

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**PANKREAS KANSERİNDE NECTİN-2 EKSPRESYONU
İLE SİTOTOKSİK T HÜCRE FONKSİYONLARI ARASINDAKİ
İLİŞKİ**

Biol. Mualla İlknur GÜNDÜZ

**Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

ANKARA

2023

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**PANKREAS KANSERİNDE NECTİN-2 EKSPRESYONU
İLE SİTOTOKSİK T HÜCRE FONKSİYONLARI ARASINDAKİ
İLİŞKİ**

Biol. Mualla İlknur GÜNDÜZ

**Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Füsun ÖZMEN**

**ANKARA
2023**

**PANKREAS KANSERİNDE NECTİN-2 EKSPRESYONU İLE
SİTOTOKSİK T HÜCRE FONKSİYONLARI ARASINDAKİ İLİŞKİ**

Öğrenci: Biol. Mualla İlknur Gündüz

Danışman: Prof. Dr. Füsun Özmen

Bu tez çalışması 07/12/2023 tarihinde jürimiz tarafından “Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi Programı”nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Güneş Esendağlı

Hacettepe Üniversitesi

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Füsun Özmen

Hacettepe Üniversitesi

Üye: Doç. Dr. Begüm Kocatürk

Hacettepe Üniversitesi

Üye: Doç. Dr. Arzu Atalay

Ankara Üniversitesi

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Seçil Demirkol Canlı

Hacettepe Üniversitesi

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Müge YEMİŞCİ ÖZKAN

Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan **“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”** kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- o Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. ⁽¹⁾
- o Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren ... ay ertelenmiştir. ⁽²⁾
- o Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. ⁽³⁾

07/12/2023
Mualla İlknur GÜNDÜZ

[i]“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”

(1) Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez **danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu** iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.

(2) Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez **danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulunun** gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.

(3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, **tezin yapıldığı kurum** tarafından verilir *. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, **ilgili kurum ve kuruluşun önerisi** ile **enstitü** veya **fakültenin** uygun görüşü üzerine **üniversite yönetim kurulu** tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir.

* Tez **danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu tarafından karar verilir.**

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Prof. Dr. Füsun zmen danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

Mualla İlknur GÜNDÜZ

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca akademik bilgi ve deneyimlerini her zaman benimle paylaşan, en başta akademik anlamda kendimi geliştirmem için desteğini hiç esirgemeyen ve her zaman fikirlerine ihtiyaç duyacağım, en önemlisi yılmadan tekrar tekrar anlatmaktan hiç bir zaman vazgeçmeyen çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Füsun ÖZMEN'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Hacettepe Üniversitesi Temel Onkoloji Anabilimdalı'nda Yüksek lisans eğitimime engin bilgi ve deneyimlerini bana aktaran başta Temel Onkoloji Anabilimdalı bölüm başkanı Prof. Dr. Güneş Esendağlı'ya, Doç. Dr. Hande Canpınar'a, Doç. Dr. Begüm Kocatürk'e, Doç. Dr. Neşe Ünver'e değerli katkılarından dolayı saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Her anımda yanımda olan benden desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen kardeşten öte dediklerim Melek Günindi Korkut, Rukiye Abanoz, Berkay Yahşi ve Ceren Narin Şimşek'e teşekkürlerimi bir borç bilirim. Ayrıca çalışmalarım sırasında tecrübelerini ve önerilerini benimle paylaşan tüm Hacettepe Üniversitesi Temel Onkoloji Anabilim Dalı yüksek lisans ve doktora öğrencilerine teşekkürlerimi sunarım. Bölüme her girdiğimde beni güler yüzüyle karşılayan Sayın Semra Solmaz ve tüm idari personele teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım sırasında her zaman bana arka çıkan, çalışma hayatımda iyikilerim dediğim benim bu yolda yürümemi destekleyen başta Prof. Dr. Nalan Akyürek, Prof. Dr. Güldal Esendağlı, Doç. Dr. Özgür Ekinci ve Gazi Üniversitesi Patoloji AD'nın tüm değerli Hocalarıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans süresince bana her türlü desteği verip yokluğumu hissettirmeyen çok kıymetli çalışma arkadaşlarım Fatma Özbek, Seda Şenol, Sinem Aytekin Yücel ve M. Sefa Demirkıran'a teşekkürlerimi sunarım.

Her zaman hayatta olduklarına şükrettiğim ve bu yoldan vazgeçmemem için her türlü çabayı benimle beraber gösteren güzel aileme, güzel kızlarım İlkay ve Olcay'a tüm içtenliğimle sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Gündüz Mualla İlknur. Pankreas Kanserinde Nectin-2 Ekspresyonu ile Sitotoksik T Hücre Fonksiyonları Arasındaki İlişki, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi Programı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2023. Çeşitli kanserlerin tedavisinde anti-CTLA-4, anti-PD1 ve anti-PDL-1 gibi kontrol noktası inhibitörleri kullanılmaktadır. Fakat pankreas kanserinde PDL-1 ekspresyonunun bulunmaması nedeniyle kullanılamamaktadır. Diğer kontrol noktası molekülleri arasında TIGIT ailesi üyeleri TIGIT, CD96, DNAM-1, PVRIG yer almaktadır. Bu reseptörlerin ligandları polio virüs reseptörü (PVR) ve Nectin ailesi üyeleridir. Nectin-2 bu reseptörler için ligand görevi görür ve Pankreas kanserindeki rolü ise tam olarak bilinmemektedir. Bu tezin amacı; Nectin-2 ekspresyonu ile ligandı olduğu reseptörleri TIGIT, PVRIG, DNAM-1'in ekspresyon düzeylerinin kesitsel olarak incelenmesidir. Çalışmamızda pankreas kanseri tanısı almış 131 hastanın tümör dokularında, Nectin-2, CD8, TIGIT, PVRIG, DNAM-1, PD-1, PD-L1, LAG3, TIM3, VISTA, Kİ-67 moleküllerinin ekspresyonlarına bakıldı. Nectin-2 hastaliksız pankreas dokusunda eksprese olmazken, tümörlü dokuların %30,5'inde eksprese olduğu görülmüştür. Hastaların hiçbirinde PD-1 ve PD-L1 ekspresyonu görülmemiştir. CD8 TIL'lerin düşük yoğunlukta olduğu grupta, Nectin-2 ekspresyonunun negatif olduğu hasta sayısının, pozitif olan hasta sayısına göre daha fazla olduğu görülmüştür. Nectin-2'nin pozitif ekspresyonuna sahip 32 hastada Kİ-67 proliferasyon belirtecinin yüksek oranda eksprese edildiği belirlendi. Nectin-2'nin ekspresyon göstermediği hasta grubunda TIGIT ekspresyonu gösteren hasta sayısının arttığı görülmüştür. Nectin-2 yokluğunda PVRIG ve DNAM-1 de izlenmemiştir. Nectin-2 ekspresyonu olmayan hastalarda LAG3 ve TIM3 ekspresyonu göstermeyen hasta sayısı daha yüksekti. Nectin-2'nin, pankreas kanserinin 3 ve 4. evrelerinde anlamlı olarak düşük eksprese edildiği gözlemlenmiştir. TIGIT reseptörünün PVRIG ve DNAM-1 moleküllerinin ekspresyonları ile ilişkisine bakıldığında negatif yönde ilişki saptanmış, istatistiksel olarak da anlamlı bulunmuştur. PVRIG ile pozitif boyanan grupta tümör boyutunun medyanı 4 cm iken, negatif ekspresyon gösterdiği grupta ise 3 cm olduğu belirlenmiştir. PVRIG ve DNAM-1 pozitifliği evre 2'de, evre 1'e göre daha eksprese edildiği gözlenmiştir. LAG3 ekspresyonu ile TIM3 ekspresyonu arasında pozitif korelasyon olduğu görülmüştür. LAG3 ve VISTA ekspresyonu pozitif olan hastalarda Lenfovasküler invazyon varlığının da arttığı gözlemlenmiştir. LAG3, TIM3 ve VISTA ekspresyonları pozitif olan hastalarda lenf nodu metastazı da anlamlı ölçüde arttığı tespit edilmiştir. VISTA molekülünün ekspresyon düzeylerinin klinik evre 3'de anlamlı fark gösterdiği belirlenmiştir. Bu veriler Nectin-2 ekspresyonu ve CD8+ hücrelerin fonksiyonu arasında yakın bir ilişki olabileceğini göstermektedir. Bu ilişkinin mekanizmasını açıklayabilmek ve Nectin-2'nin hedeflenebilirliğini gösterebilmek için ileri araştırmalara gereksinim vardır.

Anahtar Kelimeler: Nectin-2, TIGIT, DNAM-1, PVRIG, PD-1, PD-L1, LAG3, TIM3, VISTA, Sitotoksik T Hücre.

ABSTRACT

Gündüz Mualla İlknur. The Relationship Between Nectin-2 Expression and Cytotoxic T Cell Functions in Pancreatic Cancer, Hacettepe University Graduate School of Health Sciences, Tumor Biology and Immunology Program Master Thesis, Ankara, 2023. Checkpoint inhibitors such as anti-CTLA-4, anti-PD1 and anti-PDL-1 are used in the treatment of various cancers. However, they cannot be used in pancreatic cancer due to the lack of PDL-1 expression. Other checkpoint molecules include TIGIT family members TIGIT, CD96, DNAM-1, PVRIG. The ligands of these receptors are polio virus receptor (PVR) and Nectin family members. Nectin-2 acts as a ligand for these receptors and its role in pancreatic cancer is not fully known. The aim of this thesis is to cross-sectionally analyze the expression levels of Nectin-2 and its ligand receptors TIGIT, PVRIG, DNAM-1. In our study, the expressions of Nectin-2, CD8, TIGIT, PVRIG, DNAM-1, PD-1, PD-L1, LAG3, TIM3, VISTA, KI-67 molecules were examined in tumor tissues of 131 patients diagnosed with pancreatic cancer. Nectin-2 was not expressed in undiseased pancreatic tissue, whereas it was expressed in 30.5% of tumor tissues. PD-1 and PD-L1 expression was not observed in any of the patients. In the group with low density of CD8 TILs, the number of patients with negative Nectin-2 expression was higher than the number of patients with positive expression. In 32 patients with positive expression of Nectin-2, KI-67 proliferation marker was highly expressed. In the patient group where Nectin-2 was not expressed, the number of patients showing TIGIT expression increased. PVRIG and DNAM-1 were also not observed in the absence of Nectin-2. Patients without Nectin-2 expression had a higher number of patients without LAG3 and TIM3 expression. Nectin-2 was observed to be significantly underexpressed in stages 3 and 4 of pancreatic cancer. When the relationship between TIGIT receptor and the expression of PVRIG and DNAM-1 molecules was analyzed, a negative relationship was found and it was statistically significant. The median tumor size was 4 cm in the PVRIG positive staining group and 3 cm in the negative expression group. PVRIG and DNAM-1 positivity was more expressed in stage 2 than in stage I. There was a positive correlation between LAG3 expression and TIM3 expression. It was also observed that the presence of lymphovascular invasion increased in patients with positive LAG3 and VISTA expression. Lenf node metastasis was also significantly increased in patients with positive LAG3, TIM3 and VISTA expressions. Expression levels of VISTA molecule showed a significant difference in clinical stage 3. These data suggest that there may be a close relationship between Nectin-2 expression and the function of CD8+ cells. Further studies are needed to explain the mechanism of this relationship and to demonstrate the targetability of Nectin-2.

Keywords: Nectin-2, TIGIT, DNAM-1, PVRIG, PD-1, PD-L1, LAG3, TIM3, VISTA, Cytotoxic T Cell.

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR	xii
ŞEKİLLER	xiv
TABLolar	xvi
RESİMLER	xvii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	6
2.1. Kanser Biyogenezi	6
2.2. Pankreas Kanseri	7
2.2.1. Pankreas Prekanseröz Lezyonlar	9
2.2.2. Pankreas Prekanseröz Lezyonların Karsinogenezi	11
2.3. Pankreas Kanserinin Tanı ve Tedavisi	14
2.4. Pankreas Kanserine İmmünoterapötik Yaklaşım	15
2.5. Tümör İnfiltrat Edici Lenfositler (TIL)	18
2.5.1. Sitotoksik T lenfositler (CTL)	20
2.6. İmmün Hücrelerde Kontrol Noktası Molekülleri	22
2.6.1. TIGIT Ailesi	24
2.6.2. TIGIT Ligandları	28
2.7. Nectin-2 Ligandının Tümör Patogenezindeki Rolü	34
3. GEREÇ VE YÖNTEM	36
3.1. Olguların Seçimi	36
3.2. Olguların Hazırlanması	36
3.3. İmmünohistokimyasal Boyama	37

3.3.1. Nectin-2 ve CD8 Antikorlarının İmmünohistokimyasal Doublestain Boyama Yöntemi	39
3.3.2. TIGIT Antikorusunun İmmünohistokimyasal Boyama Yöntemi	40
3.3.3. DNAM-1 Antikorusunun İmmünohistokimyasal Boyama Yöntemi	40
3.3.4. PVRIG Antikorusunun İmmünohistokimyasal Boyama Yöntemi	41
3.3.5. LAG3 Antikorusunun İmmünohistokimyasal Boyama Yöntem	42
3.3.6. TIM3 Antikorusunun İmmünohistokimyasal Boyama Yöntemi	43
3.3.7. VISTA Antikorusunun İmmünohistokimyasal Boyama Yöntemi	44
3.3.8. PD-1 Antikorusunun İmmünohistokimyasal Boyama Yöntemi	44
3.3.9. PD-L1 Antikorusunun İmmünohistokimyasal Boyama Yöntemi	45
3.3.10. KI-67 Antikorusunun İmmünohistokimyasal Boyama Yöntemi	46
3.4. İmmünohistokimyasal Boyamaların Değerlendirilmesi	47
3.4.1. Anti-Nectin-2 ve CD8 Antikorlarının Değerlendirilmesi	47
3.4.2. TIGIT Antikorusunun Değerlendirilmesi	49
3.4.3. PVRIG Antikorusunun Değerlendirilmesi	50
3.4.4. DNAM-1 Antikorusunun Değerlendirilmesi	51
3.4.5. LAG3, TIM3, VISTA Antikorlarının Değerlendirilmesi	53
3.4.6. PD-1 ve PD-L1 Antikorlarının Değerlendirilmesi	54
3.4.7. Ki-67 Antikorusunun Değerlendirilmesi	55
3.5. Çalışmada Kullanılan Malzemeler	55
3.6. İstatistiksel Analiz	56
3.7. Etik Kurul Onayı	56
4. BULGULAR	57
4.1. Pankreas Kanseri Nectin-2 ve Reseptörlerinin Ekspresyon Analizleri	57
4.2. Pankreas Kanseri TIGIT Ekspresyonu ile Nectin-2, PVRIG ve DNAM-1'in Ekspresyon Analizleri	63
4.3. Pankreas Kanseri LAG3, TIM3, VISTA, PD-1 ve PD-L1 Moleküllerinin Ekspresyon Analizleri	64
4.4. Pankreas Kanseri Tanılı Hastaların Yaş ve Cinsiyet Dağılımı	70
4.5. Pankreas Kanseri Hastalarının Klinikopatolojik Özellikleri ile İmmünohistokimyasal Bulguların Karşılaştırılması	72

4.6. Pankreas Kanseri Hastalarında İmmünohistokimyasal Bulgular ile Klinik Evre ile Sağkalım Sürelerinin Karşılaştırılması	81
5. TARTIŞMA	85
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	94
7. KAYNAKÇA	100
8. EKLER	111
EK 1. Tez Çalışması Orijinallik Raporu	
EK 2. Dijital Makbuz	
EK 3. Etik Kurul Onayı	
9. ÖZGEÇMİŞ	114

SİMGELER VE KISALTMALAR

AJ	<i>Adherens Junction</i>
BRAF	<i>v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1</i>
C9	Kompleman 9
CDKN2A	Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitör 2A
CLEPD1	<i>Cleft lip/palate-actodermal Dysplasia Syndrome 1</i>
CTL	Sitotoksik T Lenfositler
CTLA-4	Stotoksik Lenfosit İlişkili Antijen 4
DAB	3,3-diamino Benzidin
DC	Dentratik Hücreler
DNAM-1	DNAX Yardımcı Molekül 1
DPC4	<i>Deleted In Pancreatic Cancer 4</i>
EDTA	Etilenediamin Tetraasetik Asit
EMT	Epitelyal-Mezenkimal Geçiş
FADD	Fas İle İlişkili Ölüm Domaini
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
GNAS	Guanin Nükleotid Bağlayıcı Protein
HCC	Hepato Sellüler Karsinom
HER2	İnsan Epidermal Büyüme Faktörü 2
HLA	İnsan Lökosit Antijeni
IFN-γ	İnterferon Gama
IgSF	İmmüngloblin Süper Ailesi
IPMN	İntraduktal Papiller Müsinöz Neoplazm
ITIM	İmmünoreseptör Tirozin Bazlı İnhibisyon Motifi
ITT	İmmünoglobulin Tirozin Kuyruğu
K-ras	Kristen Sıçan Sarkomaviral Onkogen
LAG3	Lenfosit Aktivasyon Geni 3
MCN	Müsinöz Kistik Neoplazm
MHC	Majör Doku Uygunluk Kompleksi

MMP	Matris Metalloproteaz
NECL	Nectin Benzeri Moleküller
NK	Doğal Öldürücü Hücreler
OS	Genel Sağkalım
PanIN	Pankreatik İntraepiteryal Neoplazi
PIK3CA	<i>Phosphoinositide-3-kinase, catalytic, alpha</i>
PDAC	Pankreas Duktal Adenokarsinom
PD-1	Programlanmış Hücre Ölümü 1
PD-L1	Programlanmış Hücre Ölüm Ligandı 1
PVR	Poliovirüs Reseptörü
PVRL2	Polivürüs İle İlişkili Protein 2
Th	T Yardımcı Hücreler
TIGIT	İmmüngloblin ve ITIM Domein İçeren T Hücre
TIL	Tümör İnfiltrate Edici Lenfositler
TJ	<i>Tight Junction</i>
TIM3	T Hücre İmmünogloblin ve Müsin Alanı 3
TME	Tümör Mikroçevresi
TNF	Tümör Nekroz Faktör
TP53	Tümör Proteini 53
Treg	Düzenleyici T Hücreler
siRNA	Küçük Engelleyici RNA'lar
SMAD	<i>Caenorhabditis Elegans</i> SMA Geni
VISTA	T Hücre Aktivasyonunun V-domain İmmünoglobulin İçeren

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Kanser hücrelerini tanımlayan özellikleri	7
2.2. 2020 yılında bölgelere özgü pankreas kanserinin cinsiyet ve yaşa göre görülme oranları (GLOBOCAN 2020)	8
2.3. PDAC'lerin oluşum sırasında görülen mutasyonlar	10
2.4. PanIN gelişim modeli	13
2.5. İmmün sistem ve kanser gelişimi arasındaki ilişki	16
2.6. Monoklonal antikolar ile kanser hücrelerinin yok edilmesi	17
2.7. Pankreas kanserinde tümör mikroçevresi	19
2.8. CTL'ler tarafından salgılanan Perforin ve Granzim B ile apoptozun gerçekleşmesi	21
2.9. İmmün kontrol noktası molekülleri	23
2.10. TIGIT/DNAM-1/CD96/PVRIG eksenini	27
2.11. Nectin ailesinin hücreler arasındaki fonksiyonlardaki rolü	29
2.12. Nectin-2'nin hücreler arası adhezyon aktivasyon modeli ve yapısı	31
4.1. Nectin-2 ve TIGIT, PVRIG, DNAM-1 ekspresyonu pozitif olan vaka sayısı.	58
4.2. Nectin-2 molekülünün CD8 ile ilişkisi.	60
4.3. Nectin-2 molekülünün KI-67 ile ilişkisi.	61
4.4. Nectin-2'nin reseptörleriyle olan ilişkisi.	63
4.5. TIGIT molekülünün PVRIG ve DNAM-1 ekspresyonu ile ilişkisi.	64
4.6. İmmün kontrol noktası moleküllerinin ekspresyonu	65
4.7. Nectin-2 ekspresyonu ile LAG3, TIM3, VISTA ekspresyonu arasındaki ilişki.	67
4.8. LAG3 ekspresyonu ile TIM3 ve VISTA ekspresyonu arasındaki ilişki	68
4.9. TIM3 ile VISTA arasındaki ilişki.	69
4.10. TIM3 ve LAG3 molekülleri CD8 ile ilişkisi.	70
4.11. Pankreas kanseri tanısı alma yaşının immün kontrol noktası molekülleri ile karşılaştırılması.	71
4.12. Pankreas kanserindeki tümör boyutunun immün kontrol noktası molekülleri ile karşılaştırılması.	78
4.13. Lenfovasküler invazyon varlığı ile LAG3 ve VISTA arasındaki ilişki	80

- 4.14.** Lenfnodu metastazı varlığı ile LAG3, TIM3 ve VISTA arasındaki ilişki 80
- 4.15.** CD8 ve Nectin-2 molekülünün klinik evre ile ilişkisi. 82
- 4.16.** TIGIT, PVRIG ve DNAM-1 moleküllerinin klinik evre ile ilişkisi. 82
- 4.17.** LAG3, TIM3 ve VISTA moleküllerinin klinik evre ile ilişkisi. 84
- 4.18.** Pankreas kanseri hastalarında Nectin-2 ligandının genel sağkalım süresi ile ilişkisi. 84

TABLOLAR

Tablo	Sayfa
2.1. Nectin ailesi ve hücresel fonksiyonları	30
3.1. İmmünohistokimyada kullanılan antikorların marka, klonları ile kullanılan pozitif kontrol dokuları.	38
4.1. Nectin-2 ve reseptörleri TIGIT, PVRIG, DNAM-1 ekspresyonunu gösteren vaka sayısı.	57
4.2. CD8 ⁺ hücre sayısının hastalara göre dağılımı.	59
4.3. Nectin-2 ekspresyonunun CD8ve KI-67 ekspresyon düzeyleri ile ilişkisi	59
4.4. Ki67+ hücre sayısının hastalara göre dağılımı proliferasyon indeksi	60
4.5. Nectin-2 ekspresyon varlığı ile reseptörlerinin ekspresyonları arasındaki ilişkisi.	62
4.6. TIGIT molekülünün Nectin-2, PVRIG ve DNAM-1 ile ilişkisi	62
4.7. İmmün kontrol noktası moleküllerinin ekspresyonlarının hastalara göre dağılımı.	64
4.8. Nectin-2 ekspresyonu ile LAG3, TIM3, VISTA, PD-1 ve ligandı PD-L1 ekspresyonu arasındaki ilişki.	66
4.9. LAG3 ekspresyonu ile diğer immün kontrol noktası moleküllerinin ekspresyonu arasındaki ilişki	67
4.10. TIM3 ekspresyonu ile diğer immün kontrol noktası moleküllerinin ekspresyonu arasındaki ilişki.	68
4.11. TIM3 ve LAG3 moleküllerinin CD8 ile ilişkisi.	69
4.12. Pankreas kanseri hastaların cinsiyet ve yaş dağılımı.	71
4.13. Hasta tümör dokularının histopatolojik özellikleri.	72
4.14. Klinikopatolojik özellikler ile immünohistokimyasal bulguların karşılaştırılması.	77
4.15. Klinikopatolojik özellikler ile immünohistokimyasal bulguların karşılaştırılması.	79
4.16. CD8, Nectin-2 ve reseptörlerinin klinik evrelerle olan ilişkisi.	81
4.17. LAG3, TIM3 ve VISTA moleküllerinin klinik evre ile ilişkisi.	83

RESİMLER

Resim	Sayfa
3.1. A) CD8 ⁺ T lenfositlerin düşük düzeyde ekspresyonu B) CD8 ⁺ T lenfositlerin orta düzeyde ekspresyonu C) CD8 ⁺ T lenfositlerin yüksek düzeyde ekspresyonu.	48
3.2. A) Nectin-2 pozitif ekspresyonu (siyah ok) ile CD8 yoğun miktarda ekspresyonu (kırmızı ok), B) Nectin-2 negatif ekspresyonu (siyah ok) ile CD8 az miktarda ekspresyonu (kırmızı ok)	48
3.3. A) Anti-TIGIT'ın pankreasa ait tümör hücrelerinde ekspresyon durumu, B) Tümör infiltre eden lenfositlerdeki ekspresyon durumu.	49
3.4. A) Anti-TIGIT düşük düzeyde ekspresyonu; B) Anti-TIGIT orta düzeyde ekspresyonu C) Anti-TIGIT yüksek düzeyde ekspresyonu D) Anti-TIGIT negatif ekspresyonu.	50
3.5. A) Anti-PVRIG antikoru ile boyanan lenfosit hücresi, B) Anti-PVRIG antikoru ile negatif ekspresyon gösteren lenfositler.	51
3.6. A) Anti-DNAM-1 düşük düzeyde ekspresyonu B) Anti-DNAM-1 orta düzeyde ekspresyonu C) Anti-DNAM-1 yüksek düzeyde ekspresyonu. D) Anti-DNAM-1 negatif ekspresyonu	52
3.7. A) Anti-LAG3 antikoru ile boyanan lenfosit hücresi, B) Anti-LAG3 antikoru ile negatif ekspresyon gösteren lenfositler.	53
3.8. A) Anti-TIM3 antikoru ile boyanan lenfosit hücresi, B) Anti-TIM3 antikoru ile negatif ekspresyon gösteren lenfositler.	53
3.9. A) Anti-VISTA antikoru ile boyanan lenfosit hücresi, B) Anti-VISTA antikoru ile negatif ekspresyon gösteren lenfositler.	54
3.10. A) Anti-PD-1 antikoru ile negatif ekspresyon gösteren lenfositler B) Anti-PD-L1 antikoru ile negatif ekspresyon gösteren tümör hücreleri.	54
3.11. A) Anti-Kİ-67 antikoru ile \geq %50 yüksek boyanma, B) %50< düşük boyanma.	55

4.1.A) İyi derecede diferansiye adenokarsinom, pankreas, H&E x20	74
4.1.B) Orta derecede diferansiye adenokarsinom, pankreas, H&E x20	74
4.1. C) Az derecede diferansiye adenokarsinom, pankreas, H&E x40	75
4.2. Pankreas kanseri dokusundaki perinöral invazyon varlığı.	76

1. GİRİŞ

Pankreas kanseri, agresif seyreden tümörlerdendir. Bu nedenle kötü prognozlu kanserler arasında yer almaktadır. Kansere bağlı ölümlerde kadın ve erkeklerde tüm dünyada 7. sırada yer almaktadır (1). Pankreas kanserinin erken teşhisi, oldukça zordur. Tümör ileri evreye ya da diğer organlara yayılana kadar genellikle semptom göstermeden seyretmektedir. Geç teşhis edilen bir hastalık olması nedeniyle başarılı tedavi ihtimali oldukça azalmaktadır

Pankreas kanseri, yaklaşık %10'luk 5 yıllık genel sağ kalım (OS) oranı ile kötü prognoza sahip bir kanser türüdür (2). Günümüzde cerrahi rezeksiyon pankreas kanserini iyileştirme potansiyeli olan tek tedavi yöntemidir ve önemini korumaktadır (3). Cerrahi rezeksiyonu belirleyen temel prognostik faktörler ise tümör evresi, cerrahi sınırların durumu ve tümör derecesi olarak bilinmektedir. Cerrahi rezeksiyonun ardından koruyucu kemoterapi alan hastalarda 5 yıllık sağ kalım oranı % 20 iken kemoterapi almayanlarda bu oran sadece % 10 civarındadır. Bununla birlikte, aynı evre ve derecede ki tümörlerde bile farklı davranış modellerinin bulunması prognozu etkileyen başka faktörlerin de olduğunu düşündürmektedir (4). Sonuçta, pankreas kanserinin erken teşhis için ulusal tarama testlerinin gündeme alınması, tanısı için yeni biyobelirteçlere gereksinim duyulması ve tedavisi için yeni stratejilerin geliştirilmesinin hayati bir öneme sahip olduğu açıkça görülmektedir.

Birçok kanser türünün tedavisinde etkili bir yol olarak kontrol noktası inhibitörleri yer almaktadır. İmmünoterapi ilaçları oldukça yeni olmalarına karşılık, kemoterapi ve radyoterapiden daha önce keşfedilmiştir. İmmünoterapi, bağışıklık sistemini aktifleştirerek aslında cerrahi olmayan ilk kanser tedavisidir. Günümüzde anti-CTLA-4, anti-PD-1 ve anti-PD-L1 antikorumları, başta küçük hücre dışı akciğer kanseri olmak üzere malign melanom ve renal hücreli kanserlerde immünoterapi ajanları olarak kullanılmaktadır (5). İmmünoterapi ajanlarını kullanan çok sayıda kanser hastasının ancak %10-30'u tedaviden fayda görebilmektedir. Bazı kanser türlerinin tedavisinde ise immünoterapi ajanları hiç kullanılamamaktadır. Bununla

beraber, başlangıçta immünoterapi ajanlarına yanıt veren çoğu hastada bu ajanlara sonradan kazanılmış direnç gelişebilmektedir (6). Bu nedenle immünoterapilerde bu moleküllerin dışında alternatif ya da daha iyi hedef olabilecek diğer kontrol noktası antijenlerinin belirlenmesi veya kombine tedavi olarak kullanılması kanser prognozunu iyi yönde etkileme açısından büyük önem taşımaktadır.

Tümör infiltre edici lenfositler (*Tumor infiltrating Lymphocyte*, TIL)'ler, tümör mikroçevresi (*tumor microenvironment*, TME)'nin önemli bileşenlerindedir ve tümörün ilerlemesine karşı immün yanıtı ifade etmektedirler (7). T ve B lenfositler, doğal öldürücü hücreler (*Naturel Killer*, NK), makrofajlar, nötrofiller ve dendritik hücreler "tümör infiltre eden hücreler" olarak sınıflandırılır, TIL'ler bunların içerisinde yer almaktadır. TIL'ler çoğunlukla tümör stromasında ya da tümörün kendisinde bulunabilmektedirler. CD8⁺ ve FoxP3⁺ lenfositler, TIL'lerin arasında önemli yere sahip olmakla birlikte zıt roller üstlenmiş iki spesifik TIL alt kümesidir (8). CD8⁺ TIL'ler, apoptozu tetikleyerek kanser hücrelerini öldüren ve kanser immünotesinde kritik bir role sahip olan hücrelerken Foxp3⁺ TIL'ler CD8⁺ TIL'lerin çoğalmasını ve aktivasyonunu baskılayan, immün süpresyon işlevi olan düzenleyici (regulatuvar) T hücreleridir (Treg'ler). Yapılan çalışmalarda artmış sayıda CD8⁺ TIL'in kolorektal, meme ve over karsinomlarında iyi bir prognoz ile korele olduğunu gösterilmiştir (9, 10).

T hücreler; tümör bölgesinde en fazla görülen bağışıklık sistemine ait hücrelerdir (11). Ancak bu hücrelerin tümörün evresine göre fonksiyonları değişiklik göstermektedir. Bunların arasında, sitotoksik T lenfositler (*Cytotoxic T Lymphocyte*, CTL) ve NK 'ler, kanser hücrelerinde eksprese edilen normal olmayan tümör antijenlerini tanıyarak onları yok etmek için sitokinler salgılayarak tümör antijenlerini hedef almaktadırlar. CTL'ler Th1 sitokinlerine benzer bir sitokin profiline sahiptirler ve bu hücreler CTL1 olarak da adlandırılmaktadırlar. Sitotoksik T hücreler, tümör hücrelerini öldürmenin yanı sıra interferon gama (IFN- γ) salgılayarak anjiyogenezi de baskılamaktadırlar. Aynı zamanda CTL ve NK hücreleri litik granüller olarak isimlendirilen çok sayıda hücre içi granül taşımaktadırlar. Bu litik granüller, protein yapıda olup por oluşturan perforin ile granüllerle ilişkili enzimler olan granzimleri

içermektedirler. Perforin, membranda porlar oluşturarak granzimlerin sitoplazmaya girmesini ve hedef hücrede apoptozun başlatılmasını sağlamaktadır. Tümör mikroçevresinde sitotoksik T hücrelerinin varlığı, kanser hastalarında sıklıkla pozitif prognoz ile ilişkilendirilmektedir (12).

İmmünglobulin ve ITIM domain içeren T hücre (TIGIT) reseptörü yakın zamanda tanımlanmış bir koinhibitör reseptördür ve çeşitli lenfoid hücrelerin yüzeyinde bulunabilmektedir. Bir immün kontrol reseptörü olması nedeniyle önemi her geçen gün artmaktadır (13). TIGIT, DNAM-1/CD226, CD96/TACTİLE ve CD112R/PVRIG ligand olarak PVR/CD155 ve/veya Nectin-2/CD112/PVRL2 paylaşan, ancak lenfosit fonksiyonları üzerinde zıt etkilere aracılık eden immünoglobulin süper ailesi (IgSF) reseptörleridir. Bunlar arasında DNAM-1, uyarıcı bir reseptör görevi görürken, TIGIT, PVRIG ve CD96' nın inhibe edici reseptörler olarak işlev gördüğü öne sürülmektedir. Bu aile içerisinde yer alan TIGIT, DNAM-1, CD96 ve PVRIG, T hücreleri ve NK hücreleri üzerinde eksprese edilirler. TIGIT, tümör hücreleri ve antijen sunan hücreler tarafından eksprese edilen PVR ve Nectin-2 olmak üzere iki liganda bağlanır(14). Bu iki ligand arasında TIGIT' ın PVR'ye olan bağlanma afinitesi Nectin-2'ye bağlanma afinitesine göre daha yüksektir (15). TIGIT'ın ligandı olan PVR'e bağlanmasıyla birlikte T hücrelerin çoğalmasını ve aktivasyonunu negatif yönde etkilediği gösterilmiştir. Bu ligandların da diğer immün kontrol noktası moleküllerin ligandları gibi tümör hücrelerinde yoğun bir şekilde eksprese edildiği bilinmektedir.

PVRIG, DNAM/TIGIT/CD96 nectin ailesi içerisinde yüksek afinite ile Nectin-2'ye bağlanan tek koinhibitör reseptördür. Nectin-2'ye bağlanmasıyla T ve NK hücrelerinin fonksiyonlarının baskılandığı çalışmalarda gösterilmiştir (16, 17). Ayrıca PVRIG ve TIGIT anta gonistlerinin CD8⁺ T hücrelerde sitokin üretimini ve sitotoksik aktiviteyi artırdığı gösterilmiştir. PVRIG ve TIGIT birbirini tamamlayıcı ve aynı biyolojik eksenin parçaları olsalarda, yapılan araştırmalar birbirlerinden farklı olduklarını da göstermektedir. PVRIG ve TIGIT farklı ligandlara bağlanıp (Nectin-2 ve PVR), farklı immün hücre tiplerinde eksprese edilirler ve bağlandıkları ligandlar farklı ekspresyon modellerine sahiptirler (18). PVR ile ilgili yapılan çalışmalarda

belirli bir ilerleme kaydedilmesiyle birlikte, aynı kontrol noktası moleküllerini kullanmaları nedeniyle Nectin-2 molekülünün de önemi artmaktadır. Nectin ve nectin benzeri (NECL) moleküllerin reseptörleri yakın zamanda kanser immünoterapisi için umut verici hedefler olarak gündemdeki yerini almıştır (19).

Nectinler, Nectin-1, Nectin-2, Nectin-3 ve Nectin-4 olmak üzere dört üyeli bir ailedir ve bu moleküller immünoglobulin benzeri hücre adhezyon molekülleridir. Nectinler, homofilik ve heterofilik trans-dimerler oluşturan bir F-aktin bağlayıcı protein olan afadin aracılığıyla aktin hücre iskeleti ile ilişkilidir(20, 21). Buna bağlı olarak hücre-hücre adhezyon molekülleri olarak işlev görürler ve epitelyal ve endotel hücrelerde hem *adherens junction* (AJ) hem de *tight junction* (TJ) 'nin hücre-hücre bağlantı oluşumunun ilk adımını düzenlerler.

Nectin-2'nin esas olarak epitel hücrelerinde AJ'de lokalize olduğu ve epitel hücreleri, endotel hücreleri, nöronlar ve fibroblastlar dahil olmak üzere çeşitli hücrelerde eksprese edildiği gösterilmiştir (22). Hücre adhezyon moleküllerinden biri olan Nectin-2, hücre aktivasyonu, migrasyonu, büyümesi, farklılaşması ve hatta hücre ölümü gibi birçok olayın düzenlenmesinde rol oynar.

Yapılan deneysel çalışmalarda Nectin-2 ekspresyonunun normal dokulara göre kanser dokularında daha yüksek olduğu gösterilmiştir. En fazla ekspresyonu Meme, endometriyal, akciğer ve over kanserlerinde görülmüştür (23). Literatüre bakıldığında, PVRIG reseptörü yeni bir T hücre immün kontrol noktası olarak tanımlanmaktadır. Ayrıca, PVRIG-Nectin-2 etkileşiminin antikor ile bloke edilmesinin, anti-tümör etkiyi arttırmak üzere PD-1 veya TIGIT blokajı ile birleştirilme potansiyeline sahip olduğu yapılan son çalışmalarla ortaya konulmaktadır. Bu bilgiler, kanser tedavisi için B7 ailesi kontrol noktalarına ek olarak PVRIG'i hedeflemenin yararını göstermektedir (24).

