

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI

DENEYSEL MEME KANSERİ MODELİNDE COVID-19
AŞILARININ İMMÜNOLOJİK ETKİLERİ

Dr. Urfan HUMMATOV

UZMANLIK TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

ANKARA

2024

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI

DENEYSEL MEME KANSERİ MODELİNDE COVID-19
AŞILARININ İMMÜNOLOJİK ETKİLERİ

Dr. Urfan HUMMATOV

UZMANLIK TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Derya KARAKOÇ

ANKARA

2024

TEŞEKKÜR

Tezimin ortaya çıkmasından tamamlanmasına kadar geçen süreçte sağladıkları katkılardan dolayı başta tez danışmanım Prof. Dr. Derya KARAKOÇ olmak üzere Prof. Dr. Güneş ESENDAĞLI'ya, çalışmanın sürdürülmesinde ve takibinde özveriyle çalışan Öğr. Gör. Süleyman Can ÖZTÜRK'e, Dr. Sibel GÖKŞEN'e, Moleküler Biyolog Gizem AKÇA'ya ve Moleküler Biyolog Tuğçe TEMEL'e patoloji kısmında büyük emeği olan Prof. Dr. Kemal KÖSEMEHMETOĞLU' na teşekkür ederim.

Tez süreci boyunca yardımlarından dolayı Prof. Dr. Ahmet Bülent DOĞRUL' a ve Doç. Dr. Nezh AKKAPULU'ya da ayrıca teşekkür ederim.

Eğitim hayatımın başlangıcından genel cerrah olduğum bugüne kadar desteklerini daima hissettiğim değerli annem Sudaba MİRZAYEVA'ya ve babam Bayram HUMMATOV'a, zorlu uzmanlık eğitimim boyunca yanımda olup bana destek olan değerli eşim Khuraman GAHRAMANOVA'ya teşekkür ederim.

Dr. Urfan HUMMATOV

ÖZET

Urfan H., Deneysel Meme Kanseri Modelinde COVID-19 Aşılarının İmmünolojik Etkileri, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi, Ankara, 2024.

COVID-19 salgınının kontrolü için önerilen seçeneklerden biri aşıdır. Kanser hastalarının COVID-19'dan ölme riski sıradan insanlara göre daha yüksektir dolayısıyla aşılama açısından yüksek öncelikli bir grup olarak düşünülmelidir.

Bu çalışmanın temel amacı; meme kanserinde COVID -19 aşılarının etkisini incelemektir. Bu amaçla 4T1 meme kanseri BALB/c fare modeli grupları oluşturuldu. Gruplara belirli zamanlarda iki doz Sinovac- CoronaVac (SV), Pfizer-BioNTech (B) aşıları ve Serum Fizyolojik (SF) uygulandı. Ağırlık ve tümör boyutu takibi yapıldı. Belirli günlerde kan alındı ve 2019-nCov protein düzeyine bakıldı. 22. günde sakrifikasyon yapıldı. Tümör, lenf nodları ve akciğerler çıkarıldı. Akciğer, tümör dokularının yarısı ve lenf nodları Akım Sitometri analizinde CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD62L⁺, CD11b⁺, Gr1⁺, F4/80⁺ moleküllerin düzeyi incelendi. Akciğer ve tümör dokularının diğer yarısı metastaz açısından ve nekroz oranı açısından araştırıldı.

Hayvan ağırlığı, tümör boyutu, nekroz oranı, akciğere metastazı ve Tümör infiltre eden miyeloid seri hücre oranlarında anlamlı fark görülmedi. ELISA testinde Sinovac- CoronaVac ikinci Pfizer-BioNTech ilk dozda yeterli düzeyde antikor oluşturdu. Lenf nodlarında CD3⁺ oranı kontrol gurubunda yüksek değerlendirildi CD4⁺ ve CD8⁺ oranında anlamlı fark görülmedi. Miyeloid hücre oranı aşı yapılan grupta kontrol grubu ile karşılaştırıldığında yüksek bulunsa da SF grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı fark görülmedi. Kontrol ve SF grubu ile kıyaslandığında COVID -19 aşıları yapılan gruplarda tümör boyutu, akciğer metastazında ve immün parametrelerde anlamlı fark görülmedi.

Anahtar Kelimeler: Sinovac- CoronaVac, Pfizer-BioNTech, TNBC, BALB/c

ABSTRACT

Urfan H., Immunological Effects of COVID-19 Vaccines in Experimental Breast Cancer Model, Hacettepe University Faculty of Medicine, Department of General Surgery, Specialization Thesis, Ankara, 2024.

One of suggested choices for controlling the COVID-19 outbreak is vaccination. Cancer patients have a higher risk of dying from COVID-19 than ordinary people, so they should be considered a high-priority group for vaccination.

The aim of this study is to examine the effects of COVID-19 vaccines on breast cancer. For this purpose, 4T1 breast cancer BALB/c mouse model groups were performed. Two doses of Sinovac- CoronaVac (SV), Pfizer-BioNTech (B) vaccines, and Serum Physiological (SF) were applied to the groups at certain times. Weight and tumor size were monitored. Blood was taken on certain days, and 2019-nCov protein levels were measured and sacrificed on the 22nd day. The tumor, lymph nodes, and lungs were removed. Lung, half of the tumor tissues and lymph nodes Flow Cytometry analysis examined the levels of CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD62L⁺, CD11b⁺, Gr1⁺, and F4/80⁺ molecules. Regarding metastasis and necrosis rate, the other half of the lung and tumor tissues were investigated.

No significant difference was observed in animal weight, tumor size, necrosis rate, lung metastasis, and tumor-infiltrating myeloid series cell rates. In the ELISA test, Sinovac-CoronaVac created sufficient antibodies in the first dose of the second Pfizer-BioNTech. The CD3⁺ rate in the lymph nodes was evaluated as high in the control group, and no significant difference was observed in the CD4⁺ and CD8⁺ rates. Although the myeloid cell rate was found to be higher in the vaccinated group than in the control group, no significant difference was observed compared to the SF group. No significant difference was observed in tumor size, lung metastasis, and immune parameters in the groups receiving COVID-19 vaccines compared to the control and SF groups.

Key Words: Sinovac- CoronaVac, Pfizer-BioNTech, TNBC, BALB/c

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEŞEKKÜR	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vi
TABLolar DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
GRAFİKLER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ VE AMÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	
2.1 SARS CoV-2 Virüsü	3
2.1.1 SARS-CoV-2 virüsünün ortaya çıkışı ve yapısı	3
2.1.2 SARS-CoV-2'nin hücre içine girişi	4
2.1.3 COVID-19'un epidemiyolojisi	5
2.1.4 SARS-Cov-2 Enfeksiyonunun klinik ve laboratuvar belirtileri	7
2.1.5 COVID-19'dan korunma yolları	9
2.1.6 COVID-19 aşıları	10
2.1.7 SARS –CoV- 2 Aşılarının yan etkileri	13
2.1.8 COVID-19 aşıları sonrasında görülen lenfadenopati	14
2.1.9 COVID-19 aşılarının saklanması ve taşınması	15
2.1.10 SARS-CoV-2 virüsüne karşı bağışıklık	16
2.1.10.1 SARS-CoV-2'ye karşı humoral bağışıklık	16
2.1.10.2 Hücresel bağışıklık	17
2.2 Meme Kanseri	19
2.2.1 Meme kanseri epidemiyolojisi ve etiyolojisi	19
2.2.2 Meme kanserinin alt grupları	20

2.2.3 Risk faktörleri	22
2.3 Meme kanserinin immünolojisi	27
2.3.1 CD3 ⁺ lenfositlerin kanser prognozu üzerine etkisi	27
2.3.2 CD4 ⁺ ve CD8 ⁺ lenfositlerin tümör prognozu üzerine etkisi	28
2.3.3 CD62L hücrelerinin meme kanseri akciğer metastazında rolü	29
2.3.4 Gr-1 ⁺ CD11b ⁺ hücrelerin metastazda rolü	29
2.3.5 Fare makrofaj belirteci F4/80	31
3. MATERYAL METOD	
3.1 Deneysel meme kanseri oluşturulması	32
3.2 Deney hayvanları ve protokolü	34
3.3 İstatistiksel Analizler	37
4. BULGULAR	
4.1 Hayvan Ağırlıklarının Karşılaştırılması	38
4.2 Tümör Boyutuna Göre Grupların Karşılaştırılması	42
4.3 Fare Anti-SARS-CoV (N) IgG ELISA Sonuçlarının Karşılaştırılması	45
4.4 Hayati Organlarda (Akciğer) Hematoksilen ve Eozin (H&E) Boyama Sonuçlarının Karşılaştırılması	48
4.5 Disseke Edilen Tümörlerin H&E Boyama Sonuçlarının Karşılaştırılması	50
4.6 Lenf Nodlarından İzole Edilen Lenfoid Seri Hücrelerinin Akım Sitometri Sonuçlarının Karşılaştırılması	53
4.7 Tümör ve Akciğere Dokularındaki Miyeloid Hücre Popülasyonlarının Akım Sitometri Sonuçlarının Karşılaştırılması	55
5. TARTIŞMA	57
6. SONUÇ	60
7. KAYNAKLAR	61

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ACE 2	Anjiyotensin dönüştürücü enzim 2
ADE	Antikor bağımlı geliştirme
ARDS	Akut solunum sıkıntısı sendromuna
ATM	Ataxia-telangiectasia mutated
B	Pfizer- BioNTech
Bat-CoV	Yarasa koronavirüsü
BC	Meme kanseri
BMI	Vücut kitle indeksi
BRIP1	BRCA1-interacting protein 1
CDH1	Kadherin-1
CHEK2	Checkpoint kinase 2
COVID- 19	Koronavirüs hastalığı 2019
CT	Bilgisayarlı tomografi
CTL	Sitotoksik T lenfosit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
EGFR	Epidermal büyüme faktörü reseptörü
ER	Östrojen reseptörü
Fc	Fragment crystallizable
HLA	İnsan lökosit antijeni
HRT	Hormonal replasman tedavisi
IL	İnterlökin
IR	İyonlaştırıcı radyasyon
K	Kontrol
LN	Lenf nodu
MDSC	Miyeloid türevi baskılayıcı hücre
MERS – CoV	Orta doğu solunum sendromu koronavirüs
MHC	Majör histokompatibilite kompleksi

MMP	Matriks metalloproteinaz
NK	Doğal öldürücü
NTD	N-terminal alanını
PALB2	Partner and localizer of BRCA2
PET-CT	Pozitron emisyon tomografisi
PR	Progesteron reseptörü
PTEN	Fosfataz ve tensin homologu
RAS	Renin-anjiyotensin sistemi
RBD	Reseptör bağlanma alanını
RdRp	RNA polimeraz
RNA	Ribonükleik asid
SARS-CoV	Şiddetli akut solunum sendromu koronavirüs
SARS-CoV -2	Şiddetli akut solunum sendromu koronavirüs 2
SF	Serum Fizyolojik
STK11	Serin/treonin kinaz 11
SV	Sinovac- CoronaVac
T	Tümör
TGF-β	Transforme edici büyüme faktör-beta
TIL	Tümör infiltre eden lenfosit
TMPRSS2	Transmembran proteaz serin 2
TNBC	Üçlü negatif meme kanseri
TNF-α	Tümör nekroz faktör alfa
TP53	Tümör protein 53

TABLO DİZİNİ

Tablo	Sayfa
Tablo 2.1: COVID-19 enfeksiyonunun ciddiyetine göre sınıflanması	8
Tablo 2.2: SARS-CoV-2 enfeksiyonunu önlemede ortaya çıkan zorluklar	9
Tablo 2.3: COVID-19 aşısı türleri ve örnekleri	13
Tablo 3.1: İn vivo deney grupları	34
Tablo 3.2: Çalışmada kullanılan antikorların listesi	36
Tablo 4.1: Deney başlangıcında hayvanların gruplara göre ortalama ağırlıkları ve standart sapmaları	38
Tablo 4.2: Hayvan gruplarının deney günlere göre ortalama ağırlıkları ve standart sapmalarını	39
Tablo 4.3: Hayvan ağırlıklarının deney günlerine göre ikili grup analizlerinin P değerleri	41
Tablo 4.4: Deney sonunda hayvan gruplarının ortalama ağırlıklarının ikili grup analizi ve P değeri	41
Tablo 4.5: Tümör boyutlarının deney günlerine göre ikili grup analizlerinin P değerleri	44
Tablo 4.6: Deney sonunda hayvan gruplarının tümör boyutlarının ikili grup analizi ve P değerleri	44
Tablo 4.7a: Hayvanlardan alınan kan örneklerinin dizilimi	46
Tablo 4.7b: Hayvanlardan alınan kan örneklerinin ELISA sonuçları	46
Tablo 4.8: Hayati organlara (akciğer) metastaz	49
Tablo 4.9: Tümör dokularındaki nekroz oranları	52

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekiller	Sayfa
Şekil 4.1 Deney sonunda disseke edilerek çıkarılan tümör dokuları	42
Şekil 4.2 Deney sonunda disseke edilerek çıkarılan akciğer dokuları	48
Şekil 4.3 Hayvan gruplarının akciğer metastazlarının H&E boyanmasının optik mikroskobik görünümü	49
Şekil 4.4 Deney sonunda hayvanların primer meme dokularının H&E boyanması	50
Şekil 4.5 Hayvan gruplarında tümör dokusunun optik mikroskobik görünümü	51

GRAFİK DİZİNİ

Grafik	Sayfa
Grafik 3.1: Deney protokolünü gösteren iş akış şeması	35
Grafik 3.2: Kaplama stratejisi	36
Grafik 4.1: Gruplara göre ortalama hayvan ağırlıklarının deney günlerine göre değişimi	40
Grafik 4.2: Hayvan gruplarının ortalama tümör boyutlarının deney günlerine göre değişimi	43
Grafik 4.3: 2019-nCov (N) protein üretim düzeyi	47
Grafik 4.4: Tümör dokusunda nekroz oranının dağılımı	52
Grafik 4.5: Lenf nodundan izole edilen lenfosit popülasyonlarının dağılımı	54
Grafik 4.6: Tümör ve akciğer dokularındaki miyeloid hücre popülasyonlarının dağılımı	56

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Bulaşıcı hastalıkların yayılmasını tanımlamak için çeşitli terimler kullanılmıştır, en tipik olanı "salgın"dır. Pandemi; vaka sayısında ani artış olan ve birden fazla kıtaya veya dünya geneline yayılan ve çok sayıda kişiyi etkileyen bulaşıcı bir hastalığın salgınıdır. İnsanlık tarih boyunca birçok hastalık salgını görülmüştür. Bu salgınlar arasında vebanın neden olduğu "Kara Ölüm" 14. yüzyılda Avrupa nüfusunun yarısının ölümüne neden olmuştur. Daha yaygın olarak İspanyol gribi olarak bilinen ve 1918 yılında olan H1N1 influenza A pandemisi tüm Dünyayı etkilemiştir. En son pandemiler arasında HIV/AIDS pandemisi, 2009 yılında domuz gribi pandemisi ve COVID-19 pandemisi yer almaktadır. Bu hastalıkların neredeyse tamamı insanlar arasında hala dolaşmaktadır, ancak etkileri artık genellikle çok daha azdır.

COVID -19 salgını Çin'de başlamasına rağmen çok kısa sürede bu enfeksiyon tüm dünyaya yayıldı. COVID- 19 pandemisinin diğer pandemilerden farkı tüm dünyada aynı zamanda fazla sayıda kanser hastasının olması ve bu hasta gruplarında mortalite ve morbidite oranının yüksek olmasıdır. COVID-19 salgını özellikle salgının başlangıcında dünya çapında kanser hastalarının teşhisi ve tedavisi üzerinde önemli bir etkisi oldu. Hükümetler tarafından uygulanan karantina, zorunlu sosyal mesafe, sağlık hizmeti organizasyonlarındaki verimsizliklerle kanser taramalarında neredeyse tamamen durmaya yol açtı [1]. Diğer taraftan virüsün kendisinin ya da tedavi ve önlem için kullanılan ajanların kanser üzerine olabilecek etkileri yeni soru işaretleri oluşturdu.

COVID-19 pandemisinin üstesinden gelmek için yürütülen mücadelede SARS-CoV-2 enfeksiyonunu önlemeye yönelik aşılarda salgını kontrol etmede en umut verici yaklaşım olarak kabul edildi. COVID-19 salgınının başlangıcından 1 sene sonra virüse karşı en az on aşı sınırlı kullanım için onaylandı 60 üzerinde aşı için klinik deneyler devam ediyordu. Aşıların bu kadar hızlı geliştirilmesi, aşı yapılan bazı hastalarda yan etkilerin ortaya çıkması, aynı zamanda kanserli hastalar için bu aşıların

malignite ve tedavilerin neden olduğu bağışıklık değişiklikleri ortamında güvenliği ve etkinliği konusunda sorular ortaya çıkarmaya başladı [2].

Meme kanseri dünya çapında kadınlar arasında en sık görülen kanser olup kanserden iyileşenlerin büyük bölümünü oluşturmaktadır. Meme kanseri COVID-19 hastalarında en sık görülen malignite olmasına rağmen bu popülasyona ilişkin aşı verileri sınırlıdır. Bunun genel nedeni COVID-19 aşılarıyla ilgili pek çok klinik çalışmada kanserli hastaların dışlanmasıdır. Aşılamaya yönelik çalışmalarda aşı olan meme kanserli hastaların aşı olma nedenleri arasında yarısından fazlası enfeksiyon korkusu nedeniyle ve yaklaşık üçte biri esasen işyeri veya devletin zorunluluğu nedeniyle aşı yaptırmıştır. Meme kanseri olan hastalar arasında aşı yaptırmama nedenleri arasında en sık görülen nedenler aşıların meme kanserinin ilerlemesine neden olacağı tedaviye engel olacağı endişesi, yan etki veya güvenlik endişesi olması olmuştur. Aşılanan hastaların bir kısmı tek doz aşının koruma sağlamaya yeterli olduğuna inandığı için bir sonraki dozu almak istememiştir. Hastalardan bazıları güvenlik endişeleri nedeniyle ikinci doz daha COVID-19 aşısı yaptırmak istememiştir. Genel olarak hastalar önceki dozlardan sonra yaşanan yan etkiler nedeniyle güvenlik belirsizlikleri nedeniyle takviye dozu almayı reddetmiştir; sonuç olarak aşı teredddnn temel nedeninin ciddi yan etkilerden korkmak olduğunu ortaya çıkmıştır [1, 3].

Bu çalışmanın amacı meme kanseri oluşturulan fare modelinde COVID-19 aşılarının tümör, metastaz ve immün sistem üzerine etkisini araştırmaktır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1 SARS-CoV-2 Virüsü

2.1.1 SARS-CoV-2 virüsünün ortaya çıkışı ve yapısı

Şiddetli akut solunum sendromu koronavirüs 2 (SARS-CoV-2) 2020'de küresel bir pandemiye dönüşen COVID-19'un etkenidir [4]. Otuz bir Aralık 2019'da Çin'in Hubei Eyaleti Wuhan'da Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) pnömoni salgını hakkında bilgilendirildi ve etiyoloji tespit edilemedi. Yedi Ocak 2020'de yeni tip koronavirüs tespit edildi ve 12 Ocak 2020'de DSÖ tarafından 2019-nCoV olarak adlandırıldı. Otuz Ocak 2020'de DSÖ, SARS-CoV-2 salgınının uluslararası önemli bir halk sağlığı acil durumu olduğunu ilan etti. Bir Şubat 2020'de DSÖ, mevcut koronavirüs hastalığı salgınını resmi olarak Koronavirüs Hastalığı-2019 (COVID-19) olarak adlandırdı ve Uluslararası Virüs Taksonomisi Komitesi, virüsü SARS-CoV-2 olarak adlandırdı. On bir Mart 2020'de hastalık pandemi olarak ilan edildi. SARS-CoV ve MERS-CoV 'un ortaya çıkmasından sonra SARS-CoV-2 yüzyılın üçüncü zoonotik insan koronavirüsü oldu [5, 6].

SARS-CoV-2 zarflı, tek sarmallı, pozitif RNA'lı Beta koronavirus cinsi bir virüstür [4, 5]. Wuhan'daki zatürre salgınının başlarında SARS-CoV-2 ile enfekte olan beş hastadan virüsün tam genom dizisi elde edildi. Bu genom dizileri SARS-CoV ile %79,5 dizi benzerliği gösterdi. SARS-CoV-2'nin tam uzunluktaki genom dizisi ve beta koronavirusların diğer mevcut genomları karşılaştırıldığında SARS-CoV-2'nin yarasa SARS benzeri koronavirüs türü olan BatCoV-RaTG13 ile %96 benzerlikle en yakın ilişkili olduğu görüldü. Bu çalışmalar SARS-CoV-2'nin yarasa kaynaklı olabileceğini ve SARS-CoV-2'nin doğal olarak yarasa koronavirüsü RaTG13'ten evrimleşmiş olabileceğini öne sürdü [5].

SARS-CoV-2'nin 16 yapısal olmayan proteini, birkaç yardımcı proteini ve dört yapısal proteini bulunmaktadır [7]. Koronavirüs virionu yapısal proteinleri; Nükleokapsid (N), Membran (M), Zarf (E) ve Spike (S) proteinleridir. N proteini RNA genomunu tutar. S, E ve M proteinleri birlikte viral zarfı oluşturur. S proteini virüsün en immunojenik bileşenidir ve bu nedenle virüs enfeksiyonunu engelleyen nötralize

edici antikorların en güçlü hedefidir. Viral zarftaki S proteinleri, bu tür virüslere verilen “Korona” adını doğrulayacak şekilde taç benzeri bir yapı oluşturur. M proteini, virionun şeklini tanımlayan ve viral partiküllerin konakçı hücrelerinden tomurcuklanması sürecinde çok önemli bir rol oynayan en büyük ve en bol bulunan yapısal proteindir. E proteini, virüs enfeksiyonu ve replikasyonu için gereklidir. N proteini, genomik RNA ile ilişkilidir ve genetik materyali zarfın içinde tutar, viral replikasyon için gerekli bir proteindir. Viral parçacıkların kendi kendine birleşmesi sırasında M viral proteini virionun tamamını oluşturmak için diğer yapısal proteinlerle iş birliği yapar [8].

