ACIBADEM MEHMET ALİ AYDINLAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HAŞŞAŞİN (IL-12, CD16^{+} NK-92) VE MUC-1 SPESİFİK CAR HAŞŞAŞİN'İN (Muc-1 CAR IL-12 CD16^{+} NK-92) *IN VITRO* VE *IN VIVO* PANKREAS KANSERİ MODELLERİNDE ETKİNLİĞİ

SÜMEYYE ÇİLİNGİR
DOKTORA TEZİ

FİZYOLOJİ ANA BİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Güldal Süyen

İSTANBUL-2024

ACIBADEM MEHMET ALİ AYDINLAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HAŞŞAŞİN (IL-12, CD16^{+} NK-92) VE MUC-1 SPESİFİK CAR HAŞŞAŞİN'İN (Muc-1 CAR IL-12 CD16^{+} NK-92) *IN VITRO* VE *IN VIVO* PANKREAS KANSERİ MODELLERİNDE ETKİNLİĞİ

SÜMEYYE ÇİLİNGİR
DOKTORA TEZİ

FİZYOLOJİ ANA BİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Güldal Süyen

İSTANBUL-2024

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda 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.

05/01/2024
Sümeyye Çilingir

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın her aşamasında ve doktora eğitimim boyunca yanımda olan; araştırmacı olma yolunda bana tüm imkanları sağlayarak her koşulda anlayışlı ve destekleyici olan çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Güldal Süyen'e, tez çalışmamın tüm deneysel süreçlerinde desteğini esirgemeyen Prof. Dr. Ercüment Ovalı, Dr. Öğretim Üyesi Derya Dilek Kancağı ve Dr. Öğretim Üyesi Cihan Taştan'a, tez çalışmamın histolojik değerlendirmeleri için Dr. Öğretim Üyesi Gamze Tümentemur'a, doktora eğitimimde bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım değerli hocalarım Doç. Dr. Meltem Kolgazi, Doç. Dr. Hande Yapışlar ve Doktor Öğretim Üyesi Mehmet Ergen'e, hayvan temini ve teknik destek için ACU Deney Hayvanları Merkezi'nden Vet. Hek. Samed Özer'e, doktora eğitimim boyunca yanımda olan değerli arkadaşlarım Selma Çat ve Dilan Acar'a, hayatımın her döneminde maddi ve manevi her türlü desteğini ve anlayışını esirgemeyen, bana olan inancını hiçbir zaman kaybetmeyen sevgili annem Ayşe Çilingir, babam Harun Çilingir, kardeşim Mustafa Çilingir ve biricik babaannem Fatma Çilingir'e tüm kalbimle teşekkür ederim.

Bu tez, TÜBİTAK Bilim İnsanı Destek Programları Başkanlığı (BİDEB) tarafından, 2214-A Yurt Dışı Doktora Sırası Araştırma Burs Programı 1059B142100415 numaralı ve Teknoloji ve Yenilik Destek Programları Başkanlığı (TEYDEB) tarafından 1501 Sanayi Ar-Ge Projeleri Destekleme Programı 3191231 numaralı projeler ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

BEYAN iii

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR iv

İÇİNDEKİLER v

KISALTMA VE SİMGELER LİSTESİ vii

ŞEKİLLER LİSTESİ ix

RESİMLER LİSTESİ xi

TABLOLAR LİSTESİ xii

ÖZET 1

ABSTRACT 2

1 GİRİŞ VE AMAÇ 3

2 GENEL BİLGİLER 6

2.1 Pankreas Kanseri 6
2.1.1 Pankreatik duktal adenokarsinom 6
2.1.2 Pankreatik nöroendokrin karsinom 6
2.2 Pankreas Kanseri Patogenezi 7
2.3 Pankreas Kanseri Tanısı 7
2.4 Pankreas Kanseri Tedavi Yöntemleri 8
2.4.1 İmmünoterapi 9
2.4.1.1 Kimerik antijen reseptörü 10
2.4.1.2 Doğal öldürücü hücreler 10
2.4.1.3 NK-92 hücreleri 11
2.4.1.4 CD16 reseptörü 13
2.4.1.5 İnterlökin-12 14
2.4.1.6 HAŞŞAŞİN 14

3 GEREÇ VE YÖNTEM 16

3.1 Gereç 16
3.2 Yöntem 19
3.2.1 *In vitro* analizler 19
3.2.1.1 Hücre kültürü 19
3.2.1.2 Lentivirüs üretimi 20
3.2.1.3 Transdüksiyon 23
3.2.1.4 Etkinlik deneyleri 24
3.2.1.5 Kalite kontrol testleri 26
3.2.2 *In vivo* analizler 27

3.2.2.1 Deney protokolü ve grupları 27
3.2.2.2 Alanin aminotransferaz ve aspartat aminotransferaz düzeyi 30
3.2.2.3 Tam kan sayımı 30
3.2.2.4 Doku hasarının değerlendirilmesi 31
3.2.2.5 İstatistiksel analiz 31

4 BULGULAR 32

4.1 *In Vitro* Analizler 32
4.1.1 Transdüksiyon 32
4.1.1.1 NK-92 hücrelerinin CD16 IL12 lentivirüsü ile transdüksiyonu 32
4.1.1.2 HAŞŞAŞİN hücrelerinin MUC-1 lentivirüsü ile transdüksiyonu 33
4.1.1.3 PANC-1 hücrelerinin fluciferin mCherry ile transdüksiyonu 34
4.1.2 Kalite kontrol testleri 34
4.1.3 Etkinlik deneyleri 35
4.1.3.1 Radyasyonun NK-92 ve HAŞŞAŞİN hücre canlılığı üzerine etkisi 35
4.1.3.2 Işın (-) ve (+) NK-92 ve HAŞŞAŞİN hücrelerinde IL-12 ekspresyonu . 36
4.1.3.3 Flow sitometri analizleri 36
4.1.3.4 Sitokin paneli 39
4.2 *In Vivo* Analizler 40
4.2.1 Tümör büyümesinin takibi 40
4.2.2 Alanin aminotransferaz düzeyi 41
4.2.3 Aspartat aminotransferaz düzeyi 41
4.2.4 Lökosit düzeyi 42
4.2.5 Eritrosit düzeyi 42
4.2.6 Hemoglobin düzeyi 43
4.2.7 Hematokrit düzeyi 43
4.2.8 Trombosit düzeyi 44
4.2.9 Histopatolojik değerlendirme 45
4.2.9.1 Tümör dokusunun histopatolojik değerlendirmesi 45
4.2.9.2 Karaciğer dokusunun histopatolojik değerlendirmesi 47
4.2.9.3 Akciğer dokusunun histopatolojik değerlendirmesi 49
4.2.9.4 Dalak dokusunun histopatolojik değerlendirmesi 51

5 TARTIŞMA 53

6 SONUÇ 58

7 KAYNAKLAR 59

8 ÖZGEÇMİŞ 67

KISALTMA VE SİMGELER LİSTESİ

α	Alfa
ADCC	Antikor Bağımlı Hücre Sitotoksisitesi
ALT	Alanin Aminotransferaz
AST	Aspartat Aminotransferaz
ATCC	Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu
CO_2	Karbondioksit
CTV	Cell Trace Violet
°C	Santigrat derece
CAR	Kimerik Antijen Reseptörü
CD	Yüzey Farklılaşma Antijenleri
CBA	Sitokin Paneli
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetil sülfoksit
DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
EDTA	Etilendiamin Tetraasetik Asit
EGFR	Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
ELISA	Enzime Bağlı İmmünosorbent Test
EMA	Avrupa İlaç Kurumu
FBS	Fetal Bovine Serum
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
gr	Gram
GVHD	Graft-versus-host Hastalığı
Gy	Gray
HBV	Hepatit B Virüsü
HCV	Hepatit C Virüsü
HIV	İnsan Bağışıklık Yetmezliği Virüsü
HSA	İnsan Serum Albumin
IFN	İnterferon
Ig	İmmunoglobulin
IL	İnterlökin

i.p	İntraperitoneal
KIR	Öldürücü İnhibitör Reseptör
µl	Mikrolitre
µM	Mikromolar
ml	Mililitre
mg	Milligram
MHC	Majör Histokompatibilite Kompleks
MOI	Enfeksiyon Çokluğu
NK	Doğal Öldürücü Hücre
PANC-1	İnsan Pankreas Kanseri Hücre Hattı
PBMC	Periferik Kan Mononükleer Hücresi
PDAC	Pankreatik Duktal Adenokarsinoma
rpm	Dakikadaki Devir Sayısı
s.c	Subkutan
Th	T Yardımcı Hücre
TNF	Tümör Nekroz Faktör
VDRL	Venereal Disease Research Laboratory

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. *In vitro* analizler 19

Şekil 2. anti-MUC-1 plazmid konstrakt dizaynı 20

Şekil 3. Jurkat hücrelerinde lentiviral titrasyon sonucu 22

Şekil 4. *In vivo* deney planı 28

Şekil 5. Jurkat hücrelerinde CD16 IL12 transdüksiyonu. 32

Şekil 6. Jurkat hücrelerinde Il-12 ekspresyonu 32

Şekil 7. NK-92 hücrelerinde CD16 tarsdüksiyonu ve hücre seleksiyonu 33

Şekil 8. HAŞŞAŞİN hücrelerinde MUC-1 CAR ekspresyon düzeyi 33

Şekil 9. PANC-1 hücrelerinde Fluciferin mCherry ekspresyon düzeyi. 34

Şekil 10. Işın (-) ve Işın (+) NK 92 ve HAŞŞAŞİN hücrelerinin 24, 48 ve 72. saatteki canlı hücre sayıları. 35

Şekil 11. Işın (-) ve (+) NK 92 ve HAŞŞAŞİN hücrelerinin 24, 48 ve 72. saat IL-12 ekspresyon düzeyleri 36

Şekil 12. % PANC-1 mcheryy düzeyi 36

Şekil 13. % PANC-1 mcheryy düzeyi 37

Şekil 14. %$CD4^+$/$CD25^+$ düzeyi 38

Şekil 15. %$CD8^+$/$CD25^+$ düzeyi 38

Şekil 16. %$CD4^+$/$CD107a^+$ düzeyi 39

Şekil 17. Sitokin paneli sonuçları 40

Şekil 18. Tedavi öncesi ve tedavi sonrası 10, 20 ve 30. günlerde tümör büyümesinin takibi… 41

Şekil 19. Serum örneklerinde ALT düzeyi 41

Şekil 20. Serum örneklerinde AST düzeyi..... 42

Şekil 21. Kan örneklerinde lökosit düzeyi..... 42

Şekil 22. Kan örneklerinde eritrosit düzeyi..... 43

Şekil 23. Kan örneklerinde hemoglobin düzeyi..... 43

Şekil 24. Kan örneklerinde hematokrit düzeyi..... 44

Şekil 25. Kan örneklerinde trombosit düzeyi..... 44

RESİMLER LİSTESİ

Resim 1. CD16 IL-12, MUC-1 ve Fluciferin mCherry plazmidleri jel elektroforez görüntüleri 21

Resim 2. Tümör doku örneklerinin histolojik görüntüleri 46

Resim 3. Karaciğer doku örneklerinin histolojik görüntüleri 48

Resim 4. Akciğer doku örneklerinin histolojik görüntüleri 50

Resim 5. Dalak doku örneklerinin histolojik görüntüleri 52

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1. Hücre hatları ve kullanım alanları 16

Tablo 2. Kitler, solüsyonlar ve antikorlar 16

Tablo 3. Ekipmanlar..... 18

Tablo 4. Efektör hücreler ile PANC-1 hücrelerinin kalite-kontrol analizleri 34

ÖZET

HAŞŞAŞİN (IL-12, CD16+ NK-92) ve Muc-1 Spesifik CAR HAŞŞAŞİN'in (Muc-1 CAR IL-12 CD16+ NK-92) *In Vitro* ve *In Vivo* Pankreas Kanseri Modellerinde Etkinliği

Pankreas kanseri asemptomatik olması ve geç tanısı ile karakterize bir malignitedir. Yüksek mortalite oranına sahiptir. Musin-1 pankreas kanserinde aşırı eksprese edildiği bilinen bir yüzey antijenidir. Dolayısıyla Musin-1, pankreas kanserine karşı geliştirilecek immünoterapi için iyi bir hedeftir. Kimerik antijen reseptörü (CAR) hedef hücre yüzeyinde bulunan antijeni tanıyan ve bağlanan yapay reseptörlerdir. Hematolojik malignitelerde CAR T hücre tedavisinin etkili olduğu kanıtlanmış olsa da solid tümörlerde aynı başarı elde edilememiştir. İmmünoterapide kullanılan doğal öldürücü (NK)-92 hücreleri, çeşitli kanser hücrelerine karşı güçlü sitotoksik etkileri nedeniyle günümüzde kanser tedavisinde kullanılmaktadır. Bu hücrelerin kanser tipine göre genetik olarak modifiye edilmesi ile tümöre spesifik CAR NK-92 hücreleri oluşturulabilmektedir. Şu ana kadar lenfoma, glioblastoma, akciğer kanseri, prostat kanseri ve yumurtalık kanseri olmak üzere çeşitli malignitelerde CAR NK-92 gen terapisi ile başarılar elde edilmiştir. İnterlökin-12, T lenfositler ve NK hücreleri gibi bağışıklık sistemine ait hücreleri aktive ederek konağın savunma mekanizmalarını modüle etmektedir. Çalışmada pankreas kanserine karşı CD16 reseptörüne sahip İnterlökin-12 eksprese eden NK-92 hücreleri ile yeni bir immünoterapi ürünü geliştirildi. Ayrıca Musin-1 antijenine karşı 2. nesil bir CAR tasarlandı ve HAŞŞAŞİN hücrelerine transdüksiyonu gerçekleştirildi. Geliştirilen hücrelerin pankreas kanseri hücrelerine karşı olan etkisi *in vitro* ve *in vivo* analizler ile değerlendirildi. Tümör öldürme kapasitesi, immün sistemi stimüle etmesi göz önünde bulundurularak en etkili hücre hattı ve uygulama yöntemi belirlendi. Sonuç olarak, HAŞŞAŞİN hücre hattının lokal uygulaması, pankreas kanserine karşı etkili olma potansiyeline sahiptir.

Anahtar Sözcükler: İmmünoterapi, İnterlökin-12, Kimerik Antijen Reseptörü, Musin-1, Pankreas Kanseri

ABSTRACT

Effects of HASSASIN (IL-12, CD16+ NK-92) and CAR HASSASIN (Muc-1 CAR IL-12 CD16+ NK-92) on *In Vitro* and *In Vivo* Models of Pancreatic Cancer

Pancreatic cancer is a malignancy characterized by its asymptomatic existence and late diagnosis. Mucin-1 is a surface antigen known to be overexpressed in pancreatic cancer, making it a promising target for immunotherapy against pancreatic cancer. Chimeric antigen receptors (CARs) are artificial receptors that recognize and bind to antigens on the target cell surface. CAR T cell therapy has proven effective in hematological malignancies, the same success has been not shown in solid tumors. Natural killer (NK)-92 cells used in immunotherapy are utilized in cancer treatment because of exhibiting potent cytotoxic effects against various cancer cells. By genetically modifying these cells according to the type of cancer, tumor-specific CAR NK-92 cells can be formed. Till now, CAR NK-92 gene therapy has been found to be effective in various malignancies including lymphoma, glioblastoma, lung cancer, prostate cancer and ovarian cancer. Interleukin-12 (IL-12) activates immune cells such as T lymphocytes and NK cells, modulating host defense mechanisms. In our study, a new immunotherapy product, NK-92 cells expressing IL-12 with CD16 receptor was developed. Additionally, a second-generation CAR was designed against the Mucin-1 antigen, and transduced in HAŞŞAŞİN cells. The efficacy of the HAŞŞAŞİN and CAR HAŞŞAŞİN cells against pancreatic cancer cells was evaluated through *in vitro* and *in vivo* analyses. According to tumor-killing capacity and immune system stimulation, the most effective cell line and application method were determined. In conclusion, the local application of HAŞŞAŞİN cells has an anti-tumor effect against pancreatic cancer.

Keywords: Chimeric Antigen Receptor, Immunnotherapy, Interleukin-12, Mucin-1, Pancreatic Cancer.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Pankreas kanseri, ağırlıklı olarak ileri yaşlarda görülen ve agresif bir seyir izleyen ölümcül bir malignitedir (1). Kansere bağlı ölüm nedenleri arasında dünyada yedinci sırada, Amerika Birleşik Devletleri ve Avrupa'da ise dördüncü sırada yer almaktadır. Pankreas kanserine neden olan potansiyel risk faktörleri ve erken tanı için kullanılan araçlar konusunda ilerlemelere rağmen, 5 yıllık hayatta kalma oranı %10'dan daha azdır (2).

Asemptomatik kanser tiplerinden biri olan pankreas kanseri, %95 oranında adenokarsinomdur ve bunların %10'u kalıtsal bir eğilime sahiptir (3). Pankreasın retroperitoneal lokasyonu ve abdomenin derinlerinde olması tümör hücrelerin tespitini zorlaştırmaktadır (4).

Cerrahi işlemler, pankreas kanserinde en etkili tedavi ve tek küratif müdahale olarak kabul edilmektedir. Fakat diğer rezeke edilmiş solid tümörler ile karşılaştırıldığında, en kötü sonuçlar rezeke edilmiş pankreas kanseri olan hastalarda gözlenmekte, cerrahi operasyon sonrası hastaların %80'inde nüks gerçekleşmektedir (5). Ameliyat sonrası adjuvan kemoterapi tedavisi ile hastalarda 2 yıllık bir hayatta kalma süresi elde edilmekte (6), hastaların sadece %20'si 5 yıllık yaşam süresine ulaşmaktadır (7). Kemoterapi ajanı olarak kullanılan Gemcitabine ve FOLFIRINOX her ne kadar pankreas kanseri tedavisinde ilk basamak olarak değerlendirilse de, beklenen başarı iki ajan ile de sağlanamamıştır (8). Hastanın çeşitli kemoterapötik ajan kombinasyonları veya tek başına tedavi edilmesi sonrası beklenen başarının elde edilememesi yeni bir terapötik yaklaşımın geliştirilmesine ihtiyaç olduğunu göstermektedir.

Son dönemlerde kansere özgü hücre bazlı tedaviler dikkat çekmektedir. Bu tedaviler arasında kimerik antijen reseptörüne (CAR) sahip T hücre terapisi, çeşitli malignitelere karşı geliştirilmekte ve kullanılmaktadır. Yapılan araştırmalar sonucunda hematolojik malignitelerde CAR T terapisi ile önemli başarılar elde edilmiş, FDA ve EMA onayı alınmıştır (9). Solid tümörlerde yapılan denemelerde ise,

tümör etrafındaki mikroçevre varlığı gen terapisinin tümöre ulaşmasına engel olmuştur. Bu nedenle beklenen başarı elde edilememiştir (10). Ayrıca CAR T hücreleri ile yapılan tedavinin kişiye özgü olması hem maliyeti artırmakta, hem de satışa hazır bir şekilde saklanamadığından uygulamada gecikmelere yol açmaktadır (11). Solid tümörlerdeki başarısızlıklar ve masraflı üretim süreçleri immünoterapide kullanılan NK-92 hücre hattının önemini artırmıştır. NK-92 hücre hattı perforin ve granzim B gibi yüksek seviyelerde sitolitik yolak molekülleri ifade ettiğinden güçlü sitotoksik etkiye sahiptir (12). NK-92 hücre hattı dışında diğer bilinen NK hücre hatlarının hiç biri tutarlı ve tekrarlanabilir şekilde yüksek antitümör sitotoksisiteye sahip değildir.

Ayrıca NK-92, klinik yararı ve minimal yan etkileri olan ve ileri evre kanserli hastalada kullanılan FDA onaylı tek hücresel üründür (13). Hematolojik kanserli hastalarda ışınlanarak uygulanan yüksek doz NK-92 hücre hatlarının minimal toksisite ile etkin ve güvenli olduğu çalışmalarda gösterilmiştir (14). NK-92 hücrelerinin, spesifik tümör antijenlerini tanımak veya antikora bağlı hücresel sitotoksisite aracılı monoklonal antikor aktivitesini artırmak amacıyla genetik olarak manipüle edilebilen hücreler olması, CAR NK hücre terapisi için NK-92 hücre hattının ideal olduğunu göstermektedir (12,14). CAR T'ler ile kıyaslandığında NK-92 hücreleri kolay üretilebilmekte ve satışa hazır bir şekilde saklanabilmektedir. Ayrıca ışınlama sonrası kısa yaşam ömürleri nedeniyle daha düşük sitokin uyarımına neden olmaları bu hücreleri daha güvenilir kılmaktadır. Ekonomik açıdan düşünüldüğünde de yapılan çalışmalar daha düşük maliyetle üretildiklerini göstermektedir (13).

Mevcut bilgiler ve solid tümörlerde elde edilen başarısızlıklar göz önüne alınarak pankreas tümörüne karşı etkin olabilecek özelliklere sahip hücre tasarımının yapılması planlanmıştır. Çalışmada CD16 reseptörüne sahip, IL-12 sekrete edebilen NK-92 hücre hattının (HAŞŞAŞİN) kullanılması ile, NK-92'nin sitotoksik etkisinin yanı sıra, sahip olduğu CD16 reseptörü ile antikor bazlı hücre sitotoksisiteye neden olması ve IL-12 sekresyonu ile konağın immün hücreleri de aktive etmesi amaçlanmıştır. Bu hücre hattının kullanılması ile, 48 saat süren NK-92 hücrelerinin etkisinin IL-12 salgısı ile artırılması öngörülmüştür. Ayrıca Muc-1 antijenine spesifik CAR tasarımı ile de pankreas kanserine karşı spesifik anti-tümör yanıtın elde edilmesi planlanmıştır. Bu

bağlamda geliştirilen HAŞŞAŞİN ve CAR HAŞŞAŞİN hücreleri ile *in vitro* ve *in vivo* analizlerinin yapılması pankreas kanserine karşı hücresel terapinin etkinliğine dair bilgi edinilmesini sağlayacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Pankreas Kanseri

Pankreas kanseri, ağırlıklı olarak erkeklerde ve ileri yaşlarda görülen (40-85 yaş), agresif bir seyre sahip ölümcül bir malignitedir. Klinikteki gelişmelere rağmen, görülme sıklığı giderek artmaktadır. Kanser vakalarının %2'sini, kanserle ilişkili ölümlerin ise %5'ini oluşturmaktadır (15).

