

**T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ GENEL CERRAHİ A.D.**

**DENEYSEL KİST HİDATİK VE MEME KANSERİ MODELİNDE GELİŞEN  
İMMÜN BASKILANMA KARACİĞERİ HEDEF ORGAN HALİNE GETİRİR**

**Dr. Nihan TURHAN**

**Uzmanlık Tezi  
Olarak Hazırlanmıştır**

**ANKARA**

**2014**

**T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ GENEL CERRAHİ A.D.**

**DENEYSEL KİST HİDATİK VE MEME KANSERİ MODELİNDE GELİŞEN  
İMMÜN BASKILANMA KARACİĞERİ HEDEF ORGAN HALİNE GETİRİR**

**Dr. Nihan TURHAN**

**Uzmanlık Tezi  
Olarak Hazırlanmıştır**

**Tez Danışmanı  
Prof. Dr. Osman ABBASOĞLU**

**ANKARA**

**2014**

## TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerini özveriyle aktaran, beraber çalışmaktan büyük gurur ve mutluluk duyduğum başta tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Osman ABBASOĞLU'na, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Ömer ARAN'a, Sayın Hocalarım; Prof. Dr. İskender SAYEK, Prof. Dr. Demirali ONAT, Prof. Dr. Zafer ÖNER, Prof. Dr. Volkan KAYNAROĞLU, Prof. Dr. Erhan HAMALOĞLU, Prof. Dr. Ataç BAYKAL, Prof. Dr. Kaya YORGANCI, Doç. Dr. M. Bülent TIRNAKSIZ, Doç. Dr. Yusuf Alper KILIÇ, Doç. Dr. Derya KARAKOÇ, Doç. Dr. Ali KONAN, Yrd. Doç. Dr. Ahmet Bülent DOĞRUL'a, çalışmamızda yardım ve emeklerini esirgemeyen Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Temel Onkoloji Anabilim Dalı'ndan Sayın Doç. Dr. Güneş ESENDAĞLI ve Dr. Gürcan TUNALI'ya, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'ndan Sayın Prof. Dr. Cenk Sökmensüer ve Dr. Özgür ÖZKAYAR'a, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndan Prof. Dr. Yakut AKYÖN YILMAZ'a, beraber çalıştığım tüm asistan arkadaşlarıma, hemşirelerimize ve yardımcı personelimize, ömrümün her anında yanımda olduklarını hissettiğim, destek ve sevgilerini benden esirgemeyen sevgili aileme teşekkürü bir borç bilirim.

*Dr. Nihan TURHAN*

## ÖZET

**Turhan N. , Deneysel kist hidatik ve meme kanseri modelinde gelişen immün baskılama karaciğeri hedef organ haline getirir. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Tezi, Ankara 2014**

Türkiye *E. granulosus* enfeksiyonunun endemik olduğu bölgeler arasında yer alır. *E. granulosus* antijen benzerliği sayesinde anti-tümör immün yanıtları artırabileceği yönünde görüşler mevcuttur. Karaciğer pek çok kanserde metastaz hedef organları arasında yer alır. Bu çalışmada, karaciğerde *E. granulosus* enfeksiyonu ile oluşacak immün yanıtlardaki değişikliklerin meme kanserinin karaciğer ve diğer organ metastazları üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Çalışmada beş haftalık dişi BALB/c fareler kullanılarak dört adet deney grubu oluşturuldu. Başlangıçta kontrol (n=5) ve meme kanseri (n=6) gruplarında bulunan farelere intraperitoneal olarak 0.5 ml fizyolojik salin enjekte edildi. Kist hidatik (n=8) ve kist hidatik + meme kanseri (n=10) gruplarına 0.5 ml 1xPBS (fosfat tamponlanmış tuz çözeltisi) içerisinde 3000 *E. granulosus* protoskoleksi intraperitoneal yolla inoküle edilerek oluşturuldu. Deneysel meme kanseri, 4T1 tümör hücreleri ( $5 \times 10^4$  hücre/100  $\mu$ l) 17 haftalık dişi BALB/c farelerin meme dokusuna subkütan olarak enjekte edilerek meydana getirildi. Tüm denekler 16. hafta başında sakrifiye edildi. Tümör, karaciğer ve dalak dokuları makroskopik, histopatolojik ve akım sitometri analizi ile immünolojik olarak değerlendirildi.

Sonuçta, kist hidatik ve meme kanseri grubunda karaciğerde kist hidatik enfeksiyonu gelişimi ve kanser metastazının arttığı gözlemlendi. Bu durum immünolojik olarak değerlendirildiğinde, kist hidatik+meme kanseri grubunda hem tümör hem de metastaz ölümüne neden olan Th1 tipi immün yanıtların (CD4+IFN- $\gamma$  + ve CD4 +CCR5 + T lenfosit alt-tipleri) karaciğerde belirgin olarak düştüğü ve immün yanıtları baskılayıcı CD4 +CD25 + düzenleyici T lenfosit (Treg) oranının arttığı gözlemlendi.

Gerçekleştirdiğimiz deneysel *E. granulosus* ve meme kanseri modelinde, ekinokok enfeksiyonunun karaciğerde immün baskılama yaratarak, bu organı metastaz hedefi haline getirebileceği yönünde bulgulara ulaşılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** *Echinococcus granulosus*, kist hidatik, meme kanseri, karaciğer, metastaz, immünoloji

**Destekleyen Kurum:** Bu çalışma Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) – tarafından desteklenmiştir. (Proje no.111S392)

## ABSTRACT

**Turhan N. , In experimental *Echinococcus* infection and breast cancer model, liver becomes target organ upon reduction in immune responses. Hacettepe University Faculty of Medicine, Department of General Surgery, Dissertation, Ankara 2014.**

Turkey is included in the endemic regions for *Echinococcus granulosus* infections. It is believed that due to its antigenic similarity Liver is the target organ in many cancers. Strong immune responses are one of the factors that can hinder the tumor cells' dissemination. In this study, the change in immune responses in liver during *E. granulosus* infection and its effect on breast cancer's liver and other organ metastases were investigated.

Four experimental groups were formed with five-week-old inbred female BALB/c mice. At the beginning, animals in the control group (n=5) and in the breast cancer group (n=6) were intraperitoneally injected with physiological saline solution (0.5 ml) whereas the Echinococcus infection group (n=8) and the Echinococcus infection and breast cancer group (n=10) received 3000 viable protoscoleces suspended in 0.5 ml physiological saline. On the 13<sup>th</sup> week, 4T1 cells ( $5 \times 10^4$  cells/100  $\mu$ l) were inoculated into the right-inguinal mammary fat pad of the mice in the breast cancer group and in the Echinococcus infection and breast cancer group. The other groups were injected with physiological saline. By the end of 15<sup>th</sup> week (3 weeks after the cancer cells' inoculation), the animal experiments were terminated. In this study, the change in immune responses in liver during *E. granulosus* infection and its effect on breast cancer liver and other organ metastases were investigated by macroscopy, histopathological examination and immunological analyses performed with flow cytometry.

In the experimental *E. granulosus* infection and breast cancer model, both hydatid cyst formation and cancer metastasis were increased in the liver. In addition, Th1 type of immune responses (CD4+IFN- $\gamma$ + and CD4+CCR5+ T cells), which is associated with metacestode killing and anti-tumor immunity, was significantly decreased in the liver. In addition, the amount of CD4+CD25+ regulatory T (Treg) cells that are immune suppressive was increased. These experimental data indicate

that simultaneous presence of *E. granulosus* infection and cancer may be destructive for the liver.

**Keywords:** *Echinococcus granulosus*, hydatid cyst, breast cancer, liver, metastasis, immunity

This study is supported by TÜBİTAK (Project no.111S392).

## İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	viii
KISALTMALAR	x
ŞEKİLLER	xi
TABLolar	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Kist Hidatik	4
2.1.1. <i>Echinococcus granulosus</i> 'un Yaşam Döngüsü	4
2.1.2. İnsanlarda Kist Hidatik Enfeksiyonu	5
2.2. Meme Kanseri	6
2.2.1. Tarihçe	6
2.3. Bağışıklık Sistemi	9
2.4. Doğuştan Bağışıklık Sistemi	9
2.5. Edinsel Bağışıklık Sistemi	9
2.6. Bağışıklık Sistemi Hücreleri	10
2.6.1. Lenfositler	10
2.7. Antijen Sunan Hücreler (APC)	13
2.8. Lenfoid Dokular	13
2.9. Hücre Aracılıklı İmmün Reaksiyonlar	13
2.10. Meme Kanseri ve İmmünite	14
2.11. Kist Hidatik Enfeksiyonu ve Hücre İmmünite	16
2.12. Karaciğer Tümörü ve Hücre İmmünite	17
3. YÖNTEM ve GEREÇLER	19
3.1. Deney hayvanları ve Deney Protokolü	19
3.1.1. Deney Grupları Oluşturulması	19
3.1.2. <i>Echinococcus granulosus</i> Protoskolekslerinin Elde Edilmesi	21
3.1.3. Deneysel <i>Echinococcus granulosus</i> Enfeksiyonu Geliştirilmesi	23



3.1.4.	Deneysel Meme Kanseri Oluşturulması	23
3.2.	Akım Sitometri	24
3.3.	Histopatolojik Analizler	24
3.4.	İstatistiksel analizler	25
4.	BULGULAR	26
4.1.	Deneysel Kist Hidatik ve Meme Kanseri Modellerinin in vivo ve Histopatolojik Analizleri	26
4.2.	Deney Gruplarında Karaciğer, Dalak ve Tumor Dokularında Bulunan Lenfoid Hücrelerin İmmüfenotipik Analizleri	32
5.	TARTIşMA	44
6.	SONUÇ	49
7.	KAYNAKLAR	50

## KISALTMALAR

E. granulosus	Echinococcus granulosus
CD	Cluster of Differentiation
Treg	T regulatory ( T düzenleyici)
SF	Fizyolojik Salin
PBS	Fosfat tamponlanmış tuz çözeltisi
Th	T helper (Yardımcı T hücresi)
BCG	Bacillus Calmette-Guerin
IL	Interleukin
NK	Natural Killer (Doğal Öldürücü)
APC	Antigen Presenting Cell) Antijen sunan hücre
Ig	Immunoglobulin
TIL	Tümöre infiltre lenfositler
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor Beta
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
INF- $\gamma$	Interferon Gama
AFP	Alfa Feto Protein
i.p	İntraperitoneal
s.c	Subkütan
gr	Grup
Tm	Tümör
Kont	Kontrol
KH	Kist Hidatik
Ca	Kanser
MCa	Meme kanseri
FSC	Forward Scatter; büyüklük
SSC	Side Scatter; granülarite
CCR	Chemokine Receptor

## ŞEKİLLER

Şekil-1.	Deney gruplarının oluşturulması sırasında gerçekleştirilen uygulamaların zamana bağlı olarak şematik gösterimi.	20
Şekil-2.	Protoskoleks izolasyonu	22
Şekil-3.	Koyun karaciğerinden elde edilen kistlerin histopatolojik analizi	23
Şekil-4.	Deney gruplarının ağırlık verileri ve ortalama tümör çapları.	26
Şekil-5.	Deney gruplarından diseksiyon öncesi ve sonrası temsili resimler.	29
Şekil-6.	Tümör, metastaz ve kist varlığının histopatolojik olarak değerlendirilmesi.	30
Şekil-7.	Akım sitometrik immünofenotiplendirme deneyleri sırasında kullanılan hücre analiz stratejisi gösterilmiştir.	33
Şekil-8.	Deney gruplarından toplanan farklı dokulardan elde edilen hücrelerin büyüklük (FSC) - granülarite (SSC) değerlendirmesi ile lenfoid hücrelerin seçilme (kırmızı çokgen ile işaretli) aşamasına ait temsili nokta saçılım grafikleri görülmektedir.	34
Şekil-9.	Deney gruplarının farklı dokularına ait lenfoid hücrelerin CD4 ve CD8 belirteçlere göre dağılımını gösteren temsili akım sitometri grafikleri.	35
Şekil-10.	Deney gruplarının farklı dokularına ait (A) CD4 pozitif ve (B) CD8 pozitif lenfoid hücreler üzerinde gerçekleştirilen CD25 ekspresyon analizini gösteren temsili akım sitometri histogramları.	36
Şekil-11.	Deney gruplarının dalak dokularına ait A) CD4 pozitif, (B) CD8 pozitif, (C) CD4 hücrelerin içerisindeki CD4+CD25+ ve (D) CD8 hücrelerin içerisindeki CD8+CD25+ lenfoid hücrelerin düzeyleri görülmektedir. En az üç bağımsız deney sonucuna ait ortalama ve standart sapma değerleri gösterilmiştir (* $P < 0.05$ , ** $P < 0.01$ ).	37
Şekil-12.	Deney gruplarının karaciğer dokularına ait (A) CD4 pozitif, (B) CD8 pozitif, (C) CD4 hücrelerin içerisindeki CD4+CD25+ ve (D) CD8 hücrelerin içerisindeki CD8+CD25+ lenfoid hücrelerin düzeyleri görülmektedir. En az üç bağımsız deney sonucuna ait ortalama ve standart sapma değerleri gösterilmiştir (* $P < 0.05$ ).	38

- Şekil-13. Meme kanseri ve meme kanseri + kist hidatik deney gruplarının dalak, karaciğer ve tümör dokularına ait (A) CD4 hücrelerin içerisindeki CD4+CD25+ ve (B) CD8 hücrelerin içerisindeki CD8+CD25+ lenfoid hücrelerin düzeyleri görülmektedir. En az üç bağımsız deney sonucuna ait ortalama ve standart sapma değerleri gösterilmiştir (\* $P<0.05$ ). 39
- Şekil-14. Deney gruplarının farklı dokularına ait CD4 pozitif lenfoid hücrelerin CCR3 ve CCR5 belirteçlere göre dağılımını gösteren temsili akım sitometri nokta saçılım grafikleri. 40
- Şekil-15. CCR5 reseptörünü taşıyan CD4+ lenfoid hücrelerin (A) dalak ve (B) karaciğerdeki düzeyi görülmektedir. C) Meme kanseri ve meme kanseri + kist hidatik deney gruplarının dalak, karaciğer ve tümör dokularına ait CD4 hücrelerin içerisindeki CD4+CCR5+ lenfoid hücrelerin düzeyleri görülmektedir. En az üç bağımsız deney sonucuna ait ortalama ve standart sapma değerleri gösterilmiştir (\* $P<0.05$ ). 41
- Şekil-16. Deney gruplarının dalak ve karaciğer dokularına ait CD4 pozitif lenfoid hücrelerin (A) IFN- $\gamma$  ve (B) IL-4 ekspresyon analizini gösteren temsili akım sitometri histogramları. 42
- Şekil-17. IFN- $\gamma$  (A, C) ve IL-4 (B, D) sitokinlerini eksprese eden CD4+ lenfoid hücrelerin (A, B) dalak ve (C, D) karaciğerdeki düzeyi görülmektedir. En az üç bağımsız deney sonucuna ait ortalama ve standart sapma değerleri gösterilmiştir (\* $P<0.05$ ). 43

**TABLolar**

- Tablo-1. Protoskoleks enjeksiyonu yapılan deney gruplarında kist hidatik veya kiste bağlı olduğu düşünölen granöloomatöz lezyon dağılım tablosu. 31
- Tablo-2. Meme kanseri hücresi enjeksiyonu yapılan deney gruplarında metastazların hedef organlara göre dağılım ve sıklık tablosu. 31

## 1. GİRİŞ

Neoplastik hücreler, immün keşif sırasında, çeşitli mekanizmalar aracılığıyla konağın immün sisteminden saklanırlar. Bu nedenle immün sistem tümör hücrelerini tanımakta zorlanır ve aktive olamaz. Tespit edilemeyen tümör hücrelerine karşı bir immün cevap oluşmadığı için tümörler konakta çoğalarak yaşamaya devam ederler. Ancak, immün sistemin özgül olmayan yollarla aktive edilmesinin anti-tümör yanıtlara neden olduğu bilinmektedir. Bu uyarım özellikle bazı enfeksiyöz mikroorganizmalar veya bunlara ait ürünler tarafından sağlanabilir.

Örneğin, Bacillus Calmette-Guerin (BCG) aşısının mesane karsinomlarında kullanımında immün sistemin kompleks ve uzun etkili aktivasyonunun etkisi olduğu belirtilmiştir (1). Benzer şekilde *Listeria monocytogenes*, *Corynebacterium parvum* gibi bakteri veya *Toxoplasma gondii*, *Besnoitia jellisoni* gibi protozoa enfeksiyonlarına karşı gelişen immün yanıtların aynı zamanda neoplazi gelişimini de baskılayabildiği gözlenmiştir (2). Bu enfeksiyöz ajanları ortadan kaldırmak üzere gelişen pro-inflamatuvar yanıt dolaylı olarak tümörle savaşmak üzere geliştirilmiş ve daha sonra tümör tarafından baskılanmış olan immün sistem bileşenlerini de aktive eder. Özellikle artan tümör nekroz faktör- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interlökin-12 (IL-12), IL-18 ve interferon- ( $\text{IFN-}\gamma$ ) gibi sitokinler anti-tümör immünitesinde görev alan CD8+ sitotoksik T lenfositleri ve doğal öldürücü (natural killer, NK) hücrelerin aktivitesini destekler. Yardımcı CD4+ T lenfositler ise tip 1 (Th1) yönünde farklılaşarak bu yanıtı ilerletirler (3).

Tümör antijenleri ile *Echinococcus granulosus* enfeksiyonu sonucu oluşan antijenler arasında benzerlik olduğu gösterilmiştir. Örneğin, kanser-ilişkili O glikozillenmiş Tn antijeni (cancer-associated O-glycosylated Tn antigen) meme kanserleri dahil çeşitli kanserlerin erken döneminde eksprese olur. Bu otoantijeni içeren aşı preparatlarının ise ileri evre meme kanserlerinde sitotoksik T lenfosit yanıtlarını artırabileceği bildirilmiştir (4)

Karaciğer, meme kanserinin metastaz hedef organları arasında yer alır. Özellikle deney hayvanlarında oluşturulan meme kanseri modellerinde metastaz odakları akciğer ve karaciğerde yoğunlaşmaktadır (5).

Çalışmamızda karaciğer metastaz modeli olarak meme kanserinin seçilme nedeni, meme kanserinin toplumda sık görülmesi ve meme kanseri deneysel modeli oluşturulması konusunda merkezimizde bilgi birikimi olmasıdır.

*Echinococcus granulosus* ile enfekte edilmiş deney hayvanlarında, enfeksiyonun farklı zamanlarında karaciğerdeki pek çok genin ekspresyon düzeylerinin etkilendiği ve metabolik yollarda değişikliklere neden olduğu mikrodizin analizleri ile belirlenmiştir (6).

Hastaya ve hastalığa özgü immünoterapinin günümüz koşullarında kullanıma girememesi, bağışıklık sistemindeki birçok basamağın henüz aydınlatılmamış olmasına bağlıdır.

Kist hidatik toplumda sık görülen bir hastalık olmasına rağmen, eş zamanlı bir malignite ile birlikte olduğu yayınlara literatürde nadiren rastlanmaktadır. Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Genel Cerrahi Anabilim Dalı tarafından yapılan bir çalışmada, 1990-2001 yılları arasında tümör cerrahisi uygulanan 2086 hasta kist hidatik prevalansı açısından değerlendirilmiştir. Tümör cerrahisi uygulanan hasta grubu ile 350 hastadan oluşan travma nedeniyle cerrahi operasyon uygulanan ve daha önceden bilinen ek hastalığı olmayan ikinci bir hasta grubu kıyaslanmıştır. Ayrıca, kist hidatik tanısı olanlarda eşlik eden kanser birlikteliğini göstermek amacıyla, 1968-2001 yılları arasında kist hidatik tedavisi almış 1000 hasta retrospektif olarak değerlendirilmiştir. Çalışma sonucunda kist hidatik ve kanser birlikteliği yalnızca iki hastada gösterilmiştir. Hastalardan ilki primer gastrik karsinomu olan 52 yaşında kadın, diğeri ise 54 yaşında karaciğer tümörü olan erkek hasta olarak bildirilmiştir. Her iki hastada da karaciğer kist hidatiği saptanmış ve lezyonlar cerrahi olarak çıkartılmıştır. Buna karşın travma nedeniyle değerlendirilen 350 hastadan yedisinde kist hidatik saptanmıştır. Bu değer toplumumuzda rastlanan genel kist hidatik prevalansı ile uyumlu (%2) olarak değerlendirilmiştir. Retrospektif olarak değerlendirilen 1000 hidatik kist hastasının sadece birinde karsinom varlığı saptanmıştır. Sonuç olarak, kist hidatik insidansı kanser hastalarında daha düşük bulunmuştur. Kist hidatikli hastalarda ise, maligniteye rastlanma olasılığının daha düşük olabileceği yönünde klinik gözlem yapılmıştır (7).

Kist hidatik oluşumunun gerek karaciğer homeostazını değiştirmesi gerekse anti-tümör immün yanıtları artırabilme olasılığı göz önünde bulundurulduğunda,

*Echinococcus granulosus* enfeksiyonu ve meme kanserinin karaciğer metastazları arasındaki etkileşim araştırmaya değerdir.

