

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

**SCHWANN HÜCRE-MEME KANSER HÜCRESİ
ETKİLEŞİMİNDE CD200'ÜN ROLÜ:
SCHWANN HÜCRELERDEN SALINAN
İNFLAMATUAR MEDİYATÖRLERDEKİ
DEĞİŞİKLİKLER**

Esra TAVŞAN
DOKTORA TEZİ

2025-ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

**SCHWANN HÜCRE-MEME KANSER HÜCRESİ
ETKİLEŞİMİNDE CD200'ÜN ROLÜ:
SCHWANN HÜCRELERDEN SALINAN
İNFLAMATUAR MEDİYATÖRLERDEKİ
DEĞİŞİKLİKLER**

Esra TAVŞAN

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Nuray ERİN

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TSA-2023-6369 proje numarası ile, TUSEB 2022-B-02-22529 proje numarası ile ve TÜBİTAK 122Z333-1001 projesi ile desteklenmiştir.

“Kaynakça gösterilerek tezimden yararlanılabilir”

2025-ANTALYA

Sağlık Bilimleri Enstitüsü M¼d¼rl¼ę¼ne;

Bu alışma j¼rimiz tarafından Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Tıbbi Farmakoloji Programında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir. .../...../.....

İmza

Tez Danışmanı : **Prof. Dr. Nuray ERİN**
Akdeniz Üniversitesi, Antalya

Üye : **Prof. Dr. Coşkun USTA**
Akdeniz Üniversitesi, Antalya

Üye : **Doç. Dr. Dilara Fatma KOCACIK UYGUN**
Akdeniz Üniversitesi, Antalya

Üye : **Doç. Dr. Derya KIVRAK SALİM**
Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Antalya

Üye : **Doç. Dr. Mehtap SAVRAN**
S¼leyman Demirel Üniversitesi, Isparta

Bu tez, Enstit¼ Y¼netim Kurulunca belirlenen yukarıdaki j¼ri üyeleri tarafından uygun g¼r¼lm¼ř ve Enstit¼ Y¼netim Kurulu'nun/...../..... tarih ve/..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Enstit¼ M¼d¼r¼

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı beyan ederim.

Esra TAVŞAN

İmza

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Nuray ERİN

İmza

TEŞEKKÜR

Bazen yorucu ve zorlu, bazen kahkahalarla dolu, arada gözyaşlarıyla geçen, her defasında potansiyelimi keşfettiren ve beni daha iyiye taşıyan, çoğu zaman ise yeni bir heyecan ve motivasyonla şevk veren bu 12 yıllık sürecin sonunda, teşekkür borçlu olduğum birçok insan var;

Öncelikle en başından beri bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, çalışmam için bana fırsatlar üreten, potansiyelimi daha iyiye taşımamı sağlayan, çalışkanlığıyla örnek aldığım danışman hocam Prof. Dr. Nuray ERİN'e,

Lisans eğitimim boyunca, araştırma merakımı uyandıran ve bilimin temel ilkelerini bana öğreten ilk ilham kaynağım, değerli hocam Prof. Dr. Azmi YERLİKAYA'ya

Dersleriyle ve muhabbetiyle ufukumuzu genişleten değerli hocam Prof. Dr. Coşkun USTA'ya, her zaman bilgi ve birikimlerinden yararlanmamı sağlayan değerli hocam Prof. Dr. Sadi S. ÖZDEM'e ve Tıbbi Farmakoloji ailesine,

Çalışma prensibi ve hayattaki samimi duruşuyla rol modelim olan, her zaman içtenlikle yanımda olan canım ablam Şule KALE'ye ve bana her zaman enerji kaynağı olan güzel minnoşlarına, zor zamanlarda yanımda olup sevgisini ve desteğini hissettiren, Derin'i ile bana teyzeliği tattıran kardeşim Nur OĞAN'a,

12 sene önce ekibin en küçüğü iken, varlıklarıyla beni en büyüğü yapan, kardeşlikleri ve deneylerdeki desteklerinden dolayı Z kuşağım; Damla KOLAY, Mertay Karahan ŞİMŞEK, İlayda TAMOĞULLARI ve Seher Merve İLEN'e, yakın zamanda aramıza dahil olmasına rağmen hemen sevdiğimiz Talay DENİZ'e,

Bana her zaman pozitif enerjisiyle destek olan ablam Özlem AKDENİZ'e, bazen beni benden önce düşünen, potansiyeline hayran olduğum arkadaşım Fatma Zehra HAPİL ZEVLİLİLER'E, tükenmeyen enerjisiyle her işin üstesinden gelen, her yere yetişebilen arkadaşım Pınar BAŞI'ye, hakkımdaki güzel düşüncesiyle hep yanımda olan arkadaşım Gökçe ERDOĞAN'a,

Burhan Abi başta olmak üzere Sağlık Bilimleri Enstitüsü personeline,

Ve hayatımın her aşamasında her koşulda bana verdikleri emek, sevgi, güven, anlayış ve destekleri için canım annem Gülnaz TAVŞAN'a, babam Durali TAVŞAN'a, kardeşim Samet TAVŞAN'a, teyzem Nurcan ŞEN'e, Kedim Latte'ye ve benimle gurur duyan tüm aileme ve tüm dostlarıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Amaç: Schwann hücreler kanser hücreleri ile karşılaştığında sinir onarımındaki süreçlere benzer şekilde fenotip değiştirmektedir. Bu fenotipik değişiklikler ise kanserin invazyonuna, migrasyonuna ve progresyonuna neden olmaktadır. İmmün modülatör bir molekül olan CD200 ligandının kanserdeki etkileri çift yönlüdür ve tümörün tipine göre değişir. Schwann hücrelerde ve periferik sinirlerde CD200 ligandı eksprese edilmektedir. Ancak Schwann hücre meme kanseri etkileşiminde CD200 ligandının etkileri bilinmemektedir. Bu nedenle, çalışmanın amacı, meme kanseri ile karşılaşan Schwann hücre yanıtının CD200 yokluğunda nasıl değiştiğini incelemektir.

Yöntem: Farelerin kulak dokusundan DNA izolasyonu yapıldı ve CD200 ekspresyonu PCR yöntemi ile belirlendi. Farelerin bilateral siyatik sinirlerinden CD200KO ve yabanıl tip Schwann hücre kültürleri elde edildi. Primer meme kanseri kültürü için farelerde ortotopik model oluşturuldu ve primer tümörler çıkarılarak kültüre alındı. Meme kanseri hücrelerinin sekretomları, Schwann hücreleri ile karşılaştırıldı. Schwann hücre kaynaklı sitokin (IL-6, TNF- α , IL-1 β) ve kemokinlerdeki (CCL2, MIP-2, KC) değişiklikler ELISA yöntemi ile belirlendi. Ayrıca, minosiklin, CD200fc ve Pegile lipozomal doksorubisin (PLD)'in Schwann hücre yanıtları üzerindeki etkileri değerlendirildi.

Bulgular: Meme kanseri hücrelerinin sekretomları ile karşılaştırılan Schwann hücrelerinde IL-6, CCL2, MIP-2 ve KC üretiminin arttığı gözlemlendi. Bu artış CD200KO Schwann hücrelerde belirgin şekilde daha fazla idi. Minosiklin inflamatuvar Schwann hücre yanıtlarını baskıladı. Ancak CD200KO Schwann hücre yanıtlarındaki minosikline bağlı azalma, yabanıl tip Schwann hücrelere göre daha kısıtlı kaldı. PLD Schwann hücrelerde direkt etki göstermedi; ancak PLD uygulanan meme kanseri hücrelerinin sekretomları ile uyarılan Schwann hücre yanıtları belirgin şekilde baskılandı.

Sonuç: Bu sonuçlar CD200 molekülünün, meme kanseri ile Schwann hücreleri arasındaki etkileşimde, tümörü destekleyen Schwann hücre immün yanıtlarının düzenlenmesinde rol oynayabileceğini gösteren ilk çalışmadır.

Anahtar Kelimeler: Schwann hücre, CD200, meme kanseri, sitokin, kemokin

ABSTRACT

Objective: Schwann cells undergo phenotypic changes when interacting with cancer cells, similar to nerve repair processes. These changes contribute to cancer invasion, migration, and progression. The immune modulator CD200's effects in cancer are bidirectional and vary depend on tumor type. CD200 ligand is expressed in Schwann cells and peripheral nerves, but its role in Schwann cells during breast cancer interactions remains unknown. This study aims to investigate how Schwann cell responses to metastatic breast cancer are altered in the absence of CD200.

Methods: DNA was isolated from mouse ear tissue, and CD200 expression was assessed by PCR. Bilateral sciatic nerves from female Balb/c mice were excised to prepare primary CD200KO and wild type Schwann cell cultures. An orthotopic breast cancer model was established in mice, and primary tumors were excised and cultured. The secretomes of breast cancer cells were compared with Schwann cells. Cytokines (IL-6, TNF- α , IL-1 β) and chemokines (CCL2, MIP-2, KC) known to activate Schwann cells and participate in metastasis were analyzed using ELISA. Additionally, the effects of minocycline, CD200fc, and Pegilayted liposomal doxorubicin (PLD) on Schwann cell responses were evaluated.

Results: Exposure to the secretome of breast cancer cells increased IL-6, CCL2, MIP-2, and KC production in Schwann cells, with a more pronounced increase in CD200KO Schwann cells. Minocycline suppressed Schwann cell inflammatory responses, but the reduction in CD200KO cells was more limited compared to wild-type Schwann cells. PLD did not have a direct effect on Schwann cells; however, the response of Schwann cells to the secretome of breast cancer cells treated with PLD was significantly suppressed.

Conclusion: This study is the first to demonstrate that CD200 may play a role in regulating Schwann cell immune responses in breast cancer interactions, potentially influencing tumor progression.

Keywords: Schwann cell, CD200, breast cancer, cytokine, chemokine.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
TABLolar DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Meme Kanseri.....	3
2.2. Tümör Mikroçevresi.....	3
2.3. Periferik Sinir Sistemi ve Kanseri.....	5
2.4. Schwann Hücre.....	6
2.5. Schwann Hücrelerin Gelişimi.....	6
2.6. Wallerian Dejenerasyonu	8
2.7. Schwann Hücrelerin Kanseri ile Etkileşimi	9
2.8. CD200 Molekülü ve İmmünolojik Fonksiyonları	13
2.9. CD200 Ligandının Kanserdeki Çift Yönlü Etkileri.....	15
2.9.1. CD200 Ligandının Tümörü Baskılayıcı Etkileri.....	16
2.9.2. CD200 Ligandının Tümörü Destekleyici Etkileri	17
2.10. CD200 Ligandı ve Schwann Hücre	19
2.11. Sitokinler	20
2.11.1. İnterlökin 6 (IL-6).....	21
2.11.2. Tümör Nekroz Faktörü Alfa (TNF-alfa)	22
2.11.3. İnterlökin-1 Beta (IL-1 β).....	24
2.12. Kemokinler.....	25
2.12.1. Keratinosit kaynaklı kemokin (KC ; CXCL-1).....	25

2.12.2. Makrofaj İnflamatuar Protein 2 (MIP-2).....	26
2.12.3. Monosit Kemoatraktan Protein 1 (MCP-1)	27
2.13. CD200fc.....	29
2.14. Minosiklin Hidroklorür.....	29
2.15. Pegile Lipozomal Doksorubisin (PLD).....	31
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	33
3.1. Deney Hayvanları	33
3.2. DNA Ekstraksiyonu.....	33
3.3. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR).....	33
3.4. İn vivo Ortotopik Tümör Modeli Oluşturulması	34
3.5. Primer Meme Kanseri Hücre Kültürü.....	35
3.6. Primer Schwann Hücre Kültürü	36
3.7. İmmün Floresan Boyama	38
3.8. Schwann Hücre Uyarımı, Pegile Lipozomal Doksorubisin, CD200fc ve Minosiklin Uygulaması.....	39
3.9. Hücre Proliferasyon Tayini.....	40
3.10. ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) Yöntemi ile Sitokinler Ve Kemokinlerin Ölçümü	41
3.10.1. TNF-alfa ELISA.....	41
3.10.2. IL-6 ELISA.....	42
3.10.3. MIP-2 ELISA.....	44
3.10.4. KC ELISA.....	45
3.10.5. MCP-1 (CCL-2) ELISA.....	46
3.10.5. IL-1 Beta ELISA.....	48
3.11. ELISA Sonuçlarının Hesaplanması ve Grafikleştirilmesi.....	49
3.12. İstatistiksel Analiz.....	49
3.13. Çalışmada Kullanılan Sarf Malzemeler, Kimyasallar, Kitler ve Cihazlar	49
4. BULGULAR.....	53
4.1. Farelerin Genotiplenmesi	53
4.2. Yabancıl Tip Schwann Hücrelerin Verifiye Edilmesi	53
4.3. Yabancıl Tip Schwann Hücre Uyarımları ve Sitokin-Kemokin Yanıtları.....	54
4.3.1. IL-6 Düzeyindeki Değişiklikler.....	54
4.3.2. TNF-alfa Düzeyindeki Değişiklikler.....	55

4.3.3. KC Düzeyindeki Değişiklikler.....	56
4.3.4. MIP-2 Düzeyindeki Değişiklikler	56
4.3.5. MCP-1 Düzeyindeki Değişiklikler	57
4.3.6. IL-1 Beta Düzeyindeki Değişiklikler	58
4.4. CD200KO Schwann Hücrelerin Verifiye Edilmesi.....	59
4.5. CD200KO Schwann Hücre Uyarımları ; Sitokin-Kemokin Yanıtları	60
4.5.1. IL-6 Düzeyindeki Değişiklikler.....	60
4.5.2. TNF-alfa Düzeyindeki Değişiklikler	61
4.5.3. KC Düzeyindeki Değişiklikler.....	62
4.5.4. MIP-2 Düzeyindeki Değişiklikler	63
4.5.5. MCP-1 Düzeyindeki Değişiklikler	64
4.6. Minosiklin ve CD200fc'nin Yabanıl tip Schwann Hücre Yanıtları Üzerine Etkilerinin Araştırılması	66
4.6.1. Yabanıl Tip Schwann Hücre IL-6 salınımindaki Değişiklikler; CD200fc, ve Minosiklinin Etkileri.....	66
4.6.2. Yabanıl Tip Schwann Hücre MCP-1 Salınımindaki Değişiklikler; CD200fc, ve Minosiklinin Etkileri.....	66
4.6.3. Yabanıl Tip Schwann Hücre KC Salınımindaki Değişiklikler; CD200fc, ve Minosiklinin Etkileri.....	68
4.7. Minosiklin ve CD200fc'nin CD200KO Schwann Hücre Yanıtları Üzerine Etkilerinin Araştırılması	69
4.7.1. CD200KO Schwann Hücre IL-6 Salınımindaki Değişiklikler; CD200fc, ve Minosiklinin Etkileri.....	69
4.7.2. CD200KO Schwann Hücre MCP-1 Salınımindaki Değişiklikler; CD200fc, ve Minosiklinin Etkileri.....	71
4.7.3. CD200KO Schwann Hücre KC Salınımindaki Değişiklikler; CD200fc, ve Minosiklinin Etkileri.....	72
4.8. Pegile Lipozomal Doksorubisin'in (PLD) Yabanıl tip Schwann hücre yanıtları üzerine etkilerinin araştırılması	74
4.8.1. IL-6 Düzeyindeki Değişiklikler.....	74
4.8.2. MCP-1 Düzeyindeki Değişiklikler	75
4.8.3. KC Düzeyindeki Değişiklikler.....	76
4.8.4. MIP-2 Düzeyindeki Değişiklikler	77

5. TARTIŞMA.....	78
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	86
KAYNAKLAR.....	88
ÖZGEÇMİŞ	112



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 4.1. CD200KO (CD200-) ve yabancı tip (CD200+) Schwann hücre sitokin-kemokin yanıtlarının karşılaştırılması.



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Akson boyunca Schwann hücre farklılaşması

Şekil 2.2. Schwann hücre gelişiminin evreleri

Şekil 2.3. Wallerian dejenerasyonu ve aksonun yenilenmesi

Şekil 2.4. Schwann hücre ve kanser etkileşimi

Şekil 2.5. CD200/CD200R etkileşimi.

Şekil.2.6. Kanserde CD200 upregülasyonu ile tümörü destekleyen

immünsüpresif etkiler

Şekil 2.7. Tümör mikroçevresinde sitokinlerin etkileri

Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan hücre dizileri

Şekil 3.2. Primer meme kanseri hücre kültürü.

Şekil 3.3. Primer Schwann hücre kültürü

Şekil 4.1. Farelerin CD200KO olduğunu gösteren PCR sonucu

Şekil 4.2. Yabancı tip Schwann hücrelerde S100B ve GFAP düzeylerinin immunoflorasan mikroskopide görüntülenmesi

Şekil 4.3. Kanser hücrelerinin ‘Conditioned Medium’ (CM)’leri ile karşılaştırılan Schwann hücre IL-6 sekresyonu

Şekil 4.4. Kanser hücrelerinin ‘Conditioned Medium’ (CM)’leri ile karşılaşan Schwann hücrelerinden TNF-alfa sekresyonu.

Şekil 4.5. Kanser hücrelerinin ‘Conditioned Medium’ (CM)’leri ile karşılaşan Schwann hücrelerinden KC sekresyonu

Şekil 4.6. Kanser hücrelerinin ‘Conditioned Medium’ (CM)’leri ile karşılaşan Schwann hücrelerinden MIP-2 sekresyonu

Şekil 4.7. Kanser hücrelerinin ‘Conditioned Medium’ (CM)’leri ile karşılaşan Schwann hücrelerinden MCP-1 sekresyonu

Şekil 4.8. Kanser hücrelerinin ‘Conditioned Medium’ (CM)’leri ile karşılaşan Schwann hücrelerinden IL-1 beta sekresyonu

Şekil 4.9. CD200KO Schwann hücrelerde S100B ve GFAP düzeylerinin immunoflorasan mikroskopide görüntülenmesi

Şekil 4.10. Kanser hücrelerinin ‘Conditioned Medium’ (CM)’leri ile karşılaşan CD200KO Schwann hücrelerinden IL-6 sekresyonu

Şekil 4.11. Kanser hücrelerinin ‘Conditioned Medium’ (CM)’leri ile karşılaşan CD200KO Schwann hücrelerinden TNF-alfa sekresyonu.

Şekil 4.12. Kanser hücrelerinin ‘Conditioned Medium’ (CM)’leri ile karşılaşan CD200KO Schwann hücrelerinden KC sekresyonu

Şekil 4.13. Kanser hücrelerinin ‘Conditioned Medium’ (CM)’leri ile karşılaşan CD200KO Schwann hücrelerinden MIP-2 sekresyonu

Şekil 4.14. Kanser hücrelerinin ‘Conditioned Medium’ (CM)’leri ile karşılaşan CD200KO Schwann hücrelerinden MCP-1 sekresyonu

Şekil 4.15. Yabanıl tip Schwann hücre IL-6 sekresyonu üzerine CD200fc, minosiklin ve tümör hücre uyarımlarının etkilerini gösteren grafikler

Şekil 4.16. Yabanıl tip Schwann hücre MCP-1 sekresyonu üzerine CD200fc, minosiklin ve tümör hücre uyarımlarının etkilerini gösteren grafikler

Şekil 4.17. Yabanıl tip Schwann hücre KC sekresyonu üzerine CD200fc, minosiklin ve tümör hücre uyarımlarının etkilerini gösteren grafikler

Şekil 4.18. CD200KO Schwann hücre IL-6 sekresyonu üzerine tümör CM uyarımları, CD200fc ve minosiklinin etkileri

Şekil 4.19. CD200KO Schwann hücre MCP-1 sekresyonu üzerine tümör CM uyarımları, CD200fc ve minosiklinin etkileri

Şekil 4.20. CD200KO Schwann hücre KC sekresyonu üzerine tümör CM uyarımları, CD200fc ve minosiklinin etkileri

Şekil 4.21. Yabanıl tip Schwann hücre IL-6 sekresyonu üzerine Pegile Lipozomal Doksorubisin'in (DOX-5µM) etkisini gösteren grafikler

Şekil 4.22. Yabanıl tip Schwann hücre MCP-1 sekresyonu üzerine Pegile Lipozomal Doksorubisin'in (DOX-5µM) etkisini gösteren grafikler

Şekil 4.23. Yabanıl tip Schwann hücre KC sekresyonu üzerine Pegile Lipozomal Doksorubisin'in (DOX-5µM) etkisini gösteren grafikler

Şekil 4.24. Yabanıl tip Schwann hücre MIP-2 sekresyonu üzerine Pegile Lipozomal Doksorubisin'in (DOX-5µM) etkisini gösteren grafikler

SİMGELER ve KISALTMALAR

CD200	: Cluster of differentiation 200
CD200KO	: Cluster of differentiation 200 knock out
SCH	: Schwann hücre
4TBM	: 4T1 fare meme kanseri modelinin beyine metastaz yapan alt tipi
4TLM	: 4T1 fare meme kanseri modelinin karaciğere metastaz yapan alt tipi
67NR	: Metastatik olmayan fare meme kanseri hücre dizisi
CM	: Condition medium
IL-6	: İnterlökin 6
TNF-alfa	: Tümör nekroz faktörü alfa
IL-1beta	: İnterlökin 1 beta
KC	: Keratinosit kaynaklı kemokin
CXCL-1	: CXC kemokin ligand 1
MIP-2	: Makrofaj inflamatuvar protein 2
CXCL-2	: CXC kemokin ligand 2
MCP-1	: Monosit kemoatraktan protein 1
CCL-2	: CC kemokin ligand 2
PLD	: Pegile lipozomal doksorubisin
GFAP	: Glial fibrillary asidic protein
MMP	: Matriks metalloproteinaz

NF-κB	: Nükleer faktör kappa-B
MAPK	: Mitojenle aktive protein kinaz
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
PBS	: Phosphate buffer saline (fosfat tampon solüsyonu)
PDL	: Poly-D-lysine
NRG1	: Neurogulin 1
bFGF2	: Basic fibroblast growth factor 2
μM	: Mikromolar
nM	: Nanomolar
pg/ml	: Mililitredeki pikogram düzeyi
μg/ml	: Mililitredeki mikrogram düzeyi
MDSC	: Myeloid derived suppressor cell, Miyeloid kökenli baskılayıcı hücre

1. GİRİŞ

Periferik sinir sisteminin glial hücreleri olan **Schwann hücreler**, inflamatuvar, immün modülatör ve rejeneratif kapasitelere sahip hücrelerdir ve aksonların korunmasında, nöronal hasarın onarılmasında ve miyelin oluşumunda temel rol oynarlar. Bu hücreler, periferik sinir hasarına yanıt olarak **rejenerasyon/onarım fenotipine** farklılaşırlar. Hasar durumunda Schwann hücreleri kısa sürede pro-inflamatuvar sitokinler, kemokinler ve sinir rejenerasyonunu kontrol eden büyüme faktörleri salgırlar (Jessen ve Mirsky, 2016; Ozaki ve ark., 2008; Stratton ve Shah, 2016; Taskinen ve Röyttä, 2000). Yakın dönemde yapılan çalışmalar **kanser hücreleriyle karşılaşan Schwann hücrelerinin nöronal hasarda olduğu gibi aktif hale geldiği**, sekrete ettikleri **sitokin ve kemokinlerle inflamasyona ve immün süpresyona** katkıda bulunduklarını ve **kanserin metastazını arttırdığını** göstermektedir (Deborde ve ark., 2016; G. V. Shurin ve ark., 2019; Y. Zhou ve ark., 2020). **CD200 (Cluster of differentiation)**, bir membran glikoproteinidir ve immün sistem üzerinde önemli immün modülatör etkileri vardır. CD200, immün hücreler, düz kas hücreleri, endotel hücreler, epitel hücreler ve kanser hücreleri gibi çok çeşitli hücrelerde eksprese edilmektedir (Lauzon-Joset ve ark., 2019). Nöroinflamasyon, kanser, artrit, transplantasyon gibi birçok hastalık modelinde etkileri araştırılmıştır (Holmannová ve ark., 2012). Yapılan çalışmalarda glial CD200'ün santral sinir sisteminde inflamatuvar hastalıkların kontrolünde ve baskılanmasında önemli bir işlev üstlendiğini göstermektedir (C.-Y. Chang ve ark., 2011; Chitnis ve ark., 2007; Manich ve ark., 2019; Nagy ve ark., 2020). Kanserde ise CD200 molekülünün çift yönlü etki ettiği ve bu etkinin tümörün tipine ve mikroçevrenin yapısına bağlı olarak değişebileceği anlaşılmaktadır. Bazı çalışmalarda **CD200'ün anti-inflamatuvar yanıtı uyararak sitotoksik immüniteyi uyardığı ve metastazı azalttığı** gösterilmiştir (Erin ve ark., 2018; R. M. Gorczynski ve ark., 2018). Bazı çalışmalarda ise immün süpresif mikroçevreyi destekleyerek tümörün gelişimini uyardığı bildirilmiştir. Yakın zamanda CD200 molekülünün periferik sinirlerde ve Schwann hücrelerde de, eksprese edildiği, sinir hasarına benzer durumlarda ekspresyonunun değiştiği gösterilmiştir (C.-Y. Chang ve ark., 2011). Ancak CD200'ün Schwann hücre biyolojisindeki ve periferik sinir sistemindeki etkileri tam olarak bilinmemektedir.

Bu nedenle çalışmamızda, farklı organlara metastaz yapmış fare **metastatik ve metastatik olmayan meme kanseri** hücre hatlarında **Schwann hücrelerinin** kanser hücrelerine verdiği yanıt üzerindeki **CD200 ligandının** etkisini araştırmayı amaçladık. Bu hedefler doğrultusunda CD200 geni silinmiş ve silinmemiş farelerin siyatik sinirlerinden izole edilen Schwann hücreleri metastatik (4TLM ve 4TBM) ve metastatik olmayan (67NR) meme kanser hücrelerinin sekrotomları ile uyarıldı. Bu uyarının Schwann hücre aktivasyonu gösteren ve metastatik süreçte rol oynadığı bilinen inflamatuvar sitokinlerin (IL-6, TNF- α , ve IL-1 β) ve kemokinlerin salımı (CCL2, MIP-2 ve KC) üzerine etkileri araştırıldı. Ayrıca **tetrasiklin antibiyotik grubundan olan minosiklin**, glial hücrelerin aktivasyonunu engelleyerek, inflamasyonu tetikleyen sitokinlerin ve kemokinlerin sentezini/salımını azaltmaktadır. Dolayısıyla kanser hücreleri ile karşılaşmış Schwann hücrelerin fenotipindeki değişimlerin minosiklinle geriye dönüp dönmeyeceği ve minosiklin yanıtında CD200'ün rolü araştırıldı. Son olarak meme kanseri tedavisinde kullanılan **Pegile lipozomal doksorubisin** ile meme kanseri hedefli uygulamanın da bu süreç üzerine etkileri araştırıldı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Meme Kanseri

Günümüzde erken teşhis ve tedavilerdeki ilerlemelere rağmen meme kanseri kadınlar arasında hala kanser ölümlerinin önde gelen nedenidir (Giaquinto ve ark., 2024). GLOBOCAN 2022 verilerine göre, kadınlarda her dört kanser vakasından biri ve her altı kanser ölüm nedeninden biri meme kanseridir (Giaquinto ve ark., 2024). Erken evre meme kanserinde klasik tedavi yöntemleriyle iyileşmeler olsa da çoğu kanser türünde olduğu gibi, meme kanserinde de uzak doku metastazları yüksek ölüm oranlarının başlıca nedenidir (Park ve ark., 2022).

Meme kanseri moleküler yapılarına göre çeşitli alt tiplere ayrılmaktadır. En agresif olanlarından biri üçlü negatif meme kanseri (TNBC); östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR) ve HER2'yi eksprese etmez. Bu nedenle, TNBC genellikle ileri evrede (metastatik süreçte) tanı alır, bu da hastalığın yüksek nüks oranlarına ve düşük sağkalım oranlarına yol açar (Dent ve ark., 2007; Garrido-Castro ve ark., 2019). TNBC, en sık beyne, kemiğe, akciğerlere ve karaciğere metastaz yapar (Lu ve Kang, 2007).

Cerrahi radyoterapi kemoterapi gibi klasik tedavi yöntemlerine ek olarak kişiselleştirilmiş tedavi ve immünoterapilerin de uygulanmasıyla tedavilerin etkinliği artmış olsa da çoğu hastada ilaç direnci gelişmekte, nüks ve metastaz görülmektedir. Bu durumun başlıca nedenleri ise tümör hücrelerinin heterojen yapısı, kanser kök hücreleri ve zamanla tümörü destekler hale gelen kompleks mikroçevredir (Barzaman ve ark., 2020; Lee ve ark., 2019; Xiao ve Yu, 2021; L. Zhang ve ark., 2023).

2.2. Tümör Mikroçevresi

Tümör mikroçevresi, tümör hücrelerinin de içinde bulunduğu oldukça kompleks ve dinamik bir ortamdır. Bu ortamda kanser kök hücreleri, fibroblastlar, stromal hücreler, immün hücreler, yapısı bozulmuş ekstraselüler matriks ve kan damarları, çok çeşitli büyüme hormonları, sinyal molekülleri, sitokinler ve kemokinler bulunur. Ayrıca hipoksi ile karakterize bir ortamdır (X. Chen ve Song, 2019; Siddiqui ve ark., 2024).

Tümör hücreleri ile tümöre infiltre hücreler ve stromal hücreler arasındaki etkileşimler tümör mikroçevresinin yapısını belirler. Tümör, kendi lehine çalışacak şekilde mikroçevreye sinyal gönderir. Dolayısıyla immünsüpresif ve tolerojenik özellik kazanan mikroçevre; tümörün büyümesini ve metastazını destekler, hatta tedavi direncine neden olur (Hwang ve ark., 2008; Tataranu ve ark., 2024). Örneğin yapılan çalışmalar ile tümör mikroçevresi bileşenlerinden kanserle ilişkili fibroblastların, prostat, meme, pankreas ve kolorektal kanserlerde pro-tümöral etki gösterdiği bilinmektedir. Kanserle ilişkili fibroblastların sekrete ettiği CXCL-12 meme kanseri hücrelerindeki CXCR-4'e bağlanarak hücre proliferasyonunu hızlandırır, tümör büyümesini uyarır. Ayrıca ekstraselüler matriksi ya da hücre adhezyon moleküllerini yeniden şekillendirerek kanser hücresi invazyonunu ve metastazını desteklediği bildirilmiştir (Gaggioli ve ark., 2007; Labernadie ve ark., 2017). Başka bir çalışmada ise kemoterapi direncine neden olduğu gösterilmiştir (Brennen ve ark., 2012). Yakın zamanda fibroblastların immün kontrol noktası aktivasyonuna bağlı bir mekanizmayla sitotoksik T hücre süpresyonuna yol açtığı rapor edilmiştir (Lakins ve ark., 2018).

Tümör mikroçevresinin önemli bir sitokin-kemokin kaynağı olan tümörle ilişkili makrofajlar, tümör oluşumu ve progresyonu ile ilişkili olan kronik inflamasyonun başlamasında ve sürdürülmesinde kritik rol oynamaktadır (DeNardo ve Ruffell, 2019; S. I. Grivennikov ve ark., 2010). İnflamasyonun başlıca kaynağı olan makrofajlar ve tümör hücresi, tümör hücre sağkalımını, kemoterapi ve radyoterapi direncini, metastazı, anjiyogenezi, immün kaçışı destekleyen ve ekstraselüler matriksi yeniden şekillendiren pro-inflamatuvar sitokinler ve inflamatuvar mediyatörler (IL-1, TNF-alfa, IL-6 TGF-beta gibi) salarlar (S. Grivennikov ve ark., 2009; Hojilla ve ark., 2008; Kelly ve ark., 2006; McKelvey ve ark., 2018; Zelenay ve ark., 2015). Tümörle ilişkili makrofajların ortamda toplanması ve polarizasyonu engellendiğinde, radyoterapi, kemoterapi ve anti-VEGF tedavi etkinliklerinde artış bildirilmiştir (Brown ve ark., 2017).

Tümör mikroçevresinin karmaşıklığı yalnızca bu hücrel ve moleküler bileşenlerle sınırlı değildir. Yakın zamanda yapılan çalışmalar ile tümörlerde **periferal sinir inervasyonunun varlığı ve özellikle Schwann hücrelerin de tümör mikroçevresinde bulunduğu yapısal değişimlerinin tümör gelişiminde önemli olduğu** dikkat çekmeye başlamıştır (Gysler ve Drapkin, 2021; Sun ve ark., 2022).

2.3. Periferal Sinir Sistemi ve Kanser

Bu alandaki ilk yayın 1897’de yapılmış ve farklı tümörlerde sinirlerin gösterildiği (sinir inervasyonu) ve bazılarında sinir liflerinin önemli sayıda bulunduğu bildirilmiştir. Ayrıca tespit edilen tümör içi filamentlerin normal yapıların sinirleri olduğu ve kanser hücreleri tarafından çevrelendiği sonucuna varmışlardır (Young, 1897). Sinirlerin kesilmesinin (denervasyon) tümör büyümesi üzerindeki etkisi, yarım yüzyıldan daha önce gösterilmiştir (de Sousa Pereira, 1946). Birkaç çalışmada ise tümörlerin stroma (bağ dokusu), parankim (asıl işlevsel doku) ve kan temini boyunca sinirlerle inerve edildiği ve tümör büyümesini etkilediği bildirilmiştir (Oertel, 1928). İlk kez bu bulgular, sinirlerin tümör mikroçevresinde önemli bir rol oynadığını ve tümör büyümesini etkileyen önemli bir faktör olabileceğini göstermektedir. Bu çalışmaların aksine tümörlerin nöronal yapılardan yoksun olduğunu bildiren çalışmalar olsa da (Winkelmann, 1956) son veriler tümör inervasyonunu doğrulamaktadır ve solid tümörlerde az, orta veya çok miktarda nöronların bulunduğu bildirilmiştir (Madeo ve ark., 2018; Oertel, 1930; Seifert ve Spitznas, 2001; Sone ve ark., 2017).

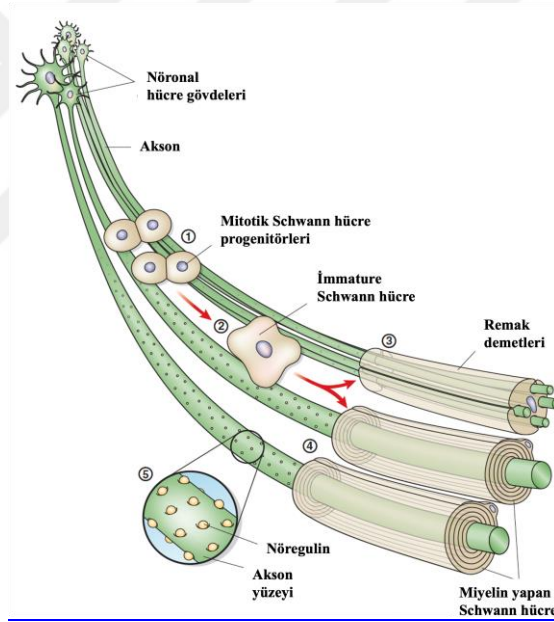
Bazı çalışmalarda ise solid tümörlerin içinde yeni sinir uçlarının oluşumları tespit edilmiştir. Tümörlerin sinir büyüme faktörü (NGF), beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF) ve slit proteinleri gibi nörotrofik faktörleri eksprese ederek kendi inervasyonlarını (neonörogenez veya neoaksonogenez) uyarabileceği bildirilmiştir (Allen ve ark., 2018; Ayala ve ark., 2008; Jobling ve ark., 2015). Bununla birlikte, yapılan başka bir çalışmada, tümörlerin büyümesi sırasında sinirlere zarar verebileceği ve tümör çevresindeki glial hücrelerin nörodejeneratif süreçleri ve sinir onarım fonksiyonlarını aktive edebileceği bildirilmiştir (G. V. Shurin ve ark., 2019). Aynı çalışmada, tümörün neden olduğu nörogliaların yeniden programlanmasının, ekstraselüler matriksi ve immün mikroçevreyi etkileyerek kanser büyümesini desteklediği ifade edilmiştir (G. V. Shurin ve ark., 2019).

Bu bulgular ışığında, tümör çevresinde ve yapısında nöronların bulunabileceği ve tümör hücreleri ile nöronlar arasındaki etkileşimlerin, tümör büyümesini etkileyebileceği sonucuna varılmaktadır. Sonuç olarak, tümör mikroçevresi; hücrel ve moleküler etkileşimler, çevresel faktörler ve sinirsel yapıların etkileşimi ile kanserin ilerlemesinde ve tedaviye direnç gelişiminde önemli bir rol oynayan karmaşık

bir yapı oluşturur. Bu nedenle, tümör mikroçevresi, tedavi yaklaşımları için popüler bir hedef haline gelmiştir.

2.4. Schwann Hücre

Schwann hücreler periferel sinir sisteminin önemli glial hücreleridir. Vücutta yaygın olarak bulunurlar. Temel fonksiyonları aksonları korumak, nöronal hasarın onarılması ve immün yanıtın düzenlenmesidir (Bunimovich ve ark., 2017). Ayrıca, nörodejeneratif hastalıklar, nöropati ve malignite ile ilişkili ağrı ve kanserin ilerlemesi gibi birçok patolojik süreçte de rol oynadıkları bilinmektedir (W.-J. Zhang ve ark., 2023; Y. Zhang ve ark., 2023). Schwann hücrelerin immün modülasyon yetenekleri, çok çeşitli hastalıklarda etkili olmalarına neden olmaktadır (S. H. Zhang ve ark., 2020)

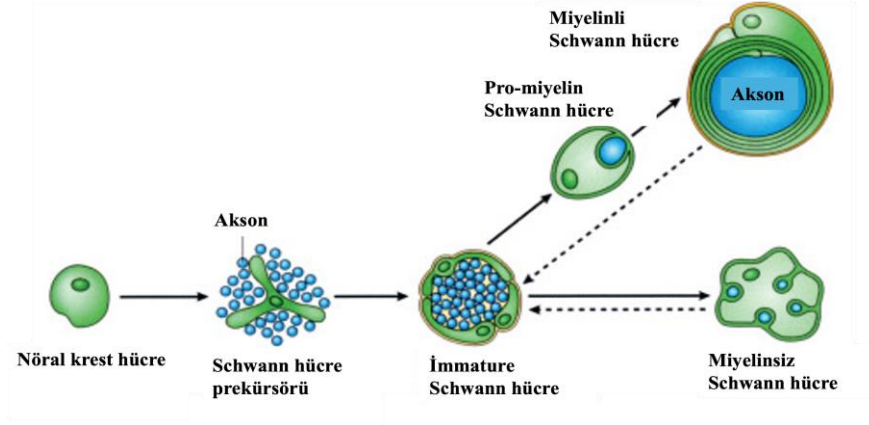


Şekil 2.1. Akson boyunca Schwann hücre farklılaşması (Nave ve Schwab, 2005).

2.5. Schwann Hücrelerin Gelişimi

Temelde Schwann hücrelerin gelişimi 3 aşamadan oluşur. İlk olarak embriyonik gelişim sırasında nöral tüpün her iki tarafında bulunan nöral plaklardan ayrılan nöral krest hücrelerinden türerler. Nöral krest hücreleri farklılaşır ve Schwann hücrelerinin gelişiminde kritik rol oynayan Schwann hücre prekürsörlerine dönüşür. Bu hücreler, BFABP (Brain fatty acid-binding protein), P0 proteini ve Desert hedgehog (DHH) gibi

bazı differansiyasyon belirteçlerini eksprese ederler. Schwann hücre öncülleri vücutta göç eder ve periferik sinirlerin etrafına yerleşir. Aksonların etrafında Schwann hücrelerinin son gelişim aşamasındaki bir diğer basamak olan immatür Schwann hücrelerine dönüşürler (Şekil 2.1). Bu hücreler miyelin yapan ve miyelin yapmayan olarak 2 türe ayrılır; Miyelin oluşturan Schwann hücreler büyük çaplı tek bir aksonun etrafını sarar ve nöral uyarının yüksek hızda iletilmesini sağlar. Miyelin oluşturmeyan Schwann hücreler ise 3 tiptir; İlki Remak Schwann hücreleridir; birden fazla küçük çaplı aksonu Remak demetleri halinde saran Schwann hücrelerdir. İkincisi terminal Schwann hücrelerdir; nöromüsküler kavşakta sinapsa kimyasal ve fiziksel destek sağlar. Üçüncüsü onarım Schwann hücreleri ise travmaya yanıt olarak yeniden programlanır, miyelin oluşturur (Deborde ve Wong, 2022; Jessen ve ark., 2015). İmmatür Schwann hücreleri, otokrin sinyaller ile hayatta kalabilirler. Bu özellik, Schwann hücre öncüllerinde mevcut değildir, aksonlardan gelen hayatta kalma sinyallerine tamamen bağımlıdır. Bu sinyallerden bilinen en önemlisi β -neuregulin 1 (NRG1) dir (Jessen ve Mirsky, 2005). Schwann hücrelerin gelişimsel aşamalarında çok farklı moleküler belirteçler vardır. Örneğin; tüm gelişimsel aşamalarda bulunan belirteçler: Örneğin, SOX10 (SRY box 10). Nöral krest hücreleri ve Schwann hücre öncülleri tarafından eksprese edilen, ancak immatür Schwann hücrelerinde down regüle olan belirteç; AP2 α (Activator protein 2 α). Sadece Schwann hücre öncülleri tarafından eksprese edilen belirteç için ise Cadherin 19 örnek verilebilir. Schwann hücre öncülleri ve immatür Schwann hücrelerinde bulunan, ancak nöral krest hücrelerinde bulunmayan belirteç ise BFABP (Brain fatty acid-binding protein). İmmatür Schwann hücrelerinde bulunan, ancak Schwann hücre öncüllerinde düşük düzeyde veya hiç bulunmayan belirteçlere **GFAP (Glial fibrillary acidic protein) ve S100 proteinleri** örnek verilebilir (Jessen ve Mirsky, 2005). Özetle Schwann hücrelerinin gelişimi, aksonlardan alınan sinyallere, sağkalım faktörlerine ve moleküler düzenleyicilere bağımlı olan bir süreçtir.



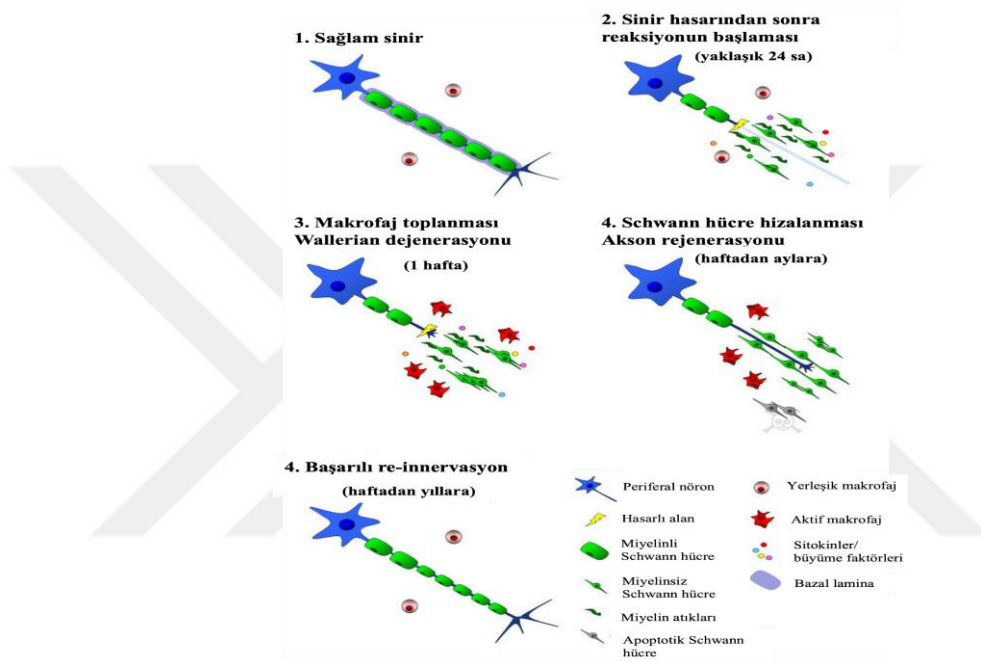
Şekil 2.2. Schwann hücre gelişiminin evreleri (Jessen ve Mirsky, 2005).

2.6. Wallerian Dejenerasyonu

Schwann hücre biyolojisinin en dikkat çekici yönü aksonun hasara uğraması (Wallerian dejenerasyonu) durumunda çok güçlü yanıt oluşturmalarıdır ve bu yanıtın geri dönüşümlü olmasıdır. Schwann hücrelerin ve periferik sinirlerin önemli rejeneratif kapasitesini oluşturan süreçler, miyelin degradasyonu, dediferansiyasyon, bölünme, aksonotropik faktörlerin üretimi ve remiyelinizasyondur (Kidd ve ark., 2013).