Konakçı hücre zarına bağlanmayı ve füzyonu kapsayan viral parçacıkların giriş adımlarına S glikoproteini aracılık eder [4, 9]. Spike glikoproteini koronavirüslerin hücreye girişi için kritik öneme sahiptir, dolayısıyla çekici bir antiviral hedefdir [5]. SARS-CoV-2 virüsün giriş glikoproteinleri enfekte olmuş hücrelerde S1 ve S2 olmak üzere iki alt birimden oluşur [4, 5, 9]. S1 alt birimi, N-terminal alanından (NTD) ve reseptör bağlanma alanından (RBD) oluşur. S1 alt biriminin işlevi, konak hücre üzerindeki reseptöre bağlanmaktır. S2 alt ünitesinin işlevi, virüslerin ve konakçı hücrelerin zarlarını birleştirmektir [5, 9].

2.1.2 SARS-CoV-2'nin hücre içine girişi

SARS-CoV-2 hücreye iki farklı mekanizma ile girebilir. Birincisi, anjiyotensin dönüştürücü enzim 2 (ACE 2) reseptörleri aracılığıyla doğrudan membran füzyonu yolu. Bu yolda SARS-CoV-2 hücrelere girmek için 2003 yılında SARS-CoV reseptörü olarak tanımlanan anjiyotensin dönüştürücü enzim 2 (ACE 2) reseptörüne S proteiniyle bağlanır ve plazma membranıyla birleşir. [10]. Spike proteini, konakçı proteazlar tarafından reseptör bağlanma alt birimi S1 ve membran füzyon alt birimi S2'ye bölünür. S1 alt birimi ACE 2'ye bağlanır, S2 alt birimi S proteinini membrana sabitler [4]. S proteininin ACE 2 reseptörüne bağlanmasıyla başlayan proteoliz, virüsün yaşam döngüsünün en önemli aşamasıdır [10]. Spike proteininin bölünmesi SARS-CoV-2'nin girişi için de gerekli olan transmembran proteaz serin 2 (TMPRSS2)

tarafından yapılır. Transmembran proteaz serin 2 (TMPRSS2), katepsin B/L ve RNA'ya bağımlı RNA polimeraz (RdRp) dahil olmak üzere bazı enzimler, viral giriş, replikasyon ve transkripsiyonun temel düzenleyicileridir [7]. Virüs girişi sırasında ACE 2 reseptörünün hücre içine alınması ve parçalanması sonucu etkilenen renin-anjiyotensin sistemi (RAS), anjiyotensin-2 artışına neden olur. Endotel hücre enfeksiyonu sonucu endotelit, apoptozis, RAS dengesinin bozulması, iskemi, ödem ve hiperkoagülabilité gelişebilir. COVID-19 hastalarında gözlenen felç ve hipertansif krizin de bu mekanizmayla ilişkili olabileceği tahmin edilmektedir [11].

SARS-CoV-2'nin hücreye girişinin bir diğer yolu da bazı virüs enfeksiyonlarında ve SARS-CoV-2'de tanımlanan "antikor bağımlı geliştirme" dir (ADE). SARS-CoV enfeksiyonlarında ADE'nin monositler, makrofajlar ve B hücreleri gibi farklı bağışıklık hücrelerinde ifade edilen Fc reseptörleri (FcR'ler) ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Anti-S antikorlarının varlığında virüs yüzeyinde Fc-gamma-2 (CD32) reseptörü bulunan hücrelere antikor-virüs kompleksi şeklinde girmekte ve sitopatik etki göstermektedir. Ayrıca SARS-CoV-2'nin ADE ile monosit-makrofaj hücrelerine girmesinin, sitokin-kemokin salınımı ve hücre apoptozu üzerinde etkileri olabileceği öngörülmektedir. Virüs bu şekilde hücreye girebilse de, hücre içinde çoğalıp daha sonra tekrar hücreden çıkabileceği henüz kanıtlanmamıştır [6].

2.1.3 COVID-19'un epidemiyolojisi

2002'de şiddetli akut solunum sendromu koronavirüs (SARS-CoV) ve 2012'de Orta Doğu Solunum Sendromu koronavirüs (MERS-CoV) dahil olmak üzere koronavirüs ailesiyle yaşanan iki tarihi pandeminin ardından Aralık 2019'da Çin'in Hubei eyaleti Wuhan'da şiddetli akut solunum sendromu koronavirüs-2 (SARS-CoV-2) enfeksiyonu olarak adlandırılan yeni bir koronavirüs ortaya çıktı ve 2019 koronavirüs hastalığına (COVID-19) neden oldu [12, 13]. Çin'de başlamasına rağmen çok kısa sürede bu enfeksiyon tüm dünyaya yayıldı. Dünya çapında 664 milyonun üzerinde insana enfeksiyon bulaşı oldu ve 6,72 milyon doğrulanmış ölüm vakası bildirildi [12].

Yarasalar, SARS-CoV-2'nin doğal kaynağı gibi görünmektedir. Pangolinlerden izole edilen beta koronavirüsün şu anda enfekte olmuş insan türüyle %99'a kadar dizi benzerliği gösterdiği saptanmaktadır. SARS-CoV-2 kedilerde ve gelinciklerde verimli bir şekilde çoğalır. SARS-CoV-2 ayrıca hamsterdan da bulaşabilir [5].

SARS-CoV-2'nin kuluçka süresi bir ile 12 gün arasındadır. Ortalama kuluçka süresi dört gündür. SARS-CoV-2 viral pnömoni gelişmeden önce tükürük, kan, balgam ve idrarda tespit edilebilir ve bazı hastalarda hiç pnömoni gelişmeyebilir. Asemptomatik kişiler, mevcut salgının bulaşma dinamiklerini kontrol eden potansiyel SARS-CoV-2 enfeksiyonu kaynaklarıdır [9]. SARS-CoV-2 enfekte olan ve olmayan kişiler arasındaki korunmasız yakın temas sırasında fomitler ve damlacıklar yoluyla bulaşır. Solunum damlacıkları ana bulaşma yollarıdır. Enfeksiyonun ana kaynağı semptomatik ve asemptomatik hastalardır. Virüs ayrıca dolaylı temas yoluyla da yayılabilir. SARS-CoV-2 sağlıklı bir kişiye, enfekte kişiyle, enfekte kişinin kıyafetleri veya herhangi bir eşyasıyla temas etmesi halinde bulaşabilir. Virüs içeren damlacıklar elleri kirletir insanlar daha sonra ağız, burun ve gözlerin mukoza zarlarına temas ederek enfeksiyona neden olur. Tıbbi prosedürler sonucu oluşan aerosoller nedeniyle sağlık tesislerinde hava yoluyla bulaşma olasılığı olabilir. COVID-19'un yayılmasında hava yoluyla bulaşma baskın yoldur. Ancak iki kişi arasında iki metre mesafenin korunması, dışarı çıkarken maske takılması ve enfekte kişilerin izolasyonu ile bulaşın önüne geçilebilir [5, 9].

2.1.4 Sars-Cov-2 Enfeksiyonunun klinik ve laboratuvar belirtileri

SARS-CoV-2 enfeksiyonu, asemptomatik, grip, zatürre ve akut solunum sıkıntısı sendromuna (ARDS) bağlı ölüme kadar çeşitli klinik semptomlara yol açabilir [13]. COVID-19'un klinik semptomları arasında kas ağrısı, öksürük, ateş, nefes darlığı, baş ağrısı, koku alma bozuklukları, tat alma bozuklukları yer alır. Ateş, en baskın başlangıç klinik semptomu olarak gözlemlenmiştir [12].

COVID-19'un en sık görülen belirtileri ateş ve kuru öksürüktür. Hastaların çoğunda bilateral pnömoni görülür. Ek hastalıkları olan yaşlı erkeklerin SARS-CoV-2'den etkilenme olasılığı daha yüksektir. Hastaların kan sayımlarında lökopeni ve lenfopeni görülebilir. Yoğun bakım hastalarının plazmasındaki IL2, IL7, IL10, TNF- α içeriği, yoğun bakım ünitesinde olmayan hastalara göre daha yüksektir [5].

COVID-19 hastalığın ciddiyetine göre hafif, şiddetli ve kritik olmak üzere üç seviyeye ayrılır (Tablo1.1). Hastaların çoğunda yalnızca hafif semptomlar görülür ve iyileşme görülür. Solunum yolu hastalığının yanı sıra COVID-19 hastalığı miyokard hasarına ve aritmik komplikasyonlara, miyalji, baş ağrısı, baş dönmesi, bilinç bozukluğu, intrakraniyal kanama, felç gibi nörolojik komplikasyonlara yol açabilir. Sindirim semptomları ve karaciğer hasarı, pıhtılaşmada artma ve trombotik komplikasyonlar da rapor edilmiştir. Kritik hastalarda hızla ARDS'ye, düzeltilmesi zor metabolik asidoza, septik şoka, pıhtılaşma bozukluğuna ve çoklu organ fonksiyon yetmezliğine ilerleyebilir. Hastaların yaklaşık %26,1'i, COVID-19'un neden olduğu komplikasyonlar nedeniyle yoğun bakım ünitesine yatırıldı. COVID-19 için doğru teşhis ve tedavilerle çoğu hastanın prognozu iyi olmasına rağmen yaşlı ve altta yatan hastalığı olanların prognozu daha kötü seyretti [5, 14] .

Klinik belirtiler yaşla birlikte farklılık göstermektedir. 60 yaş üzerinde, kan üre nitrojen düzeyinin ve inflamatuvar göstergelerin daha fazla olduğu hastalarda akciğer tutulumunun bilateral olma riski yüksek saptanmıştır. 60 yaşın üzerindeki hastalarda solunum yetmezliği ve daha uzun hastalık seyri olasılığı daha yüksektir.

Kardiyovasküler hastalık, diyabet, kronik solunum yolu hastalığı, hipertansiyon ve kanser gibi farklı komorbid durumlar COVID-19 hastaları için yüksek risk faktörleri olduğunu ve altta yatan hastalığı olmayanlara göre daha yüksek ölüm oranları görülmektedir. 65 yaş ve üzeri hastalarda, özellikle akut solunum sıkıntısı sendromu (ARDS) ve komorbiditeleri olan hastalarda, COVID-19'dan ölüm riski daha yüksektir [5, 15].

Tablo 2.1 COVID-19 enfeksiyonunun ciddiyetine göre sınıflandırılması

Hafif	Ateş, öksürük, yorgunluk, buzlu cam opasiteleri, pnömoni dışı bulgular, hafif pnömoni
Ciddi	Nefes darlığı, kan oksijen saturasyonu \leq %93, solunum frekansı \geq 30/dakika, arteriyel oksijen kısmi basıncının solunan oksijen fraksiyonuna oranı $<$ 300 ve/veya akciğer infiltrasyonları 24 ila 48 saat içinde $>$ %50, yoğun bakım ünitesine ihtiyaç var.
Kritik	ARDS, solunum yetmezliği, septik şok ve/veya çoklu organ fonksiyon bozukluğu veya yetmezliği, düzeltilmesi zor metabolik asidoz, septik şok, pıhtılaşma fonksiyon bozukluğu.

2.1.5 COVID-19'dan korunma yolları

Pandeminin ilk günlerinde hastaların maske takması ve sosyal izolasyonla virüsün sınırlanabileceğine inanılıyordu. Genel olarak tıbbi önlemlerin bulunmadığı durumlarda maske takmak en etkili yöntemdir. Pandeminin zirveye ulaşmasından sonra maske, yüz siperliği, gözlük, eldiven, önlük gibi kişisel koruyucu ekipmanların kullanılması ilk koruyucu yöntem oldu. Karantinaya alınan kişiler virüsün diğer insanlara bulaşmasını önemli ölçüde önlüyor. Ancak COVID-19'un zirve yaptığı dönemde insanların karantinaya alınması ülkelerde yüksek sosyal ve ekonomik kayıplara yol açtı. Aynı zamanda karantinanın olumsuz psikolojik etkilerinin olduğu gösterildi.

Antiviral ilaçların uygulanması COVID-19'un erken evrelerinde kullanıldığında etkili olabilir. Birçok hasta deksametazon ve anti-IL-6 tedavisine yanıt vermedi ve bazı hastalarda uygulamadan sonra bile inflamasyonun düzeyi yüksek kaldı. Çoğu durumda COVID-19'un patofizyolojik heterojenliği gözlemlendi. Hastaların SARS-CoV-2'ye tepkisi karmaşık olduğundan immünoterapinin hem etkili hem de zararlı olabileceği görüldü [13].

Tablo 2.2 SARS-CoV-2 enfeksiyonunu önlemede ortaya çıkan zorluklar

1. Viral enfeksiyonun temel özellikleri ve enfeksiyon dönemlerinin belirsizliği.
2. Enfekte bireylerin çoğunun semptom göstermemesine rağmen enfeksiyonun yayılmasında rol alması.
3. Popülasyonun enfeksiyonun yayılmasını etkileme konusundaki duyarsızlığı

2.1.6 COVID-19 aşıları

SARS-CoV-2 enfeksiyonunu önlemeye yönelik aşılar salgını kontrol etmede en umut verici yaklaşım olarak kabul edilmektedir [12, 16]. Pandemiye sınırlı bir süre içinde durdurmak için araştırmacılar SARS-CoV-2' ye karşı yeni ve etkili aşılar geliştirmeye başladı ve ilk aşı dozları Aralık 2020' de uygulandı. Pandemi sırasında 100' den fazla aşı ürünü geliştirildi ve en az 24 ürün acil kullanım için ruhsatlandırıldı [13].

Aşılamalarda hastalıktan korunmayı sağlamak için çeşitli teknikler kullanılır [16] ve dört ana COVID-19 aşı kategorisi vardır [17]. Bunlar zayıflatılmış tam virüs aşıları, protein bazlı aşılar, viral vektör aşıları ve nükleik asit aşılarıdır[16, 17]. mRNA aşıları (Pfizer-BioNTech ve Moderna aşıları), adenovirüs viral vektör aşıları (Oxford-AstraZeneca, Johnson & Johnson, Sputnik V, Covishield), Çin inaktif aşıları (Sinophathern, Sinovac- CoronaVac) ve protein bazlı aşılar (Novavax) dahil olmak üzere farklı aşı platformları SARS-CoV-2'ye karşı spesifik bir nötralize edici yanıt oluşturmak için geliştirildi (**Tablo1.3**) [12, 13, 16]. İnsanlara 25 Ocak 2023'e kadar yaklaşık 13 milyar doz aşı yapıldı [12].

Tam Virüs Aşıları: Tam virüs aşıları tüm viral proteinleri sağlam tutarken virüsün genetik materyalinin ısıtma, kimyasallar veya radyasyon yoluyla yok edilmesiyle geliştirilen zayıflatılmış veya inaktif viral aşılarıdır. Bu nedenle tam virüs aşıları bulaşıcı değildir ancak yine de bağışıklık sistemini uyarabilir. Tamamen inaktive edilmiş virüs aşıları güçlü bir bağışıklık tepkisi üretebilir. Onaylanan COVID-19 tam virüs aşıları arasında Sinopharm ve Sinovac- CoronaVac bulunmaktadır [8, 17].

Sinovac-CoronaVac Aşısı: Sinovac-CoronaVac aşısı Çin'de üretilen inaktif bir virüs aşısıdır ve birçok ülkede en yaygın kullanılan aşılarından biridir. Sinovac-CoronaVac aşısının etkinliği %83,5'tir. 18 yaş ve üzeri yetişkinlerde Sinovac-CoronaVac iki doz şeklinde ve kas içine uygulanması önerilir. Bununla birlikte

antikorlar genellikle üç ay sonra azalır. Sinovac-CoronaVac' ın iki dozundan sonra oluşan antikorların yaşlı hastalarda yetişkinlere kıyasla önemli ölçüde daha düşük olduğu gösterilmiştir Sinovac-CoronaVac aşısının takviye dozu 60 yaş ve üzeri kişilere önerilir [17].

Protein Bazlı Aşılar: Protein bazlı aşılar etkili bir konakçı immün tepkisi geliştirmek için viral proteinin yalnızca bir kısmını antijen olarak kullanır. Alt birim ve virüs benzeri parçacık aşuları olarak sınıflandırılabilirler. Alt birim aşılar rekombinan teknoloji kullanılarak hazırlanır. Bu teknoloji diğer tekniklerle karşılaştırıldığında nispeten pahalıdır ancak güvenli, verimli ve erişilebilirdir. Rekombinan protein aşısının ana dezavantajı düşük immünojenitesi ve bir adjuvan kullanma ihtiyacıdır. SARS-CoV-2 protein bazlı aşuların bir örneği Covovax (Novavax)'tır. Diğer aşularla karşılaştırıldığında daha dengeli ve sürekli bir bağışıklık tepkisi üretmesi, dış ortama dayanıklılığı Novavax'ın avantajlarıdır. Öte yandan, protein alt birim aşısının geliştirilmesi için daha uzun araştırma süresi ve çabaya ihtiyaç duyulması, daha iyi bir bağışıklık tepkisi sonucu elde etmek için bir adjuvan kullanılmasının gerekliliği ana dezavantajlardır. [17].

Nükleik Asit Bazlı Aşılar: DNA ve RNA kullanımı COVID-19 aşısının geliştirilmesinde yeni kullanılan bir tekniktir. Nükleik asit platformu hücrelere virüsün tamamını değil belirli proteinleri üretmeleri için talimatlar sağlamak üzere DNA veya mRNA olan genetik bilgiyi kullanır. DNA ve RNA aşuları insan genomuna entegre olabilir ve insanların genetik kodunu değiştirebilir. Ancak RNA, DNA'ya kıyasla çok kararsızdır ve COVID-19 için RNA onaylı aşular Pfizer-BioNTech ve Moderna'dır [8, 17]. COVID-19 salgını öncesinde hiçbir gen bazlı aşı onaylanmamıştır [8].

Her ne kadar mRNA aşularının etkinliği ve uzun vadeli güvenliği henüz tam olarak açıklığa kavuşturulmamış olsa da bunların uygulanmasının COVID-19 salgınının mortalite ve morbiditesini değiştirdiği açıktır. mRNA aşularının diğer mevcut platformlara göre daha kolay, hızlı üretim ve hücrelere oldukça uygun dağıtım dahil olmak üzere birçok avantajı vardır. mRNA aşılamanın amacı hedef immünojenin in vivo transkripsiyon yoluyla üretilmesidir. Esas olarak antikor

üretimini aktive eden geleneksel protein aşılarıyla karşılaştırıldığında, mRNA aşıları hem humoral hem de hüresel immün yanıtları uyarır. mRNA aşıları nükleer membran bariyerini geçmeye gerek kalmadan doğrudan yüksek hızda immünojen üretimine yol açabilir. mRNA aktivitesi sitozole girişi ve hedef proteine translasyonunu takiben başlatılır. Tasarlanan mRNA sonunda translasyon sonrası modifikasyonlara uğrayan, proteazom sistemi tarafından parçalanan ve bağışıklık sistemine sunulan antijenik proteini sentezlemek için hücre içi çeviri makinesini kullanır [13].

Çekirdeğe girmesi gereken DNA aşılarıyla karşılaştırıldığında mRNA aşılarının hedef antijenlerin ekspresyonunu sağlamak için yalnızca sitoplazmaya girmesi yeterlidir, dolayısıyla teorik olarak daha güvenlidirler [18].

Pfizer-BioNTech Aşısı: BNT162b2, BioNTech tarafından ilaç şirketi Pfizer'in desteğiyle hazırlandı. Tam uzunluktaki SARS-CoV-2 S proteinini kodlayan lipid nanoparçacık bazlı BNT162b2 aşısı, onu bir prefüzyon formunda kilitlemek için iki prolin mutasyonu ile modifiye edilmiştir. 16 yaş ve üzeri kişilerde iki doz BNT162b2'nin yapılan çalışmalarda COVID-19'a karşı %95 koruma sağladığı sonucuna varıldı. [17].

Viral Vektör Tabanlı Aşılar: Hastalığa neden olan virüsün belirli bileşenlerini taşıyan ve bağışıklık sisteminin uyarabilen vektörler kullanılır. Virüs vektörü bağışıklık tepkisini arttırmak için hedef viral proteinleri insan vücuduna taşır [8]. SARS-CoV-2 antijen kodunu taşımak için zararsız bir virüsü vektör olarak kullanarak AstraZeneca ve Johnson & Johnson gibi farklı SARS-CoV-2 aşılarını geliştirmek için kullanıldı. Bu teknoloji konağın bağışıklık tepkisini oluşturma kapasitesine sahip spesifik bir protein üretir. Viral vektör aşılarının ana dezavantajı çoklu takviye dozlarına ihtiyaç duyulmasıdır [8, 17].

Tablo 2.3: COVID-19 aşı türleri ve örnekleri

İnaktif aşilar	Sinopharm, Sinovac
Protein bazlı aşilar	Covovax, Novavax
Nükleik asit bazlı aşilar	BioNTech-Pfizer ve Moderna
Adenovirüs vektör aşiları	Oxford-AstraZeneca, Johnson&Johnson, Sputnik V, Covishield

2.1.7 SARS –CoV- 2 Aşilarının yan etkileri

COVID-19 aşısı pandemi nedeniyle hızlı bir sürede geliştirildi. Faz I, diğer aşiların üç ile dokuz yıllık olması gereken normal zaman dilimine kıyasla altı ile dokuz ay içerisinde tamamlandı. SARS-CoV-2 aşilarının geliştirilmesindeki inanılmaz hız güvenlik endişelerine yol açtı. Aşılama sürecinde bazı olumsuz etkiler ortaya çıktı. Yan etkiler ateş, ağrı ve döküntü gibi küçük reaksiyonlardan kusma, ishal ve alerjik reaksiyonlar gibi ciddi yan etkilere kadar değişti. Bu yan etkilerin devam etmesi ortalama iki günden kısa oldu [19]. Bununla birlikte, trombositopeni, pnömoni, karaciğer hasarı, miyokardit ve solunum yetmezliği gibi uzun vadede gelişebilen ve genellikle büyük popülasyonlar aşılandığında ortaya çıkan nadir yan etkiler de izlendi [17]. Yapılan çalışmalarda inaktif virüs aşilarının mRNA aşiları ile kıyaslandığında yan etkilerinin daha az olduğu görüldü [3].

