

TANER KASAPÖĞÜ

KANSER BİYOLOJİSİ VE FARMAKOLOJİSİ

İSTANBUL-2024

İSTİNYE ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**DOĞAL ÖLDÜRÜCÜ HÜCRELERİN PANKREAS KANSERİ HÜCRELERİNE
KARŞI SİTOTOKSİSİTESİ ÜZERİNE TÜMÖR İLİŞKİLİ SCHWANN
HÜCRELERİN ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ**

TANER KASAPOĞLU

DANIŞMAN
PROF. DR. ENGİN ULUKAYA
DR. ÖĞR. ÜYESİ DİDEM KARAKAŞ ZEYBEK

KANSER BİYOLOJİSİ VE FARMAKOLOJİSİ ANABİLİM DALI

İSTANBUL – 2024

İSTİNYE ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**DOĞAL ÖLDÜRÜCÜ HÜCRELERİN PANKREAS KANSERİ HÜCRELERİNE
KARŞI SİTOTOKSİSİTESİ ÜZERİNE TÜMÖR İLİŞKİLİ SCHWANN
HÜCRELERİN ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ**

TANER KASAPOĞLU

DANIŞMAN
PROF. DR. ENGİN ULUKAYA
DR. ÖĞR. ÜYESİ DİDEM KARAKAŞ ZEYBEK

Bu çalışma, İstinye Üniversitesi BAP tarafından desteklenmiştir. Proje No: 2023/B9

İSTANBUL – 2024

TEZ ONAYI

Bu tezin Yüksek Lisans / Doktora derecesi için gereken tüm şartları sağladığını tasdik ederim.

Anabilim Dalı Başkanı
Prof. Dr. Engin Ulukaya

Enstitü Müdürü
[Unvanı, Adı Soyadı]

Bu tezin Yüksek Lisans derecesi için gereken tüm şartları sağladığını tasdik ederim.

[Unvan Ad ve Soyadı]
Prof. Dr. Engin Ulukaya

[Unvan Ad ve Soyadı]
Dr. Öğr. Üyesi Didem Karakaş Zeybek

Okuduğumuz ve savunmasını dinlediğimiz bu tezin bir Yüksek Lisans derecesi için gereken tüm kapsam ve kalite şartlarını sağladığını beyan ederiz.

Jüri Üyeleri (İlk isim jüri başkanına, ikinci isim danışmana aittir)

Prof. Dr. Engin ULUKAYA İstinye Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Didem KARAKAŞ Acıbadem Mehmet Ali
ZEYBEK Aydınlar Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Yelda BİRİNCİ İstinye Üniversitesi
KUDU

Dr. Öğr. Üyesi Merve ERKISA İstanbul Sağlık ve
GENEL Teknoloji Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Muradiye ACAR İstinye Üniversitesi

ETİK BEYANI

Yüksek Lisans olarak sunduğum, “Doğal öldürücü hücrelerin pankreas kanseri hücrelerine karşı sitotoksitesi üzerine tümör ilişkili Schwann hücrelerin etkilerinin belirlenmesi” adlı çalışmanın, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Taner KASAPOĞLU (İmza)

İTHAF

Bu yolda her türlü desteğini esirgemeyen aileme ithaf ediyorum

TEŞEKKÜR

Bana tecrübeli bir laboratuvar ortamında yüksek lisansımı yapma imkânı sağladığı için yol göstericiliği, bana olan güveni, desteği ve sağladığı engin bilgileri için değerli danışman hocam Prof. Dr. Engin ULUKAYA'ya,

Yüksek lisans hayatım boyunca gerçekleştirmek istediğim hedeflerim doğrultusunda her türlü bilgi ve tecrübesini aktardığı ve bu hedeflerime olan inancını ve desteğini bu sürecin her noktasında bana hissettirdiği için yol göstericiliğini ve sevgisini sürekli yanımda hissettiğim, beraber çalışmaktan çok mutlu olduğum değerli danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Didem KARAKAŞ ZEYBEK'e,

Yüksek lisansım boyunca bana sadece hoca değil bir abla olan, her türlü bilgi ve tecrübesini karşılıksız aktaran, bu süreçte beni sonsuz destekleyen ve yol gösteren, hedeflerim karşısında bana olan inancını her daim hissettiğim, tez çalışmam boyunca her türlü yardımını ve kendisiyle tanıştığımdan beri sevgisini ve desteğini hiç eksik etmeyen değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Merve ERKISA GENEL'e,

Laboratuvarda beraber çalışmaktan mutluluk duyduğum, bu süreçte tüm desteklerini sağlayan, birçok şey öğreten ve gösteren değerli hocalarım Remzi Okan AKAR (namıdiğer taşsız kral) ve Hilal ŞENTÜRK'e,

Beni her daim destekleyen ve çok şey katan, tez çalışmam boyunca yardımlarını eksik etmeyen, beraber gülüp eğlendiğim değerli arkadaşlarım Yaren ARASAN, Gizem BULUT, Sıla SIĞIRLI ve Demet GÜL ERYILMAZ'a,

Maddi ve manevi desteklerini hiç esirgemeyen, yorgun döndüğüm günlerde sevgileriyle yorgunluğumu unutturan, beni bu günlere getiren annem Raime KASAPOĞLU, babam Vejdi KASAPOĞLU ve ablam Zeynep KASAPOĞLU'na teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstinye üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 2023/B9

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	i
ETİK BEYANI	ii
İTHAF	iii
TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLLER LİSTESİ	vii
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	ix
ÖZET	xi
ABSTRACT	xiii
1.GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Pankreas Kanseri	4
2.1.1. Pankreas kanseri risk faktörleri	5
2.1.2. Pankreas kanserinin moleküler biyolojisi	6
2.2. Tümör Mikroçevresi	9
2.2.1. Pankreas kanseri mikroçevresinin ve immün baskılayıcı mikroçevrenin karakteristiği	11
2.2.2. TGF- β ve immün baskılayıcı rolü	13
2.3. Perinöral İnvazyon	15
2.3.1. Schwann hücre ve perinöral invazyondaki rolü	18
2.4. Doğal Öldürücü Hücre	21
2.4.1. Hedef hücrelerin NK hücre tarafından tanınması ve sitotoksisite mekanizmaları	22
2.4.2. NK hücre ve TGF- β	24
3. MATERYAL VE METOD	26
3.1. MATERYAL	26
3.1.1. Hücre kültürü malzemeleri	26
3.1.2. Kimyasallar	26
3.1.3. Sarf malzemeler	27
3.1.4. Cihazlar	27
3.2. METOD	28

3.2.1. İnsan Rekombinant TGF- β 1 proteininin hazırlanışı	28
3.2.2. Hücre kültürü	29
3.2.3. FBS inaktivasyonu	29
3.2.4. Kullanılan besiyerlerinin hazırlanışı	29
3.2.5. Hücre soylarının stoktan çıkarılması.....	30
3.2.6. Hücre soylarının pasajlanması	30
3.2.7. Süspanse NK-92 hücrelerinin pasajlanması.....	31
3.2.8. Hücre soylarının stoklanması.....	31
3.2.9. Süspanse NK-92 hücrelerinin stoklanması	32
3.2.10. Hemositometre ile hücre sayımı	32
3.2.11. Sulforhodamine B (SRB) canlılık analizi	32
3.2.12. Conditioned besiyeri (CM) eldesi	33
3.2.13. Calcein-AM boyama ile canlılık analizi	34
3.2.14. Western Blot analizi.....	38
3.2.15. ELISA testi ile TGF- β 1 konsantrasyonunun ölçümü.....	40
3.2.16. ELISA testi ile NK-92 hücrelerinden salınan IFN- γ konsantrasyonunun ölçümü.....	42
3.2.17. İstatiksel analiz.....	43
4. BULGULAR.....	44
4.1. SRB Canlılık Testi Bulguları	44
4.2. Calcein Canlılık Testi Bulguları	45
4.3. Western Blot Bulguları	49
4.4. ELISA Bulguları	50
4.4.1. Hücre ve CM'ler içerisinde bulunan TGF- β 1 konsantrasyonunun ELISA ile ölçülmesi	50
4.4.2. NK-92 hücrelerinden salınan IFN- γ konsantrasyonunun ELISA ile ölçülmesi	51
5. TARTIŞMA	53
6. SONUÇ, ÖNERİLER VE TOPLUMA KATKI	61
KAYNAKÇA.....	62
İNTİHAL RAPORU	71
ÖZGEÇMİŞ	72

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Pankreasın genel anatomisi	4
Şekil 2.2. PanIN lezyonlarının kanserleşme süreci.....	7
Şekil 2.3. Ras proteinin çalışma mekanizması ve aktif Ras proteinin sebebiyet verebildiği hücresel olaylar.....	8
Şekil 2.4. CDKN2A ürünü tümör baskılayıcı proteinlerin hücre döngüsünde çalışma mekanizmaları.....	9
Şekil 2.5. Kanser hücreleri normal hücrelerden ayırt edilmesindeki özelliklere katkı sağlayan stroma hücreleri	10
Şekil 2.6. Pankreas kanserinin mikroçevre özellikleri ve mikroçevrenin sağladığı avantajları.....	11
Şekil 2.7. “Soğuk” pankreas kanserinin bağışıklık sisteminden kaçış mekanizması	12
Şekil 2.8. Kanonik ve kanonik olmayan TGF- β sinyal yollarının mekanizmaları ve ayrımları.....	14
Şekil 2.9. İmmünmodülatör TGF- β 1’in etkilediği bağışıklık sistemi hücreleri	15
Şekil 2.10. Pankreasın inervasyonu	16
Şekil 2.11. Pankreas kanserinde perinöral invazyonun histolojik görüntüsü. Oklar neoplastik bölgeleri gösterirken yıldızlar sınırları göstermektedir	17
Şekil 2.12. Kanser hücreleri tarafından dediferansiye edilmiş Schwann hücrelerinin perinöral invazyona olan katkısını basitleştirilmiş görseli	20
Şekil 2.13. NK hücrelerin aktivasyonu ve inhibisyonu	22
Şekil 2.14. NK hücresi ile hedef hücre arasındaki immünolojik sinapsın kurulma basamakları	24
Şekil 3.1. Hücrelerden CM eldesi ve NK-92 hücre grupları	36
Şekil 3.2. PANC-1 hücrelerinin ekimi ve Calcein işaretlemesi.....	37
Şekil 3.3. Western blot için HSC hücrelerinin dediferansiyasyonu	39
Şekil 4.1. NK-92 PANC-1 kokültürü için SRB testinin bulgularını gösteren grafik.....	44
Şekil 4.2. Çeşitli PANC-1 CM’lerine maruz bırakılan NK-92 hücreleriyle beraber kültüre edilmiş PANC-1 hücrelerinin canlılık grafiği	46
Şekil 4.3. NK-92 gruplarıyla beraber 4 saat boyunca kültüre edilmiş Calcein pozitif PANC-1 hücrelerinin floresan mikroskop görüntüleri	47

Şekil 4.4. Çeşitli koşullarla (PANC-1, HSC, TASC CM ve TGF- β 1) 24 saat inkübe edilmiş NK-92 hücreleriyle kokültüre edilmiş PANC-1 hücrelerinin Calcein canlılık grafiği.....	48
Şekil 4.5. Calcein pozitif apoptotik PANC-1 hücrelerinin ve NK-92 hücrelerinin oluşturduğu immünolojik sinapsların floresan mikroskop görüntüleri.....	48
Şekil 4.6. Schwann hücre dediferansiyasyonun doğrulanması için gerçekleştirilen Western blot yönteminin sonuçları	49
Şekil 4.7. 24 saat sonunda hücrelerin CM'lerine salınan ve hücre içi TGF- β 1 konsantrasyonunu gösteren grafik	51
Şekil 4.8. PANC-1 hücreleri ile beraber kültüre edilmiş NK-92 hücrelerinden salınan IFN- γ 'nın CM'lere olan tepkisini gösteren grafik	52

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

α	: Alfa
β	: Beta
δ	: Delta
γ	: Gama
BDNF	: Beyin-Türevli Nörotrofik Faktör
CAR	: Kimerik Antijen Reseptörü
CDK4	: Siklin Bağımlı Kinaz 4
CDK6	: Siklin Bağımlı Kinaz 6
ESS	: Enterik Sinir Sistemi
GDNF	: Glial Hücre-Türevli Nörotrofik Faktör
GDP	: Guanozin Difosfat
GFAP	: Glial Fibriller Asidik Protein
GTP	: Guanozin Trifosfat
HLA	: İnsan Lökosit Antijeni
HSC	: İnsan Schwann Hücresi
IL	: İnterlökin
IFN-γ	: İnterferon-gamma
IPMN	: İntraduktal Papiller Müsinöz Neoplazm
L1CAM	: L1 Hücre Adhezyon Molekülü
LFA-1	: Lökosit Fonksiyon İlişkili Antijen-1
LIF	: Lösemi İnhibitör Faktör
MMP	: Matriks Metalloproteinaz
NCAM	: Sinir Hücresi Adhezyon Molekülü
NGF	: Sinir Büyüme Faktörü
NK	: Doğal Öldürücü
NT-3	: Nörotrofin-3

NT-4	: Nörotrofin-4
PanIN	: Pankreatik İntraepitelyal Neoplazm
PDAC	: Pankreatik Duktal Adenokarsinom
PNI	: Perinöral İnvazyon
PP	: Pankreatik Polipeptit
PSS	: Periferel Sinir Sistemi
TβRI	: Tip 1 TGF-β Reseptörü
TβRII	: Tip 2 TGF-β Reseptörü
TGF-β	: Dönüştürücü Büyüme Faktörü-beta
TASC	: Tümör İlişkili Schwann Hücresi
TMÇ	: Tümör Mikroçevresi
TNF-α	: Tümör Nekrozis Faktör-alfa

ÖZET

Kasapoğlu, T. (2024). Doğal öldürücü hücrelerin pankreas kanseri hücrelerine karşı sitotoksitesi üzerine tümör ilişkili Schwann hücrelerin etkilerinin belirlenmesi. İstinye Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Kanser Biyolojisi ve Farmakolojisi ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Pankreas kanseri, hastaların düşük hayatta kalım süresi ve tümörün agresif karakteristiği nedeniyle en ölümcül maligniteler arasında bulunmaktadır. Pankreas kanserinde nöral invazyon yoğun bir şekilde gerçekleşen bir olgu olmakla birlikte bu durumun gerçekleşmesinde kanser hücreleri tarafından dediferansiye edilmiş Schwann hücrelerinin rolü azımsanmayacak kadar önemlidir. TGF- β 1, tümör mikroçevresinde bulunan ve Schwann hücreleri de dahil birçok mikroçevre elemanları tarafından salgılanabilen immünmodülasyon aktivitesi literatürde sıkça belirtilen bir proteindir. Literatürde TGF- β 1'in doğal öldürücü (NK) hücrelerin sitotoksik etkinliğini düşürdüğüne dair çalışmalar bulunmaktadır. Ancak pankreas kanser hücreleri tarafından dediferansiye edilmiş Schwann hücrelerin TGF- β 1 aracılı bir şekilde NK hücreleri üzerindeki etkinliğinin belirlendiği bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada pankreas kanseri hücreleri tarafından dediferansiye edilmiş Schwann hücrelerinin, NK hücrelerinin IFN- γ salgılama ve pankreas kanseri hücre soyu PANC-1 hücrelerini öldürme kapasitesi üzerindeki etkinliğinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Sonuç olarak dediferansiye Schwann hücrelerinin ve çalışmada kullanılan diğer hücrelerin (PANC-1 ve HSC) NK-92 hücrelerinin PANC-1 hücrelerini öldürme etkinliğini düşürdüğü bulundu. Ancak bu hücre gruplarının aralarında anlamlı bir farkın olmadığı saptandı. Ek olarak dediferansiye Schwann hücrelerin, çalışmada kullanılan diğer hücrelerle aynı oranda TGF- β 1 salgılamasına rağmen NK-92 hücrelerinin IFN- γ salgılama kapasitesini diğer hücrelere kıyasla anlamlı bir şekilde düşürdüğü bulundu. Bu çalışmayla pankreas kanseri mikroçevresinde NK hücrelerin disfonksiyonuna ilişkin yeni bir bakış açısı kazandırılarak NK hücre temelli immünterapi olanaklarının geliştirilmesine öncülük edebilecek temel bilgiler üretilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Pankreas kanseri mikroçevresi, Nöral invazyon, Doğal öldürücü hücre, Tümör-iliskili Schwann hücre, Dönüştürücü büyüme faktörü-beta1

Bu alışma, İstinye Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 2023/B9



ABSTRACT

Kasapoğlu, T. (2024). Determination of the effects of tumor-associated Schwann cells on natural killer cell cytotoxicity against pancreatic cancer cells. Istinye University, Institute of Graduate Education, Cancer Biology and Pharmacology. Master Thesis. Istanbul.

Pancreatic cancer is one of the deadliest malignancies due to lower patient's survival rates and the aggressiveness of the tumor. Neural invasion is an event that presents intensely in the pancreatic cancer, and the role of Schwann cells dedifferentiated by tumor cells in that event is considerably significant. TGF- β 1 is an immunomodulator protein abundantly found in the tumor microenvironment, and is secreted by the most of the cells including Schwann cells. In the literature, there are studies demonstrating that TGF- β 1 decreases the cytotoxic efficiency of natural killer (NK) cells. However, the literature lacks of the studies investigating the effects of Schwann cells dedifferentiated by the pancreatic cancer cells on NK cells. The aim of this study is determination of the effects of dedifferentiated Schwann cells in the pancreatic cancer microenvironment on NK-92 cells' cytotoxic activity against PANC-1, a pancreatic cancer cell line. In conclusion, dedifferentiated Schwann cells and other cells used in the study (PANC-1 and HSC) decreased the cytotoxicity of NK-92 cells against PANC-1 cells compared to control. However, there were no significant difference in PANC-1 cell viability between those groups. Although all cells secrete the same amount of TGF- β 1, dedifferentiated Schwann cells significantly decreased IFN- γ secreting capacity of NK-92 cells compared to control and other cell groups. In this study, it is aimed to gain new perspectives of basic knowledges about NK cell dysfunction in the pancreatic cancer microenvironment, that may be prior to develop NK cell based immunotherapies.

Key Words: Pancreatic cancer microenvironment, Neural invasion, Natural killer cell, Tumor-associated Schwann cell, Transforming growth factor-beta1

The present work was supported by Istinye University Department of Scientific Research Projects. Project No. 2023/B9

1. GİRİŞ

Kanser, birden fazla etkenin sebebiyet verdiği ve bu nedenle çok karmaşık gelişim sürecini temsil eden, hücrelerin düzensiz bir şekilde büyüdüğü, normal sağlıklı hücrelerde bulunan kontak inhibisyonun olmadığı, bulunduğu organ ya da dokudan başka bölgelere yayılabilmek özelliğine sahip, bulunduğu yere göre çevresini ve birçok sistemi kendi yararına manipüle edebilen bir hastalık olarak tanımlanabilir. Hanahan ve Weinberg 2000, 2011 ve 2022 yıllarında yayınladıkları makalelerle kanserin ayırt edici ve kanser oluşum, gelişim süreçlerine katkı sağlayan özellikleri belirlemişlerdir. Bunlar; hücre ölümüne direnebilme, proliferatif sinyalleri sürdürebilme, büyümeyi baskılayıcı sinyallerden kaçabilme, invazyon ve metastaz -uzak dokulara yayılma- yapabilme, sınırsız bölünebilme, anjiyogenez yapabilme, bağışıklık sisteminden kaçabilme, tümör oluşumunu enflamasyon ile tetikleyebilme ve sürdürebilme, enerji metabolizmasını yeniden düzenleyebilme, senesent hücrelere dönüşebilme -yaşamaya devam eden ancak bölünmesini neredeyse tamamen durdurmuş hücre popülasyonu-, fenotipik plastisite kazanabilme, genomik instabilite ve mutasyon, mutasyonel olmayan epigenetik düzenlemeler ve polimorfik mikrobiyomlar (Hanahan ve Weinberg, 2011; Hanahan, 2022).

Pankreas kanseri, yaklaşık %12'lik 5 yıllık sağ kalım oranıyla ve son yıllarda kanser nedeni ölümleri arasında üçüncü sıraya yükselmesiyle en ölümcül maligniteler arasında yer almaktadır. Yüksek derecede asemptomatik olması ve oluşan semptomların ise genellikle diğer hastalıkların semptomlarıyla çakışması nedeniyle tanısı güç bir kanser türüdür (Halbrook ve ark., 2023). Pankreas kanserinin tedavisinde cerrahi müdahale, kemoterapi, radyoterapi gibi klasik tedavi yöntemleri kullanılmakta ancak hem hastalığın asemptomatik olması ve tanı koyulan hastaların çoktan resekte olabilecek noktayı geçmeleri, hem de bu nedenlerle kullanılan bu yöntemlerin düşük başarı oranları yeni tedavi yöntemlerinin araştırılması ve/veya mevcut tedavilerin geliştirilmesi ihtiyacını açıkça ortaya koymaktadır. Pankreas kanseri tedavisindeki başarısızlıkların nedenleri birden fazla olmakla birlikte öne çıkan sebep yoğun ve eşsiz stromadır.

Tümör mikroçevresi, kanser hücreleri dışında birçok hücresel elementi ve hücre dışı komponenti ve bunlar arasındaki karmaşık ilişkileri içeren kompleks sistemdir.

Pankreas kanseri mikroçevresinde kanser hücrelerinin azınlıkta olduğu ve kanserin agresif karakterini çoğunlukla stromal hücre ve komponentlerin belirlediği gösterilmiştir (Halbrook ve ark., 2023). Pankreas kanseri mikroçevresindeki hücresel elementleri çoğunlukla stellat hücreler, kanser ilişkili fibroblastlar, regülatör immün hücreler ve sinir sistemi hücreleri oluşturmaktadır. Pankreas kanseri genellikle soğuk (“cold, non-immunogenic”) olarak nitelendirilmektedir. Bu da sitotoksik immün hücrelerin etkinliklerinin d şt ğu ve mikro evreden dışlandığı -tümör içerisine infiltre olamadığı- anlamına gelmektedir. Hem fiziksel hem de biyokimyasal bir engel olan mikroçevrenin kanser oluşum, gelişim ve ilerleme süreçlerinin her birinde aktif rol oynarken, geleneksel tedavi yöntemlerinin başarısızlıklarının başlıca nedenlerindendir.

Perinöral invazyon, kanser hücrelerinin invazyon ve metastaz yapabilmek için sinirlerin belli bölgelerine istilasını tanımlamaktadır. Bu fenomen pankreas kanseri hastalarının neredeyse hepsinde bulunmakta ve kanserin agresifliğini arttırmaktadır. Schwann hücreleri yüksek plastisite kabiliyetine sahip periferel sinir sistemi glial hücresidir ve pankreas kanseri hücrelerinin perinöral invazyonunu kolaylaştıran başlıca mikroçevre elemanıdır. Kanser hücreleriyle yakın temasta olan Schwann hücreleri dediferansiye olarak tamir tipi Schwann hücrelerine benzer bir tipe d n ş rl r, bu grup Schwann hücreleri tümör ilişkili Schwann hücreleri olarak adlandırılabilir.

Doğal  ld r c  hücreler doğuştan gelen bağışıklık sisteminin sitotoksik elemanı olmakla birlikte kanser hücrelerini ve enfekte hücreleri hedefleyebilirler. Ancak immünsupresif tümör mikroçevresinde sitotoksik etkinliklerini yitirebilirler. Dönüştürücü büyüme faktörü-beta (TGF- ) kanser mikroçevresinde yoğun bir şekilde bulunan bir proteindir ve doğal öldürücü hücre etkinliğinin düşmesinde başrol oyuncularındandır. Ayrıca pankreas kanseri mikroçevresinde, kanser hücreleri ve diğer stromal hücreler dışında Schwann hücrelerden de salgılandığı belirlenmiştir. Schwann hücrelerinin pankreas kanseri öncesi lezyonlarda nöronlardan izole bir şekilde bulunabildiği, TGF-  salgıladığı, kanser hücresinin yararına dediferansiye olduğu ve pankreas kanserinin agresifliği ve yayılmasında rolü olduğu bilinmektedir. Pankreas kanseri ve Schwann hücreleri arasındaki iletişimin ortaya çıkarıldığı birçok çalışma bulunurken, pankreas kanseri mikroçevresinde Schwann hücreleri ile doğal öldürücü hücrelerin etkileşimini araştıran bir çalışma bulunmamaktadır. Bu tez çalışmasında Schwann ve tümör ilişkili Schwann hücrelerin TGF-  aracılığıyla, doğal öldürücü

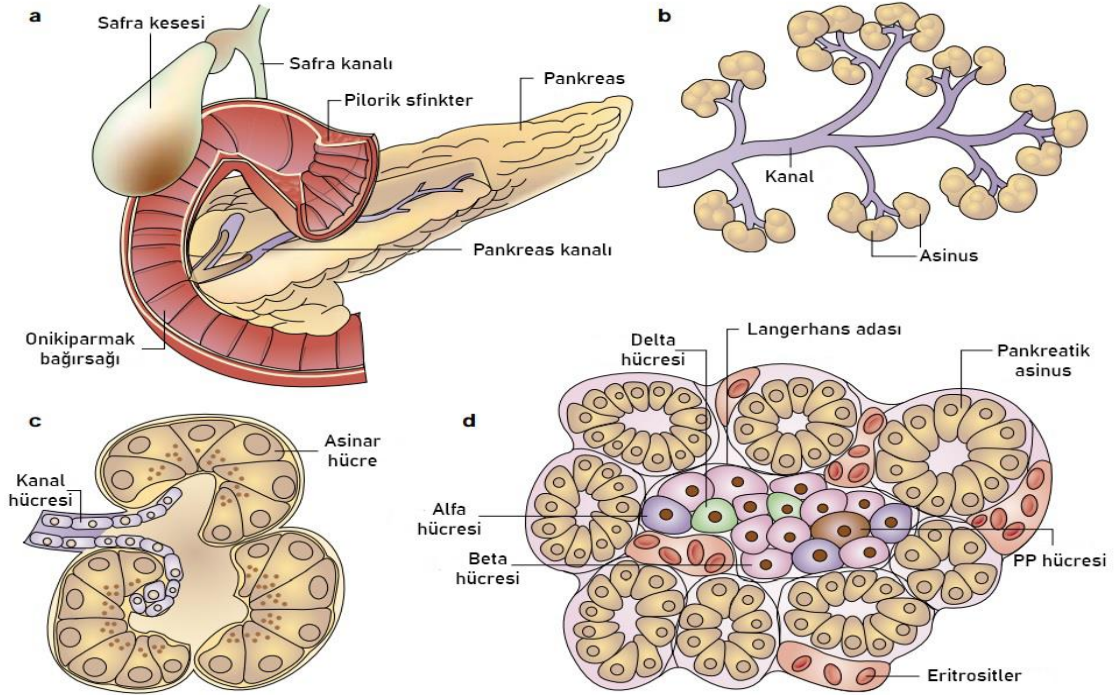
hücrelerin pankreas kanseri hücrelerine karşı olan sitotoksitesi üzerine etkileri ve dolayısıyla pankreas kanseri hücrelerini doğal öldürücü hücre aracılı hücre ölümüne olan etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Pankreas Kanseri

Pankreas sindirim sistemi için gerekli enzimleri salgılayan ve kan şekerinin düzenlenmesi için gerekli olan hormonları üreten, midenin hemen arkasında konumlu bir salgı organıdır. Baş, gövde ve kuyruk olarak adlandırılan üç bölümden oluşur. Pankreasın büyük bir kısmını tripsinojen, kimotripsinojen, lipaz, amilaz ve proteazlar gibi enzimleri onikiparmak bağırsağına salgılayan asinar hücreler ve kanal hücrelerinden oluşan ekzokrin pankreas oluştururken, az bir kısmını ise glukagon, insülin, somatostatin gibi hormonları ve pankreatik polipeptitler (PP)'i salgılayan endokrin pankreas oluşturur. Endokrin pankreas alfa (α), beta (β), delta (δ) ve PP hücrelerinden meydana gelen Langerhans adacıklarını içerir (Zhou ve Melton, 2018). Pankreasın genel anatomisi ve yapısı Şekil 2.1'de gösterilmiştir.