Pankreas kanseri pankreasın enzimleri salgılayan kanalındaki hücrelerden kaynaklanan ve insidansı %95 olan pankreatik duktal adenokarsinoma ve pankreasın hormon üreten hücrelerinde gelişen ve %5'lik bir insidansa sahip olan pankreatik nöroendokrin tümörlerinden oluşmaktadır (16).

2.1.1. Pankreatik duktal adenokarsinom

Pankreatik duktal adenokarsinom (PDAC), retroperitoneal bir organ olan pankreastan kaynaklanan, ekzokrin hücre tümörüdür (17). 2030 yılına kadar Amerika Birleşik Devletleri'nde kanserden ölümlerin ikinci önde gelen nedeni olacağı tahmin edilen ölümcül bir hastalıktır (18). Agresif bir seyre ve kötü prognoza sahiptir. Potansiyel olarak iyileştirici tek yöntem cerrahi rezeksiyon olmakla birlikte, yalnızca sınırlı sayıda hasta rezeksiyona uygundur ve geri kalanı ilerlemiş, ameliyat edilemeyen veya metastatik olarak tanımlanmaktadır (19). Etkili bir tedavi yönteminin geliştirilebilmesi ve mortalite oranının düşürülebilmesi için tümör antijenine spesifik bir yanıt oluştutabilecek ve bağışıklık sistemini uyarabilecek yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesine ihtiyaç vardır. Epidemiyolojik risk faktörleri arasında sigara ve alkol kullanımı, pankreatit, obezite ve tip 2 diyabet bulunmaktadır (17).

2.1.2. Pankreatik nöroendokrin karsinom

Pankreatik nöroendokrin tümörleri, pankreasın adacık hücrelerinden oluşan ve nadir görülen pankreas kanseri türüdür. Ancak solid tümörler arasında ikinci en sık

görülen karsinomdur (20). Pankreas adenokarsinomu ile karşılaştırıldığında nispeten farklı biyolojik davranışa ve klinik sürece sahiptir. Klinik değerlendirmesi, hem tümörün ilerlemesine hem de hormon salgı durumuna bağlıdır; bu da hem tanı hem de tedavide çeşitli komplikasyonlara neden olur. Bu tümörler işlevsel oldukları takdirde insülin ve glukagon gibi hormonları salgılayabilirler (21). Ancak vakaların %60 ila %90'ı işlevsizdir ve büyük ölçüde asemptomatiktir (22).

2.2. Pankreas kanseri patogenezi

Pankreastan kaynaklanan histolojik kanser alt tipleri arasında PDAC en sık görülen ekzokrin neoplazmdır. PDAC, pankreas kanseri vakalarının %95'ini oluşturur ve bu organdaki ikinci en yaygın neoplazma olan pankreas nöroendokrin tümörlerinden farklı bir moleküler profile sahiptir (23).

İnvaziv olmayan kanser öncesi lezyonlardan kaynaklanan PDAC yeterince erken tespit edildiğinde tedavi edilebilmektedir. Kanser öncesi görülen lezyonlar boyutlarına ve pankreas duktal sistemi ile olan tutulumlarına göre sınıflandırılmaktadır (24). PDAC'ların çoğu, pankreas kanallarını içeren ve tanımı gereği 5 mm'den küçük olan bir neoplazmaya sahip pankreatik intraepitelyal neoplaziden kaynaklanır (25). Çok daha küçük bir oranı (<%10) ise, pankreatik duktal sistemde bulunan ve makrokistik lezyonlardan kaynaklanan intraduktal papiller müsinöz neoplazmlardır (26). Müsinöz kistik neoplazm ise, en az görülen kanser öncesi neoplazmdır. Bu neoplazmlar diğerlerinin aksine duktal sistemi tutmaz ve karakteristik yumurtalık tipi stromaya sahiptir. Kadınlarda çok daha sık görülürler ve pankreas gövdesini/kuyruğunu tutarlar (27).

2.3. Pankreas Kanseri Tanısı

Pankreas kanseri olan hastaların çoğunda hastalığın ileri evresine kadar semptom görülmemekte ya da genellikle spesifik olmamaktadır. Bu da teşhisin gecikmesine neden olmaktadır (28). En sık bildirilen semptomlar arasında yorgunluk, kilo kaybı, karın veya sırt ağrısı yer almaktadır. Pankreas baş ve boyun bölgesinde ortaya çıkan

tümörler safra yolu tıkanıklığından kaynaklanan kaşıntı ve sarılıkla ilişkili olabilirken; bezin gövdesinde ve kuyruğunda bulunan tümörler daha çok ağrıyla ortaya çıkmaktadır. Hastalığın ailesel özelliği ve patojenik bir germline mutasyonu taşıyıp taşımadığının değerlendirilmesi ayrıca önem arz etmektedir (24).

Tam bir öykü ve fiziki muayeneden sonra hastalar, tam kan sayımı, elektrolit paneli ve karaciğer fonksiyon testlerini içeren laboratuvar testlerine tabi tutulmaktadır. Karaciğer fonksiyon testleri, obstrüktif bir safra sürecinin mevcut olup olmadığının değerlendirilmesinde yardımcı olmaktadır (29). CA 19-9 (Lewis kan grubu antijeni) PDAC için yaygın olarak kullanılan bir serum biyobelirtecidir ve semptomatik hastalıkla başvuran hastalarda %80 ila %90 duyarlılık ve özgüllüğe sahiptir (30). Ancak nüfusun yüzde onu Lewis antijenlerini ifade etmemektedir (31).

Pankreas adenokarsinomundan şüphelenilen bir hastanın değerlendirilmesinde ultrasonografi, invaziv olmayan ve uygun maliyetli bir yöntem olduğundan tercih edilmektedir. Sarılık veya karın ağrısı ile başvuran hastalarda sıklıkla ilk basamak tanı aracıdır (32). Ancak pankreas ultrasonunun hassasiyeti ve doğruluğu büyük ölçüde operatörün deneyimine ve hastalığın ilerleme derecesine bağlıdır. Bu nedenle, tanı koymadaki hassasiyeti tartışmalıdır (33). Öte yandan pankreas kanserinin saptanmasında %76 ile %96 arasında değişen bir hassasiyet sağlayan Bilgisayarlı Tomografi (BT) tercih edilen görüntüleme sistemidir (34). Özellikle tümörün rezektabilitesini öngörmede en önemli faktör olan vasküler tutulumun değerlendirilmesinde ve kemoterapi veya cerrahi sonrası tedavi takibinde kullanılmaktadır (35). Diğer bir görüntüleme yöntemi olan Manyetik Rezonans (MR), yüksek yumuşak doku kontrastı göz önüne alındığında BT'ye kıyasla daha üstündür. Küçük tümörler, hipertrofik pankreas başı ve parankimde fokal yağ infiltrasyonu tespit edilebilmektedir (36).

2.4. Pankreas Kanseri Tedavi Yöntemleri

Cerrahi operasyon tek küratif yöntem olmakla birlikte, operasyon öncesi verilen kemoterapi ile tümör büyümesi kontrol altına alınarak cerrahi rezeksiyonun

gerçekleştirilmesine katkı sağlanmaktadır. Böylece kişinin hayatta kalma olasılığı ve yaşam kalitesi artmaktadır (37). Ancak hastaların yaklaşık %50-60'ına tanı metastaz evresinde konulmakta ve cerrahi rezeksiyona uygun olmamaktadır. Ayrıca rezekte edilebilen tümör ayrımı cerrahlar arasında farklılık göstermekte ve cerrahi yetenek önem kazanmaktadır (7). Öte yandan gelişen teknoloji ile laparoskopik pankeas kanseri rezeksiyonunun hastaların daha az travmayla hastanede kalış sürelerini azaltmalarına ve hastaların diyetlerine daha erken dönmelerine olanak sağlamaktadır. Ancak bu teknoloji sınırlı hastanelerde ve daha az sayıda doktor tarafından uygulanabilmektedir (6).

Metastatik hastaların tedavisinde kullanılan FOLFIRONOX veya gemsitabin yaşam süresinde bir artışa sebep olsa da beklenen sonuç elde edilememiştir. Ayrıca kişide ilaca karşı direnç gelişmekte ve toksisite problemlerine neden olmaktadır (8).

Gelişen teknolojiye rağmen, pankreas kanser hücrelerinin yüksek metastatik yetenekleri, antitümör ilaçlara karşı direnç göstermeleri ve cerrahi yeteneğe gereksinim duyulması hayatta kalma oranlarında anlamlı bir değişiklik kaydedilememesine neden olmaktadır (1).

Konvansiyonel tedavi yöntemlerindeki mevcut cerrahi sınırlılıklar, mortalite oranında beklenen düzeyde başarı elde edilememesi, kemoterapi ajanlarına karşı gelişen direnç ve karşılaşılan hedef dışı toksisite pankreas kanseri gelişimini, ilerlemesini ve metastazına katkıda bulunan moleküler düzeydeki değişiklikler ve tümör mikroçevresi üzerine yapılan araştırmaların önemini artırmış, hedefe yönelik tedavi stratejilerinin geliştirilmesine sebep olmuştur.

2.4.1. İmmunoterapi

Günümüzde uygulanan kanser tedavilerine bakıldığında, vücudun kendi bağışıklık sistemini harekete geçirerek çalışan kanser immünoterapisi giderek önem kazanmaya başlamış, önemli bir tedavi seçeneği haline gelmiştir (38). Bağışıklık sistemi kansere dönüşebilecek olan hücreler de dahil olmak üzere anormal hücreleri

tanıyacak ve ortadan kaldıracak donanıma sahip olsa da kanser hücrelerinin sıklıkla bağışıklık hücreleri tarafından tespit edilmekten kaçmanın veya aktivitelerini bastırmanın yollarını bulmaktadır (39). Bu nedenle vücudun kendi bağışıklık sistemini kullanarak bir takım genetik modifikasyonlar sonucu oluşturulan, kanser hücrelerini tanıyan ve spesifik toksisiteye sebep olan çeşitli immunoterapi yaklaşımları geliştirilmiştir. Çeşitli kanser türlerinin tedavisinde dikkate değer bir başarı göstermiş ve son yıllarda kanser tedavisinde önemli bir seçenek haline gelmiştir (40).

2.4.1.1. Kimerik antijen reseptörü

Kimerik Antijen Reseptörü (CAR), immünoterapide, özellikle CAR-T hücre terapisinde kullanılmak üzere yapay olarak tasarlanmış bir reseptördür. Özel tümör hücresi yüzey antijenini hedef almakta, T hücrelerini aktive etmekte ve T hücre fonksiyonunu MHC'den bağımsız olarak geliştirmektedir. Geliştirilen bu reseptörler ile hematolojik malignitelerde ciddi başarılar elde edilmiş ve 2017 ve 2018'de FDA ve EMA onayı alan ilk iki hücresel kanser immünoterapisi (Tisagenlecleucel ve axicabtagen-ciloleuce) akut lenfoblastik lösemi ve lenfoma hastalarının tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır (9). Bununla birlikte, CAR T hücre yaklaşımının solid malignitelere doğrudan çevrilmesi, klinik denemelerde hayal kırıklığı yaratmış, toksisite problemlerine sebep olmuştur. Ayrıca solid tümörlerde bulunan tümör mikroçevresi de CAR T hücre etkinliğine sınırlıklıklar getirmiştir (10).

2.4.1.2. Doğal öldürücü hücreler

İmmünoterapide geliştirilen diğer bir strateji ise, immün hücreler arasında en etkili popülasyon olarak kabul edilen doğal öldürücü (NK) hücrelerdir (41). Bu hücreler ilk olarak 1975'te tanımlanmış olup MHC kısıtlaması olmadan anormal hücreleri tanıyabilmekte ve bunlara karşı bir immün yanıt oluşturabilmektedir. Yüzeylerinde aktivatör ve inhibitör olmak üzere 2 çeşit reseptör bulunmaktadır. Bu reseptörler normal hücre yüzeyinde bulunan MHC-I molekülünü tanırlar. MHC-I molekülü taşıyan normal hücreler inhibitor reseptörü aktive ederek hayatta kalırken, MHC-I molekülü kaybolan veya azalan tümör hücreleri, aktivatör reseptör etkinliğine sebep

olarak NK hücrelerini aktive ederler. Tümör hücreleri varlığında aktive olan bu hücreler 3 farklı yol (perforin/granzim, Fas/FAsL ve sitokin) kullanarak sitotoksik etki gösterirler. Hızlı immün yanıta sahip olmaları, güçlü sitotoksisite ve hızlı öldürme yetenekleri ile immünoterapi için ideal bir seçenek olarak görülmektedirler (42).

CAR-T hücrelerin immünoterapideki başarısı göz önüne alındığında, NK hücrelerinin CAR'lar ile genetik olarak modifiye edilmesi fikri ortaya atılmıştır. Bu amaçla geliştirilen CAR-NK hücrelerinin, CAR-T'ler ile kıyaslandığında daha güvenilir olduğu gösterilmiştir (43) NK hücreleri tarafından salgılanan sitokinler nispeten daha güvenli olan interferon (IFN) γ ve granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktördür (GM-CSF). CAR-T hücrelerinin ürettiği proinflamatuar sitokinler (TNF-α, IL-1 ve IL-6) ise, CAR-T tedavisinde yaygın olarak görülen ve hayatı tehdit eden sitokin salınım sendromuna neden olmaktadır (44). Yapılan hayvan çalışmalarında da, CAR-T tedavisinde görülen kilo kaybı, organ patolojisi ve artan sitokin seviyelerinin CAR-NK tedavisinde daha az görüldüğü gösterilmiştir (45).

Bununla birlikte, kanser hastaları için NK hücrelerinin kullanılması çeşitli zorluklar içermektedir. Otolog NK hücrelerinin kendi MHC antijenleriyle karşılaştığında etkinliği azalmaktadır. Öte yandan, allojenik NK hücreleri greft versus-host (GvHD) reaksiyonu riski taşımaktadır (46). Ayrıca dolaşımdaki lenfositlerin %10'unun NK hücreleri olması nedeniyle tedarik edilmesi sınırlıdır. Yeterli sayıda NK hücresini toplamak için hastaların tekrarlanan lökoferezlerden geçmesi gerekmektedir. Terapötik olarak anlamlı sayılara ulaşması için NK hücrelerinin ex vivo olarak çoğaltılması sırasında da, gerekli olan besleyici ortamın NK hücrelerinin sayılarını artırırken, sitotoksisitelerinde azalmalara sebep olabildiği ifade edilmektedir (47).

2.4.1.3. NK-92 hücreleri

CAR-NK hücre terapisinde, yeterli NK hücresi elde etmekteki zorluklar ve tedavi için fazla sayıda sitotoksik NK hücre gereksinimi, ölümsüzleştirilmiş (immortal) klonal bir hücre hattının geliştirilmesi fikrini ortaya atmıştır. Son 20 yılda, NK hücreli lenfoma hastalarından izole edilen birçok NK hücre hattı (KHYG-1, NK-92, NKL,

NKG ve YT) tanımlanmıştır. Saf NK hücrelerinden oluşmakta ve bu nedenle hastalara tekrar tekrar verilebilmektedir. Bu hücre hatları arasında NK-92 en güçlü sitotoksik etkiye sahip ve FDA tarafından klinik deneylerde kullanılmak üzere onaylanan tek hücre hattıdır (47).

NK hücrelerinden farklı olarak, neredeyse bütün inhibe edici reseptörlerden yoksundur ve bir dizi aktive edici reseptör ile bol miktarda perforin ve granzime sahiptir. Bu da onlara daha güçlü bir sitotoksik etki kazandırmaktadır. Bu özellikleri sayesinde NK-92 hücreleri preklinik araştırmalar için kritik bir hücre hattı haline gelmiştir (48). Swift ve diğerleri, NK-92 hücrelerinin myelomaya karşı etkinliği incelenmiş ve ksenograft fare modelinde NK-92 tedavisinin miyelom hücrelerini etkin bir şekilde öldürdüğünü ve tümör yükünü önemli ölçüde azalttığını göstermiştir (49).

NK-92 hücre hatlarının güçlü sitotoksik etkileri immünoterapide CAR-NK-92 hücrelerinin tasarlanmasına sebep olmuştur. Yapılan çalışmalar CAR-NK-92 hücrelerinin, tümör hücrelerini hedefleyebildiğini ve hedef hücreleri öldürmek için doğrudan NK-92 hücrelerini aktive edebildiğini göstermektedir. Ayrıca, tümör üzerindeki hedeflenen antijen hızla kaybedilse bile, CAR-NK-92 hücreleri, aktive edici reseptörleri tarafından aktifleştirilebilmekte ve inhibitör reseptörlerinin yüzeyde düşük seviyelerde eksprese edilmesi NK-92 hücrelerinin daha dirençli hale getirebilmektedir (50). Bazı çalışmalar, allojenik NK-92 hücrelerinin otolog NK hücrelerine göre daha güçlü tümör hücresi öldürme kabiliyetine sahip olduğunu göstermektedir (51).

Bunun yanı sıra, CAR-T hücre terapisinin gerektirdiği kişiye özgü tedavi ve buna bağlı yüksek maliyet CAR-NK-92 hücrelerinde görülmemektedir (47). CAR-T hücrelerinin üretimi, belirli bir süre gerektirmektedir. Bu da, hastalığı daha hızlı ilerleyen kişiler için kısa süre içerisinde yeterli sayıda CAR-T hücresinin hazırlanmasını zorlaştırmaktadır. Ayrıca hastadan yeterli sayıda sağlıklı T hücresi toplamak da zordur. Kullanıma hazır allojenik T hücreleri bu zorlukların üstesinden gelebilmektedir. Ancak bu da şiddetli greft versus-host hastalığına (GVHD) neden olabilmektedir (11).

CAR-NK-92 hücreleri ise, kolaylıkla üretilebilmekte ve dondurularak tedaviye hazır bir şekilde saklanabilmektedirler (47). Bu da tedaviye hem zaman kazandırmakta hem de maliyeti azaltmaktadır. Şu ana kadar, glioblastoma, akciğer kanseri, prostat kanseri ve yumurtalık kanseri de dahil olmak üzere solid ve hematolojik tümörlerde CAR-NK-92 hücre tedavisi ile yapılan çok sayıda klinik çalışma bulunmaktadır (NCT02742727, NCT02892695, NCT03383978, NCT02944162, NCT03656705) (52).

Klinik yararlarına karşın NK-92 hücreleri lösemili / lenfomalı hastalardan izole edildiği için bu hücre hatlarının enjeksiyondan sonra sekonder tümörogenezise sebep olma riskleri vardır. Bu nedenle öncesinde ışınlanmaları gerekmektedir (51). Yapılan çalışmalarda, NK-92 hücrelerinin 500 cGy gama ışınları ile ışınlanmasının, NK-92 hücrelerinin çoğalmasını önlediği halde yüksek öldürme aktivitelerinin korunduğunu göstermektedir (53). Ayrıca ışınlama dozu 1000 cGy'ye yükseltildiğinde bile, NK-92 hücrelerinin sitotoksik etkileri 48 saat muhafaza edilebilmektedir (51). Burada dezavantaj yaşam ömürlerinin kısa olmasından dolayı tedavide tekrarlanan dozlara ihtiyaç duyulmasıdır. Ancak hedef dışı sitotoksisite açısından düşünüldüğünde bu kısa yaşam ömürleri avantaja dönüşmektedir. Dahası, CAR-NK-92 hücrelerine intihar genleri takılarak da hedef dışı sitotoksisiteleri sınırlandırılabilmektedir (54).

2.4.1.4. CD16 reseptörü

Fc gama reseptör III (FcyRIII) olarak da bilinen CD16, doğal öldürücü (NK) hücreler, makrofajlar ve nötrofiller dahil olmak üzere belirli bağışıklık hücrelerinin yüzeyinde bulunan bir reseptör proteinidir (55). Antikorların Fc bölgesine bağlanarak, antikor bağımlı hücre sitotoksisitesine (ADCC) aracılık etmektedir. Antikorlar patojenlere, enfekte hücrelere ya da kanser hücrelerine bağlandığında, antikorların Fc bölgesi, bağışıklık hücrelerinde bulunan CD16 reseptörü ile etkileşime geçmekte ve çeşitli bağışıklık tepkilerine yol açmaktadır (56).

CD16 ile antikorlar arasındaki etkileşim, bağışıklık sisteminin patojenleri ve anormal hücreleri ortadan kaldırma yeteneğini artıran çok önemli bir mekanizmadır.

İmmünoterapi tedavilerinde etkinliği artırmak için kullanılan antikorlarlar ile immün yanıt modüle edilebilmektedir. Monoklonal antikorlar, NK hücre aktivasyonunu doğrudan ve / veya dolaylı olarak düzenleyebilmektedir. Tümöre özgü bu antikorlar ile, NK hücresi üzerinde eksprese edilen CD16'nın aktifleştirici reseptörünün IgG'nin Fc kısmının bağlanmasıyla NK hücreleri aktive edilebilmekte ve tümör hücrelerini öldürmek için sitotoksik granüller salgılayabilmektedirler (57).

2.4.1.5. İnterlökin 12

İnterlökin (IL)-12, $CD8^+$ T ve doğal öldürücü (NK) hücrelerin güçlü aktivasyonu ve artan interferon gama (IFN-γ) üretimindeki rolü ile bilinen pro-inflamatuar tip I sitokindir (58). Enfeksiyona veya diğer bağışıklık uyarılarına yanıt olarak çeşitli bağışıklık hücreleri tarafından üretilmektedir. Hem $CD8^+$ T hücrelerinin hem de NK hücrelerinin çoğalmasında ve sitotoksik aktivitelerinin artırılmasın etkisi olduğu bilinmektedir (59). IL-12, IFN- γ üretimini artırarak saf $CD4^+$ T hücrelerinin T yardımcı (Th) 1 hücrelerine farklılaşmasına sebep olmaktadır (60). Dolayısıyla adaptif, hücre aracılı bağışıklığın önemli bir düzenleyicisidir (61).

İmmün sistemi uyarıcı özellikleri göz önüne alındığında, IL-12'nin kanser ve bulaşıcı hastalıklar da dahil olmak üzere çeşitli durumlarda terapötik hedef olabileceği düşünülmektedir.

2.4.1.6 HAŞŞAŞİN

HAŞŞAŞİN hücre hattı, Acıbadem Labcell A.Ş.'nin patent başvurusu yapılan (EP4061385) NK-92 hücre hattına IL-12 ve CD16 plazmidlerini taşıyan lentivirus vektör yöntemiyle transfekte edilerek üretilen bir ürünüdür. IL-12 ekspresyonu ELISA yöntemiyle, CD16 reseptörü ise flow sitometri ile doğrulanmıştır. Transfeksiyon verimliliği ise, CD16 seleksiyonu ile artırılmıştır.