Wallerian Dejenerasyonu, bir aksonun kesilmesi veya hasar görmesi durumunda gerçekleşen bir süreçtir ve periferik sinir sisteminde rejenerasyon için kritik bir adımdır. Bu süreç, aksonların distal kısmının hasar görmesini takiben, hızlı hücresel ve moleküler düzeyde değişiklikler ile başlar. Periferik sinir hasarına yanıtta Schwann hücreler hızla farklılaşır ve aktifleşir. Bu aktivasyon, Toll-like reseptörleri aracılığıyla gerçekleşir. Hasar sonrası hemen ilk hücresel yanıt, Schwann hücrelerinin aksonlardan ayrılması ve dediferansiyasyona uğrayarak daha ilkel ve esnek bir hale gelmeleridir. Bu durumda Schwann hücreleri **IL-1 α** , **IL-1 β** , **IL-6**, **TNF- α** , **MCP-1**, **CXCL12** gibi pro-inflamatuar sitokinler ve kemokinler salgılar. Bu moleküller, immün hücrelerin, özellikle makrofajların bölgeye infiltre olmasını sağlar. Makrofajlar, ortamdaki hücresel ve moleküler atıkları temizler, yani akson ve miyelin kalıntılarını fagosite ederler. Bu temizlik süreci, yeni aksonların büyümesi için gerekli ortamın hazırlanmasında önemlidir. Aynı zamanda, makrofajlar ve Schwann hücreleri, rejenerasyonu uyaran NGF, BDNF, GDNF ve FGF büyüme faktörleri ve TGF- β gibi sitokinler salgırlar. Bu moleküller, yeni aksonların büyümesini ve miyelinizasyon

yapabilmesi için gerekli koşulların sağlanmasına yardımcı olur. Schwann hücreleri, miyelin kılıfını yeniden oluşturmak için aksonları sararak remiyelinizasyon sürecini başlatırlar. Makrofajlar ve Schwann hücreler, aynı zamanda, TGF- β ve IL-10 gibi anti-inflamatuar sitokinler salarak iyileşme sürecini düzenler ve aşırı inflamasyonu engeller. Bu koordineli hücresel yanıtlar, periferik sinirlerdeki hasarın tamirini ve aksonların büyümesini sağlayarak rejenerasyon sürecini destekler (Gaudet ve ark., 2011; Glenn ve Talbot, 2013; Rotszhenker, 2011; Stassart ve ark., 2013).



Şekil 2.3. Wallerian dejenerasyonu ve aksonun yenilenmesi (Gaudet ve ark., 2011).

2.7. Schwann Hücrelerin Kansere Etkileşimi

Sinir sisteminin, kanser gelişimi ve metastazı üzerindeki etkileri ile ilgili sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Yeni çalışılmakta olan bu yolla, periferik sinir sisteminin majör glial hücreleri olan ve vücutta yaygın olarak bulunan Schwann hücrelerinin önemli olduğu anlaşılmaya başlanmıştır. Schwann hücreleri temel olarak **inflamatuar, immün modülatör ve rejeneratif kapasitelere sahip hücrelerdir**. Periferik sinir sisteminde temel fonksiyonları ise, aksonların korunması, nöronal hasarın düzeltilmesi ve miyelin oluşumudur. Ancak son zamanlarda sinirlerin/Schwann hücrelerin insan ve hayvan tümör örneklerinde mevcut olduğu, pankreas, prostat, akciğer, melanoma ve servikal gibi çeşitli kanserlerle de ilişkili

olduğu anlaşılmıştır (Bunimovich ve ark., 2017; Ferdoushi ve ark., 2020; Keskinov ve ark., 2016; Martyn ve ark., 2019; Palomo Irigoyen ve ark., 2018; G. V. Shurin ve ark., 2019; M. R. Shurin ve ark., 2020; Taveggia, 2016; Y. Zhou ve ark., 2018).

Normalde Schwann hücreleri periferik sinir hasarına yanıtta tamir fenotipine farklılaşırlar, miyelin oluşturma yeteneklerini kaybederler. Kısa sürede çok çeşitli pro-inflamatuar sitokinler, kemokinler ve sinir rejenerasyonunu kontrol eden büyüme faktörlerini eksprese ederler (Jessen ve Mirsky, 2016; Ozaki ve ark., 2008; Stratton ve Shah, 2016; Taskinen ve Röyttä, 2000). Schwann hücrelerinin bu yeniden programlanma sürecinde yaklaşık 4000 gen ekspresyonun değiştiği ve c-Jun, Notch, Sox2 ve Mitogen-aktive protein kinaz (MAPK) sinyalinin bu süreçte önemli olduğu bilinmektedir (Arthur-Farraj ve ark., 2012; Jessen ve Arthur-Farraj, 2019).

Yakın zamanda yapılan çalışmalar tümör hücresi ile karşılaşmış Schwann hücrelerin fenotip değiştirdiği ve ‘de-diferansiyasyon’ geçirerek aktif hale gelip, sinir hasarına verdikleri yanıtı çok benzer bir yanıt oluşturduklarını göstermektedir (Deborde ve ark., 2016; G. V. Shurin ve ark., 2019; Y. Zhou ve ark., 2020). Örneğin GFAP (glial fibriler asidik protein) ekspresyonu, hem sinir hasarında hem de kanser hücreleri ile karşılaşmış Schwann hücrelerinde bulunmaktadır (Deborde ve Wong, 2017; Demir ve ark., 2014; Jessen ve Mirsky, 2016). GFAP⁺ Schwann hücrelerin, pankreas ve kolon kanserinin premalign evresinde bulunduğu ve kanser hücrelerine doğru göç ettiği bildirilmiştir. GFAP⁺ Schwann hücrelerin kanser hücreleriyle yakın ilişki içinde olduğu, kanser hücrelerinin yayılmasını, migrasyonunu ve invazyonlarını uyardığı bilinmektedir. Ayrıca immün hücreleri ortama çektiği ve aktiveleştirdiği bildirilmiştir (Deborde ve ark., 2016; Demir ve ark., 2014; G. V. Shurin ve ark., 2019; Silva ve ark., 2019).

Sinir onarımında olduğu gibi Schwann hücrelerden salınan IL-6 ve CCL-2 (MCP-1) gibi faktörler kanser invazyonu esnasında da Schwann hücrelerden salınır (He ve ark., 2015; Huang ve ark., 2020; Jessen ve Mirsky, 2016). Schwann hücrelerin sekrete ettiği CCL2’nin, reseptörü CCR2 aracılığı ile servikal kanser hücrelerinin çoğalmasına, göç etmesine, invazyonuna ve epitel-mezenkimal geçişine (EMT) neden olmuştur. Kanser hücresinden gelen sinyallerin ise Schwann hücrelerde MMP2, MMP9 ve MMP12 gibi metalloproteinazların (MMP’ler) ekspresyonunu uyararak Schwann hücrelerin matrisin parçalamasını tetiklediğini bildirilmiştir. Servikal kanser çalışması verileri,

kanser-sinir karşılıklı konuşmasının (cross talk) perinöral invazyonu kolaylaştıran bir tümör mikroçevresi oluşturduğunu göstermektedir. CCL2/CCR2 ekseninin servikal kanserde perinöral invazyonun tahmin edilmesinde ve sinirlerin korunmasında potansiyel bir belirteç olabileceği ifade edilmiştir (Huang ve ark., 2020).

2019'da yapılan bir çalışmada, melanoma hücrelerinin 'conditioned mediumları' ile karşılaşan Schwann hücrelerinin uyarıldığı (aktif hale geldiği), sinir hasarı varmış gibi davrandığı gösterilmiştir (G. V. Shurin ve ark., 2019). Schwann hücrelerde, Id2, Egr1, c-Jun ve Sox2 gibi genlerin ekspresyonunda artış (upregülasyon) ve Sox10, Egr2 ve Oct6 gibi miyelinasyonu teşvik eden genlerin ekspresyonunda azalma (downregülasyon) yani onarım tipi Schwann hücrelerinkine benzeyen bir gen ekspresyon profili sergilediği rapor edilmiştir. Dahası ERK ve AKT sinyal yollarının, bu hücrelerde onarım tipi Schwann hücrelerde olduğu gibi aktifleştiği bildirilmiştir. Onarım tipi Schwann hücrelere benzer şekilde, melanoma şartlandırılmış ortamda kültürlenmiş Schwann hücrelerde; sinir onarımı, hücre dışı matriksin yeniden organizasyonu, immün modülasyon, kemotaksi ve miyelin fagositozunda rol oynayan genlerin (MMP1, FGF2, VEGF, IL6, MIF, AREG, BDNF, GDNF, Galectin-3 ve TGF- β 1) ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (G. V. Shurin ve ark., 2019).

Ayrıca Schwann hücre aktivasyonunun tümörögenезin erken evrelerinde görüldüğü ve Schwann hücre aktivasyon düzeyinin tümörün tipi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Demir ve ark., 2014). Pankreatik karsinomada, aktif Schwann hücrelerinin kanser dokusunda matriksi parçaladığı ve kanser hücrelerinin invazyonunu arttırdığı gösterilmiştir (Deborde ve ark., 2016). Demir ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada Schwann hücrelerinin pankreas ve kolon kanseri hücrelerine doğru hareket ettiği bildirilmiştir (Demir ve ark., 2014). Pankreas kanserinde yapılan başka bir çalışmada ise Schwann hücrelerinin nöral hücre adhezyon molekülü 1'i (NCAM) üreterek kanser hücrelerini sinirlere doğru yönlendirdiği ve perinöral invazyona neden olduğu bildirilmiştir (Deborde ve ark., 2016).

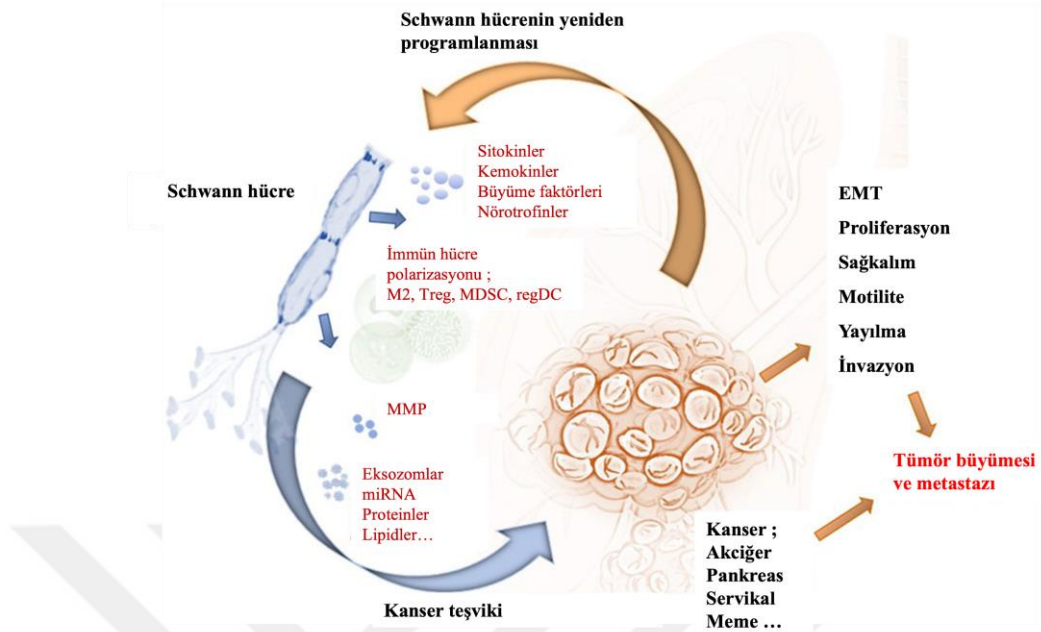
Diğer taraftan Schwann hücrelerinden elde edilen 'conditioned medium' un tükrük bezinin adenoid sistik kanser hücrelerinde epitelyal-mezankimal geçişe (EMT) neden olarak invazyon yeteneklerini arttırdığı bulunmuştur. Benzer etkiler prostat, pankreas ve akciğer kanserinde de gösterilmiştir (Shan ve ark., 2016).

Epitelyal mezenkimal geçişi, akciğer kanserinde Schwann hücrelerinden salınan CXCL5'in CXCR2 ile etkileşiminin PI3K/AKT/GSK-3 β /Snail- Twist yoluna bağlı aktifleştirdiği, insan pankreas kanserinde ise Schwann hücrelerinden salınan IL-6'nın indüklediği bildirilmiştir (Y. Zhou ve ark., 2018). Sonuç olarak tüm bu çalışmaların bulgularıyla Schwann hücrelerinden salınan faktörlerin kanser hücrelerinin metastatik potansiyelini arttırabileceği anlaşılmaktadır.

Nöron hasarına bağlı olarak veya kanser hücreleri ile aktifleşen Schwann hücreleri, malign hücreleri direkt etkileyebildikleri gibi (contact dependent effect), tümör mikroçevresindeki immün hücreleri etkileyerek de (contact independent effect) immünsüpresif ve inflamatuvar bir ortama katkı sağlayabilirler. Örneğin aktif Schwann hücreleri, miyeloid kökenli baskılayıcı hücreleri (MDSC) tümöre çekecek kemokinleri eksprese etmektedir (Martyn ve ark., 2019; M. R. Shurin ve ark., 2020). MDSC, anti-tümöral immüniteyi baskılayıp, kronik inflamasyona neden olmakta ve metastazı arttırabilmektedir. Başka bir çalışmada Schwann hücrelerinin yüksek düzeyde CCL2, CXCL5, CXCL12 ve CXCL8 ürettiği ve makrofajların M2 polarizasyonunu uyardığı gösterilmiştir. M2 fenotipine sahip makrofajlar tümör mikroçevresinde MDSC'ler gibi istenmezler çünkü anti-tümöral yeteneklerini kaybettikleri gibi anjiyogenez oluşumunu ve tümör progresyonunu desteklerler. Aynı alışmada Schwann hücreleriyle birlikte kültürlenen makrofajların akciğer kanser hücrelerinin proliferasyonunu belirgin şekilde uyardığı/arttırdığı bildirilmiştir (Y. Zhou ve ark., 2020).

Yakın zamanda akciğer kanserinde yapılan bir çalışmada Schwann hücrelerin kanser kaynaklı faktörler ile aktifleştiği, fenotip değiştirdiği bildirilmiştir. Bu alışmada Schwann hücrelerin YAP/TAZ Hippo sinyal yolağı aktivasyonuna bağlı doublecortin (DCX) eksprese ettiği, DCX + Schwann hücrelerin adrenalın sentezleyerek kanser hücrelerin kök hcreliliğini uyardığı ve kemoterapi direncine neden olduğu bildirilmiştir (Otani ve ark., 2024).

Dolayısıyla tüm bu çalışmalar kanser hücrelerinin aktifleştirdiği Schwann hücrelerinden salınan mediyatörlerin, kanser gelişimini ve metastazı arttırıcı yönde etki ettiğine hatta terapi direncine neden olduğuna işaret etmektedir. Bu nedenle tümör hücreleri ile Schwann hücrelerinin karşılıklı etkileşiminde (cross-talk) rol oynayan mediyatörlerin ve moleküler mekanizmaların detaylı araştırılması kanserin agresifliğinin kırılması ve olası tedavi direncinin önlenmesi açısından önemlidir.



Şekil 2.4. Schwann hücre ve kanser etkileşimi (Shurin, M. ve ark 2024).

2.8. CD200 Molekülü ve İmmünolojik Fonksiyonları

CD200, immunglobulin süper ailesine ait, tek geçişli membran tip 1 glikoproteinidir. OX-2 olarak da adlandırılmaktadır. Yapısında 2 ekstrasellüler alan, bir transmembran alan ve 19 amino asitten oluşan bir sitoplazmik kuyruk bulunur (Choe ve Choi, 2023). Otoimmünite, transplantasyon ve viral enfeksiyonlarda inflamasyonu düzenleyen, yaygın bulunan bir hücre yüzey molekülüdür.

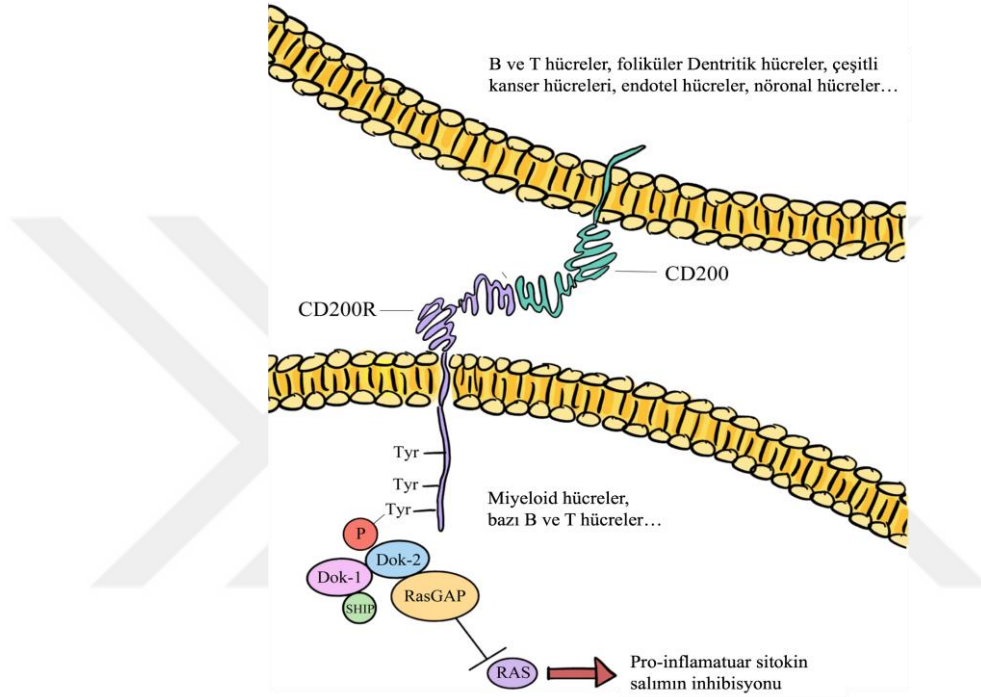
CD200, kendi reseptörü olan CD200R'e bağlanır (Barclay ve ark., 2002). CD200'ün yaygın ekspresyonunun aksine, CD200R'ün ekspresyonu miyeloid hücrelerin yüzeyleriyle sınırlıdır (Wright ve ark., 2003). CD200R, 348 amino asitten oluşan bir IgSF proteinidir ve iki ekstrasellüler Ig-benzeri alan içerir (Barclay ve ark., 2002). IgSF reseptörlerinin çoğunun aksine ITIM domainleri yoktur (S. Zhang ve ark., 2004). 67 amino asitlik bir sitoplazmik bölge ve tirozin motifi bulunur. Son tirozin motifi NPxY yapısının bir parçasıdır. CD200 bağlandığında, CD200R'nin sitoplazmik ucunda NPxY motifi ile ilişkili üçüncü tirozin fosforile olur. Adaptör proteinler olan tirozin kinaz 1 (DOK-1) ve tirozin kinaz 2 (DOK-2) fosforilasyona uğrar. DOK-1 ve DOK-2'nin fosforilasyonu, SHIP'in DOK-1'e bağlanmasına ve MAPK/ERK sinyal

yolunu negatif olarak düzenleyen RasGAP'ın toplanmasına neden olur. Sonuç olarak makrofajlarda ve mast hücrelerinde bu kaskad ERK, p38 ve JNK fosforilasyonunu inhibe etmektedir. Bu aşağı akış sinyal aktivitesi miyeloid hücrelerin fonksiyonu üzerinde inhibitör etki gösterir, mast hücre degranülasyonu baskılanır. Pro-inflamatuar sitokin salınımı ve immün hücre aktivitesi baskılanır (Şekil 2.5) (Nip ve ark., 2023).

CD200 ligandının CD200R ile etkileşime girerek hücre içi aşağı akış sinyali üzerinden etki göstermesi "kanonik yolak" olarak adlandırılmaktadır. Literatürde bildirilen diğer etki mekanizması ise kanonik olmayan yoldur. Bu yolda CD200, CD200R'nden bağımsız olarak hücre içi sinyal yolunu tetikler. Bu yolda, γ -sekretaz, sinyallemeye etkisiz olan CD200 ligandının sitoplazmik alanının kesilmesine neden olur. Bu kesilmiş CD200 sitoplazmik alanı daha sonra β -katenin'e bağlanır ve doğrudan çekirdeğe taşınır. Hücre çoğalması ve kanserin ilerlemesiyle ilişkili olduğu bilinen transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonunu arttırarak etki eder (Z. Chen ve ark., 2018; Shin ve ark., 2019, 2021). CD200/CD200R eksenini, immün toleransı sürdürmede ve sağlıklı dokuları gereksiz immün hasardan korumada önemli bir rol oynar. Normal ve patolojik koşullarda aktif miyeloid hücre seviyelerini düzenlemede, kronik inflamasyon ve otoimmün hastalığı önlemede rol oynadığı bilinir. İmmün yanıtı dengelemede merkezi bir rol oynarken, aynı zamanda doku homeostazının da korunmasında önemlidir.

CD200 molekülü çok çeşitli hücre tiplerinde eksprese edilmektedir. İnsan timositleri, nöronlar, aktif T hücreleri, B hücreleri, dendritik hücreler, vasküler endotelial hücreler, böbrek glomerülleri, epitelial keratinositler gibi birçok immün hücrede ve normal dokularda bulunduğu bilinmektedir. Periferik sinir sisteminde de rat işitme afferent ve efferent sinirlerinde de CD200'ün varlığı gösterilmiştir (Bartolomé ve ark., 2002). 2011'de ratlarda yapılan bir çalışmada ise CD200 immün reaktivitesinin miyelinsiz sinirlerde güçlü, miyelinli sinirlerde zayıf gözlendiği bildirilmiş. Bu çalışmada araştırmacılar Schwann hücresinde CD200 ekspresyonunun, sinir hasarına benzer durumlarda değiştiği sonucuna varmışlardır (C.-Y. Chang ve ark., 2011). Santral sinir sistemindeki glial hücrelerde yapılan çalışmalar, CD200'ün inflamasyonu baskılayıcı ve iyileşmeyi hızlandırıcı bir etki gösterdiğini ortaya koymuştur (Manich ve ark., 2019). Örneğin, farelerde yapılan multipl skleroz (Experimental autoimmune encephalomyelitis) modelinde, CD200 eksikliği inflamatuvar mikroglia yanıtını arttırmıştır (Hoek ve ark., 2000). Ayrıca, CD200 düzeylerinin arttığı durumlarda, bu

fare modelinde hastalığın seyrinin daha iyi olduğu gözlemlenmiştir (Chitnis ve ark., 2007). Benzer şekilde, mikrogial hücrelerde CD200fc gibi moleküllerin anti-inflamatuar etki gösterdiği bulunmuştur (Cox ve ark., 2012). Yakın zamanlarda yapılan çalışmalarda da, CD200'ün hem hematolojik malignitelerde, hem de çeşitli katı (solid) tümörlerde eksprese edildiği bildirilmiştir (J.-Q. Liu ve ark., 2020; Love ve ark., 2017; Moreaux ve ark., 2006; Petermann ve ark., 2007).



Şekil 2.5. CD200/CD200R etkileşimi (Choe ve Choi, 2023).

2.9. CD200 Ligandının Kanserdeki Çift Yönlü Etkileri

CD200 molekülünün tümör mikroçevresinin regülasyonunda da önemli rol oynadığı bilinmektedir. Literatürdeki bilgiler CD200 ligandının tümörde çift yönlü etki edebileceğine dikkat çekmektedir ; bazı çalışmalara göre CD200 ligandı çeşitli kanser tiplerinde upregüle edilmektedir ve immünsüpresyonla ve tümör progresyonu ile ilişkilendirilmektedir. Bazı araştırmalara göre ise CD200, tümörü destekleyen inflamasyonu ve anjiyogenezi baskılamaktadır.

2.9.1. CD200 Ligandının Tümörü Baskılayıcı Etkileri

CD200/CD200R eksenini immünsüpresyon ve kanserin ilerlemesiyle ilişkilendiren çalışmalar bulunmasına rağmen, güncel çalışmalarla anti-tümörojenik fonksiyonlarının da olduğu gösterilmiştir.

Tümörle ilişkili makrofajlar ve miyeloid kökenli baskılayıcı hücreler yüksek seviyelerde CD200R eksprese ederler. Bu hücreler pro-anjiyogenik faktörler üretirler, hücre dışı matriksin parçalanmasına neden olurlar ve anti-tümöral immüniteyi baskılayarak tümörün oluşumunu, ilerlemesini ve metastazını uyardırda önemli etkilere sahiptir (Solinas ve ark., 2009). Miyeloid hücrelerin CD200/CD200R etkileşimi ile doğrudan tümör hücreleriyle etkileşime girdiğine ve bu hücreleri CD200 aracılı inhibisyona duyarlı hale getirdiğine dair bulgular mevcuttur. Örneğin melanoma modelinde yapılan bir çalışmada tümörle ilişkili miyeloid hücre seviyelerinin CD200 ekspresyonu ile ters orantılı olduğu, CD200/CD200R sinyalinin bu hücrelerin genişlemesini/çoğalmasını baskıladığı rapor edilmiştir. Dahası CD200/CD200R sinyali bozulduğunda CD11b⁺ Gr1⁺, CD11b⁺ Ly6C⁺ ve CD11b⁺ Ly6C⁻ tümörle ilişkili miyeloid hücre popülasyonlarının arttığını ve paralel olarak bu hücrelerde VEGF, HIF1 α ve göç inhibitör faktörü (MIF) gibi gen ekspresyonlarının da arttığı bildirilmiştir (J.-Q. Liu ve ark., 2016). Bu ortam tümör büyümesi/ilerlemesiyle birlikte tümör anjiyogenezini kolaylaştırmaktadır (Murdoch ve ark., 2008).

2015 yılında 4THM meme karsinomu fare modelinde yapılan çalışmada CD200 aşırı ekspresyonu primer tümör ve metastazın azalmasıyla ilişkilendirilmiştir. **CD200R**-konakta visceral metastazda artış gözlenmiştir. Tümöre infiltre sitotoksik T hücrelerde azalma, inflamatuvar sitokinlerin (TNF-alfa ve IL-6) salınımında artış bildirilmiştir. **CD200 aşırı ekspresyonunun** tümör kaynaklı **interferon- γ** ve **IL-10** yanıtının artmasına ve tümör destekleyen TNF- α ve IL-6 salınımının azalmasına yol açtığı rapor edilmiştir. CD200(tg) hayvanlarda dokuların nötrofil infiltrasyonu belirgin şekilde azalmış ve CD200R1(-/-) farelerde ise artmıştır (Erin ve ark., 2015). Araştırmacılar bu sonuçlarla, CD200 ekspresyonunun immün yanıtları değiştirdiği, sistemik ve lokal inflamatuvar yanıtı uyaran tümör hücrelerinin metastatik büyümesini engellediği sonucuna varmışlardır. CD200 aktivitesinin/sinyalinin arttırılması, **agresif meme karsinomlarının** tedavisi için önemli bir terapötik strateji olabilir, önerisinde bulunmuşlardır.

B16 melanom çalışmasında, CD200+ B16 melanom hücreleri ile aşılama, C57BL/6 farelerinde tümör oluşumunu ve büyümesini baskılamış ve akciğerlerde metastatik tümör odakları oluşumunu önemli ölçüde azaltmıştır. Ayrıca, B16-CD200 melanom hücreleri implante edilen CD200R- olan farelerde, karaciğere, akciğerlere, böbreklere ve periton boşluğuna metastazla birlikte CD200+ tümörlerinin büyümesinde artış gözlemlenmiştir (Talebian ve ark., 2012).

Yakın dönemde yapılan çalışmalarda CD200'ün metastatik meme kanserinde sitotoksik immüniteyi uyardığı ve metastazı azalttığı gösterilmiştir (Erin ve ark., 2018). Başka bir çalışmada ise benzer şekilde CD200 aşırı ekspresyonun fare metastatik meme kanserinde PLD ile birlikte CD200 mimetik aptameri (Peg-M49)'nin sinerjistik antitümoral etki gösterdiği, miyeloid kökenli immünsüpresif hücreler inhibe olurken CD8+ ve CD8+CD4+ T hücrelerin arttığı bildirilmiştir (Erin ve ark., 2020).

2.9.2. CD200 Ligandının Tümörü Destekleyici Etkileri

Kanser hücrelerinde ya da tümör mikroçevresindeki CD200 ekspresyonunun, immünsüpresif mikroçevre oluşumunu uyararak kanser gelişiminde pro-tümörojenik rol oynadığına dair bilgiler mevcuttur.

CD200'ün NK hücrelerin fonksiyonunu baskıladığı, regülatör T hücrelerin tümöre invazyonunu desteklediği, regülatör T hücre yayılmasına bağlı CTLA4 aracılı sitotoksik T hücre aktivitesini baskıladığı, miyeloid kökenli baskılayıcı hücrelerin çoğalmasını uyararak immünsüpresyona yol açtığı bildirilmiştir. Bunlardan başka tümörle ilişkili makrofajların sitokin ve kemokin sekresyonlarını regüle ederek tümörün lehine bir mikroçevre oluşumunu desteklediği bildirilmiştir (Nip ve ark., 2023).

Pediyatrik B hücreli akut lenfoblastik lösemide yapılan bir araştırmada CD200+ vakalarda CD200- vakalara göre, remisyon indüksiyon tedavisine yanıtların azaldığını ve genel sağ kalımın ve hastalıksız sağ kalımın önemli ölçüde daha kısa olduğu bildirilmiştir (Aref ve ark., 2017).

Benzer şekilde kolorektal karaciğer metastazı olan hastalarda yüksek CD200 ekspresyonu, düşük CD200 ekspresyonuna kıyasla önemli ölçüde daha kötü prognoz (5 yıllık sağkalım oranları; %26,9-%54,1) ile ilişkilendirilmiştir (Matsuo ve ark., 2021).

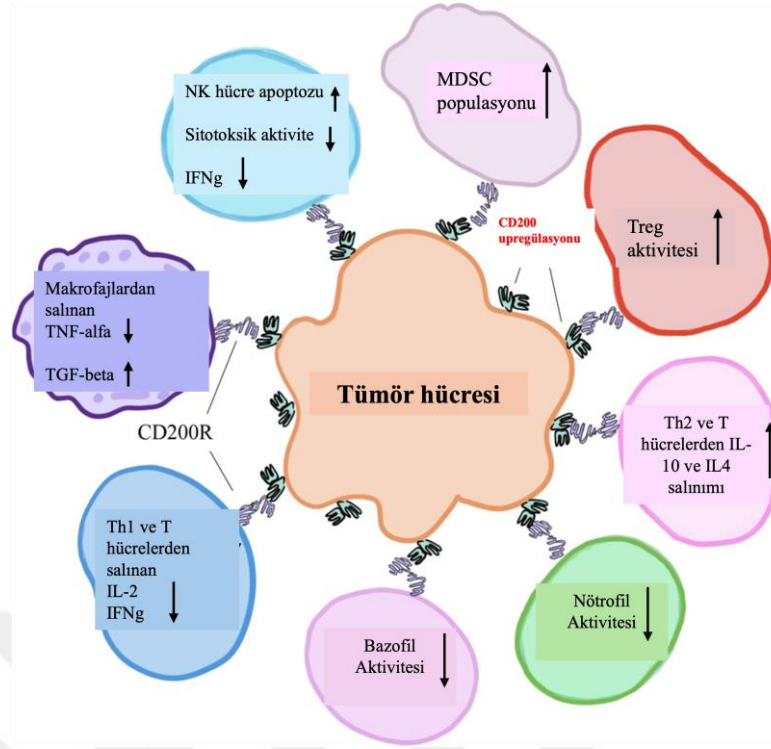
Kutanöz skuamöz hücreli karsinomda yapılan çalışmada, CD200 ekspresyon seviyeleri tümör derecesi ve klinik evre ile ilişkilendirilmiştir; yüksek CD200 ekspresyonu olan hastaların genel sağ kalım süreleri (31,3 ay) düşük ekspresyonu olan hastalara (41,9 ay) göre daha kısa olduğu rapor edilmiştir (Li ve ark., 2016).

Pankreas duktal adenokarsinomlu hastalarda yapılan bir çalışmada, CD200+ hastalarda CD200- hastalara kıyasla nüks sonrası sağkalımın daha kötü olduğu, CD200 ekspresyonu ile CD4⁺, CD8⁺ ve CD45RO⁺ tümöre infiltre lenfositlerle negatif korelasyon gösterdiği bildirilmiştir. Bu çalışmada araştırmacılar CD200 ligandını potansiyel bir terapötik hedef olarak önermişlerdir (Kinoshita ve ark., 2024).

Gliomada yapılan bir araştırmada, CD200R antagonistinin MDSC genişlemesini engellediğini ve CD200/CD200R aracılı bağışıklık baskılanmasını tersine çevirdiği, bununla birlikte yüksek CD8⁺ T hücre sayıları ile TNF- α ve IFN- γ üretiminde artış rapor edilmiştir (Moertel ve ark., 2014).

Özetle günümüze kadar yapılan çalışmaların sonuçları CD200-CD200R eksenini kanser tedavisinde **hem potansiyel bir immünsüpresif hedef**, hem de **immün yanıtı güçlendiren bir strateji** olarak raporlandırmaktadır . Çünkü CD200 bir yandan tümör ilerlemesini destekleyebilir, diğer yandan immün yanıtları şekillendirerek tümörü baskılayabilir. CD200'ün bu çift yönlü rolü **tümörün tipine, tümör mikroçevresinin özelliklerine, immün hücrelerin fenotipine ve tümörün evrimsel aşamasına** bağlı olarak değişmektedir. Akut düzeydeki inflamasyon tümöre karşı koruyucu olurken, kronik inflamasyon tümör büyümesini desteklemektedir (Fernandes ve ark., 2024; Khusnurrokhman ve Wati, 2022). Örneğin; **Melanoma ya da akciğer kanseri çok daha fazla inflamatuvar (T hücrelerle zengin ortam) ve son derece mutant bir yapıdadır ve genellikle immünoterapilere duyarlıdır**. Melanomadaki bu özellikler, CD200'ün daha **koruyucu** olmasına neden olurken, glioblastoma ve PDAC gibi tümörlerde, CD200, **T-hücre infiltrasyonu az olduğundan ya da hiç olmadığından, daha az mutasyon yüküne sahip olduğundan ve süpresif bir stroma ile zengin olduğundan, aslında immünsüpresyonu** uyarmaktadır.

Bu nedenle CD200 ligandının kanser tedavisindeki yerini araştırırken tümörün tipine, mikroçevrenin yapısına göre değerlendirmek daha etkili sonuçların elde edilmesine neden olabilir.



Şekil 2.6. Kanserde CD200 upregülasyonu ile tümörü destekleyen immünsüpresif etkiler (Choe veChoi, 2023).

2.10. CD200 Ligandı ve Schwann Hücre

CD200, immün hücrelerde (B hücre, dentritik hücre ve T hücre gibi) endotelial hücrelerde ve nöronlarda eksprese edilmektedir (Broderick ve ark., 2002; Koning ve ark., 2009; Morris veBeech, 1987; Pannunzio ve ark., 2022; Rosenblum ve ark., 2004).

Yakın zamanda **periferik sinir sisteminde de** rat işitme afferent ve efferent sinirlerde de CD200'ün varlığı gösterilmiştir (Bartolomé ve ark., 2002). 2011'de ratlarda yapılan bir çalışmada CD200 immün reaktivitesinin miyelinsiz sinirlerde güçlü miyelinli sinirlerde zayıf gözlendiği bildirilmiş. Bu çalışmada araştırmacılar **Schwann hücre nörolemmasında CD200 varlığını göstermişlerdir**. Ayrıca periferik glial hücrelerdeki CD200 ekspresyonu sıçan Schwann hücre hattı RSC96'da da gösterilmiştir. **Hasarlı-kesilmiş siyatik sinir modelinde CD200 sinyalinin zayıfladığı ancak lezyondan 7 gün sonra yaralı bölgede CD200 insidansının arttığı bildirilmiştir** (C.-Y. Chang ve ark., 2011). Başka bir çalışmanın sonuçları da bu çalışmayı doğrular niteliktedir; naif (hasarsız) siyatik sinirlerde CD200'ün Schwann hücrelerde (Schmidt-Lanterman insizyonlarında ve Ranvier düğümlerinde)

eksprese edildiği, sinir hasarından sonraki 24 saatte down regüle olduğu, 14. günde ise tekrar pik düzeyde eksprese edildiği bildirilmiştir (Pannunzio ve ark., 2022).

Dolayısıyla bu çalışmalar sinir hasarına benzer durumda CD200 ekspresyonunun düzenlendiğini göstermektedir. Ancak Schwann hücrelerdeki spesifik CD200 ekspresyonunun biyolojik işlevleri ve kanser hücrelerine verilen yanıtı nasıl değiştirdiği ve bu değişimin metastatik süreçteki olası rolü henüz bilinmemektedir.

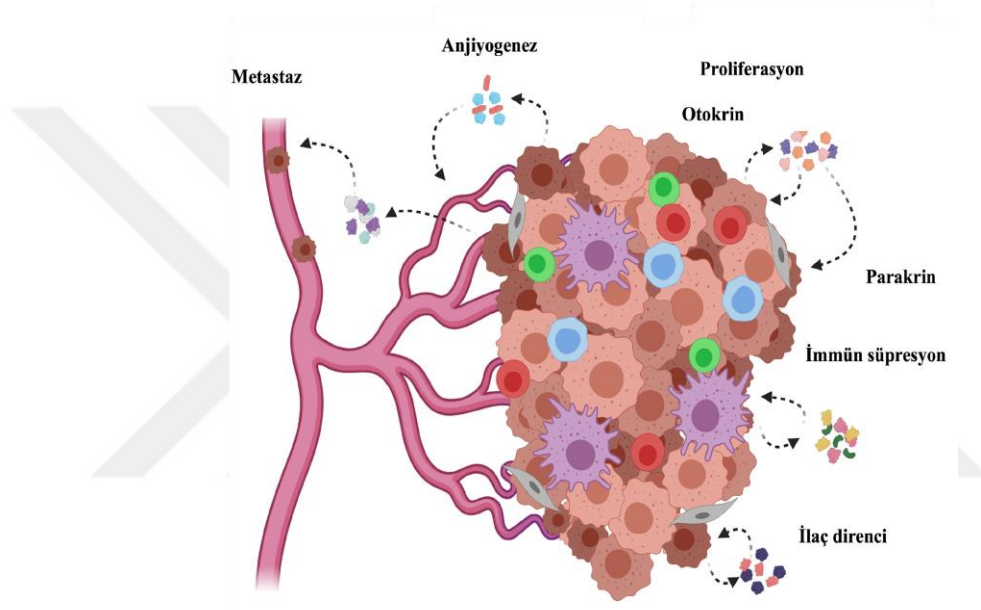
2.11. Sitokinler

Sitokinler, immün hücreler ve diğer çeşitli hücreler (endotel, epitel hücreleri, fibroblast, tümör vb.) tarafından bir uyarıya yanıt olarak salgılanan düşük molekül ağırlıklı düzenleyici polipeptidler veya glikoproteinlerdir. Sitokinlerin hedef hücrelerinin membranlarında yüksek afiniteli reseptörler eksprese edilir (Kelso, 2000). Reseptörler birçok hücre tipi tarafından eksprese edildiğinden, sitokinler çok çeşitli hücre dizilerini etkileyebilir. Reseptöre sitokin bağlanmasının ardından gen transkripsiyonunda değişikliklere yol açan sinyal kaskadı tetiklenir. İnflamasyon, hücre büyümesi, sağkalımı, hücre farklılaşması ve hücrelerin hareketi gibi birçok biyolojik süreci düzenlerler. Vücutta savunma yanıtlarını başlatırlar, modüle ederler ve sonlandırırlar. Bu nedenle sitokin salınımları arasındaki denge çok önemlidir. Genellikle otokrin veya parakrin etki gösterirler. Belirli bir süre boyunca salınır ve dolaşımdaki sınırlı yarı ömürleri nedeniyle etkileri kısa sürer. İstisna olarak interlökin IL-7 veya hematopoietik büyüme faktörleri gibi sitokinler, homeostatik olarak sürekli üretilir (Berraondo ve ark., 2019).

Günümüze kadar 200'den fazla sitokin tanımlanmıştır. Ana fonksiyonlarına göre sitokinler; interlökin (IL), interferon (IFN), tümör nekroz faktörü (TNF), koloni uyarıcı faktör (CSF), büyüme faktörü (GF) ve kemokinler (kemotaktik sitokinler) olarak gruplandırılır.

Sitokinler, tümör mikroçevresindeki hücre iletişiminin de temel araçlarıdır. Kanser immünitesinin çeşitli basamaklarında çok yönlü etkilere sahiptir. Pro-inflamatuar ya da anti-inflamatuar etki gösterirler (Goldberg ve Schwertfeger, 2010). Tümör hücrelerinin büyümesini doğrudan anti-proliferatif veya pro-apoptotik aktiviteyle ya da dolaylı olarak tümör hücrelerine karşı immün hücrelerin sitotoksik aktivitesini uyatarak baskırlar. IL-2, IFN α ve IFN γ gibi sitokinler, tümör mikroçevresindeki anti-

tümör yanıtları güçlendirir. Malign hücreler, immün hücreler ve stromal hücreler tarafından düzensiz ve kontrolsüz sitokin üretimi, karsinogenezin tüm aşamalarında ve tedaviye yanıt süreçlerinde önemli bir rol oynar (Burke ve Young, 2019; Hernandez ve ark., 2022; Silk ve Margolin, 2019). Bu nedenle, hem sitokinlerin immün uyarıcı etkilerinden yararlanmak hem de düzensiz olduklarında etkilerini nötralize etmek, araştırmalarda önemli terapötik yaklaşımlar olarak incelenmektedir (Briukhovetska ve ark., 2021; Goldberg ve Schwertfeger, 2010; Shalapour ve Karin, 2019; VAN DER Meer ve ark., 1998).



Şekil 2.7. Tümör mikroçevresinde sitokinlerin etkileri (Kartikasari ve ark., 2021).

2.11.1. İnterlökin 6 (IL-6)

IL-6 vücutta inflamasyon, immün yanıt ve hücre büyümesi gibi fizyolojik süreçleri düzenleyen çok yönlü bir sitokindir. 212 amino asitten oluşan bu glikoprotein, hepatokitin sınıfına ait olup, başlıca T hücreleri, makrofajlar, fibroblastlar ve endotelial hücreler olmak üzere çeşitli hücre tipleri tarafından üretilir (Tanaka ve ark., 2014). IL-6 hücre yüzeyindeki reseptörü IL-6R'e bağlanması, hücredeki gp130 adlı başka bir reseptörün de aktive olmasını sağlar. Bu bağlanma, JAK/STAT (Janus kinaz / Signal Transducer and Activator of Transcription) sinyal yolağını tetikler ve STAT3 gibi transkripsiyon faktörlerinin aktifleşmesine yol açar (Neurath ve Finotto, 2011). Aktivasyon sonucu, bu transkripsiyon faktörleri, hücrede gen ekspresyonunu

değiştirir; bunun sonucunda inflamasyon, hücre büyümesi, sağkalım gibi süreçler düzenlenir, akut faz proteinlerinin üretimi tetiklenir ve enfeksiyonlara karşı hızlı bir yanıt başlar. Ayrıca, IL-6'nın kanser, otoimmün hastalıklar, enfeksiyonlar veya travma gibi durumlar sırasında üretimi artar (Tanaka ve ark., 2014).

IL-6'nın kanser üzerindeki etkisi oldukça karmaşık ve çok yönlüdür (Kumari ve ark., 2016). Tümör mikroçevresindeki majör sitokinlerden biridir. IL-6'nın aşırı ekspresyonu neredeyse tüm tümör tiplerinde görülmektedir. (C. H. Chang ve ark., 2013; Hoejberg ve ark., 2012; Macciò ve Madeddu, 2013; Miura ve ark., 2015; L.-H. Wei ve ark., 2003). Tümör mikroçevresindeki yüksek IL-6 düzeyi inflamasyonun ana nedenlerinden biridir. Başta makrofajlar, fibroblastlar ve endotel hücreler olmak üzere, tümör çevresindeki çeşitli hücreler ve tümörün kendisi tarafından salgılanarak inflamasyonla karakterize ortam inşa edilir. IL-6, kanserde sağkalım, proliferasyon, anjiyogenez, invazyon, immün sistemden kaçış, metastaz ve metabolizma gibi birçok durumu etkileyerek tümör oluşumunu ve progresyonunu destekler. Anjiyogenezi arttırarak tümöre kan akışı ile glukoz, amino asit ve oksijene erişimini kolaylaştırır, büyümesini hızlandırır. Bunun yanı sıra, IL-6, özellikle Treg ve miyeloid kökenli baskılayıcı hücrelerin artışıyla immün yanıtı baskılayarak, tümörün immün sistemden kaçmasını kolaylaştırır (Johnson ve ark., 2018; Kumari ve ark., 2016; Weber ve ark., 2021).

Sonuç olarak, IL-6, kanserin ilerlemesinde ve tedaviye direnç geliştirilmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Bu nedenle, IL-6'yı hedef alan tedavi yaklaşımları üzerinde araştırmalar yoğunlaşmaktadır (Tsukamoto ve ark., 2018).

2.11.2. Tümör Nekroz Faktörü Alfa (TNF-alfa)

TNF-alfa, pro-inflamatuar bir sitokin olup, immün yanıtların, hücre ölümü (apoptoz), ve inflamasyonun düzenlenmesinde merkezi bir rol oynar. 17 kDa boyutunda, 157 amino asitten oluşan bir protein olan TNF-alfa, iki monomerden oluşan bir dimer yapıdadır. İmmün hücreler (özellikle makrofajlar ve T hücreleri) tarafından salgılanan TNF-alfa, hedef hücrelerdeki reseptörleri TNFR1 ve TNFR2'ye bağlanarak etkilerini gösterir. TNFR1, inflamasyon ve hücre ölümünü tetiklerken, TNFR2 daha çok immün hücrelerin proliferasyonu ve fonksiyonlarını düzenler (Çopuroğlu ve ark., 2021; Grell ve ark., 1994; Hehlhans ve Pfeffer, 2005). TNF-alfa reseptörüne bağlandığında NF-

kB (nükleer faktör kappa-B) aktive olur ve pro-inflamatuar gen ekspresyonunu başlatır, bu da inflamasyonu ve immün yanıtı tetikler. Bunun yanı sıra, TNF-alfa, apoptoza da neden olur. TNFR1 aracılığıyla kaspaz (caspase) aktivasyonu ile hücre ölümüne neden olur. TNF-alfa'nın aşırı salınımı, sağlıklı hücrelere zarar verebilir ve aşırı inflamasyona yol açabilir (F. R. Balkwill, 1992; Grell ve ark., 1994). Tümör mikroçevresinde tümör hücreleri de dahil birçok hücrenin (stromal hücreler ve tümörle ilişkili makrofajlar) TNF-alfa ürettiği bilinmektedir (F. R. Balkwill, 1992; Cruceriu ve ark., 2020). TNF-alfa'nın kanserdeki etkileri çift yönlüdür. Bir yandan, TNF-alfa'nın sitotoksik etkileri kanser hücrelerinin apoptoz yoluyla ölümünü tetikleyebilir. Öte yandan, uzun süreli ve yüksek seviyelerde salınan TNF-alfa, tümör mikroçevresinde inflamasyonun artmasına yol açabilir. Bu durum ise kanser hücrelerinin hayatta kalmasını ve proliferasyonunu uyarabilir. TNF-alfa aracılı inflamasyon artışı, tümörün mikrovasküler yapısını güçlendirerek metastaz potansiyelini arttırabilir. Ayrıca, TNF-alfa'nın immün hücreler üzerindeki etkisi, tümör çevresindeki immün hücrelerin aktivasyonunu arttırarak kanserin ilerlemesine yol açabilir (F. Balkwill, 2006; Cruceriu ve ark., 2020; Wolczyk ve ark., 2016).

