T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

PANKREAS ADENOKARSİNOM MODELİ VE PANC02 HÜCRELERİNDE DÜŞÜK KALORİ VE LİPOPOLİSAKKARİT TEDAVİSİ

ALİŞA BAHAR BEYDOĞAN

DANIŞMAN
PROF. DR. SEMA BOLKENT

II. DANIŞMAN
DOÇ. DR. ZEYNEP MİNE COŞKUN

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TIBBİ BİYOLOJİ PROGRAMI

İSTANBUL-2020

Bu çalışma 03.11.2020 Tarihinde aşağıdaki jüri tarafından
Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

TEZ JÜRİSİ

Prof. Dr. Sema Bolkent
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Cerrahpaşa Tıp Fakültesi

Prof. Dr. Müjgan Cengiz
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Cerrahpaşa Tıp Fakültesi

Prof. Dr. Gaye Erten
İstanbul Üniversitesi
Aziz Sancar Deneysel Tıp
Araştırma Enstitüsü

Prof.Dr. Ayşen Yarat
Marmara Üniversitesi
Diş Hekimliği Fakültesi

Prof. Dr. Elif Özkök
İstanbul Üniversitesi
Aziz Sancar Deneysel Tıp
Araştırma Enstitüsü

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, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

MSc. Alişa Bahar BEYDOĞAN

İTHAF

Annem ŞadanYILDIZLI’ya ithaf ediyorum

TEŞEKKÜR

Eğitimim süresince bana her alanda her daim sonsuz destek olan, engin sabrı ve bilgisi ile bana yol gösteren, bana inanan çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Sema BOLKENT'e, beni her daim motive eden, benden hiçbir yardımını esirgemeyen, başarıları ve kişiliği ile bana örnek olan, bitmeyen desteği, inancı ve sabrı için çok değerli ikinci danışman hocam Doç. Dr. Zeynep Mine COŞKUN'a, tez çalışmalarım süresince bana laboratuvarlarında çalışma imkanı sunan, teşviklerini ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, hoşgörüsü ile engin bilgilerini sunan değerli hocam Prof. Dr. Meral KOYUTÜRK'e, eğitimim ve tez çalışmalarım süresince bana sunduğu sonsuz ilgi, desteği ve motivasyondan dolayı değerli hocam Prof. Dr. Turgut ULUTİN'e, tezimi orjinal hale getiren ve şekillendiren hücre soyunu bana hediye eden değerli insanlar Dr. Christine HACKBARTH ve Dr. Lars Ivo PARTECKE'ye, deneysel çalışmalarım süresince desteklerini esirgemeyen Vet. Hekim Mert ÇELİKTEN'e, Nurhayat DÖNEK POLAT'a, Önder HASANBAŞ'a ve birimde çalışan herkese, lisansüstü eğitim hayatım boyunca hep yanımda olup, benden desteğini esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Matem TUNÇDEMİR'e, çalışmalarımda her ihtiyacımda yanımda olan, beni hep motive eden ve gülümseten değerli hocam Doç. Dr. Fatma KAYA DAĞISTANLI'ya, eğitim hayatım süresince beni her anımda dinleyen ve gülümseten, yanımda olan değerli hocalarım Doç. Dr. Duygu GEZEN AK ve Doç. Dr. Erdinç DURSUN'a, yalnız akademik yolda değil, hayatımda daima yanımda olan, dostlukları ile beni sakinleştiren, gülümseten, bana umut veren aynı yolda beraber yürüdüğüm Gamze ARGÜN KÜRÜM, Merve ALAYLIOĞLU, Bilgenur BİLGE ve Ceren ORHAN'a, ekip arkadaşlarım, lisansüstü eğitim hayatım boyunca katkıları, destekleri, teşvikleri ve her daim iyi dilekleri için anabilim dalındaki tüm öğretim üyelerine ve asistan arkadaşlarıma TEŞEKKÜR EDERİM.

Yaşantım boyunca, her anımda yanımda olan, bana destek olan ve elimden tutan, benden sevgisini ve inancını esirgemeyen, hakkını hiçbir zaman ödeyemeyeceğimi bildiğim annem Şadan YILDIZLI'ya,

Dualarını benden esirgemeyen teyzelerime, gurur kaynağım olan güzel ailemin tüm fertlerine sonsuz teşekkürler...

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 25597

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI ..... İİ
BEYAN ..... İİİ
İTHAF ..... İV
TEŞEKKÜR V
İÇİNDEKİLER ..... Vİİ
TABLOLAR LİSTESİ ..... Xİ
ŞEKİLLER LİSTESİ ..... Xİİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ ..... XİV
ÖZET ..... XVİİ
ABSTRACT ..... XVİİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 7
2.1. Pankreas 7
2.1.1. Ekzokrin pankreas 7
2.1.2. Endokrin pankreas 9
2.2. Pankreas Kanseri 10
2.2.1. Pankreas kanseri sınıflandırması 11
2.2.2. Pankreas kanserinin moleküler mekanizması 14
2.2.3. Pankreas kanseri risk faktörleri 15
2.2.3.1. Değiştirilemeyen risk faktörleri 15
2.2.3.2. Değiştirilebilir risk faktörleri 15
2.2.4. Pankreas kanseri tedavileri 16
2.3. Pankreatik Duktal Adenokarsinom 16
2.3.1. Pankreatik duktal adenokarsinom moleküler mekanizması 17
2.3.1.1. Apoptoz 18
2.3.1.2. DNA hasar tamir mekanizması 18
2.3.1.3. Embriyonik sinyalizasyon 19
2.3.1.4. MAPK sinyalizasyonu 19
2.3.1.5. TGF-β sinyalizasyonu 19
2.3.1.6. K-RAS aktivasyonu 19

2.4. Panc02 Tümör Modeli 21
2.4.1. Panc02 tümör modeli çeşitleri.....21
2.4.1.1. Subkutan Panc02 tümör modeli ilişkili çalışmalar.....21
2.5. İnflamasyon.....22
2.5.1. Akut inflamasyon.....23
2.5.2. Kronik inflamasyon.....23
2.6. Gram negatif bakteri 24
2.6.1. Lipopolisakkarit (LPS).....24
2.6.2. Toll benzeri reseptör-4 (TLR-4) 26
2.6.3. Lipopolisakkarit (LPS) aktivasyonunun moleküler mekanizması 27
2.6.4. LPS fonksiyonu ve ilişkili çalışmalar 29
2.7. İnflamasyon ve kanser 30
2.8. İmmünite 31
2.8.1. Doğal bağışıklık 31
2.8.2. Kazanılmış Bağışıklık 32
2.9. İmmün savunma sistemleri 32
2.9.1. İmmün sistem hücreleri.....33
2.9.1.1. Fagositik hücreler.....34
2.9.1.2. Makrofajlar.....34
1. M1 makrofajlar.....36
2. M2 makrofajlar.....36
2.10. İmmün tedavi 37
2.10.1. Bağışıklık kazandırma ve immün takip 38
2.10.2. Tümör kaynaklı immün baskılama ve immün direnç 39
2.10.3. İmmünmodülasyon ve tedavi 39
2.10.4. Kontrol noktası inhibitörleri.....40
2.10.5. Kalori kısıtlaması 41
2.10.5.1. Kalori kısıtlaması ve kanser 41
2.11. Oksidatif stres 42
2.12. Antioksidan sistem.....42
2.13. Gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR).....44
2.13.1. Özgül olmayan belirleme sistemi.....44
2.13.1.1. SYBR Green yöntemi 44