Alerjik reaksiyonlar aşı yapılmasından ortalama yaklaşık 15 dakika sonra ortaya çıktı. İlk dozdan sonra %0,5-1 oranında sekizinci gün veya sonrasında başlayan gecikmiş enjeksiyon bölgesi reaksiyonları bildirildi. COVID-19 enfeksiyonunda miyokardit riski COVID-19 aşısına göre daha yüksek olduğu; mRNA aşısının ikinci dozundan sonraki ilk haftada miyokardit riski en yüksek saptandı. Risk ergen erkek çocuklarda ve genç erkeklerde en yüksek olduğu saptandı. Adenovirüs vektörlü aşilara bağlı olarak aşının neden olduğu tromboz ve trombositopeni riski son derece düşük

olsa bile 50 yaşın altındaki kadınlara mümkünse mRNA aşıları konusunda bilgi verilmesi önerilmektedir [20].

Farklı tipteki COVID-19 aşıları arasındaki yan etki oranları birinci ve üçüncü dozda anlamlı derecede farklılık gösterdi ikinci dozda ise herhangi bir fark gözlenmedi. İlk dozdan sonra yan etkiler arasında yorgunluk, kas ağrısı ve alerjik reaksiyon bildirildi. İkinci dozda en sık görülen yan etki yorgunluk olurken, üçüncü dozda en sık görülen yan etki kas ağrısıydı [3]. mRNA ve adenoviral vektörler arasında çapraz reaktivite olmadığından alerjisi olduğu belgelenmiş bir kişiye alternatif aşi yapılabilir.

2.1.8 COVID -19 aşıları sonrasında görülen lenfadenopati

COVID-19 aşılmasının başlangıcında birçok kişi aşi sonrası lenf nodlarında büyüme fark ederek meme kliniklerine başvurmuştur. COVID-19 aşısını takiben lenf nodlarının büyümesi, aşının işe yaradığının kısa vadeli ve zararsız bir işareti olarak bildirilmiştir. Sadece lenfadenopatisi olan bir hastada bu durumu yönetmek nispeten daha kolay olsa da yeni tanı almış meme kanserli bir hastada aşılama sonrası gelişebilecek böyle bir durum meme kanseri yönetiminde çok önemli olan aksiller evrelemede karışıklığa neden olabilir [21].

Aşılamadan sonraki iki ile dört gün içinde aşi yapılan tarafta aksiller ve servikal lenfadenopati görülebilir [22]. Aksiller lenfadenopati mRNA aşıları yapılan vakalarda daha sık rapor edilmiştir [3, 22, 23]. Yan etkiler özellikle mRNA aşılarıyla ilişkili lenf nodu (LN) büyümesi meme kanserinin nüksünün bir işareti olduğundan meme kanseri (BC) yks olan hastalar için özellikle endişe vericidir [23]. Lenfadenopati süresi aşılar arasında farklılık gösterir. Moderna aşısı uygulamasından sonra bildirilen ortalama lenfadenopati gelişme süresi 1-2 gün olup bu durum Pfizer aşısında yaklaşık 10 gündür [22].

Aşılar tipik olarak deltoid kasa yapıldığından en çok etkilenecek lenf düğümleri aynı zamanda meme kanseri ile de en yakından ilişkili lenf düğümleri olan aksiller seviye I-III ve supraklaviküler lenf düğümleridir [22, 23]. Supraklaviküler bölgede veya aksillada LN büyümesinin ortalama süresi 3 dozun tamamından sonra

bir hafta veya daha kısa oldu. Az sayıda hastada 1 hafta sonra LN büyümesi izlendi. Supraklaviküler büyümeye göre aksiller LN büyümesi daha uzun sürdü [23].

Mevcut veya geçmişte kanser öyküsü olan hastalarda aşya bağlı lenfadenopati nodal metastazdan ayırt edilemeyebilir. COVID-19 aşısı bilinen meme kanseri ile aynı taraftaki koldan yapılırsa aşının yapıldığı taraftaki aksiller lenf düğümleri lenf nodu büyümesinin en sık meydana geldiği yer olduğundan görüntülemeye aşya bağlı reaktif lenfadenopati görülebilmekte ve metastazdan ayırt edilememektedir [21, 22]. Bu büyümüş lenf nodları mamografi görüntülerini etkileyebilir [19, 22]. Bu hastalar memenin aynı tarafında meme kanseri şüphesi ile bir meme kliniğine başvurursa aksillanın klinik muayenesi yanıltıcı olabilir ve aksiller N evresi klinik incelemesini ileri götürebilir. Genişlemiş aksiller düğümleri değerlendirmek için ultrason veya Pozitron Emisyon Tomografisi (PET-CT) gibi ek araştırmalar gerekebilir. Son üç ay içerisinde COVID-19 aşısı yaptıran ve meme kanseri tedavisi için sentinel lenf nodu biyopsisi yapılan hastalarda %16'nın üzerinde reaktif lenf nodu tespit edildi. Bu durum, tedaviye yönelik nihai kararın alınmasından önce bu dönemde dikkatli olunmasını ve aksiller lenf düğümlerinin ek olarak incelenmesini gerektirdi [21].

2.1.9 COVID-19 aşılarının saklanması ve taşınması

Pfizer-BioNTech flakonları son kullanma tarihine kadar -90 °C ile -60 °C arasında saklanabilir ve 30 gün stabil olduğundan kuru buz kullanılarak termal olarak gönderilebilir. Dondurucuda 2 haftaya kadar, buzdolabında ise bir aya (31 gün) kadar saklanabilmektedir. Sinovac-CoronaVac flakonları 12 ay boyunca 2 ila 8 °C arasındaki normal buzdolabı sıcaklığında ve +25°C'yi aşmayacak oda sıcaklığında saklanmalıdır [17].

2.1.10 SARS-CoV-2 virüsüne karşı bağışıklık

SARS-CoV-2 virüsü hücreye girdiğinde antijen sunan hücreler (APC) ilk olarak viral antijenleri sunar. Virüse özgü sitotoksik T lenfositler, insanlarda majör histokompatibilite kompleksi (MHC) veya insan lökosit antijeni (HLA) tarafından sunulan antijenik peptitleri tanır. SARS-CoV'nin Spike, membran ve nükleokapsid (N) gibi yapısal proteinlerinin yapısal olmayan proteinlere kıyasla virüsün antijenitesinin faktörleri olduğu gösterilmiştir. Koronavirüs nükleokapsid proteini (N), humoral ve hücrel bağışıklığı indükleyen güçlü bir immünojen olarak da görev yapan yüksek oranda fosforile edilmiş bir proteindir [24]. Antijen sunumunun bir sonucu olarak virüse özgü humoral ve hücrel bağışıklık tepkisi uyarılır. SARS-CoV-2'ye karşı immüoglobulin M (IgM) ve IgG tipi antikorlar oluşur. Antikorlar enfeksiyon geliştikten bir süre sonra tespit edilmeye başlar (IgM antikorları 7-21 günde, IgG 14 günde). IgG tipi antikorların S ve N antijenlerine karşı oluştuğu ve uzun süre devam ettiği gösterilmiştir [25].

2.1.10.1 SARS-CoV-2'ye karşı humoral bağışıklık

SARS-CoV enfeksiyonundan sonra çoğu hastada güçlü humoral tepkiler bulundu ve iyileşen hastaların serumlarında yüksek titrelerde nötralize edici antikorlar mevcuttu. Koronavirüs yapısal proteini arasında spike (S) ve nükleokapsid (N) proteinleri ana immünojenlerdir. SARS-CoV'nin nükleokapsid (N) ve spike (S) proteinleri serum antikorları tarafından tanınan baskın antijenler gibi görünmektedir[26]. SARS-CoV-2'ye karşı humoral bağışıklık tepkisi yüzey S-glikoproteinini, özellikle reseptör bağlama alanı (RBD) bölgesi ve nükleokapsid proteinini hedef alan antikorlar tarafından elde edilir. Aşılınmış veya COVID-19 geçirmiş kişilerin kanında IgM, IgA ve IgG antikorları gelişir ve bu antikorla anti-S glikoprotein ve anti-RBD'nin viral temizliği ile nötralizasyonu gerçekleştirilir [27]. SARS-CoV-2'ye karşı antikor, IgM ve ardından IgG için medyan serokonversiyon süresi 11 gün, 12 gün ve 14 gündür. Hastalığın başlangıcından itibaren 1 hafta içinde hastalarda antikor varlığı %40'dan azdır, 15. günden itibaren hızla %100'e yükselir. Buna karşılık RNA saptanabilirliği yedinci günden sonra düşme eğiliminde olur. RNA

ve antikor tespitlerinin birleştirilmesi başlangıçtan itibaren 1 haftalık erken fazda bile COVID-19 için patojenik tanı duyarlılığını önemli ölçüde artırır. SARS-CoV-2'ye karşı yüksek antikor titresi kötü bir klinik ile ilişkilendirilir [25] .

Hastalığı geçiren kişilerin kan serumunda tespit edilen yüksek IgM, IgA ve IgG antikor seviyeleri onları hastalıktan korur. IgA antikoru kan serumu seviyesinde hastalığın 20-22. günlerinde, IgM antikoru 10-12. günlerinde ve IgG antikoru hastalığın üçüncü haftasında zirve yapar. Hastalığın hemen ardından 18. günde IgM antikorları azalır ve kaybolur, IgG antikoru ise sekizinci haftadan sonra azalmaya başlar. Kan serumundaki antikor seviyesi hastalığın şiddetine göre değişir. Hafif hastalığı olan kişilerde oluşan antikor seviyesi daha düşüktür ve daha kısa sürede kaybolur. Antikorların kısa süreli azalması, COVID-19 geçiren kişilerin tekrar hastalanabileceğini göstermektedir. Bu da COVID-19 aşılarının etkisinin uzun süreli olmayabileceğini düşündürmektedir [28].

SARS-CoV-2 nükleokapsid proteinine karşı IgM ve IgG antikorlarının dinamik değişimleri ELISA ile tespit edilebilir. IgG, ELISA tespitinin duyarlılığı (%92,5) IgM antikorundan (%70,8) daha yüksektir. IgM ve IgG için serokonversiyon süreleri sırasıyla 6 gün ve 3 gündür. IgM ve IgG antikor seviyeleri yaklaşık 18. gün ve 23. günde zirve yapar ve ardından IgM yaklaşık 36. günde bazal seviyenin altına düşer, IgG 50 günden daha uzun süre pozitif kalır. IgG retrospektif tanı ve temas takibi için hassas bir gösterge olabilirken, IgM erken enfeksiyonun bir göstergesi olabilir [29].

2.1.10.2 Hücresel bağışıklık

Viral enfeksiyonlarda CD8⁺ sitotoksik T lenfositler (CTL'ler) bulaşıcı hastalıkların kontrolü için gereklidir. Virüse özgü CD8⁺ T hücreleri majör histokompatibilite kompleksi (MHC) sınıf I molekülleri tarafından sunulan sekiz ile 11 amino asitli peptitleri tanır [24].

SARS-CoV hastalarında N proteinine karşı CD4⁺ T hücre tepkileri ve S sitotoksik T lenfosit epitopu tanımlandı. SARS-CoV enfeksiyonunun neden olduğu

başıklık tepkilerinin özellikle proinflamatuvar sitokinler durumunda konakçıda patolojik hasara da neden olması muhtemeldir. [26].

SARS-CoV-2 ile enfekte olmuş kişilerde CD38⁺, HLA-DR⁺ T hücreleri (CD4⁺ ve CD8⁺) semptomlar başladıktan 7-10 gün sonra artar ve 20. gün civarında normale döner. COVID-19 vakalarının %83'ünde S-protein-spesifik aktive CD38⁺ T hücreleri bulunur. Ancak SARS-CoV-2'ye maruz kalmamış bazı kişilerde belirli miktarda S-proteine yanıt veren CD4⁺ ve CD8⁺ T lenfositleri vardır. Bunun mevsimsel koronavirüs enfeksiyonlarına karşı çapraz dirençten kaynaklanabileceği tahmin edilmektedir [6].

2.2 Meme kanseri

2.2.1 Meme kanseri epidemiyolojisi ve etiyolojisi

Meme kanseri, kadınlar arasında en sık görülen ve en sık ölüme neden olan kanserdir [30-32]. Dünyada her yıl bir milyon yeni meme kanseri vakası görülmektedir ve bu kadınlardaki kanserlerin %18'ini oluşturmaktadır. Meme kanseri diğer yaygın kanserlere göre daha genç yaşta teşhis edilme eğilimindedir. Ortalama tanı yaşı 61 yıldır. Meme kanserlerinin yaklaşık %19'u 30 ila 49 yaş arası kadınlarda teşhis edilir ve %44'ü 65 yaş ve üzeri kadınlarda görülür [32] .

Mevcut tahminler ve istatistikler dünya çapında meme kanseri vakalarının ve buna bağlı ölümlerin arttığını göstermektedir. Meme kanseri dünya çapında tahmini 1.384.155 yeni vaka ve buna bağlı yaklaşık 459.000 ölümlle önemli bir halk sağlığı sorunudur [30, 31]. İki bin yirmi yılında meme kanseri kadınlarda ilk kez küresel olarak en sık teşhis edilen kanser oldu ve tahmini 2,26 milyon yeni vaka bildirildi İki bin yirmi iki yılı itibarıyla 185 ülkenin 157'sinde kadınlarda en sık görülen kanser türü meme kanseri oldu. İki bin yirmi iki yılında dünya çapında 2,3 milyon kadına meme kanseri teşhisi kondu ve 670.000 ölüm gerçekleşti. En son tahmin, 2040 yılına kadar meme kanserinin küresel yükünün yıllık 3 milyonun üzerinde yeni vakaya çıkmasının beklendiğini gösteriyor [33]. Amerika Birleşik Devletleri'nde tek başına meme kanseri kadınlarda görülen tüm yeni kanserlerin %29'unu oluşturmaktadır [30]. Amerikan Kanser Derneği'ne göre, Amerika Birleşik Devletleri'ndeki sekiz kadından biri yaşamı boyunca meme kanserine yakalanacaktır [31, 34].

Meme kanseri vakalarının tespitinin daha iyi olması ve daha iyi kanser kaydı, kanser vakalarının son otuz yılda görülme sıklığının ve kansere bağlı ölüm oranlarının arttığını gösteriyor. Şu anda meme kanserli hastaların yaklaşık %80'i 50 yaşın üzerindeki bireylerdir. Gelişmekte olan ülkelerde gelişmiş ülkelere kıyasla meme kanserine bağlı ölümler daha yaygın olarak rapor edilmektedir. Yüksek gelirli bir ülkede meme kanserine yakalanan kadınların çoğu hayatta kalırken düşük gelirli ve

birçok orta gelirli ülkede kadınlar için bunun tersi geçerlidir. İnsidans oranları, gelişmiş bölgelerde en yüksek olmasına rağmen, Asya ve Afrika'daki ülkeler 2020'deki meme kanserinden toplam ölümlerin %63'ünü paylaşıyordu [30] .

1990 ile 2016 yılları arasında meme kanseri insidansı iki kattan fazla artarken buna bağlı ölümler iki katına çıktı. Mevcut tahminler 2030 yılına kadar dünya çapında teşhis edilen yeni vaka sayısının yıllık 2,7 milyona, ölüm sayısının ise 0,87 milyona, 2050 yılına kadar yılda yaklaşık 3,2 milyon yeni vakaya ulaşacağını öngörmektedir [30, 31]. Düşük ve orta gelirli ülkelerde yaşam tarzlarının batılılaşması (gebeliğin gecikmesi, emzirmenin azalması, menarş yaşının düşük olması, fiziksel aktivite eksikliği ve kötü beslenme), kayıt ve kanser tespitinin artması nedeniyle meme kanseri görülme sıklığının daha da artması beklenmektedir [30, 35].

Tüm meme kanserlerinin %1'den azı erkeklerde görülür. Erkeklerde meme kanseri nadir görülen bir hastalıktır ve tanı anında kadınlara göre daha ilerlemiş durumdadır. Tanı konulduğunda erkeklerin ortalama yaşı 67 civarındadır [30] .

2.2.2 Meme kanserinin alt grupları

Meme kanseri patolojik özelliği açısından oldukça heterojendir bazı vakalar yavaş büyüme gösterirken diğerleri agresif tümörlerdir [31].

mRNA gen ekspresyon seviyelerine bağlı olarak meme kanseri, moleküler alt tiplere (Luminal A, Luminal B, HER2 + ve bazal benzeri) bölünebilir. Moleküler alt tipler, meme kanseri hastalarının yönetimini etkileyen yeni tedavi stratejileri ve hasta sınıflandırmaları hakkında bilgi sağlar [30] .

Luminal A: Luminal A tümörleri östrojen reseptörü (ER) ve/veya progesteron reseptörü (PR) varlığı ve HER2'nin yokluğu ile karakterize edilir. Prevalansı %40'tır [30, 36]. Ki-67'nin düşük ekspresyonuna (%20'den az) sahiptir [37]. Klinik olarak düşük derecelidirler, yavaş büyürler ve daha az nüks ve daha yüksek hayatta kalma oranı ile en iyi prognoza sahiptirler [30, 37].

Luminal B: Luminal tümörlerin %10-20'sini oluşturur [36, 37]. Luminal A'dan farklı olarak daha yüksek dereceli ve daha kötü prognoza sahiptir [30, 36, 37].

ER pozitif, PR negatif ve/veya HER2 pozitif olabilirler. Yüksek Ki-67, hızlı büyümelerine ve prognozun daha kötü olmasına neden olur [36, 37]. En kötü prognoza sahip lümen tümörleri grubunu temsil eder [37]. Luminal A tipine kıyasla hormon tedavisinden ve kemoterapiden daha yüksek oranda yararlanırlar [36, 37]. Kemik metastazı sık olmasına rağmen, visseral metastaz oranı daha yüksektir ve tanıdan nüksetmeye kadar hayatta kalma oranı daha düşüktür [37].

HER2 (+): HER2 pozitif grup meme kanserlerinin %10-15'ini oluşturur. ER ve PR yokluğu ve HER2'nin yüksek ekspresyonu ile karakterize edilir. Luminal kanserlerden daha hızlı büyür ve HER2 hedefli tedavilerin kullanıma sunulmasından önce alt tipler arasında en kötü prognoza sahiptir [30, 37]. İnsan epidermal büyüme faktörü reseptör 2 (EGFR2) eksprese eder. Agresif seyirlidir. Yüksek gradelidir ve lenf noduna metastaz riski yüksektir. Sağ kalım kısadır; ancak hedefe yönelik tedavi şansı mevcuttur[36].

HER2 + alt tip içinde iki alt grup ayırt edilebilir: Luminal HER2 (ER+, PR+, HER2+ ve Ki-67:15–30%) ve HER2 ile zenginleştirilmiş (HER2+, ER-, PR-, Ki-67>%30). Luminal tümörlerle karşılaştırıldığında daha kötü prognoza sahiptirler ve tirozin kinaz inhibitörleri dahil olmak üzere HER2/neu proteinine yönelik spesifik ilaçlara ihtiyaç duyarlar. Kemoterapi planlarına yüksek yanıt oranlarına sahiptirler [37].

Bazal benzeri alt grup: Tüm meme kanserlerinin %8' ini temsil eder. Bazal benzeri kanserler yüksek histolojik ve nükleer grade, zayıf tübül formasyon ve santralinde nekrotik veya fibrotik bölgelerin varlığı, sınırları zorlayan, göze çarpan lenfositik infiltrasyon ve olağanüstü yüksek mitotik ve proliferatif indekslere sahip medüller özellikler ile ilişkilidir. Bazal benzeri alt gruba ait tümörler bazal miyoepitelyal belirteçleri ve epidermal büyüme faktörü reseptörünü (EGFR) aşırı eksprese ederler ve ER, PR ve HER2'yi eksprese etmezler. Prognozu kötüdür [38].

Üçlü Negatif Meme Kanseri (TNBC): Tüm meme kanserlerinin yaklaşık %10-20'sini oluştururlar [36, 37]. Üçlü Negatif Meme Kanseri (TNBC) ER-negatif, PR-negatif ve HER2-negatif olarak karakterize edilen heterojen bir meme kanseri

topluluğudur [30, 36, 37]. Daha genç yaşta tanı konulur[36]. TNBC 40 yaşın altındaki kadınlar arasında daha yaygındır [30, 37]. BRCA1 germ hattı mutasyonundan kaynaklanan meme kanserlerinin çoğunluğu (yaklaşık %80'i) TNBC' dir. Tüm TNBC' lerin %11-16' sı ise BRCA1 veya BRCA2 germ hattı mutasyonlarını barındırır. TNBC biyolojik olarak agresif olma eğilimindedir ve sıklıkla daha kötü prognozla ilişkilidir [30, 36]. Cerrahi sonrası uzak metastaz riski yüksektir. Kısa dönemde prognoz kötüdür. Hedefe yönelik tedavisi yoktur [36].

İnflamatuvar meme kanseri: Diğer gruplardan farklıdır. Dermal lenfatik kanallara tümör embolisi sonucu olur. Memede hassasiyet ile seyreder ve ileri evrede tanı konulur. Tanı anında hastaların çoğunda aksiller lenf nodu ve %35'inde uzak metastaz mevcuttur. Bu grup hastaların %50'de HER2'(+)’tir [36].

2.2.3 Risk faktörleri:

Meme kanserinin karsinogenezi öncelikle hem genetik yatkınlıklar hem de çevresel nedenler tarafından tetiklenen çok faktörlü bir süreçtir. Bu risk faktörleri hem değiştirilebilir faktörleri hem de değiştirilemeyen faktörleri içerir [30].

Değiştirilemeyen Faktörler

Cinsiyet: Menopoz öncesi ve menopoz sonrası cinsiyet hormonlarının seviyelerindeki değişimler, kadınlarda meme kanseri riskinin yükselmesine neden olur [30].