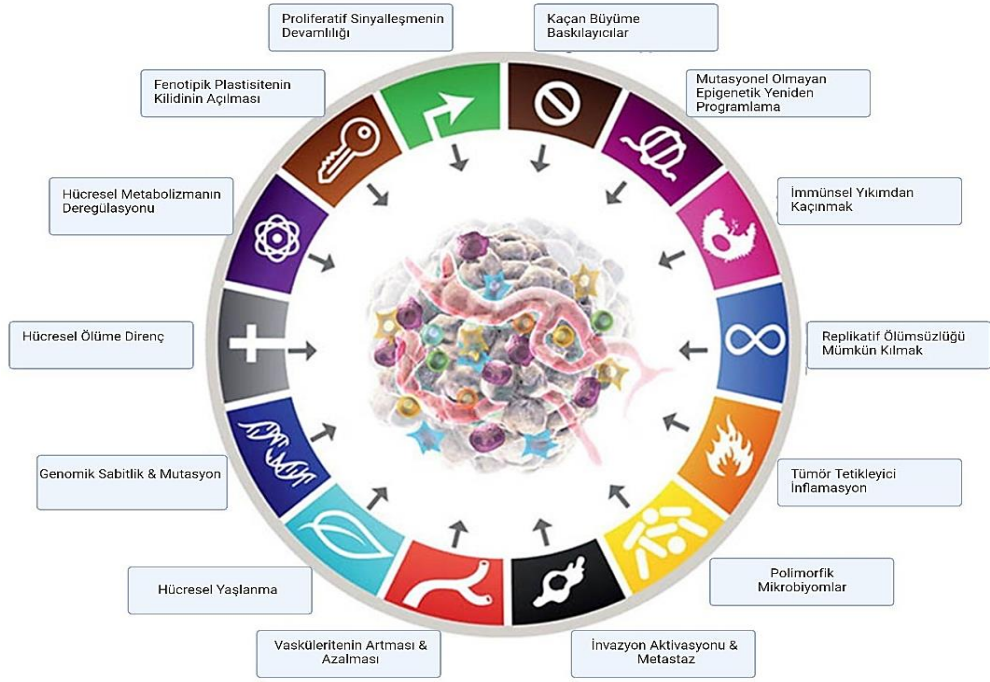
Son yıllarda kanser tedavisinin en başarılı yaklaşımlardan biri olan PD-1 veya CTLA-4'ün sinyal yollarının bloke edilmesinin klinik başarısının sınırlı kalması nedeniyle, diğer kontrol noktası sinyal yollarını hedefleyen ek immünoterapilere

ihtiyaç duyulmaktadır. Günümüzdeki çalışmalar daha çok PVR'nin kanser tedavisi üzerindeki etkisine odaklanırken, diğer ligand olan Nectin-2 üzerinde sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmanın amacı, pankreas kanseri hücre hattı ve pankreas kanseri dokularında Nectin-2 ligandı ile bunun reseptörleri olan TIGIT, DNAM-1 ve PVRIG moleküllerinin normal dokuya göre ekspresyon değişimlerini moleküler düzeyde göstermek ve ekspresyon düzeylerinin sitotoksik T lenfosit fonksiyonları üzerine etkisini araştırma ve bu moleküllerin klinikopatolojik bulgularla olan ilişkisini incelemektir. Ayrıca Nectin-2 molekülünün, pankreas hücre hatları ile yapılan çalışmalar sonucunda immün kontrol noktası ligandı olarak ne derece önemli olduğunu araştırmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser Biyogenezi

Kanser, hücre içerisinde çok sayıdaki moleküler değişim sonucunda normal hücreden farklı özellikler kazanan kontrolsüz bir hücre topluluğundan oluşmaktadır. Kanser hücrelerindeki bu değişimler, ölüme karşı direnç kazanmasını, çoğalmasını sağlayan sinyallerin artmasını, büyümesini baskı altında tutan sinyallerin azalmasını, sınırsız bölünme yeteneği kazanmasını hatta yeni damarların oluşumunu (*Anjiogenesis*) invazyon ve metastaz yapmasını sağlayarak immün sistemden kaçış yetenekleri kazandırmaktadır. 2000’li yıllarda D. Hannahan ve Weinberg tarafından tanımlanmış kanser ayırt edici özelliklere, geçen son yirmi yıl içinde bu mekanizmaların daha fazla anlaşılması ile hücresel plastisite ve özellikle polimorfik mikrobiyomların kanser fenotipleri üzerinde etkisinde bu özelliklere eklenmiştir (25). İnsan pankreas duktal adenokarsinomunda (PDAC) yapılan ilişkilendirme çalışmaları ve tümör taşıyan farelere fekal transplantlar yoluyla yapılan fonksiyonel testler, tümör mikrobiyomunda ve ilişkili bağırsak mikrobiyomunda bulunan çeşitliliğin immün fenotipi ve sağkalımı modüle ettiğini ortaya koymaktadır (26). Sonuç olarak kanser biyolojisi, genetiği ve patogenezi tanımlayan bu parametrelerin kanser araştırmalarında yeni deneysel çalışmaları teşvik edeceğini düşündürmektedir.

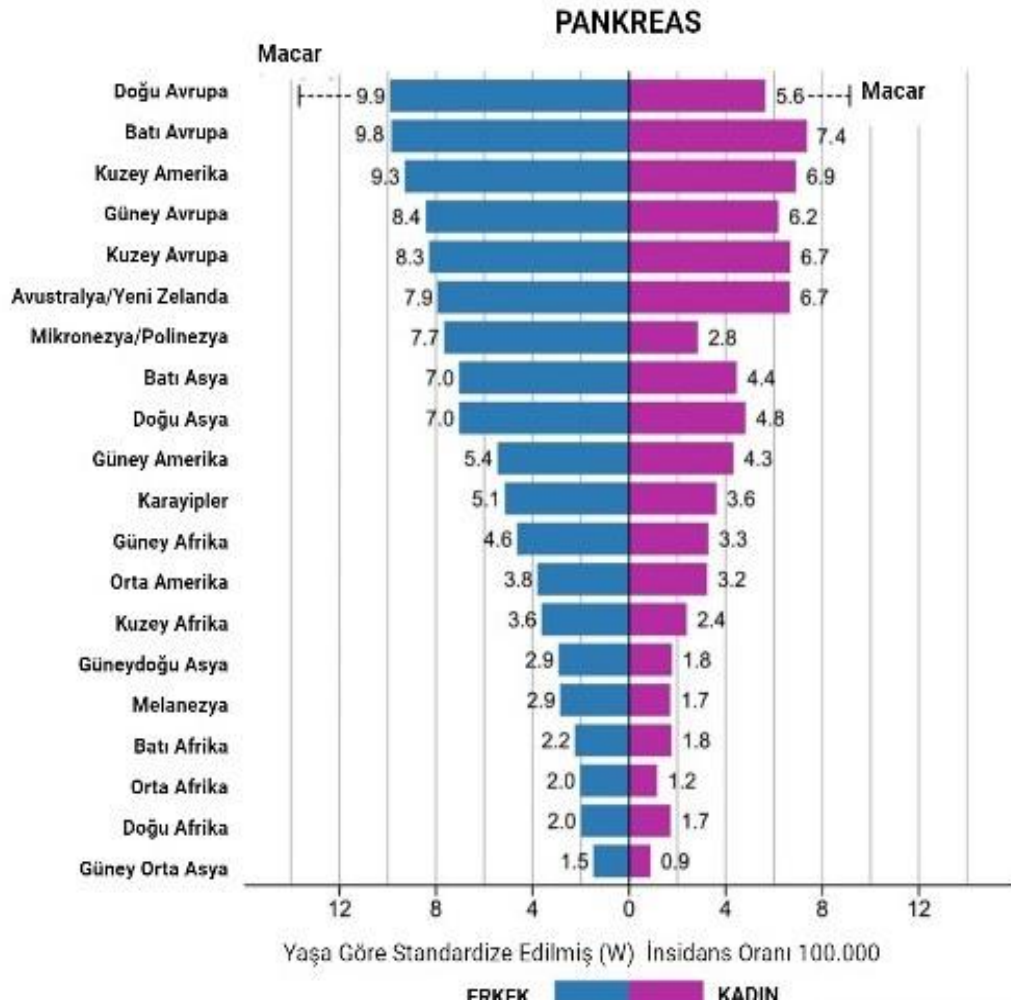


Şekil 2.1. Kanser hücrelerini tanımlayan özellikler (2022) Ref. 25'ten uyarlanmıştır.

2.2. Pankreas Kanseri

Pankreas, vücutta hayati önemi olan bir organdır. Pankreasta meydana gelecek en ufak bir hasarda bile tüm vücudumuzu etkileyebilecek durumlar meydana gelmektedir. Fonksiyonel olarak kan şekerini düzenleyen insülin ve glukagon hormonlarını salgılamasına yanında sindirim sistemi için gerekli çok sayıda enzimin yapımında da görev almaktadır.

Günümüzde dünyadaki ölüm nedenlerine bakıldığında, kanser kaynaklı ölüm oranları ilk sıralarda yer almaktadır. WHO GLOBOCAN 2020 yılı verilerine göre tüm dünyada kadın ve erkeklerde pankreas kanserinden kaynaklı ölüm oranıyla yedinci sırada yer almaktadır (1).



Şekil 2.2. 2020 yılında bölgelere özgü pankreas kanserinin cinsiyet ve yaşa göre görülme oranları.(GLOBOCAN 2020)(1).

Pankreas kanserinin 2030 yılına kadar akciğer kanserinden sonra onkolojik kaynaklı ölümlerin ikinci nedeni olacağı öngörülmektedir (27). Kanser tedavilerinde kaydedilen ilerlemeye rağmen, pankreas kanseri tanısı almış hastaların sağkalım oranı son on yılda neredeyse hiç değişmeden kalmıştır (28). Tüm solid malign tümörler arasında yaklaşık %10'luk 5 yıllık genel sağkalım (OS) oranı ile en kötü prognoza sahip olan bir kanser türüdür.

Pankreasta meydana gelen maligniteler ekzokrin veya nöroendokrin kaynaklıdır. Pankreatik duktal adenokarsinom (PDAC), % 90'dan fazla görülme

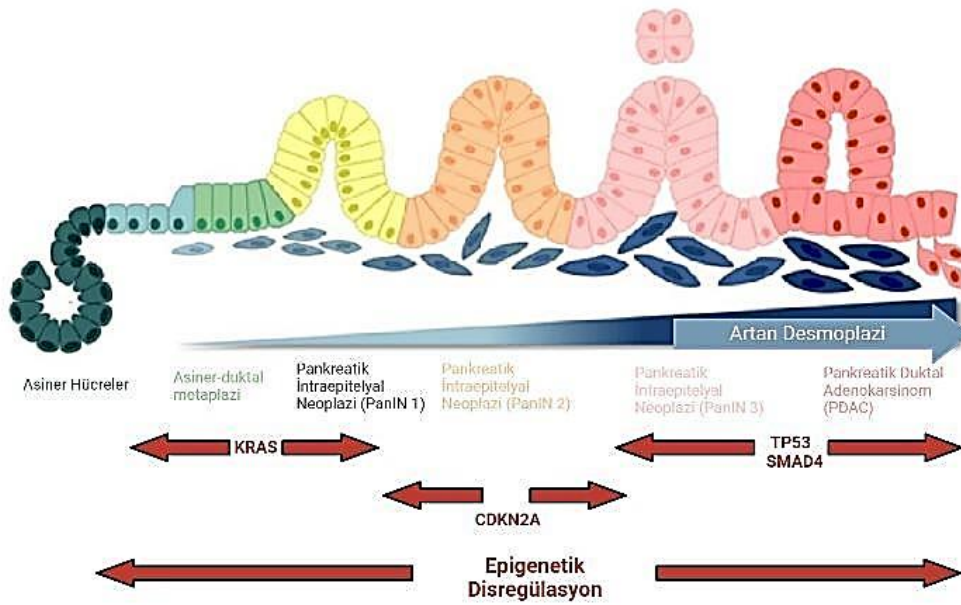
sıklığı ile pankreas maligniteleri arasında yer almaktadır. PDAC vakalarının yaklaşık %60-70'i pankreasın baş kısmından kaynaklanır ve bu tümörler genellikle pankreasın başı ile ortak safra kanalında bulunduğu için gövde ve kuyruk kısmından kaynaklanan tümörlerden daha erken teşhis edilebilmektedir(29). Pankreas malignitelerinde gövde ve kuyruk kısmından kaynaklanan tümörler, kötü prognozla ilişkilendirilmektedir(30). Pankreas kanseri, bu kadar kötü bir prognoza sahip olmasının nedeni erken evrede herhangi bir belirti göstermemesi ve tanının ancak ileri evrelerde ve genellikle metastaz yaptığında konulabilmesidir. Bu da hastaların tedavi şansını oldukça sınırlamaktadır. Dolayısıyla tek başına cerrahi yöntemlerle ya da klasik kemoterapi yöntemleri ile tedavi edilmesi oldukça güçtür(31). En iyi tedavi seçeneği olarak cerrahi rezeksiyon görülmekle birlikte hastaların ancak %10-20 kadarı ameliyat olabilmektedir, hastaların birçoğunda ise hastalık nüks etmekte olup metastazlar nedeniyle sağkalım azalmaktadır (32).

Pankreas kanserinin nedeni tam olarak bilinmemekle birlikte çeşitli genetik mutasyonlar ve çeşitli çevresel faktörler pankreas kanserinin oluşmasına neden olmaktadır. Çevresel faktörler arasında bulunan sigara kullanımının, pankreas kanserini yaklaşık %75 oranında arttırdığı bildirilmiştir (33). Alkol tüketimi ve obezite diğer risk faktörleri arasında yer alırlar. Ayrıca pankreas kanseri hastalarının %60-80'inde diyabet bulunmaktadır (34).

2.2.1. Pankreas Prekanseröz Lezyonlar

PDAC'lar arasında en sık görülen duktal tiptir. Bununla birlikte asiner hücreli karsinomlar, ampüller tümörler, endokrin tümörler, kist adenokarsinomlar, intraduktal papiller müsinöz neoplazmlerde nadir olarak görülmektedir (35). Yapılan genetik araştırmalar, pankreatik duktal adenokarsinomların morfolojik yönden öncü lezyonlarının tanımlanmasına yardımcı olmuştur. Pankreasta en sık prekanseröz epitelyal lezyonlar görülmekle birlikte pankreatik intraepitelyal neoplazi (PanIN), intraduktal papiller müsinöz neoplazm (IPMN), müsinöz kistik neoplazm (MCN)'lar da oluşturmaktadır (36).

Günümüzde pankreatik duktal adenokarsinomun gelişimi, kolorektal karsinomlarda olduğu gibi, basamaklı tümör gelişim modeli şeklinde olduğu kabul görmektedir. Bu modelde birbirini takip eden preinvaziv evreler oldukça iyi tanımlanmıştır ve morfolojik olarak birbirlerinden farklıdır (37). Prekanseroz lezyonlar arasında en yaygın olarak PanIN'ler karşımıza çıkmaktadır. Kadın ve erkeklerde görülme sıklığı birbirine eşittir.



Şekil 2.3. PDAC'lerin oluşum sırasında görülen mutasyonlar. Ref.38'den uyarlanmıştır.

PanIN'lerin PanIN-1A/B, PanIN-2 ve PanIN-3 şeklinde üç evresi bulunmaktadır. Bu evreler hücresel displazi derecelerine göre belirlenmektedir. PanIN-1A/B ve PanIN-2 düşük dereceli, PanIN-3 ise yüksek dereceli PanIN'ler olarak nitelendirilirler (39).

PanIN-1A uzun kolumnar hücrelerden oluşan yassı bir lezyondur, hücrelerdeki nukleuslar yuvarlak ya da ovalimsi olup bazalde yerleşik şekilde yer alırken, içeriğinde

bol miktarda müsin bulunmaktadır. PanIN-1B'ler papiller, mikropapiller veya bazalde yalancı çok katlı epitelden oluşan bir yapı Şeklinde izlenmektedir. Bununla beraber PanIN-1A ile aynı özellikleri göstermektedirler (36).

PanIN-2 lezyonlar, papiller Şekilde olup nükleer atipi nitelikleri ile bilinirler. Bu atipiler içinde nukleus boyutunun artışı, artan kromatinleŐme ve polarite kaybı bulunmaktadır (40).

PanIN-3 lezyonlar ise genellikle papiller veya mikropapiller yapıdadırlar. Bu lezyonlar ciddi anlamda hüresel ve yapısal atipik özellikler içermektedirler ki bunlar invaziv karsinoma ait pek çok karakter taşımaktadırlar. Bunların başında yapısal olarak papiller, mikropapiller veya kribriform Şekli, pleomorfik nukleuslu, nukleusta polarite kaybı, nükleer hiperkromatizm ve nadirde olsa mitozlar ve bazen nekrotik alanlar bulunmaktadır. Epitelyal h relerin içerisinde tomurcuklanmaya benzer yapılar görülebilmektedir. Bu nedenle PanIN-3 lezyonların tamamı invaziv duktal adenokarsinomlar ile ilişkili gösterilmektedir (41).

PanIN 1A/1B, PanIN-2 ve PanIN-3'  n her biri, belirli hedef genleri ve genetik yolları etkileyen çeşitli mutasyonlarla karakterize edilmiş çoklu moleküler süreçlerle tanımlanabilmektedirler. PDAC'larda hemen hemen tüm genetik deŐiŐiklikler duktus lezyonlarında görülmüştür. Duktus lezyonlarında hüresel atipi derecesi arttıkça genetik deŐiŐimlerde artmaktadır (40).

2.2.2. Pankreas Prekanseroz Lezyonların Karsinogenezi

Pankreas karsinogenezinde erken evrede genomik kararsızlıŐa yol açan nedenin telomerlerin erezyonu sonucu ile baŐlayan telomerik kriz olduğu düşünülmektedir. Bu durum PanIN 1A lezyonlarının %90'ından fazlasında, tüm PanIN lezyonlarının ise %95'inden fazlasında görülür(37). Pankreas kanserlerinde tümör baskılayıcı genler inaktive olurken onkogenler aktive olmaktadır. Bunun nedeni olarak, kısalan telomerli h relerin bölünürken normal olmayan bir ayrıŐma sonucunda oluşan yeni yavru h relerin bazılarında bu genetik materyalin

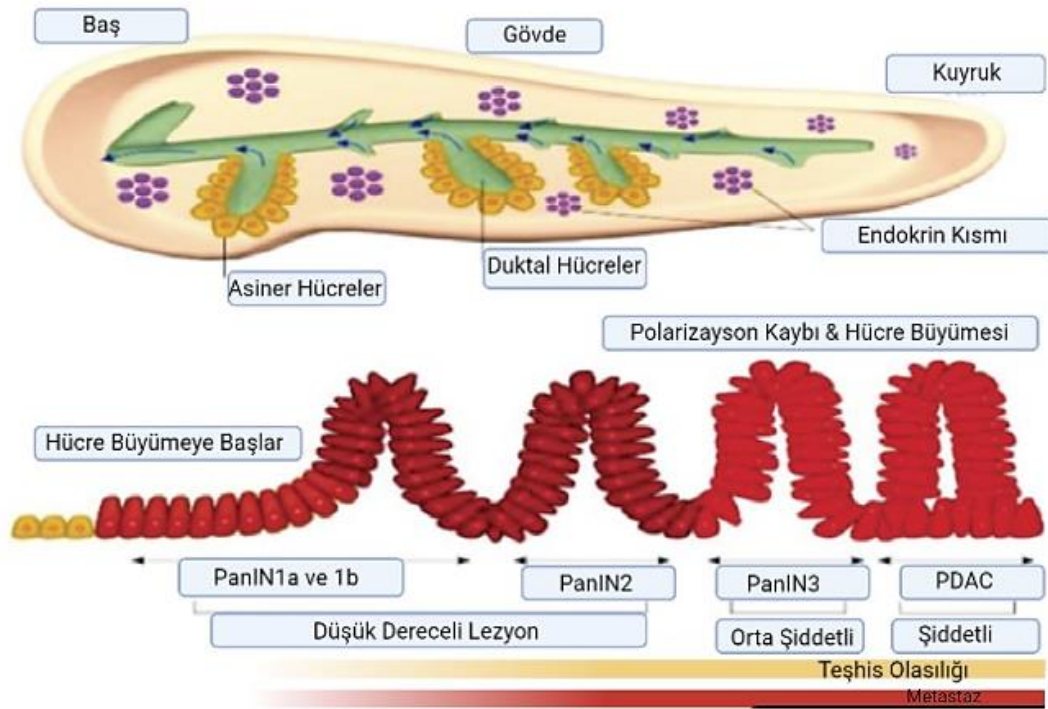
eksikliğinden ileri geldiğine inanılmaktadır (42). Onkogenler, mutasyonlar veya gen amplifikasyonu gibi çeşitli mekanizmalarla aktive olup, büyümeyi uyaran genlerden oluşmaktadır. Tümör dokularında baskın olarak etkilerini göstermektedirler (36).

K-ras onkogeni, 1988 yılında bilinen tek anlamlı genetik değişikliğe sahip onkogen olarak ortaya çıkmıştır (43). Bu onkogen hücre siklusunun progresyonundan sorumludur (36). K-ras onkogenindeki nokta mutasyonlarından en sık K-ras geninin ekson 2'si ile kodon 12 ve 13'te görülmektedir (41). K-ras2 mutasyonları, pankreas karsinogenezinde izlenmiş en erken genetik değişikliklerdir. K-ras2 mutasyonları PanIN 1A/B'in %10 ila %30'unda, PanIN-2'nin %45'inde ve PanIN-3 lezyonlarının %85'inde görülmektedir (44). Benzer şekilde, Her-2/neu onkogeninin ise nadir olarak hem sitolojik hem de yapısal anlamda atipik hücrelerle pankreasın tüm duktal lezyonlarında anlamlı şekilde arttığı bildirilmiştir. Bununla birlikte, duktus lezyonlarındaki atipi derecesi arttığında K-ras mutasyonunun da görülme sıklığının arttığı gösterilmiştir. Dolayısıyla K-ras ve Her-2/neu'deki bu değişiklikler minimal atipili pankreatik duktus lezyonlarda görülür ve pankreatik neoplazi gelişiminde “erken” bir genetik olayın meydana geldiğini düşündürmektedir (43).

Onkogenlerin aksine tümör baskılayıcı genler, inaktif olduklarında tümör gelişimini desteklemektedir. Dolayısıyla tümör dokularında çekinik olarak etki göstermektedirler. Tümör baskılayıcı genler, bir allelin baskılayıcı mutasyona sahip olduğu ve diğerinin bulunmadığı homozigot delesyonlar veya promotor metilasyonu yolu ile epigenetik gen susturma ile inaktive edilirler. Bu genlerin inaktivasyonları sonucu kromozom instabilitesine neden olan üç tümör baskılayıcı gen bulunmaktadır.

Pankreas kanserinin gelişiminde rol oynayan tümör baskılayıcı genler arasında p16/CDKN2A/INK4A, tümör proteini 53 (TP53) ve 4 genden oluşan SMAD ailesi (SMAD4/DPC4/MADH4) bulunmaktadır (36, 37, 41). Bunlardan p16(*CDKN2a/INK4a*) geni, hücre döngüsü kontrolünün p16/siklin bağımlı kinaz/retinoblastoma aşamasında yer alan önemli bir tümör baskılayıcı gen olarak bilinmektedir. P16 proteini, yolun negatif düzenleyicisi olarak kabul edilmektedir (45). P16 geninde oluşan ekspresyon kaybının görülme sıklığı displazi derecesi

arttıkça artmaktadır. Pankreatik adenomkansinomların gelişiminde P16 genindeki delesyonun TP53 ve SMAD ailesinden DPC4'ün inaktive olmasından önce gerçekleştiği ve kötü prognozla ilişkili olduğu düşünülmektedir (45). TP53 geninin fonksiyon kaybı pankreatik adenokarsinomların yaklaşık %50-75'inde görülmektedir. TP53 gen mutasyonlarının daha çok pankreas karsinogenezinin PanIN-3 evresinde meydana geldiği belirtilmektedir (37). SMAD4 genindeki fonksiyon kaybı daha çok yüksek dereceli lezyonlarda görülmekte olup bu durumun pankreas kanser gelişiminin geç evresinde olduğu bildirilmiştir (45). PanIN gelişim modeli tümör gelişimi aşamalarında sırasıyla K-ras, P16/CDKN2A, TP53 ve SMAD4/DPC4 genlerinde ek mutasyonların oluşması ile şekillenmektedir (46) (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. PanIN gelişim modeli. Ref. 46'dan uyarlanmıştır.

Bir diğer prekanseröz lezyon olan intrapapiller müsinöz neoplazmlar (IPMN)'ler pankreasın en sık görülen müsin üreten kistik tümördür. Kadınlara

nazaran erkeklerde görülme sıklığı daha fazla olup ortalama olarak görülme yaşları 60-70'tir. Bu lezyonların, yaklaşık olarak %80'i pankreasın baş kısmında görülür (36). İlginçtir ki IPMN'lerin şeker hastalığı arasında anlamlı bir ilişki saptanmış ve IPMN hastalarının %10-45 'inde ilaveten şeker hastalığı da olduğu da görülmüştür (47). Yapılan çalışmalarda IPMN'lerde çok çeşitli moleküler değişiklik gösterilmiştir. Özellikle PanIN lezyonlar için görülen K-ras, p16/CDKN2A, SMAD4 ve TP53 gen değişikliklerinin yanında PIK3CA (*phosphoinositide-3-kinase, catalytic, alpha*) ve BRAF (*v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1*) gen mutasyonları da görülmektedir(41). Araştırmalara göre, IPMN lezyonlarını oluşturan hücrelerde displazi arttıkça K-ras gen mutasyonunun görülme sıklığı da artmaktadır (48). Bununla birlikte IPMN'lerin %95'in üzerinde ya bir GNAS kompleks lokusuna (GNAS) ya da bir K-ras mutasyonuna sahip olduğu ve GNAS mutasyonlarının IPMN lezyonlarına özgü olduğu bildirilmiştir (41). Tüm bu mutasyonların çoğu IPMN'lerin yüksek dereceli lezyonlarında görülmektedir (47).

Müsinöz kistik neoplazmlar (*mucinous cystic neoplasm, MCN*) pankreasın çok nadir görülen kanser öncüsü lezyonlarından. Bu lezyonların neredeyse tamamı kadın hastalarda görülmekte olup ortalama olarak 40- 50 yaşlarda tanı almaktadırlar. Lezyonlar sıklıkla pankreasın gövde ve kuyruk kısmında oluşmaktadır(36). K-ras mutasyonu düşük dereceli displazili MCN'lerde görülmekle birlikte ilerlemiş vakalarda bu mutasyonun görülme sıklığı artmaktadır. TP53, p16 ve SMAD4/DPC4 daha çok yüksek dereceli displazi ve invaziv karsinomlarda gözlenmektedir. Bunların dışında MCN'lerin GNAS mutasyonu içermemesi IPMN'den ayıran önemli bir ayırıcı belirteç olmaktadır (41).

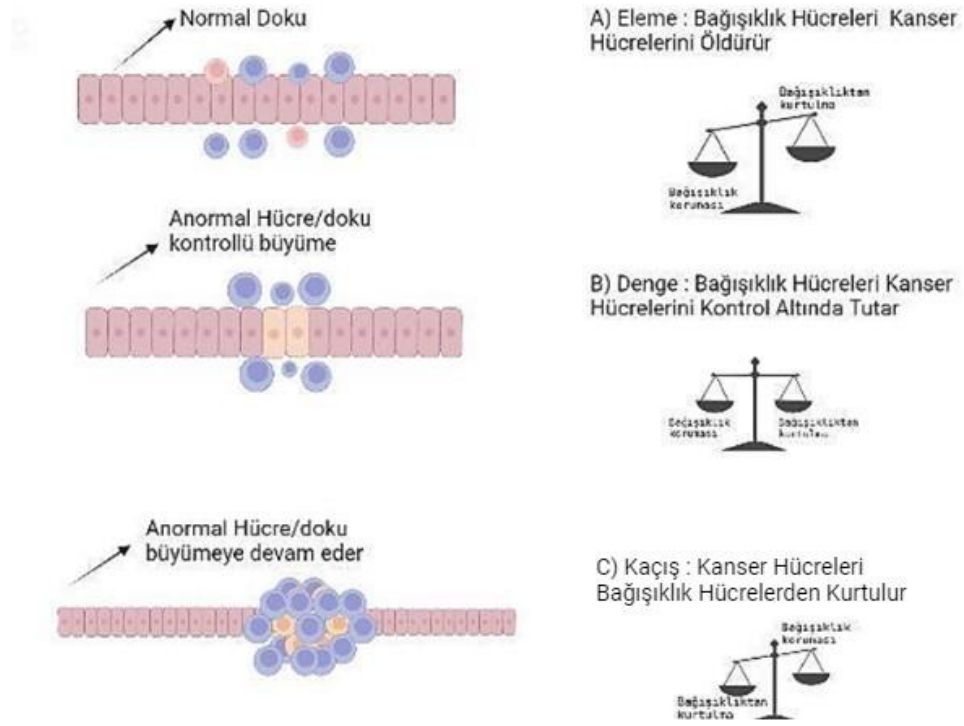
2.3. Pankreas Kanserinin Tanı ve Tedavisi

Pankreas kanseri hastalarında genellikle yorgunluk, kilo kaybı, iştahsızlık, sarılık, bulantı ve karın ağrısı gibi semptomlar görülmektedir. Ancak bu semptomların erken evrede görülmemesi sebebiyle hastaların ileri evrede tanı almasına neden olmaktadır. Bu durum pankreas kanserlerinin en sık ölümcül kanserler arasında olmasının en büyük nedenidir. PDAC tedavisinin etkinliği ve sonucu, büyük ölçüde

tanı anındaki hastalığın evresi ile belirlenir. Hastalığın hızlı ilerlemesi, geç tanı konulması ve sistemsal tedavi yöntemlerinin kısıtlılığı hastanın sağkalım sürecini olumsuz yönde etkilemektedir. Cerrahi yöntemler günümüzde halen tek tedavi seçeneği gibi görünse de PDAC'ın çok sessiz bir şekilde ilerleyişi nedeniyle ancak hastaların %15-20 kadarı bu işlemde fayda görebilmektedir. Sonuç olarak bu hastalarda hastalık tekrardan nüks etmekte ve metastaza bağlı ölümler gerçekleşmektedir(32). Bu nedenle hastalığın etkin bir şekilde tedavisi için yeni ilaçlara ve stratejik tedavi yöntemlerine ek olarak erken tanı için pankreas kanserine özel spesifik biyobelirteçlere duyulan ihtiyaç giderek önemini arttırmaktadır. PDAC'ın en belirgin özelliği ise neredeyse her türlü tedaviye karşı yüksek derecede direnç göstermesidir. Dolayısıyla yapılacak olan çalışmalarda ilk hedef bu direncin üstesinden gelebilmek için alternatif yollar bulabilmektir. Çeşitli kombine kemoterapiler geliştirilmesine rağmen PDAC'lı hastaların sağkalım oranlarında yeterli uzama elde edilememektedir. Bu nedenle PDAC için daha yüksek özgüllüğe sahip tümör odaklı biyolojik hedeflere daha çok ihtiyaç duyulmaktadır.

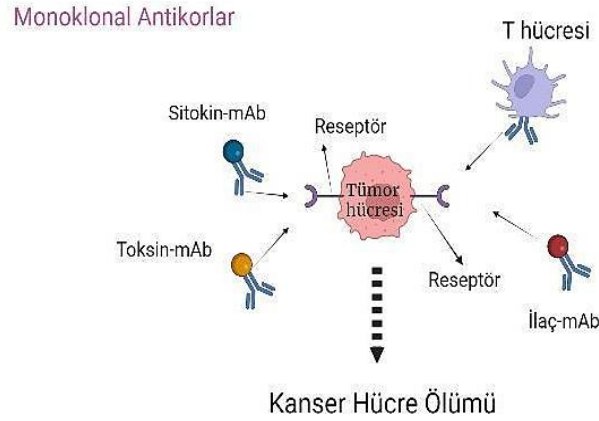
2.4. Pankreas Kanserine İmmünoterapötik Yaklaşım

İmmün sistem, etrafımızda sayılamayacak kadar çok sayıda saldırmak için bekleyen mikroorganizmalara karşı onları tanıyan ve etkisiz hale getiren bir savunma sistemidir. İmmün sistemin iki temel görevi vardır; vücudumuz yabancı patojenlere karşı korumak ve aynı zamanda ölmüş ya da anormal hücreleri yok etmektir. İmmün sistem kendiliğinden gelişen tümörlerin ilerlemesini ve baskılanmasını esas alan bağışıklık ile kanser arasındaki ilişkinin temelini oluşturmaktadır. Kanserin en temel özelliği arasında immün sistemden kaçarak görünmez olması yer almaktadır. Kanseri hücreleri de aslında kendimize ait hücrelerden köken aldığı için, bazen savunma hücrelerinden olan T ve B lenfositler tarafından tam bir yabancı olarak tanınmaları mümkün olamamaktadır. Bu nedenle kanser hücrelerinin bağışıklık hücreleri tarafından tanınmasının sağlanması ve sinyal iletim yollarının daha iyi anlaşılacak şekilde immünoterapi ile tümöre karşı immün yanıtın güçlendirilmesi araştırmalarda hedeflenmektedir (şekil 2.5).



Şekil 2.5. İmmün sistem ve kanser gelişimi arasındaki ilişki. Ref. 49'dan uyarlanmıştır.

Kanserde immünoterapi denince aklımıza ilk gelenlerden biri immün kontrol noktası düzenleyicileridir. İmmün kontrol noktası inhibitörlerinin keşfi kanser tedavisinde yeni bir umut olmuştur ve bu nedenle immünoterapi, artık kanser tedavisinin dördüncü ayağı olarak adlandırılmaktadır. Bu tedavilerdeki amaç; immün sistemin kanserle mücadele edebilmesi için onu tetikleyerek yeniden güçlendirmektir. Neredeyse bir asıra yakın zamandır kanser tedavisi üzerine yapılan çalışmalar kanser hücrelerini direkt hedef alan öldürücü yöntemler üzerine olmuştur. Bu tedavi şeklinde kullanılan ilaçlar klasik kemoterapi ilaçlarından farklı bir mantık ile çalışmaktadırlar. Hedef, sağlıklı olan hücrelerden ziyade kanserli olan hücelere odaklanmaktadır. Klasik kemoterapi ilaçları hem toksik etki yaratmakta hem de sağlıklı hücelere de zarar vermektedir. Hedefe yönelik ilaçlar ise sadece kanser hücelerine yönelerek onların kendilerine benzer şekilde çoğalmalarını önleyerek etki etmektedir.



Şekil 2.6. Monoklonal antikorlar ile kanser hücresinin yok edilmesi. Ref. 50'den uyarlanmıştır.

Günümüzde anti-CTLA-4, anti-PD-1 ve anti-PD-L1 antikorları başta küçük hücre dışı akciğer kanserlerinde olmak üzere malign melanomlu hastalarda öncül CD8⁺ T hücrelerin rolünü ortaya koyarken, renal hücreli kanserlerde T hücre gelişimini indükleyen immünoterapi ajanları olarak kullanılmaktadır (5). Bu kontrol noktası inhibitörler, küçük hücre dışı akciğer kanseri, malign melanom ve renal hücreli kanserlerde etkili kullanılmasına rağmen pankreas kanserinde istenen başarıya ulaşamamıştır. Yapılan çalışmalar, PDAC'ın çeşitli mutasyonel değişimler ile primer tümör içinde bile heterojenliğe sahip olduğunu göstermektedir. Bunun sonucunda, hastalığın tedavisine karşı gelişen direnç mekanizmasını oluşturan genetik kararsızlığın etkisi ortaya çıkmaktadır. Dolayısıyla tedavi için sayısız zorluklar ile karşı karşıya kalınmaktadır. Ayrıca PDAC mikro çevresinin tümör büyümesini ve metastazı desteklediğini ve ilaç dağılımında fiziksel bir bariyer oluşturduğu bazı çalışmalarda ortaya konulmuştur (51). Bu konuyla ilgili yapılan birçok çalışmada PDAC mikroçevresini, TME) oluşturan bileşenlerin kötü prognozla ilişkili olduğu ve tedavi zorluğunun temel nedeni olabileceği belirtilmiştir.

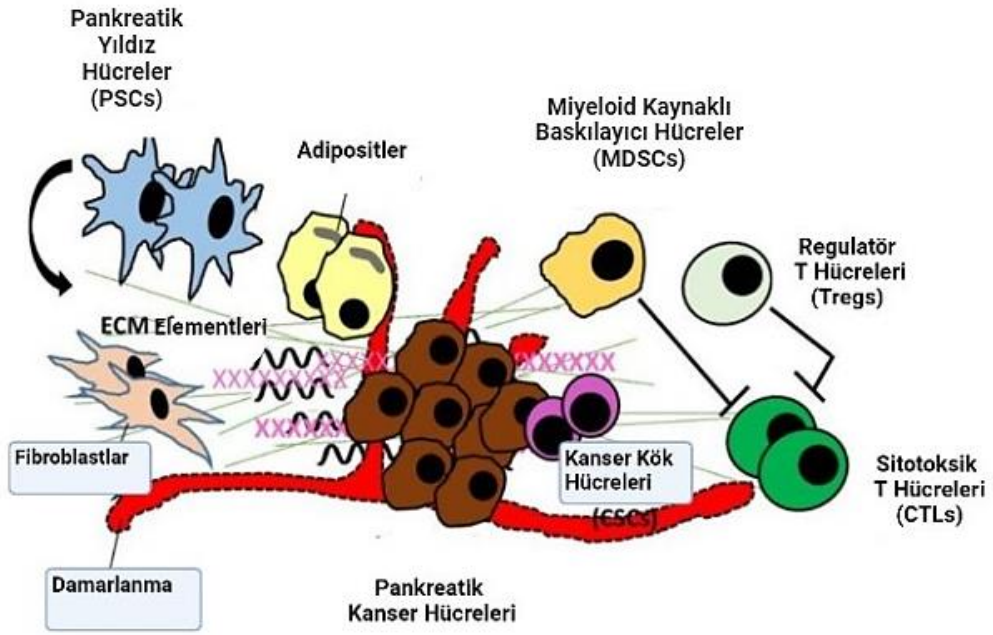
PDAC'a ait stromal yapı, pankreas kanseri hücrelerinin gelişebileceği ve kolayca metastaz yapabileceği bir mikroçevre yaratmaktadır (52). Stroma, bir organ

yüzeyinin hemen altında bulunan bir bağ dokusudur ve organın diğer kısımlarını bir arada tutmaya yardımcı iskelet görevi görmektedir. Stromada fibroblast adı verilen dokuya şekil ve dayanıklılık sağlayan hücreler yer almaktadır. Bu yapının içerisinde ayrıca besin ve oksijen taşıyan kan damarları ile fazla sıvıyı uzaklaştıran lenfatik kanallar bulunmaktadır. Stromanın görünümü, yaralanma veya kansere yanıt olarak değişim göstermektedir. Patolojik olarak bu görünüm desmoplazi olarak adlandırılır. TME yoğun bir desmoplastik alan içermesinden dolayı stroma içerisinde damarların az olmasına, immün sistem hücrelerinin infiltrasyonunun değişmesine, hipoksik ortamın artmasına, tümör boyutunun artışının desteklenmesine ve etkin ilaç tedavisinin engellenmesine neden olmaktadır (53).

Tümörlere karşı en önemli immün savunma sistemlerinden birisi de CD8⁺ T hücreleri ile NK hücrelerin aracılık ettiği hücresel sitotoksitedir. Bu süreç içerisinde, T ve NK hücrelerinin aktivasyonu ve inhibisyonu, bu bağışıklık hücreleri üzerinde ifade edilen uyarıcı ve engelleyici reseptörler ile tümör hücreleri üzerinde ifade edilen aynı kökenli ligandları arasındaki etkileşime bağlı olmaktadır. Bu etkileşimlerle, uygun bağışıklık fonksiyonu için gerekli olan aktivasyon ve inhibisyon arasında hassas bir dengenin oluşması sağlanmaktadır. Eğer yeterli aktivasyon sağlanamaz ise, tümörlere karşı bağışıklık tepkisi yeterli olmayacak ve tümör hücresinin hayatta kalmasına neden olacaktır. Diğer taraftan, immün sistem hücreleri, diğer hücreleri tanımda özgün değilse ya da her zaman aktif durumdadır ise, o zaman da bağışıklık sisteminin hiper aktivasyonu ve otoimmünite ile sonuçlanması kaçınılmaz olacaktır (54).

2.5. Tümör İnfiltrat Edici Lenfositler (TIL)

Tümör infiltrat edici lenfositler, tümör mikroçevresinin önemli bileşenlerinden biridir. Tümörün ilerlemesine karşı immün yanıtı ifade etmektedirler (55).