*Echinococcus granulosus* enfeksiyonu ve kist hidatik oluşumu karaciğer homeostazını ve immün yanıtları değişikliğe uğratabilir. Karaciğer pek çok kanserde metastaz hedef organları arasında yer alır. Bu süreçte immün yanıtların güçlü olması tümörün yayılımını engelleyebilecek faktörlerden biridir.

*Echinococcus granulosus* ve kanser gelişimi veya metastaz arasındaki ilişki henüz kesin olarak ortaya konulamamıştır.

Bu çalışmada, karaciğerde *Echinococcus granulosus* enfeksiyonu ile oluşacak immün yanıtlar ve karaciğer homeostazındaki değişikliklerin meme kanserinin karaciğer ve diğer organ metastazları üzerindeki etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Kist Hidatik

Kist hidatik enfeksiyonu sestod ailesinde yer alan *Ekinokok* (*Echinococcus*) cinsinin larvasının neden olduğu zoonotik bir enfeksiyondur (8, 9).

#### 2.1.1. *Echinococcus granulosus*'un Yaşam Döngüsü

Parazitin yaşam döngüsünde iki adet memeli konak bulunmaktadır. Erişkin sestod, etobur konağın (köpek, kurt...) ince barsağında yaşar ve enfektif onkosferler üretir. Serbest yumurtalar ya da yumurta içeren sestod segmentleri etobur konağın barsağından çevreye yayılır. Ara konak olan otobur (koyun, keçi, at, deve...) memelinin yumurtaları oral yolla almasından sonra, ara konağın iç organlarında larval, metasestod formu oluşur. Ara konakta yerleşen metasestod formu, enfektif gücü olan çok sayıda protoskoleks üretir. Protoskoleks ana konak tarafından alındığında, ana konakta sestoda dönüşür. Parazitin doğal yaşam döngüsünde bulunmamasına rağmen, ana konaktan çevreye saçılan yumurtaların oral yolla alınmasıyla insanlar ve diğer bazı canlılar kazara enfekte olurlar. *Echinococcus granulosus*'un sestod formu etobur ana konağı enfekte ettiğinde morbiditeye neden olmaz. Diğer taraftan, metasestod formu, ara konakta ve tesadüfî konakta morbiditeye ve hatta mortaliteye neden olabilen ekinokozis enfeksiyonuna neden olur (9-11).

Enfeksiyona neden olduğu bilinen altı grup ekinokok türü bildirilmiştir. Bunlardan kist hidatik enfeksiyonuna yol açan *Echinococcus granulosus* ve alveolar kist hidatik etkeni olan *Echinococcus multilocularis* ve polikistik ekinokoz etkeni olan *Echinococcus oligarthrus* insanda enfeksiyona neden olmaktadır. Diğer zoonotik enfeksiyonlara yol açan gruplar, *Echinococcus vogeli*, *Echinococcus shiquicus* ve *Echinococcus felidis*'dir (8).

*E. granulosus* Türkiye'de en sık enfeksiyona neden olan alt gruptur. *E. multilocularis*'in neden olduğu alveolar kist hidatik daha çok Anadolu'nun doğu bölgelerinde görülmektedir.

*E. granulosus*, yaklaşık 2-7 mm uzunluğunda yassı parazittir. Ortalama üç segmentten (proglotid) oluşurlar. Mitokondrial DNA üzerinde yapılan çalışmaların sonucunda *E. granulosus* için 10 farklı genotip bildirilmiştir. Her bir türün dünyadaki dağılımı, konak özgüllüğü, antijenite, kemotörapatiklere duyarlılık, patolojiye ait özellikleri bakımından farklılıklar bulunmaktadır. Bu özellikler aşıların geliştirilmesinde, tanıda kullanılacak belirteçlerin belirlenmesinde, tedavide kullanılan ilaçların etkinliğinde önemli rol oynamakta, dolayısıyla hastalığın epidemiyolojisi ve kontrolünü belirlemektedir. İnsanlarda en sık kistik ekinokkoza neden olan ve tüm dünyada en yaygın olan genotip G1'dir. Özellikle koyun çiftliklerinin yoğun olduğu coğrafi alanlarda daha baskın olarak görülmektedir. Türkiye, İran, Fas, Tunus, Kenya, Kazakistan, Batı Çin ve Arjantin gibi endemik bölgelerde en sık G1 genotipi görülmektedir (8).

Hem kist hidatik hem de alveolar kist hidatik ülkemizde endemik olarak görülmesine rağmen bu hastalıklara yönelik epidemiyolojik çalışmalar oldukça azdır. Çalışmalar genelde retrospektif olarak hastane kayıtlarının incelenmesi ile yapılmaktadır. Ülkemizde ekinokokozis ile ilgili ilk yazılı kaynak Osmanlı dönemine dayanmaktadır. C.R. Katibian 1872 yılında '*Kyste hydatique multilokulaire*' isimli yazısıyla insanda alveolar kist hidatik enfeksiyonunu ilk defa tanımlamıştır. Daha sonra, Türkiye Cumhuriyeti kurulduktan sonra 1939 yılında, Kamile Aygün ilk kez insanda kist hidatik enfeksiyonunu tanımlamıştır. Sağlık Bakanlığı'nın verilerine göre 1987-1994 yılları arasında 21.303 hasta (yıllık 2663 hasta) kist hidatik nedeniyle ameliyata alınmıştır. Aydınoglu yıllık ameliyat edilen hasta oranını yıllık 100.000'de 0,87-6,6 olarak bildirmiştir (44). Türkiye'de köpeklerde *E. granulosus* enfeksiyonu sıklığı bölgelere göre dağılım değişiklik göstermekle beraber, veriler %0,32 ile % 40 arasında değişmektedir (12).

### **2.1.2. İnsanlarda Kist Hidatik Enfeksiyonu**

Kist hidatik, *E. granulosus* metasestodunun değişik organlarda berrak sıvı içeren kist oluşturduğu bir hastalıktır. Metasestod, internal selüler (germinal) tabaka ve eksternal aselüler (laminal) tabakalardan oluşur. Boyutu yaklaşık 60-70 µm'dir. Oral yolla vücuda alınır ve endokist oluşur. Endokist büyümeye başlar ve granülomatöz doku reaksiyonu gelişir. Bunu fibröz doku reaksiyonu izler ve bağ

dokudan oluşan perikist ile endokist çevrelenir. İnsanda oluşan kistik lezyonun boyutu değişiklik göstermekle beraber, 1 cm'den 20 cm'ye kadar boyutlarda bildirilen lezyonlar mevcuttur. İnsandaki kistik lezyonlarda protoskoleks gelişimin enfeksiyondan ortalama 10 ay sonra gerçekleştiği düşünülmektedir. Protoskoleks gelişimi boyut ile ilişkili değildir. Protoskoleks üretimi olmayan kistler üretken kabul edilmez. Kistler tek kistik yapıdan oluşan unilokuler yapıda veya kız veziküller içeren multiloküle yapıda olabilir (9, 13).

Kist hidatik enfeksiyonu vücutta çok farklı organlarda görülebilir. Hastaların yaklaşık %40-50'sinde tek organda ve tek kist şeklinde bulunurlar. Çalışmalarda kist hidatik enfeksiyonunun en sık (%65-75) karaciğerde görüldüğü bildirilmiştir. Oral yolla alınan yumurtaların portal sistemden geçmesi nedeniyle karaciğer en çok etkilenen organdır. Akciğer, böbrek, dalak, beyin, kemik, overler gibi diğer organlarda da kist hidatik enfeksiyonu görülür.

*E. granulosus* yumurtalarının oral yolla alındıktan sonra dolaşıma geçerek farklı organlarda enfeksiyona neden olmasına primer kist hidatik enfeksiyonu denir. Spontan ya da travma sonucu kistik rüptürü ile protoskoleks ve kız veziküllerin etrafa saçılması ile sekonder kist hidatik enfeksiyonu oluşur (11).

## **2.2. Meme Kanseri**

Meme kanseri nedeni anlaşılammakla birlikte, çağlar boyunca cerrahların dikkatini çekmiştir. Yüzyıllardır yapılan teorik araştırma ve bilimsel incelemelere rağmen, meme kanseri insanlardaki en örkütücü hastalıklardan biri olmaya devam etmektedir (14).

### **2.2.1. Tarihçe**

Meme kanseri ile ilgili olarak ilk belgeler Milattan önce 3000-2500 yılları arasında eski Mısır'da İmhotep tarafından yazılan tıbbi bir papirusa dayanmaktadır. Bu yazılarda erkek hastalarda meme kanseri tanımlanmakta ve 'tedavisi yoktur' şeklinde belirtilmektedir. Birinci yüzyıla kadar meme kanseri ile ilgili ancak birkaç yazılı kaynak bulunmaktadır. İskenderiye okulunun yetiştirdiği Leonides Milattan sonra 100 yılında tarihte ilk defa mastektomi ve aksiler küretaj ile meme kanseri tedavi etmiştir. Aynı zamanda koterizasyon ve damar bağlama tekniklerini

kullanmıştır. Orta çağda baskın olan Galen'in görüşlerine göre hastalığın temeli kara safraya bağlanmış ve vücudun herhangi bir bölgesinde ortaya çıkan oluşumun sistemik dengeyi tedavi edemeyeceğini öne sürmüştür. Cerrahi tedavi sonrası damarlar bağlanmamış, kanın akması ile kara safranın vücuttan uzaklaştırıldığı düşünülmüştür. Daha sonra 18. Yüzyılda Henri LeDran meme kanserinin lokal bir hastalık olduğunu öne sürmüş ve lenf damarları ile aksiller lenf düğümlerine yayıldığını belirtmiş, cerrahi tedaviyi ön plana çıkartmıştır. Halsted ve Meyer, 1894'de radikal mastektomiye çağın en büyük tedavi gelişmesi olarak ilan etmişler. Radikal mastektomide meme, üzerini örten cilt, majör ve minör pektoral kaslar ve aksiller doku bir bütün olarak çıkartılmış ve cilt defekti greft ile kapatılmıştır. Radikal mastektomi yaptıkları hastalarına düzey I-II-III aksiler lenf düğümü eksizyonu yapmışlar, nervus torasikus longus ve torakodorsal nörovasküler aksiler pedikülü rutin olarak eksize etmişlerdir. Patey ve Dyson, 1948 yılında pektoralis major kasının korunduğu modifiye radikal mastektomi ameliyatını savunmuşlar. Fisher ve arkadaşları meme kanserinin sistemik bir hastalık olduğunu ve hastalığın prognozunu belirleyen asıl faktörün yapılan lokal tedavilerin şekli değil, sistemik tedavilere olan yanıt olduğunu belirtmiştir.'Etkili sistemik tedavi' fikri öne sürülmüştür. Bu görüşler ışığında çok sayıda kontrollü randomize çalışmalar yapılmış ve sistemik tedavi protokolleri ve meme koruyucu cerrahi tedavi seçenekleri geliştirilmiştir (14, 15).

Yüzyıllardır süren tedavi arayışlarına rağmen meme kanseri oluşumunda rol oynayan esas etkenler ve hastalığın tamamen şifasını sağlayacak tedavi seçenekleri henüz bulunamamıştır.

Amerika Birleşik Devletleri verilerine göre, 2010 yılında saptanan 207.090 meme kanseri hastasının 39.840'ı metastaz nedeniyle hayatını kaybetmiştir. Yıllar içerisinde meme kanseri mortalite oranı azalmasına rağmen, 5 yıllık sağ kalım, evre 4 hastalığı olan hastalar için ortalama %23 olarak bildirilmektedir (16, 17).

Meme kanseri metastazı en sık kemik, karaciğer, akciğerler ve beyine olmaktadır. Tedavi yaklaşımı ileri evre meme kanseri olan hastalar için sistemik tedavi ve metastaz olan bölgelere lokal radyoterapi ve radyofrekans ablasyon uygulamalarını içermektedir (18). Cerrahi tedavi cilde açılan tümörü olan hastalarda,

progresif nörolojik kaybı olan beyin metastazlarına, kord basısı olan vertebra metastazlarına ve patolojik kırığı olan hastalara palyatif amaçlı uygulanmaktadır. Ancak, retrospektif çalışmalarda karaciğer metastazı olan ileri evre meme kanseri hastalarında cerrahi tedavinin etkili olabileceği bildirilmiştir. Hastanın yaşı, primer tümörün histopatolojik evresi, lenf düğümü tutulumu, karaciğer metastazları gelişinceye kadar geçen süre, hepatektominin sınırları, karaciğer metastazlarının sayısı, en büyük metastazın boyutu, karaciğer dışında metastazlarının olması, hormonal reseptör pozitifliği ve HER2 reseptör durumu, ileri evre meme kanseri olan hastalarda cerrahi tedaviye yanıtı etkileyen faktörler olarak bildirilmiştir. Bu faktörlerin hastaya özel olarak değerlendirildikten sonra uygun olan hastalarda cerrahi tedavi planının belirlenmesi önerilmektedir (19, 20).

Deneysel meme kanseri oluşturulması için 4T1 meme kanseri hücreleri kullanılmaktadır.

4T1 meme kanseri ilk kez Fred Miller ve arkadaşları tarafından 1992 yılında tanımlanmış, transplante edilebilen kanser hücreleridir (21). 4T1 meme kanseri hücreleri BALB/c farelerde ve doku kültüründe yaşayabilir. Bu hücreler yüksek derecede invazif özellik gösterirler. Meme dokusundaki primer lokalizasyonundan lenf düğümü, kan, karaciğer, akciğer, beyin ve kemik başta olmak üzere diğer dokulara metastaz yaparlar.

4T1 meme kanseri hücrelerinin deneysel çalışmalarda tercih edilme nedenlerini şöyle sıralayabiliriz; Öncelikle meme dokusuna kolayca ekiminin yapılabilmesi sayesinde bu hücreler anatomik olarak doğru bölgede tümör oluşmasını sağlarlar. İkincisi, primer tümörden metastaz gelişimi spontan olarak insan meme kanserine benzer olarak gelişir. Metastaz bölgeleri insan meme kanseriyle benzerlik gösterir. Diğer bir avantajı, primer tümör cerrahi olarak eksize edildikten sonra metastaz gelişen bölgelerde çalışmaların devamı sağlanabilir. Bu hücrelerin in vivo ve in vitro deneylerde kullanımlarının uygun olması, son zamanlarda yapılan CD4+ ve CD8+ T lenfositlerin aktivasyonunu hedefleyen immünoterapi çalışmalarında kullanımlarını mümkün kılmıştır (5).

### **2.3. Bağışıklık Sistemi**

Vücuda giren yabancı maddelerin (antijenlerin) organizmaya girmesi ile birçok biyolojik reaksiyon meydana gelir. Bu reaksiyonların tümüne bağışıklık denir. Bağışıklık olaylarında rolü olan organ ve hücrelere bağışıklık sistemi ya da immün sistem adı verilir.

Bağışıklık, doğuştan bağışıklık ve edinsel bağışıklık olarak iki grupta değerlendirilir (22).

### **2.4. Doğuştan Bağışıklık Sistemi**

Doğuştan bağışıklık, adından da anlaşıldığı gibi canlının doğumuyla beraber kazanmış olduğu doğal direnç mekanizmasıdır. Doğuştan gelen bağışıklık sistemi özgül olmayan yolla koruma sağlayan hücreleri ve mekanizmaları kapsayan bir bağışıklık sistemidir. Bu sistem anlık savunmadan sorumludur. Uzun süreli korumada görev almaz (8).

### **2.5. Edinsel Bağışıklık Sistemi**

Edinsel bağışıklık sisteminin hücreleri, kanda ve lenfatik sistemde serbest olarak, lenfatik organlardaki anatomik lokalizasyonlarında ve tüm diğer dokularda dağıntık olarak bulunurlar. Enfeksiyöz ajanlara yanıt olarak bağışıklık sisteminde farklı mekanizmalar çalışmaktadır. Birincisi, periferik lenfoid organlar çeşitli mikroplara vücuda giriş yerlerinde müdahale eder. İkinci olarak bazı farklılaşmamış lenfositler (daha önce antijen ile karşılaşmamış) periferik lenfoid organlara göç ederek yeni antijenlerin tanır ve immün cevabı başlatırlar. Üçüncü yöntem ise farklılaşmış lenfositler kan dolaşımına katılarak enfeksiyöz ajanın vücuda girdiği yerden daha uzak bölgelerde elimine eder ve böylece sistemik etki sağlarlar. Bağışıklık sisteminin düzgün şekilde çalışması, bağışıklık sistemi hücrelerinin ve dokularının kritik rol aldığı çok basamaklı yolaklar ile sağlanabilmektedir (22).

Bağışıklık sistemini oluşturan hücre, doku ve organların özelliklerinin açıklanması bu yolakların daha iyi anlaşılmasını sağlar.

## 2.6. Bağışıklık Sistemi Hücreleri

### 2.6.1. Lenfositler

Spesifik olarak farklı antijenik belirteçlerin tanınması ve edinsel bağışıklık sisteminin en önemli iki özelliği olan özgüllük ve bellek fonksiyonlarının sağlanmasını sağlarlar. İnsanda beyaz kan hücrelerinin yaklaşık %20-40'ını lenfositler oluşturur.

Lenfositler işlev ve protein ürünlerine göre alt-tiplerine ayrılırlar. Lenfositler öncelikle T ve B olmak üzere iki ana gruba ayrılırlar. B lenfositler ilk kez kuşlarda bulunan Fabricius keseciğinde bulunmuştur. Memelilerde buna karşılık olarak B lenfositlerin ilk geliştiği yer kemik iliğidir. T lenfositler de ilk olarak kemik iliğindeki kök hücrelerde oluşur daha sonra timusa göç eder ve burada olgunlaşırlar. Olgunlaşan B ve T lenfositler kemik iliği ve timusu terk eder, dolaşıma katılır ve periferik lenfoid organlara yerleşirler.

B ve T lenfositlerin de alt grupları bulunmaktadır. B lenfositlerin alt tipleri, lenfoid dokularda farklı bölgelerde yerleşen folliküler B hücreleri, marjinal zon B hücreleri ve B-1 B hücreleridir. T lenfositlerin iki ana alt grubu,  $\alpha\beta$  antijen reseptörüne sahip olan yardımcı T hücreler ve sitotoksik T hücrelerdir. Bunların dışında CD4+ regülatuar T hücreler ve  $\gamma\delta$ antijene sahip farklı bir T lenfosit alt grubu daha tanımlanmıştır (23).

Hücre zarı proteinleri, farklı lenfosit gruplarının sınıflandırılmasında fenotipik belirteç olarak kullanılabilirler. Lenfositlerin gruplandırılmasında CD numaralandırma sistemi kullanılmaktadır (CD; Cluster of Differentiation). CD sınıflandırma sistemi lenfositler ve diğer immün sistem hücreleri üzerindeki hücre yüzey moleküllerinin tanımlanmasını sağlarlar. Örneğin, yardımcı T hücreler CD4, sitotoksik T hücreler CD8 yüzeyel proteinine sahiptir.

Naif (tecrübesiz) B ve T hücreler, antijen ile karşılaşmamış, matür lenfositlerdir ve antijen ile karşılaştıklarında koruyucu bağışıklık sisteminde rol alan efektör hücrelere dönüşürler. B hücrelerinin efektör formu antikor üreten plazma hücreleridir. Efektör T hücreleri ise sitokin üreten CD4+ T yardımcı ve sitotoksik CD8+ T lenfositlerdir.

CD4+ yardımcı T lenfositler ürettikleri sitokinler ile makrofajları ve B lenfositleri aktive ederler. Sitotoksik CD8+ T lenfositler virüs ile enfekte ve tümör hücrelerini öldürücü etkisi olan sitoplazmik protein granülleri içerirler. Hem CD4+ T lenfositler hem de CD8+ T lenfositlerin yakın zamanda aktivasyonunda CD25 yüzeyel proteini ekspresyonu kullanılmaktadır (22-25).

### **2.6.1.1. Efektör CD4+ T Hücreleri**

CD4+ T hücrelerin farklı sitokinler üretmesi ve farklı efektör fonksiyonlar göstermesi üzerine, bu hücreler alt gruplara ayrılmıştır.

### **2.6.1.2. Th1 ve Th2 CD4+ T lenfositler**

Th1 ve Th2 lenfosit alt tipleri, kendi ürettikleri ve antijen sunan hücrelerin ürettikleri sitokinler ile birbirlerinden ayrılırlar. İnterferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), Th1 hücreler için özgül bir sitokindir. IL-4 ve IL-5 ise Th2 hücreler için belirteç olarak kullanılan sitokinlerdir. Bu sitokinler alt grupların ayrılmasını sağlarken diğer yandan da bu hücre gruplarının gelişmesinde ve çoğalmasında rol oynarlar. Örneğin, Th1 hücreleri tarafından üretilen IFN- $\gamma$  Th1 hücrelerin farklılaşmasını sağlarken, Th2 hücrelerin oluşmasını inhibe eder. Th2 hücreler tarafından üretilen IL-4 ve IL-10, Th2 hücrelerin farklılaşmasını sağlarlar ve Th1 hücrelerin oluşmasını inhibe ederler. Yani her bir sitokin kendi hücre tipinin arttırılmasını sağlarken diğer hücre tipini baskılar. Bu nedenle bir yolaktan immünolojik yanıt oluşmaya başladığında, immünolojik yanıt o yolakta büyüyerek devam eder (26).