2.13.2. Özgül belirleme sistemi 44
2.13.2.1. TaqMan prob yöntemi 44
2.13.2.2. Hibridizasyon prob yöntemi 45
2.13.2.3. Moleküler boncuk yöntemi 45
2.14. İmmünohistokimya yöntemi 45
2.15. Akan hücre ölçer (Flow sitometri) yöntemi 46
3. GEREÇ VE YÖNTEM 47
3.1. Panc02 hücre soyu 47
3.2. Panc02 hücreleri üzerine doz çalışması 47
3.3. Panc02 hücre LPS uygulaması 48
3.4. Panc02 tümör modeli ve hayvan grupları 48
3.5. NF-κβ, IL-6 ve JNK mRNA ekspresyonunun saptanması 50
3.5.1. RNA izolasyonu 50
3.5.2. RNA saflık/miktar tayini ve cDNA sentezi 50
3.5.3. Gerçek zamanlı Polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) 51
3.6. Biyokimyasal analizler 53
3.6.1. Protein miktarının belirlenmesi 53
3.6.2. Katalaz (CAT) aktivitesi 54
3.6.3. Malondialdehit (MDA) aktivitesi 54
3.6.4. Glutatyon (GSH) Miktar tayini 55
3.6.5. Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi tayini 55
3.6.6. Protein karbonil (PCO) miktarının belirlenmesi 55
3.6.7. Glutatyon –S transferaz (GST) aktivitesi tayini 56
3.6.8. Glutatyon peroksidaz (GP-X) aktivitesi tayini 56
3.7. TH1/TH2 sitokin panel ölçümü 57
3.8. Morfolojik boyama yöntemi 58
3.9. İmmünohistokimya 58
3.9.1. PCNA protokolü 59
3.9.2. JNK protokolü 59
3.9.3. NF-kβ protokolü 60
3.9.4. IL-6 protokolü 60
3.9.5. *İn vitro* NF-kβ ve kaspaz-3 protokolü 61
3.10. İstatistiksel analiz 61

3.11. Kullanılan cihazlar 62
3.12. Kullanılan kimyasal maddeler 62
4. BULGULAR 65
4.1. Deney hayvanları 65
4.1.1. Tümör çap ölçüm sonuçları 65
4.1.2. Tümör ağırlık ölçüm sonuçları 66
4.1.3. Total pankreas ağırlık sonuçları 66
4.2. *İn vitro* LPS konsantrasyon bulguları 67
4.3. NF-kβ, JNK ve IL-6 mRNA ekspresyon seviyeleri 69
4.3.1. Tümör dokusunda mRNA ekspresyon analiz sonuçları 69
4.3.2. Pankreas dokusu mRNA ekspresyon analiz sonuçları 69
4.3.3. Morfolojik boyama bulguları 70
4.3.4. İmmünohistokimya bulguları 71
4.4. Biyokimya sonuçları 76
4.4.1. Tümör dokusu biyokimya sonuçları 76
4.4.2. Pankreas dokusu biyokimya sonuçları 79
4.5. TH1/TH2 sitokin panel ölçüm sonuçları 82
4.6. *İn vitro* immünohistokimya bulguları 88
5. TARTIŞMA 91
KAYNAKLAR 99
ETİK KURUL KARARI 136
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI 137
ÖZGEÇMİŞ 138

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 3-1: cDNA reaksiyon karışımı..... 51
Tablo 3-2: cDNA reaksiyonu için bir siklusun süreleri. 51
Tablo 3-3: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu için kullanılan primer dizileri.52
Tablo 3-4: Her örnek doku için polimeraz zincir reaksiyonu karışımı. 53
Tablo 3-5: Polimeraz zincir reaksiyonunda bir siklusun süreleri. 53

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Pankreasın anatomik yapısı 8
Şekil 2-2: Pankreatik duktal adenokarsinom (PDAC) gelişimi sırasında immün sistem hücrelerinin immün cevaba etkisi 18
Şekil 2-3: Pankreatik duktal adenokarsinom (PDAC) gelişim aşamaları 20
Şekil 2-4: Bir lipopolisakkaritin O-antijen, kor ve lipid A bölgeleri 25
Şekil 2-5: *E.coli* lipopolisakaritinin kimyasal ve immünojenik yapısı 26
Şekil 2-6: NF-κβ'nin MYD88 bağımlı/bağımsız aktivasyonu. 28
Şekil 2-7: MYD88 aracılı NF-κβ ve ilişkili sitokin aktivasyonu 29
Şekil 2-8: Multipotent hematopoetik kök hücrenin öncül myeloid ve lenfoid hücrelere farklılaşarak immün sistem hücrelerini oluşturması 33
Şekil 2-9: M1 ve M2 makrofaj farklılaşmasında görevli transkripsiyonel faktörler 35
Şekil 2-10: Makrofaj alt tiplerinin immün sistemde klasik ve alternatif yol üzerinden fonksiyonları 36
Şekil 2-11: M1 ve M2 makrofaj aktifleşme yolakları 37
Şekil 4-1: Hayvanların son gün tümör çap ölçümleri (n=8). 65
Şekil 4-2: C57BL/6 farelerde Panc02 tümör yerleşimi ve boyutu 65
Şekil 4-3: Hayvanların son gün tümör ağırlık ölçümleri (n=8).. 66
Şekil 4-4: Hayvanların total pankreas ağırlık ölçümleri (n=8). 67
Şekil 4-5: Yüksek glukoz (a) ve düşük glukoz (b) içerikli besiyerlerinde Panc02 hücrelerine farklı konsantrasyonda LPS uygulaması (n=3). 68
Şekil 4-6: Gruplara ait fare tümör dokuları (n=8), Masson trikrom boyama. 70
Şekil 4-7: Fare pankreas dokusunda Nüklear faktör kappa beta (NF-κβ) immünpozitif hücreler (ok) (n=8). 72
Şekil 4-8: Fare pankreas dokusunda c-Jun N-terminal kinaz (JNK) immünpozitif hücreler (ok) (n=8). 73
Şekil 4-9: Fare pankreas dokusunda interlökin-6 (IL-6) immünpozitif hücreler (ok) (n=8) 74
Şekil 4-10: Fare pankreas dokusunda hücre nükleer çoğalma antijeni (PCNA) immünpozitif hücreler (ok) (n=8). 75
Şekil 4-11: Tümör dokusu süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi (n=8). 76
Şekil 4-12: Tümör dokusunda glutatyon (GSH) seviyesi (n=8). 77