Şekil 2.1. Pankreasın genel anatomisi. Pankreasın onikiparmak bağırsağıyla olan ilişkisini ve pankreası oluşturan hücreleri gösteren görsel. (a) Pankreasın anatomisi. (b) Ekzokrin pankreas. (c) Asinus yapısı. (d) Ekzokrin pankreas ögeleri tarafından sarılmış Langerhans adacığı (Bardeesy ve DePinho, 2002'den Türkçeleştirilmiştir).

2023 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde pankreas kanseri mortalite açısından istatistiklerde meme kanserini geçerek en ölümcül üçüncü kanser türü olarak

listelenmiştir (Halbrook ve ark., 2023). 2030 yılına kadar kanser sebepli ölümlerde ikinci sıraya yükseleceği öngörülmektedir (Park ve ark., 2022). Pankreas kanseri tanısı almış hastaların çoktan metastatik evreye geçmiş olduğu bildirilmiştir ve bu hastaların 5 yıllık sağ kalım oranları %12'dir (Halbrook ve ark., 2023).

Pankreas kanseri tedavisinde seçenekler gelişen teknolojiye rağmen hala istenilen sayıda ve istenilen verimlikte değildir. Seçeneklerden önde gelen cerrahi müdahalede tümörün metastaz yapmamış olması gerekmektedir (Wood ve ark., 2022). Bununla birlikte lokalize bir pankreatik tümörde, tümörün organda bulunduğu konum da önemlidir. Özellikle organın kafa bölümünde oluşan bir tümörün kesilip çıkarılması, onikiparmak bağırsağı ve safra kanalıyla olan bağlantısı nedeniyle diğer bölümlerdeki tümörlere göre daha zorludur ve daha risklidir. Lokalize tümörlerde hali hazırda FOLFIRINOX (5-florourasil, lökovorin, irinotekan, oksaliptatin) adlı kombine kemoterapi ve gemsitabin ile birlikte albümine bağlı paklitaksel kullanılmaktadır (Wood ve ark., 2022). Bunun dışında immünterapi seçenekleri de genelde kontrol noktası inhibitörlerinden ileri gidememektedir. Ayrıca kimerik antijen reseptörü (CAR) eksprese eden immün hücreler gibi hedeflenebilir immünterapi seçenekleri de son zamanlarda gündemdedir ancak solid tümörlerdeki verimlilikleri hala yeterli ve istenilen düzeyde değildir. Bu tarz terapilerdeki en büyük dezavantajlardan önde gelenlerden ilki immünsupresif tümör mikroçevresi ile birlikte tümör heterojenitesidir. İmmünterapi seçeneklerinin sınırlı olması ve verimliliklerinin hala tartışma konusu olduğu ve pankreas kanserinde konvansiyonel terapilerin başarı yüzdesi göz önünde bulundurulduğunda bu terapilerin verimliliklerinin artırılması ve geliştirilebilmesi için tümör mikroçevresinin özellikleri, kompozisyonu ve komponentleri arasındaki iletişimin daha detaylı bir şekilde incelenmesi gerekmektedir.

2.1.1. Pankreas kanseri risk faktörleri

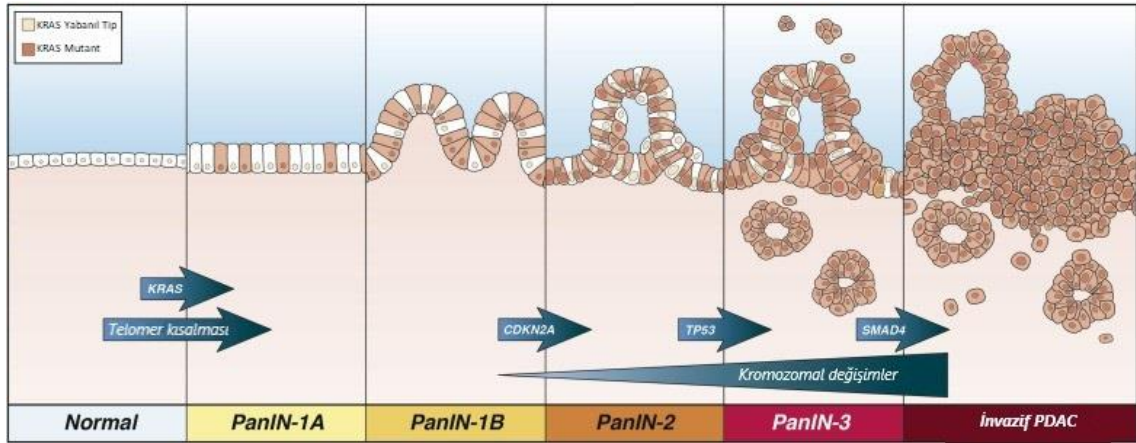
Pankreas kanserine sebebiyet veren risk faktörleri arasında sigara kullanımı ve aile öyküsü önde gelenlerdir (Vincent ve ark., 2011). Önlenebilir faktörler arasında bulunan sigara kullanımının pankreas kanseri riskini yüksek oranda arttırdığı, bununla birlikte sigara kullanımının bırakılması durumunda yıllar içerisinde pankreas kanseri riskinin azaldığı belirtilmiştir (Wood ve Hruban, 2012; Klein, 2021). Bununla birlikte, yapılan çalışmalar pankreas kanseri ve pasif içicilik arasında bir ilişki kuramamıştır (Bao ve ark., 2009; Klein, 2021). Öte yandan, başka bir önlenebilir faktörlerden biri

olan alkol kullanımının pankreas kanserine sebebiyet verip vermediği hala tartışma konusudur. Bununla birlikte aşırı alkol kullanımının dolaylı olarak pankreas kanseri riskini arttırdığını belirtilmiştir (Yadav ve Lowenfels, 2013; Klein, 2021). Pankreas kanseri hastalarının neredeyse %7-%10'unda kendisinden önceki kuşaklarda pankreas kanseri olan yakınlarının olduğu belirlenmiştir (Petersen ve ark., 2006). Ayrıca aile öyküsü bulunan kişilerde kanser öncesi lezyon varlığının aile öyküsü olmayanlara oranla daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Shi ve ark., 2009). Pankreas kanseri risk faktörleri arasında diyabet de bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda diyabeti olan kişilerde pankreas kanseri riskinin daha yüksek olmasıyla birlikte pankreas kanseri tanısı almış hastaların diyabet geliştirme olasılığında da artışlar meydana geldiği belirtilmiştir (Chari ve ark., 2005; Klein, 2021). Şarşırtıcı bir şekilde bu kişilerde pankreas kanserine cerrahi müdahale sonrası diyabetin bittiği gözlemlenmiştir (Chari ve ark., 2005; Klein, 2021). Bununla birlikte, pankreas organının sindirim sisteminin kullanımı için salgıladığı tripsinojeni kodlayan PRSS1 genindeki mutasyonlar da pankreas kanserinin sebepleri arasındadır. PRSS1 geninde meydana gelen mutasyonlar tripsinin sindirim sistemi içerisinde değil de pankreas içerisinde aktifleşmesine sebebiyet vererek doku ve hücre hasarına sebebiyet vererek pankreas kanseri için temel oluşturabilmektedir (Wood ve ark., 2022). Pankreas kanseri sebepleri arasında BRCA1 ve BRCA2 genlerinde meydana gelen mutasyonlar da bulunmaktadır (Rosen ve ark., 2021).

2.1.2. Pankreas kanserinin moleküler biyolojisi

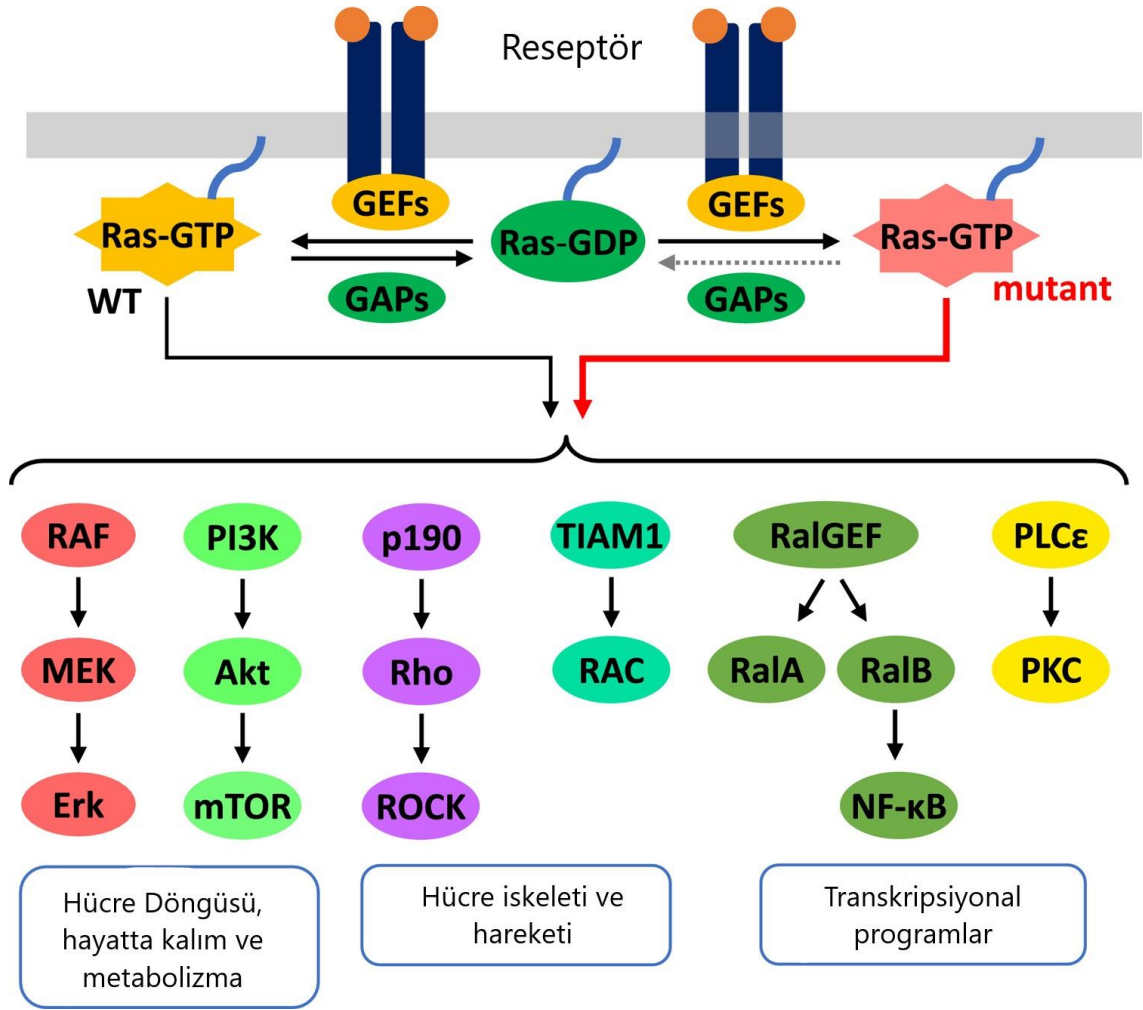
Pankreas kanseri ekzokrin ve endokrin pankreastan meydana gelebilir. Endokrin pankreastan açığa çıkan kanser langerhans adacıklarından kökenlenir ve aşırı oranda hormon üretimiyle karakterizedir. Ekzokrin pankreasta oluşan kanser genellikle duktal hücrelerden meydana gelen adenokarsinomlardır. Pankreatik duktal adenokarsinom (PDAC) en yaygın pankreas kanseridir (Grant ve ark., 2016). Kanser öncesi lezyonlar olan pankreatik intraepitelyal neoplazmlar (PanIN) ve intraduktal papiller müsinöz neoplazmlar (IPMN), çeşitli karakteristik özellikler biriktirerek gittikçe adenokarsinom haline gelebilmektedirler (Grant ve ark., 2016). Histolojik olarak PDAC atipik ve gelişigüzel bir şekilde dizilmiş hücreler olarak gözükmemektedir (Wood ve ark., 2022). PDAC alt tipinin diğer pankreas kanseri alt tiplerine göre metastaz oranı daha yüksektir; PDAC tanısı koyulmuş hastaların büyük çoğunluğunda uzak metastazlar da

saptanmıştır. PDAC gelişiminde birkaç anahtar protoonkogenlerde meydana gelen mutasyonlar ve tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu öne çıkmaktadır. Bu genler *KRAS*, *CDKN2A*, *TP53* ve *SMAD4*'tür (Cicenas ve ark., 2017). Bu genlerde meydana gelen mutasyonlar kanser öncesi lezyonların gelişip kanserleşmesine olanak sağlamaktadır (Şekil 2.2.).



Şekil 2.2. PanIN lezyonlarının kanserleşme süreci. (Wood ve ark. 2019'dan Türkçeleştirilerek kullanılmıştır.)

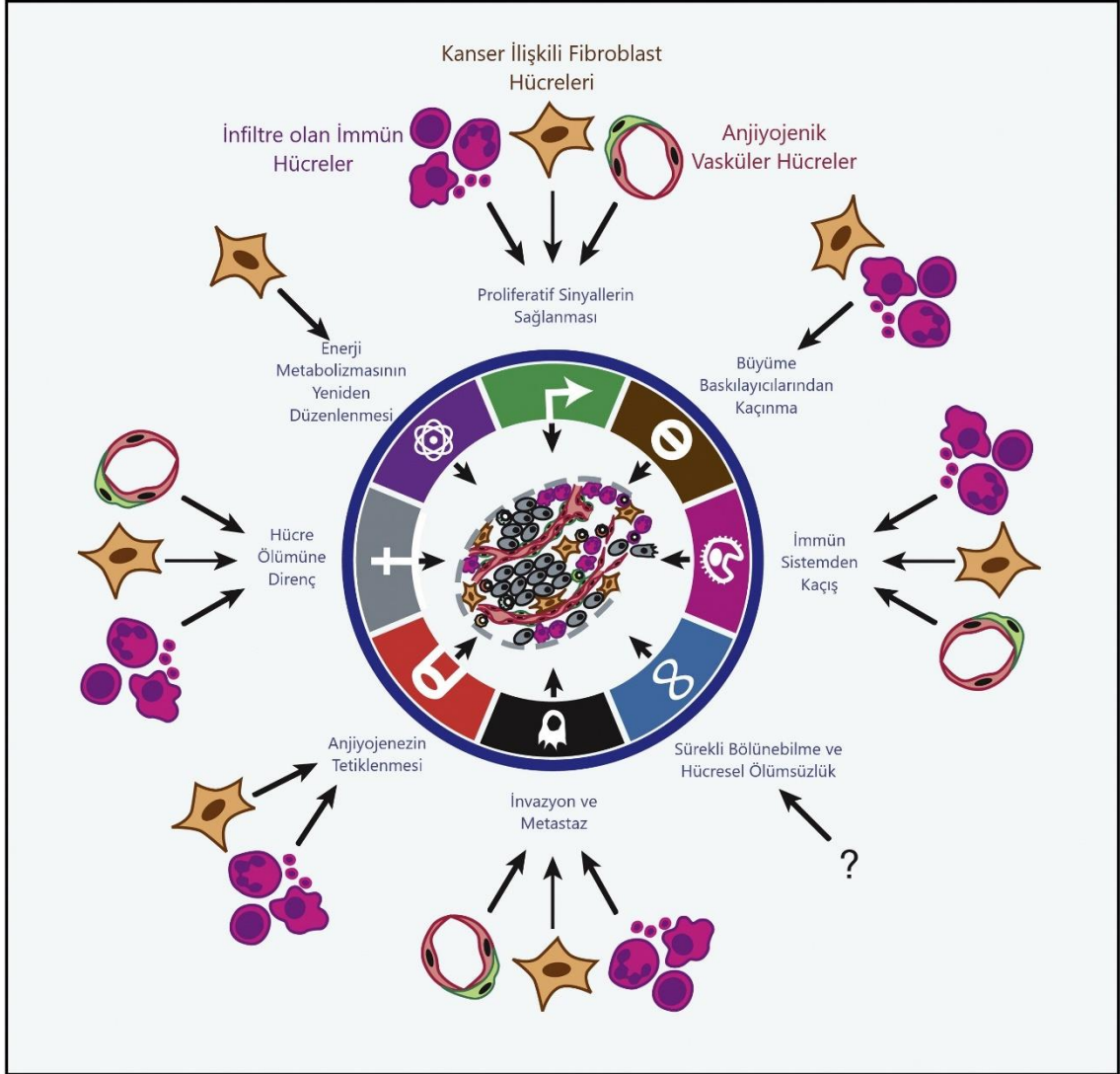
Protoonkogen *KRAS*'ı onkogen hale getiren mutasyonlar PDAC gelişimindeki en yaygın ve öncül mutasyonel değişimlerdir (Hosein ve ark., 2022). *KRAS* birçok hücrel süreçte rol alan Ras GTPaz enziminin kodlanmasından sorumludur. Ras proteinin inaktif formu guanozin trifosfat (GDP)'a bağlı olarak bulunur ve aktif haldeyken guanozin trifosfat (GTP)'ın GDP'ye hidrolizini katalizler. Ras proteini GTPaz aktive edici proteinler (GAP) ve guanin nükleotid dönüşüm faktörleri (GEF) aracılığıyla kontrol altında tutulur. Bu enzimatik reaksiyon sayesinde büyüme faktörlerinin, sitokinlerin vs. hücrel cevabı oluşturulur; Ras proteini bu sinyallerin iletilmesinde görev almaktadır. *KRAS*'ın G12, G13 ve G61 kodonlarında meydana gelen mutasyonlar Ras proteini üzerinde çeşitli değişikliklere sebebiyet verir. G12 ve G13 bölgelerindeki mutasyon Ras proteinin GAP bağlanma bölgesini etkilerken, G61'deki ise GTPaz aktivitesinin değişmesiyle ilişkilidir (Luo, 2021). Bu noktalarda meydana gelen mutasyonlar sayesinde sürekli aktif Ras proteini ve dolayısıyla sürekli olarak iletilen büyüme sinyalleri ve çeşitli hücrel olay sinyalleri anlamına gelmektedir. Ras proteinin çalışma mekanizması ve etkilediği hücrel yollara örnekler Şekil 2.3'te görsel olarak açıklanmıştır.



Şekil 2.3. Ras proteinin çalışma mekanizması ve aktif Ras proteinin sebebiyet verebildiği hücresel olaylar. (Luo, 2021’den Türkçeleştirilerek kullanılmıştır.)

CDKN2A, p16 ve p14 tümör baskılayıcı proteinlerin kodlanmasından sorumludur. İki protein de hücre döngüsünün belli noktalarında görev alırlar. P16 proteini hücre döngüsünün G1/S fazında siklin bağımlı kinaz 4 (CDK4)/siklin bağımlı kinaz 6 (CDK6) proteinlerinin baskılayıcısı görevini görürken p14 proteini MDM2 proteini üzerinden dolaylı olarak başka bir tümör baskılayıcı protein olan p53’ün aktivitesini düzenlemektedir (Saiki ve Horii, 2014). Bu gende meydana gelebilecek mutasyonlar kontrolü sağlanamayan bir hücre döngüsüne ve dolayısıyla kanserleşmeye yol açmaktadır. PDAC vakalarının büyük bir çoğunluğunda (yaklaşık %70-80) *CDKN2A* fonksiyon kaybıyla sonuçlanmış mutasyonların varlığı bildirilmiştir (Yakar ve ark., 2022). *CDKN2A* ürünleri olan tümör baskılayıcı proteinlerin hücre döngüsündeki rolü Şekil 2.4’te gösterilmiştir.

kanser hücrelerinin gelişiminde, metastaz yapmasında rol alır ve kullanılan terapi yöntemlerine olan tepkilerini şekillendirebilir (Xiao ve Yu, 2021). Ayrıca bu hücreler, Hanahan ve Weinberg'in belirlediği kanser hücrelerini sağlıklı hücrelerden ayıran özelliklerini kazanmasında ve sürdürmesinde rol almaktadırlar (Hanahan ve Coussens, 2012). Bu hücreler Şekil 2.5'te özetlenmiştir.



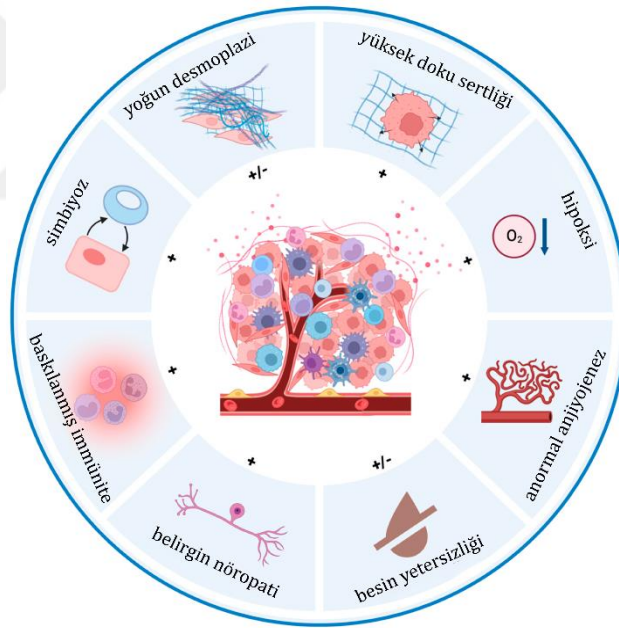
Şekil 2.5. Kanser hücreleri normal hücrelerden ayırt edilmesindeki özelliklere katkı sağlayan stroma hücreleri (Hanahan ve Coussens, 2012'den Türkçeleştirilerek kullanılmıştır.)

Bununla birlikte kanser hücrelerinin yüksek replikasyon kapasitesi sebebiyle artan hücre yoğunluğu nedeniyle TMC hipoksi ve yüksek asidite koşullarını da içermektedir (Hui ve Chen, 2015). TMC kanser hücrelerinin bağışıklık sisteminden kaçışı için de gerekli koşulları sağlamaktadır (Hanahan ve Coussens, 2012); bunu sağladığı fiziksel bariyerle efektör bağışıklık sistemi hücrelerinin TMC'den dışlayarak

ya da immün regülatör hücrelerini uyarak sağlamaktadır. İmmünterapi de dahil diğer terapi seçeneklerinin verimliliğini ve başarısı arttırmak için TMC'nin derinlemesine araştırılması gerekmekte ve TMC'yi de hedefleyen stratejiler de düşünülmelidir.

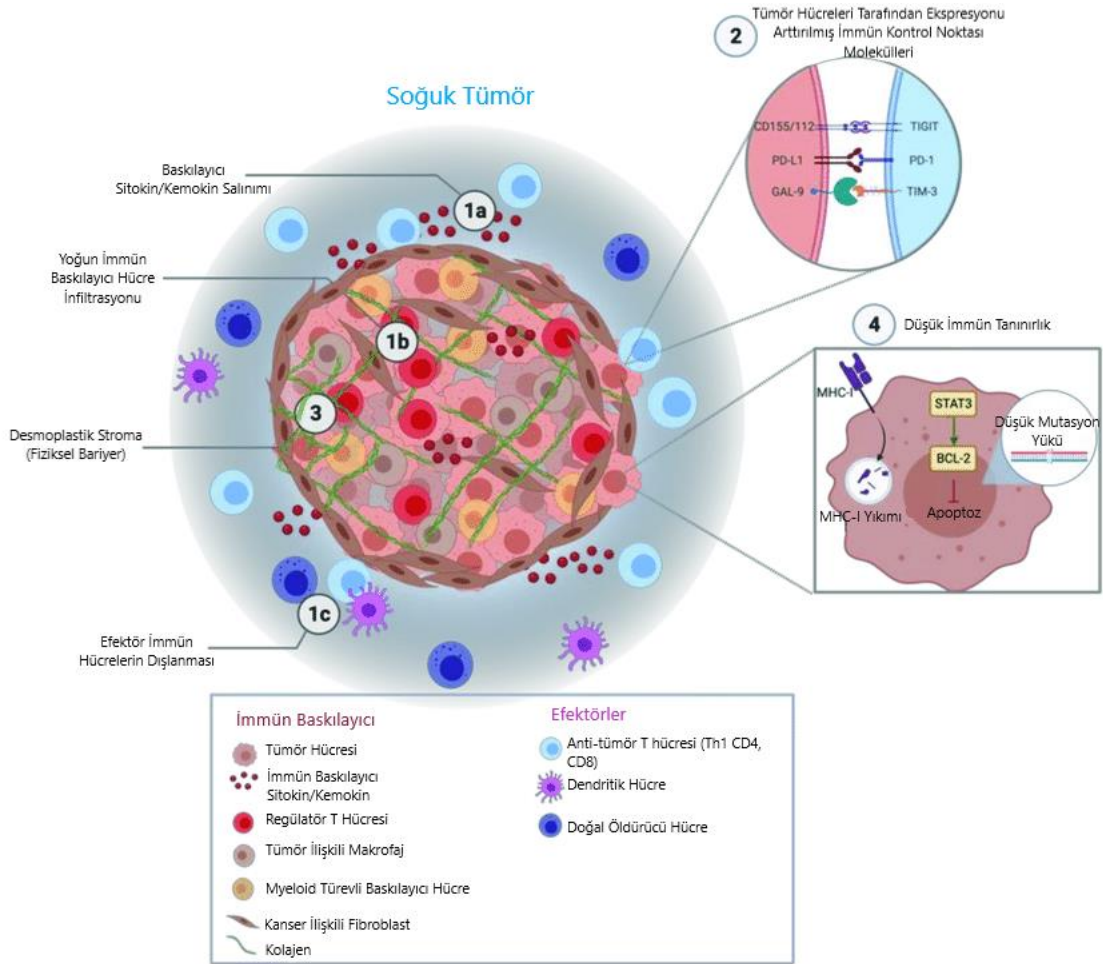
2.2.1. Pankreas kanseri mikroçevresinin ve immün baskılayıcı mikroçevrenin karakteristiği

Pankreas kanseri TMC'sinin hücresel elemanlarının çoğunluğunu pankreatik stellat hücreleri, kanser ilişkili fibroblastlar, regülatör immün hücreler, nöron ve glial hücreler oluşturur (Deng ve ark., 2022). Şaşırtıcı bir şekilde pankreas kanseri TMC'sinde tümör hücreleri azınlıktadır. Pankreas kanseri TMC'si (Şekil 2.6) yüksek doku sertliği, hipoksi, besin azlığı, nöropati, anormal kan damarı yapıları, simbiyozis - *TMC'deki hücreler birbirini birçok yönden destekler*-, yoğun desmoplastik doku yapısı ve yoğun bir şekilde bağışıklık sisteminin baskılanmasıyla karakterizedir (Deng ve ark., 2022).



Şekil 2.6. Pankreas kanserinin mikroçevre özellikleri ve mikroçevrenin sağladığı avantajları (Deng ve ark., 2022'den Türkçeleştirilerek kullanılmıştır).

Bağışıklık sistemi açısından pankreas kanseri TMC'si çoğunlukla “soğuk” olarak nitelendirilmektedir (Şekil 2.7); bu da klasik olarak efektör immün hücrelerin infiltrasyonunun yoğun bir şekilde engellendiği anlamına gelmektedir.



Şekil 2.7. “Soğuk” pankreas kanserinin bağışıklık sisteminden kaçış mekanizması (Timmer ve ark., 2021’den Türkçeleştirilerek kullanılmıştır.)

- Kanser ilişkili fibroblastlar ve pankreatik stellat hücreler pankreas kanserinin yoğun stromasını salgıladığı fibronektin ve kollajen gibi komponentlerle oluşturur (Opitz ve ark., 2021). Bu hücreler sağladıkları desmoplastik stroma ile dolaylı olarak yüksek hipoksiye sebebiyet vermektedir. Hipoksi de kanser hücrelerini birçok yönden desteklerken (metabolizmanın yeniden düzenlenmesi, artmış proliferasyon oranı, epitelial-mezenkimal dönüşüm ve invazyon vs.) özellikle immün baskılayıcı bir mikroçevrenin oluşumuna katkı sağlar.
- Pankreas kanserinin TMC’inde tümör ilişkili makrofajlar, tümör ilişkili nötrofiller, myeloid türevli baskılayıcı hücreler, regülatör T hücreleri ve regülatör B hücreleri de salgıladıkları sitokin, kemokin ve faktörlerle

immün baskılayıcı pankreas kanseri mikroçevresinin oluşumuna katkı sağlar (Deng ve ark., 2022).