Hem Th1 hem de Th2 hücreler, ortak naif CD4+ T hücrelerden kaynak alırlar. İmmünolojik yanıtın erken aşamalarında gerçekleşen uyarın cevabına göre farklılaşma başlar. En önemli uyarın sitokinlerdir. IFN- $\gamma$  ve IL-2, Th1 yönünde; IL-4, Th2 yönünde farklılaşmayı sağlar (27).

Th1 ve Th2 hücrelerin uygun inflamasyon bölgesine göçleri özel kemokinler aracılığıyla olur.

Th1 hücreler üzerindeki kemokin reseptörleri makrofajlar, doğal öldürücü hücreler ve endoteller üzerindeki CXCL9,10 ve 11, CCL2,4 ve 5 kemokinlerine bağlanırlar. Edinsel bağışıklık sisteminde önemli rolü olan CXCR3 ve CCR5 kemokin reseptörleri Th1 hücreleri tarafından eksprese edilir.



Th2 hücrelerde bulunan CCR3, CCR4 ve CCR8 kemokin reseptörleri paraziter enfeksiyonlarda ve alerjik reaksiyonlarda oldukça fazla eksprese edilen CCL11, CCL24, CCL26, CCL7, CCL13, CCL17 ve CCL22 kemokinlerine bağlanırlar (28).

#### **2.6.1.3. CD8+ Sitotoksik T Lenfositler**

CD8+ T hücreler özellikle viral antijenlere karşı oluşturulan yanıtta etkindirler. CD8+ T hücre aracılıklı patojen elimasyonu, granzyme ve perforin içeren granüllerin ekzositozu ile gerçekleşir. Perforin, hedef hücrelerin sitoplazmalarına granzyme girmesini sağlar. Granzyme, apoptoz basamaklarını başlatır. Ayrıca CD8+ T hücreler hedef FasL eksprese ederek hücrelerin hücre zarında bulunan Fas ile bağlanır ve hedef hücrelerin apoptozunu sağlarlar (29).

#### **2.6.1.4. Hafıza T Hücreleri**

Aktive olan bazı B ve T lenfositler bellek hücrelerine farklılaşırlar ve uzun süre canlı kalırlar. Tekrarlayan antijen ile karşılaşmalarda hızlı ve güçlü bir bağışıklık yanıtı oluştururlar. Bu hücreler hücre aracılıklı immün yanıt sırasında oluşurlar ve daha sonra yıllarca vücutta kalırlar. IL-7 ve IL-15 bu hücrelere spesifik sitokinlerdir. Santal hafıza T hücreleri lenfoid dokulara yerleşirler, antijen ile tekrar karşılaşıldığında çoğalırlar ve efektör hücreleri oluştururlar. Efektör hafıza T hücreleri mukozal alanlara göç ederler ve sitokin salımı ile antijenlere yanıt verirler (30).

#### **2.6.1.5. Düzenleyici T (Treg) Hücreler**

CD4+ T hücre alt gruplarının otoimmüniteyi engelleyebilecekleri gösterilmiştir. CD25 zinciri taşıyan CD4+ T lenfositler düzenleyici T (Treg) hücreler olarak adlandırılırlar. Treg hücrelerin immün sistemi baskılayıcı yönde kontrol ettikleri bilinmektedir. Bu özellikleri sayesinde otoimmünitenin ve greft rejeksiyonun önlenmesinde oldukça faydalı olmalarına rağmen enfeksiyonlarda ve malignite gelişiminde zararlı etkiye sahiptirler (31).

## 2.7. Antijen Sunan Hücreler (APC)

Mikrobiyal ve diğer antijenlerin yakalanması ve lenfositlere sunulmasını sağlayan hücrelerdir. Böylece lenfositlerin çoğalması ve olgunlaşmasını sağlarlar.

Dendritik hücreler T lenfositlerin etkinleşmesini sağlayan APC'dir. Makrofajlar hücre aracılıklı bağışıklık sisteminde T lenfositlere antijen sunarlar. Humoral bağışıklık sisteminde B lenfositler, T yardımcı lenfositlerin aktivasyonunu sağlarlar. Folliküler dendritik hücreler immün organlarda bulunurlar ve B lenfositlerin antijen tanımında rol alırlar (32).

## 2.8. Lenfoid Dokular

Lenfoid organlar, lenfositlerin antijen reseptörlerinin ilk kez oluştuğu böylece fenotipik ve fonksiyonel matürite kazandığı primer lenfoid organlar ve yabancı antijenlere karşı lenfosit cevabın geliştiği sekonder lenfoid organlar ya da periferik lenfoid organlar olarak gruplandırılır. Memelilerde primer lenfoid organlar kemik iliği ve timus, sekonder lenfoid organlar lenf düğümleri, dalak, kutanöz immün sistem ve mukozal immün sistemdir.

Periferik dokulardan gelen lenfatikler ile antijenler lenf düğümlerinde B ve T hücreleri ile karşılaşılır. Dalak kan dolaşımı ile gelen antijenlerin lenfositler tarafından karşılandığı lenfoid organdır. Hem lenf düğümleri hem de dalak, B ve T hücre zonlarına ayrılmıştır. Olgunlaşmış dendritik hücreler T hücre zonunda yer alırlar ve T hücreleri aktive ederler. Folliküler dendritik hücreler ise B hücre alanlarında bulunurlar ve B lenfositleri aktive ederler. Sekonder lenfoid organların yapısal oluşumunda sitokinler rol oynar (33).

## 2.9. Hücre Aracılıklı İmmün Reaksiyonlar

Hücre aracılıklı bağışıklık sistemi T hücre aracılıklı immün yanıttır. CD4+ ve CD8+ T lenfositler hücre aracılıklı bağışıklık sisteminde rol alırlar.

Hücre aracılıklı bağışıklık sisteminin basamakları;

1. Periferik organlarda naif T lenfositlerin antijenlerle karşılaşması,
2. T hücrelerin klonal çoğalması ve efektör hücrelere dönüşmesi,
3. Efektör T hücrelerin antijenlerle karşılaşılan bölgeye göç etmesi,
4. Patojenin elimine edilmesi basamaklarından oluşur.

Fagositler içerisinde alınan patojenlere karşı immünolojik yanıt Th1 olarak adlandırılan CD4+ efektör T lenfositler aracılığıyla olur. Bu hücreler fagositleri aktive ederek patojenin elimine edilmesini sağlarlar.

Parazitik enfeksiyonlara karşı immünolojik yanıt Th2 efektör T lenfositler aracılığı ile olur. Bu hücreler immünoglobulin E (IgE) antikorlarının üretilmesini ve eozinofil ve mast hücrelerinin aktive olmasının sağlayarak parazitlerin elimine edilmesini sağlar. Th2 aracılıklı immün reaksiyonlar eozinofil zengin inflamasyon olarak adlandırılırlar.

Çeşitli hücreleri (fagosit harici) enfekte ederek, onların içerisinde yaşamaya devam eden mikropların yok edilmesi ve enfekte hücrelerin öldürülmesi CD8+ sitotoksik T lenfositler aracılığı ile olur.

T hücre aracılıklı makrofaj aktivasyonu ve oluşan inflamasyon normal dokularda hasara neden olabilir. Bu immünolojik cevap nedeniyle oluşan doku hasarına gecikmiş tip hipersensitivite (GTH) reaksiyonu denir. GTH reaksiyonu vücuda giren mikroplara karşı oluşturulan hücre aracılıklı immün yanıtta ortaya çıkabileceği gibi, bir çok otoimmün hastalıkta oluşan doku hasarının altında yatan mekanizmasını oluşturur. Eğer enfeksiyon tamamen iyileştirilemezse, aktive olan makrofajlar doku hasarına ve fibrozise neden olurlar.

Edinsel bağışıklık sisteminin diğer bir yolağı doğal öldürücü hücreler (Natural Killer, NK) aracılığı ile gerçekleşir. Virüslere ve intra-selüler mikroplara karşı erken dönemde immün yanıt oluştururlar (3).

## **2.10. Meme Kanseri ve İmmünite**

Tüm kanser tipleri tümör dokusu çevresinde inflamatuvar yanıt oluşmasına neden olurlar. Kanser gelişiminde inflamasyonun rolü ilk kez 1867 yılında Virchow tarafından tanımlanmıştır (27). Yapılan epidemiyolojik çalışmalarda patojenlerin stimülasyonu sonucu gelişen inflamatuvar yanıtın tümör gelişimi için başlatıcı faktör olabileceği bildirilmiştir. Öteki taraftan inflamatuvar yanıtın tümör hücrelerinin yok edilmesinde rol alabileceği öne sürülmüştür. Anjiogenez, hipoksi, hücre zarı reseptörlerinin etkileşimi, sitokinlerin salınımı ve bazal membranın yıkımı, tümörün agresif karakter kazanmasında etkili olan faktörlerdir (34, 35).

İnsan solid tümörleri hemen her zaman immün hücreler tarafından infiltr edilmiştir. Ancak bu hücrelerin dağılımları ve miktarları oluşan tümör mikro çevresinin dengesini sağlamak üzere tümörler arası farklılık gösterir. Bu immün hücre infiltrasyonunun özellikleri tümör progresyonunu değerlendiren immünologların dikkatini çekmiştir. Tümör mikro çevresindeki immün hücrelerin özel fenotipik ve fonksiyonel özelliklerinin olduğu saptanmıştır. Bu çalışmalarda T, B lenfositlerin, NK hücrelerin, M1 ve M2 makrofajların ve mast hücrelerinin oluşturduğu kompleks sistemler ile tümör tiplerine göre değişkenlik gösteren özgül immünolojik sistemlerin oluştuğu bildirilmiştir (36).

Tümör hücrelerinin invazyon yeteneği ve metastaz yapabilme potansiyeli kanser hastalarının klinik durumlarını belirlerler. Tümör mikro çevresindeki hücrelerinin dağılımı ve bu hücrelerden salınan faktörler, tümör hücrelerinin davranışlarını tümörün gerilemesi ya da ilerlemesi şeklinde yönlendirirler (37, 38).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, tümöre infiltr lenfositler (TIL) ve regülatuar T (Treg) hücrelerin tümöre klinik cevapta etkin olduğu öne sürülmüştür (30). TIL hücrelerinin tümör dokusunda bulunmasının birçok solid tümörde iyi prognostik faktör olduğu gösterilmiştir. Sayısal değerlerinden çok, bu hücrelerin özgül olarak dağılımı kansere karşı bağışıklık yanıtında ana belirleç olarak bildirilmiştir. Solid tümörlerde en sık saptanan TIL hücreler, T hücre fenotipindedirler. TIL hücreler sitokin profillerine göre Th1 ve Th2 CD4+ yardımcı T hücreleri, CD8+ sitotoksik efektör hücreler ve CD4+CD25+ Treg alt gruplarına ayrılırlar (37, 38).

Bates ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada 222 meme kanseri spesmeni değerlendirmeye alınmış, bu çalışmada Treg hücrelerin sayısının arttığı durumlarda ortalama yaşam süresi ve hastalısız sağ kalım süresinin daha kısa olduğu gösterilmiştir. Yüksek dereceli tümörlerin ve lenf düğümü pozitifliğinin bu hastalarda daha sık olduğu gösterilmiştir (39).

Meme kanserinde, CD4+CD25+ Treg hücrelerin, CD8+ sitotoksik T hücrelere oranının artması kötü prognostik faktör olarak değerlendirilmiştir (37).

Meme kanseri olan hastalarda, normal bireylerle karşılaştırıldığında periferik kandaki lenfositlerin sayısının azaldığı, bunun aksine fonksiyonel olarak

immünsüpresif etkisi olan CD4+CD25+ Treg hücrelerin ve dendritik hücrelerin periferik kanda ve tümör mikro çevresinde arttığı gösterilmiştir (40).

Tümör bölgesindeki inflamatuvar yanıtta rol alan tümör ilişkili makrofajlar, bölgedeki oksijen miktarına ve tümörün evresine göre farklılaşırlar. Erken evrelerde tümör dokusunda en sık tip 1 makrofajlar bulunur. Tip 1 makrofajlardan salınan pro-inflamatuvar sitokinler CD4+ T hücrelerin Th1 yönünde farklılaşmasını sağlarlar. Daha ileri evrelerde makrofajlar tip 2 yönünde farklılaşırlar. Tip 2 makrofajlar Transforming Growth Faktör- $\beta$  1 (TGF- $\beta$ 1) ve IL-10 sitokinlerini salarlar ve Th2 yönünde farklılaşmayı sağlarlar. Bunun sonucunda Treg hücreler artar ve anti-tümör bağışıklık yanıt baskılanır (41).

Tümör dokusundaki hipoksi Tip2 makrofajları aktive ederek Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) salınmasına ve metastaz yeteneği kazanmasına neden olurlar (42, 43).

Bu verilerden yola çıkılarak, meme kanserinin ilerlemesi ve metastazında rol alan makrofaj hücrelerini hedef alan tedavi protokolleri geliştirilmektedir (44, 45).

Günümüzde immün sistemi düzenleyici ajanların ve tümör tarafından oluşan immün süpresyon etkisini ortadan kaldırmaya yönelik aşuların çalışmaları devam etmektedir. Bu yeni tedavi seçeneklerinin günümüzde kullanılan sistemik tedaviler ile kombine olarak kullanıldığında başarı oranlarının artacağı düşünülmektedir (46).

## **2.11. Kist Hidatik Enfeksiyonu ve Hücresel İmmünite**

Parazit enfeksiyonlarında konakta hem doğuştan bağışıklık sistemi hem de edinsel bağışıklık sistemi aktive olur. Kist hidatik enfeksiyonunda konakta humoral ve hücresel bağışıklık sistemleri önemli role sahiptir. Ancak aynı zamanda parazitler de konakta yaşamını sürdürebilmek için koruma mekanizmaları geliştirirler. *E.granulosus* enfeksiyonu sonrası humoral bağışıklık sisteminin aktive olmasıyla kanda bulunan IgG, IgM, IgA ve IgE antikor seviyeleri yükselir. IgG1 ve IgG4 klinikte enfeksiyonun medikal tedaviye cevabında kullanılan parametrelerdir. IgG4 uzamış, kronik enfeksiyon durumlarında immunoglobulinlere zayıf olarak bağlanan bir antikor alt grubudur. Parazitin konak bağışıklık sisteminden korunmasında yardımcı olduğu ve enfeksiyonun kronikleşmesine katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Yapılan çalışmalarda albendazol tedavisinden fayda gören

hastalarda IgG4 ve IgE antikor seviyelerinin düşük olduğu, hastalığın ilerlediği vakalarda ise yüksek olduğu gösterilmiştir. IgG1 ve IgG3 seviyeleri diğerlerinin aksine stabil hastalarda daha yüksek bulunmuştur. Kist hidatik enfeksiyonunda IgG4 ve IgE antikor yüksekliği ve eozinofili hücresel bağışıklık sisteminde hücrelerin Th2 yönünde farklılaştığını gösterir. İn vitro çalışmalarda hastalarda IL-4, IL-6, IL-10 ve INF- $\gamma$  seviyelerinin yüksek olduğu saptanmıştır. Hastalığın aktif ve inaktif durumlarında etkin olan hücre tipi değişiklik göstermektedir. Th2 aracılıklı bağışıklık sisteminin konağın aktif korunmasında, Th1'in sekonder parazit enfeksiyonu sırasında hücresel bağışıklıkta rol aldığı gösterilmiştir (47-49). Deneysel çalışmalarda anti-inflamatuar etkisi olan IL-10 salınımının, Th1'in koruyucu etkisini engellediği böylece kronik enfeksiyon oluşumuna neden olduğu gösterilmiştir (48).

## 2.12. Karaciğer Tümörü ve Hücresel İmmünite

T hücre aracılıklı bağışıklık sisteminin tümör baskılayıcı etkisi olduğu, hayvanlar üzerinde yapılan deneysel çalışmalar ve insan tümörleri üzerinde yapılan çalışmalar ile desteklenmiştir. Tümör karşıtı etkinin başlaması için kansere özgül T lenfositlerin tümör dokusuna ulaşmaları gerekir. T hücre göçü tümör dokusu tarafından salınan '*intercellular adhesion molecule 1*' (ICAM-1) ve '*vascular adhesion protein-1*' (VAP-1) adezyon molekülleri sayesinde olur. Yapılan çalışmalarda tümör rezeksiyonu sonrası T hücre infiltrasyonunun arttığı durumlarda tümör rekürrensının daha az olduğu saptanmıştır. CD8+ T lenfositler tümör regresyonu ve tümör gelişiminin engellenmesi üzerinde anahtar role sahiptir. Tümör gelişimi sonrası karaciğerde inflamatuvar mediatörlerin salınmasına neden olur. İnflamasyon aracılığı ile antijen sunan hücreler (örn; dendritik hücre) aktive olur ve karaciğere göç ederler. Aktif dendritik hücreler ve CD4+ T lenfositler, tümör ile ilişkili antijenlerin sitotoksik CD8+ T hücrelere sunulmasını ve onların aktive olmasını sağlarlar. Aktif CD8+ T lenfositler, tümör hücresinin elimine edilmesini sağlarlar (50-52).

Diğer taraftan immün süpresif etkileri nedeniyle tümörün bağışıklık sisteminden kurtulmasını sağlayan hücreler de bulunmaktadır. Treg hücreler ve myeloid derive süpresif hücreler (MDSCs) immünsüpresif etkisi çeşitli çalışmalarda gösterilmiş olan hücrelerdir. Bu hücrelerin yoğunluğunun arttığı durumlarda tümör

gelişiminin hızlandığı ve hastaların prognozlarının kötüleştiği gösterilmiştir. Treg hücreler, CD8+ T lenfositlerin ve doğal öldürücü (NK) hücrelerin çoğalmalarını ve aktive olmalarını engellerler (53, 54).

Hepatoselüler karsinomunda en fazla alfa fetoprotein (AFP) ekspresyonu olur. İnsanda hepatoselüler kanser için anti tümör etkin aşı geliştirilmesi için AFP peptidleri antijen olarak kullanılmıştır. Altı hasta üzerinde yapılan bir çalışmada AFP peptidleri kullanılarak yapılan aşılama tüm hastalarda AFP spesifik CD8+ T hücre cevabı sağlanmış ancak klinik fayda sağlanamamıştır. Klinik yarar olmaması CD4+ T lenfosit cevabının ve yardımcı hücre fonksiyonlarının tam olarak oluşmamasına bağlanmıştır (55).

Treg hücrelerin baskılanması için hayvanlarda deneysel modeller ve insanlarda klinik çalışmalar düzenlenmiştir. Klinik çalışmalarda hepatoselüler karsinomu olan hastalara düşük doz siklofosfomid verilmiş, takibinde hastalarda Treg hücre sayısının azalma olduğu, bunun sonucunda AFP spesifik CD4+ T hücre cevabında artış olduğu gösterilmiştir (56).

Bu veriler ışığında bağışıklık sistemi aracılıklı tedavi sağlamak amacıyla, CD4+ ve CD8+ T hücre infiltrasyonunu artırıcı immünoterapi çalışmaları yapılmaktadır. Tümöre karşı aşı için çalışmalar, olog tumor antijeni sunan dendritik hücre geliştirilmesi, sitokin enjeksiyonu, Treg hücre baskılanması, uyarılmış lenfosit göçünün sağlanması immünoterapi için çalışma alanları olmuştur (54, 56-59).

### 3. YÖNTEM ve GEREÇLER

#### 3.1. Deney hayvanları ve Deney Protokolü

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi ve Cerrahi Araştırma Merkezinde gerçekleştirilen bu çalışmada, Kobay A.Ş. (Ankara/Türkiye)' den temin edilen, ağırlıkları 15-16 gr arasında değişen, beş haftalık inbred BALB/c 39 tane dişi fare kullanılmıştır. Çalışma için Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulundan 2011/37-2 karar numaralı izni alınmıştır.

##### 3.1.1. Deney Grupları Oluşturulması

Deney hayvanları gruplara dağıtılırken önce fare ağırlıklarının benzer dağılımda olmasına özen gösterildi.

Kist hidatik (n=12) ve kist hidatik + meme kanseri (n=13) gruplarına *E. granulosus* protoskoleksleri (3000 protoskoleks/0.2 ml) 5 haftalık BALB/c farelere intraperitoneal (i.p.) yolla inoküle edildi. Diğer taraftan, kontrol (n=7) ve sadece meme kanseri (n=7) gruplarına aynı hacimde serum fizyolojik enjeksiyonu gerçekleştirildi.