Şekil 4-13: Tümör dokusunda malondialdehit (MDA) seviyesi (n=8). 77
Şekil 4-14: Tümör dokusunda protein karbonil (PCO) seviyesi (n=8). 78
Şekil 4-15: Tümör dokusunda katalaz (CAT) aktivitesi (n=8). 78
Şekil 4-16: Pankreas dokusunda glutatyon (GSH) seviyesi (n=8). 79
Şekil 4-17: Pankreas dokusunda malondialdehit (MDA) seviyesi (n=8). 80
Şekil 4-18: Pankreas dokusunda protein karbonil (PCO) seviyesi (n=8).. 80
Şekil 4-19: Pankreas dokusunda glutatyon–S transferaz (GST) aktivitesi (n=8).. 81
Şekil 4-20: Pankreas dokusunda glutatyon peroksidaz (GP-X) aktivitesi (n=8). 82
Şekil 4-21: Pankreas dokusunda katalaz (CAT) aktivitesi (n=8). 82
Şekil 4-22: Plazma interferon-gama (IFN-γ) seviyesi (pg/ml) (n=8). 83
Şekil 4-23: Plazma interlökin-6 (IL-6) seviyesi (n=8)..... 84
Şekil 4-24: Plazma interlökin-5 (IL-5) seviyesi (pg/ml) (n=8)..... 84
Şekil 4-25: Plazma interlökin-2 (IL-2) seviyesi (n=8)..... 85
Şekil 4-26: Plazma tümör nekroz faktörü-alfa (TNF-α) seviyesi (n=8). 86
Şekil 4-27: Plazma interlökin-10 (IL-10) seviyesi (n=8)..... 87
Şekil 4-28: Plazma interlökin-13 (IL-13) seviyesi (n=8). 87
Şekil 4-29: Plazma interlökin-4 (IL-4) seviyesi (n=8)..... 88
Şekil 4-30: Panc02 hücrelerinde nüklear faktör kappa beta (NF-κβ) immünpozitif hücreler (ok) (n=3). 89
Şekil 4-31: Panc02 hücrelerinde kaspaz-3 immünpozitif hücreler (ok) (n=3).. 90

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

3-MCA : 3-metil-kolan-threne

ADP : Adenozin difosfat

AEC : 3-amino-9 etil karbazol

ATP : Adenozin trifosfat

Bcl-2 : B hücre lenfoma-2

BMI : Vücut kitle indeksi

CAT : Katalaz

CD14 : Farklılaşma kümesi molekülleri 14

CTLA-4 : Sitotoksik T lenfosit ilişkili antijen-4

DNPH : 2,4-dinitrofenilhidrazin

DMSO : Dimetil sülfoksit

EGF : Epidermal büyüme faktörü

Erk : Ekstraselüler sinyal-düzenleyici kinaz

FAK : Fokal adezyon kinaz

FBS : Fetal bovine serum

FRET : Floresans rezonans enerji transferi

GM-SCF : Granülosit-makrofaj koloni stimüle edici faktör

GPx : Glutatyon peroksidaz

GR : Glutatyon redüktaz

GSH : Glutatyon

HCI : Hidroklorik asit

IBD : İnflamatuvar bağırsak hastalığı

IGF : İnsülin benzeri büyüme faktörü

IFN-γ : İnterferon gama

IHC **:** İmmünohistokimya

IL **:** İnterlökin

JNK **:** c-Jun N-terminal kinaz

LAM **:** Lipoarabinomannan

LPS **:** Lipopolisakkarit

LTA **:** Lipoteichoic asit

MAPK **:** Mitojenle aktiflenen protein kinaz

Mcl-1 **:** Miyeloid hücre farklılaşma protein-1

M-CSF **:** Makrofaj stimüle edici faktör

MDA **:** Malondialdehit

NF-κß **:** Nüklear kaktör kappa beta

PanIN **:** Pankreatik intraepitel neoplazi

PCO **:** Protein karbonil

PCNA **:** Hücre nükleer çoğalma antijeni

PD-1 **:** Programlı ölüm-1

PDAC **:** Pankreatik duktal adenokarsinom

PD-L1 **:** Programlı ölüm ligandı-1

qRT-PCR **:** Gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu

ROS **:** Reaktif oksijen türleri

SHIP-1 **:** Src homoloji-2 alt ünitesi içeren inositol 5' fosfataz

SNP **:** Tek nükleotid polimorfizm

SOD **:** Süperoksit dismutaz

SPN **:** Solid-psödopapiller neoplazm

TAM **:** Tümör ilişkili makrofajlar

TAMSA **:** 6-karboksi tetrametil-rodamin

TBA **:** Tribarbitürik asit

TCA **:** Trikloroasetik asit

TGF-β **:** Transforming(dönüştürücü) büyüme faktörü-beta

TLR4 **:** Toll benzeri reseptör 4

TME **:** Tümör mikro çevresi

TNF **:** Tümör nekroz faktör

TRIF **:** TNF reseptör ilişkili faktör

WCRFI **:** Dünya Kanser Araştırma Fonu

WHO **:** Dünya Sağlık Örgütü

ÖZET

Beydoğan, A.B. (2020). Pankreas adenokarsinom modeli ve Panc02 hücrelerinde düşük kalori ve lipopolisakkarit tedavisi. İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Pankreas kanseri, uygulanan cerrahi işlemler ve tedavilere rağmen sağkalım oranı oldukça düşük bir kanser çeşididir. Çalışmanın amacı pankreas adenokarsinom (PDAC) modeli oluşturulan C57BL/6 farelerin pankreas ve tümör dokuları üzerine lipopolisakkarit (LPS)'nin tek başına ve kalori kısıtlaması ile birlikte uygulanmasının ve LPS'nin Panc02 hücrelerinde etkilerinin incelemekti.

Farklı konsantrasyonlardaki (0-50 μg/ml) LPS'nin Panc02 hücrelerine uygulanması ile doz tayini yapıldı. 10-13 haftalık erkek C57BL/6 fareler (n=40), LPS (L), LPS+kalori kısıtlaması (L+K), PDAC (P), P+L ve P+L+K olarak beş grubuna ayrıldı. Tümör ve pankreas dokularında NF-κβ, JNK ve IL-6 mRNA seviyeleri ölçüldü. NF-κβ, JNK, IL-6 ve PCNA peptid seviyeleri immünohistokimya ile belirlendi. Oksidatif stres belirteçleri ve antioksidan enzim aktiviteleri tayin edildi. TH1/TH2 sitokin ölçümleri akan hücre ölçer yöntemi ile belirlendi.

P+L+K grubunun tümör çap ve ağırlık ölçümlerinin P ve P+L gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gösterdiği tespit edildi ($p < 0.001$, $p < 0.001$, $p < 0.01$ ve $p < 0.05$ sırasıyla). P+L+K grubunun PCNA immünpozitif hücre sayısının P ve P+L gruplarına göre anlamlı olarak daha düşük olduğu saptandı ($p < 0.01$, $p < 0.05$ sırasıyla). P+L+K grubunun plazma IFN-γ, IL-6, IL-2, TNF-α, IL-3 ve IL-4 seviyelerinin P grubuna göre anlamlı olarak daha düşük olduğu tespit edildi ($p < 0.01$, $p < 0.001$, $p < 0.01$, $p < 0.05$, $p < 0.01$ ve $p < 0.05$ sırasıyla).