Yaş: Meme kanseri görülme sıklığı yaşla birlikte artar ve menopoza kadar her 10 yılda bir iki katına çıkar ve menopoz döneminde artış hızı önemli ölçüde yavaşlar. Akciğer kanseriyle karşılaştırıldığında meme kanseri görülme sıklığı genç yaşlarda daha yüksektir [39]. Şu anda meme kanseri hastalarının yaklaşık %80'i 50 yaşın üzerindeki bireylerden oluşurken aynı zamanda %40'tan fazlası 65 yaşın üzerindedir. Meme kanserine yakalanma riski şu şekilde artar: 40 yaşında risk %1,5 iken 50 yaşında %3 ve 70 yaşında %4'ten fazladır. Agresif dirençli üçlü negatif meme kanseri alt tipi en sık 40 yaşın altındaki gruplarda teşhis edilirken 70 yaş üzerindeki hastalarda Luminal A alt tipi daha yaygındır [30, 40].

Genç yaşta tanı konulması kötü prognostik özelliktedir. Bu hastalarda tümör boyutu daha büyük olup lenf nodu tutulumu mevcuttur. Genç yaş ileri evreye ek olarak tanı anında biyolojik olarak daha agresif, lokal ve uzak nüks oranlarının daha yüksek olduğu kanserlerle ilişkilidir. 45 yaş altında tanı alanlarda sağ kalım daha kötüdür [41].

Aile Öyküsü: Meme kanseri tanısı alan hastaların yaklaşık %13-19'u birinci derece akrabalarında meme kanseri vardır. Etkilenen birinci derece akrabaların sayısı arttıkça meme kanseri riski de önemli ölçüde artmaktadır. Etkilenen akrabalar 50 yaşın altında olduğunda risk daha da yüksektir. Ailede over kanseri öyküsü olanlarda meme kanseri riski de yüksektir [30].

Genetik Mutasyonlar: Meme kanserlerinin %10'u genetik nedenlere bağlıdır. Genetik mutasyona bağlı meme kanserlerinin çoğu 65 yaşından önce ortaya çıkar. Bu kişilerde over, kolon, prostat ve diğer kanser insidansları da artmıştır. Bilateral meme kanseri olan, meme kanseri ile başka bir epitelyal kanseri de olan ve genç yaşta tanı konulan hastalarda genetik mutasyon taşıma olasılığı artmaktadır. Birinci derece akrabasında meme kanseri olan kişilerde meme kanseri riski 2-3 kat artmaktadır [39].

Kromozom 17 ve 13'ün uzun kollarında bulunan BRCA1 ve BRCA2 genleri yüksek riskli aileleri tanımlamaktadır. BRCA1 ve BRCA2 genleri öncelikle meme karsinogenezi riskinin artmasıyla bağlantılı olan genlerdir. Otozomal dominant kalıtılırlar ancak sporadik mutasyonları da vardır [40, 42].

Diğer meme kanseri genleri arasında TP53, CDH1, PTEN ve STK11, ATM, PALB2, BRIP1 veya CHEK2 yer almaktadır. Bu tür mutasyonların taşıyıcıları, artan meme kanseri riskinin yanı sıra yumurtalık kanserine de daha duyarlıdır [30, 42].

İrk/Etnisite: Meme kanseri insidansı gelişmiş ülkelerde ve sosyoekonomik seviyesi yüksek kadınlarda daha yüksektir. Genel olarak meme kanseri insidans oranı İspanyol olmayan beyaz kadınlar arasında en yüksek oran olmaya devam etmektedir. Aksine, bu maligniteye bağlı ölüm oranı siyahi kadınlar arasında önemli ölçüde daha yüksektir. Bu grup aynı zamanda en düşük hayatta kalma oranlarıyla da karakterize edilir. 2003-2007 yılları arasında meme kanserinden ölüm Afro-Amerikan kadınlarda en yüksek iken, Asya ve Pasifik kökenli kadınlarda en düşüktür [30, 39].

Reprodüktif Dönem: Adet görmeye erken başlayan veya menopozu geç geçiren kadınların meme kanserine yakalanma riski daha yüksektir, yani erken menarş yaşı meme kanseri riskini artırır ancak erken menopoz meme kanseri riskini azaltır. 55 yaşından sonra doğal menopoza giren kadınların meme kanserine yakalanma olasılığı, 45 yaşından önce menopoza giren kadınlara göre iki kat daha fazladır. 35 yaşından önce iki taraflı ooferektomi geçiren kadınlarda bu oran %40'tır [39, 42].

Doğum yapmama ve ilk doğumun yaşının geç olması yaşam boyu meme kanseri görülme sıklığını artırmaktadır. İlk çocuğunu 30 yaşından sonra doğuran kadınlarda meme kanserine yakalanma riski ilk çocuğunu 20 yaşından önce doğuran kadınlara göre yaklaşık iki kat daha fazladır. En yüksek risk grubu ise ilk çocuğunu 35 yaşından sonra doğuranlardır. Bu kadınların doğum yapmamış kadınlara göre daha yüksek risk altında olduğu görülmektedir. Erken yaşta (özellikle yirmili yaşların başlarında) ilk tam süreli hamilelik ve ardından artan doğum sayısı, meme kanseri riskinin azalmasıyla ilişkilidir. İkinci çocuğun erken doğması meme kanseri riskini daha da azaltır. 34 ve üzeri gebelik haftaları meme kanserine karşı koruyucudur. Artan meme kanseri riski ile kürtaj arasında herhangi bir ilişki belirtilmemiştir. Emzirme süresinin daha uzun olması kanser riskini azaltır [30, 39, 40, 42].

Meme Dokusunun Yoğunluğu: Genel olarak daha fazla meme dokusu yoğunluğu, daha fazla meme kanseri riski ile ilişkilidir bu eğilim hem menopoz öncesi hem de menopoz sonrası kadınlarda görülmektedir [30, 42].

Önceki iyi huylu meme hastalığı: Şiddetli atipik epitel hiperplazisi olan kadınların meme kanserine yakalanma riski, memelerinde herhangi bir proliferatif değişiklik olmayan kadınlara göre dört ila beş kat daha fazladır. Bu değişikliği yaşayan ve ailesinde meme kanseri öyküsü olan (birinci derece akraba) kadınlarda risk dokuz kat artmaktadır. Ele gelen kistleri, kompleks fibroadenomları, duktus papillomları, sklerozan adenozu ve orta derecede epitelyal hiperplazisi (florid) olan kadınların meme kanseri riski, bu değişiklikleri olmayan kadınlara göre biraz daha yüksektir (1,5-3 kat), ancak bu artış klinik olarak önemli değildir[39, 42].

Radyasyon: 30 yaşından önce radyasyon tedavisi gören hastalarda meme kanseri riski daha yüksektir. Ayrıca radyoterapi alan hastalarda ailede meme kanseri öyküsü olması da kanser oluşma riskini artırmaktadır [30]. İyonlaştırıcı radyasyona maruz kalma yaşamın ilerleyen dönemlerinde özellikle de meme gelişimi sırasında radyasyona maruz kalma durumunda riski artırır [39].

Değiştirilebilir Faktörler

Seçilmiş İlaçlar: Hamilelik sırasında dietilstilbestrol alımı yalnızca annelerde değil aynı zamanda çocuklarda da meme kanseri riskinin artmasıyla ilişkilidir. Beş veya yedi yıldan daha uzun süre hormon replasman tedavisi (HRT) kullanan kadınların da meme kanseri riski artmaktadır. Çeşitli çalışmalar trisiklik antidepresanlar ve seçici serotonin geri alım inhibitörleri olmak üzere seçilmiş antidepresanların alımının da meme kanseri riski ile ilişkili olabileceğini göstermiştir [30, 39, 42].

Fiziksel Aktivite: Fiziksel aktivite endojen seks hormonlarına maruz kalmayı azaltarak, bağışıklık sistemi yanıtlarını veya insülin benzeri büyüme faktörü-1 düzeylerini değiştirerek kanseri önleyebilir [30, 40].

Vücut Kitle İndeksi: Obezite meme kanseri olasılığının artmasıyla ilişkilidir. Bu ilişki çoğunlukla östrojen reseptörü pozitif meme kanseri geliştirme eğiliminde olan menopoz sonrası obez kadınlarda yoğunlaşmaktadır. Vücut Kitle İndeksi (BMI) daha yüksek olan 50 yaş üstü kadınların kanser riski daha fazladır. Daha yüksek BMI varlığı daha yüksek lenf nodu metastazı yüzdesi ve daha büyük boyut dahil olmak üzere tümörün daha agresif biyolojik özellikleriyle ilişkilidir. $BMI \geq 25 \text{ kg/ m}^2$ olan kadınlarda daha kötü sonuçlar gözlenmektedir [30, 39, 42].

Alkol Alımı: Alkol alımının neden olduğu artan östrojen düzeyleri ve hormonal dengesizlik meme kanseri riskini artırır. Alkol alımı genellikle daha yüksek BMI seviyeleriyle birlikte aşırı yağ kazanımına neden olur ve bu da riski daha da artırır. Alkol tüketiminin özellikle östrojen pozitif meme kanseri riskini arttırdığı gözlemlenmiştir [30, 39].

Sigara Kullanımı: Tütünde bulunan kanserojenler meme dokusuna taşınarak onkogenler ve baskılayıcı genler (özellikle p53) içindeki mutasyonların olasılığını artırır [30, 39, 40].

Yetersiz Vitamin Takviyesi: Yüksek serum 25-hidroksivitamin D seviyeleri, menopoz öncesi ve menopoz sonrası kadınlarda daha düşük meme kanseri insidans oranı ile ilişkilidir. D vitamini reseptörlerinin yoğunlaştırılmış ekspresyonunun meme kanserine bağlı ölüm oranlarının azalmasıyla ilişkili olduğu gösterilmiştir [30, 40].

Kimyasallara Maruz Kalma: Kimyasallara kronik olarak maruz kalan kadınlarda meme kanseri olasılığı önemli ölçüde daha yüksektir ve bu da maruz kalma süresiyle pozitif olarak ilişkilidir [30, 40].

2.3 Meme kanserinin immünolojisi

2.3.1 CD3⁺ lenfositlerin kanser prognozu üzerine etkisi

Tümörü infiltrate eden lenfositlerin (TIL) tümör proliferasyonunu ve metastazı inhibe etmede rol oynadığı ve bağımsız bir prognostik faktör olabileceği düşünülmektedir. Tümördeki TIL'ler, anti-tümör hücrel immün tepkisini gösterir. Tümörü infiltrate eden lenfositlerin miktarı birçok tümör tipinde prognoz ile ilişkilidir. TIL'ler solid neoplazmların yayılmasına karşı konak savunmasının önemli bir yönünü oluşturur. Tümör dokusunda yüksek konsantrasyonlarda lenfositlerin toplanması ve birikmesinin neoplastik yayılmaya karşı önemli bir yerel engel oluşturduğu genel bir inançtır. İyileşen klinik sonucun kısmen tümördeki belirgin TIL'lerin varlığına bağlı olduğu ileri sürülmüştür[43].

Bir pan-T hücre işaretçisi olan CD3 antijeni, tüm T hücrelerinde ifade edilen bir protein kompleksidir. CD3 antijeni olgun T lenfositlerinde bulunan bir glikoprotein reseptörüdür. CD3 hem sitotoksik T lenfosit hücrelerinin (CD8⁺) hem de yardımcı T hücrelerin (CD4⁺) aktive edilmesinde rol oynayan bir protein kompleksidir [43, 44].

T-lenfositler tarafından eksprese edilen CD3 ve CD8 antijenleri gibi hücre yüzeyi proteinleri T-lenfositlerin farklı alt gruplarını immünohistokimyasal olarak tanımlamak için kullanılabilir. Örneğin CD3, T lenfositlerin tüm gelişim aşamalarında eksprese edilir ve sitotoksik T-lenfositler (CTL), Treg ve Th hücrelerinde bulunabilir, bu da onu doku örneklerinde oldukça spesifik bir pan-T hücresi işaretçisi yapar. Ek olarak, CD8 ağırlıklı CTL'lerde eksprese edilir ve dolayısıyla T lenfositlerin bu alt grubu için spesifik bir belirteç görevi görür. [43, 45]

CD3⁺ TIL yoğunluğu tümör hücrelerine karşı devam eden bağışıklık tepkisinin durumunu yansıtabilir. CD3⁺ TIL'lerin varlığı çeşitli çalışmalarda olumlu sonuçlara bağlanmıştır. Düşük sayılara kıyasla yüksek CD3⁺ TIL sayımları Evre IB serviks kanserinde ve epitelyal over kanserinde daha iyi sağkalım ile ilişkilidir. Bunun aksine memenin invaziv mikropapiller karsinomu üzerine yapılan bir çalışmada, TIL'ler artan lenf nodu metastazı ve daha kötü prognoz göstergesidir. [43]

Yüksek CD3⁺ hücre yoğunluğunun orofaringeal kanserde olumlu sonuçlarla ilişkili olduğu rapor edilirken daha kısa hastaliksız sağkalımı öngördüğü gösterilmiştir. CD3⁺, CD4⁺ ve CD8⁺ tümör infiltre eden lenfositlerin (TIL) daha yüksek yoğunlukları hastalığın tekrarlama riskini azaltmıştır [44].

2.3.2 CD4⁺ ve CD8⁺ lenfositlerin tümör prognozu üzerine etkisi

CD4 antijeni, yardımcı T hücrelerinin, düzenleyici T hücrelerinin, monositlerin ve makrofajların yüzeyinde bulunan bir glikoproteindir. CD4⁺ T lenfositleri edinsel bağışıklığın önemli bir parçasıdır.

CD8 antijeni bir T hücresi reseptör glikoproteinidir. Genel olarak hem CD4⁺ hem de CD8⁺ TIL'ler etkili tümör eliminasyonu için gereklidir. Daha yüksek CD8⁺ ve diğer TIL'lerin kolon ve over karsinomunda iyi prognoz ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Daha yüksek sayıda CD8⁺ hastaliksız sağkalım ve genel sağkalım ile ilişkilendirilmiştir.

CD4⁺ ve CD8⁺ T hücreleri, hücre aracı bağışıklıktaki ana lenfosit türleridir ve tümörlere karşı etkili bağışıklık tepkilerinin başlatılmasında merkezi bir rol oynar [46]. CD8⁺ T hücreleri, etkili anti-tümör bağışıklığına aracılık eden ve daha iyi klinik sonuçlara yol açan temel efektör hücre popülasyonudur. Buna karşılık tümör içi CD4⁺ T hücrelerinin meme kanseri hastası sonuçları üzerinde olumsuz prognostik etkileri vardır [47]. Periferik kanda kanser hastaları ile sağlıklı kontroller arasında CD4⁺ ve CD8⁺ T hücrelerinin ortalama frekansları ile ortalama CD4⁺/CD8⁺ oranları arasında fark yoktur. Tümör dokularındaki CD4⁺ T hücrelerinin sıklığında normal dokulara kıyasla anlamlı bir fark yoktur. Ancak CD8⁺ T hücrelerinin ortalama frekansı tümör dokularında normal meme dokularına kıyasla önemli ölçüde daha yüksektir. Normal dokularla karşılaştırıldığında tümör dokularında CD4⁺/CD8⁺ oranları daha düşüktür. Ancak meme tümör dokularında hem CD4⁺ hem de CD8⁺ hücrelerinde artış vardır. Meme kanseri hastalarında tümörü infiltre eden CD8⁺ T hücreleri, hastalık prognozunu ve klinik ilerlemeyi değerlendirmede önemli bileşendir. Hem CD4⁺ hem de CD8⁺ T

hücreleri ile tümörlerin boyutu arasında güçlü, anlamlı negatif korelasyonlar vardır. T hücreleri ne kadar yüksek olursa tümör boyutu da o kadar düşük olur. T hücrelerinin sıklığı ile klinik sonuçtaki iyileşme arasında bir ilişki vardır. CD4⁺/CD8⁺ oranları ile birlikte tümörü infiltre eden CD4⁺ T hücrelerinin azalan oranları serviks karsinomunda hızlı tümör büyümesi ve lenf nodu metastazı ile yüksek düzeyde korelasyon göstermiştir. Buna karşılık, tümörlerdeki yüksek CD4⁺ hücre yüzdesine bağlı olarak yüksek CD4⁺/CD8⁺ oranı meme, böbrek, özofagus ve küçük hücreli akciğer karsinomlarında lenf nodu metastazı ve azalmış hasta sağkalımı ile ilişkilendirilmiştir.

2.3.3 CD62L hücrelerinin meme kanseri akciğer metastazında rolü

CD62L olarak da bilinen L-Selektin çoğu lökositte eksprese edilen tip I transmembran hücre yapışma molekülüdür [48]. L-Selektin (CD62L) komşu hücrelerdeki glikoproteinlere bağlanarak hücre yapışmasına aracılık etmede önemli bir rol oynayan kalsiyuma bağımlı bir lektindir. İşlevsel olarak periferik lenf düğümlerindeki yüksek endotelial venüller içindeki endotelial hücrelere lenfositlerin yapışmasını kolaylaştırır, endotelial dokularda lökositlerin başlangıçta bağlanmasını ve yuvarlanmasını teşvik eder [49]. L-selektin nötrofillerin yuvarlanma, yapışma ve göç gibi hareketlerini etkiler. CD62L nötrofillerin aktivasyonlarını da düzenler[48]. CD62L hücrelerin sayısı meme kanserinin ilerlemesi ve metastaz öncesi oluşumlarla yakından ilişkilidir[49]. CD62L nötrofillerinin meme kanseri metastazı öncesi nişin oluşmasına katkıda bulunuyor. CD62L artmasının meme kanserinin akciğer metastazının artması ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [48, 49].

2.3.4 Gr-1⁺ CD11b⁺ hücrelerin metastazda rolü

Solid tümörlerin büyümesi ve metastazı sadece bağışıklık gözetiminden kaçma yeteneklerine bağlı değil aynı zamanda damar sistemini istila etme ve yeni kan damarlarının oluşumunu tetikleme yeteneklerine de bağlıdır [50]. Tümör taşıyan konakçılarda aşırı üretilen Gr-1⁺ CD11b⁺ miyeloid türevi baskılayıcı hücreler (MDSC) tüm bu yönlere önemli ölçüde katkıda bulunur. MDSC' ler makrofaj soyunun miyeloid

hücreleri için bir işaretleyici olan CD11b'yi ve granülositler için bir işaretleyici olan Gr-1'i eksprese eder. Bu nedenle Gr-1⁺CD11b⁺ hücreleri olarak adlandırılırlar. Gr-1⁺CD11b⁺ hücreleri kanser hastaları da dahil olmak üzere tümör konakçılarının periferik kanında yüksek sayıda bulunur [50, 51] .

Gr-1⁺CD11b⁺ hücreleri kanser hastaları da dahil olmak üzere tümör konakçılarında aşırı üretilmesi tümörün yayılımıyla ilişkilidir. Gr-1⁺CD11b⁺ hücreleri arginaz ve reaktif oksijen türlerinin üretimi yoluyla doğal öldürücü (NK), B ve T hücrelerinin fonksiyonunu inhibe ederler. Ayrıca dendritik hücrelerin fonksiyonel olgunlaşmasını engeller ve tip II makrofaj gelişimini teşvik ederler. Dolayısıyla tümörün bağışıklık sistemi kontrolünden kaçmasına yönelik bir mekanizmayı temsil ederler. Bu hücreler tarafından yapılan bağışıklık baskılaması hem sistemik hem de lokal olabilir [52] .

Gr-1⁺CD11b⁺ hücrelerinin iki ana alt popülasyonu vardır: mononükleer hücreler (makrofajların öncüleri) ve düşük yoğunluklu polimorfonükleer hücreler (olgunlaşmamış nötrofiller). Her iki popülasyon da antijene spesifik T hücresi tepkilerini baskılar ancak farklı efektör moleküller ve sinyal yolları aracılığıyla baskılar. Tümöre sızan Gr-1⁺CD11b⁺ hücreleri aynı zamanda tümörün ilerlemesini ve metastazını derinden etkileyebilecek immün olmayan baskılayıcı etkilere de sahiptir. Örneğin tümör anjiyogenezine, vaskülojenезine (tümör damar sistemine dahil olur), ve tümör istilasına katkıda bulunan yüksek seviyelerde Matriks Metalloproteinazlar (MMP) ve Transforme edici büyüme faktör-beta (TGF-β) üretirler. Gr-1⁺CD11b⁺ hücreleri TGF-β üretimi için ana kaynaktır. 4T1 meme tümörü modelini kullanarak yapılan çalışmalarda anti-TGF-β antikoru ile tedavinin Gr-1⁺CD11b⁺ hücre aracılı mekanizmalar yoluyla metastazı ve tümör büyümesini baskıladığı gösterilmiştir [52].

Tümör büyümesi sırasında dalakta Gr-1⁺CD11b⁺ MDSC birikimi splenomegaliye katkıda bulunabilir. Saf farelerde yaklaşık %1-2 olan dalak MDSC sıklığının birçok kanser türünde %15 civarına çıktığı bildirilmektedir. Dalakta Gr-

1^+CD11b^+ MDSC sıklığının artması, daha sonra tümör bölgelerine göç ederek büyümelerini teşvik eden dalaktaki genişlemenin bir sonucu olabilir [53].

Gr-1⁺CD11b⁺ olgunlaşmamış miyeloid hücrelerin, yüksek TGF- β seviyeleri için ana kaynaktır. CD8⁺ hücrelerin inhibisyonuna TGF- β üretimi yoluyla Gr-1⁺ CD11b⁺ miyeloid hücreleri aracılık eder. TGF- β aynı zamanda tümör taşıyan farelerde CD8⁺ hücrelerinin polarizasyonunu da değiştirerek tümör hücrelerinin apoptozunu baskılayan interlökin 17'nin (IL-17) yükselmesine neden olur [51, 52]. TGF- β bağışıklık sistemindeki baskılayıcı etkisinin yanı sıra, tümör mikro çevresini düzenleyen inflamatuvar reaksiyonlarda da önemli düzenleyicilerden biridir. TGF- β aynı zamanda inflamasyon reaksiyonunun ana düzenleyicisi olan NF- κ B sinyallemesine de aracılık eder [52].

