

T.C.

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**UYARILMIŞ SİTOTOKSİK (CD8<sup>+</sup>) T HÜCRE EKSOZOMLARININ  
AKCİĞER KANSERİ ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ.**

Eldar SOVUNJOV

Kocaeli Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin

Tıbbi Biyoloji Programı için Öngördüğü

BİLİM UZMANLIĞI TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır.

KOCAELİ

2021



T.C.

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**UYARILMIŞ SİTOTOKSİK (CD8<sup>+</sup>) T HÜCRE EKSOZOMLARININ  
AKCİĞER KANSERİ ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ.**

**Eldar SOVUNJOV**

Kocaeli Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin

Tıbbi Biyoloji Programı için Öngördüğü

BİLİM UZMANLIĞI TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır.

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Zehra Seda HALBUTOĞULLARI

Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinasyon Birimi - Proje No: TYL-2020-2119

Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK 1002) – Proje No: 220S690

Etik Kurulu Onay No: KÜ GOKAEK 2019/316

KOCAELİ

2021

## SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Tez Adı: Uyarılmış Sitotoksik (Cd8<sup>+</sup>) T Hücre Eksozomlarının Akciğer Kanseri Üzerine Etkisinin İncelenmesi.

Tez Yazarı: Eldar SOVUNJOV

Tez savunma tarihi: 09/07/2021

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Z. Seda HALBUTOĞULLARI

Bu çalışma, sınav kurumumuz tarafından Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında BİLİM UZMANLIĞI tezi olarak kabul edilmiştir.

### **Onay**

Bu tez Kocaeli Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararıyla onaylanmıştır.

.... / .... / 2021

Prof. Dr. Sema Aşkın KEÇELİ

KOÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## ÖZET

### **Uyarılmış Sitotoksik (CD8<sup>+</sup>) T Hücre Eksozomlarının Akciğer Kanseri Üzerine Etkisinin İncelenmesi.**

**Amaç:** Akciğer kanseri (AK) görülme sıklığı ve yol açtığı fiziksel, ruhsal, sosyal ve ekonomik sorunlar nedeniyle tüm dünyada ve ülkemizde önemli bir sağlık sorunu olmaya devam etmektedir. Yapılan çalışmalar uyarılmış sitotoksik T hücreleri (USTH) ile tümör mikroçevresi (TMÇ) ve kanserin iyi seyri arasında pozitif bağlantı olduğunu göstermiştir. Son zamanlarda USTH'lerin bu etkisinde eksozomların da TMÇ'de metastazı destekleyebilecek mezenkimal kök hücrelerini engelleyerek rol aldığı gösterilmiştir. Eksozomlar çapı genellikle 40-150 nm olan; nükleik asit ve çeşitli proteinleri içeren mikroveziküllerdir. Eksozomlar doğal lipozom özelliği taşıdıkları, nanoboyutta oldukları ve membranlarında taşıdıkları protein ve lipid içeriklerinden dolayı kanda büyük ölçüde stabil kaldıkları için ilaçların kanser hücrelerine spesifik olarak iletilmesinde avantajlı olabilecekleri düşünülmektedir. Çalışmamızda USTH eksozomlarının A549 AK hücre hattı üzerindeki sitotoksik ve metastatik önleyici etkilerini *in vitro* olarak tespit etmeyi amaçladık.

**Yöntem:** Sitotoksik T hücreleri, sağlıklı bireylerden elde edilen tam kandan izole edildi ve uyarıldıktan sonra 5 ila 7 gün kültüre edildi. USTH serumsuz besiyerinden diferansiye ultrasantrifüj yöntemiyle eksozom izolasyonu yapıldı. İzole edilen eksozomların karakterizasyonu ve protein miktar tayini, akım sitometrisi ve BCA testi ile analiz edildi. Daha sonra USTH eksozomları ve USTH'ler 48 saat boyunca A549 hücreleri ile ortak kültüre alındı. Ortak kültür sonrası A549 hücrelerinin hücre canlılık analizi WST-1 deneyi ile gerçekleştirildi. Metastazla ilgili genlerin- MMP2, MMP9, TWIST, SNAIL, CDH1 - ifade düzeyleri qRT-PCR'da incelendi ve MMP-2 ve MMP-9 proteinleri konfokal mikroskopisinde değerlendirildi.

**Bulgular:** USTH ve eksozom izolasyon ve karakterizasyonları başarıyla gerçekleştirildi. Yapılan analizlerde, USTH eksozomlarının kanser hücrelerinin çoğalmasını ve metastatik özelliklerini azalttığı bulunmuştur.

Sonuçlar: AK hücre hattı üzerinde USTH eksozomlarının anti-metastatik ve anti-proliferatif etkilerinin olduğu saptanmıştır.

Anahtar sözcükler: Akciğer kanseri, immunoterapi, eksozomlar, sitotoksik T hücreler.



## ABSTRACT

### **Examining The Effect Of Activated Cytotoxic (CD8<sup>+</sup>) T Cell Exosomes To The Lung Cancer.**

Objective: Lung cancer (LC) continues to be a major health problem worldwide due to its incidence and causing physical, psychological, social, and economic problems. Several studies have indicated a positive correlation between activated cytotoxic T cells (ACTC) in the tumor microenvironment (TME) and a good prognosis in cancer. Recently, ACTC-derived exosomes (ACTC-dEX) have been implicated in this effect through inhibiting mesenchymal stem cells that may promote metastasis in the TME. Exosomes are microvesicles that are usually 40-150 nm in diameter and containing many biomolecules such as proteins, lipids, a wide variety of RNA molecules and DNA fragments. Exosomes are thought to be advantageous in the specific delivery of drugs to cancer cells, as they have the characteristics of natural liposomes, are nano-sized and remain largely stable in the blood due to the protein and lipid content they carry on their membranes. In this study, we aimed to detect the cytotoxic and metastatic inhibitory effects of ACTC-dEX on the A549 LC cell line *in-vitro*.

Method: Cytotoxic T cells were isolated from whole blood obtained from healthy individuals and cultured 5 to 7 days after stimulation. Exosomes from ACTC serum-free culture medium were collected by ultracentrifugation. The characterization and quantification of the isolated exosomes were analyzed by flow cytometry and BCA assay. We then co-cultured ACTC and ACTC-dEX with A549 cells for 48 hours. Afterward, the cell viability of A549 cells performed by WST-1 assay. MMP2 and MMP9 proteins evaluated by confocal microscopy and metastasis-related genes MMP2, MMP9, TWIST, SNAIL, CDH1 were detected by qRT-PCR.

Results: ACTC and exosome isolation and characterization were performed successfully. In the analysis, it was found that ACTC-dEX reduced the proliferation and metastatic properties of cancer cells.

Conclusions: As a result of the experiments, it was determined that ACTC-dEX have anti-metastatic and anti-proliferative effects on LC cell line.

Keywords: Lung cancer, immunotherapy, exosomes, cytotoxic T cells.





## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans süresince danışmanlığımı yapan, tez konumun seçilmesinden deneylerin tamamlanmasına kadar her aşamada her daim yanımda olan, bilgi ve deneyimlerini cömertçe paylaşmaktan çekinmeyen ve tecrübelerinden yararlanırken göstermiş olduğu hoşgörü ve sabırdan dolayı değerli hocam sayın **Dr. Öğr. Üyesi Zehra Seda HALBUTOĞULLARI**'na,

Tüm çalışmalarında fikirlerinden ve deneyimlerinden yararlandığım, eğitim hayatımın yanı sıra çalışma hayatımda da bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren bölüm başkanım sayın hocam, **Prof. Dr. Murat KASAP**'a ve çalışmamızın gerçekleştirilmesinde laboratuvar olanaklarını kullanmamıza izin veren ve KÖGEM ailesine dahil olmama vesile olan KÖGEM başkanı değerli hocam, **Prof. Dr. Yusufhan YAZIR**'a,

Eğitim sürem boyunca bilgi ve birikimlerini cömertçe sunan saygı değer hocalarım **Prof. Dr. Mehmet Doğan GÜLKAC**, **Doç. Dr. Gürler AKPINAR**, **Doç. Dr. Emel Ergül**, **Dr. Öğr. Üyesi Aylin Kanlı**, **Dr. Öğr. Üyesi Gülçin GACAR** ve **Doç. Dr. Gökhan DURUKSU**'ya,

Tez çalışmam boyunca moral ve desteklerini esirgemeyen, her konuda yardımcı olan ve birlikte çalışmaktan çok büyük keyif aldığım arkadaşlarım; **Büşra ŞAHİNÖZ**, **Mehmet SARIHAN**, **Deren ASLAN**, **Onur ÖZCAN**, **Ayşegül AÇIKSARI**, **Floriya YULDAŞEVA**, **Candan ALTUNTAŞ**, **Ahmet ÖZTÜRK**, **Kamil Can KILIÇ**, **Tülin BURHANOĞLU**'ya ve KÖGEM flow sitometri laboratuvarı personellerine,

TYL-2020-2119 ve 220S690 numaralı projelerimize ve Yüksek Lisans Eğitimim boyunca burs yoluyla sağladığı finansmandan dolayı sırasıyla **Kocaeli Üniversitesi BAP Koordinasyon Birimi**, **TÜBİTAK birimi** ve **Yurtdışı Türkler ve Akraba Toplulukları Başkanlığı**'na,

Son olarak hayatım boyunca en büyük destekçim ve her zaman yanımda olan sevgili aileme,

Sonsuz teşekkürlerimle...

Eldar SOVUNJOV

## ORJİNALLİK BİLDİRİMİ

Kocaeli Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Bilim Uzmanlığı tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Uyarılmış Sitotoksik (CD8+) T Hücre Eksozomlarının Akciğer Kanseri Üzerine Etkisinin İncelenmesi” başlıklı tezimde başka kaynaklardan yararlanılarak kullanılan yazı, bilgi, şekil, tablo ve diğer malzemeler kaynakları gösterilerek verilmiştir. Tezimde yer alan deneysel çalışmalar/araştırmalar bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yapılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususlar bir intihal programı (Turnitin) kullanılarak test edilmiş olup, doğruluğunu beyan ederim.

..... / ..... / 2021

ELDAR SOVUNJOV

İmza

# İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	iv
ABSTRACT .....	vi
TEŞEKKÜR .....	viii
ORJİNALLİK BİLDİRİMİ .....	ix
İÇİNDEKİLER.....	x
SİMGELER ve KISALTMALAR.....	xiii
ŞEKİLLER.....	xviii
TABLolar.....	xx
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Akciğer Kanseri.....	1
1.2. Akciğerin Anatomik, Fizyolojik ve Histolojik Yapısı.....	7
1.3. Akciğer Kanserinin Tanısı ve Sınıflandırılması.....	10
1.4. Akciğer Kanserinde İmmun Tedavi .....	13
1.4.1.Sitotoksik T Hücreleri .....	17
1.4.2.Tümör Mikroçevresi .....	19
1.5. Eksozomlar.....	21
1.5.1.Eksozomların Biyogenezi.....	22
1.5.2.T Hücre Eksozomları .....	23
1.6. A549 Hücre Hattı ve Özellikleri .....	25
2. AMAÇ .....	27
3. YÖNTEM .....	28
3.1. İnsan Mononükleer Hücre Populasyonunun (PKMH) Hazırlanması.....	28

3.2. Sitotoksik T Hücre İzolasyonu.....	29
3.2.1.STH'lerin Akım Sitometri Analizi ile Tayini.....	31
3.3. STH Uyarılması ve Kültürü .....	32
3.3.1.USTH'lerin Karakterizasyonu .....	34
3.4. USTH'lerden Eksozom İzolasyonu .....	34
3.5. USTH Eksozomlarının Tayini .....	35
3.5.1.Akım Sitometri Analizi .....	35
3.5.2.Mikro-BCA ile Miktar Tayini .....	36
3.6. A 549 Hücre Kültürü .....	37
3.7. A 549 Hücrelerinin USTH ve Eksozomlarla Birlikte Ko-Kültürü.....	38
3.8. WST-1 Canlılık ve Proliferasyon Analizi.....	38
3.9. Gen Ekspresyonu Analizi .....	38
3.9.1.Total RNA İzolasyonu .....	39
3.9.2.cDNA Sentezi .....	39
3.9.3.Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR).....	40
3.10.İmmunohistokimyasal Boyama.....	41
3.11.İstatiksel Analiz.....	41
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>43</b>
4.1. STH'lerin Uyarılması ve Hücre Kültürü .....	43
4.2. STH ve USTH'lerin Karakterizasyonu.....	45
4.3. USTH Eksozomların Akım Sitometri ile İmmünojenotipik Karakterizasyonu .....	47
4.4. Ortak Kültür Deneyleri .....	47
4.4.1.WST-1 Canlılık ve Proliferasyon Analizi .....	48
4.4.2.Gen Ekspresyonu Analizi.....	49
4.4.3.İmmünfloresan Boyama .....	50
<b>5. TARTIŞMA.....</b>	<b>52</b>

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	59
7. KAYNAKLAR .....	60



## SİMGELER ve KISALTMALAR

AK	Akciğer kanseri
ALDH	Aldehit Dehidrojenaz
APC	Antigen Presenting Cells
APC	Allofikosiyinin
BCA	Bikinkoninik Asit
BHK	Büyük Hücreli Karsinom
BSA	Sığır Serum Albumin
CAR	Kimerik Antijen Reseptörü
CD	Cluster of Differentiation
CD8 <sup>+</sup>	Sitotoksik T hücresi
CDH1	Kaderin 1
Con A	konkanavalin A
cDNA	Komplementer Deoksiribonükleik Asit
CTLA-4	Sitotoksik T Lenfosit Antijen 4
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DMSO	Dimetil Sülfoksit

DNA	Deoksiribonükleik Asit
ECM	Hücre Dışı Matris
EGF	Epidermal Büyüme Faktörü
EMT	Epitelyal Mezenkimal Geçiş
ESCRT	Endosomal Sorting Complex Required for Transport
EV	Ekstraselüler Veziküller
ETDA	Etilendiamintetraasetik Asit
FBS	Fetal Sığır Serum
FGF	Fibroblast Büyüme Faktörü
FITC	Fluoresan izotiyosiyonat
GABA	Gama-Aminobütirik Asit
HLA-DR	İnsan Lökosit Antijeni-DR
HPRT1	Hipoksantin Fosforibosil Transferaz 1
İARC	Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı
IF	İmmünfloresan
ILV	İntralüminal Vezikül
İL-2	İnterlökin-2
ISCT	Uluslararası Hücresel Tedavi Derneği
ISEV	International Society for Extracellular Vesicles

İGE	İnsani Gelişmişlik Endeksi
mAB	Monoklonal Antikorlar
MDSC	Miyeloid Türevi Baskılayıcı Hücreler
MET	Mezenkimal Epitelyal Geçiş
miRNA	Mikro Ribonükleik Asit
MHC	Majör Histo-Uyumluluk Kompleksi
MKH	Mezenkimal Kök Hücre
MMP2	Matriks Metalloproteinaz 2
MMP9	Matriks Metalloproteinaz 9
MVB	Mikroveziküler Cisim
NF-kB	Nükleer Faktor kappa B
KÖGEM	Kocaeli Üniversitesi Kök Hücre ve Gen Tedavileri Araştırma ve Uygulama Merkezi
KHAK	Küçük Hücreli Akciğer Kanseri
KHDAK	Küçük Hücre Dışı Akciğer Kanseri
PAH	Polisiklik Aromatik Hidrokarbonlar
PBS	Fosfat Tamponlu Salin Çözeltisi
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PD - 1	Programlanmış Hücre Ölümü 1



PDL - 1	Programlanmış Hücre Ölümü Ligandı 1
PE	R-Fikoeritrin
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PHA	Fitohemaglutinin
PI	Propiyum İyodit
PIK	Proteaz İnhibitör Kokteyli
PKMH	Periferel Kan Mononükleer Hücre
RNA	Ribonükleik Asit
RPMİ	Roswell Park Memorial Institute
SHK	Skuamöz Hücreli Karsinom
STH	Sitotoksik T hücresi
SP	Surfaktant Proteinleri
USTH	Uyarılmış Sitotoksik T hücresi
TGF $\beta$	Transforme Edici Büyüme Faktörü Beta
THR	T Hücre Reseptörü
TİA	Tümör İlişkili Antijen
TİL	Tümör İnfiltratif Lenfositler
TNF $\alpha$	Tümör Nekroz Faktörü Alfa
TMÇ	Tümör mikroçevresi

TWIST	Basic helix-loop-helix Transcription Factor
ZEB	Zinger Finger E-box-binding
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
WST-1	Suda Çözünür Tetrazolium Tuzu 1
qRT-PCR	Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu



## ŞEKİLLER

<b>Şekil 1.1.1:</b> Akciğer kanseri görseli (Lung Cancer   The Patient Guide to Heart, Lung, and Esophageal Surgery, n.d.).....	1
<b>Şekil 1.1.2:</b> a. Erkek; b. Kadınlar için en yaygın görülen 10 kanser türünün vaka ve ölüm oranlarının yüzdelik dağılımı. Melanom dışı cilt kanserleri “diğer” kategorisine dahil edilir (Bray et al., 2018). .....	2
<b>Şekil 1.2.1:</b> a. Akciğerin genel görünümü; b. Akciğerlerin lobları (Nickelson, 2021). .....	7
<b>Şekil 1.4.1:</b> Kanser immünoterapisi genel şeması (Rijavec et al., 2014). .....	14
<b>Şekil 1.4.2:</b> CTLA-4 ve PD-1 / PD-L1 inhibitörlerinin etki mekanizması (Russo <i>et al.</i> , 2020). .....	15
<b>Şekil 1.4.1.1:</b> Adaptif T hücre çeşitleri ve fonksiyonları. Mavi oklar anti-tümör etkisini, kırmızı oklar ise anti-tümör bağışıklığının inhibisyonunu temsil eder. TNF- $\alpha$ : Tümör nekroz faktörü alfa, IFN- $\gamma$ : İnterferon gama, STH'ler: CD8 <sup>+</sup> sitotoksik lenfositler, TGF- $\beta$ : Dönüştürücü büyüme faktörü beta, MDSC: Miyeloid türevi baskılayıcı hücreler (Aldarouish & Wang, 2016). .....	18
<b>Şekil 1.4.1.2:</b> STH'lerin aktivasyonu ve anti-tümör etkisi (Steven et al., 2016).....	19
<b>Şekil 1.5.1:</b> Eksozomun moleküler yapısı ve içeriği (Jia et al., 2017). .....	21
<b>Şekil 1.5.1.1:</b> Eksozom biyogenezi ve salınımı (Schorey et al., 2015). .....	22
<b>Şekil 1.5.2.1:</b> T hücre eksozomlarının içerikleri (Lu et al., 2018). .....	24
<b>Şekil 3.1.1:</b> Ficoll-Hypaque yoğunluk gradyanlı yöntemin şematik gösterimi (Kleiveland & Kleiveland, 2015).....	29
<b>Şekil 3.2.1:</b> STH izolasyon aşamaları. A: S-pluribead; B: PKMH (S-PluriBead® Mini Reagent Kit - Pluriselect.Com, n.d.). .....	31
<b>Şekil 3.3.1:</b> STH uyarılması. USTH: Uyarılmış sitotoksik T hücresi (Human & Cd, 2011). .....	33

<b>Şekil 3.4.1:</b> Diferansiye ultrasantrifüjleme yöntemi aşamaları (Salem et al., 2020).....	35
<b>Şekil 3.5.1.1:</b> İmmünofenotipleme ile eksozom karakterizasyonunun çalışma prensibi (Uslu, 2019). .....	36
<b>Şekil 4.1.1:</b> Pasaj 0'deki USTH'lerin faz-kontrast görüntüleri. Gün 1 (A1-A2); Gün 4 (B1-B2); Gün 7 (C1-C2). Ölçüm çubuğu: 500 µm (A1, B1, C1) ve 200 µm (A2, B2, C2). ....	44
<b>Şekil 4.1.2:</b> Pasaj 1'deki USTH'lerin faz-kontrast görüntüleri. Gün 1 (A1-A2); Gün 3(B); Gün 6 (C). Ölçüm çubuğu: A1, B-500 µm; A2-200 µm, C-100 µm. ....	45
<b>Şekil 4.2.1:</b> STH'lerin akım sitometri ile karakterizasyon analizi. ....	46
<b>Şekil 4.2.2:</b> USTH'lerin akım sitometri ile karakterizasyon analizi. ....	46
<b>Şekil 4.3.1:</b> USTH eksozomlarının; CD9, CD63 ve CD81 eksozom belirteçlerinin akım sitometri analizi. ....	47
<b>Şekil 4.4.1:</b> Ortak kültür 1.gün faz-kontrast mikroskobu görüntüleri. a. USTH grubu; b. Eksozom grubu; c. Kontrol. Ölçüm çubuğu: A,C-500 µm; B-100 µm. ....	48
<b>Şekil 4.4.1.1:</b> Deney gruplarının WST-1 canlılık ve proliferasyon analizi (*P<0.05, **P<0.01) .....	49
<b>Şekil 4.4.2.1:</b> SNAIL, TWIST, MMP2 ve MMP9 gen ekspresyonu analiz grafikleri (*P<0.05) .....	50
<b>Şekil 4.4.3.1:</b> Ortak kültür sonrası deney gruplarının; çekirdek boyası DAPİ (Mavi), MMP-2 (Yeşil) ve MMP-9 (Kırmızı) immünfloresan boyamalarının konfokal mikroskop görüntüleri. a. Kontrol grubu; b. USTH grubu; c. Eksozom grubu. Ölçüm çubuğu: 100 µm. ....	51

## TABLÖLAR

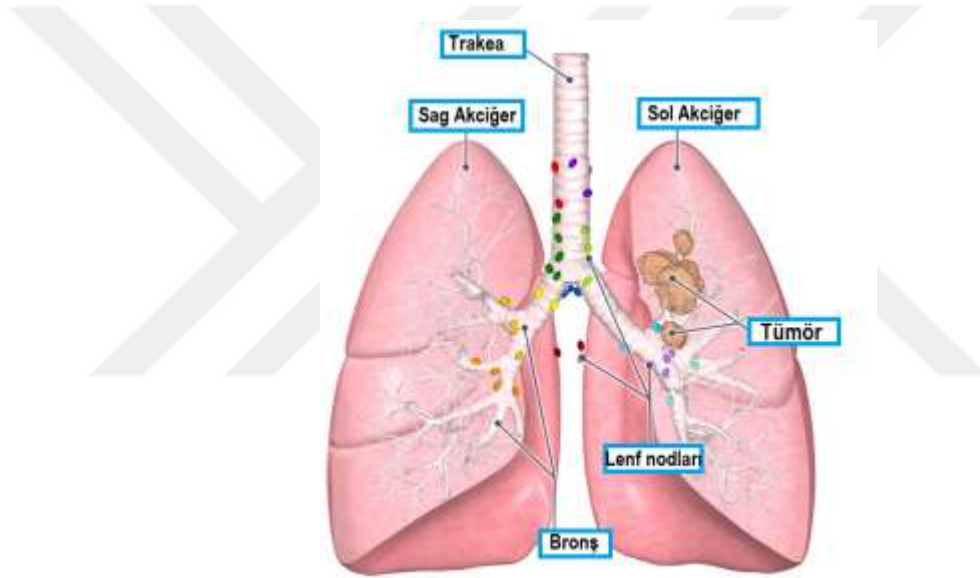
**Tablo 3.9.3.1:** Gen ekspresyon analizi yapılan genler ve primerlerinin baz dizimleri. ....41



# 1. GİRİŞ

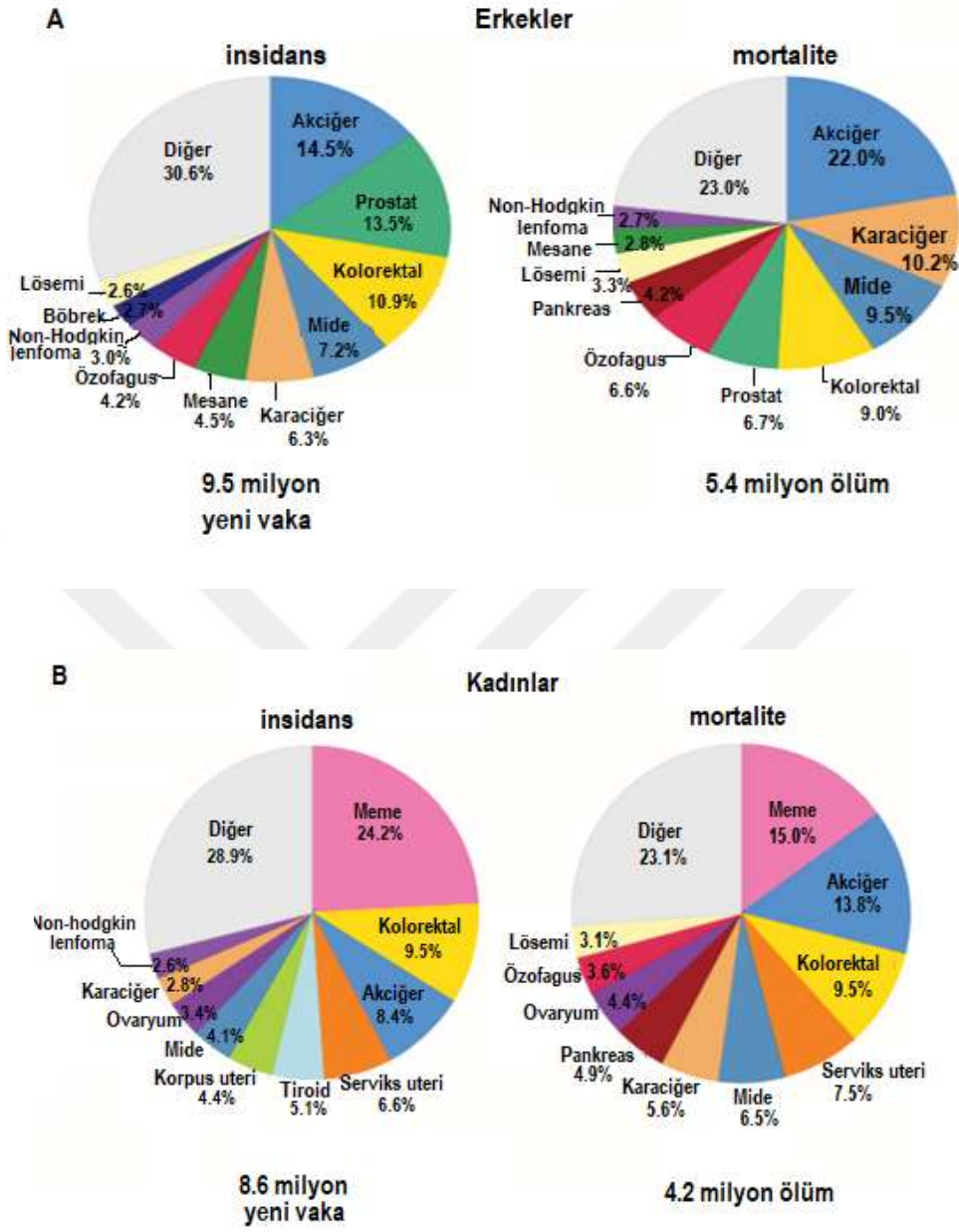
## 1.1. Akciğer Kanseri

Akciğer kanseri (AK), tanı, sınıflandırma ve tedavi için multidisipliner bir yaklaşımın gerekli olduğu karmaşık ve heterojen hastalıklar grubudur (De Sousa & Carvalho, 2018; Rodriguez-Canales vd., 2016). AK yapısal olarak normal akciğer dokusundan olan hücrelerin kontrol dışı çoğalarak akciğer içinde bir kitle (tümör) oluşturmasıyla başlar (Şekil 1.1.1). Burada oluşan kitle öncelikle bulunduğu ortamda büyür ve daha ileri aşamalarda çevre dokulara veya dolaşım yoluyla uzak organlara (karaciğer, kemik, beyin, vb.) yayılarak hasara yol açar (Acıbadem Sağlık Grubu, 2020).



**Şekil 1.1.1:** Akciğer kanseri görseli (Lung Cancer | The Patient Guide to Heart, Lung, and Esophageal Surgery, n.d.).

AK dünyada kanser türleri arasında, erkeklerde (Şekil 1.1.2. A) en sık ölüme neden olan birinci, kadınlarda (Şekil 1.1.2. B) ise meme kanserinden sonra ikinci kanser türüdür. Her yıl yaklaşık 1.6 milyon insan AK'den hayatını kaybetmektedir (Döngel, 2017; Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC), 2018). Türkiye'de ise AK'nin görülme sıklığı erkeklerde yüz binde 57,7 ve kadınlarda 9,8'dir ve bu oranlarla erkeklerde ilk sırada, kadınlarda ise beşinci sırada yer almaktadır. (Türkiye Kanser İstatistikleri 2016, 2019). AK tanısı alan hastaların sadece %15'i 5 yıldan fazla yaşamaktadır. Hastaların %70'den fazlası tanı anında ileri evrededir ve dolayısıyla küratif tedaviye uygun değildir (Cascone et al., 2016).



**Şekil 1.1.2:** a. Erkek; b. Kadınlar için en yaygın görülen 10 kanser türünün vaka ve ölüm oranlarının yüzdelik dağılımı. Melanom dışı cilt kanserleri “diğer” kategorisine dahil edilir (Bray et al., 2018).

AK birçok faktöre bağlı olarak ortaya çıkan bir hastalıktır. Bu nedenler arasında; tütün ürünlerinin içilmesi, genetik faktörler, radon gazı, asbest ve hava kirliliği gibi faktörler sorumlu tutulmaktadır. Uzun süreli olarak tütün dumanına maruz kalmak en sık görülen AK nedeni iken, tüm akciğer kanserli hastaların %15'e ulaşan bir oranı sigara içmeyenlerden oluşmaktadır (Vikipedi, 2020).