Kanser tedavisinde TNF-alfa'nın inhibe edilmesi, inflamasyonu azaltmak ve tümör büyümesini kontrol altına almak amacıyla çeşitli stratejilerle araştırılmaktadır. TNF-alfa inhibitörleri, özellikle otoimmün hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılsa da, kanser tedavisinde daha dikkatli bir yaklaşım gerektirir. Çünkü TNF-alfa'nın tümör hücrelerine karşı hem pro-apoptotik hem de pro-inflamatuar etkileri, tedavi sürecinde zorluklara neden olmaktadır. TNF-alfanın baskılanması immün sistemin tümör üzerindeki etkisini zayıflatabilir ve bu durum tedaviye direnç gelişimine yol açabilir (Bellail ve ark., 2009; Ben-Baruch, 2022; Croft ve ark., 2024; Zidi ve ark., 2010). Bu nedenle güncel araştırmalar, lokal tedavi yöntemleri ve kombinasyon terapileri, hedefe yönelik ve düşük dozda uygulama stratejileri ile sınırlamaları aşmayı hedeflemektedir (Lejeune ve Rüegg, 2006). TNF-alfa'yı hedefleyen tedavi yöntemleri pre-klinikte ve faz III klinik denemelerinde potansiyel bir tedavi seçeneği olarak araştırılmaya devam etmektedir.

2.11.3. İnterlökin-1 Beta (IL-1 β)

İnterlökin-1 Beta (IL-1 β), inflamatuvar yanıtların merkezi düzenleyicisi olan IL-1 ailesine ait bir sitokindir. Genellikle makrofajlar, dendritik hücreler, fibroblastlar ve bazı epitel hücreleri tarafından sentezlenir. Yapısal olarak, 153 amino asit içeren ve yaklaşık 17 kDa moleküler ağırlığa sahip bir proteindir. IL-1 β , pro-IL-1 β olarak sentezlendikten sonra, kaspaz-1 enzimi tarafından aktif hale gelir. Aktif IL-1 β , IL-1R1 (İnterlökin-1 reseptörü tip 1) ile bağlanarak, inflamasyon, hücre proliferasyonu ve sitokin üretimini arttıran NF- κ B ve MAPK gibi sinyal yollarını aktive eder. Ayrıca, IL-1 β , prostaglandin E2 üretimini artırarak, endotel hücrelerinin aktivasyonu ve vazodilatasyon gibi inflamatuvar yanıtları pekiştirir. Bu etkiler, immün hücrelerin aktive edilmesini, dokularda inflamasyonun artmasını ve hücrelerin apoptoza uğramasını uyarır (Dinarello, 2009).

Kanserin progresyonunda IL-1 β , tümör mikroçevresindeki inflamasyonu artırarak kritik bir rol oynar (Mantovani ve ark., 2008). IL-1 β 'nin yüksek ekspresyonu, tümör hücrelerinin proliferasyonunu, invazyonunu ve metastazını hızlandırabilir. Bununla birlikte, IL-1 β , immün yanıtları baskılar ve tümör hücrelerinin immün sistem tarafından tanınmasını engeller. Örneğin, IL-1 β , makrofajları M2 tipine polarize eder. M2 makrofajları ise anjiyogenik faktörler (VEGF) ve immünsüpresif sitokinler (TGF- β) salgılayarak tümörün büyümesini ve metastazını destekler (Gelfo ve ark., 2020). IL-1 β 'nin T hücrelerinde PD-1 ve CTLA-4 gibi immün kontrol moleküllerinin ekspresyonunu arttırır, sitotoksik immün yanıtı baskılar. IL-1 β ayrıca endotel hücreler ve fibroblastlar üzerinde etkili olarak damar geçirgenliğini artırır ve bu da tümör hücrelerinin kan dolaşımına geçişini kolaylaştırır. İmmünsüpresif etkilerinden dolayı, IL-1 β 'nin inhibe edilmesi, kanser tedavisinde araştırılmaktadır. IL-1 β 'nin inhibisyonu, tümör mikroçevresindeki inflamasyonu azaltarak kanserin ilerlemesini engellemeyi amaçlar. Bu amaçla, IL-1 reseptör antagonisti (Anakinra) ve IL-1 β inhibitörleri (Canakinumab) gibi tedavi stratejileri geliştirilmiştir (F. Balkwill ve Mantovani, 2001; Ridker ve ark., 2017). Klinik çalışmalarda özellikle akciğer kanseri ve meme kanseri gibi bazı tümörlerde IL-1 β inhibitörlerinin kullanımının, kanser tedavisi ve immünoterapilere karşı gelişen tedaviye dirençleri azaltabileceği öne sürülmektedir (Garlanda ve Mantovani, 2021). IL-1 β inhibitörlerinin immün sistemin genel yanıtlarını etkileme potansiyeli olduğundan bu tedavi stratejilerinin dikkatli ve uygun koşullar altında uygulanması önerilmektedir (Diwanji ve ark., 2023). IL-1 β 'nin tümör

mikroçevresindeki inflamasyonu artırıcı ve immünsüpresif etkileri, kanser progresyonunda önemli bir rol oynadığı için, IL-1 β hedefli tedavilerin etkinlik ve güvenlik profillerinin daha ayrıntılı bir şekilde araştırılması büyük önem taşımaktadır.

2.12. Kemokinler

Kemokinler, hücre yüzeyinde eksprese edilen G proteinine bağlı reseptörlerine (GPCR'ler) bağlanarak fonksiyonlarını gösteren küçük molekül proteinlerdir (Bhusal ve ark., 2020; Hughes ve Nibbs, 2018; Sokol ve Luster, 2015). Başlangıçta kemokinler, immün hücresi infiltrasyonunu ve spesifik inflamatuvar yanıt bölgelerine göçü indükleyen araçlar olarak tanımlanmıştır. Daha sonraki çalışmalar, kemokinlerin özellikle malign tümörlerin gelişiminde olmak üzere farklı biyolojik süreçlerde yer aldığını ortaya koymuştur (Mukaida ve Baba, 2012). Kemokinler, tümör hücreleri ve tümör mikro çevresiyle etkileşime girerek tümör oluşumunu ve ilerlemesini teşvik edebilir (F. Balkwill, 2004). Bu nedenle, kemokinler ve reseptörlerinin etkilerini derinlemesine anlamak ve bu alanı hedef alan terapötik yaklaşımları araştırmak, çalışmaların önemli bir parçası haline gelmiştir.

2.12.1. Keratinosit kaynaklı kemokin (KC ; CXCL-1)

KC, CXCL-1 olarak da bilinen, CXC kemokin ailesinin bir üyesidir. Kemokinler, immün yanıtlar ve inflamasyon süreçlerinde kritik rol oynayan küçük, çözünür proteinlerdir. Bu moleküller, hücrelerin hedef bölgelere doğru yönlendirilmesini (kemotaksi) sağlar ve immün yanıtların düzenlenmesinde temel bir rol oynar. CXCL-1, özellikle epitel hücreleri, makrofajlar ve endotelial hücreler tarafından üretilir ve inflamasyonun erken aşamalarında, nötrofillerin hedef dokulara yönlendirilmesine aracılık eder (W.-L. Cheng ve ark., 2011; Ciummo ve ark., 2021; C. Zhou ve ark., 2023). CXCL-1, reseptörü CXCR2'ye bağlanarak etki eder. CXCR2, bir G-protein bağlı reseptör (GPCR) olup, CXCL-1 ile bağlandığında PI3K/Akt, MAPK ve NF-kB gibi önemli hücre içi sinyal molekülleri aktive edilir. Bu sinyal molekülleri hedef hücrelerin kemotaksisini, proliferasyonunu ve inflamasyon yanıtını modüle eder (Kang ve ark., 2024; Korbecki ve ark., 2022; N. Wang ve ark., 2018). CXCL-1'in salgılanması, enfeksiyonlar, travmalar, hipoksi ve diğer akut stres koşullarına yanıt olarak artar. Özellikle lipopolisakaritler (LPS) ve pro-inflamatuvar sitokinler (örneğin, TNF- α ve IL-1 β) CXCL-1 üretimini tetiklemektedir (Lo ve ark., 2014; Ozga ve ark., 2021). Bu moleküller, immün hücrelerin hedef bölgelere yönlendirilmesini ve

inflamasyonun erken aşamalarında etkin bir yanıtın başlatılmasını sağlar. Ancak, aşırı CXCL1 üretimi, kronik inflamasyona, doku hasarı, anjiyogenez ve tümör gelişimi ile ilişkili patolojik süreçlere yol açabilir (Korbecki ve ark., 2022). Kanser bağlamında, CXCL-1 tümör mikroçevresinde nötrofil infiltrasyonunu artırarak, pro-inflamatuar sitokinlerin, proteazların ve pro-anjiyogenik faktörlerin (örneğin, VEGF) salınımını uyarır. Bu moleküller, tümör büyümesini, metastazı ve anjiyogenezi destekleyerek tümör progresyonuna katkıda bulunur (Korbecki ve ark., 2022, 2024). CXCL-1'in yüksek seviyeleri, özellikle metastatik potansiyel ile doğrudan ilişkili bulunmuştur. Ayrıca CXCL-1, nötrofillerin matrix metalloproteinazlar (MMP'ler) gibi enzimleri salmasına neden olarak tümör hücrelerinin invazyonunu ve yayılmasını kolaylaştırmaktadır (Korbecki ve ark., 2022; Z.-W. Wei ve ark., 2015; Yang ve ark., 2019).

CXCL-1 ve CXCR2'nin kanser tedavisinde hedeflenmesi, tümör büyümesi ve metastazının engellenmesi açısından önemli bir terapötik potansiyel olarak görülmektedir. Özellikle antagonist tedavileri ile nötrofil infiltrasyonunun azalması, anjiyogenezin engellenmesi ve dolayısıyla tümörlerin büyümesinin ve yayılmasının önlenmesi hedeflenmektedir. Bu yaklaşım, kanser tedavisinde araştırılmaya devam ediyor (Korbecki ve ark., 2024; Sitaru ve ark., 2023; Zhao ve ark., 2023).

2.12.2. Makrofaj İnflamatuar Protein 2 (MIP-2)

MIP-2, CXCL-2 olarak da bilinir. İnsandaki IL-8'in (CXCL8) fare homologudur. CXC kemokin ailesindendir. Nötrofiller için güçlü bir kemoatraktan moleküldür. İlk olarak uyarılmış makrofajlar tarafından salgılanan moleküller olarak keşfedildi (Driscoll, 1994). Daha sonra tümör hücreleri de dahil çeşitli hücrelerin de MIP-2 salgıladığı anlaşıldı. MIP-2 inflamasyonun erken evrelerinde etkin olarak görev alır. Güçlü ve hızlı inflammatuar yanıt oluşturur. KC ve MIP-2 arasında %90 benzerlik bulunmaktadır ve ikisi de inflammatuar etkili kemokinlerdir (Hol ve ark., 2010).

MIP-2 nötrofil için güçlü bir kemoatraktan olmaktan başka çeşitli pro-inflamatuar sitokinlerin (IL-1 ve TNF) salınmasını da uyarır. Dolayısıyla MIP-2 inflamasyonu hem başlatıcı hem de sürdürücü etki gösterir (Driscoll, 1994). MIP-2, CXCR2 adlı reseptöre bağlanarak biyolojik etkilerini gösterir. CXCR2, CXC kemokin ailesine ait bir G proteinine bağlı reseptördür ve özellikle nötrofiller, monositler ve bazı immün hücreleri üzerinde eksprese edilir (Y. Kobayashi, 2008). MIP-2/CXCR-2 etkileşimi

kanser, enfeksiyonlar ve otoimmün hastalıklar gibi inflamatuvar durumların patogeneğinde önemli bir etkidir.

Kanser hücreleri, CXCL-2 üretimini arttırarak tümör mikroçevresindeki inflamasyonu şiddetlendirir ve bu durum tümör hücrelerinin proliferasyonunu uyarır. Özellikle tümör mikroçevresindeki makrofajlar tarafından aşırı salgılanan CXCL-2, inflamasyon bariyerlerinin oluşmasına ve tümör hücrelerinin immün hücrelerden korunmasına yol açar (A. Yuan ve ark., 2005). Ayrıca, CXCL-2'nin artışı inflamatuvar mediyatörlerin ekspresyonunu tetikleyerek, inflamasyonu daha da yoğunlaştırır. Böylece, CXCL-2 hem otokrin hem de parakrin yollarla, tümörün büyümesi ve gelişimi için gerekli ortamı oluşturur (De Larco ve ark., 2004; Todorović-Raković ve Milovanović, 2013; Wu ve ark., 2022). MIP-2'nin de CXCR2'nin aktivasyonu yoluyla doğrudan tümör hücresi transformasyonuna ve büyümesine katkıda bulunduğu bildirilmiştir. (Dhawan ve Richmond, 2002). Yakın zamanda yapılan çalışmalarda, CXCL-2'nin metastatik meme tümörlerinde, primer meme tümörlerine kıyasla çok daha yüksek seviyelerde salgılandığı (%19.9'a karşı %7.5) bildirilmiştir (Acharyya ve ark., 2012). MIP-2, CXCR2 aracılığıyla nötrofil kemotaksisini tetikleyerek, tümör büyümesi ve metastaz için kritik olan anjiyogenezi uyarır (Scapini ve ark., 2004). Tümör mikroçevresindeki MIP-2 artışı, nötrofillerin ve diğer immün hücrelerin tümör bölgesine toplanmasına yol açar. Bu birikim, tümörlerin büyümesini hızlandırırken, aynı zamanda metastatik potansiyelini de artırır. Sonuç olarak, MIP-2'nin nötrofil infiltrasyonu ve anjiyogenez üzerindeki etkisi, kanserin ilerlemesiyle doğrudan ilişkilendirilmektedir.

Kanser hücrelerinin büyümesi, metastazı ve anjiyogenez üzerindeki etkileri, CXCL-2 /MIP-2'yi kanser tedavisinin hedeflerinden biri haline getirmiştir. CXCL-2'yi hedefleyen tedavi yaklaşımları, kanserin ilerlemesini engellemek ve tedaviye dirençli tümörlere karşı daha etkin sonuçlar elde etmek için araştırılmaya devam ediyor.

2.12.3. Monosit Kemoatraktan Protein 1 (MCP-1)

MCP-1, CCL2 olarak da bilinen bir kemokindir. CC kemokin ailesinin bir üyesi olup özellikle **monositlerin**, makrofajların ve dentritik hücrelerin inflamasyon alanlarına kemotaksisini sağlar. MCP-1, genellikle inflamasyon, doku hasarı, enfeksiyonlar ve bazı kronik hastalıklarda yüksek miktarda üretilir. CCR2 adlı reseptöre bağlanarak bu etkiyi gerçekleştirir. CCR2, monositler, makrofajlar, dendritik hücreler ve bazı T

hücreleri gibi immün hücreleri tarafından eksprese edilir. CCL2 reseptörüne bağlandıktan sonra, kemokin reseptörleri, G proteinlerinin reseptörlerin C-terminal kuyruğuna bağlanmasını sağlayan konformasyonel değişikliklere uğrar. Bu reseptör aktivasyonu, hücre içi sinyal iletimini başlatır ve sonuçta hedef hücrelerin hareketliliğini tetikler (Deshmane ve ark., 2009).

MCP-1'in etkisi sadece kemotaksi ile sınırlı değildir. Aynı zamanda, inflamatuvar yanıtların modülasyonunda, hücrelerin aktivasyonunda ve sitokin üretiminde de önemli rol oynar. MCP-1, inflamatuvar mediyatörlerin (sitokinler, büyüme faktörleri ve metalloproteinazlar gibi) salınımını artırarak, inflamasyonu şiddetlendirir, vasküler geçirgenliği artırır (Deshmane ve ark., 2009).

Kanser bağlamında MCP-1'in rolü oldukça önemlidir (Xu ve ark., 2021). Yüksek MCP-1 düzeyi, tümör mikroçevresini inflamasyonun artması hatta kronikleşmesi yönünde modüle eder. Böylece metastazı destekleyici ortama katkıda bulunur. Özellikle immün hücreleri ve fibroblastları tümör mikroçevresine çekerek inflamatuvar ve fibrotik değişikliklere yol açar ve tümörlerin invaziv özelliğini artırır. Dolayısıyla tümörün büyümesini ve yayılmasını hızlandırır. Yüksek MCP-1 düzeyinin tümörle ilişkili makrofaj (TAM) sayısının artmasına neden olduğu ve bu hücrelerin tümör büyümesini desteklediği, anjiyogenezi uyardığı bilinmektedir. MCP-1'in ayrıca endotelial hücreleri etkileyerek de anjiyogenezi uyardığı, tümörlerin beslenmesi için gerekli oksijen ve besin maddelerinin sağlanmasını kolaylaştırdığı bildirilmiştir (Dutta ve ark., 2018; Yoshimura ve ark., 2023). Sadece tümör mikroçevresini modüle etmediği aynı zamanda çeşitli kanser hücrelerinde migrasyonla ilişkili moleküllerin upregüle edilmesine neden olduğu bilinmektedir (J.-F. Liu ve ark., 2020). MCP-1 ayrıca tedavi direnci ile de ilişkilendirilmektedir. Çeşitli kanser tiplerinde yapılan çalışmalarda CCR2 antagonizmasının anti-PD-1 tedaviye duyarlılığı arttırdığı bildirilmiştir (Tu ve ark., 2020).

Sonuç olarak, tedavi perspektifinden bakıldığında MCP-1 (CCL-2), immün yanıtları ve inflamasyonu düzenlerken, kanserin progresyonu ve metastazında da önemli bir rol oynar. Bu nedenle, MCP-1'in ve CCR2'nin hedeflenmesi, antagonize edilmesine yönelik yaklaşımlar, kanser tedavisinde yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesinde potansiyel bir yol olarak görülmektedir.

2.13. CD200fc

CD200fc, CD200 transmembran proteinine ait ektodomainin (dış kısmındaki yapısal bölge) çözünür bir füzyon protein formudur. Bu füzyon proteini, CD200 proteinini, genellikle IgG2a sınıfından bir Fc bölgesi ile birleştirerek oluşturulur. CD200 proteinin doğal bağlayıcı özelliklerini ve immün yanıt üzerindeki düzenleyici etkilerini taklit etmek amacıyla kullanılır (Erin ve ark., 2018). CD200fc, çeşitli inflamatuvar hastalıkların, enfeksiyonların, otoimmün hastalıkların ve organ nakli gibi durumların inflamasyonunu önemli ölçüde azaltmada etkili olduğu görülmüştür. Çeşitli çalışmalarda, CD200fc'nin terapötik etkilerinin olduğu bildirilmiştir. Örneğin, yapılan bir araştırma, CD200fc'nin inflamatuvar yanıtları baskıladığını ve CD200'ün immün sistem üzerindeki modülatör rolünü ortaya koymuştur (R. M. Gorczynski ve ark., 1999). Ayrıca, CD200fc'nin otoimmün hastalıklar ve enfeksiyonlar üzerindeki etkilerini inceleyen çalışmalar, bu proteinle yapılan tedavi uygulamalarının inflamasyonu önemli ölçüde azalttığını göstermiştir (Boudakov ve ark., 2007; R. Gorczynski ve ark., 2004). Bir diğer çalışma ise, CD200fc'nin, organ nakli sonrası reddetme yanıtını azaltma ve alıcıda immün toleransı artırma potansiyelini vurgulamıştır (R. M. Gorczynski ve ark., 2009).

CD200fc'nin, immün sistemde kapsamlı etkiler oluşturma potansiyeli, inflamatuvar hastalıklar ve organ nakli gibi klinik durumlarda terapötik bir ajan olarak kullanımının umut verici olduğunu göstermektedir. Ayrıca, son yıllarda yapılan kanserle ilgili araştırmalarda, CD200fc'nin tümör mikroçevresindeki immün sistemi modüle ederek kanser tedavisinde de potansiyel bir terapötik seçenek olabileceği ifade edilmiştir (Erin ve ark., 2018). Bu bulgular, CD200fc'nin yalnızca immünolojik bozukluklar ve organ nakli değil aynı zamanda kanser gibi onkolojik hastalıklar açısından da araştırmalarda yer alabileceğini hatta klinik faydalar sağlayabileceğini göstermektedir.

2.14. Minosiklin Hidroklorür

Minosiklin, tetrasiklin grubunda yer alan bir antibiyotiktir. Santral sinir sisteminde glial hücrelerin aktivasyonunu engelleyerek inflamasyonu tetikleyen sitokin ve kemokinlerin sentezini azaltır (Dean ve ark., 2012; Kunze ve ark., 2016; Stock ve ark., 2013; Z. Yuan ve ark., 2019). Minosiklinin başta mikroglia hücreleri olmak üzere sinir sistemi hücreleri üzerinde anti-inflamatuvar ve nöroprotektif özellikler göstermesi, nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde umut verici bir ajan olarak öne çıkarmaktadır (Stock ve ark., 2013). Özellikle Alzheimer ve Parkinson hastalıklarında, minosiklin

mikroglial hücrelerdeki aşırı inflamatuvar yanıtları baskılayarak, nöroinflamasyonu azaltmakta ve nöronal hasarın iyileşmesine yardımcı olmaktadır (Bortolanza ve ark., 2018; Budni ve ark., 2016; Fan ve ark., 2007; W.-Y. Wang ve ark., 2015). Bu anti-inflamatuvar etkisi ve glial hücreler üzerindeki inhibitör rolü, minosiklinin kanser hastalarında, özellikle tedaviye bağlı yan etkilerin önlenmesinde kullanımını gündeme getirmiştir. Özellikle bu yan etkiler, kanser tedavisi sırasında karşılaşılan nöropatik ağrı, yorgunluk, dermatit ve ishal gibi durumlardır (Adembri ve ark., 2014; M. Chen ve ark., 2000).

Bazı çalışmalar, minosiklinin periferik glial hücrelerin yani Schwann hücrelerinin aktivasyonunu ve proliferasyonunu azalttığını ortaya koymuştur (K.-I. Cheng ve ark., 2016; Keilhoff ve ark., 2007, 2008). Ancak, bazı çalışmalar da aksini söylemektedir; Minosiklinin Schwann hücrelerinde apoptozu engelleyerek, proliferasyonu uyardığını ve sinir rejenerasyonunu desteklediği gösterilmiştir. Özellikle, minosiklinin oksijen ve glikoz yoksunluğu koşullarında Schwann hücrelerini koruduğu ve bu hücrelerin proliferasyonu ile nörotrofik faktörlerin salınımını arttırdığı gösterilmiştir (A ve ark., 2018; Keilhoff ve ark., 2008). Bu bulgular, minosiklinin periferik sinir sistemi üzerindeki potansiyel koruyucu ve iyileştirici etkilerine işaret etmektedir.

Minosiklin, özellikle melanoma modellerinde kanser gelişimi ve yayılımı sırasında aktive olan Schwann hücreleri üzerinde yapılan çalışmalarda incelenmiştir. Bu araştırmalar, minosiklinin melanomanın neden olduğu Schwann hücre aktivasyonunu engelleyerek tümör mikroçevresinde inflamasyonu ve tümör ilerlemesini sınırlayabileceğini göstermektedir (G. V. Shurin ve ark., 2019). Minosiklin, kanser tedavisinde sadece nöropatik yan etkileri azaltmakla kalmayıp, aynı zamanda kanserin progresyonu ve metastazına karşı da potansiyel bir terapötik strateji sunmaktadır. Ayrıca, minosiklinin glial hücrelerin aktivasyonunu modüle ederek ve inflamasyonu azaltarak, hem periferik hem de santral sinir sistemlerinde iyileşmeye katkıda bulunabileceği düşünülmektedir. Bu bulgular, minosiklinin kanser tedavisindeki rolünü ve nörolojik etkilerini daha geniş bir çerçevede anlamamıza katkı sağlamaktadır.

2.15. Pegile Lipozomal Doksorubisin (PLD)

Toprak bazlı mikroorganizmalardan antikanser bileşikleri arayışı 1950'lerde başlamış ve bu süreçte *Streptomyces peucetius* türünden izole edilen, parlak kırmızı pigment üreten bir bakteriden fare tümörlerine karşı etkili bir antibiyotik elde edilmiştir (Brockmann, 1963). Bu antibiyotiğe daunorubisin adı verilmiş ve akut lösemi ve lenfoma tedavisinde başarılı sonuçlar elde edilmiştir (Arcamone ve ark., 1969). Ancak, 1967'de daunorubisinin ölümcül kardiyak toksisiteye yol açabileceği fark edilmiştir. Bunun üzerine araştırmacılar, *Streptomyces spp.*'de genetik değişiklikler yaparak, daha az toksik olan ancak daha yüksek terapötik indekse sahip doksorubisini (Adriamisin) geliştirmiştir. Doksorubisin DNA ile etkileşime girerek, interkalasyon yolu ile makromoleküler biyosentezi engeller ve bu süreçte topoizomera II enziminin işlevini bozarak DNA'nın süper sarmallarını gevşetir (Fornari ve ark., 1994; Momparler ve ark., 1976). Ayrıca DNA zincirini kırar ve topoizomera II kompleksini stabilize eder ve böylece DNA çift sarmalının yeniden birleşmesini önler ve replikasyonu engeller. Doksorubisin'in bir diğer etki mekanizması, serbest radikaller üreterek DNA ve hücre zarında hasar oluşturmaktır. Bu mekanizmalar, doksorubisini, yaklaşık 2000 analogunun üretildiği ve kanser tedavisinde önemli bir prototip haline getiren temel biyolojik etkilerdir.

Doksorubisin, özellikle mesane, meme, mide, akciğer, yumurtalık, tiroid, yumuşak doku sarkomu, multipl miyelom ve Hodgkin lenfoma gibi çeşitli kanser türlerinin tedavisinde yaygın olarak kullanılan etkili bir kemoterapötik ajandır. Ancak doksorubisinin yüksek dozda kullanımı, kardiyotoksikite gibi ciddi ve doz sınırlayıcı yan etkilere yol açabilmektedir. Bu toksisite, tedavi sürecinin etkinliğini ve güvenliğini önemli ölçüde kısıtlamaktadır. Kardiyak toksisitenin azaltılabilmesi amacıyla, doksorubisinin yeni formülasyonları üzerinde çeşitli araştırmalar gerçekleştirilmiştir. Bunlardan biri, Pegile lipozomal doksorubisin formülasyonudur (Rivankar, 2014). Pegilasyon ve lipozomal kapsülleme teknolojileri, ilacın farmasötik özelliklerini iyileştirerek, daha düşük kardiyak toksisite ile daha etkin bir tedavi sağlanmasını mümkün kılmaktadır. PLD lipozomlarla çevrelenmiş ve pegilasyon yoluyla biyolojik yarı ömrü uzatılmış bir formülasyondur. Bu özellik, ilacın kanser hücrelerine daha spesifik bir şekilde hedeflenmesini ve sağlıklı dokulara zarar verme olasılığını azaltarak tedaviye daha yüksek güvenlik profili ve daha iyi tolerabilite sağlamaktadır (Rivankar, 2014).

Günümüzde PLD, çeşitli kanser türlerinin tedavisinde kullanılmaktadır ve özellikle artmış kardiyak riske sahip metastatik meme kanseri hastalarında monoterapi olarak, birinci basamak platin bazlı kemoterapi rejiminin başarısız olduğu ileri evre over kanseri hastalarında, daha önce en az bir tedavi almış ve kök hücre nakli yapılmış veya nakil için uygun olmayan hastalarda, progresif multipl miyelom tedavisinde bortezomib ile kombinasyon halinde kullanılmaktadır. Yaygın mukokütanöz veya viseral hastalığı bulunan AIDS ile ilişkili Kaposi sarkomunun tedavisinde de endikedir. Bu formülasyon, kardiyomiyopati gibi ciddi toksisiteleri sınırlandırarak, daha güvenli ve etkin bir tedavi seçeneği sunmaktadır (Barenholz, 2012; Duggan ve Keating, 2011).



3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanları

Çalışmada 6-8 haftalık CD200 ligandı olan (eksprese eden) (yabanıl tip) dişi BALB/c fareler ile CD200KO (CD200 eksprese etmeyen) fareler ile çalışılmıştır. Yabanıl tip fareler Kobay firmasından temin edilmiştir. CD200KO fareler ise 2015 yılında Toronto Üniversitesinde görev yapan Prof. Dr. Reginald M. Gorczynski'den danışman hocam Prof. Dr. Nuray ERİN aracılığı ile temin edilmiştir. Hayvanların bakımı ve üretilmesi Akdeniz Üniversitesi Deney Hayvanları Ünitesi'nde sağlanmıştır.

3.2. DNA Ekstraksiyonu

DNA ekstraksiyonu için 8-12 haftalık farelerin kulaklarından yaklaşık 2 mm kulak parçası sıvı nitrojene alındı (1,5ml kapaklı tüp içerisinde). Dokulara 150 µl alkalın lizis buffer (1M NaOH+1M NaEDTA) eklendi, 95°C'de 2 saat boyunca ara ara vakteks yapılarak kaynatıldı. Kaynatma işleminden sonra dokular buza alındı ve üzerlerine 150 µl nötralize edici buffer (1M tris HCL) eklendi. Sonrasında 10 dk boyunca yüksek devirde santrifüj yapıldı. Santrifüj işlemi bittiğinde süpernatant yeni tüplere aktarıldı ve izole edilen DNA konsantrasyonları belirlendi. Bunun için nanodrop ile spektrofotometrede 260/230 nm'de absorbans değerleri ölçülmektedir (Thermo sci. µDrop plate, kat.no. N12391, Thermo sci. Multiscan go). Alkalın lizis buffer ve nötralize edici buffer karıştırılarak 1:1 oranında blank ölçümü için kullanıldı. DNA konsantrasyonu 50 ng/µl olacak şekilde dilüsyon yapılarak örnekler PCR için kullanıma hazır hale getirildi.

3.3. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)

Çalışmada rutin olarak takip ettiğimiz farelerin CD200 gen knockout olup olmadığını belirlemek için farelerin kulak dokusundan izole edilen DNA'ların ilgili kısımları uygun primerler kullanılarak PCR ile çoğaltıldı. Bunun için genomik DNA removal kit (Abm G488) ve Blue ray biotech, turbo cycler cihazı kullanılmıştır. İlgili genlere spesifik primerler aşağıdaki gibidir.

CD200 primerleri:

5- GACTACAAGCAGAGTCTGGACAAAGGTAAG-3'

5' -GGTTCCATACTTTCTGCAGGTTTATGTCA-3'

GAPDH primerleri:

5'- AGGTCGGTGTGAACGGATTTG-3'

5'-TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA-3'

PCR yöntemi koşulları ise şöyledir;

95°C de 2 dakika ön inkübasyon, 6 döngü olacak şekilde 95°C de 20 saniye denatürasyon, 62°C de yapışma 10 saniye ve 72°C de 1 dakika uzama.

28 döngü olacak şekilde 95°C de 20 saniye denaturasyon, 56°C de yapışma 10 saniye ve 72°C de 1 dakika uzama.

Pozitif kontrol olarak ise 8-12 haftalık yabanıl tip farelerin DNA'ları kullanıldı. PCR örnekleri agaroz jel elektroforezinin ardından görüntülendi.

Agaroz jel buffer (5X TBE):

Trisbase (Sigma, T1503) 54 gr, borik asit (Merck,100165) 27,5 gr, EDTA (Sigma E5134) 4,65gr, ddH2O; 1lt

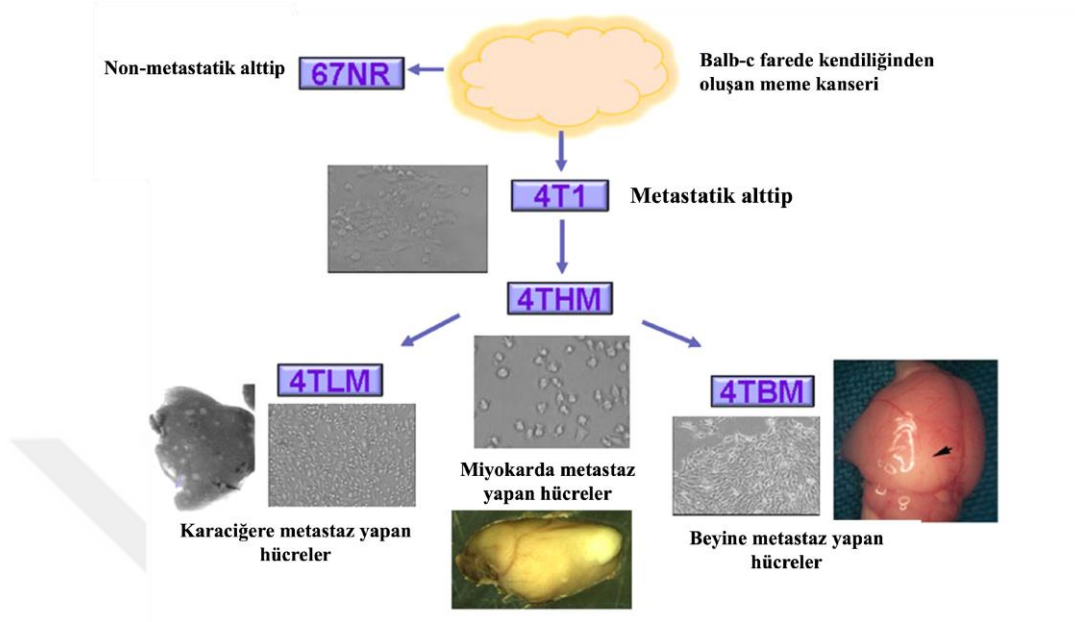
% 2'lik Agaroz Jel için:

50ml 1X TBE ile 1gr agaroz (Sigma, A9539) karıştırıldı, 1dak mikrodalga fırında kaynatıldı. 5µl Etidyum bromür eklendi ve jel sıcak halde tanka döküldü. Taraklar yerleştirildikten sonra jelin donması için ortam sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Jel dondukta sonra örnekler kuyucuklara yüklendi. 100V'da 40 dak. örnekler yürütüldü. Görüntüleme cihazında görüntülendi. (Azure spot C280 görüntüleme sistemi)

3.4. *In vivo* Ortotopik Tümör Modeli Oluşturulması

Çalışmada 4T1 metastatik fare meme kanseri hücresinin metastatik alt tipleri (4TBM ve 4TLM) ve metastatik olmayan (67NR) fare meme kanseri hücreleri kullanılmıştır (Erin ve ark., 2013). 6-8 haftalık dişi Balb/c farelerin sağ üst meme dokusuna 0,1 ml Hank's solüsyonu içerisinde 100.000 hücre olacak şekilde enjekte edilmiştir. Bu ortotopik fare tümör modelini çalışmalarımızda sıkça kullanmaktayız (Erin ve ark., 2013). Enjeksiyondan 5-7 gün sonra 2-3 mm'lik palpe edilebilen tümörler

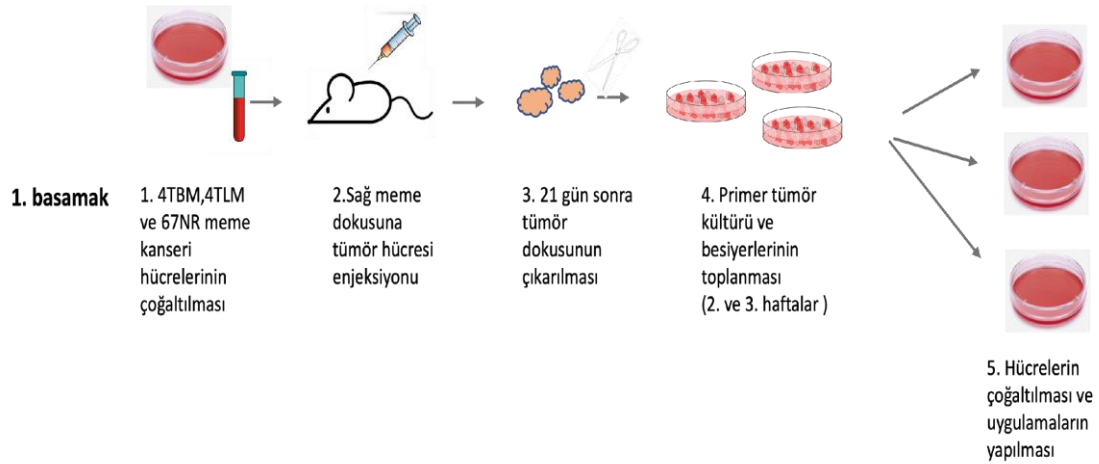
oluşmaktadır. Enjeksiyonun ardından 18-21. günde tümör eksizyonu yapıldı ve primer tümör kültürü oluşturuldu.



Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan hücre dizileri (Erin ve ark., 2013).

3.5. Primer Meme Kanseri Hücre Kültürü

Farede ortotopik olarak gelişen meme tümörü cerrahi müdahale ile çıkarıldı ve serumsuz DMEM F12'ye alındı. Ardından tümör dokusu steril koşullarda (laminar flow) mekanik olarak (makasla) parçalandı ve hücrelerin ayrışması sağlandı. Bu işlemler gentamisin içeren 1X PBS ortamında yapıldı. Parçalanmış tümör dokusu yıkama işlemi için gentamisinli 1X PBS ile karıştırıldı ve santrifüj edildikten sonra süpernatantı uzaklaştırıldı. Bu işlem 2 kez tekrarlandı. Daha sonra %5 FBS içeren DMEM-F12 ile tümör parçacıkları hücre kültür plakalarına aktarıldı ve inkübasyona bırakıldı. Hücreler %70-80 yoğunluğa ulaşana kadar düzenli olarak takip edildi ve bu süreçte haftada en az 1 kez besiyeri değiştirildi. Çoğalan hücrelerin serumlu besiyerleri uzaklaştırıldı. Hücrelerin yüzeyi serumsuz DMEM-F12 ile yıkandı. Ardından 100 mm'lik plaka için 7 ml, 250 mm'lik plaka için 12 ml serumsuz DMEM-F12 eklendi. 48 saat inkübasyonun ardından koşullandırılmış ortam (Condition medium ; CM) toplandı ve -80°C dolaba kaldırıldı. Tümör modeli oluşturma ve primer tümör kültürü, çalışma boyunca düzenli olarak yapıldı (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Primer meme kanseri hücre kültürü.

3.6. Primer Schwann Hücre Kültürü

Poly-D-Lysin Hydrobromide (PDL) ile Hücre Kültür Plakalarının Kaplanması:

Schwann hücrelerin tabana tutunabilmesi ve yayılabilmesi için kültür plakaları PDL (Sigma, P-6407 5mg) ile kaplandı. Bunun için 66 µg/ml konsantrasyonda Hanks solüsyonu ile dilüsyon yapıldı. PDL eklenen plakalar işlemiden önce en az 2 saat etüve arke inkübasyona bırakıldı. Hücreler plakalara aktarılmadan önce PDL uzaklaştırıldı ve 4 kez steril 1x PBS ile yıkama yapıldı.

Anestezi ve Dezenfeksiyon: 8 haftalık CD200KO ve yabancı tip farelere ip (intra peritoneal) anestezi uygulandıktan sonra dislokasyon yapıldı. Farenin yüzeyi batikon ve %70 alkolle dezenfekte edildi.

Siyatik Sinirlerin Çıkarılması: Laminar flow ortamında, farenin bilateral siyatik sinirleri çıkarıldı ve %5 FBS içeren Schwann hücre besiyerine (Science Cell 1701) alındı. Her defasında primer Schwann hücre kültürü için 2 farenin bilateral siyatikleri çıkarılmıştır.

Ön Kültür: Çıkarılan siyatik sinirler 37°C'de 5 gün inkübasyona bırakılarak ön kültür basamağı tamamlandı.

Enzimatik ve Mekanik Parçalama: Siyatik sinirlerin içinde bulunduğu Schwann hücre besiyeri uzaklaştırıldı. Önce 1 mg/ml kollajenaz NB4G (Nordmark, S1746502) içeren Hanks solüsyonu (Capricorn 1x) ile 37°C'de 45 dak. enzimle inkübasyona bırakıldı. Ardından, steril mikromakasla 1-2 mm olacak şekilde kesilerek mekanik

parçalama gerçekleştirildi. 37°C'de 30 dak daha kollajenazla inkübasyonun ardından 400 rcf'de 5 dak. santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve 1 ml Schwann hücre besiyeri eklendi; pipetaj ile hücrelerin ayrışması sağlandı.

Besiyeri Hazırlığı ve takibi: 10 ng/ml NRG-1 (Prospec, CYT-407- 50µg), 2 µM Forskolin (Medchem, HY15371-10mg) ve 10 ng/ml FGF-2 (Peprotech, 450-33) içeren %5 FBS Schwann hücre besiyeri ortamında, parçalanmış sinir dokusu PDL kaplı 100 mm'lik plakalara aktarıldı. 0. pasajda Schwann hücrelerin tutunması ve çoğalması ortalama 10 gündür. Bu süreçte hücreler 37°C, %5 CO₂ içeren nemli etüv ortamında inkübasyona bırakıldı ve haftada 2 kez besiyerinin yarısı tazeleni.

Pasajlama İşlemleri: İlk kültürleme basamağı pasaj 0'da Schwann hücrelerin tabana tutunma, çoğalma ve %60-70 yoğunluğa ulaşma süresi ortalama 10 gündür. Pasajlamalar hücreler en az %60 yoğunluğa ulaştığında yapıldı. Bunun için 300 µg/ml kollajenaz NB4G içeren Hanks solüsyonu ile Schwann hücreleri plakanın yüzeyinden hafif pipetajla kaldırıldı. Schwann hücreleri ile birlikte kültürde olabilecek fibroblastların bu uygulamada flasktan kalkmadığı çalışmalarda gösterilmiştir (Y. Wei ve ark., 2009) (PMID: 19639342). Ayrıca pasaj 0'da kullanılan bFGF-2, heregulin β1 ve forskolin ile Schwann hücre sağlığı ve verimi maksimize edilmiştir. PMID: 28901508. Kaldırılan hücreler 15 ml'lik tüplere toplandı ve 400 rcf'de 5 dakika santrifüj işlemi ile çöktürüldü. Süpernatant atılarak kollajenazlı besiyeri uzaklaştırıldı. %5 FBS içeren Schwann hücre besiyeri ile hücre pelleti karıştırıldı. Schwann hücreleri, bir önceki pasajın 2 katı olacak şekilde daha önce PDL ile kaplanmış plakalara bölündü. Hem pasaj 1 hem de pasaj 2'de hücrelerin en az %60 yoğunluğa ulaşması için gereken süre 2 haftadır. Dolayısıyla deneylerin yapılabilmesi için hücrelerin uygun yoğunluk ve morfolojiye ulaşması yaklaşık 8 haftayı bulmaktadır. Deneyler 2. pasajda çoğalan hücreler ile gerçekleştirildi.



Şekil 3.3. Primer Schwann hücre kültürü.

3.7. İmmün Floresan Boyama

Schwann hücrelerde immün floresan boyama ile S100B (sc-393919) ve GFAP (Glial fibrilar asidik protein) (Abcam, PAA068RA01) biyobelirteçlerinin varlığına bakıldı. S100 kalsiyum bağlayıcı bir proteindir ve spesifik bir Schwann hücre markerıdır. Bu protein Schwann hücre varlığını, saflığını ve rejenerasyonunu gösterir. GFAP ise genellikle aktif Schwann hücrelerde eksprese edilmektedir (Couve ve ark., 2018).

6 kuyucuklu plakanın her bir kuyucuğunun tam ortasına 1 lamel yerleştirildi. Kuyucuklar 1 ml % 0.1 jelatin (Sigma, G2500) ile kaplandı. 1 gece etüve arke inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün jelatin uzaklaştırıldı ve plaka 10-15 dakika steril kabinde (laminar flow) sarsılmadan kurutuldu. Hücreler 2 ml %5 FBS içeren Schwann hücre besiyeri ile kuyucuklara aktarıldı ve etüve arke inkübasyona bırakıldı. 24 saat sonra fiksasyon aşamasına geçildi. Bunun için besiyeri uzaklaştırıldı. 1ml/kuyucuk PFA (Paraformaldehit) eklendikten sonra 15 dakika etüve arke inkübasyona bırakıldı. Fikse edilen hücrelerin, PBS içinde çözünmüş %0,1'lik Triton X-100 ile 15 dakika oda ısısında permeabilizasyonu sağlandı. Daha sonra 30 dakika boyunca UV blok ile bloklanan hücreler uygun dilüsyonlarda hazırlanan primer antikorlar ile +4 C'de gece boyu inkübe edildi. Negatif kontrol kesitlerine primer antikor yerine PBS uygulandı. İnkübasyon sonrasında PBS ile yıkanarak (3x5 dk) primer antikor uzaklaştırıldı. Ardından 2 saat boyunca uygun sekonder antikorlar ile inkübe edildi (Donkey anti-chicken, 488-Jackson- 703-545-155, Donkey anti-mouse, İnvitrogen-568-A10037). Son olarak PBS yıkamasından sonra DAPI içeren kapatma solüsyonu ile kapatılarak

görüntülemeye hazır hale getirildi. Hazırlanan preparatlar floresan mikroskop (Olympus BX43, Japan) ile uygun dalga boylarında fotoğraflandı.