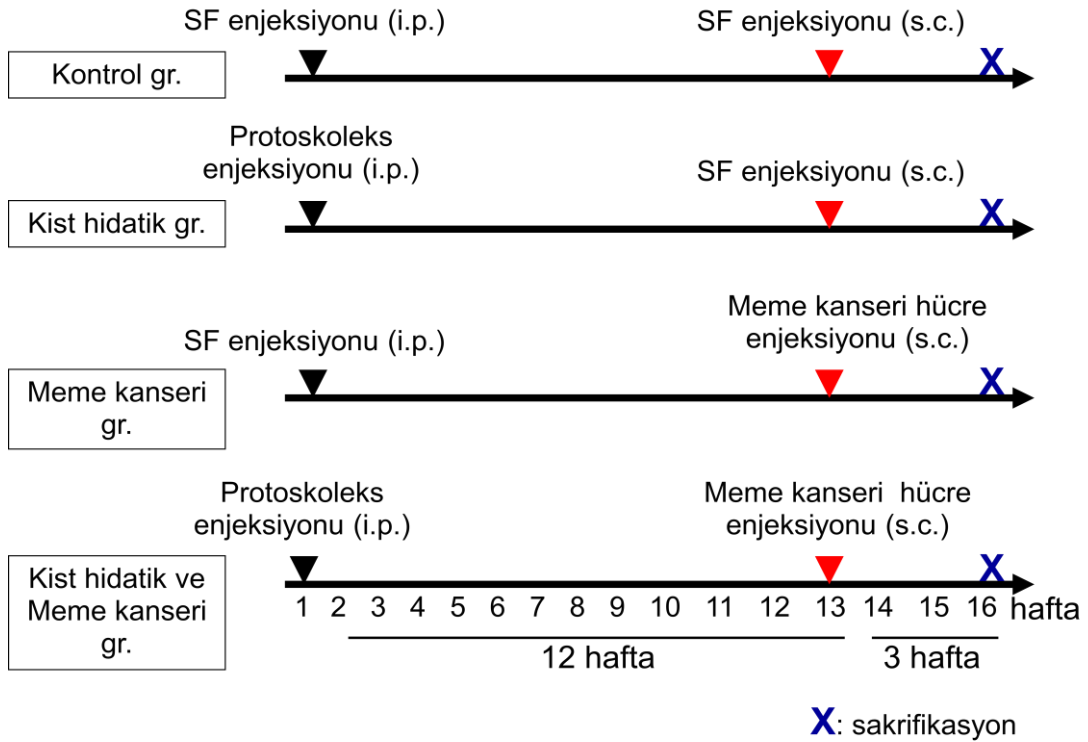
Gruplardaki denek sayıları kist hidatik oluşumunun tüm deney hayvanlarında gerçekleşmeyeceği göz önünde bulundurularak belirlendi. Bu nedenle sadece kist hidatik ve kist hidatik + meme kanseri gruplarındaki fare sayısı daha fazla tutuldu. Ancak, deney süresince kaybedilen hayvanlar nedeniyle, deney sonunda analiz edilen denek sayıları; kontrol, n=5; sadece kist hidatik, n=8; sadece meme kanseri, n=6 ve kist hidatik + meme kanseri, n=10 olarak gerçekleşmiştir.

*E. granulosus* enfeksiyonunun ve kist oluşumu için fareler 12 hafta boyunca takip edildi. Bu sürenin sonunda kist hidatik + meme kanseri ve sadece meme kanseri gruplarının sağ inguinal meme bölgesine subkütan yolla 4T1 meme kanseri hücreleri ( $5 \times 10^4$  hücre/100  $\mu$ l) inoküle edildi. Kontrol ve sadece kist hidatik gruplarına ise aynı hacimde serum fizyolojik enjeksiyonu gerçekleştirildi. Meme tümörlerinin gelişimi 3 hafta boyunca izlendi.



Aşağıda oluşturulan deney grupları özetlenmiştir (Şekil-1) ;

1. **Kontrol grubu: 5 fare** (Önce 1xPBS (fosfat-tamponlanmış tuz çözeltisi), i.p. - 3 ay sonra 1xPBS, meme dokusuna s.c.),
2. **Kist hidatik grubu: 8 fare** (Önce 3000 protoskoleks, i.p. - 3 ay sonra 1xPBS, meme dokusuna s.c.)
3. **Meme kanseri grubu: 6 fare** (Önce 1xPBS, i.p. - 3 ay sonra  $5 \times 10^4$  4T1 meme kanseri hücresi, meme dokusuna s.c.),
4. **Kist hidatik ve meme kanseri grubu: 10 fare** (Önce 3000 protoskoleks, i.p. - 3 ay sonra  $5 \times 10^4$  4T1 meme kanseri hücresi, meme dokusuna s.c.)



**Şekil-1.** Deney gruplarının oluşturulması sırasında gerçekleştirilen uygulamaların zamana bağlı olarak şematik gösterimi. Denekler 16. hafta basında sakrifiye edilerek (X) deneyler sonlandırılmıştır. (gr.,grup, i.p., intraperitoneal; s.c., subkütan)

### 3.1.2. *Echinococcus granulosus* Protoskolekslerinin Elde Edilmesi

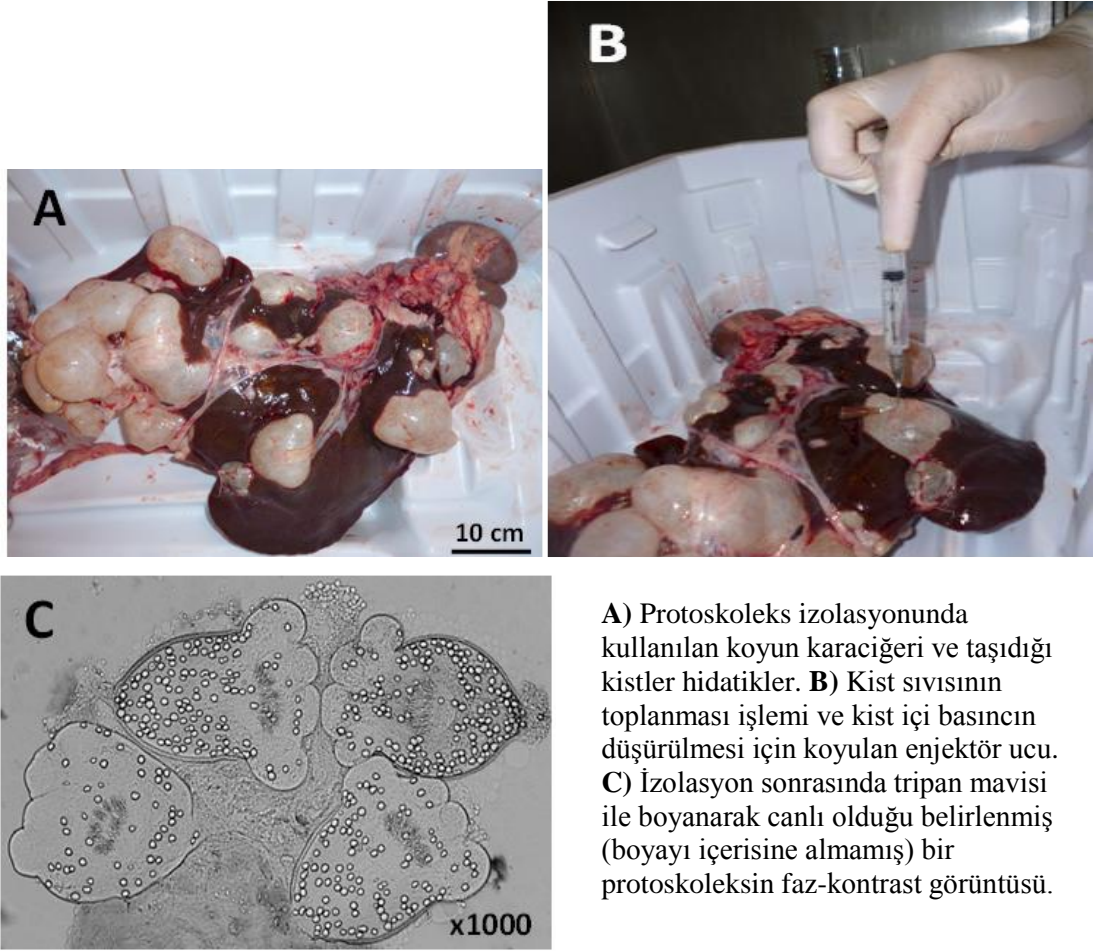
Deneysel *Echinococcus granulosus* enfeksiyon modelinin geliştirilebilmesi için canlı protoskolekslere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu nedenle Ankara çevre ilçelerinde yer alan mezbahalarda görevli veteriner hekimler ile temasa geçilmiş ve kist hidatik enfeksiyonu olan karaciğerler bu mezbahalardan sağlanmıştır.

Çalışma küveti içerisine alınan koyun (*Ovis aries*) karaciğeri çeker ocak altına yerleştirilip, kistlerin yüzeyi iyot çözeltisi ile temizlendi (Şekil 2A). Protoskoleks içeren kist sıvısının kolay aspirasyonu için bir adet enjektör iğnesi ile kist içi basınç düşürüldü ve başka bir enjektör yardımı ile berrak kist sıvısı tamamen toplandı (Şekil 2B).

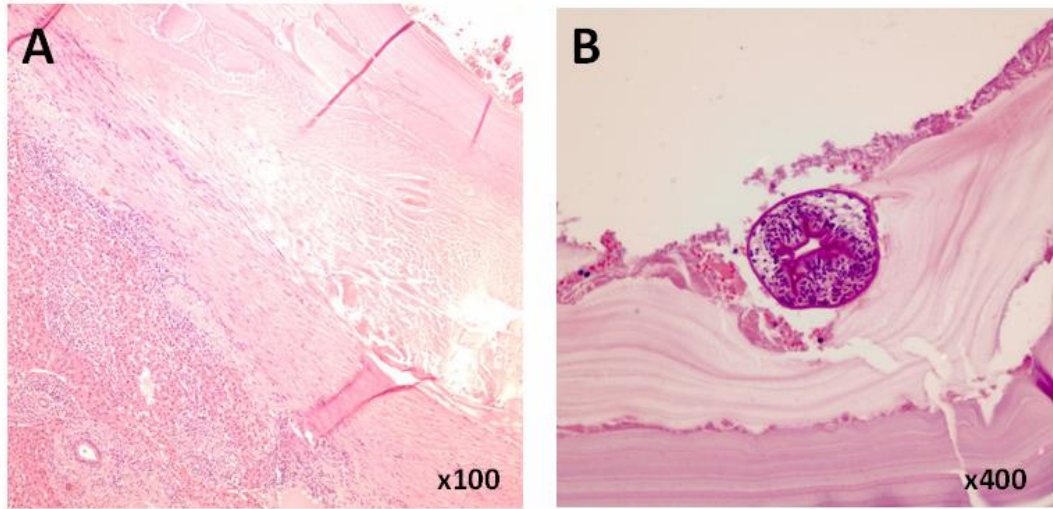
Tam RPMI hücre kültür ortamı (%10 fötal dana serumu, %1 penisilin/streptomisin, %1 L-Glutamin içeren) ile 1:1 oranında karıştırılan kist sıvısı santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Elde edilen pellet (kist kumu) 1xPBS ile tekrar yıkandı ve yeniden süspansiyon haline getirildi.

Süspansiyondan alınan örnek 1:1 oranında tripan mavisini ile karıştırılarak canlı protoskolekslerin Thoma hematositometresi ile sayımı gerçekleştirildi. Elde edilen protoskolekslerin mikroskopik görüntüsü Şekil-2C'de verilmiştir.

Kist hidatik dokusunun ve protoskoleks varlığının histopatolojik analiz ile doğrulanması amacıyla doku örnekleri %10 Formol-PBS içerisine alındı. Tespit edilen dokulardan alınan makroskopi örnekleri, parafin bloklara gömüldü ve alınan kesitler standart hematoksilin-eozin işlemine göre boyandı. Kesitlerin mikroskopik incelenmesinde karaciğer dokusuna bitişik inflamatuvar hücreler içeren fibröz kist duvarı ve daha içte lüminal yüzeyde laminer membran izlendi. Karaciğer kisti içinde kist duvarı laminer membranına bitişik halde *E. granulosus* protoskolekslerinin varlığı doğrulandı (Şekil 3).



**Şekil-2.** Protoskoleks izolasyonu



**A)** Sol alt köşede izlenen karaciğer dokusuna bitişik inflamatuvar hücreler içeren fibröz kist duvarı ve daha içte lüminal yüzeyde laminer membran izlenmektedir. **B)** Kist duvarı laminer membranı içerisinde yerleşik bir *E. granulosus* protoskoleksi görülmektedir.

**Şekil-3.** Koyun karaciğerinden elde edilen kistlerin histopatolojik analizi.

### 3.1.3. Deneysel *Echinococcus granulosus* Enfeksiyonu Geliştirilmesi

Beş haftalık dişi BALB/c farelere 0.5 ml 1xPBS içerisinde 3000 *Echinococcus granulosus* protoskoleks (tripan mavisi ile canlılık analizi ve sayım yapıldıktan sonra) olacak şekilde intraperitoneal (i.p.) yolla inoküle edildi.

### 3.1.4. Deneysel Meme Kanseri Oluşturulması

4T1 meme kanseri hücre hattı %10 fetal dana serumu, %1 L-glutamin ve %1 penisilin/streptomisin içeren, RPMI1640 medyum içerisinde büyütüldü. Çoğaltılan 4T1 hücreleri ( $5 \times 10^4$  hücre/100  $\mu$ l) 17 haftalık dişi BALB/c farelerin meme dokusuna subkütan (s.c.) enjekte edildi ve tümör gelişimi izlendi.

Oluşan tümörlerin çapı, hayvanların ağırlığı ve yaşam süresi haftada 2 kez kontrol edildi.

Deneyin sonlandırılması ile tümör dokusu, akciğer, karaciğer, ve dalak dokuları incelenmek üzere toplandı.

### 3.2. Akım Sitometri

Hayvanlar sakrifiye edildikten sonra elde edilen tümör, karaciğer ve dalak dokuları PBS tamponu bulunan steril bir petri kabına alınarak mekanik işlemlerle süspansiyon haline getirildi ve 47 µm açıklığı bulunan filtrelerden süzüldü. Süzüntü, Ficoll yoğunluk gradienti ile fraksiyonlarına ayrıldı ve mononükleer immün hücrece zengin olan faz toplanarak ilgili antikörlerle işaretlendi. T hücre alt-grupları, bunların aktivasyon dereceleri ve yardımcı T lenfositlerin tipleri Th1 ve Th2 dağılımı: CD8, CD4, CD25, CCR3, CCR5, ve (dalaktan elde edilen lenfositlerde) hücre-içi IFN-γ ve IL-4 belirteçleri kullanılarak (3 renkli boyama) belirlendi. Hücre içi boyamalarda Cytotfix/Cytoperm™ kiti kullanıldı.

Analizler FACS Aria-II akım sitometri cihazıyla (Becton-Dickinson, ABD) yapıldı. Pozitif hücre yüzdesi uygun izotipik kontrol antikoru ile karşılaştırılarak değerlendirildi.

### 3.3. Histopatolojik Analizler

Deney gruplarından toplanan dokuların bir kısmı histopatolojik inceleme amacıyla %10 formol içerisinde alındı. Tüm farelere öncelikle intraabdominal ve intratorasik inspeksiyon yapıldı. Kontrol grubu farelerde eşlik eden olası başka patoloji varlığı araştırıldı, beklenmedik patoloji içeren fareler kontrol grubu ve deney grupları dışına bırakıldı.

Meme tümörü içeren gruplarda tümör dokusunun makroskopik özellikleri ve karın duvarı kas invazyonu gözle değerlendirildi. Makroskopik olarak intraabdominal ve intratorasik yaygın tümör varlığı, gözle görülen büyüklükte meme tümörü metastazı varlığı değerlendirildi.

Kist hidatik içeren gruplarda intraabdominal ve intratorasik mezotelyal yüzeylerde kist varlığı makroskopik olarak araştırıldı. Saptanan kistik dokular diseke edildi. Karaciğer, akciğer ve dalak başta olmak üzere iç organlarda kist varlığı makroskopik olarak araştırıldı.

Kontrol grubu ve yalnızca kist hidatik içeren grup da dahil olmak üzere tüm farelerin karaciğer, akciğer ve dalakları ayrıldı. Standart patolojik takip ve Hematoksilen – Eozin boyama işlemleri sonrasında, değerlendirme ışık mikroskobu ile yapıldı.

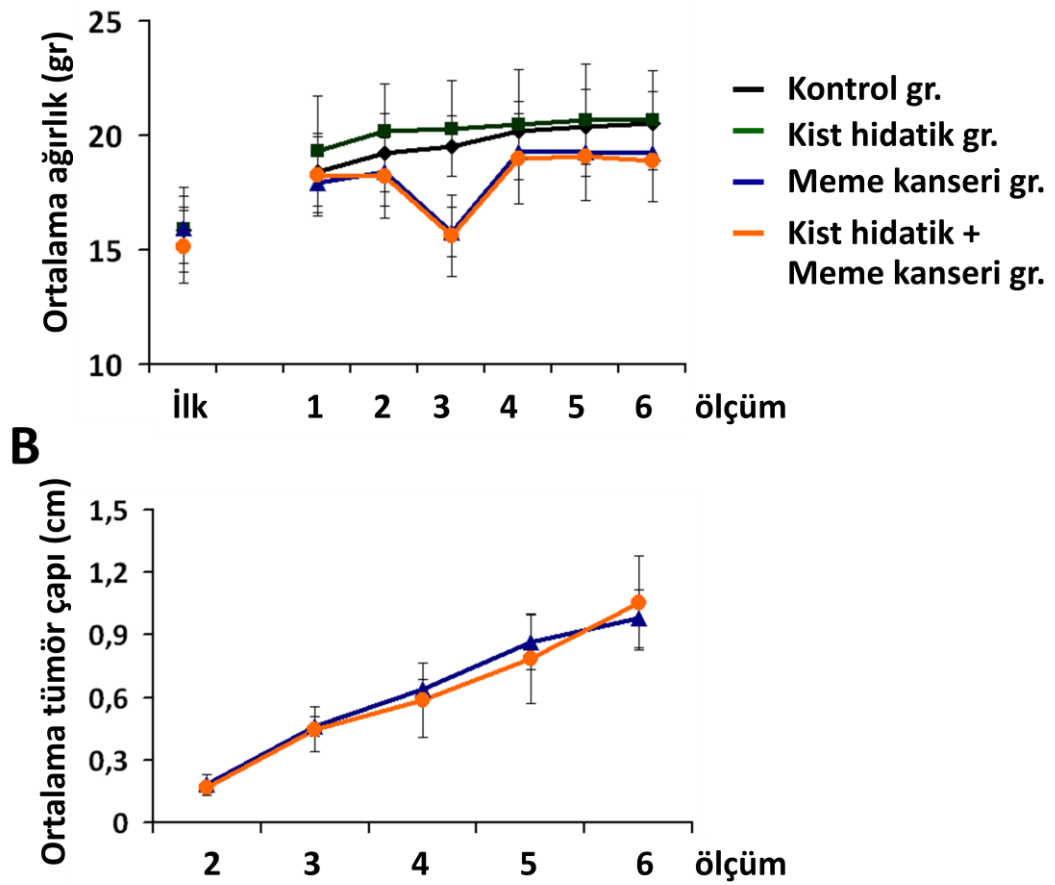
### **3.4. İstatistiksel analizler**

Deneyisel gruptan elde edilen verilerin istatistiksel analizi (Ki-kare ve/veya Student's t testleri) SPSS yazılım programı kullanılarak gerçekleştirildi.  $P < 0.05$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Deneysel Kist Hidatik ve Meme Kanseri Modellerinin in vivo ve Histopatolojik Analizleri

Deney gruplarına dahil edilen beş haftalık dişi BALB/c fareler 12 hafta boyunca takip edildi. Meme tümörlerinin gelişimi, tümör hücrelerinin enjeksiyonu sonrasında 3 hafta boyunca izlendi. Bu süre zarfında deney gruplarında yer alan farelerin ağırlık (Şekil-4A) ve tümör çapı ölçümleri yapıldı (Şekil-4B).



A) Oluşturulan deney gruplarının enjeksiyonlar öncesi (ilk, deneylere başlanmadan önce) ve 4T1 meme kanseri hücrelerinin enjeksiyonu sonrasında ortalama ağırlık değişimi görülmektedir. B) Sadece meme kanseri ve meme kanseri + kist hidatik gruplarının ortalama tümör çapı değişimi verilmiştir.

Şekil-4. Deney gruplarının ağırlık verileri ve ortalama tümör çapları.

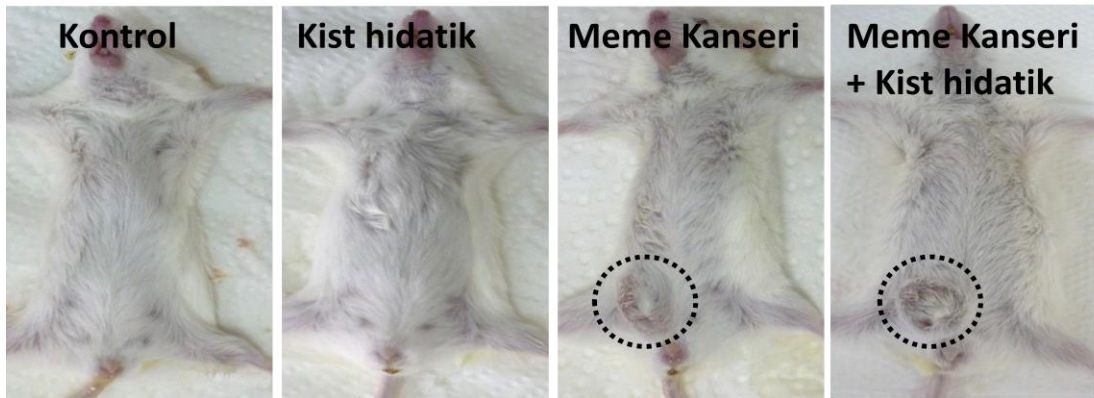
Meme kanseri hücrelerinin enjeksiyonunu takiben 1. haftanın sonunda (Şekil-4B, 3. ölçüm) farelerde palpe edilebilen kitleler geliştiği belirlendi. Bu hafta içerisinde hem sadece meme kanseri hem de kist hidatik + meme kanseri gruplarında yer alan hayvanların sağlık durumu belirgin şekilde kötüleşti. Bu durum kilo kaybı ile de belirlenmiştir (Şekil-4A, 3. ölçüm). Bu nedenle farelere verilen pellet yem doğrudan kafes içerisine koyuldu. Bu sayede farelerin kilo kaybetmesi önendi. İstatistiksel olarak anlamlılığa ulaşmamakla birlikte, meme kanseri geliştirilen grupların ağırlığı diğer gruplara göre daha düşük seyrettiği görüldü (Şekil-4A).