**Tütün ürünlerinin içilmesi:** Yirminci yüzyılda AK'nin görülme sıklığının artması, özellikle tütün endüstrisinin gelişmesiyle ve sigara kullanımının yaygınlaşmasıyla gerçekleşmiştir (Demirci ve Yurdakul, 2020). Dünya genelinde yaklaşık 1,3 milyar sigara kullanıcısı mevcuttur ve bunların %80'inden fazlası düşük ve orta gelirli ülkelerde yaşamaktadır. Türkiye'de erkeklerin %44,1'i, kadınların %19,2'si ve 15 yaş ve üzeri nüfusun %31,6'sı (yaklaşık 19.2 milyon kişi) tütün kullanmaktadır (Erdöl vd., 2020). Günümüzde, AK %85-90 oranında sigaraya bağlı olarak ortaya çıkmaktadır ve sigara içmeyen ancak dumanına maruz kalan pasif içicilerde de risk artmaktadır (Gomes & Gibbons, 2016). Gelişmiş ülkelerde AK'den ölümlerin erkeklerde %92-94'ünün, kadınlarda ise %78-80'inin sigaraya bağlı olduğu bildirilmiştir. Türkiye'de yapılan çalışmalarda ise, akciğer kanserli kadınların %17'sinin, erkeklerin ise %94'ünün sigara içtikleri kaydedilmiştir. Sigara içen insanlarda, hiç içmemişlere göre rölatif risk yaklaşık 11-17 kat daha fazladır. Ayrıca, kanser gelişme riski; sigara içme süresi, günde içilen sigara sayısı, erken başlama yaşı, derin çekme (inhalasyon), katran ("tar") miktarı ile artar, sigarayı bırakma süresi ile de azalmaktadır (Vikipedi, 2020).

Tütün dumanı, çok sayıda karsinojen ve büyüme faktörü içeren yaklaşık 4000'den fazla çeşitli kimyasalın karışımıdır. En önemlileri benzo [a] piren dahil polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH); nitratlar; ve 4- (metilnitrosamino) -1- (13-piridil-1-bütanon) gibi tütüne özgü N-nitrozaminler (TSNA)'dir (Demirci ve Yurdakul, 2020). N-nitrozaminler, tütün işlenmesi ve pirosetezi sırasında oluşmaktadır. Bunlar nikotin ve alkaloid arekolinden kökenlenmektedir. Nikotinin ana nitrazyon ürünleri, NNK (nitrozamin keton) ve NNN (N'-nitrozonornikotin)'ler çok güçlü akciğer karsinojenleri olarak bilinmektedirler (Gomes & Gibbons, 2016). Tütünün bağımlılık yapan bileşeni nikotin, bir asetilkolin agonisti olarak hareket ederek sinir sistemindeki nikotinic asetilkolin reseptörlerine (nAChR) bağlanan ve dopamin, serotonin, endorfin ve gama-aminobutirik asit (GABA) gibi nörotransmitterlerin kan dolaşımına salınmasına neden olan doğal bir alkaloiddir. Nikotinin kendisi bir kanserojen olmasa da, nikotinic reseptörlerini çoğaltarak tütün bağımlılığını artırır ve gen ekspresyonunda değişiklik yaparak akciğer tümörlerinin ilerlemesine neden olur (Demirci ve Yurdakul, 2020). Ayrıca yeni kanıtlar, nikotinic asetilkolin reseptörlerini AK'ne bir yatkınlık noktası olarak belirlemiştir (Hung et al., 2008) ve nikotinin deneysel sistemlerde tümörögenesis ve metastaza yol açabileceğini göstermiştir (Davis et al., 2009). Sigara kullanımı dünya çapında tütün kullanımının en yaygın türü olmakla birlikte, nargile, çeşitli



dumansız tütün ürünleri, puro, sigarillo, sarma tütün, pipo, bidi ve kreteks gibi diğer tütün ürünleri de AK riskini arttırmaktadır (Erdöl vd., 2020).

**Radon:** Radon, yer kabuğunda uranyumun doğal olarak çürümesi ile oluşmaktadır. Renksiz, kokusuz ve kimyasal olarak inert bir gaz olan radon, yerkabuğunu geçebilmekte ve binalarda birikebilmektedir. Radon, ağır iyonize alfa partiküller yayan ve solunum epitel hücrelerindeki DNA'ya zarar veren ürünlere ayrışmaktadır (Samet, 1989). Radon gazı, akciğer kanserinde sigaradan sonra en önemli etken olup, akciğer kanserinin %3 ile 15'inden sorumludur (T.C. Sağlık Bakanlığı, 2016). Uranyum madenlerindeki yeraltı işçilerinde yapılan epidemiyolojik çalışmalar, radon maruziyetinin skuamöz hücreli akciğer kanseri gelişimi için risk oluşturduğunu kanıtlamıştır (de Groot et al., 2018).

**Asbest:** Asbestos ya da **amyant**, lifli yapıda kanserojen bir mineraldir ve birçok doğal formda bulunmaktadır. 3.000' den fazla kullanım alanı olan asbestten, özellikle gemi, uçak, otomobil sanayiinde, makine konstrüksiyonlarında yağlayıcı madde ve sızdırmazlık elemanı olarak, inşaat sektöründe, ısı ve ses izolasyonunda yaygın olarak yararlanılmıştır (Asbest - Vikipedi, 2020). Sağlık riskleri nedeniyle günümüzde başta Avrupa olmak üzere dünyanın birçok ülkesinde asbestin üretilmesi ve endüstride kullanılması yasaklanmış; birçok ülkede ise ciddi kısıtlamalar getirilmiştir (Enerji Portalı, 2020). Epidemiyolojik çalışmalar asbest maruziyeti ile pulmoner fibrosis, mezotelyoma ve akciğer kanseri gibi belli akciğer hastalıkları arasındaki ilişkiyi doğrulamıştır. Bir inert molekül olan silikat lifi, insanın akciğerinde bir ömür boyu kalabilmekte ve karsinogeneze neden olmaktadır (Mossman et al., 1990). Sigara içiminin bronşial temizlenmeyi bozarak pulmoner epitelde asbest varlığını arttırdığı ve aynı zamanda, asbestin tütün karsinojenlerinin mutajenik etkilerini çoğalttığı varsayılmaktadır. Bu durum sigara içen asbest işçilerinde belirgin bir şekilde izlenmektedir. Şöyle ki, asbest maruziyetinin AK için rölatif riski 1.4-2.6 iken, sigara içimi asbest maruziyeti ile birleştiğinde risk çarpıcı olarak 28.8'e çıkmaktadır (Kjuus et al., 1986).

**Genetik yatkınlık:** Birçok çalışma, aile öyküsünün artmış hastalık riski ile bağlantılı olduğunu göstermiştir. Birinci derece akrabalarında AK olan kişilerde kanser gelişme riski 2-4 kat artmaktadır. Ancak bunun tamamen genetik faktörlere bağlı olmadığı, akrabaların aynı ortamda bulunmasının da etkisi olduğu düşünülmektedir (Vikipedi, 2020). Bir vaka-kontrol çalışmasında Louisiana'da AK'den ölen 336 hasta derlenmiş ve AK birinci derece akrabalarında kontrol grubundaki (hasta eşleri) birinci derece akrabalara kıyasla 2.4 kat daha

fazla bulunmuştur (Ooi et al., 1986). Ek olarak, erken yaşta AK gelişme riski mendelian kodominant yolla da ilişkilendirilmiştir (Sellers et al., 1990).

Genom çalışmaları (GWAS), 5p15, 15q25-26 ve 6q21 kromozom bölgeleri ile AK yatkınlığı arasında pozitif bağlantı olduğunu göstermiştir. 5p15 bölgesi, sigara içenlerde ve içmeyenlerde adenokarsinom gelişimi ile ilişkili bulunmuştur (Landi et al., 2009). 15q25-26 kromozom bölgesindeki mutasyonlar ise, nikotin bağımlılığını ve AK riskini artırdığı bildirilmiştir (Thorgeirsson et al., 2008).

Sigara dumanı ve diğer karsinojenlerin DNA hasarı oluşturmaları nedeniyle, DNA tamir mekanizmasındaki değişiklikler de kanser oluşturma riski açısından çalışılmıştır. Spitz ve arkadaşları, hiç sigara kullanmayanlarda ve kullananlarda KHDAK'nin gelişiminde değişmiş DNA tamir kapasitesinin önemini açık bir şekilde göstermişlerdir (Shen et al., 2003). Diğer faktörlerden kaynaklı DNA tamir mekanizmasındaki bozukluklar da, AK gelişim riski için ayrı bir değişkendir. AK'nin oluşumunda kalıtsal ön yatkınlık yaratan faktörlerin varlığı tam olarak tanımlanmamışsa da birçok çalışma, genetik yatkınlığın varlığını desteklemektedir.

**Hava kirliliği:** Gün devamında ortalama bir yetişkin yaklaşık 10.000 L hava solmaktadır. Sonuç olarak, havada kanserojen maddelerin düşük konsantrasyonlarda bulunması bile AK için risk oluşturabilmektedir (Alberg et al., 2016). Özellikle, endüstrinin yoğun olduğu ve kalabalık şehirlerde fosil yakıtların yanmasıyla ortaya çıkan polisiklik aromatik hidrokarbonlar gibi kanserojenler ve Arsenik, Nikel ve Krom gibi metaller AK riskini arttırmaktadırlar (Straif et al., 2009). Amerikan Kanser Kurumunun Kanseri Önleme Çalışması II'den elde edilen veriler, ince partikül konsantrasyonundaki her 10 g/m<sup>3</sup> artışın AK riskini % 14 oranında yükselttiğini göstermiştir (Pope et al., 2002). ABD'nin altı şehrinde yapılan bir araştırmada, havadaki en yüksek ince partikül konsantrasyonuna sahip şehir sakinlerinde, konsantrasyonun en düşük olduğu şehre kıyasla % 40'luk bir AK riski artışı bulunmuştur (Dockery et al., 1993).

Kapalı ortamda tütün içimi, yapı malzemeleri, toprak gazları, ev ürünleri, ısınma ve pişirme sonucu oluşan yanmalardan kaynaklanan iç mekanlardaki hava kirliliği de AK riskini arttırmaktadır (Alberg et al., 2016). Özellikle, evlerde kömür dumanına maruz kalan

kadınlarda risk iki kat daha fazladır ve biyoyakıtlardan oluşan yan ürünlerin çoğu bilinen veya şüphelenilen kanserojenlerdir (Sood, 2012).

### **Diğer faktörler**

Yapılan çok fazla sayıda araştırmalara rağmen, meyve ve sebze tüketiminin AK insidansı üzerine koruyucu etkisi gösterilememiştir. Ancak, meyve ve sebzelerin kanser insidansını etkileyen ve B-karoten, a-tokoferol veya retinol gibi farklı ajanların etkilerini veya biyolojik dozlarını ayarlayarak AK riskini azaltan bir dizi mikrobeyinler içerdiği varsayılmaktadır (Gomes & Gibbons, 2016).

HIV enfeksiyonu, sigara içme durumundan bağımsız olarak, genel popülasyondaki riske kıyasla AK riskini en az 2,5 kat artırmaktadır (Shiels et al., 2009). İlginç bir şekilde, Amerika Birleşik Devletleri'nde, AK olan HIV ile enfekte bireylerin yaklaşık % 80'ni Afrika kökenli Amerikalılar oluşturmaktadır (Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi, 2008).

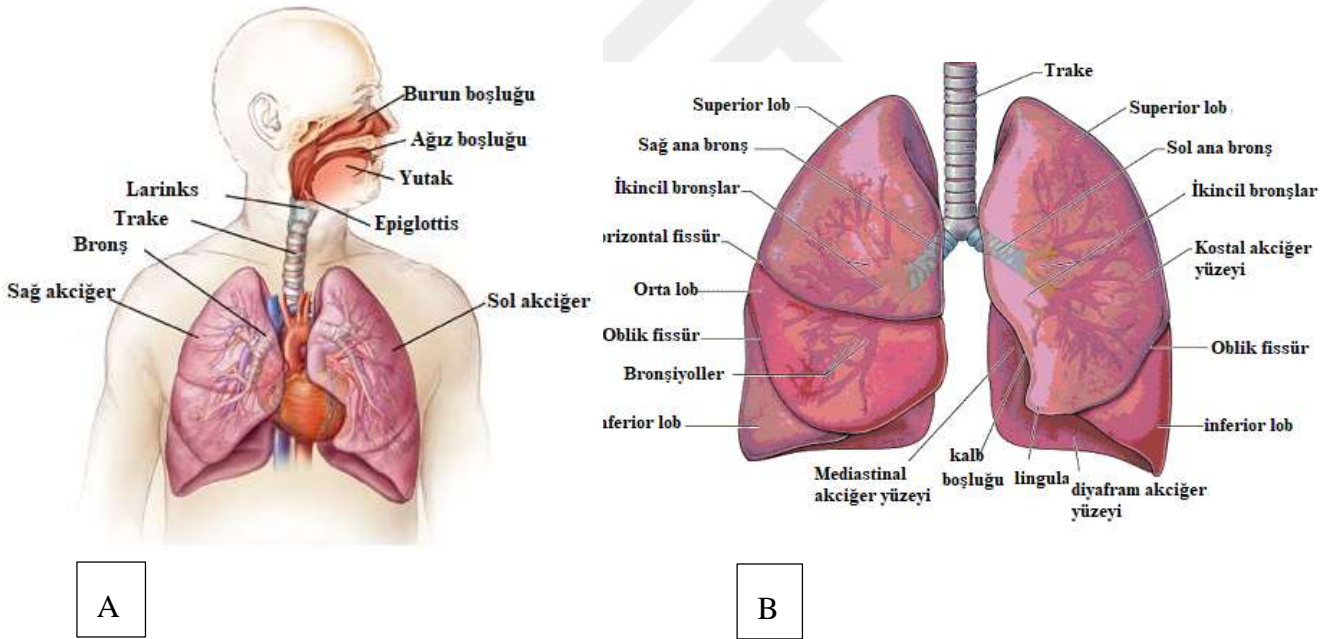
Öte yandan AK'ne artan duyarlılık, daha önce var olan akciğer hastalıkları ile ilişkilendirilebilir. Bu tür altta yatan akciğer hastalıkları iki ana formda bulunmaktadır: (1) kronik obstrüktif akciğer hastalığı (COPD) gibi hava akışını engelleyen hava yolu bozuklukları ve (2) pnömokonyoz gibi akciğer kapasitesini kısıtlayan fibrotik bozukluklar (Alberg et al., 2016). COPD hastalarında AK riskinin artması, kronik inflamasyonun tümörojenik sürece ilerleyebileceği fikrini ve COX-2 inhibitörü gibi ajanların klinik çalışmalarını desteklemektedir (Lee et al., 2009).

Erkekler ve kadınlar arasında AK insidansında ilginç farklılıklar kaydedilmiştir. Birincisi, AK olan kadınların prognozu erkeklerden daha iyidir. İkincisi, östrojen AK riskini artırmaktadır (Alberg et al., 2013). Örneğin, östrojen artı progestin formülasyonları ile hormon tedavisi yapılan iki büyük ölçekli randomize kontrollü çalışmadan elde edilen verilerin bir meta-analizinde AK riskinin önemli ölçüde arttığı gözlenmiştir (Greiser et al., 2010). Üçüncüsü, hiç sigara içmeyenlerde bazı belirgin cinsiyet farklılıkları ortaya çıkmıştır. Hiç sigara içmeyenler arasında, kadınlar erkeklerden daha yüksek AK insidans oranlarına sahiptir. AK'nin geliştiği hiç sigara içmeyenler arasında, kadınlar erkeklerden daha yüksek bir adenokarsinom yüzdesine sahiptir ve adenokarsinomlu hastalarda, kadınlar erkeklerden daha yüksek EGFR mutasyonları prevalansına sahiptir (Alberg et al., 2013).

## 1.2. Akciğerin Anatomik, Fizyolojik ve Histolojik Yapısı

Akciğerlerin birbirine bağlı iki temel işlevi vardır. 1) Vücuda oksijen vermek ve vücut tarafından üretilen karbondioksiti gidermek için ventilasyon-perfüzyon eşleştirmesidir. 2) Havadaki patojenlerin, kimyasalların ve partiküllerin saldırısına karşı konukçu savunmasıdır. Akciğerlerin anatomik yapısı bu temel işlevleri ile yakından ilişkilidir (Albertine, 2016).

Süngerimsi yapıda olan akciğerler, göğüs kafesinde kalbin her iki yanında bulunurlar (Şekil 1.2.1 A). Üstte dar bir yuvarlak tepe noktası (apex) ve altta diyaframın dışbükey yüzeyine dayanan geniş bir içbükey tabanı ile konik şekildedirler. Her iki akciğerde, kan damarlarının, hava yollarının ve bronkopulmoner lenf düğümlerinin akciğerlere geçtiği, akciğerin kökünde hilum adı verilen merkezi bir girinti vardır (Drake et al., 2014).



Şekil 1.2.1: a. Akciğerin genel görünümü; b. Akciğerlerin lobları (Nickelson, 2021).

Akciğerler, çift tabakalı membrandan meydana gelmiş pleura ile çevrilidirler. Dış parietal pleura göğüs kafesinin iç duvarını kaplarken, iç visseral pleura akciğerlerin dış yüzünü kaplamaktadır. Her iki pleura tabakası arasında pleural sıvı içeren pleural boşluk bulunmaktadır (Aktümsek, 2016). Pleural sıvı, her nefes alışta pleura tabakalarının birbiri üzerinden kolaylıkla kaymasında ve akciğerlerin göğüs duvarına bağlanmasında görev almaktadır. Pleural boşluk, parietal pleuranın ve visseral pleuranın bitişik olduğu hilum

dışında akciğeri çevreler ve pulmoner ödem sıvısının kaçabileceği çıkış görevi görür (Albertine, 2016).

Her bir akciğer, fissür (yarık) olarak adlandırılan ve akciğerlerin genişlemesine yardımcı olan pleuranın kıvrımları tarafından loblara bölünmüştür (Şekil 1.2.1 B). Sağ akciğer, oblik ve horizontal fissür ile 3 loba – superior, medius ve inferior; sol akciğer ise, sadece oblik fissür ile superior ve inferior olmak üzere iki loba ayrılmıştır. Sol akciğerde horizontal fissür bulunmamaktadır ve sağdan farklı olarak orta lob içermez (Aktümsek, 2016). Ancak, bunun yerine homolog bir özelliğe sahip üst lobun lingula adı verilen çıkıntısını içermektedir (Ayed, 2004). Her bir akciğer, lobların yanı sıra onar tane bronkopulmoner segmente bölünmüştür. Bu segmentlerin her biri kısmen bağımsız birer akciğercik gibi çalışır. Çünkü her bir bronkopulmoner segment kendine ait (segmental) bronşlara ve arteriyel damarlara sahiptir. Segmentler yüzlerce alveollardan oluşan ve etrafı bağ dokusu ile çevrili daha küçük birimlerden - lobüllerden meydana gelmiştir (Aktümsek, 2016). Segmental anatomi, akciğerlerdeki hastalık süreçlerini lokalize etmek için klinik olarak yararlıdır. Segment, çevre dokuyu ciddi şekilde etkilemeden cerrahi olarak çıkarılabilen ayrı bir birimdir (Araçawa et al., 2000).

Akciğerler alt solunum yolunun bir parçasıdır ve trakeadan dallandıklarında bronşiyal hava yollarını barındırırlar. Bronşiyal hava yolları üç ana gruba ayrılır: bronşlar, bronşiyoller (terminal bronşiyoller dahil) ve solunum bronşiyolleri. Trakea ve bronşlar kıkırdaklıdır, ventilasyonla önemli ölçüde şekil değiştirmez ve gaz değişimine katılmazlar. Çapı yaklaşık 1 mm veya daha küçük olan bronşiyollerde kıkırdak yoktur. Çok sayıda ve kısa olan bronşiyoller, yaklaşık beş dallanmadan oluşur ve terminal bronşiyollerde son bulurlar. Solunum bronşiyolleri, hava yolları olarak ve alveolar hacmin (gaz değişimi) bir parçası olarak ikili işlev görür.

Hava yollarının hücresel karmaşıklığı, burada bulunan yaklaşık 50 farklı hücre tipiyle gösterilir; bunlardan en az 12'si hava yolu yüzeyindeki epitel hücreleridir (Albertine, 2016). Normal insan hava yolundaki epitel hücrelerinin yaklaşık yarısı, bronşiyollere kadar tüm hava yolu dallanmalarında kirpiklidir ve üst hava yollarında yalancı tabakalı, alt hava yollarında ise kolumnar ve kübik halledirler. Solunum epitelindeki hücreler dört ana tiptedir: a) kirpikli hücreler, b) goblet hücreleri (kadeh hücreleri), c) club hücreleri ve d) hava yolu bazal hücreleri (Aghapour et al., 2018).

Kirpikli hücreler, özel siliyer modifikasyonlara sahip sütunlu epitel hücreleridir. Kirpikli hücrelerin ana işlevi, trakeobronşiyal salgıları farinkse doğru itmektir (Breeze & Wheeldon, 1977) ve epitelin yüzde 50 ila 80'ini oluştururlar (Yaghi & Dolovich, 2016). Kirpikli hücreler arasında pulmoner fırça hücreleri olarak adlandırılan fırça hücreleri bulunur. Fırça hücrelerinin iki karakteristik özelliği vardır: 1) sitoplazma boyunca meydana gelen filaman demetleri içeriği 2) lümen yüzeyindeki yoğun mikrovilli popülasyonudur. İşlevleri bilinmemekle birlikte, özellikle alveollerdeki konumları bir temizleme rolü olduğunu düşündürmektedir (Breeze & Wheeldon, 1977).

Müsin salgılayan epitel hücreleri olan goblet hücreleri de çoğu hava yolu seviyesinde bulunur. Goblet hücrelerinin sayısı periferde azalır, normalde terminal bronşiyollerde kaybolur. Goblet hücreleri, mukus salgılayarak epitelyal nemin korunmasına yardımcı olur. Ayrıca, hava yolu boyunca hareket eden partikül materyali ve patojenleri hapseder ve mukosilyer klirensin ne kadar iyi çalıştığını belirler (Stanke, 2015). Goblet hücreleri apikal sitoplazmalarında çok sayıda mukoza granülü ve ribozom içerirler. Bu nedenle, nispeten yoğun, elektronopak bir sitoplazmaya sahiptir. Mukoza granüllerinin içeriği, olgun hücreye karakteristik kadeh şeklini verir (Breeze & Wheeldon, 1977).

Kirpikli olmayan club hücreleri esas olarak terminal hava yollarında, kirpikli epitel hücreleri arasında serpiştirilmiş bir şekilde bulunurlar. Club hücreleri fonksiyonu gereği büyük apikal granüllere sahiptir. Kulüp hücrelerinin akciğerde en az dört işlevi vardır: 1) Kendileri ve kirpikli epitel hücreleri için progenitör hücreler olarak hizmet etmektir. 2) Sitokrom P-450 monooksijenaz sistemi yoluyla ksenobiyotik metabolizmadır. 3) Salgılama görevi: kulüp hücreleri, surfaktant proteinlerinin (SP'ler; SP-A, -B ve -D) ve ayrıca lipidlerin, proteinlerin (kulüp hücresi 10-kDa proteini), glikoproteinlerin ve iltihap modülatörlerinin kaynağıdır (lökosit proteaz inhibitörü ve tripsin benzeri proteaz). 4) iyon kanallarını etkileyerek sıvı dengesini sağlamaktır (Albertine, 2016).

Bazal hücreler, hava yollarının bazal laminasında bulunurlar. Bu küçük ve kübik epitel hücrelerinin, klasik olarak kirpikli hücreler de dahil olmak üzere diğer hava yolu epitel hücreleri için öncü hücreler olduğu düşünülmekteydi. Bununla birlikte, son yapılan çalışmalar kulüp hücrelerinin de, doku hasarını takiben kirpikli epitel hücrelerine farklılaşabileceğini göstermektedir (Albertine, 2016). Bazal hücreler ayrıca bir

antimikrobiyal protein olan RNase7 gibi doğuştan gelen bağışıklık araçlarını düzenleyen savunma işlevi de sağlamkatadır (Shaykhiev, 2015).

Akciğerlerin fonksiyonel birimleri olan alveollar, tek katlı skuamöz (squamous: pul şeklinde, yassı) örtü epiteli ile örtülüdür (Aktümsek, 2016). Solunum bronşiyollerinin kübik epitelinden alveolar skuamöz epitele geçiş anidir. Alveolar epitel, kübik alveolar tip II hücrelerden ve skuamöz tip I hücrelerden oluşur. Alveolar tip II hücreler, tip I hücrelerden sayıca üstündür ( $\approx$ % 15'e karşı % 8 ila % 10), ancak tip I hücreler alveolar yüzey alanının yaklaşık yüzde 90 ila 95'ini oluşturur (Crapo et al., 1982). İki hücre tipinin farklı işlevleri ve yapısı vardır.

Alveolar tip II hücreler, fosfolipid ve proteinlerden oluşmuş, deterjan benzeri bir madde olan surfaktan salgırlar. Surfaktantlar su molekülleri ile ilişkiye girer ve yüzey gerilimini düşürerek alveollerin açık kalmasını sağlarlar. Bu şekilde akciğerlerin büzüşerek kolaps olmasını önlerler (Aktümsek, 2016). Tip II hücreler ayrıca çeşitli büyüme faktörleri, enzimler, matris proteinleri ve epitelyal müsinler için reseptörleri barındırırlar (Mason & Williams, 1977). Tip II hücrelerin en önemli ayırt edici yapısal özelliği, hücre içi lameller cisimcikleri içermesidir. Bu cisimler, pulmoner surfaktant, SP-A, SP-B ve SP-C dahil çeşitli ptoteinler, lizozomal enzimler,  $H^+$  taşıyıcı, özgün bir a-glukozidaz ve diğer molekülleri içerirler (Albertine, 2016; Weaver et al., 2002).

Alveolar tip I hücreler, gaz değişimi için geniş, ince bir yüzey alanı oluşturmakta ve kaveola olarak adlandırılan birçok küçük, klatrin kaplı olmayan veziküller içermektedirler. Normal koşullar altında, alveolar tip I hücreler, alveolar hava ve alveolar duvar interstisyel boşlukları arasında geçirimsiz bir sızdırmazlık oluşturmak için komşu alveolar tip II hücrelere tight junctionlarla bağlanırlar (Albertine, 2016).

Alveolar yüzeylere çarpan partikül maddelerin yakalanması ve temizlenmesi hayati önem taşımakta ve bu işlem alveolar yüzey sıvısında asılı bir halde bulunan makrofajlar tarafından gerçekleştirilmektedir. Alveolar makrofajlar, doğal bağışıklık için önemli olan TNF- $\alpha$  ve TGF- $\alpha$  gibi sitokinleri aktif olarak eksprese eder ve salgırlar (Hocking & Golde, 1979).

### **1.3. Akciğer Kanserinin Tanısı ve Sınıflandırılması**

AK belirtileri geç ortaya çıktığı için hastaların % 70'i ileri evrede başvurmaktadır ve tanı histolojik veya sitolojik temelli örneklerle konulabilmektedir (W. Dean Wallace & William D. Travis, 2016). AK patolojisi, daha ileri moleküler testler için hem doku teşhisini hem de akciğer kanserlerinin spesifik alt tiplerinin seçimini kapsayacak şekilde genişletilmiştir. Doğrulayıcı histolojik tanı, erken evre hastalığın cerrahi rezeksiyonuna yönlendirirken, patolojik sınıflandırma ve moleküler test, ileri evre hastaların sağkalımlarını iyileştirmek için tümör tipine uygun adjuvan tedavi ve genotipe dayalı tedavi rejiminin seçimini mümkün kılar (M. Zheng, 2016).

AK geleneksel olarak küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) ve küçük hücre dışı akciğer kanseri (KHDAK) olarak ikiye ayrılır. Histolojik kriterleri baz alan bu sınıflama, klinik yaklaşım ve hastalığın prognozu açısından önemlidir.

**Küçük hücre dışı akciğer kanseri (KHDAK):** KHDAK'leri AK'nin yaklaşık %85'ni oluştururlar ve başka organlara yayılma eğilimi küçük hücreli akciğer kanseri grubuna göre daha düşüktür (Gomes & Gibbons, 2016). Başlıca üç alttipi şunlardır: Adenokarsinom, skuamöz hücreli karsinom ve büyük hücreli karsinom.

**Adenokarsinom:** Adenokarsinom, akciğer kanserlerinin %40'ından fazlasını, KHDAK'nin %60'ını ve cerrahi olarak rezekte edilen vakaların %70'inden fazlasını oluşturan en yaygın akciğer kanseri türüdür (Travis et al., 2015). Tanım olarak, akciğer adenokarsinomu, glandüler farklılaşma veya müsin üretimi olan malign bir epitelial neoplazidir. Genellikle periferik yerleşimli, santral fibrozlu ve plevral büzülen küçük bir kitle oluştururlar. Ancak merkezi yerleşimli ve büyük görünümlere de sahip olabilirler. Bu tür morfolojik özellikler fark edildiğinde, küçük biyopsi örneklerinde bile tümörler adenokarsinom olarak tanımlanabilirler. Akciğer adenokarsinom hücreleri çoğunlukla pnömositik belirteçleri ifade eder. Tiroid transkripsiyon faktörü (TTF-1) ve Napsin A, akciğer adenokarsinom vakalarının %85'inden fazlasında eksprese edilir ve bu nedenle, kötü farklılaşmış tümörde ve sınırlı biyopsi örnekleme materyalinde adenokarsinom veya adenokarsinom farklılaşmasının markörleri olarak hizmet edebilir (Mukhopadhyay & Katzenstein, 2011; Zheng, 2016).