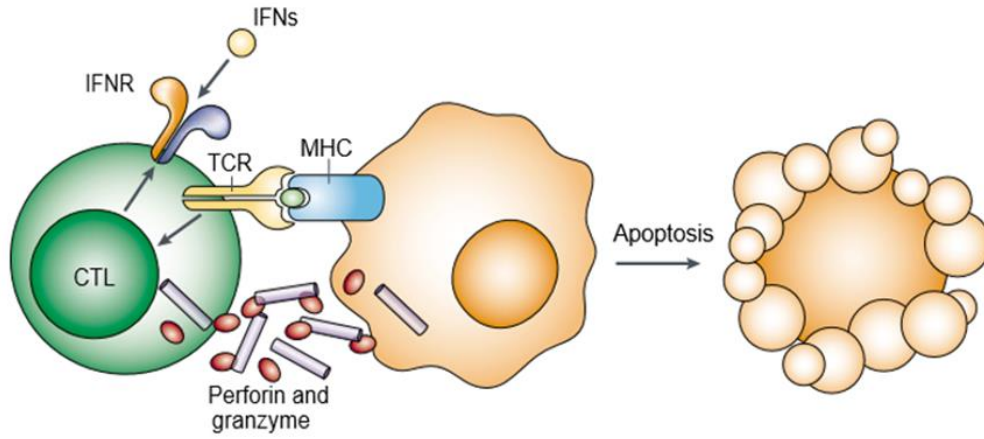


Şekil. 2.7. Pankreas kanserinde tümör mikroçevresi. Ref. 53'den uyarlanmıştır.

1980'lerin sonlarında araştırmalarda, tümör infiltre edici lenfositlerin özel bağışıklık hücreleri olduğu ve tümör büyümesini engelleme konusunda daha iyi bir yeteneğe sahip oldukları ortaya çıkmıştır. TIL'lerin alt tipleri içerisinde $CD4^+$ ve $CD8^+$ T hücreler, B hücreler, NK ve Treg'ler yer almaktadır. Bununla beraber, TIL 'lerin büyük bir bölümünü tümöre spesifik T hücrelerden $CD8^+$ CTL'ler ve $CD4^+$ T yardımcı (*Thelper*, Th) hücrelerinden oluştuğu gösterilmiştir (56). TIL'ler ile ilgili yapılan çalışmaların başında tümörün ya da TME'de bulunan TIL'lerden kaynaklı inflamasyon ile kanserin oluşumuna katkı sağladığı düşünülmüş daha sonra bu TIL'lerin kanser oluşumunu hazırlayan bir çevre mi yarattıkları yoksa tümör oluşumuna karşı tepkisel bir cevap olarak mı buldukları tartışma konusu olmuştur (56). Çalışmaların devamında ise tümör mikroçevresinde sitotoksik T hücrelerinin varlığı, kanser hastalarında sıklıkla iyi prognoz ile ilişkilendirilmiştir (57). Dolayısıyla immünoterapik tedavilerin temelini oluşturan hücrelerin başında TIL'ler yer almaktadır. TIL içerisinde yer alan ve tümör hücrelerini öldürme kapasitesi yüksek olan CTL popülasyonları TIL bazlı kişiselleştirilmiş tedavilerin özgülüğünü ve sitotoksitesini arttırmada önemli bir potansiyel güç oluşturmaktadır.

2.5.1. Sitotoksik T Lenfositler (CTL)

Sitotoksik T lenfositler, tümör hücreleri ve virüsler gibi hücre içi enfeksiyonlara cevap veren T hücrelerinin önemli bir alt kümesini oluşturmaktadır. Bu hücreler yüzeylelerinde CD8 belirteci taşırlar (CD8⁺ T lenfositler) ve enfekte olmuş hücreleri doğrudan öldüren sitotoksik özellik gösterirler. CD8⁺ T lenfositler, antijenleri majör doku uygunluk kompleksi (MHC) sınıf I (insan lökosit antijeni [HLA] A, B, C) tarafından sunulan 8 ila 10 aminoasit uzunluğundaki polipeptidlerden oluşan antijen epitoplarını tanıyabilmektedirler. MHC sınıf I proteinleri temel olarak tüm çekirdekli hücrelerde eksprese edilirler. CD4⁺ T hücrelerin çok az bir kısmında CTL'lerin içerisinde yer almaktadır. Bunlar, MHC sınıf II molekülleri tarafından sunulan antijenleri tanımaktadırlar. CTL'ler, tümör hücrelerini doğrudan ve dolaylı olarak öldürebilirler. Tümör antijenlerini doğrudan tanıyabilirler, litik mekanizmasıyla perforin ve granzim gibi proteinler salgırlar ve tümör hücresi ölümüne neden olurlar. Aktif CTL'ler litik granüller adı verilen birçok hücre içi granül taşırlar. Hedef hücrelerin tanınması üzerine bu granüller polarize olur ve içeriklerini hedef hücreler ile CTL'ler arasındaki kontakt kurduğu alana boşaltırlar. İki hücre arasında kurulan bu kontakt bölgesi 'immünolojik temas' olarak adlandırılmaktadır. Litik granüller por oluşturan perforin ile granüllerle ilişkili enzimler olan granzimler içermektedirler (58).



Şekil 2.8. CTL'ler tarafından salgılanan Perforin ve Granzim B ile apoptozun gerçekleşmesi. Ref. 58'den uyarlanmıştır.

a) Perforin

CTL'ler ve NK hücreleri hedef hücreleri tanımada farklı mekanizmalar kullansa da, hedef hücreleri yok etmek için aynı lizis mekanizmasını kullanmaktadırlar. Buradaki anahtar protein olan perforin por oluşturuucu monomerik bir proteindir. Perforin, kompleman bileşenlerinden biri olan C9'a yapısal ve işlevsel olarak benzerlik göstermektedir. Perforin granüller içindeyken inaktif haldedir ancak ortamdaki Ca^{+2} iyonlarının varlığına yanıt olarak konformasyonel değişiklikler yoluyla aktif hale gelir. C9 gibi perforin de homopolimerler oluşturabilme yeteneğine sahiptirler. C9'un aksine, bir perforin zinciri Ca^{2+} varlığında işlenebilir ve doğrudan membran fosfolipitleriyle ilişkilendirilebilir (58).

b) Granzim

Litik granüller içeriğinde yer alan diğer bir molekül de granzimlerdir. Granzimler serin proteaz grubunda yer almaktadırlar. İmmün savunma hücreleri, hedef hücrenin içine girebilmek için ayrıca perforine ihtiyaç duymaktadırlar. Sitoplazmanın içine girdikleri zaman birçok substratı keserek apoptozu başlatırlar. Bu olay şu şekilde gerçekleşmektedir:

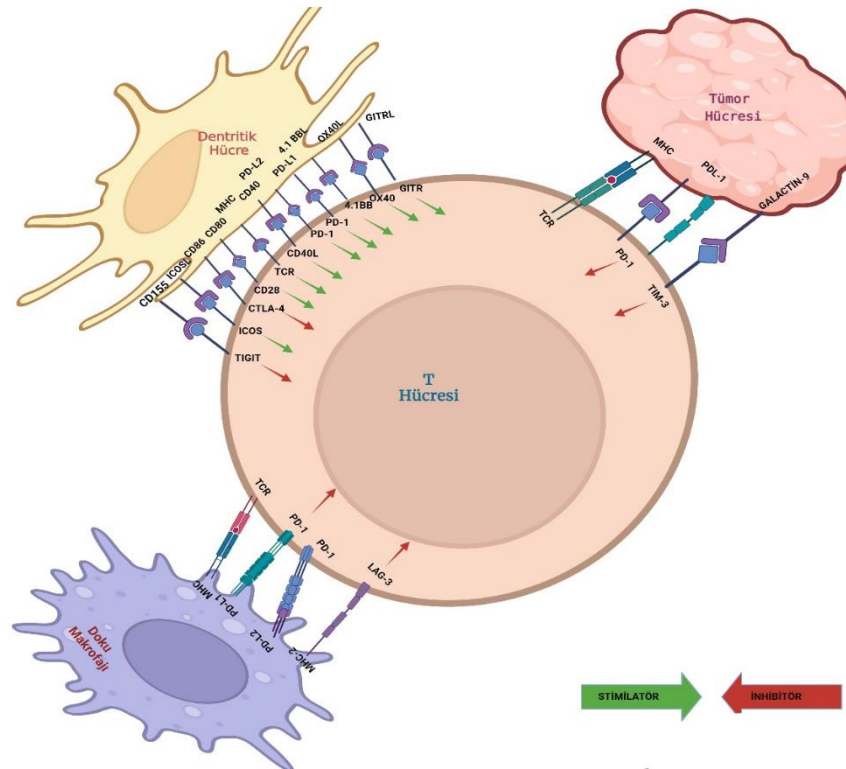
- Granzim B bazı prokaspazları keserek kaspaz 10, 3 ve 7'nin uyarımına yol açarak hedef hücrenin apoptoza girmesini tetiklemektedir.
- Granzim A ise kaspazlardan bağımsız bir mekanizma kullanır ve substratlardan birini katalize etmektedir. Bu substrat SET olarak adlandırılır. SET, endoplazmik retikuluma bağlı olan bir protein komplekstir ve DNaz'ları uyarmaktadır. DNaz'lar DNA moleküllerini keserek nükleer kırılmalara yol açarlar.
- Granzim C de kaspazlardan bağımsız olarak bir mekanizma ile apoptoza destek olmaktadır. Henüz bu mekanizma aydınlatılamamıştır.

CTL'ler, tümör hücresi apoptozunu indüklemek için Fas-FasL yolunu dolaylı olarak aktive edebilir.. Tümör nekroze faktör (TNF) reseptör grubundan moleküller aracılığıyla hedef hücrelere öldürücü sinyaller gönderebilmektedir. TNF reseptör grubundan bu moleküller arasında; Fas (CD95) ve TNF reseptörleri de yer almaktadır. Hem CD4 hem de CD8 T lenfositleri, Fas ligandını eksprese ederek hücre ölümünü başlatabilmektedirler. Fas ligandı TNF ailesinin bir üyesidir ve birçok hücrede bulunan CD95'e bağlanmaktadır. Çapraz bağlantılar Fas molekülünün trimerizasyonuna neden olmaktadır. Takiben Fas'ın sitoplazmik kuyruğunda yer alan ölüm döngüsüne FADD (*death domain*, DD) bağlanmaktadır. FADD daha sonra, kaspaz 8 ve 10'a bağlanarak kaspaz kaskadını aktive eder ve Ca²⁺'ye bağımlı apoptoz yoluyla hücre ölümüne yol açar (58). CTL'ler yalnızca hedef hücrelerde apoptozu indüklerler; komşu dokularda ki hücreler bu durumdan etkilenmez.

2.6. İmmün Hücrelerde Kontrol Noktası Molekülleri

İmmün kontrol noktası moleküllerinin immün yanıtların düzenli bir şekilde devamlılığını sağlamak için önemli rolleri bulunmaktadır. Bu moleküller özellikle T lenfositler üzerinde artan ekspresyonları ile efektör T lenfositlerin aktivasyonunu baskılamaktadırlar. İlk olarak ortaya çıkan kontrol noktası inhibitörlerinden olan PD-1/PD-L1 ve CTLA-4 moleküllerinin monoklonal antikorları ile kanser tedavisinde olumlu yanıt almada önemli katkıları olmuştur. Bu immunoterapiler sonrası bazı

hastalarda tedaviye direnç geliştiği gibi bazı kanser türleri için de mevcut inhibitörlerle beklenen klinik başarı elde edilememiştir. Dolayısıyla yeni immün kontrol noktası inhibitörlerini bulmaya yönelik çalışmalar artarak devam etmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda lenfosit aktivasyon geni 3 (*lymphocyte activation gene 3*, LAG3), T hücre immüoglobulin ve müsin alanı 3 (*T cell immunoglobulin and mucin domain 3*, TIM3), Ig ve immünoresptör tirozin bazlı inhibe edici motif alanları (*T cell immunoreceptor with Ig and immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif domains*, TIGIT), T hücresi aktivasyonunun V-domain immüoglobulin içeren baskılayıcısı (*V-domain immunoglobulin-containing suppressor of T cell activation*, VISTA) gibi immün kontrol noktası moleküllerinin hedeflenebilir bir biyobelirteç oldukları bulunmuştur. Bu moleküllerle ilgili prelinik araştırmalar ve deneylerde umut vaad eden sonuçlar elde edilmiştir (60).



Şekil.2.9. İmmün Kontrol Noktası Molekülleri. Ref. 61'den uyarlanmıştır.

Yaping Chen ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, fare modelinde TIGIT'i eksprese eden tümörde, TIGIT inhibitörlerine maruz bırakıldığında, bunun sağkalımı uzattığı ve tümörün ilerlemesini yavaşlattığı sonucuna ulaşmışlardır (62). TIGIT'i küçük hücre dışı akciğer kanseri dahil olmak üzere ileri evre solid tümörlerde ya tek bir monoklonal antikör olarak ya da diğer immün kontrol noktası molekülleriyle kombine antikörler olarak hedef alan çok sayıda klinik çalışma şu anda devam etmektedir(63). Pankreas kanserlerinde TIGIT ile yapılan çalışmaların çok kısıtlı olduğundan bizde bu molekülün pankreas kanserindeki önemini ortaya koymak için TIGIT ile çalışmaya karar verdik.

2.6.1. TIGIT Ailesi

a) TIGIT Molekülünün Yapısı ve Önemi

İlk defa 2009 yılında bir grup araştırmacı tarafından immünomodülatör reseptörler için spesifik alanları içeren proteinleri tanımlamayı amaçlayan genom düzeyinde yapılan analizler yoluyla keşfedilmiştir. TIGIT/WUCAM/Vstm3/VSIG9 molekülünün yapısında hücre dışında immüoglobulin değişken bölge, tip I transmembran bölgesi, hücre içi immünoresptör tirozin bazlı inhibisyon motifi (*immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*, ITIM) ve bir immüoglobulin tirozin kuyruğu (*immunoglobulin tail tyrosine*, ITT) benzeri motif yer almaktadır(64, 65, 66). Nectin ve nectin benzeri moleküller (Nec1s) ile etkileşime giren bir immüoglobulin süper ailesi reseptörlerden olan TIGIT ailesi reseptörleri içinde TIGIT, DNAM-1, CD96 ve PVRIG yer almaktadır. Bu reseptörler, yakın zamanda kanser tedavisinde immünoterapötik potansiyeli yüksek birer hedef olarak ortaya çıkmışlardır(67). TIGIT, fareler ve insanlarda bulunan NK hücreleri ile T hücrelerinden olan CD4⁺ T, CD8⁺ T hücreleri ve Tregler üzerinde ifade edilmektedir. Naif hücrelerde TIGIT ekspresyonu genellikle düşüktür ancak T ve NK hücrelerinin aktivasyonunun üzerine naif hücrelerde de TIGIT ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir(64). TIGIT'ın Nectin ve Necl ailesine ait olan CD155, CD112 ve CD113 ve Nectin-4 olmak üzere dört ligandı vardır. PVR esas olarak dendritik hücreler (DC'ler), T hücreleri, B hücreleri ve makrofajlar üzerinde, ayrıca böbrek, sinir sistemi

ve bağırsaklar gibi hematopoietik olmayan dokularda da eksprese edilir. Nectin ailesi üyelerinden Nectin-2, kemik iliği, böbrek, pankreas ve akciğer gibi hem hematopoietik hem de hematopoietik olmayan dokularda geniş bir ekspresyona sahiptir, ancak CD113'ün ekspresyonu, plasenta, testis, böbrek, karaciğer ve akciğer gibi hematopoietik olmayan dokularla sınırlıdır (68, 69, 70 71). Literatüre bakıldığında ilginç bir şekilde, PVR ve Nectin-2'nin birçok insan malign tümörlerinde aşırı eksprese edildiği gösterilmiştir. Ayrıca onkogen ekspresyonu veya interferon (IFN)- γ gibi sitokinlerinde bulunduğu birçok faktörün tümör hücreleri üzerinde PVR ve Nectin-2 ekspresyonlarının artmasına neden olduğu gösterilmiştir.

**b) DNAX Yardımcı Molekül-1 (*DNAX Accessory Molecule-1, DNAM-1*)/
CD226 Molekülünün Yapısı ve Önemi**

İmmünoglobulin süper ailesinin bir transmembran nectin benzeri glikoproteinidir. Başlangıçta NK hücreleri ve CD8⁺ T hücreleri tarafından sitotoksiteyi ve sitokin salgılanmasını destekleyen bir molekül olarak tanımlanmıştır (76). Daha sonraları yapılan çalışmalarda, DNAM-1'in melanom, rabdomyosarkom ve Ewing sarkom hücreleri gibi tümör hücrelerinin NK hücre aracılı hücre ölümleri için önemli olduğu ortaya konulmuştur (77, 78, 79). NK hücreleri, sitotoksik T hücreler ve monositler ile küçük bir kısım B hücresi tarafından eksprese edilen aktive edici bir reseptör olarak görev görmektedir(80). Ligandları ise yine nectin ailesi üyelerinden olan Nectin2 ve PVR'dir. Bununla birlikte, DNAM-1-Nectin2/PVR eksenini, tümör hücrelerinin NK hücre aracılı öldürülmesinde önemli bir kilit rolü bulunmaktadır. Ayrıca bu eksenin, miyeloid hücrelerde migrasyonu etkilediği de bildirilmiştir (81). Ig süper ailesinin bir parçası olmasına rağmen, DNAM-1 diğer reseptörlerden oldukça farklıdır. Bu farklılık, özellikle diğer Ig süper ailesi üyeleriyle çok az homoloji paylaşması ya da hiç olmayan sitoplazmik alanda kendini göstermesidir (82). DNAM-1 ayrıca liganda bağlanması için kostimülatör reseptörlerden özellikle TIGIT ile doğrudan rekabet edecek şekilde hareket edebilmektedir. PVR'nin DNAM-1'e bağlanması, proinflamatuvar sitokinlerin salınımını ve T hücreleri ile NK hücrelerinin sitotoksitesini artırırken, TIGIT'e bağlanmasıyla anti-inflamatuvar, proliferatif ve sitotoksik olmayan bir profili indüklediği gösterilmiştir (83, 84). NK hücrelerinde

DNAM-1'in ekspresyonu üzerine yapılan çalışmalarda, bunun tümör hücreleri üzerindeki ligandları ile etkileşiminin farklı kanser türlerine karşı önemli bir rol oynadığını desteklemektedir (85).

c) CD96/TACTILE Molekülünün Yapısı ve Önemi

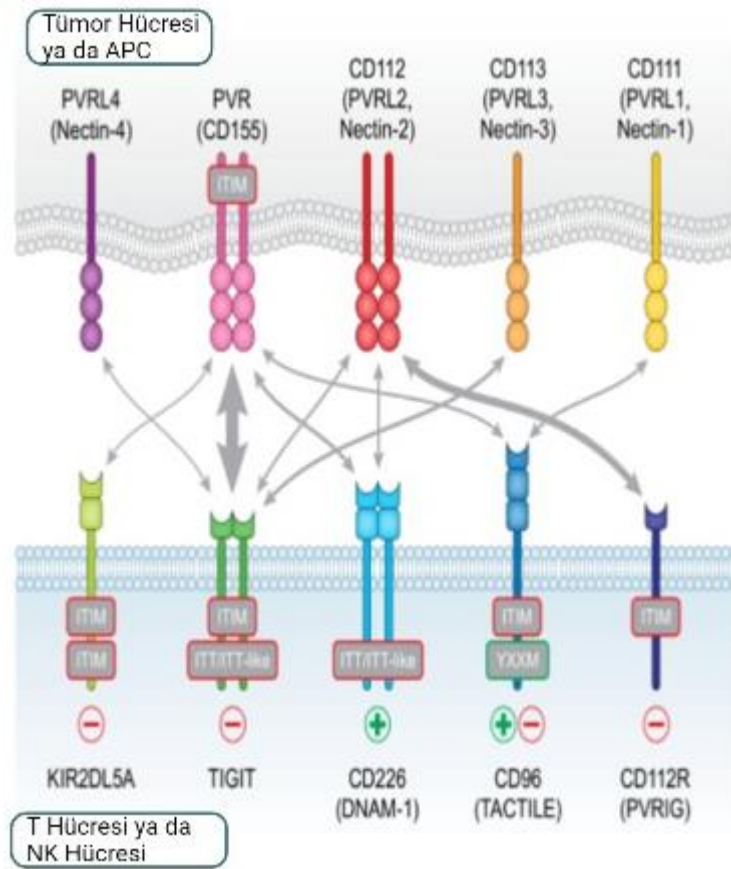
CD96 olarak da bilinen insan TACTILE, 1992 yılında keşfedilmiştir (86). Ig süper ailesinin bir üyesi olan CD96'nın ekspresyonu T ve NK hücreleriyle sınırlıdır.

Fare ve insanlarda CD96, ligand olarak PVR ile etkileşime girerken yalnızca farelerde CD96 Nectin-1'e bağlanması gözlemlenmiştir. Farelerde, PVR'ye CD96'nın bağlanması, IFN- γ üretimini inhibe eder ki bu da CD96'nın inhibitör rolünü göstermektedir(87). Bununla birlikte, insanlarda, CD96 reseptörünün NK hücre aktivitesinin kontrolündeki rolü belirsizdir çünkü CD96 reseptörü, bu hücrelerde hem pozitif hem de negatif sinyalleşmeye aracılık edebilmektedir. Bu nedenle, CD96'nın insan NK hücre aktivasyonunda bir kontrol noktası olarak rolünü ortaya çıkarmak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır (85).

d) PVRIG /CD112R Molekülünün Yapısı ve Önemi

İlk olarak Zhu ve arkadaşları tarafından adlandırılmış ve tanımlanmıştır. 2016 yılında PVRIG'in, poliovirüs reseptörü (PVR) ailesine ait yeni bir ko-inhibitör reseptör olduğu ortaya konmuştur (16). Yakın zamanda keşfedilen bu reseptör üzerine yapılan araştırmalar ile TIGIT, CD96 ve DNAM-1 reseptörleri ile ilgili yapılan araştırmalar karşılaştırıldığında PVRIG hakkındaki yayınlar oldukça sınırlıdır. PVRIG'in hücre dışı değişken bir alan ile transmembran ve sitoplazmik bölgeden oluşmaktadır. PVRIG'in hücre içi alanında ise fosfatazlar için potansiyel bir yerleştirme yeri olabilecek ITIM benzeri bir motife sahiptir. PVRIG reseptörü NK ve T lenfosit hücreleri üzerinde eksprese edilirken, monosit türevli dendritik hücrelerde, nötrofillerde (CD66b⁺) eksprese edilmemektedir. PVRIG, hedef hücrelerde ki Nectin-2 ligandına yüksek afinite ile bağlanır, böylece T ve NK hücrelerinin sitotoksik fonksiyonunu inhibe ederek IFN- γ üretimini azalttığı gösterilmiştir(17). PVRIG ve

DNAM-1, Nectin-2 üzerinde ortak bir bağlanma bölgesi içermektedirler. T lenfositler üzerindeki PVRIG, Nectin-2'ye bağlanmak için DNAM-1 ile rekabet eder ve DNAM-1'den farklı olarak inhibisyon yönünde sinyalleşmede rol almaktadır. Ayrıca, PVRIG eksikliği olan farelerde yapılan bir çalışmada, gelişmiş CD8⁺ T hücre fonksiyonu nedeniyle tümör büyümesini önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir (90). PVRIG reseptörünün bloke edilmesiyle sadece sitokinlerin salınmasını ve T lenfositlerin proliferasyonunu desteklemekle kalmayıp, aynı zamanda NK hücrelerinin de antikora bağımlı hücre aracılı sitotoksitesini arttırdığı bildirilmiştir. Bununla birlikte, solid tümörlerin mikroçevresindeki NK hücrelerinin düzenlenmesi ve immünoterapisinde PVRIG'nin rolü henüz araştırılmamıştır (91).



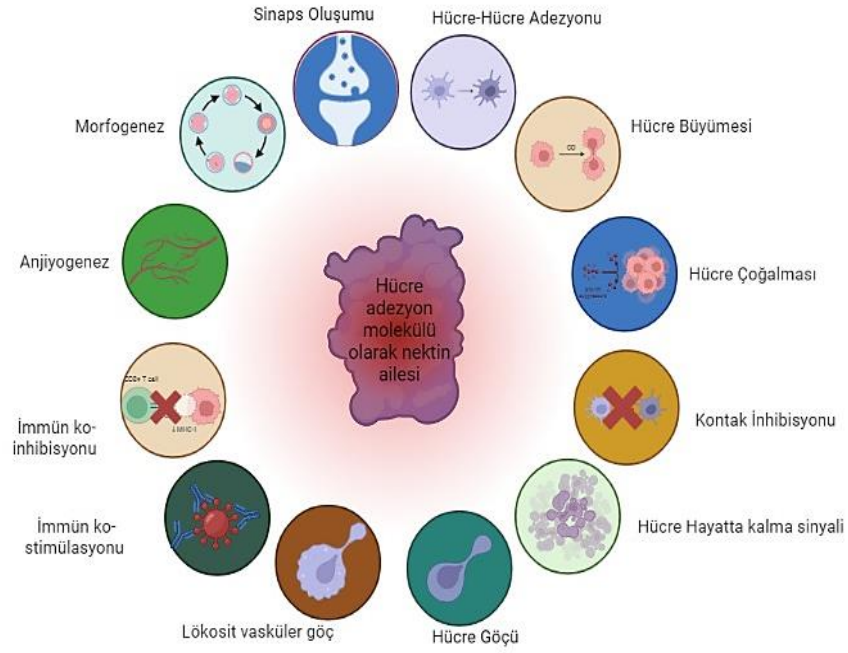
Şekil 2.10. TIGIT/DNAM-1/CD96/PVRIG eksen. Ref. 92'den uyarlanmıştır.

2.6.2. TIGIT Ligandları

Nectin Ailesi

Çok hücreli organizmalarda hücre-hücre yapışma süreçleri fizyolojik olayların merkezinde yer almaktadır. Hücre adhezyon moleküllerinin çoğu dört büyük protein ailesinde yer almaktadırlar. Bunlar; integrinler, selektinler, immünoglobulin süper ailesi ve kaderinlerdir. İntegrinler, hücre-hücre ile hücre-hücre dışı matriksin fibronektin ve kollajen gibi protein yapısındaki bileşenleri bağlayan büyük heterodimerik bir transmembran proteinidirler. Selektinler ise lektin uçları ile diğer hücrelerin yüzeyinde bulunan müsin gibi glikoproteinlerin karbonhidrat kısımlarını tanıyarak hücre-hücre yapışmasına aracılık etmektedirler (93). IgSF ve kaderin protein ailelerinin üyeleri, kendi ailelerine ait proteinlerin homotipik olarak komşu hücrelere bağlanması yoluyla hücre-hücre yapışmasında görev almaktadırlar. Nectinler ve nectin benzeri moleküller, IgSF ailesi içindeki iki önemli hücre yapışma molekülü sınıfı içinde yer almaktadırlar (94, 95, 96).

Nectinler başlangıçta virüs reseptörleri olarak tanımlanmış olsalar da, son zamanlarda yapılan çalışmalarda Necls molekülleri ile birlikte hücreler için çok önemli olan bir takım fonksiyonel özelliklere sahip hücre adhezyon molekülleri olarak ortaya çıkmışlardır. Bu özellikler arasında bir hücrenin çoğalması, farklılaşması, hareketi, polarizasyonu ve yaşamına devam edebilme gücü gibi çeşitli hücresel fonksiyonlar olarak gösterilmektedir. Nectinler esas olarak hücre-hücre adhezyonlarını düzenlerken, Necls'lar ise daha çok hücresel fonksiyonların düzenlenmesinde rol alırlar (95).



Şekil 2.11. Nectin ailesinin hüresel fonksiyonlardaki rolü. Ref. 95'den uyarlanmıştır.

Nectin ile Necl5 ailesi esas olarak kalsiyumdan bağımsız immünoglobulin (Ig) benzeri bir yapıya sahiptirler. Nectinler; Nectin-1/PVRL1/CD111, Nectin-2/PVRL2/CD112, Nectin-3/PVRL3/CD113), Nectin-4/PVRL4 olmak üzere dört üyeden oluşurken Necl ailesi ise Necl1, Necl2, Necl3, Necl4 ve PVR/CD155/ Necl5 olmak üzere beş üyeden oluşmaktadır (97). Nectin ailesinin tüm üyeleri, homodimerik veya heterodimerik yapıların oluşmasıyla sonuçlanan homofilik ve heterofilik etkileşimler oluşturabilen üç immünoglobulin benzeri alan ile tek bir transmembran bölgesine ve bir sitoplazmik kuyruk bölgesine sahip bir hücre dışı bölgeden oluşan Tip I integral membran proteinleridir (64, 98, 99, 100, 101, 102). Hücre temelli biyokimyasal çalışmalarda, heterofilik formların homofilik formlardan daha güçlü olduğunu ve bir takım fizyolojik olayları kontrol ettiği öne sürülmektedir (95, 103, 104).

Tablo 2.1. Nectin ve Necl Ailelerinin ve Hücresel fonksiyonları (105)

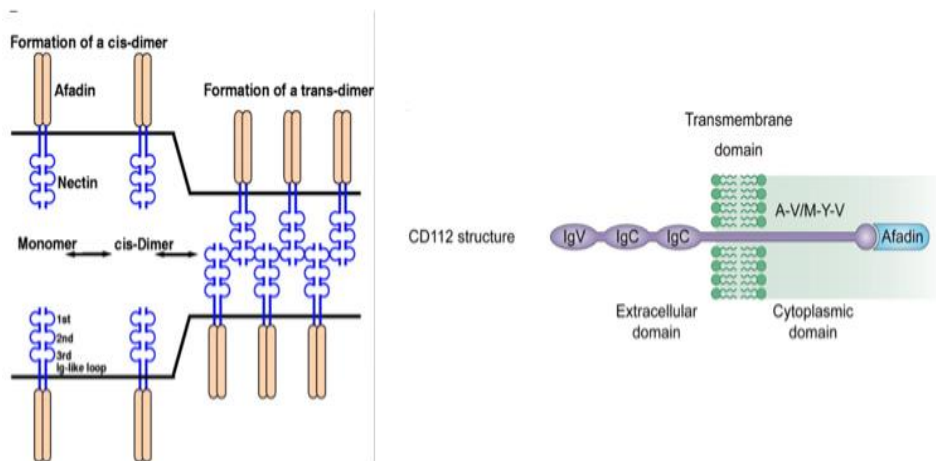
Proteinler	Heterofilik benzeri	Fonksiyonu
Nectin ailesinin üyeleri		
Nectin-1	Nectin-3, Nectin-4, Necl-1	Hücre adezyonu
	CD96	Bağışıklık modülasyonu
Nectin-2	Nectin-3	Hücre adezyonu
	CD226, TIGIT	Bağışıklık modülasyonu
Nectin-3	Nectin-1, Nectin-2, Necl-1, 2, 5	Hücre adezyonu
	TIGIT	Bağışıklık modülasyonu
Nectin-4	Nectin-1	Hücre adezyonu
Necl ailesinin üyeleri		
Necl-1	Nectin-1, Nectin-3, Necl-2, 3, 4	Hücre adezyonu
Necl-2	Nectin-3, Necl-1, Necl-3	Hücre adezyonu
	CRTAM	Bağışıklık modülasyonu
Necl-3	Necl-1, Necl-2	Hücre adezyonu
Necl-4*	Necl-1	Hücre adezyonu
Necl-5*	Nectin-3	Hücre adezyonu
	CD96, CD226, <u>TIGIT</u>	Bağışıklık modülasyonu

a) Nectin-1/PVRL1/CD111 Ligandının Önemi

Kendisiyle veya diğer nectinlerle trans-etkileşime girdiği, adherens junction'larda bulunan bir hücre yapışma molekülüdür. Aynı zamanda herpes simpleks virüsü için de önemli bir reseptördür(106). Nectin-1 çok çeşitli epitel dokularında eksprese olmaktadır. Buna rağmen epitel kökenli malign tümörlerde örneğin; servikal skuamöz hücreli karsinomlarda, pankreas duktal adenokarsinomların kanserle ilişkili fibroblastlarında, kolorektal kanserlerde ve mide kanserlerinde normale göre daha düşük seviyelerde eksprese edildiği gösterilmiştir(107). İnsan nectin-1 geninde meydana gelen mutasyonun yarık dudak/damak ektodermal displazi sendromu (*cleft lip/palate-ectodermal dysplasia syndrome*, 1CLPED1) ile ilişkili olduğu bildirilmiştir(108).

b) Nectin-2/PVRL2/CD112 Ligandının Yapısı ve Önemi

Poliovirüs reseptörü ile ilişkili protein 2 (PVRL2) olarak da adlandırılan Nectin-2, ilk olarak hücre-hücre bağlantılarının oluşumunda rol oynayan bir adhezyon reseptörü olarak tanımlanmıştır (109). Nectin-2, nectin ailesinin diğer üyeleriyle aynı alanlardan oluşmaktadır. Üç Ig benzeri alan (iki IgC ve bir IgV alanı), bir sitoplazmik kuyruk ve tek bir transmembran bölgesi içeren bir hücre dışı bölge içermektedir. Nectin aile üyelerinin çoğu homo-cis-dimer yapıdadır. Fakat Nectin-2 α ve Nectin-2 γ hetero-cis-dimer yapılara da sahiptirler. Nectin-2'nin birinci Ig-benzeri alan trans-dimerik yapının oluşumu için gerekli iken Nectin'in ikinci Ig-benzer alanı cis-dimerik yapının oluşumu için gereklidir. Üçüncü Ig-benzeri alanın işlevi ise henüz bilinmemektedir. Afadin, Nectini aktin hücre iskeletine bağlayan nectin ve aktin-filament bağlayıcı bir proteindir. Nectin, F-aktin vasıtasıyla sitoplazmik son kısmı boyunca afadin ile bağlanmaktadır. Böylece Nectin temelli bağlanmaların, kaderin temelli bağlanmalardan daha hızlı olduğundan, nectin-afadin yapısının hücre tanımada önemli bir rol oynayabileceği bildirilmiştir (110). Dolayısıyla Nectin-2 endotelial hücrelerin bir yüzey belirteci olarak da tanımlanmasıyla birlikte, bir yapışma proteini olarak, endotelial göç, proliferasyon ve hücre geçirgenliğin düzenlenmesinde önemli bir role sahip olduğunu düşünülmektedir (111).



Şekil 2.12. Nectin-2'nin hücreler arası adhezyon aktivasyon modeli ve yapısı(110).

b) Nectin-3/PRR3/PVRL3 Ligandının Önemi

Hücre TJ'larda fonksiyonu bulunan bir hücre adhezyon molekülüdür. Normalde koşullarda epitel hücreleri, fibroblastlar, nöronlar ve spermatidler gibi çeşitli dokularda yaygın olarak eksprese edilmektedirler. Meme kanseri ve pankreas adenokarsinomlarında Nectin-3'ün gen ekspresyonunun azalması, metastaz ve invazyon gibi malign özelliğinin artmasına neden olmaktadır. Buna karşın akciğer adenokarsinomu ve over kanserinde ise Nectin-3'ün gen ekspresyon seviyesinin arttığı tespit edilmiştir. Bununla birlikte Nectin-3'ün, over kanserine ait hücrelerinde, matris metalloproteaz-2 ve -9 (MMP2 ve MMP9) gen ekspresyon seviyelerini arttırarak hücre migrasyonu ve invazyonun gelişmesine neden olmaktadır(112). Ayrıca Nectin-3 ligandı, kronik hastalıklarla da ilişkisi olan önemli bir moleküldür. Strese bağlı sinaptik anormallikleri ve stresle ilişkili bilişsel bozuklukları tedavi etmede umut verici bir hedef olarak karşımıza çıkmaktadır (113).

c) Nectin-4/PVRL4 Ligandının Önemi

Nectin ailesinin diğer üyeleri erişkin dokularında yaygın olarak bulunurken Nectin-4 ligandı embriyo ve plasentada bol miktarda bulunmaktadır ve erişkin yaşamında ise gen ekspresyonu giderek azalmaktadır. Bununla birlikte, Nectin-4'ün akciğer, over, meme ve pankreas kanseri dahil olmak üzere insan kanserlerinin birçoğunda aşırı eksprese edildiği bildirilmiştir (114). Klinik çalışmalar, Nectin-4 gen ekspresyonunun proliferasyon, anjiyogenez, epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT), metastaz ve tümör nüksü gibi kötü prognostik özelliklerle ilgili olarak tümör biyolojisindeki potansiyel rolünü ve işlevini göstermiştir (115).

d) PVR/CD155/Nect5 Ligandının Yapısı ve Önemi

İnsan poliovirüs reseptörü (PVR), hücre adhezyonu ve migrasyonu, proliferasyonu ve immün yanıtların modülasyonu gibi pek çok farklı fizyolojik süreçte yer alan bir immünoglobulin süper ailesi adhezyon molekülüdür. Yapılan son araştırmalar, PVR'nin hücre yapışması ve göçü dışında adaptif bağışıklık ve kanser ile büyük ölçüde ilişkili olduğunu göstermektedir (116). CD155'in hücre dışı bölgesi, IgV (değişken) alanları, bir C1 benzeri alan ve bir C2 alanı α , β , δ ve γ olarak adlandırılan dört izoformu vardır. Nect ailesi üyesi olan PVR, nectinler ile IgV alanında korunmuş üç ortak bölgeye sahipken, ancak hücre içi alanı yoluyla F-aktin bağlayıcı protein afadin'e bağlanamamasıyla nectinlerden farklılık gösterir (95). PVR ve Nectin-2, tümör epitelyal ve miyeloid hücreler üzerinde yapısal olarak eksprese edilen iki ana ligandır (117). PVR, DNAM-1, CD96 ve TIGIT gibi immünoresseptörlerini bağlayabilmektedir bu da efektör lenfoid hücre aktivasyonunda farklı profillerin ortaya çıkmasına neden olmaktadır.

PVR'nin DNAM-1'e bağlanmasıyla, proinflamatuvar sitokinlerin salınmasını, T hücreler ile NK hücrelerinin sitotoksitesini arttırırken, TIGIT'a bağlanması ise daha çok antiinflamatuvar cevap ile beraber hem proliferatif hem de sitotoksik olmayan bir immün yanıtın oluşmasına neden olmaktadır (118). Ayrıca son zamanlarda Th9 ve NK hücreleri üzerinde inhibe edici bir reseptör olarak tanımlanan, immünoglobulin süper ailesinin başka bir reseptör üyesi olan CD96'ya da bağlanmaktadır (119). Sonuç olarak PVR, hem aktive edici hem de inhibe edici reseptörlerle etkileşime girerek immün yanıtın seyrini etkileyen bir immün düzenleyici molekül olarak görev almaktadır.

İlk olarak 1990'lı yıllarda kanser hücrelerinde yüksek düzeyde ekspresyonunun bulunmasıyla birlikte anti tümör tedavide bir hedef molekül olarak gösterildi(120). Bu zamana kadar yapılan çalışmalarda özellikle kolorektal kanser, glioma, nöroblastom, miyeloid lösemi, over kanseri, akciğer adenokarsinomu ve pankreas kanseri gibi pek çok kanser türünde yüksek düzeylerde PVR'nin ifade edildiği gösterilmiştir (121). Özellikle anti tümör tedavilerde immün kontrol noktası inhibisyonunun, bu ligandlar ve ilgili reseptörleri arasındaki etkileşime bağlı

olduğundan, bunlardan birinin veya her ikisinde antikör ile bloke edilerek, immünsüpresyonun tersine çevrilmesinde etkili bir yaklaşım olduğu gösterilmiştir (122).