Sadece meme kanseri ve kist hidatik + meme kanseri grupları arasında tümör boyutu açısından da bir fark oluşmadı (Şekil-4B).

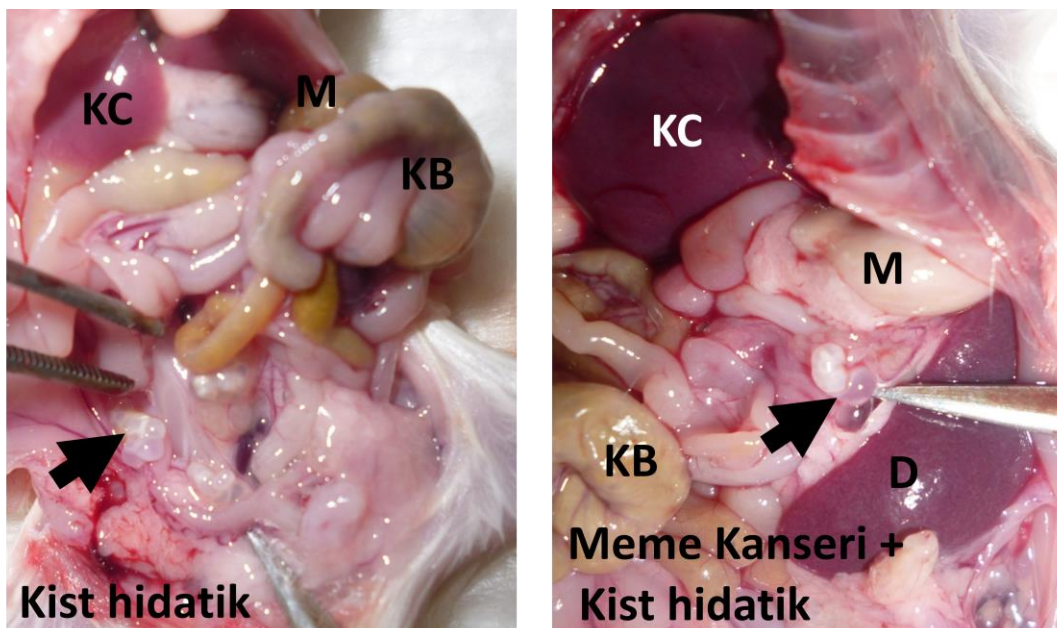
Meme kanseri hücrelerinin inokülasyonunu takiben 3 hafta sonunda deneyler sonlandırıldı ve fareler sakrifiye edildi (Şekil-5A). Gerçekleştirilen nekropsi ve diseksiyonda, sadece kist hidatik grubunda %50 ve kist hidatik + meme kanseri grubunda %60 oranında gözle görülür boyutta, çoğunlukla mezenterik bölgede yerleşmiş kistlerin varlığı saptandı (Şekil-5B ve Tablo-1). Sadece meme kanseri ve kist hidatik + meme kanseri gruplarının tümünde meme tümörlerinin varlığı belirlendi. Tümörlerin periton invazyonu olduğu ve deri yapışıklığı olduğu gözlemlendi (Şekil-5C).



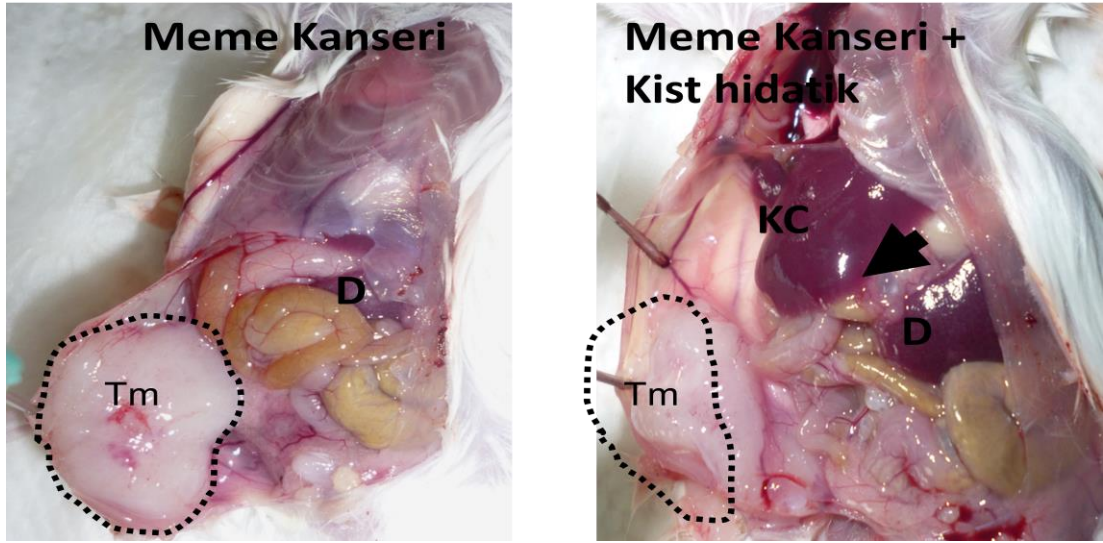
A



B



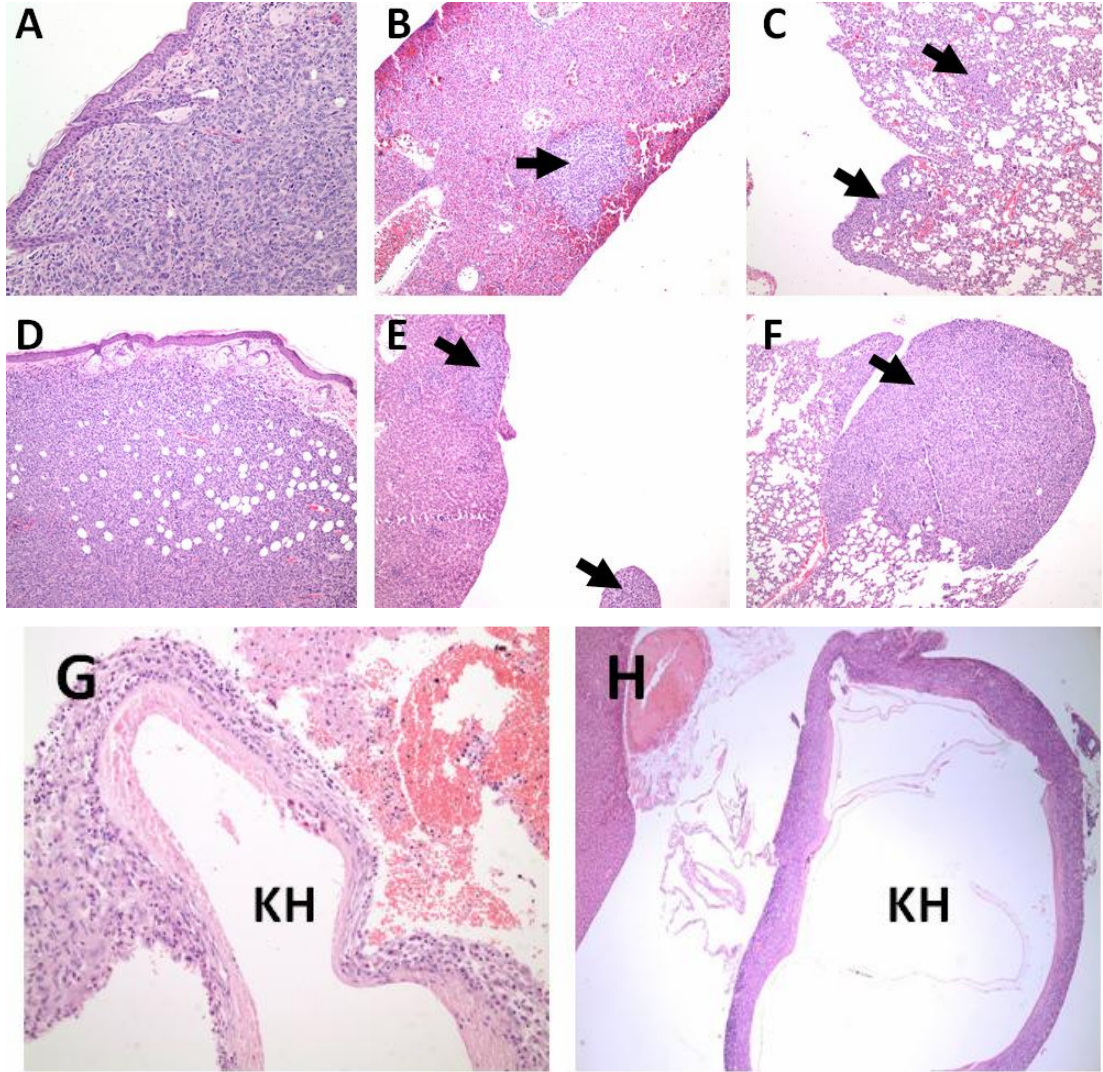
C



A)Sakrifikasyon sonrasında deney gruplarından birer farenin temsili resmi. Tümör bölgeleri daire içerisine alınmıştır. B) Kist hidatik ve meme kanseri + kist hidatik gruplarının peritoneal bölge incelemesi sonrasında gözlenen kist oluşumları ok ile gösterilmiştir. C) Meme kanseri ve meme kanseri + kist hidatik gruplarının periton altı dokusuna yayılmış tümörlerin sınırları kesikli çizgi ile gösterilmiştir. Meme kanseri + kist hidatik grubuna ait bir farede karaciğer komşuluğu bulunan bir kist de görülmektedir (ok). (Tm, tümör; KC, karaciğer; D, dalak; M, mide; KB, kalın barsak).

**Şekil-5.** Deney gruplarından diseksiyon öncesi ve sonrası temsili resimler.

Yapılan makroskopik ve mikroskopik incelemeler sonucunda kontrol grubunda eşlik eden diğer bir inflamatuvar patoloji ve/veya neoplastik durum saptanmadı. Tümör bulunan gruplarda farelerin tümünde bulunan tümör dokuları ortak histopatolojik özellikler içermektedir. Tümörler küçük büyütmede solid olup tümüyle indifferansiye, tübül oluşturmeyen epitelyal hücrelerden oluşmaktaydı. Bu neoplastik hücreler çoğunlukla sınırları seçilemeyen sinsityal geniş eozinofilik sitoplazmalı olup, az sayıda hücrede görece iğsi görünüm mevcuttu. Neoplastik hücrelerde geniş pleomorfik oval nükleus izlendi, nükleuslar açık kromatine ve bir ya da iki periferik nükleole sahipti. Mitoz yaygındı (15-20/BBA). Bu tümör özellikleri meme tümörü ve kist hidatik içeren farelerdeki tümör özellikleri ile benzerdi ve histomorfolojik olarak ayrılması mümkün değildi (Şekil-6).



Meme kanseri (A-C) ve kist hidatik + meme kanseri (D-F) gruplarına ait tümör (A,D), karaciğer (B,E) ve akciğer (C,F) metastazlarına ait mikrograflar gösterilmiştir. Kist hidatik + meme kanseri (G) ve kist hidatik (H) gruplarında kist varlığı görülmektedir.

**Şekil-6.** Tümör, metastaz ve kist varlığının histopatolojik olarak değerlendirilmesi.

Yalnızca kist hidatik içeren grupta bulunan 8 fareden 4'ünde intrabdominal kist varlığı saptandı. Bu gruptaki hiçbir farede karaciğer, akciğer ve dalakta kist varlığı makroskopik veya mikroskopik olarak gösterilemedi (Tablo-1).

**Tablo-1.** Protoskoleks enjeksiyonu yapılan deney gruplarında kist hidatik veya kiste bağlı olduğu düşünülen granümatöz lezyon dağılım tablosu.

Kist hidatik veya kiste bağlı granülom varlığı			
Kist hidatik grubu		Kist hidatik + Meme kanseri grubu	
Karın	Karaciğer	Karın	Karaciğer
%50 (4/8)	%0 (0/8)	%60 (6/10)	%50 (5/10)

Yalnızca meme tümörü içeren grupta incelenen 6 fareden tümünde meme tümörü mevcuttu. Tüm tümör dokularında mikroskopik nekroz varlığı saptandı. 4 farede mikroskopik karın duvarı kas invazyonu mevcuttu. 4 farede akciğer, 2 farede karaciğer ve 1 farede dalak metastazı saptandı (Tablo-2). Karaciğer metastazı bulunan bu iki farede akciğer metastazı da beraberdi. Dalak metastazı olan farede hem karaciğer hem de akciğer metastazı eşlik ediyordu.

**Tablo-2.** Meme kanseri hücresi enjeksiyonu yapılan deney gruplarında metastazların hedef organlara göre dağılım ve sıklık tablosu.

Meme kanseri metastaz sıklığı			
Meme kanseri grubu		Kist hidatik + Meme kanseri grubu	
Akciğer	Karaciğer	Akciğer	Karaciğer
%66.6 (4/6)	%33.3 (2/6)	%80 (8/10)	%60 (6/10)

Meme tümörü ve kist hidatik içeren grupta bulunan 10 farenin tümünde meme tümörü varlığı makroskopik ve mikroskopik olarak doğrulandı (Şekil-6). Bu 10 farenin 9'unda mikroskopik karın duvarı kas invazyonu mevcuttu. Kas invazyonu

bulunan farelerden birinde nekroz saptanmadı, diğer tüm farelerin tümörleri mikroskopik incelemede geniş nekroz alanları içeriyordu. Bu grupta 2 farede karaciğerde, 1 farede ise dalakta lokalize eski kist varlığına bağlı olduğu düşünülen granülom formasyonu mevcuttu. On farenin 8'inde akciğer metastazı, 6'sında karaciğer, 2'sinde dalak metastazı saptandı (Tablo-2). Dalak metastazı olan farelerin birinde ilave olarak karaciğer ve pankreas metastazı mevcuttu, meme tümörü batın duvarı

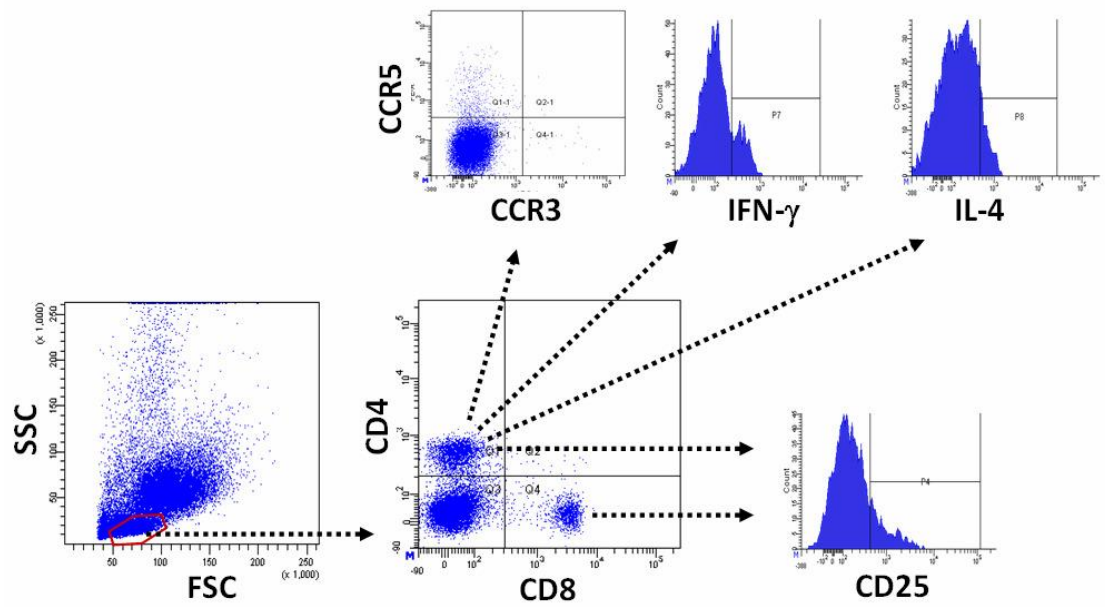
invazyonu yanı sıra batın içine ileri derecede yayılmış olarak gözlemlendi. Diğerinde ise hem akciğerde hem karaciğerde metastaz mevcuttu ve karaciğer metastaz odağı diğer farelerdeki karaciğer metastaz odaklarına kıyasla görece büyüktü (Şekil-6). Bununla beraber, karaciğerde kist ve metastaz birlikteliğinin korelasyon gösterdiğine işaret edecek net bir bulgu elde edilemedi.

#### **4.2. Deney Gruplarında Karaciğer, Dalak ve Tümör Dokularında Bulunan Lenfoid Hücrelerin İmmünofenotipik Analizleri**

Taze karaciğer, dalak ve tümör dokuları %1 PBS içerisine alındı ve enjektör pistonu ile ezmek suretiyle hücrelerin dökülmesi sağlandı. Elde edilen hücre süspansiyonları öncelikle ıslak gazlı bezden, daha sonra 47 µm por açıklığına sahip süzgeçten geçirildi. Süzülen hücreler Ficoll™ 1077 yoğunluğuna göre ayrımlandı ve interfaz bölgesi toplandı. Bu sayede doku debris, hücre agregatları ve eritrositler mümkün olduğunca uzaklaştırıldı; hücre süspansiyonu içerisinde analiz edilecek lenfoid hücrelerin zenginleşmesi sağlandı. Elde edilen hücreler CD4, CD8, CD25; CD4, CCR3, CCR5; CD4, IFN-γ, IL-4 üçlü boyamaları ile akım sitometrik immünofenotiplendirme analizi yapıldı. Büyüklük (Forward Scatter, FSC) ve granülaritesine (Side Scatter, SSC) göre belirlenen lenfoid fenotipteki hücreler CD4

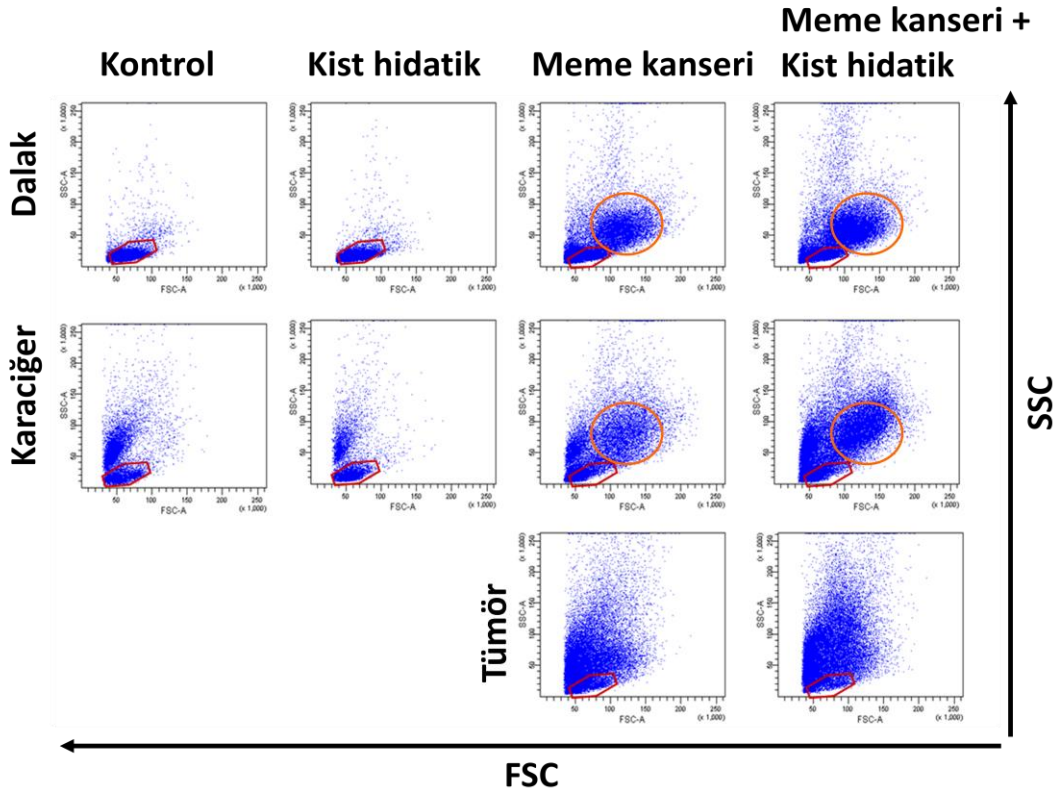
ve CD8 alt-tiplerine göre ayrımlandı. CD4+ hücrelerin CD25, CCR3, CCR5, IFN-γ ve IL-4 ekspresyonu; CD8+ hücrelerin ise CD25 ekspresyonu belirlendi. Gerçekleştirilen akım sitometri analizlerinin temsili şekli ve hücre kapı alma stratejisi Şekil-7'de gösterilmiştir. Farklı dokulardan (dalak, karaciğer ve tümör) elde edilen hücrelerin büyüklük (FSC) ve granülaritesine (SSC) göre dağılımları farklılık göstermesine rağmen lenfoid hücrelerin özellikleri oldukça homojen idi (Şekil-8).