**Skumöz hücreli karsinom (SHK):** Skumöz hücreli karsinom, tüm akciğer kanserlerinin yaklaşık %20'sini oluşturur (Lewis et al., 2014). Genellikle akciğerin orta kısmında, en sık segmental bronşlarda ortaya çıkar ve ekstansiyonla lobar ve ana bronşları da içerir. SHK, karakteristik olarak keratinizasyon, hücreler arası köprüleşme ve skumöz inci oluşumu gösterir ve yuvalanma modeli sergiler. Tümör hücreleri glandüler yapıdan veya müsin üretiminden yoksundur. Keratinizasyon, keratin inci oluşumu ve hücreler arası köprüler dahil olmak üzere skumöz hücre farklılaşmasının morfolojik özelliklerinin tanınması, küçük biyopsi örneklerinde bile SHK tanısı konulabilir (M. Zheng, 2016). Tümör zayıf bir şekilde farklılaştığında ve güvenilir morfolojik sınıflandırmaya izin vermediğinde, skumöz farklılaşmayı göstermek için p40, CK5 / 6, CK5 ve p63 gibi seçici skumöz hücre markörleri kullanılır (Conde et al., 2013). SHK'lu hastaların hayatta kalma oranı, adenokarsinomdan önemli ölçüde daha iyidir.

**Büyük hücreli karsinom (BHK):** BHK'ler akciğer kanserlerinin %3'ünden azını temsil eder ve diğer KHDK'ların morfolojik ve immünohistokimyasal özelliklerinden yoksundur. Genellikle periferik yerleşimli, hacimli ve nekrotik görünümlü tümörlerdir. Tümör hücreleri, pleomorfik ve veziküler çekirdeklerle büyük ve poligonal şekillidir. Desensiz solid tabaka veya yuvalanmalar oluştururlar (Lewis et al., 2014). Morfolojik veya immünohistokimyasal olarak glandüler veya skumöz farklılaşma olmadığından tanı küçük biyopsiler veya sitoloji örnekleriyle konulamaz. Tanı için ayrıntılı histolojik örnekleme ile cerrahi rezeksiyon örneği gereklidir (W. Dean Wallace & William D. Travis, 2016). Çoğu BHK vakası, özellikle herhangi bir immünofenotipi olmayanlar için olumsuz sonuçlara sahiptir (Rekhtman et al., 2013).

**Küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK):** KHAK'ler tüm akciğer kanserlerinin %10'undan biraz fazlasını oluşturur. Oldukça hızlı ilerleyen bir türdür ve başka organlara (beyin, kemik ve böbreküstü bezi gibi) yayılma eğilimi diğer türlerden daha yüksektir. Genellikle hastaların başvuru anında metastatik hastalığı vardır ve tedaviden sonraki 2 yıllık sağ kalım oranı %10'dan azdır (Planchard & Le Péchoux, 2011). Genellikle ana hava yolunda merkezi olarak bulunur. Tümör hücreleri, belirgin nükleol içermeyen ince tanecikli kromatin ve dar sitoplazmadan oluşurlar. Diğer akciğer kanseri türlerine kıyasla boyut olarak küçüktür ve hücresel sınırları belirgin değildir. Karakteristik olarak yüksek mitoz oranına sahiptir.

Yaklaşık 2 mm<sup>2</sup>'lik alanda mitoz sayısı ortalama 80 veya daha fazladır. Ayrıca yüksek apoptotik oran ve yaygın tümör nekrozu vardır (Travis, 2012). Çoğu hasta ileri evrelerde bulunduğundan, tanı genellikle transbronşiyal biyopsi ve/veya sitolojiye dayanılarak konulur ve oldukça güvenilirdir. Teşhis, rutin hematoxilen-eozin boyalı slaytlar kullanılarak ışık mikroskopunda yapılır. Önemli ezilme artefaktına sahip küçük biyopsi materyallerinde ise immünohistokimya tanı için oldukça yararlıdır (M. Zheng, 2016). DSÖ sınıflandırması, KHAK'yi 2 ana histolojik tipe ayırır: Tüm tümörün sadece KHAK'dan oluştuğu ve kombine KHAK. Kombine KHAK, adenokarsinom, skuamöz hücreli karsinom, büyük hücreli karsinom, içsi hücreli karsinom, ve dev hücreli karsinom gibi KHDAK türleri ile birlikte ortaya çıkmaktadır (W. Dean Wallace & William D. Travis, 2016).

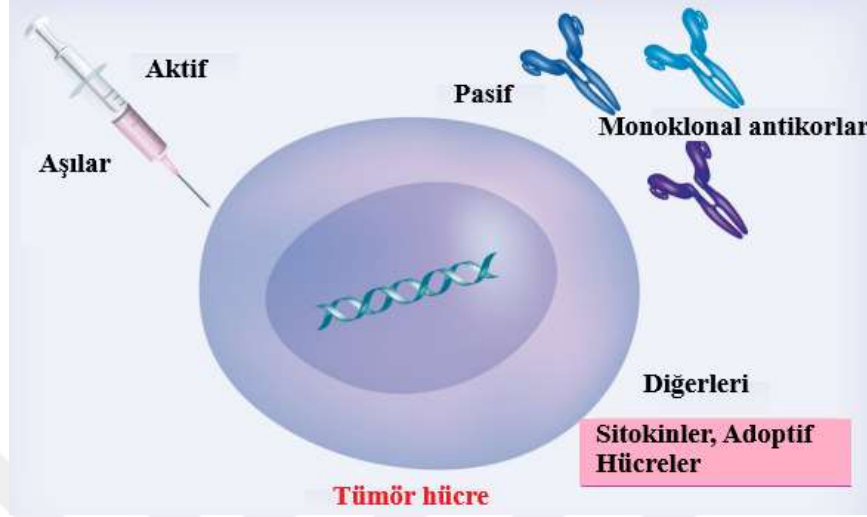
#### **1.4. Akciğer Kanserinde İmmun Tedavi**

Günümüzde cerrahi, radyoterapi, kemoterapi gibi yöntemlerin yeterli olmaması ya da vücudun sağlıklı hücrelerine de büyük zarar vermesi nedeni ile immünoterapi AK'i tedavisinde önemli seçeneklerden biri olarak öne çıkmaktadır. Böylece daha az yan etki görülen, bireye özgü ve daha az toksik bir tedavi şekli mümkün olabilmektedir (Barbaros & Dikmen, 2015).

Alternatif bir tedavi yöntemi olarak kanser immünoterapisi, son yıllarda önemli ölçüde gelişmiş ve diğer terapötik yöntemlerin aksine, doğrudan kanser hücrelerini hedef alarak sağlıklı hücrelere zarar vermemesiyle gün geçtikçe daha da yaygınlaşmaktadır. İmmünoterapide uygulanan yaklaşımlar, temelde sitokinler, aşılardan, immün sistemin *in vitro* uyarılmış efektör hücreleri veya antikorlar gibi çok sayıda bileşik yoluyla bağışıklık sisteminin tamamlanması veya uyarılmasına dayanır (Schuster et al., 2006).

Son zamanlarda, birçok çalışma, metastatik KHDAK tedavisi için bu tür tedavilerin önemini vurgulamışlar: ipilimumab, tremelimumab, nivolumab ve lambrolizumab, bu alanda çok araştırılan immünoterapötik ajanlardır. Bununla birlikte, MAGE-A3, Tecetomide, TG4010, CIMAvax, gangliosid aşılardan, tümör hücre aşılardan ve dendritik hücre aşılardan gibi anti-tümör aşılardan, tümöre karşı bağışıklık yanıtının güçlü uyarıcıları olarak önem kazanmıştır (Domingues et al., 2014; Madureira et al., 2015).

Kanser immünoterapisinin amacı, tümöre yönelik bağışıklık yanıtı spesifik olarak güçlendirmektir ve bu iki şekilde gerçekleştirilmektedir: aktif ve pasif immünoterapi (Şekil 1.4.1).



Şekil 1.4.1: Kanser immünoterapisi genel şeması (Rijavec et al., 2014).

**Aktif immünoterapi:** İmmün sistemi aktive edebilen bağışıklık hücreleri veya araçları (antitümör aşıları veya hücresele tedaviler) kullanarak kanseri ortadan kaldırmak için *in vivo* da bireyin kendi bağışıklık sistemini uyarmayı amaçlar (Domingues et al., 2014; Aldarouish & Wang, 2016).

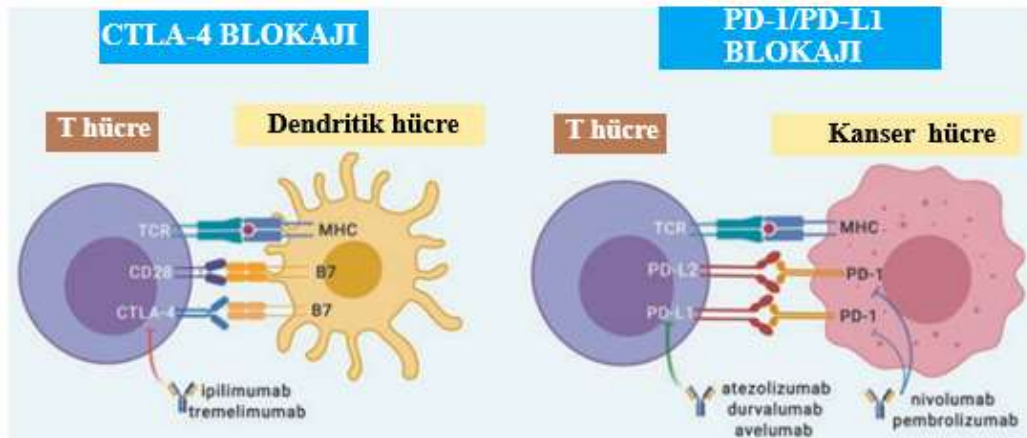
**Anti-tümör aşılar:** Klinik olarak denenmiş, çoğu KHDAK için kullanılan ve daha az bir kısmı ise KHAK için geliştirilmiş çeşitli AK aşı terapileri vardır. Antijene özgül aşılar, spesifik tümör-ilişkili antijenlere yönelik anti-tümör bağışıklığı uyatarak etki gösterirler. Diğer yandan, otolog veya allojenik tümör hücrelerinden oluşan tümör hücre aşıları ise, bağışıklık sistemini, genellikle bilinmeyen çeşitli tümör antijenlerine maruz bırakarak immün yanıt oluşturur (Steven et al., 2016).

Mevcut TG4010 aşısının faz III denemesi haricinde, aşılar AK'de önemli bir yol katetmemiştir. Diğer birçok solid tümörler gibi, AK konakçı immün tepkisini bozmak için HLA / MHC moleküllerinin regülasyonunu azaltmak, tümör antijen ekspresyonunun kaybını veya modülasyonunu sağlamak ve immünosupresif sitokinlerin sekresyonunu başlatmak gibi mekanizmaları kullanmaktadır. Tüm bunlar aşıların akciğer kanserinde işe yaramadığının nedenleri olarak öne sürülmüştür (Thomas & Giaccone, 2015). Bununla

birlikte, çok sayıda çalışma, terapötik aşuların bağışıklık kontrol noktası inhibitörleri ile kombinasyonunun AK tedavisinde önemli bir rol oynayabileceğini göstermiştir (Aldarouish & Wang, 2016).

**Pasif immünoterapi:** Pasif immünoterapi ise, tümör antijenlerini tanıyan ve kanserin ilerlemesine müdahale eden monoklonal antikorlar gibi vücut dışında yapılan immünolojik olarak aktif bir ajanın pasif transferine dayanır (Rijavec et al., 2014).

**İmmün kontrol noktası inhibitörleri:** AK için immünoterapide en umut verici yaklaşımlardan biri T hücre aktivasyonunu ve proliferasyonunu düzenleyen bağışıklık kontrol noktalarını engellemektir (Şekil 1.4.2). Bu bağışıklık kontrol noktaları arasında yaygın olarak CTLA-4, PD-1 ve PD-L1 bulunur ve bunların engellenmesinde T hücrelerine yönelik tasarlanmış monoklonal antikorlar (mAb'ler) kullanılır (Domingues et al., 2014).



Şekil 1.4.2: CTLA-4 ve PD-1 / PD-L1 inhibitörlerinin etki mekanizması (Russo *et al.*, 2020).

*CTLA-4*, aktivasyonlarından sonra T hücrelerin yüzeyinde eksprese edilen ve klinik olarak hedeflenen ilk bağışıklık kontrol noktası reseptörüdür. *CTLA-4* ligandlarına, B7.1 (CD80) ve B7.2'ye (CD86) bağlandığında, T hücrelerinin işlevi bastırılır ve kanser hücrelerine karşı immün yanıt azalır (Rijavec et al., 2014). Tümör oluşumunun erken evresinde TGF- $\beta$  yardımıyla T hücreleri üzerindeki *CTLA-4* ekspresyonunun artırılması, tümörün en önemli immün kaçış mekanizmalarından biri olduğu bilinmektedir. Son yıllarda, kanser immünoterapisinde güçlü bir strateji olarak *CTLA-4*'ü inhibe etmek için spesifik mAB'ların geliştirilmesinde önemli ilerleme kaydedilmiştir (Aldarouish & Wang, 2016). Bu şekilde, daha uzun süren T

hücre aktivasyonuna bağılı olarak AK'de dahil olmak üzere birkaç solid tümörlerde hastaların genel sağkalım oranlarında yükselme gözlemlenmiştir. Ipilimumab (MDX-010), tümör hücrelerine karşı T-hücre aktivasyonunu teşvik etmek için B7 ligandları ile CTLA-4 arasındaki etkileşimi bloke edebilen anti-CTLA-4 monoklonal antikordur. Halihazırda skuamöz KHDAK'li hastalarda kemoterapiye alternatif olarak kemoterapi ile aşamalı ipilimumab kullanan faz III çalışması devam etmektedir (Steven et al., 2016b).

*PD-1* reseptörleri de, CTLA-4'e benzer şekilde uyarılmış T hücre yüzeylerinde eksprese edilir ve bu hücrelerin immün yanıtlarını inhibe eder. Kansere immün döngüsünün erken aşamalarında yer alan CTLA-4'ün aksine, PD-1 ve ligandları kanser hücrelerinin öldürülmesinde çok önemli bir role sahiptir. PD-1, antijen sunan hücreler (ASH'ler, APC), makrofajlar, fibroblastlar ve T hücreleri üzerinde ifade edilen PD-L1 (B7-H1) ve ağırlıklı olarak ASH'leri üzerinde ifade edilen PD-L2 (B7-DC) olmak üzere iki liganda sahiptir (Russo et al., 2020). Tümör hücreleri üzerindeki PD-L1 ile T hücreleri üzerindeki PD-1 arasındaki etkileşim, IFN-g ve IL-2 gibi sitokinlerin üretimini azaltmasıyla karakterize edilen tükenmiş bir fenotip sergileyen T hücrelerinin negatif düzenlemesine ve apoptozunda bir artışa yol açar (Freeman et al., 2000). PD-1 kontrol noktası blokajı, PD-1 reseptöre veya onun ligandı PD-L1'e yönelik antikörleri kullanır. PD-L1 (B7-H1), KHDAK'de en çok çalışılan membran inhibe edici ligandlardır ve hastaların yaklaşık yarısının tümör hücrelerinde eksprese edilir. Bunların ekspresyonu T hücre fonksiyonunu baskılayarak ve tümör hücrelerinin immün kaçışını teşvik ederek zayıf prognoza katkıda bulunabilmektedirler (Steven et al., 2016b).

CTLA-4 ve PD-1 / PD-L1'in immün baskılamadaki rolü ve solid tümörlerdeki ekspresyonu, terapötik kullanımlarının önemini göstermiştir. AK'de sadece kemoterapi ile birlikte kullanıldığında işe yaradığı görülen CTLA-4 inhibitörlerinin aksine, PD-1 kontrol noktası blokajı, KHAK'de tek tedavi olarak da aktivite göstermiştir (Russo et al., 2020).

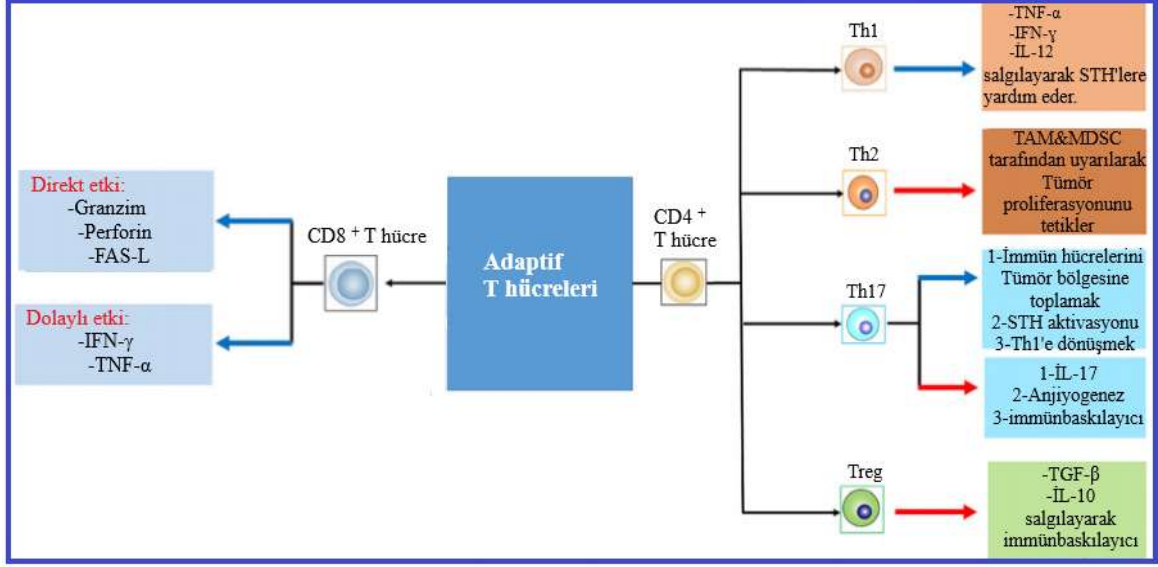
Diğer immünoterapötik yaklaşımlar arasında adaptif immünoterapi (hücresele immünoterapi), sitokinler ve immün sistemi destekleyici tedaviler yer almaktadır. Özellikle adoptif immünoterapiye olan ilgi gittikçe artmaktadır (Barbaros & Dİkmen, 2015). Hücresele tedavi, tümör reaktif immün hücrelerin *ex vivo* üretimine ve çok sayıda hücrelerin hastaya

uygulanmasına dayanır (J. Wang & Wang, 2014). Adaptif immün hücrelerin hızlı *ex vivo* üretimi, güçlü immünoterapötik ürün oluşturmanın daha basit, pratik ve ekonomik bir yoldur (Y. W. Zheng et al., 2013). Bu amaçla T hücreleri kullanılır. Hücrel immünoterapinin özü olan T hücreleri, akciğer kanserinin araştırılmasında ve tedavisinde önemli bir rol oynar.

Kanser hastalarında genellikle kanser hücrelerini hedefleyebilen T hücreleri mevcuttur. Bu T hücrelerin aktivasyonu, adaptif immün yanıtın başlatılması ve immünolojik hafızanın oluşturulması için çok önemlidir. Bu nedenle, T hücreleri, endojen anti-tümör bağışıklığı geliştirmeyi amaçlayan immünoterapilerin başlıca hedefleri olmuştur. Bu T hücrelerinden özellikle sitotoksik (CD8<sup>+</sup>) T hücreleri (STH ya da CTH), virüsle enfekte ve tümör hücrelerinin yıkımına neden olmaktadır. Bu da onları kanser immünoterapisi için önemli bir araç haline getirmektedir (Madureira et al., 2015).

#### **1.4.1. Sitotoksik T Hücreleri**

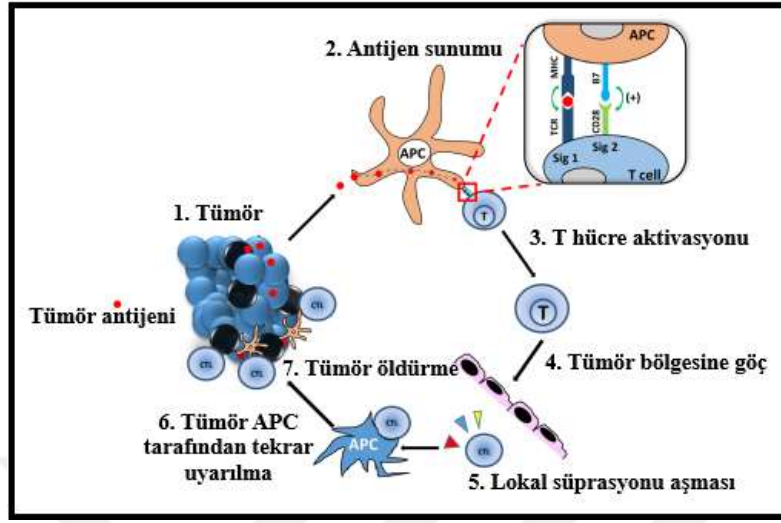
Fenotiplerine göre, T hücreleri esas olarak CD4<sup>+</sup> yardımcı T hücrelerine ve CD8<sup>+</sup> sitotoksik T (STH) hücrelerine bölünürler (Şekil 1.4.1.1). Aynı zamanda CD4<sup>+</sup> T hücreleri de, her biri özel transkripsiyonel düzenleme altında spesifik efektör sitokinler üreten Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, foliküler yardımcı T hücreleri (Tfh) ve düzenleyici T hücrelerine (Treg) ayrılırlar (Lu et al., 2018). STH'ler, antitümör bağışıklığın ana gücü olan CD8<sup>+</sup> αβ T hücreleridir. Bu hücreler tümör ilişkili antijenleri (TİA) sunan MHC sınıf I moleküllerini tanıma ve tümör hücrelerini yok etmek için granzimler ve perforinler salgılama kabiliyetine sahiptirler (Li et al., 2015).



**Şekil 1.4.1.1:** Adaptif T hücre çeşitleri ve fonksiyonları. Mavi oklar anti-tümör etkisini, kırmızı oklar ise anti-tümör bağışıklığının inhibisyonunu temsil eder. TNF- $\alpha$ : Tümör nekroz faktörü alfa, IFN- $\gamma$ : İnterferon gama, STH'ler: CD8<sup>+</sup> sitotoksik lenfositler, TGF- $\beta$ : Dönüştürücü büyüme faktörü beta, MDSC: Miyeloid türevi baskılayıcı hücreler (Aldarouish & Wang, 2016).

STH'lerin kanser hücrelerini etkili bir şekilde öldürebilmeleri için ilk önce aktive olması gerekmektedir (Şekil 1.4.1.2). Kemik iliğindeki kök hücrelerden kökenlenen lenfositlerin bir kısmı timüs bezine göç ederek buradaki gelişiminin ardından T hücrelerine dönüşürler. Kemik iliğinde kalarak olgunlaşan lenfositler ise, B hücrelerine gelişirler (Wesserman et al., 2011). Bu T hücreleri timüs medullasında sınıflandırma proteinlerini CD4<sup>+</sup> ya da CD8<sup>+</sup> ifade etmeye başlar. Olgunlaşmış CD8<sup>+</sup> T hücreleri lenf düğümleri ya da dalak gibi sekonder lenfoid organlara taşınırlar. Burada bu hücrelerin bölünmesi ve çoğalması gerçekleşir. Ayrıca, lenf düğümlerinde yabancı antijenlerin belirlenmesi ve bu antijenlerin APC (antigen presenting cells, antijen sunucu hücreler)'ler tarafından (özellikle dendritik hücreler) alınması gerçekleşmektedir. APC tarafından sunulan antijenlerin STH'ler üzerinde bulunan T hücre reseptörlerine (THR) uygun gelmesi halinde STH'ler aktifleşir. Aktifleşmiş olgun STH'ler lenf düğümlerinden ayrılarak torasik kanala (vücuttaki lenf sıvısının çoğunluğunu toplayan ve dolaşıma akıtan en büyük lenf damarıdır), oradan da dolaşım sistemine geçerek görevini tamamlamak üzere hedef bölgeye göç eder (Maimela et al., 2019). Tümör bölgesine girdikten sonra, uyarılmış STH'ler aşması gereken bir dizi yerel immün baskılayıcı mekanizma ile karşılaşır ve ayrıca, muhtemelen tümör içindeki APC'ler tarafından da yeniden uyarılmaları gerekmektedir. Son olarak, tümör tarafından ifade edilen antijenleri

tanımları ve tümör hücrelerini öldüren perforin ve granzimler gibi güçlü molekülleri salgılayarak tümöre saldırımları gerekir (Steven et al., 2016).



Şekil 1.4.1.2: STH'lerin aktivasyonu ve anti-tümör etkisi (Steven et al., 2016).

Önemli olarak, bu aşamaların her biri düzenlenebilmektedir. Örneğin, normalde otoimmüniteyi kontrol eden, ancak anti-tümör yanıtları engelleyebilen veya "yardımcı" CD4 T hücreleri tarafından arttırılabilen düzenleyici CD4 T hücreleri (Treg) tarafından aktivasyon inhibe edilebilmektedir (Steven et al., 2016).

Anti-tümör STH'lerin uyarılmalarının yanı sıra bu hücrelerin sayısı da bağışıklık sisteminin kanser hücrelerine saldırması için en öncelikli etkenlerdir. Kanser çevresindeki ve stromadaki CD8<sup>+</sup> T hücrelerinin sayısı, kemoterapi ile tedavi edilen evre IV KHDAK hastalarında bağımsız bir prognostik faktördür. Bu nedenle, STH'lerin sayısını arttırmaya yönelik yöntemler geliştirilmektedir (Li et al., 2015).

#### 1.4.2. Tümör Mikroçevresi

Bir kez etkinleştince STH'ler, virüslerle ya da diğer hücre içi patojenlerle enfekte olmuş hücreleri ve tümör hücrelerini yok edebilirler. USTH'lerin uzun vadede anti-tümör yanıt oluşturabilmesi için bu aktiviteyi devam ettirmesi gerekir. Ancak, tümör mikroçevresi (TMÇ) sistemik ve lokal immünbaskılayıcı hücreleri aktive ederek tümör hücrelerinin immün sistemden kaçmasına yardım etmektedir. Dahası, AK'nin konakçı bağışıklık tepkisini diğer kanser türlerine göre yüksek oranda baskıladığı bilinmektedir. Bunun başlıca



sebeplerinden biride sigara dumanının bağışıklık sistemindeki olumsuz etkileridir (Aerts & Hegmans, 2013).

AK, farklı mekanizmalar kullanarak bağışıklık sisteminden kaçabilmektedir. Örneğin, kanser öncesi hücrelerinin bağışıklık denetimine karşı yavaş yavaş seçici adaptasyona uğraması ile bağışıklık düzenleme sürecinden yavaş geçerler. AK hücreleri, STAT-3, IDO, TGF- $\beta$  ve IL-10 dahil olmak üzere çeşitli proteinlerin salgılanması yoluyla antijenlerinin pAPC tarafından rutin olarak işlenmesini de bozar. Ayrıca, tümör çevresindeki yoğun fibrotik stroma, T hücrelerinin tümör hücrelerine erişimini sınırlayarak antitümör bağışıklığını etkiler (Salmon & Donnadieu, 2012). Bunun dışında, MHC sınıf I molekül ekspresyonunun regülasyonu azaltarak konakçı immün yanıt oluşumundan kaçır, böylece herhangi bir endojen veya terapötik anti-tümör T hücresi tepkisini etkisiz hale getirir. Son olarak, AK, özellikle Treg ve MDSC olmak üzere immün baskılayıcı hücrelerin artışını teşvik eder. Bu immün baskılayıcı hücreler, TMÇ'de birikir, tümör büyümesini destekler ve antitümör immün yanıtlarını aşağı doğru düzenler (Aldarouish & Wang, 2016).

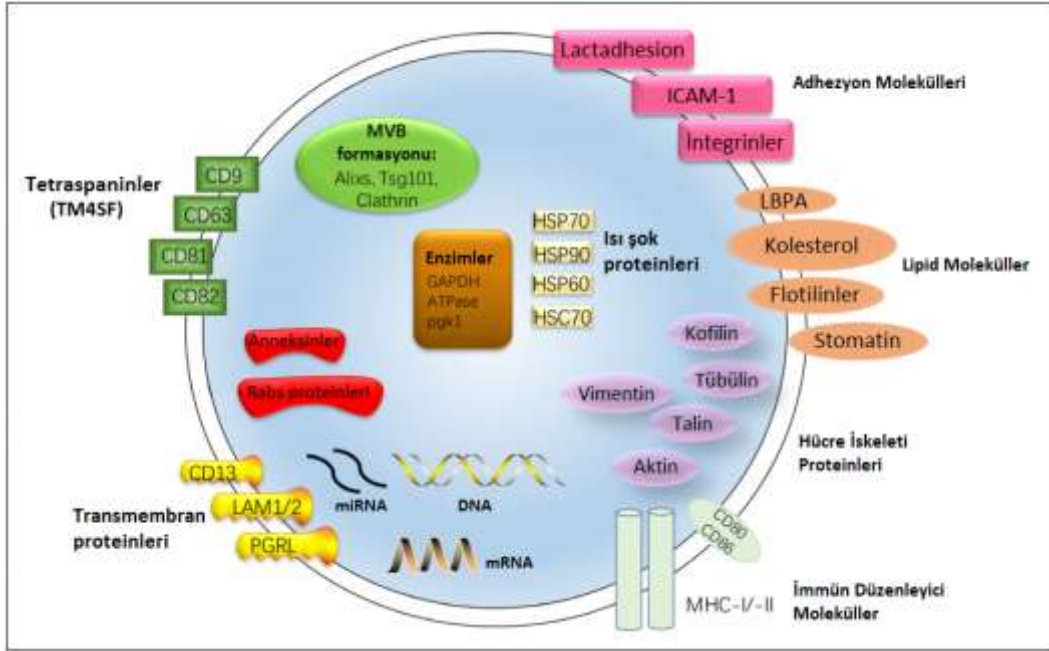
Dolayısıyla, yukarıda belirtilen sebeplerden ötürü USTH'lerin anti-tümör etkinlikleri TMÇ'de bulunan çeşitli immünbaskılayıcı hücreler tarafından engellenmektedir. Bu nedenle, T hücrelerinin anti-tümör etkilerini arttırmak için STH'lerin aktivasyonunu sağlayan ve tümör hücrelerini spesifik olarak hedefleyen terapi yöntemleri geliştirilmiştir.