CAR konstraktı, ikinci bir lentiviral vektör ile HAŞŞAŞİN hücre grubuna transfekte edilmiş ve doğrudan tümör hücre grubuna hedeflenmiştir. Pankreas duktal

adenokarsinomunda aşırı eksprese edilen ve anormal şekilde lokalize olan Müsin-1 (MUC-1) (62) antijenine spesifik bir CAR ile tümör öldürme kapasitesinin artırılması amaçlanmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

Tablo 1. Hücre hatları ve kullanım alanları

Hücre Hattı	**Katalog Numarası, Marka**	**Kullanım Alanı**
Jurkat - İnsan Akut Lenfoblastik Lösemi T Hücre Hattı	TIB-152, ATCC	Lentiviral titrasyon and RCL test
HEK293T - İnsan Embriyonik Böbrek Hücre Hattı	CRL-3216, ATCC	Lentivirüs Üretimi
NK-92- Non-Hodgkins Lenfoma NK Hücre Hattı	CRL-2407, ATCC	Efektör Hücre
HAŞŞAŞİN-CD16^{+} IL12^{+}NK-92 Hücre Hattı	Acıbadem Labcell	Efektör Hücre
CAR HAŞŞAŞİN -Muc-1 spesifik CD16^{+}IL-12^{+} NK-92 Hücre Hattı	Acıbadem Labcell	Efektör Hücre
PANC-1-İnsan Pankreas Kanseri Hücre Hattı	CRL-1469, ATCC	Hedef Pankreas Kanseri Hücre Hattı

Tablo 2. Kitler, solüsyonlar ve antikorlar

Kitler, Solüsyonlar ve Antikorlar	**Katalog Numarası, Marka**
DMEM Besiyeri	11965084, Gibco
TexMACS Besiyeri	130-097-196, Miltenyi
Heat-inactivated Fetal Bovine Serum	10500064, Gibco

Tablo 2. Kitler, solüsyonlar ve antikorlar (Devamı)

Kitler, Solüsyonlar ve Antikorlar	**Katalog Numarası, Marka**
İzopropanol	A3928, PanReac Appli chem
Tripan Mavisi	T8154, Sigma Aldric
MACSPlex Cytokine Bead Array Kit	130-099-169, Miltenyi
QIAfilter Plasmid Giga Kit	12291, QIAgen
Lenti-X concentrator	PT4421-2, Takara
Fugene HD Transfection Reagent	E2312, Promega
Optimem	31985070, Gibco
Penisilin/Streptomisin	03-031-5B, Biological Industries
Tripsin	03-053-1B, Biological Industries
Ringer Laktat	PPB-2001252, Polypharma
Human Serum Albumin	Octapharma CSL Behring
Ficoll-Paque Plus	17-1440-02, Cytiva
LB agar	110283.0500, Merck
LB broth	110285.0500, Merck
Ampicilin 100mg/mL	A5354, Sigma Aldrich
LS column	130-042-40, Miltenyi
MACS GMP recombinant human IL-2	170-075-14, Miltenyi
Trypsin EDTA solution C	03-053-1B, Biological Industries
2-mercaptoethanol	21985023, Gibco
CD25-APC	302610, Biolegend
CD107alpha-PeCy5.5	328616, Biolegend
Human EGFR Biotinyleted antibody	FAB9577B-100 , R and D systems
CD4-APC.Cy7	317418, Biolegend
CD8-FITC	301050, Biolegend
CD56PE	981202, Biolegend
İzopropanol	A3928, PanReac Appli chem
CD16 VioBlue	130-113-396, Miltenyi
Ksilen	109843.5000, Merck

Tablo 2. Kitler, solüsyonlar ve antikorlar (Devamı)

Kitler, Solüsyonlar ve Antikorlar	**Katalog Numarası, Marka**
Hematoksilen	1.05174.0500, Merck
Eozin Y Solüsyonu	1.09844.1000, Merck
CellTrace™ violet cell proliferation kit	C34557, Invitrogen™
Matrigel Matrix	354230, Corning
D-luciferin	L9504, Sigma Aldrich
EDTA'lı kan tüpü	368861, BD Vacutainer
IL-12 ELISA kit	KAC1568, Invitrogen
DPBS	02-023-1A, Biological Industries
Penisilin-Streptomisin (10X)	03-031-5B, Biological Industries

Tablo 3. Ekipmanlar

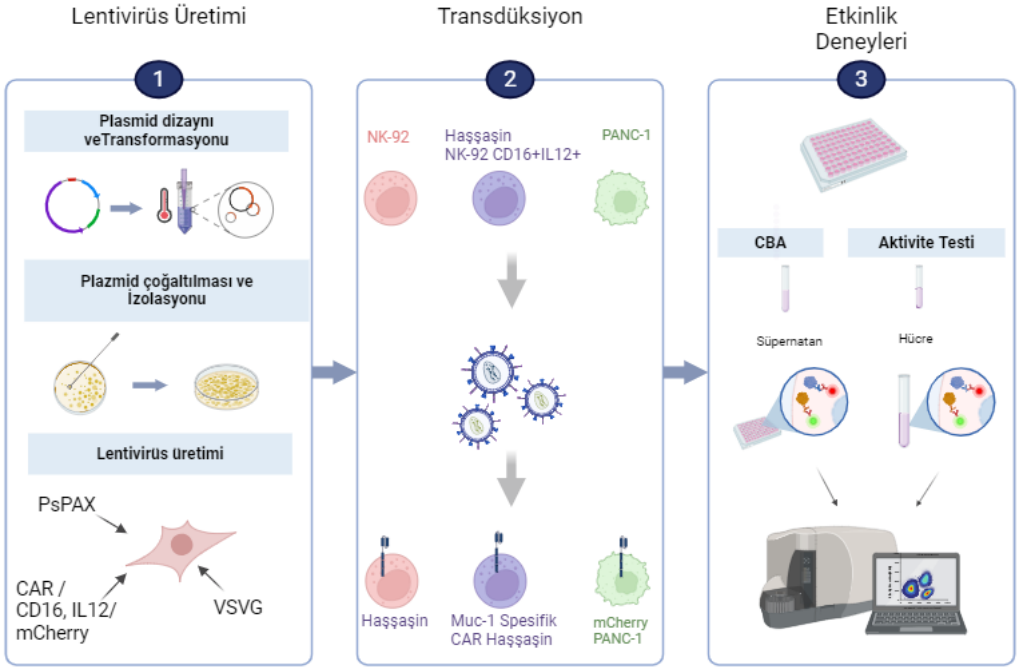
Ekipman	**Katalog Numarası, Marka**
Sınıf II Biolojik Güvenlik Kabini	MN120, Nüve
Işık Mikroskopu	Leica
İnkübatör	IC0150med, Memmert
Floresan Mikroskop	Zeiss Axio Scope A1
Elisa Okuyucu	Omega, BMG
Flow Sitometrisi	Ctoflex, Beckman Coulter
Su Banyosu	NB20,Nüve
Santrifüj	Allegra X-30R, Beckman Coulter
Otomatik Hücre Sayıcı	T20, Biorad
Pipetör	Pipetus, Hirschmann
Nanodrop	NanoDrop one, Thermo
Dondurucu (-20)	1060TY, Arçelik

Tablo 3. Ekipmanlar (Devamı)

Ekipman	**Katalog Numarası, Marka**
Dondurucu (-80)	DW-86L628, Haier
In vivo Görüntüleme Cihazı	CaliperLumina III, PerkinElmer
Otomatik Pipet	(10, 100, 200, 1000 uL) Axygen
Buzdolabı (+4)	1060TY, Arçelik

3.2. Yöntem

3.2.1. *In vitro* analizler



Şekil 1. *In vitro* Analizler. 1. Lentivirüs üretimi. 2. Transdüksiyon. 3. Etkinlik deneyleri (BioRender.com ile oluşturuldu).

3.2.1.1. Hücre kültürü

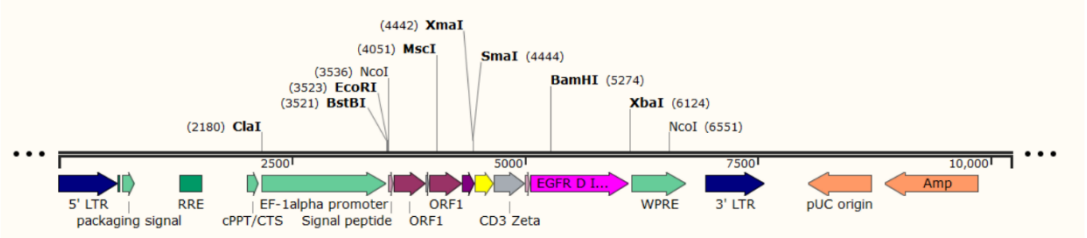
Çalışmada PANC-1 (CRL-1469, ATCC), HEK293T (CRL-3216, ATCC), Jurkat (TIB-152, ATCC), NK-92 (CRL-2407, ATCC), HAŞŞAŞİN/CAR HAŞŞAŞİN

(EP4061385) hücre hatları kullanıldı. PANC-1 ve HEK293T hücre hatları %10 fetal bovine serum (FBS) (10500064, Gibco) ve %1 penisilin-streptomisin (03-031-5B, Biological Industries) eklenen uygun besiyeri içerisinde, NK-92, HAŞŞAŞİN ve CAR HAŞŞAŞİN hücre hatları %10 fetal bovine serum (FBS) (10500064, Gibco), %1 penisilin-streptomisin (03-031-5B, Biological Industries), % 0,1 2-Mercaptoethanol (21985023, Gibco) ve 50 U/ml interlökin (IL)-2 (170-075-14, Miltenyi) eklenen TexMACS (170-076-309, Miltenyi) besiyeri içerisinde, standart koşullarda (37 °C' de, %5 CO_2) inkübe edildi.

3.2.1.2. Lentivirüs üretimi

Plazmid dizaynı

anti-MUC-1 plazmid konstraktı Creative Biolabs'tan temin edilmiştir. Plazmid konstraktı bilgileri Şekil 2'de gösterilmiştir. Acıbadem Labcell Hücre Laboratuvarı ekibi tarafından dizaynı gerçekleştirilen CD16 IL12 gen dizisi Gen Script firmasına sentezletilmiştir. Fluciferin-mcherry plazmidi Koç Üniversitesi'nde görev alan Dr. Tuğba Bağcı tarafından temin edilmiştir (63).



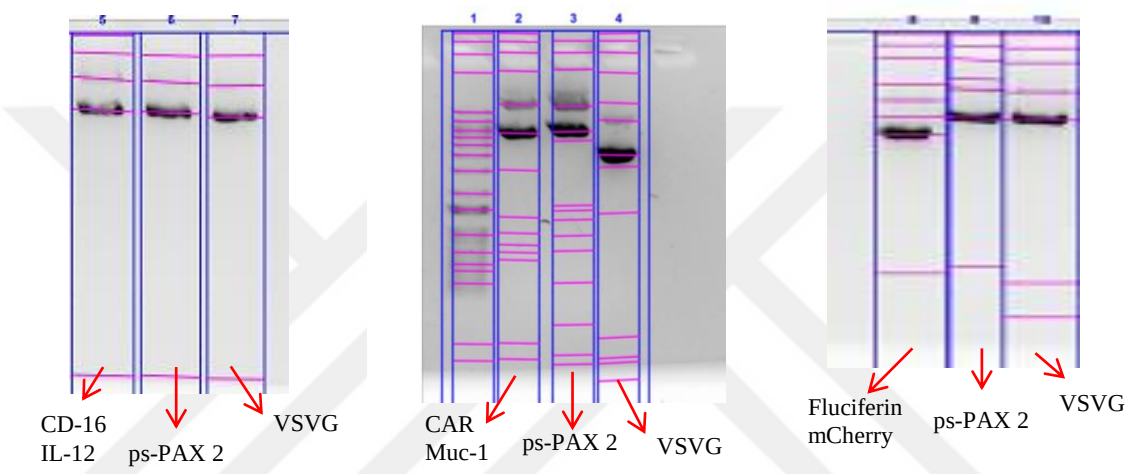
Şekil 2. anti-MUC-1 plazmid konstrakt dizaynı.

Transformasyon, plazmid izolasyonu

GeneScript/Creative BioLabs firmasından gelen plazmidler (CD16 IL12 ve CAR MUC1) ve Fluciferin-mcherry plazmidi, E.coli DH5α suşu kullanılarak ısı şoku protokolü ile transforme edildi. LB agarda, 37°C'de 16-20 saat kültüre edildi. Spesifik koloniler seçilerek 15 ml'lik falkon tüplerde ampisilin içeren LB sıvı besiyerine

aktarıldı, 6 saat boyunca 37°C'de inkübe edildi (mini kültür). Ardından LB sıvı besiyeri içeren erlenlere aktarılarak 37°C'de 16 saat inkübe edildi (maksi kültür).

Çoğaltılan plazmidlerin izolasyonu için QIAfilter Plasmid Giga Kit (12291, Qiagen) kullanıldı ve protokole uygun şekilde plazmidlerin izolasyonu gerçekleştirildi. Plazmid DNA'larının kalitesi Nanodrop ile ölçüldü (1,8 – 2), saflığı ve miktarı hesaplandı. Örnek içinde istenmeyen ek moleküler bileşenlerin olup olmadığı jel elektroforezi ile değerlendirildi (Resim 1).



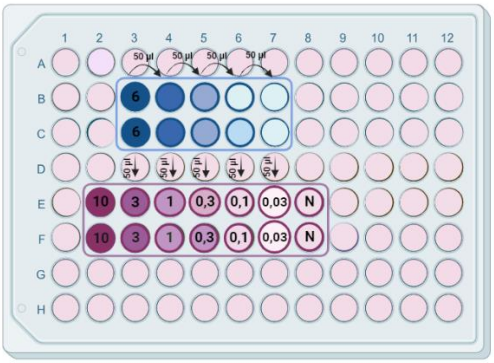
Resim 1. CD16 IL-12, MUC-1 ve Fluciferin mCherry plazmidleri jel elektroforez görüntüleri

Lentivirus üretimi, titrasyon

Lentivirüs üretimi için hedef plazmidlerden her biri (CD16 IL12, CAR MUC-1 ya da Fluciferin mCherry) ile VSVG ve psPAX2 vektörleri kullanıldı. Çok sayıda HAŞŞAŞİN, Muc-1 spesifik CAR HAŞŞAŞİN ya da fluciferin mCherry eksprese eden PANC-1 hücreleri üretebilmek için 5 katlı flasklar kullanıldı. Öncelikle, HEK293T hücreleri 100 ml DMEM besiyerinde (11965084, Gibco), her bir flask katında $60x10^6$ hücre olacak şekilde inoküle edildi. Hücrelerin flask yüzeyindeki doluluk oranı %70-80'ne ulaştığında, DMEM besiyeri flasktan uzaklaştırıldı ve %1 penisilin-streptomisin içeren 75 ml OPTIMEM (31985070, Gibco) besiyeri eklenerek 37 °C'de 1-2 saat inkübe edildi. Ardından pCMV.VSVG, psPAX2 plazmidleri ve hedef plazmidlerden

her biri (CD16 IL12, MUC-1 ya da fluciferin mCherry plazmidi) ile transfeksiyon reaktifi olarak kullanılan Fugene (E2312, Promega) hücrelerin üzerine ekildi. Seri olarak gerçekleştirilen hücre pasajı sonrasında, süpernatanlar uzaklaştırıldı ve peletler 400 µl soğuk OPTIMEM (31985070, Gibco) içerisinde çözüldü ve 1 ml kriyo tüplerine aktarılarak, -80 °C'de saklandı.

Titrasyon için 96 kuyucuklu plakanın 14 kuyucuğuna 100 µl besiyeri içerisinde 10000 Jurkat hücresi (TIB-152, ATCC) ekildi. Her bir örnek çift tekrarlı olarak çalışıldı. Plakanın ayrı bir alanında 10 adet kuyucuğa100 µl Jurkat besiyeri eklendi. Ilk iki kuyucuğa 6 µl virüs eklenip seri dilüsyon ile 50 µl örnek bir sonraki kuyucuğa aktarıldı. Ardından her bir kuyucuktan alınan 50 µl örnek Jurkat hücrelerinin olduğu kuyucuklara ekildi (Şekil 3). Titrasyona tabi tutulan hücreler, 37 °C'lik bir hücre inkübatöründe 3 gün boyunca inkübe edildi. 3 günlük inkübasyonun ardından her bir kuyucuktaki hücreler otomatik pipet ile al-ver yapıldı ve 50 µl örnek cam tüplere toplandı. CAR için 2 µl anti-EGFR antikoru (352908, Biolegend), CD16 IL12 virüsü için CD16 antikoru (130-113-396, Miltenyi) ilave edildi. +4°C'de 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra her bir örneğe 1 ml DPBS eklendi ve 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatanlar atıldı, peletler 150 µl DPBS (02-023-1A, Biological Industries) içinde çözüldü ve ekpresyon düzeyleri flow sitometri (Cytoflex, Beckman Coulter) ile ölçüldü. Fluciferin mCherry virüsleri için herhangi bir boyama yapılmadan flow sitometri cihazındaki mCherry kanalı üzerinden analiz gerçekleştirildi.



Şekil 3. Jurkat hücreleri üzerinde lentiviral titrasyon deneyi (BioRender.com ile oluşturuldu).

Viral titrasyon sonrası hedef gen ekspresyonunun %5 ila %10 aralığına karşılık gelen konsantrasyonu belirlendi. Bu konsantrasyona göre virüsün IFU/mL'si hesaplandı. Ardından IFU değeri kullanılarak bir hücreye düşen ortalama virüs parçacığı sayısı (MOI değeri) hesaplandı.

3.2.1.3. Transdüksiyon

NK-92 hücrelerinin transdüksiyonu

Hücre canlılığı ve sayısı optimal seviyeye ulaşan NK-92 (CRL-2407, ATCC) hücreleri transdüksiyon için hazırlandı. 1 ml besiyeri içerisinde 200000 hücre 24 kuyucuklu plakanın 12 tanesine ekildi. 5 MOI CD16 IL12 lentivirüsü vectofusin-1(130-111-163, miltenyi) ile birleştirildi ve 1 saat 400g'de 4 °C'de santrifüjlendi. Ardından NK-92 hücrelerinin üzerine ekildi. Plaka 37 °C'de inkübe edildi. 2 gün sonra, hücreler T25 flaska transfer edildi. Transdüksiyonun 5. gününde 100 µl örnek alınarak, HAŞŞAŞİN hücreleri CD16 antikoru ile boyandı ve flow sitometri analizi yapılarak CD16 ekpresyon düzeyleri ölçüldü. HAŞŞAŞİN hücre yüzdesini artırmak için CD16 seleksiyonu yapıldı.

HAŞŞAŞİN hücrelerininin transdüksiyonu

Hücre sayısı ve canlılığı optimal seviyeye ulaşan HAŞŞAŞİN hücreleri 1 ml besiyeri içerinde 200000 hücre olacak şekilde 24 kuyucuklu plakanın 12 tanesine ekildi. 5 MOI CAR lentivirüsü vectofusin-1(130-111-163, miltenyi) ile birleştirildi ve 1 saat 400g'de 4 °C'de santrifüjlendi. HAŞŞAŞİN hücreleri üzerine ekilerek, 37 °C'de inkübe edildi. 2 gün sonra, hücreler T25 flaska transfer edildi. Transdüksiyonun 5. gününde 100 µl örnek alınarak, CAR HAŞŞAŞİN hücreleri anti-EGFR antikoru (352908, Biolegend) ile boyandı ve ekpresyon düzeyleri flow sitometri ile ölçüldü.

PANC-1 hücrelerinin transdiksüyonu

Hücre canlılığı ve sayısı optimal seviyeye ulaşan PANC-1 hücreleri transdüksiyon için hazırlandı. Komplet besiyerinde kültüre alınıp çoğaltılan hücreler, tripsin ile kaldırılıp, 300g'de 10 dakika santrifüj edildi. 24 kuyucuklu plakanın 5 kuyucuğuna, her bir kuyucuğa 500 µl besiyeri içerisinde 100000 hücre ekildi. 5 MOI fluc mCherry lentivirüsü vectofusin-1(130-111-163, miltenyi) ile birleştirildi ve 1 saat 400g'de 4 °C'de santrifüjlendi. Ardından PANC-1 hücrelerin üzerine eklendi ve 37 °C'de inkübe edildi. 3 gün sonra hücreler tripsin ile toplandı ve sayım yapıldıktan sonra T25 flaska transfer edildi. Transdüksiyonun 6. gününde 100 µl örnek alınarak flow sitometri ile mCherry ekpresyon düzeyleri belirlendi.

3.2.1.4. Etkinlik deneyleri

Radyasyonun NK-92 ve HAŞŞAŞİN hücre canlılığı üzerine etkisi

Sekonder tümörogeneze neden olmaması için 1000 cGy'de ışınlanan NK-92 ve HAŞŞAŞİN hücrelerinin ışınlama sonrası canlılıklarında herhangi bir etkinin olup olmadığı test edildi. Işınlanmış ve ışınlanmamış NK-92 ve HAŞAŞŞİN hücreleri 24 kuyucuklu plakaya ekilerek, 24, 48 ve 72. saatlerde canlı hücre sayıları karşılaştırıldı.

NK-92 ve HAŞŞAŞİN hücrelerinde IL-12 ekspresyonunun belirlenmesi

Işınlanmış ve ışınlanmamış NK92 ve HAŞŞAŞİN hücrelerinin IL-12 ekspresyon düzeyleri ticari kit kullanılarak (KAC1568, Invitrogen), ELISA yöntemi ile üretici firmanın kullanım talimatlarına göre ölçüldü.

Efektör hücrelerin PANC-1 hücreleri ile ko-kültürü

Efektör hücrelerinin sitotoksik aktivitesini belirlemek için 500 µl besiyeri içerinde süspanse edilmiş 25000 fluciferin mCheryy ile işaretlenmiş PANC-1 hücreleri 24 kuyucuklu plakaya ekildi. Ardından 500 µl besiyeri içerinde efektör hücreler (NK-92,

HAŞŞAŞİN ya da CAR HAŞŞAŞİN), efektör hücre: hedef hücre oranı 1:1, 5:1, 10:1 olacak şekilde PANC-1 hücrelerinin üzerine eklendi.