Meme tümörü taşıyan grupların karaciğer ve dalak dokusunda monositik/granülositik hücre dağılımı ile uyumlu popülasyon artışı belirgindi (Şekil-8).



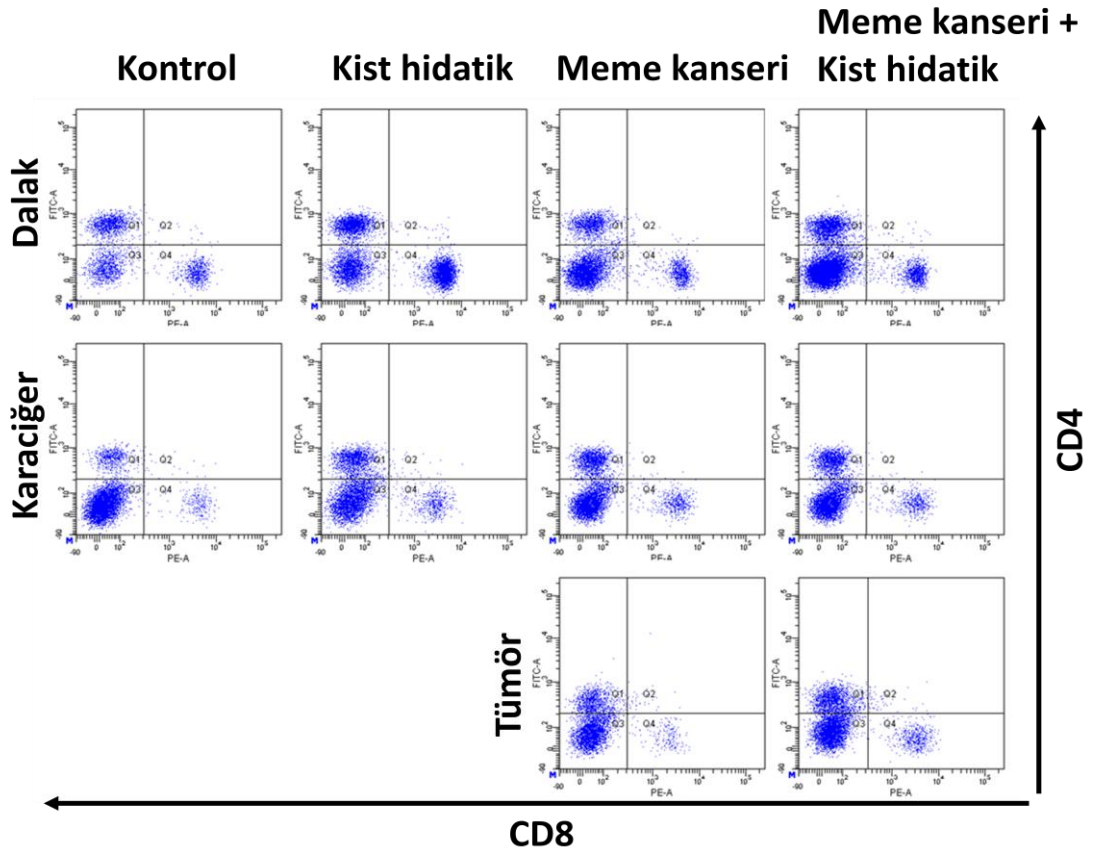
**Şekil-7.** Akım sitometrik immünofenotiplendirme deneyleri sırasında kullanılan hücre analiz stratejisi gösterilmiştir.

Dokulardan elde edilen hücre süspansiyonunda lenfoid yapıdaki hücreler (SSC – FSC grafiğinde kırmızı çokgen ile isaretlenmiştir.) seçilmiş (kapı alınmış) ve CD4 veya CD8 lenfositler belirlenmiştir. Daha sonra CD4 pozitif hücrelerin CCR3, CCR5, CD25, IL-4 ve IFN- $\gamma$ ; CD8 pozitif hücrelerin ise CD25 düzeyleri değerlendirilmiştir.



**Şekil-8.** Deney gruplarından toplanan farklı dokulardan elde edilen hücrelerin büyüklük (FSC) - granülarite (SSC) değerlendirilmesi ile lenfoid hücrelerin seçilme (kırmızı çokgen ile işaretli) aşamasına ait temsili nokta saçılım grafikleri görülmektedir.

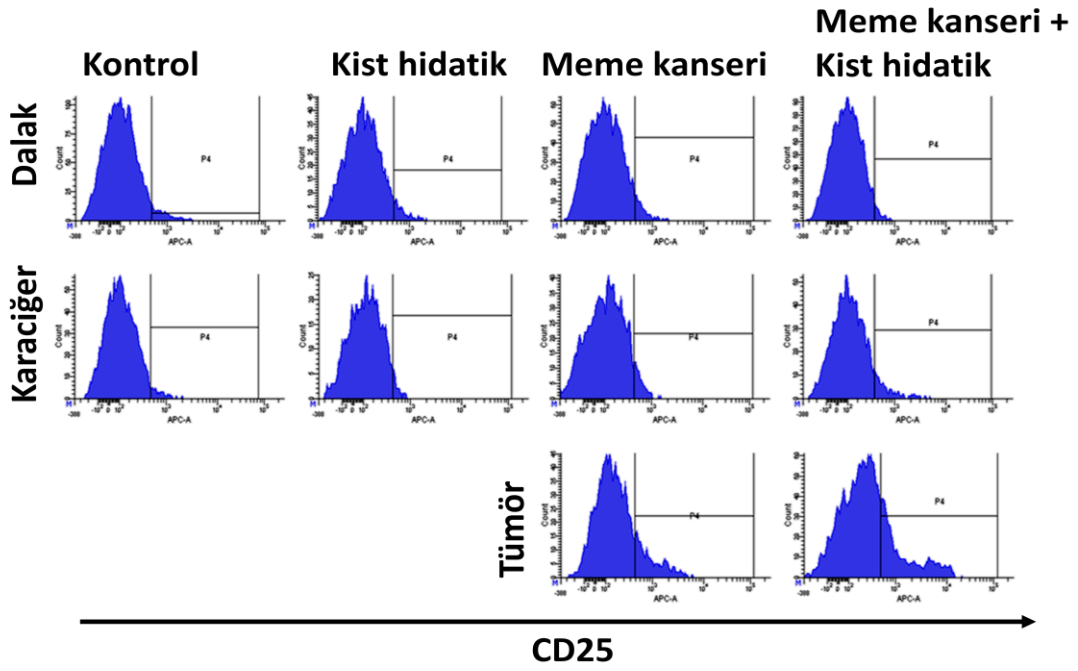
Dalak, karaciğer ve tümör dokularından elde edilen lenfoid hücreler öncelikle CD4 ve CD8 pozitifliklerine göre ayrıldı (Şekil-9). Bu hücreler içerisinde yer alan CD25 pozitif hücreler de analiz edildi (Şekil-10A ve Şekil-10B).



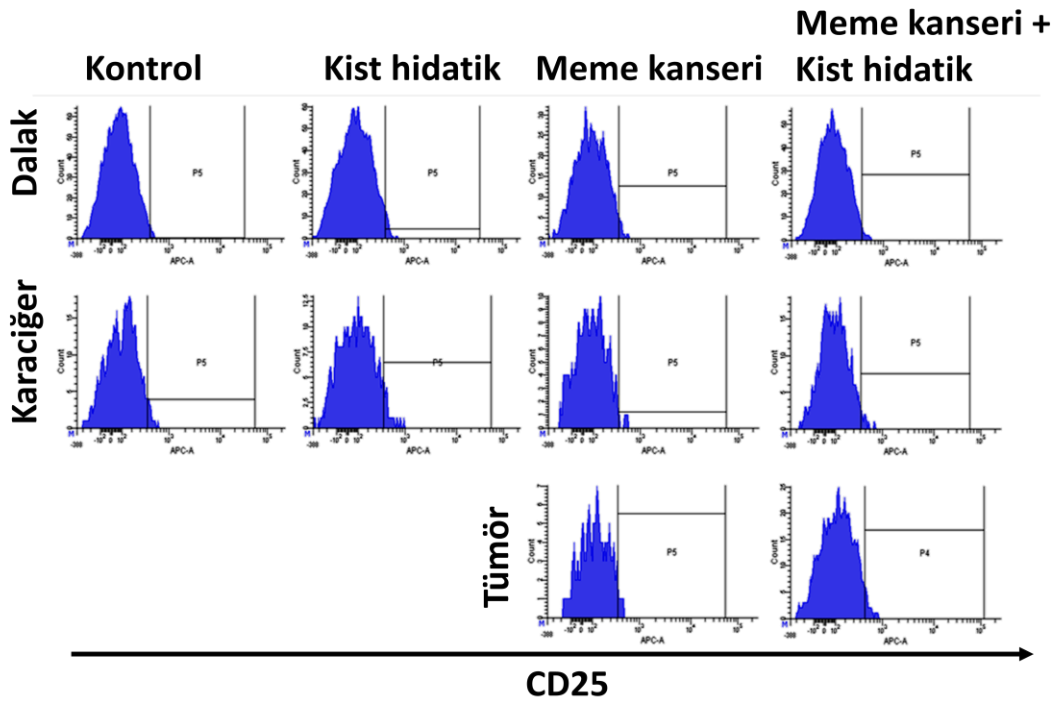
**Şekil-9.** Deney gruplarının farklı dokularına ait lenfoid hücrelerin CD4 ve CD8 belirteçlere göre dağılımını gösteren temsili akım sitometri grafikleri.



A

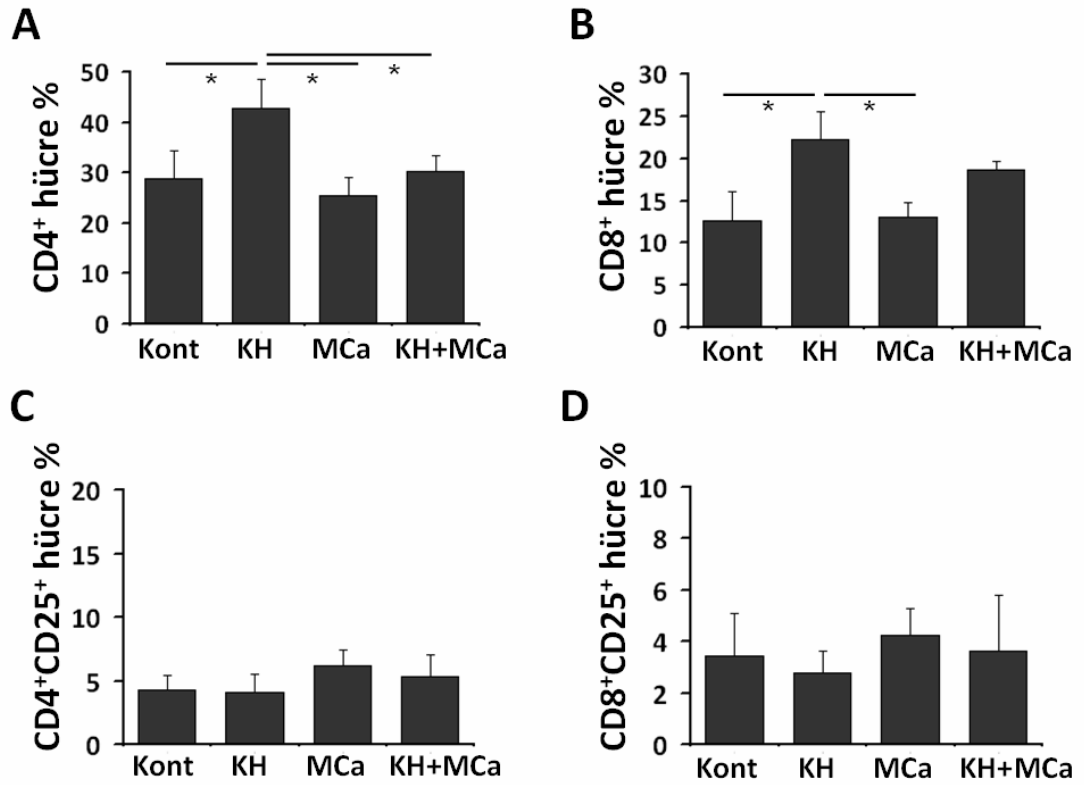


B



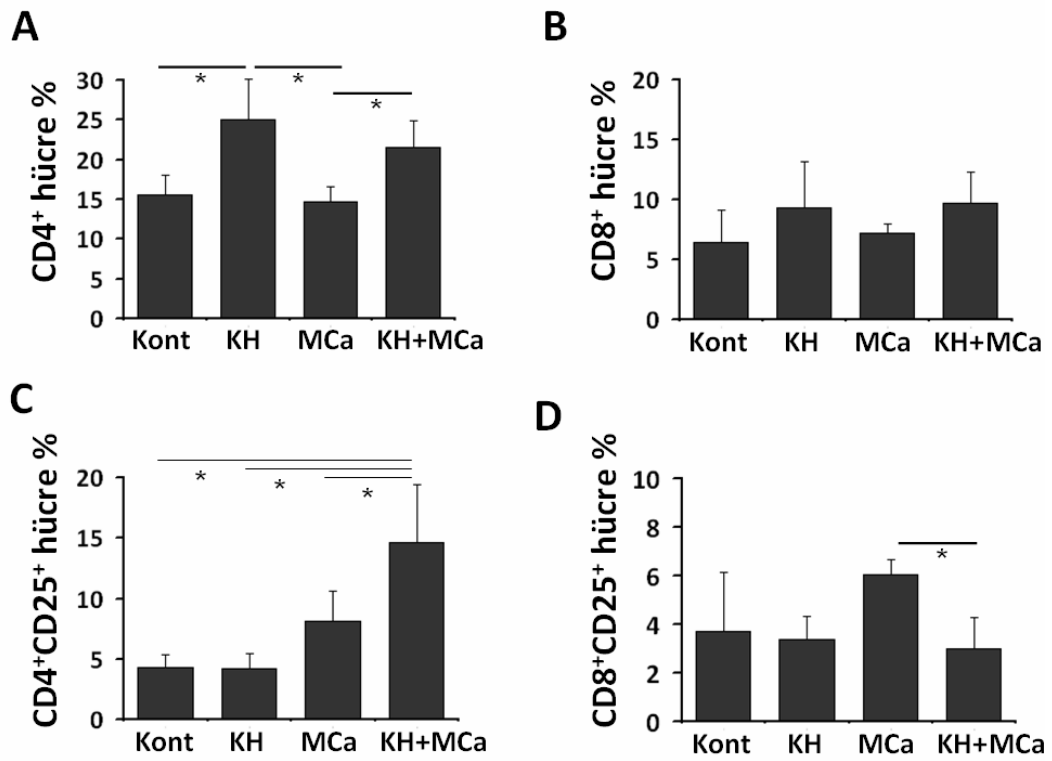
**Şekil-10.** Deney gruplarının farklı dokularına ait (A) CD4 pozitif ve (B) CD8 pozitif lenfoid hücreler üzerinde gerçekleştirilen CD25 ekspresyon analizini gösteren temsili akım sitometri histogramları.

Kist hidatik deney grubuna ait dalak lenfoid hücreleri içerisinde anlamlı düzeyde CD4+ veya CD8+ lenfosit artışı saptandı (Şekil-11A ve Şekil-11B). Benzer bir artış meme kanseri + kist hidatik grubunda da gözlenmesine rağmen istatistiksel düzeyde anlamlı farklılık belirlenmedi. Dalaktaki bu hücrelerin üzerindeki aktivasyon ve/veya düzenleyici fenotip belirteci olan CD25 açısından ise gruplar arasında anlamlı farklılık yoktu (Şekil-11C ve Şekil-11D).

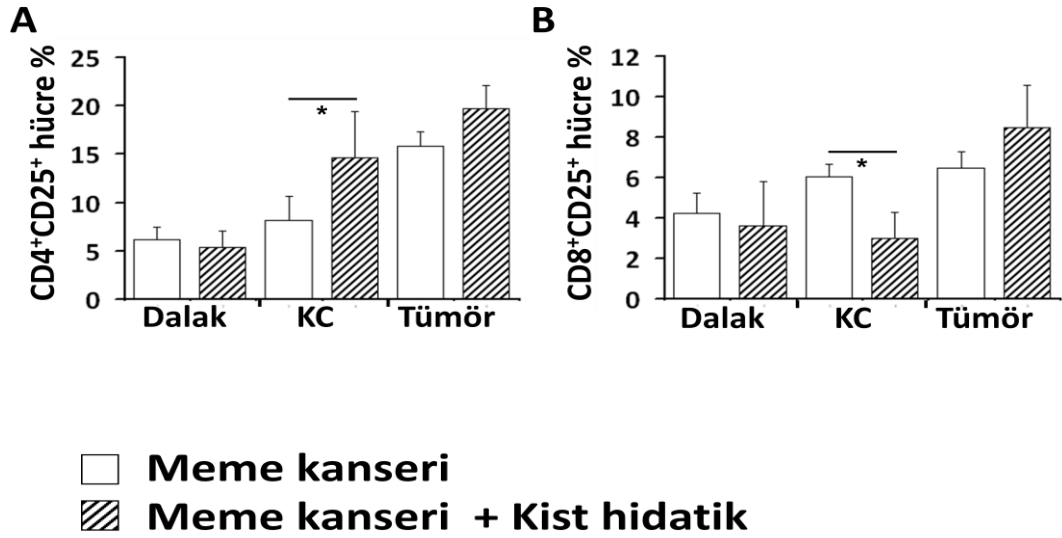


**Şekil-11.** Deney gruplarının dalak dokularına ait A) CD4 pozitif, (B) CD8 pozitif, (C) CD4 hücrelerin içerisindeki CD4+CD25+ ve (D) CD8 hücrelerin içerisindeki CD8+CD25+ lenfoid hücrelerin düzeyleri görülmektedir. En az üç bağımsız deney sonucuna ait ortalama ve standart sapma değerleri gösterilmiştir (\*P<0.05, \*\*P<0.01).

Kist hidatik deney grubuna ait karaciğer lenfoid hücreleri içerisinde anlamlı düzeyde CD4+ lenfosit artışı saptandı. Sadece meme kanseri grubu ile kıyaslandığında, benzer bir artış meme kanseri + kist hidatik grubunda da gözlemlendi (Şekil-12A ve Şekil-13A). Karaciğerdeki CD4+ hücrelerin üzerindeki aktivasyon ve/veya düzenleyici fenotip belirteci olan CD25 açısından ise meme tümörü taşıyan gruplarda artış izlendi. Bu artış meme kanseri + kist hidatik grubunda diğer gruplara göre anlamlı olarak belirlendi (Şekil-12C). Karaciğer CD8+ hücre oranları açısından ise gruplar arasında bir fark saptanmadı (Şekil-12B). CD8+CD25+ hücreler ise sadece meme kanseri grubunda, meme kanseri + kist hidatik grubuna kıyasla anlamlı derecede yüksek bulundu (Şekil-12D ve Şekil-13B).



**Şekil-12.** Deney gruplarının karaciğer dokularına ait (A) CD4 pozitif, (B) CD8 pozitif, (C) CD4 hücrelerin içerisindeki CD4+CD25+ ve (D) CD8 hücrelerin içerisindeki CD8+CD25+ lenfoid hücrelerin düzeyleri görülmektedir. En az üç bağımsız deney sonucuna ait ortalama ve standart sapma değerleri gösterilmiştir (\* $P < 0.05$ ).