Bunlar; tümör infiltratif lenfositler (TIL), kanser spesifik THR ekspresyonu için düzenlenmiş T hücreleri ve antikorun ekstraselüler kısmı ile T hücresi reseptörünün sinyal mekanizmasını bir araya getiren kimerik antijen reseptörü (CAR) ekspresyonu için düzenlenmiş T hücrelerdir. Bu yaklaşımlardan en kolay hazırlananı TIL'lerdir fakat tedavi invazif prosedürler gerektirir. Ayrıca transfer sonrası TIL'lerin desteklenmesi için yüksek dozda IL-2 (interlökin-2) gerekir. Bu da önemli toksisitelere yol açar. T hücresine MHC ile sınırlı antijenin aksine, yapay olarak hazırlanan CAR-T hücreleri tüm antijeni tanıma fırsatı sağlar. Bu yöntemle başarılı sonuçlar elde edilse de aktarımdaki etkinliğe bağlı sıkıntılar ve muhtemel toksisite nedeniyle kullanımını sınırlıdır. Diğer bir yaklaşım ise endojen Tümör Spesifik T hücrelerinin kullanımınıdır. Bu yöntem en fizyolojik olanı olmakla beraber en çok işlem gerektirendir (Barbaros & Dikmen, 2015).

Tüm bu çalışmalara ilgi giderek artmakla birlikte, USTH'lerin anti-tümör etkinliklerinde granzim-perforin yolağının (yukarıda belirtilen yolakların) yanı sıra diğer mekanizmalarında olabileceği bilim dünyası tarafından tartışılmaktadır. Son yapılan çalışmalarda ise, USTH'lerin anti-tümör etkinliklerinde eksozomlarında rol aldığı gösterilmiştir.

## 1.5. Eksozomlar

Eksozomlar (Şekil 1.5.1) çapı genellikle 40-150 nm olan; içlerinde proteinler, lipitler, çok çeşitli RNA molekülleri ve DNA fragmentleri gibi birçok biyomolekül taşıyan mikroveziküllerdir (Bzokurt, 2018). Bu biyomoleküller vasıtasıyla, alıcı hücrelerde gen ifadelerini düzenleyerek, immün regülasyon, hücre farklılaşması, hücreler arası haberleşme, hücre göçü gibi birçok biyolojik fonksiyonda rol alırlar (Théry, 2011).



Şekil 1.5.1: Eksozomun moleküler yapısı ve içeriği (Jia et al., 2017).

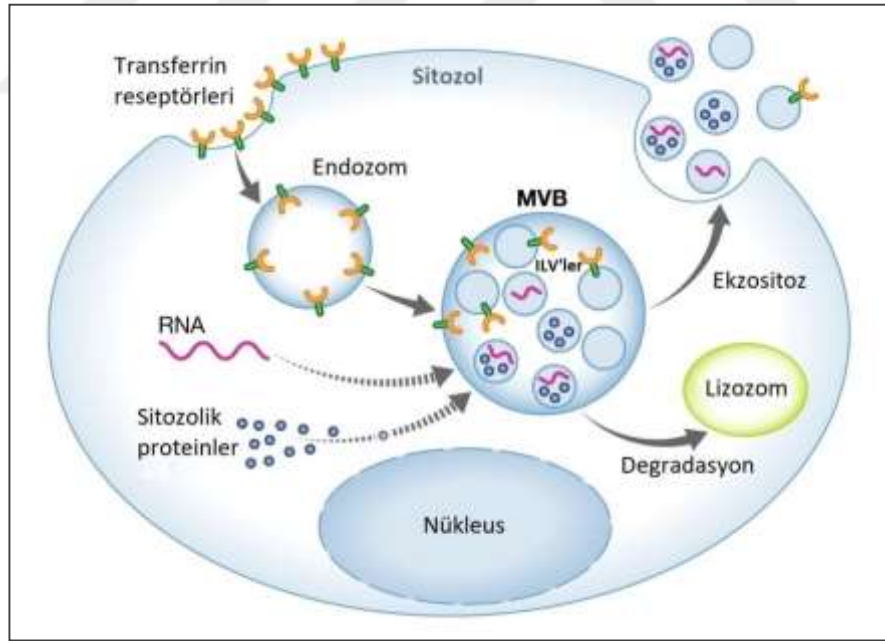
Eksozomlar, vücutta bulunan hücrelerin neredeyse tamamı tarafından salgılanmakta ve çift fosfolipid tabaka ile çevrilidirler. Eksozomları diğer hücre dışı veziküllerden ayırt eden en önemli özellikleri:

- Kendilerine özgü biyolojik oluşum yolları
- Lipit bileşimleri
- Taşıdıkları RNA yükleridir (mRNA, miRNA, lncRNA).

Eksozomların içerikleri, bunları salgılayan hücrelerin kökeni ve patofizyolojisi ile yakından ilgilidir. Bununla birlikte: ısı-şok proteinleri, hücre iskelet sistemi proteinleri (aktin, tubulin), tetraspanin ailesine dahil olan proteinler (CD9, CD37, CD53, CD63, CD81 ve CD82 ) tüm eksozomlarda görülür (Mathieu et al., 2019). Özellikle CD9, CD81 ve CD63 tetraspaninler eksozomları diğer EV’lerden ayırmada kullanılan membran proteinleridir.

### 1.5.1. Eksozomların Biyogenezi

Eksozomlar, endozomlar olarak adlandırılan hücre dışı ligandların ve hücresel bileşenlerin geri dönüşümü ve yıkımı için önemli olan organellerden oluşmaktadır. Plazma membranının içe kıvrılmasıyla oluşan erken endozomlar, olgunlaşıp geç endozomlara dönüşürler. Bu aşamada plazma membranları internal olarak tomurcuklanır ve spesifik protein, lipid ve sitozol alt grupları içeren intralüminal vezikül (ILV)'ler oluştururlar (Şekil 1.5.1.1). Olgunlaşmış endozomlar [Multiveziküler cisim (MVC)’ler], degrade olmak üzere lizozom organeliyle, ya da eksozom salınımı yapmak üzere plazma membranı ile füzyon oluşturduğu iki farklı yol izlemektedir (Kugeratski & Kalluri, 2021).



Şekil 1.5.1.1: Eksozom biyogenezi ve salınımı (Schorey et al., 2015).

MVC’ler ve ILV’ler, toplamda 30 farklı proteinin yer aldığı ‘*Endosomal sorting complex required for transport (ESCRT)*’ sisteminin dört kompleksi (ESCRT-0, -I, -II ve -III) ve ilişkili proteinlerle (VPS4, VTA1, ALIX) koordine edilmektedir. Bunlardan: ESCRT-0

ubikuitin işaretli proteinlerinin birikmesinde ve tanınmasında görevlidir. Bu ubikuitin işaretli proteinlerin endozom üzerindeki birikimi; vezikül oluşumuna yol açan membran daralmasını sağlamaktadır. ESCRT-1 ve ESCRT-2 ise membran tomurcuklanmasını sağlar ve ESCRT-3'de tomurcuklanan membranın ayrılmasını tetikler (Luzio et al., 2009).

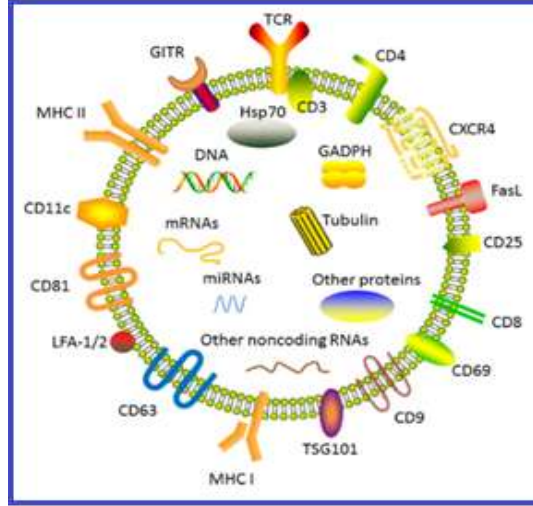
MVC'lerin plazma zarı ile füzyonu ve eksozom salınımı, hücre içi kalsiyum seviyesi, hücre içi ve dışı pH gradienti, hipoksi dahil olmak üzere; Rab GTPazlar (Rab 11, Rab27, Rab35), SNARE'ler gibi çeşitli mekanizmalar tarafından düzenlenmektedir. Yüksek kalsiyum seviyesi ve hipoksik koşullarda eksozom salınımının arttığı belirtilmektedir (Chaineau et al., 2009).

Eksozomlar doğal lipozom özelliği taşıdıkları, nanoboyutta oldukları ve membranlarında taşıdıkları protein ve lipid içeriklerinden dolayı kanda büyük ölçüde stabil kaldıkları için ilaçların kanser hücrelerine spesifik olarak iletilmesinde avantajlı olabilecekleri düşünülmektedir.

### **1.5.2. T Hücre Eksozomları**

Eksozomlarla ilgili çalışmaların yaygınlaşmasıyla birlikte, T hücrelerinden kökenlenen eksozomların da bağışıklık yanıtı aktive etme veya bastırma, iltihap tepkisini teşvik etme ve çeşitli hastalıklara katılma gibi işlevleri büyük ölçüde ortaya çıkarılmıştır. Çoğunlukla, bu T hücresi eksozomlarının işlevleri salgılandığı T hücre alt tipine benzer, ancak aynı zamanda hücrelerin durumuna bağlı olarak da çeşitlilik gösterebilirler.

T hücre eksozomların membranı, yukarıda bahsedilen görevlerde yer alan proteinlerle zenginleştirilmiş çift lipit tabakasından oluşur (Şekil 1.5.2.1). Bu küçük veziküller CD2, CD3 / TCR, CD4, CD8, CD11c, CD25, CD69, LFA-1, CXCR4, FASL, GITR vb. proteinleri ifade ederler (Lu et al., 2018).



**Şekil 1.5.2.1:** T hücre eksozomlarının içerikleri (Lu et al., 2018).

Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda T hücre eksozomlarının özellikle de USTH'lerden salgılanan eksozomların farklı görevlerinin olduğu ortaya konulmuştur.

İlk olarak, CD8<sup>+</sup> T hücrelerinin granzim, perforin ve diğer efektör molekülleri taşıyabilen ve bu sitolitik moleküllerin hedef hücrelere spesifik dağıtılmasında önemli bir rol oynayan salgı lizozomlarını salgıladığı doğrulanmıştır (Peters et al., 1991). Daha sonrasında da, Tumne ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada CD8<sup>+</sup> T hücrelerinden salgılanan eksozomların, *in vitro* olarak HIV-1'in CCR5-tropik (R5) ve CXCR4-tropik (X4) replikasyonunu baskıladığı kanıtlanmıştır (Tumne et al., 2009). Bu çalışmalar, HIV-1 transkripsiyonunun eksozom-aracılı baskılanmasında yer alan hücre içi sinyalleşme mekanizmasının bulunduğunu gösteriyor ki bu da, anti-viral hastalıklar için potansiyel tedavi yöntemi olabilir.

Ayrıca araştırmalar, USTH eksozomlarının tümör oluşumu veya tümör invazyonunun ilerlemesinde rol oynayabileceğini de göstermiştir. USTH eksozomlarının melanom hücrelerinde ERK ve NF-κB sinyal yollarını aktive ederek MMP9 ekspresyonunu artırdığını ve *in vitro* kanser hücresi invazyonunu teşvik ettiği gösterilmiştir. Öte yandan, farelerde yapılan çalışmada da Fas ligand içeren USTH eksozomlarının, MMP 9 ekspresyonunu artırarak akciğerlerde tümör invazyonunun ilerlemesinde rol aldığı bildirilmiştir (Cai et al., 2012). Dolayısıyla bu da, USTH eksozomlarının tümör ilerlemesinde potansiyel bir etken olduğunu düşündürmektedir.

Yakın zamanda yapılan bir çalışmada ise, USTH eksozomlarının kanser hücre mikroçevresinde metastazı destekleyebilecek mezenkimal kök hücrelerini (MKH) engellediği gösterilmiştir. Bu çalışmada sağlıklı fare splenosit hücre hattından elde edilen uyarılmış CD8<sup>+</sup> eksozomlarından salgılanan miR-298'lerin kültürde tümörojenik MKH'lerini azaltığı gözlemlenmiştir. Malign transformasyon esnasında, epitelyal karakterde olan tümör hücreleri, epitelyal- mezenkimal geçiş (EMT) ile kan damarlarına metastatik göç ve tümör kapsülü boyunca istilacı yayılmasını sağlayan mezenkimal benzeri özellikler kazanır. Mezenkimal tümör stromalarının CD8<sup>+</sup> T hücre eksozomları tarafından imhası, invaziv tümörlerin cAMP / PKA aracılı bir şekilde mezenkimal-epitelyal geçişini (MET) sağlayabilir (Seo, Shirakura, et al., 2018).

Dahası, farklı donörlerden alınan T hücrelerinin yüzey reseptörlerine karşı alıcı hücre tarafından immun yanıt oluşabilirken, T hücre eksozomları immunitate tarafından yabancı olarak algılanamayacak kadar küçüktürler ve antijenik özellik gösterebilecek yüzey reseptörleri bulunmamaktadır. Bu avantajlarından dolayı, T hücre eksozomlarının çeşitli kanser tiplerinde olası tedavi edici ve/veya metastaz önleyici ajan olarak kullanılabilirliği düşünülmektedir.

## **1.6. A549 Hücre Hattı ve Özellikleri**

İnsan akciğer adenokarsinom hücre hattı A549, Giard tarafından 1972 yılında 48 yaşındaki Kafkasyalı bir erkekten karsinomatöz dokunun eksplant kültürü yoluyla oluşturulmuş (Giard et al., 1973) ve Lieber tarafından ATCC hücre hattı bankasına (CCL-185TM) verilmiştir (Lieber et al., 1976). Bu hücreler, akciğer kanserinin incelenmesi ve buna karşı ilaç tedavilerinin geliştirilmesi için model olarak kullanılmaktadırlar. A549 hücreleri, hipotriploid insan alveolar bazal epitelyal hücreleri olarak karakterize edilir ve in vitroda tek tabaka şeklinde kültür flasklarına yapışarak büyürler. Bu hücreler keratin için pozitifdir, lesitin sentezleyebilmekte ve plazma membranında membran fosfolipitlerini korumak için önemli olan yüksek seviyelerde çoklu doymamış yağ asitleri içermektedir (Korrodi-Gregório et al., 2016). A549 hücreleri, alveolların yüzey gerilimini düşürmek için pulmoner sürfaktan salgılayan ve hasarlı tip I hücreleri yenilemek için farklılaşabilen tip II alveolar hücrelerin neoplastik dönüşümünden kökenlenmektedirler. Dolayısıyla, bu hücrelerin tipik özelliklerini sergilerler. Bunlardan en belirginini ise, erken ve geç pasajlarda elektron mikroskobu ile incelenen tüm A549 hücrelerinin, tip II alveolar epitelyal

hücrelerinde bulunanlara özgü çok lamelli sitoplazmik inklüzyon cisimciklerini içermeleridir (Lieber et al., 1976).



## 2. AMAÇ

Bu çalışmada, USTH eksozomlarının AK hücrelerinin çoğalması ve metastazı üzerine etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla epitelyal karakterde olan A549 AK hücreleri ve USTH eksozomları ile yapılan ortak kültürler sonrası A549 AK hücrelerinin metastatik özelliklerinde meydana gelen değişimler saptanmıştır.

USTH, MHC sınıf I moleküllerinin tümör antijen peptitleriyle doğrudan etkileşimi sonucu tümör hücrelerinin öldürülmesinde merkezi bir etkiye sahiptir. USTH'lerinin anti-tümör etkileri iki önemli etkene bağlıdır. İlki, USTH'lerin farklılaşması; ikincisi de USTH'lerinin tümör mikroçevresine taşınmasıyla tümör bölgesine sızmasıdır. Araştırmacılar tümör mikroçevresindeki yüksek seviyelerde bulunan USTH'lerini meme, kolorektal, glioblastoma ve servikal kanserlerdeki pozitif anti-tümör etkileri ile ilişkilendirmişlerdir (Maimela et al., 2019). Dolayısıyla USTH'lerinin tümör mikroçevresindeki düzeyini kontrol eden faktörlerin belirlenmesi, anti-tümör etkilerinde rol alan moleküllerin tespiti ve etki mekanizmalarının incelenmesi, yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilebilmesini sağlayacaktır.

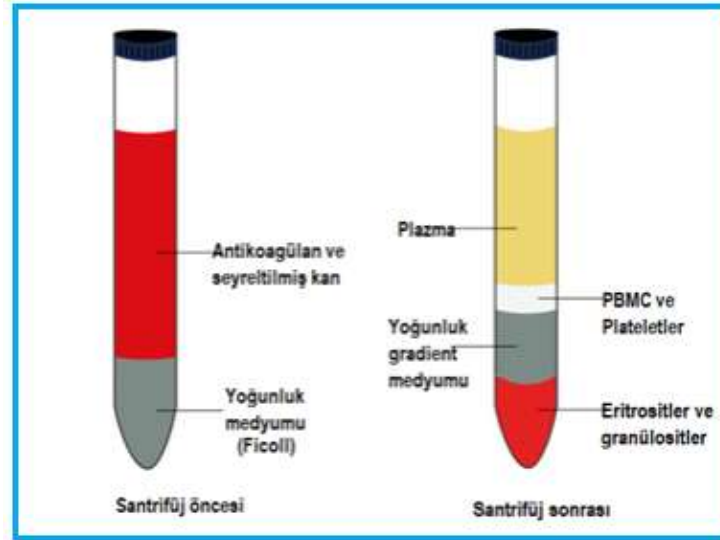


### 3. YÖNTEM

#### 3.1. İnsan Mononükleer Hücre Populasyonunun (PKMH) Hazırlanması

İnsan periferel kanının lenfoid hücre kaynağı olarak kullanımı Ficoll-Hypaque yoğunluk gradyanlı santrifüjleme ile kolaylaştırılmıştır. PKMH'nin saflaştırılmasının bu basit ve hızlı yöntemi, mononükleer hücreleri ve diğer kan materyalleri arasındaki yoğunluk farklılıklarından yararlanmaktadır. Mononükleer hücreler ve trombositler Ficoll-Hypaque tabakasının üzerinde toplanır, çünkü bunlar daha düşük bir yoğunluğa sahiptir. Eritrositler ve granülositler (nötrofiller ve eozinofiller) ise Ficoll-Hypaque'den daha yüksek bir yoğunluğa sahiptirler ve gradiyent medyumun alt tabakasında toplanırlar (Raulf-Heimsoth, 2008) (Şekil 3.1.1).

Kan alma işlemi KÖGEM flow sitometri laboratuvarında Helsinki Bildirgesine uygun olarak ve Kocaeli Üniversitesi Etik Kurul Onayı (Bkz. EK1) alınarak gerçekleştirildi. Gönüllü bağışçılardan alınan venöz kan 4 adet 9 ml'lik heparinli tüplerde toplandı ve PKMH eldesi için laminar flow kabine (Safe Fast Elite 2150, İtalya) getirildi. Kan oda sıcaklığına gelene kadar yaklaşık yarım saat kabinde bekletildi. Ardından 2 adet 50'lik falkona eşit miktarda kan aktarıldı ve 1:1 oranında PBS'le (Gibco) sulandırıldı. Sonrasında ise, oda sıcaklığındaki Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich, USA) solüsyonundan 4 ml 7 adet 15 ml'lik steril falkonlara eklenildi ve üzerine 10 ml dilüe kan pipetle yatay bir şekilde yavaş-yavaş damlatılarak konuldu. Sonrasında 20 dk 1200 rpm'de ara vermeden başlama ve bitiş hızı 1:1 olacak şekilde santrifüjlendi. Santrifüj sonrası oluşan bulutsu tabaka (PKMH) yeni 15'lik falkonlara alındı ve üzerine 7-8 ml RPMI besiyeri [ %88 RPMI 1640 (Gibco), %10 FBS (Gibco), %1 Penisilin-Streptomisin (Capricorn), %1 Glutamax-100x (Gibco)] eklenerek 5 dk 1600 rpm'de normal hızda santrifüj yapıldı. Süpernatant atıldı ve yıkama işlemi bir kez daha tekrarlandı. Sonrasında süpernatant atılarak hücre pelleti RPMI besiyeri ile homojenize edildi ve tek hücre süspansiyonu haline getirdi. Hücre süspansiyonundan alınan örnek, tripan mavisini ile 1:1 oranda karıştırılarak BIO-RAD TC20 (Bio-Rad Laboratories Inc., USA) cihazında hücre sayımı yapıldı. Ortalama 30 ml'e kandan  $20-30 \times 10^7$  PKMH elde edildi. PKMH'ler 15'lik falkon tüpte STH izolasyonu için kullanılacak malzemeler hazırlanana kadar 37 °C, %5 CO<sub>2</sub> koşullarında yaklaşık yarım saat inkübatörde bekletildi.



**Şekil 3.1.1:** Ficoll-Hypaque yoğunluk gradyanlı yöntemin şematik gösterimi (Kleiveland & Kleiveland, 2015).

### 3.2. Sitotoksik T Hücre İzolasyonu

PKMH'lerden STH izolasyonu S-pluriBead hücre ayrıştırma kiti (©pluriSelect Life Science, Almanya) kullanılarak yapıldı. PluriBead®, hücre karışımlarının ayrılması için manyetik olmayan monodispers mikropartiküller (boncuklar) kullanır. Yüzeyleri, hedef hücre yüzeyindeki spesifik yapılara karşı yönlendirilen monoklonal antikorlarla (mAb) kaplıdır. İnkübasyon sırasında, süspansiyondaki STH'ler boncuklara bağlanır ve daha sonra süspansiyondan özel filtre - pluriStrainer® (©pluriSelect Life Science, Almanya) yardımıyla ayrılır. Boncuklar hücrelerden daha büyüktür ve bu nedenle fagosite edilmezler (Gacar, G., Halbutoğulları, Z. S., Gültekin et al., 2018).

Elde ettiğimiz PKMH'lerden STH izolasyonu S-pluribead kiti kullanılarak üreticinin sunduğu talimatlara uyularak gerçekleştirildi (Şekil 3.2.1):

**1. Tamponların hazırlanması:** 10 x yıkama tamponu steril su ile dilue edildi. 1800 µl tampon D'ye (ayrıştırma tamponu) 200 µl'e tampon C eklenerek aktive edildi.

**2. İnkübasyon:** PKMH'ler kabine getirildi ve 5 milyon hücreye toplam 1 ml tampon olacak şekilde tampon B ve yıkama tamponu eklenildi. Ardından agregatlardan kurtulmak için hücre süspansiyonu S-pluriStrainer®'den geçildi. CD8<sup>+</sup> S-pluriBead® süspansiyonu (pluriSelect Life Science, Almanya) 5-10 saniye vortekslendi ve 1 milyon hücreye 40 µl

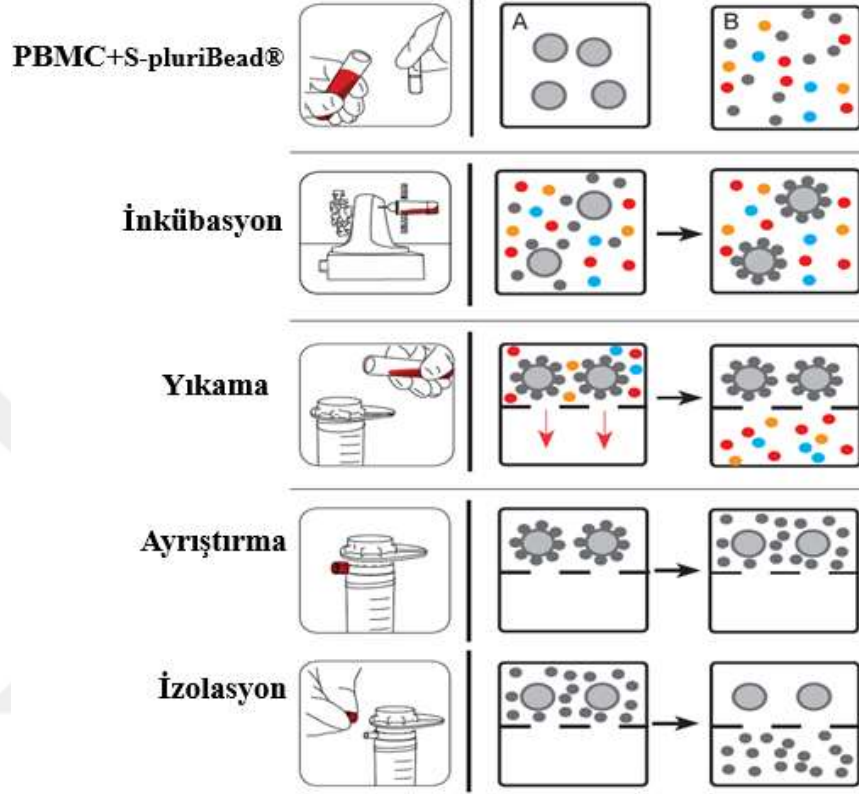
olacak şekilde hücreye eklendi. Sonrasında pluriPlix® (pluriSelect Life Science, Almanya) rotorü kullanılarak PKMH'ler pluribead antikoruyla 45 dakika boyunca 300 rpm'de inkübe edildi.

**3. Yıkama:** S-pluriStrainer 50'lik falkona takıldı ve süzgeci dengelemek ve ayırmayı desteklemek için 1 ml yıkama tamponu eklendi. İnkübasyon sonrasında hücre süspansiyonu pluristrainere tek seferde eklendi. Beadlere bağlanmamış hücreler süzgeçten falkon tüpüne geçmekte, bağlanmış STH'ler ise süzgeçte kalmaktadır. Ardından pluristrainer 2 ml'e yıkama tampon ile yıkandı. Toplamda 15-20 ml'e yıkama tampon ile filtrenin içini ve kenarlarını çok fazla baskı uygulamadan yıkama yapıldı.

**4. Ayırıştırma:** Yıkama aşamasından sonra filtrede kalan bağlı STH'leri beadlerden ayırştırmak için filtre yeni 50'lik falkon tüpe bağlı ve luer kilidi kapatılmış bağlayıcı yüzüğe yerleştirildi. Luer kilidin kapalı olması bağlayıcıyla filtre duvarı arasında basınç oluşturarak süspansiyonun filtreden geçmesini önlemektedir ve bu şekilde hedef hücrelerin daha iyi ayrışmasında etkilidir. Akabinde 1 ml yıkama tamponu filtre kenarı boyunca eklendi ve filtre dairesel bir şekilde hafifçe hareket ettirilerek süspansiyon homojenize edildi. Sonrasında hücreler boncuklara bağlanmış mı diye 10 µl örnek ışık mikroskopu altında bakıldı. Hedef hücrelerin boncuklara bağlandığından emin olduktan sonra 1 ml aktive tampon D filtre kenarı boyunca eklendi ve 10 dakika boyunca oda sıcaklığında her 2 dakikadan dairesel bir şekilde filtreyi hareketlendirerek inkübe edildi.

İnkübasyonu takiben 1 ml yıkama tamponu eklendi ve 10 kez pipetaj (hava kabarcığı oluşturmadan ve filtreye dokundurmadan) yapılarak hücreler boncuklardan ayrıştırıldı. Ardından hücrelerin ayrıştığından emin olmak için 10 µl örnek ışık mikroskopu altında incelendi (eğer hücreler ayrışmamışsa 5 dakika daha inkübe edildi). Luer kilidi açıldı ve ayrışmış hücreler 50'lik falkonun içine aktı, boncuklar ise filtrede kaldı. Filtre 10 kez 1 ml yıkama tampon ile yıkandı. Filtre ve bağlayıcı yüzük çıkarıldıktan sonra 50'lik falkondaki hücre süspansiyonu yeni 15'lik falkona alındı ve 10 dakika 300 g'de santrifüj yapıldı (büyük tüpte santrifüj yapılması hücre kaybına neden olmaktadır). Santrifüj sonrası supernatant dikkatli bir şekilde atıldı (hızlı atım hücre kaybına neden olmaktadır) ve hücre peleti 1 ml RPMI besiyeri ile iyice homojenize edildi. Ardından 2 ml besiyeri daha eklenerek hücre sayımı için 20 µl örnek alındı ve 20 µl Tripan mavisi ile karıştırıldı. Boyayı içine almamış ve şişmemiş hücreler canlı olarak nitelendirilerek Thoma lamında 40x'lik büyütme altında

sayıldı. Yaklaşık 10 milyon PKMH'den 1 milyon STH elde edildi. İzole edilen STH'ler homojenize edilerek T-75 hücre kültür kabına (SPL Biosciences, Kore) 10 ml RPMI besiyeri ilave edilerek ekildi ve 37 °C, %5 CO<sub>2</sub> koşullarında uyarma için gerekli hazırlıklar yapılanaya kadar bekletildi (yaklaşık 15 dakika).