IL-12'nin etkinliğini görebilmek için, periferik kan mononükleer hücresi (PBMC) varlığında yapılan deneylerde, aynı deney gruplarına CTV (Cell Trace Violet) (C34557, Invitrogen) ile işaretlenen, 100 µl besiyeri içerisinde 25000 PBMC hücresi eklendi. Deneye başlamadan önce CTV'li hücre popülasyonunun %95'in üzerinde olduğu flow sitometri ile doğrulandı.

Efektör hücreler etkinlik deneyi öncesinde, %1 HSA (insan serum albumin) (Octapharma CSL Behring) içeren ringer laktat (PPB-2001252, Polypharma) içerisinde süspanse edilerek, ışınlanmak üzere Acıbadem Altunizade hastanesine gönderildi. 1000 cGy'de ışınlanan hücreler, hemen laboratuvara getirilerek 2 kez DPBS ile yıkandı ve hücre sayısı belirlendikten sonra deney düzenekleri kuruldu.

PBMC hücrelerinin izolasyonu ve CTV ile işaretlenmesi

Etilendiamin Tetraasetik Asit (EDTA)'lı kan tüpüne (368861, BD Vacutainer) alınan 22 ml taze insan kan örneği 50 ml'lik falkon tüpe aktarılarak, üzerine 11 ml Ficoll-Paque Plus (17-1440-02, Cytiva) eklendi. 800 g'de 25 dakika santrifüj edildi. Santfifüj sonrası PBMC'lerin yer aldığı beyaz alan, otomatik pipet ile toplandı. Üzerine PBS eklenerek 400 g'de 10 dakika santrifüj edildi. PBS ile 2 kez yıkama yapıldıktan sonra, hücre sayım cihazı ile elde edilen PBMC hücrelerinin sayısı belirlendi.

PBMC hücresinin CTV ile işaretlenmesinde, Cell Trace™ Violet Cell Proliferation kit (C34557, Invitrogen™) kullanıldı. 1 vial stok solüsyondan 5 mM hazırlamak için, vial üzerine 2 µl DMSO eklendi. İyice pipetaj yapılıp karıştırıldı ve ışıktan korundu. Çalışma konsantrasyonunun 5 µM olabilmesi için 1:100 dilüe edildi. Bunun için, 2 ml içerisinde 5 milyon PBMC hücresi kullanıldı. Hücreler 1800 µl TexMacs besiyeri içerisinde çözüldü. Hazırlanan stok solüsyonundan 2 µl alınıp 198 µl PBS içerisinde çözüldü. Sonrasında hücre süspansiyonuna eklendi. Hücre

süspansiyonu iyice karıştırılıp, ışıktan muhafaza edilerek 37°C'de 20 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 10 ml media eklendi ve 37°C'de 20 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası hücre sayımı alınıp hücreler 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. İstenen hücre sayısına göre besiyerinde çözüldü.

Flow sitometri

Ko-kültürden 48 saat sonra, hücreler toplandı ve flow sitometri analizleri CD56-PE (981202, Biolegend), CD107a-PerCp.cy5.5 (328616, Biolegend), CD4-APC.cy7 (317418, Biolegend), CD8-FITC (301050, Biolegend), CD25-APC (302610, Biolegend) antikorları ile boyama sonrasında üretici firmanın protokolüne göre gerçekleştirildi (Ctoflex, Beckman Coulter).

Sitokin paneli

Etkinlik deneyinde, 48 saat sonra toplanan süpernatan örnekleri kullanılarak sitokin paneli analizi gerçekleştirildi. Analiz için MACSPlex Cytokine Bead Array kiti (130-099-169, Miltenyi) kullanıldı ve kitin protokolüne uygun şekilde flow sitometri ile analiz gekleştirildi (Ctoflex, Beckman Coulter). Protokole uygun olarak, her bir sitokin için standart eğriler oluşturuldu ve elde edilen veriler bu standart eğri üzerinde analiz edilerek değerlendirildi.

3.2.1.5. Kalite kontrol testleri

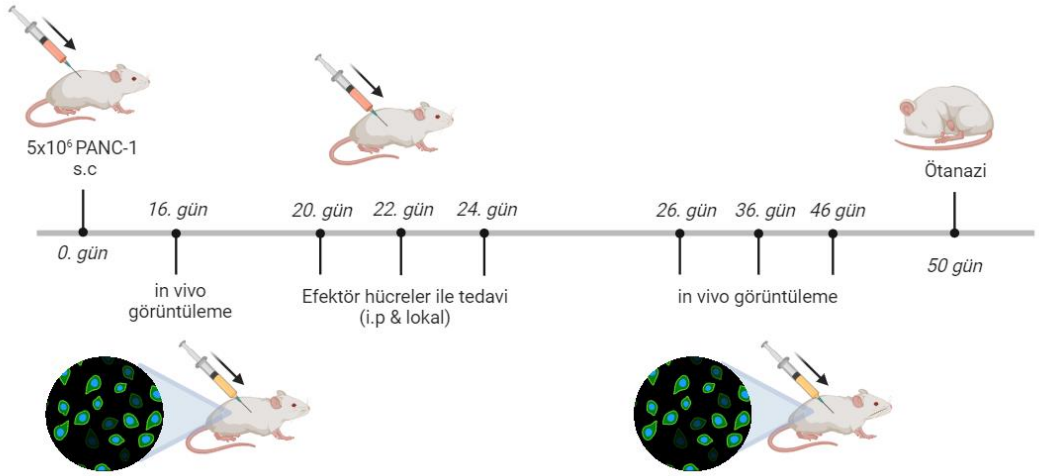
Her bir hücrenin mikoplazma, endotoksin, VDRL (Venereal Disease Research Laboratory), mantar, aerobik-anaerobik bakteri kültürü, Hepatit B, Hepatit C, İnsan Bağışıklık Yetmezliği Virüsü (HIV), Epstein-Barr Virüsü (EBV) kontrol testleri Acıbadem Labmed Laboratuvarı tarafından test edildi.

3.2.2. *In vivo* analizler

Çalışmada, Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden alınan, 20-25 gr ağırlığında, 6-8 haftalık NSG (NOD-scidIL2Rgammanull) dişi fareler (n=40) kullanıldı. Fareler steril koşullar altında, 12 saat aydınlık/karanlık ışık döngüsünde, sabit ısı (22 ± 1 ºC) ve nem (%60-70) ortamında steril pellet yem kullanılarak ad libitum beslendi. Çalışmaya ilişkin etik kurul izni Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan alındı (Onay tarihi ve numara: ACU-HADYEK 2019/67 EK-1).

3.2.2.1. Deney protokolü ve grupları

Çalışmada 6-8 haftalık NSG dişi farelerin sağ bacağının üst kısmına insan pankreas kanseri hücre hattı olan fluc mCheryy PANC-1 (CRL-1469, ATCC) subkutan (s.c) olarak uygulandı. Uygulamadan sonra hayvanların tümör gelişimleri ve vücut ağırlıkları haftada iki kez olacak şekilde takip edildi. Model oluşturulduktan 2 hafta sonra, hayvanların tümörleri IVIS-İnvivo (CaliperLumina III) görüntüleme cihazı ile görüntülendi. Ardından randomize bir şekilde gruplara ayrıldı. Efektör hücrelerin (NK-92, HAŞŞAŞİN ve CAR HAŞŞAŞİN) PANC-1 hücreleri üzerindeki etkinliğini belirlemek amacıyla her bir hücre 48 saat arayla 3 doz olacak şekilde 10^7 sayıda lokal veya intraperitoneal olarak uygulandı. Sekonder tümorogenezise sebep olmamak için hücreler tedavi öncesinde 1000 cGy'de ışınlanarak verildi. Tedaviden sonraki 2., 12. ve 22. günlerde tümör gelişimi *in vivo* görüntüleme ile takip edildi. Tedavi sonrası 28. günde hayvanlar maksiller venlerinden hemogram ve biyokimya ölçümleri için kan alındıktan sonra ötanazi edildi (Şekil 4).



Şekil 4. *In vivo* deney planı (BioRender.com ile oluşturuldu).

Pilot Çalışma: Hayvanlara $1x10^6$, $2x10^6$ veya $5x10^6$ sayıda fluciferin mCheryy PANC-1 hücreleri s.c olarak verildi ve tümör gelişimi kaliper ile takip edildi. 100 mm^3'e ulaşma sürelerine göre tümör modelinde kullanılacak olan hücre sayısına karar verildi.

Subkutan Tümör Modelinin Oluşturulması: Tümör modelini oluşturmak için insan pankreas kanseri hücre hattı olan PANC-1 hücreleri kullanıldı. Model oluşumu öncesinde bu hücre hattı kültüre alınıp, tümör gelişimini *in vivo* görüntüleyebilmek için Fluciferin mCherry virüsü ile transdükte edildi.

Fluciferin mCherry Panc-1 Hücrelerinin Enjeksiyon için Hazırlanması: Adeziv olan PANC-1 hücreleri, %0,25 tripsin kullanılarak 37 °C' de 2 dakika bekletilerek kaldırıldı. Süspanse edilen hücreler, 300 g'de 10 dakika santrifüj edildi. Hücre sayımının ardından, her bir fareye verilecek olan $1x10^6$, $2x10^6$ veya $5x10^6$ hücre (64-66), inokülasyon sırasında sızıntı riskini en aza indirgemek ve bölgede tutunmalarını kolaylaştırmak amacıyla matrigel (354230, Corning) içerisinde (100 µl) süspanse edildi (67). Farelerin implantasyon yapılacak bölgeleri hood içerisinde traş edildi. Matrigel içinde süspanse edilen PANC-1 hücreleri insülin enjektörü kullanılarak subkutan (s.c) olarak enjekte edildi. İmplantasyon sonrası farelerin morbidite açısından değerlendirilmesi için kambur duruş, özbakımın azalması ve hareket azalması parametreleri takip edildi. Ayrıca inokülasyondan bir hafta sonra, tüm

hayvanların tümör gelişimi haftada iki kez olacak şekilde kaliper ile ölçüldü ve kilo değişimleri kaydedildi. Kaliper ile tümör boyutunun hesaplanması aşağıdaki formül ile yapıldı (68).

$$\frac{(\text{Kısa kenar})^2 \text{ x Uzun kenar}}{2}$$

İnokülasyondan iki hafta sonra hayvanların tümör hacmi IVIS - *In vivo* (CaliperLumina III) görüntüleme sistemi ile ölçüldü. Bu amaçla hayvanlar; cihaza ilave edilmiş isofluran anestezisi altında, dorsoventral, ventrodorsal pozisyonda ısıtıcı pedin üzerine yatırılarak görüntülendi. Hayvanların tümör ölçümlerinin yapılabilmesi için her birine görüntülemeden 15 dakika önce 100 µl D-lucirefin (L9504, Sigma Aldrich) i.p olarak uygulandı. Fluciferin mCherry ile işaretli PANC-1 hücrelerinin floresan ışıma yapmasına göre, belirli alandaki fotonlar sayılarak, tümöre etkisi (küçülme veya büyüme) kantitatif olarak değerlendirildi. Bu noktada tümör büyüklükleri 2 farklı açı ile yapılan ölçüm sonrasında hesaplandı (uzunluk×genişlik).

Tümör ölçümleri gerçekleştirilen hayvanlar randomize bir şekilde aşağıdaki gruplara ayrıldı.

1. Tümör grubu (n=5): Bu gruba, $5x10^6$ PANC-1 hücresi s.c verildi.

2. NK-92 grubu (n:5): Bu gruba, $5x10^6$ PANC-1 hücre enjeksiyonu sonrası 20, 22 ve 24. günlerde 10^7 NK-92 hücresi i.p. olarak verildi.

3. Lokal NK-92 grubu (n:5): Bu gruba, $5x10^6$ PANC-1 hücre enjeksiyonu sonrası 20, 22 ve 24. günde 10^7 NK-92 hücresi tümör implantasyonunun hemen yanına s.c. olarak verildi.

4. HAŞŞAŞİN grubu (n:5): Bu gruba, $5x10^6$ PANC-1 hücre enjeksiyonu sonrası 10^7 HAŞŞAŞİN hücresi 20, 22 ve 24. günde i.p. olarak verildi.

5. Lokal HAŞŞAŞİN grubu (n:5): Bu gruba, $5x10^6$ PANC-1 hücre enjeksiyonu sonrası 20, 22 ve 24. günde 10^7 HAŞŞAŞİN hücresi tümör implantasyonunun hemen yanına s.c. olarak verildi.

6. CAR HAŞŞAŞİN grubu (n:5): Bu gruba, $5x10^6$ PANC-1 hücre enjeksiyonu sonrası 10^7 CAR HAŞŞAŞİN hücresi 20, 22 ve 24. günde i.p. olarak verildi.

7. Lokal CAR HAŞŞAŞİN grubu (n:5): Bu gruba, $5x10^6$ PANC-1 hücre enjeksiyonu sonrası 20, 22 ve 24. günde 10^7 CAR HAŞŞAŞİN hücresi tümör implantasyonunun hemen yanına s.c. olarak verildi.

Enjeksiyon öncesi efektör hücrelerin hazırlığı: Tedavi günü NK-92, HAŞŞAŞİN ve CAR HAŞŞAŞİN hücreleri, %1 HSA içeren ringer laktat içerisinde çözülerek, 1000 Gy'de ışınlandı. Işınlama sonrası hücreler 100 µl içerinde 10^7 hücre olacak şekilde %1 HSA içeren ringer laktat içerisinde süspanse edildi. Hazırlanan hücreler insilün enjektörleri kullanılarak her bir hayvana i.p ya da lokal olarak uygulandı.

Ötanazi günü tüm hayvanların maksiller veninden alınan kan örnekleri ile tam kan sayımı, Alanin Aminotransferaz (ALT), Aspartat Aminotransferaz (AST) seviyeleri ölçüldü. Ötanazi sonrası; tümör dokusu, karaciğer, akciğer ve dalak dokuları diseke edildi ve histolojik değerlendirmeleri gerçekleştirildi.

3.2.2.2. Serumda alanin aminotransferaz ve aspartat aminotransferaz düzeyi

Alanin Aminotransferaz (ALT) ve Aspartat Aminotransferaz (AST) düzeyleri ticari kit kullanılarak otoanalizör yardımı ile kolorimetrik yöntemle ölçüldü.

3.2.2.3. Tam kan sayımı

Tam kan sayımı ticari kit kullanılarak otoanalizör yardımı ile fotometrik yöntemle ölçüldü.

3.2.2.4. Doku hasarının değerlendirilmesi

Doku örnekleri %10'luk nötral formalinde fikse edildikten sonra %70, %90, %96, %100'lük alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edildi. Ksilol (109843.5000, Merck) ile şeffaflaştırıldıktan sonra parafine gömüldü. Parafin bloklardan 5µm kalınlığında alınan karaciğer, akciğer, dalak ve tümör dokusu kesitleri hematoksilen (1.05174.0500, Merck) eozin (1.09844.1000, Merck) ile boyandı. Boyanan kesitler ışık mikroskobu altında incelenerek nekroz ve inflamasyon varlığı açısından değerlendirildi.

3.2.2.5. İstatistiksel analiz

Tüm veriler ortalama ± standart hata olarak ifade edildi. Parametrelerin değerlendirilmesinde tek-yönlü varyans analizi (ANOVA) ve çift yönlü varyans analizi (ANAVO) kullanıldı. P değerinin 0,05'ten küçük olması durumunda veriler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. İstatistiksel analizler GraphPad Prism version 8.4.3. kullanılarak gerçekleştirildi.

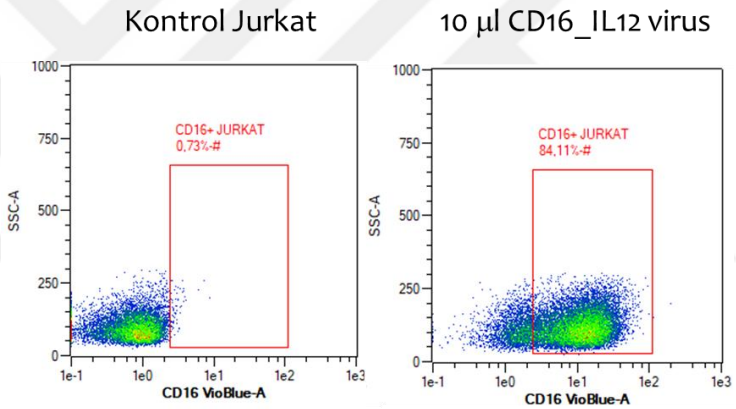
4. BULGULAR

4.1. *In Vitro* Analizler

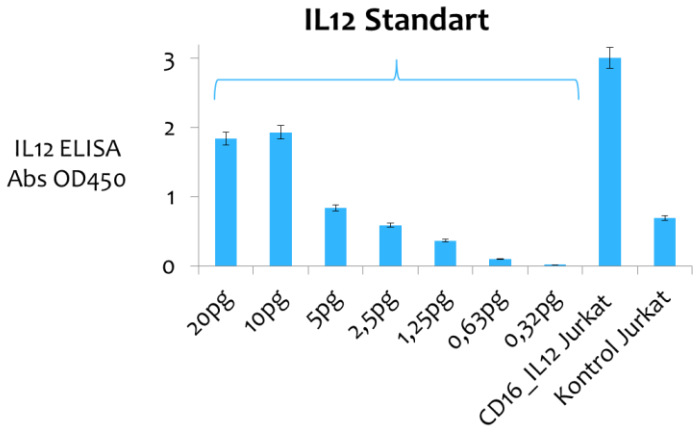
4.1.1. Transdüksiyon

4.1.1.1. NK-92 hücrelerinin CD16 IL12 lentivirüsü ile transdüksiyonu

Elde edilen CD16 IL12 lentivirusü ön çalışma olarak Jurkat hücrelerine transdükte edilmiş, CD16 ekspresyonu düzeyi flow sitometri ile, IL-12 sekresyonu ise ELISA testi ile doğrulanmıştır (Şekil 5 ve Şekil 6).

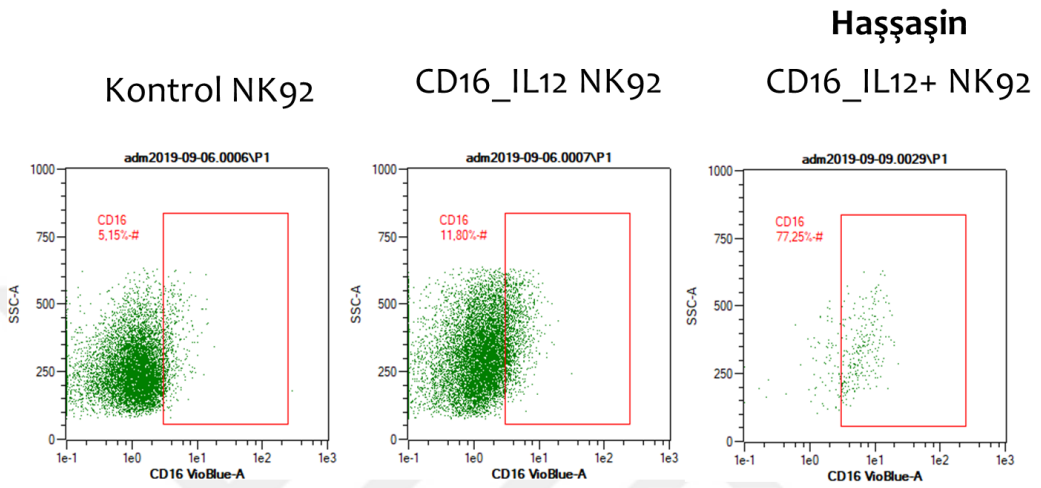


Şekil 5. Jurkat hücrelerinde CD16 IL-12 transdüksiyonu.



Şekil 6. Jurkat hücrelerinde IL-12 ekpresyon düzeyi

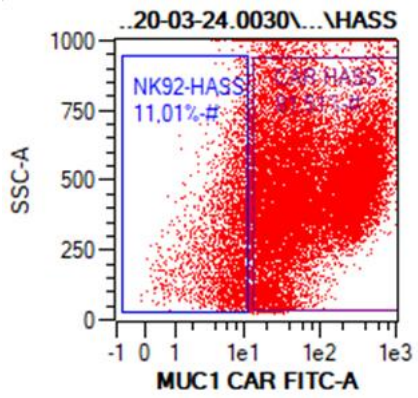
Ardından CD16 reseptörüne sahip IL12 eksprese eden NK92 hücre hattı transdüksiyon yöntemi ile üretildi. Transdüksiyon yüzdesini artırmak için CD16 seleksiyonu yapıldı. Ekspresyon düzeyleri CD16 antikoru (130-113-396, Miltenyi) kullanılarak flow sitometri ile gösterildi. HAŞŞAŞİN hücrelerinin CD16 ekspresyon düzeyi %77,25 olarak saptandı (Şekil 7).



Şekil 7. NK-92 hücrelerinde CD16 transdüksiyonu ve hücre seleksiyonu.

4.1.1.2. HAŞŞAŞİN hücrelerinin MUC-1 lentivirüsü ile transdüksiyonu

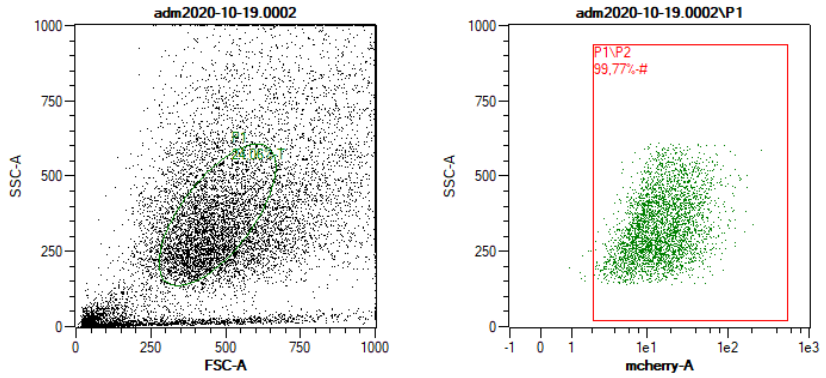
MUC-1 spesifik CAR ile transdükte edilen HAŞŞAŞİN hücrelerinde MUC-1 spesifik CAR ekspresyon düzeyi EGFR (FAB9577B-100, R and D systems) kullanılarak flow sitometri ile belirlendi. HAŞŞAŞİN hücrelerinin CAR ekspresyon düzeyi %81,51 olarak saptandı (Şekil 8).



