyde Yildirim.** Metastasis of the Rectal Carcinoma to Hard Palate. An Unusual Presentation
- 3- Primer Mesane Kanseri Tanısında Cinsiyet Farklılığının Patolojik Sonuçları Rahmi Gökhan Ekin¹, Zübeyde Yıldırım Ekin², Gökhan Koç¹, Ayşe Gül den Diniz Ünlü², Yusuf Özlem İlbey¹, Ferruh Zorlu¹ Tepecik Eğitim Hast Derg. 2015; 25(2): 89-92 | DOI: 10.5222/terh.2015.089
- 4- Fetal ve neonatal otopsi sonuçlarımız Zübeyde Yıldırım Ek İn , Sevil Sayhan , Pınar Öksüz , Duygu Ayaz ... İzmir Dr. Behçet Uz Çocuk Hast. Dergisi 2015; 5(2):115-119
- 5- Ülkü Küçük, **Zübeyde Yıldırım**, Ümit Bayol, Emel Ebru Pala, Ebru Çakır, İbrahim Çukurova. Karotid cismi paragangliomu
- 6- Meme kanserinin klinikopatolojik özelliklerinin moleküler alt tipe göre değerlendirilmesi GDİİ Melek Ünçel , Gamze Aköz , Zübeyde Yıldırım , Gönül Pişkin , Mustafa Değirmenci Tepecik Eğitim ve Araştırma Hast. Dergisi
- 7- Histopathological Review of Male Breast Cancer Cases EE Pala, Z Yildirim, U Kucuk, E Cakir, N Senkorkmaz, U Bayol Medical Science and Discovery 1 (3), 76-79
- 8- Coexistence of intracranial marginal zone B-cell lymphoma and meningioma: Case report and review of the literature E Cakir, Z Yildirim, U Kucuk, EE Pala, AO Binatli, U Bayol Indian Journal of Neurosurgery 3 (3), 154

Hakemli konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayınlar
II-Yurtiçi Kongre (Poster sunumları)

1-Inverted Papillom Üzerinde Gelişmiş Skuamöz Hücreli Karsinom : Olgu Sunumu

Yildirim Z. Bayol NÜ, Ünlüoğlu S, SayhanS, Çukurova I, DuyguluH

(23. Ulusal Patoloji Kongresi) (6-10 Kasım 2013)

2-Whartın-Benzeri Papiller Tiroid Karsinomu: 3 Olgu Sunumu

Yildirim Z., Ünlüoğlu S., Bayol NÜ, KüçükÜ, Pala EE, SezerÖ, Şen KorkmazN

(23. Ulusal Patoloji Kongresi) (6-10 Kasım 2013)

3-Malign Bifazik Nodüler Plevral Mezotelyoma: Olgu Sunumu

Yildirim Z. Özgüzer A; SertC, Bayol NÜ,

(23. Ulusal Patoloji Kongresi) (6-10 Kasım 2013)

4-Karotid Cismi Malign Paragangliomu: 2 Olgu Sunumu

KüçükÜ, **Yildirim Z.** Bayol NÜ, Pala EE, Çukurova I

(23. Ulusal Patoloji Kongresi) (6-10 Kasım 2013)

5-Toksik guatr ön tanısı ile gelen olguda amiloid guatr ve diffüz lipomatozis birlikteliği

Karadeniz T, **Yildirim Z.** Bayol NÜ, Karaca C

(23. Ulusal Patoloji Kongresi) (6-10 Kasım 2013)

6-Memenin Hamartomu

Bayol NÜ, Ünlüoğlu S, Cumurcu S, **Yıldırım Z**, Usturalı Keskin FE, küçükalioglu S
(23. Ulusal Patoloji Kongresi) (6-10 Kasım 2013)

7-Respratuvar Epitelyal Adenomatoid Hamartom: Olgu Sunumu

Çakır İE, Pala EE, Küçük Ü, **Yıldırım Z**, Çukurova I, Bayol NÜ

(23. Ulusal Patoloji Kongresi) (6-10 Kasım 2013)