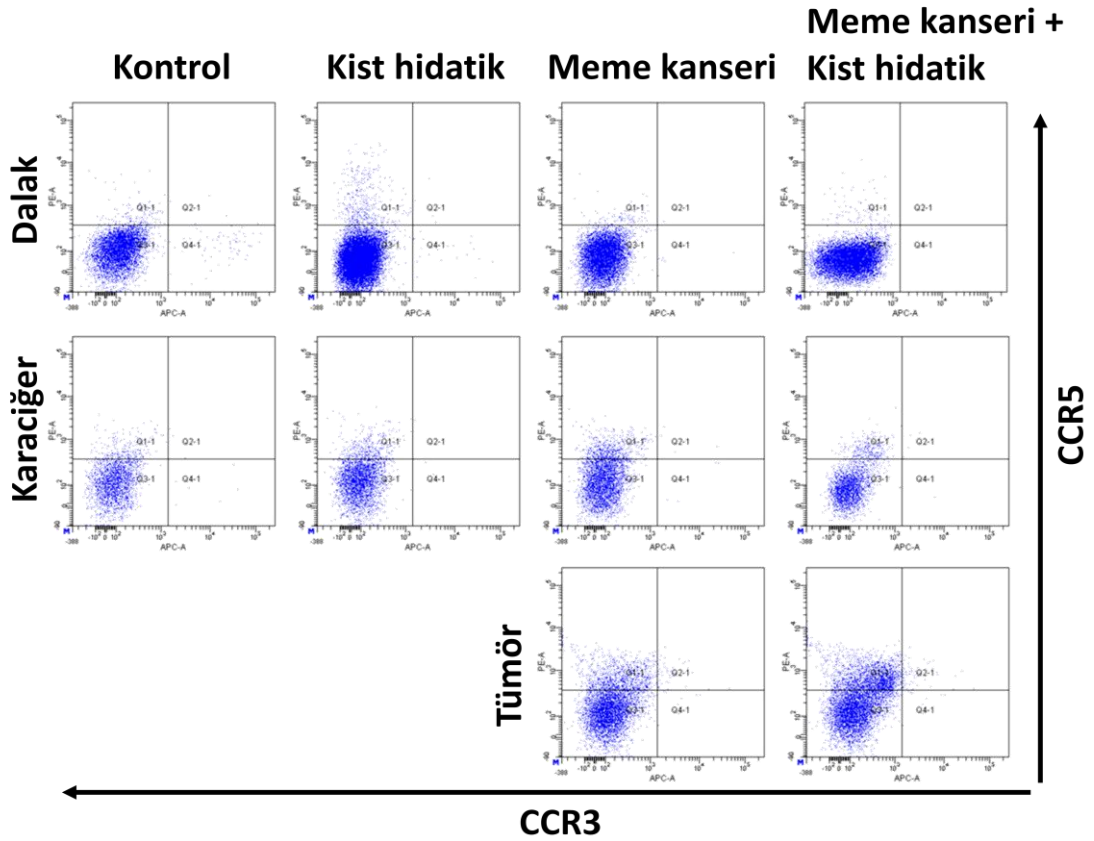


**Şekil-13.** Meme kanseri ve meme kanseri + kist hidatik deney gruplarının dalak, karaciğer ve tümör dokularına ait (A) CD4 hücrelerin içerisindeki CD4+CD25+ ve (B) CD8 hücrelerin içerisindeki CD8+CD25+ lenfoid hücrelerin düzeyleri görülmektedir. En az üç bağımsız deney sonucuna ait ortalama ve standart sapma değerleri gösterilmiştir (\* $P < 0.05$ ).

Sadece meme kanseri ve meme kanseri + kist hidatik gruplarının dalak, karaciğer ve tümör dokuları CD4+CD25+ ve CD8+CD25+ hücre dağılımı açısından karşılaştırıldı (Şekil-13). Tümör dokusunda yer alan hücrelerin CD25 pozitifliğinin diğer dokulardaki hücelere oranla daha yaygın olduğu saptandı. Bununla birlikte, CD4+CD25+ hücre yüzdesi dalak < karaciğer < tümör olarak sıralandı (Şekil-13A).

CD4+ lenfoid hücreler üzerindeki kemokin reseptörleri CCR3 ve CCR5 varlığının analizi için; dalak, karaciğer ve tümör dokularından elde edilen hücreler öncelikle CD4 pozitifliğine göre ayrıldı. Daha sonra CCR3 ve CCR5 hücrelerin dağılımı belirlendi (Şekil-14).

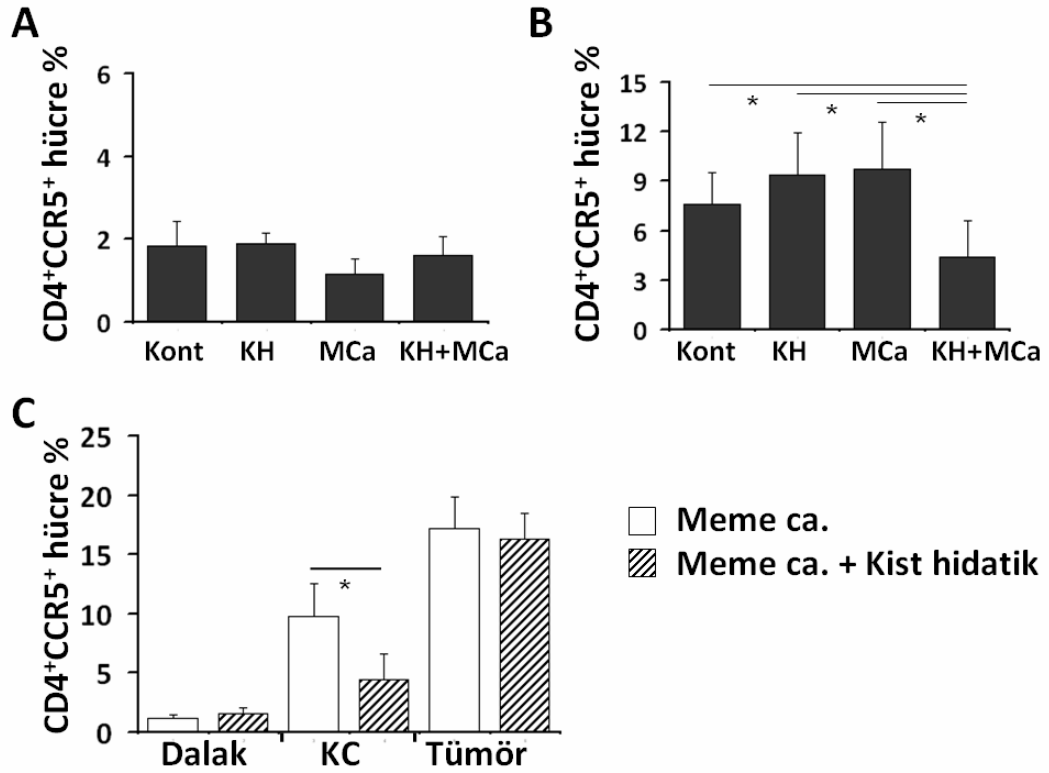
Analiz edilen tüm dokulardaki CD4+ lenfositlerin CCR3 reseptörünü çok düşük düzeyde taşıdığı görüldü (Şekil-14).



**Şekil-14.** Deney gruplarının farklı dokularına ait CD4 pozitif lenfoid hücrelerin CCR3 ve CCR5 belirteçlere göre dağılımını gösteren temsili akım sitometri nokta saçılım grafikleri.

Dalaktan elde edilen CD4+ lenfositlerin CCR5 düzeyleri açısından gruplar arasında bir farklılık saptanmadı (Şekil-15A). CD4+CCR5+ hücreler özellikle karaciğerde daha yoğun olarak saptandı. Ancak, meme kanseri + kist hidatik grubunda CD4+CCR5+ lenfoid hücrelerin düzeyleri anlamlı derecede düşük bulundu (Şekil-15B).

Sadece meme kanseri ve meme kanseri + kist hidatik gruplarının dalak, karaciğer ve tümör dokuları CD4+CCR5+ hücre dağılımı açısından karşılaştırıldı (Şekil-15C). Tümör dokusunda yer alan hücrelerin CCR5 pozitifliğinin diğer dokulardaki hücrelere oranla daha yaygın olduğu saptandı. Bununla birlikte, CD4+CCR5+ hücre yüzdesi dalak < karaciğer < tümör olarak sıralandı (Şekil-15C).

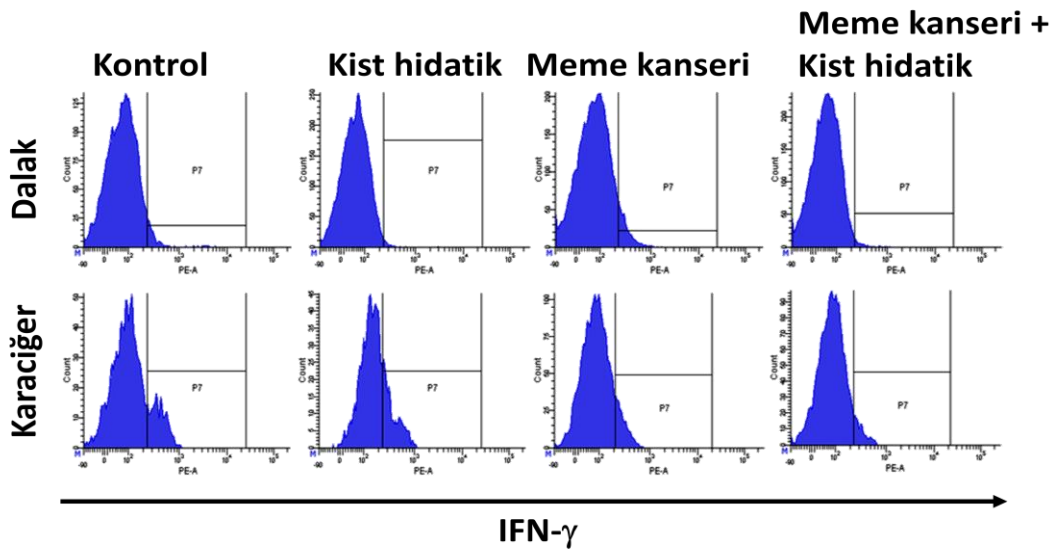


**Şekil-15.** CCR5 reseptörünü taşıyan CD4<sup>+</sup> lenfoid hücrelerin (A) dalak ve (B) karaciğerdeki düzeyi görülmektedir. C) Meme kanseri ve meme kanseri + kist hidatik deney gruplarının dalak, karaciğer ve tümör dokularına ait CD4 hücrelerinin içerisindeki CD4<sup>+</sup>CCR5<sup>+</sup> lenfoid hücrelerin düzeyleri görülmektedir. En az üç bağımsız deney sonucuna ait ortalama ve standart sapma değerleri gösterilmiştir (\* $P < 0.05$ ).

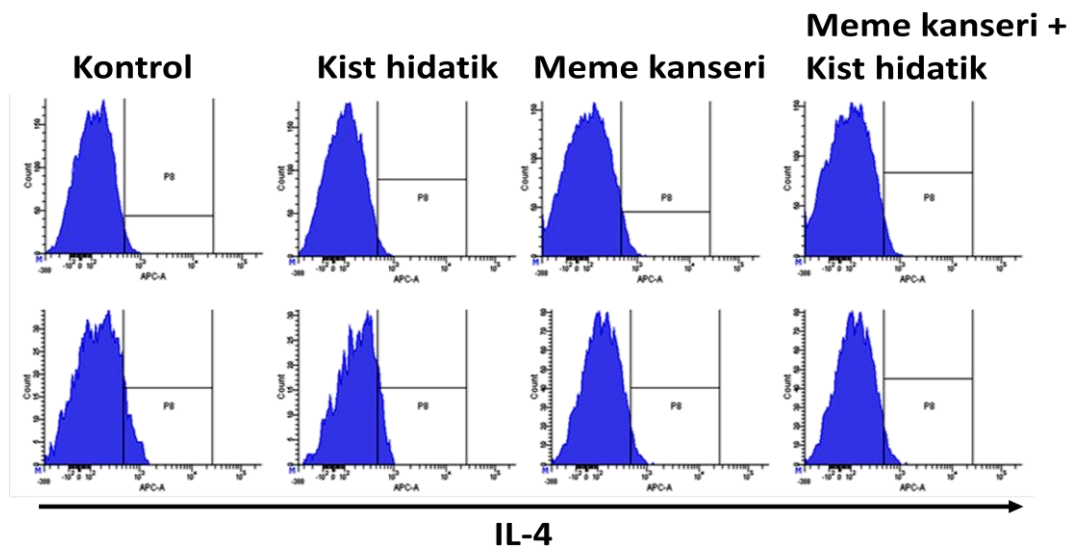
CD4<sup>+</sup> lenfoid hücreler tarafından sentezlenen sitokinler IFN- $\gamma$  ve IL-4'ün hücre içerisindeki varlığının analizi için; dalak ve karaciğer dokularından elde edilen hücreler öncelikle CD4 pozitifliğine göre ayrıldı. Daha sonra IFN- $\gamma$  (Şekil-16A) ve IL-4 (Şekil-16B) eksprese eden hücrelerin dağılımı belirlendi. Tüm gruplarda dalaktan izole edilen CD4<sup>+</sup> lenfositlerin hem IFN- $\gamma$  hem de IL-4 pozitifliğinin çok düşük düzeyde olduğu görüldü (Şekil-17A ve Şekil-17B). Dalaktan elde edilen IFN- $\gamma$  ve/veya IL-4 eksprese eden CD4<sup>+</sup> lenfositlerin düzeyleri açısından gruplar arasında bir farklılık saptanmadı (Şekil-17A ve Şekil-17B). CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ + hücrelerin özellikle

karaciğerde daha yoğun olduğu saptandı. Ancak, meme kanseri + kist hidatik grubunda CD4+IFN- $\gamma$ + lenfoid hücrelerin düzeyleri anlamlı derecede düşük bulundu (Şekil-17C). Meme kanseri + kist hidatik grubunda, karaciğerdeki CD4+IL-4+ hücre düzeyi ise kontrol ve sadece kist hidatik gruplarına kıyasla anlamlı derecede azalmış olarak saptandı (Şekil-17D).

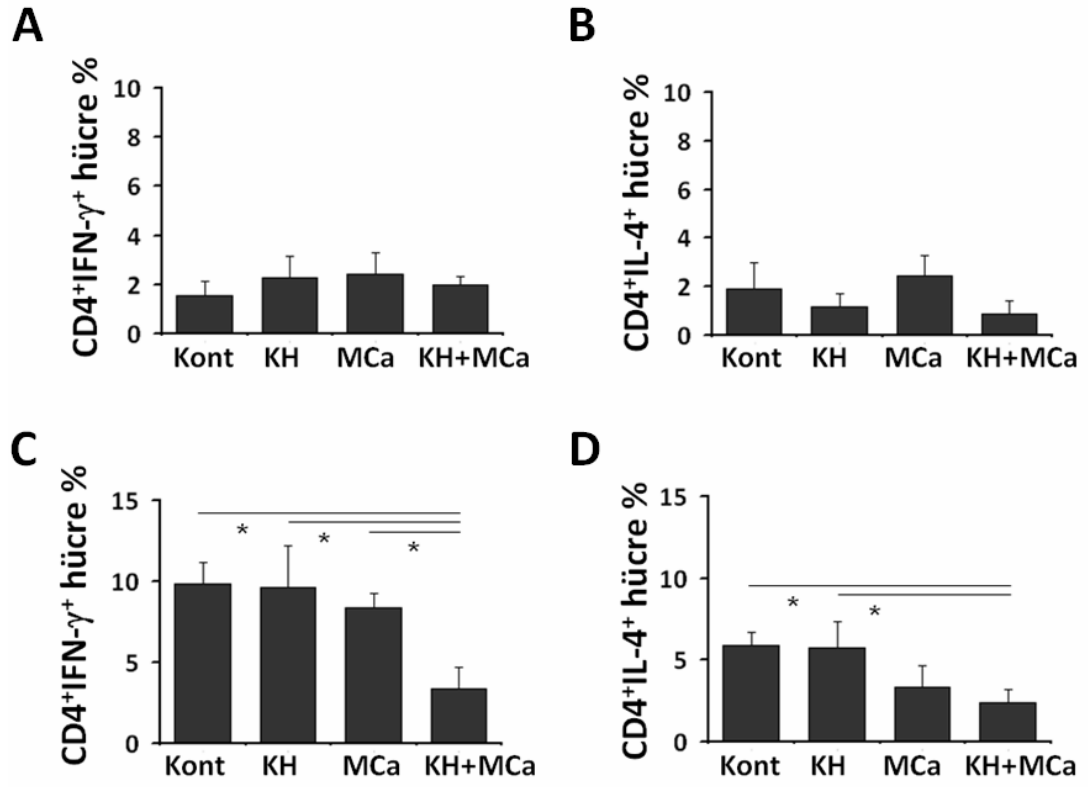
A



B



**Şekil-16.** Deney gruplarının dalak ve karaciğer dokularına ait CD4 pozitif lenfoid hücrelerin (A) IFN- $\gamma$  ve (B) IL-4 ekspresyon analizini gösteren temsili akım sitometri histogramları.



**Şekil-17.** IFN- $\gamma$  (A, C) ve IL-4 (B, D) sitokinlerini eksprese eden CD4+ lenfoid hücrelerin (A, B) dalak ve (C, D) karaciğerdeki düzeyi görülmektedir. En az üç bağımsız deney sonucuna ait ortalama ve standart sapma değerleri gösterilmiştir (\* $P < 0.05$ ).



## 5. TARTIŞMA

Kist hidatik oluşumunun gerek karaciğer homeostazını değiştirmesi gerekse immün yanıtları etkilemesi nedeniyle *Echinococcus granulosus* enfeksiyonuna eşlik eden kanserlerin davranışı değişiklik gösterebilir. Ancak, bu ilişki geniş kapsamlı klinik çalışmalarla ya da deneysel modeller kullanılarak kesin olarak ortaya konulmamıştır.

Çalışmamızda *Echinococcus granulosus* enfeksiyonu sırasında karaciğerde oluşacak immün değişikliklerin meme kanserinin karaciğer ve diğer organ metastazları üzerindeki etkisi hakkında bilgi elde edilmiştir.

Gerçekleştirdiğimiz deneysel çalışmada protoskoleks enjeksiyonu sonucunda kist hidatik ve kist hidatik + meme kanseri gruplarında gözle görülür düzeyde kistler gelişmiştir. Buna dayanılarak elde edilen protoskolekslerin enfektivitesi ve deneysel yöntemin uygun olduğu anlaşılmaktadır. Meme kanseri ve kist hidatik + meme kanseri gruplarında yer alan tüm deneklerde tümör gelişimi sağlanmıştır. Tümör taşıyan hayvanların ağırlıklarının taşımayanlara göre daha düşük seyrettiği belirlenmiştir. Kontrol grubu ile sadece kist hidatik gruplarının ağırlığı arasında belirgin bir fark bulunmamıştır. Bu veriler, *E. granulosus* enfeksiyonunun hayvanların yaşam kalitesi ve beslenmesi üzerinde olumsuz etkisi olmadığına işaret etmektedir. Meme kanseri ve kist hidatik + meme kanseri gruplarında gelişen tümörlerin boyutları ve gelişim süresi benzer bulunmuştur. Bu da *E. granulosus* enfeksiyonunun primer meme tümörü gelişimi üzerinde etkisi olmayabileceğini düşündürmektedir. Deneysel meme kanseri modeli olarak kullanılan 4T1 hücreleri oldukça tümörijeniktir, metastaz kapasitesi yüksektir ve pek çok kemoterapi ajanına karşı dirençlidir (5). Bu nedenle *E. granulosus* enfeksiyonunun neden olduğu sistemik etkilerin bu hücrelerin meme dokusundaki gelişimini etkilememiş olması beklenebilir. Sadece kist hidatik grubunda dalak ve karaciğer dokularında yardımcı T lenfositlerle uyumlu olabilecek CD4+ lenfoid hücrelerin belirgin artışı saptandı. Benzer şekilde dalakta sitotoksik T lenfositlerle uyumlu olabilecek CD8+ lenfoid hücrelerde de artış vardı. Kist hidatik grubunda T lenfositlerin fonksiyonel ve fenotipik belirteçleri (CD25, CCR5, IL-4, IFN- $\gamma$ ) açısından bir fark gözlenmedi. Ancak, CD4 ve CD8 belirteçlerini taşıyan hücrelerin artışı bu grupta kronik

enfeksiyon varlığı ile ilişkilendirilebilir. Parazit enfeksiyonlarının yol açtığı alerjik aşırı duyarlılık immün yanıt tipinde IL-4'ün rol oynayabileceği bilinmektedir (22). Kist hidatik grubunda IL-4 taşıyan lenfositlerin oranında bir değişim yoktu. Bu durumun nedenleri arasında; IL-4 dışında alerjik yanıtlara aracılık eden diğer sitokinlerin etkin olabilmesi (özellikle helmint enfeksiyonlarına karşı immün yanıtlarda IL-5, IL-10 ve IL-13), karaciğer ve dalak dışındaki, özellikle barsakla ilişkili lokal (örneğin, mezenterik) lenf bezlerinin değerlendirilmemiş olması, enfeksiyonun doğal yollarla *E. granulosus* yumurtaları ile değil doğrudan i.p. protoskoleks inokülasyonu ile gerçekleştirilmiş olması, ve immünolojik analizlerin enfeksiyonun kronik döneminde yapılmış olması olarak sıralanabilir.

Tüm dokularda oldukça düşük düzeyde belirlenen IL-4 verisi, yine çok az oranda belirlenen CD4+CCR3+ hücre düzeyi ile koreledir. Zira, CCR3'ün alerjik immün yanıtlara aracılık eden tip 2 yardımcı T hücrelerde (T helper 2, Th2) CCR5'e göre daha yaygın bulunduğu bilinmektedir. Sonuçlarımızla uyumlu olarak, CD25, CCR5 ve IFN- $\gamma$  pozitifliği gösteren CD4+ hücrelerin düzeyinde ise parazit enfeksiyonları sırasında belirgin bir değişim bildirilmemiştir (6).

Meme kanseri ve kist hidatik + meme kanseri grupları tümör dokularından elde edilen CD4+ lenfoid hücrelerin CD25 ve CCR5'i diğer dokulardaki hücrelere kıyasla daha yüksek düzeyde taşıdığı görüldü. Ancak, iki grup arasında tümör boyutları arasında fark olmadığı gibi immün parametreler açısından da bir farka rastlanmadı.