Şekil 8. HAŞŞAŞİN hücrelerinde MUC-1 CAR ekspresyon düzeyi.

4.1.1.3. PANC-1 hücrelerinin fluciferin mCherry ile transdüksiyonu

Fluciferin mCherry ile transdükte edilen PANC-1 hücrelerinde ekspresyon düzeyi mCherry kanalı kullanılarak flow sitometri ile belirlendi. PANC-1 hücrelerinin Fluc-Mcherry ekspresyon düzeyi %99,7 olarak saptandı (Şekil 9).



Şekil 9. PANC-1 hücrelerinde Fluciferin mCherry ekspresyon düzeyi.

4.1.2. Kalite kontrol testleri

Tablo 4. Efektör hücreler ile PANC-1 hücrelerinin kalite-kontrol analizleri

Test	**Metot**	**Referans Aralığı**	**Sonuç**
Endotoksin	Gel clot (LAL)	+/-	Negatif
Mikoplazma	DNA PCR	+/-	Negatif
Mantar	TSA plak analizi	+/-	Negatif
Aerobik-anaerobik bakteri	Bactec	+/-	Negatif
VDRL	Kart test	+/-	Negatif
HBV	DNA QRT- PCR	1,4-7,3 log IU/mL 1 log IU/mL	Negatif

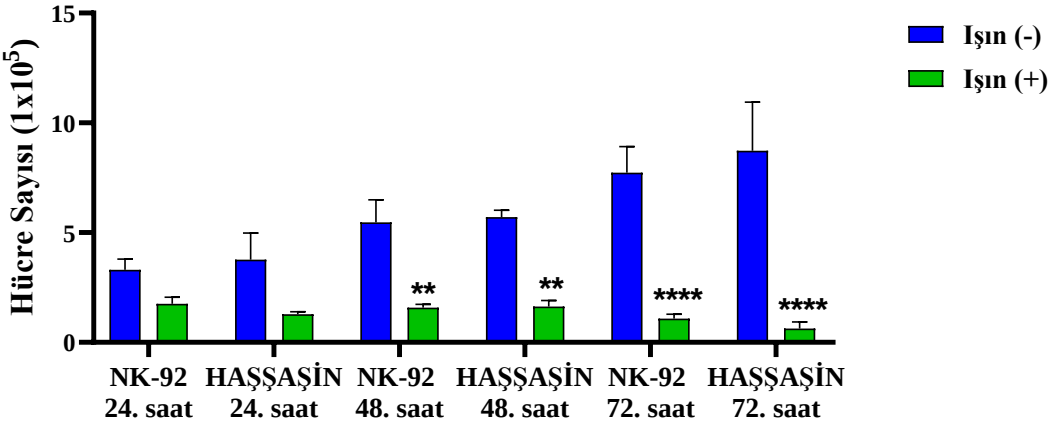
Tablo 4. Efektör hücreler ile PANC-1 hücrelerinin kalite-kontrol analizleri (Devamı)

Test	Metot	Referans Aralığı	Sonuç
HCV	RNA QRT- PCR	1,5-7,2 log IU/Ml 1,3 log IU/mL	Negatif
HIV	RNA QRT- PCR	2-8 log/Ml 1,88 log IU/mL	Negatif

4.1.3. Etkinlik deneyleri

4.1.3.1. Radyasyonun NK-92 ve HAŞŞAŞİN hücre canlılığı üzerine etkisi

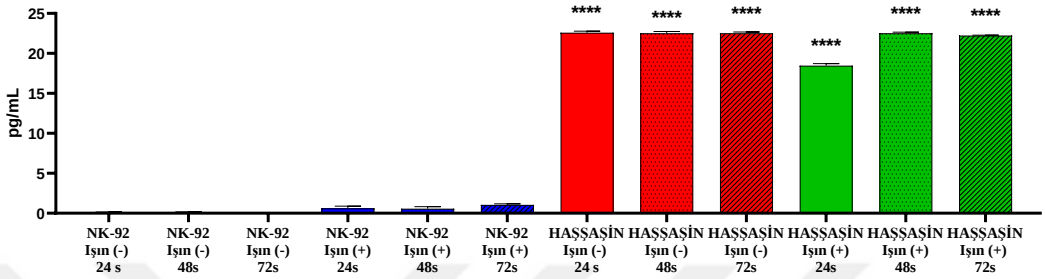
Işın (+) NK-92 ve HAŞŞAŞİN hücrelerinin canlılıklarında Işın (-) hücrelere kıyasla azalma olsada 48 saat boyunca canlıklıklarını koruyabildikleri, Işın (-) hücrelerde görülen hücre çoğalması nedeniyle 48. saatte Işın (-) hücrelere kıyasla Işın (+) hücre sayında belirgin bir fark olduğu ($p<0,001$), 72. saatte ise farkın daha da arttığı görüldü ($p<0,0001$) (Şekil 10).



Şekil 10. Işın (-) ve Işın (+) NK 92 ve HAŞŞAŞİN hücrelerinin 24, 48 ve 72. saatteki canlı hücre sayıları. Işın (-) göre ** $p<0,01$ ve ****$p<0,0001$.

4.1.3.2. Işın (-) ve (+) NK-92 ve HAŞŞAŞİN hücrelerinde IL-12 ekspresyonu

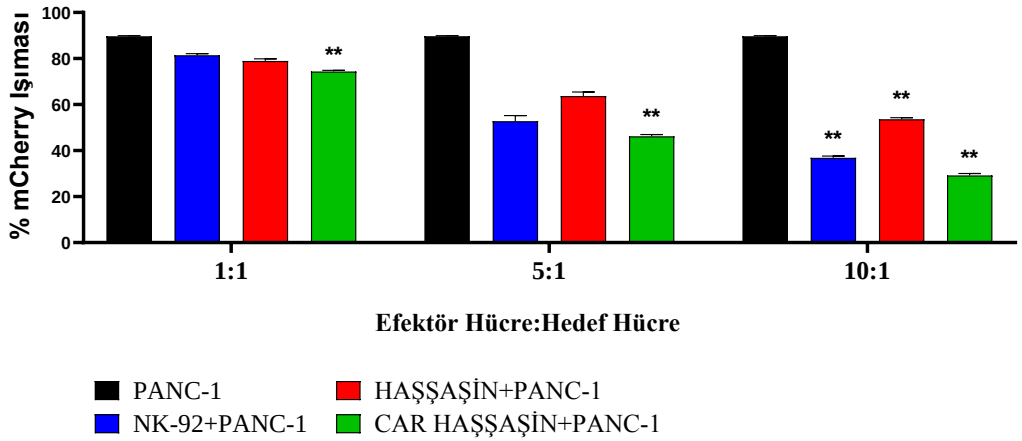
Işın (-) ve (+) HAŞŞAŞİN hücrelerinde IL-12 sekresyonunun, ışınlanmadan ve süreden bağımsız bir şekilde devam ettiği gösterildi ($p<0,0001$) (Şekil 11).



Şekil 11. Işın (-) ve (+) NK 92 ve HAŞŞAŞİN Hücrelerinin 24, 48 ve 72. saat IL-12 ekspresyon düzeyleri. NK-92 hücrelerine göre ****$p<0,0001$.

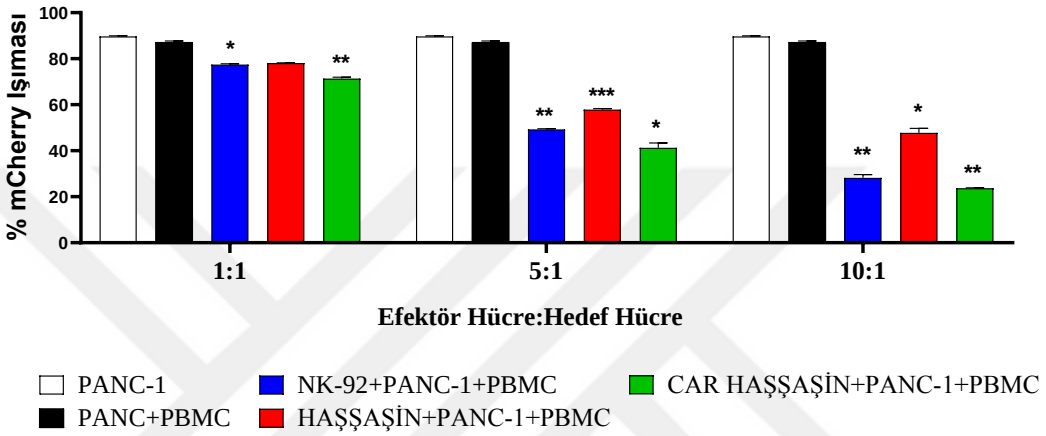
4.1.3.3. Flow sitometri analizleri

Yapılan *in vitro* etkinlik deneyinde, PANC-1 hücrelerine kıyasla 3 efektör hücrede de doz arttıkça mcherry ışımasının azaldığı, 1:1 ve 5:1 oranında CAR HAŞŞAŞİN hücre grubunda anlamlı bir azalma olduğu gösterildi ($p<0,01$). 10:1 oranında her üç hücre grudunda da PANC-1 mcherry ışıma yüzdelerinde anlamlı bir azalma olduğu bulundu ($p<0,01$) (Şekil 12).



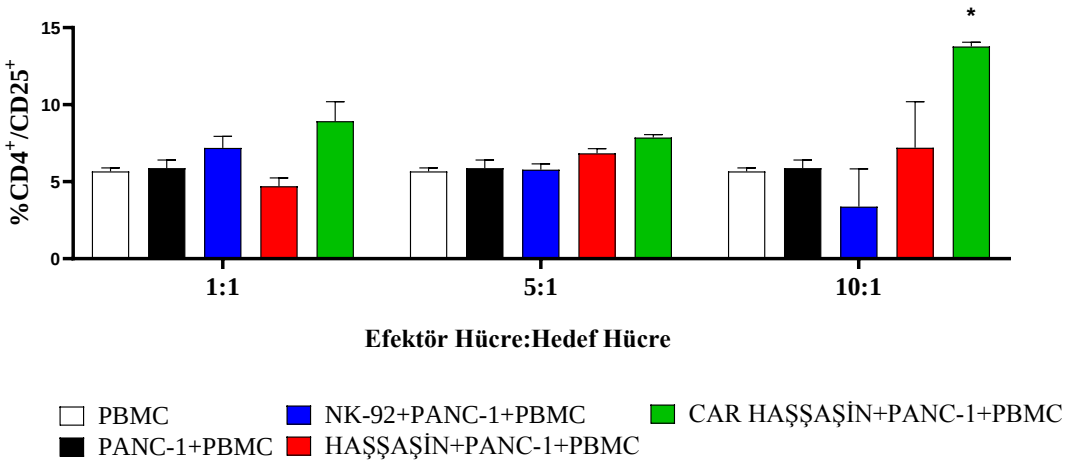
Şekil 12. % PANC-1 mcheryy düzeyi. PANC-1 hücrelerine göre ** $p<0,01$.

HAŞŞAŞİN'in IL-12 aracılı etkiliğini görebilmek için ortama PBMC eklendiği durumda, PANC-1+PBMC hücrelerine kıyasla 3 efektör hücre içinde doz arttıkça mcherry ışımasının azaldığı, 1:1 oranında NK-92 ve CAR HAŞŞAŞİN hücre grubunda (sırasıyla $p<0,05$ ve $p<0,01$), 5:1 ve 10:1 oranında her üç hücre grubunda anlamlı bir azalma olduğu gösterildi (5:1 oranında sırasıyla $p<0,01$, $p<0,001$ ve $p<0,05$ ve 10:1 oranında sırasıyla $p<0,01$, $p<0,05$ ve $p<0,01$) (Şekil 13).



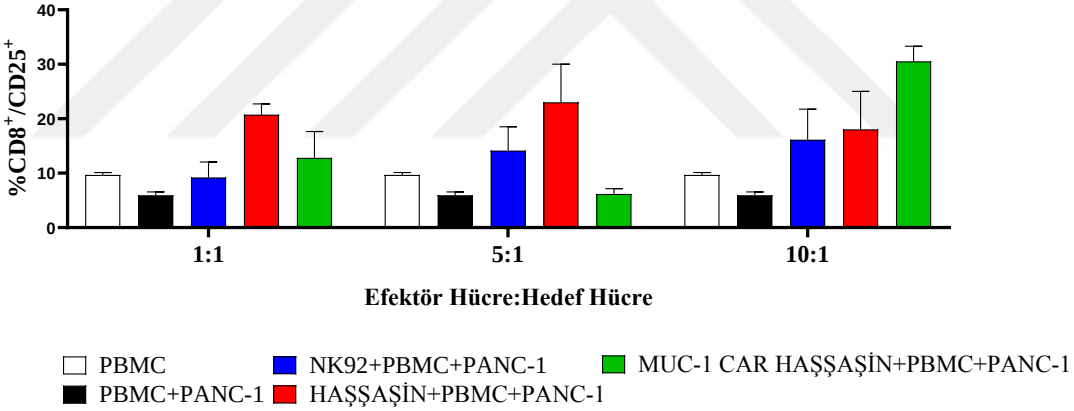
Şekil 13. % PANC-1 mcheryy düzeyi. PANC-1+PBMC hücrelerine göre * $p<0,05$, ** $p<0,01$ ve *** $p<0,001$.

Aktif (CD25+) CD4 oranına bakıldığında 10:1 oranında PANC-1+PBMC hücrelerine kıyasla MUC-1 CAR HAŞŞAŞİN hücrelerinde anlamlı bir artış olduğu gösterildi ($p<0,05$) (Şekil 14).



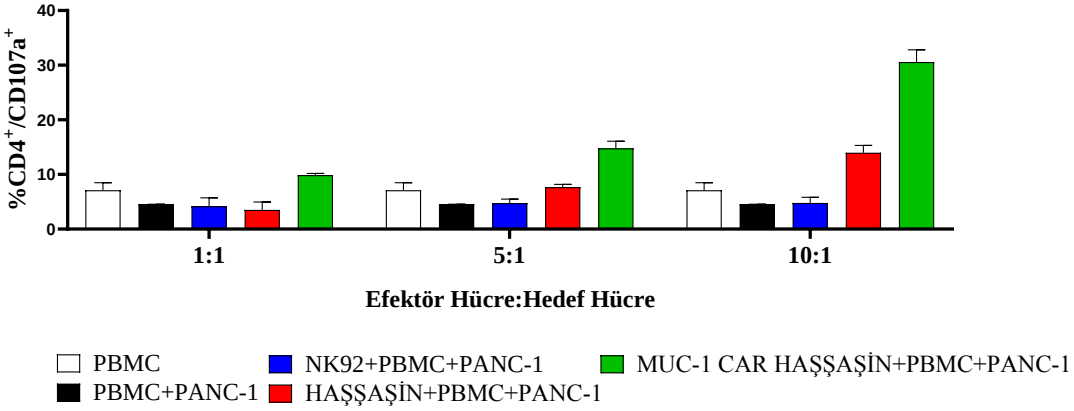
Şekil 14. %$CD4^+/CD25^+$ düzeyi. PANC-1+PBMC hücrelerine göre * $p<0,05$.

Aktif (CD25+) CD8 oranına bakıldığında her üç hücre grubunda da istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görüldü (Şekil 15).



Şekil 15. %$CD8^+/CD25^+$ düzeyi.

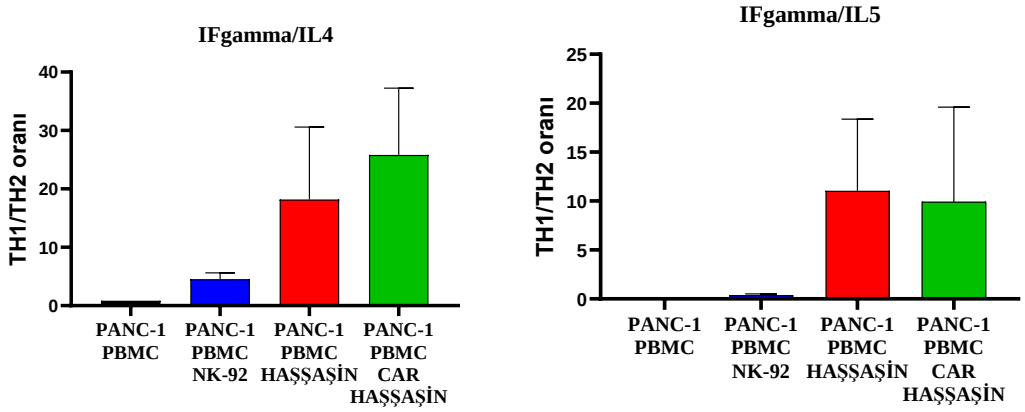
(CD107a+) CD4 oranında ise, her üç hücre grubunda doz arttıkça bir artış olsa da, istatistiksel olarak gruplar arasında anlamlı bir fark gözlenmedi (Şekil 16).



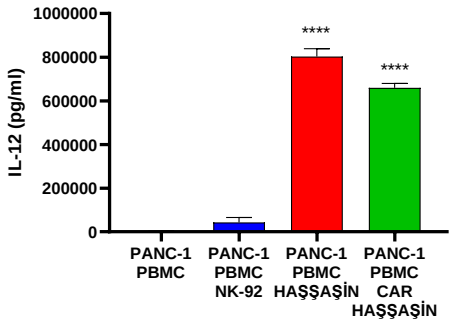
Şekil 16. %CD4$^+$/CD107a$^+$ düzeyi.

4.1.3.4. Sitokin paneli

Sitokin paneli (CBA) ile T yardımcı 1 hücrelerinin (TH1) anti-tümör sitokin cevabının HAŞŞAŞİN ve CAR HAŞŞAŞİN gruplarında arttığı fakat istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı gösterildi. Ayrıca HAŞŞAŞİN ve CAR HAŞŞAŞİN hücrelerinde NK-92 hücrelerine kıyasla IL-12 seviyelerimde anlamlı bir artış olduğu gözlendi (Şekil 17).



Şekil 17. Sitokin paneli sonuçları. PANC-1+PBMC grubuna göre **** p<0,0001.

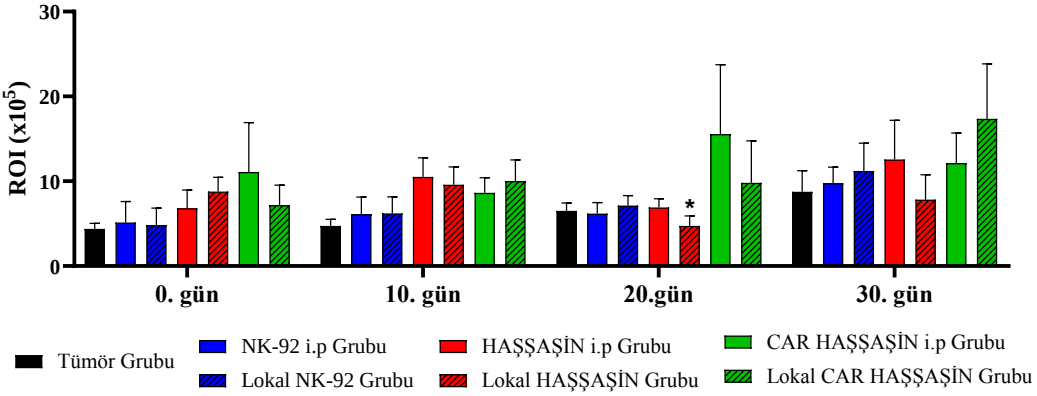


Şekil 17. Sitokin paneli sonuçları. PANC-1+PBMC grubuna göre **** p<0,0001. (devamı)

4.2. In Vivo Analizler

4.2.1. Tümör büyümesinin takibi

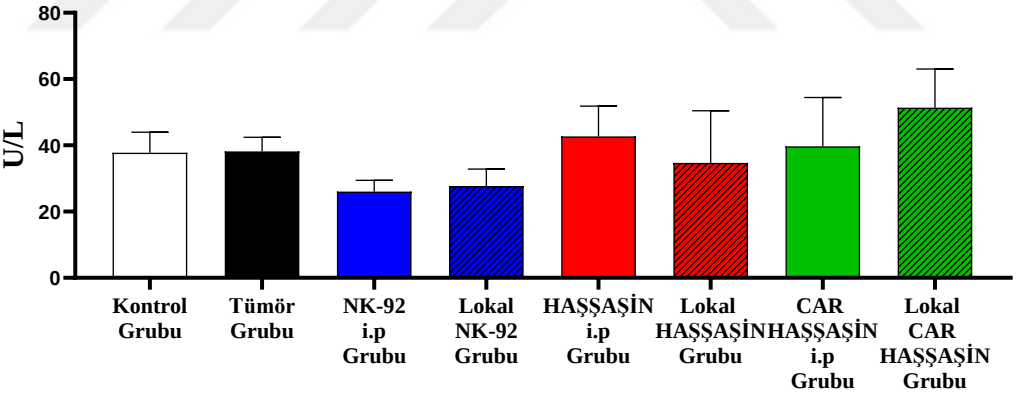
Tedavi öncesi 0. gün ile tedavi sonrası 10, 20 ve 30. günlerde *in vivo* görüntüleme ile tümör gelişimi takip edildi. Tümör grubu, NK-92 i.p ve Lokal NK-92 grubunda yer alan hayvanlarda tümör gelişiminin zamanla arttığı, HAŞŞAŞİN i.p grubunda artan tümör hacminin 20. günde azalma gösterirken, 30. günde artmaya devam ettiği tespit edildi. Lokal HAŞŞAŞİN grubunda ise, yer alan hayvanların tümör hacimlerinin 10. günde arttığı, 20. günde ise 0. güne kıyasla anlamlı bir şekilde azaldığı görüldü. ($p<0,05$). Tedavi sonrası 30. günde ise tümör hacminin artmaya devam ettiği bulundu. CAR HAŞŞAŞİN i.p grubunda ise, tedavi sonrası 10. günde tümör hacminin azaldığı, 20. ve 30. günlerde ise arttığı görüldü. Lokal CAR HAŞŞAŞİN grubunda 10. günde artan tümör hacmi 20. günde azalsa da anlamlı bir düzeye ulaşmadığı, 30. günde tümör hacminin artmaya devam ettiği gösterildi (Şekil 18).



Şekil 18. Tedavi öncesi 0. gün ve tedavi sonrası 10, 20 ve 30. günlerde tümör büyümesinin takibi. Tedavi öncesine göre * $p<0,05$.