Günümüzde PVR'yi hedefleyen kanser tedavilerinde klinik deneylerde araştırılıyor olsa da onkolitik poliovirüsler dışında doğrudan PVR'yi hedefleyen yaklaşımlar hala az olduğu görülmektedir. İmmünoterapik tedavilerin sağladığı avantajlara rağmen hala daha klinik deneylerde anti PVR antikörlerinin kullanılmaması aslında normal hücrelerdeki PVR indüksiyonu hakkında yeterli bilgi birikiminin olmayışından kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Bugüne kadar yapılan in vivo fare çalışmalarında daha çok inhibitör bir reseptör olan PVR 'nin bir immün kontrol noktası blokörü olarak umut vaat eden bir immünoterapik hedef olabileceğini açıkça göstermektedir (123). Ayrıca kombine yapılan immüno tedavilerin başarı potansiyelleri bu kadar güçlüyken gelecekte PVR'nin tümör hücrelerindeki bağışıklıkla ilgili önemli fonksiyonlarını destekleyen keşifler arttıkça yeni hedefler listesinde üst sıralarda yerini alacaktır.

2.7. Nectin-2 Ligandının Tümör Patogenezindeki Rolü

Günümüze kadar Nectin-2 ile ilgili yapılan çalışmalarda bu ligandın tümör büyümesi, anjiyogenezi ve metastazı ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (124). Özellikle skuamöz hücreli karsinomlar ile meme, yumurtalık, akciğer, prostat, pankreas duktal adenokarsinomları gibi epitel kökenli tümörlerde ve akut miyeloid lösemi, multiple miyelom gibi farklı kanser türlerinde Nectin-2 geninin aşırı eksprese edilerek tümör oluşumuna katkı sağlamakla birlikte tümör hücrelerinin çoğalmasını, invazyonunu ve hücre göçü ile lenf nodu metastaz oluşumunu kolaylaştırdığı bulunmuştur (125, 126, 127, 128). Nectin-2 gen ekspresyonunun artışı, safra kesesi kanserinin agresifliği ve kötü prognozu ile ilişkiliyken (129), Nectin-2 gen ekspresyonunun azalmasının hepatoselüler karsinomda (HCC) kötü prognozla ilişkili olduğu gösterilmiştir (130)

Bu ligandın PVR benzeri bir sinyal yolunun parçası olduklarından, immün yanıtın düzenlenmesinde rol oynadıkları gösterilmiştir. Kanser hücreleri veya antijen

sunan hücreler üzerinde aşırı eksprese edilen Nectin-2, CTL ve NK hücrelerinin yüzeyinde eksprese edilen TIGIT ve PVRIG'e bağlanır, böylece immün hücre aktivasyonunu inhibe etmek için bir immün kontrol noktası görevi görür. Bunun aksine, Nectin-2 ligandı immün sistem hücreleri üzerindeki başka bir reseptör olan DNAM-1'e bağlanarak bu hücrelerin aktive olmasında rol oynaktadır.

Ancak, ligand-reseptör arasındaki ilişkiye baktığımızda PVR'nin TIGIT'e güçlü afinite ile bağlandığı, Nectin-2'nin ise TIGIT'e çok daha zayıf afinite ile bağlandığı bildirilmiştir (64). İmmün yanıtları düzenlemede PVR işlevine yönelik bu güçlü afinite göz önüne alındığında, Nectin-2 ayrıca immünoterapi için ilginç bir hedef olabilmektedir. Aslında, zayıf PVR ekspresyonu durumunda, Nectin-2 ve antagonist antikolar kullanılarak TIGIT ile etkileşiminin bloke edilmesi alternatif bir yaklaşım olabileceği görülmektedir.

Hem hedefe özel hem de daha az yan etki ile bağışıklık hücrelerinin potansiyelini ortaya çıkaran kontrol noktası inhibisyonunu içeren immünoterapiler son yıllarda büyük başarılar elde edilmiştir. Nectin-2'nin, immünomodülatör fonksiyonu aracılığıyla insan pankreas kanserinde de rol oynayabileceği düşünülmektedir. Spesifik prognostik faktörlerin pankreas kanseri tedavisinde kullanılması umut verici olmaktadır. Nectin-2 hedefli tedavi güçlü bir silah olacaktır çünkü pankreas kanseri hücrelerinin yanı sıra birçok immün sistem hücresi de etkilenir ve immün sisteminin hedef ve savaşan hücrelerini harekete geçirir.

Nectin-2, immün hücrelerin kontrol noktası moleküllerinden TIGIT, PVRIG ve DNAM-1 için ligand görevi gören bir moleküldür. Pankreas kanserindeki rolü ve hedeflenebilirliği tam olarak bilinmemektedir. Bu araştırmanın amacı; Nectin-2 ekspresyonu ile reseptörlerinin ve diğer bazı kontrol noktası moleküllerinin ekspresyonu arasındaki ilişkiyi araştırmaktır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Histopatolojik araştırmalar (immunohistokimyasal analizler) Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'nda yapılmıştır.

3.1. Olguların Seçimi

Çalışmada ilk olarak, Gazi Üniversitesi Hastanesi Patoloji Anabilim Dalında 2008-2015 yılları arasında pankreas kanseri tanısı almış hastalar hastane otomasyon sistemi olan Nukleus sistemi kullanılarak taranarak dahil edildi. Pankreas kanseri tanısı ile whipple ameliyatı, total/subtotal pankreatektomi yapılan hastaların hastalıksız (normal) ve kanserli dokuları kullanıldı. Bu retrospektif çalışmaya primer pankreatik duktal adenokarsinom, adenokarsinom, adenoskuamöz karsinom ve müsinöz adenokarsinom tanısı olan 131 hasta dahil edildi.

Primer tümörü pankreasta olmayan, pankreatik duktal adenokarsinomu metastazı bulunan vakalar çalışmaya dahil edilmemiştir.

Vakalara ait patoloji raporlarından tanı yaşı, cinsiyet, tümör çapı, tümör derecesi, anjiolenfatik invazyon, perinöral invazyon, metastatik lenf nodu tutulumuna ait bilgiler kayıt altına alındı.

3.2. Olguların Hazırlanması

Pankreas kanseri tanısı almış olan hastaların whipple ve pankreas rezeksiyonu materyallerine ait parafin bloklar Gazi Üniversitesi Hastanesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı arşivinden seçildi.

Biyopsilerde araştırmanın verimliliğini artırmak için pankreas tümörlerinin incelenmesi sırasında Hematoksilen&Eosin ile boyanmış preparatlardan normal pankreas dokusuna ait hücrelerin yanında tümör hücrelerinin en fazla olduğu ve tümör etrafında lenfositik hücreler yönünden zengin alanların yoğun bulunduğu, nekroz alanların ise en az olduğu parafin bloklar seçildi. Seçilen bu bloklarda Nectin-2, DNAM-1, TIGIT, PVRIG, LAG3, TIM3, VISTA, PD-1, PD-L1, CD8 ve Kİ-67 antikörlerinin immün ekspresyonlarını göstermek için immünohistokimyasal boyama yöntemi uygulandı.

3.3. İmmünohistokimyasal Boyama

Çalışmaya dâhil edilen tüm dokular öncelikle %10'luk formaldehit ile fikse edildi. İmmünohistokimyasal boyama için seçilen parafin bloklardan Rotary Mikrotom kullanılarak 4µm kalınlığında pozitif şarjlı lamlara her lama iki ya da üç adet vaka kesiti alınarak hazırlandı.

İmmünohistokimyasal boyama aşamasına başlamadan önce, antikörlerin uygun dilüsyon oranını bulmak ve antijenlerin geri kazanılması sağlamak, uygun PH değerini belirlemek için antikörlere ait kullanım kılavuzlarında belirtilen pozitif doku örneklerinde optimizasyon denemeleri yapıldı. Nectin-2 antikoru için normal testis dokusu, DNAM-1 antikoru için akciğer karsinomu, TIGIT, PVRIG, LAG3, TIM3, VISTA, PD1, PDL1, CD8 ve Kİ-67 antikoru için normal tonsil dokusu pozitif kontrol için kullanıldı.

İmmünohistokimyasal boyama işlemi ROCHE Ventana marka Benchmark Ultra model tam otomatik immünohistokimya boyama (Tucson, Amerika) cihazı kullanıldı. Ticari formda hazırlanmış 3,3- diaminobenzidin (DAB) UltraView universal DAB ile UltraView Alkalen Fosfataz (FAST RED) detection kitleri kullanılarak boyama yapıldı.

Uygun bloklardan hazırlanmış kesitler 70°C sıcaklıktaki etüvde 30 dakika bekletildi. Deparafinizasyon işlemi için lamlar boyama makinesinin içine

yerleştirilerek 72°C’de ‘EZprep’ solüsyonu uygulanarak yapıldı. Ardından antijenlerin geri kazanılması için dokulara ‘Antigen Retrieval’ işlemi uygulandı.

İmmünohistokimyasal çalışmalarda kullanılan antikorların klon, marka bilgileri ve antikorun çalıştığını göstermek için kullanılan pozitif kontrol dokuları Tablo 3.1’de listelendirilmiştir.

Tablo 3.1. İmmünohistokimyasal boyamada kullanılan antikorların marka, klonları ile kullanılan pozitif kontrol dokuları.

Antikor Adı	Klon	Marka	Pozitif Kontrol
Anti-Nectin-2	D8D3F, Tavşan monoklonal	Cell Signaling	Testis dokusu
Anti-TIGIT	BLR047F, Tavşan monoklonal	Abcam	Tonsil dokusu
Anti-DNAM1	BLR063G, Tavşan monoklonal	Abcam	Akciğer Karsinomu
Anti- PVRIG	Poliklonal, Tavşan	Proteintech	Tonsil dokusu
Anti-LAG3	D2G40, Tavşan monoklonal	Cell Signaling	Tonsil dokusu
Anti-TIM3	D5D5R, Tavşan monoklonal	Cell Signaling	Tonsil dokusu
Anti-VISTA	D1L2G, Tavşan monoklonal	Cell Signaling	Tonsil dokusu
Anti-PD-1	NAT105, Fare monoklonal	Roche	Tonsil dokusu
Anti-PD-L1	SP263, Tavşan monoklonal	Roche	Tonsil dokusu
Anti-CD8	SP57, Tavşan monoklonal	Roche	Tonsil dokusu
Anti-Kİ-67	30-9, Tavşan monoklonal	Roche	Tonsil dokusu

3.3.1. Nectin-2 ve CD8 Antikorlarının İmmünohistokimyasal Doublestain Boyama Yöntemi

Hazırlanan parafin doku kesitleri Nectin-2 ve CD8 antikorları kullanılarak “doublestain” metodu ile aşağıdaki prosedüre göre beraber boyandı.

1. Seçilen parafin bloklardan pozitif şarj yüklü lamlara 4µm kalınlığında doku kesitleri alındı.
2. Roche Ventana Benchmark Ultra model otomatik boyama cihazıyla EZprep solüsyonunda 72°C’de 8 dakika inkübe edilerek deparafinizasyon işlemi yapıldı.
3. Nectin-2 ve CD8 antikorlarına Antigen Retrieval işlemi için doku kesitleri etilenediamin tetraasetik asit (EDTA) solüsyonu (buffer) (pH 8,0) içinde yaklaşık 100°C’de 76 dakika süreyle cihazda ısıtma işlemi uygulandı.
4. Nectin-2 primer antikorunu inkübasyonu için 1/200 dilüsyonda otomatik cihazda 32 dakika bekletildi.
5. Nectin-2’yi renk vererek görüntülemeyi sağlamak için Ventana marka “Ultraview universal DAB detection kit” kullanıldı.
6. Doublestain boyaması yapabilmek için 90°C’de 4 dakika denatürasyon işlemi uygulandı.
7. Kullanıma hazır formda olan CD8 primer antikorunu inkübasyon için otomatik cihazda 28 dakika bekletildi.
8. CD8 antikorunu için renk vererek görüntülemeyi sağlamak amacıyla Ventana marka “ultraView universal Alkalen Fosfataz (FAST RED) detection kit” kullanıldı.
9. Counterstain yapmak için cihazın Ventana marka hematoksilin II’de 12 dakika bekletildi.
10. Postcounterstain yapmak için Ventana marka Bluing Reagent solüsyonunda 8 dakika bekletildi.
11. Boyanan lamlar çeşme suyunun altında yıkanıp dehidrasyon aşaması için sırasıyla 2 dakika %96’lık etil alkolde ve 2 dakika ksilende tutuldu.

12. Lamlar entellan kullanılarak uygun büyüklükteki lamellerle kapatıldı.

3.3.2. TIGIT Antikorumun İmmünohistokimyasal Boyama Yöntemi

Hazırlanan parafin doku kesitleri TIGIT antikoru streptavidin-biotin üçlü indirekt immünperoksidaz yöntemi kullanılarak aşağıdaki prosedüre göre boyama yapıldı.

1. Pozitif şarj yüklü lamlara 4µm kalınlığında doku kesitleri alındı.
2. Roche Ventana Benchmark Ultra model otomatik boyama cihazıyla EZprep solüsyonunda 72°C’de 8 dakika inkübe edilerek deparafinizasyon işlemi yapıldı.
3. TIGIT antikoru Antigen Retrieval işlemi için doku kesitleri etilenediamin tetraasetik asit (EDTA) solüsyonu (buffer) (pH 8,0) içinde yaklaşık 100°C’de 76 dakika süreyle cihazda ısıtma işlemi uygulandı.
4. TIGIT primer antikoru inkübasyonu için 1/400 dilüsyonda otomatik cihazda 1 saat 32 dakika bekletildi.
5. TIGIT’ı renk vererek görüntülemeyi sağlamak için Ventana marka “Ultraview universal DAB detection kit” kullanıldı.
6. Counterstain yapmak için cihazın Ventana marka hematoksilin II’de 12 dakika bekletildi.
7. Postcounterstain yapmak için Ventana marka Bluing Reagent solüsyonunda 8 dakika bekletildi.
8. Boyanan lamlar çeşme suyunun altında yıkanıp dehidrasyon aşaması için sırasıyla 2 dakika %96’lık etil alkolde ve 2 dakika ksilende tutuldu.
9. Lamlar entellan kullanılarak uygun büyüklükteki lamellerle kapatıldı.

3.3.3. DNAM-1 Antikorumun İmmünohistokimyasal Boyama Yöntemi

Hazırlanan parafin doku kesitleri DNAM-1 antikoru streptavidin-biotin üçlü indirekt immünperoksidaz yöntemi kullanılarak aşağıdaki prosedüre göre boyama yapıldı.

1. Pozitif şarj yüklü lamlara 4µm kalınlığında doku kesitleri alındı.
2. Roche Ventana Benchmark Ultra model otomatik boyama cihazıyla EZprep solüsyonunda 72°C’de 8 dakika inkübe edilerek deparafinizasyon işlemi yapıldı.
3. DNAM-1 antikoru Antigen Retrieval işlemi için doku kesitleri Sitrat (buffer) solüsyonu (pH 6,0) içinde 68 dakika süreyle cihazda bekletildi.
4. DNAM-1 primer antikoru inkübasyonu için 1/200 dilüsyonda otomatik cihazda 40 dakika bekletildi.
5. DNAM-1’i renk vererek görüntülemeyi sağlamak için Ventana marka “Ultraview universal DAB detection kit” kullanıldı.
6. Counterstain yapmak için cihazın Ventana marka hematoksilin II’de 12 dakika bekletildi.
7. Postcounterstain yapmak için Ventana marka Bluing Reagent solüsyonunda 8 dakika bekletildi.
8. Boyanan lamalar çeşme suyunun altında yıkanıp dehidrasyon aşaması için sırasıyla 2 dakika %96’lık etil alkolde ve 2 dakika ksilende tutuldu.
9. Lamalar entellan kullanılarak uygun büyüklükteki lamellerle kapatıldı.

3.3.4. PVRIG Antikorumun İmmünohistokimyasal Boyama Yöntemi

Hazırlanan parafin doku kesitleri PVRIG antikoru streptavidin-biotin üçlü indirekt immünperoksidaz yöntemi kullanılarak aşağıdaki prosedüre göre boyama yapıldı.

1. Pozitif şarj yüklü lamlara 4µm kalınlığında doku kesitleri alındı.
2. Roche Ventana Benchmark Ultra model otomatik boyama cihazıyla EZprep solüsyonunda 72°C’de 8 dakika inkübe edilerek deparafinizasyon işlemi yapıldı.
3. PVRIG antikoru Antigen Retrieval işlemi için doku kesitleri etilenediamin tetraasetik asit (EDTA) solüsyonu (buffer) (pH 8,0) içinde yaklaşık 100°C’de 92 dakika süreyle cihazda ısıtma işlemi uygulandı.

4. PVRIG primer antikoru inkübasyonu için 1/100 dilüsyonda otomatik cihazda 1 saat 32 dakika bekletildi.
5. PVRIG'i renk vererek görüntülemeyi sağlamak için Ventana marka "Ultraview universal DAB detection kit" kullanıldı.
6. Counterstain yapmak için cihazın Ventana marka hematoksilin II'de 12 dakika bekletildi.
7. Postcounterstain yapmak için Ventana marka Bluing Reagent solüsyonunda 8 dakika bekletildi.
8. Boyanan lamalar çeşme suyunun altında yıkanıp dehidrasyon aşaması için sırasıyla 2 dakika %96'lık etil alkolde ve 2 dakika ksilende tutuldu.
9. Lamalar entellan kullanılarak uygun büyüklükteki lamellerle kapatıldı.

3.3.5. LAG3 Antikorumun İmmünohistokimyasal Boyama Yöntemi

Hazırlanan parafin doku kesitleri LAG3 antikoru streptavidin-biotin üçlü indirekt immünperoksidaz yöntemi kullanılarak aşağıdaki prosedüre göre boyama yapıldı.

1. Pozitif şarj yüklü lamalara 4µm kalınlığında doku kesitleri alındı.
2. Roche Ventana Benchmark Ultra model otomatik boyama cihazıyla EZprep solüsyonunda 72°C'de 8 dakika inkübe edilerek deparafinizasyon işlemi yapıldı.
3. LAG3 antikoru Antigen Retrieval işlemi için doku kesitleri etilenediamin tetraasetik asit (EDTA) solüsyonu (buffer) (pH 8,0) içinde yaklaşık 100°C'de 76 dakika süreyle cihazda ısıtma işlemi uygulandı.
4. Kullanıma hazır formda olan LAG3 primer antikoru inkübasyonu için otomatik cihazda 1 saat bekletildi.
5. LAG3 antikorumu renk vererek görüntülemeyi sağlamak için Ventana marka "Ultraview universal DAB detection kit" kullanıldı.
6. Counterstain yapmak için cihazın Ventana marka hematoksilin II'de 12 dakika bekletildi.
7. Postcounterstain yapmak için Ventana marka Bluing Reagent solüsyonunda 8 dakika bekletildi.

8. Boyanan lamlar çeşme suyunun altında yıkanıp dehidrasyon aşaması için sırasıyla 2 dakika %96'lık etil alkolde ve 2 dakika ksilende tutuldu.

9. Lamlar entellan kullanılarak uygun büyüklükteki lamellerle kapatıldı.

3.3.6. TIM3 Antikorumun İmmünohistokimyasal Boyama Yöntemi

Hazırlanan parafin doku kesitleri TIM3 antikoru streptavidin-biotin üçlü indirekt immünperoksidaz yöntemi kullanılarak aşağıdaki prosedüre göre boyama yapıldı.

1. Pozitif şarj yüklü lamlara 4µm kalınlığında doku kesitleri alındı.
2. Roche Ventana Benchmark Ultra model otomatik boyama cihazıyla EZprep solüsyonunda 72°C'de 8 dakika inkübe edilerek deparafinizasyon işlemi yapıldı.
3. TIM3 antikoru Antigen Retrieval işlemi için doku kesitleri etilenediamin tetraasetik asit (EDTA) solüsyonu (buffer) (pH 8,0) içinde yaklaşık 100°C'de 76 dakika süreyle cihazda ısıtma işlemi uygulandı.
4. Kullanıma hazır formda olan TIM3 primer antikoru inkübasyonu için otomatik cihazda 1 saat bekletildi.
5. TIM3'ü renk vererek görüntülemeyi sağlamak için Ventana marka "Ultraview universal DAB detection kit" kullanıldı.
6. Counterstain yapmak için cihazın Ventana marka hematoksilin II'de 12 dakika bekletildi.
7. Postcounterstain yapmak için Ventana marka Bluing Reagent solüsyonunda 8 dakika bekletildi.
8. Boyanan lamlar çeşme suyunun altında yıkanıp dehidrasyon aşaması için sırasıyla 2 dakika %96'lık etil alkolde ve 2 dakika ksilende tutuldu.
9. Lamlar entellan kullanılarak uygun büyüklükteki lamellerle kapatıldı.

3.3.7. VISTA Antikorumun İmmünohistokimyasal Boyama Yöntemi

Hazırlanan parafin doku kesitleri VISTA antikoru streptavidin-biotin üçlü indirekt immünperoksidaz yöntemi kullanılarak aşağıdaki prosedüre göre boyama yapıldı.

1. Pozitif şarj yüklü lamlara 4µm kalınlığında doku kesitleri alındı.
2. Roche Ventana Benchmark Ultra model otomatik boyama cihazıyla EZprep solüsyonunda 72°C’de 8 dakika inkübe edilerek deparafinizasyon işlemi yapıldı.
3. VISTA antikoru Antigen Retrieval işlemi için doku kesitleri Sitrat (buffer) solüsyonu (pH 6,0) içinde 68 dakika süreyle cihazda bekletildi.
4. Kullanıma hazır formda olan VISTA primer antikoru inkübasyonu için otomatik cihazda 32 dakika bekletildi.
5. VISTA antikorumu renk vererek görüntülemeyi sağlamak için Ventana marka “Ultraview universal DAB detection kit” kullanıldı.
6. Counterstain yapmak için cihazın Ventana marka hematoksilin II’de 12 dakika bekletildi.
7. Postcounterstain yapmak için Ventana marka Bluing Reagent solüsyonunda 8 dakika bekletildi.
8. Boyanan lamlar çeşme suyunun altında yıkanıp dehidrasyon aşaması için sırasıyla 2 dakika %96’lık etil alkolde ve 2 dakika ksilende tutuldu.
9. Lamlar entellan kullanılarak uygun büyüklükteki lamellerle kapatıldı.

3.3.8. PD-1 Antikorumun İmmünohistokimyasal Boyama Yöntemi

Hazırlanan parafin doku kesitleri PD-1 antikoru streptavidin-biotin üçlü indirekt immünperoksidaz yöntemi kullanılarak aşağıdaki prosedüre göre boyama yapıldı.

1. Pozitif şarj yüklü lamlara 4µm kalınlığında doku kesitleri alındı.

2. Roche Ventana Benchmark Ultra model otomatik boyama cihazıyla EZprep solüsyonunda 72°C’de 8 dakika inkübe edilerek deparafinizasyon işlemi yapıldı.

3. PD-1 antikoru Antigen Retrieval işlemi için doku kesitleri etilenediamin tetraasetik asit (EDTA) solüsyonu (buffer) (pH 8,0) içinde yaklaşık 100°C’de 76 dakika süreyle cihazda ısıtma işlemi uygulandı.

4. Kullanıma hazır formda olan PD-1 primer antikoru inkübasyonu için otomatik cihazda 36 dakika bekletildi.

5. PD-1 antikoru renk vererek görüntülemeyi sağlamak için Ventana marka “Ultraview universal DAB detection kit” kullanıldı.

6. Counterstain yapmak için cihazın Ventana marka hematoksilin II’de 12 dakika bekletildi.

7. Postcounterstain yapmak için Ventana marka Bluing Reagent solüsyonunda 8 dakika bekletildi.

8. Boyanan lamalar çeşme suyunun altında yıkanıp dehidrasyon aşaması için sırasıyla 2 dakika %96’lık etil alkolde ve 2 dakika ksilende tutuldu.

9. Lamalar entellan kullanılarak uygun büyüklükteki lamellerle kapatıldı.

3.3.9. PD-L1 Antikorusunun İmmünohistokimyasal Boyama Yöntemi

Hazırlanan parafin doku kesitleri PD-L1 antikoru streptavidin-biotin üçlü indirekt immünperoksidaz yöntemi kullanılarak aşağıdaki prosedüre göre boyama yapıldı.

1. Pozitif şarj yüklü lamlara 4µm kalınlığında doku kesitleri alındı.

2. Roche Ventana Benchmark Ultra model otomatik boyama cihazıyla EZprep solüsyonunda 72°C’de 8 dakika inkübe edilerek deparafinizasyon işlemi yapıldı.

3. PD-L1 antikoru Antigen Retrieval işlemi için doku kesitleri etilenediamin tetraasetik asit (EDTA) solüsyonu (buffer) (pH 8,0) içinde yaklaşık 100°C’de 32 dakika süreyle cihazda ısıtma işlemi uygulandı.

4. Kullanıma hazır formda FDA onaylı PD-L1 primer antikoru inkübasyonu için otomatik cihazda 44 dakika bekletildi.

5. PD-L1 antikorunu renk vererek görüntülemeyi sağlamak için FDA onaylı Ventana marka “OptiView universal DAB detection kit” kullanıldı.

6. Counterstain yapmak için cihazın Ventana marka hematoksilin II’de 12 dakika bekletildi.

7. Postcounterstain yapmak için Ventana marka Bluing Reagent solüsyonunda 8 dakika bekletildi.

8. Boyanan lamalar çeşme suyunun altında yıkanıp dehidrasyon aşaması için sırasıyla 2 dakika %96’lık etil alkolde ve 2 dakika ksilende tutuldu.

9. Lamalar entellan kullanılarak uygun büyüklükteki lamellerle kapatıldı.

3.3.10. KI-67 Antikorumunun İmmünohistokimyasal Boyama Yöntemi

Hazırlanan parafin doku kesitleri KI-67 antikorunu streptavidin-biotin üçlü indirekt immünperoksidaz yöntemi kullanılarak aşağıdaki prosedüre göre boyama yapıldı.

1. Pozitif şarjlı lamalara 4µm kalınlığında kesitler alındı.

2. Roche Ventana Benchmark Ultra model otomatik boyama cihazıyla EZprep solüsyonunda 72°C’de 8 dakika inkübe edilerek deparafinizasyon işlemi yapıldı.

3. KI-67 antikorunu Antigen Retrieval işlemi için doku kesitleri etilenediamin tetraasetik asit (EDTA) solüsyonu (buffer) (pH 8,0) içinde 64 dakika süreyle cihazda bekletildi.

4. Kullanıma hazır formda olan KI-67 primer antikorunu inkübasyonu için otomatik cihazda 28 dakika bekletildi.

5. KI-67 antikorunu renk vererek görüntülemeyi sağlamak için Ventana marka “Ultraview universal DAB detection kit” kullanıldı.

6. Counterstain yapmak için cihazın Ventana marka hematoksilin II’de 12 dakika bekletildi.

7. Postcounterstain yapmak için Ventana marka Bluing Reagent solüsyonunda 8 dakika bekletildi.

8. Boyanan lamalar çeşme suyunun altında yıkanıp dehidrasyon aşaması için sırasıyla 2 dakika %96’lık etil alkolde ve 2 dakika ksilende tutuldu.

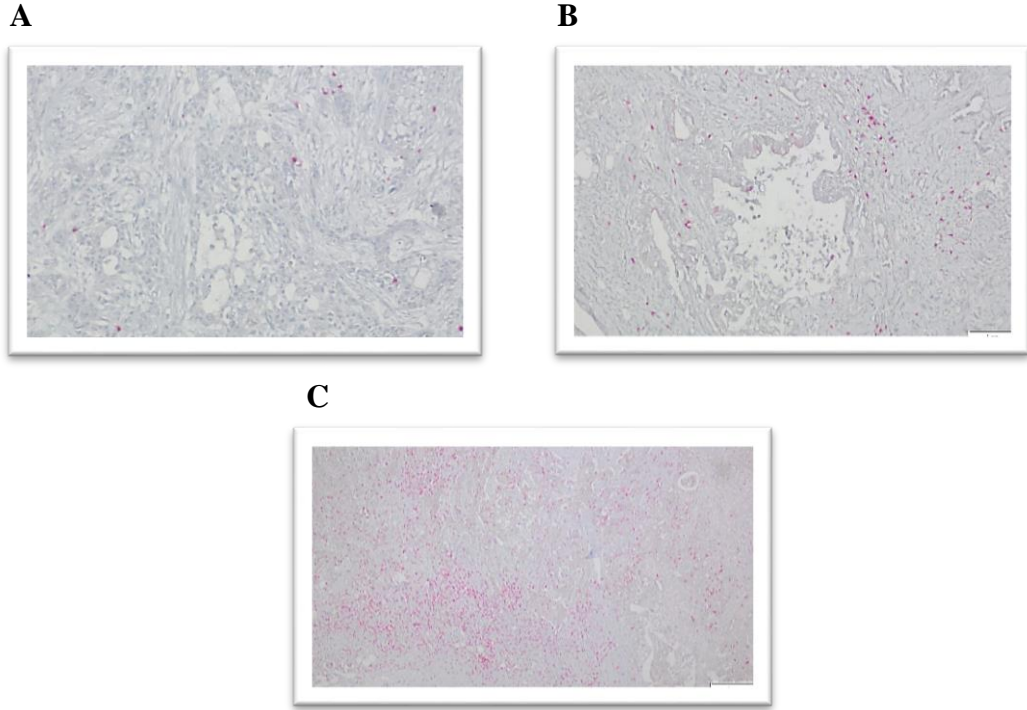
9. Lamlar entellan kullanılarak uygun büyüklükteki lamellerle kapatıldı.

3.4. İmmünohistokimyasal Boyamaların Değerlendirilmesi

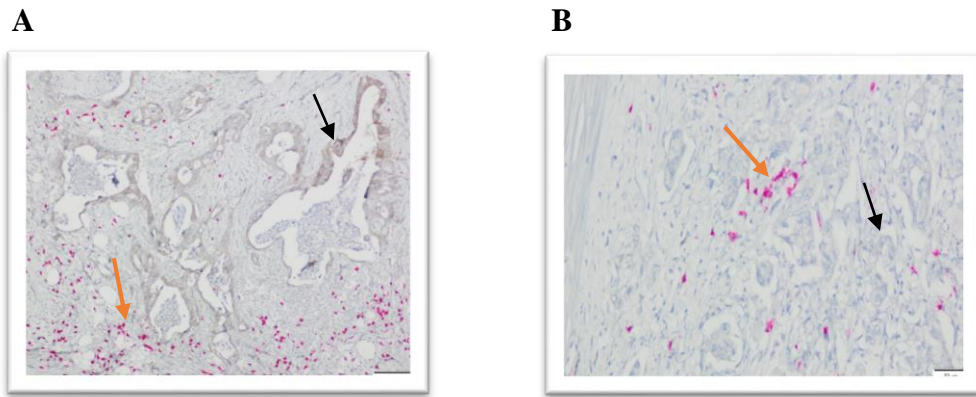
Seçilen bloklardan hazırlanan kesitler ticari formdaki multimer streptavidin-peroksidaz yöntemiyle boyandıktan sonra ışık mikroskobunda değerlendirilmiştir.

3.4.1. Anti-Nectin-2 ve CD8 Antikorlarının Değerlendirilmesi

Pankreas tümörlerine ait kesitler anti-Nectin-2 ve CD8 antikorları doublestain olarak çalışılan immünohistokimyasal boyanmalar mikroskop eşliğinde değerlendirildi. Mikroskop altında bakıldığında kahverengi ile boyanan tümör hücrelerinde Nectin-2 ekspresyonu gösterilirken lenfositlerdeki kırmızı boyanmalar ile CD8 ekspresyonu gösterildi. Nectin-2 için tümör hücrelerindeki boyanmaların değerlendirilmesinde membranöz ve/veya sitoplazmik boyanma şekli pozitif olarak kabul edildi ve boyanma skorları belirlendi. Tümörde boyanmanın olmadığı durumlar negatif (0), boyanmanın görüldüğü durumlar ise pozitif (1) olarak değerlendirildi. Boyanma paternleri Resim 3.2'de gösterilmiştir. Anti-CD8 antikoruna ile yapılan immünohistokimyasal boyamada stromada ve tümör çevresindeki CD8 ile boyanan T lenfositlerin sayısı yarı kantitatif olarak belirlendi. (bkn. Tablo 4.3). CD8 immünohistokimyasal boyanmasının değerlendirilmesinde membranöz ve/veya sitoplazmik boyanma pozitif olarak kabul edildi. CD8 ile boyanan hücre sayıları 3 kategoride değerlendirildi: +1 (boyanan hücrelerin sayısı ≤ 60 'den az), +2 (boyanan hücrelerin sayısı 60-120 arası), +3 (boyanan hücrelerin sayısı > 120 'den fazla) (Resim 3.1)



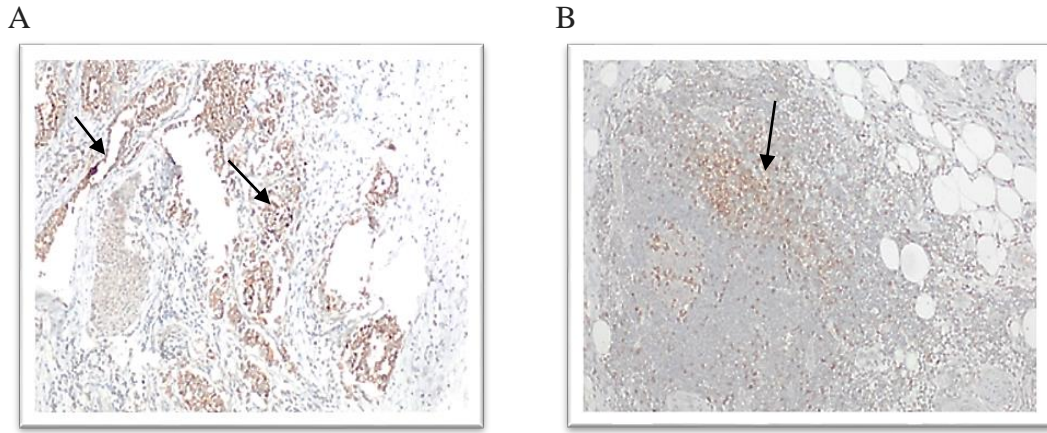
Resim 3.1. A) CD8⁺ T lenfositlerin düşük düzeyde ekspresyonu B) CD8⁺ T lenfositlerin orta düzeyde ekspresyonu C) CD8⁺ T lenfositlerin yüksek düzeyde ekspresyonu.



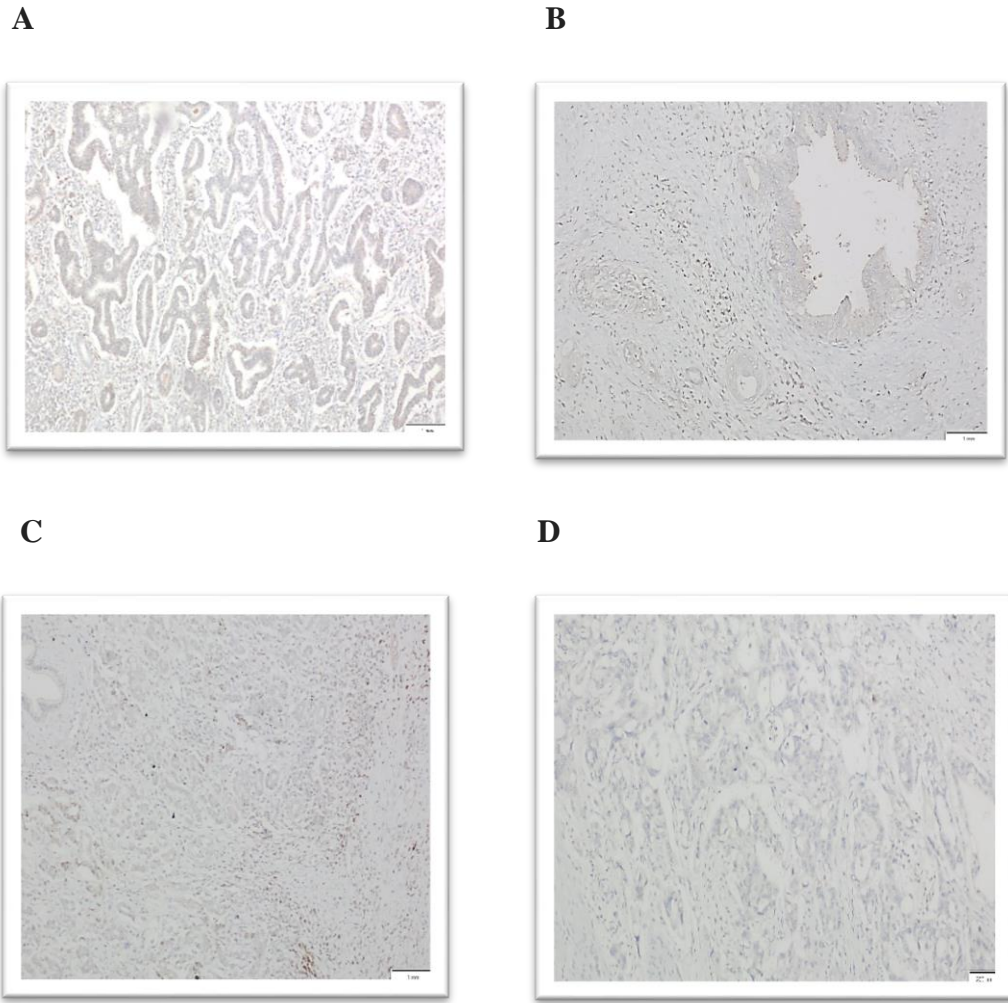
Resim 3.2. A) Nectin-2 pozitif ekspresyonu (siyah ok) ile CD8 yoğun miktarda ekspresyonu (kırmızı ok), B) Nectin-2 negatif ekspresyonu (siyah ok) ile CD8 az miktarda ekspresyonu (kırmızı ok)

3.4.2. TIGIT Antikoru'nun Değerlendirilmesi

Anti-TIGIT antikoru ile immünohistokimyasal boyanmalarda pankreas kanseri dokularına kesitlerde hem tümör hem de tümör infiltre eden lenfositlerde boyanma olduğu saptanmıştır (Resim 3.3). Çalışmamızda lenfositlerdeki boyanmalar dikkate alınarak değerlendirme yapılmıştır. Değerlendirmeler sonucunda TIGIT ile boyanan TIL'lerde pozitif boyanan lenfositlerin sayısına göre skorlama yapıldı. Buna göre kesitlerde hiç boyanmanın olmadığı durumlar negatif (0) olarak kabul edildi. Pozitif boyanmalarda ise skorlama; düşük sayıda boyanma olması durumu +1, orta sayıda boyanma olması durumu +2, yüksek sayıda boyanma olması durumu +3 olarak değerlendirildi (Resim 3.4).



Resim 3.3. A) Anti-TIGIT'in pankreasa ait tümör hücrelerinde ekspresyon durumu, B) Tümör infiltre eden lenfositlerdeki ekspresyon durumu.