8- Zübeyde Yıldırım, Emel Ebru Pala, Ülkü Küçük, Ebru Çakır, Ümit Bayol
Erkek Meme Kanseri Olgularımızda Histopatolojik Verilerin Dökümü ve Sağkalım ilişkisi

24. ulusal patoloji kongresi (19-23 Kasım 2014)

9- Dudu Solakoğlu Kahraman¹, Duygu Ayaz¹, **Zübeyde Yıldırım¹**, Sevil Sayhan¹, Tuğba Karadeniz¹, Gbrahim Çukurova²
Nazofarenkste Nadir Bir Kist:Thornwaldt Kisti

24. ulusal patoloji kongresi (19-23 Kasım 2014)

10- Dudu Solakoğlu Kahraman¹, Gülden Diniz¹, **Zübeyde Yıldırım¹**, Duygu Ayaz¹, Sevil Sayhan¹, Tuğba Karadeniz¹, Ali Özcan Binatlı², Eren Demirtağ.
Primitif Nöroektodermal Tümör Benzeri Komponent Geçeren Glioblastom:Olgu Sunumu

24. ulusal patoloji kongresi (19-23 Kasım 2014)

11- Dudu Solakoğlu Kahraman¹, Ebru Çakır¹, Zekiye Aydoğdu², Gamze Aköz¹, **Zübeyde Yıldırım¹**, Gsmail Sert³, Ömer Burçak Binicier
Primer Akciğer Sarkomatoid Karsinomun Mide Endoskopik Biyopsi ve Gnce Barsak Perforasyonu Sonrası Saptanan Metastazları: 2 Olgu Sunumu

24. ulusal patoloji kongresi (19-23 Kasım 2014)

12- **Zübeyde Yıldırım¹**, AyGe Gül den Diniz Ünlü¹, Emel Ebru Pala¹, Ali Sayan.
Nadir lokalizasyonlu rabdomyomatöz mezenkimal hamartom

24. ulusal patoloji kongresi (19-23 Kasım 2014)

13- **Zübeyde Yıldırım¹**, Ümit Bayol¹, Süheyla Cumhurcu¹, Ali Özcan Binatlı
Suprasellar Kordoma: Case Report

24. ulusal patoloji kongresi (19-23 Kasım 2014)

14- **Zübeyde Yıldırım**, Ebru Çakır, Emel Ebru Pala, Ülkü Küçük, Ümit Bayol

Safra Duktus Adenomu:Olgu Sunumu.

24. ulusal patoloji kongresi (19-23 Kasım 2014)

15- **Zübeyde Yıldırım1**, Saime Ünlüoğlu1, Yetkin Koca1, Elif Keskin1, Berna Atabay2, Meral Türker2, Haldun Öniz2, Ümit Bayol.
Costa Kaynaklı Ewing Sarkomu: Olgu Sunumu

24. ulusal patoloji kongresi (19-23 Kasım 2014)

16- **Zübeyde Yıldırım1**, Saime Ünlüoğlu1, Hadun Öniz2, Ümit Bayol1
Çocukluk Çağı Castleman Hastalığı:6 Olgunun Dökümantasyonu

24. ulusal patoloji kongresi (19-23 Kasım 2014)

17- **Zübeyde Yıldırım1**, Ümit Bayol1, Sülün Narin Solakoğlu2, Nur Yücel Cabar
Sarkoidozda Gastrik Tutulum:2 Olgu Sunumu

24. ulusal patoloji kongresi (19-23 Kasım 2014)

18- Ebru Çakır1, Ülkü Küçük1, Ayça ErGen2, Emel Ebru Pala1, Mehmet genoglu3, Ali Özcan Binatlı3, **Zübeyde Yıldırım1**
Dev Hücreli Ependimom Olgusunda İntraoperatif İmprint Sitoloji ve Histopatoloji Bulguları

24. ulusal patoloji kongresi (19-23 Kasım 2014)

II-Yurtdışı Kongre Katılımları (Poster sunumları)

European Society of Gynaecological Oncology(ESGO)

1-Adenoid Basal Carcinoma of the Cervix

Sayhan S, Karadeniz T, Tosun G, Gokcu M, **Yildirim Z.** Kahraman D;, Adiyek M, Sancı M
(**European Society of Gynaecological Oncology(ESGO)**)