2.3.5 Fare Makrofaj Belirteci F4/80

Doku makrofajları homeostazın korunmasına katkıda bulunan ve uyarılara yanıt olarak immün aktivasyonu tetikleyen tüm vücut dokularında bulunan heterojen hücre popülasyonudur. Bu heterojenlik dokuya özgü işlevlerle ilişkili olabilir ancak aynı mikro çevrede farklı makrofaj popülasyonlarının varlığı makrofaj heterojenliğinin doku uzmanlaşması dışında da etkilenebileceğini gösterir. F4/80 molekülü fare makrofajlarının benzersiz bir işaretçisi olduğu monoklonal bir antikorun yalnızca bu hücreler tarafından ifade edilen bir antijeni tanıdığı tespit edildiğinde ortaya çıktı [54].

F4/80 dalaktaki kırmızı pulpa makrofajları, beyindeki mikroglia, karaciğerdeki Kupffer hücreleri ve derideki Langerhans hücreleri dahil olmak üzere yerleşik doku makrofajlarının çoğunda yüksek oranda ve yapısal olarak eksprese edilir. Ayrıca F4/80'in ekspresyonu hücrelerin fizyolojik durumuna göre sıkı bir şekilde düzenlenir. Dolayısıyla doku makrofajlarının öncüsü olan kan monositinin olgun muadillerine göre daha az F4/80 eksprese ettiği bilinmektedir lenf düğümleri ve dalaklarda F4/80 yalnızca T hücresinden bağımsız alanlardaki makrofajlarda tespit edilir [54-56].

3. MATERYAL METOD

3.1 Deneysel Meme Kanseri Oluşturulması

Tümör oluşumunu in vivo olarak incelemek için giderek artan sayıda hayvan modeli geliştirilir. Özellikle fare modelleri kanser araştırmaları için birincil araçlar haline gelmiştir ve bunlar üç ana gruba ayrılabilir:

- 1- Ksenograft modelleri
- 2- Kimyasal, viral veya iyonlaştırıcı radyasyonun (IR) neden olduğu modeller
- 3- Transgenikler ve knock-out içeren genetik olarak tasarlanmış fareler (GEM) [57].

Genetiği değiştirilmiş fare modelleri hastalığın moleküler temellerini incelemek için araç olarak hizmet edebilir. Bireysel meme kanseri alt tiplerinin başlangıcını ve ilerlemesini yönlendiren genetik karmaşıklık göz önüne alındığında bazı modellerin bu malignitenin yalnızca belirli yönlerini yansıtabileceği açıktır [57].

Diğer meme kanseri türlerine göre daha sık tekrarlayan ve metastaz yapan agresif bir hastalık olarak ortaya çıkan üçlü negatif meme kanseri (TNBC) fare modelinde tümör kısa sürede büyüyor, bu nedenle bu kanserli fare modellerinden yararlanılan deneylerde çok yardımcı oluyorlar [12].

4T1 meme karsinomu oldukça tümörojenik ve invazif olan ve çoğu tümör modelinin aksine meme bezindeki birincil tümörden lenf düğümleri, kan, karaciğer, akciğer, beyin dahil olmak üzere birçok uzak bölgeye kendiliğinden metastaz yapabilen nakledilebilir bir tümör hücre dizisidir. 4T1 fare modeli, araştırmacılara kadın meme kanseri çalışmaları için çeşitli avantajlar sunmuştur. 4T1 tümör hücreleri meme bezine kolayca nakledilir ve anatomik olarak doğru bölgede büyümesi sağlanır tümör gelişiminin verimliliği yüksektir. İkincisi insan meme kanserinde olduğu gibi

4T1 metastatik hastalık da primer tümörden kendiliğinden gelişir. Ayrıca 4T1 metastazlarının drenaj yapan lenf düğümlerine ve diğer organlara ilerleyici yayılması insan meme kanserine çok benzer. 4T1'in bir diğer avantajı ise 6-tiyoguanin'e karşı direncidir. Bu özellik, burada açıklandığı gibi uzak organlarda yayılmış olsalar ve mikroskopik düzeyde olsalar bile metastatik hücrelerin miktarının kesin olarak belirlenmesini sağlar. Ek olarak, bu hayvan modeli hem erkeklerde hem de kadınlarda oldukça agresif bir meme kanseri türü olan evre IV'teki üçlü negatif kadın meme kanserini etkili bir şekilde taklit etmektedir [58, 59].

Tipik olarak 4T1 meme kanseri modeli, 6-15 adet 5-8 haftalık dişi BALB/c'nin, meme bezine deri altından enjekte edilen belirli sayıda 4T1 tümör hücresi ile aşılmasını içerir [59].

BALB/c farelerinden izole edilen 4T1 hücreleri doğal olarak oluşan insan meme kanseri ile birçok özelliği paylaşır. Hematojen yolla uzak organlara metastaz yapar bu da onu insan meme kanserinin metastatik ve ileri aşamalarını taklit etmek için iyi bir model haline getirmektedir [47]. 4T1 tümörünün tümör naklinden sonraki sekiz gün kadar erken bir dönemde karaciğer ve akciğerlere metastaz yapabilir [60].

Tümör oluşturulması amacıyla kullanılacak olan 4T1 (105/100 IJL PBS) fare meme kanseri hücre hatları için %10 fetal bovin serum (FBS), %1 penisilin/streptomisin ve %1 L-glutamin içeren RPMI besiyerinde hücre flaskında %70 yoğunluğa ulaşana kadar 37 °C ve %5 CO₂'li etüvde çoğaltıldı. Çoğalan hücreler, tripsinizasyon (10x tripsin-edta karışımı) ile kaldırıldı ve PBS ile 2 kez yıkandı. 2000 rpm 5 dk. santrifüjlenerek toplandı. Daha sonra enjekte edilecek hücre sayısı hesaplanarak hücre süspansiyonları PBS ile hazırlandı. Tümörlü gruplar için 4T1 ortotopik meme kanseri modeli için tüm hayvanların sağ inguinal memelerine 10⁵/100 µL PBS içerisinde olacak şekilde 4 T1 meme kanseri hücreleri subkutanöz (s.c.) olarak enjekte edildi. İnokülasyon bölgesindeki tümörlerin büyümesi palpe edilerek ve kaliper (kumpas) ile çapları (en-boy) ölçülerek takip edildi. Tümör çaplarının geometrik ortalaması alınarak büyüme oranları değerlendirildi.

3.2 Deneş hayvanları ve protokolü:

Bu çalışma Hacettepe Üniversitesi Deneş Hayvanları Etik Kurulu'nun 30.01.2024 tarih, 2024/01 kayıt ve 2024/01-01 karar numaralı izni ile uygulandı. Deneşler Hacettepe Üniversitesi Deneş Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde gerçekteştirildi. Çalışmaya ağırlıkları 18-22 gr arasında değişen 6-8 haftalık BALB/c ırkı dişi fareler dahil edildi. Fareler steril yem ve su bakımında *ad libitum* olarak %50 nem 22 ±2 °C sıcaklığındaki odalarda steril kafes ve altlıklar ile bakıldı. Deneş grupları için hayvanlar kendi kafeslerinde gruplar halinde tutuldu (Tablo 3.1).

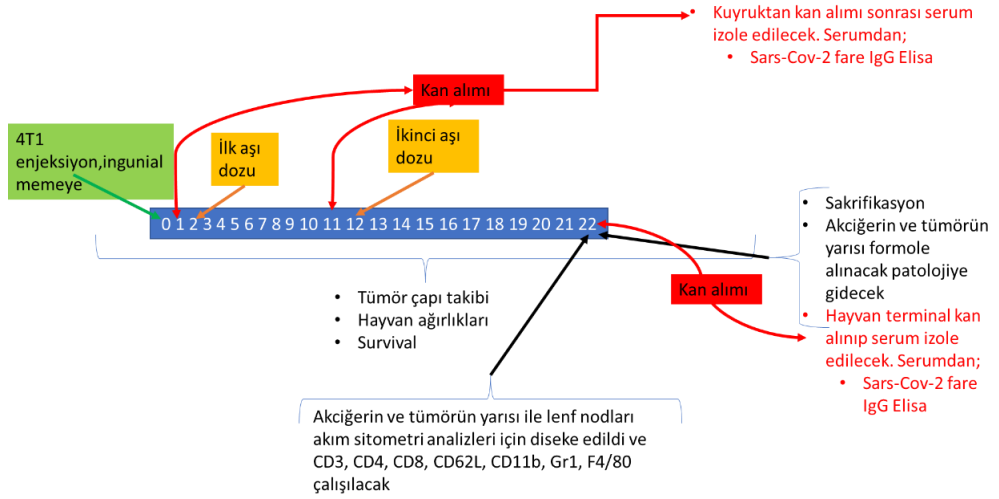
Tablo 3.1. *İn vivo* deneş grupları.

Deneş ve Kontrol Grupları	Grup Başına Hayvan Adedi (n)
Kontrol grubu (Tümörsüz ve Uygulamasız)	3
Tümörlü Serum Fizyolojik Grubu	6
Tümörlü Pfizer-BioNTech Sars-Cov-2 Aşı Grubu	6
Tümörlü Sinovac-CoronaVac Sars-Cov-2 Aşı Grubu	6

Tümör inokülasyonundan sonraki bir, 11 ve 22. günlerde tüm gruplarda bulunan hayvanların kuyruk veninden kan alındı. Birinci ve 11. günlerde aşı gruplarından alınan kanlar aşılar vurulmadan önce alındı. Kanlar 4000 rpm 10 dk santrifüj edilerek serumları toplandı. Serumlar ELISA testleri için -80 °C'ye alındı. Subkutan olarak 2. ve 12. Günlerde kan alımından sonra inaktive Sars-Cov-2 aşısı (Sinovac-CoronaVac) (500ul/fare) ve mRNA Sars-Cov-2 aşısı (30ug/fare) (BioNTech-Pfizer) uygulamaları gerçekteştirildi. Serum fizyolojik grubuna 0,5 cc serum fizyolojik subkutan olarak enjekte edildi.

Tüm gruplarda vücut ağırlıkları günaşırı kaydedildi ve hayvanların genel sağlık durumları, sağkalımları su ve besin alımları gözlemlendi. 22. günde hayvanlar sakrifiye edildi. Tüm gruplar için ötanazi öncesi genel anestezi etki süresi 20-60 dak

süren 10 mg/kg Xylasine ve 100 mg/kg Ketamin karışımı intraperitoneal verilerek sağlanmıştır. Anestezi derinliği 2-3 dakikada bir cilt ve parmak kıstırma yanıtları ile değerlendirildi. Çıkarılan tümör ve akciğer dokularının yarısı %10 formalin ile sabitlenip, akciğer dokusunda metastaz, tümör dokusunda nekroz açısından değerlendirilmek üzere ileri patolojik değerlendirmeler için patolojiye gönderildi. Tümör ve akciğer dokularının diğer yarısı ve lenf nodları ise akım sitometri analizleri için kullanıldı.



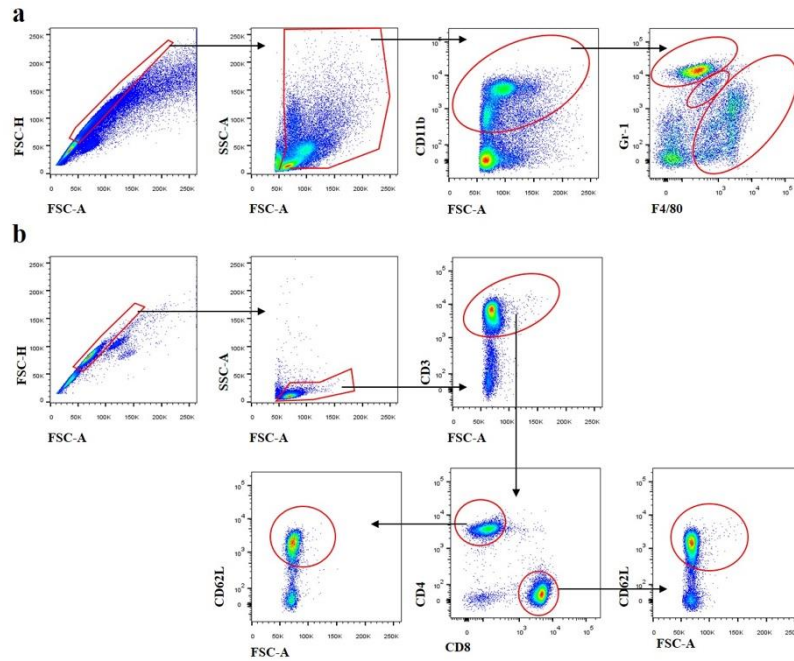
Grafik 3.1: Denei protokolünü gösteren iş akış şeması. Tümör oluşturma, aşı yapılması, kandan serum edilmesi sonucunda ELISA testleri ve sakrifikasyon sonrası patolojik analizler ve akım sitometri analizleri gün skalası üzerinde gösterilmiştir.

1. İmmünfenotip analizi: Çıkarılan tümör, akciğer dokularının yarısı ve lenf nodları %10 FBS içeren RPMI besiyerine alındı. Dokular ilk olarak bistüri yardımıyla küçük parçalara ayrılarak mekanik parçalama yapıldı. Daha sonra kollajenaz (100 U/ml), DNaseI (200 U/ml) ve %10 FBS-RPMI besiyeri karışımının içerisinde 37°C su banyosunda 1 saat inkübasyona bırakılarak enzimatik parçalama sağlandı. Parçalama işleminin ardından 70 mikrometrelik (pnr) steril süzgeçten geçirilerek %10 FBS-RPMI besiyeri ile 2 kez yıkama yapıldı (2000rpm, 5dk). Böylece tümöre infiltre olmuş immün hücrelerin elde edilmesi sağlandı. Elde edilen immün hücreler anti-CD11 b, -Gr1, -F4/80 -CD-3, -CD4 ve -CD8- CD62L

antikorlarının farklı kombinasyonlarıyla boyanarak +4°C'de 40 dk inkübasyona bırakıldı ve inkübasyon sonrası hücre yıkama solüsyonuyla (Becton Dickinson (BD)-cell wash) ile santrifüj edildi (2000rpm, 5dk). Farklı antikor kombinasyonlarıyla işaretlenen hücreler BD-FACSCanto II akım sitometri cihazı ile okunduktan sonra FlowJo yazılımı kullanılarak analiz edildi.

Tablo 3. 2 Çalışmada kullanılan antikorların listesi

Antikor Adı	Klon	Florokrom	Üretici Firma	Konsantrasyon
Gr-1	RB6-8C5	PE	Biolegend	1:100
F4/80	BM8	FITC	Biolegend	1:100
CD11b	M170	APC-Cy7	Biolegend	1:100
CD3	17A2	BV421	Sony	1:100
CD4	RM4-5	FITC	Biolegend	1:100
CD8a	53-6.7	PE	Biolegend	1:100
CD62L	MEL-14	APC	Biolegend	1:100



Grafik 3.2 Kapılama stratejisi. a) Miyeloid panelin kapılama stratejisi b) Lenfoid panelin kapılama stratejisi.

2. Histopatolojik Analiz: Çıkarılan tümör, akciğer ve lenf nodları % 10'luk formalin içerisinde fikse edildi. Formalinde fikse olan tümör dokusu OCT solüsyonu içine gömüldü ve kriostat kullanılarak -30°C de 5 prn'lik kesitler alındı. Daha sonra % 60, 70, 80 ve 90'lık alkol serisinden ve methanolden geçirilerek dehidrate edildi. Sonrasında tümör dokuları Hematoksilen Eozin ile boyama yapıldı ve histopatolojik olarak primer tümördeki nekroz durumu ışık mikroskobu ile değerlendirildi.

3. Sars Cov-2 IgG ELISA: Birinci, 11. ve 22. günlerde kuyruk venlerinden hayvanlardan kan alındı ve bu kanlardan 2000rpm santrifüjle serum elde edildi. Seyreltilmiş örnekleri ve kontrolü 96 kuyucuklu plakalara eklendi. Seyreltilmiş HRP işaretli IgG eklendi. Plakayı yıkandı ve diğer kolorimetrik HRP substratı eklendi. Seyreltilmiş asit ekleyerek substrat reaksiyonunu durduruldu ve istatistiksel analiz öncesinde arka plan gürültüsünü ortadan kaldırmak için absorbans (OD), 450 nm'deki değerin 630 nm'deki değerden çıkarıldı. OD Değeri hesaplanan standart grafiğe göre hesaplandı ve bağlanan antikor miktarı bulundu.

3.3 İstatistiksel Analizler

Elde edilen verilerin değerlendirilmesi için GraphPad Prism (V.08) programı ile Kruskal-Wallis testi, Mann-Whitney testi ve Two-Way ANOVA testleri yapıldı. Veriler; %95 güven düzeyinde incelenerek, $p < 0.05$ 'ten olduğunda istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4.BULGULAR

4.1 Hayvan Ağırlıklarının Karşılaştırılması

Çalışmaya toplam BALB/c türü 25 deney hayvanı alındı. Hayvanlar tümör inokülasyon gününden başlayarak iki günde bir elektronik terazi yardımı ile tartıldı (**Tablo 4.1 ve Tablo 4.2**)(**Grafik 4.1**).

Deney süresince bazı günlerde hayvan ağırlıklarına yönelik ikili grup analizinde gruplar arası istatistiksel anlamlı fark görülse de deney sonunda ikili grup analizinde gruplar arasında anlamlı fark görülmedi [Two-way ANOVA (Tukey) testi] (**Tablo 4.3, Tablo 4.4**).

Tablo 4.1 Deney başlangıcında hayvanların gruplara göre ortalama ağırlıkları ve standart sapmaları

Hayvan Grupları	Ortalama Hayvan Ağırlıkları(gr)	Standart Sapma (\pm)
K	21,133	$\pm 0,907$
T + SF	21,867	$\pm 1,108$
T + SV	21,683	$\pm 1,312$
T + B	23,000	$\pm 0,890$

K - Kontrol Grubu (tümörsüz ve uygulamasız)

T + SF - Tümör + Serum Fizyolojik Grubu

T + SV – Tümör + Sinovac- CoronaVac Grubu

T + B - Tümör + Pfizer-BioNTech Grubu

Tablo 4.2 Hayvan gruplarının deney günlerine göre ortalama ağırlıkları ve standart sapmalarını

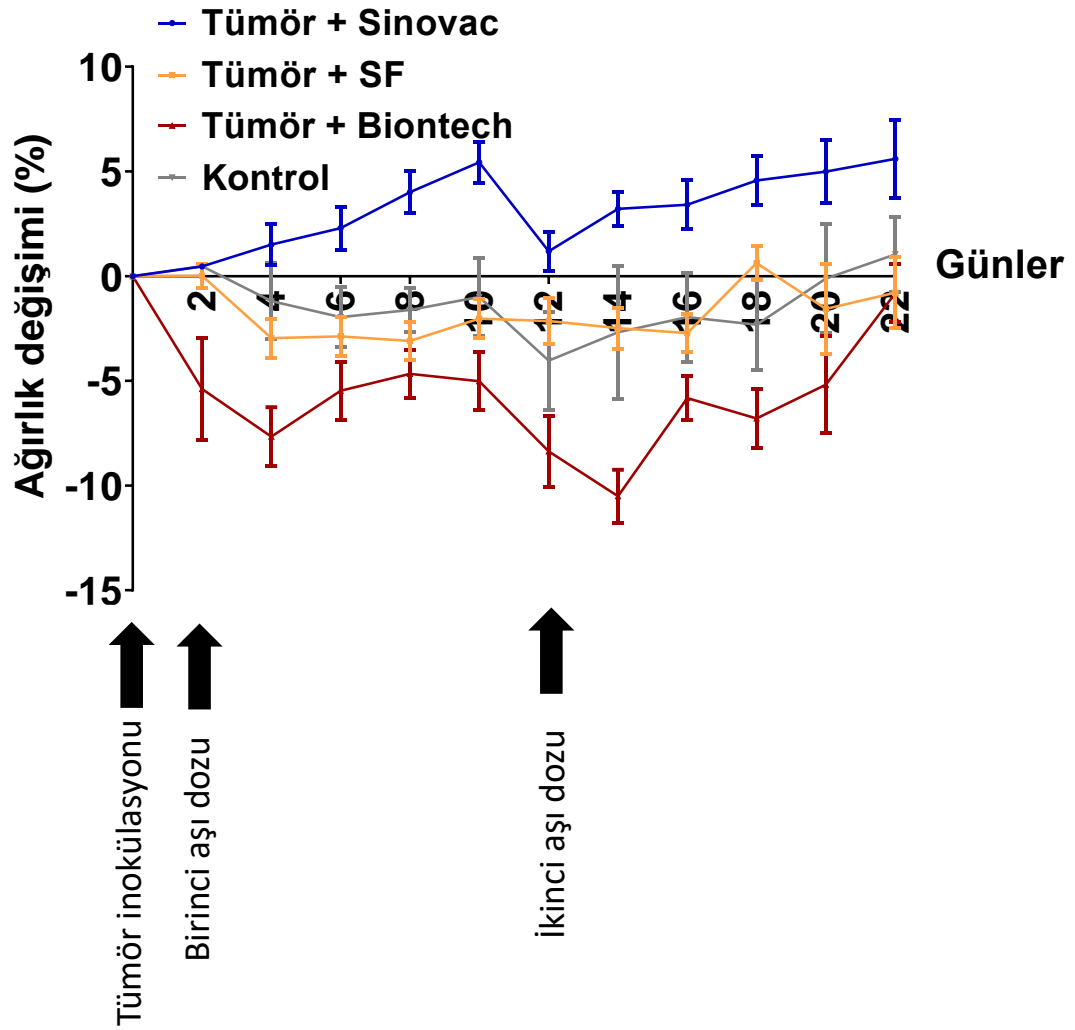
Grup	0. Gün	4. Gün	6. Gün	8. Gün	10. Gün	12. Gün	14. Gün	16. Gün	18. Gün	20. Gün	22. Gün
K	21,133	20,900	20,733	20,800	20,933	20,300	20,800	20,733	20,667	21,133	21,333
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	0,907	1,539	1,387	1,212	1,405	1,652	1,682	1,504	1,665	1,815	1,450
SF+T	21,867	20,789	20,800	20,767	20,989	21,067	20,889	20,844	21,567	21,078	21,289
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	1,108	1,003	0,847	1,130	1,040	0,568	0,974	1,089	1,201	1,402	1,087
SV+T	21,683	22,000	22,333	22,533	22,867	21,933	22,367	22,400	22,650	22,733	22,867
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	1,312	1,208	1,203	1,058	1,528	1,252	1,136	1,004	0,983	0,864	1,063
B+T	22,871	21,629	21,114	21,614	21,800	21,714	20,457	21,529	21,314	21,671	22,671
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	0,502	1,352	0,890	0,845	0,716	0,662	0,465	0,304	0,871	1,195	0,475

K - Kontrol Grubu (tümörsüz ve uygulamasız)

T + SF - Tümör + Serum Fizyolojik grubu

T + SV - Tümör + Sinovac- CoronaVac Grubu

T + B-Tümör + Pfizer-BioNTech Grubu



Grafik 4.1 Gruplara göre ortalama hayvan ağırlıklarının deney günlerine göre değişimi

K - Kontrol grubu (tümörsüz ve uygulamasız)

T + SF - Tümör + Serum Fizyolojik grubu

T + SV - Tümör + Sinovac- CoronaVac grubu

T + B - Tümör + Pfizer-BioNTech grubu

Tablo 4.3 Hayvan ağırlıklarının deney günlerine göre ikili grup analizi p değerleri

Grup	4.gün	6.gün	8.gün	10.gün	12.gün	14.gün	16.gün	18.gün	20.gün	22.gün
	*	*	**	***		**	**			
SV vs SF	0,0257	0,013	0,0012	0,0007	0,1496	0,0034	0,009	0,0826	0,1055	0,1034
	**	**	***	***	**	****	***	***	*	
SV vs B	0,0013	0,0044	0,0008	0,0005	0,0034	0,0001	0,0006	0,0004	0,0183	0,0823
			*							
SV vs K	0,6134	0,21	0,0372	0,1513	0,3497	0,4495	0,286	0,1801	0,4454	0,37
					*	**		**		
SF vs B	0,0721	0,4318	0,7167	0,334	0,0451	0,0015	0,159	0,005	0,6665	>0,9999
SF vs K	0,8252	0,9442	0,7286	0,9565	0,8791	>0,9999	0,9853	0,6433	0,9715	0,8751
B vs K	0,1344	0,3708	0,2993	0,4168	0,5122	0,2971	0,4771	0,4232	0,5236	0,8439

K - Kontrol Grubu (tümörsüz ve uygulamasız)

T + SF - Tümör + Serum Fizyolojik grubu

T + SV - Tümör + Sinovac- CoronaVac Grubu

T + B - Tümör + Pfizer-BioNTech Grubu.