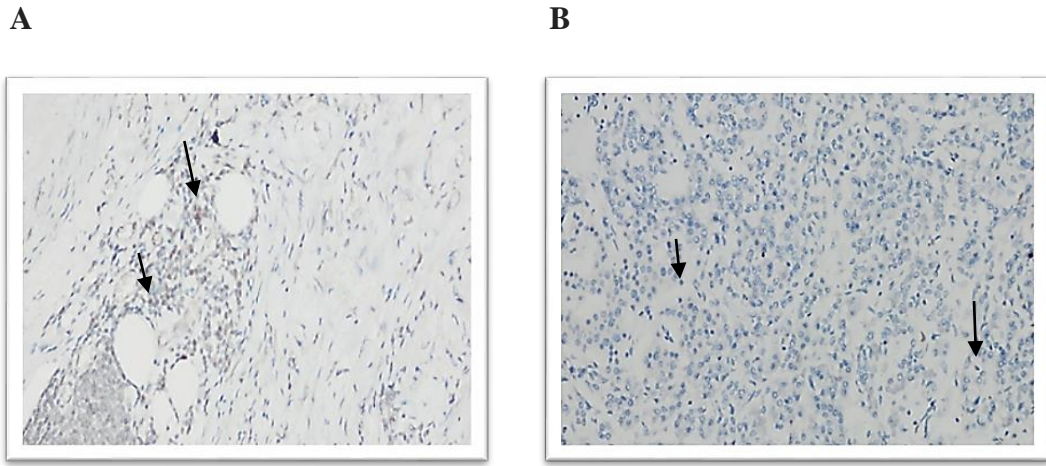


Resim 3.4. A) Anti-TIGIT düşük düzeyde ekspresyonu B) Anti-TIGIT orta düzeyde ekspresyonu C) Anti-TIGIT yüksek düzeyde ekspresyonu D) Anti-TIGIT negatif ekspresyonu.

3.4.3. PVRIG Antikorumun Değerlendirilmesi

Anti-PVRIG antikoru ile yapılan immünohistokimyasal boyamalarda pankreas tümör hücrelerini infiltre eden lenfositlerin boyanma paternlerine bakarak değerlendirilme yapıldı. Anti-PVRIG antikorumun immünohistokimyasal çalışmada kullanılmak üzere üretilen antikorumun klon çeşitliliğinin azlığı ve tam otomatik boyama cihazına uyumluluğunun kısıtlı olması bu antikorumun değerlendirilmesini güçleştirmiştir olup tümör hücrelerini çevreleyen lenfositlerde boyanma olmaması durumu negatif (0)

olarak kabul edildi. PVRIG ile boyanma görülen TIL'ler ise pozitif (1) olarak kabul edildi (Resim 3.5).



Resim 3.5. A) Anti-PVRIG antikoruna boyanan lenfosit hücresi, B) Anti-PVRIG antikoruna negatif ekspresyon gösteren lenfositler.

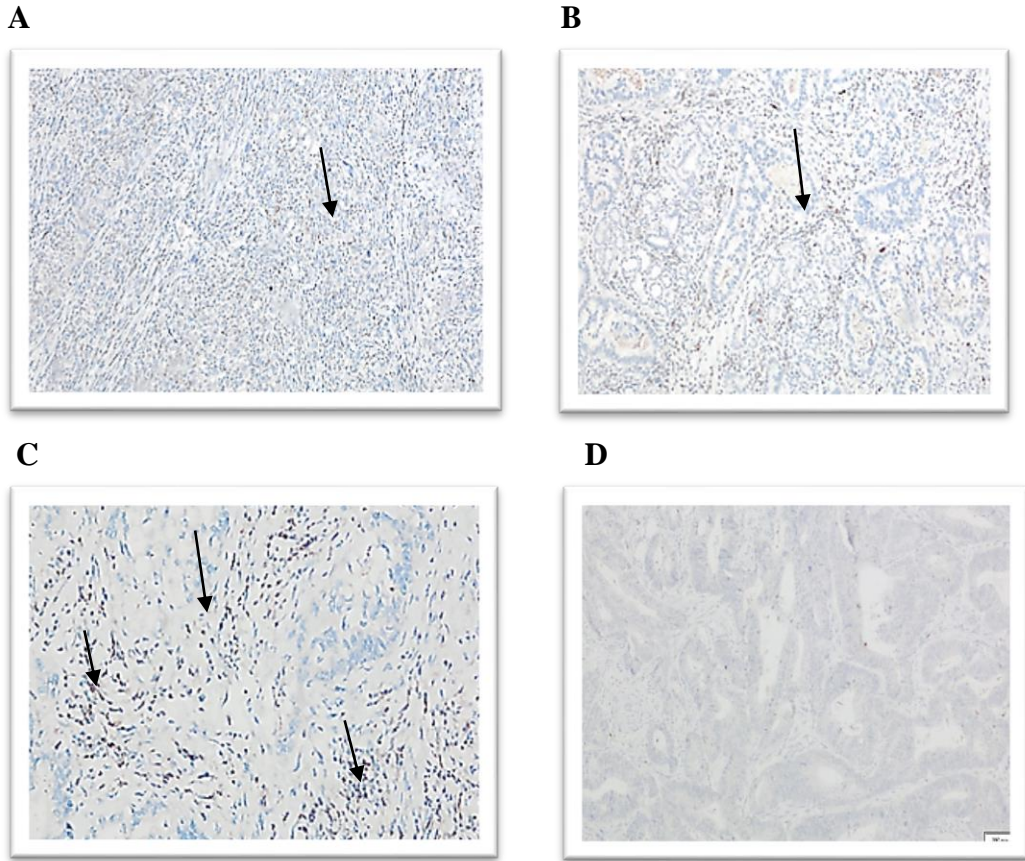
3.4.4. DNAM-1 Antikorumunun Değerlendirilmesi

DNAM-1'in immünohistokimyasal boyanmasının değerlendirilmesinde membranöz ve/veya sitoplazmik boyanma pozitif olarak kabul edildi. Anti-DNAM-1 antikoruna boyanan pankreas tümör dokularının çevresinde ve içerisinde yer alan lenfositlerdeki pozitif boyanmalar immünohistokimyasal değerlendirilmesi sonucunda belirlenen boyanma yüzdeleri kombine skorlama yöntemiyle belirlendi.

DNAM-1 pozitif lenfosit sayısı X 100

Tüm Canlı Tümör Hücre Sayısı

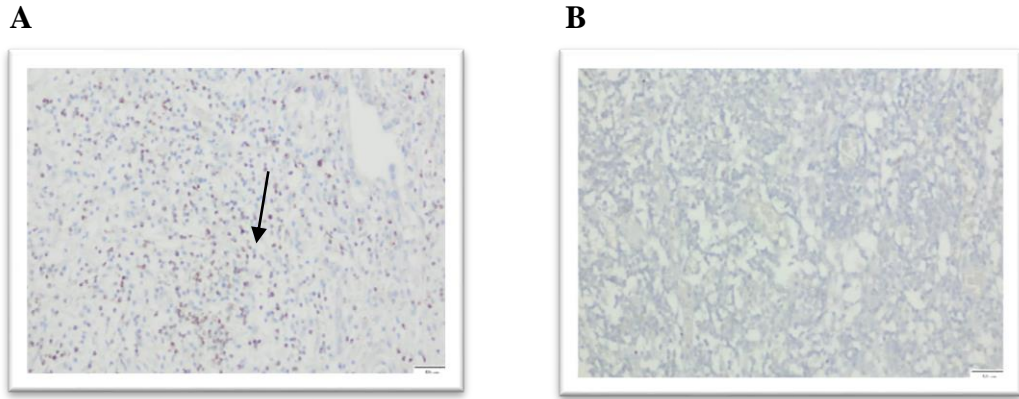
Buna göre DNAM-1 'in kombine skorlama yöntemiyle belirlediğimiz boyanma yüzdelerini; hiç boyanma olmaması durumu negatif (0), düşük oranda boyanma olması durumu %1 (+1), orta oranda boyanma olması durumu %5 (+2), yüksek oranda boyanma olması durumu \geq %10 (+3) olarak değerlendirildi. (Resim 3.6)



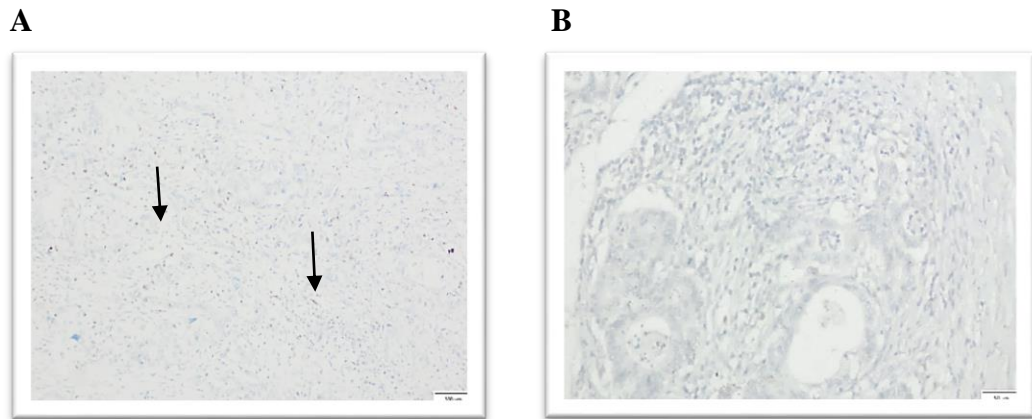
Resim 3.6. A) Anti-DNAM-1 düşük düzeyde ekspresyonu B) Anti-DNAM-1 orta düzeyde ekspresyonu C) Anti-DNAM-1 yüksek düzeyde ekspresyonu D) Anti-DNAM-1 negatif ekspresyonu.

3.4.5. LAG3, TIM3, VISTA Antikorlarının Değerlendirilmesi

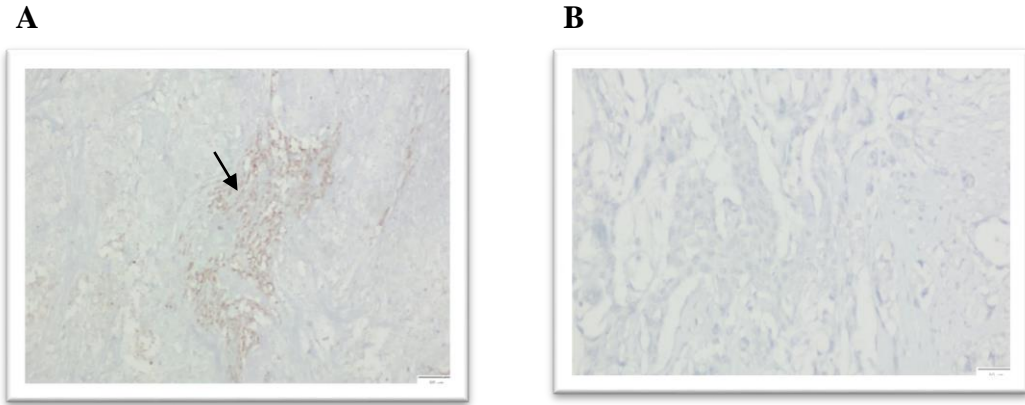
Anti-LAG3, TIM3 ve VISTA antikorları ile yapılan immünohistokimyasal boyamalarda pankreas tümör hücrelerini infiltre eden lenfositlerin boyanma paternlerine bakarak değerlendirilme yapıldı. Tümör hücrelerini çevreleyen lenfositlerde boyanma olmaması durumu negatif (0) olarak kabul edildi. LAG3, TIM3 ve VISTA ile boyanma görülen TIL'ler ise pozitif (1) olarak kabul edildi. Bu antikorlar ile pankreas tümör dokularında herhangi bir boyanma olmamıştır (Resim 3.7, 3.8, 3.9)



Resim 3.7. A) Anti-LAG3 antikoruna boyanan lenfosit hücreleri, B) Anti-LAG3 antikoruna negatif ekspresyon gösteren lenfositler.



Resim 3.8. A) Anti-TIM3 antikoruna boyanan lenfosit hücreleri, B) Anti-TIM3 antikoruna negatif ekspresyon gösteren lenfositler.

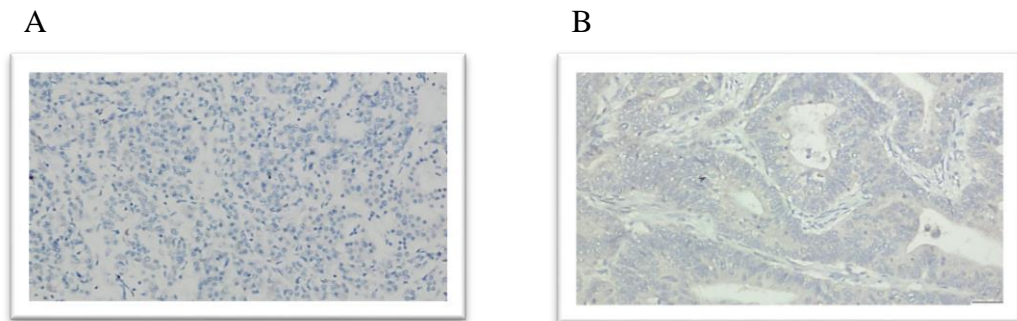


Resim 3.9. A) Anti-VISTA antikoruna ile boyanan lenfosit hücresi, B) Anti-VISTA antikoruna ile negatif ekspresyon gösteren lenfositler.

3.4.6. PD-1 ve PD-L1 Antikorlarının Değerlendirilmesi

Anti- PD-1 antikoruna ile yapılan immünohistokimyasal boyamalarda pankreas tümör hücrelerini infiltre eden lenfositlerin boyanma paternlerine bakarak değerlendirilme yapıldı. Çalışmaya dahil olan vakaların tamamında PD-1 ile hiç bir boyanma görülmedi. Tüm olgular negatif (0) olarak değerlendirildi (Resim 3.10)

FDA onaylı olan Anti- PD-L1 antikoruna ile yapılan immünohistokimyasal boyamalarda pankreas tümör hücrelerinde çalışmaya dahil olan vakaların tümünde hiçbir boyanma görülmedi. Tüm olgular negatif (0) olarak değerlendirildi (Resim 3.10).

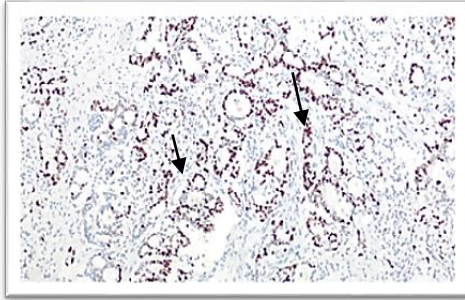


Resim 3.10. A) Anti-PD-1 antikoruna ile negatif ekspresyon gösteren lenfositler B) Anti-PD-L1 antikoruna ile negatif ekspresyon gösteren tümör hücreleri.

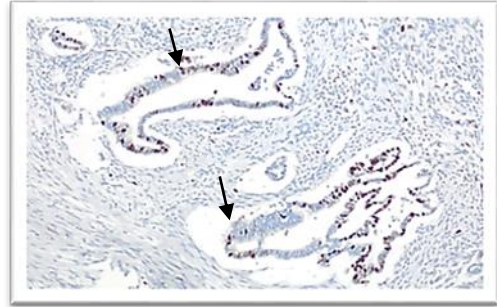
3.4.7. Kİ-67 Antikorumun Değerlendirilmesi

Pankreas kanseri dokularında tümörün proliferasyon indeksini belirlemek için Anti-Kİ-67 antikoruna ile immünohistokimyasal boyama yapıldı. Tümör hücrelerinde nükleer boyanan Kİ-67 ekspresyon düzeyi; tüm kesit yüzeyinde bulunan tümör hücrelerinde içerisinde boyanan hücre sayısına göre yarı kantitatif olarak belirlendi. Buna göre tüm hücreleri içerisinde boyanan hücre sayısı oranı $< \%50$ 'den az ise düşük (1), eğer $\geq \%50$ 'den fazla ise yüksek (2) proliferasyon gösterdiği kabul edilerek değerlendirilme yapıldı (Resim 3.11).

A



B



Resim 3.11. A) Anti-Kİ-67 antikoruna ile $\geq \%50$ yüksek boyanma, B) $< \%50$ düşük boyanma.

3.5 Çalışmada Kullanılan Malzemeler

Leica marka LM2145 model rotary mikrotom, Mikrotom bıçağı (Feather, Japonya), pozitif şarjlı lam (TOMO, Japonya), Menzel marka lamel, Ventana Benchmark Ultra immünohistokimya Boyama Cihazı, UW DAB deteksiyon kiti (Roche), UW Alkalen Fosfataz deteksiyon kiti (Roche), Olympos marka ışık mikroskopu.

3.6. İstatistiksel Analiz

Hastalara ait klinik bilgiler dahilinde laboratuvarında yapılan immünohistokimyasal boyama yöntemi ile ekspresyon düzeylerine bakılan

antikorlardan elde edilen verilerin IBM SPSS 20.0 istatistik paket programı kullanılarak analizleri yapıldı. Yaş ve tümör boyutu gibi sayısal veriler normal dağılım kriterleri olan Kolmogorov-Smirnov ve Shapiro-Wilk testleriyle incelendi. İkili gruplarda normal dağılım göstermeyenlerde Mann-Whitney U testi kullanıldı. Sayısal veriler ile kategorik verilerin analizleri Kruskal-Wallis testi ile yapıldı. Gruplandırılan klinikopatolojik bulgular ile kategorik olan ekspresyon düzeylerinin birbirleriyle karşılaştırılması için Pearson Ki-kare testi kullanıldı. Sağkalım analizi için Kaplan-Meier testi uygulandı. Genel sağkalım testi olan Log-Rank ile Breslow testleri kullanarak analiz edildi. Veri analizlerin P değeri ≤ 0.05 olanlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3.7. Etik Kurul Onayı

Çalışmamıza yönelik ilk araştırma önerisi 29.06.2021 yılında Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Etik Kurul onayına sunuldu ve GO-21/764 proje numarasıyla kabul edildi. Araştırmacı revizyonu için yeniden Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Etik Kurul onayına yeniden sunuldu. GO-21/764 nolu projemiz 15.11.2022 tarihinde yapılan toplantı kararıyla ilgili teklifimiz kabul edildi.

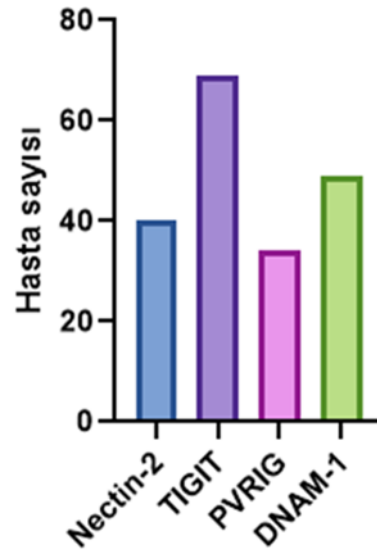
4. BULGULAR

4.1. Pankreas Kanserinde Nectin-2 ve Reseptörlerinin Ekspresyon Analizleri

Nectin-2, TIGIT, PVRIG, DNAM-1 moleküllerinin ekspresyonları immünohistokimyasal boyama yöntemiyle değerlendirildi. Bu moleküllerin birbirleriyle olan ilişkileri yanı sıra sitotoksik T lenfosit belirteci olan Anti-CD8 molekülü ve proliferasyon indeksini belirleyen Anti-Kİ-67 molekülü ile olan ilişkileri de değerlendirildi.

Tablo 4.1. Nectin-2 ve reseptörleri TIGIT, PVRIG, DNAM-1 ekspresyonunu gösteren vaka sayısı.

İmmün Kontrol Noktası Molekülleri	Pozitif Vaka sayısı(%)	Negatif Vaka sayısı(%)	n
NECTİN-2	40 (%30,5)	91 (%69,5)	131
TIGIT	69 (%52,6)	62 (%47,4)	131
PVRIG	34 (%26)	97 (%74)	131
DNAM-1	49 (%37,4)	82 (%62,6)	131



Şekil 4.1. Nectin-2 ve Reseptörlerinin ekspresyonunu gösteren vaka sayısı.

Tümör hücrelerindeki Nectin-2 pozitifliği dikkate alınarak boyanma skorlarına göre ekspresyonu değerlendirildi. Normal pankreas hücrelerinde Nectin-2 ekspresyonu görülmezken incelenen 40 (%30,5) vakanın tümör dokularında Nectin-2 ekspresyonunun pozitif olduğu belirlendi. Buna karşılık 91 (%69,5) vakanın tümör dokusunda ise Nectin-2 ekspresyonu görülmedi (Tablo 4.1.) (Şekil 4.1.)

CD8 molekülü boyanarak, boyanması değerlendirilen tümör infiltre eden lenfositlerin sayısı üç farklı düzeyde değerlendirildi; düşük, orta, yüksek. Çalışmaya alınan tüm hastaların tümör dokularında CD8⁺ hücre pozitifliği mevcuttu fakat yoğunlukları farklıydı. Hastaların 76 (%58)'sında düşük yoğunlukta boyanma, 28 (%21,4)'inde orta yoğunlukta, 27 (%20,6)'sinde ise yüksek yoğunlukta CD8⁺ T hücresi izlendi (Tablo 4.2).

Tablo 4.2 CD8⁺ hücre sayısının hastalara göre dağılımı.

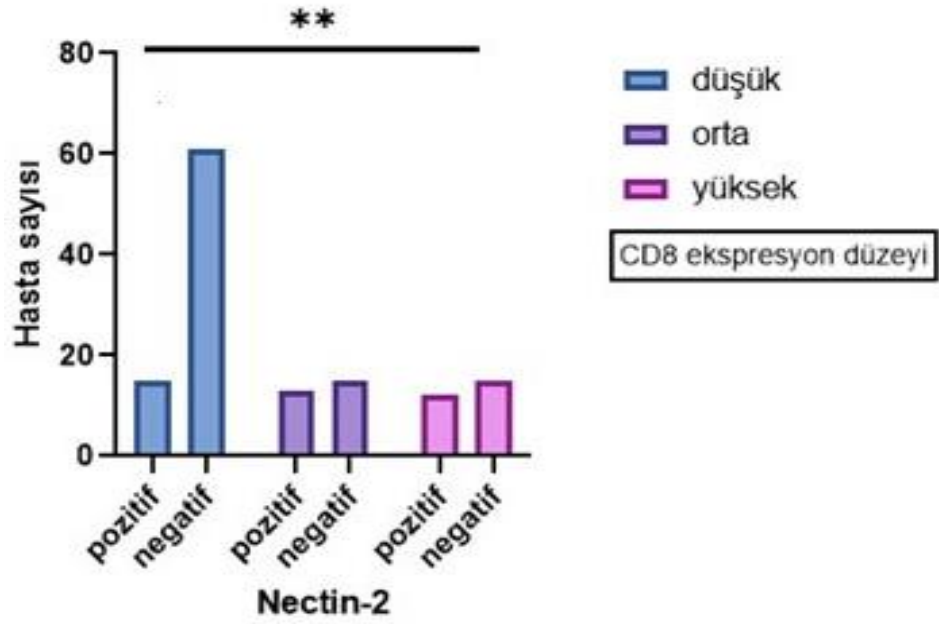
CD8 hücre sayısı	Hasta Sayısı, n (%)
≤60 (Düşük)	76 (%58)
60<,< 120 (Orta)	28 (%21,4)
≥ 120 (Yüksek)	27 (%20,6)
Toplam n	131 (%100)

Tablo 4.3. Nectin-2 ekspresyonunun CD8 ve KI-67 ekspresyon düzeyleri ile ilişkisi.

Nectin-2	CD8 ⁺ Hasta sayısı, n (%)			KI67+ Hasta sayısı, n (%)	
	Düşük	Orta	Yüksek	Düşük	Yüksek
Pozitif	15 (%37,5)	13 (%32,5)	12 (%30)	8 (%19)	32 (%36)
Negatif	61 (%67)	15 (%16,5)	15 (%16,5)	34 (%81)	57 (%64)
P	0,0068			0,0788	

Nectin-2 ekspresyonunun pozitif olduğu hastaların sırasıyla %37,5 düşük, %32,5’inde orta, %12’sinde yüksek yoğunlukta sitotoksik T lenfosit varlığı izlendi. Nectin-2’nin negatif olduğu hastaların ise %57’inde düşük, %16,5’inde orta, %16,5’inde yüksek yoğunlukta CD8 varlığı görüldü (Tablo 4.3). Nectin-2 ekspresyonunun varlığı ile CD8⁺ hücrelerin yoğunluğu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki tespit edildi ($p=0,0068$), (Tablo 4.3), (Şekil 4.2).

CD8 TIL’lerin düşük yoğunlukta olduğu grupta, Nectin-2 ekspresyonunun negatif olduğu hasta sayısının, pozitif olan hasta sayısına göre daha fazla olduğu görüldü. (Şekil 4.2).



Şekil 4.2 Nectin-2 molekülünün CD8 ile ilişkisi.

Çalışmaya alınan hastaların tümör dokularında, hücre proliferasyon göstergesi olan Ki-67 ekspresyonuna bakıldığında, vakaların 42 (%32)' sinin tümör dokusunda düşük ekspresyon görülürken, 89 (%68) hastada yüksek ekspresyon düzeyleri gösterdiği belirlendi (Tablo 4.4).

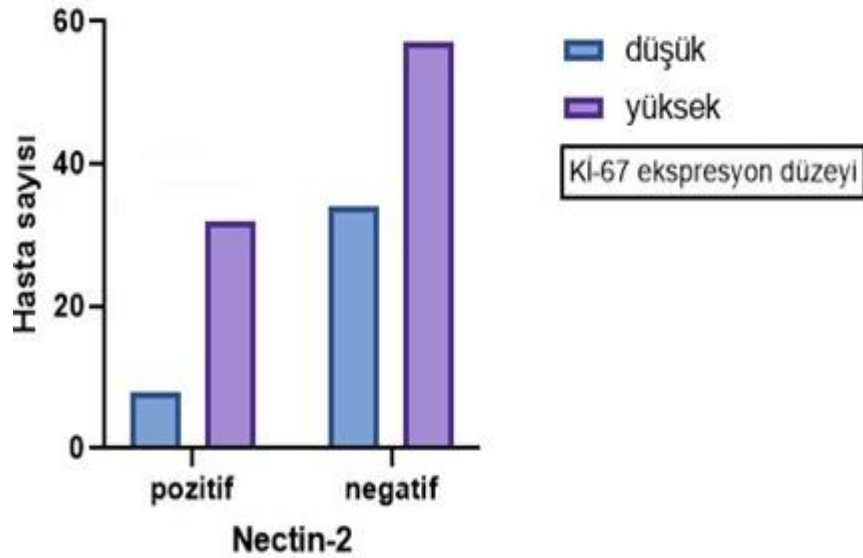
Tablo 4.4. Ki67+ hücre sayısının hastalara göre dağılımı proliferasyon indeksi.

Ki67+ Hücre Sayısı	Hasta Sayısı n, (%)
< 50 (Düşük)	42 (%32)
≥ 50 (Yüksek)	89 (%68)
Toplam n	131 (%100)

Nectin-2 ekspresyonu görülen hasta grubunda, Ki-67 ekspresyonu 8 (%19) hastada düşük, 32 (%36) hastada yüksek oranda pozitif olarak tespit edildi. Nectin-2

ekspresyonunun pozitif olduğu grupta izlendi. Nectin-2'nin negatif olduğu hasta grubunda ise %81 düşük, %64 yüksek oranlarda KI-67+ hücre bulunduğu saptandı. (Tablo 4.3) Nectin-2 ekspresyonu ile KI-67+ hücre sayısı arasında anlamlı bir ilişki tespit edilemedi ($p=0,0788$), (Şekil 4.3)

Nectin-2'nin pozitif ekspresyonunun olduğu grupta, KI-67 ekspresyonunun yüksek olan hasta sayısının, düşük ekspresyon gösteren hasta sayısından daha fazla olduğu görüldü. (Tablo 4.3), (Şekil 4.3)



Şekil 4.3 Nectin-2 molekülünün KI-67 ile ilişkisi.

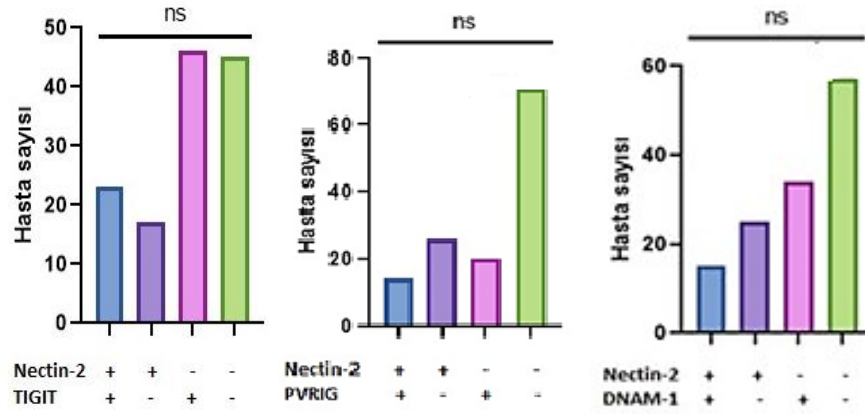
Tablo 4.5 Nectin-2 ekspresyon varlığı ile reseptörlerinin ekspresyonları arasındaki ilişkisi.

Nectin-2	TIGIT		PVRIG		DNAM-1	
	Pozitif (n)	Negatif (n)	Pozitif (n)	Negatif (n)	Pozitif (n)	Negatif (n)
Pozitif	23 (%33,3)	17 (%27,4)	14 (%41,2)	26 (%26,8)	15 (%30,5)	25 (%30,5)
Negatif	46 (%66,6)	45 (%72,6)	20 (%58,8)	71 (%73,2)	34 (%69,5)	57 (%69,5)
P	0,5866		0,1772		0,6565	

(n= hasta sayısı)

Çalışmaya dahil olan hasta grubunun 62 (%47,4)'sinde TIGIT ekspresyonunun negatif olduğu tespit edildi. TIGIT ekspresyonunun pozitif boyandığı vaka sayısının 69 (%52,6) olduğu belirlendi. PVRIG ekspresyonunun pozitif olduğu grupta hasta sayısı 34 (%26) iken negatif olan hastaların sayısı 97 (%74) olarak tespit edildi. Pankreas kanseri dokularındaki DNAM-1 ekspresyonunun 82 (% 62,6) hastada negatif olduğu görüldü. DNAM-1 ekspresyonunun pozitif olduğu hasta sayısının 49 (% 37,4) olduğu belirlendi (bkn. Tablo 4.1).

Nectin-2 molekülünün ekspresyon düzeyleri ile reseptörleri olan TIGIT, PVRIG, DNAM-1'in ekspresyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamadı ($p=0,5866$, $p=0,1772$, $p=0,6565$), (Tablo 4.5). Nectin-2 ekspresyonu bulunmayan hastaların %73,2'inde PVRIG, %69,5'inde ise DNAM-1 ekspresyonunun olmadığı tespit edildi (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. Nectin-2'nin reseptörleriyle olan ilişkisi.

4.2. Pankreas Kanserinde TIGIT Ekspresyonu ile Nectin-2, PVRIG ve DNAM-1'in Ekspresyon Analizleri

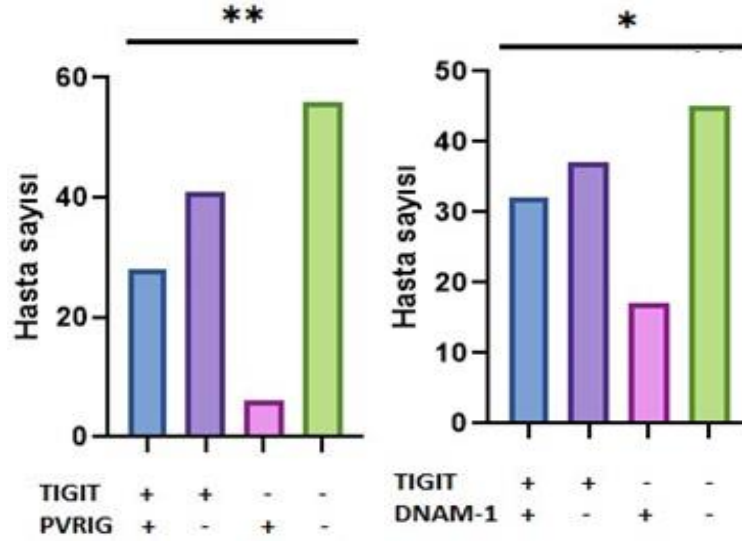
Tablo 4.6 TIGIT molekülünün Nectin-2, PVRIG ve DNAM-1 ile ilişkisi

TIGIT	PVRIG		DNAM-1	
	Pozitif (n)	Negatif (n)	Pozitif (n)	Negatif (n)
Pozitif	28 (%40,6)	41 (%59,4)	32 (%46,4)	37 (%53,6)
Negatif	6 (%9,68)	56 (%90,32)	17 (%27,4)	45 (%72,6)
P	<0,0001		0,004	

(n= hasta sayısı)

TIGIT molekülünün pankreas kanseri tanısı almış vakalardaki ekspresyon düzeyi ile diğer Nectin-2 reseptörleri olan PVRIG ve DNAM-1'in ekspresyon düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olduğu bulundu (sırasıyla $p < 0,0001$, $p = 0,004$), (Tablo 4.6). TIGIT molekülünün negatif ekspresyonunun bulunduğu vakalarda PVRIG molekülünün negatif olduğu vaka sayısının da yüksek

olduğu görüldü (Şekil 4.5). TIGIT negatif vakalarda DNAM-1 molekülünün ekspresyonu olmayan vakaların %72 olduğu tespit edildi (Şekil 4.5).

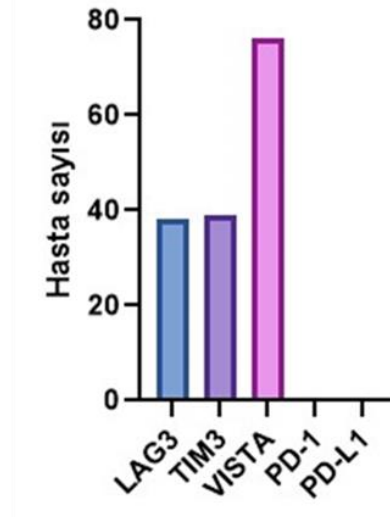


Şekil 4.5 TIGIT molekülünün PVRIG ve DNAM-1 ekspresyonu ile ilişkisi.

4.3. Pankreas Kanserinde LAG3, TIM3, VISTA, PD-1 ve PD-L1 Moleküllerinin Ekspresyon Analizleri

Tablo 4.7. İmmün kontrol noktası moleküllerinin ekspresyonlarının hastalara göre dağılımı.

Diğer İmmün Kontrol Noktası Molekülleri	Pozitif Vaka sayısı(%)	Negatif Vaka sayısı(%)	Toplam n
PD-1	0 (%0)	131 (%100)	131
PD-L1 (Ligand)	0 (%0)	131 (%100)	131
LAG3	38 (%29)	93 (%71)	131
TIM3	39 (%29,8)	92 (%70,2)	131
VISTA	76 (%58)	55 (%42)	131



Şekil 4.6. İmmün kontrol noktası moleküllerinin ekspresyonu

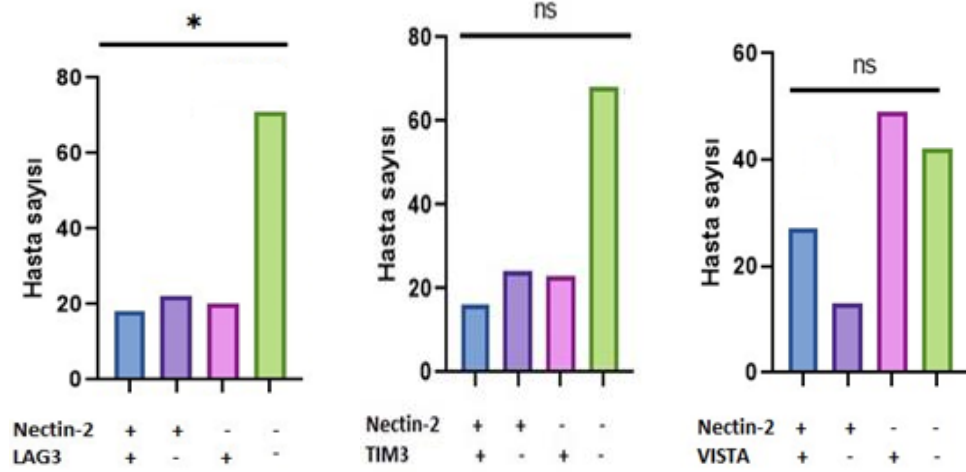
Pankreas kanseri hasta dokularından elde edilen kesitlerden önemli immün kontrol noktası moleküllerinden olan LAG3, TIM3, VISTA, PD-1 ve PD-L1'in ekspresyon düzeyleri de immünohistokimyasal yöntemle belirlendi. Çalışmada yer alan 131 vakanın tümünde PD-1 ve PD-L1 ekspresyonu negatif olarak izlendi. Buna karşın Anti-LAG3 antikoruyla pozitif boyanan vaka sayısı 38 (%29) iken negatif gruptaki vaka sayısı 93 (%71) olarak belirlendi. Anti-TIM3 antikoruyla pozitif olan vaka sayısı 39 (%29,8) iken vakaların 92 (% 70,2)'sinde negatif boyanma görüldü. Anti-VISTA antikoruyla ekspresyon seviyesine bakıldığında 76 (%58)'sında pozitif boyanma izlenirken 55 (%42) vakada ise negatif boyanma izlendi. (Tablo 4.7), (Şekil 4.6).

Tablo 4.8. Nectin-2 ekspresyonu ile LAG3, TIM3, VISTA, PD-1 ve ligandı PD-L1 ekspresyonu arasındaki ilişki.

Nectin-2	LAG3		TIM3		VISTA		PD-1	PD-L1
	Pozitif (n)	Negatif (n)	Pozitif (n)	Negatif (n)	Pozitif (n)	Negatif (n)	Negatif (n)	Negatif (n)
Pozitif	18 (%47,4)	22 (%23,7)	16 (%41)	24 (%26)	27 (%35,5)	13 (%23,6)	40 (%30,5)	40 (%30,5)
Negatif	20 (%52,6)	71 (%76,3)	23 (%59)	68 (%74)	49 (%64,5)	42 (%76,4)	91 (%69,5)	91 (%69,5)
P	0,0137		0,0909		0,1470		>0,05	>0,05

(n= hasta sayısı)

Nectin-2 ligandının ekspresyonu ile T hücre aktivasyonunun sonlandırılmasında rol oynayan immün kontrol noktası molekülleri TIM3, VISTA, PD-1 ve PD-L1 ekspresyonları karşılaştırıldığında, oranlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı. LAG3 ekspresyonu ile karşılaştırıldığında ise oranlar arası farkın anlamlı olduğu tespit edildi ($p=0,0137$). Nectin-2 ekspresyonunun negatif olduğu hastalarda LAG3 ve TIM3 ekspresyonlarının da negatif olduğu hasta sayısının daha fazla olduğu saptandı. Nectin-2'nin pozitif ekspresyon gösterdiği grupta VISTA ekspresyonu pozitif hasta oranının % 67,5 olduğu saptandı (Tablo 4.8), (Şekil.4.7).