**Şekil 3.2.1:** STH izolasyon aşamaları. A: S-pluribead; B: PKMH (S-PluriBead® Mini Reagent Kit - Pluriselect.Com, n.d.).

### 3.2.1. STH'lerin Akım Sitometri Analizi ile Tayini

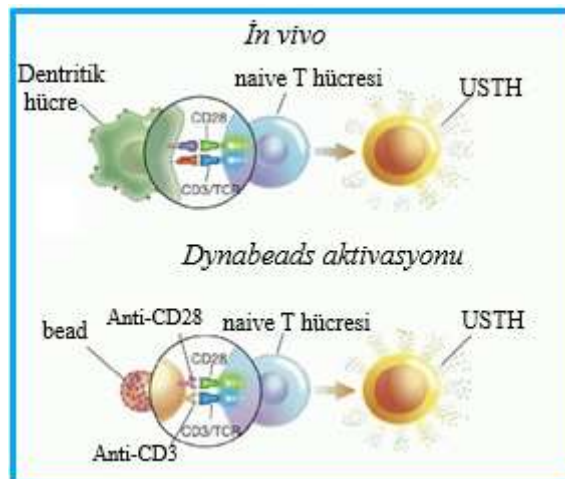
Süspansiyon haline getirilmiş çok miktardaki hücrenin antijenik yapılarının mAB kullanılarak çok yüksek hızda tek tek sayılarak tanımlanması ve bu yöntemle karışık bir popülasyonda belli bir hücre grubunun belirlenmesi ve ayrılmasına dayanan tekniktir. Hücreler FITC (Fluoresan izotiyosiyonat), APC (Allofikosiyanın) ve PE (R-Fikoeritrin) gibi florokromlarla işaretli antikorlar ile direkt/indirekt olarak inkübe edilir. Floresan ışığa yoğunluğuna bağlı olarak, süspansiyon halindeki hücrelerin aranan belirtecin pozitifliğine ve büyüklüğüne göre tek hücre düzeyinde kantitatif ölçüm yapılır. Her bir popülasyonu birbirinden ayırmak için gate (kapılama sistemi) kullanılır ve bu sistemde yapılan işaretlemeye doğrusal şekil kullanılır (Uslu, 2019).

İzole edilen STH'lerden  $2 \times 10^5$  hücre, polikarbon akım sitometri tüplerine (12×75mm polikarbon) aktarıldı. Hücreler yıkama tamponu ile yıkandıktan sonra, STH'lerin ve genel lenfositlerin yüzey belirteçlerine özel sırasıyla CD8-FITC ve CD45-APC insan monoklonal antikoları ile oda ısısında (karanlıkta) 45 dakika süreyle inkübe edildi. Süre sonunda tekrar yıkama tamponu ilave edildi ve 300g'de 5 dakika süreyle santrifüj edildi. Supernatan atılarak yıkama işlemi tamamlanan hücreler, 350 µl yıkama tamponu ile tekrar homojenize edilerek analize hazır hale getirildi. FACS Calibur (BD Biosciences) akım sitometri cihazında okutuldu ve Cell Quest programında (BD Biosciences) analiz işlemleri gerçekleştirildi.

### 3.3. STH Uyarılması ve Kültürü

Tümör reaktif STH'lerin üretilmesinin ve çoğalmasının başarısı, T hücrelerinin CD3/T hücre reseptörü (THR) kompleksi ve CD28 gibi kostimulatör moleküller aracılığıyla yeterli derecede uyarılmasına bağlıdır. CD3/TCR kompleksine özgü antikolar başlangıç aktivasyon sinyali sağlarken, proliferasyon, CD28 molekülü aracılığıyla sağlanan kostimulatör bir sinyale bağlıdır. Bu sinyaller *in vivo* koşullarında genellikle antijen sunan hücreler (APC'ler) tarafından sağlanır ve aktivasyon düzeyinin yanı sıra antijene özgü T hücrelerinin proliferatif ve fonksiyonel özelliklerini kontrol eder (Teschner et al., 2011; Trickett & Kwan, 2003).

Son 20 sene içerisinde T hücrelerinin *in vitro* da uyarılmasına ve çoğaltılmasına yönelik çalışmalar hız kazanmıştır. Geleneksel uyarıcı olarak kullanılan fitohemaglutinin (PHA) ve konkanavalin A (Con A) gibi mitojenik lektinler yerine son zamanlarda APC taklidi yapan anti-CD3 ve anti-CD28 kaplı yapay magnetik boncuklar yaygın olarak kullanılmaya başlamıştır (Hedfors & Brinchmann, 2003), (Şekil 3.3.1).



**Şekil 3.3.1:** STH uyarılması. USTH: Uyarılmış sitotoksik T hücresi (Human & Cd, 2011).

Çalışmamızda izole edilen STH'ler Dynabeads® Human T-Activator CD3/CD28 (Life Technologies AS, Norveç) kullanılarak, üreticinin sunduğu talimatlara uyularak gerçekleştirilmiştir. Kısaca; 30 saniye boyunca Dynabeads® süspansiyonu vortekslendi ve kabinde 1 milyon hücreye 10 µl olacak şekilde (hücre bead oranı 2:1) yuvarlak tabanlı polistiren tüpe (Falcon®, STEMCELL Technologies Inc., Meksiko) aktarıldı. Ardından 1 ml sulandırma tamponu (PBS, 0,1% BSA ve 2 mM ETDA) eklendi ve 5 saniye boyunca vortekslendi. 2 dakika boyunca tüp magnette (EasySep™, STEMCELL Technologies Inc.) bekletildi ve sonrasında tüp magnetten süpernatant atıldı. Magnetten tüp alındı ve 2 ml RPMI besiyeri eklenerek resüspanse edildi. Daha sonra T-75 kültür kabına ektiğimiz STH'ler kabine getirildi ve resüspanse Dynabeads® süspansiyonu üzerine eklendi. Ardından besiyerine 20 µg/ml miktarda interleukin 2 (İL-2) (MedChemExpress, ABD) eklenerek 37 °C, %5 CO<sub>2</sub> koşullarında kültüre edildi. Hücreler günlük olarak incelendi ve 3'er günde bir besiyerine 20 µg/ml İL-2 eklenerek %80 konfluente ulaşana kadar yaklaşık 1 hafta çoğaltıldı.

**Hücrelerin Pasajlanması:** CD3/CD28 Dynabeads® aktivatör magnetik özellikte olduğu için santrifüjleme aşamasında hücre kaybına yol açmaktadır. Bu nedenle öncelikle hücrelerin beadlerden ayrılması gerekmektedir.

Konfluente ulaşmış hücreler kabine getirildi ve 15'lik falkon tüpe aktarıldı. Sonrasında hücre süspansiyonu iyice resüspanse edilerek kümeleşmiş olan hücrelerin beadlerden ayrılması sağlandı. Ardından tüpler magnette 3 dakika bekletilip magnetin içindeyken hücre süspansiyonu yeni 15'lik tüpe aktarıldı. Beadlerden ayrıştırılmış hücreler 1200 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi. Süpernatant atıldı ve STH izolasyonu kısmında anlatıldığı gibi Thoma lamında hücre sayımı yapıldı. Hücre sayısına göre USTH'ler RPMI besiyeriyle yeni kültür kaplarına ekildi ve yeni Dynabeads® aktivatör ardından da 20 µg/ml İL-2 eklenerek 37 °C, %5 CO<sub>2</sub> koşullarında inkübatöre konuldu.

**Hücrelerin Dondurulması:** Saklanacak olan hücreler ise hücre sayımı sonrasında tekrar santrifüj edildi. Hücre pelleti basal besiyeri (sadece RPMI 1640) ile istenilen hacimde homojenize edilip kriyoviallere aktarıldı. DMSO (Dimetil sülfoksit) son aşamada yavaşça ilave edildi ve hücreler, içeriği tamamlanan dondurma solusyonu (%5 DMSO ve %95 FBS) içerisinde, -152 °C soğutucuda (Sanyo MDF-1156, Japonya) dondurularak muhafaza edildi.

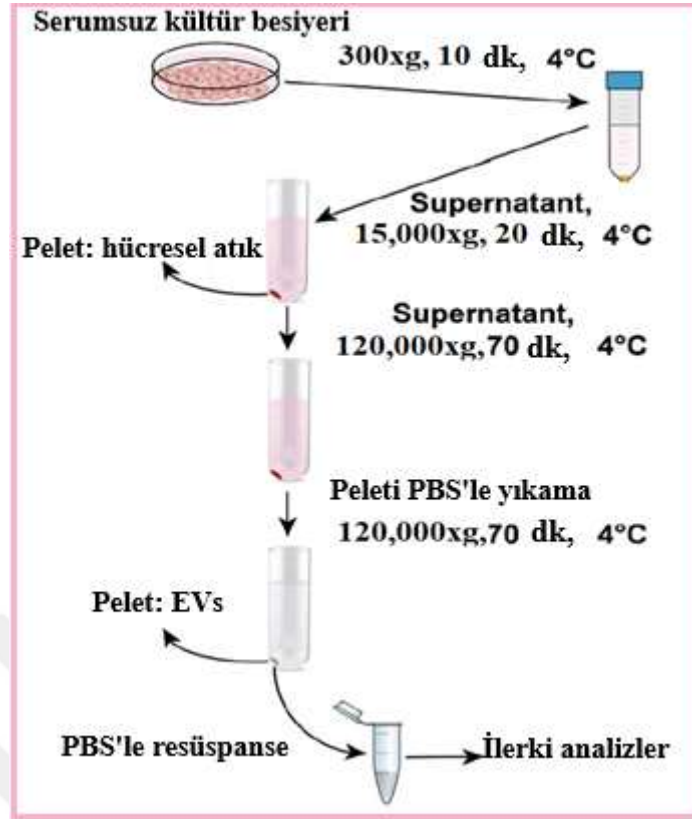
### 3.3.1. USTH'lerin Karakterizasyonu

USTH'lerin karakterizasyonu hücreler uyarıldıktan sonra 5.gününde akım sitometri yöntemi kullanılarak yapıldı. Literatür taramaları sonucunda en çok USTH yüzey belirteci olarak kullanılan CD8, CD45, CD25, CD28, HLA-DR, CD69 ve CD62L değerlerine bakıldı (Al-Shanti & Aldahoudi, 2007). Akım sitometri yöntemi STH'lerin karakterizasyonunda (Bkz. 3.2.1) belirtilen protokole uyularak gerçekleştirildi.

### 3.4. USTH'lerden Eksozom İzolasyonu

USTH'lerden eksozom izolasyonu, yüksek verim ve saflıkta eksozom izolasyonu sağlayan diferansiye ultrasantrifüleme yöntemi (Şekil 3.4.1) kullanılarak daha önce açıklanan protokole uyularak gerçekleştirildi (Uslu, 2019).

Kısaca; pasaj 2'den sonra %70 konfluente ulaşmış USTH'ler FBS içermeyen yeni besiyerlerinde (%99 RPMI 1640, %1 Pen/Strep ve %1 glutamaks) 24 saat kültüre edildi. Süre sonunda USTH kültür besiyerleri falkon tüplerde toplandı ve hücreler bir önceki kısımda anlatıldığı gibi Dynabeads® beadlerden uzaklaştırılarak saflaştırma işlemine başlandı. Beadlerden uzaklaştırıldıktan sonra toplanan USTH kültür besiyerleri 300 g'de 10 dakika süreyle santrifüj edildi. Ardından supernatant yeni tüplere aktarılıp ölü hücreler uzaklaştırıldı. Bir sonraki aşamaya geçmeden önce eksozom dışındaki proteinlerden de kurtulmak için 1 tablet proteaz inhibitör kokteyli (PIK) (Roche, Almanya) PBS'le çözülerek 50'lik falkon tüpteki supernatanta eklendi. PIK'nın eksozomların yüzey proteinlerini lizise ettiğini ancak bütünlüğünü ve fonksiyonunu etkilemediği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Cvjetkovic et al., 2016). Sonrasında 15.000 g'de 20 dakika süreyle santrifüj edildi ve supernatant yeni tüplere aktarılarak hücresel atıklar uzaklaştırıldı. Supernatant 0,22 µm por boyutlu filtreden (Sartorius AG, Almanya) geçirilip yeni ultrasantrifüj tüpüne (Himac, Japonya) aktarılarak 220 nm'den büyük mikroveziküller uzaklaştırıldı. Ardından CS150FNX (Hitachi Himac, Japonya) ultrasantrifüj cihazı ve S50A model rotor kullanılarak 4°C'de, 120.000 g'de ve 70 dakika süreyle ultrasantrifüj işlemi yapıldı. Supernatant uzaklaştırıldı ve pellet haldeki eksozom 1 ml PBS'le ile yıkanıp tekrardan bir kez daha ultrasantrifüj işlemi yapıldı. Takiben supernatant atıldı ve pellet haldeki eksozom az miktarda (~100-600 µl) PBS ile homojenize edildi. Eksozom 1 ml PBS'le tamamlanarak düşük protein bağlayan tüplere (Thermo Scientific, ABD) aktarıldı ve -80°C soğutucuda (Sanyo MDF-U5386S, Japonya) muhafaza edildi.



Şekil 3.4.1: Diferansiyel ultrasantrifüjleme yöntemi aşamaları (Salem et al., 2020)

### 3.5. USTH Ekzozomlarının Tayini

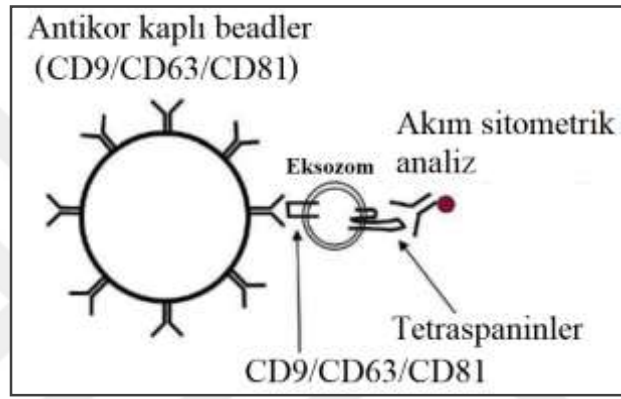
#### 3.5.1. Akım Sitometri Analizi

İzole edilen USTH ekzozomları, ekzozom yüzey belirteci olarak en çok kullanılan CD9, CD63 ve CD81 antikorlarıyla inkübe edilip daha önce açıklanan protokole uyularak akım sitometri cihazıyla analiz edilmiştir (Uslu, 2019). Kısaca;

Test tamponu için %0.1 BSA (Sığır serum albumin) içeren PBS hazırlandı ve 0.22 µm filtreden geçirildi. Her ekzozom örneği için; CD 9, CD 63, CD 81 ve izotip kontrol olmak üzere 4 tüp hazırlandı. CD 9, CD 63 ve CD 81 'Dynabeads' (manyetik boncuklar) tamponlarından (Invitrogen, Litvanya) 20 µl, hazırlanmış tüplere konuldu. Test tamponu ve manyetik ayırıcı (StemCell Technologies) aracılığıyla manyetik boncuklara yıkama işlemi yapıldı. Her bir belirteç için 10 µl ekzozom örneği tüplere dağıtıldı. Üzerine 90 µl test tamponu ilave edildi ve orbital çalkalayıcıda (Biosan) +4°C'de gece boyu inkübe edildi ve bu süreçte ekzozomlar ile antikorlarla kaplı olan manyetik boncukların kompleks oluşturması sağlandı (Şekil 3.5.1.1). Süre sonunda, tüplere 1'er ml test tamponu ilave edilip vortekslendi. Her tüp sırayla



manyetik ayırıcıya yerleştirildi ve 2 dakika süreyle eksozomların manyetik boncuklar ile tüp yüzeyine tutunması sağlandı. Test tamponu uzaklaştırılarak, yıkama işlemi tamamlanan eksozom+manyetik boncuk kompleksleri test tamponuyla yeniden homojenize edildi. Uygun miktarlarda CD9, CD81, CD63 ve IgG1 antikorları (BD Biosciences) ilave edildi ve orbital çalkalayıcı üzerinde, oda ısısında, 45 dakika süreyle inkübe edildi. Antikorlar ile boyanan eksozom+manyetik boncuk komplekslerine; test tamponu ve manyetik ayırıcı aracılığıyla bir kez yıkama işlemi yapıldı. Test tamponu ile yeniden homojenize edilen eksozomlar; FACS Calibur (BD Biosciences) cihazında okutuldu, Cell Quest programında (BD Biosciences) analiz işlemleri gerçekleştirildi.



**Şekil 3.5.1.1:** İmmünofenotipleme ile eksozom karakterizasyonunun çalışma prensibi (Uslu, 2019).

### 3.5.2. Mikro-BCA ile Miktar Tayini

Bu yöntemde önce  $Cu^{+2}$  iyonları, alkali ortamdaki proteinler tarafından  $Cu^{+1}$  iyonlarına indirgenir (Biüret reaksiyonu). Daha sonra,  $Cu^{+1}$  iyonlarının bikinkoninik asit (BCA) içeren, çok duyarlı ve seçici bir belirteçle oluşturduğu kompleksinin protein miktarıyla orantılı olarak, yeşilden mora dönüşen renk değişiminin kolorimetrik olarak saptanmasına dayanmaktadır (Arda & Ertan, 2017).

USTH besiyerlerinden elde edilen eksozomların miktar tayini, ticari 'BOSTER micro BCA Protein Assay Kit' (BOSTER Biological Technology, CA) ile, üreticinin sunduğu talimatlara uyularak gerçekleştirildi. Kısaca; 96-kuyucuklu plakaya; standart dilüsyonlar ve örnekler yüklendi. Üzerine (1:1) oranda 'Working' solüsyon ilave edilip, 37°C ayarlı çalkalamalı inkübatörde (Finepcr-combi-SV120, Kore) 2 saat süreyle inkübe edildi. Eksozom örnekleri, mikropłaka okuyucuda (Versamax, ABD) 562 nm dalga boyunda okutulurken kromojenik

reaksiyon ölçümü yapıldı. Örneklerin protein konsantrasyonları; ölçülen absorbans değerleri, standart eğrisi ile karşılaştırılarak değerlendirildi.

### 3.6. A 549 Hücre Kültürü

Deneylerde kullandığımız A549 insan AK hücre hattı Kocaeli Üniversitesi Kök Hücre ve Gen Tedavileri Araştırma ve Uygulama Merkezi (KÖGEM) hücre koleksiyonundan temin edilmiştir.

**Hücrelerin stoktan çıkartılması:** Kriyovialerde bulunan donmuş haldeki stok hücreleri -156° C'den alındı ve hızlı bir şekilde sıcak su banyosunda çözüldü. Çözülen hücre süspansiyonu 15 ml'lik falkon tüpe aktarılıp üzerine 10 ml RPMI besiyeri eklendi ve 5 dk 1600 rpm'de santrifüj yapıldı. Süpernatant atılarak yıkama işlemi bir kez daha yapıldı. Yıkama işlemini takiben süpernatant atıldı ve hücre pelleti üzerine 1ml besiyeri ilave edilerek hücreler homojenize edildi. Daha sonra tüp üzerine 2 ml besiyeri ilave edildi ve hücre süspansiyonundan alınan örnek, tripan mavisi ile 1:1 oranda karıştırılarak Thoma lamında sayım yapıldı. Ardından A549 hücreleri T75 hücre kültür kaplarına 15 ml RPMI besiyeriyle ekildi ve 37° C'de, %5 CO<sub>2</sub> içeren ortamda inkübe edildi. Hücreler %80 konfluente ulaşana kadar çoğaltıldı.

**Hücrelerin pasajlanması:** Hücreler büyütüldükleri hücre kültürü kabının yüzeyini %80 oranında kapladığında pasajlama işlemi gerçekleştirildi. Öncelikle hücre kültürü kabı içindeki besiyeri atıldı ve 7 ml Ca<sup>+2</sup> Mg<sup>+2</sup> içermeyen PBS'le hücre artıklarının uzaklaştırılması ve hücrelerin serumdan arındırılması için yıkama yapıldı. Ardından PBS ortamdan uzaklaştırıldı ve 7 ml %0,25 Tripsin-EDTA (Gibco) solüsyonu eklenip 37 °C'de, %5 CO<sub>2</sub>'li ortamda 5 dk inkübe edildi. Böylelikle kabın yüzeyine yapışmış halde bulunan hücrelerin yüzeyden ayrılması sağlandı. Mikroskopta hücrelerin yüzeyden ayrıldığı kontrol edildikten sonra 7 ml % 10 FBS içeren DMEM/F-12 ile tripsin aktivitesi durduruldu ve hücre süspansiyonu falkon tüpe aktarıldı. 1600 rpm'de 5 dk santrifüj edilip, süpernatantın atılmasıyla tripsin uzaklaştırıldı. Hücre pelleti RPMI besiyeri ile homojenize edildi ve hücre süspansiyonundan alınan örnek tripan mavisi ile 1:1 oranda karıştırılarak Thoma lamında hücre sayımı yapıldı. A549 hücreler total hücre sayısına göre, RPMI besiyeri ile yeni kültür kaplarına ekilip 37 °C'de, %5 CO<sub>2</sub>'li ortamda kültüre edildi. Bu şekilde hücreler istenilen sayıya ulaşmaya kadar çoğalmaları sağlandı.

**Hücrelerin Dondurulması:** Saklanacak olan hücreler ise hücre sayımı sonrasında tekrar santrifüj edildi. Hücre peleti basal besiyeri (sadece RPMI 1640) ile istenilen hacimde homojenize edilip kriyoviallere aktarıldı. DMSO (Dimetil sülfoksit) son aşamada yavaşça ilave edildi ve hücreler, içeriği tamamlanan dondurma solusyonu (%5 DMSO , %35 FBS, %60 basal besiyeri) içerisinde, -152 °C soğutucuda (Sanyo MDF-1156, Japonya) dondurularak muhafaza edildi.

### **3.7. A 549 Hücrelerinin USTH ve Eksozomlarla Birlikte Ko-Kültürü**

Pasaj 3'den sonra %80 konflüente ulaşan A549 hücreleri 12 kuyucuklu plakalara  $2 \times 10^4$  hücre/kuyucuk olacak şekilde ekildi. Hücreler 24 saat boyunca RPMI besiyerinde 37° C'de, %5 CO<sub>2</sub>'li ortamda kültüre edildi. Sonrasında ilk satırdaki kuyucuklar kontrol grubu (sadece A549 hücreleri) olarak belirlendi. 2.satırdaki kuyucukların her birine  $5 \times 10^4$  USTH'ler ve 3.satırdaki kuyucuklara da günlük 50 µg eksozom/ml olacak şekilde USTH'lerden elde edilen eksozomlar direkt olarak eklendi. Bu şekilde 3 adet 12 kuyucuklu plakalara ekim yapıldı: 1. WST-1 analizi 2. Gen ekspresyonu analizi- kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) ve 3. İmmünohistokimyasal (IHC) boyamalar için kullanıldı. IHC için hücreleri ekmeden önce kuyucuklara boyama amacıyla cam lameller konulmuştur. Hücreler 2 gün boyunca kültüre edilip sonraki analizlere geçilmiştir.

### **3.8. WST-1 Canlılık ve Proliferasyon Analizi**

WST-1, canlı hücrelerdeki dehidrojenaz aktivitesiyle orantılı olarak oluşan ortamdaki koyu sarı renk değişiminin belirli nanometre dalga boylarında ölçümüne dayanan kalorimetrik bir testtir (Kara et al., 2019). Bu yöntemle, Çizim 3.6'da tanımlanan deney gruplarının hücre canlılık ve proliferasyon düzeyleri belirlendi. Ortak kültür sonrasında WST-1 için hazırlanan plakanın hücre kültür besiyerleri, %10 oranda WST-1 (Roche Diagnostics, Almanya) reaktifi içeren besiyeri ile değiştirildi ve 37 °C, %5 CO<sub>2</sub> koşullarında 2 saat süreyle inkübe edildi. Süre sonunda, 12-kuyucuklu plakanın her kuyucuğundan 200 µl besiyeri örneği çekilip dördümlü tekrarlar halinde 96 kuyucuklu plakalara yüklendi. Örneklerin absorbans değerleri, mikropilaka okuyucuda (Versamax, ABD) 450 nm dalga boyunda ölçülerek Microsoft Excel'de grafiksel olarak değerlendirilmiştir.

### **3.9. Gen Ekspresyonu Analizi**

Kanser hücrelerinde invazyon, migrasyon ve metastaz gibi birçok hücrenel süreç gen ekspresyonunun değişmesiyle gerçekleştiğinden, özel genlerin transkripsiyon düzeylerinin nicel olarak ortaya konulabilmesi kanser tedavisine yönelik yapılan çalışmalarda uygulanan ajanların (tedavilerin) ne kadar etkili olduğuna dair önemli bilgiler vermektedir. Ayrıca, klinikte gen ekspresyon seviyelerinin saptanması kanser teşhisi, prognozu ve tedavi tahmini için kullanılabilir. Gen ekspresyon analizi için çeşitli yöntemler geliştirilmiştir.

Çalışmamızda gen ifadesi analizleri için qRT-PCR yöntemi kullanılmıştır. Bu amaçla, ortak kültür sonrası A549 hücrelerinden öncelikle total RNA izolasyonu ve takiben cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir.

### **3.9.1. Total RNA İzolasyonu**

Ön hazırlık: Ortak kültür sonrasında gen ekspresyon analizleri için hazırlanan plakadaki hücreler tripsin enzimiyle kaldırıldı ve her bir deney grubu için  $\sim 4 \times 10^4$  hücre ependorfa alındı. Hücre süspansiyonları 1600 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek supernatant atıldı ve 1000  $\mu$ l PBS ile homojenize edildi. Hücre süspansiyonu tekrar 1600 rpm'de 5 dk santrifüj edildi ve supernatant atıldı.

RNA izolasyon işlemi ticari 'PureLink RNA Mini Kit'(Life Technologies, CA) ile, üreticinin sunduğu protokole uygun olarak gerçekleştirildi. Kısaca; pelletler 200  $\mu$ l PBS ile homojenize edildi ve üzerine 600  $\mu$ l lizis tamponu ilave edilip vorteksle karıştırıldı. 350  $\mu$ l etanol ilave edilerek karıştırıldı ve filtreli tüplere aktarıldı. Daha sonra, 12000 rpm'de 1 dakika süreyle santrifüj edilip filtreden süzülen alt sıvı döküldü. Takiben filtreler yeni tüplere aktarıldı ve 3 kez yıkama işlemi yapıldı. Son aşamada; filtreler ependorf tüplere aktarıldı ve üzerine 50  $\mu$ l su eklendi. 1 dakika bekledikten sonra 12000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilerek RNA saf bir şekilde ependorf tüpe toplandı. Elde edilen RNA'ların konsantrasyonları picodrop spektrofotometre ile ölçüldü ve artan total RNA örnekleri  $-80^\circ\text{C}$  soğutucuda (Sanyo MDF-U5386S, Japonya) muhafaza edildi.

### **3.9.2. cDNA Sentezi**

cDNA sentezi ticari kit (RevertAid First Standard cDNA Synthesis Kit, Thermo Scientific, Litvanya) kullanılarak üreticinin sunduğu protokole uyularak gerçekleştirildi. Kısaca; total RNA örnekleri 1'er  $\mu$ g olacak şekilde PCR tüplerine aktarıldı ve toplam hacim

12 µl olacak şekilde 1 µl Oligo dT primer ve uygun saflıkta su eklendi. 65°C'de 10 dakika süreyle PCR cihazında (TaKaRa Biotechnology, Japonya) inkübe edildi. Bu süreçte primerlerin ısı ile denatüre olan RNA örneklerine bağlanması sağlandı. Daha sonra örnekler buz üzerine alındı ve 4 µl reaksiyon tamponu, 1 µl ters transkriptaz enzimi, 2 µl dNTP karışımı ve 1 µl Rnase inhibitörü eklendi. Tekrar PCR cihazına alınan örnekler, 55°C'de 30 dakika uzama reaksiyonu ve hemen ardından 85°C'de 5 dakika süreyle enzimin inaktivasyonu sağlandı. Sentezlenen cDNA örnekleri RT-PCR kurulancaya kadar -20 °C'de muhafaza edildi.

### **3.9.3. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR)**

qRT-PCR floresan boyalar kullanılarak gerçek zamanlı olarak DNA'nın belirlenmesi ve miktarının gösterilmesi tekniğidir. Oluşan ürünler yüksek sıcaklığa ve devamında erimeye bırakılarak uzunlukları ve nükleotid içeriklerine bağlı olarak daha ayrıntılı bir şekilde tanımlanabilmektedirler. Ayrıca ürünlerin analizi reaksiyon sırasında yapıldığından agaroz jel elektroforezi uygulamasına gerek kalmamaktadır. Bu da çok örnekli çalışmalarda zaman tasarrufu sağladığı gibi kontaminasyon tehlikesini de azaltmaktadır. Bu özellikleriyle qRT-PCR gen anlatımı analizi araştırmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Arda & Ertan, 2017).

qRT-PCR yöntemiyle deney gruplarında; CDH1, MMP2, MMP9, TWIST, SNAIL genlerinin transkripsiyon düzeyinde ekspresyonu incelendi. Her bir örnek için 10 µl SYBR boyası içeren master karışımı (RealQ Plus Master Mix Green, Ampliqon), 1 µl Primer çifti karışımı, 0,5 µl cDNA ve 8,5 µl distile su olacak şekilde 20 µl reaksiyon karışımı hazırlandı. Primerler ve hazırlanmış olan cDNA karışımı 96 kuyucuklu PCR plakalarına yüklendi. Kurulan reaksiyonlar gerçek zamanlı PCR (LightCycler-II 480, Roche, Mannheim, Almanya) cihazında 480 nm dalga boyunda okutularak ilgili genlerin çoğalmaları takip edildi. PCR koşulları; 95°C'de 10 dakika inkübasyon, takibinde 45 döngü 95°C'de 10 saniye, 60°C'de 30 saniye ve 72°C'de 60 saniye şeklinde uygulanmıştır. Daha sonra çıkan Cp sonuçları doğrultusunda referans gene (HPRT1) oranlanarak göreceli olarak analizleri yapılmıştır. Kullanılan primerlerin baz dizimleri Tablo 3.9.3.1'de gösterilmiştir.