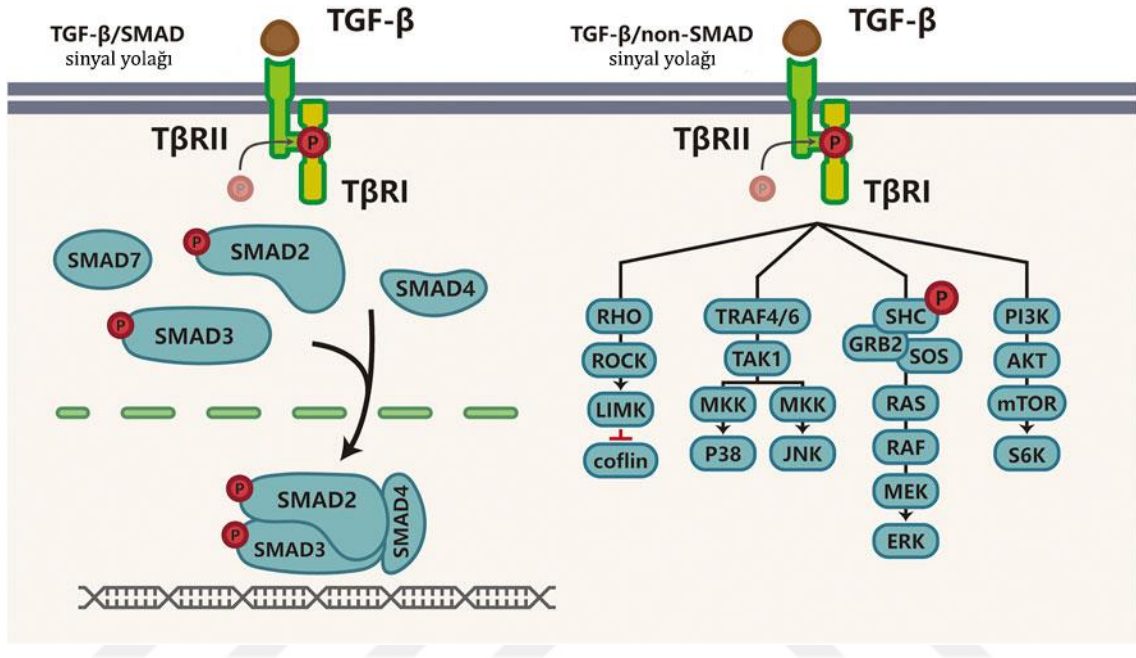
İnterlökin (IL)-6, IL-21, IL-10, IL-1, IL-3, IL-1 β , tümör nekrozis faktör-alfa (TNF- α), CXCL13, CXCL1, CCL2, lösemi inhibitör faktör (LIF), granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör (GM-CSF), TGF- β ve dahası TMÇ’de bulunan hücrelerden salgılanan kanser hücrelerinin gelişimi, hayatta kalması, onkojenik potansiyelinin artması ve immün sistemden kaçışla ilişkilendirilen sitokin, kemokin ve faktörlerdendir.

2.2.2. TGF- β ve immün baskılayıcı rolü

TGF- β proteinleri, TGF- β 1 en yaygın TGF- β protein ailesi molekülü olmakla birlikte TGF- β 2 ve TGF- β 3 olarak üç farklı izomer şeklinde bulunurlar. TGF- β proteinleri inaktif homodimerler olarak salgılanır (Caja ve Vannucci, 2015). TGF- β , trombospodin-1, matriks metalloproteinaz (MMP)’lar, reaktif oksijen türleri, asidik ortam yardımı ile aktifleşebilmektedir. Kanser açısından aktifleşmiş olan TGF- β iki yönlü bir şekilde fonksiyoneldir; tümör destekleyici ya da baskılayıcı olarak davranabilir. TGF- β ’nın sinyal kaskadı iki şekildedir; kanonik ve kanonik olmayan (Şekil 2.8). Kanonik olmayan TGF- β sinyalleri sonucunda PI3K/Akt ve MAPK gibi hücrel sinyal yollarını etkiler. Kanonik TGF- β /SMAD yolağının çalışma mekanizması ise şu şekildedir:

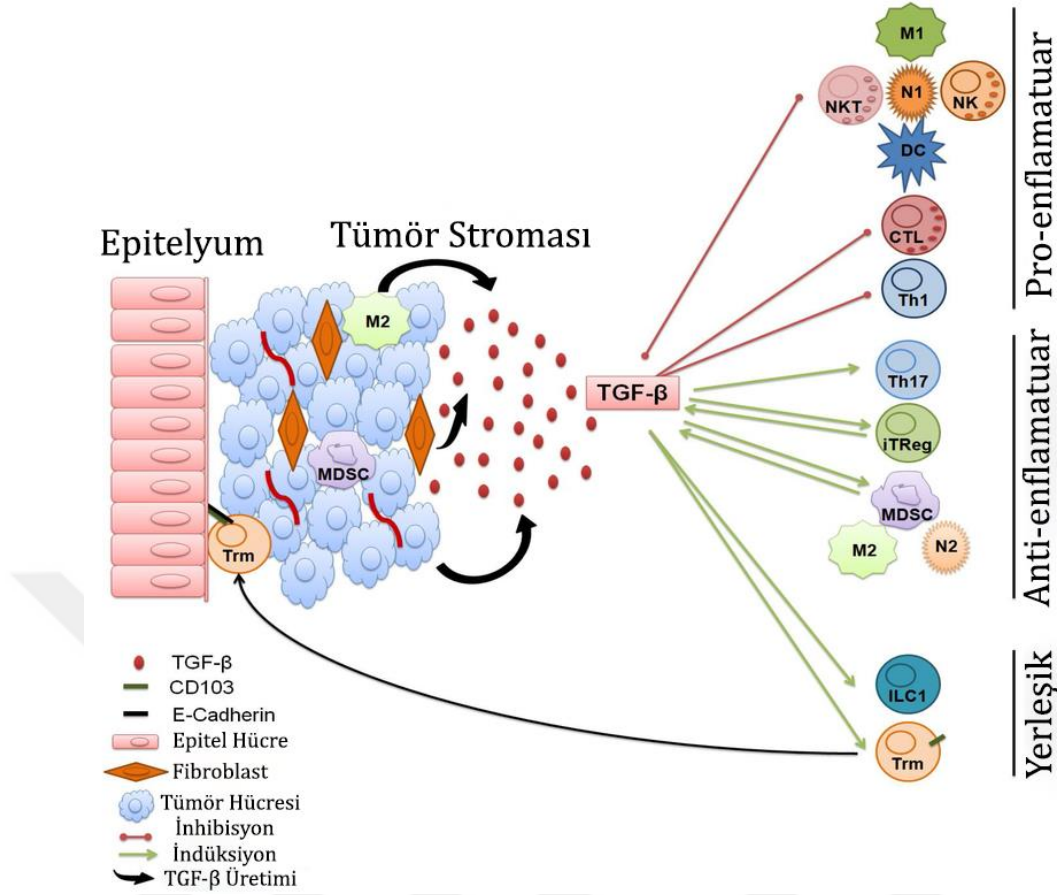
- TGF- β , hücre membranında bulunan reseptörlerinden tip 2 TGF- β reseptörü (T β RII)’ne bağlanır.
- Bu etkileşim sonucunda T β RII otofosforillenir. Aktifleşmiş T β RII, tip 1 TGF- β reseptörü (T β RI) ile etkileşerek fosforiller ve heterotetramerik bir yapı oluştururlar.
- T β RII ve T β RI’in oluşturduğu heterotetramerik yapı sitoplazmada bulunan SMAD2 ve SMAD3 proteinlerini karboksi-terminal serin rezidülerini fosforiller (Caja ve Vannucci, 2015).
- Fosforillenmiş SMAD2 ve SMAD3, SMAD4 ile etkileşime girerek nükleusa transloke olurlar ve hedef genler üzerinde etkinliklerini gerçekleştirirler (Joshi ve Cao, 2010).

TGF- β sinyal yolağında meydana gelen bozukluklar sonucunda apoptoz gibi hücresel süreçlerin düzenlenememesinden dolayı kanserleşmenin önü açılmaktadır. Ancak ileri seviye kanserlerde TGF- β 'nın kanser hücrelerinin migrasyon, invazyon ve hayatta kalmalarını hem doğrudan hem de dolaylı olarak TMÇ'yi yeniden düzenleyerek destekler.



Şekil 2.8. Kanonik ve kanonik olmayan TGF- β sinyal yolaklarının mekanizmaları ve ayrımları (Zhang ve ark., 2021'den Türkçeleştirilerek kullanılmıştır.)

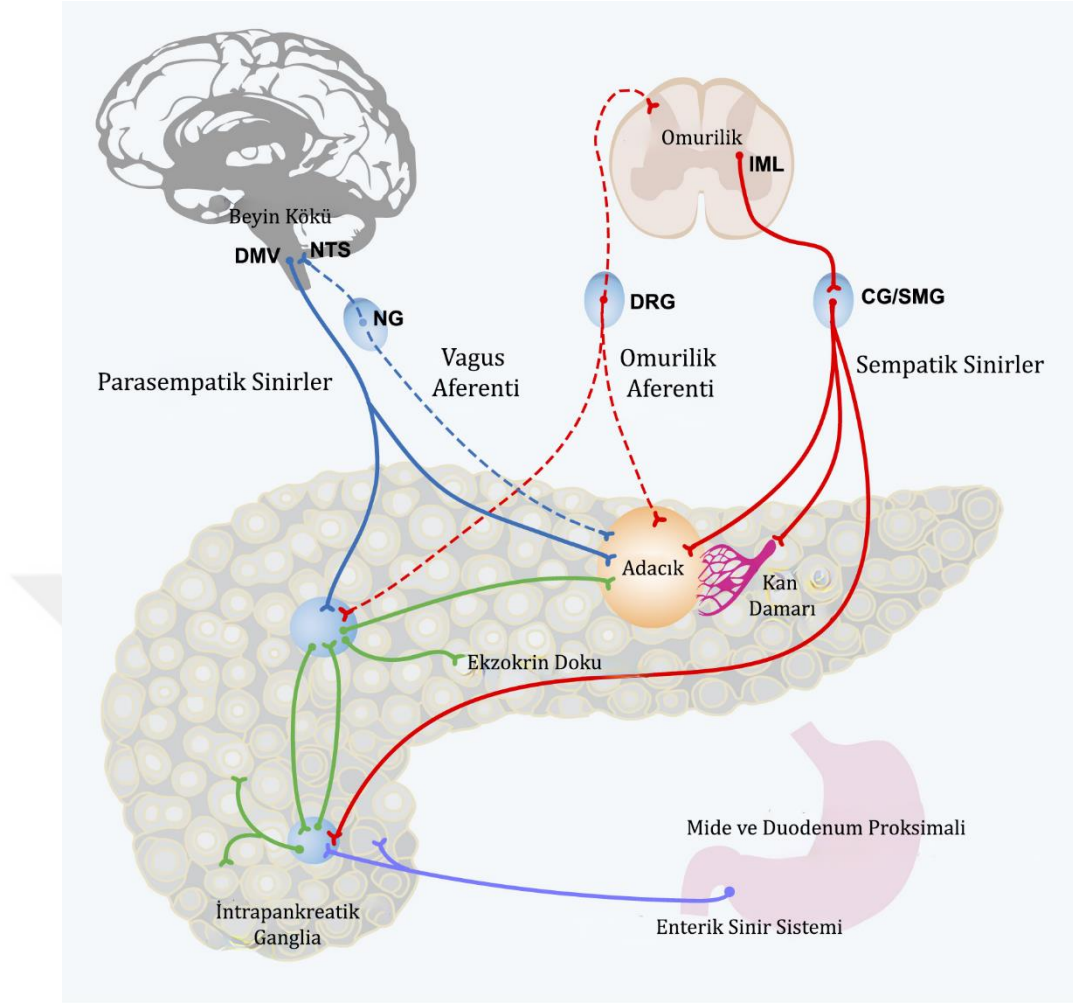
Salgılanan TGF- β , kanser ile ilişkisi dışında ayrıca bağışıklık sistemi için de düzenleyici bir protein olarak davranır. Birçok immün hücrenin fonksiyonlarını düzenler. CD8⁺ T hücrelerinin efektör moleküllerinin ekspresyonunu ters yönde etkiler ve CD4⁺ T hücrelerinin proliferasyonlarını inhibe eder. Böylelikle CD8⁺ T hücrelerinin sitotoksitesini baskılar (Thomas ve Massagué, 2005). Ayrıca TGF- β , Treg'lerin stimülasyonunu da sağlamaktadır. TGF- β 1, TMÇ'de CD8⁺ T hücrelerini negatif bir şekilde düzenleyip, Treg'leri stimüle ederek immün baskılayıcı bir tümör nişinin oluşmasına ön ayak olmaktadır (Şekil 2.9). Bununla birlikte TGF- β , doğal öldürücü (NK) hücrelerin olgunlaşmasını ve sitotoksik kapasitesini kısıtlar (Coyle ve ark., 2023).



Şekil 2.9. İmmünomodülatör TGF-β1'in etkilediği bağışıklık sistemi hücreleri (Dahmani ve Delisle, 2018'den Türkçeleştirilerek kullanılmıştır.)

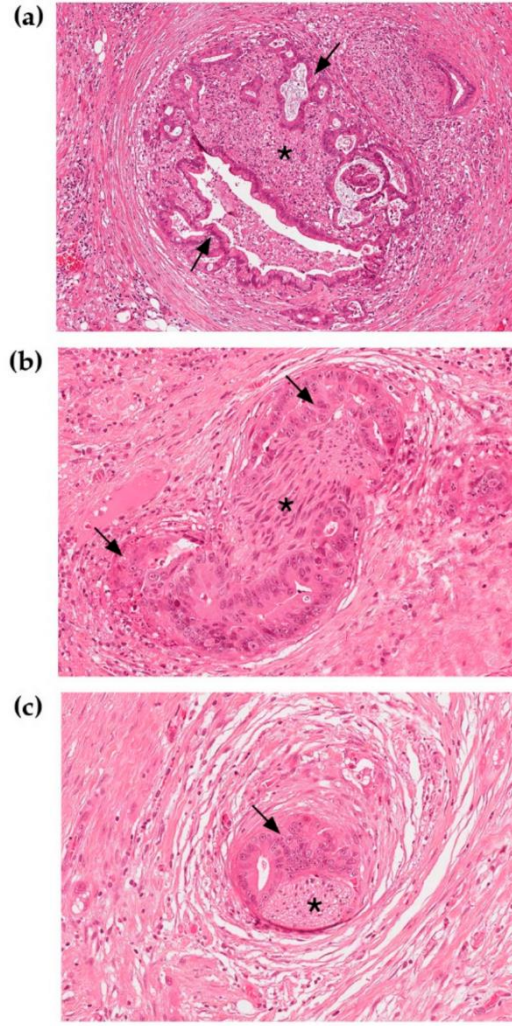
2.3. Perinöral İnvazyon

Pankreas yüksek oranda inerve bir organdır. Pankreas kanseri inervasyonu iki bölümde incelenir; intrinsik (içsel) ve ekstrinsik (dışsal). İntrinsik sinir dağılımı çoğunlukla myelinsiz nöronları içerir ve hem Langerhans adacıklarını hem de ekzokrin asinüsleri çevreler (Perucho ve ark., 2024). Pankreasa gelen ekstrinsik sinir dağılımı ise omurilik sinirleri, vagus siniri, parasempatik ve sempatik sinirler, enterik sinir sistemi (ESS)'ne ait sinirleri içermektedir (Perucho ve ark., 2024). Pankreasın sinir dağılımı Şekil 2.10'da verilmiştir.



Şekil 2.10. Pankreasın inervasyonu. (Ding ve ark., 2024'ten Türkçeleştirilerek kullanılmıştır.)

Perinöral invazyon (PNI) tümör hücrelerinin sinirleri istila etmesine verilen addır (Şekil 2.11). Diğer bir deyişle lenfler ve kan damarları dışında kanser hücreleri tarafından sinirlerin invazyon ve metastaz amacıyla kullanılmasıdır. Bununla birlikte PNI'nın kanser gelişiminde rolü olabileceği tartışmalar arasındadır. Bunu destekler nitelikte; erken safhalardaki PDAC vakalarının %75'inde PNI saptandığı bildirilmiştir (Gasparini ve ark., 2019). Bu durumda PNI pankreas kanserinin herhangi bir safhasında bulunabilir ve kanser oluşum ve gelişiminde rol alabildiği söylenebilmektedir. PNI, PDAC'nin patolojik ve karakteristik bir özelliğidir. Birçok kanser türünde PNI çoğunlukla karşılaşılan bir fenomenken, PDAC vakalarında daha yaygındır. Bununla birlikte PDAC dokularının yeterince incelenemesi doğrultusunda neredeyse tüm vakalarda PNI'nin varlığı iddia edilmektedir (Gasparini ve ark., 2019).



Şekil 2.11. Pankreas kanserinde perinöral invazyonun histolojik görüntüsü. Oklar neoplastik bölgeleri gösterirken yıldızlar sinirleri göstermektedir. (Gasparini ve ark., 2019'dan Türkçeleştirilerek kullanılmıştır.)

Kanser hücreleri bir nöronun üç bölümüne de invaze olabilmektedir; epinöryum, perinöryum, endonöryum. Bu nedenle genelde perinöral invazyon terimi terk edilmekte ve yerini nöral invazyon terimi almaktadır. Ayrıca endonöryumun maruz kaldığı invazyon durumunun hastalarda perinöryuma gerçekleşen nöral invazyona kıyasla daha ciddi ağrı semptomlarına yol açtığı bildirilmiştir (Ceyhan ve ark., 2009). PNI sürecinde tümör dokusuna yakın olan periferik nöronlar ile kanser hücreleri arasındaki sinyali sağlayan birçok faktör bulunur. Bunlar sitokinler, kemokinler, nörotrofinler, ligandlar ve ilgili reseptörlerini kapsamaktadır (Bapat ve ark., 2011). Tümör mikroçevresinde bulunan bu faktörler ve bu faktörlerin kaynak hücreleri hem kanser hücreleri hem de nöron ve glial hücreler üzerinde etkileri bulunmaktadır. Öyle ki bu durum tümör

dokusunda nöral yeniden düzenlenmeye sebebiyet vermektedir. Bu da kanser hücrelerinin gelişimi ve invazyonu için avantaj sağlamaktadır. Ayrıca PanIN lezyonlarında dahi nöral yeniden düzenlenmenin gerçekleştiği ve intrapankreatik nöronların tekrardan düzenlendiği bildirilmiştir (Wang ve ark., 2021). Dahasında kanser hücreler ile nöronların yakın teması ve kanser hücrelerinin nöral invazyonu kronik bir nörojenik enflamasyona dolayısıyla kanser hücrelerinin sebebiyet verdiği hem nöropatik hem de enflamatuvar ağrıya dönüşmektedir. Kanser hücrelerinin nöronlardaki hasarlayıcı davranışları tümör dokusunda artmış nöral yeniden modellenmesine sebebiyet veren faktörlerdendir. Ayrıca nöral densitenin artması da söz konusu olabilirken, PDAC vakalarında nöral densitenin artmasıyla ilgili henüz bir konsensus sağlanmış değildir; PDAC vakalarında nöral densitenin arttığına ve azaldığına dair birbirine ters düşen verileri içeren çalışmalar mevcuttur (Gola ve ark., 2022). PDAC'nin yoğun desmoplastik özelliği nedeniyle sinir liflerinin daha düzensiz olduğu da bildirilmiştir (Iwasaki ve ark., 2019).

Yapılan çalışmaların yapısı ve yetersizliği nedeniyle PNI şu anda “var” ya da “yok” olarak sınıflandırılmaktadır. Ancak PNI yeterince heterojen bir yapıdadır ve histolojik olarak intrapankreatik intratümöral, intrapankreatik ekstrapankreatik ve ekstrapankreatik retroperinöral olarak sınıflandırılabilir (Schorn ve ark., 2017).

Sinir liflerine invaze olan kanser hücreleri kendileri için mikroçevre oluşturmaya başlamaktadır. Bu mikroçevre kanser hücrelerinin gelişimine, nöronlarla olan iletişimine ve metastaz kabiliyetine katkı sağlar. Bu mikroçevrenin hücresel temel taşlarını fibroblastlar, kanser ilişkili fibroblastlar, immün hücreler oluştururken pankreas kanseri özelinde bir de pankreatik stellat hücreler de bu gruba dahil olmaktadır. Sinir invazyonunun varlığında ve pankreas gibi yoğun bir şekilde inerve organların oluşturduğu tümör mikroçevresinde nöronlar ve Schwann hücreler gibi glial hücreler de bulunmaktadır. Bu hücreler salgıladıkları çeşitli faktörler sayesinde ya da hücre-hücre interaksiyonları aracılığıyla pankreas kanseri hücrelerinin perinöral invazyonunu kolaylaştırmaktadır.

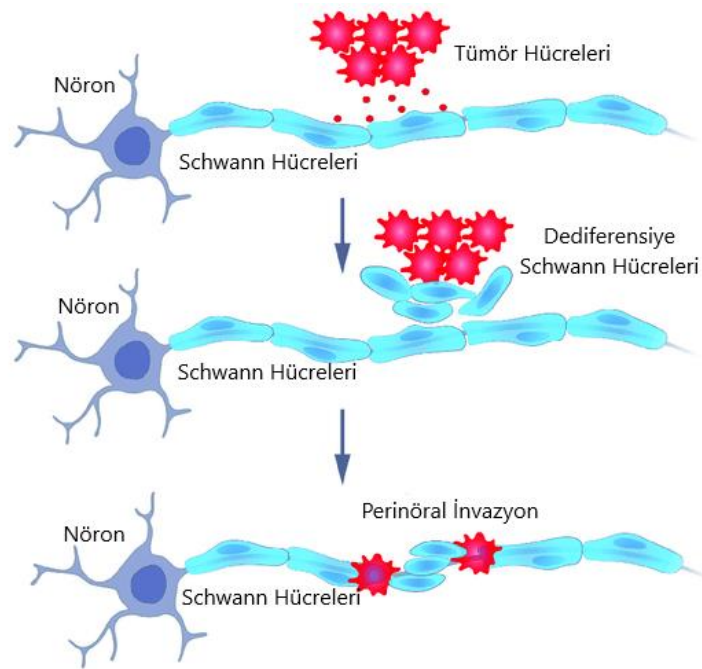
2.3.1. Schwann hücre ve perinöral invazyondaki rolü

Schwann hücreleri periferik sinir sistemi (PSS) glial hücrelerindendir. Schwann hücreleri periferik nöronların destekleme görevini gerçekleştirirler. Yüksek plastisite kabiliyetine -dediferansiye olabilirken, rediferansiye de olabilirler- sahip olmalarıyla

birlikte birkaç alt tipine sahiptirler ve alt tiplerinin farklı rolleri bulunmaktadır. Genel olarak Schwann hücreleri nöronların gelişimi sırasında hayatta kalmalarını, myelin kılıf yapımını sağlarken nöron hasarı durumunda nöronların yeniden yönlendirilmesi ve akson uzamasını destekleyerek Büngner bandlarının oluşumunu sağlarlar (Deborde ve ark., 2016). Sinir hasarı sonrası Schwann hücreleri dediferansiye olarak tamir görevini üstlenir ve myelinleme görevini yitirerek aksonların uzamasına yardımcı olurken ayrıca aksonların yönlendirilmesi görevini de üstlenirler. Tamir görevini üstlenmek amacıyla dediferansiye olan Schwann hücrelerinde karakteristik olarak glial fibriller asidik protein (GFAP) ekspresyonu artmaktadır (Garajova ve ark., 2024). Bununla birlikte c-Jun, Sox2, Notch ve MAPK sinyal yollarının Schwann hücre programlanmasını desteklediği ve rol aldığı bildirilmiştir (Deborde ve ark., 2022). Hasar görmüş bir nöronun varlığında bu sinyal yolları Schwann hücrelerinin tamir görevini yerine getirebilmesi için programlanmasını sağlar, yeniden programlanmış bu Schwann hücreleri nöronların tamir edilmesi ve debrisin temizlenmesi için çeşitli kemokin ve sitokinleri salgılayarak makrofaj gibi bağışıklık sistemi hücrelerinin travma bölgesine migrasyonunu sağlar (Zhang ve ark., 2020), debriste bulunan myelinleri temizler ve aksonların tekrardan uzaması için gerekli ortamı sağlar. Makrofajların migrasyonunu sağlamak için Schwann hücreleri TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , LIF ve CCL2 gibi sitokin ve kemokinleri salgılar. Bu da Schwann hücrelerin gerektiği durumlarda immün modülasyon yapabildiğinin bir göstergesidir.

Aynı şekilde pankreas kanseri hücreleri ile etkileşimde olan ve kanser hücreleri tarafından yeniden programlanan Schwann hücrelerinde de tamir/onarım ilişkili Schwann hücrelerinde olduğu gibi GFAP ekspresyonunun arttığı gözlemlenmiştir. Kanser hücreleri tarafından yeniden programlanmış ve kanser hücrelerinin bir takım özellikler kazanmasına yardımcı olan Schwann hücreleri, tümör ilişkili Schwann hücreleri (Tumor-associated Schwann Cells; TASC) olarak adlandırılabilir. Bununla birlikte Deborde ve ark. pankreas kanseri hücrelerinin Schwann hücrelerinde c-Jun ekspresyonunun artmasını sağladığı ve yeniden programlanmasına öncü olduğu raporlanmıştır (Deborde ve ark., 2022). Schwann hücreleri çeşitli MMP'leri salgılayarak ekstraselüler matriksi degrade edebilirler, bu özellikleri sayesinde nöron hücrelerini yönlendirdiği yollar açarlar. Ayrıca Schwann hücreleri tarafından oluşturulan bu yollar kanser hücreleri tarafından kullanılan bir invazyon seçeneği de

olmaktadır. Ancak oluşturulan bu yollar kanser hücrelerinin invazyonu için yeterli olmamakla birlikte Schwann hücrelerinin fiziksel bir şekilde kanser hücreleriyle etkileşime girip kanser hücrelerinin yayılmasını, invaze olmalarını teşvik etmeleri gerekmektedir (Deborde ve ark., 2017). Schwann hücreleri nöronların proksimalinde bulunmaktadır fakat yapılan çalışmalar sonucunda PanIN lezyonlarında nöronlardan uzakta Schwann hücrelerinin varlığı bildirilmiştir (Demir ve ark., 2014). Bu nedenle Schwann hücrelerinin hem pankreas kanseri hücrelerinin metastazını ve gelişimini destekler (Şekil 2.12) hem de pankreas kanseri öncesi lezyonlarda da etkinlik göstererek karsinogenezde de rol alabilmektedir.



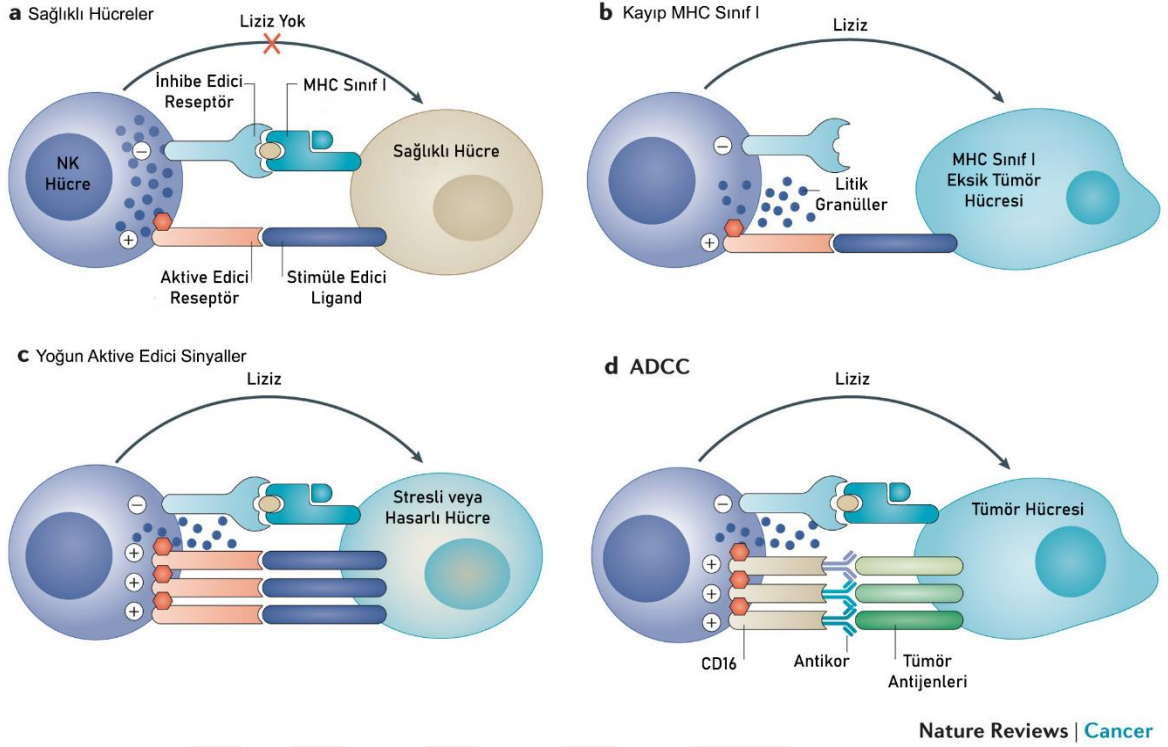
Şekil 2.12. Kanser hücreleri tarafından dediferansiye edilmiş Schwann hücrelerinin perinöral invazyona olan katkısını basitleştirilmiş görseli (Milichko ve Dyachuk, 2020'den Türkçeleştirilerek kullanılmıştır.)