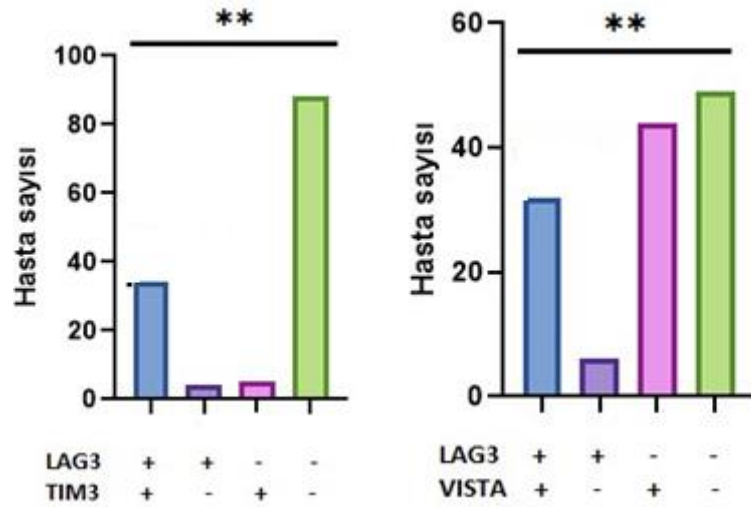
Şekil 4.7. Nectin-2 ekspresyonu ile LAG3, TIM3, VISTA ekspresyonu arasındaki ilişki

Tablo 4.9. LAG3 ile diğer immün kontrol noktası moleküllerinin ekspresyonu arasındaki ilişki.

LAG3	TIM3		VISTA		PD-1	PD-L1
	Pozitif (n)	Negatif (n)	Pozitif (n)	Negatif (n)	Negatif (n)	Negatif (n)
Pozitif	34 (%87,2)	4 (%4,3)	32 (%42,1)	6 (%10,9)	38 (%29)	38 (%29)
Negatif	5 (%12,8)	88 (%95,7)	44 (%57,9)	49 (%89,1)	93 (%71)	93 (%71)
P	<0,0001		<0,0001		>0,05	>0,05

(n=hasta sayısı)

LAG3 molekülü ile diğer immün kontrol noktası moleküllerinin ekspresyonları ile olan ilişki düzeyleri incelendiğinde LAG3'ün pozitif ve negatif ekspresyonlarının saptandığı bağımsız gruplarda TIM3 ve VISTA ekspresyonları arasında anlamlı bir fark görüldü ($p < 0,0001$) (Tablo 4.9). LAG3'ün pozitif ekspresyonunun olduğu 38 hastanın 32 (%84)'sinde VISTA pozitifliği saptandı. LAG3 ekspresyonunun negatif olduğu grupta ise TIM3'ün de negatif ekspresyon gösterme eğiliminde olduğu görüldü (Şekil 4.8).



Şekil 4.8 LAG3 ekspresyonu ile TIM3 ve VISTA ekspresyonu arasındaki ilişki.

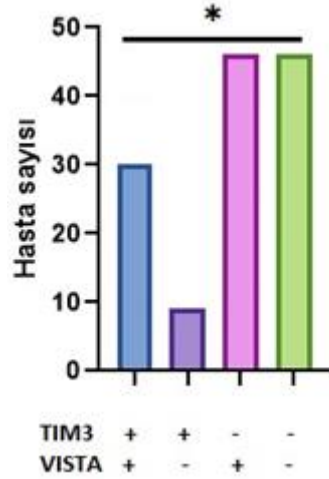
Tablo 4.10. TIM3 ekspresyonu ile diğer immün kontrol noktası moleküllerinin ekspresyonu arasındaki ilişki.

TIM3	VISTA		PD-1	PD-L1
	Pozitif (n)	Negatif (n)	Negatif (n)	Negatif (n)
Pozitif	30 (%39,5)	9 (%16,4)	39 (%29,8)	39 (%29,8)
Negatif	46 (%60,5)	46 (%83,6)	92 (%70,2)	92 (%70,2)
P	0,0078		>0,05	>0,05

(n= hasta sayısı)

Çalışmadaki diğer molekül olan TIM3'ün ekspresyon düzeyi diğer immün kontrol noktası moleküllerinin ekspresyonları ile karşılaştırıldı. TIM3 inhibitörünün pozitif ekspresyon gösterdiği grupta VISTA molekülünün de pozitif ekspresyonları

arasında anlamlı bir fark olduğu görüldü (Şekil 4.9). TIM3 molekülü ile VISTA arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olduğu bulundu ($p=0,0078$), (Tablo 4.10)

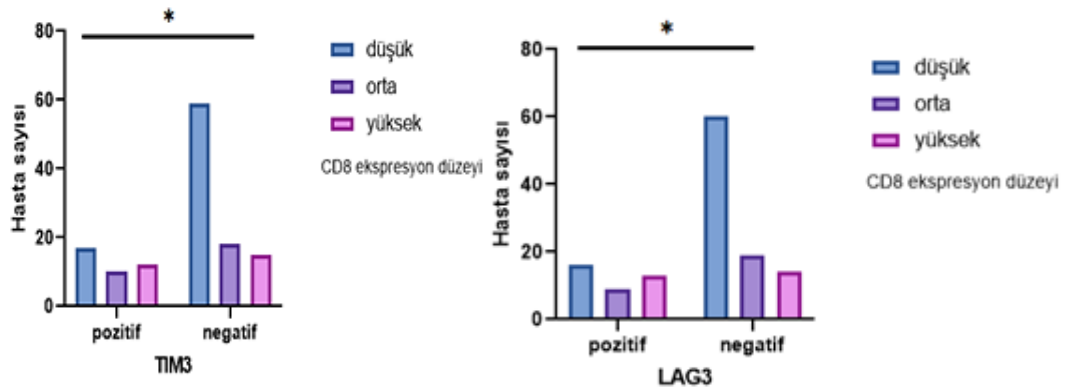


Şekil 4.9 TIM3 ile VISTA arasındaki ilişki.

Tablo 4.11. TIM3 ve LAG3 moleküllerinin CD8 ile ilişkisi.

TIM3	CD8 ⁺ Hasta sayısı, n (%)		
	Düşük	Orta	Yüksek
Pozitif	17 (%43,6)	10 (%25,6)	12 (%30,8)
Negatif	59 (%64,1)	18 (%19,6)	15 (%16,3)
P	0,0226		
LAG3	Düşük	Orta	Yüksek
Pozitif	16 (%42,1)	9 (%23,7)	13 (%34,2)
Negatif	60 (%64,5)	19 (%20,4)	14 (%15,1)
P	0,0264		
VISTA	Düşük	Orta	Yüksek
Pozitif	32 (%58,2)	12 (%21,8)	11 (%20)
Negatif	44 (%57,9)	16 (%21,1)	16 (%21,1)
P	0,987		

Bu çalışmada ayrıca önemli immün kontrol noktası moleküllerinin sitotoksik T lenfositlerle olan ilişkisi de incelendi. LAG3 ve TIM3 moleküllerinin negatif ekspresyon gösterdiği grupta CD8 ekspresyonları arasında anlamlı bir fark olduğu görüldü ($p=0,007$, $p=0,009$). Sonuç olarak LAG3 ve TIM3 moleküllerinin CD8⁺ T lenfositlerin ekspresyon miktarları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olduğu belirlendi ($p=0,0226$), ($p=0,0264$), (Tablo 4.11), (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. TIM3 ve LAG3 ekspresyonunun CD8 ile ilişkisi.

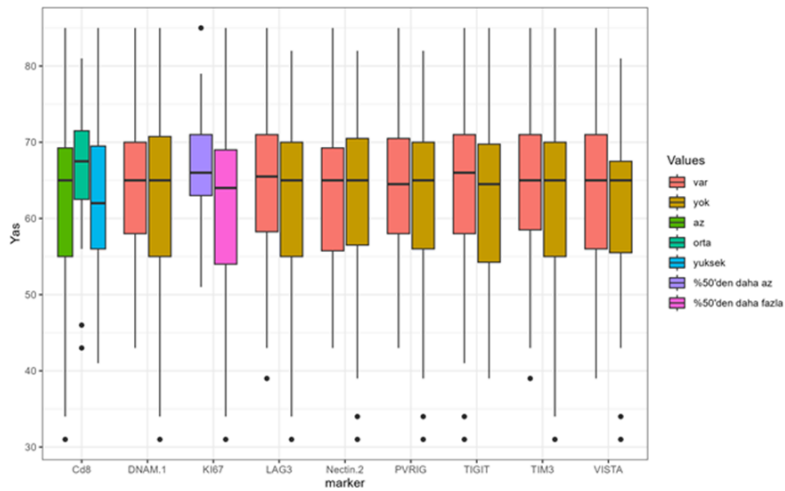
4.4. Pankreas Kanseri Tanılı Hastaların Yaş ve Cinsiyet Dağılımı

Çalışmamızda incelenen pankreas kanseri tanısı alan 165 olgunun hematoksilen&eosin kesitleri yeniden değerlendirilerek 24 olgunun dokularında yeterli tümör alanı bulunmadığından değerlendirme dışı bırakıldı. Değerlendirmeye 131 olgu ile devam edildi. Hastaların cinsiyetine göre dağılımlarına bakıldığında 77'si (%58,7) erkek, 54'ü (%41,2) kadındır. Hastaların yaş aralığı 31 ile 85 arasında değişmekte olup yaş ortalaması 63,27'dir. Pankreas kanseri tanısı almış erkek hastaların sayısının kadın hastaların sayısından fazla olduğu görüldü. Erkek hastalar ile kadın hastaların yaş ve cinsiyet dağılımı incelendiğinde aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamadı ($p=0,1070$, $p>0,05$). (Tablo 4.12)

Tablo 4.12. Pankreas Kanseri Hastaların Cinsiyet ve Yaş Dağılımı.

Cinsiyet	N	Yaş Ortalama	Standart Sapma	Min.-Max. Yaş Aralığı
Erkek	77	62,36	1,185	34-81
Kadın	54	64,57	1,434	31-85

Pankreas kanseri tanısı almış olan 131 vakanın tanı alma yaşının immün kontrol noktası inhibitörleriyle olan ilişkisine bakıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamadı (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. Pankreas kanseri tanısı alma yaşının immün kontrol noktası moleküllerinin ile karşılaştırılması.

4.5. Pankreas Kanseri Hastalarının Klinikopatolojik Özellikleri ile İmmünohistokimyasal Bulguların Karşılaştırılması

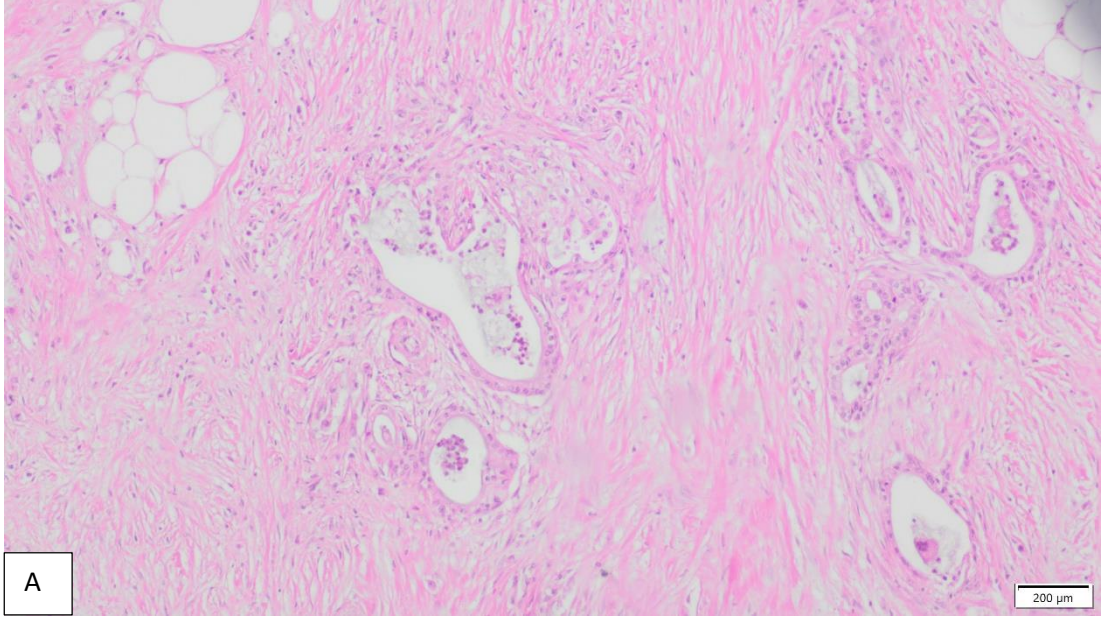
Çalışmadaki hastaların preparatları yeniden değerlendirildiğinde hastaların klinik öyküleri araştırılırken, dikkate alınan başlıca histopatolojik özellikler şunlardır: hastalara ait tümörlerin histopatolojik alt tipleri ve dereceleri, tümörün çapı, lenfovasküler ve perinöral invazyonlar ile hastaların varsa metastatik lenf nodu tutulumları kaydedildi. Bu hastaların klinik evre bilgileri klinik onkoloji bölümünün hasta arşiv dosyalarından yararlanıldı. Genel sağkalım süresi Medulla sistemi kullanılarak belirlendi. Hastalara ait klinikopatolojik bulgular Tablo 4.13’de gösterilmiştir.

Tablo 4.13. Hasta tümör dokularının histopatolojik özellikleri.

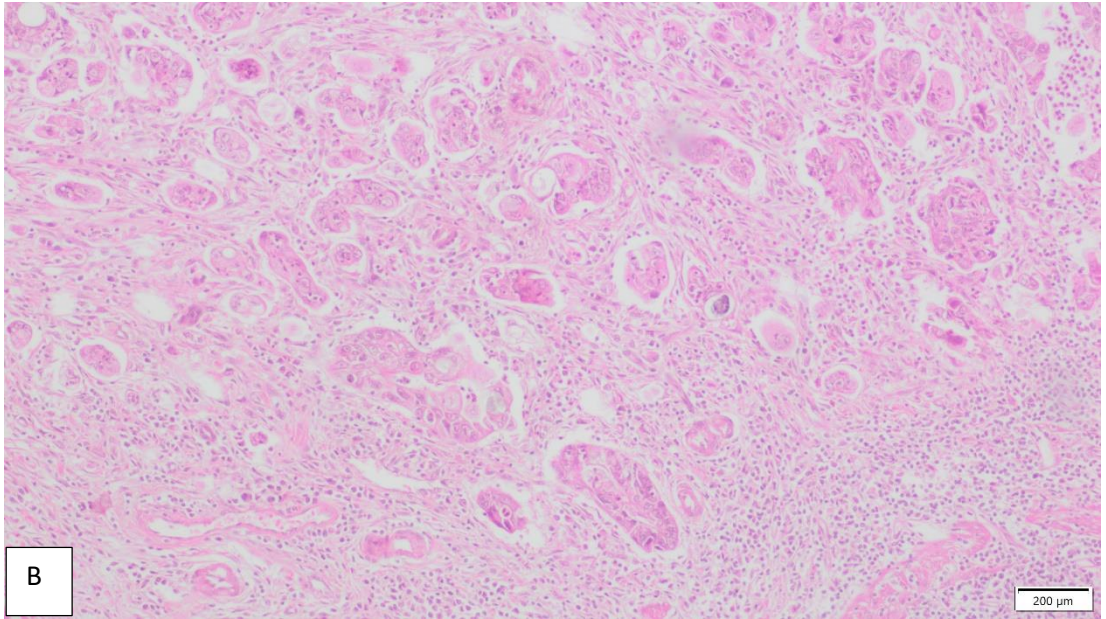
Hasta Tümör Dokularının Histopatolojik Özellikleri.			
		n	%
Histopatolojik Alt Tip	Adenokarsinom	44	33.5
	Adenoskuamöz karsinom	4	3.1
	Anaplastik karsinom	2	1.5
	Duktal Adenokarsinom	78	59.5
	Müsinöz Adenokarsinom	3	2.2
Histopatolojik Grade	İyi Diferansiye	42	32.1
	Orta Diferansiye	67	51.1
	Az Diferansiye	22	16.7
Tümör Çapı	<4cm	95	72.6
	>4cm	36	27.4
	var	90	68.7

Lenfovasküler invazyon	yok	41	31.2
Perinöral invazyon	var	109	83.2
	yok	22	16.7
Metastatik lenf nodu	var	86	65.6
	yok	45	34.3
Klinik Evre	IA	3	2.30
	IB	22	16.8
	2A	16	12.21
	2B	47	35.87
	3	35	26.71
	4	8	6.10
Genel Sağkalım	Yaşıyor	12	9.16
	Ex	119	90.84

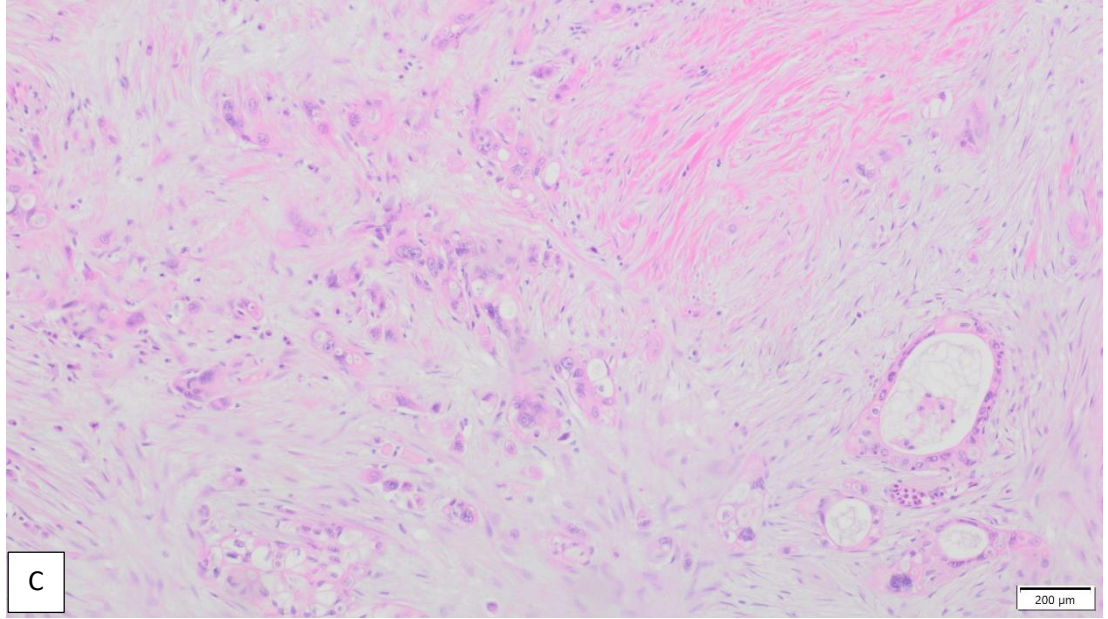
Preparatlar yeniden değerlendirildikten sonra tüm olgular içinde Adenokarsinom tanılı olguların 44'ü (%33,5), Adenoskuamöz karsinom tanılı olguların 4'ü (%3,1) Anaplastik karsinom tanısı alan 2'sinin (%1,5), Duktal adenokarsinom tanılı olguların 78'nin (%59,5) ve Müsinöz adenokarsinom tanısı alan 3'nün (%2,2) tanısı teyit edilmiştir. Tümörlerin histopatolojik derecesine bakıldığında en yaygın olarak Orta diferansiye (grade 2) izlenmiş olup 67 hastanın (%51,1) bu grupta yer aldığı görüldü. 42 hastanın (%32,1) iyi diferansiye, 22 hastanın ise (%16,7) az diferansiye tümörü olduğu görüldü. Mikroskopik incelemelerde lenfovasküler ve perinöral invazyonların varlığına bakıldığında 90 hastada lenfovasküler invazyon görülürken hastaların 109'unda ise perinöral invazyon varlığı tespit edilmiştir. Eşlik eden diğer bulgular arasında metastatik lenf nodu tutulumu görülen hasta sayısı 86 (%65,6) olarak belirlenmiştir. Pankreas kanserine ait histopatolojik tipler Resim 4.1 A,B,C' de gösterilmiştir.



Resim 4.1.A) İyi derecede diferansiye adenokarsinom, pankreas, H&E x20

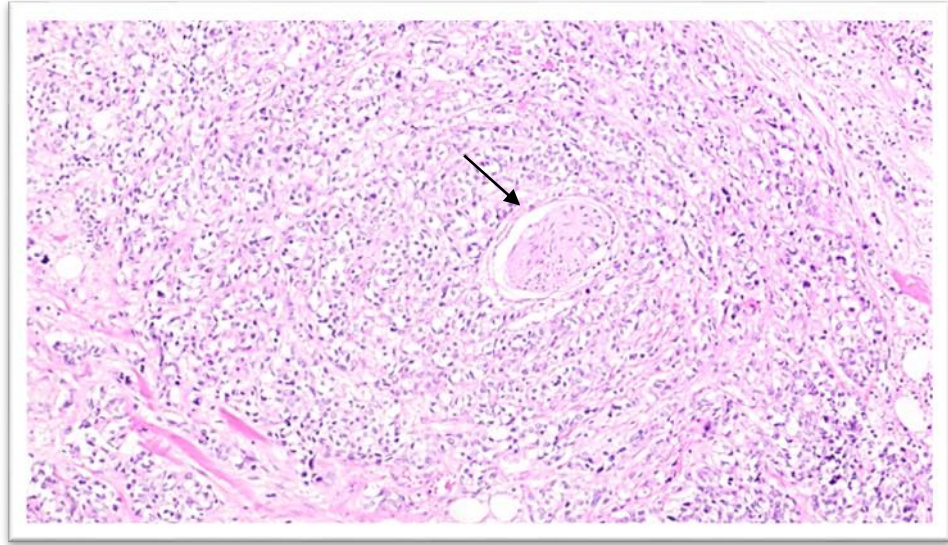


Resim 4.1.B) Orta derecede diferansiye adenokarsinom, pankreas, H&E x20



Resim 4.1. C) Az derecede diferansiye adenokarsinom, pankreas, H&E x40

Mikroskopik incelemelerde lenfovasküler ve perinöral invazyonların varlığına bakıldığında 90 hastada anjiolenfatik invazyon görülürken hastaların 109'unda ise perinöral invazyon varlığı tespit edilmiştir (Resim 4.2). Eşlik eden diğer bulgular arasında metastatik lenf nodu tutulumu görülen hasta sayısı 86 (%65,6) olarak belirlenmiştir.



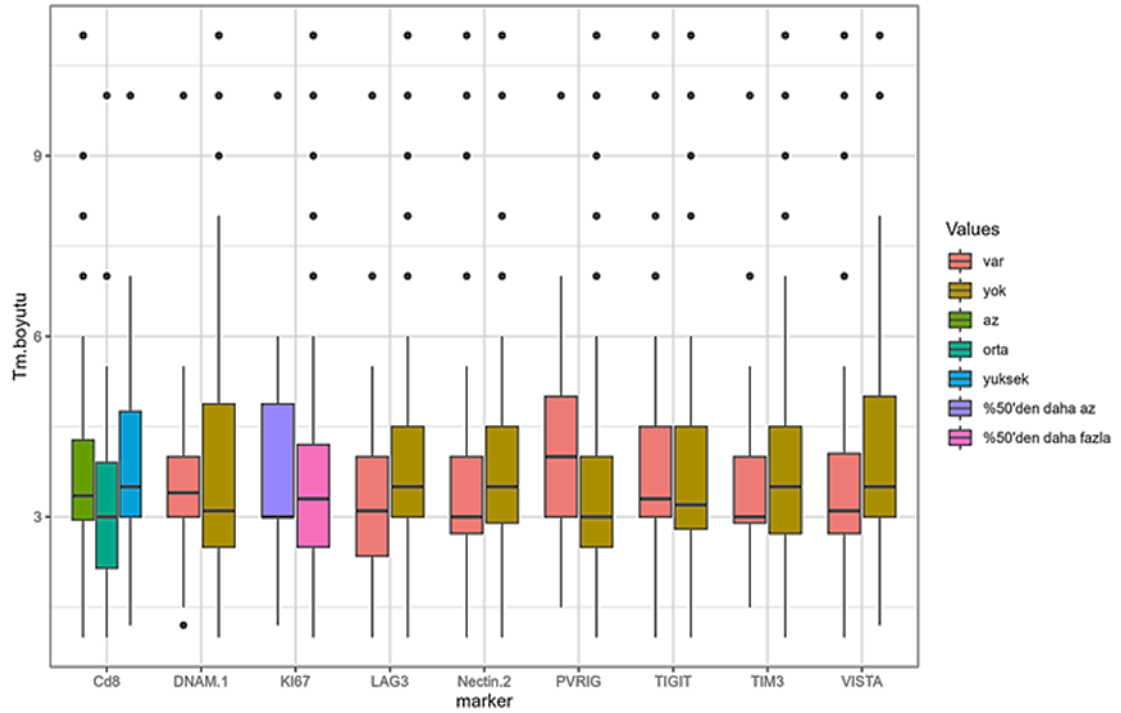
Resim 4.2. Pankreas kanseri dokusundaki perinöral invazyon varlığı.

Pankreas kanseri tanısı almış hastaların dokularından elde edilen kesitlere immünohistokimyasal boyama yöntemiyle Nectin-2 ligandının ve onun reseptörleri olan TIGIT, PVRIG ve DNAM-1'in ekspresyon seviyeleri belirlendi ve elde edilen bu bulgular hastaların histopatolojik özellikleri ile karşılaştırıldı. Nectin-2, TIGIT, PVRIG, DNAM-1 ekspresyonları ile lenf nodu metastazı, perinöral invazyon ve lenfovasküler invazyon varlığını gösteren histopatolojik özellikler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamadı. Dünya sağlık örgütü tarafından 2013 yılında belirlenen kriterlere göre tümörlerin derecelendirilmesi az, orta ve iyi diferansiye adenokarsinom olarak yapıldı. Pankreas kanserindeki tümör derecesini Nectin-2, TIGIT, PVRIG, DNAM-1 ekspresyonları ile karşılaştırdığımızda aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olmadığı görüldü ($p>0.05$). Bir diğer histopatolojik özellik olan tümör boyutunun Nectin-2, TIGIT, PVRIG, DNAM-1 ekspresyonları ile ilişkisine bakıldığında PVRIG molekülü ile aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulundu ($p=0,02$), (Tablo 4.14). PVRIG ile pozitif boyanan grupta tümör boyutunun medyanı 4 cm iken, negatif ekspresyon gösterdiği grupta ise 3 cm olduğu belirlendi (Şekil 4.12).

Tablo 4.14. Klinikopatolojik özellikler ile immünohistokimyasal bulguların karşılaştırılması.

İmmün Kontrol		Nectin-2		TIGIT		PVRİG		DNAM-1	
Noktası Molekülleri		Pozitif (n)	Negatif (n)	Pozitif (n)	Negatif (n)	Pozitif (n)	Negatif (n)	Pozitif (n)	Negatif (n)
Lenf Nodu Metastazı	var	27 (%31,4)	59 (%68,6)	47 (%68,1)	39 (%63)	26 (%30,2)	60 (%69,8)	34 (%69,4)	52 (%63,5)
	yok	13 (%28,9)	32 (%71,1)	22 (%31,9)	23 (%37)	8 (%17,8)	37 (%82,2)	15 (%30,6)	30 (%36,5)
P		0,7695		0,6791		0,1244		0,2955	
Perinöral İnvazyon	var	34 (%31,2)	75 (%68,8)	54 (%78,3)	55 (%88,7)	29 (%26,6)	80 (%73,4)	43 (%87,8)	66 (%80,5)
	yok	6 (%27,3)	16 (%72,7)	15 (%21,7)	7 (%11,3)	5 (%22,7)	17 (%77,3)	6 (%12,2)	16 (%19,5)
P		0.7183		0.1714		0.7077		0.2696	
Lenfovasküler İnvazyon	var	28 (%30,1)	65 (%69,9)	50 (%72,5)	43 (%69,4)	28 (%30,1)	65 (%69,9)	37 (%75,5)	56 (%68,3)
	yok	12 (%31,6)	26 (%68,4)	19 (%27,5)	19 (%30,6)	6 (%15,8)	32 (%84,2)	12 (%24,5)	26 (%31,7)
P		0,8694		0,7470		0,0911		0,2070	
Tümör Derecesi	az	5 (%22,7)	17 (%77,3)	12 (%17,4)	10 (%16,1)	7 (%31,8)	15 (%68,2)	12 (%24,5)	10 (%12,2)
	orta	22 (%32,8)	45 (%67,2)	38 (%55,1)	29 (%46,8)	19 (%28,4)	48 (%71,6)	17 (%34,7)	50 (%61)
	iyi	13 (%31)	29 (%69)	19 (%27,5)	23 (%37,1)	8 (%19)	34 (%81)	20 (%40,8)	22 (%26,8)
P		0,6018		0,4006		0,2239		0,7706	
Tümör Boyutu		40 (%30,5)	91 (%60,5)	69 (%52,7)	62 (%47,3)	34 (%26)	97 (%74)	49 (%37,4)	82 (%62,6)
P		0,315		0,281		0,02		0,725	
Klinik Evre		0,0652		0,6275		0,1279		0,018	
Genel Sağlıkım		0,663		0,748		0,291		0,148	

(n= Hasta sayısı)

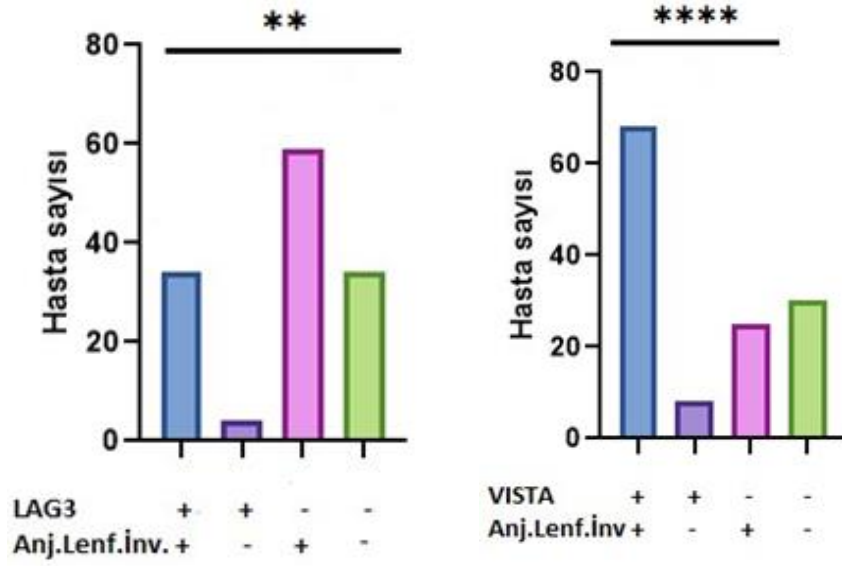


Şekil 4.12. Pankreas kanserindeki tümör boyutunun immün kontrol noktası molekülleri ile karşılaştırılması.

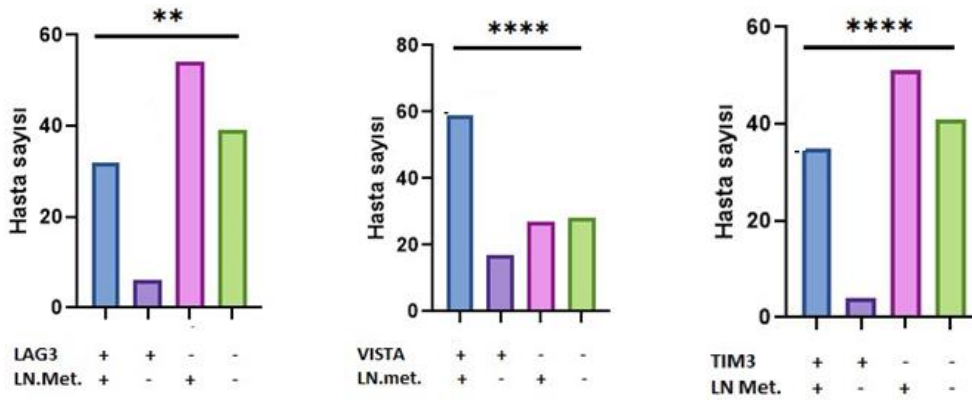
Bu çalışmada yer alan immün kontrol noktası moleküllerinden olan LAG3, TIM3, VISTA, PD-1 ve PD-L1 moleküllerinin immünohistokimyasal yöntemle belirlenen ekspresyon düzeyleri histopatolojik özellikler ile karşılaştırıldı. Lenfovasküler invazyon varlığının LAG3 ve VISTA molekülleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulundu ($p=0,0056$, $p<0,0001$), (Şekil 4.13). TIM3, PD-1 ve PD-L1 moleküllerinin ekspresyon düzeylerinin lenfovasküler invazyon varlığı ile arasında anlamlı bir ilişki bulunamadı. LAG3, TIM3 ve VISTA ekspresyonları ile lenf nodu metastazı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olduğu görüldü (sırasıyla $p=0,0040$, $p=0,0001$, $p=0,0006$) (Şekil 4.14). Lenf nodu metastaz varlığının PD-1 ve PD-L1 ekspresyonları ile aralarında bir ilişki bulunamadı. Perinöral invazyon varlığının bu moleküllerin ekspresyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı. LAG3, TIM3, VISTA, PD-1 ve PD-L1 moleküllerinin ekspresyon düzeylerinin diğer histopatolojik özelliklerden olan tümör derecesi ve tümör boyutu ile karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamadı (Tablo 4.15)

Tablo 4.15. Klinikopatolojik özellikler ile immünohistokimyasal bulguların karşılaştırılması

Diğer İmmün		LAG3		TIM3		VISTA		PD-1	PD-L1
Kontrol Noktası Molekülleri		Pozitif (n)	Negatif (n)	Pozitif (n)	Negatif (n)	Pozitif (n)	Negatif (n)	Negatif (n)	Negatif (n)
Lenf Nodu Metastazi	var	32 (%37,2)	54 (%62,8)	35 (%40,7)	51 (%59,3)	59 (%68,6)	27 (%31,4)	131 (%100)	131 (%100)
	yok	6 (%13,3)	39 (%86,7)	4 (%8,9)	41 (%91,1)	17 (%37,8)	28 (%62,2)		
P		0,0040		0,0001		0,0006		>0,05	>0,05
Perinöral İnvazyon	var	33 (%30,3)	76 (%69,7)	34 (%31,2)	75 (%68,8)	66 (%60,6)	43 (%39,4)	131 (%100)	131 (%100)
	yok	5 (%22,7)	17 (%77,3)	5 (%22,7)	17 (%77,3)	10 (%45,5)	12 (%54,5)		
P		0,4805		0,4322		0,1935		>0,05	>0,05
Lenfo vasküler İnvazyon	var	34 (%36,6)	59 (%63,4)	32 (%34,4)	61 (%65,6)	68 (%73,1)	25 (%26,9)	131 (%100)	131 (%100)
	yok	4 (%10,5)	34 (%89,5)	7 (%18,4)	31 (%81,6)	8 (%21,1)	30 (%78,9)		
P		0,0056		0,0703		< 0,0001		>0,05	>0,05
Tümör Derecesi	az	5 (%22,7)	17 (%77,3)	5 (%22,7)	17 (%77,3)	14 (%63,6)	8 (%36,4)	131 (%100)	131 (%100)
	orta	21 (%31,3)	46 (%68,7)	21 (%31,3)	46 (%68,7)	43 (%64,2)	24 (%35,8)		
	iyi	12 (%28,6)	30 (%71,4)	13 (%31)	29 (%69)	19 (%45,2)	23 (%54,8)		
P		0,740		0,629		0,126		>0,05	>0,05
Tümör Boyutu		38 (%29)	93 (%71)	39 (%29,8)	92 (%70,2)	76 (%58)	55 (%42)	131 (%100)	131 (%100)
P		0,255		0,409		0,272		>0,05	>0,05
Klinik Evre		0,1997		0,3212		0,0531		>0,05	>0,05
Genel Sağkalım		0,447		0,716		0,564		>0,05	>0,05



Şekil 4.13. Lenfovasküler invazyon varlığı ile LAG3 ve VISTA arasındaki ilişki.



Şekil 4.14. Lenf nodu metastazı varlığı ile LAG3, TIM3 ve VISTA arasındaki ilişki.

4.6. Pankreas Kanseri Hastalarında İmmünohistokimyasal Bulgular ile Klinik Evre ile Sağkalım Sürelerinin Karşılaştırılması

Pankreas kanseri tanısı almış olguların I.Evrede olan hasta sayısı 25, 2.Evrede olan hasta sayısı 63, 3.Evrede olan hasta sayısı 35 iken 4. Evrede olan hasta sayısı 8'dir. Bu hastaların klinik evrelerinin CD8, Nectin-2, TIGIT, PVRIG, DNAM-1, LAG3, TIM3 VE VISTA molekülleriyle olan ilişkisine bakıldı.

Tablo.4.16. CD8, Nectin-2 ve reseptörlerinin klinik evrelerle olan ilişkisi

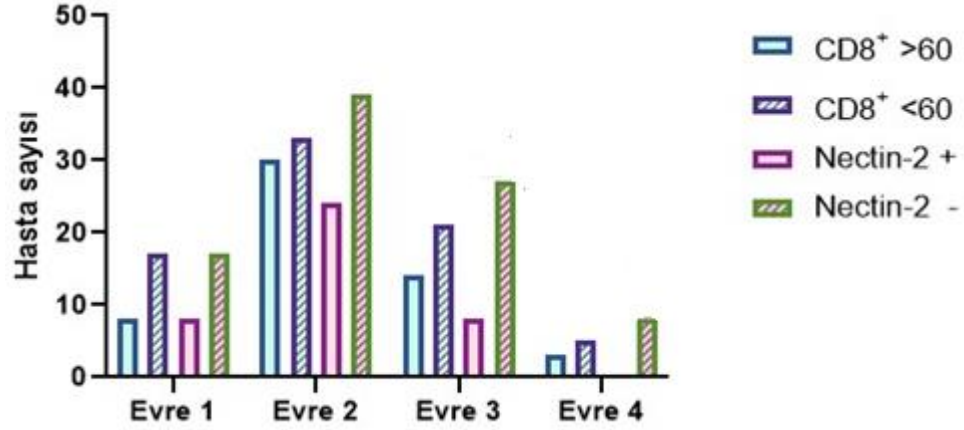
	CD8		Nectin-2		TIGIT		PVRIG		DNAM-1	
	Düşük (n)	Yüksek (n)	Pozitif (n)	Negatif (n)	Pozitif (n)	Negatif (n)	Pozitif (n)	Negatif (n)	Pozitif (n)	Negatif (n)
Evre I	17 (%68)	8 (%32)	8 (%32)	17 (%68)	14 (%56)	11 (%44)	3 (%12)	22 (%88)	7 (%28)	18 (%72)
Evre 2	33 (%52)	30 (%48)	24 (%38)	39 (%62)	30 (%48)	33 (%52)	17 (%27)	46 (%73)	21 (%33)	42 (%67)
Evre 3	21 (%60)	14 (%40)	8 (%23)	27 (%77)	22 (%63)	13 (%37)	12 (%34)	23 (%66)	16 (%46)	19 (%54)
Evre 4	5 (%62,5)	3 (%37,5)	0 (%0)	8 (%100)	3 (%37,5)	5 (%62,5)	2 (%25)	6 (%75)	5 (%62)	3 (%38)
P			0,6252		0,6275		0,1279		0,018	

(n=Hasta Sayısı)

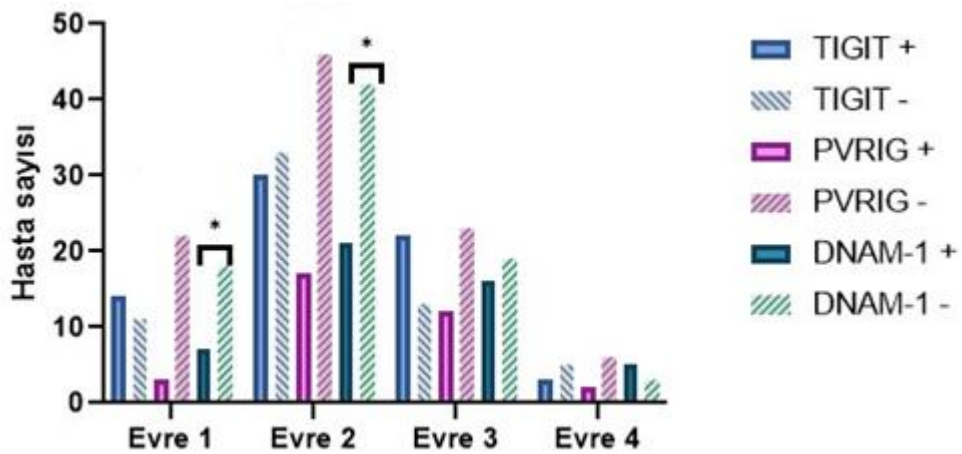
CD8 ekspresyon düzeylerinde klinik evreye göre bir değişim saptanamadı. Fakat Nectin-2'nin evre I ve evre 2' de ekspresyon varlığı açısından bir fark gözlenmezken evre 3 ve 4'teki ekspresyonun negatif olma durumunun daha fazla olduğu gözlemlendi. Klinik evre 4'de hasta sayısının az olması da dikkate alınmalıdır. Evre 3' de Nectin-2'nin pozitif ekspresyonu olan vaka sayısı evre 4'e göre daha fazlaydı (Şekil 4.15).