Bulgularımıza göre, LPS ve kalori kısıtlamasının birlikte uygulanması PDAC modeli farelerde daha etkili olduğu belirlendi.

Anahtar Kelimeler: pankreas kanseri; lipopolisakkarit, kalori kısıtlaması, immüntedavi, adenokarsinom

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 25597

ABSTRACT

Beydogan, A.B. (2020). Low calorie and lipopolysaccharide therapy in pancreatic adenocarcinoma model and Panc02 cells. Istanbul University-Cerrahpasa, Institute of Graduate Studies, Department of Medical Biology. Doktora Tezi. İstanbul.

Pancreatic cancer is a type of cancer that has a very low survival rate despite surgical procedures and treatments. The aim of the study was to examine the effects of lipopolysaccharide (LPS) alone and in combination with calorie restriction on the pancreatic and tumor tissues in C57BL/6 mice modeled with pancreatic adenocarcinoma (PDAC) and then the effect of LPS in Panc02 cells.

Dose determination was made by applying LPS at different concentrations (0-50 μg / ml) to Panc02 cells. Male C57BL/6 mice (n = 40), 10-13 weeks old, were divided into 5 groups as LPS (L), LPS + calorie restriction (L + K), PDAC (P), P + L and P + L + K. NF-κβ, JNK and IL-6 mRNA levels were measured in tumor and pancreatic tissues. NF-κβ, JNK, IL-6 and PCNA peptide levels were determined by immunohistochemistry. Oxidative stress markers and antioxidant enzyme activities were determined. TH1 / TH2 cytokine measurements were determined by flow cytometer.

It was determined that tumor diameter and weight measurements of the P + L + K group showed a statistically significant decrease compared to the P and P + L groups ($p < 0.001$, $p < 0.001$, $p < 0.01$ and $p < 0.05$ respectively). It was detected that the number of PCNA immunpositive cells in the P + L + K group was significantly lower than the P and P + L groups ($p < 0.01$, $p < 0.05$ respectively). P + L + K group's plasma IFN-γ, IL-6, IL-2, TNF-α, IL-3 and IL-4 levels were found to be significantly lower than the P group ($p < 0.01$, $p < 0.001$, $p < 0.01$, $p < 0.05$, $p < 0.01$ and $p < 0.05$ respectively).

According to our findings, the combination of LPS and calorie restriction was found to be more effective in PDAC model mice.

Key Words: pancreatic cancer; lipopolysaccharide, calorie restriction, immunotherapy, adenocarcinoma

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University-Cerrahpaşa. Project No.25597

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kansere bağlı ölümler arasında bazı bölgelerde ikinci sırada yer alan pankreatik duktal adenokarsinom (PDAC) yüksek mortalite ve artan insidansa sahip ölümcül bir hastalıktır (1, 2). PDAC genel olarak ileri evrede ortaya çıkar ve bu nedenle yaklaşık %2-9 beş yıllık zayıf bir sağkalım oranı sağlar. Tanı sırasında hastaların %50'sinden fazlasında distal metastaz görülmekte ve bu durumda beş yıllık sağkalım oranı ortalama %3 olarak saptanmaktadır (3). Cerrahi işlemler, kemoterapi ve neoadjuvan kemoradyoterapi uygulamalarına rağmen beş yıllık sağkalım bazı ülkelerde %2'nin altındadır (1). PDAC vakalarının neredeyse %60-70'i pankreasın baş kısmından kaynaklanır ve genellikle pankreas başı ortak safra kanalını içerdiğinden gövde ve kuyruk kısımlarından kaynaklanan tümörlerden daha erken teşhis edilir. Pankreas gövde kısmı (%15) ve kuyruk kısmı (%10) tümörleri daha geç evrede ortaya çıkma eğiliminde olup kötü prognoz ile ilişkilidir (4). Pankreatik intraepitel neoplazi (PanIN) pankreatik adenokarsinomun en yaygın öncüsüdür. Bu lezyonların pankreatik adenokarsinom ile ortak genetik anormalliklere sahip olduğunu gösteren moleküler çalışmalar bulunmaktadır. PanIN'ın histolojik ilerlemesi anormal moleküler değişimlerin saptanması ile paraleldir (5). Altta yatan PDAC biyolojisi tam olarak aydınlatılmamış olmasına rağmen K-Ras, CDKN2A/P16, TP53 ve SMAD4 gibi belirli genlerin mutasyonları ile sinyal yollarının eşzamanlı aktivasyonu tedavilere dirençte önemli bir rol oynamaktadır (6, 7). Fare pankreas asinar hücrelerinde mutant K-RAS aktivasyonunun spontan düşük dereceli lezyon oluşumuna yol açtığı bilinmektedir. Bununla birlikte, K-RAS nedenli yüksek dereceli PanIN lezyonlarında ilerleme kronik inflamasyonu beraberinde getirmektedir (8). Pankreatit, PDAC için bir risk faktörü olup asinar hücre nekrozu, inflamatuvar hücre popülasyonlarının infiltrasyonu, stromal fibroz ve çözünebilen/çözünmeyen inflamatuvar aracıların salınması ile karakterizedir (9). Makrofaj polarizasyonunu indükleyen endoteldeki yüksek ekspresyonlu K-RAS onkogen varlığı inflamasyonla ilişkili neoplastik değişime katkıda bulunmaktadır. Hem kronik hem de akut pankreas inflamasyonu, onkojenik K-RAS varlığında pankreatik stromada yer alan makrofajların aktivasyonu ile ilişkilendirilmiştir (10). İleri aşamalı pankreatik adenokarsinomlarda P16, CDNK27, p53 ve SMAD4 mutasyonları ortaya çıkar (11). Notch delta ve Sonic HedgeHog sinyal yollarındaki anomaliler de pankreatik

adenokarsinom gelişiminde rol oynamaktadır. Bu mutasyonların %80'i sporadik görünmektedir (12).