3.8. Schwann Hücre Uyarımı, Pegile Lipozomal Doksorubisin, CD200fc ve Minosiklin Uygulaması

2. pasajda çoğalan Schwann hücreler ile deneyler gerçekleştirildi. 1. basamakta Schwann hücreler, primer tümör hücre CM'leri ile uyarıldı. Uyarım için %30 CM, %70 serumsuz Schwann hücre besiyeri ile seyreltildi. Önce Schwann hücrelerin besiyeri uzaklaştırıldı ve serumsuz besiyeri ile yıkama yapıldı. Hazırlanan uyarımlar her bir grup için 2 ya da 3 tekrarlı olacak şekilde 100 mm'lik kültür plakası için 7 ml uygulandı. Gruplar aşağıdaki gibidir ;

Kontrol Schwann Hücre grubu: %30 serumsuz DMEM F12 + %70 serumsuz Schwann hücre besiyeri

4TLM CM uyarımlı Schwann Hücre grubu: %30 4TLM CM + %70 serumsuz Schwann hücre besiyeri

4TBM CM uyarımlı Schwann Hücre grubu: %30 4TBM CM + %70 serumsuz Schwann hücre besiyeri

67NR CM uyarımlı Schwann Hücre grubu: %30 67NR CM + %70 serumsuz Schwann hücre besiyeri

1.Uyarımlar uygulandıktan 48 saat sonra uyarımlı Schwann hücre CM'ları toplandı. Schwann hücre besiyeri eklendi ve hücreler etüve arke 24 saat dinlendirildi. Ardından 2. kez aynı uyarımlar aynı şekilde uygulandı. 48 saat sonra 2. uyarım CM'ları toplandı ve -80°C dolaba kaldırıldı.

2.basamakta hem uyarılan hem de kontrol grubundaki Schwann hücreler PDL ile kaplı 12, 24 ve 48 kuyucuklu kültür plakalarına aktarıldı. Hücrelerin kaldırılması daha önce pasajlama işleminde anlatıldığı gibi kollajenaz ile yapıldı. Schwann hücreler; 12 kuyucuklu kültür plakasında yaklaşık olarak 100.000/kuyucuk, 24 kuyucuklu kültür plakasında 50.000/kuyucuk ve 48 kuyucuklu kültür plakasında ise 30.000/kuyucuk olacak şekilde ekilmiştir. 24-48 saat inkübasyonun ardından besiyerler uzaklaştırılarak ilaçlı ortamlar uygulandı. Her bir grup en az 4 tekrarlı olarak çalışıldı.

Kontrol grubu; Daha önce ya da ilaç uygulaması esnasında CM ile uyarılmayan gruptur. Serumsuz Schwann hücre besiyerileri kullanıldı.

CD200fc (Biolegend, 783206); 0,4 µg/ml konsantrasyonda çalışıldı. Kontrol grubu için serumsuz ortamda uyarımlı gruplar için CM içeren ortamda uygulandı.

Pegile Lipozomal Doksorubisin (Baxter, Caelyx 2 mg/ml) 5 µM konsantrasyonda çalışıldı. Aşağıda anlatıldığı gibi 2 farklı şekilde deneye dahil edildi;

- a) Schwann hücrelere direkt olarak CM içerisinde uygulanarak Pegile Lipozomal Doksorubisinin direkt Schwann hücreler üzerindeki etkisi araştırıldı.
- b) Önce primer tümör hücrelerine uygulandıktan sonra toplanan CM'ların Schwann hücrelere uygulanması ile dolaylı olarak Schwann hücrelere uygulandı. Böylece Pegile Lipozomal Doksorubisinin kanser hücreleri üzerindeki etkisine bağlı olarak ortaya çıkması muhtemel Schwann hücre yanıtı araştırıldı.

Minosiklin (Sigma, M9511); Minosiklin DMSO ile çözündürüldü. 10nM stok hazırlandı. Alikotlanarak -20 °C dolapta muhafaza edildi. 40 µM konsantrasyonda çalışıldı.

İlaçlı ortamlar uygulandıktan 48 saat sonra sitokin ve kemokin yanıtlarını değerlendirmek üzere CM'lar toplandı ve -80°C dolapta (Thermo sci.) muhafaza edildi.

3.9. Hücre Proliferasyon Tayini

MTT assay (Sigma, M2128): Hücrelerin besiyerleri uzaklaştırıldı. 0,5 mg/ml MTT stok solüsyonu %10 olacak şekilde besiyeri ile seyreltildi. Kuyucuklara hücrelerin yüzeyini kaplayacak şekilde %10 MTT solüsyonu koyuldu. 3 saat inkübasyona bırakıldı. MTT içeren besiyeri kuyucuklardan çekilip atıldı. Her bir kuyucuğa DMSO eklendi ve 5 dak çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı. Formazan kristalleri tamamen çözündükten sonra spektrofotometrede 570 nm dalga boyunda okumaları yapıldı. (540-690). Hücre standart eğrisi (1.std 120.000 hücreden başlamaktadır) kullanılarak hesaplamalar yapıldı.

CCK-8 assay (Elabscience, E-CK-A362): Hücrelerin besiyerleri uzaklaştırıldıktan sonra %10 CCK-8 içeren besiyeri kuyucuklara eklendi. 2,5 saat inkübasyona bırakıldı.

Spektrofotometrede 450 nm dalga boyunda okumaları yapıldı. Hücre standart eğrisi (1.std 120.000 hücreden başlamaktadır) kullanılarak hesaplamalar yapıldı.

Kristal viyole assay: Kristal viyole ile proliferasyon analizi için ilk önce besiyeri uzaklaştırıldı ve kuyucuklar yıkandı. Bunun için 1x PBS kullanıldı. Yıkama işleminin ardından fiksasyon aşamasında metanol:asetik asit (3:1) solüsyonu ile hücreler 5 dk. oda ısısında inkübe edildi. Fiksasyon solüsyonu uzaklaştırıldı ve daha sonra boyama basamağına geçildi. % 0.5 kristal viyole (metanol içerisinde) boyası damla damla eklenerek kuyucukların yüzeyi kaplanacak şekilde boyandı. Bu aşamada kültür plakaları 15 dakika oda ısısında inkübe edildi. İnkübasyon sonunda boya uzaklaştırılarak kuyucuklar çeşme suyu ile yavaş yavaş yıkandı. Son olarak kuyucuklara %1 SDS eklenerek kristal viyole çözüldü ve spektrofotometre cihazında 570 nm’de absorbans değerleri ölçüldü.

3.10. ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) Yöntemi ile Sitokinler Ve Kemokinlerin Ölçümü

Kullandığımız kitlerin marka ve katalog numaralarıyla beraber uyguladığımız yöntem protokolleri ve reaktiflerin hazırlığı detaylı olarak aşağıda anlatılmıştır.

Fosfat Tamponu (Phosphate Buffer Saline, PBS):

8 g NaCl (Sigma), 0,2 g KCl (Sigma), 1,44 g NaH₂PO₄ (Sigma), ve 0,24 g KH₂PO₄ (Sigma) tartılarak, 700 ml distile su ile çözüldü. pH 7.4’ e ayarlandı ve toplam hacim distile su ile 1 litreye tamamlandı. Solüsyon 0,22 µm vakumlu filtreden (Jetbiofil ve Milipore) geçirildikten sonra kullanıldı.

3.10.1. TNF-alfa ELISA (Biolegend, 430901)

Reaktiflerin hazırlanması ;

- **Yıkama solüsyonu :** PBS içinde %0,05 Tween20
- **Bloklama solüsyonu:** PBS içinde %1 BSA
- **Dilüent:** PBS içinde %1 BSA
- **Coating Buffer:** 8,4 gr. NaHCO₃, 3,56 gr. Na₂CO₃; 1 litre 1x PBS ile hazırlandı, pH 9,5’e ayarlandı.
- **Capture Antikoru:** 1/500 dilüsyonda coating buffer ile hazırlandı.
- **Detection Antikoru:** 1/500 dilüsyonda dilüent ile hazırlandı.
- **Enzim, Avidin HRP:** 1/15000 dilüsyonda dilüent ile hazırlandı.

- **Substrat:** TMB
- **Durdurma solüsyonu:** 2N H₂SO₄
- **Standart:** Standart tüpü 200ul assay dilüent ile sulandırıldı. 1. standart 1000 pg/ml olacak şekilde hazırlandı ve 1. standarttan başlanarak %50 oranında 11 adet seri dilüsyon yapıldı.

Protokol Adımları:

1. Kaplama Aşaması: Primer antikor (capture; kaplama ab) çözeltisi, yüksek bağlama kapasiteli 96 kuyucuklu plakanın her bir kuyucuğuna 100 µl eklendi. Gece boyunca +4°C’de inkübe edildi.
2. Yıkama: 4 kez yıkama solüsyonu ile yıkama yapıldı.
3. Bloklama: Bloklama solüsyonundan 200 µl eklenmiştir. 60 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
4. Yıkama: 3 kez yıkama solüsyonu ile yıkama yapıldı.
5. Standart ve Örnek Yükleme : Standart ve örneklerden 100 µl eklenmiştir. 2 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
6. Yıkama: 4 kez yıkama solüsyonu ile yıkama yapıldı.
7. Sekonder antikor: Sekonder antikor (detection; tracer) çözeltisinden 100 µl eklenmiştir. 1.5 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
8. Yıkama: 4 kez yıkama solüsyonu ile yıkama yapıldı.
9. HRP : HRP çözeltisinden 100 µl eklendi. 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
10. Yıkama: 5 kez yıkama solüsyonu ile yıkama yapıldı.
11. Substrat : Substrat (TMB) çözeltisinden 100 µl eklenmiştir. 30 dakika boyunca karanlıkta oda sıcaklığında renk değişimine göre takip edilerek bekletildi.
12. Durdurma: Durdurma çözeltisinden 100 µl eklenmiştir.
13. Okuma: 450-570 nm dalga boyunda absorbans okumaları yapılmıştır.
14. Hesaplamalar için Microsoft excel programı kullanıldı. Standart eğrisi oluşturuldu. Buna göre X/Y grafiği ve R değeri elde edildi. Formülde yerine koyarak hesaplamalar yapıldı. Ortalama, standart sapma ve standart hata değerleri hesaplandı. Grafikler oluşturuldu.

3.10.2. IL-6 ELISA (Biolegend, 431301)

Reaktiflerin hazırlanması:

- **Yıkama solüsyonu:** PBS içinde %0,05 Tween20
- **Bloklama solüsyonu:** PBS içinde %10 FBS
- **Dilüent:** PBS içinde %10 FBS
- **Coating Buffer:** 0,1M Sodyum karbonat
8,4 gr. NaHCO₃, 3,56 gr. Na₂CO₃; 1 litre 1x PBS içinde çözdürüldü, pH 9,5'e ayarlandı.
- **Capture Antikoru:** 1/1000 dilüsyonda coating buffer ile hazırlandı.
- **Detection Antikoru:** 1/1000 dilüsyonda diluent ile hazırlandı.
- **Enzim, Avidin HRP:** 1/5000 dilüsyonda dilüent ile hazırlandı.
- **Substrat:** TMB
- **Durdurma solüsyonu:** 2N H₂SO₄
- **Standart:** Standart tüpü 200ul assay dilüent ile sulandırıldı. 1. standart 2000 pg/ml olacak şekilde hazırlandı ve 1. standarttan başlanarak %50 oranında 11 adet seri dilüsyon yapıldı.

Protokol Adımları:

1. Kaplama Aşaması: Primer antikor (capture; kaplama ab) çözeltisi, yüksek bağlama kapasiteli 96 kuyucuklu plakanın her bir kuyucuğuna 100 µl eklendi. Gece boyunca +4°C'de inkübe edildi.
2. Yıkama: 4 kez yıkama solüsyonu ile yıkama yapıldı.
3. Bloklama: Bloklama solüsyonundan 200 µl eklenmiştir. 60 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
4. Yıkama: 3 kez yıkama solüsyonu ile yıkama yapıldı.
5. Standart ve Örnek Yükleme : Standart ve örneklerden 100 µl eklenmiştir. 2 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
6. Yıkama: 4 kez yıkama solüsyonu ile yıkama yapıldı.
7. Sekonder antikor: Sekonder antikor (detection; tracer) çözeltisinden 100 µl eklenmiştir. 1.5 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
8. Yıkama: 4 kez yıkama solüsyonu ile yıkama yapıldı.
9. HRP : HRP çözeltisinden 100 µl eklendi. 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
10. Yıkama: 5 kez yıkama solüsyonu ile yıkama yapıldı.

11. Substrat : Substrat (TMB) çözeltisinden 100 µl eklenmiştir. 30 dakika boyunca karanlıkta oda sıcaklığında renk değişimine göre takip edilerek bekletildi.
12. Durdurma: Durdurma çözeltisinden 100 µl eklenmiştir.
13. Okuma: 450-570 nm dalga boyunda absorban okumaları yapılmıştır.

3.10.3. MIP-2 ELISA (Antigenix America, RMF431CK)

Reaktiflerin hazırlanması:

- **Yıkama solüsyonu** : PBS içinde %0,05 Tween20
- **Bloklama solüsyonu**: PBS içinde %10 FBS
- **Dilüent**: PBS içinde %10 FBS
- **Coating Buffer**: PBS
- **Capture Antikoru**: Kit içindeki 50 µg capture Ab içine 500µl %1BSA PBS eklendi(0,1µg/ml). Alikotlandı, -20 C dolapta saklandı. 1:1000 coating buffer ile hazırlandı.
- **Detection Antikoru**: Kit içindeki 25µg tracer Ab içine 500µl %1BSA PBS eklendi, alikotlandı ve -20 C dolapta saklandı. 1:1000/ dilüent ile hazırlandı (1ml diluent +1 µl detection antikoru)
- **Enzim, Avidin HRP**: 1/1000 dilüsyonda dilüent ile hazırlandı. (Thermo scientific, 21126)
- **Substrat**: TMB 1:1 oranında karıştırıldı.
- **Durdurma solüsyonu**: 2N H₂SO₄
- **Standart**: Kit içindeki standart içine 50µl %1BSA PBS eklendi (ana stok, 20000ng/ml). 100 kez sulandırılıp ara stok (200 ng/ml) yapıldı. (5µl ana stok+500µl %1BSA ddH₂O) **1.standart : 2000 pg/ml olacak şekilde hazırlandı** ve 1. standarttan başlanarak %50 oranında 11 adet seri dilüsyon yapıldı.

Protokol Adımları:

1. Kaplama Aşaması: Primer antikor (capture; kaplama ab) çözeltisi, yüksek bağlama kapasiteli 96 kuyucuklu plakanın her bir kuyucuğuna 100 µl eklendi. Gece boyunca +4°C’de inkübe edildi.
2. Yıkama: 4 kez yıkama solüsyonu ile yıkama yapıldı.
3. Bloklama: Bloklama solüsyonundan 200 µl eklenmiştir. 2 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.

4. Yıkama: 3 kez yıkama solüsyonu ile yıkama yapıldı.
5. Standart ve Örnek Yükleme : Standart ve örneklerden 100 µl eklenmiştir. 2 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
6. Yıkama: 4 kez yıkama solüsyonu ile yıkama yapıldı.
7. Sekonder antikor: Sekonder antikor (detection; tracer) çözeltisinden 100 µl eklenmiştir. 2 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
8. Yıkama: 4 kez yıkama solüsyonu ile yıkama yapıldı.
9. HRP : HRP çözeltisinden 100 µl eklendi. 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
10. Yıkama: 5 kez yıkama solüsyonu ile yıkama yapıldı.
11. Substrat : Substrat (TMB) çözeltisinden 100 µl eklendi. 30 dakika boyunca karanlıkta oda sıcaklığında renk değişimine göre takip edilerek bekletildi.
12. Durdurma: Durdurma çözeltisinden 100 µl eklendi.
13. Okuma: 450-650 nm dalga boyunda absorbans okumaları yapılmıştır.

3.10.4. KC ELISA (Antigenix America, RMF428CK)

Reaktiflerin hazırlanması:

- **Yıkama solüsyonu** : PBS içinde %0,05 Tween20
- **Bloklama solüsyonu**: PBS içinde %10 FBS
- **Dilüent**: PBS içinde %10 FBS
- **Coating Buffer**: PBS
- **Capture Antikoru**: Kit içindeki 50 µg capture Ab içine 1000µl %1BSA PBS eklendi. Alikotlandı, -20 C dolapta saklandı. 1:500 coating buffer ile hazırlandı.
- **Detection Antikoru**: Kit içindeki 25µg tracer Ab içine 500µl %1BSA PBS eklendi, alikotlandı ve -20 C dolapta saklandı. 1:500/ dilüent ile hazırlandı (1ml diluent +2 µl detection antikoru)
- **Enzim, Avidin HRP**: 1/10000 dilüsyonda dilüent ile hazırlandı. (Thermo scientific, 2126)
- **Substrat**: TMB 1:1 oranında karıştırıldı.
- **Durdurma solüsyonu**: 2N H₂SO₄
- **Standart**: Kit içindeki standart içine 50µl %1BSA PBS eklendi (ana stok, 20000ng/ml). 100 kez PBS ile sulandırılıp ara stok (200 ng/ml) yapıldı. (5µl ana stok+500µl %1BSA ddH₂O) **1.standart : 4000 pg/ml olacak şekilde**

hazırlandı ve 1. standarttan başlanarak %50 oranında 11 adet seri dilüsyon yapıldı.

Protokol Adımları:

1. Kaplama Aşaması: Primer antikor (capture; kaplama ab) çözeltisi, yüksek bağlama kapasiteli 96 kuyucuklu plakanın her bir kuyucuğuna 100 µl eklendi. Gece boyunca +4°C’de inkübe edildi.
2. Yıkama: 4 kez yıkama solüsyonu ile yıkama yapıldı.
3. Bloklama: Bloklama solüsyonundan 200 µl eklenmiştir. 2 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
4. Yıkama: 3 kez yıkama solüsyonu ile yıkama yapıldı.
5. Standart ve Örnek Yükleme : Standart ve örneklerden 100 µl eklenmiştir. 2 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
6. Yıkama: 4 kez yıkama solüsyonu ile yıkama yapıldı.
7. Sekonder antikor: Sekonder antikor (detection; tracer) çözeltisinden 100 µl eklenmiştir. 2 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
8. Yıkama: 4 kez yıkama solüsyonu ile yıkama yapıldı.
9. HRP : HRP çözeltisinden 100 µl eklendi. 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
10. Yıkama: 5 kez yıkama solüsyonu ile yıkama yapıldı.
11. Substrat : Substrat (TMB) çözeltisinden 100 µl eklendi. 30 dakika boyunca karanlıkta oda sıcaklığında renk değişimine göre takip edilerek bekletildi.
12. Durdurma: Durdurma çözeltisinden 100 µl eklendi.
13. Okuma: 450-650 nm dalga boyunda absorbans okumaları yapılmıştır.

3.10.5. MCP-1 (CCL-2) ELISA (Biolegend, 432701)

Reaktiflerin hazırlanması ;

- **Yıkama solüsyonu** : PBS içinde %0,05 Tween20
- **Bloklama solüsyonu**: PBS içinde % 10 FBS
- **Dilüent**: PBS içinde %1 BSA
- **Coating Buffer**: : 8.4 g NaHCO₃ , 3.56 g Na₂CO₃ 750ml litre deiyonize su ile çözdürüldü pH:9.5'e ayarlandıktan sonra PBS ile 1 lt'ye tamamlandı
- **Capture Antikoru**: 1/750 dilüsyonda coating buffer ile hazırlandı.
- **Detection Antikoru**: 1/750 dilüsyonda diluent ile hazırlandı.

- **Enzim, Avidin HRP:** 1/1000 dilüsyonda dilüent ile hazırlandı.
- **Substrat:** TMB
- **Durdurma solüsyonu:** 2N H₂SO₄
- **Standart:** Standart tüpü 200ul assay dilüent ile sulandırıldı. Stok standart 69.000 pg/ml 1. standart 4000 pg/ml olacak şekilde hazırlandı ve 1. standarttan başlanarak %50 oranında 11 adet seri dilüsyon yapıldı. (1. Std 300ul diluent + 17.4ul stok)

Protokol Adımları:

1. Kaplama Aşaması: Primer antikor (capture; kaplama ab) çözeltisi, yüksek bağlama kapasiteli 96 kuyucuklu plakanın her bir kuyucuğuna 100 µl eklendi. Gece boyunca +4°C’de inkübe edildi.
2. Yıkama: 4 kez yıkama solüsyonu ile yıkama yapıldı.
3. Bloklama: Bloklama solüsyonundan 200 µl eklenmiştir. 60 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
4. Yıkama: 3 kez yıkama solüsyonu ile yıkama yapıldı.
5. Standart ve Örnek Yükleme : Standart ve örneklerden 100 µl eklenmiştir. 2 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
6. Yıkama: 4 kez yıkama solüsyonu ile yıkama yapıldı.
7. Sekonder antikor: Sekonder antikor (detection; tracer) çözeltisinden 100 µl eklenmiştir. 1 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
8. Yıkama: 4 kez yıkama solüsyonu ile yıkama yapıldı.
9. HRP : HRP çözeltisinden 100 µl eklendi. 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
10. Yıkama: 5 kez yıkama solüsyonu ile yıkama yapıldı.
11. Substrat : Substrat (TMB) çözeltisinden 100 µl eklenmiştir. 30 dakika boyunca karanlıkta oda sıcaklığında renk değişimine göre takip edilerek bekletildi.
12. Durdurma: 100 µl durdurma solüsyonu eklendi.
13. Okuma: 450-570 nm dalga boyunda absorbans okumaları yapıldı.

3.10.5. IL-1 Beta ELISA (Biolegend, 432601)

Reaktiflerin hazırlanması :

- **Yıkama solüsyonu** : PBS içinde %0,05 Tween20
- **Bloklama solüsyonu**: PBS içinde % 10 FBS
- **Dilüent**: PBS içinde %1 BSA
- **Coating Buffer**: : 8.4 g NaHCO₃ , 3.56 g Na₂CO₃ 750ml litre deiyonize su ile çözdürüldü, pH:9.5'e ayarlandıktan sonra PBS ile 1 lt'ye tamamlandı
- **Capture Antikoru**: 1/750 dilüsyonda coating buffer ile hazırlandı.
- **Detection Antikoru**: 1/750 dilüsyonda diluent ile hazırlandı.
- **Enzim, Avidin HRP**: 1/1000 dilüsyonda dilüent ile hazırlandı.
- **Substrat**: TMB
- **Durdurma solüsyonu**: 2N H₂SO₄
- **Standart**: Standart tüpü 200ul assay dilüent ile sulandırıldı. Stok standart 69.000 pg/ml 1. standart 4000 pg/ml olacak şekilde hazırlandı ve 1. standarttan başlanarak %50 oranında 11 adet seri dilüsyon yapıldı. (1. Std 300ul diluent + 17.4ul stok)

Protokol Adımları:

1. Kaplama Aşaması: Primer antikör (capture; kaplama ab), yüksek bağlama kapasiteli 96 kuyucuklu plakanın her bir kuyucuğuna 100 µl eklendi. Gece boyunca +4°C'de inkübe edildi.
2. Yıkama: 4 kez yıkama solüsyonu ile yıkama yapıldı.
3. Bloklama: Bloklama solüsyonundan 200 µl eklenmiştir. 60 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
4. Yıkama: 3 kez yıkama solüsyonu ile yıkama yapıldı.
5. Standart ve Örnek Yükleme : Standart ve örneklerden 100 µl eklenmiştir. 2 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
6. Yıkama: 4 kez yıkama solüsyonu ile yıkama yapıldı.
7. Sekonder antikoru: Sekonder antikör (detection; tracer) çözeltisinden 100 µl eklenmiştir. 1 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
8. Yıkama: 4 kez yıkama solüsyonu ile yıkama yapıldı.
9. HRP : HRP çözeltisinden 100 µl eklendi. 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
10. Yıkama: 5 kez yıkama solüsyonu ile yıkama yapıldı.

11. Substrat : Substrat (TMB) çözeltisinden 100 µl eklenmiştir. 30 dakika boyunca karanlıkta oda sıcaklığında renk değişimine göre takip edilerek bekletildi.
12. Durdurma: 100 µl durdurma solüsyonu eklendi.
13. Okuma: 450-570 nm dalga boyunda absorban okumaları yapıldı.

3.11. ELISA Sonuçlarının Hesaplanması ve Grafikleştirilmesi

Deneyde elde edilen veriler, örneklerin absorban değerleri ile standart çözeltilerin konsantrasyonları arasındaki ilişkiyi içermektedir. Bilinen konsantrasyonlarda standart çözeltiler hazırlandı ve bu çözeltilerin absorban değerleri ölçüldü. Elde edilen standart verileri ile Microsoft Excel programında absorban (X) ve konsantrasyon (Y) değerleri kullanılarak bir grafik oluşturuldu ve standart eğrisi elde edildi. Standart eğrisi üzerinden hesaplanan R değeri, eğrinin veriye ne kadar iyi uyum sağladığını göstermekte olup, R değerinin 1'e yaklaşması, modelin veriye uyumunu ve testin güvenilirliğini arttırmaktadır.

Son olarak, elde edilen standart eğrisi ile örneklerin absorban (X) değerleri üzerinden konsantrasyonları (Y) hesaplandı ve bu hesaplamalarda eğrinin denklemi kullanıldı. Her bir grup en az dört kez tekrarlanarak elde edilen sonuçların ortalamaları, standart sapmaları ve standart hataları hesaplandı. Bu veriler, sonuçları görselleştirmek amacıyla sütun grafiklerine aktarıldı.

3.12. İstatistiksel Analiz

Deney gruplarına göre “Student's t”-testi, ANOVA ve takibinde “Dunnett” karşılaştırma testi, non-parametrik “Mann–Whitney” testi ve “Welch t”-testi kullanıldı. $p < 0,05$ değerleri anlamlı kabul edildi. Analizler “GraphPad InStat 3 software” kullanılarak yapıldı.

3.13. Çalışmada Kullanılan Sarf Malzemeler, Kimyasallar, Kitler ve Cihazlar

Bu çalışmadaki tüm imkanlar ve gereçler Akdeniz Üniversitesi, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı'nda Prof. Dr. Nuray ERİN'in laboratuvarında sağlandı ve tüm deneyler burada yürütüldü. Hayvanların barınması ve bakımı Akdeniz Üniversitesi Deney Hayvanları Ünitesi'nde yapıldı. Çalışmada moleküler biyoloji için uygun saflıkta kimyasallar kullanıldı.

Çalışmada Kullanılan Sarf Malzemeler

Hücre kültür Flaskı 75cm'lik	(Thermo scientific)
Hücre kültür plakası, 100 mm	(Jetbiofil, Greiner)
6 kuyucuklu hücre kültür plakası	(Corning)
12 kuyucuklu hücre kültür plakası	(Corning)
24 kuyucuklu hücre kültür plakası	(Corning)
48 kuyucuklu hücre kültür plakası	(Corning)
96 kuyucuklu hücre kültür plakası	(Corning)
Santrifüj tüpleri (15 ml ve 50 ml)	(Jet Biofil)
Hücre dondurma tüpleri	(TRP)
Steril serolojik pipet	(BD)
Pipet uçları (10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)	(Thermo sci.)
1,5 ml'lik kapaklı deney tüpü	(Axygen)
İnsülin enjektörü	(Baby)
5ml ve 10ml enjektör	(Baby)
Enjektör filtresi (0,22um ve 0,45um)	(Jet biofil, isolab)
Parafilm	

Çalışmada Kullanılan ELISA Kitleri

Fare MIP-2 ELISA kiti	(Antigenix America, RMF431CK)
Fare KC ELISA kiti	(Antigenix America, RMF428CK)
Fare IL-6 ELISA kiti	(Biolegend, 431301)
Fare TNF- α ELISA kiti	(Biolegend, 430901)
Fare MCP-1 (CCL-2) ELISA kiti	(Biolegend, 432701)
Fare IL-1Beta ELISA kiti	(Biolegend, 432601)

Çalışmada Kullanılan Kimyasallar

NRG1	(Prospec, CYT-407- 50µg)
Forskolin	(Medchem, HY15371-10mg)
FGF-2	(Peprotech, 450-33)
Schwann hücre besiyeri	(SCM 1701)
DMEM (<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>)	(Gibco)
FBS (Fetal Dana Serumu)	(Gibco, Serox)
Gentamisin	(NZY tech, MB16601)

Sodyum klorür	(Carlo Erba, İtalya)
Dimetil sülfoksit (DMSO)	(Amresco-ABD)
Cyristal violet	(Sigma-ABD)
Metanol	(Tekkim, TK 120320)
Sodyum dodesil süfat	(Applichem, A7249)
MTT	(Sigma)
CCK-8	(Elabscience)
Kollajenaz NB4G	(Nordmark, S1746502)
Etanol	(Merck 1.00971))
Mouse IgG HRP	(Thermo scientific, 2126)
NaCl	(Sigma)
KH ₂ PO ₄	(Sigma)
KCl	(Sigma)
NaH ₂ PO ₄	(Sigma)
H ₂ SO ₄	(Merck, 1.00731.2511)

Çalışmada Kullanılan Aletler ve Gereçler

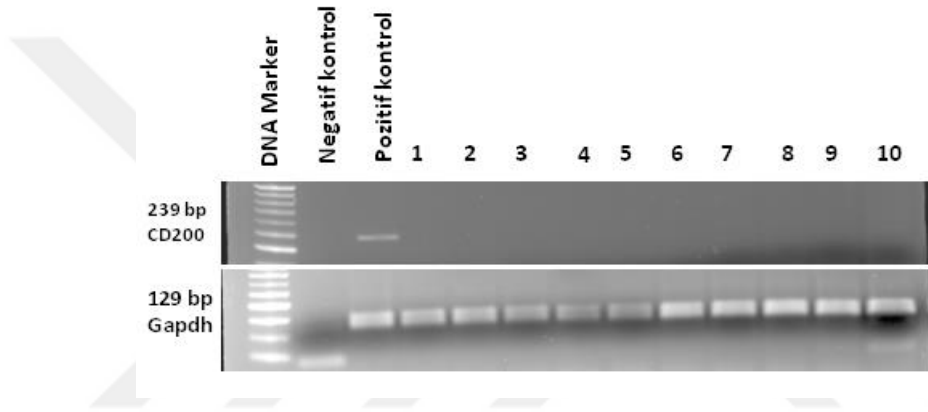
Inverted mikroskop	(Olympos)
Class II LaminAir	(ESCO)
Laminar flow 2	(Thermo sci. Msc Advantage)
CO ₂ inkübatörü (%5 CO ₂)	(Thermo sci.)
CO ₂ inkübatörü (%5 CO ₂)	(RWD, D180)
Buzdolabı (+4 ve -20)	(Beko)
Derin dondurucu (-20)	(Bosch)
Derin dondurucu (-20)	(Arçelik)
Şişe soğutucu dolap (+4)	(Uğur) X 3 adet
Görüntüleme cihazı	(Azure spot C280)
-80 °C dondurucu dolap	(Thermo sci.)
Sıvı azot tankı	(Thermo sci)
Sıvı azot tankı	(IC biomedical)
Vorteks	(Labnet)
Su banyosu	(Memmert)
Soğutmalı mikrosantrifüj (1,5ml'lik)	(Thermo sci.)
Soğutmalı mikrosantrifüj (15ml ve50ml'lik)	(Eppendorf)

Santrifüj	(Beckhman Coulter)
PCR cihazı (Thermo cycler)	(Blue ray biotech, turbo cycler)
Spektrofotometre	(Thermo sci. multiskan go)
Hassas Terazı	(Kern)
Isıtmalı Manyetik Karıştırıcı	(Thermo sci.)
Distile su cihazı	(Thermo sci.)
Buz makinası	(Uğur)
Güç kaynağı	(Cleaver)
pH metre	(İnolab, ph7110)
Şarjlı pipetör	(Thermo sci., isolab)
Thoma lamı	(Marienfeld- C964730)
Vakum cihazı	(Wisd, Wev-003S)
Mikro pipet	(Eppendorf, Gilson, Ohaus, Thermo sci. Biohit)
Multichannel pipet	(Thermo sci., Gilson)
Isıtıcı (1.5 ml'lik tüp için)	(Wisd)

4. BULGULAR

4.1. Farelerin Genotiplenmesi

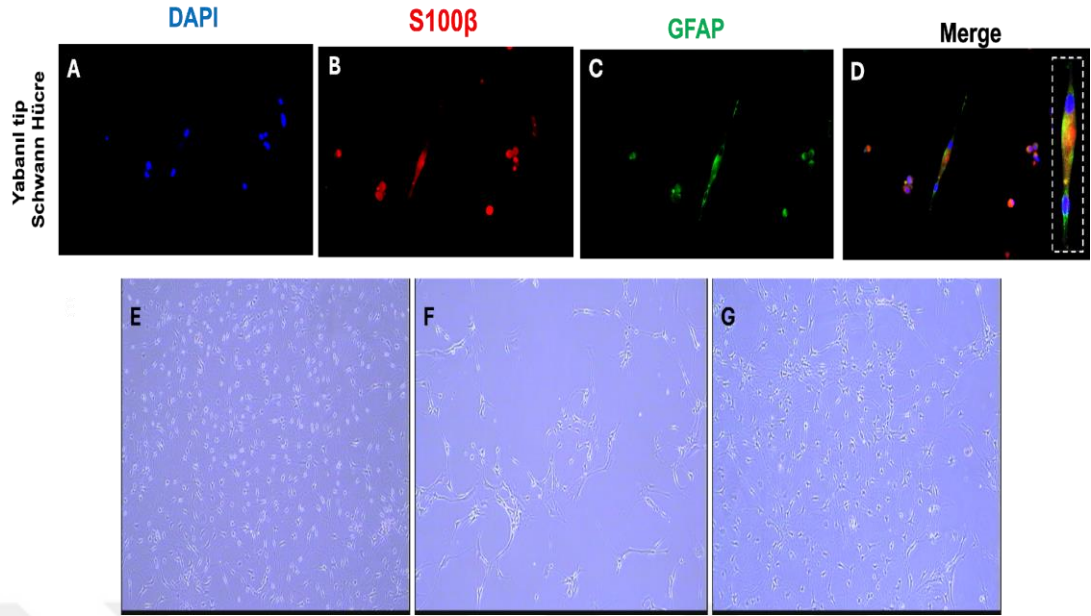
2015'te Kanada'dan getirilen CD200KO fareler çiftleşmeye alındı ve çoğaltıldı. Genotipleme için 5-6 haftalık farelerin kulaklarından alınan dokulardan DNA izolasyonu yapıldı ve PCR yöntemi ile CD200 ekspresyonu analiz edildi. Pozitif kontrol olarak yabancı tip fare kulak dokusu kullanıldı. Sonuç olarak deneylere başlamadan önce ilk olarak çoğaltılan farelerde CD200 geninin var olup olmadığı tespit edildi (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Farelerin CD200KO olduğunu gösteren PCR sonucu. Negatif kontrol; yalnızca PCR ürünlerinin eklendiği DNA'nın bulunmadığı grup. Pozitif kontrol; yabancı tip farelerin kulak dokusundan ekstrakte edilen DNA'yı içeren PCR grubu. 1-10 ; CD200 gen knockout (KO) farelerin kulak dokusundan ekstrakte edilen DNA'yı içeren PCR grupları. Gapdh; house keeping gen.

4.2. Yabancı Tip Schwann Hücrelerin Verifiye Edilmesi

Farelerin genotiplenmesi yapıldıktan sonra bilateral siyatikler çıkarılarak kültürlendi. Hücreler pasaj 2'de % 60-70 yoğunluğa ulaştığında immünfloresan yöntemi ile S100B ve GFAP (Glial fibrillar asidik protein) ekspresyonlarına bakıldı. S100B ve GFAP yaygın olarak kullanılan bir Schwann hücre belirteçleridir. Farklılaşmamış GFAP+ Schwann hücrelerin çoğalma ve göç etme potansiyeline sahip olduğu bilinmektedir. Şekil 4.2'de S100B ve GFAP pozitif Schwann hücre immün floresan boyama mikroskop görüntüleri görülmektedir. Sonuç olarak Schwann hücrelerinde görüldüğü gibi nükleusları ile görüntülenen hücrelerin hemen hepsi S100B'yı eksprese etmekteydi. S100B ile boyanan hücrelerin önemli bir kısmı GFAP ile de boyandı (Merge).

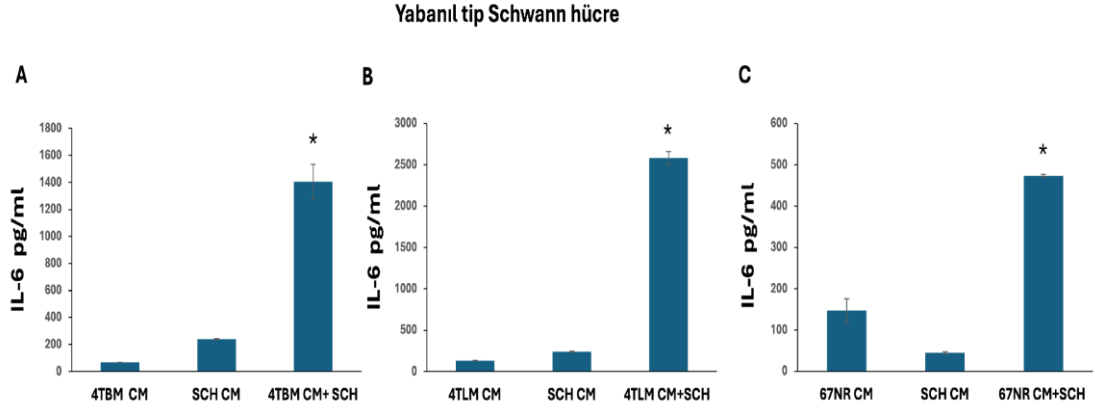


Şekil 4.2. Yabancı tip Schwann hücrelerde S100B ve GFAP düzeylerinin immunoflorasan mikroskopide görüntülenmesi. A) DAPI boyaması ile çekirdeklerin görüntüsü, B) S100B ile boyanan hücreler, C) GFAP ile boyanan hücreler, D) İki görüntünün birleştirilmiş hali. E-G) İmmün floresan boyama öncesi Schwann hücrelerin mikroskop görüntüleri. E) Pasaj; 0-6. gün, F) Pasaj; 1- 4.gün, G) Pasaj; 2-12.gün.

4.3. Yabancı Tip Schwann Hücre Uyarımları ve Sitokin-Kemokin Yanıtları

4.3.1. IL-6 Düzeyindeki Değişiklikler

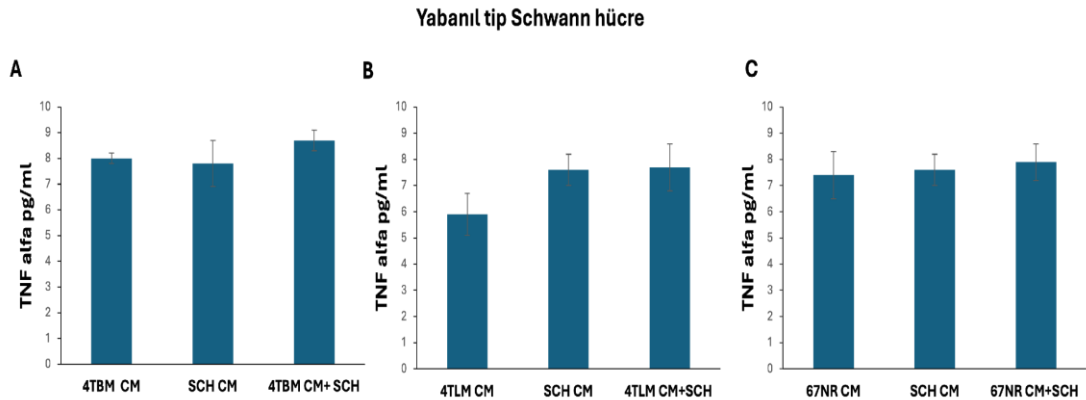
100 mm’lik hücre kültür plakalarında büyütülen yabancı tip Schwann hücrelerin, metastatik meme kanseri hücreleri (4TLM ve 4TBM) ile metastatik olmayan 67NR fare meme kanseri hücre dizisinin IL-6 düzeyleri ELISA yöntemi ile belirlendi. Ayrıca tümör hücrelerinin sekretomları ile uyarılan Schwann hücrelerinin de IL-6 düzeyleri belirlendi. Bu ölçümlerin sonuçları Şekil 4.3’te verilmiştir. Uyarımsız yabancı tip Schwann hücre IL-6 düzeyi 260pg/ml idi. Tümör hücrelerinin CM’leri ile bekletilen Schwann hücrelerin IL-6 sekresyonunun önemli düzeyde arttığı görüldü. Bu artış özellikle 4TLM hücrelerinin uyardığı artış ile daha fazla ölçüldü. (4TLM ile yaklaşık 2500 pg/ml düzey elde edilirken 67NR ile uyarılan düzey yaklaşık 500 pg/ml ölçüldü). **Tümör CM’lerinden gelen değerler çıkarıldığında 4TLM CM ile uyarım 9.4 kat, 4TBM CM ile uyarım 5.3 kat 67NR CM ile uyarım ise 1.8 kat yabancı tip Schwann hücre IL-6 sekresyonunu arttırdı.** Primer kültürden elde edilen 4TBM, 4TLM ve 67NR hücrelerinin de IL-6 sekrete ettiği ayrıca görülmektedir. Ortalama beş pasajdan sonra yapılan ölçümlerde ise bu hücrelerin CM’lerinde ölçülebilir düzeyde IL-6 bulunamadı. Bu sonuçlar primer tümörlerden elde edilen hücrelerle erken pasajlarda çalışmanın önemini göstermektedir.



Şekil 4.3. Kanser hücrelerinin ‘Conditioned Medium’ (CM)’leri ile karşılaştırılan Schwann hücre IL-6 sekresyonu. Uyarımda kullanılan CM’lerdeki ve CM uygulanmayan Schwann hücrelerinden sekrete edilen IL-6 düzeyi de görülmektedir. (A; 4TBM CM, B; 4TLM CM ve C; 67NR CM, SCH CM (Kontrol Schwann hücre CM)), * $p < 0,05$ kontrol Schwann hücrelerine göre anlamlılığı göstermektedir.

4.3.2. TNF-alfa Düzeyindeki Değişiklikler

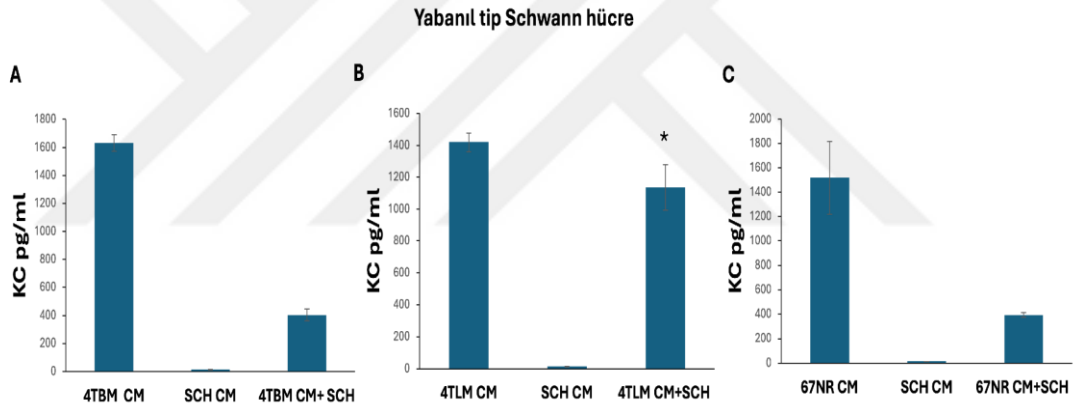
100 mm’lik hücre kültür plakalarında büyütülen yabanıl tip Schwann hücrelerin, metastatik meme kanseri hücreleri (4TLM ve 4TBM) ile metastatik olmayan 67NR fare meme kanseri hücre dizisinin TNF-alfa düzeyleri ELISA yöntemi ile belirlendi. Ayrıca tümör hücrelerinin sekretomları ile uyarılan Schwann hücrelerinin CM’lerinde da TNF-alfa düzeyleri belirlendi. Bu ölçümlerin sonuçları Şekil 4.4’te verilmiştir. Sonuçlara göre tümör hücrelerinde ve yabanıl tip Schwann hücrelerde TNF-alfa ölçümleri en düşük standart düzeyinin altında kaldı, çok düşük ölçüldü.



Şekil 4.4. Kanser hücrelerinin ‘Conditioned Medium’ (CM)’leri ile karşılaşan Schwann hücrelerinden TNF-alfa sekresyonu. Uyarımda kullanılan CM’lerdeki ve CM uygulanmayan Schwann hücrelerinden sekrete edilen IL-6 düzeyi görülmektedir. (A; 4TBM CM, B; 4TLM CM ve C; 67NR CM, SCH CM (Kontrol Schwann hücre CM)), * $p < 0,05$ kontrol Schwann hücrelerine göre anlamlılığı göstermektedir

4.3.3. KC Düzeyindeki Değişiklikler

100 mm'lik kültür plakalarında büyütülen yabancı tip Schwann hücrelerin uyarımsız bazal KC düzeyleri ile tümör hücrelerinin KC düzeyleri ELISA yöntemi ile ölçüldü. Ayrıca tümör hücre sekretomları ile uyarılan yabancı tip Schwann hücrelerin KC düzeyleri de belirlendi. Sonuçlar Şekil 4.5'te görülmektedir. Yabancı tip Schwann hücrelerde uyarımsız bazal KC sekresyon düzeyi ort. 75 pg/ml (SCH CM) bulundu. 4TBM CM' de 1600pg/ml (%30 değeri 480pg/ml), 4TLM CM ve 67NR CM' de ise yaklaşık 1400 pg/ml (%30 değeri 420pg/ml) KC düzeyi ölçüldü. Yabancı tip Schwann hücreler tümör 4TLM CM'leri ile uyarıldığında ise KC anlamlı olarak arttı (CM+ SCH; 1100pg/ml). 4TLM CM'den gelen değerin %30'u çıkarıldığında yaklaşık 9 kat artış söz konusudur. 4TBM CM ve 67NR CM ile uyarımda yabancı tip Schwann hücre KC sekresyon düzeyi değişmedi, 400 pg/ml ölçüldü. Bu miktarın uyarımda kullanılan CM'den geldiği düşünülmektedir (Şekil 4.5).