TIGIT molekülünün ekspresyon düzeyleri ile klinik evreler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı. PVRIG molekülünün ekspresyonu hem evre I hem de evre 2'de negatif olma eğilimindeydi. PVRIG pozitifliği evre 2'de (%27), evre I'e (%12) göre daha fazla olduğu görüldü. (Şekil 4.16).

DNAM-1 molekülünün klinik evre I ve 2' deki ekspresyon düzeyleri PVRIG ile benzerdi. DNAM-1'in evre I ve evre 2' deki ekspresyon düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardı ($p= 0,018$). Evre I ve 2'de negatif hasta sayısı daha fazlaydı (Tablo 4.16).



Şekil 4.15 CD8 ve Nectin-2 molekülünün klinik evre ile ilişkisi.



Şekil 4.16 TIGIT, PVRIG ve DNAM-1 moleküllerinin klinik evre ile ilişkisi.

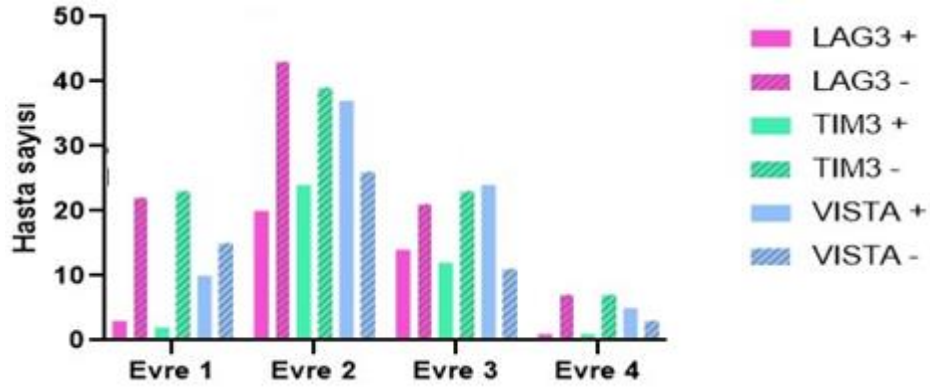
Tablo 4.17 LAG3, TIM3 ve VISTA moleküllerinin klinik evre ile ilişkisi

	LAG3		TIM3		VISTA	
	Pozitif (n)	Negatif (n)	Pozitif (n)	Negatif (n)	Pozitif (n)	Negatif (n)
Evre I	3 (%12)	22 (%88)	2 (%8)	23 (%92)	10 (%40)	15 (%60)
Evre 2	20 (%32)	43 (%68)	24 (%38)	39 (%62)	37 (%59)	26 (%41)
Evre 3	21 (%60)	14 (%40)	12 (%34)	23 (%66)	24 (%68,5)	11 (%31,5)
Evre 4	1 (%12,5)	7 (%87,5)	1 (%12,5)	7 (%87,5)	5 (%62,5)	3 (%37,5)
P	0,1997		0,3212		0,0531	

(n=Hasta Sayısı)

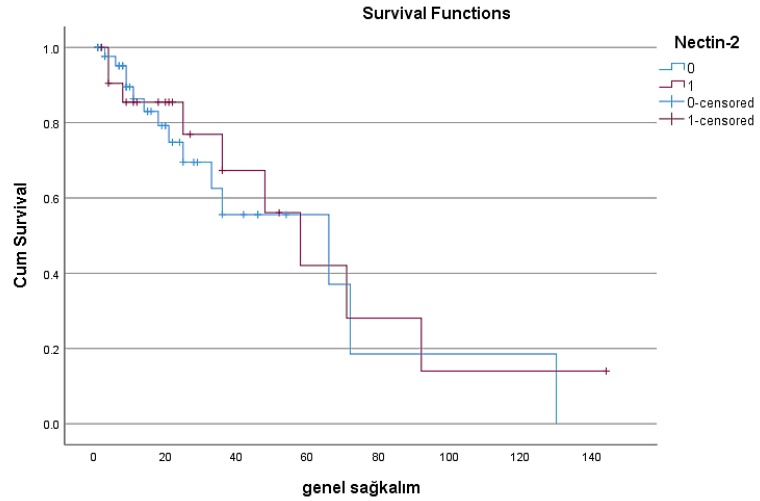
LAG3'ün evre I' ve 2' de negatiflik oranı daha fazla iken, evre 3' ve evre 4' de pozitif-negatif oranlarında bir fark gözlemlenmedi. LAG3'ün, evre 2'de %32, evre I'de ise %12 oranında pozitif hasta sayısının olduğu görüldü. Evre 4' de de negatif ekspresyon yönünde bir eğilim olsa da, hasta sayısının az olması karar vermeyi güçleştirmektedir.

TIM3 molekülünün ekspresyonu evre 1'de %92 negatif , %8 pozitif olarak bulundu, evre 2'de ise ekspresyon düzeylerinde bir farklılık görülmedi. Buna karşın evre I ve evre 2 TIM3 pozitifliği açısından karşılaştırıldığında, evre 2'de daha fazla hastada (%38) TIM3 pozitifliği tespit edildi. VISTA molekülünün ekspresyon düzeylerinin klinik evre 3'de evre 2'ye göre pozitif hasta sayısının negatif hasta sayısından daha fazla olduğu belirlendi (Tablo 4.17), (Şekil 4.17)



Şekil 4.17 LAG3, TIM3 ve VISTA moleküllerinin klinik evre ile ilişkisi

Pankreas kanseri tanısı almış 131 hastanın 12'sinin yaşadığı belirlendi. Genel sağkalım süresi ortalama 23,80 aydır. Nectin-2 ve reseptörleri olan TIGIT, PVRIG, DNAM-1 ile diğer immün kontrol noktası molekülleri olan LAG3, TIM3, VISTA'nın pankreas kanseri dokularındaki ekspresyon düzeylerine göre genel sağkalım süreleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0,05$) (Şekil 4.18).



Şekil 4.18. Pankreas kanseri hastalarında Nectin-2 ligandının genel sağkalım süresi ile ilişkisi.

5.TARTIŞMA

Pankreas duktal adenokarsinomu (PDAC), solid tümörler içerisinde en yüksek ölüm oranına sahip olan tümörler arasında yer almaktadır. Yakın zamanda kansere bağlı ölüm nedenleri arasında ikinci sırada yer alacağı öngörülmektedir (131). PDAC tedavisinde umut vaad eden ilerlemelere rağmen 5 yıllık sağkalım oranı %5'in üstüne çıkamamıştır (132). Pankreas kanseri erken evrelerde herhangi bir belirti göstermediğinden teşhisi oldukça zordur ve hızlı bir yayılım göstermektedir. Cerrahi, kemoterapi gibi yöntemlerin pankreas kanseri tedavisi için başarı oranı oldukça düşük olmaktadır. Torphy ve arkadaşlarına göre, kombine neoadjuvan yada adjuvan kemoterapi veya radyoterapi tedavilerinin yanında cerrahi işlemlerin de yer aldığı modelleme tedavi yöntemi hala altın standart olarak kabul edilmektedir (133).

Kanser tedavisinde PD-1 ve PD-L1 moleküllerini hedefleyen immün kontrol noktası inhibitörlerinin kullanımının onaylanmasıyla birlikte özellikle metastatik kanserlerin tedavisinde yaygınlaşmıştır. İmmün kontrol noktası inhibitörleri ile küçük hücre dışı akciğer kanseri, şeffaf hücreli renal hücreli karsinom ve malign melanom gibi bazı kanserlerin klinik uygulamalarında umut vaat edici sonuçlar görülmüş olsa da, PDAC'in klinik tedavisinde immünoterapiye neredeyse hiç yanıt vermemiştir (134, 135). Bugüne kadar PDAC ilerlemesinin moleküler mekanizmaları belirsizliğini korumaya devam etmektedir bu nedenle pankreas kanserinin immünoterapisinde erken tanının konulması, yeni ve etkili terapötik hedeflerin belirlenmesi ile birlikte tümör immünsüpresyonunun azaltılması büyük önem taşımaktadır (136).

Nectin ve Nectin benzeri moleküller, kalsiyumdan bağımsız hücreden hücreye yapışma oluşumu, hücre hareketliliği, çoğalması, farklılaşması ve hücre ölümünde önemli rol oynayan immünotoglobulin benzeri transmembran proteini olsalarda bazılarının da immünomodülatör işlevleri bulunmaktadır (95). Bu zamana kadar Nectinler ve Nectin benzeri moleküllerle ilgili yapılan çalışmalarda bu moleküllerden bazılarının pozitif ekspresyonunun hücrelerin tümör oluşturma potansiyellerini azalttığı gösterilmiştir (137,138). Buna karşılık yapılan başka bir çalışmada pankreasın

nöroendokrin tümörlerinde Nectin-3 molekülünün ekspresyon kaybının tümörün daha agresif bir hal almasına neden olduğu gösterilmiştir. Başta meme, over ve gastrointestinal kanserler olmak üzere, Nectin-2'nin kanser gelişiminde önemli bir rol oynadığı ve yapılan birçok çalışmada bu molekülün prognoz üzerinde etkisi olduğu gösterilmiştir (139).

Çalışmamızda pankreas kanserinde Nectin-2 molekülünün ekspresyon düzeyi ile bu molekülün reseptörleri olan TIGIT, PVRIG, DNAM-1'in ekspresyon durumlarının CTL'ler ile olan ilişkisinin histopatolojik bulgular ile karşılaştırması ve bu molekülün pankreas kanseri için immünotöröpatik tedavilere yönelik bir biyobelirteç olarak kullanılabilme imkanı araştırılmıştır. Ayrıca Nectin-2'nin diğer önemli immün kontrol noktası molekülleri olan PD-1, PD-L1, LAG3, TIM3 ve VISTA gibi moleküllerin TIL'ler üzerindeki ekspresyonu ile olan ilişkisine de bakılmıştır. Çok heterojen bir tümör mikroçevresine sahip olan pankreas kanserinde sinerjistik tedavilerle birlikte daha etkili bir immün kontrol noktası tedavisine katkı sağlayabilme potansiyeli araştırılmıştır. Son olarak bu moleküllerin hastaların genel sağkalım süreleri ve klinik evre ilişkisi değerlendirilmiştir. Bu amaç doğrultusunda 2008-2015 yılları arasında pankreas kanseri tanısı almış immünohistokimyasal boyamalarda kullanılmak üzere yeterli tümör hücresine sahip olgular seçilerek çalışmalar yapılmıştır.

Pankreas kanseri tanısı almış 131 hastanın doku kesitlerinde Nectin-2 ile CD8 antikorları ile dual olarak immünohistokimyasal boyama yöntemiyle çalışılmıştır. Bu hastaların normal pankreas hücrelerinde Nectin-2 ekspresyonu görülmemiştir. Hastaların 40 (%30,5)'inde Nectin-2'nin pozitif ekspresyonu görülürken 91 (%69,5)'inde negatif ekspresyon görülmüştür. Bununla birlikte CD8 TIL'lerin düşük yoğunlukta olduğu grupta, Nectin-2 ekspresyonunun negatif olduğu hasta sayısının, pozitif olan hasta sayısına göre daha fazla olduğu ve istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi. Tümörde CD8⁺ T lenfositlerin az sayıda olması Nectin-2 ekspresyonunu negatif yönde etkileyebilir. CD8⁺ T lenfositlerin tümör hücrelerine saldırmasıyla, immün sistemden kaçış mekanizması olarak T hücrelerini inhibe edici ligandların ekspresyonu arttığı bilinmektedir. Nectin-2'nin, inhibitör reseptörler TIGIT ve

PVRIG'in ligandı olduğu düşünülürken CD8 varlığındaki Nectin-2 ekspresyonu açıklanabilir. Bu bulguyu destekler şekilde Pankreas kanserinde Nectin-2 ifadesinin pozitif olmasının over, safra kesesi ve pankreas kanseri kötü prognoz ile olan ilişkisini belirten araştırmalar da bulunmaktadır (111, 129, 149).

Agresif bir tümör olan pankreas kanser hücrelerinde, proliferasyon göstergesi olan KI-67'nin ekspresyonuna bakıldı. Nectin-2 ekspresyonu pozitif olan hasta grubunda KI-67'nin de yüksek ekspresyon gösterdiği görülmüştür. Bu ilişki, Nectin-2 varlığının proliferasyonla ilişkili olabileceğini de düşündürmektedir. Bununla birlikte daha fazla hasta grubu ile çalışılan araştırmalara gereksinim vardır.

Nectin-2'nin hücreler arası adezyon işlevinin yanında T lenfositlerde ve NK hücrelerinde düzenleyici bir görevi de bulunmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalar, Nectin-2 ligandının TIGIT, PVRIG, DNAM-1 gibi farklı immün reseptörlere bağlanarak bu reseptörlerin özellikle T lenfositlerin aktivasyonu ya da inhibisyonundaki etkileşimine ışık tutmuştur (140). Nectin-2 ligandı TIGIT, PVRIG ve DNAM-1 reseptörlerine bağlanabilmektedir ve özellikle TIGIT ve DNAM-1 reseptörleri Nectin-2'nin yanında PVR ligandını da paylaşırlar. Böylelikle bu ligandlar DNAM-1 ve TIGIT'a bağlanarak spesifik bir aktivasyon ya da inhibisyon ile immünolojik yanıtın oluşmasını sağlarlar. TIGIT reseptör ailesi kansere yönelik immünoterapinin olası hedefleri açısından geniş çapta araştırılmaya devam etmektedir.

Çalışmamızda yer alan TIGIT, PVRIG ve DNAM-1 reseptörlerinin pankreas kanserindeki ekspresyonları immünohistokimyasal boyanmalarına göre değerlendirildiğinde aralarında vaka sayısı bakımından en fazla pozitif ekspresyon gösterenin TIGIT molekülü olduğu görüldü (n=69). Fakat Nectin-2 molekülünün ekspresyon düzeyleri ile reseptörleri olan TIGIT, PVRIG, DNAM-1'in ekspresyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamadı ($p=0,5866$, $p=0,1772$, $p=0,6565$).

Nectin-2 ekspresyonu bulunmayan hasta grubunda PVRIG molekülünün negatif olduğu hasta sayısının pozitif olan hasta sayısından daha fazla olduğu

belirlendi. Bu hastaların %73,2'sinde PVRIG negatifti. PVRIG, ligand olarak yalnızca Nectin-2'ye bağlanır. Nectin-2 yokluğunda PVRIG'in de eksprese edilmediğini gösteren verilerimiz literatürdeki bu bilgiyle uyumaktadır (141-142) .

Nectin-2 ekspresyonu görülmeyen hasta grubunda DNAM-1 molekülünün negatif olduğu hasta sayısının pozitif olan hasta sayısından daha fazla olduğu görüldü. Bu hastaların %37,4'ünde ise DNAM-1 ekspresyonu olduğu, %62,6'sında DNAM-1 ekspresyonunun olmadığı tespit edildi (bkn. Şekil 4.4). DNAM-1 pozitif hasta grubunda Nectin-2 'nin anlamlı derecede az ekspresyon gösterdiği bulundu. Bu da Nectin-2'nin DNAM-1 ekspresyonunu etkilediğini gösterebilir.

TIGIT reseptörünün PVRIG ve DNAM-1 moleküllerinin ekspresyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olduğunu gösterdik. TIGIT'in ekspresyonunun olduğu durumda PVRIG ekspresyonu açısından fark olmamasına rağmen, TIGIT ekspresyonunun olmadığı olgularda PVRIG'in ekspresyonunun %8,7 olduğu görülmektedir. TIGIT ile PVRIG'in ortak ligandlarının Nectin-2 olması TIGIT ve PVRIG'in ekspresyonlarının birbirleriyle olan ilişkisini olduğunu gösterebilir fakat bu ilişkinin deneysel araştırmalarla gösterilmesine gereksinim vardır.

Literatürdeki çalışmalara bakıldığında TIGIT ve PVRIG moleküllerinin çeşitli kanserlerde TIL'ler üzerinde artan bir ekspresyon gösterdiği belirtilmiştir ve bu da bizim çalışmamızın sonuçlarını destekler niteliktedir (141). PD-1/PD-L1 immün kontrol noktası inhibitörünün pankreas kanserinde etkisinin yeterli olmadığı bilinmektedir. TIGIT ve PVRIG moleküllerinin bloke edilmesiyle CTL'lerin efektör fonksiyonlarını geri kazandığı in vitro çalışmaların başarısı göz önüne alındığında, bu moleküllerin kombine tedavi ile blokajının daha etkili olabileceği vurgulanmıştır (142).

Çalışmamızdaki pankreas kanseri vakalarının immünohistokimyasal boyanmasında TIGIT molekülünün ekspresyon göstermediği vakaların çoğunda DNAM-1 molekülünün de eksprese olmadığı görüldü. TIGIT ekspresyonunun varlığında DNAM-1 ekspresyonunun yokluğu daha baskındır Bu reseptörlerin

ligandlarına afinitesi üzerine yapılan çalışmalarda TIGIT'in, DNAM-1'in cis homodimerizasyonuna müdahale ederek DNAM-1 aracılı T hücresi kostimülasyonunu bozabileceği öne sürülmüştür (143). Johnston ve arkadaşlarını yaptıkları bir çalışmada, TIGIT'in immün düzenleyici etkisinin aslında DNAM-1'e bağlı olduğu belirtmişlerdir (143). Yu ve arkadaşları, TIGIT ve DNAM-1 reseptörlerinin ligandlarına yönelik rekabetlerinin bu bağımlılığı açıklayabileceğini ifade etmişlerdir (144). TIGIT'in DNAM-1 ile ligandları için rekabet etmek yerine onun homodimerizasyonu bozarak sinyalizasyonunu engellemesi, inhibitör reseptörlerin immün hücreler üzerindeki düzenleyici etkilerini göstermektedir (145).

İmmünoterapi başta akciğer, meme kanseri olmak üzere malign melanom gibi diğer kanser türleri için çığır açan bir başarı göstermiştir. Bununla birlikte, pankreas kanseri mevcut immünoterapilere karşı oldukça dirençlidir. Bu durumdan dolayı pankreas kanserine karşı etkili bir immün cevabın yeniden sağlanabilmesi için araştırmalara konu olmaya devam edecektir. CTLA-4 ve PD-1 gibi inhibitör reseptörler, T hücrelerin fonksiyonlarının düzenlenmesinde önemli bir rol oynarlar. PD-1/PD-L1 inhibe eden antikorlarla yapılan faz 1 çalışmasında PDAC hastalarında etkin bir cevap alınamamıştır(146). Çalışmamızda yer alan pankreas kanseri hastalarına ait dokularda Anti-PD-1 ve PD-L1 antikorlarıyla immünohistokimyasal boyanmalarda vakaların hiç birinde bu antikorlara ait bir boyanma izlenmedi. Bu da çalışmamızın literatürle benzer olarak pankreas kanserinde PD-1/PD-L1 moleküllerinin düşük ekspresyon gösterdiğini teyit etmektedir. Bu bulgular, pankreas kanserinde Anti-PD-1/PD-L1 tedavilerinin başarısızlığı ile uyumludur. Bu yüzden tümöre karşı immün cevabın yeniden oluşabilmesi için yeni immün moleküllerin araştırılması devam etmektedir.

Çalışmaya dahil olan 131 hastanın tümünde PD-1 ile bunun ligandı olan PD-L1 moleküllerinin ekspresyonu bulunmamıştır. Yakın zamanda LAG3, TIM3 ve VISTA gibi ortak inhibitör reseptörlerin pankreas kanseri için birer potansiyel immün kontrol noktası hedefi olabilmeleri ile ilgili araştırmaların yapıldığını görmekteyiz. Çalışmamızda bu immün kontrol noktası moleküllerinin ekspresyon düzeyleri ile Nectin-2 ve reseptörlerinin ekspresyon seviyeleriyle aralarındaki ilişkiyi inceledik. Bu

moleküllerin 131 hastadaki ekspresyonlarına bakıldığında 38 olguda LAG3'ün, 39 olguda TIM3'ün ve 76 olguda ise en yüksek pozitif ekspresyonun VISTA molekülünde olduğunu gözlemledik. Nectin-2 ekspresyonu ile TIM3, VISTA, PD-1 ve PD-L1 moleküllerinin ekspresyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olmadığını gösterdik. Buna karşın LAG3 ve Nectin-2'nin ekspresyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olduğunu belirledik ($p=0,0137$). Henüz literatürde T hücreler üzerindeki tükenmeyle ilişkili LAG3 ve bir adezyon molekülü olan Nectin-2 arasındaki ilişkiyi açıklayan bir çalışma bulunmamaktadır.

CD8+ T lenfositler üzerindeki LAG3 ve TIM3 ekspresyonuna bakıldığında incelenen vakaların sırasıyla %64,5 ve %64,1'ni bu inhibitör reseptörlerini ifade etmediğini belirledik. LAG3, TIM3 ve VISTA moleküllerinin ekspresyon seviyelerini de karşılaştırdık. LAG3 molekülünün TIM3 ile pozitif korelasyon gösterdiğini ve LAG3 ile TIM3'ün pozitif ekspresyon gösterdiği olguların çoğunda VISTA'nın da pozitif ekspresyon gösterdiğini belirledik. Bu sonuçlar, Popp ve arkadaşlarının pankreas kanseri üzerinde yaptıkları araştırmadaki verilerini destekler niteliktedir (147).

Bu çalışmada ayrıca önemli immün kontrol noktası moleküllerinin sitotoksik T lenfositlerle olan ilişkisi de incelendi. LAG3 ve TIM3 moleküllerinin negatif ekspresyon gösterdiği grupta CD8 ekspresyonları arasında bir fark olduğu görüldü. Sonuç olarak LAG3 ve TIM3 moleküllerinin CD8+ T lenfositlerin ekspresyon miktarları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olduğu belirlendi ($p=0,0226$), ($p=0,0264$).

Pankreas kanseri erkeklerde kadınlara göre daha yaygın görülmektedir. Çalışmamıza dahil edilen 131 vakanın %58,7'si erkek, %41,2'si kadın hastalardan oluşmaktadır. Hastaların tanı yaşı 31 ile 85 arasında değişmekte olup yaş ortalaması 63,27'dir. Hasta tanı yaşlarının çalışmamızda yer alan Nectin-2 ve diğer moleküllerle istatistiksel olarak anlamlı bir ilişkisi bulunamadı. Tanı anındaki yaşın tüm kanserler için önemli bir prognostik belirteç olduğu bilinmektedir. Wang ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ileri yaşta olan hastaların hayatta kalma oranının çok düşük olduğunu ve bağımsız bir prognostik faktör olabileceğini ifade etmişlerdir (148).

Bizim çalışmamızdaki hastaların tanı yaşları ile genel sağkalım analizinde istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamadı ($p=0.110$).

Çalışmamıza dahil edilen pankreas kanseri vakalarının %59.5'i duktal adenokarsinom olarak çoğunlukta %33.5'i adenokarsinom, %3.1'i adenoskuamöz karsinom, %2.2'si müsinöz karsinom ve %1.5'i anaplastik karsinomdan oluşmaktadır. Vakalar, histopatolojik evreleri göz önüne alınarak sınıflandırıldığında %51,1 oranı ile çoğunlukla orta diferansiye tümörler izlenmektedir. Bunu, %32,1 ile iyi diferansiye, %16,7 az diferansiye tümörler takip etmektedir. Histopatolojik evrelemelerin çalışmamızda yer alan Nectin-2 ve diğer moleküllerle istatistiksel açıdan anlamlı bir ilişkisi olmadığı görüldü. Vakalarımızdaki tümör boyutlarına bakıldığında çoğunluğunun %72,6 ile 4 cm'den küçük tümörlerden oluştuğu görülmektedir. Liang ve arkadaşlarının bir çalışmasında PDAC'lerde Nectin-2 ekspresyonunun büyük tümör çapı ve lenf nodu metastaz varlığının klinik progresyonda öneme sahip olduğunu belirtmişlerdir (149). Çalışmamızdaki Nectin-2 ve diğer moleküllerin tümör boyutu ile bir ilişkisi olduğu saptanamamıştır. Buna karşın tümör boyutu ile PVRIG reseptörü arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olduğu görüldü ($p=0,02$). PVRIG ile pozitif ekspresyon olan grupta tümör boyutunun medyanı 4 cm iken, negatif ekspresyon gösterdiği grupta ise 3 cm olduğu belirlendi. Tümör boyutu ile PVRIG ekspresyonu anlamlı bir ilişki görülürken tek ligandı olan Nectin-2 ile bu ilişkinin bulunamaması PVRIG ekspresyonunun ligand etkileşimi dışında başka bir mekanizma ile de düzenlendiğini düşündürmektedir.

Lenfovasküler invazyon varlığının %68,7 ile sık görüldüğünü belirledik. Lenf nodu metastazı olan vakaların %76'sında lenfovasküler invazyonun da mevcut olduğu görüldü. Lenfovasküler invazyon dağılımının Nectin-2 ligandı ve bunun reseptörleri olan TIGIT, PVRIG ve DNAM-1 ile ilişkisine bakıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamadı. Diğer immün kontrol noktası moleküllerinden olan LAG3 ve VISTA ekspresyonlarının pozitif olan olgularda lenfovasküler invazyon varlığının istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olduğu gösterilmiştir ($p=0,0056$, $p<0,0001$).

Lenfovasküler invazyonun genel sağkalım verileri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olmadığı görüldü ($p=0,594$).

Pankreas adenokarsinomlarında perinöral invazyon varlığı sıklıkla karşılaşılan histopatolojik bir bulgudur. Çalışmamızdaki olguların %83,2'sinde bu bulgunun mevcut olduğu görüldü. Perinöral invazyonun başta Nectin-2 molekülü olmak üzere diğer tüm moleküller ve genel sağkalım arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamamıştır ($p=0,777$).

Pankreas duktal adenokarsinomların cerrahisinde en önemli tartışma konusu çevre bağ dokusu ile beraber lenf nodlarının ne derecede çıkarılması gerektiğidir. Doi ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada lenf nodu metastaz varlığının pankreas kanserinde ileri evreye geçişe neden olduğu ve hasta prognozu açısından en olumsuz prognostik faktörlerden biri olduğuna dair kanıtlar sunmuşlardır (150). Rezeke edilmiş olgularımızın %65,6'sında lenf nodu metastaz varlığı görüldü. Nectin-2 ve reseptörlerinin lenf nodu tutulumu ile ilişkisi istatistiksel olarak anlamlı değildi. Diğer immün kontrol noktası molekülleriyle ilişkisine baktığımızda LAG3, TIM3 ve VISTA ile istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olduğu görüldü ($p=0,0040$, $p=0,0001$, $p=0,0006$). Lenf nodu varlığının genel sağkalım analizinde anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p=0,659$).

Çalışmaya dahil edilen 131 hastanın klinik evrelerinin CD8, Nectin-2, TIGIT, PVRIG, DNAM-1, LAG3, TIM3 VE VISTA molekülleriyle olan ilişkisine bakıldı. CD8 ekspresyon düzeylerinde klinik evreye göre bir değişim saptanamadı. Fakat Nectin-2'nin evre I ve evre 2' de ekspresyon varlığı açısından bir fark gözlenmezken evre 3 ve 4'teki ekspresyonun negatif olma durumunun daha fazla olduğu gözlemlendi. Evre 4'de hasta sayısının az olması da dikkate alınmalıdır. Evre 3' de Nectin-2'nin pozitif ekspresyonu olan vaka sayısının evre 4'e göre daha fazla olduğu görüldü.

LAG3'ün evre I' ve 2' de negatiflik oranı daha fazla iken, evre 3' ve evre 4' de pozitif-negatif oranlarında anlamlı bir fark gözlemlenmedi. LAG3, evre 2'de %32, evre I'de ise %12 pozitif oranında hasta sayısının olduğu görüldü. Evre 4' de de

negatif ekspresyon yönünde bir eğilim olsa da, hasta sayısının az olması karar vermeyi güçleştirmektedir.

TIM3 molekülünün ekspresyonu evre 1’de %92 negatif , %8 pozitif olarak bulundu, evre 2’de ise ekspresyon düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanamadı. Buna karşın evre I ve evre 2 TIM3 pozitifliği açısından karşılaştırıldığında, evre 2’de daha fazla hastada (%38) TIM3 pozitifliği tespit edildi.. VISTA molekülünün ekspresyon düzeylerinin klinik evre 3’de evre 2’ye göre pozitif hasta sayısının negatif hasta sayısından daha fazla olduğu belirlendi.

Pankreas kanseri tanısı almış 131 hastanın 12’sinin yaşadığı belirlendi. Genel sağkalım süresi ortalama 23,80 aydır. Nectin-2 ve reseptörleri olan TIGIT, PVRIG, DNAM-1 ile diğer immün kontrol noktası molekülleri olan LAG3, TIM3, VISTA’nın pankreas kanseri dokularındaki ekspresyon düzeylerine göre genel sağkalım süreleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0,05$).

Pankreas kanserinde Nectin-2 ekspresyonunun önemli olabileceği, Nectin-2 ekspresyonun $CD8^+$ hücrelerden etkilenebileceği, kontrol noktası moleküllerinin ekspresyonunun da buna bağlı eksprese olabileceği, aralarında bir ekspresyon ilişkisi olabileceği bu çalışmada gösterilmiştir. Bu kesitsel araştırmadan elde edilen verilerin mekanizmalarının açıklanabilmesi ve Nectin-2 molekülünün immünoterapi açısından öneminin belirlenebilmesi amacıyla yeni deneysel araştırmaların planlanmasına gereksinim vardır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

- Pankreas kanseri 131 hastaya ait dokular immünohistokimyasal yöntemle analiz edildi. Nectin-2'nin normal pankreas dokusunda ekspresyonu görülmezken 40 hastanın tümör dokularında Nectin-2'nin gen ekspresyonunun arttığı görüldü.
- CD8⁺ hücre sayısının düşük yoğunlukta olduğu grupta, Nectin-2 ekspresyonunun negatif olduğu hasta sayısının, pozitif olan hasta sayısına göre daha fazla olduğu dikkati çekmiştir.
- Nectin-2'nin pozitif ekspresyonuna sahip 32 hastada KI-67 proliferasyon belirtecinin yüksek oranda eksprese edildiği belirlendi.
- Nectin-2 molekülünün ekspresyon düzeyleri ile TIGIT, PVRIG, DNAM-1'in ekspresyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamadı (sırasıyla $p=0,5866$, $p=0,1772$, $p=0,6565$).
- Nectin-2'nin ekspresyon göstermediği hasta grubunda TIGIT ekspresyonu gösteren hasta sayısının arttığı dikkati çekmiştir.
- Nectin-2 ekspresyonu bulunmayan hastaların %73,2'inde PVRIG ekspresyonunun olmadığı tespit edildi.
- Nectin-2'nin pozitif ekspresyon gösterdiği hasta grubuna nazaran negatif ekspresyon gösterdiği gruba göre T lenfositleri aktive eden DNAM-1 ekspresyonunun arttığı dikkati çekmiştir.
- TIGIT molekülünün ekspresyon düzeyi ile PVRIG ve DNAM-1 'in ekspresyon düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olduğu bulundu (sırasıyla $p<0,0001$, $p=0,004$). PVRIG ve DNAM-1 moleküllerinin pozitif ekspresyonunun TIGIT'in ekspresyon değişimine bağlı olarak azaldığı tespit edildi.

- Pankreas kanseri tanısı almış hastaların tümörlü ve sağlıklı dokularında PD-1 ile PD-L1 ekspresyonu bulunamadı.
- Nectin-2 molekülünün ekspresyonu ile TIM3, VISTA, PD-1 ve PD-L1 ekspresyonları karşılaştırıldığında, oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı (sırasıyla $p=0,0909$, $p=0,1470$, $p>0,05$, $p>0,05$).
- Nectin-2 molekülünün ekspresyonu ile LAG3 ekspresyonu karşılaştırıldığında aralarında anlamlı farkın olduğu tespit edildi ($p=0,0137$).
- Nectin-2 ekspresyonunun negatif olduğu hastalarda LAG3 ve TIM3 ekspresyonlarının da negatif olduğu hasta sayısının daha fazla olduğu saptandı.
- Önemli kontrol noktası moleküllerinden olan VISTA'nın pankreas tanısı almış 131 hastanın içinde en fazla pozitif ekspresyon gösteren molekül olduğu görüldü ($n=76$).
- Nectin-2'nin pozitif ekspresyon gösterdiği grupta VISTA ekspresyonu pozitif hasta oranının % 67,5 olduğu saptandı.
- LAG3'ün negatif ekspresyonlarının bulunduğu gruplarda TIM3 ve VISTA ekspresyonlarının da negatiflik gösterme oranları daha fazlaydı.
- LAG3 ekspresyonu ile TIM3 ekspresyonu arasında pozitif korelasyon olduğu görüldü ($p<0,0001$).
- LAG3'ün pozitif ekspresyonunun olduğu 38 hastanın 32 (%84)'sinde VISTA pozitifliği saptandı ($p<0,0001$).
- TIM3'ün pozitif ekspresyon gösterdiği hasta grubunda VISTA'nın da pozitif ekspresyonunun arttığı ve aralarında fark olduğu bulundu ($p=0,0078$).

- CD8 TIL'lerin düşük yoğunlukta olduğu grupta, TIM3 ve LAG3 ekspresyonlarının negatif olduğu hasta sayısının, pozitif olan hasta sayısına göre daha fazla olduğu ve istatistiksel olarak da anlamlı olduğu tespit edildi ($p=0,0264$, $p=0,0226$).
- Hastaların demografik özelliklerinden cinsiyetine göre dağılımlarına bakıldığında 77'si (%58,7) erkek, 54'ü (%41,2) kadındır. Hastaların yaş aralığı 31 ile 85 arasında değişmekte olup yaş ortalaması 63,27'dir.
- Erkek hastalar ile kadın hastaların yaş ve cinsiyet dağılımı incelendiğinde aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamadı ($p=0,1070$, $p>0,05$).
- Çalışmaya dahil edilen 131 hastanın %33,5'i Adenokarsinom, %3,1'i Adenoskuamöz karsinom, %1,5'i Anaplastik karsinom, %59,5'i Duktal adenokarsinom ve %2,2'si Müsinöz adenokarsinom tanılı olgulardan oluşmaktadır. Histopatolojik alt tipler ile Nectin-2, TIGIT, PVRIG, DNAM-1 ve diğer immün kontrol noktası moleküllerinin ekspresyonları arasında anlamlı bir fark bulunamadı.
- Tümörlerin histopatolojik derecesine bakıldığında en yaygın olarak %51,1'i orta diferansiye. %32,1'i iyi diferansiye, %16,7'sinin az diferansiye tümörü olduğu görüldü. Histopatolojik grade ile Nectin-2, TIGIT, PVRIG, DNAM-1 ve diğer immün kontrol noktası moleküllerinin ekspresyonları arasında anlamlı bir ilişki bulunamadı.
- Nectin-2, TIGIT, PVRIG, DNAM-1 ekspresyonları ile lenf nodu metastazı, perinöral invazyon, lenfovasküler invazyon gibi histopatolojik özellikler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamadı.
- Bir diğer histopatolojik özellik olan tümör boyutunun, Nectin-2, TIGIT, PVRIG, DNAM-1 ekspresyonları ve diğer immün kontrol noktası

moleküllerinin ekspresyonları ile ilişkisine bakıldığında, PVRIG ile pozitif boyanan grupta tümör boyutunun medyanı 4 cm iken, negatif ekspresyon gösterdiği grupta ise 3 cm olduğu belirlendi ($p=0,02$).

- LAG3, TIM3, VISTA, PD-1 ve PD-L1 moleküllerinin ekspresyon düzeyleri histopatolojik özellikler ile karşılaştırıldı. Lenfovasküler invazyon varlığının LAG3 ve VISTA inhibitörleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulundu ($p=0,0056$, $p<0,0001$).
- LAG3, TIM3 ve VISTA ekspresyonları ile lenf nodu metastazı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olduğu görüldü (sırasıyla $p=0,0040$, $p=0,0001$, $p=0,0006$).
- Perinöral invazyon varlığı ile LAG3, TIM3, VISTA, PD-1 ve PD-L1 moleküllerinin ekspresyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmadı.
- CD8, TIGIT ekspresyon düzeylerinde klinik evreye göre bir farklılık bulunmadı.
- Nectin-2'nin evre I ve evre 2' de ekspresyon varlığı açısından bir fark gözlenmezken evre 3 ve 4'teki ekspresyonun negatif olma durumunun daha fazla olduğu görüldü.
- PVRIG ve DNAM-1 moleküllerinin ekspresyonları hem evre I hem de evre 2'de negatif olma yönündeydi. Aynı zamanda PVRIG ve DNAM-1 pozitifliği evre 2'de, evre I'e göre daha fazlaydı. DNAM-1 'in evre I ve evre 2'deki ekspresyon düzeyleri arasında istatistiksel olarak aralarında anlamlı fark bulundu ($p=0,018$).
- LAG3 ve evre I' ve 2' de negatiflik oranı daha fazla iken, evre 3' ve evre 4' de pozitif-negatif oranlarında anlamlı bir fark gözlemlenmedi.

- TIM3 molekülünün ekspresyonu evre 1'de %92 negatif , %8 pozitif olarak bulundu.
- VISTA molekülünün ekspresyon düzeylerinin klinik evre 3'de evre 2'ye göre pozitif hasta sayısının negatif hasta sayısından daha fazla olduğu belirlendi.