Schwann hücreleri birçok sitokin, kemokin ve nörotrofik faktör salgılar. Bu moleküler arasında kanser hücrelerinin nöral invazyonu ile ilişkili olanlar vardır. Schwann hücreleri tarafından salgılanan ve PNI ile ilişkili bu faktörlere sinir büyüme faktörü (NGF), beyin-türevli nörotrofik faktör (BDNF), glial hücre-türevli nörotrofik faktör (GDNF), nörotrofin-3 (NT-3), nörotrofin-4 (NT-4) gibi nöronların hayatta kalmaları, gelişimleri ve tamirlerinde öncül nörotrofik faktörler, CCL2, CX3CL1 ve CXCL5 gibi hücrelerin yönlendirilmesine olanak sağlayan kemokinler, sinir hücresi adhezyon molekülü (NCAM) ve L1 hücre adhezyon molekülü (L1CAM) gibi hücreler

interaksiyonu sağlayan adhezyon molek  lleri, IL-6 ve TGF-  gibi sitokinler örnek verilebilir. TGF- 'nın pankreas kanserinde zayıf prognoz ile ili kilendirilirken (Pinho ve ark., 2018) NGF gibi nöral faktörlerin ekspresyonunun artmasını sağladığı (Roger ve ark., 2019) ve sinirleri koruyucu özelliklere sahip olduğu da bildirilmiştir (Debolyi ve ark., 2012; Roger ve ark., 2019). Roger ve ark. Schwann hücrelerden salınan TGF- 'nın pankreas kanseri hücreleri üzerindeki fonksiyonel etkinliğini değerlendirmiştir ve bulguları arasında şunlar vardır: kullanılan Schwann hücre soyunun pankreas kanseri hücre hattı Capan-2'den daha fazla TGF-  salgıladığı ve TGF- /SMAD yolağı bağımlı bir şekilde pankreas kanseri hücrelerinin migrasyon ve invazyon yeteneğini arttırdığı bildirilmiştir (Roger ve ark., 2019).

2.4. Doğal  ld r c  Hücre

NK hücre ($CD3^- CD56^+ CD16^+$) doğuştan gelen bağışıklık sisteminin büyük granüllü lenfositlerindendir. Virüs tarafından enfekte olmuş ve kanser hücrelerini hedefleyip elemine edebilme işlevine sahiplerdir ve bu hücrelere karşı savunmada en önde harekete geçen sitotoksik h crelerdendir. T hücrelerinin aksine NK hücreleri aktive olmak için herhangi bir antijen sunumuna ihtiyaç duymamaktadır. NK hücrelerinin aktivasyonu bulundurduğu aktive edici ve inhibe edici reseptörlerdeki sinyallerin dengesine bağlıdır. Inhibe edici reseptörler, insan lökosit antijen (HLA)-I'e ya da immün kontrol noktası inhibitörü ligandlarına bağlanarak NK hücresine hedef hücreyi "kendi" (self) olarak tanıtarak NK hücreyi inhibe ederek, aktive edici reseptörler stres ligandlarına bağlanarak NK hücre sitotoksitesini tetiklemektedir ( ekil 2.13) (Regis ve ark., 2020).



Şekil 2.13. NK hücrelerin aktivasyonu ve inhibisyonu. a) MHC Sınıf I moleküllerini eksprese eden sağlıklı bir hücre ile etkileşime giren bir NK hücre inhibe edici reseptörlerinden alacağı sinyaller nedeniyle inhibe olur ve sağlıklı hücre lize olmaz b) Virüs ve kanser hücreleri savunma stratejisi olarak MHC Sınıf I moleküllerinin ekspresyonunu düşürmekte fakat bu NK hücrelerini inhibe edemeyecekleri anlamına gelir, böyle bir hücre NK hücre tarafından lize edilir c) Hasarlı ya da stresli bir hücre MHC Sınıf I moleküllerini eksprese etmesine rağmen yoğun bir şekilde NK hücresine aktive edici sinyaller gönderdiği için NK hücre aktive olur ve hedef hücre lize edilir d) Tümör hücresi üzerindenki antijenler, antikorlar tarafından hedeflendiği durumlarda NK hücresi CD16 reseptörü yardımıyla da hedef hücrenin ölümüne yol açmaktadır. (Morvan ve Lanier, 2016'dan Türkçeleştirilerek kullanılmıştır).

2.4.1. Hedef hücrelerin NK hücre tarafından tanınması ve sitotoksisite mekanizmaları

NK hücre reseptörleri iki grup altında toplanır:

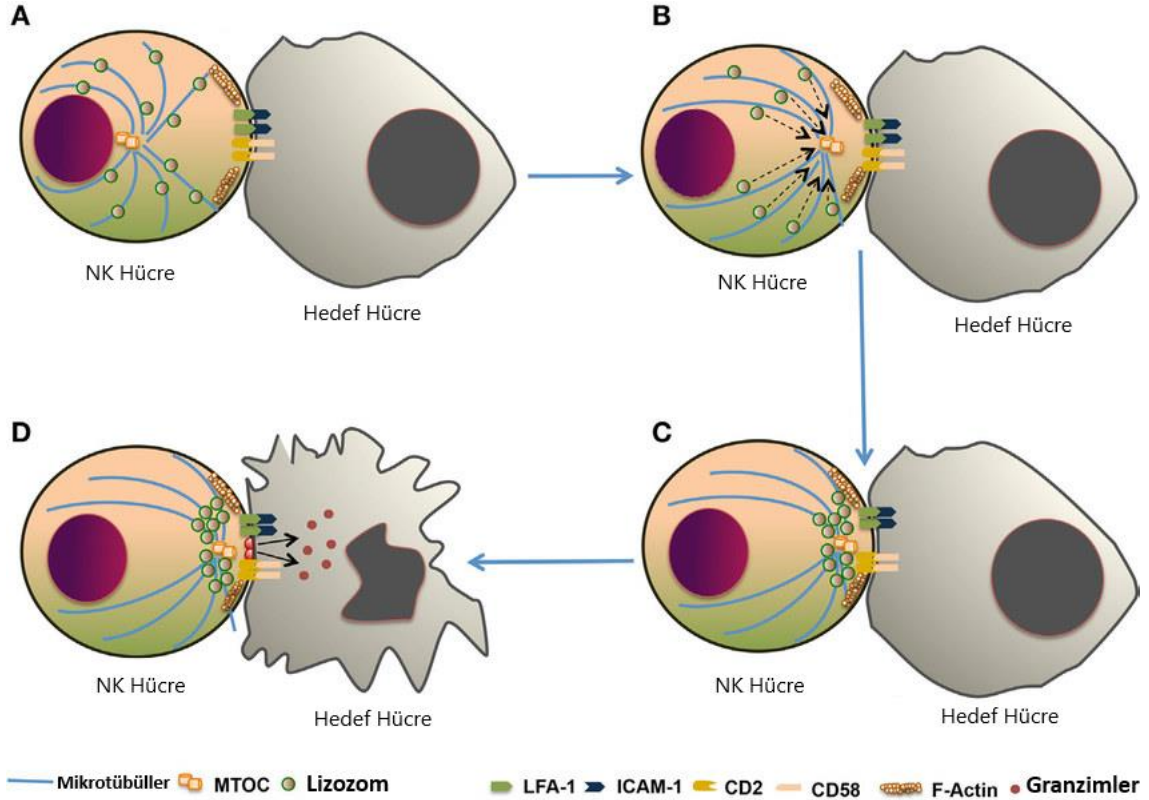
- İnhibe edici reseptörler: inhibe edici KIR reseptörleri, C tipi lektin benzeri reseptörler, NKG2A, vs.
- Aktive edici reseptörler: NKp46, NKp44, NKp30, NKG2C, NKG2D, DNAM1 vs.

Virüsler ve kanser hücreleri T hücre aracılı sitotoksisiteden kaçmak amacıyla HLA-I (diğer adıyla MHC-I) ekspresyonunu düşürme stratejisini kullanabilirler ancak NK hücrelerin inhibe olması için hedef hücrenin HLA-I'yi ile etkileşmesi gerektiği göz önünde bulundurulursa bu tarz bir durumda HLA-I eksprese etmeyen bir konak hücre

ve kanser hücresi NK hücre tarafından tanınacak, NK hücre inhibe olmayacak ve hedef hücre elemine olacak. Ancak şu da not edilmelidir ki bu durum NK hücrelerini aktif etmek için yeterli değildir ayrıca yoğun aktive edici sinyaller de gereklidir (Mehta ve ark., 2018). Buna ek olarak NK hücreler hedef hücre üzerindeki programlı ölüm ligandı-1 (PDL-1) ile de inhibe olabilmektedir (Gonzalez-Rodriguez ve ark., 2019). Bununla birlikte NK hücrelerini aktif eden stres moleküllerine MICA, MICB ve UL-16 proteinleri örnek verilebilir, bu proteinler NKG2D reseptörünün ligandlarıdır.

- ***NK hücreleri ve hedef hücre arasındaki immünolojik sinaps nasıl oluşur?***

Hedef hücreden NK hücrelerine yeterince aktive edici sinyaller geldiği durumda hedef hücre ile NK hücreleri arasında immünolojik sinaps oluşmaya başlar. Bu immünolojik sinapsa lökosit fonksiyon ilişkili antijen-1 (LFA-1) rol almaktadır (Urlaub ve ark., 2017). İmmünolojik sinapsın oluşması şu süreçleri içerir (Şekil 2.14); LFA-1'in aktivasyonu ve ligand etkileşimi, mikrotübül düzenleme merkezi (MTOC)'nde granzimleri ve perforinleri içeren sitolitik granül keselerinin toparlanması, MTOC'un hedef hücrenin olduğu bölgeye polarize olması için çeşitli sinyal moleküllerinin aktif olması, sitolitik granüllerin kenetlenmesi için aktin düzenlenmesinin gerçekleşmesi (Fincham ve ark., 2021). İmmünolojik sinaps sonrası sitolitik granüllerden salınan perforinler hedef hücrenin membranında porlar oluşturur ve serin proteazları olan granzimlerin hedef hücre içerisine girip granzim aracılı kaspaz bağımlı apoptozun ya da nekrozun başlamasına olanak sağlar (Fincham ve ark., 2021). Ayrıca perforin ve granzimler dışında interferon-gamma (IFN- γ), TNF ilişkili bir şekilde hedef hücrede apoptozu tetikleyebilirler. Bununla birlikte CD16 ile hedef hücreye bağlanmış antikorun Fc bölgesine bağlanarak hedef hücrede antikor bağımlı hücresel sitotoksisteye sebebiyet verirler (Mehta ve ark., 2018).



Şekil 2.14. NK hücresi ile hedef hücre arasındaki immünolojik sinapsın kurulma basamakları (Paul ve Lal, 2017'den Türkçeleştirilerek kullanılmıştır.)

2.4.2. NK hücre ve TGF- β

TGF- β , kanser hücreleri üzerindeki pro-tümörojenik ve anti-tümörojenik etkileri dışında immün modülasyon etkileri de bilinmektedir. NK hücrelerinin sitotoksik kabiliyeti üzerinde negatif bir etkisi vardır. NK hücrelerinin IFN- γ üretim kapasitesini düşürürken Nkp30 ve NKG2D gibi aktive edici reseptörlerinin de ekspresyonunu inhibe etmektedir (Castriconi ve ark., 2003; Yu ve ark., 2006; Regis ve ark., 2020). NK hücrelerinde TGF- β , IFN- γ ekspresyonunu SMAD3 üzerinden inhibe etmektedir. Genel olarak TGF- β NK hücrelerinin sitotoksik fonksiyonlarını, metabolizmasını ve olgunlaşma süreçlerini negatif bir şekilde etkileyebilmektedir (Regis ve ark., 2020). Bununla birlikte NK hücrelerin aktivasyonunu mTOR üzerinden engelleyebilir ve NK hücrelerinin daha az sitotoksik ve doku yerleşik alt tipi olan ILC1 benzeri hücrelere dönüşümünü tetikleyebilir (Coyle ve ark., 2023).

PDAC TMÇ'sinde NK hücre disfonksiyonundan sorumlu birçok hücresel element bulunmaktadır. Ancak perinöral invazyon, ağrı, PDAC başlangıç ve gelişiminde rolü olduğu bilinen Schwann hücrelerinin PDAC TMÇ'sinde immün

regölasyondaki rolü yeterince aydınlatılmış değildir. Bununla birlikte NK hücrelerinin kansere karşı savunmada öncül hücreler olduğu, yüksek sitotoksik kabiliyetleri ve immün baskılayıcı TMÇ'ye duyarlılığı göz önünde bulundurulduğunda, Schwann hücrelerin ve ayrıca TASC'lerin NK hücrelerini baskılayarak PDAC gelişiminde rolünün olup olmadığı dikkat çekmektedir. Bu nedenle bu tez çalışmasında hem PDAC gelişimi ve PDAC TMÇ'sinde NK hücre disfonksiyonunun derinlikleri için hem de TGF- β ilişkili bir şekilde Schwann ve TASC'lerin immün baskılayıcı rolü üzerine sorulara cevap aranmıştır.



3. MATERYAL VE METOD

3.1. MATERYAL

3.1.1. Hücre kültürü malzemeleri

- Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI) 1640, Gibco
- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) High Glucose, Gibco
- DMEM/Ham's F12 1:1 mix with L-glutamine, Gibco
- Schwann Cell Medium (SCM), ScienCell, Kaliforniya, ABD
- Schwann Cell Growth Supplement (SCGS), ScienCell, Kaliforniya, ABD
- Penisilin/Streptomisin Solüsyonu, ScienCell, Kaliforniya, ABD
- Fötal Sığır Serum (FBS), ScienCell, Kaliforniya, ABD
- FBS, Gibco
- Penisilin/Streptomisin Solüsyonu (100X), Diagnostikum, Almanya
- %0.05 Tripsin/Etilen Diamin Tetraasetik Asit (EDTA), Wisent Bioproducts
- Fosfat Tuz Tamponu (PBS), Gibco
- TrypLE Express, Gibco

3.1.2. Kimyasallar

- Dimetil Sülfoksit (DMSO), Sigma
- Asetik Asit, Isolab
- Sulforhodamine B sodium salt, Chemcruz
- Trikloroasetik asit (TCA), AFG Bioscience
- Bovine Serum Albumin (BSA), Sigma
- Calcein-AM, Invitrogen
- Human Recombinant TGF- β 1 Protein, Peprotech
- Human Recombinant IL-2 Protein, Peprotech
- RIPA Lysis Buffer System, Chemcruz

- 2-merkaptoetanol, Merck
- Human TGF- β 1 ELISA kit, Sunred
- Human IFN- γ ELISA kit, Sunred
- Anti-GFAP Poliklonal Antikor, Z0334, Dako
- Mouse Anti-Rabbit IgG-HRP, Santa Cruz Biotechnology
- HRP Anti- β -actin Antikoru, Abcam
- Tripan Mavisi %0.4, Gibco
- Pierce™ BCA Protein Assay Kit, Sigma
- Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder, Thermo Scientific

3.1.3. Sarf malzemeler

- 5 ve 10ml'lik serolojik pipet, Nest
- 25ml'lik serolojik pipet, Corning Costar
- 2ml'lik cam pastör pipet, Isolab
- 15ml ve 50ml'lik santrifüj tüpü, Nest
- 6 kuyucuklu hücre kültürü plakası, Corning Costar
- 96 kuyucuklu hücre kültürü plakası, Nest
- 25cm² ve 75cm²'lik hücre kültürü flaskı, Nest
- 10 μ l, 200 μ l ve 1000 μ l'lik pipet uçları, Labselect
- Kriyovial, Isolab
- 0.5ml, 1.5ml ve 2ml'lik mikro santrifüj tüpleri, Jetbiofil
- Hemositometre, Isolab

3.1.4. Cihazlar

- Plate Reader-Spektrofotometre, BMG Labtech, Spectrostar
- Hassas terazi, KERN, ABJ-NM/ABS-N
- Inverted mikroskop, Nikon, Eclipse Ts2
- 10 μ l, 200 μ l ve 1000 μ l'lik pipet seti, Brand

- 200 µl çok kanallı pipet, Brand
- -80°C buzdolabı, Panasonic, MDF-U5386S-PE
- Buzdolabı, Panasonic, MPR-721-PE
- CO2 inkübatörü, Panasonic, MCO-230AIC-PE
- Kuru sterilizatör, Panasonic, MOV-212-PE
- Laminer hava kabini class II, Telstar, Biovanguard
- Otoklav, Nüve, OT90L
- Santrifüj, Hitachi, CF16RN
- Vorteks, Scilogex, MX-F
- Transfer cihazı, BioRad, 10016505C
- Soğutmalı santrifüj, Hitachi, CT15RE
- Orbital shaker, Lab companion
- Dikey elektroforez, Bio-Rad
- ChemiDoc Görüntüleme Sistemi, Bio-Rad
- Axio Observer Z1 Motorized Inverted Floresan Mikroskop, Zeiss
- Axio Observer Z1 Inkübatör, XLMultiS, Zeiss
- Floresan Mikroskop Heating Unit XL S, Zeiss
- Floresan Mikroskop CO₂ Modülü, Zeiss
- Floresan Mikroskop Sıcaklık Modülü, Zeiss

3.2. METOD

3.2.1. İnsan Rekombinant TGF-β1 proteininin hazırlanışı

10µg olarak gelen İnsan Rekombinant TGF-β1 proteini 1mg/ml ana konsantrasyonda olması için 10µl steril distile su ile çözülmüştür. İleri dilüsyon ve proteinin stabilizasyonu için üretici firmanın önerisi üzerine 1ml hacimde 1X PBS'te %0.1 BSA solüsyonu hazırlanmıştır. 1mg/ml ana stok hazırlanan %0.1 BSA solüsyonunda 10µg/ml'ye dilüe edilmiştir. Üretici firmanın yönlendirmesiyle alikotlar 10µg/ml konsantrasyonda ve 10µl'lik hacimlerde hazırlanıp -80°C'de saklanmıştır.

3.2.2. Hücre kültürü

Pankreas kanseri hücre soyu PANC-1 (ATCC CRL-1469), NK hücre soyu NK-92 (ATCC CRL-2407) ve Schwann hücre soyu insan Schwann hücresi (Human Schwann Cell; HSC) (ScienCell) kriyovial tüpler içerisinde -80°C’de saklanmıştır.

PANC-1 hücre soyu KRAS mutasyona (Deer ve ark., 2010) ve epiteloid morfolojiye sahip metastatik ekzokrin pankreas adenokarsinomudur (Lieber ve ark., 1975). Bununla birlikte hücre soyu tipik olarak multinukleuslu büyük hücre popülasyonu şeklinde gözükmetedir. Ayrıca Lieber ve ark. PANC-1 hücre soyunu izole ettikleri tümörde **perinöral invazyonun** varlığını da belirtmiştir (Lieber ve ark., 1975).

NK-92 non-Hodgkin lenfomaya sahip bir hastadan izole edilmiş IL-2 bağımlı NK hücre soyudur (Gong ve ark., 1994). NK-92 hücreleri süspansedirler ve agregatlar şeklinde büyürler. Ayrıca malignant hücrelere karşı yüksek sitotoksiste gösterir ve aktive edici reseptörleri yoğun bir şekilde eksprese ederken, inhibe edici reseptörlerin sadece çok daha az bir kısmını eksprese etmektedirler (Klingemann, 2023). Şaşırtıcı bir şekilde periferik kandan izole edilmiş NK hücrelerinden daha verimli bir şekilde hedef hücreleri öldürdüğü bildirilmiştir (Klingemann, 2023).

3.2.3. FBS inaktivasyonu

Hücrelerin kültüründe kullanılacak FBS’i inaktive etmek için su banyosunda 30 dakika boyunca 50°C’ye maruz bırakılmıştır. Her 5 dakikada bir çökmeleri engellemek amacıyla yavaşça çalkalanmıştır. 30 dakika sonunda direkt olarak +4°C’ye kaldırılıp, soğuduktan sonra uygun şekilde alikotlanıp -20°C’de saklanmıştır.

3.2.4. Kullanılan besiyerlerinin hazırlanışı

PANC-1 hücre hattı DMEM:F12 (1:1) besiyeri içerisine %10 inaktif FBS ve %1 Penisilin/Streptomisin (P/S) solüsyonu eklemesiyle oluşturulan besiyeride kültüre edilmiştir.

NK-92 hücre soyu için %20 inaktif FBS, %1 P/S solüsyonu ve %0,074 β -merkaptotanol içeren RPMI 1640 ana stok besiyeri hazırlandıktan sonra 50ml’lik alikotlar halinde porsiyonlanmıştır. Alikotlar kullanılacağı zaman içerisine 5 μ l IL-2 takviyesi yapılarak hücreler kültüre edilmiştir.

İnsan Schwann hücre soyu (HSC) için %5 FBS (ScienCell), %1 P/S solüsyonu (ScienCell) ve %1 SCGS (ScienCell) içeren SCM besiyeri (ScienCell) hazırlanmıştır. Bununla birlikte %10 inaktif FBS ve %1 P/S solüsyonu içeren yüksek glukoz içerikli DMEM besiyeri hazırlanmıştır. HSC hücrelerinin kültürü 1:1 oranında hazırlanan SCM:DMEM besiyerinde yapılmıştır.

3.2.5. Hücre soylarının stoktan çıkarılması

Kriyovialler -80°C'den çıkarıldıktan sonra hemen su banyosuna alınıp çözünmesi sağlandı. 15ml'lik santrifüj tüpü içerisine stoktan çıkarılacak hücreye uygun besiyerinden 5ml eklendi. Çözünen hücre süspansiyonu besiyeri içeren santrifüj tüpüne yavaşça aktarıldı. Hücre süspansiyonunu içeren santrifüj tüpleri *PANC-1* ve *HSC* için 800rpm'de 5 dakika, *NK-92* için 180g'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda süpernatant atıldı ve hücre pelleti üzerine 1ml uygun besiyeri eklenip hücre süspansiyonu oluşturdu. 1ml hücre süspansiyonu üzerine 4ml daha uygun besiyeri eklendikten sonra 25cm²'lik hücre kültürü flasklarına aktarıldı. Flasklar 37°C ve %5 CO₂ ortamına sahip inkübatörde inkübe edildi.

3.2.6. Hücre soylarının pasajlanması

Hücreler flaskı %80-90 oranında kapladığı zaman alt kültüre alındı. Pasajlama işlemi için flasktan ilk önce besiyeri aspire edildi. Daha sonrasında ortamın nötralize olması, besiyeri artıklarının ve debrisin uzaklaştırılması ve hücrelerin ozmotik basıncının dengede tutulması için 25cm²'lik flask için 2ml, 75cm²'lik flask için 4ml 1X PBS eklemesi yapıldı. PBS'in tüm flaskın tüm yüzeyini yıkadığından emin olundu. Yıkama işlemi sonrası PBS flasktan aspire edildi. Dahasında 25cm²'lik flask için 0.5ml, 75cm²'lik flask için 1ml %0,05 Trypsin-EDTA solüsyonundan eklemesi yapıldı. Daha sonra flask 5 dakika boyunca inkübatöre kaldırıldı, böylelikle enzimin çalışması için gerekli olan optimal sıcaklık sağlandı. 5 dakika sonunda hücrelerin flask yüzeyinden kalktığı mikroskop yardımıyla belirlendi. Hücrelerin flask yüzeyinden kalktığı tespit edildiği zaman flask laminar akım içerisine tekrardan alındıktan sonra kullanılan Trypsin-EDTA hacminin 10 katı kadar %10 FBS içeren besiyeri eklemesi yapıldı. Hücreler bu besiyeri içerisine toplandıktan sonra 15ml'lik santrifüj tüplerine aktararak 800rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant aspire edildi. Eğer flask tekrar kullanılacaksa bir kez 1X PBS ile yıkandı ve 9ml uygun besiyeri eklemesi yapıldı. Hücre pelleti hücre tipine göre uygun alt kültür oranında uygun

besiyeri ile süspanse hale getirildikten sonra flask içerisine eklendi. Flasklar 37°C ve %5 CO₂ ortamına sahip inkübatörde inkübe edildi.

3.2.7. Süspanse NK-92 hücrelerinin pasajlanması

NK-92 hücreleri tezde kullanılan diğer hücrelerin aksine süspanse ve agregatlar şeklinde büyümektedir. Oluşan agregatlar gözle görülebilir büyüklüklere ulaşabilmektedir. Bu hücrelerin pasajlanmasında hücrelerin “akış gerilimi” sebebiyle hasar görmemesi amacıyla sadece 5ml’lik serolojik pipetler kullanıldı. NK-92 hücre agregatları yeterli büyüklüğe ve yoğunluğa geldiğinde 15ml’lik santrifüj tüplerine aktarıldı. Tüpler 180g’de 5 dakika boyunca santrifüje edildi. Santrifüj tüplerinden süpernatant aspire edildi ve hücre pelleti üzerine 5ml uygun besiyeri eklendi. Hücre pelleti bu besiyeri içerisinde yavaş hareketlerle süspanse hale getirildikten sonra 25cm²’lik flaska eklendi. Flasklar 37°C ve %5 CO₂ ortamına sahip inkübatörde flask *dik* bir şekilde inkübe edildi.

3.2.8. Hücre soylarının stoklanması

Hücreler flaskı %80-90 oranında kapladığı zaman alt kültüre alınmıştır. Pasajlama işlemi için flasktan ilk önce besiyeri aspire edildi. Daha sonrasında ortamın nötralize olması, besiyeri artıklarının ve debrisin uzaklaştırılması ve hücrelerin ozmotik basıncının dengede tutulması için 25cm²’lik flask için 2ml, 75cm²’lik flask için 4ml 1X PBS eklemesi yapıldı. PBS’in tüm flaskın tüm yüzeyini yıkandığından emin olundu. Yıkama işlemi sonrası PBS flasktan aspire edildi. Dahasında 25cm²’lik flask için 0,5ml, 75cm²’lik flask için 1ml %0.05 Trypsin-EDTA solüsyonundan ekleme yapıldı. Daha sonra flask 5 dakika boyunca inkübatöre kaldırıldı, böylelikle enzimin çalışması için gerekli olan optimal sıcaklık sağlandı. 5 dakika sonunda hücrelerin flask yüzeyinden kalktığı mikroskop yardımıyla belirlendi. Hücrelerin flask yüzeyinden kalktığı tespit edildiği zaman flask laminar akım içerisine tekrardan alındıktan sonra kullanılan Trypsin-EDTA hacminin 10 katı kadar %10 FBS içeren besiyeri eklemesi yapıldı. Hücreler bu besiyeri içerisine toplandıktan sonra 15ml’lik santrifüj tüplerine aktararak 800rpm’de 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant aspire edildi. Hücre pelletine her kriyovial için 1ml olacak şekilde dondurucu besiyeri (%10 DMSO, %10 FBS, %80 DMEM) karanlık ortamda eklendi. Hücre süspanسیونu kriyoviallere porsiyonlanarak -80°C’ye kaldırıldı.