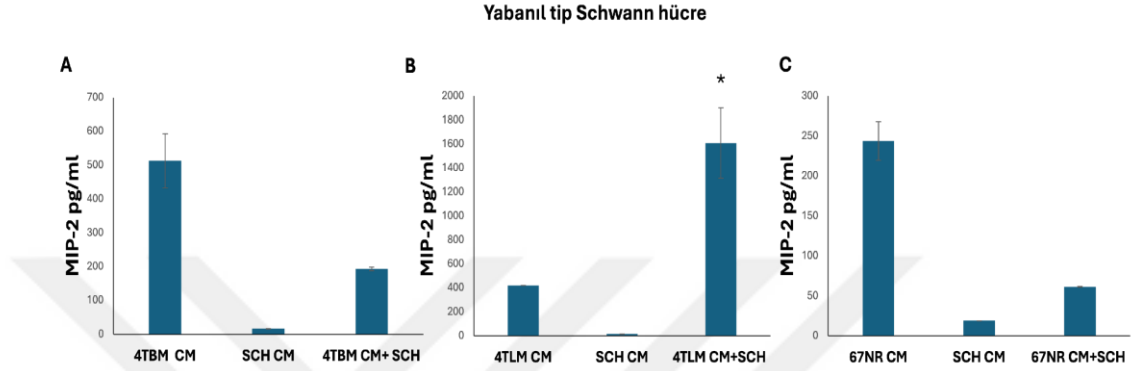


Şekil 4.5. Kanser hücrelerinin 'Conditioned Medium' (CM)'leri ile karşılaşan Schwann hücrelerinden KC sekresyonu. Uyarımda kullanılan CM'lerdeki ve CM uygulanmayan Schwann hücrelerinden sekrete edilen IL-6 düzeyi görülmektedir. (A; 4TBM CM, B; 4TLM CM ve C; 67NR CM, SCH CM (Kontrol Schwann hücre CM)), * $p < 0,05$ kontrol Schwann hücrelerine göre anlamlılığı göstermektedir.

4.3.4. MIP-2 Düzeyindeki Değişiklikler

100 mm'lik kültür plakalarında büyütülen yabancı tip Schwann hücrelerin uyarımsız bazal MIP-2 düzeyleri ile tümör hücrelerinin MIP-2 düzeyleri ELISA yöntemi ile ölçüldü. Ayrıca tümör hücre sekretomları ile uyarılan yabancı tip Schwann hücrelerin MIP-2 düzeyleri de belirlendi. Sonuçlar Şekil 4.6'da görülmektedir. Kullandığımız tümör hücrelerin CM'lerinde yaklaşık 200-500 pg/ml MIP-2 düzeyi olduğu belirlendi. 67NR hücreleri çok daha az MIP-2 sekrete etmektedir. Schwann hücrelerde ise minimal düzeyde MIP-2 sekresyonu belirlendi (20 pg/ml). **Özellikle 4TLM**

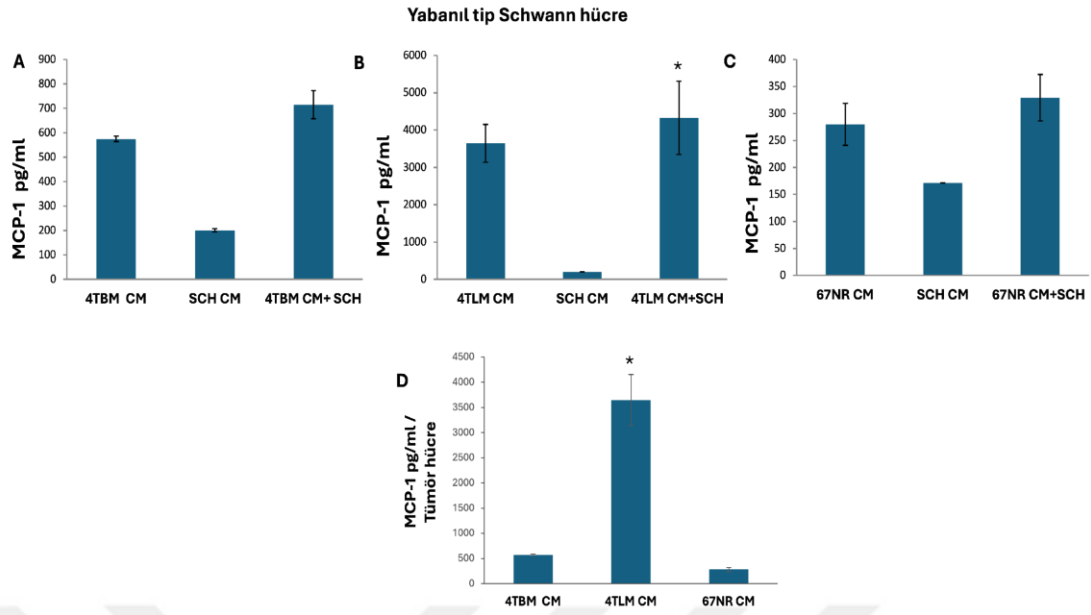
eksozomları ile uyarılan Schwann hücrelerde MIP-2 sekresyonunda 68,5 kat artış gözlemlendi (yaklaşık 1400 pg/ml) (Şekil 4.6, Panel B). 4TBM CM ile karşılaşan Schwann hücrelerinde ise MIP-2 sekresyonu 200 pg/ml, 67NR CM ile karşılaşan Schwann hücrede 50pg/ml civarında ölçüldü, bu düzeyler CM'den gelen miktarlara yakın düzeydedir. (Şekil 4.6, A ve C).



Şekil 4.6. Kanser hücrelerinin ‘Conditioned Medium’ (CM)’leri ile karşılaşan Schwann hücrelerinden MIP-2 sekresyonu. Uyarımda kullanılan CM’lerdeki ve CM uygulanmayan Schwann hücrelerinden sekrete edilen MIP-2 düzeyi görülmektedir. (A; 4TBM CM, B; 4TLM CM ve C; 67NR CM, SCH CM (Kontrol Schwann hücre CM)), *p<0,05 kontrol Schwann hücrelerine göre anlamlılığı göstermektedir.

4.3.5. MCP-1 Düzeyindeki Değişiklikler

100 mm’lik kültür plakalarında büyütülen yabancı tip Schwann hücrelerin uyarımsız bazal MCP-1 düzeyleri ile tümör hücrelerinin MCP-1 düzeyleri ELISA yöntemi ile ölçüldü. Ayrıca tümör hücre sekretomları ile karşılaştırılan yabancı tip Schwann hücrelerin MCP-1 düzeyleri de belirlendi. Sonuçlar Şekil 4.7’de görülmektedir. Kullandığımız primer tümör hücrelerinde; 4TBM CM’de 500 pg/ml, 67NR CM’de 250 pg/ml ölçülürken; **en agresif fenotipli 4TLM hücresinin CM’unda ise 3500 pg/ml MCP-1 ölçüldü.** Yabancı tip Schwann hücrelerde ise MCP-1 düzeyi ortalama 150 pg/ml ölçüldü. Tümör hücre sekretomları ile uyarıldığında ise yabancı tip Schwann hücre MCP-1 düzeyi uyarımda kullanılan 4TBM ve 67NR CM’lerde ölçülen düzeylere çok yakın bulundu. Ancak 4TLM CM’de 3500 pg/ml MCP-1 düzeyinden gelen değerin %30’u 1050 pg/ml’dir. 4TLM CM ile uyarılan Schwann hücre MCP-1 düzeyi de yaklaşık 3500pg/ml olarak ölçüldü. Dolayısıyla 4TLM CM ile uyarıldığında yabancı tip Schwann hücre MCP-1 düzeyi yaklaşık 16 kat arttı (Şekil 4.7, B).

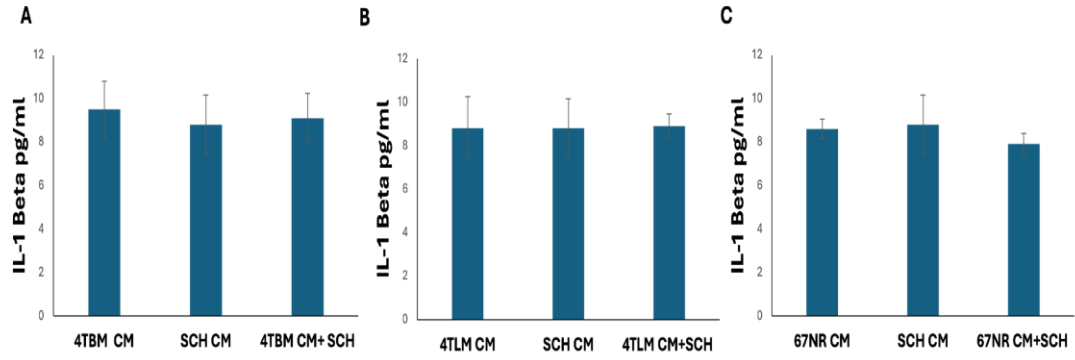


Şekil 4.7. Kanser hücrelerinin ‘Conditioned Medium’ (CM)’leri ile karşılaşan Schwann hücrelerinden MCP-1 sekresyonu. Uyarımda kullanılan CM’lerdeki ve CM uygulanmayan Schwann hücrelerinden sekrete edilen MCP-1 düzeyi de görülmektedir. (A; 4TBM CM, B; 4TLM CM ve C; 67NR CM, SCH CM (Kontrol Schwann hücre CM)), * $p < 0,05$ kontrol Schwann hücrelerine göre anlamlılığı göstermektedir.

4.3.6. IL-1 Beta Düzeyindeki Değişiklikler

100 mm’lik hücre kültür plakalarında büyütülen yabancı tip Schwann hücrelerin, metastatik meme kanseri hücreleri (4TLM ve 4TBM) ile metastatik olmayan 67NR fare meme kanseri hücre dizisinin IL-1 beta düzeyleri ELISA yöntemi ile belirlendi. Ayrıca tümör hücrelerinin sekretomları ile karşılaşan Schwann hücrelerinin IL-1 beta düzeyleri de belirlendi. Bu ölçümlerin sonuçları Şekil 4.8’de verilmiştir. Sonuçlara göre tümör hücrelerinde ve yabancı tip Schwann hücrelerde IL-1 beta ölçümleri en düşük standart düzeyinin altında kaldı, çok düşük ölçüldü.

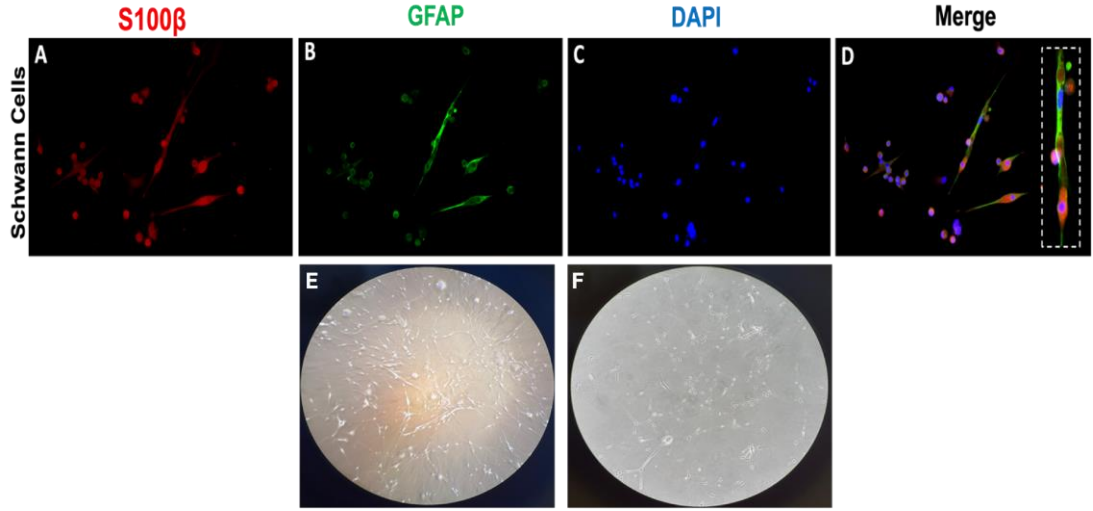
Yabanıl tip Schwann hücre



Şekil 4.8. Kanser hücrelerinin ‘Conditioned Medium’ (CM)’leri ile karşılaşan Schwann hücrelerinden IL-1 beta sekresyonu. Uyarımda kullanılan CM’lerdeki ve CM uygulanmayan Schwann hücrelerinden sekrete edilen IL-1 beta düzeyi de görülmektedir. (A; 4TBM CM, B; 4TLM CM ve C; 67NR CM, SCH CM (Kontrol Schwann hücre CM)), * $p < 0,05$ kontrol Schwann hücrelerine göre anlamlılığı göstermektedir.

4.4. CD200KO Schwann Hücrelerin Verifiye Edilmesi

Yabanıl tip Schwann hücrelerde olduğu gibi CD200KO farelerin genotiplemesi yapıldıktan sonra bilateral siyatikler çıkarılarak kültürlendi. Hücreler pasaj 2’de % 60 yoğunluğa ulaştığında immunfloresan yöntemi ile S100B ve GFAP ekspresyonlarına bakıldı. Şekil 4.9’da S100B ve GFAP pozitif schwann hücre immün floresan boyama mikroskop görüntüleri görülmektedir. Nükleusları ile görüntülenen hücrelerin hemen hepsinin S100B’yı eksprese ettiği görüntülendi. S100B ile boyanan hücrelerin ise önemli bir kısmı GFAP ile de pozitif olarak boyandı.



Şekil 4.9. CD200KO Schwann hücrelerde S100B ve GFAP düzeylerinin immunofloresan mikroskopide görüntülenmesi. A) S100B ile boyanan hücreler, B) GFAP ile boyanan hücreler, C) DAPI boyaması ile çekirdeklerin görüntüsü D) İki görüntünün birleştirilmiş hali. E-F) İmmün floresan boyama öncesi CD200KO Schwann hücrelerin mikroskop görüntüleri.

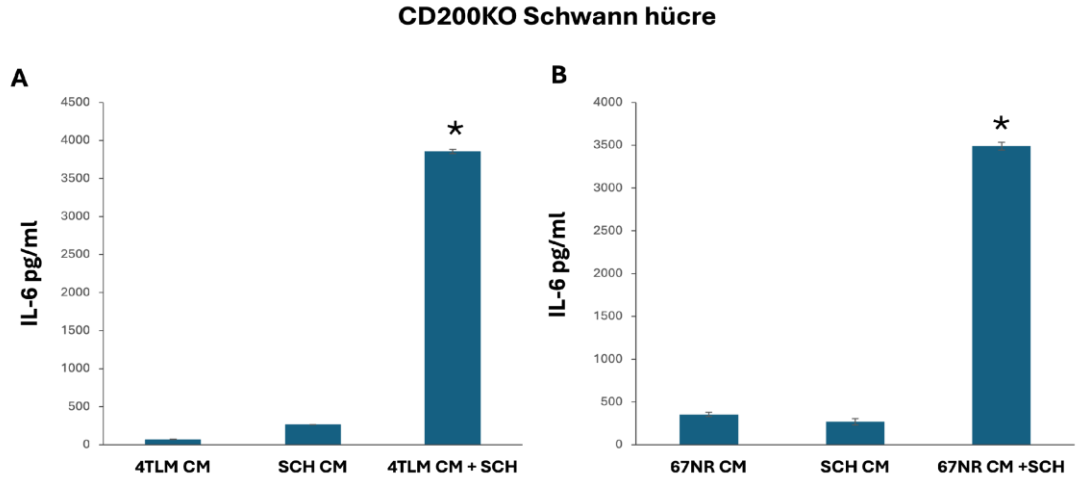
4.5. CD200KO Schwann Hücre Uyarımları ; Sitokin-Kemokin Yanıtları

4.5.1. IL-6 Düzeyindeki Değişiklikler

CD200KO Schwann hücrelerin, metastatik meme kanseri hücre dizisi 4TLM ile metastatik olmayan 67NR fare meme kanseri hücre dizisinin IL-6 düzeyleri ELISA yöntemi ile belirlendi. Ayrıca tümör hücrelerinin sekretomları ile uyarılan CD200KO Schwann hücrelerinin IL-6 düzeyleri de ölçüldü. Bu ölçümlerin sonuçları Şekil 4.10'da verilmiştir.

CD200KO Schwann hücreleri uyarımsız IL-6 sekresyon düzeyi 260pg/ml idi (SCH CM), tümör CM'leri ile uyarıldığında çok yüksek düzeyde IL-6 sekrete etti (4TLM CM ile uyarımda yaklaşık 3800 pg/ml, 67NR CM ile uyarım ile 3000pg/ml). Tümör CM'lerinden gelen değerler çıkarıldığında bu artış 4TLM CM ile uyarımla 14.5 kat, 67NR CM ile uyarımla 11 kat fazla bulundu.

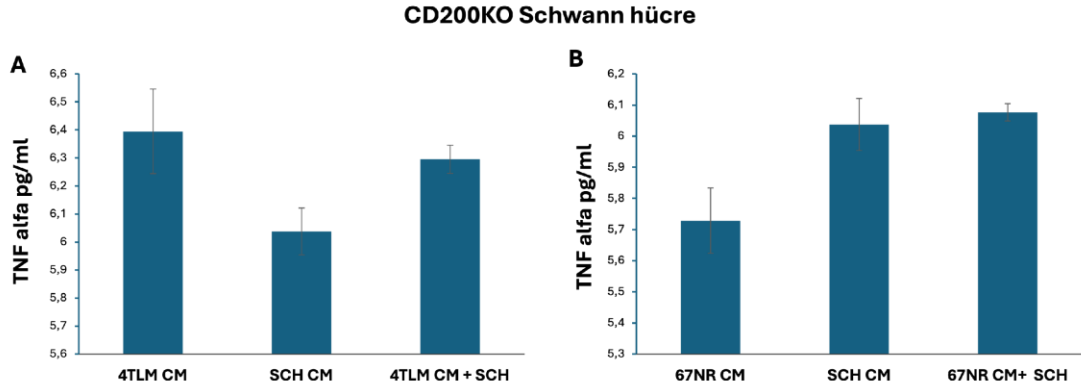
Yabani tip Schwann hücrelerde uyarıma bağlı IL-6 artışı 4TLM CM ile yaklaşık 2500 pg/ml iken 67NR ile uyarılan düzey daha sınırlı bulundu; yaklaşık 500 pg/ml ölçüldü. **Tümör CM'leri ile uyarıldığında CD200KO Schwann hücreler ile yabani tip Schwann hücrelere göre belirgin şekilde daha fazla IL-6 sekrete etti ;** 67NR CM uyarımı 6 kat daha fazla idi (Şekil 4.3 ve Şekil 4.10).



Şekil 4.10. Kanser hücrelerinin ‘Conditioned Medium’ (CM)’leri ile karşılaşan CD200KO Schwann hücrelerinden IL-6 sekresyonu. Uyarımda kullanılan CM’lerdeki ve CM uygulanmayan Schwann hücrelerinden sekrete edilen IL-1 beta düzeyi görülmektedir. (A; 4TLM CM ve B; 67NR CM, SCH CM (Uyarımsız CD200KO Schwann hücre CM)), * $p < 0,05$ uyarımsız CD200KO Schwann hücrelerine göre anlamlılığı göstermektedir.

4.5.2. TNF-alfa Düzeyindeki Değişiklikler

CD200KO Schwann hücrelerin, metastatik meme kanseri hücreleri 4TLM ile metastatik olmayan 67NR fare meme kanseri hücre dizisinin TNF-alfa düzeyleri ELISA yöntemi ile belirlendi. Ayrıca tümör hücrelerinin sekretomları ile karşılaştırılan CD200KO Schwann hücrelerinin TNF-alfa düzeyleri belirlendi. Bu ölçümlerin sonuçları Şekil ‘ de verilmiştir. Sonuçlara göre tümör hücrelerinde ve yabancı tip Schwann hücrelerde TNF-alfa ölçümleri çok düşük ölçüldü ve sonuçlar en düşük standart düzeyinin altında kaldı. Dolayısıyla karşılaştırma açısından TNF-alfa ölçümleri güvenilir değildir.

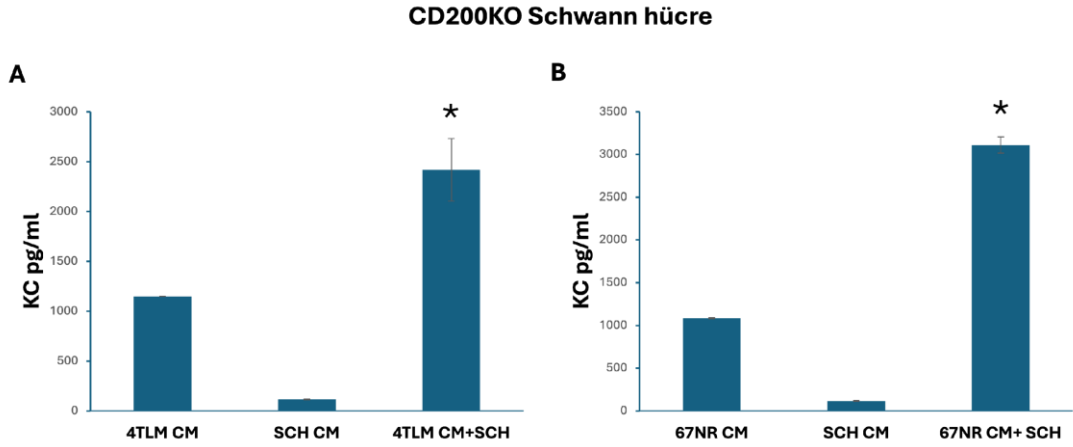


Şekil 4.11. Kanser hücrelerinin ‘Conditioned Medium’ (CM)’leri ile karşılaşan CD200KO Schwann hücrelerinden TNF-alfa sekresyonu. Uyarımda kullanılan CM’lerdeki ve CM uygulanmayan Schwann hücrelerinden sekrete edilen TNF-alfa düzeyi görülmektedir. (A; 4TLM CM ve B; 67NR CM, SCH CM (Uyarımsız CD200KO Schwann hücre CM)), * $p < 0,05$ uyarımsız CD200KO Schwann hücrelerine göre anlamlılığı göstermektedir.

4.5.3. KC Düzeyindeki Değişiklikler

CD200KO Schwann hücrelerin uyarımsız bazal KC düzeyleri ile tümör hücrelerinin KC düzeyleri ELISA yöntemi ile ölçüldü. Ayrıca tümör hücre sekretomları ile karşılaştırılan CD200KO Schwann hücrelerin KC düzeyleri de belirlendi. Sonuçlar Şekil 4.12’de görülmektedir.

CD200KO Schwann hücrelerinde uyarımsız bazal KC düzeyi düşüktür (110 pg/ml; SCH CM). CD200KO Schwann hücreler, tümör CM’leri ile uyarıldığında ise KC anlamlı olarak arttı (CM+ SCH). Bu artış 4TLM CM ile 2400 pg/ml ve 67NR CM ile uyarımda 3100 pg/ml ölçüldü. **Tümör CM’leri ile uyarımda CD200KO Schwann hücreleri yabancı tip Schwann hücrelere göre belirgin şekilde daha fazla KC sekrete etti.** 67NR CM ile uyarıldığında CD200KO Schwann hücreler 24.5 kat fazla, 4TLM CM ile uyarıldığında 18.5 kat daha fazla KC sekrete etti. Yabancı tip Schwann hücre KC sekresyonundaki artış ; 67NR CM ile uyarımda değişmedi, 4TLM CM ile uyarımda ise 9 kat arttı (Şekil 4.5 ve 4.12).

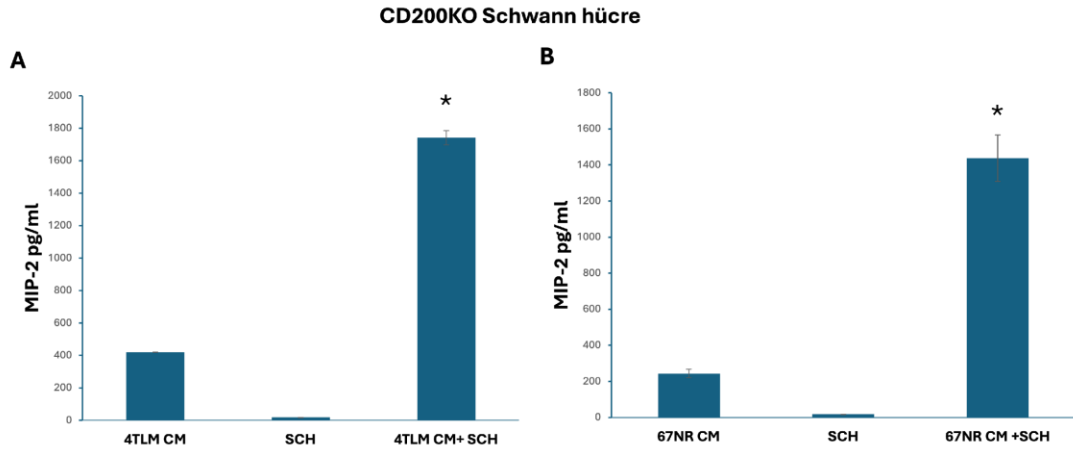


Şekil 4.12. Kanser hücrelerinin ‘Conditioned Medium’ (CM)’leri ile karşılaşan CD200KO Schwann hücrelerinden KC sekresyonu. Uyarımda kullanılan CM’lerdeki ve CM uygulanmayan Schwann hücrelerinden sekrete edilen KC düzeyi görülmektedir. (A; 4TLM CM ve B; 67NR CM, SCH CM (Uyarımsız CD200KO Schwann hücre CM)), * $p < 0,05$ uyarımsız CD200KO Schwann hücrelerine göre anlamlılığı göstermektedir.

4.5.4. MIP-2 Düzeyindeki Değişiklikler

CD200KO Schwann hücrelerin uyarımsız MIP-2 düzeyleri ile tümör hücrelerinin MIP-2 düzeyleri ELISA yöntemi ile ölçüldü. Ayrıca tümör hücre sekretomları ile karşılaştırılan CD200KO Schwann hücrelerin (uyarımlı) MIP-2 düzeyleri de belirlendi. Sonuçlar Şekil 4.13’te görülmektedir.

CD200KO Schwann hücrelerde MIP-2 düzeyi yabanıl tip Schwann hücrelerde olduğu gibi çok düşük ölçüldü (20 pg/ml). Sonuçlar 4TLM CM ve 67NR CM uyarımı ile CD200KO Schwann hücre MIP-2 sekresyonunun belirgin şekilde arttığını göstermektedir. CM’den gelen miktarlar çıkarıldığında bu artış yaklaşık 1500 pg/ml olarak ölçüldü. **CD200KO ve yabanıl tip Schwann hücrelerde 4TLM CM uyarımı ile MIP-2 artışı yakın düzeyde bulundu (1370-1580 pg/ml). Ancak 67NR CM uyarımı ile yabanıl tip Schwann hücre MIP-2 sekresyonu değişmezken; CD200KO Schwann hücre MIP-2 sekresyonu 70 kat arttı (Şekil 4.6 ve 4.13).**



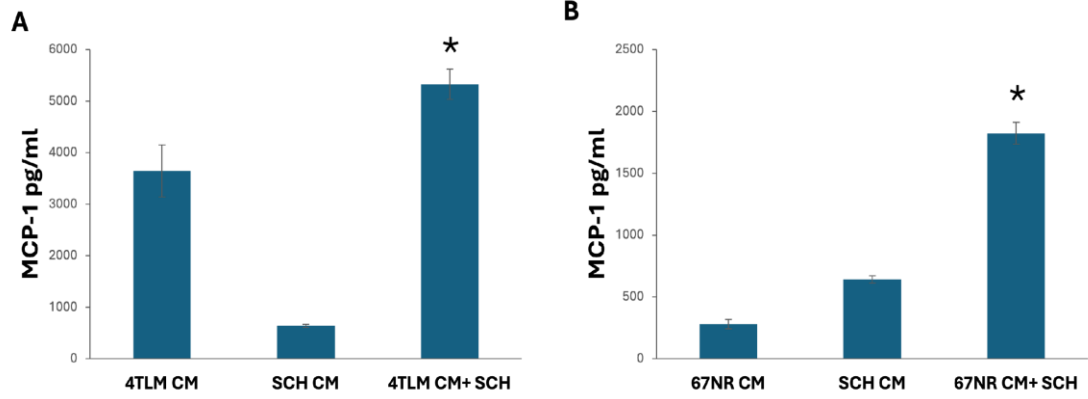
Şekil 4.13. Kanser hücrelerinin ‘Conditioned Medium’ (CM)’leri ile karşılaşan CD200KO Schwann hücre MIP-2 sekresyonu. Uyarımda kullanılan CM’lerdeki ve CM uygulanmayan Schwann hücrelerinden sekrete edilen MIP-2 düzeyi görülmektedir. (A; 4TLM CM ve B; 67NR CM, SCH CM (Uyarımsız CD200KO Schwann hücre CM)), * $p < 0,05$ uyarımsız CD200KO Schwann hücrelerine göre anlamlılığı göstermektedir.

4.5.5. MCP-1 Düzeyindeki Değişiklikler

MCP-1’in özellikle agresif metastatik 4TLM hücrelerinde çok yüksek düzeyde sekrete edildiğini gözlemledik (yaklaşık 3700 pg/ml). Metastaz yapmayan 67NR tümör hücrelerinde ise MCP-1 ölçümü ortalama 280pg/ml olarak bulundu. Uyarılmamış CD200KO Schwann hücreler (SCH CM) ortalama 600pg/ml MCP-1 sekrete ederken 4TLM-CM ile uyarıldığında yaklaşık 5350 pg/ml, 67NR CM ile uyarıldığında ise yaklaşık 1800pg/ml’ye yükseldiği görülmektedir (Şekil 4.14). Tümörden gelen miktar çıkarıldığında uyarıma bağlı CD200KO Schwann hücre MCP-1 sekresyonunun 4TLM CM ile 7 kat, 67NR CM ile 2.8 kat arttığı görüldü. (Şekil 4.14)

CD200KO Schwann hücre bazal **MCP-1 düzeyinin yabancı tip Schwann hücrelere göre 4 kat daha fazla olduğu görüldü.** (600 pg/ml ve 150 pg/ml). 4TBM ve 67NR tümör hücre sekretomları ile uyarıldığında yabancı tip Schwann hücre MCP-1 düzeyi uyarımda kullanılan CM’lerde ölçülen düzeylere çok yakın bulundu yani değişmedi. 4TLM CM ile uyarıldığında ise yabancı tip Schwann hücre MCP-1 düzeyi 16 kat arttı (Şekil 4.7 ve 4.14).

CD200KO Schwann hücre



Şekil 4.14. Kanser hücrelerinin ‘Conditioned Medium’ (CM)’leri ile karşılaşan CD200KO Schwann hücrelerinden MCP-1 sekresyonu. Uyarımda kullanılan CM’lerdeki ve CM uygulanmayan Schwann hücrelerinden sekrete edilen MCP-1 düzeyi görülmektedir. (A; 4TLM CM ve B; 67NR CM, SCH CM (Uyarımsız CD200KO Schwann hücre CM)), * $p < 0,05$ uyarımsız CD200KO Schwann hücrelerine göre anlamlılığı göstermektedir.

Sitokinler		IL-6	MIP-2	KC	MCP-1
Uyarım grupları					
SCH CM	CD200+	239 pg/ml	20 pg/ml	75 pg/ml	150 pg/ml
	CD200-	266 pg/ml	20 pg/ml	110 pg/ml	600 pg/ml
4TBM CM+	CD200+	5.7 ↑	∅	∅	∅
	CD200-	-	-	-	-
4TLM CM+	CD200+	10.2 ↑	68,5 ↑	9 ↑	16 ↑
	CD200-	14.5 ↑	79 ↑	18.5 ↑	7 ↑
67NR CM +	CD200+	1.8 ↑	∅	∅	∅
	CD200-	11 ↑	70 ↑	24.5 ↑	2.8 ↑

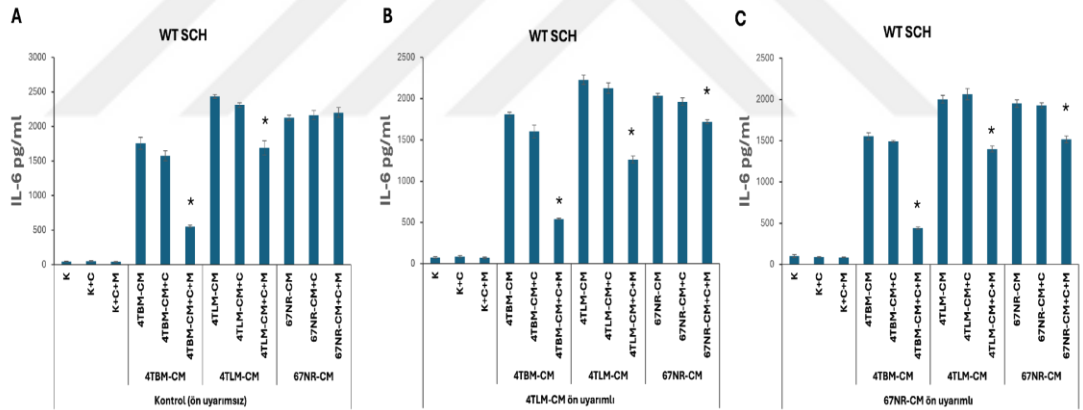
Tablo 4.1. CD200KO (CD200-) ve yabancı tip (CD200+) Schwann hücre sitokin-kemokin yanıtlarının karşılaştırılması. Tablo ortalamayı en iyi yansıtan deney sonuçları seçilerek oluşturulmuştur. SCH CM; uyarımsız schwann hücre bazal sitokin ve kemokin düzeylerini ifade etmektedir. 4TBM CM+ ; 4TBM CM ile uyarılan gruplar, 4TLM CM+ ; 4TLM CM ile uyarılan gruplar, 67NR CM+ ; 67NR CM ile uyarılan gruplardır. Kırmızı oklar; en fazla artışın olduğu grupları göstermektedir.

4.6. Minosiklin ve CD200fc'nin Yabani tip Schwann Hücre Yanıtları Üzerine Etkilerinin Araştırılması

4.6.1. Yabani Tip Schwann Hücre IL-6 salınımindaki Değişiklikler; CD200fc, ve Minosiklinin Etkileri

Tümör CM'leri ile ön uyarım yapılan (4TLM CM ve 67NR CM) ve ön uyarım yapılmayan (Kontrol) yabani tip Schwann hücreler 48 kuyucuklu hücre kültür plakalarına ekildi. Uyarımlar tekrarlandı ve 0,4 µg/ml CD200fc ve 40 µM Minosiklin uygulandı. ELISA ile IL-6 yanıtları değerlendirildi. Sonuçlar Şekil 4.15'te görülmektedir.

Tümör CM'leri ile uyarıldığında yabani tip Schwann hücrelerde beklenildiği gibi IL-6 sekresyonu artmıştır ve bu artış CD200fc tek başına uygulandığında değişmezken, Minosiklin ile birlikte kullanıldığında anlamlı olarak azalmıştır. 67NR CM uyarımlı grupta 4TLM-CM ve 4TBM-CM uyarımlı gruba göre bu azalma daha sınırlıdır (Şekil 4.15).



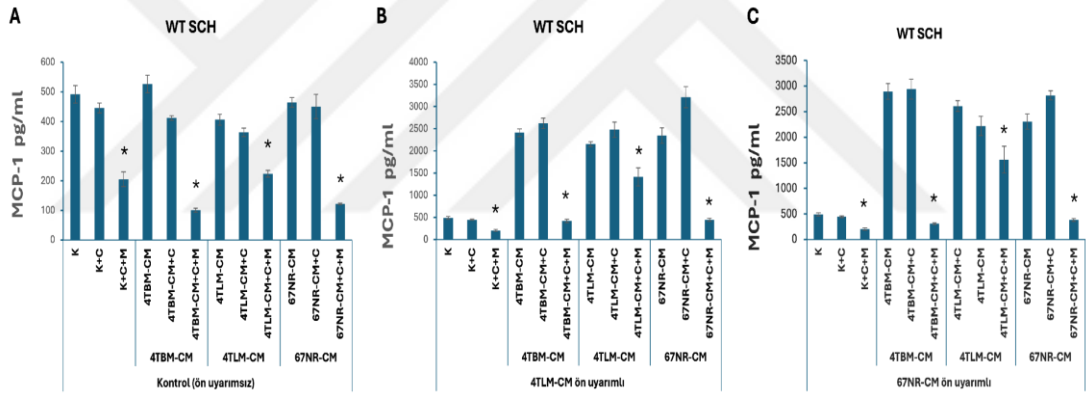
Şekil 4.15. Yabani tip Schwann hücre IL-6 sekresyonu üzerine CD200fc, minosiklin ve tümör hücre uyarımlarının etkilerini gösteren grafikler. A; Daha önce uyarılmamış ve 4TBM-CM ile uyarılmış Schwann hücreleri; B; Daha önce uyarılmamış ve 4TLM-CM ile uyarılmış Schwann hücreleri; C; Daha önce uyarılmamış ve 67NR-CM ile uyarılmış Schwann hücreleri. 67NR-CM-67NR hücrelerinin CM'leri ile tedavi; 4TBM-CM- 4TBM hücrelerinin CM'leri ile tedavi; 4TLM-CM- 4TLM hücrelerinin CM'leri ile tedavi; K; Kontrol, C; CD200fc ile tedavi, M; Minosiklin ile tedavi, WT sch ; Wild type; yabani tip Schwann hücre.

4.6.2. Yabani Tip Schwann Hücre MCP-1 Salınımindaki Değişiklikler; CD200fc, ve Minosiklinin Etkileri

Tümör CM'leri ile ön uyarım yapılan (4TLM CM ve 67NR CM uyarımlı) ve ön uyarım yapılmayan yabani tip Schwann hücreler (Kontrol) 48 kuyucuklu hücre kültür plakalarına ekildi. Uyarımlar tekrarlandı ve 0,4 µg/ml CD200fc ve 40 µM Minosiklin

uygulandı. ELISA ile MCP-1 yanıtları değerlendirildi. Sonuçlar Şekil 4.16’da görülmektedir.

MCP-1 tümör hücre CM’leri ile 2. kez uyarıldığında yabancı tip Schwann hücrelerde arttı. Ön uyarımsız (kontrol) yabancı tip Schwann hücre grubu tümör CM’leri ile uyarıldığında yaklaşık 500 pg/ml MCP-1 düzeyi ölçüldü ve kanser hücrelerinin CM’leri bu düzeyi daha fazla arttırmadı (bu sonuç 100mm’lik hücre kültür plakalarında yapılan ve önceki bölümde verilen sonuçlar ile tutarlıdır). Diğer taraftan ön uyarımlı gruplar 48 kuyucuklu hücre kültür plakalarında tekrar uyarıldığında (2. uyarım) MCP-1 2500-3000 pg/ml düzeyine ulaştı. 0,4 µg/ml CD200fc ve 40 µM Minosiklinin birlikte uygulandığı tüm gruplarda MCP-1’deki artış belirgin şekilde baskılandı (Şekil 4.16). Bu baskılanma 4TLM CM ile uyarılan gruplarda daha düşük ölçüldü (Şekil 4.16).



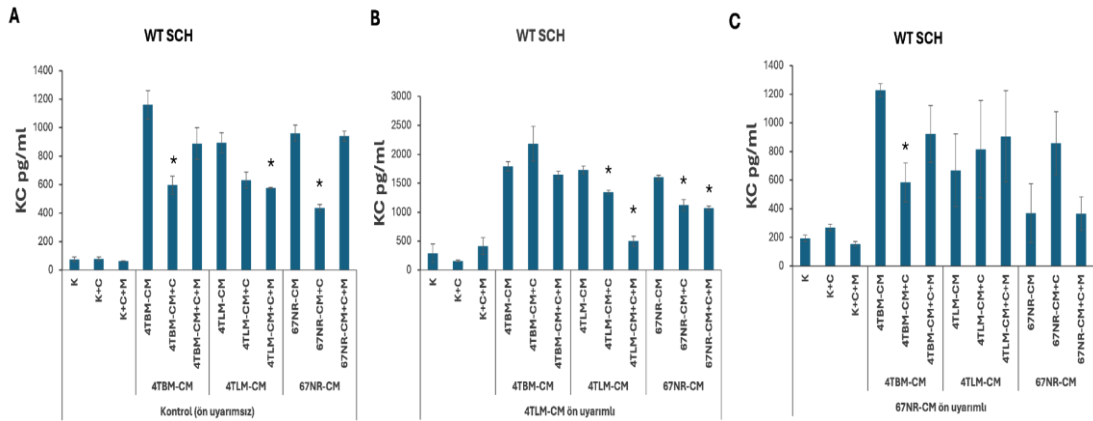
Şekil 4.16. Yabancı tip Schwann hücre MCP-1 sekresyonu üzerine CD200fc, minosiklin ve tümör hücre uyarımlarının etkilerini gösteren grafikler. A; Daha önce uyarılmamış ve 4TBM-CM ile uyarılmış Schwann hücreleri; B; Daha önce uyarılmamış ve 4TLM-CM ile uyarılmış Schwann hücreleri; C; Daha önce uyarılmamış ve 67NR-CM ile uyarılmış Schwann hücreleri. 67NR-CM-67NR hücrelerinin CM’leri ile tedavi; 4TBM-CM- 4TBM hücrelerinin CM’leri ile tedavi; 4TLM-CM- 4TBM hücrelerinin CM’leri ile tedavi; K; Kontrol, C; CD200fc ile tedavi, M; Minosiklin ile tedavi, WT sch ; yabancı tip Schwann hücre.

4.6.3. Yabani Tip Schwann Hücre KC Salınımındaki Değişiklikler; CD200fc, ve Minosiklinin Etkileri

Tümör CM'leri ile ön uyarım yapılan (4TLM CM ve 67NR CM uyarımlı) ve ön uyarım yapılmayan (Kontrol) yabani tip Schwann hücreler 48 kuyucuklu hücre kültür plakalarına ekildi. Uyarımlar tekrarlandı ve 0,4 µg/ml CD200fc ve 40 µM Minosiklin uygulandı. ELISA ile KC yanıtları değerlendirildi. Sonuçlar Şekil 4.17'de görülmektedir.

Yabani tip Schwann hücrelerinde uyarımsız bazal KC sekresyon düzeyi ort. 75 pg/ml düzeyinde bulundu (Şeki 4.17). **Yabani tip Schwann hücreleri tümör CM'leri ile ilk kez uyarıldığında 1000 pg/ml'nin üzerinde bir artış gözlemlendi (Şekil 4.17, A).**

Yabani tip Schwann hücrelerde, tümör CM'leri uyarımıyla artan KC sekresyonu, ön uyarımsız grupta CD200fc ile azaldı. 4TLM CM ile uyarımda ayrıca minosiklin ile CD200fc birlikte kullanıldığında anlamlı olarak azaldığı görüldü (Şekil 4.17, A). 4TLM CM ile ön uyarımlı grup tekrar uyarıldığında (4TLM CM ve 67NR CM) ise minosiklin KC sekresyonundaki artışı baskıladı. Öte yandan 67NR CM ön uyarımlı grupta tekrar uyarımla KC sekresyonunda artış görüldü, 4TBM CM ile artan KC sekresyonu CD200fc ile anlamlı olarak azalırken minosiklinle birlikte uygulandığında anlamlı azalma görülmedi (Şekil 4.17, B ve C).



Şekil 4.17. Yabani tip Schwann hücre KC sekresyonu üzerine CD200fc, minosiklin ve tümör hücre uyarımlarının etkilerini gösteren grafikler. A; Daha önce uyarılmamış ve 4TBM-CM ile uyarılmış Schwann hücreleri; B; Daha önce uyarılmamış ve 4TLM-CM ile uyarılmış Schwann hücreleri; C; Daha önce uyarılmamış ve 67NR-CM ile uyarılmış Schwann hücreleri. 67NR-CM-67NR hücrelerinin CM'leri ile tedavi; 4TBM-CM- 4TBM hücrelerinin CM'leri ile tedavi; 4TLM-CM- 4TLM hücrelerinin CM'leri ile tedavi; K; Kontrol, C; CD200fc ile tedavi, M; Minosiklin ile tedavi, WT sch ; yabani tip Schwann hücre.