Pankreas kanserinde mevcut olan tedavilerin kısıtlı olması sebebi ile yeni araştırma stratejilere ihtiyaç artmaktadır (8, 13). PDAC vakalarında sağkalım oranının düşüklüğü tedavi sonuçlarını iyileştirebilmek için yeni terapötik ajan uygulama araştırmalarına olan ihtiyacı artırmıştır (14). Geleneksel tedavilerden özellikle kemoterapi bireysel hastalar için immünsüpresif mikro ortamı yeniden şekillendirmek üzere optimize edilebilir (15). Birçok çalışma, PDAC tümör mikro çevresinin (TME) tümör büyümesi ve metastazı desteklediğini ve ilaç iletimine karşı fiziksel bir bariyer oluşturduğunu ortaya koymuştur (16). Uyarıcı ve inhibitör sitokinler arasındaki dengenin bozulması nedeniyle PDAC hızlandırılmış bir büyüme kazanır. PDAC deney modellerinde interlökin (IL)-12 veya interferon gama (IFN-γ) ekzojen uygulamaları TME'deki myeloid hücreleri yeniden programlayabilmekte ve T hücreleri indükleyebilmekte sonuç olarak tümör gerilemesine yol açabilmektedir (17). Sitokinler immün baskılayıcı rollerini örneğin peri-tümöral inflamatuvar hücreleri epidermal büyüme faktörü (EGF), insülin benzeri büyüme faktörü (IGF)-1, dönüştürücü (transforming) büyüme faktörü-alfa (TGF-α), IL-1α ve IL-6 pozitif sinyalleri ile sağlayabilirler (18, 19). Kanser hücrelerini veya stromayı hedefleme, baskılayıcı immün reaksiyonları tersine çevirme veya anti-tümör aktivitesini artırma PDAC tedavisi için umut verici yaklaşımlar olabilir.

Corbett ve ark. (13) C57BL/6 fare soyunun pankreas kuyruk kısmına 3-metil-kolan-threne (3-MCA) enjeksiyonu ile Panc02 ve Panc03 olarak iki tip tümör modeli oluşturmuşlardır. Ancak tümör hücrelerinin izole edilerek kullanıldığı Panc02 modelin daha invaziv olduğu bildirilmiştir. Panc02 tümör modeli C57BL/6 farelerin pankreas ile sol arka bacak arasındaki bölgeye subkutan enjeksiyon veya cerrahi işlem ile pankreas kuyruk kısmına ortotopik olmak üzere iki farklı model olarak çalışılmaktadır (3). Panc02 subkutan modelde peroksinitrit üreterek tümör hücrelerini öldürmeye programlanmış dendritik hücre uygulamasının folfirinox ile birlikte sonucu sağkalımı arttırdığı bildirilmiştir (16). Bir başka subkutan Panc02 modelde ise sonuçlar, IL-6 baskılanmasının anti-PD-L1 antikor uygulamasının etkisini olumlu yönde arttırdığına yöneliktir (20). Ortotopik ve subkutan Panc02 modelleri birlikte kullanılarak yapılan çalışmada, subkutan modelde glikat kitosan ve fototerapinin birlikte

uygulanmasının tek başına fototerapiye kıyasla sekonder tümör gelişimini yavaşlattığı ileri sürülmüştür (3).

Gram negatif bakterilerin hücre duvarı ana bileşeni olan lipopolisakkarit veya lipoglikanlar (LPS), O-antijene bağlı kısa polipeptid içeren çekirdek kısmı ve lipit A içeriğine sahip olup patolojik model oluşturmada kullanılmaktadır (21-24). LPS'de bulunan hidrofobik özellikteki lipid-A bileşeni bakterilere spesifik patojenik özellikler kazandırmak için gerekli olan endotoksik aktiviteye sahiptir (25). Çoğu bakteri LPS molekülü doğal bağışıklık sistemi üzerinden konak-patojen etkileşiminde anahtar rol oynamaktadır (26). LPS, pro-inflamatuvar sitokinler, nitrik oksit ve eikosanoidlerin salgılanmasını indükleyen Toll benzeri reseptör 4 (TLR4)/farklılaşma kümesi molekülleri 14 (CD14)/Lenfosit antijen 96 (MD2)'nin dendritik hücre veya makrofaj hücre yüzey reseptörlerine bağlanan güçlü bir endotoksindir. Kanda veya interstisyel sıvıda bulunan LPS, lipid A yardımı ile endotoksemiye yol açabilir ve bu da yüksek immün cevap aracılığı ile septik şoka neden olabilir (27). LPS, monositler, makrofajlar, dendritik hücreler ve nötrofiller gibi birçok bağışıklık hücresinde bulunan TLR4'ler yoluyla doğuştan gelen bağışıklık tepkisini tetikleyebilir. TLR-4 reseptörleri ile birlikte LPS'nin aracılık ettiği doğuştan gelen bağışıklık aktivasyonu, sitokinlerin, kemokinlerin ve IFN'lerin üretimi ile şiddetli bir tepki ile sonuçlanır (28). Son zamanlarda, düşük dozda LPS otoimmün hastalıklar ve alerjiler ile ilişkilendirilirken, kandaki yüksek LPS konsantrasyonları ise metabolik sendrom, tip 2 diyabet, kardiyovasküler hastalıklar ve karaciğer anomalileri gibi ciddi hastalıkların riskini artırmaktadır. Organizmada enfeksiyon ile LPS seviyesinin yüksek olması septik şok ile akut ölüme neden olur ve eğer LPS kandan temizlenmezse çoklu kronik hastalıklara katkıda bulunabilecek uzun süreli bir inflamatuvar durumu teşvik edebilir (29). Aktive olan monositler, dendritik hücreler ve makrofajlar, prostaglandin ve lökotrien salınımını uyaran tümör nekroz faktör (TNF), IL-1, IL-6, IL-8 gibi sitokinlerin üretimini arttırır. Endotelyal aktivasyon ve hücre adezyon moleküllerinin ileriye dönük düzenlenmesi, kompleman aktivasyonu, prokoagülan durumun ortaya çıkışı ve kemokin/vazoaktif moleküllerin üretimi ile sonuçlanır. Böylelikle doku harabiyeti ve sistemik inflamasyon gelişir (30).

İmmünoterapi, en düşük toksisite ile nüksü önleme potansiyeline sahiptir. Kanser immünterapisinin temel amacı hasta bireyin T hücrelerini tümörlerini yok edebilmesi için aktive etmektir. İmmün sistem kontrol noktalarına etki eden hedefli