4.2.2. Alanin aminotransferaz düzeyi

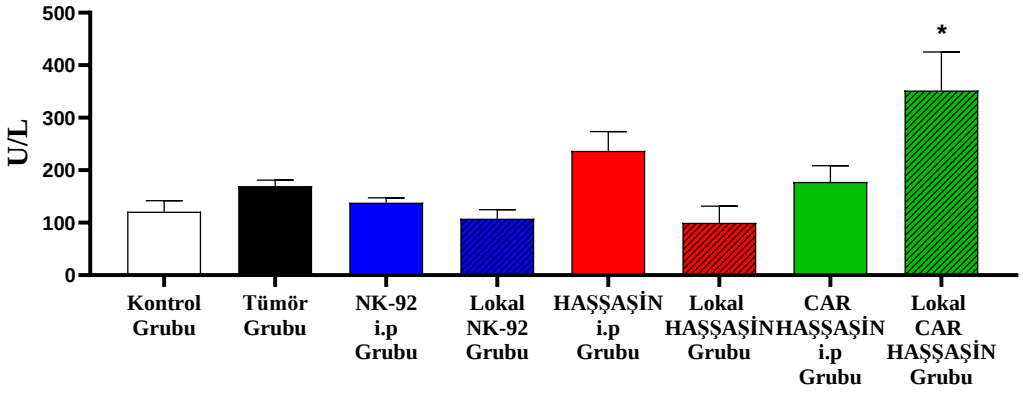
Serum alanin aminotransferaz (ALT) düzeylerinde gruplar arasında bir fark görülmedi (Şekil 19).



Şekil 19. Serum örneklerinde ALT düzeyi.

4.2.3. Aspartat aminotransferaz düzeyi

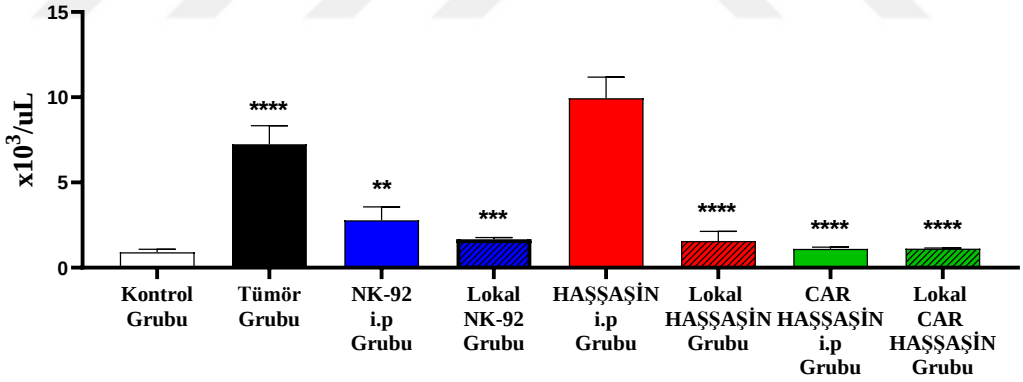
Serum aspartat aminotransferaz (AST) düzeyinin CAR HAŞŞAŞİN grubunda, tümör grubuna kıyasla anlamlı bir şekilde arttığı görüldü ($p<0,05$) (Şekil 20).



Şekil 20. Serum örneklerinde AST düzeyi. Tümör grubuna göre * p<0,05.

4.2.4. Lökosit düzeyi

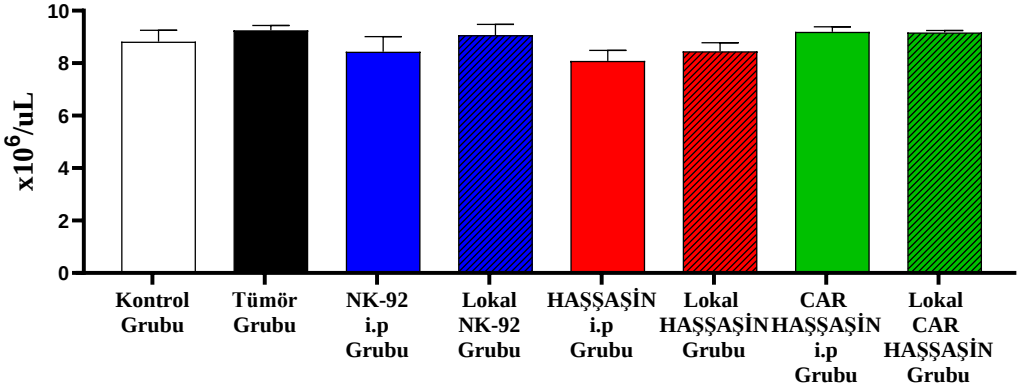
Tümör grubunda kontrol grubuna kıyasla artan lökosit seviyesi (p<0,001), HAŞŞAŞİN i.p grubu hariç tüm tedavi gruplarında tümör grubuna kıyasla anlamlı bir şekilde azaldı (**p<0,01, ***p<0,001 ve ****p<0,0001) (Şekil 21).



Şekil 21. Kan örneklerinde lökosit düzeyi. Tümör grubuna göre ** p<0,01, *** p<0,001 ve **** p<0,0001.

4.2.5. Eritrosit düzeyi

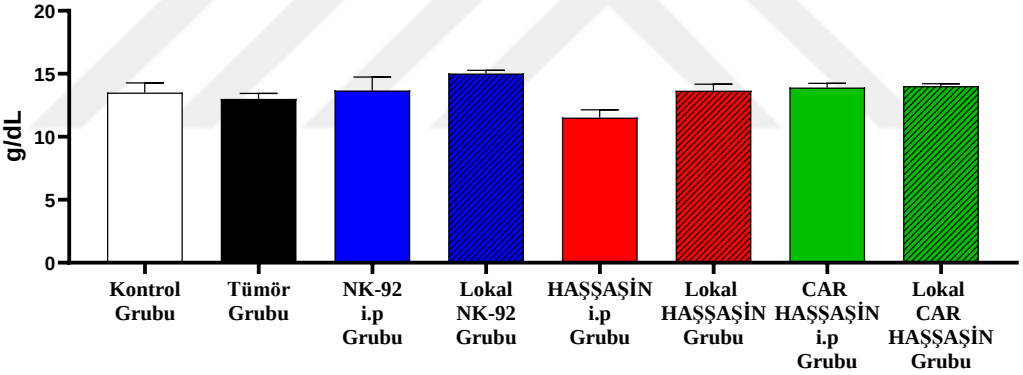
Gruplar arasında eritrosit düzeyleri açısından bir fark görülmedi (Şekil 22).



Şekil 22. Kan örneklerinde eritrosit düzeyi.

4.2.6. Hemoglobin düzeyi

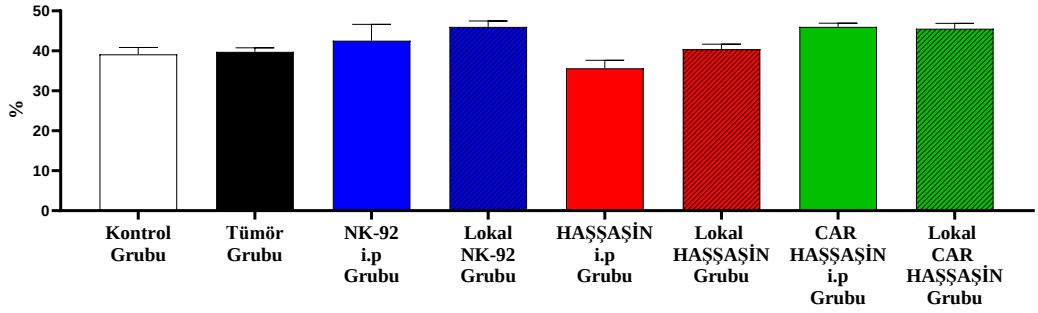
Gruplar arasında hemoglobin düzeyleri açısından bir fark görülmedi (Şekil 23).



Şekil 23. Kan örneklerinde hemoglobin düzeyi.

4.2.7. Hematokrit düzeyi

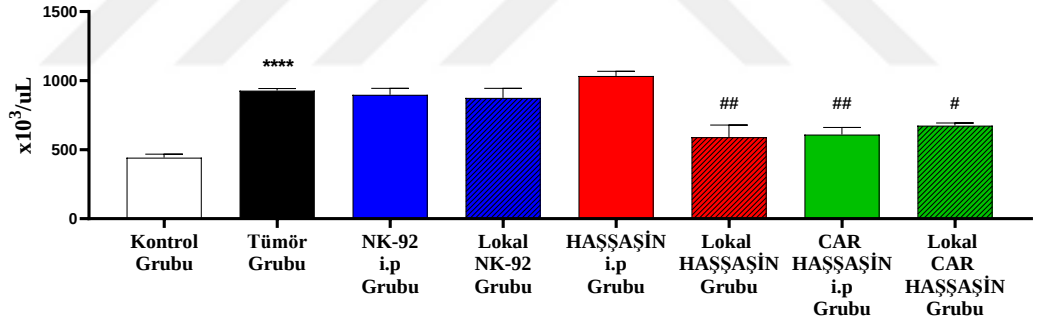
Gruplar arasında hematokrit düzeyleri açısından bir fark görülmedi (Şekil 24).



Şekil 24. Kan örneklerinde hematokrit düzeyi.

4.2.8. Trombosit düzeyi

Tümör grubunda kontrol grubuna kıyasla artan trombosit sayısı ($p<0,0001$), Lokal HAŞŞAŞİN, CAR HAŞŞAŞİN i.p ve Lokal CAR HAŞŞAŞİN gruplarında anlamlı bir şekilde azalırken (sırasıyla $p<0,01$, $p<0,01$ ve $p<0,05$), diğer tedavi gruplarında belirgin bir fark görülmedi (Şekil 25).

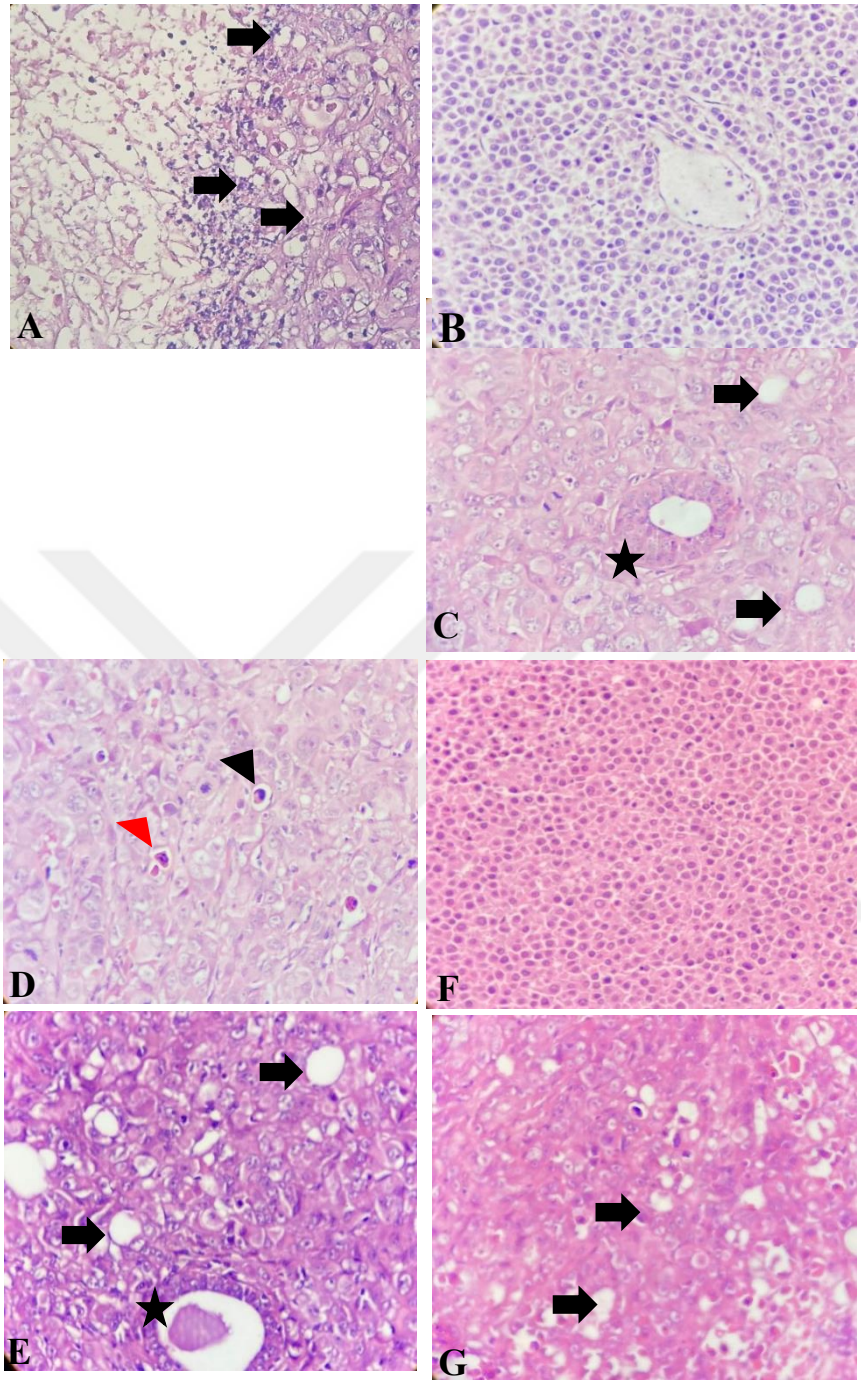


Şekil 25. Kan örneklerinde trombosit düzeyi. Kontrol grubuna göre **** $p<0,0001$; tümör grubuna göre # $p<0,05$ ve ## $p<0,01$.

4.2.9. Histopatolojik değerlendirme

4.2.9.1. Tümör dokusunun histopatolojik değerlendirmesi

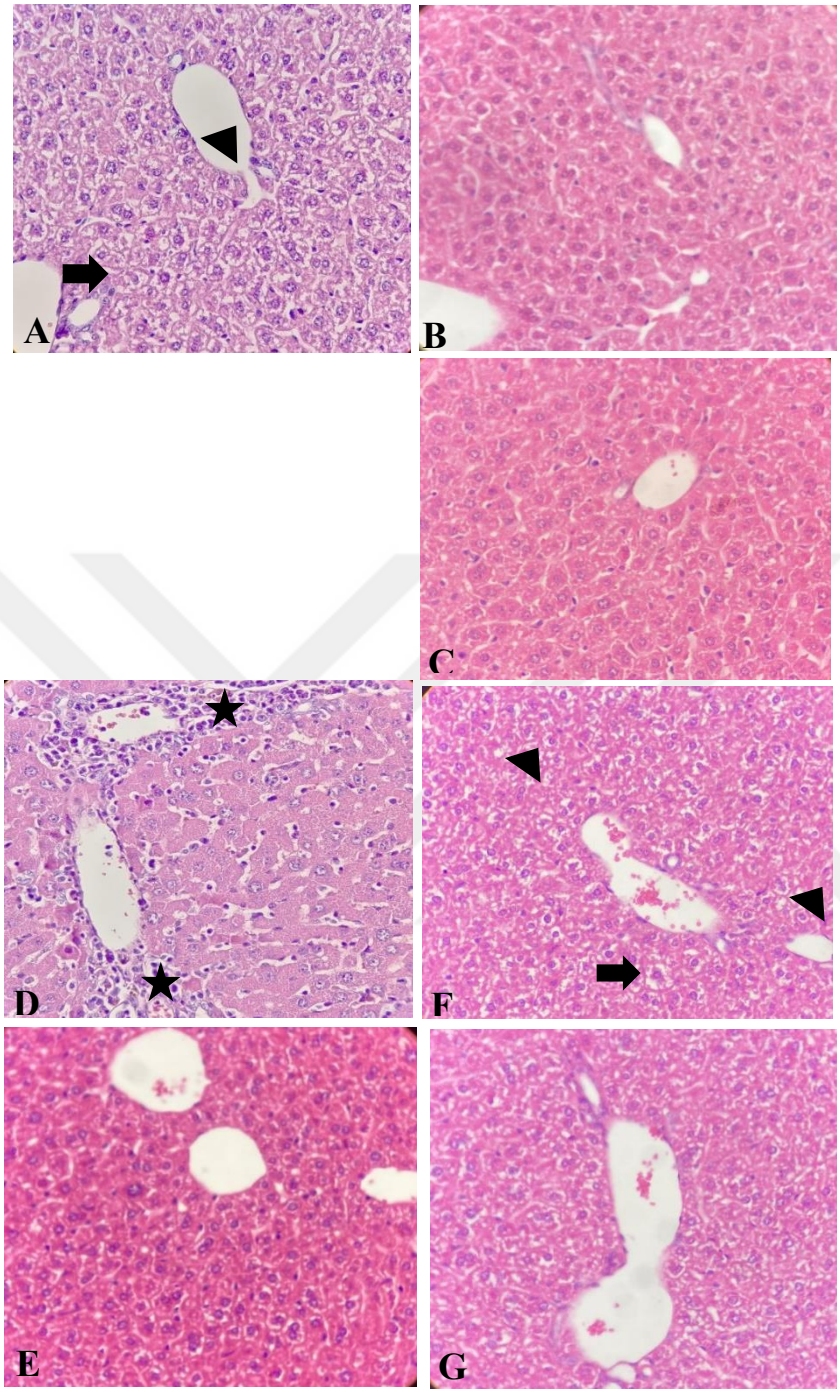
Tümör grubunda çoğunlukla vakuolleşmeler görüldü. NK-92 i.p grubunda neovaskülarizasyon varlığı saptandı (yıldız). Lokal N-K92 ve Lokal HAŞŞAŞİN gruplarında kuboidal epitel özellikli bez hücreleri (yıldız) görüldü. HAŞŞAŞİN i.p grubunda nötrofil (kırmızı ok başı) ve monosit hücreleri (siyah ok başı) saptandı. CAR HAŞŞAŞİN i.p grubunda tümör dokusunda farklı bir patolojik bulguya rastlanılmadı. Lokal NK-92, Lokal HAŞŞAŞİN ve Lokal CAR HAŞŞAŞİN gruplarında yer yer vakuolleşmeler (ok) görüldü (Resim 2).



Resim 2. Tümör doku örneklerinin histolojik görüntüleri. A, Tümör grubu; B, NK-92 i.p; C, Lokal NK-92; D, HAŞŞAŞİN i.p; E, Lokal HAŞŞAŞİN; F, CAR HAŞŞAŞİN i.p; G, Lokal CAR HAŞŞAŞİN. H&E boyası, bar 100 µm.

4.2.9.2. Karaciğer dokusunun histopatolojik değerlendirmesi

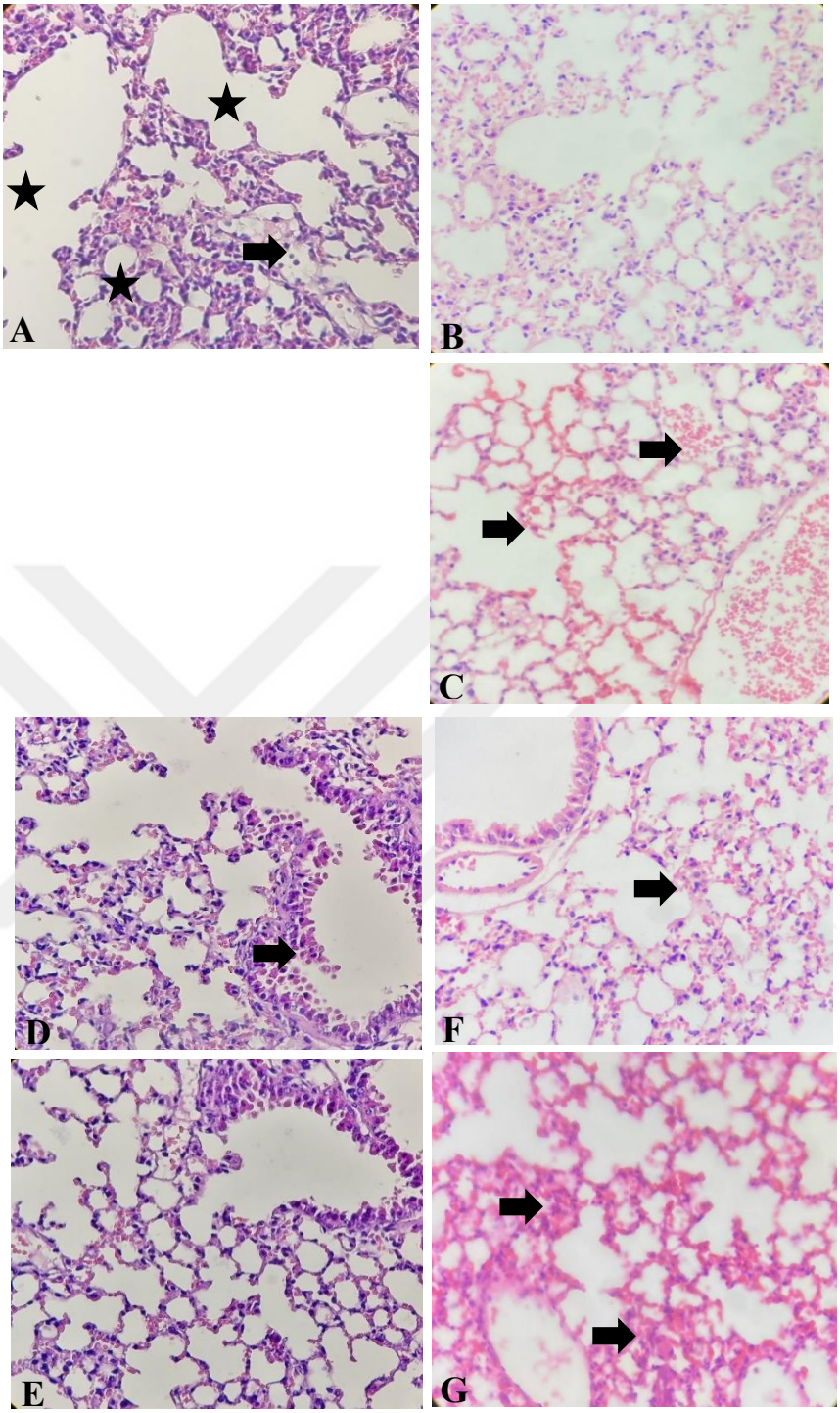
Tümör grubunda sinüzoid duvarının düzensiz olduğu (ok) ve portal ven çevresinde hepatosit nükleuslarının piknoza (ok başı) uğradığı saptandı. NK-92 i.p, Lokal NK-92 ve Lokal CAR HAŞŞAŞİN grubunda, portal ven yapıları ve ışınsal hepatosit kordonları normal görünümde izlendi. CAR HAŞŞAŞİN i.p grubunda sinüzoidal genişlemeler (okbaşı) ve hepatositlerin nukleuslarında gevşek kromatin yapıları gözlendi (ok). HAŞŞAŞİN i.p grubunda yaygın dağılımlı inflamatuvar hücre (yıldız) topluluğu vardı. Lokal HAŞŞAŞİN grubunun normal histolojik yapıya sahip olduğu saptandı (Resim 3).