**Tablo 3.9.3.1:** Gen ekspresyon analizi yapılan genler ve primerlerinin baz dizilimleri.

Gen	Açık İsim	Primer Baz Dizilimi (5'→3')
SNAI1	Snail Ailesi Transkripsiyonel Baskılayıcı 1	L- tacagcgagctgcaggact
		R- atctccggaggtgggatg
TWIST	Twist Ailesi BHLH Transkripsiyon Faktörü 1	L- agctacgccttctcggctct
		R- ccttctctggaacaatgacatc
CDH1	E-Kaderin 1	L- aggggtctgtcatggaaggt
		R- gcggcattgtaggtgttca
MMP-2	Matriks Metalloproteinaz 2	L- ccccaaacggacaaagag
		R-cttcagcacaacaggttgc
MMP-9	Matriks Metalloproteinaz 9	L- gaaccaatctcaccgacagg
		R- gccaccgagtgtaaccata

### 3.10. İmmunohistokimyasal Boyama

İmmünositokimyasal boyama; hücrede hedeflenen molekül ile bu moleküle özgü, floresan ile işaretlenmiş antikorun bağlanması temeline dayanan, hedef molekülün örnek üzerindeki dağılımını görsel hale getiren bir boyama yöntemidir.

Deneyimizde ortak kültür sonrası A549 hücrelerindeki MMP-2 ve MMP-9 fenotiplerini ikili (*Double*) immünfloresan boyama yaparak inceledik. Bunun için cam lameller üzerine ekilmiş hücrelerin kültür besiyerleri ko-kültür sonrasında çekilip soğuk PBS ile 3 kez yıkama işlemi yapıldı. Hücreler %4 paraformaldehit solusyonunda oda sıcaklığında 15 dakika süreyle fikse edildi. Örnekler PBS ile yıkandıktan sonra, antikorun hücrelerin içine erişiminde gerekli olan geçirgenliği sağlamak için Triton™ X-100 (Abcam, ABD) solusyonu ile 10 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Süre sonunda triton solusyonu bir pipet aracılığıyla, lamel kenarlarından nazikçe geri çekildi. Uygun dilusyon oranlarında MMP-2 (Thermo Scientific) ve MMP-9 (Abcam) primer antikorları eklenip, +4°C'de gece boyu inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda lameller PBS ile 3 kez yıkandıktan sonra uygun floresan işaretli sekonder antikorlarla oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. Örneklerin kuruması beklenip, DAPI ile kapatıldı. Boyama yapılan örnekler, konfokal mikroskop (LEICA SP8 LIGHTNING, Almanya) altında incelendi.

### 3.11. İstatiksel Analiz

Sonuçların istatistiksel analizlerinde SPSS10.0 (SPSS, Chicago, ABD) programı kullanılmıştır. Veriler eşli t-testi ve çoklu analizler için Newman–Keuls metodu ile test edilmiştir. Her deney grubu en az üç tekrardan oluşmaktadır. Deney ve kontrol grupları arasındaki fark  $p<0.05$  olduğunda anlamlı ve  $p<0.01$  olduğunda ileri derece anlamlı olarak ifade edilmiştir.

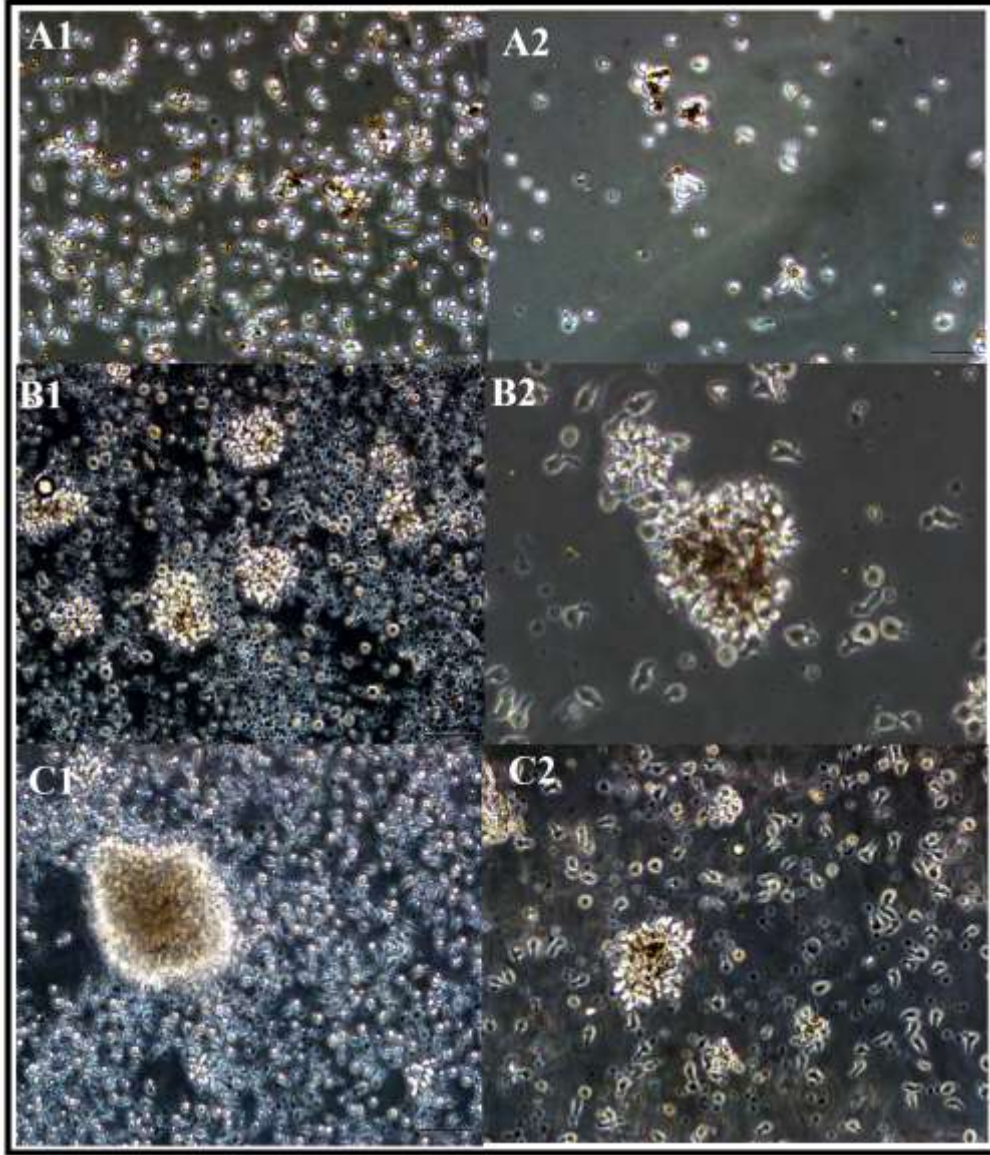


## 4. BULGULAR

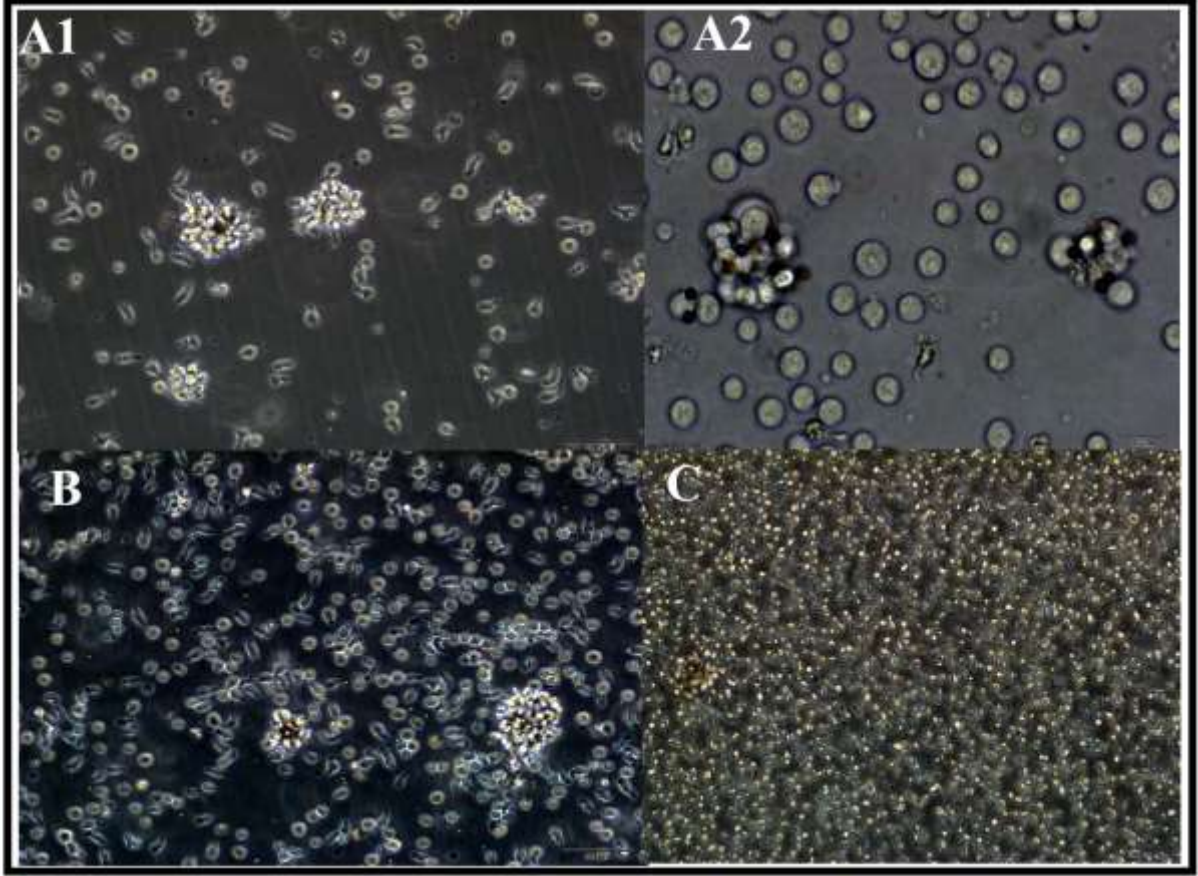
### 4.1. STH'lerin Uyarılması ve Hücre Kültürü

PKHM'lerden izole edilen STH'ler süspansiyon kültürü olarak çoğaltılmış ve hücrelerin morfolojileri kültür süresince günlük olarak mikroskop altında incelenmiştir. İzolasyonu takiben STH'ler manyetik beadler kullanılarak uyarılmış ve İL-2 eklenerek çoğalması sağlanmıştır. STH'ler uyarıldıktan sonra 12-24 saat içinde beadler etrafında birikerek kümeler oluşturmaya başlamıştır ve bu 5-7. gününde hücrelerin çoğalmasıyla birlikte en yoğun haline ulaşmıştır (Şekil 4.1.1). Daha uzun süre beklettiğimiz deneylerde ise, bu zirve noktasından sonra hücrelerin azalmaya başladığı gözlemlendi. Bu nedenle 5-7. günün ardından hücreler yeni bead eklenerek pasajlandı (Şekil 4.1.2) ve 2-3 gün daha çoğaltılarak eksozom izolasyonu için serumsuz besiyerine alındı. Daha sonraki pasajlarda da hücrelerin kümeleşmeye ve çoğalmaya aynı hızda devam ettiği gözlemlendi.





**Şekil 4.1.1:** Pasaj 0'deki USTH'lerin faz-kontrast görüntüleri. Gün 1 (A1-A2); Gün 4 (B1-B2); Gün 7 (C1-C2). Ölçüm çubuğu: 500  $\mu\text{m}$  (A1, B1, C1) ve 200  $\mu\text{m}$  (A2, B2, C2).



**Şekil 4.1.2:** Pasaj 1'deki USTH'lerin faz-kontrast görüntüleri. Gün 1 (A1-A2); Gün 3(B); Gün 6 (C). Ölçüm çubuğu: A1, B-500 µm; A2-200 µm, C-100 µm.

#### 4.2. STH ve USTH'lerin Karakterizasyonu

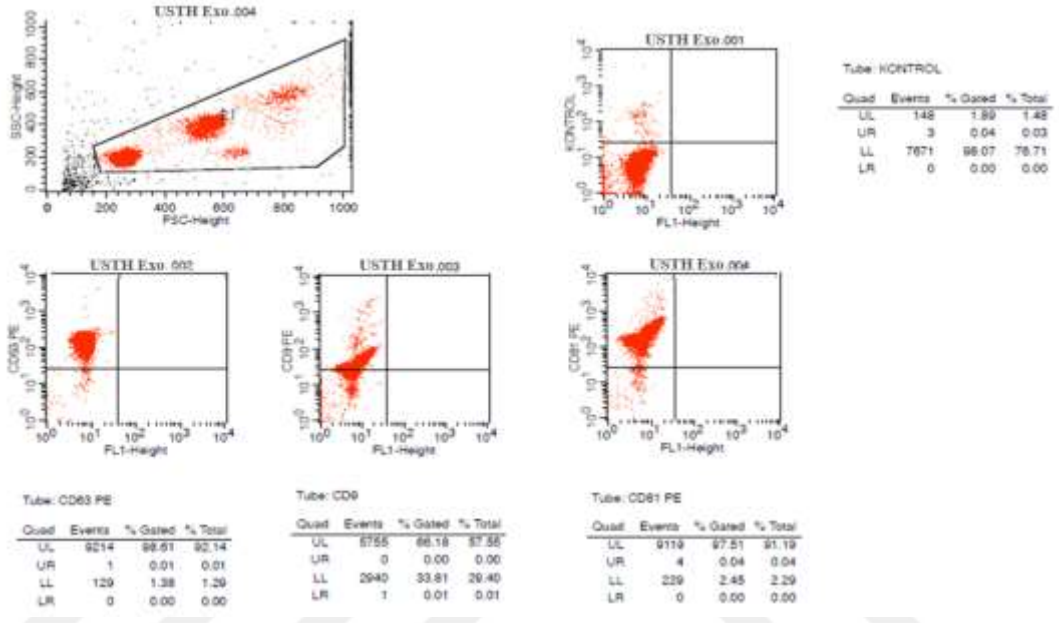
PKMH'lerden yeni izole edilmiş STH'lerin ve uyarılarak kültürü devam eden 5.günüdeki USTH'lerin karakterizasyonu akım sitometri yöntemiyle yapılmıştır. Akım sitometri analizi sonucunda STH yüzey belirteçlerinden CD8 (%77) ve CD45 (%80) yüksek oranlarda pozitif bulunmuştur (Şekil 4.2.1). Öte yandan, 5.günüdeki USTH akım sitometri analizi sonuçlarında CD8 (%98) ve CD45 (%99) yüzey belirteçleri daha da yüksek pozitiflik sergilemiştir (Şekil 4.2.2). Diğer uyarılma yüzey belirteçlerinden CD25 (%99) ve CD28 (%94) pozitifliğide yüksek bulunmuştur. Erken uyarılma belirteci CD69 (%28) ve down regülasyonu beklenen CD62L (%32) pozitiflikleri az bulunmuştur.





### 4.3. USTH Eksozomların Akım Sitometri ile İmmünojenotipik Karakterizasyonu

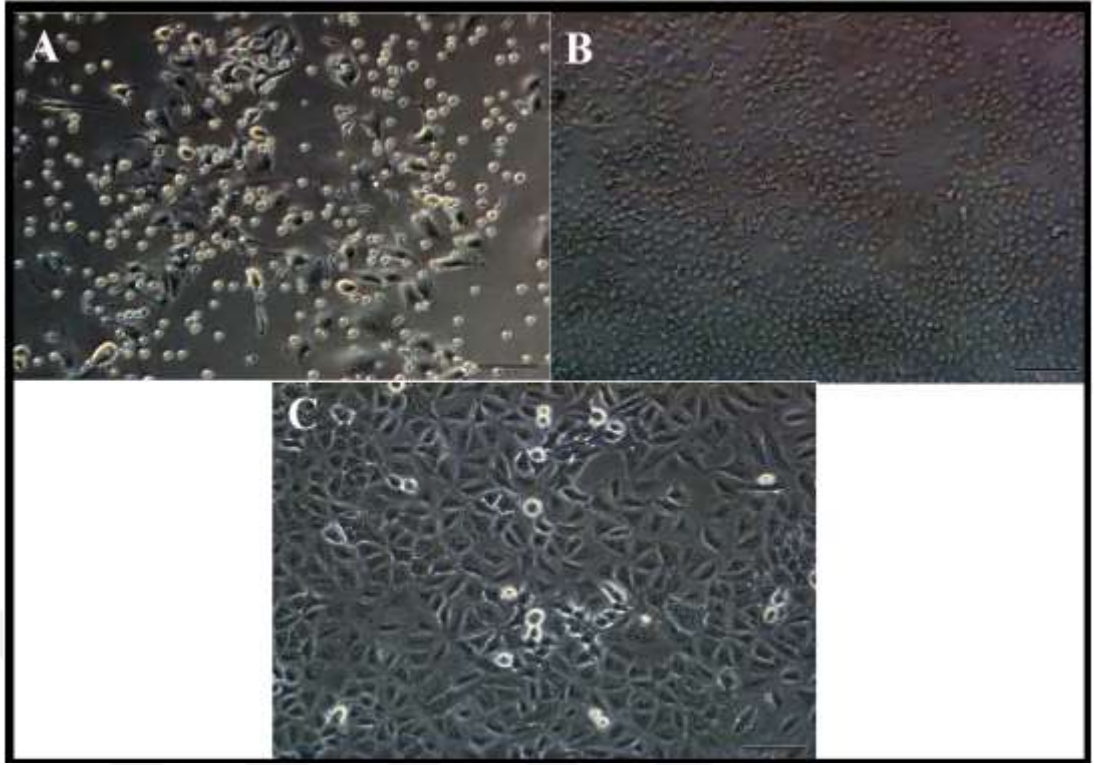
USTH'lerden izole edilen eksozomların immünojenotipik karakterizasyonu akım sitometri yöntemi ile CD9, CD63 ve CD81 yüzey belirteçleri bakımından incelenmiştir (Şekil 4.3.1). Akım sitometri analizi sonucunda CD63 (%92) ve CD81 (%91) yüksek oranlarda pozitif bulunurken CD9 (%57) pozitifliği daha az bulunmuştur.



Şekil 4.3.1: USTH eksozomlarının; CD9, CD63 ve CD81 eksozom belirteçlerinin akım sitometri analizi.

### 4.4. Ortak Kültür Deneyleri

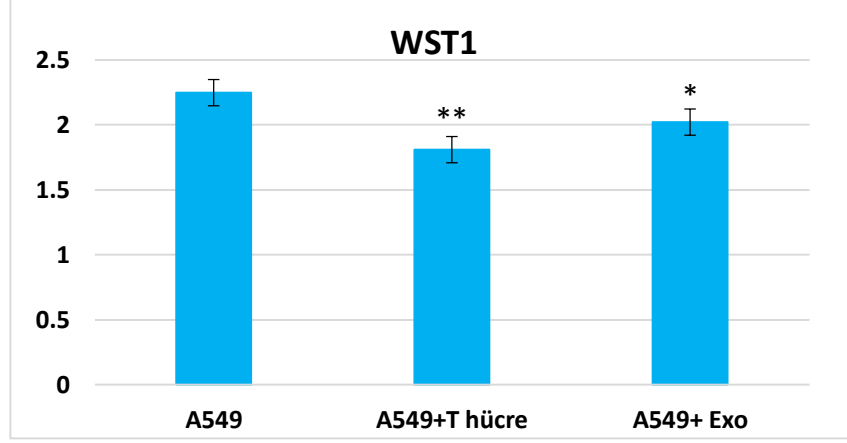
A 549 hücreleri 12 kuyucuklu hücre kültür kaplarına ekilmiş ve kabın tabanına yapışıp belirli bir (%60) yoğunluğa ulaştıktan sonra USTH eksozomları ve USTH'lerle direk olarak ortak kültüre alınmıştır. 48 saat boyunca devam eden ortak kültürdeki hücrelerin morfolojik değişimleri mikroskop altında izlenmiştir (Şekil 4.4.1) ve süre bitiminde hücrelerin canlılıkları ve çoğalmaları değerlendirilmek üzere analizlere geçilmiştir.



**Şekil 4.4.1:** Ortak kültür 1.gün faz-kontrast mikroskobu görüntüleri. a. USTH grubu; b. Ekzozom grubu; c. Kontrol. Ölçüm çubuğu: A,C-500 µm; B-100 µm.

#### 4.4.1. WST-1 Canlılık ve Proliferasyon Analizi

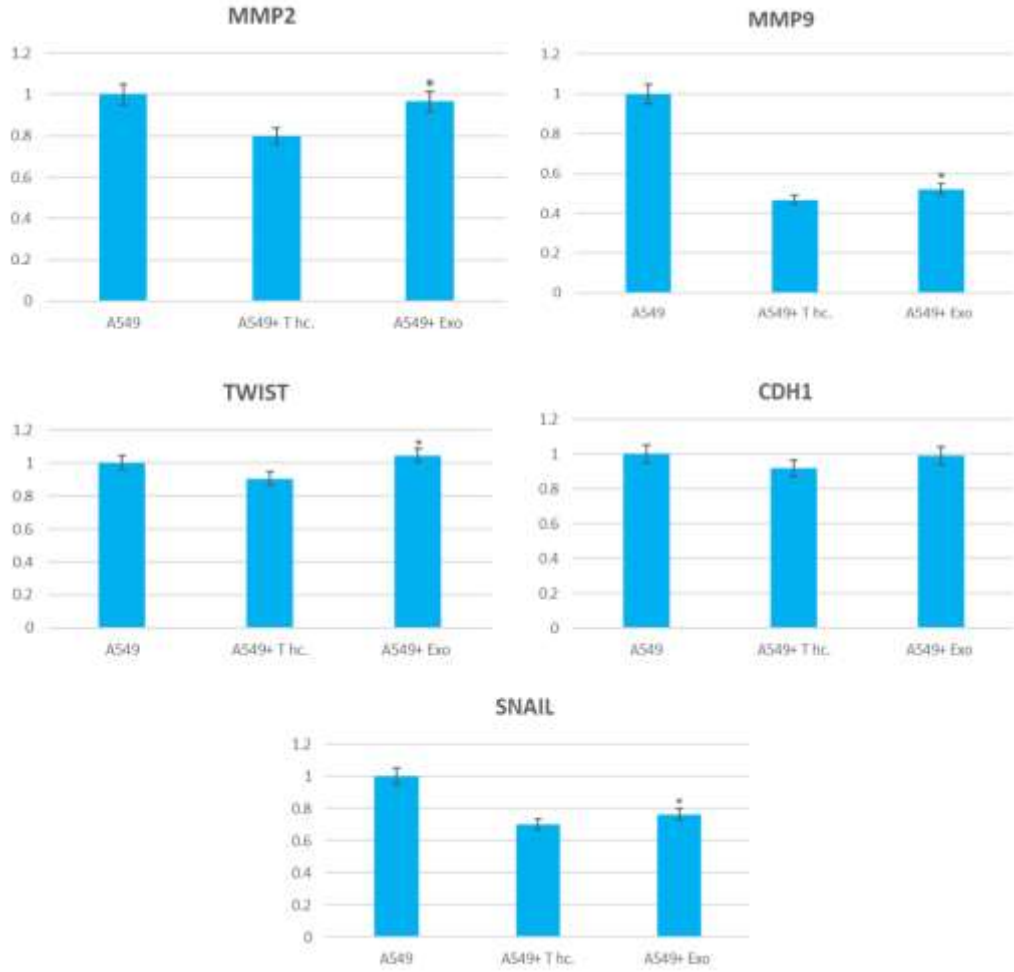
Ortak kültür sonrası yapılan WST-1 deneyinde, USTH ekzozom grubu A549 hücre canlılığında ve proliferasyonunda, kontrol grubu A549'lara göre anlamlı bir azalış görülmüştür ( $P<0.05$ ). Öte yandan, USTH grubu A549 hücre canlılığında ise kontrol grubu A549'lara göre daha da anlamlı bir azalma gözlemlendi ( $P<0.01$ ), (Şekil 4.4.1.1).



**Şekil 4.4.1.1:** Deney gruplarının WST-1 canlılık ve proliferasyon analizi (\*P<0.05, \*\*P<0.01).

#### 4.4.2. Gen Ekspresyonu Analizi

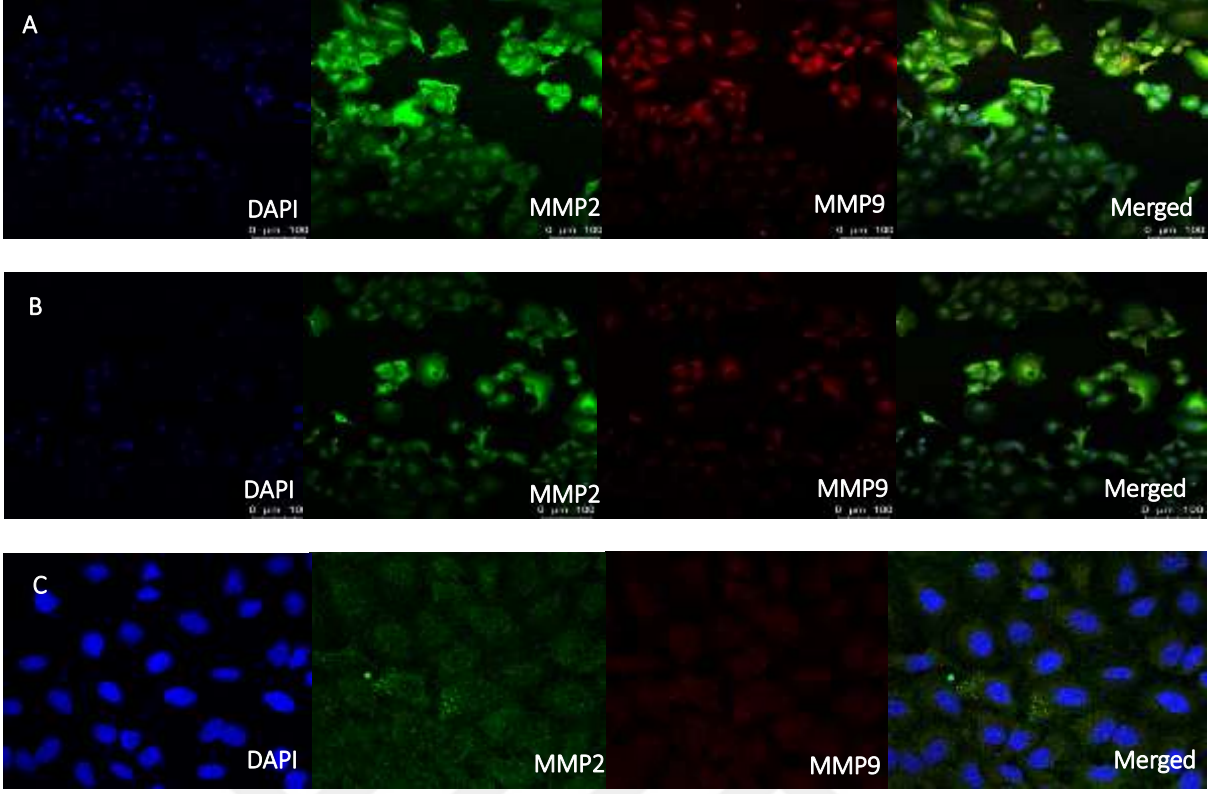
Ortak kültür sonrası A549 hücrelerindeki; CDH1, MMP2, MMP9, TWİST, SNAIL1 genlerinin ekspresyon düzeyleri RT-PCR yöntemi ile incelenmiştir (Şekil 4.4.2.1). USTH grubu A549 hücrelerinde RT-PCR sonucu CDH1, MMP2, MMP9, TWİST ve SNAIL1 genlerin ekspresyon düzeylerinde kontrol gruba göre azalma bulunmuştur. Eksozom grubu A549 hücrelerinde ise MMP2, MMP9 ve SNAİL1 genlerinin ekspresyonunda anlamlı bir azalma görülürken (P<0.05), TWİST geninde artış gözlemlenmiştir. CDH1 geninde ise anlamlı bir fark bulunmamıştır.



**Şekil 4.4.2.1:** SNAIL, TWIST, MMP2 ve MMP9 gen ekspresyonu analiz grafikleri (\*P<0.05).

#### 4.4.3. İmmü Floresan Boyama

İmmü floresan boyama sonuçlarında ortak kültür sonrası A549 hücrelerindeki MMP-2 ve MMP-9 proteinlerinin ifade düzeyleri görüntülenmiş olup hem eksozom hem de USTH grupları için boyamalar pozitif bulunmuştur. Ancak, hem MMP-2 hem de MMP-9 boyamalarında eksozom grubundaki hücreler kontrol grubundakilere oranla anlamlı bir azalış sergilerken; USTH grubundaki hücrelerde MMP-9 boyamasında azalma, MMP-2 boyamasında ise anlamlı bir fark bulunmamıştır (Şekil 4.4.3.1).