kanser immünterapiler olarak bağışıklık yanıtı üreten virüsler, bağışıklık yanıtını teşvik etmek için tasarlanmış kanser aşıları veya spesifik antijenler için tasarlanan T hücre tedavileri sayılabilir (31). Fibroblastlar, miyofibroblastlar, pankreatik stellat hücreler, immün sistem hücreleri, kan damarları, hücre dışı matriks, sitokinler ve büyüme faktörleri gibi çözünür proteinlerden oluşan stromal matriks, tümör büyümesine katkıda bulunur ve metastazı artırır (32). Pankreas kanseri tedavisi için immün terapötik ajanlar ve hedefler; immün kontrol noktası inhibitörleri (anti CTLA-4, anti PD-1 ve PD-L1), T lenfosit hedefli tümör aşıları (GVAX), neo-antijen ve neo-epitoplar, stromal matriks hedefli tedaviler (karsinoma ilişkili fibroblastlar (CAR)), CD40/CD40L monosit yolağı, RAS/MAPK (mitojenle aktiflenen protein kinaz) ve FAK (fokal adezyon kinaz) yolağı DNA tamir mekanizması (poli-ADP-riboz-polimeraz (PARP), ADP) olarak sayılabilir (14). Tümör mikroçevresi de PD-L1'in ileriye dönük düzenlenmesi T hücrelerinden bağışıklık saldırısına karşı koruma sağlamak için bir "bağışıklık kalkanı" oluşturur ve T hücresi azalmasına katkıda bulunur (33). PDAC'larda PD-L1 ekspresyon seviyesi raporları %12-90 arasında değişmektedir ve yanlış eşleşme mutasyonuna sahip olmayan PDAC hastalarının tek ajan anti-PD-L1 tedavisine yanıt vermediği açıklanmıştır (14). T hücrelerinin kısmen kontrol noktası blokaj tedavisine (anti-PD-1/PD-L1 ve anti-CTLA-4 dahil) yanıt vermemesinin nedeni TME' den ayrı düşünülmesi gerekliliğidir (32, 34). Bir başka immün tedavi hedefi olarak açıklanan tümör infiltrasyonuna neden olan lenfositlerin (TIL'ler) TME ile doğrudan etkileşime giren immün sistem hücresi bağımlı olup, çeşitli kanserlerde tedavi için prognostik bir faktör olarak işlev gördüğü gösterilmiştir. Bununla birlikte, sadece PD-L1 ekspresyonunun ve TIL'lerin immün pozitif olması, anti-PD-1 terapilerine yanıt veren pankreas kanseri için yeterli olmadığı bildirilmiştir (35-40). PDAC tedavisi için immün kontrol noktası blokaj antikorları ve CART hücre terapileri uygulanan hasta bireylerde kalıcı tepkilere yol açmıştır. Bununla birlikte, tek ajan immünterapisi alan bireyler arasında ortaya çıkan zorluklar sadece % 10-30 objektif bir yanıt oranı olarak izlenmektedir (17).

Kilo yönetimi için yaygın olarak kullanılan bir yaklaşım kalori kısıtlamasıdır. Enerji kısıtlamasının bir çeşidi olarak kalori kısıtlaması, toplam kalori alımının azaltılması ile veya azalmadan periyodik oruç, aralıklı oruç veya oruç taklit eden diyetler, kronik kalori kısıtlamasının etkilerine benzemektedir. Ayrıca kalori kısıtlamasının anti-kanser özellikleri de dahil olmak üzere sağlıklı olmak ve hayatta kalmak için çok çeşitli faydalı etkileri bilinmektedir (41). Sıçanlar, fareler ve primatlar

olmak üzere çeşitli organizmalarda yapılan çalışmalar kalori kısıtlamasının hayatta kalmayı desteklediğini ve koruyucu etkileri olduğunu göstermiştir (42-45). Yaşam süresini artıran kalori kısıtlaması, birçok fizyolojik sistemi etkiler, glukoz ve yağ homeostazını düzenler, insülin seviyesini azaltır ve insülin duyarlılığını artırır (46). Fareler üzerinde yapılan çalışmada %30 uygulanan kalori kısıtlaması gün boyunca kan glukoz ve insülin seviyelerini önemli ölçüde azaltmış ancak glukoz toleransı ve insülin duyarlılığını arttırmıştır. Aynı zamanda bu uygulama ile glukoz metabolizması ile ilgili mRNA ekspresyonları önemli ölçüde artmıştır (47). Bununla birlikte, kalori kısıtlaması tarafından immünmodülasyonun ayrıntılı mekanizmaları belirsizliğini korumaktadır (48). Ancak yapılan bir çalışmada, erken erişkinlik döneminde başlatılan uzun süreli kalori kısıtlamasının T hücre yaşlanmasını geciktirdiği ileri sürülmektedir. Spesifik olarak erken yetişkinlik döneminde başlatılan bu kısıtlamanın, dolaşımda CD8 ve CD4 T hücrelerini koruyarak, T hücre reseptör çeşitliliğinin stabil halde kalmasını sağladığı ve pro-inflamatuvar sitokinlerin T hücre üretiminin azalmasına neden olduğu açıklanmıştır (49, 50). Dört haftalık kalori kısıtlaması uygulanan farelerin uygulanmayanlar ile immün sistem hücre değişimleri karşılaştırıldığında kalori kısıtlaması uygulanan farelerden elde edilen dalak hücrelerindeki CD4+, CD8+ ve saf CD4+ T hücre oranlarının kontrol farelerinden daha yüksek olduğu gösterilmiştir (48).

Harvey ve ark. (51) tümörojenik MC38 hücrelerinin enjeksiyonundan önce 21 hafta boyunca dişi C57BL/6 farelere %30 kalori kısıtlaması uygulamışlardır. Enjeksiyondan 24 gün sonra kalori kısıtlaması uygulanan farelerin, azalmış vücut ağırlığı, vücut yağı, serum IGF-1, leptin ve insülin ile birlikte düşük tümör hacmi sergilediği bulunmuştur. Tümörojenik gen ekspresyonunun IL-6, IL-1β, TNF-α veya siklooksijenaz 2 gibi enflamatuvar ve tümöre bağlı genlerin azaltılmış ekspresyonu ile karakterize edildiği ileri sürülmüştür. Aynı zamanda açlığın, tümörle ilişkili M2 makrofajların polarizasyonunun baskılanması ve TME'deki adenozin eksikliğinin aracılık ettiği kolorektal tümör büyümesinin gerilemesi için temel bir süreç olduğu bildirilmiştir (52). Obez farelere %30 karbonhidrat kısıtlaması 15 hafta boyunca uygulandığında farelerin tümör gelişim süresinin uzadığı ve gerileyen tümör boyutu saptandığı ileri sürülmüştür (53). Ancak anti-tümör etkinin aksine başka bir çalışmada tek bir dimetilhidrazin (DMH) enjeksiyonundan sonra 56 gün %40 kalori kısıtlaması uygulamasının erken tümör öncüsü lezyonlarının oluşumunun artmasına neden olduğu

da açıklanmaktadır. Bu sonuç kolon kanseri için kalori kısıtlamasının karsinogeneze karşı koruyucu özellikte olmadığını göstermektedir (52).

Panc02 subkutan tümör ve *in vitro* modellerde terapötik ajan olarak artan konsantrasyonlarda LPS kullanımına ait herhangi bir çalışmaya rastlanmadı. Aynı zamanda PDAC tedavisi için LPS kullanımı ile birlikte %40 kalori kısıtlaması uygulanan ikili bir tedavi araştırması da henüz bulunmamaktadır. Bu nedenle çalışmamızda, Panc02 hücreleri kullanılarak PDAC subkutan tümör modeli oluşturulan C57BL/6 farelerine artan konsantrasyonlarda LPS uygulamasının tek başına ve %40 kalori kısıtlaması ile birlikte *in vivo* etkilerini, apoptoz, inflamasyon, sağ kalım, oksidatif stres ve TH1/TH2 sitokin sistemi üzerinden biyokimyasal, immünohistokimyasal ve moleküler yöntemler kullanarak açıklamayı hedefledik. Bununla birlikte Panc02 hücreleri üzerine düşük ve yüksek konsantrasyonda glukoz içeren besiyeri ortamında LPS uygulamasının *in vitro* sonuçlarının apoptoz ve inflamasyon üzerine etkisini göstermeyi amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Pankreas