CD25 T hücre aktivasyonu ve yüksek düzeyde bulunduğu ise düzenleyici T hücre (regulatory T cell, Treg) varlığını gösteren bir belirteçtir (3). Tümör dokusu gibi immün baskılamanın yüksek olduğu bölgelerde CD4+CD25+ hücrelerin Treg olarak nitelendirilmesi yaygındır. İnflamatuvar bölgelere lenfosit toplanmasına aracılık eden CCR5 ise dokuda yer alan hücreler üzerinde bulunur. CCR5'in antitümör immün yanıtlara aracılık eden tip 1 yardımcı T hücrelerde (T helper 1, Th1) CCR3'e göre daha yaygın bulunduğu bilinmektedir. Treg ve dokuya göçen Th1 benzeri hücrelerin varlığı tümör mikroçevresi için oldukça iyi tanımlanmış bir durumdur (23).

Kist hidatik + meme kanseri grubunda dalakta yer alan lenfoid hücre miktarında hafif bir artış olmasına rağmen istatistiksel anlamlılığa ulaşmamıştır. Bu durum sadece kist hidatik oluşturulmuş gruptaki CD4 ve CD8 lenfoid hücrelerin artışının kanser varlığında azaldığı şeklinde yorumlanabilir. Gerek *E. granulosus* gerekse meme kanserinin metastaz hedefleri arasında olan karaciğer bu grupta en çok değişime uğrayan organ oldu. Kist hidatik + meme kanseri grubu karaciğerlerinde sadece meme kanseri geliştirilen gruba kıyasla anlamlı düzeyde CD4+ lenfoid hücre artışı görüldü. Bu hücreler arasında CD25 pozitifliğinin artmış, CCR5 ve IFN- $\gamma$  taşıyan hücre düzeyinin belirgin derecede azalmış olduğu belirlendi.

IFN- $\gamma$  anti-tümör immün yanıtlara aracılık eden Th1 hücrelerinin başlıca ürünüdür (23). Hem IFN- $\gamma$  hem de CCR5 düzeyindeki azalma kist hidatik + meme kanseri grubu karaciğer dokusundaki Th1 yanıtlarının güçsüzlüğüne işaret eder. Diğer taraftan, CD4+CD25+ hücrelerin varlığı immün baskılayıcı Treg hücrelerinin karaciğer dokusunda arttığı anlamına gelebilir. Elde ettiğimiz veriler karaciğerde tümöre karşı Th1 yanıtlarının düşmesi ve tümörü destekleyen Treg yanıtlarının artışı göstermektedir. Ek olarak, kist hidatik + meme kanseri grubu karaciğerlerinde IL-4 ekspresyon eden CD4+ T lenfosit düzeylerinin de azaldığı belirlendi. Bu da karaciğerde hem Th1 hem de Th2 tipi yanıtları sekteye uğratabilecek ve Treg aktivitesi ile uyumlu genel bir immün baskılama olduğu şeklinde yorumlanabilir. Th1 hücrelerinin etkisi ile *Echinococcus* metastodlarının öldürülebildiğine dair yayınlar bulunmaktadır (6).

Th1/Th2 dengesi konakçının immün sistemi ve *E. granulosus* enfeksiyonu arasındaki dengeyi açıklamak için önemlidir (60). Kronik enfeksiyon durumunda T hücreler Th2 yönünde farklılaşırlar. Bu nedenle kısa süreli in vivo deneylerde IL-4 seviyesi ve CCR3 ekspresyon eden T helper hücrelerin seviyesinin düşük olarak saptanması beklenir. Ayrıca, Treg hücreler Th2 yönünde farklılaşmayı inhibe ederler (61). Bu faktörler, kist hidatik + meme kanseri deney grubunda saptanan IL-4+ fenotip düşüklüğünü açıklayabilir.

Meme kanseri ve kist hidatik + meme kanseri grupları arasında primer tümörlerin gerek boyut gerekse histopatolojik düzeyde invazyon ve yayılım açısından bir fark gözlenmedi. Ancak, kist hidatik + meme kanseri grubunda karaciğer metastazları anlamlı derecede artmış olarak bulundu. Ayrıca, karaciğerdeki

metastaz odakları yalnızca meme kanseri geliştirilen farelerdeki karaciğer metastaz odaklarına kıyasla görece büyüktü. Diğer taraftan, kist hidatik ve kist hidatik + meme kanseri grupları arasında karın bölgesinde kist gelişim sıklığı açısından bir fark gözlenmezken, karaciğerde kist varlığı kist hidatik + meme kanseri grubunda görüldü.

Bu bulgular immünolojik veriler ile yorumlandığında, *E. granulosus* enfeksiyonu ve meme kanseri varlığının karaciğerde hem kanser yayılımını hem de kist hidatik gelişimini artıracak şekilde değişiklikler yarattığı savunulabilir. Kist hidatik + meme kanseri grubuna öncelikle *E. granulosus* inokülasyonu yapıp daha sonra meme kanseri hücreleri enjekte edildiğinden dolayı karaciğerde gelişen kistlerin meme kanserinin yarattığı immün baskılama ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Yine bu grupta gözlenen karaciğer metastaz oranındaki artış *E. granulosus* enfeksiyonunun karaciğeri hedefleyen metastaz sürecini de etkilediğine işaret etmektedir. Bu gruptaki metastaz odaklarının meme kanseri grubuna göre daha büyük oluşu da bu yönde bir kanıt oluşturmaktadır. Ancak, karaciğerde kist ve metastaz birlikteliğinin korelasyon göstermemiş olması kist oluşumu ve metastaz süreçlerinin bir birinden bağımsız olarak geliştiği görüşünü destekler.

*E. granulosus* yaşam döngüsü sırasında karaciğere de uğrar. Ancak, fare *E. multilocularis* enfeksiyonuna açıkken, *E. granulosus* için doğal bir konakçı değildir (9). Protoskoleksler ile enfekte edilmiş farelerde karın bölgesinde kist gelişimi olmasına rağmen karaciğerde lezyona rastlanmamış olması bu parazitin fare karaciğerine yerleşerek kist oluşturacak uygun bir ortam bulamadığı şeklinde yorumlanabilir. Ancak, tümör gelişimini takiben değişen fizyoloji ve immün düzenlenme karaciğeri kist oluşumu için daha duyarlı kılmış olabilir.

Benzer şekilde, 4T1 meme kanseri modelinde karaciğer ikincil düzeyde tercih edilen yayılım hedefidir (5). İnflamatuvar bölgeler metastaz için daha cazip alanlar olarak nitelendirilir. *E. granulosus* enfeksiyonunun karaciğerde daha aktif hale gelmesi metastatik 4T1 hücrelerini bu organa yönlendirmiş olabilir. Meme kanseri ve kist hidatik + meme kanseri grupları arasında akciğer metastazları açısından bir fark olmaması bu görüşü destekler. Bu olgunun daha detaylı bir şekilde doğrulanması amacıyla, karaciğerde gerçekleşen metastaz kinetiğinin zamana bağlı analizi ve buna paralel değişen immün yanıtların analiz edilmesi önerilebilir.

*E.granulosus* enfeksiyonu ve kanser gelişimi sonrası oluşan benzer antijenik yapılar, hastada çapraz reaksiyona neden olabilirler. Normal florada bulunan mikroorganizmalar ve immün sistemin etkileşimi sonrası anti-T ve anti-Tn antikoru oluşur. Kanser hücreleri normal flora mikroorganizmalarına benzer T (Thomsen-Friedenreich) ve Tn antijeni üretirler. Böylece daha önce vücutta üretilmiş antikoru spontan olarak kanser hücreleri üzerindeki antijenleri de tanıyabilirler. Kist hidatik enfeksiyonu olan hastalarda *E.granulosus* nedeniyle yüksek miktarda o-glikozillenmiş Tn antijeni oluşur. Diğer taraftan *E. granulosus* özgül olmayan natural killer (NK) hücre aktivitesini hızla artırarak anti-tümör yanıtta rol alan sitokinlerin salınmasına neden olabilir. Dolayısıyla *E. granulosus* enfeksiyonu nedeniyle gelişen immün mediatörler kanser hücreleri ile çapraz reaksiyon oluşturabilir (4). Oysa bizim çalışmamızda *E. granulosus* enfeksiyonunun, farelerde meme kanseri metastazı gelişiminde koruyucu etkisi olmadığı gösterilmiştir. Ancak çalışmamızda tümör gelişimi oldukça saldırgan özellikler gösteren 4T1 meme kanseri hücrelerinin doğrudan dokuya ekimi sonrası geliştirildiğinden, kanser oluşumunun ilk basamaklarında olabilecek immünolojik koruma mekanizmaları ile ilgili bilgi sahibi olmak mümkün olmamıştır.

## 6. SONUÇ

Gerçekleştirdiğimiz deneysel çalışmamızda;

- Enfeksiyon ve tümör patofizyolojisini anlamaya yönelik deneysel kist hidatik, meme kanseri ve metastatik meme kanseri modelleri oluşturuldu.
- Meme kanseri ve kist hidatik birlikteliği olan deney grubunda, patolojik incelemelerde karaciğerde hem kist hidatik hem de metastaz oranının diğer gruplara göre daha fazla olduğu gösterildi.
- Bu durum immünojenik olarak değerlendirildiğinde, hem tümör hem de metastaz ölümüne neden olan Th1 tipi immün yanıtın, meme kanseri ve kist hidatik grubu karaciğerinde belirgin olarak düşük olduğu gösterildi.
- Elde ettiğimiz deneysel veriler kanser ve ekinokok enfeksiyonu varlığının karaciğerde yıkıcı etkisi olabileceğine işaret etmektedir.

## 7. KAYNAKLAR

1. Bohle A, Brandau S. Immune mechanisms in bacillus Calmette-Guerin immunotherapy for superficial bladder cancer. *The Journal of urology*. 2003;170(3):964-9.
2. Hunter CA, Yu D, Gee M, Ngo CV, Sevignani C, Goldschmidt M, ve ark. Cutting edge: systemic inhibition of angiogenesis underlies resistance to tumors during acute toxoplasmosis. *Journal of immunology*. 2001;166(10):5878-81.
3. Abbas A.K. LAH, Pober, J.S. Immunity to Tumors, Cellular and Molecular Immunology. 6.baskı Syf; 303-20 .2009
4. Alvarez Errico D, Medeiros A, Miguez M, Casaravilla C, Malgor R, Carmona C, ve ark. O-glycosylation in *Echinococcus granulosus*: identification and characterization of the carcinoma-associated Tn antigen. *Experimental parasitology*. 2001;98(2):100-9.
5. Pulaski BA, Ostrand-Rosenberg S. Mouse 4T1 breast tumor model. *Current protocols in immunology / edited by John E Coligan [ve ark]*. 2001;Chapter 20:Unit 20 2.
6. Lin R, Lu G, Wang J, Zhang C, Xie W, Lu X, ve ark. Time course of gene expression profiling in the liver of experimental mice infected with *Echinococcus multilocularis*. *PloS one*. 2011;6(1):e14557.
7. Akgul H, Tez M, Unal AE, Keskek M, Sayek I, Ozcelik T. *Echinococcus* against cancer: why not? *Cancer*. 2003;98(9):1999-2000.
8. Tunger O. [Epidemiology of cystic echinococcosis in the world]. *Turkiye parazitolojii dergisi / Turkiye Parazitoloji Dernegi = Acta parasitologica Turcica / Turkish Society for Parasitology*. 2013;37(1):47-52.
9. McManus DP, Zhang W, Li J, Bartley PB. Echinococcosis. *Lancet*. 2003;362(9392):1295-304.
10. Eckert J, Deplazes P. Biological, epidemiological, and clinical aspects of echinococcosis, a zoonosis of increasing concern. *Clinical microbiology reviews*. 2004;17(1):107-35.

11. Moro P, Schantz PM. Echinococcosis: a review. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases*. 2009;13(2):125-33.
12. Altintas N. Past to present: echinococcosis in Turkey. *Acta tropica*. 2003;85(2):105-12.
13. McManus DP, Gray DJ, Zhang W, Yang Y. Diagnosis, treatment, and management of echinococcosis. *Bmj*. 2012;344:e3866.
14. Brunicaudi FC. *Schwartz's Principles of Surgery*. 9th ed2010.
15. Cotlar AM, Dubose JJ, Rose DM. History of surgery for breast cancer: radical to the sublime. *Current surgery*. 2003;60(3):329-37.
16. Chua TC, Saxena A, Liauw W, Chu F, Morris DL. Hepatic resection for metastatic breast cancer: a systematic review. *European journal of cancer*. 2011;47(15):2282-90.
17. Andre F, Slimane K, Bachelot T, Dunant A, Namer M, Barrelier A, ve ark. Breast cancer with synchronous metastases: trends in survival during a 14-year period. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2004;22(16):3302-8.
18. Le Scodan R, Stevens D, Brain E, Floiras JL, Cohen-Solal C, De La Lande B, ve ark. Breast cancer with synchronous metastases: survival impact of exclusive locoregional radiotherapy. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2009;27(9):1375-81.
19. Largillier R, Ferrero JM, Doyen J, Barriere J, Namer M, Mari V, ve ark. Prognostic factors in 1,038 women with metastatic breast cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2008;19(12):2012-9.
20. Bafford AC, Burstein HJ, Barkley CR, Smith BL, Lipsitz S, Iglehart JD, ve ark. Breast surgery in stage IV breast cancer: impact of staging and patient selection on overall survival. *Breast cancer research and treatment*. 2009;115(1):7-12.
21. Aslakson CJ, Miller FR. Selective events in the metastatic process defined by analysis of the sequential dissemination of subpopulations of a mouse mammary tumor. *Cancer research*. 1992;52(6):1399-405.



22. Abbas A.K. LAH, Pober, J.S. Immunity to Tumors, Cellular and Molecular Immunology. 6. baskı Syf; 235-67, 2009 .
23. Abbas A.K. LAH, Pober, J.S. Immunity to Tumors, Cellular and Molecular Immunology. 6. Baskı, Syf; 303-19, 2009.
24. Farrar JD, Asnagli H, Murphy KM. T helper subset development: roles of instruction, selection, and transcription. The Journal of clinical investigation. 2002;109(4):431-5.
25. Marrack P, Kappler J. Control of T cell viability. Annual review of immunology. 2004;22:765-87.
26. Seder RA, Ahmed R. Similarities and differences in CD4+ and CD8+ effector and memory T cell generation. Nature immunology. 2003;4(9):835-42.
27. Murphy KM, Reiner SL. The lineage decisions of helper T cells. Nature reviews Immunology. 2002;2(12):933-44.
28. Bromley SK, Mempel TR, Luster AD. Orchestrating the orchestrators: chemokines in control of T cell traffic. Nature immunology. 2008;9(9):970-80.
29. Stemberger C, Neuenhahn M, Buchholz VR, Busch DH. Origin of CD8+ effector and memory T cell subsets. Cellular & molecular immunology. 2007;4(6):399-405.
30. Lanzavecchia A, Sallusto F. Understanding the generation and function of memory T cell subsets. Current opinion in immunology. 2005;17(3):326-32.
31. Schumacher A, Zenclussen AC. Regulatory T Cells: Regulators of Life. American journal of reproductive immunology. 2014.
32. Xu W, Banchereau J. The Antigen Presenting Cells Instruct Plasma Cell Differentiation. Frontiers in immunology. 2014;4:504.
33. von Andrian UH, Mempel TR. Homing and cellular traffic in lymph nodes. Nature reviews Immunology. 2003;3(11):867-78.
34. Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? Lancet. 2001;357(9255):539-45.
35. Thun MJ, Henley SJ, Gansler T. Inflammation and cancer: an epidemiological perspective. Novartis Foundation symposium. 2004;256:6-21; discussion 2-8, 49-52, 266-9.

36. Pages F, Galon J, Dieu-Nosjean MC, Tartour E, Sautes-Fridman C, Fridman WH. Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored. *Oncogene*. 2010;29(8):1093-102.
37. de la Cruz-Merino L, Barco-Sanchez A, Henao Carrasco F, Nogales Fernandez E, Vallejo Benitez A, Brugal Molina J, ve ark. New insights into the role of the immune microenvironment in breast carcinoma. *Clinical & developmental immunology*. 2013;2013:785317.
38. Whiteside TL. Immune responses to cancer: are they potential biomarkers of prognosis? *Frontiers in oncology*. 2013;3:107.
39. Bates GJ, Fox SB, Han C, Leek RD, Garcia JF, Harris AL, ve ark. Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2006;24(34):5373-80.
40. Liyanage UK, Moore TT, Joo HG, Tanaka Y, Herrmann V, Doherty G, ve ark. Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. *Journal of immunology*. 2002;169(5):2756-61.
41. Obeid E, Nanda R, Fu YX, Olopade OI. The role of tumor-associated macrophages in breast cancer progression (review). *International journal of oncology*. 2013;43(1):5-12.
42. Lewis JS, Landers RJ, Underwood JC, Harris AL, Lewis CE. Expression of vascular endothelial growth factor by macrophages is up-regulated in poorly vascularized areas of breast carcinomas. *The Journal of pathology*. 2000;192(2):150-8.
43. Eichbaum C, Meyer AS, Wang N, Bischofs E, Steinborn A, Bruckner T, ve ark. Breast cancer cell-derived cytokines, macrophages and cell adhesion: implications for metastasis. *Anticancer research*. 2011;31(10):3219-27.
44. Giraud E, Inoue M, Hanahan D. An amino-bisphosphonate targets MMP-9-expressing macrophages and angiogenesis to impair cervical carcinogenesis. *The Journal of clinical investigation*. 2004;114(5):623-33.

45. Dineen SP, Lynn KD, Holloway SE, Miller AF, Sullivan JP, Shames DS, ve ark. Vascular endothelial growth factor receptor 2 mediates macrophage infiltration into orthotopic pancreatic tumors in mice. *Cancer research*. 2008;68(11):4340-6.
46. Zitvogel L, Kepp O, Kroemer G. Immune parameters affecting the efficacy of chemotherapeutic regimens. *Nature reviews Clinical oncology*. 2011;8(3):151-60.
47. Zhang W, Wen H, Li J, Lin R, McManus DP. Immunology and immunodiagnosis of cystic echinococcosis: an update. *Clinical & developmental immunology*. 2012;2012:101895.
48. Bayraktar MR, Mehmet N, Durmaz R. Th1 and Th2 inducing cytokines in Cystic echinococcosis. *Turkiye parazitolojii dergisi / Turkiye Parazitoloji Dernegi = Acta parasitologica Turcica / Turkish Society for Parasitology*. 2005;29(3):167-70.
49. Siracusano A, Rigano R, Ortona E, Profumo E, Margutti P, Buttari B, ve ark. Immunomodulatory mechanisms during *Echinococcus granulosus* infection. *Experimental parasitology*. 2008;119(4):483-9.
50. Wada Y, Nakashima O, Kutami R, Yamamoto O, Kojiro M. Clinicopathological study on hepatocellular carcinoma with lymphocytic infiltration. *Hepatology*. 1998;27(2):407-14.
51. Mizukoshi E, Nakamoto Y, Arai K, Yamashita T, Sakai A, Sakai Y, ve ark. Comparative analysis of various tumor-associated antigen-specific t-cell responses in patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2011;53(4):1206-16.
52. Shibolet O, Alper R, Zlotogarov L, Thalenfeld B, Engelhardt D, Rabbani E, ve ark. NKT and CD8 lymphocytes mediate suppression of hepatocellular carcinoma growth via tumor antigen-pulsed dendritic cells. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2003;106(2):236-43.
53. Wu H, Chen P, Liao R, Li YW, Yi Y, Wang JX, ve ark. Intratumoral regulatory T cells with higher prevalence and more suppressive activity in hepatocellular carcinoma patients. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2013;28(9):1555-64.

54. Huang X, Zou Y, Lian L, Wu X, He X, He X, ve ark. Changes of T cells and cytokines TGF-beta1 and IL-10 in mice during liver metastasis of colon carcinoma: implications for liver anti-tumor immunity. *Journal of gastrointestinal surgery : official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract*. 2013;17(7):1283-91.
55. Butterfield LH, Ribas A, Meng WS, Dissette VB, Amarnani S, Vu HT, ve ark. T-cell responses to HLA-A\*0201 immunodominant peptides derived from alpha-fetoprotein in patients with hepatocellular cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2003;9(16 Pt 1):5902-8.
56. Schmidt N, Neumann-Haefelin C, Thimme R. Cellular immune responses to hepatocellular carcinoma: lessons for immunotherapy. *Digestive diseases*. 2012;30(5):483-91.
57. Cany J, Tran L, Gauttier V, Judor JP, Vassaux G, Ferry N, ve ark. Immunotherapy of hepatocellular carcinoma: is there a place for regulatory T-lymphocyte depletion? *Immunotherapy*. 2011;3(4 Suppl):32-4.
58. Butterfield LH. Recent advances in immunotherapy for hepatocellular cancer. *Swiss medical weekly*. 2007;137(5-6):83-90.
59. Butterfield LH. Immunotherapeutic strategies for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 2004;127(5 Suppl 1):S232-41.
60. Dematteis S, Baz A, Rottenberg M, Fernandez C, Orn A, Nieto A. Antibody and Th1/Th2-type responses in BALB/c mice inoculated with live or dead *Echinococcus granulosus* protoscoleces. *Parasite immunology*. 1999;21(1):19-26.
61. Pan W, Zhou HJ, Shen YJ, Wang Y, Xu YX, Hu Y, ve ark. Surveillance on the status of immune cells after *Echinococcus granulosus* protoscoleces infection in Balb/c mice. *PloS one*. 2013;8(3):e59746.