3.2.9. Süspanse NK-92 hücrelerinin stoklanması

NK-92 hücre agregatları yeterli büyüklüğe ve yoğunluğa geldiğinde 15ml'lik santrifüj tüplerine aktarıldı. Tüpler 180g'de 5 dakika boyunca santrifüje edildi. Santrifüj tüplerinden süpernatant aspire edildi. Hücre pelletine her kriyovial için 1ml olacak şekilde dondurucu besiyeri (%10 DMSO, %90 FBS) karanlık ortamda eklendi. Hücre süspansiyonu kriyoviallere porsiyonlanarak -80°C'ye kaldırıldı.

3.2.10. Hemositometre ile hücre sayımı

%0,05 Trypsin-EDTA solüsyonu ile flask yüzeyinden kaldırılan hücreler pellet yoğunluğuna göre uygun besiyeri ile sulandırıldıktan sonra süspansiyondan 10µl alınarak sayım için ayrılmış 96 kuyucuklu hücre kültürü plakasının bir kuyusuna koyuldu. Daha sonra 10µl %0,5 tripan mavisinden eklenerek 1:1 hücre süspansiyonu hazırlandı. Hemositometre %70'lik etanol ile temizlendikten sonra her iki alanına da hazırlanan karışımdan 10µl eklendi ve 1ml hacimdeki hücre sayısı bulundu.

3.2.11. Sulforhodamine B (SRB) canlılık analizi

SRB boyası hafif asidik koşullarda proteinlere bağlanabilen bir boyadır (Skehan ve ark., 1990). Hafif bazik koşullarda ise çözünen bu boya sayesinde varsayımsal olarak boya yoğunluğunun hücre canlılığıyla ilişkisi kurulabilmektedir. Gerekli tedavi gerçekleştirilen hücreler %50 TCA (kütle/hacim) ile fiks edildikten sonra %0,4 SRB boyası ile boyaması gerçekleştirilir ve boya homojenize edildikten sonra spektrofotometre yardımıyla 564nm'de okunur.

%0,4 (kütle/hacim) SRB boyası %1'lik asetik asit içerisinde hazırlandı ve +4°C'de saklandı. %50'lik TCA (kütle/hacim) distile su ile hazırlandıktan sonra +4°C'de tutuldu.

SRB testi kullanılacak olan efektör hücre:hedef hücre (E:H) oranının belirlenmesinde kullanıldı. Bunun için PANC-1 hücreleri 96 kuyucuklu hücre kültürü plakasının her bir kuyusu için 100µl hacimde 5×10^3 hücre sayısında olacak şekilde ekildi. Deney planı 3 saat, 12 saat ve 24 saatlik ve her bir zaman noktası için 1:1, 2,5:1, 5:1 E:H oranını içerecek şekilde tasarlandı. Deney planına kör kuyuları ve kontrol grubu da dahil edildi. Kör kuyulara uygun besiyeri eklendi. PANC-1 hücreleri ekildikten sonra kuyu yüzeylerine yapışmaları için 24 saat boyunca 37°C ve %5 CO₂ ortamına sahip inkübatörde inkübe edildi. İnkübasyon sonrası kuyu başına 100µl hacimde olacak

şekilde 1:1 oranı için 5×10^3 , 2,5:1 için $12,5 \times 10^3$, 5:1 için 25×10^3 hücre sayısında NK-92 hücreleri ekildi. Akabinde kontrol grubuna 100µl besiyeri eklemesi yapıldı. Hücre kültürü plakaları 37°C'de %5 CO₂ inkübatörde belirlenen inkübasyon süresine kadar inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda tüm kuyulardan -kontrol ve blank kuyusu dahil- besiyeri aspire edildi ve 1X PBS ile yavaşça yıkama yapıldı. Yıkama sonunda her kuyuya 200µl taze besiyeri eklendikten sonra %50'lik TCA solüsyonundan her kuyuya 50µl eklendi ve 1 saat boyunca +4°C'de inkübe edildi. TCA inkübasyon süresi sonunda plakadan uzaklaştırıldı ve her kuyu 5 kez distile su ile yıkandı. Yıkama sonunda plakanın hava ile kuruması sağlandıktan sonra her kuyuya 50µl %0,4 SRB boyasından eklendi ve plaka 30 dakika boyunca oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda SRB boyası tüm kuyulardan aspire edildi ve her kuyu %1'lik asetik asit ile 5 kez yıkandı. Yıkama sonrası plakanın tamamen kuruması sağlandı. Daha sonra proteinlere bağlanan SRB boyasının çözünmesi için her kuyuya 150 µl (10 mM, pH:10) Tris Bazı eklemesi yapıldı ve 10 dakika 100rpm'de orbital çalkalayıcıda bırakıldı. Süre sonunda çözünen boyanın absorbansı (renk şiddeti) spektrofotometrede 564nm dalga boyunda ölçüldü. Absorbans değerleri üzerinden PANC-1 hücrelerinin canlılık oranları belirlendi.

Kontrol grubunun canlılığı %100 olarak kabul edildi. Aşağıdaki denklem ile tedavi uygulanan kuyulardaki PANC-1 hücrelerinin canlılığı belirlendi.

$$\% \text{Canlılık} = [100 \times (\text{Tedavi uygulanan grupların absorbans ortalaması} - \text{Kör kuyularının absorbans ortalaması}) / (\text{Kontrol grubunun absorbans ortalaması} - \text{Kör kuyularının absorbans ortalaması})]$$

3.2.12. Conditioned besiyeri (CM) eldesi

Conditioned besiyeri (Conditioned Media; CM), serumsuz ya da düşük serum içerikli ortamda büyütülen hücrelerin salgıladığı faktörlerin elde edilmesi için kullanılan hücre kültürü yöntemidir. Bu yöntemle deneylerde kullanılmak üzere PANC-1, HSC ve dediferansiye edilmiş HSC hücrelerinin salgılanan komponentleri elde edildi.

Hücreler %75-80 oranında flask yüzeyini kapladığında %1 FBS içeren besiyerine geçirildi. 24 saat boyunca bu şekilde 37°C ve %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübe edildi. 24 saatin sonunda flask içerisindeki besiyerleri 15ml'lik santrifüj tüplerine aktarılıp 2000rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüj sonunda

süpernatant tüpün dibine çok yaklaşımadan toplanarak yeni bir santrifüj tüpüne aktarıldı ve gerekli deneylerde toplanılan CM'ler kullanıldı.

3.2.13. Calcein-AM boyama ile canlılık analizi

Calcein-Asetoksimetil ester (Calcein-AM) floresan olmayan, yağda çözünebilen bu nedenle hücre membranından geçebilen bir maddedir. Hücre içerisine girdiği zaman aktif esterazlar tarafından Calcein-AM, yağda çözünmeyen, polar ve yeşil floresan Calcein haline indirgenir (Neri ve ark., 2001). Bu canlılık analizi NK hücrelerin, hedef hücrelerin canlılığını tayin etmede interfere olmamaları amacıyla seçildi.

50µg Calcein-AM üretici firmanın protokolünde belirtildiği üzere 50µl DMSO ile çözülerek 1mM stok solüsyon elde edildi ve -20°C'de saklandı. Firma tarafından çalışma konsantrasyonu 2µM olarak önerildiği için bu konsantrasyonun elde edilmesi için 10ml serumsuz DMEM:F12 besiyeri içerisine 1mM ana stoktan 20µl eklendi.

Calcein-AM canlılık analizi için beş (5) basamakta gerçekleştirildi:

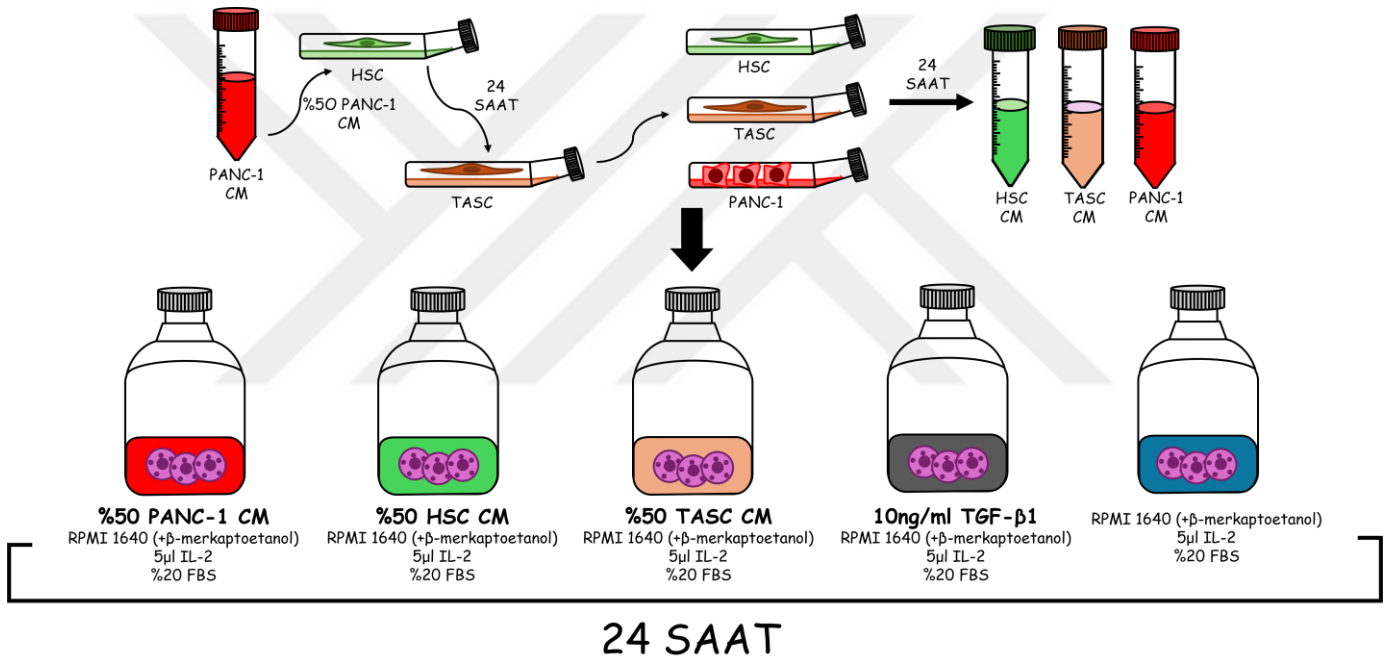
- PANC-1 hücrelerinden HSC dediferansiyasyonu için CM toplanması;
 - *25cm²'lik flaskta bulunan PANC-1 hücreleri flask yüzeyini %75-80 oranında kapladığı zaman %1 FBS içeren seruma geçildi ve 24 saat boyunca 37°C %5 CO₂ ortamında inkübe edildi. 24 saatin sonunda flask içerisindeki besiyeri 15ml'lik santrifüj tüplerine aktarılıp 2000rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüj sonunda süpernatant tüpün dibine çok yaklaşımadan toplanarak yeni bir santrifüj tüpüne aktarıldı. Daha sonra 25cm²'lik flaskta bulunan HSC hücrelerinin besiyeri aspire edilip 1X PBS ile yıkanmıdı. Elde edilen PANC-1 CM ile SCM:DMEM 1:1 oranında (%50 PANC-1 CM) karıştırılıp flaska eklemesi yapıldı. Dediferansiyasyonu sağlamak amacıyla HSC flaskı 24 saat boyunca 37°C %5 CO₂ ortamında inkübe edildi.*

- PANC-1, HSC ve TASC gruplarından CM eldesi;

- 25cm²'lik flasklarda bulunan üç hücre grubu da (PANC-1, HSC ve TASC) %75-80 oranında flask yüzeyini kapladığında besiyerleri aspire edildi ve 1X PBS ile iyice yıkandı. %1 FBS içeren uygun besiyerleri flasklara eklendi ve 24 saat boyunca 37°C %5 CO₂ ortamında inkübe edildi. 24 saat sonunda CM eldesi yapılacak hücrelerin flask içerisindeki besiyerleri 15ml'lik santrifüj tüplerine aktarılıp 2000rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüj sonunda süpernatant tüpün dibine çok yaklaşımadan toplanarak yeni bir santrifüj tüpüne aktarıldı ve CM'leri elde edildi.
- NK-92 hücrelerinin CM ve rekombinant TGF-β1 uygulaması ve PANC-1 hücrelerinin ekimi (Şekil 3.1);
 - NK-92 hücreleri 15ml'lik santrifüj tüplerine toplandı ve 180g'de 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüj sonunda süpernatant dikkatli bir şekilde aspire edildi. Akabinde elde edilen CM'ler her grup için 2,5ml yani %50 CM uygulaması yapılırken CM uygulanan gruplara 1,5ml, TGF-β1 uygulanacak ve CM uygulanmayacak gruplara 4ml RPMI 1640 (+β-merkaptoetanol) besiyeri eklendi. Her flaska %20 FBS içeriğinin olması için 1ml inaktif FBS eklemesi yapıldı. Daha sonra 45μl serumsuz RPMI 1640 besiyeri içerisine 5μl IL-2 eklemesi yapılarak IL-2 karışımı hazırlandı. Bu IL-2 karışımından her gruba 5μl eklenerek gerekli IL-2 takviyesi yapıldı. TGF-β1 grubuna, 10μg/ml insan rekombinant TGF-β1 protein ana stoğundan 5μl eklenerek son konsantrasyon 10ng/ml TGF-β1 olması sağlandı. Böylelikle her grubun aynı oranda FBS ve IL-2 takviyesinden yararlanması sağlandı ve bu komponentler sebebiyle olabilecek interferasyonların önüne geçilmeye çalışıldı. Tüm NK-92 gruplarının (PANC-1 CM, HSC CM, TASC CM, TGF-β1,

CM'siz) flaskları 37°C %5 CO₂ ortamında 24 saat boyunca dik bir şekilde inkübe edildi.

- PANC-1 hücreleri %0,05 Tripsin-EDTA solüsyonu ile kaldırıldıktan sonra sayıldı. 96 kuyucuklu hücre kültürü plakasına her grup (Kontrol, PANC-1 CM NK-92, HSC CM NK-92, TASC CM NK-92, TGF- β 1 NK-92 ve CM'siz NK-92) üç tekrarlı olacak şekilde kuyu başına 5×10^3 hücre sayısında 100 μ l hacimde ekildi. Plaka 37°C %5 CO₂ ortamında 24 saat boyunca inkübe edildi.



Şekil 3.1. Hücrelerden CM eldesi ve NK-92 hücre grupları

- PANC-1 hücrelerinin boyanması ve NK-92 hücrelerinin ko-kültüre edilmesi (Şekil 3.2);

- 96 kuyucuklu hücre kültürü plakalarına ekilen PANC-1 hücrelerinin 24 saatlik inkübasyon süresi bittikten sonra tüm kuyulardan besiyeri aspire edildi ve 1X PBS ile dikkatli bir şekilde yıkandı. Daha sonra gerekli hacimde 2 μ M Calcein-AM solüsyonu hazırlandı ve ışıktan

tüplerine geçirildikten sonra 180g'de 5 dakikaya kadar santrifüj edildi. Süpernatant aspire edilmiş ve 25x10⁶ hücre grubun ilgili kuyularına, kuyu başına 25x10⁶ hücre (oranında) hücre sayısında olacak şekilde 100µl DMEM:F12 besiyeri kullanılarak ekildi. PAN-01 hücre grubuna da 100µl daha DMEM:F12 besiyeri eklendi.

- 1** Besiyeri aspire edilir

2 1X PBS ile yıkama yapılır

3 50µl 2µM Calcein-AM eklenir

4 Boya aspire edilir

5 1X PBS ile 2-3 kez yıkama yapılır

6 NK-92 hücreleri ekilir

PANC-1 HÜCRELERİNİN EKİMİ

CALCEIN İŞARETLEME

PANC-1 NK-92 KOKÜLTÜRÜ

24 SAAT

30 DAKİKA

2µM Calcein-AM

37

- Floresan mikroskop yardımıyla kuyuların fotoğraflarının çekilmesi ve PANC-1 canlılığının belirlenmesi;
 - *PANC-1 ve NK-92 ko-kültürü 4 saat boyunca 37°C %5 CO₂'li inkübatörde inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda floresan mikroskopta 10x büyütmede her kuyundan beş (5) farklı bölgeden fotoğraflar alındı. Calcein pozitif hücrelerin sayısı ImageJ programı kullanılarak yapıldı. Ancak apoptotik cisimciklerin ve kabarcıkların membran bütünlüğü bozulmamış olduğu için Calcein'in salınmadığı ve bu yapıların hala Calcein pozitif olduğu bilindiği için (Somanchi ve ark., 2015) programın sayımları Calcein pozitif apoptotik hücrelerin varlığının saptanıp sayımdan düşülmesi için kontrol edildi. En son olarak PANC-1 hücrelerinin canlılığı aşağıdaki denklem kullanılarak belirlendi.*
$$\%Canlılık = [100 \times (\text{Grupların Calcein pozitif hücre sayısının ortalaması}) / (\text{PANC-1 kontrol grubunun Calcein pozitif hücre sayısının ortalaması})]$$

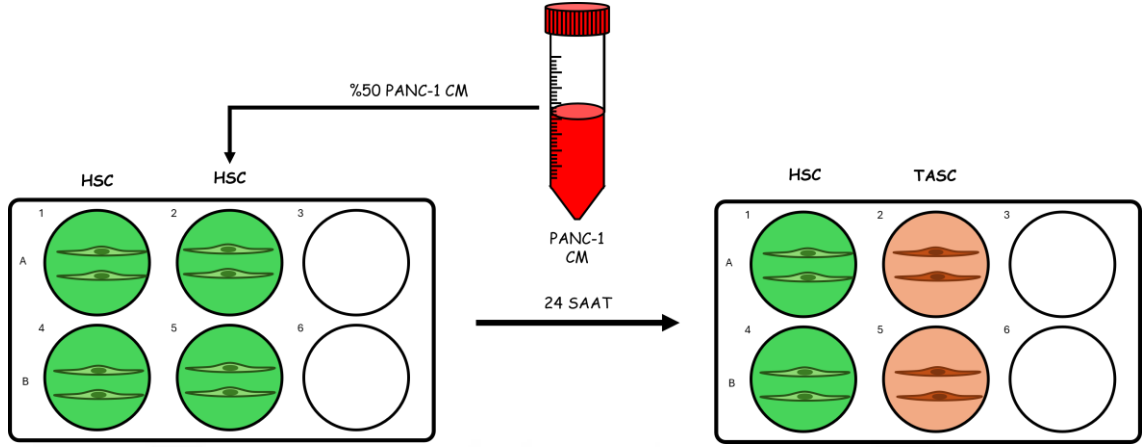
3.2.14. Western Blot analizi

Western blot analizi dediferansiye edilmek amacıyla %50 PANC-1 CM'sine maruz kalmış Schwann hücrelerinin GFAP ekspresyonunun belirlenmesi dolayısıyla Schwann hücre dediferansiyasyonunun doğrulanması amacıyla kullanıldı.

HSC'lerin dediferansiyasyonu için 6 kuyucuklu hücre kültürü plakasına 4×10^3 hücre sayısında PANC-1 ekildi. Akabinde bu hücrelerin CM'lerinin eldesi için "3.2.12. Conditioned besiyeri eldesi" başlığı altındaki adımlar izlendi.

HSC'ler 6 kuyucuklu hücre kültürü plakasına 3×10^3 hücre sayısında 2ml hacimde ekildi. 24 saat boyunca 37°C %5 CO₂'li inkübatörde inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda tüm kuyulardan besiyeri aspire edilip 1X PBS ile yıkandı. Akabinde dediferansiyasyonun yapılacağı kuyulara %50 PANC-1 CM uygulaması yapılırken kontrol grubu kuyularına 1:1 oranında [DMEM:F12]:[SCM:DMEM] besiyeri

uygulaması yapıldı ve plaka 24 saat boyunca 37°C %5 CO₂'li inkübatörde inkübe edildi (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Western blot için HSC hücrelerinin dediferansiyasyonu

İnkübasyon süresi sonunda her iki grubunda besiyerleri ayrı ayrı 15ml'lik santrifüj tüplerine toplandı. Hücreler %0,05 Tripsin-EDTA ile kaldırılmıştır ve uygun santrifüj tüplerine aktarıldıktan sonra +4°C 1000g'de 5 dakika boyunca santrifüj edildikten sonra süpernatant uzaklaştırıldı. Hücre pelleti üzerine liziz tamponu eklenip iyice al-ver yapılmıştır ve lizat mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı. Hücreler +4°C'de 45 dakika boyunca karanlıkta inkübe edildi. İnkübasyon süresi içerisinde her 15 dakikada bir 10 saniye boyunca sonikasyon yapıldı. İnkübasyon süresi sonunda mikrosantrifüj tüpleri +4°C 10.000g'de 30 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüj sonunda süpernatant ilgili yeni mikrosantrifüj tüplerine toplanıp, porsiyonlanıp -20°C'de saklandı.

Western blot yönteminin ikinci basamağı olan protein konsantrasyonunun belirlenmesi bikinkoninik asit (BCA) yöntemi ile yapılmıştır. BCA yöntemi Cu⁺² iyonlarının proteinlerin peptit bağlarının yardımıyla Cu⁺'ya indirgenmesi ve bu iyonlara iki BCA molekülünün bağlanarak güçlü mor kompleksinin oluşmasına dayanmaktadır (Wiechelman ve ark., 1988). Oluşan kompleks spektrofotometrede 562nm dalga boyunda okunmaktadır. BCA yöntemiyle protein konsantrasyonun ölçülmesi için 2mg/ml BSA çözeltisi hazırlandı ve 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625 ve 0.03125 mg/ml'lik BSA dilüsyonları yapıldı. BSA standart kuyuları 25µl hacimdedir. Örneklerden 5µl koyuldu ve 20µl distile su ile 5 kat seyreltilip 25µl hacime tamamlandı. Daha sonra bu seyreltme kat sayısı konsantrasyon hesabında göz önünde bulunduruldu. Tüm kuyulara

200µl BCA solüsyonundan eklendi ve 37°C’de 15 dakika boyunca karanlıkta inkübe edildi. İnkübasyon sonunda plaka 570nm dalga boyunda okundu. Standart kuyularından standart eğri grafiği oluşturularak örneklerin konsantrasyonu belirlendi.

Western blot yöntemi için laemmli tamponu (5x), distile su ve örnekler uygun hacimlerde karıştırıldı ve 95°C’de 5 dakika boyunca termal blokta bekletilerek denatürasyon işlemi yapıldı. %10 SDS-PAGE hazırlandı ve ilk kuyuda protein ladder olacak şekilde kuyulara örnekler yüklendi. Örnekler 100 voltta yürütme tamponuyla birlikte yürütüldü. Yürütme sonunda transfer işlemi için PVDF membran metanolde bir miktar bekletilip aktive hale gelmesi sağlandı. Daha sonra transfer blot sisteminin kasedine sırayla ped, membran, jel ve ped şeklinde koyuldu ve 2,5 amper 25 voltta 7 dakika boyunca transfer işlemi gerçekleştirildi. Transfer işlemi sonrasında membran 1X TBS-T (%0,1 Tween 20 içeren 1X TBS) ile hazırlanmış olan %5’lik yağsız süt tozu içerisinde 1 saat boyunca bloklama yapıldı. Bloklama sonunda membranlar birincil antikorla +4°C’de orbital karıştırıcıda gece boyu inkübe edildi. Birincil antikor inkübasyonu sonrası membran 5 dakika 3 kez 1X TBS-T ile yıkama yapıldı. Yıkamalar sonrası birincil antikor ile uyumlu ikincil antikor eklendi ve oda sıcaklığında orbital karıştırıcıda inkübe edildi. İkincil antikor bağlanması sonunda 5 dakika 3 kez 1X TBS-T ile yıkama yapıldı. Yıkamalar sonunda ChemiDoc görüntüleme sisteminde membran görüntülendi.

3.2.15. ELISA testi ile TGF-β1 konsantrasyonunun ölçümü

ELISA peptidlerin, proteinlerin ve hormonların vs. kantitatif analizi için kullanılan, antijen-antikor etkileşimi prensibi üzerine kurulmuş, konjuge edilmiş enzim ve substratının kullanıldığı yöntemdir (Aydın, 2015).

Hücrelerin CM’lerindeki TGF-β1 konsantrasyonunun belirlenmesi için öncelikle PANC-1 ve HSC hücreleri 2×10^5 hücre sayısında 6 kuyucuklu hücre kültürü plakasına ekildi. Bununla birlikte başka bir 6 kuyucuklu hücre kültürü plakasına HSC dediferansiyasyonu için 4×10^5 hücre sayısında PANC-1 ekildi ve CM elde etme basamaklarına uygun bir şekilde PANC-1 CM elde edilerek HSC gruplarından bir tanesine %50 PANC-1 CM uygulaması yapıldı ve dediferansiyasyon gerçekleştirildi. Hücreler ekildikten sonra 24 saat boyunca, HSC dediferansiyasyonu için 24 saat boyunca ve %1 FBS’li besiyerine geçildiği zaman da CM eldesi için 24 saat boyunca 37°C %5 CO₂’li inkübatörde inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonrası besiyerler

15ml'lik santrifüj tüplerine toplanıp 2000rpm 5 dakika boyunca santrifüj edildikten sonra CM'ler elde edildi.

ELISA testi kitin üretici firmasının belirlediği protokole göre gerçekleştirildi;

- Standartlar kit ile beraber gelen 1600ng/ml TGF- β 1 standart proteininden standart dilüsyon tamponuyla dilüe edilmesiyle 25-800ng/ml aralığında iki tekrarlı olacak şekilde standart kuyuları oluşturuldu. Kör kuyusu için herhangi bir ekleme yapılmadı, boş bırakıldı.
- CM'ler ile birlikte hücre içi TGF- β 1 konsantrasyonunun ölçülmesi için “3.2.14. *Western Blot analizi*” başlığı altında belirtildiği şekilde protein izolasyonu gerçekleştirildi. Böylelikle kullanılan hücrelerin hücre içerisindeki proteinleri elde edildi. ELISA testi sırasında bu protein örnekleri kit ile beraber gelen standart dilüsyon tamponu ile 12 kat seyreltildi. Hesaplar yapılırken bu seyreltme kat sayısı hesaplamaya katıldı.
- Örnekler üç tekrar olacak şekilde 40 μ l, standartlar 50 μ l hacimde kuyulara eklendi. Örneklerin yüklenmesinden sonra test edilen kuyulara 10 μ l anti-TGF- β 1 antikorundan eklendi. Akabinde tüm kuyulara 50 μ l Streptavidin-HRP solüsyonundan eklendi. Kuyuların bu şekilde hazırlanmasından sonra kit ile beraber gelen membran ile kuyuların üzeri kapatıldı ve 37°C'de 1 saat boyunca inkübe edildi.
- İnkübasyon sonunda 30X yıkama tamponu distile su kullanılarak 1X'e düşürüldü. Yıkamalar 1X yıkama tamponuyla 5 tekrar olacak şekilde 200 μ l hacim kullanılarak yapıldı. Her yıkama 1-2 dakika boyunca bekletilerek yapıldı ve her yıkama sonunda temiz bir filtre kağıdı kullanılarak kuyulardaki fazla sıvının düşmesi sağlandı.
- Yıkamalar sonunda kitin komponentlerinde 50 μ l “Chromogen A” ve 50 μ l “Chromogen B” kör kuyusu dahil tüm kuyulara eklendi. Plaka 37°C'de karanlıkta 10 dakika boyunca inkübe edildi.

- İnkübasyon sonunda durdurma solüsyonu tüm kuyulara 50µl hacimde eklenmiştir ve oluşan renk yoğunluğu 450nm dalga boyunda spektrofotometrede okundu.
- Standartların absorbans değerlerinden ve test edilen kuyuların absorbansından kör kuyuların absorbans ortalaması çıkarıldı.
- Standart kuyularıyla standart eğri grafiği çizilerek R^2 ve denklem elde edildi. Denklem ile test edilen kuyuların TGF-β1 konsantrasyonları hesaplandı.

3.2.16. ELISA testi ile NK-92 hücrelerinden salınan IFN-γ konsantrasyonunun ölçümü

NK-92 hücrelerinin IFN-γ salgılama kapasitesinin CM uygulamaları sonrası ne şekilde değiştiğini belirlemek amacıyla ELISA testi uygulandı. “3.2.13. *Calcein-AM boyama ile canlılık analizi*” başlığı altındaki deney gerçekleştirildikten sonra tüm kuyuların besiyerleri 1,5ml’lik ilgili mikrosantrifüj tüplerine toplandı. Mikrosantrifüj tüpleri kit protokolünü uyularak 20 dakika boyunca 3000rpm’de santrifüj edildi. Santrifüj sonunda süpernatant elde edildi ve örnekler ELISA testinde kullanıldı.