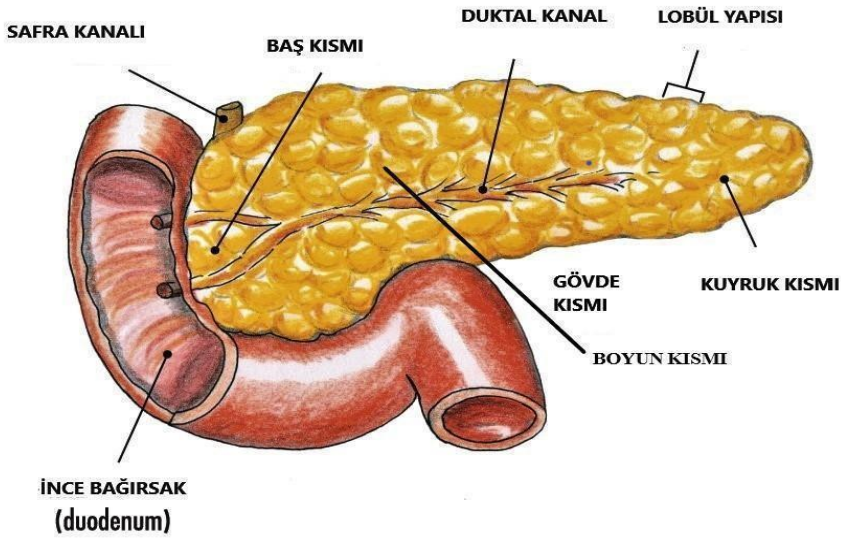
Pankreas metabolizmanın düzenlenmesi ve enerji kullanımında görevli olup, karın arka duvarında sol abdomenin üstüne doğru yerleşen, sağ kısımda duodenumun kavitesinden sol kısımda dalağa kadar uzanan, hem endokrin hem de ekzokrin yapıda bir bezdir. Bu bez 12-15 cm uzunluğunda L şeklinde olup yaklaşık 100±20 g ağırlığındadır (54). Langerhans adacıkları endokrin bez olarak pankreasın yaklaşık % 2'lik kısmını oluşturur. Endokrin bezin ana görevi, çeşitli hormonlar ile glukoz metabolizmasını düzenlemektir. Pankreasın kalanını oluşturan kanal (dukt) sistemi ile ekzokrin bezin fonksiyonu sindirim için gerekli enzimlerin salınımıdır. Bunlar başlıca protein sindirimi için tripsin ve kimotripsin, karbonhidrat sindirimi için amilaz ve yağ moleküllerini parçalamak için lipaz olarak bilinmektedir (54-57).

2.1.1. Ekzokrin pankreas

Pankreasın %95'inden fazla kısmını oluşturan ekzokrin yapı tubulo-asiner bez olarak 4 anatomik kısımda incelenir (Şekil 2-1):

- Baş kısmı, duodenumun 2. ve 3. segmentleri boyunca uzanır.
- Boyun kısmı, portal ven ile kontakt halinde bulunur.
- Gövde kısmı, aortanın anteriorunda lokalizedir.
- Kuyruk kısmı, dalak hilumunun (üst kısım) yanında sonlanan bölgedir.

Pankreas, karın bölgesinin üst kısmında abdominal duvarın arkasında yer alarak travmalara karşı korunaklı durumdadır (58).



Şekil 2-1: Pankreasın anatomik yapısı (59).

Temel pankreas dukt sistemi, kuyruk-baş boyunca devam eden yapıdadır. Pankreatik dukt, koledok kanalıyla birleşerek Ampula Vater (hepatopankreatik ampula) yapısını oluşturur. Duktlardan toplanan salgılar, pankreasın baş bölgesine gelince direkt olarak duodenuma Ampula Vater ile Oddi sfinkterinden boşaltılır (54, 59).

Ekzokrin pankreasın fonksiyonel histolojik ünitesi asinüs yapısıdır. Asinüs lümeni, yalnızca pankreasa özgü sentro-asinar hücreleri içerir. Sindirim için gerekli enzimler, inaktif pro-enzim yapısında pankreatik asiner hücrelerin granüllü endoplazmik retikulumlarında sentezlenir. Buradan Golgiye yönlendirilerek zimojen granülleri halinde paketlenir. Her zimojen granülü birçok pankreatik enzim içerir. Zimojen salgı granüllerinde bulunan yaklaşık 20 çeşit pankreatik enzimin beslenme şekline göre üretim miktarlarında farklılık görülmektedir. Örneğin, proteaz artışı protein zengin diyet ile doğrudan ilişkili iken, karbonhidrat ağırlıklı beslenmede proteazların salgısı azalmakta amilaz salgısı ise artmaktadır. Amilaz gen ekspresyonu ise insülin ile düzenlenmektedir. Pankreatik enzimlerin salgı kontrolü, duodenumda bulunan enteroendokrin hücreler tarafından salınan peptidler ve endokrin pankreasta sentezlenen peptid hormonlar tarafından kontrol edilir (56, 60).

Sekretin ve kolesistokinin duodenumda bulunan duodenal mukozadaki enteroendokrin hücreler ile kana verilir. İnterkalar dukttaki epitelyal hücreler su ve

bikarbonat iyonlarını salgılar. Bu salgı sekretin hormonu ile düzenlenir. Sekretin duodenumda üretilip, interkalar dukt hücrelerinin yüzey reseptörleri ile etkileşerek pankreatik dukt hücrelerinde su ve bikarbonat iyon salgısını düzenler. Asiner pankreatik hücreler tripsin, kimotripsin ve karboksi peptidaz enzimlerinin inaktif formlarını salgılarken amilaz, lipaz, kolesterol esteraz ve fosfolipaz enzimlerinin aktif formlarını salgılarlar. Bu hücreler aynı zamanda tripsin ve diğer proteolitik enzimlerin aktivasyonunu sağlayan tripsin inhibitörünü salgılar (54-56, 58, 60).