**Şekil 4.4.3.1:** Ortak kültür sonrası deney gruplarının; çekirdek boyası DAPI (Mavi), MMP-2 (Yeşil) ve MMP-9 (Kırmızı) immünfloresan boyamalarının konfokal mikroskop görüntüleri. a. Kontrol grubu; b. USTH grubu; c. Eksozom grubu. Ölçüm çubuğu: 100  $\mu$ m.



## 5. TARTIŞMA

Primer akciğer karsinomunun başlaması ve ilerlemesinde tümör mikroçevresinin (TMÇ) merkezi rolü olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Peinado et al., 2017). Bunun yanı sıra, meme ve kolon kanseri gibi göğüs dışı maligniteler ve melanomlar sekonder akciğer tümörlerini oluşturmak için yayılmış tümör hücrelerinin kolonizasyonunu ve aşırı büyümesini destekleyerek akciğer mikroçevresini sistematik olarak yeniden programlamaktadır. TMÇ, hem primer hem de sekonder akciğer tümörlerinde yeni antikanser ajanlarının geliştirilmesi için hedef açısından zengin bir ortam olarak kabul edilmektedir (Altorki et al., 2019). Bu nedenle, TMÇ’de bulunan hücrelerin- tümör hücreleri, immün hücreleri, kanserle ilişkili stromal hücreler ve hücre dışı bileşenlerin- sitokinler, kemokinler, ekstraselüler veziküller (EV) arasındaki bağlantısallığın anlaşılması hücresel düzeyde AK’ne karşı yeni alternatif tedavi olanakları sunmaktadır.

Anti-tümör aktiviteden sorumlu kilit bağışıklık hücreleri olan STH’ler, T hücre reseptörlerinin (THR’ler) ligasyonundan sonra IFNy, tümör nekroz faktörü (TNF) ve granzim B üretimi yoluyla tümör hücrelerini hedef alarak yok edilmesinde görev alırlar. Bununla birlikte STH’lerin anti-tümör etkilerini gösterebilmesi için öncelikle aktive olması gerekmektedir. STH’lerin aktivasyonu sırasında büyük miktarda eksozom olarak bilinen veziküler cisimcikler salgıladığı daha önce yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Martínez-Lorenzo et al., 1999). Eksozomlar, multiveziküler endozomlardan (MVE) türetilen hücre dışı veziküllerdir (EV) ve hücre membranları ile sitozolik proteinler, lipidler ve mi-RNA’lar da dahil nükleotidler arasında transfer aracı olarak görev alırlar. Böylece komşu ve/veya uzak hücrelerin iletişimde yeni veziküler cisimcikler olarak tanımlanmışlardır (Seo, Akiyoshi, et al., 2018).

USTH’lerden salgılanan eksozomların hem kanser hücrelerinin yok edilmesinde görevli olan T lenfositlerin etkilerini çeşitli mekanizmalarla baskılayarak tümör gelişimini arttırdığı hem de TMÇ’deki tümör gelişimine katkıda bulunan stromal hücreleri engelleyerek anti-tümör etki göstererek kanserde ikili rol oynadığı şimdiye kadar yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Seo, Akiyoshi, et al., 2018). Cai ve ark. tarafından gerçekleştirilen çalışmada, OT-I fare

splenositlerinden elde edilen FasL<sup>+</sup> USTH eksozomlarının B16 and 3LL kanser hücre hatları üzerine etkisi araştırılmıştır. Çalışmanın sonucunda USTH eksozomlarının Fas/FasL sinyal yolağı aracılığıyla tümör invazyonunu hızlandırdığını ancak tümör çoğalması ve apoptozu üzerine herhangi bir etkisinin olmadığı bulunmuştur (Cai et al., 2012). Diğer bir çalışmada ise Seo ve arkadaşları, DUC18 ve BALB/c fare splenositlerinden izole edilen USTH eksozomlarının çeşitli kanser hücre hatları üzerindeki etkilerini incelemişler ve sağlıklı farelerden izole edilen USTH eksozomlarının tümör büyümesini mezenkimal tümör stromal hücrelerini kısmen miRNA'ya (miR-298-5p) bağlı bir şekilde azaltarak önlediğini göstermişler. USTH eksozomları tarafından mezenkimal tümör stromasının imhası, epitelial-mezenkimal geçiş (EMT) kaybına bağlı olarak tümör hücrelerinin invaziv ve metastatik potansiyelinin azalması ile ilişkilendirilmektedir (Seo, Shirakura, et al., 2018).

Bu ve diğer yapılan çalışmalara rağmen USTH'lerden salgılanan eksozomların kanser hücreleri üzerindeki etkileri tam olarak anlaşılmış değildir ve buna yönelik çalışmalar devam etmektedir. Çalışmamızda da sağlıklı bireylerin kan hücrelerinden izole edilen USTH eksozomlarının AK hücre hattı olan A549 hücrelerinin çoğalma ve gen ekspresyonları üzerindeki etkilerinin anlaşılması amaçlanmıştır ve USTH eksozomlarının A549 hücre hattı üzerine etkisinin araştırıldığı ilk çalışma olma özelliğindedir.

Belirli bir hücre tipini izole etmek için iki ana strateji kullanılmaktadır: ilgilenilen hücrenin "pozitif izolasyonu" veya istenmeyen hücrelerin uzaklaştırıldığı "negatif izolasyon". Pozitif izolasyonla, belirli bir hücre alttipi farklı bir yüzey antijeninin ekspresyonuna dayalı olarak karmaşık hücre karışımından doğrudan izole edilir. Negatif izolasyonda ise, antikörlerle duyarlı hale getirilen tüm istenmeyen hücre tipleri manyetik boncuklar kullanılarak numuneden uzaklaştırılır. Pozitif hücre izolasyonu, belirli bir hücre alt kümesini yüksek saflık ve verimle izole etmenin en hızlı ve etkili yolu olarak bilinmektedir. Bu nedenle, son 20 yılda hücre biyolojisi, immünoloji, kanser araştırmaları, *in vitro* teşhis ve hücre tedavisi gibi çeşitli yaşam bilimleri alanlarında araştırmaları yönlendiren güçlü bir araç haline gelmiştir (Neurauter et al., 2007).

Çalışmamızda da STH'ler pluriBead hücre ayrıştırma kiti kullanılarak pozitif izolasyonla sağlıklı bireylerin periferik kanından elde edilen PKMH'lerden başarıyla izole edilmiştir. Pluribead yöntemi, hücrelerin farklı büyüklükteki boncuklara antikör aracılı bağlanmasına ve bunların farklı ağ boyutundaki filtrelerle izolasyonuna dayanır. Bu yöntemin ana

avantajlarından biri, pozitif seçim yoluyla hücreleri doğrudan tam kandan izole edilebilmesidir (Pierzchalski et al., 2013). Bu şekilde PKMH aşamasında olası T hücre kayıplarını önleyerek hem verim hem de süre açısından daha avantajlı olabilmektedir. Bununla birlikte çalışmamızda hem PKMH'den hem de tam kandan STH izolasyonu yapılmıştır ve hücrelerin veriminde pek fazla fark bulunmamıştır. PKMH'de daha fazla naif STH'lerinin varlığı, bu hücrelerin uyarılması ve kültürü açısından olumlu bulunmuştur. İzolasyon sonrası hücrelerin STH'lere özgü CD8 ve CD45 belirteçleri ifade ettikleri akım sitometri yöntemiyle gösterilmiştir ve literatür taraması sonucu %70'in üzerindeki saflık başarılı olarak kabul görülmüştür (Pierzchalski et al., 2013). Tüm deneylerde STH izolasyonu %70'in üzerinde gerçekleştirilmiştir

Adoptif CD8<sup>+</sup> T hücre terapisinde (ACT), tümöre özgü T hücreleri hastalardan elde edilir ve *in vitro* ortamda çoğaltılarak hastalara geri infüze edilir. İlk ACT'ler, tümörü infiltre eden lenfositlerden (TIL) çoğaltılmış hücreler kullanılarak yapılmıştır. Günümüzde ise, gen mühendisliği teknolojisi kanser immünoterapisi için, THR ile tasarlanmış T hücreleri (THR-T) ve Kimerik Antijen Reseptör T hücresi (CAR-T) tedavilerinde olduğu gibi tümöre özgü antijen reseptörünü *in vitro* da aktive edilmiş T hücrelerine transfer ederek büyük miktarda kansere özgü T hücrelerinin tutarlı bir şekilde üretilmesini sağlamaktadır (Jiang et al., 2019). ACT'lerde, infüzyondan önce STH'lerin uyarılmasını ve büyük miktarlarda çoğalmasını sağlayan çeşitli *in vitro* yöntemler geliştirilmiştir. Bu yaklaşımlar içerisinde araştırmacılar tarafından en çok tercih edileni, yapay APC'ler oluşturmak için antijen-aracılı THR sinyalini taklit eden CD3'e özgü mAb'ların ve gerekli kostimülatör sinyali sağlayan agonistik anti-CD28 mAb'ların kombinasyonunun manyetik boncuklarla birleştirilerek T hücrelerinin uyarılmasıdır (Neurauter et al., 2007). Daha önceki yapılan çalışmalarda, bu tür yapay APC'lerin T hücrelerinin uyarılmasında geleneksel uyarıcı olarak kullanılan mitojenik lektinlerden (PHA, Con A vs.) veya çözünür anti-CD3 ve anti-CD28 mAb'lardan daha etkili olduğu bildirilmiştir (Teschner et al., 2011). Uyarılmayı takiben, T hücreleri aktivasyona verdikleri tepkiye bağlı olarak iki ana gruba ayrılırlar: aktivasyona bağlı hücre ölümü (AICD) tarafından ölenler ve çoğalanlar. Aktivasyon sonrası T-hücre kaderinin ana belirleyicileri; IL-2'nin T hücreleri üzerindeki reseptörüne bağlanması ve T hücresinin aktivasyon durumu veya alt küme bağlantısı olarak bilinmektedir (Hedfors & Brinchmann, 2003). Özellikle, IL-2'nin T hücresi uyarıldıktan sonra kültürünün devamı için önemli bir sitokin grubu olduğu Shanti ve Aldahoudi tarafından gerçekleştirilen araştırmada gösterilmiştir. Bu çalışmada, IL-2'nin STH'lerinin büyümesini destekleme yeteneği ve

optimal doz oranları incelenmiştir ve IL-2 yokluğunda CD8<sup>+</sup> T hücrelerinin hayatta kalması ve büyümesinin çok zayıf olduğu bulunmuştur (Al-Shanti & Aldahoudi, 2007).

Tüm bu bilgiler doğrultusunda çalışmamızda da STH'ler anti CD-3/CD-28 manyetik boncuklar kullanılarak uyarılmış ve IL-2 eklenerek kültürü devam ettirilmiştir. Deneylerde farklı oranlarda boncuk-hücre miktarlarının STH'lerin uyarılması ve çoğalması üzerine etkileri denenmiş ve en iyi sonucun 1:1/1:2 oranında olduğu tespit edilmiştir. Daha az miktarlarda boncuk eklenildiğinde (1:3) oransal olarak daha az sayıda hücrelerin uyarıldığı ve çoğunun boncuklara bağlanmadan 2-3 gün içerisinde öldüğü gözlemlendi. Aynı şekilde daha fazla boncuk eklenildiğinde de (2:1) hücrelerin apoptoza uğrayarak sayılarının azaldığı ve boncukların kendi aralarında birleşerek kümeler oluşturduğu gözlemlendi. Kalamasz ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada da, sonuçlarımıza paralel olarak STH'lerin uyarılmasının ve çoğalmasının boncuk:hücre oranının 1:1 olduğu durumlarda en yüksek sayıya ulaştığı bulunmuştur (Kalamasz et al., 2004). Aynı şekilde Trickett ve Kwan'ın yaptığı çalışmada da STH'lerin boncuk:hücre oranlarının 1:2 olduğu durumlarda daha iyi uyarıldığı ve daha fazla boncuk eklemenin hücrelerin daha fazla uyarılmasını etkilemediği bildirilmiştir (Trickett & Kwan, 2003). IL-2 miktarı da literatüre göre 20 µg/ml olarak belirlenmiş ve kültür süresince her 3/4 günde bir eklenmiştir. Bu şekilde hücrelerin uzun süre çoğalmaları sağlanmış ve canlılık oranları IL-2 eklenmeyen kültürlere göre daha yüksek miktarlarda bulunmuştur. Uyarılmayı takiben 12-24 saat içerisinde hücrelerin boncuklara birleşerek kümeler oluşturmaya başladığı ve uzunlamasına büyüyerek şekillerinin yuvarlaktan iğnemi bir şekle değiştiği gözlemlenmiştir. Hücrelerin çok az bir kısmı ise (%10) apoptoza uğramıştır ve bunun sebebinde STH olmayan monositlerden kaynaklı olabileceğini düşünmekteyiz. Diğer bir nedeni ise, T hücrelerinin tekrar uyarılmasına bağlı olarak AICD kaynaklı ölümü olabilmektedir. Yine de uyarılmanın ardından hücrelerin çoğalmaları 5.güne kadar stabil devam etmiştir. Hızlı bir çoğalma ise 5-6.günden itibaren başlamıştır. Bu süreç bazı deneylerde 4-5 bazılarında ise 5-6.günden başlayıp gözlemlenmiş ve bu da gönüllüler arasındaki kan grubu, etnik köken ve yaş grubu gibi farklılıklardan kaynaklı olduğunu düşünmekteyiz.

Daha önceki yapılan çalışmalarda STH'lerin *in vitro* kültürlerinde 14.gününde plato evresine (hücre sayısında artışın durması) ulaştığı gösterilmiştir (Al-Shanti & Aldahoudi, 2007). Çalışmamızda da USTH'ler 14 gün boyunca kültüre edilerek çoğalma gözlemlenmiş ancak daha uzun sürelerde sayılarının azalmaya başladığı bulunmuştur. Bu nedenle, hücreler

hızlı bir çoğalmayı takiben yaklaşık 6.gününde pasajlanmış ve 10.gününde de serumsuz besiyerine alınarak eksozom izolasyonu için 48 saat bekletilmiştir. Diferansiye ultrasantrifüj yöntemiyle hücre süpernatantlarından eksozom izolasyonu yapılarak eksozom belirteçleri olarak kullanılan CD9, CD63 ve CD81 yüzey belirteçleri akım sitometride incelenmiştir.

USTH kaynaklı eksozomlar izole edilip karakterizasyonları yapıldıktan sonra A549 hücreleri ile birlikte ortak kültüre alındı. Aynı şekilde uyarılarak kültüre edilen USTH'lerde karakterizasyonları yapıldıktan sonra A549 hücreleri ile birlikte ortak kültüre alındı. Çalışmada eksozomlar literatüre göre hücre kültürüne 24 saatte bir 50µg/mL olmak üzere 3 tekrar (toplam, 150µg/mL) olacak şekilde uygulandı (Seo, Shirakura, et al., 2018). USTH'ler ise her kuyucuğa 50 bin olacak şekilde bir kerede uygulandı ve 3 gün bekletildi. Bu uygulama sonrasında eksozom grubundaki hücrelerin kontrol ve USTH grubu hücrelerine göre çoğalmasında gözle görülür bir azalma gözlemlendi.

Ortak kültür sonrası eksozom ve USTH'lerin A549 hücrelerinin çoğalma kapasiteleri üzerindeki etkilerini görebilmek amacıyla WST-1 Testi yapılmıştır. Hücre çoğalma analizi sonucunda her iki grupta da kontrol gruba göre azalma gözlemlenmiştir. Bununla birlikte, USTH grubundaki hücrelerde çoğalmanın eksozom grubuna göre daha az olması yeterli miktarlarda eksozom elde edemediğimizden kaynaklandığını düşünmekteyiz. Sonuçlarımıza paralel olarak, Seo ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada da USTH'lerden salgılanan eksozomların tümör büyümesini engellediği gösterilmiştir (Seo, Shirakura, et al., 2018).

Tümörlerin metastatik davranışında önemli olan biyolojik işlevlerden biri de epitelyal mezenkimal geçiştir (EMT). EMT'de, epitelyal tümör hücreleri fibroblastik/miyofibroblastik özellikler kazanarak komşu yapıları istila etme ve metastaz yapma konusunda daha başarılı olurlar. Bu geçiş sırasında E-cadherin gibi birkaç adhezyon molekülünün regülasyonunun azaldığı gösterilmiştir. Ayrıca, TWİST ve SNAİL1 gibi transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonunun da EMT'ye neden olduğu bilinmektedir (Merikallio et al., 2012). Çalışmamızda da ortak kültür sonrası gen ekspresyon analizlerinde EMT'de önemli roller üstlenen ve tümör invazyonu ve metastazı ile ilişkili olduğu bilinen CDH1, TWİST, SNAİL1, MMP2 ve MMP9 genlerinin ekspresyonlarına bakılmıştır.

EMT'nin düzenleyicilerinden biri olan SNAİL1, AK'nin gelişiminde ve metastazında kilit rol oynayan bir transkripsiyon faktörüdür (G. Wang et al., 2018). SNAİL1'in, sıkı bağlantı

(*tight junction*) proteinleri okludin ve claudinlerin ekspresyonunu azaltarak EMT’de rol alan çeşitli genleri regüle ettiği bildirilmiştir (Ohkubo & Ozawa, 2004). Merikallio ve ark. SNAİL1 ekspresyonunun skuamöz hücreli karsinom ve adenokarsinom hastalarında kötü prognozu ile ilişkili olduğunu belirtmiştir (Merikallio et al., 2012). Aynı şekilde Wang ve arkadaşları da SNAİL1’in yüksek ekspresyonunun, patolojik N0 KHDAK’li (Lenf nodu metastazı bulunmayan) hastalarda azalmış sağkalımı ile ilişkili olduğunu göstermişler (G. Wang et al., 2018). Bu çalışmada da SNAİL1 gen ekspresyonunun; hem eksozom grubu hem de USTH grubu hücrelerinde kontrol gruba göre azaldığı saptanmıştır. Bu da USTH eksozomlarının anti-metastatik özellikleri sergilediğini göstermektedir ve sonuçlarımız diğer araştırmacıların bulgularıyla uyumludur.

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda çeşitli kanser türlerinde TWİST’in up regülasyonu bulunmuştur ve bunun EMT’de düzenleyici bir rol oynadığı bildirilmiştir. TWİST’in down regülasyonu ise, mezenkimal-epitelyal geçişi (MET) başlatarak metastazı önlediği bilinmektedir (G. Wang et al., 2011). Çalışmamızda TWİST gen ifadesinin eksozom grubu hücrelerinde kontrol gruba göre artış, USTH grubundaki hücrelerde ise azalış gözlemlenmiştir. USTH grubundaki hücrelerde azalmanın TWİST kaynaklı metastazın E-kadherinin down regülasyonu ile ilişkili olduğu gerçeğine bağlı olabileceğini düşünmekteyiz (G. Wang et al., 2018).

CDH1 hem tümörijenik hem de metastatik süreçlerle bağlantılı tümör baskılayıcı bir genidir. CDH1 ürünü olan E-kaderin önemli bir adezyon ve sinyal yolu aracısıdır ve doku bütünlüğünün korunmasında kilit rol oynamaktadır. E-kadherin ifadesinin down regülasyonu EMT’nin ayırt edici özelliklerinden biridir (G. Wang et al., 2018). Çalışmamızda CDH1 gen ifadesinde, eksozom grubu hücrelerinde anlamlı bir fark bulunmazken, USTH grubundaki hücrelerde kontrol gruba göre göreceli bir azalma gözlenmiştir.

Birçok çalışma, stromal hücre dışı matriksin (ECM) yeniden yapılanmasındaki değişikliklerin tümör invazyonu ve inflamatuvar reaksiyonlar gibi diğer patolojik durumlarda meydana geldiğini bildirmiştir. Bazal membranların ve ECM’nin degradasyonu, malign hücrelerin invazyonu ve metastazı için çok önemli bir aşamadır (Stamenkovic, 2003). Bu sürece dahil olan en belirgin ajanlar MMP2 ve MMP9’dur. Daha önce yapılan çalışmalar, primer tümörlerde artan MMP2 ve MMP9 ekspresyonunun çeşitli kanser türlerinde agresif

hastalık ve olumsuz sonuçlarla ilişkili olduğunu göstermiştir. Guo ve ark. immünboyama ve serumda MMP2 seviyesindeki artışın, KHDAK hastalarında ileri evre tümör ve metastaz varlığı ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir. Bununla birlikte, MMP9 için sadece serum seviyesindeki artışın ileri evre tümörle bağlantılı olduğu bulunmuştur (Guo et al., 2007). Çalışmamızda da hem USTH hem de eksozom grubu hücrelerinin gen analizlerinde MMP2 ve MMP9 ifadesinde kontrol grubuna göre azalma bulunmuştur.

Gen analizlerinde bulduğumuz sonuçları desteklemek amacıyla MMP-2 ve MMP-9 proteinlerinin ortak kültür sonrası hücrelerdeki ifadeleri immünfloresan boyama yöntemiyle incelenmiştir. İmmünfloresan boyama sonuçlarında USTH grubundaki hücrelerde MMP-9 ve MMP-2 ifadesinde azalma gözlenirken, bu azalmanın eksozom grubu hücrelerinde daha fazla olduğu saptanmıştır.

Yaptığımız gen analizleri ve immün boyamaları sonucunda elde ettiğimiz bulgulara dayanarak USTH eksozomlarının A549 hücrelerinin çoğalmalarını azalttığı ve anti-metastatik etki gösterdikleri saptanmıştır. Bunun temelindeki nedenler ise, daha geniş kapsamlı moleküler ve *in vivo* deneyleri çalışmaları ile desteklenerek açıklanabilir.

### **Sınırlılıklar**

İzole edilen STH alttiplerinin belirlenmesi daha sağlıklı bir kültür ortamının oluşturulmasına ve daha fazla sayıda hücre eldesine imkan sağlayacaktır. miRNA düzeyinde analizlerin gerçekleştirilmesi ve *in-vivo* deneylerin yapılması elde edilen sonuçların temel nedenini açıklayarak daha ileri bir noktaya taşıyacaktır. Deneylerimizin COVID-19 pandemisine denk gelmesi nedeniyle metastatik değişimleri saptamak amacıyla yapmayı planladığımız invazyon ve migrasyon deneyleri gerçekleştirilememiştir. Yayın aşamasında bu eksikliklerin tamamlanması planlanmaktadır.

## 6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Biyouyumlulukları, uzun yarılanma ömürleri ve modifikasyona yatkınlıkları nedeniyle, eksozomlar umut verici terapötik dağıtım sistemleri olarak ortaya çıkmıştır. Nükleik asitler, proteinler, antikolar, nano cisimler ve kemoterapötik ilaçlar için dağıtım araçları olarak başarıyla kullanılmışlardır ve iyi üretim uygulamaları kullanılarak büyük ölçekte üretilbilirler. Eksozomların canlı organizmalarda doğal olarak üretilmesinden dolayı, bunların farelere ve insanlara uygulanması düşük toksisite göstermektedir. Ayrıca, eksozomlar, kltrin bağımlı endositoz ve kltrin bağımsız yolaklar; fagositoz, makropinositoz, lipid-sal aracılı alım, caveolin aracılı içselleştirme, doğrudan membran füzyonu ve reseptör aracılı giriş dahil olmak üzere çeşitli mekanizmalar yoluyla alıcı hücreler tarafından verimli bir şekilde içselleştirilir. Tüm bu özellikler eksozomları kanser immünoterapisi için çekici bir dağıtım sistemi haline getirmektedir (Kugeratski & Kalluri, 2021).

Çalışmamızda AK hücre hattı üzerinde USTH eksozomlarının anti-metastatik ve anti-proliferatif etkilerinin gösterilmiş olması literatüre yeni bilgiler sunmuş olsa da bu etkinin moleküler mekanizmalarının aydınlatılması yönünde gerçekleştirilecek detaylı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. İlaveten, tümör spesifik antijenlerin bulunması ve THR'lerinin bu antijenlere karşı genetik olarak değiştirilmesi sonucu elde edilen USTH eksozomlarının A549 hücrelerine yönelik uygulanması daha efektif anti-tümör etkiler oluşturabilir.



## 7. KAYNAKLAR

- Akciğer Kanseri Nedir? Belirtileri ve Tedavi Yöntemleri | Acıbadem. (n.d.). Retrieved October 30, 2020, from <https://www.acibadem.com.tr/ilgi-alani/akciger-kanseri/>
- Aerts, J. G., & Hegmans, J. P. (2013). Tumor-specific cytotoxic t cells are crucial for efficacy of immunomodulatory antibodies in patients with lung cancer. *Cancer Research*, 73(8), 2381–2388. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-3932>
- Aghapour, M., Raei, P., Moghaddam, S. J., Hiemstra, P. S., & Heijink, I. H. (2018). Airway epithelial barrier dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease: Role of cigarette smoke exposure. In *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* (Vol. 58, Issue 2, pp. 157–169). American Thoracic Society. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2017-0200TR>
- Akciğer kanseri - Wikipedi. (n.d.). Retrieved October 30, 2020, from [https://tr.wikipedia.org/wiki/Akciğer\\_kanseri](https://tr.wikipedia.org/wiki/Akciğer_kanseri)
- AKTÜMSEK, A. (2016). *Anatomi ve Fizyoloji İnsan Anatomisi* (10th ed.). Nobel Kitabevi.
- Al-Shanti, N., & Aldahoudi, Z. (2007). Human purified CD8+ T cells: Ex vivo expansion model to generate a maximum yield of functional cytotoxic cells. *Immunological Investigations*, 36(1), 85–104. <https://doi.org/10.1080/08820130600991950>
- ALBERG, A. J., BROCK, M. V., & SAMET, J. M. (2016). EPİDEMİOLOGY OF LUNG CANCER. In *Murray & Nadel's Textbook of Respiratory Medicine* (sixth). Elsevier Inc.
- Alberg, A. J., Wallace, K., Silvestri, G. A., & Brock, M. V. (2013). Invited commentary: The etiology of lung cancer in men compared with women. In *American Journal of Epidemiology*. <https://doi.org/10.1093/aje/kws444>

ALBERTINE, K. H. (2016). ANATOMY OF THE LUNGS. In Murray & Nadel's Textbook of Respiratory Medicine (Sixth). Elsevier Inc.

Aldarouish, M., & Wang, C. (2016). Trends and advances in tumor immunology and lung cancer immunotherapy. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 35(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13046-016-0439-3>

Altorki, N. K., Markowitz, G. J., Gao, D., Port, J. L., Saxena, A., Stiles, B., McGraw, T., & Mittal, V. (2019). The lung microenvironment: an important regulator of tumour growth and metastasis. *Nature Reviews Cancer*, 19(1), 9–31. <https://doi.org/10.1038/s41568-018-0081-9>

Arakawa, H., Niimi, H., Kurihara, Y., Nakajima, Y., & Webb, W. R. (2000). Expiratory high-resolution CT: Diagnostic value in diffuse lung diseases. *American Journal of Roentgenology*, 175(6), 1537–1543. <https://doi.org/10.2214/ajr.175.6.1751537>

Arda, N., & Ertan, H. (2017). Proteinlerin Nicel Analizi. In G. Temizkan & N. Arda (Eds.), *Temel ve İleri Moleküler Biyoloji Yöntemleri* (1st ed.).

Asbest - Vikipedi. (n.d.). Retrieved November 10, 2020, from <https://tr.wikipedia.org/wiki/Asbest>

Asbest Nedir, Nerelerde Kullanılır? | Enerji Portalı. (n.d.). Retrieved November 10, 2020, from <https://www.enerjiportali.com/asbest-nedir-nerelerde-kullanilir/>

Ayed, A. K. (2004). Resection of the Right Middle Lobe and Lingula in Children for Middle Lobe/Lingula Syndrome. *Chest*, 125(1), 38–42. <https://doi.org/10.1378/chest.125.1.38>

T.C. Sağlık Bakanlığı (2016). 2013-2018 Ulusal Kanser Kontrol programı.

Barbaros, B., & Dİkmen, M. (2015). Kanser İmmünoterapisi Key Words: Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 31(4), 177–181. <http://dergipark.gov.tr/download/article-file/235978>

Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide

for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 394–424.  
<https://doi.org/10.3322/caac.21492>

Breeze, R. G., & Wheeldon, E. B. (1977). The cells of the pulmonary airways. *American Review of Respiratory Disease*, 116(4), 705–777.  
<https://doi.org/10.1164/arrd.1977.116.4.705>

Cai, Z., Yang, F., Yu, L., Yu, Z., Jiang, L., Wang, Q., Yang, Y., Wang, L., Cao, X., & Wang, J. (2012). Activated T Cell Exosomes Promote Tumor Invasion via Fas Signaling Pathway. *The Journal of Immunology*, 188(12), 5954–5961.  
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1103466>

Cascone, T., Gold, K. A., & Glisson, B. S. (2016). Small Cell Carcinoma of the Lung. In H. M. Kantarjian & R. A. Wolff (Eds.), *The MD Anderson Manual of Medical Oncology* (third). McGraw-Hill Education.

Centers for Disease Control and Prevention. (2008). HIV among African Americans. Cdc Fact Sheet.

Chaineau, M., Danglot, L., & Galli, T. (2009). Multiple roles of the vesicular-SNARE TI-VAMP in post-Golgi and endosomal trafficking. In *FEBS Letters* (Vol. 583, Issue 23, pp. 3817–3826). *FEBS Lett.* <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.10.026>

Conde, E., Angulo, B., Izquierdo, E., Paz-Ares, L., Belda-Iniesta, C., Hidalgo, M., & López-Ríos, F. (2013). Lung adenocarcinoma in the era of targeted therapies: Histological classification, sample prioritization, and predictive biomarkers. *Clinical and Translational Oncology*, 15(7), 503–508. <https://doi.org/10.1007/s12094-012-0983-z>

Crapo, J. D., Barry, B. E., Gehr, P., Bachofen, M., & Weibel, E. R. (1982). Cell number and cell characteristics of the normal human lung. *American Review of Respiratory Disease*. <https://doi.org/10.1164/arrd.1982.126.2.332>

Cvjetkovic, A., Jang, S. C., Konečná, B., Höög, J. L., Sihlbom, C., Lässer, C., & Lötvall, J. (2016). Detailed Analysis of Protein Topology of Extracellular Vesicles-Evidence of Unconventional Membrane Protein Orientation. *Scientific Reports*, 6(1), 1–12.