- Standartlar kit ile beraber gelen 640ng/L IFN-γ standart proteininden standart dilüsyon tamponuyla dilüe edilmesiyle 25-800ng/ml aralığında iki tekrarlı olacak şekilde standart kuyuları oluşturuldu. Kör kuyusu için herhangi bir ekleme yapılmadı, boş bırakıldı.
- Örnekler üç tekrar olacak şekilde 40µl, standartlar 50µl hacimde kuyulara eklendi. Örneklerin yüklenmesinden sonra test edilen kuyulara 10µl anti-IFN-γ antikorundan eklendi. Akabinde tüm kuyulara 50µl Streptavidin-HRP solüsyonundan eklendi. Kuyuların bu şekilde hazırlanmasından sonra kit ile beraber gelen membran ile kuyuların üzeri kapatıldı ve 37°C’de 1 saat boyunca inkübe edildi.
- İnkübasyon sonunda 30X yıkama tamponu distile su kullanılarak 1X’e düşürüldü. Yıkamalar 1X yıkama tamponuyla 5 tekrar olacak şekilde 200µl hacim kullanılarak yapıldı. Her yıkama 1-2 dakika boyunca bekletilerek yapıldı ve her yıkama sonunda temiz bir filtre kağıdı kullanılarak kuyulardaki fazla sıvının düşmesi sağlandı.

- Yıkamalar sonunda kitin komponentlerinde 50µl “Chromogen A” ve 50µl “Chromogen B” kör kuyusu dahil tüm kuyulara eklendi. Plaka 37°C’de karanlıkta 10 dakika boyunca inkübe edildi.
- İnkübasyon sonunda durdurma solüsyonu tüm kuyulara 50µl hacimde eklenmiştir ve oluşan renk yoğunluğu 450nm dalga boyunda spektrofotometrede okundu.
- Standartların absorbans değerlerinden ve test edilen kuyuların absorbansından kör kuyuların absorbans ortalaması çıkarıldı.
- Standart kuyularıyla standart eğri grafiği çizilerek R^2 ve denklem elde edildi. Denklem ile test edilen kuyuların IFN- γ konsantrasyonları hesaplandı.

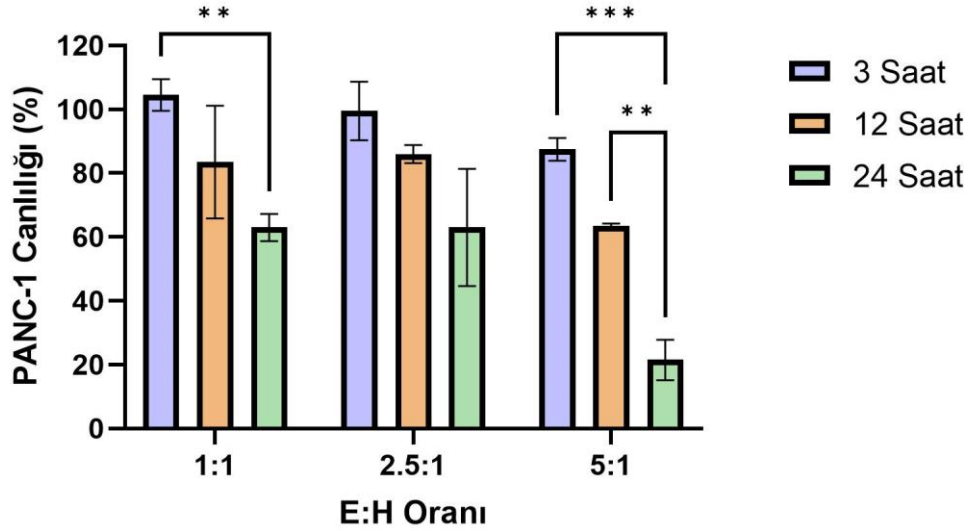
3.2.17. İstatiksel analiz

Yapılan tüm deneylerin verileri “Graphpad Prism 9.0” programı ile analiz edilip grafik haline getirilmiştir. Western blotlama deneyindeki bant görüntülerinin intensite değerleri “ImageJ” programı ile elde edilmiştir. Grupların karşılaştırılmasında one-way ve two-way Anova testi kullanılmıştır. Dunnett doğrulama yöntemi ile anlamlı değişimler için p değeri <0,05 olarak belirlenmiştir.

4. BULGULAR

4.1. SRB Canlılık Testi Bulguları

SRB analizi ileride kullanılacak olan Efektör:Hedef hücre (E:H) oranının belirlenmesi amacıyla gerçekleştirildi. Değerlendirilen E:H oranları 1:1, 2.5:1 ve 5:1 şeklindedir. SRB analizi NK hücrelerinin zamana bağlı olarak PANC-1 hücrelerinin canlılığın azaltırken, özellikle 5:1 grubunda zamana bağlı olarak PANC-1 canlılığının anlamlı bir şekilde düştüğü bulundu (Şekil 4.1). Bu nedenle ilerideki deneylerde 5:1 E:H oranı kullanılmak üzere seçildi.



Şekil 4.1. NK-92 PANC-1 kokültürü için SRB testinin bulgularını gösteren grafik. (**: p < 0,01, ***: p < 0,001)

Fakat SRB testinde proteinlerin boyandığı ve deney kurgusunun ko-kültür olduğu göz önünde bulundurulursa NK hücrelerinin de proteinlerinin boyanacağı aşıkardır. Bu nedenle NK-92 hücrelerinin de proteinlerinin boyanmaması ve böylece PANC-1 hücrelerinin canlılığını doğru bir şekilde ölçmek için kuyulardan besiyeri aspire edilip yıkamalar yapıldı ve ardından taze besiyeri koyularak protokole devam edildi. Sonuç olarak 24.saatte 5 kat fazla NK-92 hücrelerinin yeterince efektif bir şekilde PANC-1 hücrelerinin canlılığını düşürdüğü bulundu.

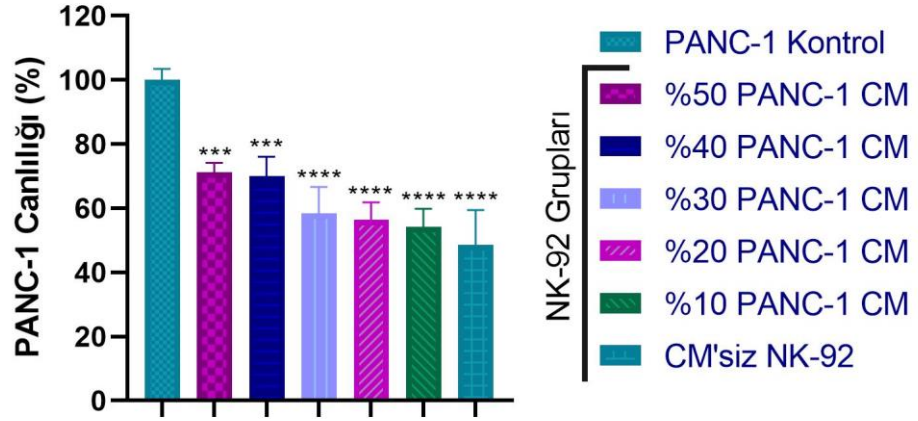
4.2. Calcein Canlılık Testi Bulguları

Calcein-AM boyası NK hücre temelli kokültür sistemlerinde hedef hücrelerin canlılığını/efektör hücrelerin sitotoksitesini belirlemek amacıyla kullanılan yöntemlerdendir. Calcein-AM dışında akış sitometrisi ya da ⁵¹krom izotopu ile de bu deneyler gerçekleştirilmektedir. Calcein-AM testinin kolay uygulanabilir yapısı aksine apoptotik hücrelerin bozulmamış membran bütünlüğü nedeniyle apoptotik hücrelerin de ışıma verdiği bilinmektedir (Somanchi ve ark., 2015).

Calcein yardımı ile ilk önce NK-92 hücrelerinin maruz bırakılacağı CM oranı belirlendi. NK-92 hücreleri PANC-1 CM'sine %50-10 oranlarında maruz bırakıldı. Sonuç olarak PANC-1 hücrelerinin canlılığı en çok %50 ve %40 PANC-1 CM'si NK-92 hücrelerine uygulandığı zaman olduğu gözlemlendi (Şekil 4.2). Bu nedenle bir sonraki deneylerde tüm hücre gruplarında %50 CM'nin kullanılmasına karar verildi.

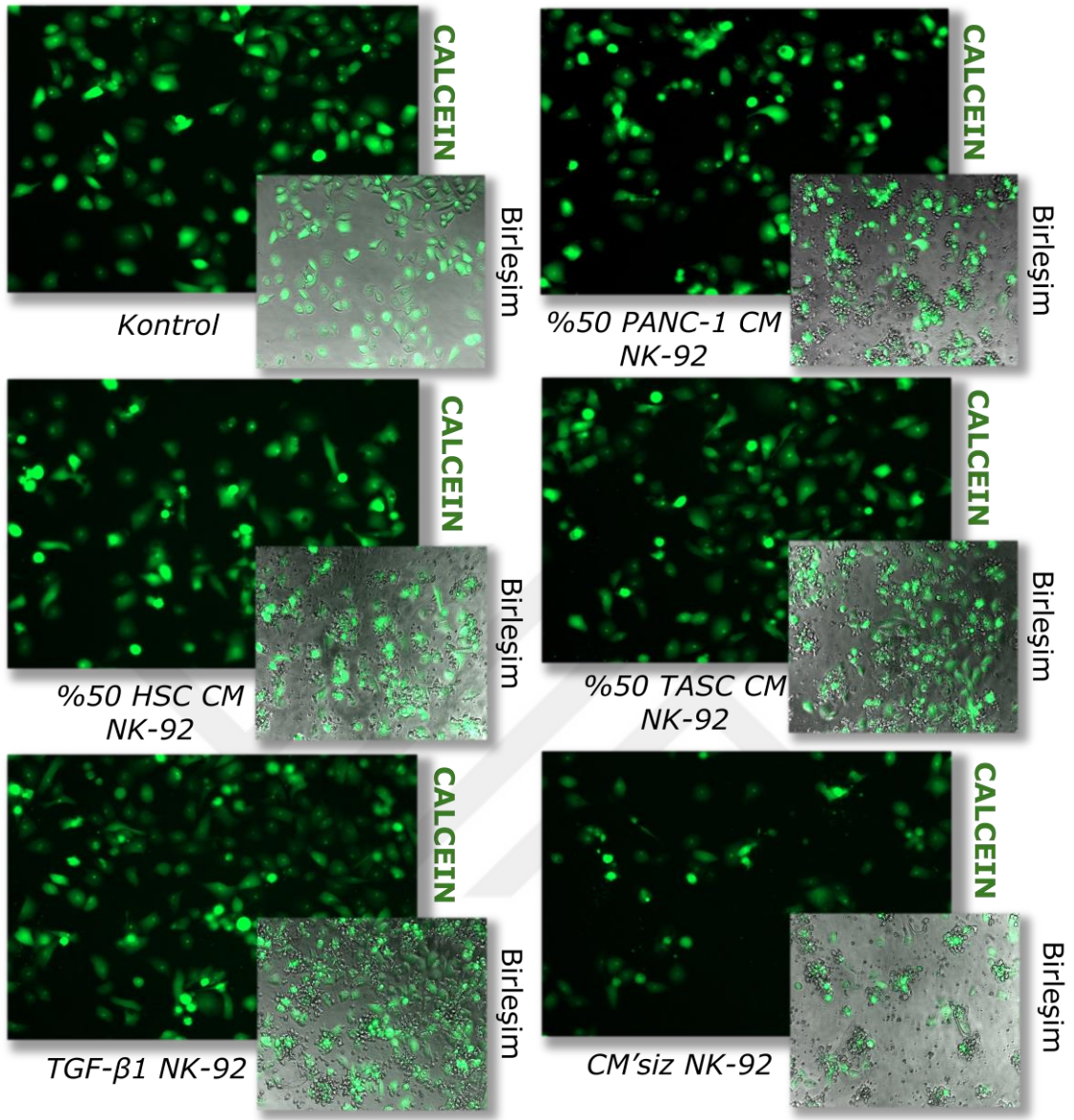
Litartüre göre NK hücreleri ile 2 boyutlu kokültürde 2-6 saat arasında inkübasyon sürelerinin kullanıldığı yayınlar vardır (Grote ve ark., 2021; Cao ve ark., 2021; Parlar ve ark., 2019; Zuo ve ark., 2023). Ayrıca NK-92 hücrelerinin CM'lere 24 saat boyunca kokültür öncesi maruz bırakıldığı için kokültür sırasında uzayan sürelerin CM'lerin etkilerini ekarte etmemesi açısından ve Calcein ışımalarının hedef hücrelerde azalabilme durumu nedeniyle 4 saatlik kokültür gerçekleştirildi. NK-92 hücreleri herhangi bir CM'ye maruz bırakılmadığı durumda 4 saat içerisinde PANC-1 hücrelerinin yaklaşık %60'ını öldürdüğü görülmektedir (Şekil 4.2). SRB canlılık testinin 5:1 ve 3 saat (Şekil 4.1) grubuna bakıldığı zaman NK-92 hücrelerinin SRB sonuçlarına interfere olduğu ortaya çıktı.

Calcein-AM 4 Saat NK-92 PANC-1 Ko-kültür



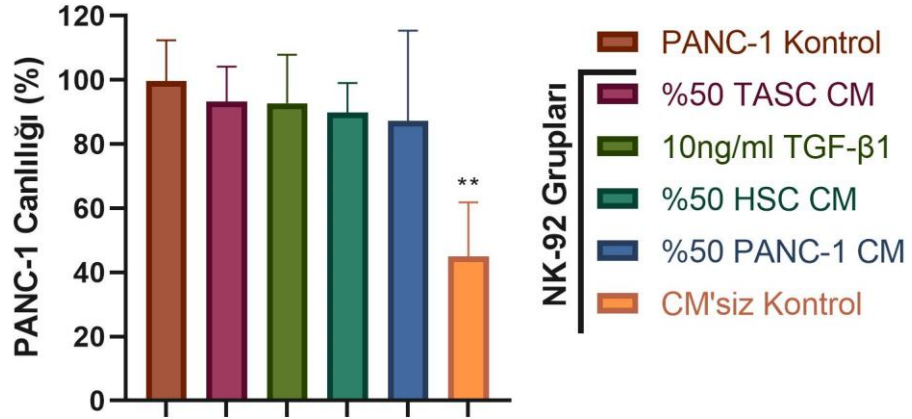
Şekil 4.2. Çeşitli PANC-1 CM'lerine maruz bırakılan NK-92 hücreleriyle beraber kültüre edilmiş PANC-1 hücrelerinin canlılık grafiği. (***: $p < 0,0001$)**

Calcein canlılık testi NK-92 hücrelerinin çeşitli hücrelerin CM'lerine 24 saat boyunca maruz bırakıldığı zaman NK-92 hücrelerinin PANC-1 hücreleri üzerindeki etkinliğini ve PANC-1 hücrelerin kokültür sonrası canlılığının ne şekilde değiştiğini belirlemek için kullanıldı. NK-92 hücreleri %50 PANC-1, %50 HSC ve %50 TASC CM'lerine ayrı ayrı maruz bırakılırken, pozitif kontrol için ayrıca 10ng/ml TGF- β 1 içeren besiyerine de maruz bırakıldı. SRB canlılık testinin sonuçlarına göre en etkin E:H oranının 5:1 olduğu belirlendiği için (Şekil 4.1) Calcein deneylerin de 5:1 E:H oranı kullanıldı. NK-92 hücreleri belirtilen koşullara 24 saat boyunca maruz bırakıldıktan sonra Calcein ile işaretlenmiş PANC-1 hücreleri ile 4 saat boyunca kokültüre edildi. 4 saat sonunda TGF- β 1 ve TASC grubunda en fazla PANC-1 canlılığı gözlemlenmekte (Şekil 4.3) ancak CM grupları arasında PANC-1 canlılığı açısından anlamlı bir değişim gözlenmedi (Şekil 4.4). Böylelikle PANC-1, HSC ve TASC CM'lerinin NK-92 hücrelerinin sitotoksik kapasitesi üzerine etkileri neredeyse aynı oranda olduğu saptandı.



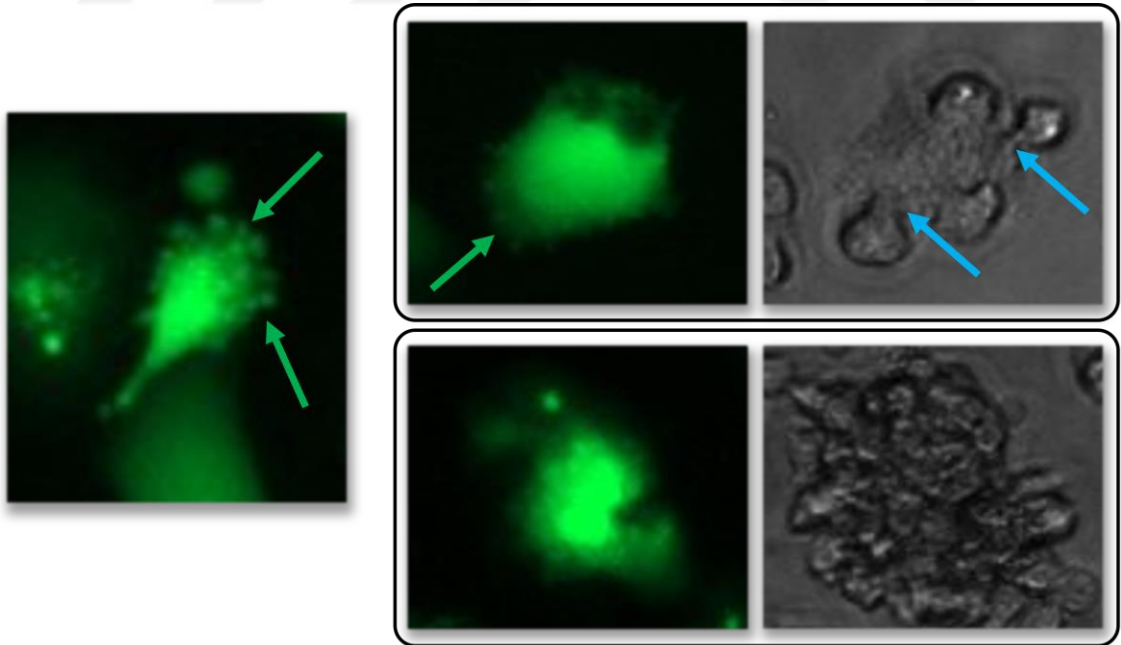
Şekil 4.3. NK-92 gruplarıyla beraber 4 saat boyunca kültüre edilmiş Calcein pozitif PANC-1 hücrelerinin floresan mikroskop görüntüleri. Fotoğraflar 10x büyütmeyle çekilmiştir.

Calcein-AM, 4 Saat, NK-92 PANC-1 Kokültür



Şekil 4.4. Çeşitli koşullarla (PANC-1, HSC, TASC CM ve TGF-β1) 24 saat inkübe edilmiş NK-92 hücreleriyle kokültüre edilmiş PANC-1 hücrelerinin Calcein canlılık grafiği. (**: $p < 0,01$)

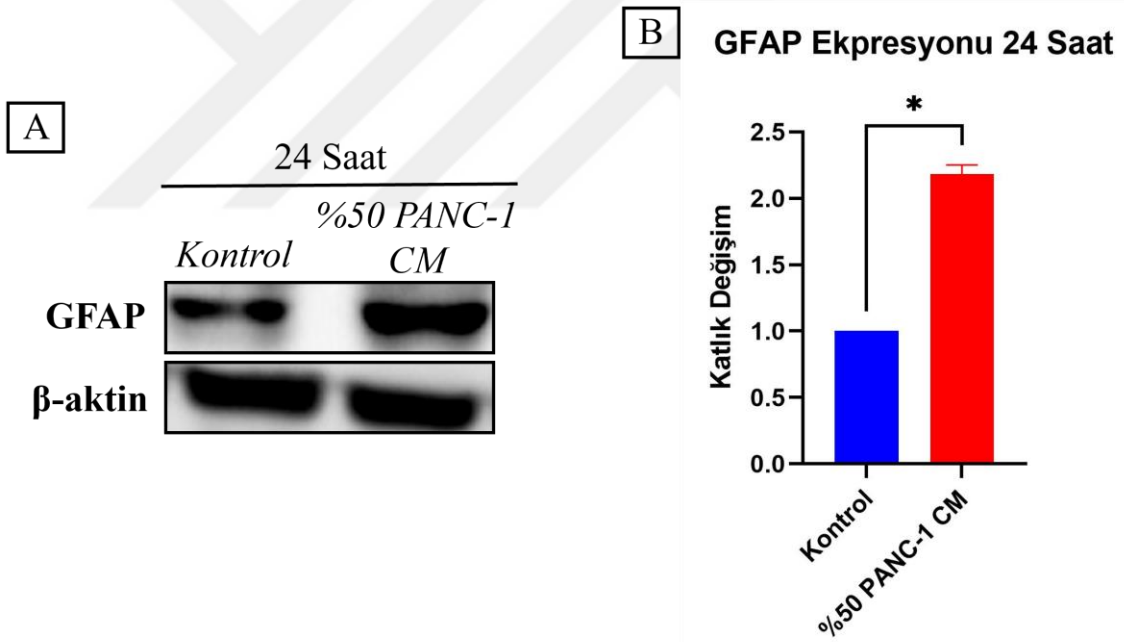
Bununla birlikte Calcein pozitif apoptotik PANC-1 hücrelerinin de varlığı saptanmıştır (Şekil 4.5). Ayrıca bu apoptotik hücreler sayım sırasında sayımdan düşüldü. Bununla birlikte NK-92 hücreleri ile PANC-1 hücreleri arasında gerçekleşen immünolojik sinapsa ilişkin görseller de yakalandı (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. Calcein pozitif apoptotik PANC-1 hücrelerinin ve NK-92 hücrelerinin oluşturduğu immünolojik sinapsların floresan mikroskop görüntüleri. Yeşil oklar apoptozun işaretçilerinden olan membran kabarcıklarını göstermektedir, mavi oklar NK-92 hücrelerinin PANC-1 hücreleri üzerinde oluşturduğu immünolojik sinapsı göstermektedir. Fotoğraflar ImageJ programıyla kırılıp, düzenlenmiştir.

4.3. Western Blot Bulguları

Schwann hücrelerinin kanser hücreleriyle etkileşime girdiği zaman GFAP ekspresyonunun artması gibi tamir/onarım ilişkili Schwann hücre özelliklerini kazandığı bilinmektedir. Bu nedenle %50 PANC-1 CM'sine maruz bırakılmış HSC hücrelerinin protein düzeyinde GFAP ekspresyonları Western blot yöntemi ile değerlendirildi. Bunun için HSC hücreleri 6 kuyucuklu hücre kültürü plakalarına ekildikten 24 saat sonra %50 PANC-1 CM'sine 24 saat boyunca maruz bırakıldı ve ardından uygun şekilde proteinleri izole edildi. Western blot sonucuna göre %50 PANC-1 CM'sine maruz bırakılmış HSC hücrelerinde protein düzeyinde GFAP ekspresyonunun kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde arttığı tespit edildi (Şekil 4.6). Böylelikle HSC hücrelerinin pankreas kanseri hücre soyu PANC-1'in CM'siyle 1:1 oranında dahi kültüre edildiğinde tamir/onarım ilişkili benzeri Schwann hücre tipine dediferansiye olduğu doğrulandı.



Şekil 4.6. Schwann hücre dediferansiyasyonun doğrulanması için gerçekleştirilen Western blot yönteminin sonuçları. A) Western blot membranının kemilüminesans görüntüsü, B) 24 saat sonunda GFAP ekspresyonunun katlık değişimini gösteren grafik. (*: $p < 0,05$)

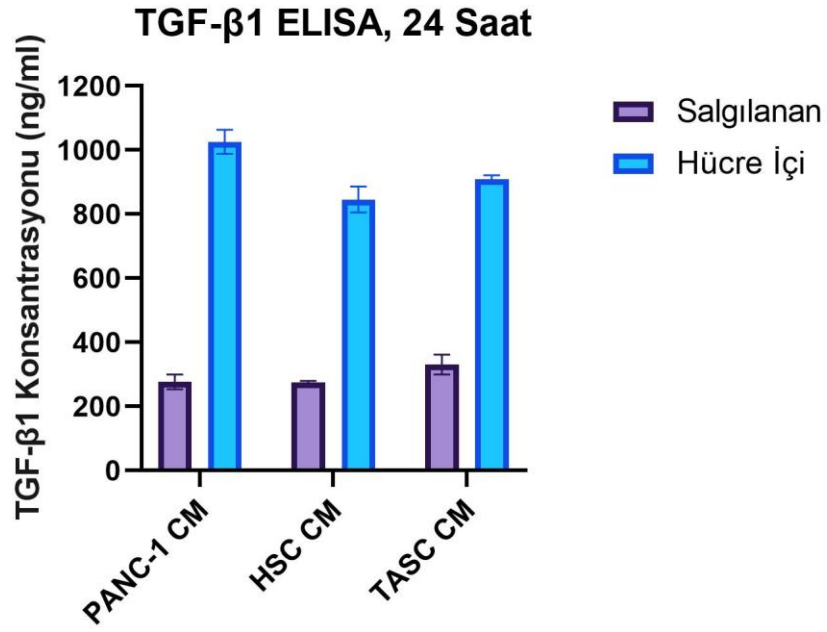
4.4. ELISA Bulguları

4.4.1. Hücre ve CM'ler içerisinde bulunan TGF- β 1 konsantrasyonunun ELISA ile ölçülmesi

TGF- β 1, TMÇ'de bolca bulunan, protümörojenik/antitümörojenik ve immünmodulator etkileri bilinen sitokinlerdendir. TMÇ'de kanser hücrelerinden ve Schwann hücrelerinden salgılanabilmektedir. Bunun dışında diğer stromal hücreler tarafından da salgılanmaktadır. Ancak Roger ve ark. tarafından yapılan çalışmada Schwann hücre soyu sNF96.2'nin pankreas kanseri hücre soyu Capan-2'den çok daha fazla TGF- β 1 salgıladığı gösterilmiş (Roger ve ark., 2019) olmasına karşın kanser hücresi tarafından dediferansiye edilmiş Schwann hücrelerinin TGF- β 1 salınımıyla ilgili bir bulgu literatürde bulunmamaktadır. Bu nedenle tümör ilişkili dediferansiye Schwann hücrelerinin TGF- β 1 salgılama kapasitesi de çalışmamıza konu olmuştur.

Bunun için hücreler 6 kuyucuklu hücre kültürü plakasına uygun besiyerleriyle ekilip 24 saat boyunca inkübe olması sağlandıktan sonra HSC dediferansiyasyonu gerçekleştirildi. 24 saatlik dediferansiyasyon sonunda CM'ler uygun şekilde toplandı. Akabinde hücreler çarpanıp proteinleri izole edildi. İzole edilen proteinler uygun şekilde dilüe edildi. Hem CM'lere hem de hücre içi örneklerle TGF- β 1 ELISA uygulaması yapıldı.

ELISA testine göre PANC-1 ve HSC hücreleri aynı miktarda TGF- β 1 salgılamakla TASC'ler bu hücrelerden biraz daha fazla TGF- β 1 salgıladığı gösterildi (Şekil 4.7). Ancak bu farkın anlamlı olmadığı da görülmektedir. Bununla birlikte hücre içi TGF- β 1 konsantrasyonunun PANC-1 hücrelerinde HSC ve TASC'lerdekine oranla daha fazla olduğu gösterildi.