Resim 3. Karaciğer doku örneklerinin histolojik görüntüleri. A, Tümör grubu; B, NK-92 i.p; C, Lokal NK-92; D, HAŞŞAŞİN i.p; E, Lokal HAŞŞAŞİN; F, CAR HAŞŞAŞİN i.p; G, Lokal CAR HAŞŞAŞİN. H&E boyası, bar 100 µm.

4.2.9.3. Akciğer dokusunun histopatolojik değerlendirmesi

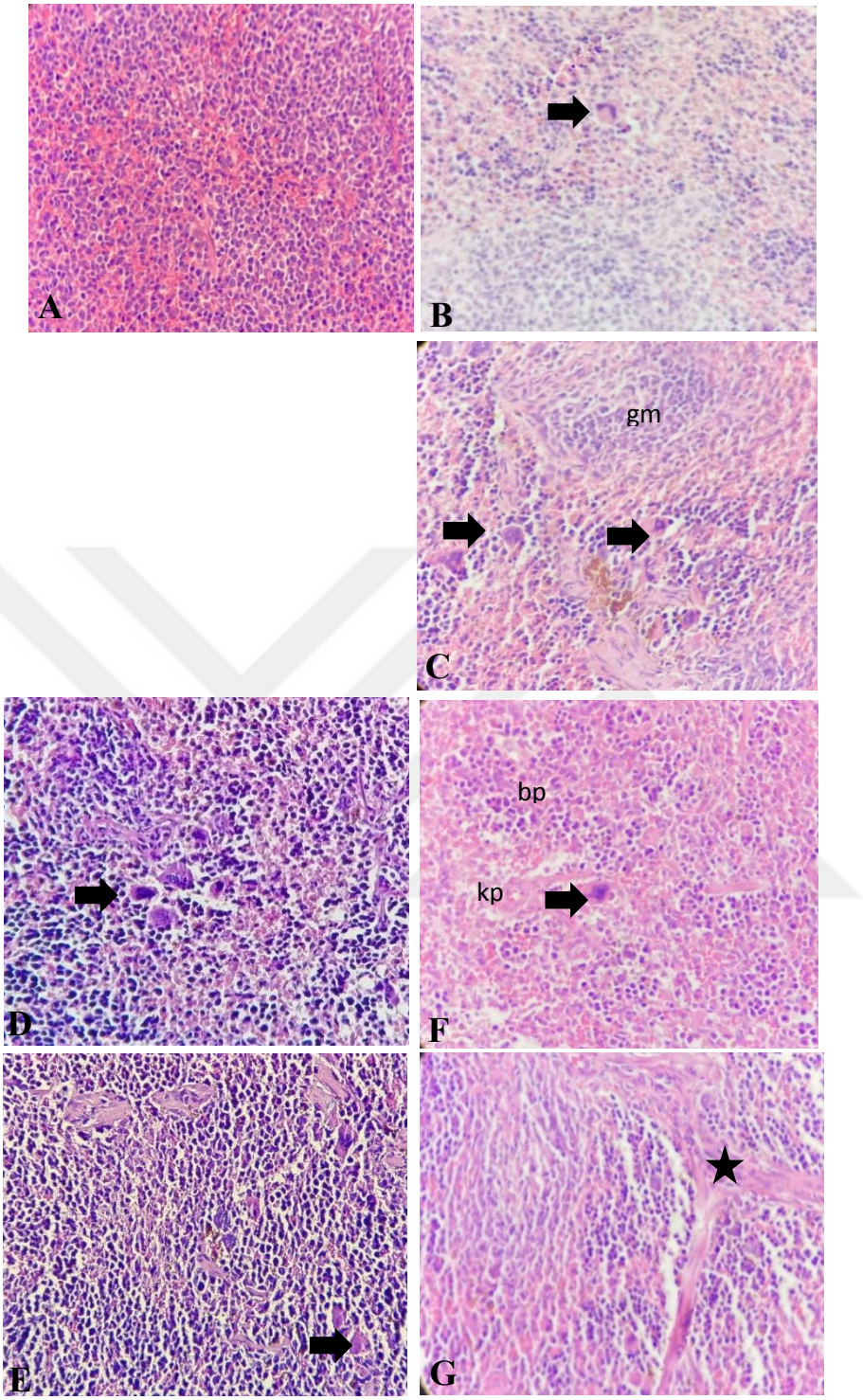
Tümör grubunda alveollerde yer yer amfizematöz bulgular (yıldız) ve hafif derecede inflamatuvar bulgular görüldü (ok). NK-92 i.p ve CAR HAŞŞAŞİN i.p gruplarında düzenli yapıda akciğer parankimi izlendi. Ancak hafif derecede konjesyon bulguları görüldü (ok). Lokal NK-92 ve Lokal CAR HAŞŞAŞİN gruplarında akciğer parankimi alanlarında yer yer konjesyon bulguları izlendi (ok). HAŞAŞİN i.p grubunda respiratör bronşiol epitelinde dökülme görüldü. Lokal HAŞŞAŞİN grubunda düzenli yapıda akciğer parankimi izlendi (Resim 4).



Resim 4. Akciğer doku örneklerinin histolojik görüntüleri. A, Tümör grubu; B, NK-92 i.p; C, Lokal NK-92; D, HAŞŞAŞİN i.p; E, Lokal HAŞŞAŞİN; F, CAR HAŞŞAŞİN i.p; G, Lokal CAR HAŞŞAŞİN. H&E boyası, bar 100 µm.

4.2.9.4. Dalak dokusunun histopatolojik değerlendirmesi

Tümör grubunda beyaz pulpa ve kırmızı pulpa ayırt ediliyordu. NK-92 i.p, Lokal NK-92, HAŞŞAŞİN i.p, Lokal HAŞŞAŞİN ve CAR HAŞŞAŞİN i.p gruplarında makrofaj varlığı görüldü (ok). Ancak trabeküller belirgin değildi. Lokal NK-92 grubunda germinal merkez (gm) belirgindi. CAR HAŞŞAŞİN i.p grubunda, beyaz pulpa (bp), kırmızı pulpa (kp) ayırt ediliyordu. Lokal CAR HAŞŞAŞİN grubunda trabeküler kalınlaşma saptandı (yıldız) (Resim 5).



Resim 5. Dalak doku örneklerinin histolojik görüntüleri. A, Tümör grubu; B, NK-92 i.p; C, Lokal NK-92; D, HAŞŞAŞİN i.p; E, Lokal HAŞŞAŞİN; F, CAR HAŞŞAŞİN i.p; G, Lokal CAR HAŞŞAŞİN. H&E boyası, bar 100 µm.

4. TARTIŞMA

İmmunoterapi son yıllarda önemi giderek artan, immün sistemi kansere karşı aktive ederek güçlendiren ve kansere spesifik bir yanıt oluşturan tedavi yöntemidir (38). Özellikle CAR T tedavisi ile hematolojik malignitelerde ciddi başarılar elde edilmiş, bu başarı solid tümörler için de umut verici olmuştur (69). Ancak solid tümörlerde bulunan mikroçevre nedeniyle istenen yanıt sağlananamıştır (70). Solid tümörlerde immünoterapi başarı oranının düşük olması yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesi gerektiğini göstermiştir. Özellikle pankreas kanseri gibi asemptomatik olan ve geç tanı ile karakterize, yüksek mortalite oranına ve kötü bir prognoza sahip bir malignite için yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi önem kazanmıştır.

NK-92 hücreleri, anti-tümör etkileri nedeniyle immünoterapi ve hücresel tedavi stratejilerinde önemli bir potansiyele sahiptir. Güçlü sitotoksik etkiye sahip olmaları ve laboratuvar koşullarında kolaylıkla üretilebilmeleri onları immünoterapi ajanı olarak ön plana çıkarmaktadır (71).

Bu tez çalışmasında pankreas kanserine karşı spesifik bir yanıt oluşturan ve konağın immün sistemini de aktive ederek uzun süreli bir anti-tümör yanıt oluşturabilecek genetik modifikasyonlara sahip bir NK-92 hücre hattı kullanarak pankreas kanserine karşı olası bir tedavi yönteminin geliştirilmesi amaçlanmıştır.

Lenfomalı hastadan üretilen ve sekonder tümorogeneze neden olmalarına karşı ışınlananarak verileren NK-92 hücrelerinin uygulandığı çalışmada ışın (-) ve ışın (+) NK-92 ve HAŞŞAŞİN hücrelerinin canlılığı 72 saat boyunca takip edilmiş, ışınlamanın HAŞŞAŞİN hücreleri üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Elde edilen veriler ışın (-) hücrelerin canlılığını koruyup, hücre sayısını zamanla artırırken; ışınlanan NK-92 ve HAŞŞAŞİN hücrelerinin 48 saat boyunca canlılıklarını koruduklarını ve hücre sayılarında bir artış olmadığını, 72. saatte ise literatürle uyumlu bir şekilde canlılıklarını kaybettiklerini göstermiştir (Şekil 10) (72).

Ardından HAŞŞAŞİN hücrelerinin IL-12 sekresyonu ELISA ve CBA analizleri ile gösterilmiştir. Yapılan ELISA testinde HAŞŞAŞİN hücrelerinin ışınlanmadan bağımsız bir şekilde IL-12 sekresyonuna sahip olduğu bulunmuştur (Şekil 11). Işın (+) NK-92 hücrelerinde görülen düşük IL-12 salgısının ise deney sırasında meydana gelen kontaminasyon kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Ayrıca CBA testi ile de, HAŞŞAŞİN ve CAR HAŞŞAŞİN hücrelerinin IL-12 ekspresyonuna sahip olduğu gösterilmiştir (Şekil 17).

Işınlanmaya karşı 48 saat boyunca canlılığını koruyan ve IL-12 sekresyonu doğrulanan HAŞŞAŞİN hücreleri ile MUC-1 spesifik CAR HAŞŞAŞİN hücrelerinin PANC-1 hücrelerine karşı toksisitesi değerlendirilmiştir. HAŞŞAŞİN ve CAR HAŞAŞŞİN hücrelerinin etkili bir sitotoksisiteye sahip olduğu bulunmuştur. Özellikle CAR HAŞŞAŞİN hücrelerinin en etkili sitotoksisiteye sahip olduğu, doz arttıkça etkinliğinin daha da arttığı görülmüştür (Şekil 12). Gözlenen bu etkinin, PANC-1 hücrelerinde aşırı eksprese edildiği bilinen MUC-1 antijenine spesifik geliştirilen CAR'dan kaynaklı olabileceği ve CAR'ın MUC-1 antijenine bağlanarak spesifik bir yanıt geliştirilmiş olabileceği düşünülmektedir. Yapılan başka bir çalışmada da MUC-1 spesifik CAR markofaj hücrelerinin mürin pankreas kanseri hücrelerine karşı spesifik bir sitotoksisiteye sahip olduğu gösterilmiştir (73).

Ayrıca HAŞŞAŞİN hücrelerinin IL-12 aracılı etkinliğini görmek için ortama PBMC eklenerek etkinlik deneyleri tekrarlanmış, IL-12'nin PBMC aktivasyonu yaparak sitotoksik etkiye olan katkısı incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar HAŞŞAŞİN ve CAR HAŞŞAŞİN hücrelerinin sitoksisiteye sahip olduğunu göstermiştir. CAR HAŞŞAŞİN hücrelerinin ise en etkin öldürme yapan hücre olduğu ve doz arttıkça bu etkisini artırdığı bulunmuştur. Önceki etkinlik deneyi ile kıyaslandığında tümör hücrelerine karşı sitotoksisite de PBMC varlığının anlamlı bir fark yaratmadığı görülmüştür (Şekil 13).

Öte yandan IL-12 nin PBMC aktivasyonu üzerindeki rolü etkinlik deneyi sonrası süpernatanların toplanarak flow analizlerinin yapılması ile değerlendirilmiştir. Yapılan önceki çalışmalar IL-12'nin, antijene maruz kalan CD4 T hücrelerini aktive

ederek Th1 hücrelerinin gelişimini desteklediği (74), Th1 hücrelerinin ise özellikle sitotoksik T lenfositlerinin (CD8) aktivasyonunu artırarak tümörlere karşı savunmada önemli bir rol oynadığını göstermektedir (75). Bu amaçla gerçekleştirilen flow analizinde, literatürle uyumlu bir şekilde özellikle CAR HAŞŞAŞİN hücrelerinde IL-12 ekspresyonu nedeniyle aktif CD4 ve aktif CD8 hücre grubunda artış olduğu görülmüştür (Şekil 14-16). Elde edilen sonuçlar ışınlama sonrası canlılığını 2 gün sürdürebilen efektör hücre grubundan CAR HAŞŞAŞİN'in, 2. günün sonunda etkinliğini kaybetse de CD4 ve CD8 aktivasyonu ile tümör spesifik bir immünite oluşturabileceğini düşündürmektedir. PBMC varlığının CD4 ve CD8 aktivasyonuna neden olurken etkinlik deneyinde sitotoksisite açısından anlamlı bir fark yaratmamasının nedeninin deneyin 48 saat ile sınırlı olması ve CD4 ve CD8 hücrelerinden kaynaklı bir yanıtın oluşabilmesi için bu sürenin yeterli olmadığı varsayılmaktadır.

Dahası geliştirilen HAŞAŞŞİN ve CAR HAŞŞAŞİN'in 48 saat tümör hücreleri ile inkübasyonu sonrası, Th1 anti-tümör sitokin tepkisi ile etkili bir tümör öldürme kapasitesine sahip olduğu gösterilmiştir (Şekil 17). Ancak bu etkinin, NK-92 hücreleri ile kaşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olmaması grup sayısının düşük olmasından kaynaklı olabilir.

Etkinliği *in vitro* analizler ile gösterilen efektör hücreler ile hayvan deneyleri planlanarak, farelerde s.c tümor modeli oluşturulmuştur. Hücresel terapilerde sistemik dolaşıma verilen hücrelerin hedef organa ulaşmalarındaki zorluk (76) ve NK-92 hücrelerinin kısa süreli etkinlikleri (77) göz önünde bulundurularak iki farklı tedavi yaklaşımı değerlendirilmiştir. Her bir efektör hücresi i.p ya da lokal olarak uygulanmış ve tümör üzerindeki etkileri *in vivo* görüntüleme ile takip edilmiştir (Şekil 18). Elde edilen veriler sadece HAŞŞAŞİN hücrelerinin lokal uygulanmasından sonraki 20. günde tümör boyutunu tedavi öncesine kuyasla anlamlı bir şekilde azalttığı, tümör kontrolünde etkin bir role sahip olabileceğini göstermiştir. Bu etkiye HAŞŞAŞİN hücrelerinin lokal uygulama nedeniyle hızla sitotoksik etki göstermesi, bu hücreler tarafından salgılanan IL-12'ye karşı konak immün yanıtın gelişmesi ve HAŞŞAŞİN hücrelerinin aktivitesinin sona ermesine rağmen IL-12 aracılı anti-tümör yanıtın

devam etmesi sebep olabilir. Öte yandan, HAŞŞAŞİN hücrelerinin i.p olarak uygulanmasında beklenen etkinin görülememesi ise sistemik dolaşıma katılan hücrelerin hedefe ulaşmada zaman kaybetmesi ve etkin bir yanıt oluşturamadan canlılığını kaybetmiş olması olabilir.

Öte yandan etkinliği değerlendirilen diğer bir efektör hücre olan CAR HAŞŞAŞİN hücrelerinde ise her iki tedavi yaklaşımı tümör boyutunda bir değişiklik yaratmamıştır. MUC-1 spesifik CAR'a sahip hücrelerin tümör kontrolünde beklenen etkiyi göstermemesinin nedeninin diğer gruplara kıyasla her iki CAR HAŞŞAŞİN grubuna ait hayvanların tümör boyutlarının tedavi öncesinde büyük olması ve bu nedenle tedavi dozunun yetersiz kalmasının olabileceği düşünülmektedir. Dahası CAR kaynaklı görülen sitokin salınımının tümörü besleyerek tümör büyümesine katkı sağlamış olabiliceği varsayılmaktadır. Yapılan çalışmalar immünoterapide görülen sitokin salınımının paradoksal bir etkiye sahip olduğunu; bir yandan immün yanıtın düzenlenmesinde rol oynarken, diğer yandan tümör büyümesine ve metastaza katkıda bulunabildiklerini göstermektedir (78,79). Ayrıca yapılan klinik çalışmalarda büyük tümör yüküne sahip hastalarda yüsek sitokin salınımının görüldüğü, düşük tümör yüküne sahip kişlerde için sitokin salınımının daha düşük seyrettiği gösterilmiştir (80). Bu nedenle CAR HAŞŞAŞİN grubundaki hayvanların büyük tümör boyutuna sahip olması yüksek sitokin salınımına sahip olabileceklerini düşündürmektedir. Tümör mikroçevresindeki kompleks etkileşimlere bağlı olarak görülen bu etkide rol oynayan mekanizmaların aydınlatılmasına ve bu durumun göz önünde bulundurularak yeni immünoterapi stratejilerinin geliştirilmesine ihtiyaç vardır.

Ayrıca efektör hücrelerinin dokular ve biyokimyasal parametreler üzerindeki etkisi araştırılmış ve HAŞŞAŞİN ve CAR HAŞŞAŞİN hücrelerinin minimal tokisisiteye sebep olduğu gösterilmiştir (Şekil 19-25 ve Resim 2-5). Yapılan klinik çalışmalar NK-92 hücrelerinin hemoglobin, trombosit, lökosit hücre sayısı ve karaciğer fonksiyon testleri üzerinde anlamlı bir değişikliğe sahip olmadığı ve GVHD geliştirmediğini göstermektedir (83). Çalışmada görülen minimal toksisitenin ise mevcut genetik modifikasyonlardan kaynaklı olabileceği düşünülmektedir.

Öte yandan HAŞŞAŞİN hücrelerinde gösterilmesi planlanan CD16 reseptörü aracılı antikor bağımlı hücresel sitotoksisite (ADCC) araştırmanın limitasyonu olarak belirtilmiştir. Tez çalışmasında HAŞŞAŞİN hücreleri ile ADCC'nin tetiklenmesi ve anti-tümör aktivitenin artması amaçlanmıştır. Anti-MUC-1 Monoklonal antikor tedavisi ile hastaya verilecek antikorun CD16'ya bağlanarak ADCC yanıtı oluşturabileceği ve tedavinin başarısını artırabileceği, bu sayede pankreas kanserine spesifik etkin bir tedavi yönteminin mümkün kılınabileceği öngörülmektedir. Ayrıca CAR HAŞŞAŞİN hücrelerinin tedavi dozunun artırılarak tümör büyümesi üzerine etkinliğinin takip edilememesi diğer bir limitasyon olarak gösterilmiştir. Yapılacak hayvan çalışması ile etkinliği *in vitro* deneyler ile gösterilen CAR HAŞŞAŞİN hücrelerinin s.c tümör modeli üzerinde spesifik bir bağlanma yaparak anti-tümör etkinliğe sahip olduğu gösterilebilir.