<https://doi.org/10.1038/srep36338>

Davis, R., Rizwani, W., Banerjee, S., Kovacs, M., Haura, E., Coppola, D., & Chellappan, S. (2009). Nicotine promotes tumor growth and metastasis in mouse models of lung cancer. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007524>

de Groot, P. M., Wu, C. C., Carter, B. W., & Munden, R. F. (2018). The epidemiology of lung cancer. In *Translational Lung Cancer Research*. <https://doi.org/10.21037/tlcr.2018.05.06>

De Sousa, V. M. L., & Carvalho, L. (2018). Heterogeneity in Lung Cancer. *Pathobiology*. <https://doi.org/10.1159/000487440>

Dem, Y., & Yurdakul, A. S. (2020). *Ep i dem i yolo j i , R i sk Faktörler i*. 1–5.

Dockery, D. W., Pope, C. A., Xu, X., Spengler, J. D., Ware, J. H., Fay, M. E., Ferris, B. G., & Speizer, F. E. (1993). An Association between Air Pollution and Mortality in Six U.S. Cities. *New England Journal of Medicine*. <https://doi.org/10.1056/nejm199312093292401>

Domingues, D., Turner, A., Silva, M. D., Marques, D. S., Mellidez, J. C., Wannesson, L., Mountzios, G., & De Mello, R. A. (2014). Immunotherapy and lung cancer: Current developments and novel targeted therapies. *Immunotherapy*, 6(11), 1221–1235. <https://doi.org/10.2217/imt.14.82>

DÖNGEL, İ. (2017). Dünyada ve Türkiye’de Akciğer Kanseri. *Turkiye Klinikleri Thoracic Surgery - Special Topics*, 8(1), 1–6. <https://www.turkiyeklinikleri.com/article/en-dunyada-ve-turkiyede-akciger-kanseri-78160.html>

Drake, R. L., Vogl, W., & Mitchell, A. W. M. (2014). *Gray’s anatomy for students (third)*. Churchill Livingstone/Elsevier.

Freeman, G. J., Long, A. J., Iwai, Y., Bourque, K., Chernova, T., Nishimura, H., Fitz, L. J., Malenkovich, N., Okazaki, T., Byrne, M. C., Horton, H. F., Fouser, L., Carter, L., Ling, V., Bowman, M. R., Carreno, B. M., Collins, M., Wood, C. R., & Honjo, T. (2000). Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member

leads to negative regulation of lymphocyte activation. *Journal of Experimental Medicine*, 192(7), 1027–1034. <https://doi.org/10.1084/jem.192.7.1027>

GACAR, G., HALBUTOĞULLARI, Z. S., GÜLTEKN, A., İŞGÖREN, S., DURUKSU, G., KAYA, A., & YUSUFOĞLU, S. (2018). The Comparative Investigation of Healing and Anti-Cancer Effects of Resveratrol with CD8 T Cell Assisted, Mesenchymal Stem Cell – Based Treatment in Animal Model of Chondrosarcoma. 7.Multidisipliner Kanser Araştırma ve 1.Temel Onkoloji Kongresi, 132.

Giard, D. J., Aaronson, S. A., Todaro, G. J., Arnstein, P., Kersey, J. H., & Parks, W. P. (1973). In vitro cultivation of human tumors: Establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *Journal of the National Cancer Institute*, 51(5), 1417–1423. <https://doi.org/10.1093/jnci/51.5.1417>

Gomes, D. B. D. K. A. G., & Gibbons, D. L. (2016). Non–Small Cell Lung Cancer. In H. M. Kantarjian & R. A. Wolff (Eds.), *The MD Anderson Manual of Medical Oncology* (third). McGraw-Hill Education.

Greiser, C. M., Greiser, E. M., & Dören, M. (2010). Menopausal hormone therapy and risk of lung cancer-Systematic review and meta-analysis. In *Maturitas*. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2009.11.027>

Guo, C. B., Wang, S., Deng, C., Zhang, D. L., Wang, F. L., & Jin, X. Q. (2007). Relationship between matrix metalloproteinase 2 and lung cancer progression. *Molecular Diagnosis and Therapy*, 11(3), 183–192. <https://doi.org/10.1007/BF03256240>

Hedfors, I. A., & Brinchmann, J. E. (2003). Long-Term Proliferation and Survival of In Vitro-Activated T Cells is Dependent on Interleukin-2 Receptor Signalling but not on the High-Affinity IL-2R. *Scandinavian Journal of Immunology*, 58(5), 522–532. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3083.2003.01338.x>

Hocking, W. G., & Golde, D. W. (1979). The Pulmonary-Alveolar Macrophage. *New England Journal of Medicine*, 301(11), 580–587. <https://doi.org/10.1056/nejm197909133011104>

- Human, D., & Cd, T. C. D. (2011). DynabeadsHumanTActivatorCD3CD28\_man-1. 1, 1–2. [https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/DynabeadsHumanTActivatorCD3CD28\\_man.pdf%5Cpapers3://publication/uuid/1980E947-3F83-4612-82EC-2CE9460DC70F](https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/DynabeadsHumanTActivatorCD3CD28_man.pdf%5Cpapers3://publication/uuid/1980E947-3F83-4612-82EC-2CE9460DC70F)
- Hung, R. J., McKay, J. D., Gaborieau, V., Boffetta, P., Hashibe, M., Zaridze, D., Mukeria, A., Szeszenia-Dabrowska, N., Lissowska, J., Rudnai, P., Fabianova, E., Mates, D., Bencko, V., Foretova, L., Janout, V., Chen, C., Goodman, G., Field, J. K., Liloglou, T., ... Brennan, P. (2008). A susceptibility locus for lung cancer maps to nicotinic acetylcholine receptor subunit genes on 15q25. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature06885>
- International Agency for Research on Cancer (IARC). (2018). GLOBOCAN 2018: Latest global cancer data. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*.
- Jia, Y., Chen, Y., Wang, Q., Jayasinghe, U., Luo, X., Wei, Q., Wang, J., Xiong, H., Chen, C., Xu, B., Hu, W., Wang, L., Zhao, W., & Zhou, J. (2017). Exosome: Emerging biomarker in breast cancer. In *Oncotarget* (Vol. 8, Issue 25, pp. 41717–41733). Impact Journals LLC. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16684>
- Jiang, X., Xu, J., Liu, M., Xing, H., Wang, Z., Huang, L., Mellor, A. L., Wang, W., & Wu, S. (2019). Adoptive CD8+ T cell therapy against cancer: Challenges and opportunities. *Cancer Letters*, 462(July), 23–32. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2019.07.017>
- Kalamasz, D., Long, S. A., Taniguchi, R., Buckner, J. H., Berenson, R. J., & Bonyhadi, M. (2004). Optimization of human T-cell expansion ex vivo using magnetic beads conjugated with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies. *Journal of Immunotherapy*, 27(5), 405–418. <https://doi.org/10.1097/00002371-200409000-00010>
- Kara, A., Duman, B. O., Yazır, Y., SinanYilmaz, M., Halbutogulları, Z. S. U., Demir, D., Kara, R. O., Bayraktar, H., & Guven, M. (2019). Evaluation of the effect of diclofenac sodium and 5-fluourasil in a 3D cholesteatoma cell culture model. *Otology and Neurotology*, 40(8), 1018–1025. <https://doi.org/10.1097/MAO.0000000000002297>
- Kjuus, H., Langard, S., & Skjaerven, R. (1986). A case-referent study of lung cancer,

occupational exposures and smoking. III Etiologic fraction of occupational exposures. *Scandinavian Journal of Work, Environment and Health*.  
<https://doi.org/10.5271/sjweh.2156>

Kleiveland, C., & Kleiveland, C. (2015). Peripheral blood mononuclear cells. In *The Impact of Food Bioactives on Health: In Vitro and Ex Vivo Models* (pp. 161–167). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-16104-4\\_15](https://doi.org/10.1007/978-3-319-16104-4_15)

Korrodi-Gregório, L., Soto-Cerrato, V., Vitorino, R., Fardilha, M., & Pérez-Tomás, R. (2016). From proteomic analysis to potential therapeutic targets: Functional profile of two lung cancer cell lines, A549 and SW900, widely studied in pre-clinical research. *PLoS ONE*, 11(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165973>

Kugeratski, F. G., & Kalluri, R. (2021). Exosomes as mediators of immune regulation and immunotherapy in cancer. *FEBS Journal*, 288(1), 10–35. <https://doi.org/10.1111/febs.15558>

Landi, M. T., Chatterjee, N., Yu, K., Goldin, L. R., Goldstein, A. M., Rotunno, M., Mirabello, L., Jacobs, K., Wheeler, W., Yeager, M., Bergen, A. W., Li, Q., Consonni, D., Pesatori, A. C., Wacholder, S., Thun, M., Diver, R., Oken, M., Virtamo, J., ... Caporaso, N. E. (2009). A Genome-wide Association Study of Lung Cancer Identifies a Region of Chromosome 5p15 Associated with Risk for Adenocarcinoma. *American Journal of Human Genetics*. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2009.09.012>

Lee, G., Walser, T. C., & Dubinett, S. M. (2009). Chronic inflammation, chronic obstructive pulmonary disease, and lung cancer. In *Current Opinion in Pulmonary Medicine* (Vol. 15, Issue 4, pp. 303–307). *Curr Opin Pulm Med*. <https://doi.org/10.1097/MCP.0b013e32832c975a>

Lewis, D. R., Check, D. P., Caporaso, N. E., Travis, W. D., & Devesa, S. S. (2014). US lung cancer trends by histologic type. *Cancer*, 120(18), 2883–2892. <https://doi.org/10.1002/cncr.28749>

Li, K., Zhang, Q., Zhang, Y., Yang, J., & Zheng, J. (2015). T-cell-associated cellular immunotherapy for lung cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*,

141(7), 1249–1258. <https://doi.org/10.1007/s00432-014-1867-0>

Lieber, M., Todaro, G., Smith, B., Szakal, A., & Nelson-Rees, W. (1976). A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. *International Journal of Cancer*, 17(1), 62–70. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910170110>

Lu, J., Wu, J., Tian, J., & Wang, S. (2018). Role of T cell-derived exosomes in immunoregulation. *Immunologic Research*, 66(3), 313–322. <https://doi.org/10.1007/s12026-018-9000-0>

Lung Cancer | The Patient Guide to Heart, Lung, and Esophageal Surgery. (n.d.). Retrieved October 30, 2020, from <https://ctsurgerypatients.org/lung-esophageal-and-other-chest-diseases/lung-cancer-0>

Luzio, J. P., Piper, S. C., Bowers, K., Parkinson, M. D. J., Lehner, P. J., & Bright, N. A. (2009). ESCRT proteins and the regulation of endocytic delivery to lysosomes. In *Biochemical Society Transactions* (Vol. 37, Issue 1, pp. 178–180). *Biochem Soc Trans.* <https://doi.org/10.1042/BST0370178>

Madureira, P., de Mello, R. A., de Vasconcelos, A., & Zhang, Y. (2015). Immunotherapy for lung cancer: for whom the bell tolls? *Tumor Biology*, 36(3), 1411–1422. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-3285-6>

Maimela, N. R., Liu, S., & Zhang, Y. (2019). Fates of CD8<sup>+</sup> T cells in Tumor Microenvironment. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 17, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2018.11.004>

Martínez-Lorenzo, M. J., Anel, A., Gamen, S., Monle n, I., Lasierra, P., Larrad, L., Piñeiro, A., Alava, M. A., & Naval, J. (1999). Activated human T cells release bioactive Fas ligand and APO2 ligand in microvesicles. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md. : 1950), 163(3), 1274–1281. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10415024>

Mason, R. J., & Williams, M. C. (1977). Type II alveolar cell. Defender of the alveolus. *American Review of Respiratory Disease*, 115(6 II), 81–91.



<https://doi.org/10.1164/arrd.1977.115.S.81>

- Mathieu, M., Martin-Jaular, L., Lavieu, G., & Théry, C. (2019). Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication. *Nature Cell Biology*, 21(1), 9–17. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0250-9>
- Merikallio, H., Turpeenniemi-Hujanen, T., Pääkkö, P., Mäkitaro, R., Riitta, K., Salo, S., Salo, T., Harju, T., & Soini, Y. (2012). Snail promotes an invasive phenotype in lung carcinoma. *Respiratory Research*, 13, 1–10. <https://doi.org/10.1186/1465-9921-13-104>
- Mossman, B. T., Bignon, J., Corn, M., Seaton, A., & Gee, J. B. L. (1990). Asbestos: Scientific developments and implications for public policy. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.2153315>
- Mukhopadhyay, S., & Katzenstein, A. L. A. (2011). Subclassification of non-small cell lung carcinomas lacking morphologic differentiation on biopsy specimens: Utility of an immunohistochemical panel containing TTF-1, napsin A, p63, and CK5/6. *American Journal of Surgical Pathology*, 35(1), 15–25. <https://doi.org/10.1097/PAS.0b013e3182036d05>
- Neurauter, A. A., Bonyhadi, M., Lien, E., Nøkleby, L., Ruud, E., Camacho, S., & Aarvak, T. (2007). Cell isolation and expansion using dynabeads. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 106(August), 41–73. [https://doi.org/10.1007/10\\_2007\\_072](https://doi.org/10.1007/10_2007_072)
- Nickelson, J. (2021). Solunum sistemi. Pinterest. <https://tr.pinterest.com/pin/424605071096733465/>
- Ohkubo, T., & Ozawa, M. (2004). The transcription factor Snail downregulates the tight junction components independently of E-cadherin downregulation. *Journal of Cell Science*, 117(9), 1675–1685. <https://doi.org/10.1242/jcs.01004>
- Ooi, W. L., Elston, R. C., Chen, V. W., Bailey-Wilson, J. E., & Rothschild, H. (1986). Increased familial risk for lung cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. [https://doi.org/10.1016/s0169-5002\(86\)80686-9](https://doi.org/10.1016/s0169-5002(86)80686-9)

- Peinado, H., Zhang, H., Matei, I. R., Costa-Silva, B., Hoshino, A., Rodrigues, G., Psaila, B., Kaplan, R. N., Bromberg, J. F., Kang, Y., Bissell, M. J., Cox, T. R., Giaccia, A. J., Ertler, J. T., Hiratsuka, S., Ghajar, C. M., & Lyden, D. (2017). Pre-metastatic niches: Organ-specific homes for metastases. *Nature Reviews Cancer*, 17(5), 302–317. <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.6>
- Peters, P. J., Borst, J., Oorschot, V., Fukuda, M., Krahenbuhl, O., Tschopp, J., Slot, J. W., & Geuze, H. J. (1991). Cytotoxic T lymphocyte granules are secretory lysosomes, containing both perforin and granzymes. *Journal of Experimental Medicine*, 173(5), 1099–1109. <https://doi.org/10.1084/jem.173.5.1099>
- Pierzchalski, A., Mittag, A., Bocsi, J., & Tarnok, A. (2013). An Innovative Cascade System for Simultaneous Separation of Multiple Cell Types. *PLoS ONE*, 8(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074745>
- Planchard, D., & Le Péchoux, C. (2011). Small cell lung cancer: New clinical recommendations and current status of biomarker assessment. *European Journal of Cancer*, 47(SUPPL. 3). [https://doi.org/10.1016/S0959-8049\(11\)70173-3](https://doi.org/10.1016/S0959-8049(11)70173-3)
- Pope, C. A., Burnett, R. T., Thun, M. J., Calle, E. E., Krewski, D., Ito, K., & Thurston, G. D. (2002). Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. *Journal of the American Medical Association*. <https://doi.org/10.1001/jama.287.9.1132>
- Raulf-Heimsoth, M. (2008). T cell - primary culture from peripheral blood. *Methods in Molecular Medicine*, 138, 17–30. [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-366-0\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-366-0_2)
- Rekhtman, N., Tafe, L. J., Chaft, J. E., Wang, L., Arcila, M. E., Colanta, A., Moreira, A. L., Zakowski, M. F., Travis, W. D., Sima, C. S., Kris, M. G., & Ladanyi, M. (2013). Distinct profile of driver mutations and clinical features in immunomarker-defined subsets of pulmonary large-cell carcinoma. *Modern Pathology*, 26(4), 511–522. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2012.195>
- Rijavec, E., Genova, C., Alama, A., Barletta, G., Sini, C., Pronzato, P., Coco, S., Bello, M. G. D., Savarino, G., Truini, A., Boccardo, F., & Grossi, F. (2014). Role of

immunotherapy in the treatment of advanced non-small-cell lung cancer. *Future Oncology*, 10(1), 79–90. <https://doi.org/10.2217/fon.13.145>

Rodriguez-Canales, J., Parra-Cuentas, E., & Wistuba, I. I. (2016). Diagnosis and molecular classification of lung cancer. In *Cancer Treatment and Research*. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-40389-2\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-319-40389-2_2)

Russo, A., McCusker, M. G., Scilla, K. A., Arensmeyer, K. E., Mehra, R., Adamo, V., & Rolfo, C. (2020). Immunotherapy in Lung Cancer: From a Minor God to the Olympus. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1244, 69–92. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-41008-7\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-030-41008-7_4)

S-pluriBead® Mini Reagent Kit - pluriselect.com. (n.d.). Retrieved June 11, 2021, from <https://www.pluriselect.com/tr/s-pluribead-mini-reagent-kit.html>

Salem, I., Naranjo, N. M., Singh, A., DeRita, R., Krishn, S. R., Sirman, L. S., Quaglia, F., Duffy, A., Bowler, N., Sayeed, A., & Languino, L. R. (2020). Methods for extracellular vesicle isolation from cancer cells. *Cancer Drug Resistance*, 3(3), 371–384. <https://doi.org/10.20517/cdr.2019.118>

Salmon, H., & Donnadieu, E. (2012). Within tumors, interactions between T cells and tumor cells are impeded by the extracellular matrix. *OncoImmunology*, 1(6), 992–994. <https://doi.org/10.4161/onci.20239>

Samet, J. M. (1989). Radon and lung cancer. In *Journal of the National Cancer Institute*. <https://doi.org/10.1093/jnci/81.10.745>

Schorey, J. S., Cheng, Y., Singh, P. P., & Smith, V. L. (2015). Exosomes and other extracellular vesicles in host–pathogen interactions. *EMBO Reports*, 16(1), 24–43. <https://doi.org/10.15252/embr.201439363>

Schuster, M., Nechansky, A., Loibner, H., & Kircheis, R. (2006). Cancer immunotherapy. *Biotechnology Journal*, 1(2), 138–147. <https://doi.org/10.1002/biot.200500044>

Sellers, T. A., Bailey-wilson, J. E., Elston, R. C., Wilson, A. F., Elston, G. Z., Ooi, W. L., & Rothschild, H. (1990). Evidence for mendelian inheritance in the pathogenesis of lung

cancer. *Journal of the National Cancer Institute*.  
<https://doi.org/10.1093/jnci/82.15.1272>

Seo, N., Akiyoshi, K., & Shiku, H. (2018). Exosome-mediated regulation of tumor immunology. *Cancer Science*, 109(10), 2998–3004. <https://doi.org/10.1111/cas.13735>

Seo, N., Shirakura, Y., Tahara, Y., Momose, F., Harada, N., Ikeda, H., Akiyoshi, K., & Shiku, H. (2018). Activated CD8<sup>+</sup> T cell extracellular vesicles prevent tumour progression by targeting of lesional mesenchymal cells. *Nature Communications*, 9(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-02865-1>

Shaykhiev, R. (2015). Multitasking basal cells: Combining stem cell and innate immune duties. *European Respiratory Journal*, 46(4), 894–897. <https://doi.org/10.1183/13993003.00521-2015>

Shen, H., Spitz, M. R., Qiao, Y., Guo, Z., Wang, L. E., Bosken, C. H., Amos, C. I., & Wei, Q. (2003). Smoking, DNA repair capacity and risk of nonsmall cell lung cancer. *International Journal of Cancer*. <https://doi.org/10.1002/ijc.11346>

Shiels, M. S., Cole, S. R., Kirk, G. D., & Poole, C. (2009). A meta-analysis of the incidence of non-AIDS cancers in HIV-infected individuals. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*. <https://doi.org/10.1097/QAI.0b013e3181b327ca>

Sood, A. (2012). Indoor Fuel Exposure and the Lung in Both Developing and Developed Countries: An Update. In *Clinics in Chest Medicine*. <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2012.08.003>

Stamenkovic, I. (2003). Extracellular matrix remodelling: The role of matrix metalloproteinases. In *Journal of Pathology* (Vol. 200, Issue 4, pp. 448–464). *J Pathol*. <https://doi.org/10.1002/path.1400>

Stanke, F. (2015). The Contribution of the Airway Epithelial Cell to Host Defense. In *Mediators of Inflammation* (Vol. 2015). Hindawi Publishing Corporation. <https://doi.org/10.1155/2015/463016>

Steven, A., Fisher, S. A., & Robinson, B. W. (2016a). Immunotherapy for lung cancer.

Respirology, 21(5), 821–833. <https://doi.org/10.1111/resp.12789>

Steven, A., Fisher, S. A., & Robinson, B. W. (2016b). Immunotherapy for lung cancer. In *Respirology* (Vol. 21, Issue 5, pp. 821–833). Blackwell Publishing. <https://doi.org/10.1111/resp.12789>

Straif, K., Benbrahim-Tallaa, L., Baan, R., Grosse, Y., Secretan, B., El Ghissassi, F., Bouvard, V., Guha, N., Freeman, C., Galichet, L., & Cogliano, V. (2009). A review of human carcinogens--part C: metals, arsenic, dusts, and fibres. *The Lancet Oncology*, 10(5), 453–454. [https://doi.org/10.1016/s1470-2045\(09\)70134-2](https://doi.org/10.1016/s1470-2045(09)70134-2)

Teschner, D., Wenzel, G., Distler, E., Schnürer, E., Theobald, M., Neurauter, A. A., Schjetne, K., & Herr, W. (2011). In Vitro Stimulation and Expansion of Human Tumour-Reactive CD8 + Cytotoxic T Lymphocytes by Anti-CD3/CD28/CD137 Magnetic Beads. *Scandinavian Journal of Immunology*, 74(2), 155–164. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2011.02564.x>

Théry, C. (2011). Exosomes: Secreted vesicles and intercellular communications. In *F1000 Biology Reports* (Vol. 3, Issue 1, p. 15). Faculty of 1000 Ltd. <https://doi.org/10.3410/B3-15>

Thomas, A., & Giaccone, G. (2015). Why has active immunotherapy not worked in lung cancer? In *Annals of Oncology* (Vol. 26, Issue 11, pp. 2213–2220). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdv323>

Thorgeirsson, T. E., Geller, F., Sulem, P., Rafnar, T., Wiste, A., Magnusson, K. P., Manolescu, A., Thorleifsson, G., Stefansson, H., Ingason, A., Stacey, S. N., Bergthorsson, J. T., Thorlacius, S., Gudmundsson, J., Jonsson, T., Jakobsdottir, M., Saemundsdottir, J., Olafsdottir, O., Gudmundsson, L. J., ... Stefansson, K. (2008). A variant associated with nicotine dependence, lung cancer and peripheral arterial disease. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature06846>

Travis, W. D. (2012). Update on small cell carcinoma and its differentiation from squamous cell carcinoma and other non-small cell carcinomas. *Modern Pathology*, 25, 18–30. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2011.150>

- Travis, W. D., Brambilla, E., Burke, A. P., Marx, A., & Nicholson, A. G. (2015). Introduction to the 2015 World Health Organization Classification of Tumors of the Lung, Pleura, Thymus, and Heart. *Journal of Thoracic Oncology*, 10(9), 1240–1242. <https://doi.org/10.1097/JTO.0000000000000663>
- Trickett, A., & Kwan, Y. L. (2003). T cell stimulation and expansion using anti-CD3/CD28 beads. *Journal of Immunological Methods*, 275(1–2), 251–255. [https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(03\)00010-3](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(03)00010-3)
- Tumne, A., Prasad, V. S., Chen, Y., Stolz, D. B., Saha, K., Ratner, D. M., Ding, M., Watkins, S. C., & Gupta, P. (2009). Noncytotoxic Suppression of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Transcription by Exosomes Secreted from CD8+ T Cells. *Journal of Virology*, 83(9), 4354–4364. <https://doi.org/10.1128/jvi.02629-08>
- Türkiye kanser istatistikleri 2016. (2019).
- Üniversitesi, İ., Fakültesi, T., & Biyoloji, T. (2018). Derleme / Review Eksozomlar ve Kanserdeki Rollerini Süreyne Bozkurt. *Dicle Medical Journal*, 45(2), 209–217. <http://dergipark.gov.tr/download/article-file/474498>
- Use, T. (2020). Tütün Kullanımı. 137–142.
- Uslu, G. (2019). Analysing in-vitro effects of adipose-derived Mesenchymal stem cells Exosomes and alpha Lipoic Acid on breast cancer stem cells. Kocaeli Üniversitesi.
- W. DEAN WALLACE, M., & WILLIAM D. TRAVIS, M. (2016). PATHOLOGY: MALIGNANT AND INTERSTITIAL LUNG DISEASES. In Murray & Nadel's Textbook of Respiratory Medicine (sixth). Elsevier Inc.
- Wang, G., Dong, W., Shen, H., Mu, X., Li, Z., Lin, X., Liu, Y., & Du, J. (2011). A comparison of Twist and E-cadherin protein expression in primary non-small-cell lung carcinoma and corresponding metastases. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*, 39(6), 1028–1032. <https://doi.org/10.1016/j.ejcts.2011.01.023>
- Wang, G., Ma, W., Li, Y., Jiang, Y., Ma, G., Zhang, X., Meng, L., & Du, J. (2018). Prognostic value of Twist, Snail and E-cadherin expression in pathological N0 non-

- small-cell lung cancer: A retrospective cohort study. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*, 54(2), 237–245. <https://doi.org/10.1093/ejcts/ezy022>
- Wang, J., & Wang, X. (2014). Beyond chemotherapy and targeted therapy: Adoptive cellular therapy in non-small cell lung cancer. *Molecular Biology Reports*, 41(9), 6317–6323. <https://doi.org/10.1007/s11033-014-3514-x>
- Weaver, T. E., Na, C. L., & Stahlman, M. (2002). Biogenesis of lamellar bodies, lysosome-related organelles involved in storage and secretion of pulmonary surfactant. *Seminars in Cell and Developmental Biology*. <https://doi.org/10.1016/S1084952102000551>
- Wesserman, S. A., Minorsky, P. V., Urry, L. A., Reece, J. B., Jackson, R. B., & Urry, M. L. C. (2011). *Campbell Biyoloji* (9th ed.). Palme Yayınevi.
- Yaghi, A., & Dolovich, M. (2016). Airway Epithelial Cell Cilia and Obstructive Lung Disease. *Cells*, 5(4), 40. <https://doi.org/10.3390/cells5040040>
- Yang, Y. L., Chen, M. W., & Xian, L. (2014). Prognostic and clinicopathological significance of downregulated E-cadherin expression in patients with Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC): A meta-analysis. *PLoS ONE*, 9(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099763>
- Zheng, M. (2016). Classification and Pathology of Lung Cancer. *Surgical Oncology Clinics of North America*, 25(3), 447–468. <https://doi.org/10.1016/j.soc.2016.02.003>
- Zheng, Y. W., Li, R. M., Zhang, X. W., & Ren, X. B. (2013). Current adoptive immunotherapy in non-small cell lung cancer and potential influence of therapy outcome. *Cancer Investigation*, 31(3), 197–205. <https://doi.org/10.3109/07357907.2013.775294>

## Tez Denetleme Listesi

- Kapak ve iç kapak sayfalarında BİLİM UZMANLIĞI şeklinde elde edilen unvanlar yazıldı (Kapak sayfasına danışman adı yazılmamalıdır).
- Kapak sayfasına mezun olunan PROGRAMIN (Anabilim dalının değil) adı yazıldı.
- Tez kapağı sırt kısmına kılavuzda belirtilen şekilde (yazının yönüne dikkat!) ad, program, yıl yazıldı.
- Onay sayfası uygun şekilde hazırlandı (kazanılan unvanlar BİLİM UZMANLIĞI imzalatıldı (Enstitü Müdürü'nün imzası da gereklidir, imzaların aynı renk kalemle atılmasına dikkat edilmelidir).
- Dizinler kılavuzda belirtildiği gibi sıralandı.
- Ön sayfalara i, ii, iii şeklinde Romen rakamları konuldu.
- Sayfa numaraları kılavuzda belirtildiği şekilde konuldu.
- Sayfa düzeni kılavuzda belirtildiği şekilde yapıldı.
- Ana metin yazı boyutu 12 olacak biçimde yazıldı.
- Dipnot yazı boyutu 10 olacak şekilde yazıldı.
- Ana metin satır aralığı 1,5 olacak şekilde yazıldı.
- Kaynaklar alfabetik sıralamaya göre yazıldı.
- Kaynak gösterme ilkelerine ve yazım kurallarına uyuldu.
- Ekler kılavuzda belirtildiği gibi verildi.
- Lisansüstü eğitim sırasında yapmış olduğu yayınlar ve bildirimler eklendi.
- Teze ait intihal raporu eklendi.

..... / ..... / 2021

Yazar

İmza

..... / ..... / 2021

Danışman

İmza