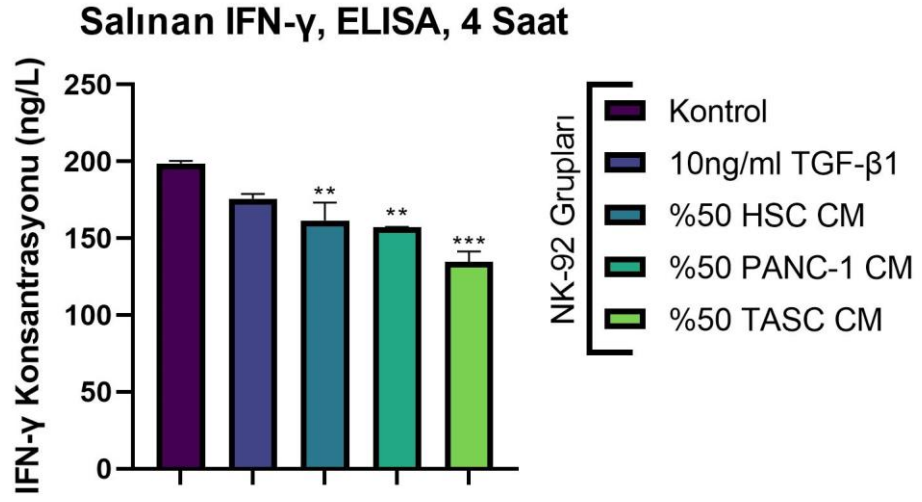
Şekil 4.7. 24 saat sonunda hücrelerin CM'lerine salınan ve hücre içi TGF- β 1 konsantrasyonunu gösteren grafik.

4.4.2. NK-92 hücrelerinden salınan IFN- γ konsantrasyonunun ELISA ile ölçülmesi

NK-92 hücreleri sitotoksik etkinliklerini birden fazla yolla sağlamaktadır, bunlardan biri de IFN- γ salgılamaktır. Ancak IFN- γ NK-92 hücrelerinden sitotoksosite yanı sıra immünmodülasyon için de salgılanmaktadır. TGF- β 1'in NK-92 hücrelerinde IFN- γ 'nın negatif regülatörü olduğu bilinmektedir. Bu nedenle CM'lere maruz kalmış olan NK-92 hücrelerinin PANC-1 kokültürü sonrası IFN- γ salınımları incelendi.

Bunun için Calcein deneyinin hemen ardından kuyulardan besiyerleri uygun şekilde toplanıp IFN- γ ELISA uygulaması yapıldı. Böylelikle 4 saat içerisinde PANC-1'leri hedefleyen NK-92 hücrelerinin IFN- γ salınımları belirlendi.

Deney sonucunda hiç CM uygulanmamış NK-92 hücrelerine oranla CM uygulanmış olan NK-92 hücrelerinde IFN- γ salınımının azaldığı gözlemlendi. CM'ler arasında ise IFN- γ konsantrasyonundaki en anlamlı düşüş %50 TASC CM uygulanmış NK-92 hücrelerinde olduğu saptandı (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. PANC-1 hücreleri ile beraber kültüre edilmiş NK-92 hücrelerinden salınan IFN- γ 'nın CM'lere olan tepkisini gösteren grafik. (**: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$)

5. TARTIŞMA

Pankreas kanseri, yüksek derece agresif ve bu nedenle düşük sağ kalım oranlarının olduğu bir kanser türüdür. Pankreas kanseri, ABD’de 2023 yılı itibarı ile tüm kanser türleri arasından en ölümcül üçüncü kanser türü olarak belirtilmiştir. Bununla birlikte mortalitesinin git gide arttığı da belirtilmiştir (Park ve ark., 2022), bu nedenle tüm dünyada kritik öneme sahip kanser türü olarak bahsedilmektedir. Pankreas kanseri tedavisindeki seçeneklerin limitli olması ve bu tedavi seçeneklerinin verimliliği hala tartışma konusudur. Bu nedenle pankreas kanseri için henüz etkin bir tedavi yöntemi bulunmadığı söylenebilir. Bununla birlikte henüz pankreas kanserine spesifik biyobelirteçin olmaması, organın vücuttaki konumu gibi sınırlamalar da tedavi ve tanıyı güçleştirmektedir. Tedavilerin etkinliğini negatif yönde etkileyen en temel sebeplerden biri TMC’dir. Bu nedenle tedavi seçeneklerinin geliştirilmesi ve başarı oranlarının artması için pankreas kanseri TMC’sinin kompozisyonu, kanser oluşum ve gelişim aşamalarındaki rollerinin daha fazla aydınlatılması gerekmektedir.

TMC pankreas kanseri hücrelerinin kemoterapiye ve radyoterapiye karşı direnç kazanmasında rol oynarken immün hücrelerin infiltrasyonunu ve etkinliğini de engelleyerek birçok yönden tümörü desteklemektedir. Böylelikle TMC’nin pankreas kanserinin agresif doğasını beslediği söylenebilir. Pankreas kanseri mikroçevresi yüksek doku sertliği, dezmoplazi, nöropati vs. gibi özellikleriyle ön plandadır (Deng ve ark., 2022). Bununla birlikte TMC’deki salgılanan komponentler TMC’nin karakteristiğini de belirlemektedir. Özellikle TGF- β hem kanser hücreleri ve immün sistem hem de sinir sistemi üzerindeki etkinliği sebebiyle dikkat çekmektedir.

Nöral invazyon, tümör hücrelerinin invazyon ve metastaz amaçlı sinirleri istila etmesini tanımlamaktadır. Pankreas kanseri dahil birçok kanser türünde varlığı bilinen bir fenomendir. Öyle ki pankreas kanseri vakaları histolojik olarak yeterince incelenirse neredeyse hepsinde nöral invazyonun varlığı iddia edilmektedir (Gasparini ve ark., 2019). PNI, kanser hücrelerinin invazyon ve metastaz süreçlerinde rol almaktadır. Birçok hücresel ve hücre dışı komponent PNI’nin oluşmasına ön ayak olurken, özellikle Schwann hücreleri bu sürecin öne çıkan destekleyicilerindendir. Şaşırtıcı bir şekilde Schwann hücrelerinin nöronlardan izole bir şekilde sadece invazif karsinom dokularında

değil, aynı zamanda erken neoplastik lezyonlar olarak kabul edilen PanIN lezyonlarında da bulunabildiği gösterilmiştir (Demir ve ark., 2014). Kanseri hücreleri Schwann hücrelerinin dediferansiyasyona teşvik ederek PNI oluşumunu kolaylaştırmaktadır. Kanseri hücreleri tarafından dediferansiyasyonu sağlanan Schwann hücrelerinde tamir/onarım ilişkili Schwann hücre tipine geçiş gerçekleşir. Bu durumda kanseri hücresi tarafından dediferansiye edilmiş Schwann hücresi belirtilen hücre grubuna spesifik moleküler değişimler geçirir; GFAP ekspresyonunun artması buna örnek verilebilir. Bununla birlikte Schwann hücrelerinden TGF- β 1'in salgılandığı da bilinmektedir (Einheber ve ark., 1995; Roger ve ark., 2019). Roger ve ark. yaptığı çalışmada Schwann hücrelerinden salınan TGF- β 1 ile pankreas kanseri agresifliği ve onkojenik potansiyeli arasında bir ilişki kurmuştur. Schwann hücrelerinin, özellikle sinir hasarı durumunda debrisin temizlenmesi için makrofajları travma bölgesine çektiği bilinmektedir. Bu nedenle Schwann hücrelerinin immünmodülasyon kapasitesi de göz önünde bulundurulmalıdır. Transgenik PDAC fare modeli ile yapılan bir çalışmada, fare modelini Schwann hücrelerden yoksun hale getirdiklerinde CD8+ T hücrelerinin infiltrasyonunun desteklendiği belirlenmiştir (Sun ve ark., 2023). Bu durum Schwann hücrelerinin tümör mikroçevresindeki immünmodulator etkinliğine kanıt olarak gösterilebilir.

Doğal öldürücü (NK) hücreler doğuştan gelen bağışıklık sisteminin sitotoksik lenfosit hücreleridir. Diğer lenfositlerin aksine antijen sunumuna ihtiyaç duymadan hedefleme yaparak sitotoksik etkinliğini gösterebilmektedir. NK hücreleri immün baskılayıcı bir TMC'den yüksek oranda etkilenebilmektedir; bunun sonucunda yorgun, sitotoksik kapasitesini ve etkinliği kaybetmiş NK hücreleri ortaya çıkmaktadır. TGF- β 1, TMC'de yoğun bir şekilde bulunur ve NK hücrelerini negatif bir şekilde etkileyerek tümör gelişimini destekleyebilir. Tüm bu bilgiler ışığında, bu çalışmada pankreas kanseri hücreleri tarafından yeniden programlanmış ve tümör ilişkisi bir duruma geçmiş olan Schwann hücrelerinin NK hücrelerini TGF- β 1 yoluyla etkileyerek *in vitro* koşullarda pankreas kanseri hücrelerinin hayatta kalma potansiyellerini ne şekilde etkilediği araştırma sorusu olarak ortaya çıkmıştır.

Çalışmada ilk olarak pankreas kanseri hücre soyu PANC-1 hücreleri ile doğal öldürücü hücre soyu NK-92 hücrelerinin birlikte kültüre edilerek oluşturulmuş kokültür ortamında Etki:Hedef hücre (E:H) oranı belirlendi. Bu amaçla SRB canlılık testi

uygulandı. SRB testinde PANC-1 ve NK-92 hücre kokültürü üç farklı zamanda (3, 12, 24.saat) ve her zaman noktası için de üç farklı E:H oranı (1:1, 2,5:1, 5:1) değerlendirildi. SRB testinin sonucuna göre 3.saate kıyasla 5 kat fazla NK-92 hücrelerinin 24.saatte PANC-1 hücrelerinin canlılığını yaklaşık %20'ye düşürdüğü bulundu. Bu nedenle ilerideki deneylerde 5:1 E:H oranının kullanılması kararlaştırıldı. SRB boyası kokültür sistemlerinde kuyulardaki tüm hücrelerin proteinlerini boyayacak olması nedeniyle kullanışsız olduğu için yıkamalar yapıldı. Ancak yıkamalara rağmen NK-92 hücrelerinin proteinlerinin de boyandığı mikroskop yardımı ile saptandı. Daha sonra kokültür sistemlerinde daha kullanışlı ve literatürde de NK-92 hücrelerinin sitotoksitesinin belirlenmesinde çokça kullanılan Calcein boyama ilerideki deneyler için tercih edildi. NK-92 hücrelerinin hedef hücrelerle birlikte kültürünün çok daha kısa sürelerde (2-6 saat) gerçekleştirildiği literatür örneklerinin bulunması sebebiyle Calcein canlılık testinde 4 saatlik kokültür yapılması kararlaştırılmıştır. Calcein canlılık testinin sonuçlarıyla SRB testinin 3.saat 5:1 E:H grubunun sonuçlarının uyumsuz olduğu bulundu. Bunun sebebi ise SRB testinin çalışma prensibi nedeniyle kokültür deneylerinde kullanışsız olmasıdır. Kullanışsız olma durumu özellikle kokültür içerisinde bir grup hücrenin canlılığının belirlenmesi amaçlar arasında olduğu zaman ortaya çıkmaktadır. Literatürde NK-92 kokültür sistemlerinde çoğunlukla 1:1 ile 10:1 arasında değişen E:H oranları kullanılmaktadır. Bu nedenle çalışmamızda, literatürde kullanılan bu oranlardan yola çıkılarak E:H oranları belirlendi.

Ardından pankreas kanseri hücre soyu PANC-1 hücrelerinden TGF- β 1 dahil salgılanan faktörlerin NK-92 hücrelerinin PANC-1 hücrelerini öldürme kapasitesi üzerindeki etkileri PANC-1 hücrelerinin Calcein-AM ile boyanmasıyla değerlendirildi. Bu doğrultuda ilk önce PANC-1 hücrelerinin CM'si elde edildi ve NK-92 hücreleri %10-50 arasında değişen oranlarla PANC-1 CM'sine 24 saat boyunca maruz bırakıldıktan sonra Calcein-AM ile işaretlenmiş PANC-1 hücreleriyle birlikte 4 saat boyunca kültüre edildi. 4 saatlik kokültür sonunda PANC-1 hücrelerinin canlılığı floresan mikroskop aracılığıyla değerlendirildi. Deneyin sonucuna göre NK-92 hücrelerinin PANC-1 hücrelerini öldürme yeteneklerindeki en anlamlı düşüşün %50 PANC-1 CM'sine maruz bırakıldığı zaman gerçekleştiği gözlemlendi (Şekil 4.2). Bu nedenle diğer deneylerde de test edilecek diğer hücrelerin CM'leri için de %50 oranı kullanıldı. Ancak CM oranları arasında PANC-1 canlılığı açısından farkların az olduğu

da gözlemlenmiştir (Şekil 4.2). Bunun sebebi NK-92 hücrelerinin kültüründe kullanılan IL-2 olabilir; IL-2 NK-92 hücrelerinin proliferasyonunu ve sitotoksitesini desteklemek amacıyla NK-92 hücrelerinin normal kültüründe kullanılmaktadır. NK-92 hücrelerine CM uygulaması sırasında hem NK-92 hücrelerini IL-2 açısından yoksun bırakmamak için hem de tüm gruplardaki durumun eşit olabilmesi için tüm gruplara eşit oranda IL-2 eklemesi yapılmıştır. Bu durumda CM'lerin NK-92 hücrelerini negatif etkilerken IL-2'nin pozitif etkiliyor olması bu sonucun alınmasına yol açmış olabilir.

Bununla birlikte SRB testinde uygulanandan farklı olarak Calcein canlılık testinde 4 saatlik birlikte inkübasyon süresi kullanıldı. Bunun sebebine literatürde genellikle daha kısa birlikte kültür zamanlarının kullanılmasıdır. Bu çalışmalardan birine örnek olarak şu literatür örneği verilebilir; periferik NK hücrelerinin kullanıldığı literatür örneği çalışmada, sağlıklı donörlerden izole edilmiş NK hücrelerinin IL-15 (IL-2 gibi NK hücrelerinin stimülasyonunda kullanılan sitokinlerden) ile uyarılması gerçekleştirildikten sonra 4 saat boyunca üç farklı pankreas kanseri hücre soyuyla kokültüre edildiğinde, 5:1 E:H oranının pankreas kanseri hücre soyları Mia-Paca-2 ve BxPC-3'nin canlılığını yaklaşık %40 oranında düşürdüğü gösterilmiştir (Van Audenaerde ve ark., 2017). Literatürdeki bu bilgiyle CM uygulaması yapmadığımız NK-92 hücrelerinin PANC-1 hücrelerini öldürme kapasitesiyle ters düştüğünü görmekteyiz (Şekil 4.2, Şekil 4.4). Bunun başlıca sebebi literatürdeki bu çalışmada sağlıklı donörlerden NK hücrelerinin izole edilmiş olması olabilir. Ayrıca donörler arasındaki heterojenite ve NK-92 hücrelerinin periferik NK hücrelerine oranla aktive edici reseptörleri daha fazla, inhibe edici reseptörleri nispeten daha az eksprese etmesi başlıca sebepler olabilir.

Demir ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, pankreas kanseri hücrelerinden elde edilmiş CM'lerin Schwann hücrelerin kültüründe kullanıldığında Schwann hücrelerinin GFAP ekspresyonunun arttığı western blot ile gösterilmiştir (Demir ve ark., 2016). Ayrıca literatürde pankreas kanseri hücrelerinin sinirleri istila etmesi sonucunda Schwann hücrelerinin kanser hücreleriyle yakın temasının da Schwann hücrelerinde GFAP ekspresyonunun artmasıyla sonuçlandığına dair çalışma da mevcuttur, bu da sinir hasarı sonucunda dediferansiye olan Schwann hücreleriyle ilişkilendirilmiştir (Deborde ve ark., 2016). Bu literatür bilgilerinden yola çıkarak, çalışmamızda PANC-1 hücrelerinden Schwann hücrelerinin dediferansiyasyonunu sağlamak amacıyla CM

toplandı. Schwann hücrelerinin tümör ilişkili Schwann hücre tipine dediferansiye olmaları için %50 PANC-1 CM'sine 24 saat boyunca maruz bırakıldıktan sonra bu hücrelerin GFAP ekspresyonu western blot ile belirlendi. Çalışmamızda western blot sonucuna göre %50 PANC-1 CM uygulamasının Schwann hücrelerinin GFAP ekspresyonunu kontrol grubuna göre 2 kat arttırdığı bulundu. Böylelikle pankreas kanseri hücre soyu PANC-1 hücrelerinin CM'siyle etkileşime geçen Schwann hücrelerinin yeniden programlandığı doğrulandı ve bu sonucun literatür ile uyumlu olduğu bulundu.

Makrofajların sinir hasarı sonrası hasarlı myelinlerin ortamdan temizlenmesi ve debrisin kaldırılması için Schwann hücreleri tarafından sinir hasarı bölgesine migrasyonlarının sağlandığı bilinmektedir (Zhang ve ark., 2020). Ayrıca Sun ve ark. pankreas kanseri modelini Schwann hücrelerinden yoksun hale getirdiklerinde sitotoksik T lenfositlerin tümör içerisine infiltrasyonunun arttığını göstermişlerdir (Sun ve ark. 2023). Bu çalışmalar Schwann hücrelerinin immün modülasyonda da rol aldığına kanıt olarak değerlendirilebilir. Ayrıca Roger ve ark. tarafından Schwann hücre kaynaklı TGF- β 1'in pankreas kanseri hücrelerinin onkojenik potansiyelini arttırdığı gösterilmiştir (Roger ve ark., 2019).

Literatürde bazı kanser türlerine ait CM'lerin NK-92 hücreleri üzerinde etkilerini araştıran çalışmalar bulunurken (Grote ve ark., 2021) pankreas kanseri hücreleri ve Schwann hücrelerinin CM'sinin NK-92 hücreleri üzerindeki etkilerinin araştırıldığı bir çalışma bulunmamaktadır. Bu literatür bilgileri doğrultusunda pankreas kanseri hücreleri tarafından dediferansiye edilmiş Schwann hücrelerinin TGF- β 1 yoluyla NK-92 hücrelerinin pankreas kanseri hücrelerine karşı olan sitotoksitesi üzerine etkileri araştırılmıştır. PANC-1 hücrelerinin canlılığı Calcein-AM boyası kullanılarak değerlendirilmiştir. Buna göre, CM uygulaması yapılmamış NK-92 hücrelerine kıyasla PANC-1, HSC ve TASC CM uygulaması yapılmış NK-92 hücrelerinin PANC-1 hücrelerini öldürme kapasitesinin anlamlı bir şekilde düştüğü bulundu (Şekil 4.4). Ancak CM grupları arasında özellikle HSC ve TASC hücrelerinin CM'lerinin uygulanmasının PANC-1 hücrelerinin canlılığına olan etkileri arasında bir fark olmadığı bulundu. Bunun en temeli sebebi, Schwann hücrelerinin yüksek plastisite kabiliyeti olabilir. Çalışmamızda dediferansiyasyonun indüklenebilmesi için PANC-1 hücrelerine ait CM Schwann hücrelerinin bulunduğu kuyulara 1:1 oranında eklendikten

sonra 24 saatlik inkübe edildi. Ardından dediferansiye edilmiş Schwann hücreleri CM toplaması için %1 serum içeren SCM:DMEM besiyerine geçirildi ve TASC CM toplaması yapıldı. Bu noktada Schwann hücrelerin %10 serum içeren besiyerinden %1 serum içeren besiyerine geçirilmesi Schwann hücrelerinin dediferansiyasyon kapasitesini etkilemesi söz konusu olabilir. %1 serumlu besiyerinin Schwann hücrelerin dediferansiyasyonu üzerindeki etkilerinin belirlenmesi ileride planladığımız çalışmalar arasındadır.

Calcein canlılık testinde pozitif kontrol olarak TGF- β 1'in literatüre göre NK-92 hücrelerini inhibe ettiği bilinen 10ng/ml konsantrasyonu kullanılmıştır. Literatürle uyumlu şekilde 10ng/ml TGF- β 1 eklemesi ile inkübe edilen NK-92 hücreleriyle kokültüre edilmiş PANC-1 hücrelerinin canlılığının yaklaşık %90-92 olduğu gözlemlendi.

Yukarıda da belirtildiği gibi NK-92 hücreleriyle birlikte kültüre edilmiş PANC-1 hücrelerinin canlılığı Calcein-AM boyama ile belirlendi. Calcein-AM hücre membranından geçebilen bir maddedir ve hücre içerisinde esterazlar tarafından katalize edildiğinde Calcein formuna dönüşür. Calcein, 517nm emisyon dalga boyunda floresan olarak görüntülenebilmektedir. Hücre içerisinde Calcein artık hücre membranından geçemeyen bir form olarak durmaktadır. Apoptotik hücrelerin erken safhada henüz membran bütünlüğü bozulmadığı için Calcein pozitif olduğu bilinmektedir (Somanchi ve ark., 2015). Çalışmamızda da hala Calcein pozitif olan apoptotik hücrelerin varlığı gözlemlendi (Şekil 4.5).

Bu çalışmanın amacı PANC-1, HSC ve TASC CM'lerinde yer alan TGF- β 1'nin NK-92 hücreleri üzerindeki etkilerinin araştırılması olduğundan dolayı bu CM'lerde bulunan TGF- β 1 konsantrasyonunun belirlenmesi amacıyla ELISA yapıldı. ELISA sonuçlarına göre üç hücrenin de CM'lerinde neredeyse aynı oranda TGF- β 1 varlığı bulundu (Şekil 4.7). Ancak TASC CM'sinde çok az da bir artış olmasına rağmen artışın anlamlı olmadığı bulundu (Şekil 4.7). HSC ve PANC-1 hücrelerinin salgıladığı TGF- β 1 konsantrasyonu arasında farkın bulunmaması Roger ve ark. yapmış olduğu çalışmanın sonuçlarıyla uyumsuzdur (Roger ve ark., 2019). Literatür ile uyumsuzluğun sebepleri birden fazla olabilir. İlk olarak Roger ve ark. çalışmasında pankreas kanseri hücre soyu Capan-2 ve Schwann hücre soyu sNF96.2 hücrelerini kullanırken, bizim çalışmamızda

PANC-1 ve HSC hücrelerini kullandı. Literatürde Capan-2 hücre soyunun TGF- β 1'i neredeyse hiç salgılamadığını gösteren çalışma vardır (Bellone ve ark., 1999). Ayrıca sNF96.2 hücre soyu tip 1 nörofibromatozis hastasından izole edildiği bildirilirken HSC hücreleri sağlıklı Schwann hücre soyudur. Bu nedenle literatür ile çalışmamız arasındaki bu farklılığın sebebi hücrelerin karakteristiği sebebiyle olabileceğini düşünmekteyiz. HSC ve TASC hücrelerinin salgıladığı TGF- β 1 konsantrasyonu arasındaki farkın olmamasının sebebi ise Schwann hücrelerin yüksek plastisite kabiliyeti olabilir. Dediferansiye ettiğimiz HSC hücrelerinin CM'sini toplamak için %1 hücreleri serumlu besiyerine geçirip 24 saat boyunca inkübe etmemiz Schwann hücrelerinin dediferansiye olmuş fenotiplerini kaybetmelerine sebebiyet vermiş olabilir.

Bununla birlikte bu üç hücre grubunun intraselüler TGF- β 1 konsantrasyonu da belirlendi. PANC-1 hücrelerinin TGF- β 1'i daha fazla ürettiği, TASC hücrelerinin ise HSC hücrelerine göre daha fazla TGF- β 1 ürettiği gösterildi (Şekil 4.7). Literatürde PANC-1 hücrelerinin özellikle otokrin amaçlı TGF- β 1'i salgıladığı raporlanmıştır (Ellenrieder ve ark., 2001). Toplam TGF- β 1 oranına bakıldığı zaman en fazla TGF- β 1'in en fazla PANC-1 hücrelerinden salgılandığı görülürken, bu hücrelerden salınan TGF- β 1'in az olduğu görüldü (Şekil 4.7). Ayrıca TASC hücrelerinin HSC hücrelerine göre TGF- β 1 üretimini arttığı söylenebilir. Bu nedenle TASC hücreleri yeterince TGF- β 1 ürettiği halde salgıladıkları TGF- β 1'in az kalmasının sebebi 24 saatin yetersiz olması olabilir ya da dediferansiyasyon sonucunda hücrelerin TGF- β 1 salgılama yeteneklerinde değişimler gerçekleşmiş olabilir.

Literatüre göre NK hücrelerinde TGF- β 1'in IFN- γ ekspresyonunu düşürdüğü bilinmektedir. Bu nedenle çeşitli hücrelerden elde edilen CM'ler ile birlikte inkübe edilen NK-92 hücreleri, PANC-1 hücreleri ile 4 saat boyunca birlikte kültüre edildikleri zaman salgıladıkları IFN- γ konsantrasyonundaki değişim ELISA testi ile belirlendi. CM uygulaması yapılmamış NK-92 hücreleri ve NK hücrelerini inhibe ettiği bilinen konsantrasyon olan 10ng/ml TGF- β 1'e kıyasla, hipotezimizle uyumlu olarak IFN- γ salınımında anlamlı düşüşün en fazla olduğu grubun %50 TASC CM uygulanmış NK-92 grubunun olduğu bulundu (Şekil 4.8). Fakat TGF- β 1 ELISA sonuçlarına göre CM grupları arasında anlamlı bir farkın bulunmuyor oluşu göz önüne alınırsa (Şekil 4.7) TASC CM'sinde NK-92 hücrelerindeki IFN- γ ekspresyonunu negatif bir şekilde regüle edebilecek faktörler olabileceğini düşünmekteyiz. Bununla birlikte ELISA için

kullanılan CM'ler seyrelmiş durumdadır, bu nedenle CM'lerin konsantre hale getirilip ELISA'larının yapılması TGF- β 1 konsantrasyonunun daha doğru belirlenmesi için gerekli olabilir.

Elde edilen bu sonuçların ışığında pankreas kanseri hücreleri tarafından dediferansiye edilmiş Schwann hücrelerinin NK-92 hücrelerinin sitotoksik kapasitesi üzerinde negatif bir etki gerçekleştirdiği söylenebilir. Ancak bu etkide TGF- β 1 tek ya da ana sorumlu faktör olmayabilir. Bu nedenle Schwann hücrelerden salınan immünmodülatör proteinlerin NK hücreler üzerindeki etkilerinin araştırılması gerekmektedir. Ayrıca dediferansiye Schwann hücrelerinin pankreas kanseri hücrelerinin perinöral invazyonunu sağlaması sadece salınan faktörlerle olmadığı fiziksel etkileşimin de olması gerektiğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Deborde ve ark., 2022). Bu nedenle Schwann hücrelerinin immünmodülasyon etkinlikleri de fiziksel etkileşimler üzerinden de incelenmelidir. Ayrıca TASC CM'si uygulanmış NK-92 hücrelerinde IFN- γ salınımı azalmış olsa da (Şekil 4.8) PANC-1 hücrelerinin canlılığı üzerinde CM grupları arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır (Şekil 4.4). NK-92 hücrelerinden IFN- γ immünmodülasyon amaçlı da kullanıldığı için CM'lere maruz kalmış NK-92 hücrelerdeki moleküler düzeydeki değişimlerin incelenmesi gerekmektedir; örneğin reseptör ekspresyon değişimleri ya da sitotoksosite yollarından sorumlu proteinlerin ekspresyonları değerlendirilmelidir. Bu doğrultuda çalışmamızın NK-92 sitotoksosite yollarını araştırma yönünden zayıf kaldığını söyleyebiliriz. Yukarıda da bahsettiğimiz gibi çalışma farklı açılardan ele alınarak genişletilecek ve tamamlanacaktır.

6. SONUÇ, ÖNERİLER VE TOPLUMA KATKI

Bu çalışma pankreas kanseri mikroçevresindeki dediferansiye Schwann hücrelerinin NK hücrelerinin sitotoksitesi üzerindeki etkilerinin araştırıldığı ilk çalışmadır. Hücre sayılarının optimizasyonu dışında çalışmada öncelikle western blot yöntemiyle PANC-1 CM'siyle beraber inkübe edilmiş Schwann hücrelerinin dediferansiyasyonu doğrulandı. Ardından pankreas kanseri, normal Schwann hücresi ve dediferansiye Schwann hücrelerinin Conditioned besiyeri (Conditioned medium, CM) ile inkübe edilmiş NK-92 hücrelerinin PANC-1 hücre canlılığı üzerindeki etkinlikleri Calcein-AM boyama ile belirlendi. Akabinde bu hücrelerin intraselüler ve salgıladığı TGF- β 1 konsantrasyonu belirlendi. Son olarak da PANC-1 NK-92 kokültürü sonrası IFN- γ salınım konsantrasyonu ELISA yöntemleriyle belirlendi.