4.7. Minosiklin ve CD200fc'nin CD200KO Schwann Hücre Yanıtları Üzerine Etkilerinin Araştırılması

4.7.1. CD200KO Schwann Hücre IL-6 Salınımındaki Değişiklikler; CD200fc, ve Minosiklinin Etkileri

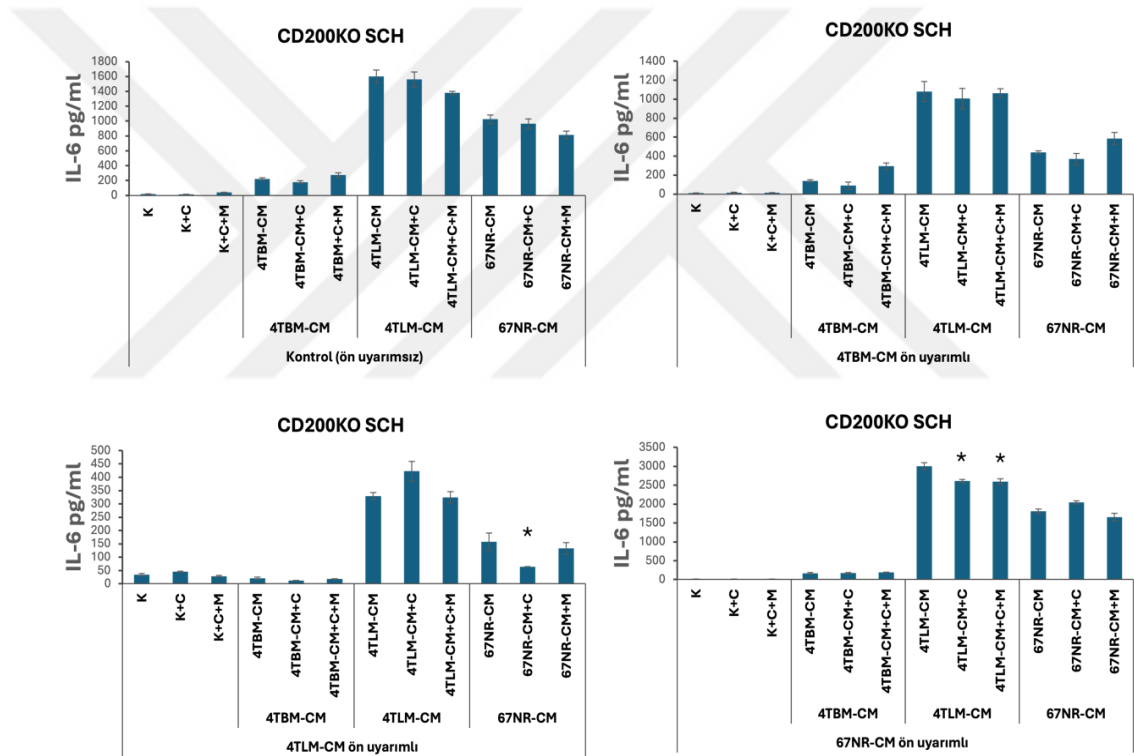
Tümör CM'leri ile ön uyarım yapılan (4TBM, 4TLM CM ve 67NR CM) ve ön uyarım yapılmayan CD200KO Schwann hücreler (Kontrol) 48 kuyucuklu hücre kültür plakalarına ekildi. Uyarımlar tekrarlandı ve 0,4 µg/ml CD200fc ve 40 µM Minosiklin uygulandı. ELISA ile IL-6 yanıtları değerlendirildi. Sonuçlar Şekil 4.18'de görülmektedir.

Daha önce hiç uyarılmamış CD200KO Schwann hücreler (Kontrol) tümör CM'leri ile uyarıldığında IL-6 çok yüksek düzeyde salındı (özellikle 4TLM CM ve 67NR CM uyarımında). En yüksek IL-6 düzeyi Schwann hücreler 4TLM CM eksozomları ile karşılaştığında görüldü ve 0,4 µg/ml CD200fc ile değişmeyen IL-6 düzeyi, CD200fc ile birlikte 40µM Minosiklin uygulandığında kısmen azaldı (Şekil 4.18, A).

İlk göze çarpan sonuç ön uyarımlı (4TLM CM, 4TBM CM ve 67NR CM ile uyarım) ve ön uyarımsız (Kontrol) tüm CD200KO Schwann hücre gruplarında en yüksek IL-6 sekresyonu 4TLM CM uyarımıyla ortaya çıkmasıdır. Diğer taraftan 67NR CM ön uyarımlı grupta 4TLM CM uyarımı ile IL-6 düzeyi yaklaşık 3000 pg/ml ölçülürken, 4TLM CM ön uyarımlı grupta 4TLM CM ile uyarım tekrarlandığında yaklaşık 400 pg/ml ölçülmüştür (desensitizasyon). Ayrıca daha önce 67NR CM ile uyarılan CD200KO Schwann hücreler 4TLM CM ile tekrar uyarıldığında CD200fc tek başına kullanıldığında IL-6 düzeyi azalma eğilimi göstermiştir (Şekil 4.18, C). Genel olarak hem uyarımsız hem ön uyarımlı Schwann hücrelerinde, 4TBM CM uyarımı, diğer hücrelerle uyarıma oranla, IL-6 düzeyini sınırlı miktarda arttırmıştır. **Bu durum, farklı organlara metastaz yapmış hücrelerin Schwann hücrelerinde farklı etkilere neden olabileceğini göstermesi açısından önemlidir.** 4TLM hücreleri karaciğere metastaz yapan meme kanseri hücreleridir, EMT fenotipi göstermekte ve daha agresif seyretmektedir. 67NR hücreleri ise 4TLM ile aynı kökenden gelip, metastatik olmayan/çok zor metastaz yapan alt grup olarak değerlendirilmektedir.

Karşılaştırma; Tüm gruplardaki etkiler karşılaştırıldığında Yabanıl tip Schwann hücre grubundaki IL-6 artışı CD200fc ile Minosiklin birlikte uygulandığında

azalırken CD200KO Schwann hücre gruplarında azaltıcı etki sınırlı düzeyde kaldı; hatta bazı gruplarda etki görülmedi. Diğer göze çarpan sonuç ise yabancı tip Schwann hücrelerde 4TBM CM uyarımı IL-6 sekresyonunu arttırırken CD200KO Schwann hücrelerde arttırmadı. CD200KO Schwann hücreler tekrar uyarıldığında ise IL-6’daki artış yabancı tip Schwann hücre CM uyarımlı gruplara göre daha kısıtlı kaldı. CD200fc uygulandığında artma ya da azalma görülmedi. **Hem tedaviye yanıt açısından hem de tekrar uyarımla IL-6 artışı açısından yabancı tip Schwann hücrelerle karşılaştırıldığında CD200KO Schwann hücrelerde desensitize yanıtlar ortaya çıktı.**



Şekil 4.18. CD200KO Schwann hücre IL-6 sekresyonu üzerine tümör CM uyarımları, CD200fc ve minosiklinin etkileri. A; daha önce uyarılmamış Schwann hücreleri, B; 4TBM-CM ile ön uyarım yapılan Schwann hücreleri, C; 67NR-CM ile ön uyarım yapılan Schwann hücreleri, D; 4TLM-CM ile ön uyarım yapılan Schwann hücreleri. 4TLM-CM-4TLM hücrelerinin CM’leri ile tedavi; 67NR-CM-67NR hücrelerinin CM’leri ile tedavi; 4TBM-CM- 4TBM hücrelerinin CM’leri ile tedavi; 4TBM sch-daha önce 4TBM hücrelerinin CM’leri ile uyarılmış Schwann hücreleri; 4TLM sch-daha önce 4TLM hücrelerinin CM’leri ile uyarılmış Schwann hücreleri; 67NR sch-daha önce 67NR hücrelerinin CM’leri ile uyarılmış Schwann hücreleri. C-Cd200fc ile tedavi, M-minosiklin ile tedavi.

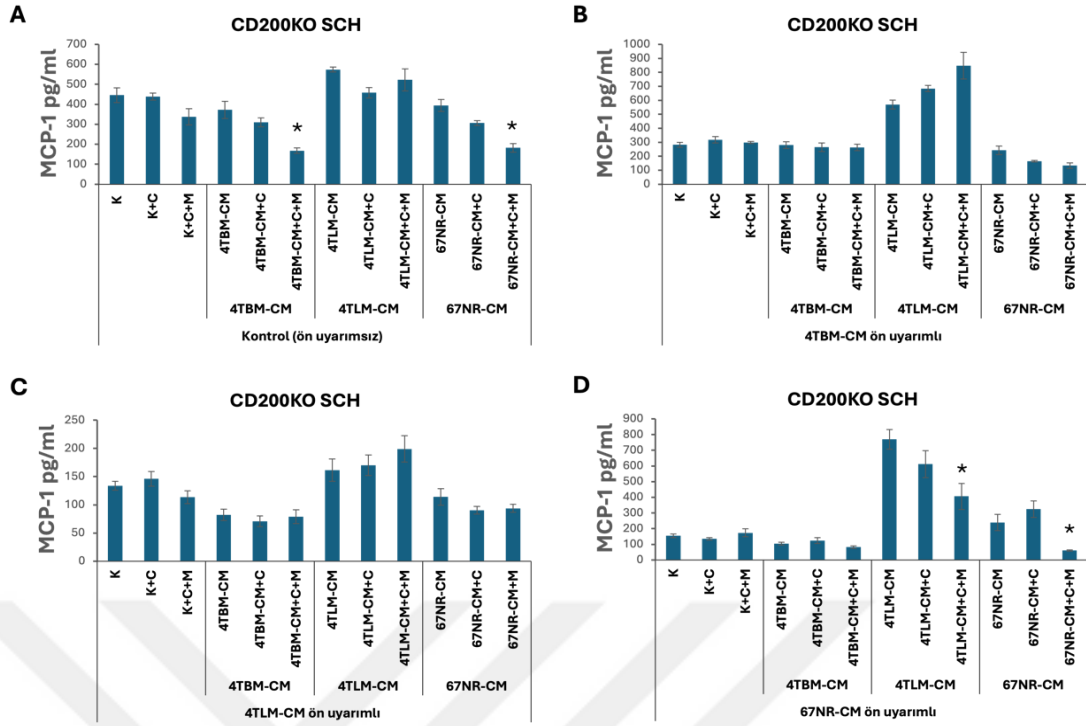
4.7.2. CD200KO Schwann Hücre MCP-1 Salınımındaki Değişiklikler; CD200fc, ve Minosiklinin Etkileri

Tümör CM'leri ile ön uyarım yapılan (4TBM CM, 4TLM CM ve 67NR) ve ön uyarım yapılmayan (Kontrol) CD200KO Schwann hücreler 48 kuyucuklu hücre kültür plakalarına ekildi. Uyarımlar tekrarlandı ve 0,4 µg/ml CD200fc ve 40 µM Minosiklin uygulandı. ELISA ile MCP-1 yanıtları değerlendirildi. Sonuçlar Şekil 4.19'da görülmektedir.

CD200KO Schwann hücrelerde uyarımsız durumda MCP-1 düzeyi yaklaşık 500 pg/ml olarak bulundu ve ön uyarımsız grup CM'lar ile uyarıldığında artış da sınırlı düzeyde kaldı (Şekil 4.19, A). Daha önce hiç uyarılmayan CD200KO Schwann hücre grubu 4TBM CM ve 67NR CM ile uyarıldığında MCP-1'de belirgin bir artış olmamasına rağmen CD200fc ve Minosiklin kombinasyonu ile azalma eğilimi göstermiştir (Şekil 4.19, A). CD200KO Schwann hücrelerde tüm gruplarda 4TLM CM uyarımıyla belirgin şekilde MCP-1 sekresyonu arttı. İlginç olarak daha önce 4TBM CM ile ön uyarımlı CD200KO Schwann hücre grubu 4TLM-CM ile tekrar uyarıldığında CD200fc minosiklin ile beraber MCP-1 sekresyonunu daha da arttırdı (Şekil 4.19, B). Yalnızca 67NR CM ön uyarımlı CD200KO Schwann hücre grubunda 4TLM CM' ye bağlı MCP-1 artışı CD200fc ve Minosiklinin birlikte uygulaması ile azalmıştır (Şekil 4.19, D).

CD200KO farelerde ikinci uyarım sonrası MCP-1 artışı, yabanıl tip Schwann hücrelere göre daha düşük düzeyde bulundu (Şekil 4.16 ve 4.19). Bu sonuç IL-6 sonuçlarıyla da benzerlik göstermektedir. Yabanıl tip Schwann hücrelerde 4TBM CM uyarımı MCP-1 sekresyonunu arttırırken, CD200KO Schwann hücrelerde arttırmadı. Hem uyarımsız hem de ön uyarımlı gruplarda CD200fc ile birlikte Minosiklin uygulaması yabanıl tip Schwann hücrelerde MCP-1 sekresyonundaki artışı azaltırken; CD200KO Schwann hücrelerde sadece 67NR CM ön uyarımlı grupta 4TLM CM ve 67NR CM uyarımına bağlı artışta azalma görüldü.

Özetle uyarım tekrarlandığında CD200KO Schwann hücre MCP-1sekresyonundaki artış yabanıl tip Schwann hücrelere göre çok daha azdı, Minosiklin uygulandığında da azalma görülmedi ya da çok az görüldü.



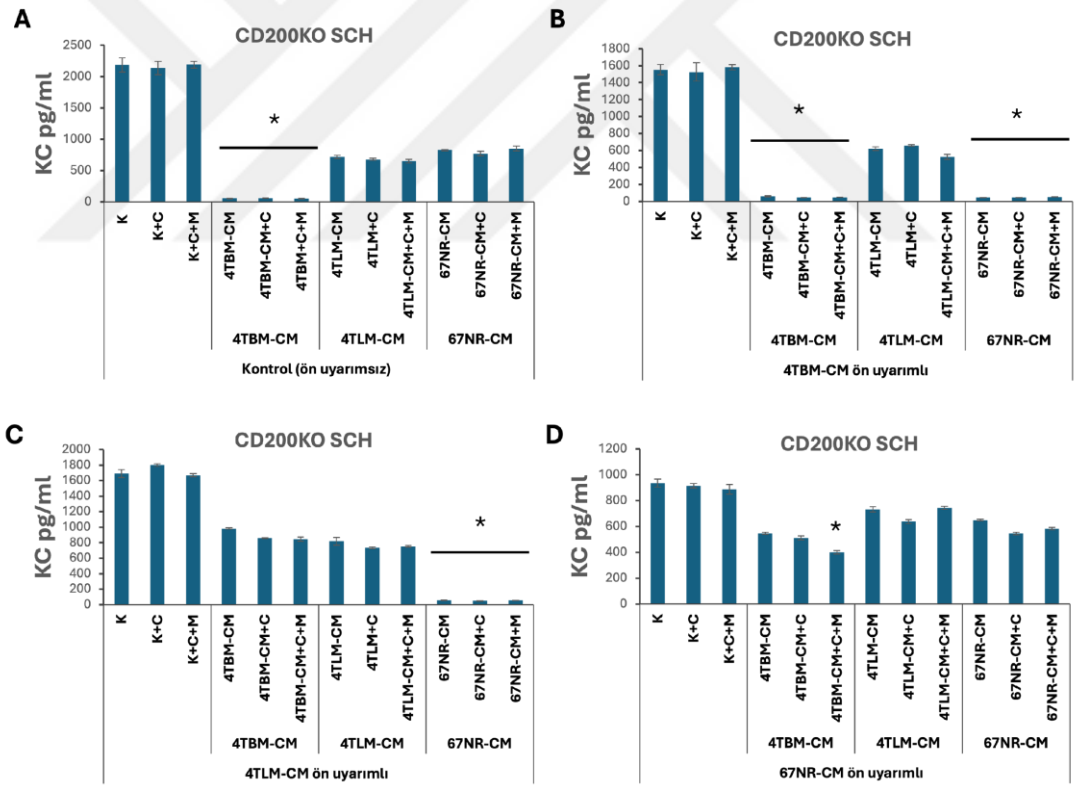
Şekil 4.19. CD200KO Schwann hücre MCP-1 sekresyonu üzerine tümör CM uyarımları, CD200fc ve minosiklinin etkileri. A; daha önce uyarılmamış Schwann hücreleri, B; 4TBM-CM ile ön uyarım yapılan Schwann hücreleri, C; 67NR-CM ile ön uyarım yapılan Schwann hücreleri, D; 4TLM-CM ile ön uyarım yapılan Schwann hücreleri. 4TLM-CM-4TLM hücrelerinin CM'leri ile tedavi; 67NR-CM-67NR hücrelerinin CM'leri ile tedavi; 4TBM-CM- 4TBM hücrelerinin CM'leri ile tedavi; 4TBM sch-daha önce 4TBM hücrelerinin CM'leri ile uyarılmış Schwann hücreleri; 4TLM sch-daha önce 4TLM hücrelerinin CM'leri ile uyarılmış Schwann hücreleri; 67NR sch-daha önce 67NR hücrelerinin CM'leri ile uyarılmış Schwann hücreleri. C-CD200fc ile tedavi, M-minosiklin ile tedavi.

4.7.3. CD200KO Schwann Hücre KC Salınımındaki Değişiklikler; CD200fc, ve Minosiklinin Etkileri

Tümör CM'leri ile ön uyarım yapılan (4TLM CM ve 67NR CM uyarımlı) ve ön uyarım yapılmaya (Kontrol) CD200KO Schwann hücreler 48 kuyucuklu hücre kültür plakalarına ekildi. Uyarımlar tekrarlandı ve 0,4 µg/ml CD200fc ve 40 µM Minosiklin uygulandı. ELISA ile KC yanıtları değerlendirildi. Sonuçlar Şekil 4.20'de görülmektedir. En yüksek KC sekresyonu hiç uyarılmayan CD200KO Schwann hücre grubunda 2200pg/ml düzeyinde ölçüldü. CD200fc ve minosiklinin tek başına ve birlikte uygulaması KC düzeylerini değiştirmede (Şekil 4.20, A). İlginç olarak ön uyarımsız ve ön uyarımlı CD200KO Schwann hücrelerinde (4TBM CM, 4TLM CM ve 67NR CM), kanser hücrelerinin CM'leri ile tekrar uyarıldığında KC sekresyonu belirgin şekilde baskılandı (Şekil 4.20, B-D). **Bunu yaptığımızda uyarımsız durumda çok fazla KC sekresyonu olduğu ve uyarımla bu durumun geriye döndüğü görüldü. Bu durum, hali hazırda çok yüksek KC sekresyonu olmasına**

bağlı olabilir (negative feed back). CM'deki başka faktörler KC'yi parçalıyor olabilir ya da CM'deki KC, Schwann hücre KC salınımına negatif etki ediyor olabilir. Bu gruplarda minosiklinin ve CD200fc'nin etkisi sınırlı olup, sadece daha önce 67NR-CM ile uyarılan Schwann hücreler 4TBM-CM ve 67NR-CM ile tekrar uyarıldığında oluşan KC sekresyonunu bir miktar azalttı (Şekil 20 Panel D).

Karşılaştırma ; Benzer sayıda hücre kullanıldığında CD200KO Schwann hücrelerde KC sekresyonu yabancı tip Schwann hücrelere göre yaklaşık 10 kat daha yüksek bulundu. CD200KO Schwann hücrelerin aksine CM uyarımı ile yabancı tip Schwann hücrelerde KC sekresyonu belirgin şekilde arttı ve bazı gruplarda CD200fc ve Minosiklin ile azalma eğilimi gösterdi. **CD200KO Schwann hücrelerde kanser CM'leri ile uyarım KC miktarını arttırmadığı gibi tam tersi azalttı ve CD200fc ve Minosiklin ile belirgin şekilde azalma da görülmeydi.**

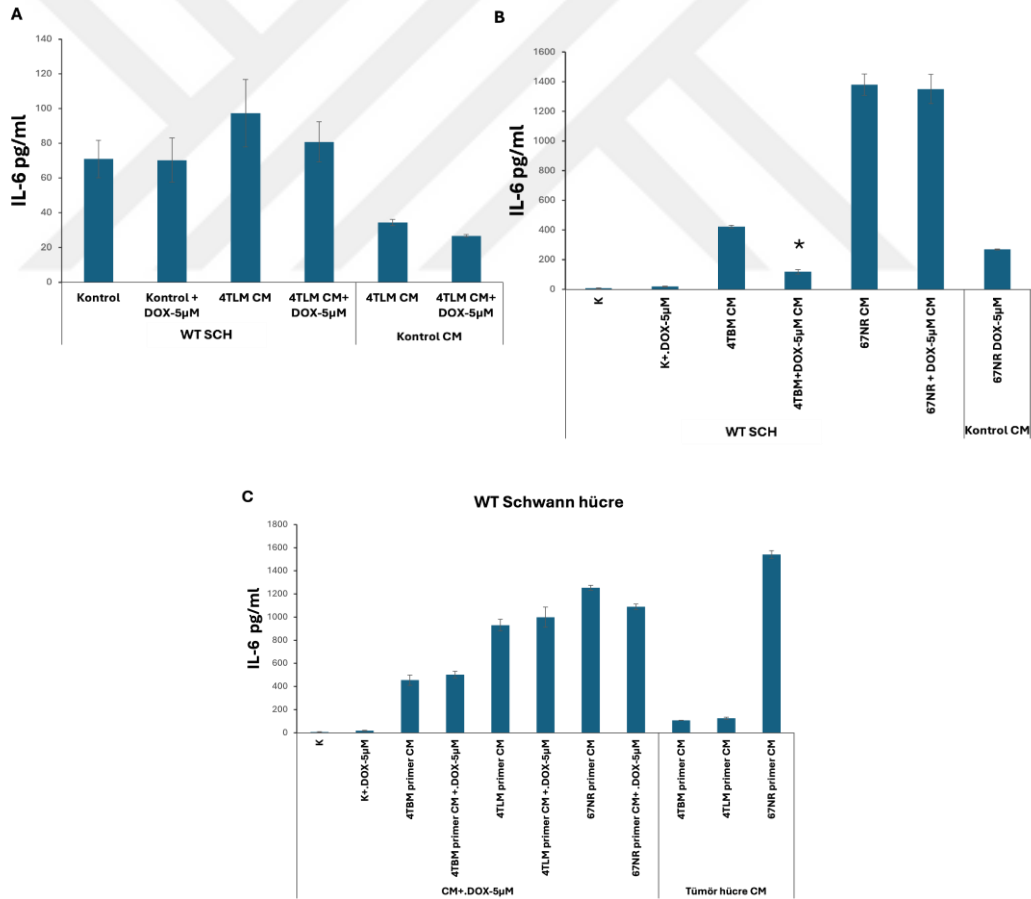


Şekil 4.20. CD200KO Schwann hücre KC sekresyonu üzerine tümör CM uyarımları, CD200fc ve minosiklinin etkileri. A; daha önce uyarılmamış Schwann hücreleri, B; 4TBM-CM ile ön uyarım yapılan Schwann hücreleri, C; 67NR-CM ile ön uyarım yapılan Schwann hücreleri, D; 4TLM-CM ile ön uyarım yapılan Schwann hücreleri. 4TLM-CM-4TLM hücrelerinin CM'leri ile tedavi; 67NR-CM-67NR hücrelerinin CM'leri ile tedavi; 4TBM-CM- 4TBM hücrelerinin CM'leri ile tedavi; 4TBM sch-daha önce 4TBM hücrelerinin CM'leri ile uyarılmış Schwann hücreleri; 4TLM sch-daha önce 4TLM hücrelerinin CM'leri ile uyarılmış Schwann hücreleri; 67NR sch-daha önce 67NR hücrelerinin CM'leri ile uyarılmış Schwann hücreleri. C-Cd200fc ile tedavi, M-minosiklin ile tedavi.

4.8. Pegile Lipozomal Doksorubisin'in Yabancı tip Schwann hücre yanıtları üzerine etkilerinin araştırılması

4.8.1. IL-6 Düzeyindeki Değişiklikler

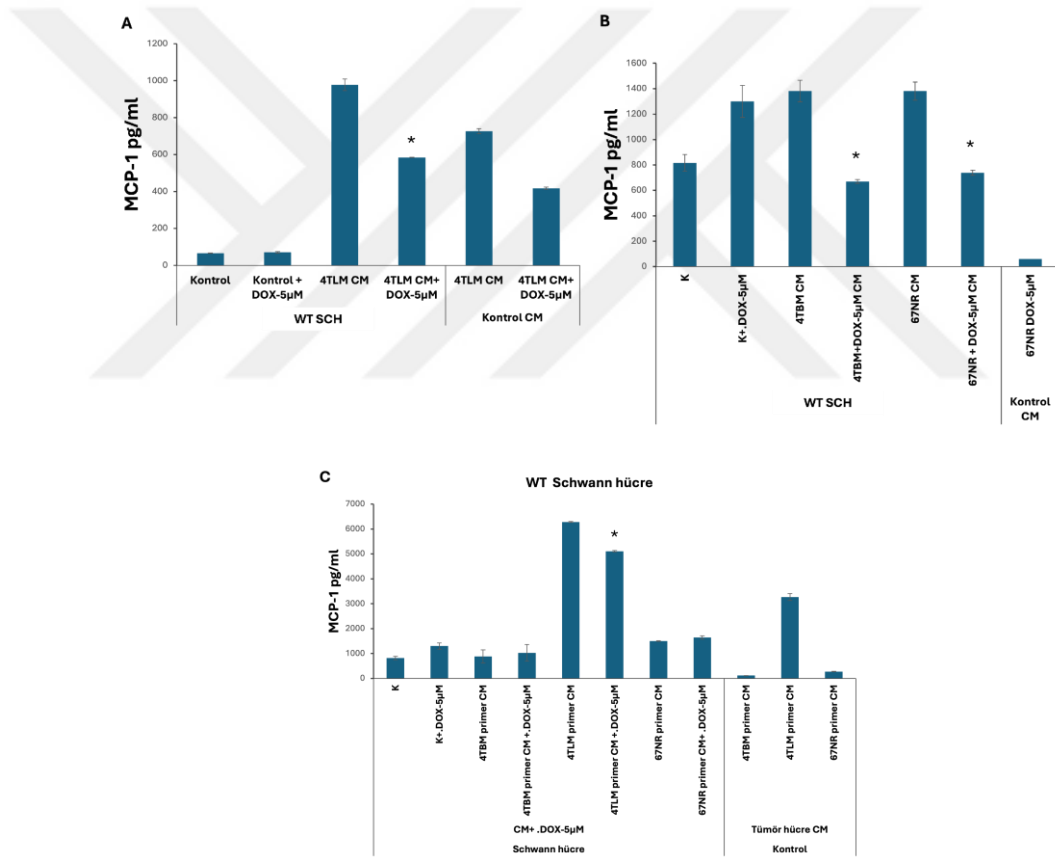
Yabancı Schwann hücreler 12 kuyucuklu hücre kültür plakalarına ekildi. Bir gruba daha önce 5 μ M PLD ile tedavi edilen primer tümör hücrelerin CM'leri ile indirekt olarak (Şekil 4.21, A ve B); diğer gruba ise direkt olarak primer tümör CM içerisinde 5 μ M Pegile Lipozomal Doksorubisin olacak şekilde uygulama yapıldı (Şekil 4.21, C). IL-6 sekresyonu üzerine etkiler araştırıldı. Sonuçlara göre direkt olarak uygulandığında PLD, yabancı tip Schwann hücre IL-6 sekresyonunu etkilemedi. Ancak daha önce 5 μ M PLD ile tedavi edilen primer tümör CM'si 4TBM CM uyarımı ile ortaya çıkan IL-6 artışını azalttı (Şekil 4.21, B).



Şekil 4.21. Yabancı tip Schwann hücre IL-6 sekresyonu üzerine Pegile Lipozomal Doksorubisin'in (DOX-5 μ M) etkisini gösteren grafikler. A ve B; DOX-5 μ M ile tedavi edilen primer tümör CM'lerinin yabancı tip Schwann hücre IL-6 yanıtı üzerine indirekt etkisi. C; Primer tümör CM'leri ve eş zamanlı DOX-5 μ M uygulamasının yabancı tip Schwann hücre IL-6 yanıtı üzerine direkt etkisi. * ; primer tümör CM etkisine göre anlamlılığı göstermektedir.

4.8.2. MCP-1 Düzeyindeki Değişiklikler

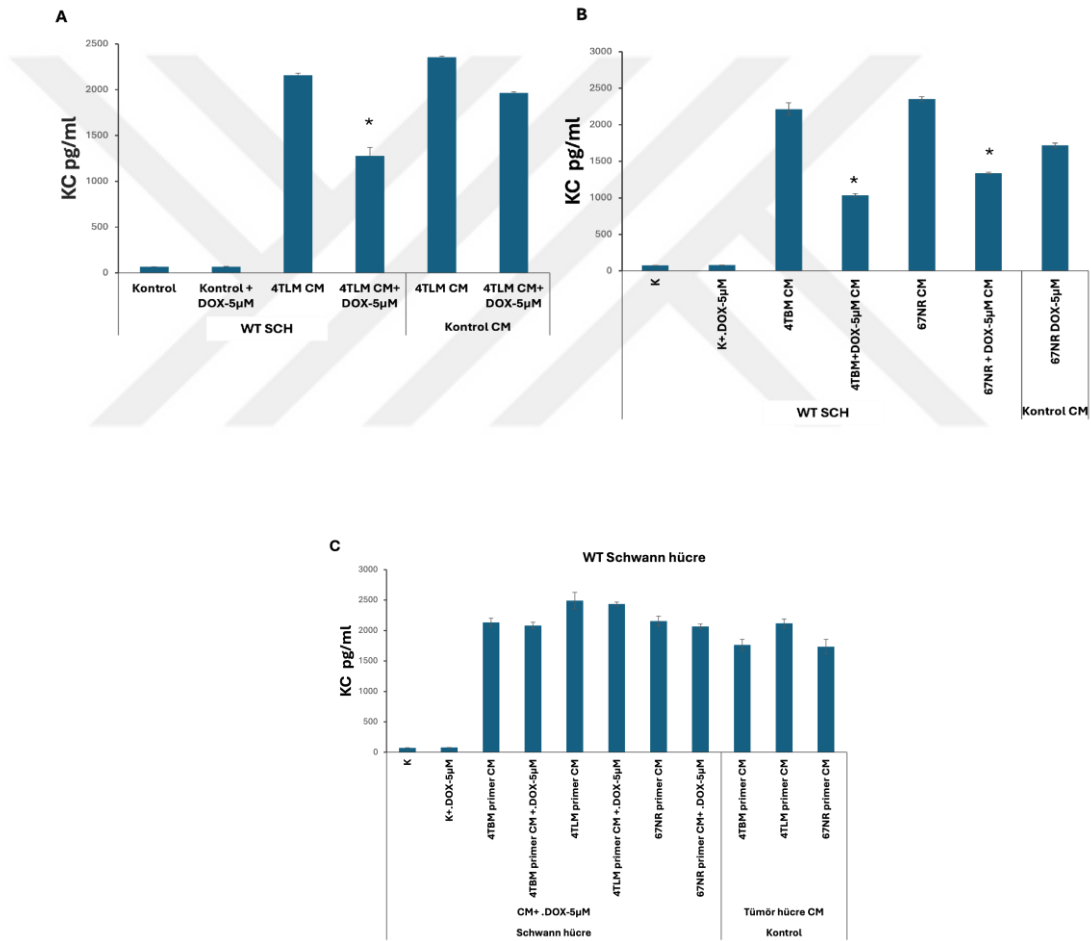
Yabanıl tip Schwann hücreler 12 kuyucuklu hücre kültür plakalarına ekildi. Bir gruba daha önce 5 μ M PLD ile tedavi edilen primer tümör hücrelerin CM'leri ile indirekt olarak (Şekil 4.22, A ve B); diğer gruba ise direkt olarak primer tümör CM içerisinde 5 μ M PLD olacak şekilde uygulama yapıldı (Şekil 4.22, C). MCP-1 sekresyonu üzerine etkiler araştırıldı. Sonuçlara göre Pegile Lipozomal Doksorubisin direkt olarak uygulandığında 4TLM CM'ye bağlı MCP-1 artışını kısmen azalttı (Şekil 4.22, C). Ancak daha önce 5 μ M PLD ile tedavi edilen primer tümör CM'lerinin uygulandığı tüm gruplarda, CM'ye bağlı MCP-1 artışı belirgin şekilde baskılandı. (Şekil 4.22, A ve B).



Şekil 4.22. Yabanıl tip Schwann hücre MCP-1 sekresyonu üzerine Pegile Lipozomal Doksorubisin'in (DOX-5 μ M) etkisini gösteren grafikler. A ve B; DOX-5 μ M ile tedavi edilen primer tümör CM'lerinin yabanıl tip Schwann hücre MCP-1 yanıtı üzerine indirekt etkisi. C; Primer tümör CM'leri ve eş zamanlı DOX-5 μ M uygulamasının yabanıl tip Schwann hücre MCP-1 yanıtı üzerine direkt etkisi. * ; primer tümör CM'nin artırıcı etkisine göre anlamlılığı göstermektedir.

4.8.3. KC Düzeyindeki Değişiklikler

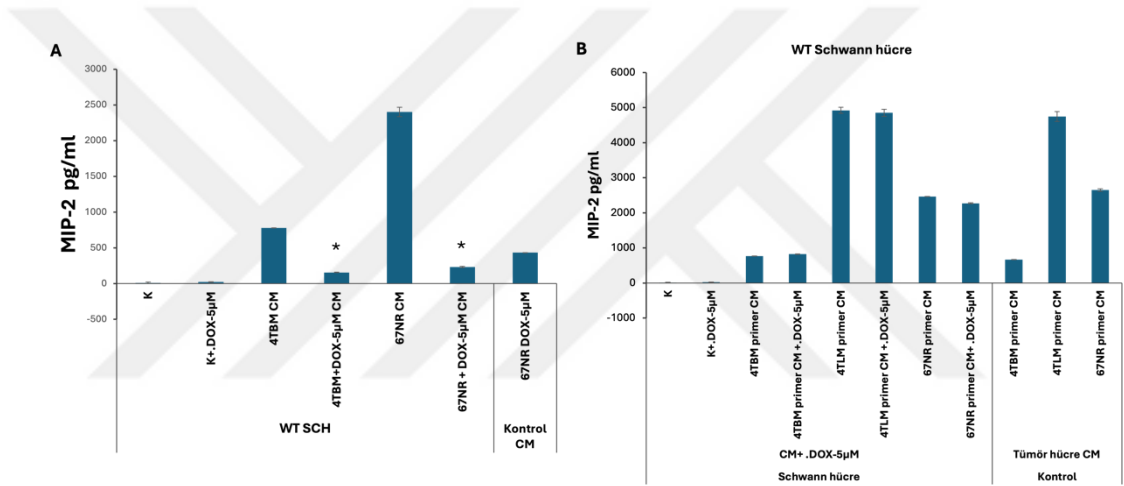
Yabanıl Schwann hücreler 12 kuyucuklu hücre kültür plakalarına ekildi. Bir gruba daha önce 5 μ M PLD ile tedavi edilen primer tümör hücrelerin CM'leri ile indirekt olarak (Şekil 4.23, A ve B); diğer gruba ise direkt olarak primer tümör CM içerisinde 5 μ M PLD olacak şekilde uygulama yapıldı (Şekil 4.23, C). KC sekresyonu üzerine etkiler araştırıldı. Sonuçlara göre PLD direkt olarak uygulandığında CM'ye bağlı KC artışı azalmadı. (Şekil 4.23, C). Ancak daha önce 5 μ M PLD ile tedavi edilen primer tümör CM'lerinin uygulandığı tüm gruplarda, CM'ye bağlı KC artışı belirgin şekilde baskılandı. (Şekil 4.23, A ve B).



Şekil 4.23. Yabanıl tip Schwann hücre KC sekresyonu üzerine Pegile Lipozomal Doksorubisin'in (DOX-5 μ M) etkisini gösteren grafikler. A ve B; DOX-5 μ M ile tedavi edilen primer tümör CM'lerinin yabanıl tip Schwann hücre KC yanıtı üzerine indirekt etkisi. C; Primer tümör CM'leri ve eş zamanlı DOX-5 μ M uygulamasının yabanıl tip Schwann hücre KC yanıtı üzerine direkt etkisi. * ; primer tümör CM'nin arttırıcı etkisine göre anlamlılığı göstermektedir.

4.8.4. MIP-2 Düzeyindeki Değişiklikler

Yabanıl Schwann hücreler 12 kuyucuklu hücre kültür plakalarına ekildi. Bir gruba daha önce 5 μ M PLD ile tedavi edilen primer tümör hücrelerin CM'leri ile indirekt olarak (Şekil 4.24, A); diğer gruba ise direkt olarak primer tümör CM içerisinde 5 μ M PLD olacak şekilde uygulama yapıldı (Şekil 4.24, B). MIP-2 sekresyonu üzerine etkiler araştırıldı. Sonuçlara göre PLD direkt olarak uygulandığında CM'ye bağlı MIP-2 artışı azalmadı. Ancak daha önce 5 μ M PLD ile tedavi edilen 4TBM ve 67NR primer tümör CM'lerinin uygulandığı gruplarda, CM'ye bağlı MIP-2 artışı belirgin şekilde baskılandı. (Şekil 4.24, A).



Şekil 4.24. Yabanıl tip Schwann hücre MIP-2 sekresyonu üzerine Pegile Lipozomal Doksorubisin'in (DOX-5 μ M) etkisini gösteren grafikler. A; DOX-5 μ M ile tedavi edilen primer tümör CM'lerinin yabanıl tip Schwann hücre MIP-2 yanıtı üzerine indirekt etkisi. B; Primer tümör CM'leri ve eş zamanlı DOX-5 μ M uygulamasının yabanıl tip Schwann hücre MIP-2 yanıtı üzerine direkt etkisi. * ; primer tümör CM'nin arttırıcı etkisine göre anlamlılığı göstermektedir.

5. TARTIŞMA

Günümüzde metastatik meme kanseri, birçok etkili tedavi yöntemi geliştirilmiş olmasına rağmen, kadınlarda kansere bağlı ölümler arasında önde gelen nedenlerden biri olmaya devam etmektedir. Modern tedavi seçenekleri, özellikle hedefe yönelik tedaviler, immünoterapiler ve kemoterapi kombinasyonları ile hastaların yaşam süreleri uzatılabilmekte ve bazı durumlarda hastalığın ilerlemesi engellenebilmektedir (Trayes ve Cokenakes, 2021). Ancak, metastatik meme kanserinin heterojen doğası, tedaviye yanıtın kişiden kişiye değişmesi ve kanserin farklı organlara yayılma şekilleri, tedaviye direnç gelişimine yol açabilmektedir. Bununla birlikte **tümör mikroçevresi**, kanser hücrelerinin çoğalma, hayatta kalma ve metastaz yapma yeteneklerini doğrudan etkileyebilecek faktörler sunmaktadır (Xiao ve Yu, 2021). Bu nedenle, günümüzdeki araştırmalarda, kanserin moleküler mekanizmalarını, heterojen yapısını, tümör mikroçevresindeki dinamikleri ve immün yanıtları anlamak tümör mikroçevresini hedefleyen tedavi yaklaşımları, tedaviye dirençle başa çıkmak ve daha kalıcı çözümler üretmek adına öncelikli hedefler arasındadır (Barzaman ve ark., 2020).

Tümör mikroçevresinde **periferik sinirlerin rolü**, son yıllarda anlaşılmaya başlanmıştır (Gysler ve Drapkin, 2021). Yapılan çalışmalarda özellikle periferik sistemin ana glial hücresi **Schwann hücrelerinin** kanser hücreleriyle karşılaştığında nöronal hasarda olduğu gibi fenotip değiştirdiği gösterilmiştir. Bu fenotipik değişikliklerin de çeşitli kanser tiplerinde, tümörlerin gelişimi ve metastazı üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğu bildirilmiştir. Melanoma, pankreas ve akciğer kanseri gibi çeşitli kanserlerde Schwann hücrelerinin saldırdığı büyüme faktörleri, sitokinler ve kemokinlerle tümör mikroçevresini değiştirdiği, kanser hücrelerinin invazyon yeteneklerini arttırarak hastalığın ilerlemesine katkıda bulunduğu rapor edilmiştir (Martyn ve ark., 2019; G. V. Shurin ve ark., 2019; Y. Zhou ve ark., 2020).

Meme kanseri hücrelerinin Schwann hücreleriyle erken dönemde karşılaşma olasılığı oldukça yüksektir. Çünkü meme dokusu, özelleşmiş fonksiyonları ve süt üretimi gibi görevleri nedeniyle önemli düzeyde nöronal inervasyona sahiptir. Histoanatomik çalışmalar, meme dokusunun her tarafına yayılan sinir liflerinden oluşan kompleks bir ağ içerdiğini ortaya koymaktadır (Sarhadi ve ark., 1996). Özellikle duyuşal nöronal liflerin, kan damarlarını inerve ettiği ve bu sinir uzantılarının çevresindeki

mikroçevreyi etkileyerek kanser hücrelerinin davranışını değiştirebileceği gösterilmiştir (Eriksson ve ark., 1996). Nöronal uzantıların olduğu her yerde Schwann hücreleri de bulunur (Bhatheja veField, 2006). Bu da meme kanseri hücrelerinin Schwann hücreleri ile etkileşime girmesini ve bu etkileşimin kanserin ilerleyişine olan potansiyel katkısını ortaya koymaktadır (Deborde veWong, 2022). Ancak, bu konuda metastatik meme kanseri ile ilgili bildiğimiz kadarıyla yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle çalışmamız, metastatik meme kanseri ile Schwann hücrelerin etkileşiminin araştırıldığı ilk çalışma olma niteliğindedir.

Tümör mikroçevresinde son yıllarda etkileri giderek daha fazla anlaşılan önemli moleküllerden biri de **CD200 ligandır**. Yapılan çalışmalar CD200 molekülünün kanserdeki etkilerinin çift yönlü olduğunu göstermektedir. Tümörü destekleyici ya da baskılayıcı etkilerinin tümör tipine ve mikroçevresine bağlı olarak farklılık gösterebileceği bildirilmiştir (Erin ve ark., 2018, 2020; Nip ve ark., 2023). Bu durum, CD200'ün tümör mikroçevresindeki dinamik rolünü karmaşık bir hale getirmekte ve molekülün kanserle ilişkili biyolojik işlevlerini anlamak için daha fazla araştırma yapılması gerektiğini ortaya koymaktadır. CD200 molekülünün, çeşitli hücrelerde ve nöronlarda eksprese edildiği bilinmektedir. 2011 yılında yapılan bir çalışmada, ratlarda CD200 immün reaktivitesinin miyelinsiz sinirlerde güçlü, miyelinli sinirlerde ise zayıf gözleendiği bildirilmiştir. Bu çalışmada, araştırmacılar ayrıca Schwann hücrelerinin nörolema bölgesinde CD200 varlığını göstermişlerdir (C.-Y. Chang ve ark., 2011). Farklı çalışmalar da, CD200 molekülünün periferik glial hücrelerdeki ekspresyonunu doğrulamaktadır. Rat Schwann hücre hattı RSC96'da CD200'ün eksprese edildiği bildirilmiştir. Sinir hasarı modellerinde, CD200 sinyalinin değişkenliği de dikkat çekicidir. Hasarlı veya kesilmiş siyatik sinir modelinde yapılan bir çalışmada, CD200 sinyalinin başlangıçta zayıfladığı ancak lezyondan 7 gün sonra yaralı bölgede CD200 ekspresyonunun arttığı bildirilmiştir (C.-Y. Chang ve ark., 2011). Benzer şekilde, bir başka çalışmada, hasarsız siyatik sinirlerde CD200 ligandının Schwann hücrelerinde (özellikle Schmidt-Lanterman insizyonları ve Ranvier düğümlerinde) ekspresyon gösterdiği, sinir hasarından sonraki 24 saatte CD200'ün down-regüle olduğu, 14. günde ise tekrar pik düzeye ulaştığı bildirilmiştir (Pannunzio ve ark., 2022). Bu bulgular, sinir hasarı durumunda CD200 ekspresyonunun düzenlendiğini ve bunun iyileşme sürecinde rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Ancak, Schwann hücrelerde spesifik olarak eksprese edilen

CD200'ün biyolojik işlevleri ve kanser hücrelerine verdiği yanıtı nasıl değiştirdiği henüz tam olarak açıklığa kavuşmamıştır. Özellikle, CD200'ün metastatik süreçlerdeki potansiyel rolü ve bu molekülün tümör hücreleri ile etkileşimi hakkındaki bilgi eksiklikleri, bu alandaki araştırmalar için önemli bir boşluk oluşturmaktadır.

Bu çalışmada, **Schwann hücrelerinin metastatik ve non-metastatik meme kanseri hücreleriyle etkileşiminde CD200 ligandının etkileri ilk kez araştırılmıştır.** Bunun için, primer tümör hücre sekretomları ile CD200KO ve yabancı tip primer Schwann hücreleri karşılaştırılarak, Schwann hücre aktivasyonu ile ilişkili inflamatuvar sitokin ve kemokinlerden IL-6, KC, MIP-2, MCP-1, TNF-alfa ve IL-1 beta düzeyleri belirlenmiştir. Ayrıca meme kanseri heterojen bir hastalık olup, alt tiplerinin tedavilere verdiği yanıtlar önemli farklılıklar içermektedir (Barzaman ve ark., 2020). Bu nedenle primer tümör kültürü metastatik ve non metastatik alt tipleri ile primer Schwann hücre kültürü kullanılarak, tümörün biyolojik özelliklerini ve metastatik potansiyelini daha doğru yansıtan bir model oluşturulmuş ve tümör mikroçevresindeki etkileşimler daha gerçekçi bir şekilde incelenmiştir.

IL-6, tümör mikroçevresinde yüksek seviyelerde bulunan ve kanserle ilişkilendirilen önemli bir sitokindir. Yüksek IL-6 seviyeleri, inflamasyon ve kanser arasındaki güçlü bağı gösterir ve birçok tümör türünde aşırı şekilde sekrete edilmektedir (Kumari ve ark., 2016). Çalışmalarda **siyatik sinir hasarında Schwann hücre IL-6 sekresyonunun arttığı**, IL-6 artışının periferik sinir hasarında pro-inflamatuvar, nöroprotektif ve rejeneratif özellikler gösterdiği rapor edilmiştir (Bolin ve ark., 1995). Çalışmanın ilk sonucunda tümör sekretomları ile uyarımın Schwann hücre IL-6 sekresyonu üzerine etkilerini araştırdık. Bulgularımıza göre hem yabancı tip ve CD200KO Schwann hücrelerde hem de tümör hücrelerinde bazal IL-6 düzeyi düşük ölçüldü. Tümör CM'leri ile uyarıldığında ise CD200KO Schwann hücreler, yabancı tip Schwann hücrelere göre belirgin şekilde daha fazla IL-6 sekrete etti; ilginç olarak bu fark 67NR CM uyarımı ile 11 kat daha fazla idi. Sonuçlarımıza benzer şekilde pankreas kanserinde yapılan bir çalışmada, yalnızca Schwann hücre ortamının (condition medium) bir etkisinin olmadığı, pankreas kanser hücre uyarımı ile artan Schwann hücre kaynaklı IL-6'nın STAT-3 sinyalini aktifleştirerek kanser hücre göçünü ve invazyonunu arttırdığı gösterilmiştir (Su ve ark., 2020). Çalışmamızda tümör sekretomları uyarımıyla CD200KO Schwann hücrelerin yabancı tip Schwann hücrelerden daha fazla IL-6 üretmesi, CD200 molekülünün bilinen inflamasyonu

düzenleyici/baskılayıcı etkileriyle örtüşmektedir (Cox ve ark., 2012; Manich ve ark., 2019; Walker ve ark., 2009). Bildiğimiz kadarıyla CD200 molekülünün Schwann hücre biyolojik aktivitesi ve IL-6 sekresyonu arasındaki ilişkinin/etkileşiminin araştırıldığı başka bir çalışma henüz yoktur.