ÖNERİLER:

- Nectin-2 tümörsüz dokuda eksprese olmazken, tümörlü dokuda ekspresyonunu tetikleyen etkenleri saptamak üzere deneysel çalışmalar yapılabilir.
- Nectin-2 ile CD8⁺ T hücre ko-kültürü yapılarak, hücrelerdeki fonksiyonel ve fenotipik değişimler saptanabilir.
- Nectin-2 hedeflenerek inhibe edildiğinde CD8⁺ T hücre fonksiyonel değişimlerini tespit edebilmek amacı ile bir proje yapılabilir.
- TIGIT, PVRIG ve DNAM-1 ekspresyonu tetikleyen mekanizmaları açıklamak amacı ile çalışma planlanabilir.
- Nectin-2 ile reseptörlerinin ekspresyon paterni arasındaki ilişkiyi çözmeye yönelik araştırmalar yapılabilir.
- Nectin-2 için hangi reseptörün inhibisyonunda daha önemli olduğunu bulmaya yönelik araştırma yapılabilir.
- TIGIT, PVRIG ve DNAM-1 ekspresyonlarının zamanlamasını tespit edebilmek için zamana bağımlı mRNA ekspresyon ve protein ekspresyonları için western blot çalışmaları yapılabilir.

- TIGIT, PVRIG ve DNAM-1 ekspresyonu ile diğer kontrol noktası moleküllerinin ekspresyon zamanlamasını ortaya koyacak bir araştırma planlanabilir.
- Neden pankreas tümöründe PD-L1 ekspresyonu yerine Nectin-2 ekspresyonunun olduğunun açıklanmasına yönelik araştırma yapılabilir.
- Nectin-2'nin pankreas kanserinde hedeflenebilirliğini göstermek üzere *in vivo* bir araştırma planlanabilir ve tümör büyümesi üzerine olan etkileri araştırılabilir.

7. KAYNAKÇALAR

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries: a cancer journal for clinicians, 71(3):209-249
2. Cancer Stat Facts: Pancreatic Cancer. Available online: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/pancreas.html> (accessed on 17 July 2020).
3. Multidisciplinary standards of care and recent progress in pancreatic ductal adenocarcinoma 2020 Sep; 70(5):375-403. doi: 10.3322/caac.21626. Epub 2020 Jul 19
4. Kuhlmann KF, de Castro SM, Wesseling JG, ten Kate FJ, Offerhaus GJ, Busch OR, van Gulik TM, Obertop H, Gouma DJ. Surgical treatment of pancreatic adenocarcinoma; actual survival and prognostic factors in 343 patients. Eur J Cancer 2004; 40: 549-558.
5. Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, Gettinger SN, Smith DC, McDermott DF. Five-year survival and correlates among patients with advanced melanoma, renal cell carcinoma, or non-small cell lung Cancer treated with Nivolumab. JAMA Oncol. 2019; 5:1411–20.
6. Zaretsky JM, Garcia-Diaz A, Shin DS, Escuin-Ordinas H. Mutations associated with acquired resistance to PD-1 blockade in melanoma New England Journal of Medicine. 2016.
7. Wang LC, Lo A, Scholler J, Sun J, Majumdar RS, Kapoor V. Targeting fibroblast activation protein in tumor stroma with chimeric antigen receptor T cells can inhibit tumor growth and augment host immunity without severe toxicity. Cancer Immunol Res. 2014; 2:154–66.
8. Ma C, Dong X. Colorectal cancer-derived Foxp3(+) IL-17(+) T cells suppress tumour-specific CD8+ T cells. Scand J Immunol. 2011; 74:47–51.
9. Naito Y, Saito K, Shiiba K, Ohuchi A, Saigenji K, Nagura H. CD8+ T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer. Cancer Res. 1998; 58:3491–4.
10. Salgado R, Denkert C, Demaria S, Sirtaine N, Klauschen F, Pruneri G. The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014. Ann Oncol. 2015; 26: 259–71.
11. Mihm M, Clemente C, Cascinelli N. Tumor infiltrating lymphocytes in lymph node melanoma metastases – a histopathologic prognostic indicator and an expression of local immune response. Lab Invest 1996; 74: 43-47.
12. Anderson NM. The tumor microenvironment 12M. CelesteSimon Current Biology August 17, 2020; 30: R905–R931.

13. Kurtulus S, Sakuishi K, Ngiow SF, Joller N, Tan DJ, Teng MW. TIGIT predominantly regulates the immune response via regulatory T cells. *The Journal of clinical investigation*. 2015; 125(11):4053-62.
14. Chauvin JM, Zarour HM. J TIGIT in cancer immunotherapy. *Immunother Cancer*. 2020 Sep; 8(2):e000957. doi: 10.1136/jitc-2020-000957. PMID: 32900861
15. Liu XG, Hou M, Liu Y. TIGIT, A Novel therapeutic target for tumor immunotherapy. *Immunol Investig*. 2017; 46:172–82
16. Zhu Y, Paniccia A, Schulick AC, Chen W, Koenig MR, Byers JT. Identification of CD112R as a novel checkpoint for human T cells. *J Exp Med* 2016; 213:167–76
17. Xu F, Sunderland A, Zhou Y, Schulick RD, Edil BH, Zhu Y. Blockade of CD112R and TIGIT signaling sensitizes human natural killer cell functions. *Cancer Immunol Immunother* 2017; 66:1367–75.
18. PVRIG and PVRL2 Are Induced in Cancer and Inhibit CD8+ T-cell Function. *Cancer Immunol Res* 2019; 7(2): 257-268. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-18-0442>
19. Chauvin JM, Zarour HM. TIGIT in cancer immunotherapy. *J Immunother Cancer*. 2020 Sep; 8(2):e000957. doi: 10.1136/jitc-2020-000957. PMID: 32900861
20. Mandai K, Nakanishi H, Satoh A. Afadin: a novel actin filament-binding protein with one PDZ domain localized at cadherin-based cell-to-cell adherens junction. *J Cell Biol*. 1997; 139(2): 517- 528.
21. Mandai K, Nakanishi H, Miyahara M. Nectin/PRR: an immunoglobulin-like cell adhesion molecule recruited to cadherin-based adherens junctions through interaction with Afadin, a PDZ domain-containing protein. *J Cell Biol*. 1999; 145(3): 539- 549.
22. Molfetta R, Milito ND, Zitti B, Lecce M, Fionda C, Cippitelli M. The ubiquitin-proteasome pathway regulates Nectin2/CD112 expression and impairs NK cell recognition and killing. *Eur J Immunol*. 2019; 49: 873-83.
23. Oshima T, Sato S, Kato J, Ito Y, Watanabe T, Tsuji I. Nectin-2 is a potential target for antibody therapy of breast and ovarian cancers. *Mol Cancer* 2013; 12: 60.
24. Discovery and development of COM701, a therapeutic antibody targeting the novel immune checkpoint PVRIG *Cancer Res*. 2017; 77(13): 581.
25. Hannahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions *Cancer Discov*. 2022 Jan; 12(1): 31-46. doi: 10.1158/2159-8290.CD-21-1059
26. McAllister F, Khan MAW, Helmink B, Wargo JA. The tumor microbiome in pancreatic cancer: bacteria and beyond. *Cancer Cell* 2019; 36: 577-9.
27. Ortega MA, Pekarek L, Current FM. Implication of ERBB2 as a Predictive Tool for Survival in Patients with Pancreatic Cancer in Histological Studies. 2022; [mdpi.com](https://www.mdpi.com)
28. Zhong Y, Naito Y, Kope L, Naranjo-Suarez S, Saunders T, Hong SM, Goggins MG, Herman JM, Wolfgang CL, Iacobuzio-Donahue, Functional p38 MAPK Identified by Biomarker Profiling of Pancreatic Cancer Restrains Growth through JNK Inhibition and Correlates with Improved Survival *Clin. Cancer Res.* 2014; 20: 6200–6211

29. Corbo V, Tortora G, Scarpa A. Molecular pathology of pancreatic cancer: from bench-to bedside translation. *Curr Drug Targets*. 2012; 13: 744–752.
30. Ghaneh P, Costello E, Neoptolemos JP. Biology and management of pancreatic cancer. *Postgrad Med J*. 2008; 84: 478–497.
31. Toruner M, Fernandez-Zapico ME, Pin CL. New aspects of the epigenetics of pancreatic carcinogenesis. *Epigenomes*. 2020; 4(3): 18.
32. Krempley BD, Yu KH. Preclinical models of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Chin Clin Oncol*. 2017; 6(3): 25
33. Iodice S, Gandini S, Maisonneuve P, Lowenfels AB. Tobacco and the risk of pancreatic cancer: a review and meta-analysis. *Langenbeck's archives of surgery*, 2008; 393(4): 535-545.
34. Carreras-Torres R, Johansson M, Gaborieau V, Haycock PC, Wade K H, Relton CL, Brennan P. The role of obesity, type 2 diabetes, and metabolic factors in pancreatic cancer: a Mendelian randomization study. *JNCI: Journal of th*. 2017
35. Buchholz M, Gress TM. Molecular changes in pancreatic cancer. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2009; 9(10): 1487-97.
36. Haugk B. Pancreatic intraepithelial neoplasia—can we detect early pancreatic cancer?. *Histopathology*. 2010; 57(4): 503-514.
37. Ottenhof NA, Milne AN, Morsink FH. Pancreatic intraepithelial neoplasia and pancreatic tumorigenesis: of mice and men. *Arch Pathol Lab Med*. 2009; 133(3): 375-81
38. Orth M, Metzger P, Gerum S, Mayerle J, Schneider G, Belka C, Schnurr M, Lauber K. Pancreatic ductal adenocarcinoma: biological hallmarks, current status, and future perspectives of combined modality treatment approaches. Published online. 2019 Aug 8. doi: 10.1186/s13014-019-1345-6
39. Hata T, Suenaga M, Marchionni L. Genome-wide somatic copy number alterations and mutations in highgrade pancreatic intraepithelial neoplasia. *Am J Pathol*. 2018; 188(7): 1723-33.
40. Cornish TC, Hruban RH. Pancreatic intraepithelial neoplasia. *Surg Pathol Clin*. 2011; 4(2): 523-35.
41. Distler M, Aust D, Weitz J, Pilarsky C, Grützmann R. Precursor lesions for sporadic pancreatic cancer: PanIN, IPMN, and MCN. *Biomed Res Int*. 2014; 2014: 474905.
42. Maitra A, Kern SE, Hruban RH. Molecular pathogenesis of pancreatic cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2006; 20(2): 211-26.
43. Hruban RH, Goggins M, Parsons J, Kern SE. Progression model for pancreatic cancer. *Clin Cancer Res*. 2000; 6(8): 2969-72.
44. Löhr M, Klöppel G, Maisonneuve P, Lowenfels AB, Lüttges J. Frequency of K-ras mutations in pancreatic intraductal neoplasias associated with pancreatic ductal adenocarcinoma and chronic pancreatitis: a meta-analysis. *Neoplasia*. 2005; 7: 17–23

45. Maitra A, Adsay NV, Argani P. Multicomponent analysis of the pancreatic adenocarcinoma progression model using a pancreatic intraepithelial neoplasia tissue microarray. *Mod Pathol*. 2003; 16(9): 902-12
46. Aslan M. Targeted Therapies for Pancreatic Cancer and Hurdles Ahead. *Anticancer research* 2018; 38(12): 6591-6606. doi:10.21873/anticancer.13026
47. Nasca V, Chiaravalli M, Piro G. Intraductal pancreatic mucinous neoplasms: A tumor-biology based approach for risk stratification. *Int J Mol Sci*. 2020; 21(17): 6386.
48. Hruban RH, Takaori K, Canto M. Clinical importance of precursor lesions in the pancreas. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*. 2007; 14(3): 255-63.
49. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoeediting: from immuno-surveillance to tumor escape. *Nat Immunol*. 2002; 3(11): 991-998. doi: 10.1038/ni1102-991.
50. Kirkwood CJ Immunotherapy of Cancer in 2012 CA Cancer Author manuscript; available in PMC. 2013 September 01.
51. Sarantis P, Koustas E, Papadimitropoulou A, Papavassiliou AG, Karamouzis MV. Pancreatic ductal adenocarcinoma: Treatment hurdles, tumor microenvironment and immunotherapy. *World J Gastrointest Oncol*. 2020 Feb 15; 12(2): 173-181.
52. Shah VM, Dorrell C, Al-Fatease A, Allen-Petersen BL, Woo Y, Bortnyak Y, Gheewala R, Sheppard BC, Sears RC, Adam WG. Alani. Microfluidics Formulated Liposomes of Hypoxia Activated Prodrug for Treatment of Pancreatic Cancer. *Pharmaceutics*. 2022; 14 (4): 713 DOI: 10.3390/pharmaceutics14040713
53. Uzunparmak B, Sahin IH. Pancreatic cancer microenvironment: a current dilemma. *Clin Transl Med*. 2019; 8: 2.
54. Duraivelan K, Dibyendu S. BBA Emerging roles of the nectin family of cell adhesion molecules in tumour-associated pathways. *Reviews on Cancer* 1876. 2021
55. Wang LC, Lo A, Scholler J, Sun J, Majumdar RS, Kapoor V. Targeting fibroblast activation protein in tumor stroma with chimeric antigen receptor T cells can inhibit tumor growth and augment host immunity without severe toxicity. *Cancer Immunol Res*. 2014; 2: 154-66.
56. Rollins BJ. Inflammatory chemokines in cancer growth and progression. *Eur J Cancer* 2006; 42: 760-7
57. Anderson NM. The tumor microenvironment. *12M CelesteSimon Current Biology* August 17, 2020; 30: R905-R931,
58. Roitt I, Male D, Brostoff J, Roth DB. *Immunology*, 7/E Paperback- January 1, 2006.
59. Bots M, Medema JP. Granzymes at a glance. *Cell Science at a Glance*. 2006; 119(24): 5011-4.
60. Qin S, Xu L, Yi M, Yu S, Wu K. Novel immune checkpoint targets: moving beyond PD-1 and CTLA-4. corresponding author and Suxia Luocorresponding author *Mol Cancer* 2019; 18: 155.

61. Immuno Oncology Checkpoint Proteins/ Origene
62. Chen Y, Huang H, Li Y, Xiao W, Liu Y, Chen R, Zhu Y, Zheng X, Wu C, Chen L. TIGIT Blockade Exerts Synergistic Effects on Microwave Ablation Against Cancer. *Front. Immunol.* 2022; 13: 832230
63. Kucan Brlic P, Lenac Rovis T, Cinamon G, Tsukerman P, Mandelboim O, Jonjic S. Targeting PVR (CD155) and Its Receptors in Anti-Tumor Therapy. *Cell Mol Immunol* 2019; 16(1): 40–52. doi: 10.1038/s41423-018-0168-y
64. Yu X, Harden K, Gonzalez LC. The surface protein TIGIT suppresses T cell activation by promoting the generation of mature immunoregulatory dendritic cells. *Nat Immunol* 2009; 10:48–57.
65. Boles KS, Vermi W, Facchetti F. A novel molecular interaction for the adhesion of follicular CD4 T cells to follicular DC. *Eur J Immunol* 2009; 39:695–703
66. Stanietsky N, Simic H, Arapovic J. The interaction of TIGIT with PVR and PVRL2 inhibits human NK cell cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106:17858–63
67. Jin HS, Park Y. Hitting the complexity of the TIGIT-CD96-CD112R-CD226 axis for next-generation cancer immunotherapy. *BMB Rep.* 2021; 54(1): 2–11.
68. Eberle F, Dubreuil P, Mattei MG, Devilard E, Lopez M. The human PRR2 gene, related to the human poliovirus receptor gene (PVR), is the true homolog of the murine MPH gene. *Gene* 1995; 159:267–72.
69. Lopez M, Aoubala M, Jordier F, Isnardon D, Gomez S, Dubreuil P. The human poliovirus receptor related 2 protein is a new hematopoietic/endothelial homophilic adhesion molecule. *Blood* 1998; 92: 4602–11
70. Satoh-Horikawa K, Nakanishi H, Takahashi K. Nectin-3, a new member of immunoglobulin-like cell adhesion molecules that shows homophilic and heterophilic cell-cell adhesion activities. *J Biol Chem* 2000; 275: 10291–9.
71. Reymond N, Borg JP, Lecocq E. Human nectin3/PRR3: a novel member of the PVR/PRR/nectin family that interacts with afadin. *Gene* 2000; 255: 347–55.
72. Masson D, Jarry A, Baurly B. Overexpression of the CD155 gene in human colorectal carcinoma. *Gut* 2001; 49: 236–40.
73. Oshima T, Sato S, Kato J. Nectin-2 is a potential target for antibody therapy of breast and ovarian cancers. *Mol Cancer* 2013; 12: 60
74. Solecki DJ, Gromeier M, Mueller S, Bernhardt G, Wimmer E. Expression of the human poliovirus receptor/CD155 gene is activated by sonic hedgehog. *J Biol Chem* 2002; 277:25697–702
75. Escalante NK, Rossum A, Lee M, Choy JC. CD155 on human vascular endothelial cells attenuates the acquisition of effector functions in CD8 T cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011; 31:1177–84.
76. Shibuya A, Campbell D, Hannum C, Yssel H, Franz-Bacon K, McClanahan T, Kitamura T, Nicholl J, Sutherland GR, Lanier LL, Phillips JH. DNAM-1, a novel adhesion molecule involved in the cytolytic function of T lymphocytes. *Immunity.* 1996; 4: 573–581. 10.1016/S1074-7613(00)70060-4

77. Verhoeven DH, Hooge AS, Mooiman EC, Santos SJ, Dam MM, Gelderblom H, Melief CJ, Hogendoorn PC, Egeler RM, Tol MJ. NK cells recognize and lyse Ewing sarcoma cells through NKG2D and DNAM-1 receptor dependent pathways. *Mol. Immunol.* 2008; 45: 3917–3925. 10.1016/j.molimm.2008.06.016
78. Lakshmikanth T, Burke S, Ali T.H, Kimpfler S, Ursini F, Ruggeri L, Capanni M, Umansky V, Paschen A, Sucker A. NCRs and DNAM-1 mediate NK cell recognition and lysis of human and mouse melanoma cell lines in vitro and in vivo. *J. Clin. Invest.* 2009; 119: 1251–1263. 10.1172/JCI36022
79. Cho D, Shook DR, Shimasaki N, Chang YH, Fujisaki H, Campana D. Cytotoxicity of activated natural killer cells against pediatric solid tumors. *Clin. Cancer Res.* 2010; 16: 3901–3909. 10.1158/1078-0432.CCR-10-0735.
80. Chashchina A, Märklin M, Hinterleitner C, Salih HR, Heitmann JS, Klimovich B. DNAM-1/CD226 is functionally expressed on acute myeloid leukemia (AML) cells and is associated with favorable prognosis. *Scientific Reports* 2021; 11: 18012.
81. Reymond N. DNAM-1 and PVR regulate monocyte migration through endothelial junctions. *J. Exp. Med.* 2004; 199: 1331-1341.
82. Zhang Z. DNAM-1 controls NK cell activation via an ITT-like motif. *J. Exp. Med.* 2015; 212: 2165-2182.
83. Chauvin JM, Pagliano O, Fourcade J. TIGIT and PD-1 impair tumor antigen-specific CD8 + T cells in melanoma patients. *J Clin Invest.* 2015;125(5):2046–58. 10.1172/JCI80445
84. Dougall WC, Kurtulus S, Smyth MJ. TIGIT and CD96: New checkpoint receptor targets for cancer immunotherapy. *Immunol Rev.* 2017; 276(1): 112–20. 10.1111/imr.12518
85. Sanchez-Correa B, Valhondo I, Hassouneh F, Lopez-Sejas N, Pera A, Bergua JM, Arcos MJ, Bañas H, Casas-Avilés I, Durán E, Alonso C, Solana R, Tarazona R. DNAM-1 and the TIGIT/PVRIG/TACTILE Axis: Novel Immune Checkpoints for Natural Killer Cell-Based Cancer Immunotherapy. 2019 Jun 23; 11(6): 877. doi: 10.3390/cancers11060877.
86. Wang PL, O’Farrell S, Clayberger C, Krensky AM. Identification and molecular cloning of tactile. A novel human T cell activation antigen that is a member of the Ig gene superfamily. *J. Immunol.* 1992; 148: 2600-2608
87. Chan CJ, Martinet L, Gilfillan S, Souza-Fonseca-Guimaraes F, Chow MT, Town L, Ritchie DS, Colonna M, Andrews DM, Smyth M.J. The receptors CD96 and CD226 oppose each other in the regulation of natural killer cell functions. *Nat. Immunol.* 2014; 15: 431–438. doi: 10.1038/ni.2850
88. Fuchs A, Cella M, Giurisato E, Shaw A.S, Colonna M. Cutting edge: CD96 (tactile) promotes NK cell-target cell adhesion by interacting with the poliovirus receptor (CD155) *J. Immunol.* 2004; 172: 3994–3998. doi: 10.4049/jimmunol.172.7.3994
89. Billadeau DD, Leibson PJ. ITAMs versus ITIMs: striking a balance during cell regulation. *J Clin Invest.* 2002; 109(2): 161–168. doi: 10.1172/JCI0214843.

90. Murter B, Pan X, Ophir E. Mouse PVRIG has CD8(+) T cell-specific coinhibitory functions and dampens antitumor immunity. *Cancer Immunol Res.* 2019; 7(2): 244–256. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-18-0460
91. Li Y, Zhang Y, Cao G, Zheng X, Sun C, Wei H. Blockade of Checkpoint Receptor PVRIG Unleashes Anti-Tumor Immunity of NK Cells in Murine and Human Solid Tumors. *J Hematol Oncol* 2021; 14: 100. doi: 10.1186/s13045-021-01112-3
92. Chiang EY, Mellman IJ. *Immunother Cancer.* 2022; 10: e004711. doi:10.1136/jitc-2022-004711
93. Chothia C, Jones EY. The molecular structure of cell adhesion molecules. *Annu Rev Biochem* 1997; 66: 823–862
94. Yap AS, Briehner WM, Gumbiner BM. Molecular and functional analysis of cadherin-based adherens junctions. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1997; 13: 119–146
95. Takai Y, Miyoshi J, Ikeda W, Ogita H. Nectins and nectin-like molecules: roles in contact inhibition of cell movement and proliferation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9(8): 603–615
96. Brasch J, Harrison OJ, Honig B, Shapiro L. Thinking outside the cell: how cadherins drive adhesion. *Trends Cell Biol* 2012; 22(6): 299–310
97. Takai Y, Irie K, Shimizu K, Sakisaka T, Ikeda W. Nectins and nectin-like molecules: roles in cell adhesion, migration, and polarization. *Cancer Sci* 2003; 94: 655–667.
98. Harrison. Nectin ectodomain structures reveal a canonical adhesive interface *Nature Structural & Molecular Biology.* 2012; volume 19: 906–915.
99. Liu. Upregulation of nectin-4 is associated with ITGB1 and vasculogenic mimicry and may serve as a predictor of poor prognosis in colorectal cancer. 2019. <https://doi.org/10.3892/ol.2019.10417>
100. Mandai K, Rikitake Y, Mori M, Takai Y. Nectins and Nectin-Like Molecules in Development and Disease. 2015.
101. Dibyendu Sa, Ramagopal UA, Rubinstein R, Vigdorovich V, Nathenson SG, Almo SC. Structure of Nectin-2 reveals determinants of homophilic and heterophilic interactions that control cell–cell adhesion. 2012.
102. Satoh-Horikawa K, Nakanishi H, Takahashi K, Miyahara M, Nishimura M, Tachibana K, Mizoguchi A, Takai Y. Nectin-3, a new member of immunoglobulin-like cell adhesion molecules that shows homophilic and heterophilic cell–cell adhesion activities. *J. Biol. Chem.* 2000; 275: 10291-10299
103. Sakisaka T, Ikeda W, Ogita H, Fujita N, Takai Y. The roles of nectins in cell adhesions: cooperation with other cell adhesion molecules and growth factor receptors. *Curr Opin Cell Biol.* 2007; 19: 593–592
104. Yamada A, Fujita N, Sato T, Okamoto R, Ooshio T, Hirota T. Requirement of nectin, but not cadherin, for formation of claudin-based tight junctions in annexin II-knockdown MDCK cells. *Oncogene* 2006; 25: 5085–5082.

105. Samanta D, Almo SC. Nectin family of cell-adhesion molecules: Structural and molecular aspects of function and specificity. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2015; 72(4): 645-658.
106. Krummenacher C, Baribaud F, Ponce de Leon M, Baribaud I, Whitbeck JC, Xu R, Cohen GH, Eisenberg RJ. *Virology Comparative usage of herpesvirus entry mediator A and nectin-1 by laboratory strains and clinical isolates of herpes simplex virus*. 2004; 322: 286 – 299
107. Guzman G, Oh S, Shukla D, Valyi-Nagy T. Nectin-1 expression in the normal and neoplastic human uterine cervix, *Arch. Pathol. Lab. Med*. 2006; 130: 1193-1195.
108. Suzuki K, Hu D, Bustos T, Zlotogora J, Richieri-Costa A, Helms JA, Spritz RA. Mutations of PVRL1, encoding a cell-cell adhesion molecule/herpesvirus receptor, in cleft lip/palate-ectodermal dysplasia. *Nat Genet*. 2000 Aug; 25(4): 427-30. doi: 10.1038/78119.
109. Lopez M, Aoubala M, Jordier F, Isnardon D, Gomez S, Dubreuil P. The human poliovirus receptor related 2 protein is a new hematopoietic/endothelial homophilic adhesion molecule. 1998; *Blood* 92: 4602-4611.
110. Takai Y, Nahanishi H. Nectin and afadin: novel organizers of intercellular junctions. *Journal of Cell Science* 2003; 116: 17-27.
111. Bekes I, Lob S, Holzheu I, Janni W, Baumann L, Wockel A, Wulff C. Nectin-2 in ovarian cancer: how is it expressed and what might be its functional role? *Cancer Sci*. 2019; 110: 1872–1882
112. Duraivelan K, Dibyendu S. Emerging roles of the nectin family of cell adhesion molecules in tumour-associated pathways *BBA - Reviews on Cancer* 1876. 2021; 188589.
113. F Xu, X Si, J Wang, A Yang, T Qin, Y Yang. Nectin-3 is a new biomarker that mediates the upregulation of MMP2 and MMP9 in ovarian cancer cells, *Biomed. Pharmacother*. 2019; 110: 139–144
114. M-Rabet M, Cabaud O, Josselin E. Nectin-4: a new prognostic biomarker for efficient therapeutic targeting of primary and metastatic triple-negative breast cancer. *Ann Oncol* 2017; 28: 769–76. doi:10.1093/annonc/mdw678
pmid:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27998973>
115. Pavlova NN, Pallasch C, Elia AE, Braun CJ, Westbrook TF, Hemann M. A role for PVRL4-driven cell-cell interactions in tumorigenesis. *Elife*. 2013; 2: e00358
116. Molfetta R, Zitti B, Lecce M, Milito N.D, Stabile H, Fionda C, Cippitelli M, Gismondi A, Santoni A, Paolini R. Cd155: a multi-functional molecule in tumor progression, *Int. J. Mol. Sci*. 2020; 21: 1–14.
117. Gao J, Zheng Q, Xin N. CD155, an onco-immunologic molecule in human tumors. *Cancer Sci*. 2017; 108(10): 1934–8. 10.1111/cas.13324
118. Stamm H, Oliveira-Ferrer L, Grossjohann EMI. Targeting the TIGIT-PVR immune checkpoint axis as novel therapeutic option in breast cancer. *Oncoimmunology*. 2019; 8(12): e1674605. 10.1080/2162402X.2019.1674605

119. Stanko K. CD96 expression determines the inflammatory potential of IL-9-producing Th9 cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2018; 115: E2940–E2949.
120. Masson D. Overexpression of the CD155 gene in human colorectal carcinoma. 2001; *Gut* 49: 236–240.
121. Nishiwada S. Clinical significance of CD155 expression in human pancreatic cancer. *Anticancer Res.* 2015; 35: 2287–2297.
122. Mahmoudi M, Farokhzad OC. Cancer immunotherapy: wound-bound checkpoint blockade. *Nat. Biomed. Eng.* 2017; 1: 0031.
123. Stamm H. Immune checkpoints PVR and PVRL2 are prognostic markers in AML and their blockade represents a new therapeutic option. *Oncogene* 2018.
124. Huang K, Lui WY. Nectins and nectin-like molecules (Necls): recent findings and their role and regulation in spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol.* 2016; 59: 54–61
125. Sanchez-Correa B, Gayoso I, Bergua JM. Decreased expression of DNAM-1 on NK cells from acute myeloid leukemia patients. *Immunol Cell Biol* 2012; 90: 109–115.
126. Casado JG, Pawelec G, Morgado S, Sanchez-Correa B, Delgado E, Gayoso I, Duran E, Solana R, Tarazona R. Expression of adhesion molecules and ligands for activating and costimulatory receptors involved in cell-mediated cytotoxicity in a large panel of human melanoma cell lines *Cancer Immunol., Immunotherapy: CII.* 2009; 58 (9): 1517-1526
127. El-Sherbiny YM, Meade JL, Holmes TD. The requirement for DNAM-1, NKG2D, and NKp46 in the natural killer cell-mediated killing of myeloma cells. *Cancer Res* 2007; 67: 8444–8444.
128. Mastaglio S, Wong E, Perera T, Ripley J, Blombery P, Smyth MJ, Koldej R, Ritchie D. Natural Killer Receptor Ligand Expression on Acute Myeloid Leukemia Impacts Survival and Relapse after Chemotherapy. 2018.
129. Miao X, Yang ZL, Xiong L, Zou Q, Yuan Y, Li J, Liang L, Chen M, Chen S. Nectin-2 and DDX3 are biomarkers for metastasis and poor prognosis of squamous cell/adenosquamous carcinomas and adenocarcinoma of gallbladder. *Int J Clin Exp Pathol.* 2014; 6: 179–190.
130. Huang X, Qu P, Chen Y, Zhou X, Wu Y, Liu F, Wang D, Zhang J, An J. Low expression of CD112 is associated with poor overall survival in patients with hepatocellular carcinoma. *Hum Pathol.* 2014; 45: 1944–1950.
131. Neoptolemos JP, Kleeff J, Michl P, Costello E, Greenhalf W, Palmer DH. Therapeutic developments in pancreatic cancer: current and future perspectives. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2018;15:333–348.
132. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer statistics, 2022. *CA Cancer J Clin.* 2022 Jan; 72(1): 7-33. doi: 10.3322/caac.21708. Epub 2022 Jan 12. PMID: 35020204.
133. Torphy RJ, Fujiwara Y, Schulick RD. Pancreatic cancer treatment: better, but a long way to go. *Surg Today.* 2020; 50: 1117–1125.

134. Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQ, Hwu WJ, Topalian SL, Hwu P, et al. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N. Engl J Med.* 2012; 366: 2455–65.
135. Zou W, Wolchok JD, Chen L. PD-L1 (B7-H1) and PD-1 pathway blockade for cancer therapy: Mechanisms, response biomarkers, and combinations. *Sci Transl Med.* 2016; 8: 328rv4.
136. Zhang X, Lao M, Xu J, Duan Y, Yang H, Li M. Combination cancer immunotherapy targeting TNFR2 and PD-1/PD-L1 signaling reduces immunosuppressive effects in the microenvironment of pancreatic tumors. *J Immunother Cancer.* 2022; 10:3.
137. Salda L, Massimini M, Romanucci M, Palmieri C, Perillo A, Grieco V, Malatesta D, Spinillo M.A, Passantino G, Dondi F. Nectin-4 and P63 Immunohistochemical Expression in Canine Prostate Tumourigenesis. *Vet. Comp. Oncol.* 2019; 17: 298–307
138. Kawanishi A, Hirabayashi K, Yamada M, Takanashi Y, Hadano A, Kawaguchi Y, Nakagohri T, Nakamura N, Mine T. Clinicopathological Significance of Nectin-4 Expression in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *J. Clin. Pathol.* 2017; 70: 619–624
139. Hirabayashi K, Tajiri T, Bosch D.E, Morimachi M, Miyaoka M, Inomoto C, Nakamura N, Yeh M.M. Loss of Nectin-3 Expression as a Marker of Tumor Aggressiveness in Pancreatic Neuroendocrine Tumor. *Pathol. Int.* 2020; 70: 84–91.
140. Klekowski J, Zielińska D, Hofman A, Zajdel N, Gajdzis P, Chabowski M. Clinical Significance of Nectins in HCC and Other Solid Malignant Tumors: Implications for Prognosis and New Treatment Opportunities—A Systematic Review. *Cancers* 2023; 15: 3983.
141. Whelan S, Ophir E, Kotturi MF. PVRIG and PVRL2 are induced in cancer and inhibit CD8+ T-cell function *Cancer Immunol Res.* 2019; 7 (2): 257-268.
142. Li J, Whelan S, Kotturi MF, Meyran D, D'Souza C, Hansen K, Liang S, Hunter J, Trapani JA, Neeson PJ. PVRIG is a novel natural killer cell immune checkpoint receptor in acute myeloid leukemia. *Haematologica.* 2021 Dec 1; 106(12): 3115-3124. doi: 10.3324/haematol.2020.258574. PMID: 33147937; PMCID: PMC8634199.
143. Johnston RJ, Comps-Agrar L, Hackney J, Yu X, Huseni M, Yang Y, Park S, Javinal V, Chiu H, Irving B. The immunoreceptor TIGIT regulates antitumor and antiviral CD8(+) T cell effector function. *Cancer Cell.* 2014; 26:923–937. doi: 10.1016/j.ccell.2014.10.018.
144. Yu X, Harden K, C Gonzalez L. The surface protein TIGIT suppresses T cell activation by promoting the generation of mature immunoregulatory dendritic cells. 2009; *Nat Immunol* 10: 48–57.
145. Pauken KE, Wherry EJ. TIGIT and CD226: tipping the balance between costimulatory and coinhibitory molecules to augment the cancer immunotherapy toolkit. *Cancer Cell.* 2014 Dec 8; 26(6): 785-787. doi: 10.1016/j.ccell.2014.11.016. PMID: 25490444.

146. Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQM, Hwu WJ, Topalian SL, Hwu P, Drake CG, Camacho LH, Kauh J, Odunsi K. Safety and Activity of Anti-PD-L1 Antibody in Patients with Advanced Cancer. *N. Engl. J. Med.* 2012, 366: 2455–2465
147. Popp FC, Capino I, Bartels J, Damanakis AI, Li J, Datta RR, Löser H, Zhao Y, Quaas A, Lohneis P. Expression of Immune Checkpoint Regulators IDO, VISTA, LAG3, and TIM3 in Resected Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancers* 2021; 13: 2689.
148. Wang H, Liu J, Xia G. Survival of pancreatic cancer patients is negatively correlated with age at diagnosis: a population-based retrospective study. 2020; *Sci Rep* 10; 7048.
149. Liang S, Yang Z, Li D, Miao X, Yang L, Zou Q, Yuan Y. The Clinical and Pathological Significance of Nectin-2 and DDX3 Expression in Pancreatic Ductal Adenocarcinomas. *Dis Markers.* 2015.
150. Doi R, Kami K, Ito D. Prognostic Implication of Para-aortic Lymph Node Metastasis in Resectable Pancreatic Cancer. *World J. Surg.* 2007; 31: 147–154.

8.EKLER

EK-1: Tez Çalışması Orijinallik Raporu

Pankreas Kanserinde Nectin-2 Ekspresyonu ile Sitotoksik T Hücre Fonksiyonları Arasındaki İlişki

ORJİNALLİK RAPORU

%9	%9	%3	%1
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	%3
2	dspace.gazi.edu.tr İnternet Kaynağı	%2
3	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	%1
4	openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<%1
5	www.mdpi.com İnternet Kaynağı	<%1
6	Submitted to Hacettepe University Öğrenci Ödevi	<%1
7	www.ailevecalisma.gov.tr İnternet Kaynağı	<%1
8	openaccess.hacettepe.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
9	Submitted to TechKnowledge Turkey Öğrenci Ödevi	<%1

EK-2: Dijital Makbuz



Dijital Makbuz

Bu makbuz ödevinizin Turnitin'e ulaştığını bildirmektedir. Gönderiminize dair bilgiler şöyledir:

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen: Mualla ilknur Gündüz
 Ödev başlığı: Pankreas Kanserinde Nectin-2 Ekspresyonu ile Sitotoksik T H...
 Gönderi Başlığı: Pankreas Kanserinde Nectin-2 Ekspresyonu ile Sitotoksik T H...
 Dosya adı: I_Ilknur_Gu_ndu_z_Tez2.pdf
 Dosya boyutu: 25.22M
 Sayfa sayısı: 117
 Kelime sayısı: 20,555
 Karakter sayısı: 134,579
 Gönderim Tarihi: 22-Ara-2023 05:50ÖS (UTC+0300)
 Gönderim Numarası: 2264109525



EK-3 Etik Kurul Onayı

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı : 16969557 - 2121

Konu : **ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU**

Toplantı Tarihi : 15 KASIM 2022 SALI
Toplantı No : 2022/19
Proje No : GO 21/764 (Onay Tarihi: 29.06.2021)
Karar No : 2022/19-37

Kurulumuzun 29.06.2021 tarihli toplantısında GO 21/764 kayıt numarası ile onaylanmış olan, Üniversitemiz Kanser Enstitüsü Temel Onkoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Doç. Dr. Füsün ÖZMEN'in sorumlu araştırmacı olduğu, Doç. Dr. Özgür EKİNCİ ile birlikte çalışacakları ve Bio. Mualla İlknur GÜNDÜZ'ün yüksek lisans tezi olan, GO 21/764 kayıt numaralı "*Pankreas Kanseri Nectin-2 Ekspresyonu ile Sitotoksik T Hücre Fonksiyonları Arasındaki İlişki*" başlıklı proje için vermiş olduğunuz 28.10.2022 tarihli araştırmacı revizyonu dilekçesi talebi Kurulumuzun 15.11.2022 tarihli toplantısında görüşülmüş ve **uygun bulunmuştur**. Proje araştırmacılarından Doç. Dr. Özgür EKİNCİ proje ekibinden çıkarılmış ve Uzm. Bio. Melek Günindi KORKUT proje ekibine eklenmiştir. Çalışma tamamlandığında sonuçlarını içeren bir rapor örneğinin Etik Kurulumuza gönderilmesi gerekmektedir.

- | | | |
|---|---|-------|
| 1. Prof. Dr. Nüket Paksoy ERBAYDAR (Başkan) | 8. Prof. Dr. Hande Güney DENİZ | (Üye) |
| 2. Prof. Dr. G. Burça AYDIN | 9. Doç. Dr. Betül Çelebi SALT | (Üye) |
| 3. Prof. Dr. M. Özgür UYANI | İZİNLİ
10. Doç. Dr. Merve BATUK | (Üye) |
| 4. Prof. Dr. Ayşe Kin İŞLER | 11. Doç. Dr. Gülten KOÇ | (Üye) |
| 5. Prof. Dr. Sibel PEHLİVAN | 12. Dr. Öğr. Üyesi Müge DEMİR | (Üye) |
| 6. Prof. Dr. Burcu Balan DOĞU | 13. Dr. Öğr. Üyesi Burcu Ersöz | (Üye) |
| 7. Prof. Dr. Tolga YILDIRIM | 14. Av. Buket ÇINAR | (Üye) |

9.ÖZGEÇMİŞ

MUALLA İLKNUR GÜNDÜZ