Sonuç olarak CM'lerin yaklaşık olarak aynı oranda NK-92 hücrelerinin öldürme kapasitesine etki ettiği gözlemlenirken, dediferansiye edilmiş Schwann hücrelerinin NK-92 hücrelerinin IFN- γ salgılama kapasitesini kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir şekilde azalttığı belirlendi. Ancak TGF- β 1 ELISA sonuçları PANC-1, HSC ve TASC CM'lerinin neredeyse aynı oranda TGF- β 1 bulundurduğu saptandı. Bu nedenle TASC hücrelerinden NK-92 hücrelerinin IFN- γ salınımını negatif olarak etkileyebilecek başka komponentlerin de olabileceği üzerinde duruldu. İleri çalışmalarda NK-92 hücrelerinde bu CM gruplarına maruziyet sonrasında moleküler düzeyde hangi değişimlerin meydana geldiği belirlenmelidir. Ayrıca bu çalışmada sadece hücrelerden salınan komponentler ile NK-92 hücrelerinin etkilenmesi sağlandı, hücreler arasında fiziksel bir etkileşim gerçekleşmedi. Bu nedenle ilerideki çalışmalarda Schwann hücreleriyle NK-92 hücrelerinin fiziksel olarak nasıl etkileştiği de ortaya çıkarılmalıdır.

Bu çalışmada, literatüre pankreas kanserinde NK hücre disfonksiyonuna farklı bir bakış açısı kazandırılmaya çalışılmıştır. Bu yönde yapılacak çalışmalar perinöral invazyonun yoğun bir şekilde gerçekleştiği pankreas kanserinin mikroçevresinin aydınlatılmasına dolayısıyla immüterapi verimliliğinin ve başarısının artırılmasında rol oynayabilir.

KAYNAKÇA

Aydin, S. (2015). A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides*, 72, 4–15. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2015.04.012>.

Bardeesy, N., & DePinho, R. A. (2002). Pancreatic cancer biology and genetics. *Nature Reviews Cancer* 2002 2:12, 2(12), 897–909. <https://doi.org/10.1038/nrc949>.

Bao, Y., Giovannucci, E., Fuchs, C. S., & Michaud, D. S. (2009). Passive smoking and pancreatic cancer in women: a prospective cohort study. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention : A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 18(8), 2292–2296. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-09-0352>.

Bapat, A. A., Hostetter, G., Von Hoff, D. D., & Han, H. (2011). Perineural invasion and associated pain in pancreatic cancer. *Nature Reviews. Cancer*, 11(10), 695–707. <https://doi.org/10.1038/nrc3131>.

Bellone, G., Turletti, A., Artusio, E., Mareschi, K., Carbone, A., Tibaudi, D., Robecchi, A., Emanuelli, G., & Rodeck, U. (1999). Tumor-Associated Transforming Growth Factor- β and Interleukin-10 Contribute to a Systemic Th2 Immune Phenotype in Pancreatic Carcinoma Patients. *The American Journal of Pathology*, 155(2), 537–547.

Caja, F., & Vannucci, L. (2015). TGF β : A player on multiple fronts in the tumor microenvironment. *Journal of Immunotoxicology*, 12(3), 300–307. <https://doi.org/10.3109/1547691X.2014.945667>.

Castriconi, R., Cantoni, C., Della Chiesa, M., Vitale, M., Marcenaro, E., Conte, R., Biassoni, R., Bottino, C., Moretta, L., & Moretta, A. (2003). Transforming growth factor beta 1 inhibits expression of NKp30 and NKG2D receptors: Consequences for the NK-mediated killing of dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(7), 4120–4125. <https://doi.org/10.1073/pnas.0730640100>.

Cao, B., Liu, M., Huang, J., Zhou, J., Li, J., Lian, H., Huang, W., Guo, Y., Yang, S., Lin, L., Cai, M., Zhi, C., Wu, J., Liang, L., Hu, Y., Hu, H., He, J., Liang, B., Zhao, Q., & Zhu, K. (2021). Development of mesothelin-specific CAR NK-92 cells for the treatment of gastric cancer. *International Journal of Biological Sciences*, 17(14), 3850–3861. <https://doi.org/10.7150/ijbs.64630>

Ceyhan, G. O., Bergmann, F., Kadihasanoglu, M., Altintas, B., Demir, I. E., Hinz, U., Müller, M. W., Giese, T., Büchler, M. W., Giese, N. A., & Friess, H. (2009). Pancreatic neuropathy and neuropathic pain—A comprehensive pathomorphological

study of 546 cases. *Gastroenterology*, 136(1), 177-186.e1. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.09.029>.

Cicenas, J., Kvederaviciute, K., Meskinyte, I., Meskinyte-Kausiliene, E., & Skeberdyte, A. (2017). KRAS, TP53, CDKN2A, SMAD4, BRCA1, and BRCA2 Mutations in Pancreatic Cancer. *Cancers*, 9(5). <https://doi.org/10.3390/CANCERS9050042>.

Chari, S. T., Leibson, C. L., Rabe, K. G., Ransom, J., de Andrade, M., & Petersen, G. M. (2005). Probability of pancreatic cancer following diabetes: a population-based study. *Gastroenterology*, 129(2), 504–511. <https://doi.org/10.1016/J.GASTRO.2005.05.007>.

Coyle, K. M., Hawke, L. G., & Ormiston, M. L. (2023). Addressing Natural Killer Cell Dysfunction and Plasticity in Cell-Based Cancer Therapeutics. *Cancers*, 15(6), Article 6. <https://doi.org/10.3390/cancers15061743>.

Dahmani, A., & Delisle, J.-S. (2018). TGF- β in T Cell Biology: Implications for Cancer Immunotherapy. *Cancers*, 10(6), Article 6. <https://doi.org/10.3390/cancers10060194>.

Deborde, S., Omelchenko, T., Lyubchik, A., Zhou, Y., He, S., McNamara, W. F., Chernichenko, N., Lee, S.-Y., Barajas, F., Chen, C.-H., Bakst, R. L., Vakiani, E., He, S., Hall, A., & Wong, R. J. (2016). Schwann cells induce cancer cell dispersion and invasion. *The Journal of Clinical Investigation*, 126(4), 1538–1554. <https://doi.org/10.1172/JCI82658>.

Deborde, S., & Wong, R. J. (2017). How Schwann cells facilitate cancer progression in nerves. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 74(24), 4405–4420. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2578-x>.

Deborde, S., Gusain, L., Powers, A., Marcadis, A., Yu, Y., Chen, C.-H., Frants, A., Kao, E., Tang, L. H., Vakiani, E., Amisaki, M., Balachandran, V. P., Calo, A., Omelchenko, T., Jessen, K. R., Reva, B., & Wong, R. J. (2022). Reprogrammed Schwann Cells Organize into Dynamic Tracks that Promote Pancreatic Cancer Invasion. *Cancer Discovery*, 12(10), 2454–2473. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1690>.

Deer, E. L., Gonzalez-Hernandez, J., Coursen, J. D., Shea, J. E., Ngatia, J., Scaife, C. L., Firpo, M. A., & Mulvihill, S. J. (2010). Phenotype and Genotype of Pancreatic Cancer Cell Lines. *Pancreas*, 39(4), 425–435. <https://doi.org/10.1097/MPA.0b013e3181c15963>.

Demir, I. E., Boldis, A., Pfitzinger, P. L., Teller, S., Brunner, E., Klose, N., Kehl, T., Maak, M., Lesina, M., Laschinger, M., Janssen, K.-P., Algül, H., Friess, H., & Ceyhan, G. O. (2014). Investigation of Schwann Cells at Neoplastic Cell Sites Before

the Onset of Cancer Invasion. JNCI: Journal of the National Cancer Institute, 106(8), dju184. <https://doi.org/10.1093/jnci/dju184>.

Demir, I. E., Tieftrunk, E., Schorn, S., Saricaoglu, Ö. C., Pfitzinger, P. L., Teller, S., Wang, K., Waldbaur, C., Kurkowski, M. U., Wörmann, S. M., Shaw, V. E., Kehl, T., Laschinger, M., Costello, E., Algül, H., Friess, H., & Ceyhan, G. O. (2016). Activated Schwann cells in pancreatic cancer are linked to analgesia via suppression of spinal astroglia and microglia. *Gut*, 65(6), 1001–1014. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-309784>.

Deng, D., Patel, R., Chiang, C.-Y., & Hou, P. (2022). Role of the Tumor Microenvironment in Regulating Pancreatic Cancer Therapy Resistance. *Cells*, 11(19), Article 19. <https://doi.org/10.3390/cells11192952>

Ding, X., Chen, J., & Zeng, W. (2024). Neuroimmune regulation in the pancreas. *Fundamental Research*, 4(2), 201–205. <https://doi.org/10.1016/J.FMRE.2022.08.001>.

Dobolyi, A., Vincze, C., Pál, G., & Lovas, G. (2012). The neuroprotective functions of transforming growth factor beta proteins. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(7), 8219–8258. <https://doi.org/10.3390/ijms13078219>.

Einheber, S., Hannocks, M. J., Metz, C. N., Rifkin, D. B., & Salzer, J. L. (1995). Transforming growth factor-beta 1 regulates axon/Schwann cell interactions. *The Journal of Cell Biology*, 129(2), 443–458. <https://doi.org/10.1083/jcb.129.2.443>.

Ellenrieder, V., Hendler, S.F., Ruhland, C., Boeck, W., Adler, G. and Gress, T.M. (2001), TGF- β -induced invasiveness of pancreatic cancer cells is mediated by matrix metalloproteinase-2 and the urokinase plasminogen activator system. *Int. J. Cancer*, 93: 204-211. <https://doi.org/10.1002/ijc.1330>.

Farooq, U., & Notani, D. (2022). Transcriptional regulation of INK4/ARF locus by cis and trans mechanisms. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 10, 948351. <https://doi.org/10.3389/FCELL.2022.948351/BIBTEX>.

Fincham, R. E. A., Delvecchio, F. R., Goulart, M. R., Yeong, J. P. S., & Kocher, H. M. (2021). Natural killer cells in pancreatic cancer stroma. *World Journal of Gastroenterology*, 27(24), 3483–3501. <https://doi.org/10.3748/wjg.v27.i24.3483>.

Garajová, I., Trentini, F., Leonardi, F., & Giovannetti, E. (2024). Unraveling the Connection: Pancreatic Cancer Cells and Schwann Cells. *Journal of Clinical Medicine*, 13(6), Article 6. <https://doi.org/10.3390/jcm13061785>.

Gasparini, G., Pellegatta, M., Crippa, S., Lena, M. S., Belfiori, G., Doglioni, C., Taveggia, C., & Falconi, M. (2019). Nerves and Pancreatic Cancer: New Insights into A Dangerous Relationship. *Cancers* 2019, Vol. 11, Page 893, 11(7), 893. <https://doi.org/10.3390/CANCERS11070893>

Gits, H. C., Tang, A. H., Harmsen, W. S., Bamlet, W. R., Graham, R. P., Petersen, G. M., Smyrk, T. C., Mahipal, A., Kowalchuk, R. O., Ashman, J. B., Rule, W. G., Owen, D., Neben Wittich, M. A., McWilliams, R. R., Halfdanarson, T., Ma, W. W., Sio, T. T., Cleary, S. P., Truty, M. J., ... Merrell, K. W. (2021). Intact SMAD-4 is a predictor of increased locoregional recurrence in upfront resected pancreas cancer receiving adjuvant therapy. *Journal of Gastrointestinal Oncology*, 12(5), 2275–2286. <https://doi.org/10.21037/JGO-21-55>.

Gola, M., Sejda, A., Godlewski, J., Cieślak, M., & Starzyńska, A. (2022). Neural Component of the Tumor Microenvironment in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancers*, 14(21), 5246. <https://doi.org/10.3390/cancers14215246>.

Gong, J. H., Maki, G., & Klingemann, H. G. (1994). Characterization of a human cell line (NK-92) with phenotypical and functional characteristics of activated natural killer cells. *Leukemia*, 8(4), 652–658.

Gonzalez-Rodriguez, A. P., Villa-Álvarez, M., Sordo-Bahamonde, C., Lorenzo-Herrero, S., & Gonzalez, S. (2019). NK Cells in the Treatment of Hematological Malignancies. *Journal of Clinical Medicine*, 8(10), 1557. <https://doi.org/10.3390/jcm8101557>.

Grant, T. J., Hua, K., & Singh, A. (2016). Molecular Pathogenesis of Pancreatic Cancer. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 144, 241–275. <https://doi.org/10.1016/BS.PMBTS.2016.09.008>.

Grote, S., Ureña-Bailén, G., Chan, K. C., Baden, C., Mezger, M., Handgretinger, R., & Schleicher, S. (2021). In Vitro Evaluation of CD276-CAR NK-92 Functionality, Migration and Invasion Potential in the Presence of Immune Inhibitory Factors of the Tumor Microenvironment. *Cells*, 10(5), 1020. <https://doi.org/10.3390/cells10051020>.

Halbrook, C. J., Lyssiotis, C. A., Pasca di Magliano, M., & Maitra, A. (2023). Pancreatic cancer: Advances and challenges. In *Cell* (Vol. 186, Issue 8, pp. 1729–1754). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2023.02.014>.

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2011.02.013>.

Hanahan, D., & Coussens, L. M. (2012). Accessories to the Crime: Functions of Cells Recruited to the Tumor Microenvironment. *Cancer Cell*, 21(3), 309–322. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.02.022>.

Hanahan, D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery*, 12(1), 31–46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>.

Hosein, A. N., Dougan, S. K., Aguirre, A. J., & Maitra, A. (2022). Translational advances in pancreatic ductal adenocarcinoma therapy. *Nature Cancer*, 3(3), 272–286. <https://doi.org/10.1038/S43018-022-00349-2>.

Hui, L., & Chen, Y. (2015). Tumor microenvironment: Sanctuary of the devil. *Cancer Letters*, 368(1), 7–13. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.07.039>.

Iwasaki, T., Hiraoka, N., Ino, Y., Nakajima, K., Kishi, Y., Nara, S., Esaki, M., Shimada, K., & Katai, H. (2019). Reduction of intrapancreatic neural density in cancer tissue predicts poorer outcome in pancreatic ductal carcinoma. *Cancer Science*, 110(4), 1491–1502. <https://doi.org/10.1111/cas.13975>.

Joshi, A., & Cao, D. (2010). TGF-beta signaling, tumor microenvironment and tumor progression: The butterfly effect. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*, 15(1), 180–194. <https://doi.org/10.2741/3614>.

Klein, A. P. (2021). Pancreatic cancer epidemiology: understanding the role of lifestyle and inherited risk factors. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, 18(7), 493. <https://doi.org/10.1038/S41575-021-00457-X>.

Klingemann, H. (2023). The NK-92 cell line—30 years later: Its impact on natural killer cell research and treatment of cancer. *Cytotherapy*, 25(5), 451–457. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2022.12.003>.

Lieber, M., Mazzetta, J., Nelson-Rees, W., Kaplan, M., & Todaro, G. (1975). Establishment of a continuous tumor-cell line (PANC-1) from a human carcinoma of the exocrine pancreas. *International Journal of Cancer*, 15(5), 741–747. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910150505>.

Luo, J. (2021). KRAS mutation in Pancreatic Cancer. *Seminars in Oncology*, 48(1), 10. <https://doi.org/10.1053/J.SEMINONCOL.2021.02.003>.

McGinnis, T., Bantis, L. E., Madan, R., Dandawate, P., Kumer, S., Schmitt, T., Paluri, R. K., & Kasi, A. (2020). Survival Outcomes of Pancreatic Intraepithelial Neoplasm (PanIN) versus Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm (IPMN) Associated Pancreatic Adenocarcinoma. *Journal of Clinical Medicine*, 9(10), 1–8. <https://doi.org/10.3390/JCM9103102>.

Mehta, R. S., Randolph, B., Daher, M., & Rezvani, K. (2018). NK cell therapy for hematologic malignancies. *International Journal of Hematology*, 107(3), 262–270. <https://doi.org/10.1007/s12185-018-2407-5>.

Milichko, V., & Dyachuk, V. (2020). Novel Glial Cell Functions: Extensive Potency, Stem Cell-Like Properties, and Participation in Regeneration and Transdifferentiation. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00809>.

Morvan, M. G., & Lanier, L. L. (2016). NK cells and cancer: You can teach innate cells new tricks. *Nature Reviews Cancer*, 16(1), 7–19. <https://doi.org/10.1038/nrc.2015.5>.

Neri, S., Mariani, E., Meneghetti, A., Cattini, L., & Facchini, A. (2001). Calcein-Acetyoxymethyl Cytotoxicity Assay: Standardization of a Method Allowing Additional Analyses on Recovered Effector Cells and Supernatants. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 8(6), 1131–1135. <https://doi.org/10.1128/CDLI.8.6.1131-1135.2001>.

Opitz, F. V., Haeberle, L., Daum, A., & Esposito, I. (2021). Tumor Microenvironment in Pancreatic Intraepithelial Neoplasia. *Cancers*, 13(24), Article 24. <https://doi.org/10.3390/cancers13246188>.

Park, W., Chawla, A., & O'Reilly, E. M. (2021). Pancreatic Cancer: A Review. *JAMA*, 326(9), 851. <https://doi.org/10.1001/JAMA.2021.13027>.

Parlar, A., Sayitoglu, E. C., Ozkazanc, D., Georgoudaki, A.-M., Pamukcu, C., Aras, M., Josey, B. J., Chrobok, M., Branecki, S., Zahedimaram, P., Ikromzoda, L., Alici, E., Erman, B., Duru, A. D., & Sutlu, T. (2019). Engineering antigen-specific NK cell lines against the melanoma-associated antigen tyrosinase via TCR gene transfer. *European Journal of Immunology*, 49(8), 1278–1290. <https://doi.org/10.1002/eji.201948140>.

Paul, S., & Lal, G. (2017). The Molecular Mechanism of Natural Killer Cells Function and Its Importance in Cancer Immunotherapy. *Frontiers in Immunology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01124>.

Perucho, M., Pisegna, J. R., Nicoletti, A., Vitale, F., Paratore, M., Quero, G., Negri, M., Celestino Nista, E., Alfieri, S., Gasbarrini, A., Zileri, L., & Verme, D. (2024). Neuropancreatology: The Nervous System and Pain Management in Pancreatic Diseases. *Life* 2024, Vol. 14, Page 299, 14(3), 299. <https://doi.org/10.3390/LIFE14030299>

Petersen, G. M., de Andrade, M., Goggins, M., Hruban, R. H., Bondy, M., Korczak, J. F., Gallinger, S., Lynch, H. T., Syngal, S., Rabe, K. G., Seminara, D., & Klein, A. P. (2006). Pancreatic cancer genetic epidemiology consortium. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 15(4), 704–710. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-05-0734>.

Pinho, A. V., Van Bulck, M., Chantrell, L., Arshi, M., Sklyarova, T., Herrmann, D., Vennin, C., Gallego-Ortega, D., Mawson, A., Giry-Laterriere, M., Magenau, A., Leuckx, G., Baeyens, L., Gill, A. J., Phillips, P., Timpson, P., Biankin, A. V., Wu, J., & Rooman, I. (2018). ROBO2 is a stroma suppressor gene in the pancreas and acts via TGF- β signalling. *Nature Communications*, 9(1), 5083. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07497-z>.

Regis, S., Dondero, A., Caliendo, F., Bottino, C., & Castriconi, R. (2020). NK Cell Function Regulation by TGF- β -Induced Epigenetic Mechanisms. *Frontiers in Immunology*, 11, 311. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00311>.

Roger, E., Martel, S., Bertrand-Chapel, A., Depollier, A., Chuvain, N., Pommier, R. M., Yacoub, K., Caligaris, C., Cardot-Ruffino, V., Chauvet, V., Aires, S., Mohkam, K., Mabrut, J.-Y., Adham, M., Fenouil, T., Hervieu, V., Broutier, L., Castets, M., Neuzillet, C., ... Bartholin, L. (2019). Schwann cells support oncogenic potential of pancreatic cancer cells through TGF β signaling. *Cell Death & Disease*, 10(12), 1–19. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-2116-x>.

Rosen, M. N., Goodwin, R. A., & Vickers, M. M. (2021). BRCA mutated pancreatic cancer: A change is coming. *World Journal of Gastroenterology*, 27(17), 1943. <https://doi.org/10.3748/WJG.V27.I17.1943>

Saiki, Y., & Horii, A. (2014). Molecular pathology of pancreatic cancer. *Pathology International*, 64(1), 10–19. <https://doi.org/10.1111/PIN.12114>.

Schorn, S., Demir, I. E., Haller, B., Scheufele, F., Reyes, C. M., Tieftrunk, E., Sargut, M., Goess, R., Friess, H., & Ceyhan, G. O. (2017). The influence of neural invasion on survival and tumor recurrence in pancreatic ductal adenocarcinoma – A systematic review and meta-analysis. *Surgical Oncology*, 26(1), 105–115. <https://doi.org/10.1016/j.suronc.2017.01.007>.

Shi, C., Klein, A. P., Goggins, M., Maitra, A., Canto, M., Ali, S., Schulick, R., Palmisano, E., & Hruban, R. H. (2009). Increased Prevalence of Precursor Lesions in Familial Pancreatic Cancer Patients. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 15(24), 7737–7743. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-0004>.

Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J. T., Bokesch, H., Kenney, S., & Boyd, M. R. (1990). New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *Journal of the National Cancer Institute*, 82(13), 1107–1112. <https://doi.org/10.1093/jnci/82.13.1107>.

Somanchi, S. S., McCulley, K. J., Somanchi, A., Chan, L. L., & Lee, D. A. (2015). A Novel Method for Assessment of Natural Killer Cell Cytotoxicity Using Image Cytometry. *PLoS ONE*, 10(10), e0141074. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141074>.

Sun, C., Ye, Y., Tan, Z., Liu, Y., Li, Y., Hu, W., Liang, K., Egranov, S. D., Huang, L. A., Zhang, Z., Zhang, Y., Yao, J., Nguyen, T. K., Zhao, Z., Wu, A., Marks, J. R., Caudle, A. S., Sahin, A. A., Gao, J., ... Yang, L. (2023). Tumor-associated nonmyelinating Schwann cell-expressed PVT1 promotes pancreatic cancer kynurenine pathway and tumor immune exclusion. *Science Advances*, 9(5), eadd6995. <https://doi.org/10.1126/sciadv.add6995>.

Thomas, D. A., & Massagué, J. (2005). TGF-beta directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance. *Cancer Cell*, 8(5), 369–380. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2005.10.012>.

Timmer, F. E. F., Geboers, B., Nieuwenhuizen, S., Dijkstra, M., Schouten, E. A. C., Puijk, R. S., de Vries, J. J. J., van den Tol, M. P., Bruynzeel, A. M. E., Streppel, M. M., Wilmink, J. W., van der Vliet, H. J., Meijerink, M. R., Scheffer, H. J., & de Gruijl, T. D. (2021). Pancreatic Cancer and Immunotherapy: A Clinical Overview. *Cancers*, 13(16), Article 16. <https://doi.org/10.3390/cancers13164138>.

Urlaub, D., Höfer, K., Müller, M.-L., & Watzl, C. (2017). LFA-1 Activation in NK Cells and Their Subsets: Influence of Receptors, Maturation, and Cytokine Stimulation. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md.: 1950), 198(5), 1944–1951. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1601004>.

Van Audenaerde, J. R. M., De Waele, J., Marcq, E., Van Loenhout, J., Lion, E., Van den Bergh, J. M. J., Jesenofsky, R., Masamune, A., Roeyen, G., Pauwels, P., Lardon, F., Peeters, M., & Smits, E. L. J. (2017). Interleukin-15 stimulates natural killer cell-mediated killing of both human pancreatic cancer and stellate cells. *Oncotarget*, 8(34), 56968–56979. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.18185>

Vincent, A., Herman, J., Schulick, R., Hruban, R. H., & Goggins, M. (2011). Pancreatic cancer. *Lancet* (London, England), 378(9791), 607. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)62307-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)62307-0).

Wang, J., Chen, Y., Li, X., & Zou, X. (2021). Perineural Invasion and Associated Pain Transmission in Pancreatic Cancer. *Cancers*, 13(18), Article 18. <https://doi.org/10.3390/cancers13184594>.

Wiechelman, K. J., Braun, R. D., & Fitzpatrick, J. D. (1988). Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation. *Analytical biochemistry*, 175(1), 231–237.

Wood, L. D., & Hruban, R. H. (2012). Pathology and molecular genetics of pancreatic neoplasms. *Cancer Journal* (Sudbury, Mass.), 18(6), 492–501. <https://doi.org/10.1097/PPO.0B013E31827459B6>.

Wood, L. D., Yurgelun, M. B., & Goggins, M. G. (2019). Genetics of Familial and Sporadic Pancreatic Cancer. *Gastroenterology*, 156(7), 2041–2055. <https://doi.org/10.1053/J.GASTRO.2018.12.039>.

Wood, L. D., Canto, M. I., Jaffee, E. M., & Simeone, D. M. (2022). Pancreatic Cancer: Pathogenesis, Screening, Diagnosis, and Treatment HHS Public Access. *Gastroenterology*, 163(2), 386–402. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2022.03.056>.

Xiao, Y., & Yu, D. (2021). Tumor microenvironment as a therapeutic target in cancer. *Pharmacology & Therapeutics*, 221, 107753. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2020.107753>.

Yadav, D., & Lowenfels, A. B. (2013). The epidemiology of pancreatitis and pancreatic cancer. *Gastroenterology*, 144(6), 1252–1261. <https://doi.org/10.1053/J.GASTRO.2013.01.068>.

Yakar, D. Ö., Bozkirli, B. O., & Ceyhan, G. O. (2022). Genetic landscape of pancreatic cancer: a narrative review. *Chinese Clinical Oncology*, 11(1), 5–5. <https://doi.org/10.21037/CCO-22-4/COIF>.

Yu, J., Wei, M., Becknell, B., Trotta, R., Liu, S., Boyd, Z., Jaung, M. S., Blaser, B. W., Sun, J., Benson, D. M., Mao, H., Yokohama, A., Bhatt, D., Shen, L., Davuluri, R., Weinstein, M., Marcucci, G., & Caligiuri, M. A. (2006). Pro- and antiinflammatory cytokine signaling: Reciprocal antagonism regulates interferon-gamma production by human natural killer cells. *Immunity*, 24(5), 575–590. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.03.016>.

Zhang, M., Zhang, Y. Y., Chen, Y., Wang, J., Wang, Q., & Lu, H. (2021). TGF- β Signaling and Resistance to Cancer Therapy. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.786728>.

Zhang, S. H., Shurin, G. V., Khosravi, H., Kazi, R., Kruglov, O., Shurin, M. R., & Bunimovich, Y. L. (2020). Immunomodulation by Schwann cells in disease. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 69(2), 245–253. <https://doi.org/10.1007/s00262-019-02424-7>.

Zhou, Q., & Melton, D. A. (2018). Pancreas regeneration. *Nature*, 557(7705), 351. <https://doi.org/10.1038/S41586-018-0088-0>.

Zuo, P., Li, Y., He, C., Wang, T., Zheng, X., Liu, H., Wu, Z., Zhang, J., Liao, X., & Zhang, L. (2023). Anti-tumor efficacy of anti-GD2 CAR NK-92 cells in diffuse intrinsic pontine gliomas. *Frontiers in Immunology*, 14, 1145706. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1145706>.

İNTİHAL RAPORU

Taner_Kasapoglu_yl_tez.docx

ORIGINALITY REPORT

9%

SIMILARITY INDEX

8%

INTERNET SOURCES

6%

PUBLICATIONS

4%

STUDENT PAPERS

PRIMARY SOURCES

1

Submitted to The Scientific & Technological
Research Council of Turkey (TUBITAK)

Student Paper

2%

2

acikerisim.istinye.edu.tr

Internet Source

2%

3

acikbilim.yok.gov.tr

Internet Source

1%

4

Korkmaz, Nalan Sümeyra. "İlaç Yeniden
Konumlandırma İle Belirlenen Aday İlaçların
Akut Myeloid Lösemi Hücrelerinde Proteazom
Inhibitörü İle Kombinasyon Tedavisinin
İncelenmesi", Marmara Üniversitesi (Turkey),
2023

Publication

<1%

5

Aydinlik, seyma. "Palladyum (II) Bilesigi Ve
Canertinin Kolon Kanseri Hücrelerinde
Sitotoksikite, Anjiyogenez, İlaç Dirençliliği Ve
Otofaji Mekanizmaları Üzerine Etkileri", Bursa
Uludağ University (Turkey), 2021

Publication

<1%