İstatistiksel anlamlılık $p \leq 0.05$ *; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0,001$; **** $P \leq 0,0001$ olarak gösterildi

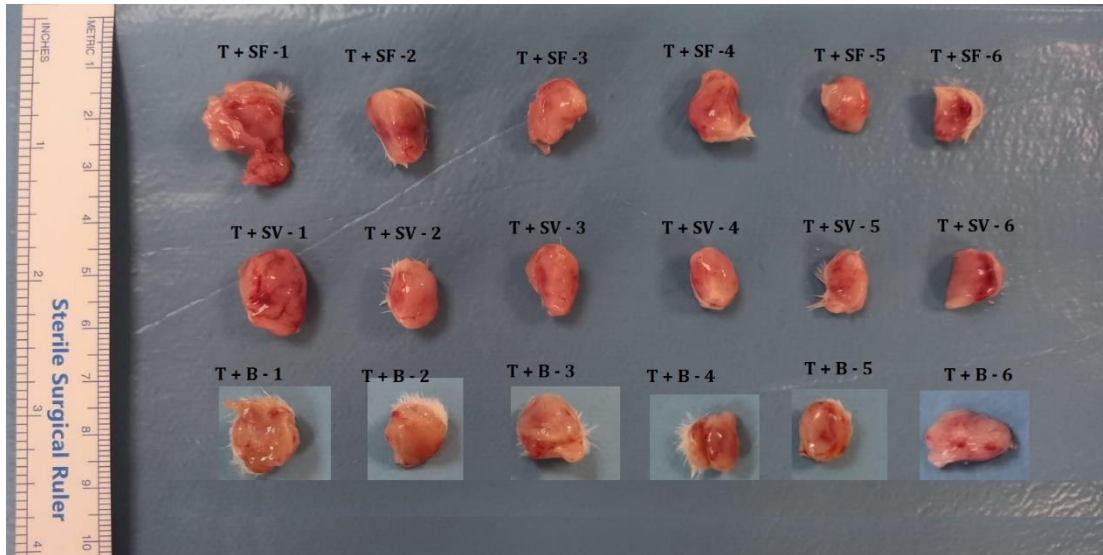
Tablo 4.4 Deney sonunda hayvan gruplarının ortalama ağırlıklarının ikili grup analizi ve P değeri

Gruplar	Anlamlılık	P değeri
Tümör + Sinovac- CoronaVac vs. Tümör + SF	Ns	0.1034
Tümör + Sinovac- CoronaVac vs. Tümör + BioNTech	Ns	0.0823
Tümör + Sinovac- CoronaVac vs. Kontrol	Ns	0.37
Tümör + SF vs. Tümör + BioNTech	Ns	>0.9999
Tümör + SF vs. Kontrol	Ns	0.8751
Tümör + BioNTech vs. Kontrol	Ns	0.8439

Ns- İstatistiksel anlamlılık yok

4.2 Tümör Boyutuna Göre Grupların Karşılaştırılması

Hayvan gruplarında tümör oluşumu ortalama altıncı günde başladı. Tümör dokuları son günde manuel kumpasla ölçüldükten sonra disseke edilerek çıkartıldı (Şekil 4.1). Deney süresinde tümör dokuları büyüme eğiliminde oldu (Grafik 4.2). Tümör boyutuna yönelik yapılan istatistiksel testlerde anlamlı fark görülmedi (Tablo 4.5),(Tablo 4.6).

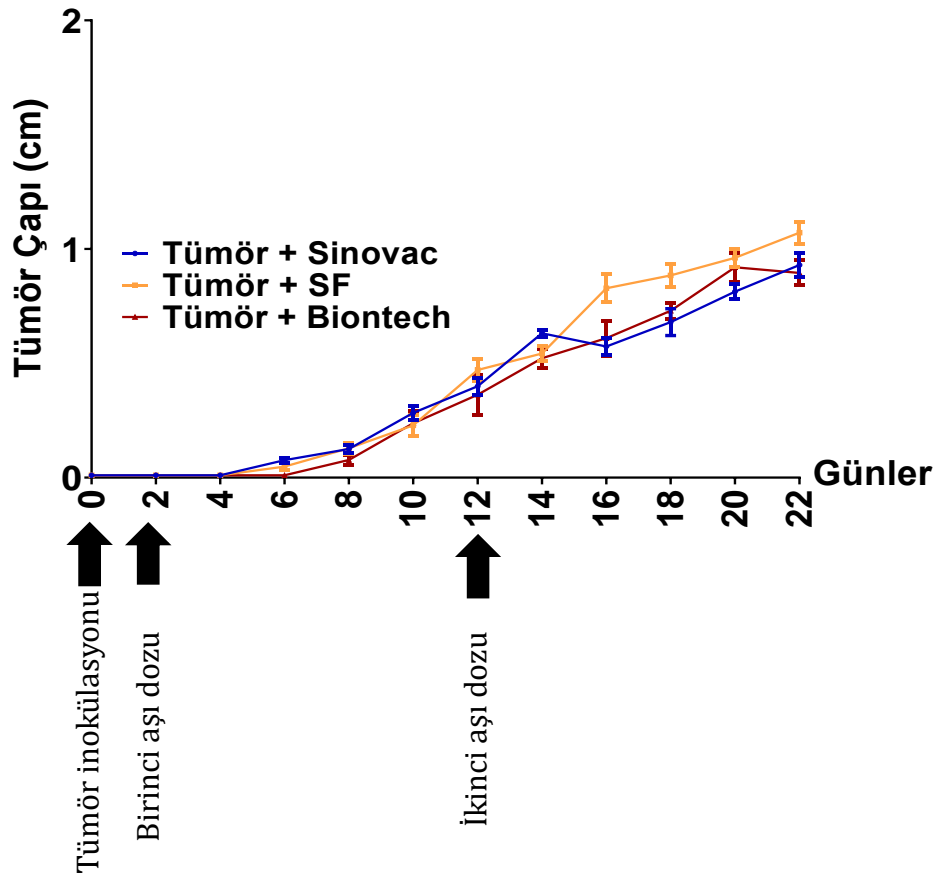


Şekil 4.1 Deney sonunda diseke edilerek çıkarılan tümör dokuları:

T + SF – Tümör + Serum Fizyolojik n=6,

T + SV – Tümör + Sinovac- CoronaVac n=6

T + B – Tümör + Pfizer – BioNTech n=6



Grafik 4.2 Hayvan gruplarının ortalama tümör boyutlarının deney günlerine göre değişimi.

SV- Tümör + Sinovac- CoronaVac grubu n=6,

SF- Tümör + Serum Fizyolojik grubu n=6,

B - Tümör + Pfizer –BioNTech grubu n=6

Tablo 4.5 Tümör boyutlarının deney günlerine göre ikili grup analizlerinin P değerleri

Grup	6.gün	8.gün	10.gün	12.gün	14.gün	16.gün	18.gün	20.gün	22.gün
SV vs SF	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	0,0133**	Ns	0,0344*	0,1731
SV vs B	0,0034**	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	0,8937
SF vs B	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	0,103

SF- Tümör + Serum Fizyolojik grubu n=6,
SV- Tümör + Sinovac- CoronaVac grubu n=6,
B - Tümör + Pfizer –BioNTech grubu n=6

İstatistiksel anlamlılık $p \leq 0.05$ *; ** $p \leq 0.01$; olarak gösterildi

Tablo 4.6 Deney sonunda hayvan gruplarının tümör boyutlarının ikili gruplar analizi ve P değerleri

Gruplar	Anlamlılık	P değeri
Tümör + Sinovac- CoronaVac vs. Tümör + SF	Ns	0,1731
Tümör + Sinovac- CoronaVac vs. Tümör + BioNTech	Ns	0,8937
Tümör + Sinovac- CoronaVac vs. Kontrol	Ns	0,103

İstatistiksel anlamlılık $p \leq 0.05$ *; ** $p \leq 0.01$; olarak gösterildi

4.2 Fare Anti – SARS – CoV (N) IgG ELISA Sonuçlarının Karşılaştırılması

Hayvanlardan üç farklı zamanda [tümör inokülasyonundan bir gün sonra (birinci gün), 11. Günde ve sakrefikasyon günü(22. Gün)] alınan kan örnekleri ELISA çalışılarak değerlendirildi. Sinovac- CoronaVac aşısı 2. dozdan sonra ve Pfizer- BioNTech aşısı ilk dozdan sonra yeteri kadar antikor oluşturdu (**Tablo 4.7a, Tablo 4.7b**).

Grupların birinci, 11. ve 22. gün sonuçları karşılaştırdığında; Sinovac- CoronaVac birinci gün sonuçları ile Sinovac- CoronaVac 22. gün sonuçları arasında ($P<0,0001$) ve Sinovac- CoronaVac 11. gün sonuçları ile 22. gün sonucu arasında ($P<0,0001$) anlamlı fark görüldü (Two-Way ANOVA testi) (**Grafik 4.3a**)

Pfizer-BioNTech grubunun birinci gün sonuçları ile 11. gün sonuçları arasında ($P<0,0001$) ve birinci gün sonuçları ile 22. gün sonuçları arasında ($P<0,0001$) anlamlı fark görüldü (Two-Way ANOVA testi) (**Grafik 4.3a**).

22. günde 2019-nCov (N) protein üretim düzeyinin ikili grup analizinde Sinovac- CoronaVac grubu ile Kontrol grubu arasında (0,0238), Sinovac- CoronaVac grubu ile Serum Fizyolojik grubu arasında ($P=0,0007$), Pfizer-BioNTech grubu ile Kontrol grubu arasında ($P<0,0055$), Pfizer- BioNTech grubu ile Serum Fizyolojik grubu arasında ($P<0,0001$) ve Pfizer – BioNTech grubu ile Sinovac- CoronaVac grubu arasında ($P<0,0071$) anlamlı fark görüldü (Mann-Whitney U testi) (**Grafik4.3b**).

Tablo 4.7a Hayvanlardan alınan kan örneklerinin dizilimi.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	S0	K1-1	K3-3	SF3-2	SF6-1	SV2-3	SV5-2	B2-1	B4-3
B	S1	K1-2	SF1-1	SF3-2	SF6-2	SV3-1	SV5-3	B2-2	B5-1
C	S2	K1-3	SF1-2	SF4-1	SF6-3	SV3-2	SV6-1	B2-3	B5-2
D	S3	K2-1	SF1-3	SF4-2	SV1-1	SV3-3	SV6-2	B3-1	B5-3
E	S4	K2-2	SF2-1	SF4-3	SV1-2	SV4-1	SV6-3	B3-2	B6-1
F	S5	K2-3	SF2-2	SF5-1	SV1-3	SV4-2	B1-1	B3-3	B6-2
G	S6	K3-1	SF2-3	SF5-2	SV2-1	SV4-3	B1-2	B4-1	B6-3
H	Blank	K3-2	SF3-1	SF5-3	SV2-2	SV5-1	B1-3	B4-2	

K - kontrol (tümörsüz ve uygulamasız) n=3

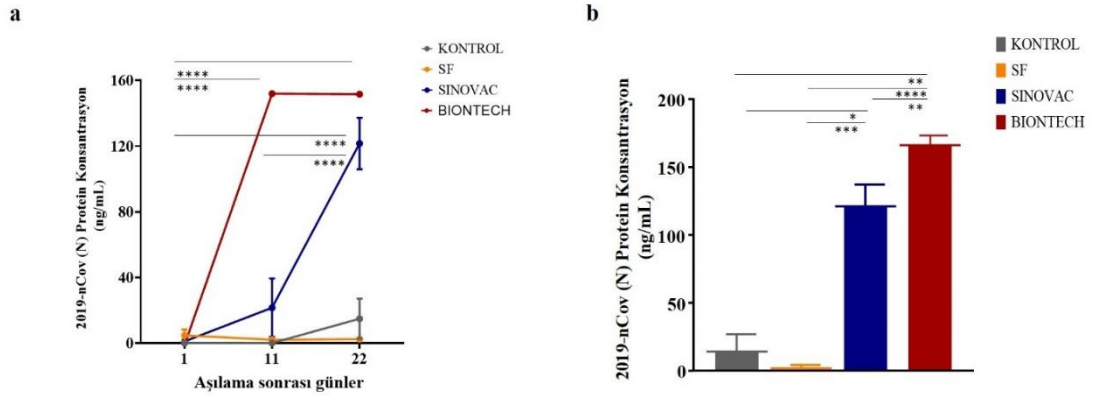
SV- Tümör + Sinovac- CoronaVac grubu n=6,

SF - Tümör + Serum Fizyolojik grubu n=6

B - Tümör + Pfizer –BioNTech grubu n=6

Tablo 4.7b Hayvanlardan alınan kan örneklerinin ELISA sonuçları

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	0.071	0.119	0.142	0.360	0.123	3.416	0.186	0.093	3.526
B	2.326	0.114	0.128	0.148	0.113	0.153	2.580	3.493	0.105
C	1.379	0.061	0.281	0.117	0.119	0.061	0.130	3.504	3.536
D	0.770	0.113	0.138	0.112	0.112	1.538	0.140	0.082	3.524
E	0.415	0.113	0.116	0.126	2.135	0.111	2.150	3.547	0.057
F	0.234	0.120	0.119	0.125	2.709	0.153	0.075	3.474	3.497
G	0.165	0.185	0.132	0.399	0.134	1.663	3.507	0.057	3.502
H	0.065	0.145	0.183	0.184	0.347	0.146	3.481	3.487	



Grafik 4.3 2019-nCov (N) protein üretim düzeyi.

a) Aşılama sonrası belirlenen günlerde (birinci, 11., 22. günler) toplanan serum örneklerinde 2019-nCov (N) protein üretim düzeyi

b) Aşılama sonrası 22. günde 2019-nCov (N) protein üretim düzeyi.

Kontrol (tümörsüz ve uygulamasız) grubu n=3,

Tümör + Serum Fizyolojik grubu n=6,

Tümör + Sinovac- CoronaVac grubu n=6,

Tümör + Pfizer-BioNTech grubu n=6

4.4 Hayati Organlarda (Akciğer) Hematoksilen ve Eozin (H&E) Boyama Sonuçlarının Karşılaştırılması.

Deney sonunda hayvanların akciğer dokuları diseke edilerek çıkarıldı (Şekil 4.2).



Şekil 4.2 Deney sonunda hayvanlardan diseke edilerek çıkarılan akciğer dokuları:

K – Kontrol (tümörsüz ve uygulamasız),

SF- Tümör + Serum Fizyolojik grubu n=6,

SV- Tümör + Sinovac- CoronaVac grubu n=6,

B - Tümör + Pfizer –BioNTech grubu n=6

Akciğer dokularının yarısı tümör metastazı açısından değerlendirilmek üzere H&E ile boyandı. H&E ile boyanmış örneklerin optik mikroskopta görüntüleme sonuçlarına göre tümör enjekte edilen her hayvan grubunda birer hayvanda birer adet akciğer metastazı görüldü. SF+T grubunda hayvanların bir tanesinin (1/6) akciğerinde bir mm boyutunda bir adet metastatik lezyon görüldü. SV+T grubunda hayvanların bir tanesinin (1/6) akciğerinde 0,25 mm boyutunda bir adet metastatik lezyon görüldü. B+T grubunda hayvanların bir tanesinde (1/6) bir mm boyutunda bir adet metastatik lezyon görüldü (Tablo 4.8),(Şekil 4.3).

Tablo 4.8 Hayati organlara (akciğer) metastaz

Hayvan Numarası	T + SF	T + B	T + SV
1.	-	-	-
2.	-	-	-
3.	-	+ (1mm)	-
4.	-	-	-
5.	+ (1mm)	-	+(0,25mm)
6.	-	-	-

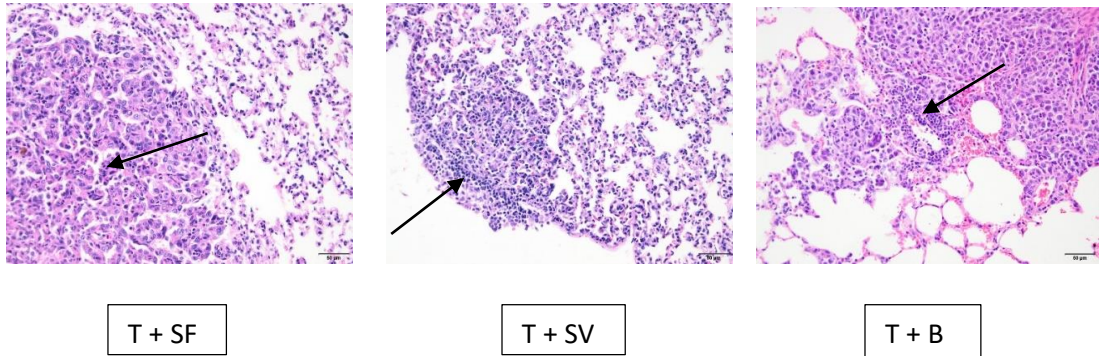
T + SF: Tümör + Serum Fizyolojik n=6

T + B: Tümör + Pfizer-BioNTech n=6

T + SV: Tümör + Sinovac- CoronaVac n=6

(Metastatik lezyonların boyutu parantez içerisinde gösterilmiştir.)

Akciğerlerde metastatik lezyonların varlığı ve ya yokluğu sırasıyla + ve ya – olarak gösterilmiştir.



Şekil 4.3 Hayvan gruplarının akciğer metastazlarının H&E boyanmasının optik mikroskopik görünümü(Ok işareti metastazı göstermektedir).

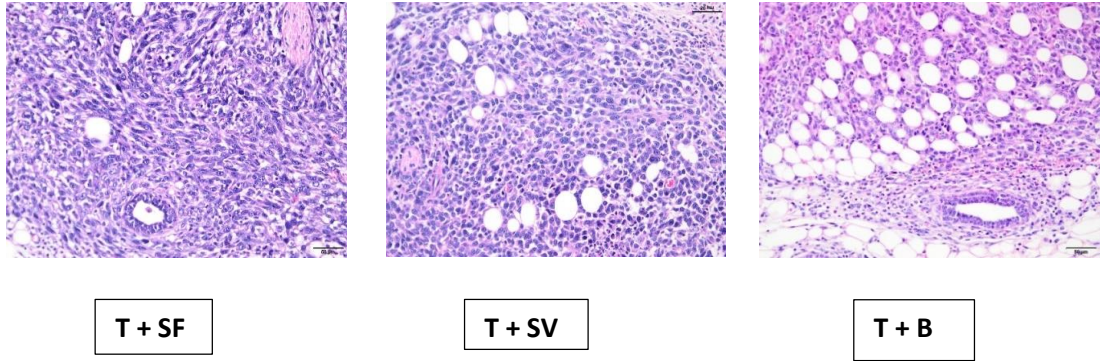
T + SF –Tümör + Serum Fizyolojik

T + SV – Tümör + Sinovac- CoronaVac

T + B – Tümör + Pfizer – BioNTech

4.5 Diseke Edilen Tumorlerin H&E Boyama Sonuçlarının Karşılaştırılması.

Tümör dokularının yarısı nekroz açısından değerlendirilmesi amacıyla H&E ile boyandı (Şekil 4.4), (Şekil 4.5). Hayvanlar arasında tümörlerdeki nekroz oranları farklılık gösterdi (Tablo 4.9). Gruplar arası yapılan testte (Kruskal-Wallis testi) ve ikili grup analizlerinde (Mann-Whitney testi) anlamlı fark görülmedi (Grafik 4). Grupların nekroz oranları ortalama %20 olarak değerlendirildi.