KC (CXCL-1), nötrofiller için güçlü bir kemoatraktan olup, tümör mikroçevresindeki yüksek seviyeleri özellikle metastatik potansiyel ile doğrudan ilişkilidir (Korbecki ve ark., 2023). Bu bağlamda, çalışmamızda Schwann hücrelerin tümör hücreleri ile etkileşiminde KC sekresyonundaki olası değişiklikleri de araştırdık. Elde edilen sonuçlar, tümör hücrelerinin sekretomlarında KC seviyelerinin ortalama 1000 pg/ml düzeyine ulaştığını göstermiştir. Buna karşın, uyarımsız Schwann hücrelerde KC düzeyleri belirgin şekilde daha düşük bulunmuştur (yabanıl tip: 75 pg/ml, CD200KO: 110 pg/ml). Tümör hücrelerinin sekretomları ile karşılaştırıldığında, IL-6 sekresyonundaki artışa benzer olarak, CD200KO Schwann hücrelerinde KC sekresyonu, yabanıl tip Schwann hücrelerine göre anlamlı derecede daha fazla artmıştır. Özellikle, 67NR CM uyarımı ile CD200KO Schwann hücrelerinin KC sekresyonu 24,5 kat, 4TLM CM ile yapılan uyarımda ise 18,5 kat artmıştır. Bu bulgular, CD200 molekülünün aktifleşmiş Schwann hücrelerinde artan KC sekresyonunu dengelemeye yönelik bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Literatürde, Schwann hücrelerinde KC sekresyonu üzerine, Schwann hücre CD200 ligandının etkilerini inceleyen bir çalışmaya henüz rastlanmamıştır. Bununla birlikte, 2018 yılında yapılan bir çalışmada, akciğer kanseri modelinde Schwann hücrelerinden salınan CXCL5'in, PI3K/AKT/GSK-3 β /Snail-Twist sinyal yolunu aktiveleştirerek epitelyal-mezenkimal geçişi, invazyonu ve metastazı artırdığı bildirilmiştir (Y. Zhou ve ark., 2018). Bu çalışma, tümör mikroçevresinde Schwann hücrelerin inflamatuvar yanıtları artırarak kanserin progresyonuna katkı sağladığını ve metastaz sürecini desteklediğini göstermektedir. Benzer şekilde, bizim çalışmamızda gözlemlenen KC sekresyonundaki artış, Schwann hücrelerinin tümör mikroçevresinde önemli bir inflamatuvar rol oynadığını ve potansiyel olarak metastaz sürecine katkıda bulunabileceğini göstermektedir.

Çalışmamızda araştırılan bir diğer önemli inflamatuvar ve nötrofil kemoatraktan molekül olan MIP-2 (CXCL-2) sekresyonu üzerine de benzer etkiler görüldü. Uyarımsız CD200KO Schwann hücrelerde MIP-2 düzeyleri, yabanıl tip Schwann hücrelerinde olduğu gibi çok düşük ölçülmüştür. 4TLM CM uyarımı ile hem yabanıl

tip hem de CD200KO Schwann hücrelerinde MIP-2 sekresyonu belirgin şekilde artmıştır. Ancak, 67NR CM uyarımı ile CD200KO Schwann hücre MIP-2 sekresyonu 70 kat artarken; yabancı tip Schwann hücrede artış görülmedi. Bu bulgular, CD200 molekülünün Schwann hücrelerinde MIP-2 üretimini düzenlemede önemli bir rol oynadığını düşündürmektedir. Literatürde, MADB106 meme kanseri uyarımı ile Schwann hücrelerinde CXCL-2 üretiminin arttığı ve bu artışın ortama makrofajları çekerek kanser ağrısına yol açtığı bildirilmiştir (Y. Zhang ve ark., 2023). Bu çalışmada, terapötik bir yaklaşım olarak Schwann hücre aktivasyonuna neden olan meme kanseri kaynaklı Ref-1'in inhibitörlerinin veya Schwann hücrelerinin sekrete ettiği CXCL-2 için antikorların kullanımı önerilmektedir. Literatürde CD200 molekülünün Schwann hücrelerinde MIP-2 (CXCL-2) sekresyonu üzerindeki etkisini inceleyen bir çalışmaya henüz rastlamadık. Bu bağlamda, çalışmamız, CD200 ligandının Schwann hücrelerde MIP-2 üretimini modüle etme potansiyelini ortaya koymakta, inflamasyon ve metastaz süreçlerindeki rolünün anlaşılması için yeni bir bakış açısı sunmaktadır.

Yapılan çalışmalarda MCP-1 (monosit kemotaktik protein-1) ve reseptörünün, çeşitli kanser türlerinde tümör büyümesi, progresyonu ve migrasyonu ile ilişkilendirilmektedir (Lim ve ark., 2016; Xu ve ark., 2021; Yoshimura ve ark., 2023). MCP-1'in tümör mikroçevresine immünsüpresif hücreleri çekerek, tümör lehine bir ortamın oluşumunu desteklediği bildirilmiştir (Deborde ve Wong, 2017). Ayrıca, Schwann hücrelerinin bazı kanser türlerinde MCP-1 üreterek, perinöral invazyonu tetiklediği ve bu süreçte önemli bir rol oynadığı rapor edilmiştir (Huang ve ark., 2020). Bu bağlamda, çalışmamızda MCP-1 sekresyonu üzerine etkiler de araştırıldı. Sonuçlarımıza göre, **CD200KO Schwann** hücrelerde bazal MCP-1 düzeyi, yabancı tip Schwann hücrelerine göre **4 kat daha** yüksek bulundu (600 pg/ml ve 150 pg/ml). Tümör hücreleri arasında ise en yüksek MCP-1 düzeyi en agresif metastatik alt tipi olan 4TLM'de ölçüldü. İlginç bir şekilde, 4TLM CM ile uyarıldığında, yabancı tip Schwann hücrelerinde MCP-1 sekresyonunun 16 kat, CD200KO Schwann hücre grubunda 7 kat arttığını gözlemledik. Yabancı tip Schwann hücrelerine kıyasla, CD200KO Schwann hücrelerinde MCP-1 artışının daha sınırlı kalması, CD200KO Schwann hücre bazal MCP-1 düzeylerinin dört kat daha yüksek olması ve 4TLM CM'deki yüksek MCP-1 düzeyinden dolayı otheregölasyon mekanizmalarının devreye girdiğini düşündürmektedir. Daha düşük MCP-1 düzeyi olan 67NR CM ile uyarımda

CD200KO Schwann hücre MCP-1 sekresyonu 2.8 kat artarken yabancı tip Schwann hücre MCP-1 sekresyonunun değişmemesi de bu düşüncüyü destekler niteliktedir. Bu bulgulara göre tümörün heterojenitesine ve Schwann hücre bazal MCP-1 düzeyine bağlı olarak CD200 ligandı MCP-1 sekresyonu üzerinde farklı etkiler gösterebilir. Literatürde, Schwann hücrelerinde CD200 ligandının MCP-1 aracılı inflamatuvar yanıtlar üzerindeki etkilerini inceleyen herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle, çalışmamız, Schwann hücreleri, CD200 ligandı ve MCP-1 arasındaki ilişkiyi araştırarak, kanser mikroçevresinde bu moleküllerin olası etkileşimlerine dair yeni bir bakış açısı sunmaktadır. Ayrıca gruplar arasındaki farklılıklar; metastatik alt tipler arasındaki heterojeniteyi göstermektedir. Yani kanser mikroyapısındaki çeşitliliğin ve her alt tipin özgün biyolojik özelliklerinin, tümör mikroçevresindeki etkileşimlerle farklı şekillendiğini gösterir. Dolayısıyla sonuçlarımız metastatik ve non metastatik tümör alt tiplerine spesifik araştırmaların önemini, spesifik terapötik yaklaşımların geliştirilmesinin önemini ortaya koymaktadır.

Minosiklin, Schwann hücrelerini de içeren glial hücrelerin patolojik aktivasyonunu geriye çevirebilen tetrasiklin grubu bir antibiyotiktir (K.-I. Cheng ve ark., 2016; Dean ve ark., 2012; Guillemot-Legris ve ark., 2023; Stokes ve ark., 2017; C. Zhou ve ark., 2020). Bildiğimiz kadarıyla meme kanser hücreleriyle aktifleşen Schwann hücre yanıtları üzerine CD200 ligandının ve minosiklinin etkilerinin araştırıldığı bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızda CD200 eksprese eden ve etmeyen Schwann hücre yanıtlarının 40 µM minosiklinin varlığında geriye dönüp dönmediği araştırıldı (Guillemot-Legris ve ark., 2023; K. Kobayashi ve ark., 2013; Vandooren ve ark., 2017). Bununla birlikte Schwann hücrelerde gözlenen değişikliklerin, dışardan 0,4µg/ml CD200fc uygulaması ile geriye dönüp dönmeyeceği de incelendi.

Bulgular, tümör CM uyarımına bağlı yabancı tip Schwann hücre IL-6 artışının, CD200fc ve 40 µM minosiklinin birlikte uygulandığında belirgin şekilde azaldığını göstermektedir. Ancak, CD200KO Schwann hücrelerde bu azalma sınırlı kalmış ve bazı gruplarda etkisizlik gözlemlenmiştir. İlginç bir şekilde, uyarım tekrarlandığında CD200KO Schwann hücre IL-6 artışı, yabancı tip Schwann hücrelere kıyasla daha kısıtlı kalmıştır. CD200fc uygulandığında ise herhangi bir değişiklik gözlemlenmemiştir. Bu sonuçlar, CD200 eksprese eden ve etmeyen Schwann hücrelerin 40 µM minosiklin tedavisine karşı farklı yanıtlar verdiğini göstermektedir. Özellikle, tümör CM'leri ile uyarım tekrarlandığında CD200KO Schwann hücrelerde

IL-6 artışının yabanıl tip Schwann hücrelere göre daha kısıtlı kalması bir desensitizasyon mekanizmasının varlığını düşündürmektedir. Literatürde bu konuda yapılan bir çalışmaya henüz rastlamadık.

Minosiklin ve CD200fc uygulamasının MCP-1 üzerine etkileri de IL-6 sonucuyla benzer bulundu. **CD200KO farelerde ikinci uyarım sonrası MCP-1 artışı, yabanıl tip Schwann hücrelere göre daha düşük düzeyde bulundu.** Hem uyarımsız hem de ön uyarımlı gruplarda CD200fc ile birlikte Minosiklin uygulaması yabanıl tip Schwann hücrelerde MCP-1 sekresyonundaki artışı azaltırken; CD200KO Schwann hücrelerde MCP-1’de belirgin bir azalma görülmedi. Bu durumun nedeni uyarım tekrarlandığında CD200KO Schwann hücre MCP-1 sekresyonundaki beklenen artışın gerçekleşmemesi, yani desensitizasyon olabilir. Sonuçlar CD200 ligandının minosiklin yanıtında rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Literatürde bildiğimiz kadarıyla bu konuda yapılan bir çalışma yoktur.

Yabanıl tip Schwann hücrelerde KC sekresyonu, benzer sayıda hücre kullanıldığında CD200KO Schwann hücrelere göre yaklaşık 10 kat daha düşük bulundu. CD200KO Schwann hücrelerin aksine CM uyarımı ile yabanıl tip Schwann hücrelerde KC sekresyonu belirgin şekilde arttı ve bazı gruplarda CD200fc ve Minosiklin ile azalma eğilimi gösterdi. **CD200KO Schwann hücrelerde kanser CM’leri ile uyarım KC miktarını arttırmadığı gibi tam tersi azalttı yani uyarımsız durumda çok fazla KC sekresyonu olduğu ve uyarımla bu durumun geriye döndüğü görüldü.** CD200fc ve minosiklin ile belirgin şekilde azalma da görülmedi. **Bu durum, hali hazırda çok yüksek KC sekresyonu olmasına bağlı olabilir (negative feed back).** **CM’deki başka faktörler KC’yi parçalıyor olabilir ya da CM’deki KC, Schwann hücre KC salınımına negatif etki ediyor olabilir.** Bildiğimiz kadarıyla bu konuda, meme kanseri hücreleriyle aktifleşen Schwann hücre yanıtları üzerine minosiklinin etkilerinin araştırıldığı çalışma yoktur.

Pannunzio ve arkadaşlarının 2022 yılında yaptığı çalışmada, sinir hasarından sonra 24. saatte Schwann hücrelerinde CD200 ligandının down-regüle olduğu bildirilmiştir (Pannunzio ve ark., 2022). Bizim çalışmamızda ise kanser hücreleriyle karşılaşan yabanıl tip Schwann hücrelerinde yaklaşık 48. saatte sitokin ve kemokin yanıtları değerlendirilmiştir. CD200KO Schwann hücrelerinde gözlemlenen artışa kıyasla daha düşük olsa da, yabanıl tip Schwann hücrelerinde inflamatuvar sitokin ve kemokin

yanıtlarında bir artış olması, sinir hasarındaki gibi CD200 ligandının down-regülasyonuna dair kısmi bir ipucu sunmaktadır. Kanseri hücre ortamlarıyla karşılaşan Schwann hücrelerinin CD200 ligand ekspresyonunun, sinir hasarındaki gibi değişip değişmediğini anlamak için ileri düzey moleküler araştırmalar gerekmektedir. Bu durumun aydınlatılması, tedavi yaklaşımları açısından literatüre önemli veriler sağlayacaktır.

Çalışmamızda tümör hücre uyarımıyla artan Schwann hücre aktivitesi üzerine meme kanseri tedavisinde yaygın olarak kullanılan Pegile lipozomal doksorubisinin (PLD) etkileri de araştırıldı. Hem yabancı tip Schwann hücreler üzerine direkt PLD etkisini hem de meme kanseri hücreleri üzerinden dolaylı etkileri araştırıldı. PLD, direkt olarak yabancı tip Schwann hücre proliferasyonunu, IL-6, MCP-1, KC, MIP-2 sekresyonunu etkilemedi. İlginç olarak daha önce 5 µM Pegile Lipozomal Doksorubisin ile tedavi edilen primer tümör CM'leri uyarımı ile Schwann hücrelerde IL-6, MCP-1, KC ve MIP-2 artışı belirgin şekilde azaldı. Bu durum PLD'in Schwann hücreler üzerine doğrudan bir etkisinin olmadığını ancak tümör hücrelerinde meydana getirdiği değişikliğe bağlı olarak ortaya çıktığını düşündürmektedir. Literatürde bu konuyla ilgili yapılan bir çalışmaya henüz rastlamadık.

Bu bulgular, genel olarak CD200 ligandının meme kanseri ile aktifleşen Schwann hücre immün yanıtlarını ve tedaviye duyarlılığını düzenleyici bir faktör olabileceğini düşündürmektedir. Bununla birlikte, metastatik ve non metastatik meme kanseri hücrelerinin Schwann hücreleri hangi mekanizma ile aktive ettiği, Schwann hücre CD200 ligandının tam olarak nasıl bir mekanizma ya da mekanizmalar ile bu yanıtları modüle ettiği ve minosiklin gibi tedavi ajanlarının etkilerini nasıl değiştirdiği konusunda daha fazla araştırma yapılması gerektiği açıktır.

Schwann hücreleri ile metastatik meme kanseri hücreleri arasındaki etkileşimin ve bu etkileşimde CD200 ligandının rolünün araştırıldığı bu çalışma, bu alandaki literatüre kazandırılmış ilk çalışma olma özelliğine sahiptir. Elde ettiğimiz veriler, Schwann hücrelerinin kanser hücreleri ile etkileşiminin daha iyi anlaşılması ve CD200 molekülünün bu etkileşimdeki potansiyel rolünün aydınlatılması ile ilgili ilk verilerin literatüre kazandırılmasında önemli bir katkı sunmaktadır.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

- 1) Tümör sekretomları ile uyarıldığında CD200KO Schwann hücreler, yabancı tip Schwann hücrelere göre belirgin şekilde daha fazla IL-6 sekrete etti; Bu fark 67NR CM uyarımı ile 11 kat daha fazla ölçüldü.
- 2) En yüksek MCP-1 düzeyi, en agresif metastatik meme kanseri hücre dizisi 4TLM'de ölçüldü. CD200KO Schwann hücre uyarımsız, bazal MCP-1 düzeyi, yabancı tip Schwann hücrelere göre 4 kat daha fazladır (600 pg/ml ve 150 pg/ml). 4TLM CM ile uyarıldığında yabancı tip Schwann hücre MCP-1 düzeyi 16 kat, CD200KO Schwann hücre MCP-1 düzeyi 7 kat arttı. 67NR CM ile uyarıma bağlı CD200KO Schwann hücre MCP-1 2.8 kat artarken, yabancı tip Schwann hücrede artış görülmeydi.
- 3) Tümör CM'leri ile uyarımda CD200KO Schwann hücreleri yabancı tip Schwann hücrelere göre belirgin şekilde daha fazla KC sekrete etti. 67NR CM ile uyarıldığında CD200KO Schwann hücre KC sekresyonu 24.5 kat arttı, yabancı tip Schwann hücrede ise artış olmadı. 4TLM CM ile uyarımda CD200KO Schwann hücre KC sekresyonu 18.5 kat arttı; yabancı tip Schwann hücrede ise 9 kat arttı.
- 4) Tümör hücreleri, yabancı tip ve CD200KO Schwann hücreler, ölçülemeyecek düzeyde çok düşük TNF-alfa ve IL-1 beta sekrete etmektedir.
- 5) Bazal MIP-2 düzeyi hem CD200KO Schwann hücrelerde hem de yabancı tip Schwann hücrelerde çok düşük ölçüldü. 67NR CM uyarımı ile CD200KO Schwann hücrelerde MIP-2 sekresyonu 70 kat artarken; yabancı tip Schwann hücrelerde MIP-2 sekresyonu değişmedi. 4TLM CM uyarımı ile CD200KO Schwann hücrede MIP-2 artışı 79 kat, yabancı tip Schwann hücrede ise 68,5 kat bulundu.
- 7) Yabancı tip Schwann hücre grubundaki IL-6 artışı CD200fc ile Minosiklin birlikte uygulandığında azalırken CD200KO Schwann hücre gruplarında azaltıcı etki sınırlı düzeyde kaldı ; hatta bazı gruplarda etki görülmeydi. CD200KO Schwann hücreler tekrar uyarıldığında ise IL-6'daki artış yabancı tip Schwann hücre CM uyarımlı gruplara göre daha kısıtlı kaldı. CD200fc etkilemedi. Hem tedaviye yanıt açısından hem de tekrar uyarıma bağlı IL-6 artışı açısından yabancı tip Schwann hücrelerle karşılaştırıldığında CD200KO Schwann hücrelerde daha desensitize yanıtlar görüldü.

8) CD200KO farelerde uyarım tekrarlandığında (ikinci uyarım) sonrası MCP-1 artışı, yabancı tip Schwann hücrelere göre daha düşük düzeyde bulundu. Yabancı tip Schwann hücrelerde 4TBM CM uyarımı MCP-1 sekresyonunu arttırırken CD200KO Schwann hücrelerde arttırmadı. Hem uyarımsız hem de ön uyarımlı gruplarda CD200fc ile birlikte Minosiklin uygulaması yabancı tip Schwann hücrelerde MCP-1 sekresyonundaki artışı azalttı. CD200KO Schwann hücrelerde sadece 67NR CM ön uyarımlı grupta 4TLM CM ve 67NR CM uyarımına bağlı artışta azalma görüldü. Uyarım tekrarlandığında CD200KO Schwann hücre gurubunda minosiklinin azaltıcı etkisine karşı direnç gözlemlendi.

9) CD200KO Schwann hücrelerin uyarımsız bazal KC sekresyon düzeyi yabancı tip Schwann hücrelere göre en az 10 kat daha yüksek bulundu. İlk tümör CM'leri ile uyarıldığında yabancı tip Schwann hücrelerde KC sekresyonu belirgin şekilde arttı ve bazı gruplarda CD200fc ve Minosiklin ile azalma eğilimi gösterdi. CD200KO Schwann hücrelerde ise tekrar uyarım KC miktarını arttırmadığı gibi tam tersi azalttı ve CD200fc ve Minosiklin ile belirgin şekilde azalma da görülmedi.

10) Pegile Lipozomal Doksorubisin direkt olarak uygulandığında yabancı tip Schwann hücre IL-6, MIP-2, KC ve MCP-1 sekresyonunu etkilemedi. Ancak daha önce 5 µM Pegile Lipozomal Doksorubisin uygulanan primer tümör CM uyarımı ile tüm gruplarda, tümör hücre sekretomlarına bağlı IL-6, MIP-2, KC ve MCP-1 sekresyonundaki artışlar belirgin şekilde baskılandı.

Kanser ile Schwann hücrelerin karşılıklı olarak birbirini etkilediği ve bu etkileşimin kanserin ilerlemesine katkı sağladığına dair çalışmalar bulunmaktadır. Bizim çalışmamızda ise, metastatik meme kanseri ile Schwann hücrelerinin aktifleştiği ve bu etkileşimde CD200 ligandının rol oynayabileceği gösterilmiştir. Ancak, metastatik meme kanseri ve Schwann hücreleri arasındaki bu etkileşimi ve CD200 molekülünün süreçteki etkilerini inceleyen başka bir çalışma bulunmamaktadır. Bu bağlamda, sonuçlarımızın özellikle immünolojik etkilerinin ve moleküler mekanizmalarının daha derinlemesine incelenmesi ve bu süreçlerin hangi koşullarda terapötik hedefler olarak kullanılabileceğinin belirlenmesi için ek araştırmalara duyulan ihtiyaç açıkça ortaya çıkmaktadır.

KAYNAKLAR

Acharyya, S., Oskarsson, T., Vanharanta, S., Malladi, S., Kim, J., Morris, P. G., Manova Todorova, K., Leversha, M., Hogg, N., Seshan, V. E., Norton, L., Brogi, E., & Massagué, J. (2012). A CXCL1 paracrine network links cancer chemoresistance and metastasis. *Cell*, 150(1), 165-178.

Adembri, C., Selmi, V., Vitali, L., Tani, A., Margheri, M., Loriga, B., Carlucci, M., Nosi, D., Formigli, L., & De Gaudio, A. R. (2014). Minocycline but not tigecycline is neuroprotective and reduces the neuroinflammatory response induced by the superimposition of sepsis upon traumatic brain injury. *Critical Care Medicine*, 42(8), e570-e582.

Allen, J. K., Armaiz-Pena, G. N., Nagaraja, A. S., Sadaoui, N. C., Ortiz, T., Dood, R., Ozcan, M., Herder, D. M., Haemmerle, M., Gharpure, K. M., Rupaimoole, R., Previs, R. A., Wu, S. Y., Pradeep, S., Xu, X., Han, H. D., Zand, B., Dalton, H. J., Taylor, M., Sood, A. K. (2018). Sustained adrenergic signaling promotes intratumoral innervation through BDNF induction. *Cancer Research*, 78(12), 3233-3242.

A, L., Xu, W., Zhao, J., Li, C., Qi, M., Li, X., Wang, L., & Zhou, Y. (2018). Surface functionalization of TiO₂ nanotubes with minocycline and its in vitro biological effects on Schwann cells. *Biomedical Engineering Online*, 17(1), 88.

Arcamone, F., Cassinelli, G., Fantini, G., Grein, A., Orezzi, P., Pol, C., & Spalla, C. (1969). Adriamycin, 14-hydroxydaunomycin, a new antitumor antibiotic from *S. peucetius* var. *caesius*. *Biotechnology and Bioengineering*, 11(6), 1101-1110.

Aref, S., Azmy, E., El-Bakry, K., Ibrahim, L., & Abdel Aziz, S. (2017). Prognostic impact of CD200 and CD56 expression in pediatric B-cell acute lymphoblastic leukemia patients. *Pediatric Hematology and Oncology*, 34(5), 275-285.

Arthur-Farraj, P. J., Latouche, M., Wilton, D. K., Quintes, S., Chabrol, E., Banerjee, A., Woodhoo, A., Jenkins, B., Rahman, M., Turmaine, M., Wicher, G. K., Mitter, R., Greensmith, L., Behrens, A., Raivich, G., Mirsky, R., & Jessen, K. R. (2012). c-Jun reprograms Schwann cells of injured nerves to generate a repair cell essential for regeneration. *Neuron*, 75(4), 633-647.

Ayala, G. E., Dai, H., Powell, M., Li, R., Ding, Y., Wheeler, T. M., Shine, D.,

Kadmon, D., Thompson, T., Miles, B. J., Ittmann, M. M., & Rowley, D. (2008). Cancer-related axonogenesis and neurogenesis in prostate cancer. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 14(23), 7593-7603.

Balkwill, F. (2004). Cancer and the chemokine network. *Nature Reviews. Cancer*, 4(7), 540-550.

Balkwill, F. (2006). TNF-alpha in promotion and progression of cancer. *Cancer Metastasis Reviews*, 25(3), 409-416.

Balkwill, F., & Mantovani, A. (2001). Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet*, 357(9255), 539-545.

Balkwill, F. R. (1992). Tumour necrosis factor and cancer. *Progress in Growth Factor Research*, 4(2), 121-137.

Barclay, A. N., Wright, G. J., Brooke, G., & Brown, M. H. (2002). CD200 and membrane protein interactions in the control of myeloid cells. *Trends in Immunology*, 23(6), 285-290.

Barenholz, Y. (2012). Doxil®--the first FDA-approved nano-drug: lessons learned. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 160(2), 117-134.

Bartolomé, M. V., Ibáñez-Olías, M. A., & Gil-Loyzaga, P. (2002). Transitional expression of OX-2 and GAP-43 glycoproteins in developing rat cochlear nerve fibers. *Histology and Histopathology*, 17(1), 83-95.

Barzaman, K., Karami, J., Zarei, Z., Hosseinzadeh, A., Kazemi, M. H., Moradi-Kalbolandi, S., Safari, E., & Farahmand, L. (2020). Breast cancer: Biology, biomarkers, and treatments. *International Immunopharmacology*, 84(106535), 106535.

Bellail, A. C., Qi, L., Mulligan, P., Chhabra, V., & Hao, C. (2009). TRAIL agonists on clinical trials for cancer therapy: the promises and the challenges. *Reviews on Recent Clinical Trials*, 4(1), 34-41.

Ben-Baruch, A. (2022). Tumor necrosis factor α : Taking a personalized road in cancer therapy. *Frontiers in Immunology*, 13, 903679.

Berraondo, P., Sanmamed, M. F., Ochoa, M. C., Etxeberria, I., Aznar, M. A., Pérez-Gracia, J. L., Rodríguez-Ruiz, M. E., Ponz-Sarvisé, M., Castañón, E., & Melero, I. (2019). Cytokines in clinical cancer immunotherapy. *British Journal of Cancer*, 120(1), 6-15.

Bhatheja, K., & Field, J. (2006). Schwann cells: origins and role in axonal maintenance and regeneration. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 38(12), 1995-1999.

Bhusal, R. P., Foster, S. R., & Stone, M. J. (2020). Structural basis of chemokine and receptor interactions: Key regulators of leukocyte recruitment in inflammatory responses. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, 29(2), 420-432.

Bolin, L. M., Verity, A. N., Silver, J. E., Shooter, E. M., & Abrams, J. S. (1995). Interleukin-6 production by Schwann cells and induction in sciatic nerve injury. *Journal of Neurochemistry*, 64(2), 850-858.

Bortolanza, M., Nascimento, G. C., Socias, S. B., Ploper, D., Chehín, R. N., Raisman-Vozari, R., & Del-Bel, E. (2018). Tetracycline repurposing in neurodegeneration: focus on Parkinson's disease. *Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria)*, 125(10), 1403-1415.

Boudakov, I., Liu, J., Fan, N., Gulay, P., Wong, K., & Gorczynski, R. M. (2007). Mice lacking CD200R1 show absence of suppression of lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha and mixed leukocyte culture responses by CD200. *Transplantation*, 84(2), 251-257.

Brennen, W. N., Isaacs, J. T., & Denmeade, S. R. (2012). Rationale behind targeting fibroblast activation protein-expressing carcinoma-associated fibroblasts as a novel chemotherapeutic strategy. *Molecular Cancer Therapeutics*, 11(2), 257-266.

Briukhovetska, D., Dörr, J., Endres, S., Libby, P., Dinarello, C. A., & Kobold, S. (2021). Interleukins in cancer: from biology to therapy. *Nature Reviews. Cancer*, 21(8), 481-499.

Brockmann, H. (1963). Anthracyclinones and anthracyclines. (rhodomycinone, pyrromycinone and their glycosides). *Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe [Progress in the chemistry of organic natural products]*, 21, 121-182.

Broderick, C., Hoek, R. M., Forrester, J. V., Liversidge, J., Sedgwick, J. D., & Dick,

A. D. (2002). Constitutive retinal CD200 expression regulates resident microglia and activation state of inflammatory cells during experimental autoimmune uveoretinitis. *The American Journal of Pathology*, 161(5), 1669-1677.

Brown, J. M., Recht, L., & Strober, S. (2017). The promise of targeting macrophages in cancer therapy. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 23(13), 3241-3250.

Budni, J., Garcez, M. L., de Medeiros, J., Cassaro, E., Bellettini-Santos, T., Mina, F., & Quevedo, J. (2016). The anti-inflammatory role of minocycline in Alzheimer's disease. *Current Alzheimer Research*, 13(12), 1319-1329.

Bunimovich, Y. L., Keskinov, A. A., Shurin, G. V., & Shurin, M. R. (2017). Schwann cells: a new player in the tumor microenvironment. *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII*, 66(8), 959-968.

Burke, J. D., & Young, H. A. (2019). IFN- γ : A cytokine at the right time, is in the right place. *Seminars in Immunology*, 43(101280), 101280.

Chang, C. H., Hsiao, C. F., Yeh, Y. M., Chang, G. C., Tsai, Y. H., Chen, Y. M., Huang, M. S., Chen, H. L., Li, Y. J., Yang, P. C., Chen, C. J., Hsiung, C. A., & Su, W. C. (2013). Circulating interleukin-6 level is a prognostic marker for survival in advanced nonsmall cell lung cancer patients treated with chemotherapy. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, 132(9), 1977-1985.

Chang, C.-Y., Lee, Y.-H., Jiang-Shieh, Y.-F., Chien, H.-F., Pai, M.-H., Chen, H.-M., Fong, T.-H., & Wu, C.-H. (2011). Novel distribution of cluster of differentiation 200 adhesion molecule in glial cells of the peripheral nervous system of rats and its modulation after nerve injury. *Neuroscience*, 183, 32-46.

Cheng, K.-I., Wang, H.-C., Wu, Y.-C., Tseng, K.-Y., Chuang, Y.-T., Chou, C.-W., Chen, P.-L., Chang, L.-L., & Lai, C.-S. (2016). Sciatic nerve intrafascicular lidocaine injection-induced peripheral neuropathic pain: Alleviation by systemic minocycline administration. *The Clinical Journal of Pain*, 32(6), 513-521.

Cheng, W.-L., Wang, C.-S., Huang, Y.-H., Tsai, M.-M., Liang, Y., & Lin, K.-H. (2011). Overexpression of CXCL1 and its receptor CXCR2 promote tumor invasion in gastric cancer. *Annals of Oncology*, 22(10), 2267-2276.

Chen, M., Ona, V. O., Li, M., Ferrante, R. J., Fink, K. B., Zhu, S., Bian, J., Guo, L.,

Farrell, L. A., Hersch, S. M., Hobbs, W., Vonsattel, J. P., Cha, J. H., & Friedlander, R. M. (2000). Minocycline inhibits caspase-1 and caspase-3 expression and delays mortality in a transgenic mouse model of Huntington disease. *Nature Medicine*, 6(7), 797-801.

Chen, X., & Song, E. (2019). Turning foes to friends: targeting cancer-associated fibroblasts. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 18(2), 99-115.

Chen, Z., Kapus, A., Khatri, I., Kos, O., Zhu, F., & Gorczynski, R. M. (2018). Cell membrane-bound CD200 signals both via an extracellular domain and following nuclear translocation of a cytoplasmic fragment. *Leukemia Research*, 69, 72-80.

Chitnis, T., Imitola, J., Wang, Y., Elyaman, W., Chawla, P., Sharuk, M., Raddassi, K., Bronson, R. T., & Khoury, S. J. (2007). Elevated neuronal expression of CD200 protects Wlds mice from inflammation-mediated neurodegeneration. *The American Journal of Pathology*, 170(5), 1695-1712.

Choe, D., & Choi, D. (2023). Cancel cancer: The immunotherapeutic potential of CD200/CD200R blockade. *Frontiers in Oncology*, 13, 1088038.

Ciummo, S. L., D'Antonio, L., Sorrentino, C., Fieni, C., Lanuti, P., Stassi, G., Todaro, M., & Di Carlo, E. (2021). The C-X-C motif chemokine ligand 1 sustains breast cancer stem cell self-renewal and promotes tumor progression and immune escape programs. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 689286.

Çopuroğlu, F. E., Hapil, F. Z., Yoldaş, Ş. B., & Özeş, O. N. (2021). Positive regulation of TNFR1 signaling via SH3 recognition motif. *Türk Biyoloji Dergisi [Turkish Journal of Biology]*, 45(1), 171-179.

Couve, E., Lovera, M., Suzuki, K., & Schmachtenberg, O. (2018). Schwann cell phenotype changes in aging human dental pulp. *Journal of Dental Research*, 97(3), 347-355.

Cox, F. F., Carney, D., Miller, A.-M., & Lynch, M. A. (2012). CD200 fusion protein decreases microglial activation in the hippocampus of aged rats. *Brain, Behavior, and Immunity*, 26(5), 789-796.

Croft, M., Salek-Ardakani, S., & Ware, C. F. (2024). Targeting the TNF and TNFR superfamilies in autoimmune disease and cancer. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 23(12), 939-961.

Cruceriu, D., Baldasici, O., Balacescu, O., & Berindan-Neagoe, I. (2020). The dual role of tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) in breast cancer: molecular insights and therapeutic approaches. *Cellular Oncology*, 43(1), 1-18.

Dean, O. M., Data-Franco, J., Giorlando, F., & Berk, M. (2012). Minocycline: therapeutic potential in psychiatry. *CNS Drugs*, 26(5), 391-401.

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

Deborde, S., & Wong, R. J. (2017). How Schwann cells facilitate cancer progression in nerves. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 74(24), 4405-4420.

Deborde, S., & Wong, R. J. (2022). The role of Schwann cells in cancer. *Advanced Biology*, 6(9), e2200089.

De Larco, J. E., Wuertz, B. R. K., & Furcht, L. T. (2004). The potential role of neutrophils in promoting the metastatic phenotype of tumors releasing interleukin-8. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 10(15), 4895-4900.

Demir, I. E., Boldis, A., Pfitzinger, P. L., Teller, S., Brunner, E., Klose, N., Kehl, T., Maak, M., Lesina, M., Laschinger, M., Janssen, K.-P., Algül, H., Friess, H., & Ceyhan, G. O. (2014). Investigation of Schwann cells at neoplastic cell sites before the onset of cancer invasion. *Journal of the National Cancer Institute*, 106(8). <https://doi.org/10.1093/jnci/dju184>

DeNardo, D. G., & Ruffell, B. (2019). Macrophages as regulators of tumour immunity and immunotherapy. *Nature Reviews. Immunology*, 19(6), 369-382.

Dent, R., Trudeau, M., Pritchard, K. I., Hanna, W. M., Kahn, H. K., Sawka, C. A., Lickley, L. A., Rawlinson, E., Sun, P., & Narod, S. A. (2007). Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 13(15 Pt 1), 4429-4434.

Deshmane, S. L., Kremlev, S., Amini, S., & Sawaya, B. E. (2009). Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *Journal of Interferon & Cytokine*

Research: The Official Journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research, 29(6), 313-326.

de Sousa Pereira, A. (1946). A basis for sympathectomy for cancer of the cervix uteri. Archives of Surgery, 52, 260-285.

Dinarello, C. A. (2009). Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. Annual Review of Immunology, 27(1), 519-550.

Diwanji, R., O'Brien, N. A., Choi, J. E., Nguyen, B., Laszewski, T., Grauel, A. L., Yan, Z., Xu, X., Wu, J., Ruddy, D. A., Piquet, M., Pelletier, M. R., Savchenko, A., Charette, L., Rodrik-Outmezguine, V., Baum, J., Millholland, J. M., Wong, C. C., Martin, A.-M., Jayaraman, P. (2023). Targeting the IL1 β pathway for cancer immunotherapy remodels the tumor microenvironment and enhances antitumor immune responses. Cancer Immunology Research, 11(6), 777-791.

Driscoll, K. E. (1994). Macrophage inflammatory proteins: biology and role in pulmonary inflammation. Experimental Lung Research, 20(6), 473-490.

Duggan, S. T., & Keating, G. M. (2011). Pegylated liposomal doxorubicin: a review of its use in metastatic breast cancer, ovarian cancer, multiple myeloma and AIDS-related Kaposi's sarcoma. Drugs, 71(18), 2531-2558.

Dutta, P., Sarkissyan, M., Paico, K., Wu, Y., & Vadgama, J. V. (2018). MCP-1 is overexpressed in triple-negative breast cancers and drives cancer invasiveness and metastasis. Breast Cancer Research and Treatment, 170(3), 477-486.

Eriksson, M., Lindh, B., Uvnäs-Moberg, K., & Hökfelt, T. (1996). Distribution and origin of peptide-containing nerve fibres in the rat and human mammary gland. Neuroscience, 70(1), 227-245.

Erin, N., Dilmaç, S., Curry, A., Duymuş, Ö., Tanrıöver, G., Prodeus, A., Gariepy, J., & Gorczynski, R. M. (2020). CD200 mimetic aptamer PEG-M49 markedly increases the therapeutic effects of pegylated liposomal doxorubicin in a mouse model of metastatic breast carcinoma: an effect independent of CD200 receptor 1. Cancer Immunology, Immunotherapy: CII, 69(1), 103-114.

Erin, N., Kale, S., Tanrıöver, G., Köksoy, S., Duymuş, O., & Korcum, A. F. (2013). Differential characteristics of heart, liver, and brain metastatic subsets of murine breast carcinoma. Breast Cancer Research and Treatment, 139(3), 677-689.

Erin, N., Podnos, A., Tanriover, G., Duymuş, Ö., Cote, E., Khatri, I., & Gorczynski, R. M. (2015). Bidirectional effect of CD200 on breast cancer development and metastasis, with ultimate outcome determined by tumor aggressiveness and a cancer-induced inflammatory response. *Oncogene*, 34(29), 3860-3870.

Erin, N., Tanrıöver, G., Curry, A., Akman, M., Duymuş, Ö., & Gorczynski, R. (2018). CD200fc enhances anti-tumoral immune response and inhibits visceral metastasis of breast carcinoma. *Oncotarget*, 9(27), 19147-19158.

Fan, R., Xu, F., Previti, M. L., Davis, J., Grande, A. M., Robinson, J. K., & Van Nostrand, W. E. (2007). Minocycline reduces microglial activation and improves behavioral deficits in a transgenic model of cerebral microvascular amyloid. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 27(12), 3057-3063.

Ferdoushi, A., Li, X., Griffin, N., Faulkner, S., Jamaluddin, M. F. B., Gao, F., Jiang, C. C., van Helden, D. F., Tanwar, P. S., Jobling, P., & Hondermarck, H. (2020). Schwann cell stimulation of pancreatic cancer cells: A proteomic analysis. *Frontiers in Oncology*, 10, 1601.

Fernandes, Q., Inchakalody, V. P., Bedhiafi, T., Mestiri, S., Taib, N., Uddin, S., Merhi, M., & Dermime, S. (2024). Chronic inflammation and cancer; the two sides of a coin. *Life Sciences*, 338, 122390.

Fornari, F. A., Randolph, J. K., Yalowich, J. C., Ritke, M. K., & Gewirtz, D. A. (1994). Interference by doxorubicin with DNA unwinding in MCF-7 breast tumor cells. *Molecular Pharmacology*, 45(4), 649-656.

Gaggioli, C., Hooper, S., Hidalgo-Carcedo, C., Grosse, R., Marshall, J. F., Harrington, K., & Sahai, E. (2007). Fibroblast-led collective invasion of carcinoma cells with differing roles for RhoGTPases in leading and following cells. *Nature Cell Biology*, 9(12), 1392-1400.

Garlanda, C., & Mantovani, A. (2021). Interleukin-1 in tumor progression, therapy, and prevention. *Cancer Cell*, 39(8), 1023-1027.

Garrido-Castro, A. C., Lin, N. U., & Polyak, K. (2019). Insights into molecular classifications of triple-negative breast cancer: Improving patient selection for treatment. *Cancer Discovery*, 9(2), 176-198.

- Gaudet, A. D.,** Popovich, P. G., & Ramer, M. S. (2011). Wallerian degeneration: gaining perspective on inflammatory events after peripheral nerve injury. *Journal of Neuroinflammation*, 8(1), 110.
- Gelfo, V.,** Romaniello, D., Mazzeschi, M., Sgarzi, M., Grilli, G., Morselli, A., Manzan, B., Rihawi, K., & Lauriola, M. (2020). Roles of IL-1 in cancer: From tumor progression to resistance to targeted therapies. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(17), 6009.
- Giaquinto, A. N.,** Sung, H., Newman, L. A., Freedman, R. A., Smith, R. A., Star, J., Jemal, A., & Siegel, R. L. (2024). Breast cancer statistics 2024. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 74(6), 477-495.
- Glenn, T. D.,** & Talbot, W. S. (2013). Signals regulating myelination in peripheral nerves and the Schwann cell response to injury. *Current Opinion in Neurobiology*, 23(6), 1041-1048.
- Goldberg, J. E.,** & Schwertfeger, K. L. (2010). Proinflammatory cytokines in breast cancer: mechanisms of action and potential targets for therapeutics. *Current Drug Targets*, 11(9), 1133-1146.
- Gorczynski, R.,** Chen, Z., Kai, Y., Lee, L., Wong, S., & Marsden, P. A. (2004). CD200 is a ligand for all members of the CD200R family of immunoregulatory molecules. *The Journal of Immunology*, 172(12), 7744-7749.
- Gorczynski, R. M.,** Cattral, M. S., Chen, Z., Hu, J., Lei, J., Min, W. P., Yu, G., & Ni, J. (1999). An immunoadhesin incorporating the molecule OX-2 is a potent immunosuppressant that prolongs allo- and xenograft survival. *The Journal of Immunology*, 163(3), 1654-1660.
- Gorczynski, R. M.,** Chen, Z., He, W., Khatri, I., Sun, Y., Yu, K., & Boudakov, I. (2009). Expression of a CD200 transgene is necessary for induction but not maintenance of tolerance to cardiac and skin allografts. *The Journal of Immunology*, 183(3), 1560-1568.
- Gorczynski, R. M.,** Erin, N., Maqbool, T., Gorczynski, C. P., & Gorczynski, L. Y. (2018). Characterization of an in vitro model system to explore control of tumor invasion of EMT6 and 4THM breast tumors by CD200:CD200R interactions. *Breast Cancer (Tokyo, Japan)*, 25(5), 547-559.

Grell, M., Zimmermann, G., Hülser, D., Pfizenmaier, K., & Scheurich, P. (1994). TNF receptors TR60 and TR80 can mediate apoptosis via induction of distinct signal pathways. *The Journal of Immunology*, 153(5), 1963-1972.

Grivennikov, S. I., Greten, F. R., & Karin, M. (2010). Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*, 140(6), 883-899.

Grivennikov, S., Karin, E., Terzic, J., Mucida, D., Yu, G.-Y., Vallabhapurapu, S., Scheller, J., Rose-John, S., Cheroutre, H., Eckmann, L., & Karin, M. (2009). IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer. *Cancer Cell*, 15(2), 103-113.

Guillemot-Legris, O., Girmahun, G., Shipley, R. J., & Phillips, J. B. (2023). Local administration of minocycline improves nerve regeneration in two rat nerve injury models. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(15). <https://doi.org/10.3390/ijms241512085>

Gysler, S. M., & Drapkin, R. (2021). Tumor innervation: peripheral nerves take control of the tumor microenvironment. *The Journal of Clinical Investigation*, 131(11). <https://doi.org/10.1172/JCI147276>

Hehlgans, T., & Pfeffer, K. (2005). The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology*, 115(1), 1-20.

Hernandez, R., Pöder, J., LaPorte, K. M., & Malek, T. R. (2022). Engineering IL-2 for immunotherapy of autoimmunity and cancer. *Nature Reviews. Immunology*, 22(10), 614-628.

He, S., Chen, C.-H., Deborde, S., Bakst, R. L., Chernichenko, N., McNamara, W. F., Lee, S. Y., Barajas, F., Yu, Z., Al-Ahmadie, H. A., & Wong, R. J. (2015). The chemokine (CCL2-CCR2) signaling axis mediates perineural invasion. *Molecular Cancer Research: MCR*, 13(2), 380-390.

Højberg, L., Bastholt, L., & Schmidt, H. (2012). Interleukin-6 and melanoma. *Melanoma Research*, 22(5), 327-333.

Hoek, R. M., Ruuls, S. R., Murphy, C. A., Wright, G. J., Goddard, R., Zurawski, S. M., Blom, B., Homola, M. E., Streit, W. J., Brown, M. H., Barclay, A. N., & Sedgwick, J. D. (2000). Down-regulation of the macrophage lineage through interaction with

OX2 (CD200). *Science* (New York, N.Y.), 290(5497), 1768-1771.

Hojilla, C. V., Wood, G. A., & Khokha, R. (2008). Inflammation and breast cancer: metalloproteinases as common effectors of inflammation and extracellular matrix breakdown in breast cancer. *Breast Cancer Research: BCR*, 10(2), 205.

Hol, J., Wilhelmsen, L., & Haraldsen, G. (2010). The murine IL-8 homologues KC, MIP-2, and LIX are found in endothelial cytoplasmic granules but not in Weibel-Palade bodies. *Journal of Leukocyte Biology*, 87(3), 501-508.