5. SONUÇ

Sonuç olarak, donörden bağımsız olarak üretilen ve dondurulmuş olarak saklanabilecek olan HAŞŞAŞİN ve CAR HAŞŞAŞİN hücre hatları ile, daha hızlı üretilebilen ve daha az maaliyete sahip terapötik adaylar geliştirilmiştir. Bu hücreler pankreas kanserine karşı etkin sitotoksik özellik göstermiş ve konak immün yanıtı regüle etmiştir. Özellikle HAŞŞAŞİN hücrelerinin lokal uygulamasının anti-tümör etkinliğinin daha üstün olduğu ve monoklonal antikorlar vb. tedavilerle kombine edildiğinde etkinliğinin daha da artırılabileceği düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

1. Ansari D, Tingstedt B, Andersson B, Holmquist F, Sturesson C, Williamsson C, et al. Pancreatic cancer: yesterday, today and tomorrow. Future Oncol [Internet]. 2016 Aug 1 [cited 2023 Dec 29];12(16):1929–46. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27246628/
2. Rawla P, Sunkara T, Gaduputi V. Epidemiology of Pancreatic Cancer: Global Trends, Etiology and Risk Factors. World J Oncol [Internet]. 2019 [cited 2023 Dec 29];10(1):10. Available from: /pmc/articles/PMC6396775/
3. Amundadottir LT. Pancreatic Cancer Genetics. Int J Biol Sci [Internet]. 2016 Jan 28 [cited 2023 Dec 29];12(3):314–25. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26929738/
4. Tonini V, Zanni M. Pancreatic cancer in 2021: What you need to know to win. World J Gastroenterol [Internet]. 2021 Sep 21 [cited 2023 Dec 29];27(35):5851–89. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34629806/
5. Karanikas M, Esempidis A, Chasan ZTM, Deftereou T, Antonopoulou M, Bozali F, et al. Pancreatic Cancer from Molecular Pathways to Treatment Opinion. J Cancer [Internet]. 2016 [cited 2023 Dec 29];7(10):1328–39. Available from: http://www.jcancer.org
6. Chiorean EG, Coveler AL. Pancreatic cancer: optimizing treatment options, new, and emerging targeted therapies. Drug Des Devel Ther [Internet]. 2015 Jul 7 [cited 2023 Dec 29];9:3529–45. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26185420/
7. Kamarajah SK, Burns WR, Frankel TL, Cho CS, Nathan H. Validation of the American Joint Commission on Cancer (AJCC) 8th Edition Staging System for Patients with Pancreatic Adenocarcinoma: A Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) Analysis. Ann Surg Oncol [Internet]. 2017 Jul 1 [cited 2024 Jan 1];24(7):2023–30. Available from: https://link.springer.com/article/10.1245/s10434-017-5810-x
8. Pereira NP, Corrêa R. Review Open Access Journal of Cancer Metastasis and Treatment Pancreatic cancer: treatment approaches and trends. [cited 2024 Jan 1]; Available from: www.jcmtjournal.com
9. Kruger S, Ilmer M, Kobold S, Cadilha BL, Endres S, Ormanns S, et al. Advances in cancer immunotherapy 2019 – latest trends. J Exp Clin Cancer Res [Internet]. 2019 Jun 19 [cited 2024 Jan 1];38(1). Available from: /pmc/articles/PMC6585101/
10. Yong CSM, Dardalhon V, Devaud C, Taylor N, Darcy PK, Kershaw MH. CAR T-cell therapy of solid tumors. Immunol Cell Biol [Internet]. 2017 Apr 1 [cited 2024 Jan 1];95(4):356–63. Available from: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1038/icb.2016.128
11. Jacoby E, Yang Y, Qin H, Chien CD, Kochenderfer JN, Fry TJ. Murine allogeneic CD19 CAR T cells harbor potent antileukemic activity but have the potential to mediate lethal GVHD. Blood [Internet]. 2016 Mar 3 [cited 2024 Jan 1];127(10):1361. Available from: /pmc/articles/PMC4786842/

12. Liu P, Chen L, Zhang H. Carcinoma and the NK Cell-Based Immunotherapy. 2018 [cited 2024 Jan 1]; Available from: https://doi.org/10.1155/2018/1206737
13. Klingemann H. The NK-92 cell line—30 years later: its impact on natural killer cell research and treatment of cancer. Cytotherapy [Internet]. 2023 [cited 2024 Jan 1];25:451–7. Available from: https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2022.12.003
14. Williams BA, Law AD, Routy B, denHollander N, Gupta V, Wang XH, et al. A phase I trial of NK-92 cells for refractory hematological malignancies relapsing after autologous hematopoietic cell transplantation shows safety and evidence of efficacy. Oncotarget [Internet]. 2017 Oct 10 [cited 2024 Jan 1];8(51):89256. Available from: /pmc/articles/PMC5687687/
15. Goral V. Pancreatic Cancer: Pathogenesis and Diagnosis. Asian Pac J Cancer Prev [Internet]. 2015 [cited 2024 Jan 1];16(14):5619–24. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26320426/
16. Ilic M, Ilic I. Epidemiology of pancreatic cancer. World J Gastroenterol [Internet]. 2016 Nov 11 [cited 2024 Jan 1];22(44):9694. Available from: /pmc/articles/PMC5124974/
17. Connor AA, Gallinger S. Pancreatic cancer evolution and heterogeneity: integrating omics and clinical data. [cited 2024 Jan 1]; Available from: https://doi.org/10.1038/
18. Wood LD, Canto MI, Jaffee EM, Simeone DM. Pancreatic Cancer: Pathogenesis, Screening, Diagnosis, and Treatment. Gastroenterology [Internet]. 2022 Aug 1 [cited 2024 Jan 1];163(2):386. Available from: /pmc/articles/PMC9516440/
19. Sarfraz H, Saha A, Jhaveri K, Kim DW. Review of Current Systemic Therapy and Novel Systemic Therapy for Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. Current Oncology [Internet]. 2023 Jun 1 [cited 2024 Jan 1];30(6):5322. Available from: /pmc/articles/PMC10296812/
20. Salahshour F, Taslimi R, Moosavi NS, Yazdi NA, Esfandbod M. Pancreatic Neuroendocrine Tumor presenting as a diffuse pancreatic enlargement, case report and review of literature. J Radiol Case Rep [Internet]. 2021 Jan 1 [cited 2024 Jan 1];15(1):11. Available from: /pmc/articles/PMC7942962/
21. Egal ESA, Jacenik D, Soares HP, Beswick EJ. Translational challenges in pancreatic neuroendocrine tumor immunotherapy. Biochim Biophys Acta Rev Cancer [Internet]. 2021 Dec 1 [cited 2024 Jan 1];1876(2):188640. Available from: /pmc/articles/PMC10695297/
22. Ma ZY, Gong YF, Zhuang HK, Zhou ZX, Huang SZ, Zou YP, et al. Pancreatic neuroendocrine tumors: A review of serum biomarkers, staging, and management. World J Gastroenterol [Internet]. 2020 May 5 [cited 2024 Jan 1];26(19):2305. Available from: /pmc/articles/PMC7243647/
23. Halbrook CJ, Lyssiotis CA, Pasca M, Magliano D, Maitra A. Leading Edge Pancreatic cancer: Advances and challenges. [cited 2024 Jan 1]; Available from: https://doi.org/10.1016/j.cell.2023.02.014

24. Wood LD, Canto MI, Jaffee EM, Simeone DM. Pancreatic Cancer: Pathogenesis, Screening, Diagnosis, and Treatment. Gastroenterology [Internet]. 2022 Aug 1 [cited 2024 Jan 1];163(2):386. Available from: /pmc/articles/PMC9516440/
25. Basturk O, Hong SM, Wood LD, Adsay NV, Albores-Saavedra J, Biankin A V., et al. A REVISED CLASSIFICATION SYSTEM AND RECOMMENDATIONS FROM THE BALTIMORE CONSENSUS MEETING FOR NEOPLASTIC PRECURSOR LESIONS IN THE PANCREAS. Am J Surg Pathol [Internet]. 2015 Dec 1 [cited 2024 Jan 1];39(12):1730. Available from: /pmc/articles/PMC4646710/
26. Felsenstein M, Noë M, Masica DL, Hosoda W, Chianchiano P, Fischer CG, et al. IPMNs with co-occurring invasive cancers: neighbours but not always relatives. Gut [Internet]. 2018 Sep 1 [cited 2024 Jan 1];67(9):1652. Available from: /pmc/articles/PMC10489026/
27. Zamboni G, Scarpa A, Bogina G, Iacono C, Bassi C, Talamini G, et al. Mucinous cystic tumors of the pancreas: clinicopathological features, prognosis, and relationship to other mucinous cystic tumors. Am J Surg Pathol [Internet]. 1999 [cited 2024 Jan 1];23(4):410–22. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10199470/
28. Raptis DA, Fessas C, Belasyse-Smith P, Kurzawinski TR. Clinical presentation and waiting time targets do not affect prognosis in patients with pancreatic cancer. Surgeon [Internet]. 2010 Oct [cited 2024 Jan 1];8(5):239–46. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20709279/
29. Tests for Pancreatic Cancer | Diagnosing Pancreatic Cancer | American Cancer Society [Internet]. [cited 2024 Jan 1]. Available from: https://www.cancer.org/cancer/types/pancreatic-cancer/detection-diagnosis-staging/how-diagnosed.html
30. Ballehaninna UK, Chamberlain RS. The clinical utility of serum CA 19-9 in the diagnosis, prognosis and management of pancreatic adenocarcinoma: An evidence based appraisal. J Gastrointest Oncol [Internet]. 2012 [cited 2024 Jan 1];3(2):105–19. Available from: https://jgo.amegroups.org/article/view/181/html
31. Baine MJ, Menning M, Smith LM, Mallya K, Kaur S, Rachagani S, et al. Differential gene expression analysis of Peripheral Blood Mononuclear Cells reveals novel test for early detection of pancreatic cancer. Cancer Biomark. 2011;11(1):1–14.
32. Lee ES, Lee M, Lee JM. Imaging diagnosis of pancreatic cancer: A state-of-the-art review WJG 20 th Anniversary Special Issues (14): Pancreatic cancer. World J Gastroenterol. 2014;20(24):7864–77.
33. Miura F, Takada T, Amano H, Yoshida M, Furui S, Takeshita K. Diagnosis of pancreatic cancer. HPB (Oxford) [Internet]. 2006 Oct [cited 2024 Jan 1];8(5):337–42. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18333085/
34. Chu LC, Goggins MG, Fishman EK. Diagnosis and Detection of Pancreatic Cancer. Cancer J [Internet]. 2017 Nov 1 [cited 2024 Jan 1];23(6):333–42. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29189329/

35. Sahani D V., Bonaffini PA, Catalano OA, Guimaraes AR, Blake MA. State-of-the-Art PET/CT of the Pancreas: Current Role and Emerging Indications. Radiographics [Internet]. 2012 Jul [cited 2024 Jan 1];32(4):1133. Available from: /pmc/articles/PMC6939848/
36. Raman SP, Horton KM, Fishman EK. Multimodality imaging of pancreatic cancer-computed tomography, magnetic resonance imaging, and positron emission tomography. Cancer J [Internet]. 2012 Nov [cited 2024 Jan 1];18(6):511–22. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23187837/
37. Beger HG, Gansauge F, Leder G. Pancreatic cancer: who benefits from curative resection? Can J Gastroenterol [Internet]. 2002 [cited 2024 Jan 1];16(2):117–20. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11875596/
38. Wang X, Fan S, Pan H, Chen W, Wang H. Cancer immunotherapy for metastasis: past, present and future. Brief Funct Genomics [Internet]. 2019 Mar 22 [cited 2024 Jan 1];18(2):140–6. Available from: https://dx.doi.org/10.1093/bfgp/ely022
39. Costoya JA, Arce VM. Cancer cells escape the immune system by increasing stemness through epigenetic reprogramming. Cell Mol Immunol [Internet]. 2023 [cited 2024 Jan 1];20:6–7. Available from: https://doi.org/10.1038/s41423-022-00953-3
40. Lata Gupta S, Srijani Basu ·, Soni V, Rishi ·, Jaiswal K. Immunotherapy: an alternative promising therapeutic approach against cancers. 2022 [cited 2024 Jan 1];49:9903–13. Available from: https://doi.org/10.1007/s11033-022-07525-8
41. Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S. Functions of natural killer cells. Nature Immunology 2008 9:5 [Internet]. 2008 Apr 18 [cited 2024 Jan 1];9(5):503–10. Available from: https://www.nature.com/articles/ni1582
42. Ramírez-Labrada A, Pesini C, Santiago L, Hidalgo S, Calvo-Pérez A, Oñate C, et al. All About (NK Cell-Mediated) Death in Two Acts and an Unexpected Encore: Initiation, Execution and Activation of Adaptive Immunity. Front Immunol. 2022 May 16;13:896228.
43. Hibler W, Merlino G, Yu Y. CAR NK Cell Therapy for the Treatment of Metastatic Melanoma: Potential & Prospects. Cells [Internet]. 2023 Dec 1 [cited 2024 Jan 1];12(23). Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38067178/
44. Klingemann H. Are natural killer cells superior CAR drivers? Oncoimmunology [Internet]. 2014 [cited 2024 Jan 1];3(4). Available from: /pmc/articles/PMC4203506/
45. Chan LY, Dass SA, Tye GJ, Imran SAM, Wan Kamarul Zaman WS, Nordin F. CAR-T Cells/-NK Cells in Cancer Immunotherapy and the Potential of MSC to Enhance Its Efficacy: A Review. Biomedicines [Internet]. 2022 Apr 1 [cited 2024 Jan 1];10(4). Available from: /pmc/articles/PMC9024487/
46. Shah NN, Baird K, Delbrook CP, Fleisher TA, Kohler ME, Rampertaap S, et al. Acute GVHD in patients receiving IL-15/4-1BBL activated NK cells following T-cell-depleted stem cell transplantation. Blood [Internet]. 2015 Jan 29 [cited 2024 Jan 1];125(5):784–92. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25452614/

47. Klingemann H, Boissel L, Toneguzzo F. Natural Killer Cells for Immunotherapy - Advantages of the NK-92 Cell Line over Blood NK Cells. Front Immunol [Internet]. 2016 Mar 14 [cited 2024 Jan 1];7(MAR). Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27014270/
48. Binyamin L, Alpaugh RK, Hughes TL, Lutz CT, Campbell KS, Weiner LM. Blocking NK Cell Inhibitory Self-Recognition Promotes Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity in a Model of Anti-Lymphoma Therapy. J Immunol [Internet]. 2008 May 5 [cited 2024 Jan 1];180(9):6392. Available from: /pmc/articles/PMC2810560/
49. Swift BE, Williams BA, Kosaka Y, Wang XH, Medin JA, Viswanathan S, et al. Natural killer cell lines preferentially kill clonogenic multiple myeloma cells and decrease myeloma engraftment in a bioluminescent xenograft mouse model. Haematologica [Internet]. 2012 Jul 1 [cited 2024 Jan 1];97(7):1020. Available from: /pmc/articles/PMC3396673/
50. Mehta RS, Rezvani K. Chimeric Antigen Receptor Expressing Natural Killer Cells for the Immunotherapy of Cancer. Front Immunol [Internet]. 2018 Feb 15 [cited 2024 Jan 1];9(FEB). Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29497427/
51. Zhang J, Zheng H, Diao Y. Natural Killer Cells and Current Applications of Chimeric Antigen Receptor-Modified NK-92 Cells in Tumor Immunotherapy. Int J Mol Sci [Internet]. 2019 Jan 2 [cited 2024 Jan 1];20(2). Available from: /pmc/articles/PMC6358726/
52. Natural killer cells for cancer immunotherapy: a new CAR is catching up. EBioMedicine [Internet]. 2019 Jan 1 [cited 2024 Jan 1];39:1. Available from: /pmc/articles/PMC6355444/
53. Tonn T, Schwabe D, Klingemann HG, Becker S, Esser R, Koehl U, et al. Treatment of patients with advanced cancer with the natural killer cell line NK-92. Cytotherapy [Internet]. 2013 Dec [cited 2024 Jan 1];15(12):1563–70. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24094496/
54. Tam YK, Martinson JA, Doligosa K, Klingemann HG. Ex vivo expansion of the highly cytotoxic human natural killer-92 cell-line under current good manufacturing practice conditions for clinical adoptive cellular immunotherapy. Cytotherapy [Internet]. 2003 [cited 2024 Jan 1];5(3):259–72. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12850795/
55. Romee R, Foley B, Lenvik T, Wang Y, Zhang B, Ankarlo D, et al. NK cell CD16 surface expression and function is regulated by a disintegrin and metalloprotease-17 (ADAM17). Blood [Internet]. 2013 May 5 [cited 2024 Jan 1];121(18):3599. Available from: /pmc/articles/PMC3643761/
56. Yeap WH, Wong KL, Shimasaki N, Teo ECY, Quek JKS, Yong HX, et al. CD16 is indispensable for antibody-dependent cellular cytotoxicity by human monocytes. Scientific Reports 2016 6:1 [Internet]. 2016 Sep 27 [cited 2024 Jan 1];6(1):1–22. Available from: https://www.nature.com/articles/srep34310
57. Di Stasi A, Tey SK, Dotti G, Fujita Y, Kennedy-Nasser A, Martinez C, et al. Inducible apoptosis as a safety switch for adoptive cell therapy. N Engl J Med [Internet]. 2011 Nov 3 [cited 2024 Jan 1];365(18):1673–83. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22047558/

58. Manetti R, Parronchi P, Giudizi MG, Piccinni MP, Maggi E, Trinchieri G, et al. Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12 [IL-12]) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells. J Exp Med [Internet]. 1993 Apr 1 [cited 2024 Jan 1];177(4):1199–204. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8096238/
59. Briukhovetska D, Dörr J, Endres S, Libby P, Dinarello CA, Kobold S. Interleukins in cancer: from biology to therapy. Nat Rev Cancer [Internet]. 2021 Aug 1 [cited 2024 Jan 1];21(8):481–99. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34083781/
60. Trinchieri G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. Nat Rev Immunol [Internet]. 2003 Feb [cited 2024 Jan 1];3(2):133–46. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12563297/
61. Cheng EM, Tsarovsky NW, Sondel PM, Rakhmilevich AL. Interleukin-12 as an in situ cancer vaccine component: a review. Cancer Immunol Immunother [Internet]. 2022 Sep 1 [cited 2024 Jan 1];71(9):2057. Available from: /pmc/articles/PMC9276836/
62. Bose M, Grover P, Sanders AJ, Zhou R, Ahmad M, Shwartz S, et al. Overexpression of MUC1 Induces Non-Canonical TGF-β Signaling in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. Front Cell Dev Biol [Internet]. 2022 Feb 14 [cited 2024 Jan 1];10. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35237602/
63. Kung AL, Kimbrel EA, Davis TN, Bradner JE. In vivo pharmacodynamic imaging of proteasome inhibition. Mol Imaging [Internet]. 2009 May 1 [cited 2024 Jan 3];8(3):140–7. Available from: https://journals.sagepub.com/doi/full/10.2310/7290.2009.00007
64. Lee CJ, Spalding AC, Ben-Josef E, Wang L, Simeone DM. In Vivo Bioluminescent Imaging of Irradiated Orthotopic Pancreatic Cancer Xenografts in Nonobese Diabetic-Severe Combined Immunodeficient Mice: A Novel Method for Targeting and Assaying Efficacy of Ionizing Radiation. Transl Oncol [Internet]. 2010 [cited 2024 Jan 2];3(3):153. Available from: /pmc/articles/PMC2887644/
65. Pancreatic tumor mass in a xenograft mouse model is decreased by treatment with therapeutic stem cells following introduction of therapeutic genes [Internet]. [cited 2024 Jan 2]. Available from: https://www.spandidos-publications.com/or/30/3/1129
66. Sullivan LA, Carbon JG, Roland CL, Toombs JE, Nyquist-Andersen M, Kavlie A, et al. r84, a Novel Therapeutic Antibody against Mouse and Human VEGF with Potent Anti-Tumor Activity and Limited Toxicity Induction. PLoS One [Internet]. 2010 [cited 2024 Jan 2];5(8). Available from: /pmc/articles/PMC2917360/
67. Tadros S, Shukla SK, King RJ, Gunda V, Vernucci E, Abrego J, et al. De Novo Lipid Synthesis Facilitates Gemcitabine Resistance through Endoplasmic Reticulum Stress in Pancreatic Cancer. Cancer Res [Internet]. 2017 Oct 15 [cited 2024 Jan 2];77(20):5503–17. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28811332/
68. Faustino-Rocha A, Oliveira PA, Pinho-Oliveira J, Teixeira-Guedes C, Soares-Maia R, Da Costa RG, et al. Estimation of rat mammary tumor volume using caliper and ultrasonography

measurements. Lab Animal 2013 42:6 [Internet]. 2013 May 21 [cited 2024 Jan 2];42(6):217–24. Available from: https://www.nature.com/articles/laban.254

69. Wang C, Wang J, Che S, Zhao H. CAR-T cell therapy for hematological malignancies: History, status and promise. Heliyon. 2023 Nov 1;9(11):e21776.
70. Tan S, Li D, Zhu X. Cancer immunotherapy: Pros, cons and beyond. Biomedicine & Pharmacotherapy. 2020 Apr 1;124:109821.
71. Abd Talib FNA, Marzuki M, Hoe SLL. Analysis of NK-92 cytotoxicity in nasopharyngeal carcinoma cell lines and patient-derived xenografts using impedance-based growth method. Heliyon [Internet]. 2023 Jul 1 [cited 2024 Jan 1];9(7). Available from: /pmc/articles/PMC10320316/
72. Zhang J, Zheng H, Diao Y. Natural Killer Cells and Current Applications of Chimeric Antigen Receptor-Modified NK-92 Cells in Tumor Immunotherapy. Int J Mol Sci [Internet]. 2019 Jan 2 [cited 2024 Jan 1];20(2). Available from: /pmc/articles/PMC6358726/
73. Liu Y, Jing W, Zhang J, Chen C, Gao L, Shi C, et al. In situ MUC1-specific CAR engineering of tumor-supportive macrophages stimulates tumoricidal immunity against pancreatic adenocarcinoma. Nano Today. 2023 Apr 1;49:101805.
74. Ostroumov D, Fekete-Drimusz N, Saborowski M, Kühnel F, Woller N. CD4 and CD8 T lymphocyte interplay in controlling tumor growth. Cellular and Molecular Life Sciences [Internet]. 2018 Feb 1 [cited 2024 Jan 2];75(4):689. Available from: /pmc/articles/PMC5769828/
75. Tay RE, Richardson EK, Toh HC. Revisiting the role of CD4+ T cells in cancer immunotherapy—new insights into old paradigms. Cancer Gene Therapy 2020 28:1 [Internet]. 2020 May 27 [cited 2024 Jan 2];28(1):5–17. Available from: https://www.nature.com/articles/s41417-020-0183-x
76. Zhang C, Oberoi P, Oelsner S, Waldmann A, Lindner A, Tonn T, et al. Chimeric Antigen Receptor-Engineered NK-92 Cells: An Off-the-Shelf Cellular Therapeutic for Targeted Elimination of Cancer Cells and Induction of Protective Antitumor Immunity. Front Immunol [Internet]. 2017 May 18 [cited 2024 Jan 21];8(MAY):533. Available from: /pmc/articles/PMC5435757/
77. Klingemann H. The NK-92 cell line—30 years later: its impact on natural killer cell research and treatment of cancer. 2023 [cited 2024 Jan 21]; Available from: https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2022.12.003
78. Fisher DT, Appenheimer MM, Evans SS. The Two Faces of IL-6 in the Tumor Microenvironment. Semin Immunol [Internet]. 2014 [cited 2024 Feb 15];26(1):38. Available from: /pmc/articles/PMC3970580/
79. Han Z, Kang D, Joo Y, Lee J, Oh GH, Choi S, et al. TGF-β downregulation-induced cancer cell death is finely regulated by the SAPK signaling cascade. Experimental & Molecular Medicine 2018 50:12 [Internet]. 2018 Dec 6 [cited 2024 Feb 15];50(12):1–19. Available from: https://www.nature.com/articles/s12276-018-0189-8

80. Zhang Y, Zhou F, Wu Z, Li Y, Li C, Du M, et al. Timing of Tocilizumab Administration Under the Guidance of IL-6 in CAR-T Therapy for R/R Acute Lymphoblastic Leukemia. Front Immunol [Internet]. 2022 Jun 21 [cited 2024 Feb 15];13. Available from: /pmc/articles/PMC9253384/

81. Marofi F, Saleh MM, Rahman HS, Suksatan W, Al-Gazally ME, Abdelbasset WK, et al. CAR-engineered NK cells; a promising therapeutic option for treatment of hematological malignancies. Stem Cell Research & Therapy 2021 12:1 [Internet]. 2021 Jul 2 [cited 2024 Jan 2];12(1):1–18. Available from: https://stemcellres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13287-021-02462-y

82. Rezvani K, Rouce RH. The Application of Natural Killer Cell Immunotherapy for the Treatment of Cancer. Front Immunol [Internet]. 2015 [cited 2024 Jan 2];6(NOV). Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26635792/

83. Williams BA, Law AD, Routy B, denHollander N, Gupta V, Wang XH, et al. A phase I trial of NK-92 cells for refractory hematological malignancies relapsing after autologous hematopoietic cell transplantation shows safety and evidence of efficacy. Oncotarget [Internet]. 2017 [cited 2024 Jan 2];8(51):89256–68. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29179517/

7. ÖZGEÇMİŞ