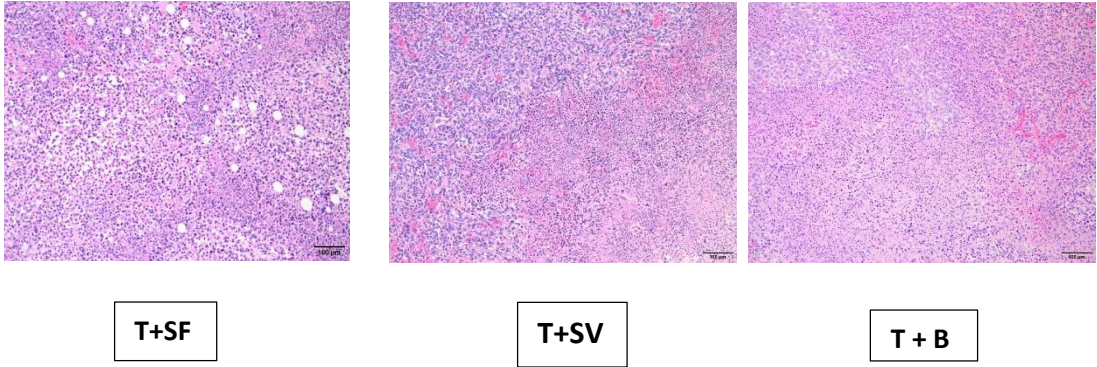


Şekil 4.4 Deney sonunda hayvanların primer meme dokularının H&E boyanması:

T + SF –Tümör + Serum Fizyolojik,

T + SV – Tümör + Sinovac- CoronaVac

T + B – Tümör + Pfizer – BioNTech



Şekil 4.5 Hayvan gruplarında tümör dokusunun optik mikroskopik görünümü.

T+ SF – Tümör + Serum Fizyolojik 5 numaralı hayvan nekroz oranı %20 akciğer metastaz (+)

T + SV – Tümör + Sinovac- CoronaVac 5 numaralı hayvan nekroz oranı %20 akciğer metastazı (-)

T+ B – Tümör + Pfizer- BioNTech 5 numaralı hayvan nekroz oranı %20 akciğer metastazı (+)

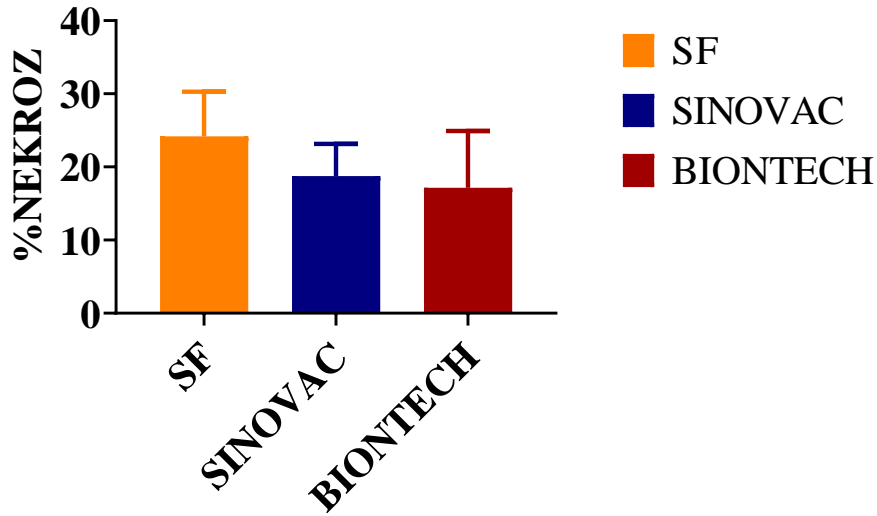
Tablo 4.9 Tümör dokularındaki nekroz oranları.

Hayvan Numarası	T + SF	T + B	T + SV
1.	%30	%10	%10
2.	%20	%40	%0
3.	%20	%0	%20
4.	%50	%0	%40
5.	%20	%20	%20
6.	%5	%50	%30

T + SF –Tümör + Serum Fizyolojik n=6

T + SV – Tümör + Sinovac- CoronaVac n=6

T + B – Tümör + Pfizer – BioNTech n=6

**Grafik 4.4** Tümör dokusunda nekroz oranının dağılımı

T + SF –Tümör + Serum Fizyolojik n=6

T + SV – Tümör + Sinovac- CoronaVac n=6

T + B – Tümör + Pfizer – BioNTech n=6

4.6 Lenf Nodlarından İzole Edilen Lenfoid Seri Hücrelerinin Akım Sitometri Sonuçlarının Karşılaştırılması

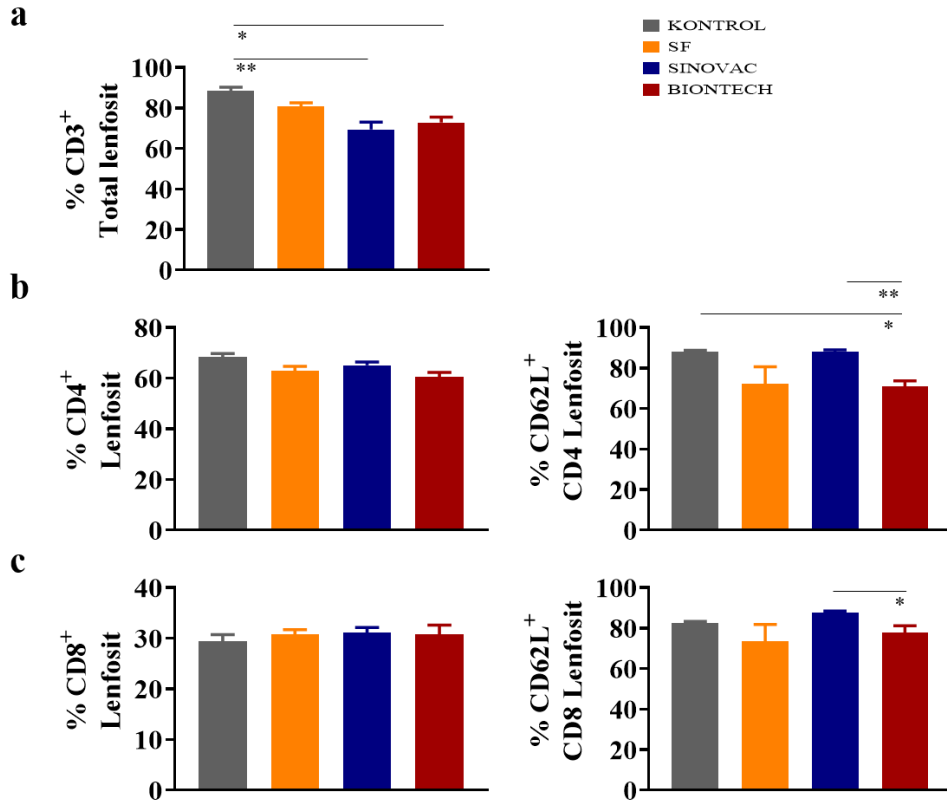
Lenf nodlarındaki CD3⁺ (total lenfosit) lenfoid seri hücrelerinin Akım Sitometri sonuçlarına göre yapılan analizlerde; gruplar arası testte K grubu ile SV grubu (P=0,0058) ve K grubu ile B grubu arasında (P=0,0265,) anlamlı fark bulundu (Kruskal-Wallis testi) (**Grafik 4.5 a**).

Akım Sitometri sonuçlarına göre CD4⁺ lenfosit yüzdesine yönelik yapılan gruplar arası teste (Kruskal-Wallis testi) ve ikili grup analizinde (Mann-Whitney testi) anlamlı fark görülmedi (**Grafik 4.5 b**).

Akım Sitometri sonuçlarına göre CD62L⁺ CD4 lenfosit yüzdesi gruplar arası teste K grubu ile B grubu arasında (P= 0,0371) ve S grubu ile B grubu (P=0,0064) arasında anlamlı fark bulundu (Kruskal Wallis testi) (**Grafik 4.5b**).

Akım Sitometri sonuçlarına göre CD8⁺ lenfosit yüzdesine yönelik yapılan gruplar arası teste (Kruskal-Wallis testi) ve ikili grup analizinde (Mann-Whitney testi) anlamlı fark görülmedi (**Grafik 4.5 c**).

Akım Sitometri sonuçlarına göre CD62L⁺CD8 yüzdesine yönelik yapılan ikili grup analizinde S grubu ile B grubu arasında anlamlı fark bulundu (P=0,0140) (Mann-Whitney testi) (**Grafik 4.5 c**).



Grafik 4.5 Lenf nodundan izole edilen lenfosit popülasyonlarının dağılımı.

a) CD3⁺ Total lenfosit yüzdesi

b) CD4⁺ T hücre yüzdesi ve CD62L⁺ CD4 T hücre yüzdesi

c) CD8⁺ sitotoksik T hücre yüzdesi ve CD62L⁺ CD8 sitotoksik T hücre yüzdesi.

Kontrol (tümörsüz ve uygulamasız) grubu n=3

Tümör + Serum Fizyolojik grubu n=6

Tümör + Sinovac- CoronaVac grubu n=6

Tümör + BioNTech grubu n=6

4.7 Tümör ve Akciğere Dokularındaki Miyeloid Hücre Popülasyonlarının Akım Sitometri Sonuçlarının Karşılaştırılması

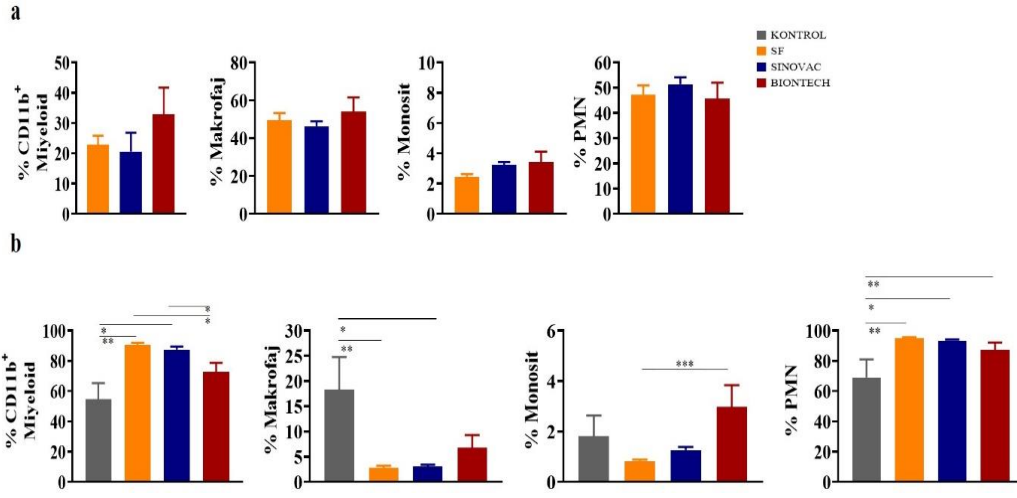
Tümör dokusundaki miyeloid seri hücrelerine yönelik yapılan Akım Sitometri analizinde total miyeloid hücre oranı (%CD11b⁺ Miyeloid), makrofaj, monosit ve PMN oranı gruplar arası yapılan testte (Kruskal-Wallis testi) ve ikili grup analizinde (Mann-Whitney testi) istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi (**Grafik 4.6 a**).

Akciğer dokusundaki Akım Sitometri analizinde total miyeloid hücre oranı (%CD11b⁺ Miyeloid) iki grup analizinde SF grubu ve K grubu arasında (P=0,0091), SV grubu ve K grubu arasında (P=0,238), SF grubu ile B grubu arasında (P=0,0031) ve SV grubu ile B grubu arasında (P=0,0385) anlamlı fark olduğu görüldü (Mann-Whitney testi) (**Grafik 4.6b**).

Akciğer dokularında miyeloid serilerden makrofaj oranlarına bakıldığında iki grup analizinde K grubu ile SF grubu arasında (P=0,0091) ve SV grubu ile K grubu arasında (P=0,0238) anlamlı fark olduğu görüldü (Mann-Whitney testi) (**Grafik 4.6 b**).

Akciğerlerde miyeloid serilerden monositlerin oranı ikili grup analizinde B grubu ve SF grubu arasında (P=0,0003) anlamlı fark olduğu görüldü (Mann-Whitney testi) (**Grafik 4.6 b**).

PMN oranlarına bakıldığında tümör enjekte edilen gruplarla (SF + T, SV+T, B+T) Kontrol grubunun ikili analizinde SF grubu ile K grubu arasında (P=0,0091), SV grubu ile K grubu arasında (P=0,0238) ve B grubu ile K grubu arasında (P=0,0127) anlamlı fark olduğu görüldü (Mann-Whitney testi) (**Grafik 4.6 b**).



Grafik 4.6 Tümör ve akciğer dokularındaki miyeloid hücre popülasyonlarının dağılımı.

a) Tümöre infiltrate olmuş total miyeloid, makrofaj, monosit ve PMN hücrelerinin yüzdesi

b) Akciğere infiltrate olmuş total miyeloid, makrofaj, monosit ve PMN hücrelerinin yüzdesi

Kontrol (tümörsüz ve uygulamasız) grubu n=3,

Tümör + Serum Fizyolojik grubu n=6,

Tümör + Sinovac- CoronaVac grubu n=6,

Tümör + Pfizer-BioNTech grubu n=6

5.TARTIŞMA

COVID -19 pandemisi ile mücadelede en etkin yol aşılama olarak kabul edilir. Bu pandemi döneminde kanser hastalarının ve kanserden iyileşen hastaların fazla olması düşünüldüğünde aşılarda tümör üzerine etkisine yönelik çalışmalara gerek görülmektedir. Literatür değerlendirildiğinde bu kapsamda yapılmış tek bir hayvan modeli çalışması bulunmuştur; yapılmış olan bu çalışmada COVID-19 aşısı 4T1 BALB/c meme kanser model çalışmasında aşılarda tümör boyutunu ve akciğer metastazı azalttığı gösterilmiştir [12]. Bizim çalışmamızda 4T1 meme kanseri BALB/c fare modelinde aşının tümör boyutu, tümörde nekroz oranı, tümörün akciğer metastazı, lenf nodlarındaki lenfoid seri hücreleri, tümör ve akciğer dokusunda miyeloid seri hücreleri üzerine etkisi araştırıldı. Sonuç olarak aşının tümör boyutu, akciğer metastazı ve immün parametreler üzerine istatistiksel anlamlı etkisi olmadığı görüldü.

Farelerde tümörün hacmini belirleyen en önemli faktör tümör enjeksiyonundan sonra geçen zaman olmuştur. BALB/c farelerinde tümörün boyutu ilk haftadan sonra artmaya başlamıştır. Tümör enjeksiyonundan sonraki üçüncü ve dördüncü haftada tümör dokusu büyüme eğiliminde olmuş ve en büyük tümörler dördüncü haftada gözlemlenmiştir [59]. AstraZeneca ve Sinopharm aşılarda yapılmış olan çalışmada iki doz aşı yapılan gruplarda tümör boyutu tek doz aşı yapılan gruplarla ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında daha düşük olmuştur [12]. Bu çalışmada tümör enjeksiyonundan sonraki birinci haftada (altıncı günde) tümörler palpe edilmeye başlandı. İkinci ve üçüncü haftalarda tüm gruplarda tümör dokuları büyüme eğiliminde oldu. Tümör dokuları deney sonunda en büyük boyutta oldu. Deney sonunda tümör boyutu ve hayvan ağırlığına yönelik yapılan istatistiksel analizlerde gruplar arasında istatistiksel anlamlı fark görülmedi.

4T1 meme kanseri BALB/c fare modeline yönelik yapılan çalışmalarda 18. ve 26. gün grupları arasında 26. gün farelerinde akciğere tümör metastazı sayısı ve boyutunun arttığı görülmüştür [61]. Yapılan çalışmalarda 4T1meme kanseri üçüncü haftadan sonra en sık akciğere metastaz yapmış ve nekroz gelişimi ile akciğer metastazı arasında bir korelasyon bulunmuştur [59]. Önceden AstraZeneca ve

Sinopharm aşıları ile yapılmış olan çalışmada tek ve iki doz aşı yapılan gruplarda 30 günün sonunda kontrol grubu ile kıyaslandığında akciğere tümör metastazı saptanmamıştır [12]. Bu çalışmada akciğer dokularının H&E boyamalarının optik mikroskopta görüntüleme sonuçlarına göre 2 doz aşı yapılan gruplarla (Tümör + Sinovac- CoronaVac, Tümör + Pfizer-BioNTech) Serum Fizyolojik yapılan grup arasında metastaz açısından anlamlı fark görülmedi. Kontrol grubu ile kıyaslandığında akciğere tümör metastazı açısından anlamlı farkın olmaması aşının tümör metastazını artırmadığını veya azaltmadığını göstermiştir.

Önceden yapılmış olan çalışmada tümör gelişiminin ilk haftasında, tümör inokülasyon bölgesinde hafif iltihap ve ödem gözlenmiş. İkinci haftada hayvanların %50'sinde tümör kütesinin yaklaşık %5'inde nekroz görülmüş. Üçüncü haftada, aşılanan hayvanların hepsinde tümör kütesinin %30 ila %40'ında koagülasyon nekrozu görülmüş. Dördüncü haftada gözlenen tümörler, yaygın koagülasyon nekrozu ve cilt ülserasyonu ile cildi ve derin dokuları istila etmişti [59]. Tümör dokusunun nekroz oranı hayvanlar arasında fark gösterse de gruplar arası ve iki grup arası yapılan istatistiksel analizlerde anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Meme kanserinde CD8⁺ T lenfositlerin oranının CD4⁺ lenfositlerden yüksek olması iyi prognosis olarak değerlendirilmektedir. 4T1 meme kanseri fare modelinde yapılan çalışmalarda CD8⁺ ve CD4⁺ lenfositlerin artışı gösterilmiştir [47]. Bu çalışmada aşı yapılan gruplarla kontrol ve Serum Fizyolojik grubu arasında CD8⁺ ve CD4⁺ hücre oranında anlamlı fark görülmemiştir.

4T1 tümörlerine yönelik yapılmış olan çalışmalarda 4T1 tümörlerinin çeşitli kemokinler üretmekle farelerde derin granülositoza neden olduğu gösterilmiştir. Yirmi ikinci gün tümörünün akış sitometri analizi CD45⁺Lökosit ortak antijeni (LCA) hücrelerin %86'sının CD11b⁺ hücre popülasyonu olduğu ve tümörden salınan sitokinlerin etkisi ile miyeloid seri hücre popülasyonları artmış olduğu gösterilmiştir [60, 62]. Bu çalışmada tümör dokusundaki Miyeloid seri hücrelerine yönelik yapılan Akım Sitometri analizinde total Miyeloid hücre oranı (CD11b⁺ Miyeloid), Makrofaj, Monosit ve PMN oranı gruplar arasında ve ikili grup analizinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir. Aşı yapılan gruplarda Miyeloid hücre serisine yönelik

yapılan akım sitometri analiz sonuçlarının istatistiksel olarak SF grubu ile anlamlı farkının olmaması aşının tümörü infiltre etmiş miyeloid hücre popülasyonlara etki etmediği göstermektedir.

4T1 meme kanseri BALB/c fare modeline yönelik yapılan çalışmalarda kanser hücrelerinden salınan sitokin ve kemokinlerin lökomoid reaksiyona neden olarak kanda miyeloid seri hücrelerini artırdığı ve Gr-1⁺ granüositlerin akciğer dokusuna önemli bir şekilde sızdığı görülmüştür [60, 63] Yapılan çalışmalarda bu hücreler kontrol farelerinde CD45⁺ hücrelerinin <%20'sini oluşturmuş ve tümör taşıyan farelerde Gr1⁺ hücreleri tümör naklinden 29 gün sonra CD45⁺ hücrelerinin >%60'ı oluşturmuştur. T ve B lenfositleri normal farelerde CD45⁺ akciğer hücrelerinin %50'sini oluşturmuş ancak tümör taşıyan farelerde bu sayılar <%15'e düşmüştür [60, 62]. Bu çalışmada akciğer dokusunda miyeloid hücrelere yönelik yapılan Akım Sitometri analizine göre miyeloid seri hücrelerinin oranı tümör enjekte edilen gruplarda kontrol grubu ile kıyaslandığında daha yüksektir. Bu veriler metastatik 4T1 tümör odaklarına sahip karaciğer ve akciğerlerin çok sayıda olgunlaşmamış granüosit ile infiltre olduğunu göstermektedir.

Çalışmamızın üç kısıtlılığı mevcuttur. Deney süresi 4T1 fare modellerinin yaşam sürelerinden dolayı 23 günle kısıtlı tutulmuştur. 4T1 BALB/c meme kanseri modelinde akciğer metastazı ve tümör nekroz oranını belirleyen tümör inokülasyonundan sonra geçen zamandır. Deney süresi daha uzun tutulsa idi hayvanlarda daha fazla akciğer metastazı bulunabilirliği ve tümörde daha fazla nekrotik alan görülebilirliği soru işareti olarak kalmıştır. Hayvanların çıkarılan akciğer dokularının yarısı akım sitometri analizi için kullanıldı ve histopatolojik değerlendirme için kullanılan akciğer dokusundan bir adet kesit alınarak metastaz açısından incelendi. Akciğer dokusunun tümünden daha fazla kesit alınması durumunda daha fazla sayıda akciğer metastaz bulunabilme ihtimali de kısıtlılıklardan kısıtlılık olarak karşımıza çıkmıştır. COVID-19 aşılı insanlarda deltoid kasa enjekte edilmiştir bizim çalışmamızda farelerin sırtına subkutan olarak enjekte edildi. Bu bir kısıtlılık olarak düşünülmektedir.

6.SONUÇ

Bu çalışmada BALB/c farelerde 4T1 hücreleri ile oluşturulan meme kanseri modelinde COVID-19 pandemisinde kullanılan inaktif ve mRNA aşlarının tümör boyutu, akciğer metastazı ve immün parametrelere istatistiksel olarak anlamlı etkisi saptanmamıştır.