Holmannová, D., Kolácková, M., Kondelková, K., Kunes, P., Krejsek, J., & Ctírad, A. (2012). CD200/CD200R paired potent inhibitory molecules regulating immune and inflammatory responses; Part II: CD200/CD200R potential clinical applications. *Acta Medica (Hradec Kralove)*, 55(2), 59-65.

Huang, T., Fan, Q., Wang, Y., Cui, Y., Wang, Z., Yang, L., Sun, X., & Wang, Y. (2020). Schwann cell-derived CCL2 promotes the perineural invasion of cervical cancer. *Frontiers in Oncology*, 10, 19.

Hughes, C. E., & Nibbs, R. J. B. (2018). A guide to chemokines and their receptors. *The FEBS Journal*, 285(16), 2944-2971.

Hwang, R. F., Moore, T., Arumugam, T., Ramachandran, V., Amos, K. D., Rivera, A., Ji, B., Evans, D. B., & Logsdon, C. D. (2008). Cancer-associated stromal fibroblasts promote pancreatic tumor progression. *Cancer Research*, 68(3), 918-926.

Jessen, K. R., & Arthur-Farraj, P. (2019). Repair Schwann cell update: Adaptive reprogramming, EMT, and stemness in regenerating nerves. *Glia*, 67(3), 421-437.

Jessen, K. R., & Mirsky, R. (2005). The origin and development of glial cells in peripheral nerves. *Nature Reviews. Neuroscience*, 6(9), 671-682.

Jessen, K. R., & Mirsky, R. (2016). The repair Schwann cell and its function in regenerating nerves. *The Journal of Physiology*, 594(13), 3521-3531.

Jessen, K. R., Mirsky, R., & Lloyd, A. C. (2015). Schwann cells: Development and role in nerve repair. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(7), a020487.

Jobling, P., Pundavela, J., Oliveira, S. M. R., Roselli, S., Walker, M. M., & Hondermarck, H. (2015). Nerve-cancer cell cross-talk: A novel promoter of tumor progression. *Cancer Research*, 75(9), 1777-1781.

- Johnson, D. E.,** O’Keefe, R. A., & Grandis, J. R. (2018). Targeting the IL-6/JAK/STAT3 signalling axis in cancer. *Nature Reviews. Clinical Oncology*, 15(4), 234-248.
- Kang, W.,** Wang, C., Wang, M., Liu, M., Hu, W., Liang, X., Yang, J., & Zhang, Y. (2024). A key regulator of tumor-associated neutrophils: the CXCR2 chemokine receptor. *Journal of Molecular Histology*, 55(6), 1051-1061.
- Kartikasari, A. E. R.,** Huertas, C. S., Mitchell, A., & Plebanski, M. (2021). Tumor-induced inflammatory cytokines and the emerging diagnostic devices for cancer detection and prognosis. *Frontiers in Oncology*, 11, 692142.
- Keilhoff, G.,** Langnaese, K., Wolf, G., & Fansa, H. (2007). Inhibiting effect of minocycline on the regeneration of peripheral nerves. *Developmental Neurobiology*, 67(10), 1382-1395.
- Keilhoff, G.,** Schild, L., & Fansa, H. (2008). Minocycline protects Schwann cells from ischemia-like injury and promotes axonal outgrowth in bioartificial nerve grafts lacking Wallerian degeneration. *Experimental Neurology*, 212(1), 189-200.
- Kelly, M. G.,** Alvero, A. B., Chen, R., Silasi, D.-A., Abrahams, V. M., Chan, S., Visintin, I., Rutherford, T., & Mor, G. (2006). TLR-4 signaling promotes tumor growth and paclitaxel chemoresistance in ovarian cancer. *Cancer Research*, 66(7), 3859-3868.
- Kelso, A.** (2000). Cytokines and their receptors: an overview. *Therapeutic Drug Monitoring*, 22(1), 40-43.
- Keskinov, A. A.,** Tapias, V., Watkins, S. C., Ma, Y., Shurin, M. R., & Shurin, G. V. (2016). Impact of the sensory neurons on melanoma growth in vivo. *PloS One*, 11(5), e0156095.
- Khusnurrokhman, G.,** & Wati, F. F. (2022). Tumor-promoting inflammation in lung cancer: A literature review. *Annals of Medicine and Surgery* (2012), 79(104022), 104022.
- Kidd, G. J.,** Ohno, N., & Trapp, B. D. (2013). Biology of Schwann cells. *Handbook of Clinical Neurology*, 115, 55-79.
- Kinoshita, S.,** Terai, T., Nagai, M., Nakamura, K., Kohara, Y., Yasuda, S., Matsuo, Y., Doi, S., Sakata, T., Migita, K., Ouji-Sageshima, N., Ito, T., & Sho, M. (2024).

Clinical significance and therapeutic implication of CD200 in pancreatic cancer. *Et Al [Pancreatology]*, 24(8), 1280-1287.

Kobayashi, K., Imagama, S., Ohgomori, T., Hirano, K., Uchimura, K., Sakamoto, K., Hirakawa, A., Takeuchi, H., Suzumura, A., Ishiguro, N., & Kadomatsu, K. (2013). Minocycline selectively inhibits M1 polarization of microglia. *Cell Death & Disease*, 4(3), e525.

Kobayashi, Y. (2008). The role of chemokines in neutrophil biology. *Frontiers in Bioscience*, 13(13), 2400-2407.

Koning, N., Swaab, D. F., Hoek, R. M., & Huitinga, I. (2009). Distribution of the immune inhibitory molecules CD200 and CD200R in the normal central nervous system and multiple sclerosis lesions suggests neuron-glia and glia-glia interactions. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 68(2), 159-167.

Korbecki, J., Bosiacki, M., Barczak, K., Łagocka, R., Brodowska, A., Chlubek, D., & Baranowska-Bosiacka, I. (2023). Involvement in tumorigenesis and clinical significance of CXCL1 in reproductive cancers: Breast cancer, cervical cancer, endometrial cancer, ovarian cancer and prostate cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(8). <https://doi.org/10.3390/ijms24087262>

Korbecki, J., Bosiacki, M., Szatkowska, I., Kupnicka, P., Chlubek, D., & Baranowska-Bosiacka, I. (2024). The clinical significance and involvement in molecular cancer processes of chemokine CXCL1 in selected tumors. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(8). <https://doi.org/10.3390/ijms25084365>

Korbecki, J., Kupnicka, P., Chlubek, M., Gorący, J., Gutowska, I., & Baranowska-Bosiacka, I. (2022). CXCR2 receptor: Regulation of expression, signal transduction, and involvement in cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(4), 2168.

Kumari, N., Dwarakanath, B. S., Das, A., & Bhatt, A. N. (2016). Role of interleukin-6 in cancer progression and therapeutic resistance. *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 37(9), 11553-11572.

Kunze, C., Mentzel, H.-J., Krishnamurthy, R., Fleck, R., Stenzel, M., Bhargava, R., Burrowes, D., Sutter, G., Schultze-Mosgau, M., Santiuste, M., & Hahn, G. (2016). Pharmacokinetics and safety of macrocyclic gadobutrol in children aged younger than

2 years including term newborns in comparison to older populations. *Investigative Radiology*, 51(1), 50-57.

Labernadie, A., Kato, T., Brugués, A., Serra-Picamal, X., Derzsi, S., Arwert, E., Weston, A., González-Tarragó, V., Elosegui-Artola, A., Albertazzi, L., Alcaraz, J., Roca-Cusachs, P., Sahai, E., & Trepac, X. (2017). A mechanically active heterotypic E-cadherin/N-cadherin adhesion enables fibroblasts to drive cancer cell invasion. *Nature Cell Biology*, 19(3), 224-237.

Lakins, M. A., Ghorani, E., Munir, H., Martins, C. P., & Shields, J. D. (2018). Cancer-associated fibroblasts induce antigen-specific deletion of CD8 + T Cells to protect tumour cells. *Nature Communications*, 9(1), 948.

Lauzon-Joset, J.-F., Marsolais, D., Tardif-Pellerin, É., Patoine, D., & Bissonnette, E. Y. (2019). CD200 in asthma. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 112, 141-144.

Lee, K.-L., Kuo, Y.-C., Ho, Y.-S., & Huang, Y.-H. (2019). Triple-negative breast cancer: Current understanding and future therapeutic breakthrough targeting cancer stemness. *Cancers*, 11(9), 1334.

Lejeune, F. J., & Rüegg, C. (2006). Recombinant human tumor necrosis factor: an efficient agent for cancer treatment. *Bulletin Du Cancer*, 93(8), E90-E100.

Li, L., Tian, Y., Shi, C., Zhang, H., & Zhou, Z. (2016). Over-expression of CD200 predicts poor prognosis in cutaneous squamous cell carcinoma. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 22, 1079-1084.

Lim, S. Y., Yuzhalin, A. E., Gordon-Weeks, A. N., & Muschel, R. J. (2016). Targeting the CCL2-CCR2 signaling axis in cancer metastasis. *Oncotarget*, 7(19), 28697-28710.

Liu, J.-F., Chen, P.-C., Chang, T.-M., & Hou, C.-H. (2020). Monocyte Chemoattractant Protein-1 promotes cancer cell migration via c-Raf/MAPK/AP-1 pathway and MMP-9 production in osteosarcoma. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research: CR*, 39(1), 254.

Liu, J.-Q., Hu, A., Zhu, J., Yu, J., Talebian, F., & Bai, X.-F. (2020). CD200-CD200R pathway in the regulation of tumor immune microenvironment and immunotherapy. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1223, 155-165.

- Liu, J.-Q.,** Talebian, F., Wu, L., Liu, Z., Li, M.-S., Wu, L., Zhu, J., Markowitz, J., Carson, W. E., 3rd, Basu, S., & Bai, X.-F. (2016). A critical role for CD200R signaling in limiting the growth and metastasis of CD200+ melanoma. *The Journal of Immunology*, 197(4), 1489-1497.
- Lo, H.-M.,** Lai, T.-H., Li, C.-H., & Wu, W.-B. (2014). TNF- α induces CXCL1 chemokine expression and release in human vascular endothelial cells in vitro via two distinct signaling pathways. *Acta Pharmacologica Sinica*, 35(3), 339-350.
- Love, J. E.,** Thompson, K., Kilgore, M. R., Westerhoff, M., Murphy, C. E., Papanicolau-Sengos, A., McCormick, K. A., Shankaran, V., Vandeven, N., Miller, F., Blom, A., Nghiem, P. T., & Kussick, S. J. (2017). CD200 expression in neuroendocrine neoplasms. *American Journal of Clinical Pathology*, 148(3), 236-242.
- Lu, X., & Kang, Y.** (2007). Organotropism of breast cancer metastasis. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 12(2-3), 153-162.
- Macciò, A., & Madeddu, C.** (2013). The role of interleukin-6 in the evolution of ovarian cancer: clinical and prognostic implications--a review. *Journal of Molecular Medicine*, 91(12), 1355-1368.
- Madeo, M.,** Colbert, P. L., Vermeer, D. W., Lucido, C. T., Cain, J. T., Vichaya, E. G., Grossberg, A. J., Muirhead, D., Rickel, A. P., Hong, Z., Zhao, J., Weimer, J. M., Spanos, W. C., Lee, J. H., Dantzer, R., & Vermeer, P. D. (2018). Cancer exosomes induce tumor innervation. *Nature Communications*, 9(1), 4284.
- Manich, G.,** Recasens, M., Valente, T., Almolda, B., González, B., & Castellano, B. (2019). Role of the CD200-CD200R axis during homeostasis and neuroinflammation. *Neuroscience*, 405, 118-136.
- Mantovani, A.,** Allavena, P., Sica, A., & Balkwill, F. (2008). Cancer-related inflammation. *Nature*, 454(7203), 436-444.
- Martyn, G. V.,** Shurin, G. V., Keskinov, A. A., Bunimovich, Y. L., & Shurin, M. R. (2019). Schwann cells shape the neuro-immune environs and control cancer progression. *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII*, 68(11), 1819-1829.
- Matsuo, Y.,** Sho, M., Nomi, T., Hokuto, D., Yoshikawa, T., Kamitani, N., Nakamura, K., & Iwasa, Y. (2021). Clinical importance of CD200 expression in colorectal liver metastasis. *Annals of Surgical Oncology*, 28(9), 5362-5372.

- McKelvey, K. J.,** Hudson, A. L., Back, M., Eade, T., & Diakos, C. I. (2018). Radiation, inflammation and the immune response in cancer. *Mammalian Genome: Official Journal of the International Mammalian Genome Society*, 29(11-12), 843-865.
- Miura, T.,** Mitsunaga, S., Ikeda, M., Shimizu, S., Ohno, I., Takahashi, H., Furuse, J., Inagaki, M., Higashi, S., Kato, H., Terao, K., & Ochiai, A. (2015). Characterization of patients with advanced pancreatic cancer and high serum interleukin-6 levels. *Pancreas*, 44(5), 756-763.
- Moertel, C. L.,** Xia, J., LaRue, R., Waldron, N. N., Andersen, B. M., Prins, R. M., Okada, H., Donson, A. M., Foreman, N. K., Hunt, M. A., Pennell, C. A., & Olin, M. R. (2014). CD200 in CNS tumor-induced immunosuppression: the role for CD200 pathway blockade in targeted immunotherapy. *Journal for Immunotherapy of Cancer*, 2(1), 46.
- Momparler, R. L.,** Karon, M., Siegel, S. E., & Avila, F. (1976). Effect of adriamycin on DNA, RNA, and protein synthesis in cell-free systems and intact cells. *Cancer Research*, 36(8), 2891-2895.
- Moreaux, J.,** Hose, D., Reme, T., Jourdan, E., Hundemer, M., Legouffe, E., Moine, P., Bourin, P., Moos, M., Corre, J., Möhler, T., De Vos, J., Rossi, J. F., Goldschmidt, H., & Klein, B. (2006). CD200 is a new prognostic factor in multiple myeloma. *Blood*, 108(13), 4194-4197.
- Morris, R. J., & Beech, J. N.** (1987). Sequential expression of OX2 and Thy-1 glycoproteins on the neuronal surface during development. An immunohistochemical study of rat cerebellum. *Developmental Neuroscience*, 9(1), 33-44.
- Mukaida, N., & Baba, T.** (2012). Chemokines in tumor development and progression. *Experimental Cell Research*, 318(2), 95-102.
- Murdoch, C.,** Muthana, M., Coffelt, S. B., & Lewis, C. E. (2008). The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. *Nature Reviews. Cancer*, 8(8), 618-631.
- Nagy, E. E.,** Frigy, A., Szász, J. A., & Horváth, E. (2020). Neuroinflammation and microglia/macrophage phenotype modulate the molecular background of post-stroke depression: A literature review. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 20(3), 2510-2523.

Nave, K.-A., & Schwab, M. H. (2005). Glial cells under remote control. *Nature Neuroscience*, 8(11), 1420-1422.

Neurath, M. F., & Finotto, S. (2011). IL-6 signaling in autoimmunity, chronic inflammation and inflammation-associated cancer. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 22(2), 83-89.

Nip, C., Wang, L., & Liu, C. (2023). CD200/CD200R: Bidirectional role in cancer progression and immunotherapy. *Biomedicines*, 11(12). <https://doi.org/10.3390/biomedicines11123326>

Oertel, H. (1928). Innervation and tumour growth: A preliminary report. *Canadian Medical Association Journal*, 18(2), 135-139.

Oertel, H. (1930). On the mechanism of cancer development. *Canadian Medical Association Journal*, 23(2), 183-189.

Otani, Y., Katayama, H., Zhu, Y., Huang, R., Shigehira, T., Shien, K., Suzawa, K., Yamamoto, H., Shien, T., Toyooka, S., & Fujimura, A. (2024). Adrenergic microenvironment driven by cancer-associated Schwann cells contributes to chemoresistance in patients with lung cancer. *Cancer Science*, 115(7), 2333-2345.

Ozaki, A., Nagai, A., Lee, Y. B., Myong, N. H., & Kim, S. U. (2008). Expression of cytokines and cytokine receptors in human Schwann cells. *Neuroreport*, 19(1), 31-35.

Ozga, A. J., Chow, M. T., & Luster, A. D. (2021). Chemokines and the immune response to cancer. *Immunity*, 54(5), 859-874.

Palomo Irigoyen, M., Tamayo Caro, M., Pérez Andrés, E., Barreira Manrique, A., Varela Rey, M., & Woodhoo, A. (2018). Isolation and purification of primary rodent Schwann cells. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1791, 81-93.

Pannunzio, B., Amo-Aparicio, J., Julián, C., López-Vales, R., Peluffo, H., & Lago, N. (2022). CD200R1 contributes to successful functional reinnervation after a sciatic nerve injury. *Cells (Basel, Switzerland)*, 11(11), 1786.

Park, M., Kim, D., Ko, S., Kim, A., Mo, K., & Yoon, H. (2022). Breast cancer metastasis: Mechanisms and therapeutic implications. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(12), 6806.

Petermann, K. B., Rozenberg, G. I., Zedek, D., Groben, P., McKinnon, K., Buehler, C., Kim, W. Y., Shields, J. M., Penland, S., Bear, J. E., Thomas, N. E., Serody, J. S.,

& Sharpless, N. E. (2007). CD200 is induced by ERK and is a potential therapeutic target in melanoma. *The Journal of Clinical Investigation*, 117(12), 3922-3929.

Ridker, P. M., Everett, B. M., Thuren, T., MacFadyen, J. G., Chang, W. H., Ballantyne, C., Fonseca, F., Nicolau, J., Koenig, W., Anker, S. D., Kastelein, J. J. P., Cornel, J. H., Pais, P., Pella, D., Genest, J., Cifkova, R., Lorenzatti, A., Forster, T., Kobalava, Z., CANTOS Trial Group. (2017). Antiinflammatory therapy with canakinumab for atherosclerotic disease. *The New England Journal of Medicine*, 377(12), 1119-1131.

Rivankar, S. (2014). An overview of doxorubicin formulations in cancer therapy. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 10(4), 853-858.

Rosenblum, M. D., Olasz, E. B., Yancey, K. B., Woodliff, J. E., Lazarova, Z., Gerber, K. A., & Truitt, R. L. (2004). Expression of CD200 on epithelial cells of the murine hair follicle: a role in tissue-specific immune tolerance? *The Journal of Investigative Dermatology*, 123(5), 880-887.

Rotshenker, S. (2011). Wallerian degeneration: the innate-immune response to traumatic nerve injury. *Journal of Neuroinflammation*, 8(1), 109.

Sarhadi, N. S., Shaw Dunn, J., Lee, F. D., & Soutar, D. S. (1996). An anatomical study of the nerve supply of the breast, including the nipple and areola. *British Journal of Plastic Surgery*, 49(3), 156-164.

Scapini, P., Morini, M., Tecchio, C., Minghelli, S., Di Carlo, E., Tanghetti, E., Albini, A., Lowell, C., Berton, G., Noonan, D. M., & Cassatella, M. A. (2004). CXCL1/macrophage inflammatory protein-2-induced angiogenesis in vivo is mediated by neutrophil-derived vascular endothelial growth factor-A. *The Journal of Immunology*, 172(8), 5034-5040.

Seifert, P., & Spitznas, M. (2001). Tumours may be innervated. *Virchows Archiv: An International Journal of Pathology*, 438(3), 228-231.

Shalapour, S., & Karin, M. (2019). Pas de deux: Control of anti-tumor immunity by cancer-associated inflammation. *Immunity*, 51(1), 15-26.

Shan, C., Wei, J., Hou, R., Wu, B., Yang, Z., Wang, L., Lei, D., & Yang, X. (2016). Schwann cells promote EMT and the Schwann-like differentiation of salivary adenoid cystic carcinoma cells via the BDNF/TrkB axis. *Oncology Reports*, 35(1), 427-435.

- Shin, S.-P.,** Goh, A.-R., Ju, J.-M., Kang, H.-G., Kim, S.-J., Kim, J.-K., Park, E.-J., Bae, Y.-S., Choi, K., Jung, Y.-S., & Lee, S.-J. (2021). Local adenoviral delivery of soluble CD200R-Ig enhances antitumor immunity by inhibiting CD200- β -catenin-driven M2 macrophage. *Molecular Therapy Oncolytics*, 23, 138-150.
- Shin, S.-P.,** Goh, A.-R., Kang, H.-G., Kim, S.-J., Kim, J.-K., Kim, K.-T., Lee, J. H., Bae, Y.-S., Jung, Y.-S., & Lee, S.-J. (2019). CD200 induces epithelial-to-mesenchymal transition in head and neck squamous cell carcinoma via β -catenin-mediated nuclear translocation. *Cancers*, 11(10), 1583.
- Shurin, G. V.,** Kruglov, O., Ding, F., Lin, Y., Hao, X., Keskinov, A. A., You, Z., Lokshin, A. E., LaFramboise, W. A., Falo, L. D., Jr, Shurin, M. R., & Bunimovich, Y. L. (2019). Melanoma-induced reprogramming of Schwann cell signaling aids tumor growth. *Cancer Research*, 79(10), 2736-2747.
- Shurin, M. R.,** Shurin, G. V., Zlotnikov, S. B., & Bunimovich, Y. L. (2020). The neuroimmune axis in the tumor microenvironment. *The Journal of Immunology*, 204(2), 280-285.
- Shurin, M.R.,** Wheeler, S., Shurin, G. V., Zhoungh H., & Zhou, Y. (2024). Schwann cells in the normal and pathological lung microenvironment. *Front Mol Biosci*.
- Siddiqui, Z.,** Equbal, Z., Muhammad, N., Usmani, D., Sankhwar, S. N., Rizvi, S. N. F., & Naeem, A. (2024). Cancer stem cells niche regulation within the tumor microenvironment. *Current Tissue Microenvironment Reports*, 5(2), 25-37.
- Silk, A. W.,** & Margolin, K. (2019). Cytokine therapy. *Hematology/oncology Clinics of North America*, 33(2), 261-274.
- Silva, V. M.,** Gomes, J. A., Tenório, L. P. G., de Omena Neta, G. C., da Costa Paixão, K., Duarte, A. K. F., da Silva, G. C. B., Ferreira, R. J. S., Koike, B. D. V., de Sales Marques, C., da Silva Miguel, R. D., de Queiroz, A. C., Pereira, L. X., & de Carvalho Fraga, C. A. (2019). Schwann cell reprogramming and lung cancer progression: a meta-analysis of transcriptome data. *Oncotarget*, 10(68), 7288-7307.
- Sitaru, S.,** Budke, A., Bertini, R., & Sperandio, M. (2023). Therapeutic inhibition of CXCR1/2: where do we stand? *Internal and Emergency Medicine*, 18(6), 1647-1664.
- Sokol, C. L., & Luster, A. D. (2015). The chemokine system in innate immunity. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(5), a016303.

- Solinas, G.,** Germano, G., Mantovani, A., & Allavena, P. (2009). Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. *Journal of Leukocyte Biology*, 86(5), 1065-1073.
- Sone, Y.,** Takatori, S., Ochi, E., Zamami, Y., Matsuyama, A., Fukuhara, S., Goda, M., Kitamura, Y., & Kawasaki, H. (2017). Nerve growth factor facilitates the innervation of perivascular nerves in tumor-derived neovasculature in the mouse cornea. *Pharmacology*, 99(1-2), 57-66.
- Stassart, R. M.,** Fledrich, R., Velanac, V., Brinkmann, B. G., Schwab, M. H., Meijer, D., Sereda, M. W., & Nave, K.-A. (2013). A role for Schwann cell-derived neuregulin-1 in remyelination. *Nature Neuroscience*, 16(1), 48-54.
- Stock, M. L.,** Fiedler, K. J., Acharya, S., Lange, J. K., Mlynarczyk, G. S. A., Anderson, S. J., McCormack, G. R., Kanuri, S. H., Kondru, N. C., Brewer, M. T., & Carlson, S. A. (2013). Antibiotics acting as neuroprotectants via mechanisms independent of their anti-infective activities. *Neuropharmacology*, 73, 174-182.
- Stokes, J. A.,** Arbogast, T. E., Moya, E. A., Fu, Z., & Powell, F. L. (2017). Minocycline blocks glial cell activation and ventilatory acclimatization to hypoxia. *Journal of Neurophysiology*, 117(4), 1625-1635.
- Stratton, J. A., & Shah, P. T.** (2016). Macrophage polarization in nerve injury: do Schwann cells play a role? *Neural Regeneration Research*, 11(1), 53-57.
- Su, D.,** Guo, X., Huang, L., Ye, H., Li, Z., Lin, L., Chen, R., & Zhou, Q. (2020). Tumor-neuroglia interaction promotes pancreatic cancer metastasis. *Theranostics*, 10(11), 5029-5047.
- Sun, L.,** Chen, S., & Chen, M. (2022). Schwann cells in the tumor microenvironment: Need more attention. *Journal of Oncology*, 2022, 1058667.
- Talebian, F.,** Liu, J.-Q., Liu, Z., Khatabi, M., He, Y., Ganju, R., & Bai, X.-F. (2012). Melanoma cell expression of CD200 inhibits tumor formation and lung metastasis via inhibition of myeloid cell functions. *PloS One*, 7(2), e31442.
- Tanaka, T.,** Narazaki, M., & Kishimoto, T. (2014). IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6(10), a016295.
- Taskinen, H. S., & R  ytt  , M.** (2000). Increased expression of chemokines (MCP-1, MIP-1  , RANTES) after peripheral nerve transection. *Journal of the Peripheral*

Nervous System: JPNS, 5(2), 75-81.

Tataranu, L. G., Turliuc, S., Kamel, A., Rizea, R. E., Dricu, A., Staicu, G.-A., Baloi, S. C., Rodriguez, S. M. B., & Manole, A. I. M. (2024). Glioblastoma tumor microenvironment: An important modulator for tumoral progression and therapy resistance. *Current Issues in Molecular Biology*, 46(9), 9881-9894.

Taveggia, C. (2016). Schwann cells–axon interaction in myelination. *Current opinion in neurobiology*, 39, 24-29.

Todorović-Raković, N., & Milovanović, J. (2013). Interleukin-8 in breast cancer progression. *Journal of Interferon & Cytokine Research: The Official Journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*, 33(10), 563-570.

Trayes, K. P., & Cokenakes, S. E. H. (2021). Breast cancer treatment. *American Family Physician*, 104(2), 171-178.

Tsukamoto, H., Fujieda, K., Senju, S., Ikeda, T., Oshiumi, H., & Nishimura, Y. (2018). Immune-suppressive effects of interleukin-6 on T-cell-mediated anti-tumor immunity. *Cancer Science*, 109(3), 523-530.

Tu, M. M., Abdel-Hafiz, H. A., Jones, R. T., Jean, A., Hoff, K. J., Duex, J. E., Chauca-Diaz, A., Costello, J. C., Dancik, G. M., Tamburini, B. A. J., Czerniak, B., Kaye, J., & Theodorescu, D. (2020). Inhibition of the CCL2 receptor, CCR2, enhances tumor response to immune checkpoint therapy. *Communications Biology*, 3(1), 720.

VAN DER Meer, J. W. M., Vogels, M. T. E., Netea, M. G., & Kullberg, B. J. (1998). Proinflammatory cytokines and treatment of disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 856(1), 243-251.

Vandooren, J., Knoop, S., Aldinucci Buzzo, J. L., Boon, L., Martens, E., Opdenakker, G., & Kolaczowska, E. (2017). Differential inhibition of activity, activation and gene expression of MMP-9 in THP-1 cells by azithromycin and minocycline versus bortezomib: A comparative study. *PloS One*, 12(4), e0174853.

Walker, D. G., Dalsing-Hernandez, J. E., Campbell, N. A., & Lue, L.-F. (2009). Decreased expression of CD200 and CD200 receptor in Alzheimer's disease: a potential mechanism leading to chronic inflammation. *Experimental Neurology*, 215(1), 5-19.

Wang, N., Liu, W., Zheng, Y., Wang, S., Yang, B., Li, M., Song, J., Zhang, F., Zhang,

X., Wang, Q., & Wang, Z. (2018). CXCL1 derived from tumor-associated macrophages promotes breast cancer metastasis via activating NF- κ B/SOX4 signaling. *Cell Death & Disease*, 9(9), 880.

Wang, W.-Y., Tan, M.-S., Yu, J.-T., & Tan, L. (2015). Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in Alzheimer's disease. *Annals of Translational Medicine*, 3(10), 136.

Weber, R., Groth, C., Lasser, S., Arkhypov, I., Petrova, V., Altevogt, P., Utikal, J., & Umansky, V. (2021). IL-6 as a major regulator of MDSC activity and possible target for cancer immunotherapy. *Cellular Immunology*, 359(104254), 104254.

Wei, L.-H., Kuo, M.-L., Chen, C.-A., Chou, C.-H., Lai, K.-B., Lee, C.-N., & Hsieh, C.-Y. (2003). Interleukin-6 promotes cervical tumor growth by VEGF-dependent angiogenesis via a STAT3 pathway. *Oncogene*, 22(10), 1517-1527.

Wei, Y., Zhou, J., Zheng, Z., Wang, A., Ao, Q., Gong, Y., & Zhang, X. (2009). An improved method for isolating Schwann cells from postnatal rat sciatic nerves. *Cell and Tissue Research*, 337(3), 361-369.

Wei, Z.-W., Xia, G.-K., Wu, Y., Chen, W., Xiang, Z., Schwarz, R. E., Brekken, R. A., Awasthi, N., He, Y.-L., & Zhang, C.-H. (2015). CXCL1 promotes tumor growth through VEGF pathway activation and is associated with inferior survival in gastric cancer. *Cancer Letters*, 359(2), 335-343.

Winkelmann, R. K. (1956). Cutaneous nerves in relation to epithelial tumors. *The Journal of Investigative Dermatology*, 27(5), 273-279.

Wolczyk, D., Zaremba-Czogalla, M., Hryniewicz-Jankowska, A., Tabola, R., Grabowski, K., Sikorski, A. F., & Augoff, K. (2016). TNF- α promotes breast cancer cell migration and enhances the concentration of membrane-associated proteases in lipid rafts. *Cellular Oncology*, 39(4), 353-363.

Wright, G. J., Cherwinski, H., Foster-Cuevas, M., Brooke, G., Puklavec, M. J., Bigler, M., Song, Y., Jenmalm, M., Gorman, D., McClanahan, T., Liu, M.-R., Brown, M. H., Sedgwick, J. D., Phillips, J. H., & Barclay, A. N. (2003). Characterization of the CD200 receptor family in mice and humans and their interactions with CD200. *The Journal of Immunology*, 171(6), 3034-3046.

Wu, T., Yang, W., Sun, A., Wei, Z., & Lin, Q. (2022). The role of CXC chemokines

in cancer progression. *Cancers*, 15(1), 167.

Xiao, Y., & Yu, D. (2021). Tumor microenvironment as a therapeutic target in cancer. *Pharmacology & Therapeutics*, 221(107753), 107753.

Xu, M., Wang, Y., Xia, R., Wei, Y., & Wei, X. (2021). Role of the CCL2-CCR2 signalling axis in cancer: Mechanisms and therapeutic targeting. *Cell Proliferation*, 54(10), e13115.

Yang, C., Yu, H., Chen, R., Tao, K., Jian, L., Peng, M., Li, X., Liu, M., & Liu, S. (2019). CXCL1 stimulates migration and invasion in ER-negative breast cancer cells via activation of the ERK/MMP2/9 signaling axis. *International Journal of Oncology*, 55(3), 684-696.

Yoshimura, T., Li, C., Wang, Y., & Matsukawa, A. (2023). The chemokine monocyte chemoattractant protein-1/CCL2 is a promoter of breast cancer metastasis. *Cellular & Molecular Immunology*, 20(7), 714-738.

Young, H. (1897). On the presence of nerves in tumors and of other structures in them as revealed by a modification of Ehrlich's method of "vital staining" with methylene blue. *The Journal of Experimental Medicine*, 2(1), 1-12.

Yuan, A., Chen, J. J. W., Yao, P.-L., & Yang, P.-C. (2005). The role of interleukin-8 in cancer cells and microenvironment interaction. *Frontiers in Bioscience*, 10(1-3), 853-865.

Yuan, Z., Chen, X., Yang, W., Lou, B., Ye, N., & Liu, Y. (2019). The anti-inflammatory effect of minocycline on endotoxin-induced uveitis and retinal inflammation in rats. *Molecular Vision*, 25, 359-372.

Zelenay, S., van der Veen, A. G., Böttcher, J. P., Snelgrove, K. J., Rogers, N., Acton, S. E., Chakravarty, P., Girotti, M. R., Marais, R., Quezada, S. A., Sahai, E., & Reis e Sousa, C. (2015). Cyclooxygenase-dependent tumor growth through evasion of immunity. *Cell*, 162(6), 1257-1270.

Zhang, L., Chen, W., Liu, S., & Chen, C. (2023). Targeting breast cancer stem cells. *International Journal of Biological Sciences*, 19(2), 552-570.

Zhang, S., Cherwinski, H., Sedgwick, J. D., & Phillips, J. H. (2004). Molecular mechanisms of CD200 inhibition of mast cell activation. *The Journal of Immunology*, 173(11), 6786-6793.

- Zhang, S. H.,** Shurin, G. V., Khosravi, H., Kazi, R., Kruglov, O., Shurin, M. R., & Bunimovich, Y. L. (2020). Immunomodulation by Schwann cells in disease. *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII*, 69(2), 245-253.
- Zhang, W.-J.,** Wu, C.-L., & Liu, J.-P. (2023). Schwann cells as a target cell for the treatment of cancer pain. *Glia*, 71(10), 2309-2322.
- Zhang, Y.,** Sang, R., Bao, J., Jiang, Z., Qian, D., Zhou, Y., Su, W., Wei, J., Zhao, L., Wei, Z., Zhao, Y., Shi, M., & Chen, G. (2023). Schwann cell-derived CXCL2 contributes to cancer pain by modulating macrophage infiltration in a mouse breast cancer model. *Brain, Behavior, and Immunity*, 109, 308-320.
- Zhao, H.,** Wei, S., Zhou, D., Liu, Y., Guo, Z., Fang, C., Pang, X., Li, F., Hou, H., & Cui, X. (2023). Blocking the CXCL1-CXCR2 axis enhances the effects of doxorubicin in HCC by remodelling the tumour microenvironment via the NF- κ B/IL-1 β /CXCL1 signalling pathway. *Cell Death Discovery*, 9(1), 120.
- Zhou, C.,** Gao, Y., Ding, P., Wu, T., & Ji, G. (2023). The role of CXCL family members in different diseases. *Cell Death Discovery*, 9(1), 212.
- Zhou, C.,** Sun, R., Sun, C., Gu, M., Guo, C., Zhang, J., Du, Y., Gu, H., & Liu, Q. (2020). Minocycline protects neurons against glial cells-mediated bilirubin neurotoxicity. *Brain Research Bulletin*, 154, 102-105.
- Zhou, Y.,** Li, J., Han, B., Zhong, R., & Zhong, H. (2020). Schwann cells promote lung cancer proliferation by promoting the M2 polarization of macrophages. *Cellular Immunology*, 357(104211), 104211.
- Zhou, Y.,** Shurin, G. V., Zhong, H., Bunimovich, Y. L., Han, B., & Shurin, M. R. (2018). Schwann cells augment cell spreading and metastasis of lung cancer. *Cancer Research*, 78(20), 5927-5939.
- Zidi, I.,** Mestiri, S., Bartegi, A., & Amor, N. B. (2010). TNF-alpha and its inhibitors in cancer. *Medical Oncology (Northwood, London, England)*, 27(2), 185-198.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Esra	Uyruğu	TC
Soyadı	TAVŞAN	Tel no	
Doğum tarihi		e-posta	

Eğitim Bilgileri

Mezun olduğu kurum		Mezuniyet yılı
Lise	Kepez Lisesi, Antalya	2006
Lisans	Dumlupınar Üniversitesi, Kütahya, Biyoloji	2011
Pedagojik Formasyon	Dumlupınar Üniversitesi, Eğitim Bilimleri Fakültesi, Kütahya	2011-2013
Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi, Antalya Tıbbi Farmakoloji	Şubat 2013- 2016
Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi, Antalya İmmünofarmakoloji	2016-2019
Doktora	Akdeniz Üniversitesi, Antalya Tıbbi Farmakoloji	2025

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (yıl-yıl)
Araştırma Görevlisi	Akdeniz Üniversitesi	2016- devam ediyor

Yabancı Dilleri	Sınav türü	Puanı
İngilizce	YÖKDİL	78,5

Proje Deneyimi

Proje Adı	Destekleyen kurum	Süre (Yıl-Yıl)
NK1 ve NK2 Reseptör antagonistlerinin metastatik meme kanseri üzerine etkilerinin ortotopik fare modelinde araştırılması.	TÜBİTAK, 1002, Bursiyer Proje No: 214S389	2015-2016
Meme kanserinde CXC Kemokinlerinin regülasyonunda rol oynayan moleküler mekanizmaların araştırılması: CXC Kemokin Reseptör 2 antagonistlerinin	TÜBİTAK, 1001, Bursiyer Proje No:115Z286	2015-2018

anti-tümöral etkilerine karşı olası direnç mekanizmaları.		
Metastatik ve metastatik olmayan meme kanseri hücrelerinde Fluoksetinin etkilerinin ve etki mekanizmasının in vitro modellerde araştırılması.	BAP, Araştırmacı Proje No: TSA-2014-123	2014-2016
Substance P antagonistlerinin fare meme kanseri metastazı üzerine etkilerinin araştırılması.	BAP, Araştırmacı Proje no. 214.02.0122.010	2015-2016
Metastatik meme kanserinde CXC kemokin reseptör 2 antagonistlerinin anti-tümöral etkilerine karşı dirençte PI3K ve PKC alt tiplerinin etkileri.	BAP, Araştırmacı	2017-2019
Metastatik Meme Kanserinde PI3K p110 alfa İnhibisyonunun (BYL719), Peg Doksorubisin İle Birlikte Olası Anti-tümöral Etkilerinin Araştırılması.	BAP, Araştırmaacı	2018-2019
Metastatik meme kanseri hücrelerinde ekstraselüler matriks proteini Fibulin-4'ün rolünün araştırılması: TGF- β 1, LTBP-1 ve BMP-1 ile ilişkisi.	TÜBİTAK 1001, Bursiyer	2018-2021
Ön kamara sıvısındaki immün mediatör düzeylerinin belirlenmesi.	BAP, Araştırmacı	2022-2023
Diffüz Parankimal Akciğer Hastalıklarında Bone Morfogenetik Protein-1 ve TGF β 1 Düzeyi ile Hastalık Prognozu ile İlişkisi	BAP, Araştırmacı	2023-
Schwann Hücre-Meme Kanseri Hücresi Etkileşiminde CD200'ün rolü: Schwann Hücrelerden Salınan İnflamatuvar Mediyatörlerdeki Değişiklikler	BAP, Araştırmacı	2023-
Schwann Hücre Kültüründe Poly-D-Lysine'e Alternatif Olarak Jelatin	BAP, Araştırmacı	2024-

Kullanımının Fenotipik Etkilerinin İncelenmesi; Kanser Hücrelerinin Eksozomları İle Uyarımda Olası Değişiklikler.		
Metastatik ve metastatik olmayan meme kanseri hücreleri ile Schwann hücreleri arasındaki etkileşim: Etkileşimin meme kanser hücrelerinin agresifliği üzerine etkilerinin araştırılması.	TÜBİTAK, Cost, Bursiyer Proje No: 122Z333	2022-2025
Kanser hücrelerine bağlı Schwann hücre aktivasyonunda CD200'ün rolü: CD200 yokluğunda Schwann hücre-metastatik meme kanser hücreleri etkileşiminin karakterizasyonu	TUSEB, B grubu, Bursiyer ve Mali sorumlu 2022-B-02-22529	2023-2025

Burslar-Ödüller:

Bildiriler:

- 1. Esra Tavşan,** Nuray Erin. Phosphatidylinositol 3-kinases are involved in MIP-2 secretion from heart and brain metastatic breast carcinoma. EACR-Sponsored 2nd Anticancer Agents Congress ve5th Multidisciplinary Cancer Research Congress. 23rd-27th of April 2014 Bodrum.
- 2. Esra Nizam (Tavşan),** Nuray Erin. Effects of neurokinin-1 receptor antagonist (RP67580) and neurokinin-2 receptor antagonist (GR159897) on metastatic breast cancer cells. International Symposium on Advances in Predictive vePersonalized Medicine. 2-3 April 2015, İstanbul.
- 3. Esra Nizam (Tavşan),** Nuray Erin. Effects of neurokinin-1 receptor antagonist (RP67580) on metastatic breast cancer cells EACR- Sponsored 3rd Anticancer Agents Congress 18rd-19th of May 2015 İzmir.
- 4. Esra Nizam (Tavşan),** Mustafa Gökhan Ertosun, Nuray Erin. Effects of neurokinin-2receptor antagonist (GR159897) on metastatic breast cancer cells

EACR- Sponsored 3rd Anticancer Agents Congress 18rd-19th of May 2015
İzmir.

5. **Esra Nizam (Tavşan)**, Nuray Erin. NK2 receptor but not NK1 receptor antagonist (GR159897, RP67580) increases release of angiogenic chemokine from breast carcinoma. 7th European Congress of Pharmacology 26rd-30th June 2016, İstanbul.
6. **Esra Nizam (Tavşan)**, Gamze Tanrıöver Nuray Erin. In-vivo effects of NK1 and NK2 receptor antagonists on metastatic breast carcinoma. 7th European Congress of Pharmacology 26rd-30th June 2016, İstanbul.
7. Nuray Erin, Özlem Duymuş, **Esra Nizam (Tavşan)**. Inhibition of PKC activity with Byrostatin alters secretion of inflammatory chemokines. 14th CIMT Annual Meeting, mechanisms of efficacy in cancer immunotherapy. 10rd-12th May 2016, Mainz, Germany.
8. **Esra Nizam (Tavşan)**, Nuray Erin. The effects of PI3K- α and PI3K- β inhibitors on MIP-2 and KC secretion from metastatic breast carcinoma. 6th Multidisciplinary Cancer Research Congress , 27rd-30th October 2016, Konya.
9. **Esra Nizam (Tavşan)**, Nuray Erin; Protein Kinaz C (PKC ϵ) Aktivatörü FR236924, Meme Kanseri Hücrelerinin Proliferasyonunu Azaltırken Kemokin Sekresyonunu Değiştirmemektedir. 24.Ulusal Farmakoloji Kongresi-2017, Trabzon.
10. **Esra Nizam (Tavşan)**, Gamze Tanrioever, Nuray Erin, Substance P antagonistlerinin karaciğere metastaz yapmış meme kanseri üzerine İn vivo etkilerinin Araştırılması. 1.Temel Onkoloji Sempozyumu, 9-11 Mayıs 2018, İzmir.
11. **Esra Nizam (Tavşan)**, Ayşe Sevgi Yıldız, Nuray Erin. Inhibition of PI3K α activity decreases chemokine release and enhances anti-proliferative effects of PEG-DOX in metastatic breast cancer. 6th International Conference Cancer

Immunotherapy and Immunomonitoring. 29 April- 2 May 2019, Tbilisi, Georgia.

12. Nuray Erin, Esra Nizam (Tavşan), Gamze Tanrıöver, Sadi Köksoy. Opposed effects of NK1R inhibition on metastatic breast carcinoma; Phenotype-dependent therapeutic and toxic consequences. 6th International Conference Cancer Immunotherapy and Immunomonitoring. 29 April- 2 May 2019, Tbilisi, Georgia.

13. Esra Nizam (Tavşan), Nuray ERİN. Inhibition of bone morphogenetic protein 1 activity decreases colony and spheroid formation in metastatic breast carcinoma cells. WG3 online meeting 4th November 2020.

14. Esra Tavşan, Nuray Erin. TGF- β 1 receptor inhibitor SB-431542 inhibits proliferation of metastatic breast carcinoma cells and enhances anti-tumoral effects of Doxorubicin. 20th CIMT Annual Meeting. 3-5 May 2023, Mainz, Germany.

15. Esra Tavşan, Shurin, G., Shurin, M., Nuray Erin. "Pro-Inflammatory Response of Schwann Cells in Metastatic Breast Cancer". TuPA International Proteomics Congress, 5th Turkish National Proteomic Congress 13-14 Oct 2023, Ankara, Türkiye.

16. Esra Tavşan, Nuray ERİN. Crosstalk Between Schwann Cells and Breast Cancer Cells: Implications for Tumor Progression and Therapeutic Strategies. 9th international Congress of the Molecular Biology association of Türkiye. 12-14 September 2024, İzmir, Türkiye.

Yayınlar

1. Nuray Erin, Esra Nizam (Tavşan), Gamze Tanrıöver, Sadi Köksoy, Autocrine control of MIP-2 secretion from metastatic breast cancer cells is mediated by CXCR2: a mechanism for possible resistance to CXCR2 antagonists **Breast cancer research and treatment, 2015.**

2. **Esra Nizam (Tavşan)**, Nuray Erin. Differential consequences of neurokinin receptor 1 and 2 antagonists in metastatic breast carcinoma cells; Effects independent of Substance P. **Biomedicine and pharmacotherapy, 2018.**
3. **Esra Nizam (Tavşan)**, Sadi Köksoy Nuray Erin. NK1R antagonist decreases inflammation and metastasis of breast carcinoma cells metastasized to liver but not to brain; phenotype-dependent therapeutic and toxic consequences. **Cancer immunology immunotherap, 2020.**
4. Nuray Erin, **Esra Tavşan**, Özlem Akdeniz, Vera M S Isca, Patricia Rijo . Rebound increases in chemokines by CXCR2 antagonist in breast cancer can be prevented by PKC δ and PKC ϵ activators. **Cytokine, 2021.**
5. Nuray Erin, **Esra Tavşan**, Seren Haksever, Azmi Yerlikaya, Chiara Riganti. Targeting BMP-1 enhances anti-tumoral effects of doxorubicin in metastatic breast cancer: Common and distinct features of TGF- β inhibition. **Breast cancer research and treatment, 2025.**