2-Case Report: Existence of Low Grade Endometrial Adenocarcinoma and Undifferentiated Carcinoma (Dediferantiated Carcinoma)

Sayhan S, Karadeniz T, Gokcu M Ocal E.C.E, Adiyek M, Sancı M, **Yildirim Z.** Sezer Ö, Ayaz D, Kahraman
(**European Society of Gynaecological Oncology(ESGO)**)

3- G. Diniz, O yavascan, **Z. Yildirim**, B. sarkiz, C. alparslan, C. ozturk

A rare inflamatory myopathy with cytocrome oxidase negative muscle fiber petient which presents in childhood: Case report .

19th international Congress of the World Muscle Society (7-11 Ekim 2014)

4-Z. Yildirim, R. G. Ekin, F. Zorlu, U. Bayol. Primary Squamous Cell Carcinoma (SCC) of the male urethral diverticulum mimicking prostate cancer: Case report and review of the literature.

26th European Congress of Pathology (30 Ağustos-3 Eylül 2014)

5- R. G. Ekin, **Z. Yildirim**, F. Zorlu, U. Bayol. Additional anterior apical cores to the initial 12-core prostate biopsy: Does it increase detection probability of prostatic cancer?

26th European Congress of Pathology (30 Ağustos-3 Eylül 2014)

6- R. G. Ekin, **Z. Yildirim**, U. Bayol, F. Zorlu. Renal tumours in adults with congenital renal anomalies: Documentation of five cases.

26th European Congress of Pathology (30 Ağustos-3 Eylül 2014)

7- U. Bayol, M. Uncel, T. Karadeniz, Z. Yildirim, F. Zorlu, A. Özgüzer. **Plaque-like adrenal-renal fusion**

26th European Congress of Pathology (30 Ağustos-3 Eylül 2014)

8- U. Bayol, M. Uncel, U. Kucuk, C. Yildizakdeniz, F. Zorlu, S. Isoglu, Z. Yildirim. Unilateral

syncrone three primary tumors of kidney: Case report.

26th European Congress of Pathology (30 Ağustos-3 Eylül 2014)

- 9- A. Ozguzer, S. Cumhurcu, Z. Yildirim, S. Unluoglu, M. Uncel, U. Bayol, M. Incesu. Kaposiform hemangioendotelioma.

26th European Congress of Pathology (30 Ağustos-3 Eylül 2014)

- 10- Z. Yildirim, I.E.Cakir, U. Kucuk, E.E.Pala, U.Bayol. Clinical and detailed histopathologic features of hemangioblastoma cases.

26th European Congress of Pathology (30 Ağustos-3 Eylül 2014)

- 11- E. Cakir, Z. Yildirim, U. Kucuk, E.E.Pala, M. Uncel, A.O. Binatli, U. Bayol, A.Ozguzer. Co-existence of intracranial marginal zone B-Cell Lymphoma and menengioma.

26th European Congress of Pathology (30 Ağustos-3 Eylül 2014)

- 12- E.E.Pala, U. Bayol, U. Kucuk, E. Cakir, C. Akdeniz, E.U. Keski, S. Salimoglu, Z. Yildirim. Metaplastic breast carcinoma report of five cases.

26th European Congress of Pathology (30 Ağustos-3 Eylül 2014)

- 13- U. Bayol, M. Uncel, U. Kucuk, S. Ozturk, O. Cetindag, Z.Yildirim. A large intraabdominal fibromyoma: Case report.

26th European Congress of Pathology (30 Ağustos-3 Eylül 2014)

- 14- U.kucuk, S.Ekmekci, **Z.Yildirim Ekin**, E.Cakir, R.G.Ekin, E.E.Pala Is budding an independent prognostic factor for bladder cancer?

27th European Congress of Pathology (5-9 Eylül 2015)

- 15- 2-E.Cakir, A.Erdogan, U.kucuk, S.Ekmekci, E.E.Pala, **Z.Yildirim** , C.Tugmen Adenocarcinoma ex goblet cell carcinoid, signet ring cell type: A rare case

27th European Congress of Pathology (5-9 Eylül 2015)

8.4 Ödüller