KAYNAKLAR

1. Rucinska M, Nawrocki S. COVID-19 Pandemic: Impact on Cancer Patients. *Int J Environ Res Public Health*. 2022;19(19). Epub 20220930. doi: 10.3390/ijerph191912470. PubMed PMID: 36231769; PubMed Central PMCID: PMC9564768.
2. Lurie N, Sharfstein JM, Goodman JL. The Development of COVID-19 Vaccines: Safeguards Needed. *Jama*. 2020;324(5):439-40. doi: 10.1001/jama.2020.12461. PubMed PMID: 32749496.
3. Xu Y, Li L, Li X, Li H, Song Y, Liu Y, et al. COVID-19 vaccination status, side effects, and perceptions among breast cancer survivors: a cross-sectional study in China. *Front Public Health*. 2023;11:1119163. Epub 20230417. doi: 10.3389/fpubh.2023.1119163. PubMed PMID: 37139378; PubMed Central PMCID: PMC10150050.
4. Jackson CB, Farzan M, Chen B, Choe H. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2022;23(1):3-20. Epub 20211005. doi: 10.1038/s41580-021-00418-x. PubMed PMID: 34611326; PubMed Central PMCID: PMC8491763.
5. Wang MY, Zhao R, Gao LJ, Gao XF, Wang DP, Cao JM. SARS-CoV-2: Structure, Biology, and Structure-Based Therapeutics Development. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020;10:587269. Epub 20201125. doi: 10.3389/fcimb.2020.587269. PubMed PMID: 33324574; PubMed Central PMCID: PMC7723891.
6. Hintistan S, Demirag H. COVID-19 vaccine and immune response. *Exploration of Immunology*. 2021;1(5):341-55. doi: 10.37349/ei.2021.00023.
7. Wang S, Li L, Yan F, Gao Y, Yang S, Xia X. COVID-19 Animal Models and Vaccines: Current Landscape and Future Prospects. *Vaccines (Basel)*. 2021;9(10). Epub 20210926. doi: 10.3390/vaccines9101082. PubMed PMID: 34696190; PubMed Central PMCID: PMC8537799.
8. Hadj Hassine I. Covid-19 vaccines and variants of concern: A review. *Rev Med Virol*. 2022;32(4):e2313. Epub 20211109. doi: 10.1002/rmv.2313. PubMed PMID: 34755408; PubMed Central PMCID: PMC8646685.

9. Yesudhas D, Srivastava A, Gromiha MM. COVID-19 outbreak: history, mechanism, transmission, structural studies and therapeutics. *Infection*. 2021;49(2):199-213. Epub 20200904. doi: 10.1007/s15010-020-01516-2. PubMed PMID: 32886331; PubMed Central PMCID: PMC7472674.
10. Belouzard S, Chu VC, Whittaker GR. Activation of the SARS coronavirus spike protein via sequential proteolytic cleavage at two distinct sites. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(14):5871-6. Epub 20090324. doi: 10.1073/pnas.0809524106. PubMed PMID: 19321428; PubMed Central PMCID: PMC2660061.
11. Magro C, Mulvey JJ, Berlin D, Nuovo G, Salvatore S, Harp J, et al. Complement associated microvascular injury and thrombosis in the pathogenesis of severe COVID-19 infection: A report of five cases. *Transl Res*. 2020;220:1-13. Epub 20200415. doi: 10.1016/j.trsl.2020.04.007. PubMed PMID: 32299776; PubMed Central PMCID: PMC7158248.
12. Deldadeh N, Haghghat S, Omidi Z, Sarrami-Foroushani R, Ansari AM, Sanati H, et al. Anti-cancer effect of COVID-19 vaccines in mice models. *Life Sci*. 2023;325:121569. Epub 20230311. doi: 10.1016/j.lfs.2023.121569. PubMed PMID: 36907328; PubMed Central PMCID: PMC10007716.
13. Mirtaleb MS, Falak R, Heshmatnia J, Bakhshandeh B, Taheri RA, Soleimanjahi H, et al. An insight overview on COVID-19 mRNA vaccines: Advantageous, pharmacology, mechanism of action, and prospective considerations. *Int Immunopharmacol*. 2023;117:109934. Epub 20230227. doi: 10.1016/j.intimp.2023.109934. PubMed PMID: 36867924; PubMed Central PMCID: PMC9968612.
14. Xie NN, Zhang WC, Chen J, Tian FB, Song JX. Clinical Characteristics, Diagnosis, and Therapeutics of COVID-19: A Review. *Curr Med Sci*. 2023;43(6):1066-74. Epub 20231014. doi: 10.1007/s11596-023-2797-3. PubMed PMID: 37837572.
15. Umeh C, Watanabe K, Tuscher L, Ranchithan S, Gupta R. Comparison of Clinical Characteristics and Outcomes of COVID-19 Between Young and Older Patients: A Multicenter, Retrospective Cohort Study. *Cureus*. 2022;14(1):e21785.

Epub 20220131. doi: 10.7759/cureus.21785. PubMed PMID: 35251855; PubMed Central PMCID: PMCPMC8890849.

16. Chohan HK, Jamal A, Mubeen M, Khan MU, Junaid M, Chohan MK, et al. The Common Systemic and Local Adverse Effects of the Sinovac COVID-19 Vaccine: An Observational Study From Pakistan. *Cureus*. 2023;15(5):e38564. Epub 20230504. doi: 10.7759/cureus.38564. PubMed PMID: 37284387; PubMed Central PMCID: PMCPMC10239542.

17. Abufares HI, Oyoun Alsoud L, Alqudah MAY, Shara M, Soares NC, Alzoubi KH, et al. COVID-19 Vaccines, Effectiveness, and Immune Responses. *Int J Mol Sci*. 2022;23(23). Epub 20221206. doi: 10.3390/ijms232315415. PubMed PMID: 36499742; PubMed Central PMCID: PMCPMC9737588.

18. Han X, Xu P, Ye Q. Analysis of COVID-19 vaccines: Types, thoughts, and application. *J Clin Lab Anal*. 2021;35(9):e23937. Epub 20210815. doi: 10.1002/jcla.23937. PubMed PMID: 34396586; PubMed Central PMCID: PMCPMC8418485.

19. Kleebayoon A, Wiwanitkit V. Side effects of COVID-19 vaccination and breast cancer. *Clin Exp Med*. 2023;23(7):4035-6. Epub 20230515. doi: 10.1007/s10238-023-01086-1. PubMed PMID: 37184601; PubMed Central PMCID: PMCPMC10184091.

20. Hahn WO, Wiley Z. COVID-19 Vaccines. *Infect Dis Clin North Am*. 2022;36(2):481-94. Epub 20220131. doi: 10.1016/j.idc.2022.01.008. PubMed PMID: 35636910; PubMed Central PMCID: PMCPMC8802612.

21. Ozcan C, Dag A, Arslan B, Ozcan PP, Ustun RO, Turkegun M. Axillary Lymph Nodes in Breast Cancer Patients After COVID-19 Vaccine. *Indian J Surg*. 2023:1-6. Epub 20230513. doi: 10.1007/s12262-023-03804-1. PubMed PMID: 37361395; PubMed Central PMCID: PMCPMC10181920.

22. Lane DL, Neelapu SS, Xu G, Weaver O. COVID-19 Vaccine-Related Axillary and Cervical Lymphadenopathy in Patients with Current or Prior Breast Cancer and Other Malignancies: Cross-Sectional Imaging Findings on MRI, CT, and PET-CT. *Korean J Radiol*. 2021;22(12):1938-45. Epub 20211026. doi: 10.3348/kjr.2021.0350. PubMed PMID: 34719892; PubMed Central PMCID: PMCPMC8628159.

23. Juhel BC, Brunelle CL, Bernstein MC, Smith LH, Jung AW, Ababneh HS, et al. Side effects of COVID-19 vaccinations in patients treated for breast cancer. *Clin Exp Med*. 2023;23(7):3671-80. Epub 20230408. doi: 10.1007/s10238-023-01050-z. PubMed PMID: 37031282; PubMed Central PMCID: PMCPMC10098240.
24. Liu J, Wu P, Gao F, Qi J, Kawana-Tachikawa A, Xie J, et al. Novel immunodominant peptide presentation strategy: a featured HLA-A*2402-restricted cytotoxic T-lymphocyte epitope stabilized by intrachain hydrogen bonds from severe acute respiratory syndrome coronavirus nucleocapsid protein. *J Virol*. 2010;84(22):11849-57. Epub 20100915. doi: 10.1128/jvi.01464-10. PubMed PMID: 20844028; PubMed Central PMCID: PMCPMC2977860.
25. Zhao J, Yuan Q, Wang H, Liu W, Liao X, Su Y, et al. Antibody Responses to SARS-CoV-2 in Patients With Novel Coronavirus Disease 2019. *Clin Infect Dis*. 2020;71(16):2027-34. doi: 10.1093/cid/ciaa344. PubMed PMID: 32221519; PubMed Central PMCID: PMCPMC7184337.
26. Xu X, Gao X. Immunological responses against SARS-coronavirus infection in humans. *Cell Mol Immunol*. 2004;1(2):119-22. PubMed PMID: 16212898.
27. Okba NMA, Müller MA, Li W, Wang C, GeurtsvanKessel CH, Corman VM, et al. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2-Specific Antibody Responses in Coronavirus Disease Patients. *Emerg Infect Dis*. 2020;26(7):1478-88. Epub 20200621. doi: 10.3201/eid2607.200841. PubMed PMID: 32267220; PubMed Central PMCID: PMCPMC7323511.
28. Ni L, Ye F, Cheng ML, Feng Y, Deng YQ, Zhao H, et al. Detection of SARS-CoV-2-Specific Humoral and Cellular Immunity in COVID-19 Convalescent Individuals. *Immunity*. 2020;52(6):971-7.e3. Epub 20200503. doi: 10.1016/j.immuni.2020.04.023. PubMed PMID: 32413330; PubMed Central PMCID: PMCPMC7196424.
29. Shu H, Wang S, Ruan S, Wang Y, Zhang J, Yuan Y, et al. Dynamic Changes of Antibodies to SARS-CoV-2 in COVID-19 Patients at Early Stage of Outbreak. *Virol Sin*. 2020;35(6):744-51. Epub 20200727. doi: 10.1007/s12250-020-00268-5. PubMed PMID: 32720214; PubMed Central PMCID: PMCPMC7383121.

30. Łukasiewicz S, Czezelewski M, Forma A, Baj J, Sitarz R, Stanisławek A. Breast Cancer-Epidemiology, Risk Factors, Classification, Prognostic Markers, and Current Treatment Strategies-An Updated Review. *Cancers (Basel)*. 2021;13(17). Epub 20210825. doi: 10.3390/cancers13174287. PubMed PMID: 34503097; PubMed Central PMCID: PMC8428369.
31. Tao Z, Shi A, Lu C, Song T, Zhang Z, Zhao J. Breast Cancer: Epidemiology and Etiology. *Cell Biochem Biophys*. 2015;72(2):333-8. doi: 10.1007/s12013-014-0459-6. PubMed PMID: 25543329.
32. Miller KD, Siegel RL, Lin CC, Mariotto AB, Kramer JL, Rowland JH, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2016. *CA Cancer J Clin*. 2016;66(4):271-89. Epub 20160602. doi: 10.3322/caac.21349. PubMed PMID: 27253694.
33. Xu H, Xu B. Breast cancer: Epidemiology, risk factors and screening. *Chin J Cancer Res*. 2023;35(6):565-83. doi: 10.21147/j.issn.1000-9604.2023.06.02. PubMed PMID: 38204449; PubMed Central PMCID: PMC8428369.
34. DeSantis C, Ma J, Bryan L, Jemal A. Breast cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin*. 2014;64(1):52-62. Epub 20131001. doi: 10.3322/caac.21203. PubMed PMID: 24114568.
35. Druesne-Pecollo N, Touvier M, Barrandon E, Chan DS, Norat T, Zelek L, et al. Excess body weight and second primary cancer risk after breast cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective studies. *Breast Cancer Res Treat*. 2012;135(3):647-54. Epub 20120805. doi: 10.1007/s10549-012-2187-1. PubMed PMID: 22864804.
36. Anderson KN, Schwab RB, Martinez ME. Reproductive risk factors and breast cancer subtypes: a review of the literature. *Breast Cancer Res Treat*. 2014;144(1):1-10. Epub 20140130. doi: 10.1007/s10549-014-2852-7. PubMed PMID: 24477977; PubMed Central PMCID: PMC4026199.
37. Orrantia-Borunda E, Anchondo-Nuñez P, Acuña-Aguilar LE, Gómez-Valles FO, Ramírez-Valdespino CA. Subtypes of Breast Cancer. In: Mayrovitz HN, editor. *Breast Cancer*. Brisbane (AU): Exon Publications

Copyright: The Authors.; The authors confirm that the materials included in this chapter do not violate copyright laws. Where relevant, appropriate permissions have

been obtained from the original copyright holder(s), and all original sources have been appropriately acknowledged or referenced.; 2022.

38. Yersal O, Barutca S. Biological subtypes of breast cancer: Prognostic and therapeutic implications. *World J Clin Oncol.* 2014;5(3):412-24. doi: 10.5306/wjco.v5.i3.412. PubMed PMID: 25114856; PubMed Central PMCID: PMC4127612.

39. McPherson K, Steel CM, Dixon JM. ABC of breast diseases. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics. *Bmj.* 2000;321(7261):624-8. doi: 10.1136/bmj.321.7261.624. PubMed PMID: 10977847; PubMed Central PMCID: PMC1118507.

40. Momenimovahed Z, Salehiniya H. Epidemiological characteristics of and risk factors for breast cancer in the world. *Breast Cancer (Dove Med Press).* 2019;11:151-64. Epub 20190410. doi: 10.2147/bctt.S176070. PubMed PMID: 31040712; PubMed Central PMCID: PMC6462164.

41. Gajdos C, Tartter PI, Bleiweiss IJ, Bodian C, Brower ST. Stage 0 to stage III breast cancer in young women. *J Am Coll Surg.* 2000;190(5):523-9. doi: 10.1016/s1072-7515(00)00257-x. PubMed PMID: 10801018.

42. Obeagu EI, Obeagu GU. Breast cancer: A review of risk factors and diagnosis. *Medicine (Baltimore).* 2024;103(3):e36905. doi: 10.1097/md.00000000000036905. PubMed PMID: 38241592; PubMed Central PMCID: PMC6462164.

43. Rathore AS, Kumar S, Konwar R, Srivastava AN, Makker A, Goel MM. Presence of CD3+ tumor infiltrating lymphocytes is significantly associated with good prognosis in infiltrating ductal carcinoma of breast. *Indian J Cancer.* 2013;50(3):239-44. doi: 10.4103/0019-509x.118744. PubMed PMID: 24061465.

44. Rathore AS, Kumar S, Konwar R, Makker A, Negi MP, Goel MM. CD3+, CD4+ & CD8+ tumour infiltrating lymphocytes (TILs) are predictors of favourable survival outcome in infiltrating ductal carcinoma of breast. *Indian J Med Res.* 2014;140(3):361-9. PubMed PMID: 25366203; PubMed Central PMCID: PMC4248382.

45. Kasurinen J, Hagström J, Kaprio T, Beilman-Lehtonen I, Haglund C, Böckelman C. Tumor-associated CD3- and CD8-positive immune cells in colorectal

cancer: The additional prognostic value of CD8 +to-CD3 + ratio remains debatable. *Tumor Biology*. 2022;44:37-52. doi: 10.3233/TUB-211571.

46. Riazi Rad F, Ajdary S, Omranipour R, Alimohammadian MH, Hassan ZM. Comparative analysis of CD4+ and CD8+ T cells in tumor tissues, lymph nodes and the peripheral blood from patients with breast cancer. *Iran Biomed J*. 2015;19(1):35-44. doi: 10.6091/ibj.1289.2014. PubMed PMID: 25605488; PubMed Central PMCID: PMC4322231.

47. Huang Y, Ma C, Zhang Q, Ye J, Wang F, Zhang Y, et al. CD4+ and CD8+ T cells have opposing roles in breast cancer progression and outcome. *Oncotarget*. 2015;6(19):17462-78. doi: 10.18632/oncotarget.3958. PubMed PMID: 25968569; PubMed Central PMCID: PMC4627321.

48. Wang Z, Yang C, Li L, Jin X, Zhang Z, Zheng H, et al. Tumor-derived HMGB1 induces CD62L(dim) neutrophil polarization and promotes lung metastasis in triple-negative breast cancer. *Oncogenesis*. 2020;9(9):82. Epub 20200917. doi: 10.1038/s41389-020-00267-x. PubMed PMID: 32943604; PubMed Central PMCID: PMC7499196.

49. Wang Z, Yang C, Li L, Zhang Z, Pan J, Su K, et al. CD62L(dim) Neutrophils Specifically Migrate to the Lung and Participate in the Formation of the Pre-Metastatic Niche of Breast Cancer. *Front Oncol*. 2020;10:540484. Epub 20201015. doi: 10.3389/fonc.2020.540484. PubMed PMID: 33178575; PubMed Central PMCID: PMC7593663.

50. Yang L, Edwards CM, Mundy GR. Gr-1+CD11b+ myeloid-derived suppressor cells: formidable partners in tumor metastasis. *J Bone Miner Res*. 2010;25(8):1701-6. doi: 10.1002/jbmr.154. PubMed PMID: 20572008; PubMed Central PMCID: PMC3153347.

51. Gallego-Ortega D, Ledger A, Roden DL, Law AM, Magenau A, Kikhtyak Z, et al. ELF5 Drives Lung Metastasis in Luminal Breast Cancer through Recruitment of Gr1+ CD11b+ Myeloid-Derived Suppressor Cells. *PLoS Biol*. 2015;13(12):e1002330. Epub 20151230. doi: 10.1371/journal.pbio.1002330. PubMed PMID: 26717410; PubMed Central PMCID: PMC4696735.

52. Li Z, Pang Y, Gara SK, Achyut BR, Heger C, Goldsmith PK, et al. Gr-1+CD11b+ cells are responsible for tumor promoting effect of TGF- β in breast cancer progression. *Int J Cancer*. 2012;131(11):2584-95. Epub 20120508. doi: 10.1002/ijc.27572. PubMed PMID: 22487809; PubMed Central PMCID: PMC3433574.
53. Varghese GR, Patra D, Jaikumar VS, Rajan A, Latha NR, Srinivas P. β hCG mediates immune suppression through upregulation of CD11b(+) Gr1(+) myeloid derived suppressor cells, CD206(+) M2 macrophages, and CD4(+) FOXP3(+) regulatory T-cells in BRCA1 deficient breast cancers. *Immunology*. 2023;170(2):270-85. Epub 20230620. doi: 10.1111/imm.13673. PubMed PMID: 37340549.
54. Dos Anjos Cassado A. F4/80 as a Major Macrophage Marker: The Case of the Peritoneum and Spleen. *Results Probl Cell Differ*. 2017;62:161-79. doi: 10.1007/978-3-319-54090-0_7. PubMed PMID: 28455709.
55. Lin HH, Faunce DE, Stacey M, Terajewicz A, Nakamura T, Zhang-Hoover J, et al. The macrophage F4/80 receptor is required for the induction of antigen-specific efferent regulatory T cells in peripheral tolerance. *J Exp Med*. 2005;201(10):1615-25. Epub 20050509. doi: 10.1084/jem.20042307. PubMed PMID: 15883173; PubMed Central PMCID: PMC2212925.
56. van den Berg TK, Kraal G. A function for the macrophage F4/80 molecule in tolerance induction. *Trends Immunol*. 2005;26(10):506-9. doi: 10.1016/j.it.2005.07.008. PubMed PMID: 16087400.
57. Sakamoto K, Schmidt JW, Wagner KU. Mouse models of breast cancer. *Methods Mol Biol*. 2015;1267:47-71. doi: 10.1007/978-1-4939-2297-0_3. PubMed PMID: 25636464; PubMed Central PMCID: PMC6492279.
58. Pulaski BA, Ostrand-Rosenberg S. Mouse 4T1 breast tumor model. *Curr Protoc Immunol*. 2001;Chapter 20:Unit 20.2. doi: 10.1002/0471142735.im2002s39. PubMed PMID: 18432775.
59. Albores-Mendez EM, Casanas-Pimentel RG, Reyes-Chacon IR, Maldonado Cubas J, Lopez-Cruz J, Rincon-Huerta JA, et al. Cancer Progression Is not Different in Mice of Different Gender Inoculated With Cells of the Triple-Negative 4T1 Breast Cancer Model. *World J Oncol*. 2022;13(5):249-58. Epub 20221022. doi:

10.14740/wjon1517. PubMed PMID: 36406197; PubMed Central PMCID: PMCPMC9635788.

60. DuPré SA, Redelman D, Hunter KW, Jr. The mouse mammary carcinoma 4T1: characterization of the cellular landscape of primary tumours and metastatic tumour foci. *Int J Exp Pathol*. 2007;88(5):351-60. doi: 10.1111/j.1365-2613.2007.00539.x. PubMed PMID: 17877537; PubMed Central PMCID: PMCPMC2517332.

61. Yang L, Yong L, Zhu X, Feng Y, Fu Y, Kong D, et al. Disease progression model of 4T1 metastatic breast cancer. *J Pharmacokinet Pharmacodyn*. 2020;47(1):105-16. Epub 20200122. doi: 10.1007/s10928-020-09673-5. PubMed PMID: 31970615.

62. Swierczak A, Pollard JW. Myeloid Cells in Metastasis. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2020;10(5). Epub 20200501. doi: 10.1101/cshperspect.a038026. PubMed PMID: 31548218; PubMed Central PMCID: PMCPMC7197422.

63. DuPre SA, Hunter KW, Jr. Murine mammary carcinoma 4T1 induces a leukemoid reaction with splenomegaly: association with tumor-derived growth factors. *Exp Mol Pathol*. 2007;82(1):12-24. Epub 20060817. doi: 10.1016/j.yexmp.2006.06.007. PubMed PMID: 16919266.