2.1.2. Endokrin pankreas

Pankreasın %2'lik kısmını oluşturan endokrin bez Langerhans adacıklarından meydana gelmektedir. Her bir Langerhans adacığı ise iki birimden meydana gelir:

- Endokrin hücrelerin anastomoz kordon yapıları (A (alfa), B (beta), D (delta) E (epsilon) ve F hücreleri)
- İnsulo-asiner portal sistem (vasküler birim)

Erişkin bir insanda Langerhans adacığı; %25 A hücreleri, %55 B hücreleri, %10 D hücreleri, %3 E hücreleri, %5 F hücreleri içermektedir. A hücreleri glukagon üretir, B hücreleri insülin sentezinden sorumludur, D hücreleri somatostatin salgılar, E hücreleri ghrelin ve F hücreleri pankreatik polipeptid üretiminden sorumludur. A hücreleri tarafından üretilen glukagon 3.5 kd'luk ve 29 aminoasit içeren bir peptid olup, plazma glukoz seviyesi düştüğünde ekzositoz ile salınır. Glukagon beyinde ve gastrointestinal sistemde enteroglukagon olarak bulunur ve hepatik glikojenezi artırarak kan glukoz seviyesini yükseltir. Kanda glukoz seviyesinin azalması dışında, serumda arjinin ve alanin amino asitlerinin yükselmesi ve sempatik sinir sisteminin uyarılması sonucu da glukagon salgılanır (61, 62). B hücreleri tarafından üretilen insülin 6 kd'luk bir polipeptid olup, birbiri ile disülfit bağı ile bağlanmış 21 amino asit içeren A zinciri ile 30 aminoasit içeren B zincirinden meydana gelir. Kan glukozundaki artış pro-insülinin A ve B zincirleri ile etkileşen C-peptid yapısının açığa çıkmasını sağlar. Glukoz B hücreleri tarafından glukoz transporter protein-2 (GLUT-2) aracılığı ile alınır (56, 61).

D hücreleri somatostatin üretir. Somatostatin 14 aminoasit içeren bir peptid olup hipotalamusta üretilen somatostatin ile benzerlik gösterir. Somatostatin, fundustaki

parietal hücrelerden hidroklorik asit (HCI) salınımını, enteroendokrin hücrelerden gastrin salınımını ve pankreatik bikarbonat ve enzim salınımını, safra kesesi konsantrasyonunu baskılar. Bu peptid aynı zamanda hipotalamusta da üretilir ve ön hipofiz bezinde büyüme hormonunun salınımını baskılar (61). E hücrelerinden salgılanan ghrelin, adacık hücrelerinin özellikle beta hücrelerinin apoptoza gidişini baskılayarak çoğalma ve hücre büyümesinden sorumlu hormondur. Aynı zamanda ghrelin hormonunun vücut kitle indeksi ile doğrudan ilişkili olduğu açıklanmıştır (57,63). F hücrelerinden salgılanan pankreatik polipeptid 36 aminoasitten oluşur ve somatostatin salınımını baskılar. Pankreatik polipeptidin temel görevi, sindirim enzimlerini ve safrayı öğün aralarında korumaktır. Ayrıca kolesistokinin pankreatik polipeptidin serbest kalmasını uyarır (55, 62).

2.2. Pankreas Kanseri

Pankreas kanseri, ortalama sağkalım süresinin 6 ay olarak açıklanması ve 5 yıllık sağkalım oranının %5'ten düşük olması nedeni ile kansere bağlı ölümler arasında dünyada dördüncü sıradadır. Hatta bazı ülkelerde bu oran %2'ye kadar düşmektedir. Bunun nedeninin geç teşhis ve ilaç direnci olduğu, aynı zamanda çoğu pankreas kanser çeşitlerinin metastaz yapma eğilimlerinin yüksek olmasının da etkili olduğu düşünülmektedir (64-67). Aynı zamanda pankreas kanseri, erken metastaz ve kemoterapi -radyasyon tedavisine karşı gösterdiği direnç ile karakterizedir (68). Son yıllarda pankreatik adenokarsinom indisansının artışında obezite ve alkol kullanımının önemli rol oynadığı vurgulanmıştır (1).

Pankreatik kanser oluşum mekanizmaları:

1. Hiperplazi,
2. Metaplazi,
3. *In situ* karsinom,
4. İnvaziv karsinoma olarak sayılabilir.

Non-duktal adenokarsinomlar ise pankreas tümörleri içinde morfolojik ve biyolojik özellikleri sebebi ile farklı bir yere sahiptir. Pankreas kanserlerinin çoğunluğu ekzokrin yapıda olup duktal adenokarsinomlar olarak bilinmektedir (64).

2.2.1. Pankreas kanseri sınıflandırması

Pankreas tümörlerinin fenotipleri genel olarak duktal, asiner ve endokrin hücreleri kapsamaktadır. Sınıflandırma sistemi, Tümör Patoloji Atlas Serisi 4 (2007) ve Dünya Sağlık Örgütü (WHO) Sindirim Sistemi Tümörlerinin Sınıflandırılması (2010) kaynaklarına göre yapılmaktadır (69).

Pankreatik tümörler; solid veya kistik özellikleri, anatomik lokasyonlarına (intraduktal gibi), histolojik özelliklerine (epitelyal, epitelyal olmayan) ve klinik davranışlar gibi birçok kıstas açısından alt gruplara ayrılırlar (70).

1. **EPİTELYAL TÜMÖRLER:**

1.1. *Kistik*

1.1.1. **Seröz neoplazm**

1.1.1.1. Seröz kistadenom

1.1.1.1.1. Mikrokistik seröz kistadenom

1.1.1.1.2. Makrokistik seröz kistadenom

1.1.1.1.3. Solid seröz kistadenom

1.1.1.2. Von Hippel-Landau (VHL)-ilişkili seröz kistik neoplazm

1.1.1.3. Seröz kistadenokarsinom

1.1.2. **Müsinöz kistik neoplazm (MCN)**

1.1.2.1. MCN düşük veya orta derecede displazi ile beraber

1.1.2.2. MCN yüksek derecede displazi ile beraber

1.1.2.3. MCN invaziv karsinom ile ilişkili

1.1.3. **İntraduktal papiller müsinöz neoplazm (IPMN)**

1.1.3.1. IPMN düşük veya orta derecede displazi ile beraber

1.1.3.2. IPMN yüksek derecede displazi ile beraber

1.1.3.3. IPMN invaziv karsinom ile ilişkili

1.1.4. İntraduktal onkokistik müsinöz neoplazm (IOPN)

1.1.5. İntraduktal tübüler neoplazm

1.1.6. Kistik asiner neoplazm

1.1.6.1. Asiner hücre kistadenom

1.1.6.2. Asiner hücre kistadenokarsinom

1.2. *Solid*

1.2.1. İnvaziv pankreatik duktal adenokarsinom ve çeşitleri

1.2.1.1. Tubular adenokarsinom

1.2.1.2. Adenoskuamöz karsinom

1.2.1.3. Kolloid karsinom

1.2.1.4. Medüller karsinom

1.2.1.5. Hepatoid karsinom

1.2.1.6. Signet halkalı hücre karsinomu

1.2.1.7. Farklılaşmamış karsinom

1.2.1.8. Osteoklast benzeri dev hücrelerle farklılaşmamış karsinom

1.2.2. Asiner hücre karsinomu

1.2.3. Nöroendokrin neoplazm

1.2.3.1. Nöroendokrin mikroadenom

1.2.3.2. Nöroendokrin tümörler (NET)

1.2.3.2.1. NET G1

1.2.3.2.2. NET G2

1.2.3.2.3. Nöroendokrin karsinom (NEC)

1.2.3.2.3.1. Küçük hücre NEC

1.2.3.2.3.2. Büyük hücre NEC

1.2.3.2.4. Fonksiyonel NET (klinik sendrom ilişkili)

1.2.3.2.4.1. İnsülinoma

1.2.3.2.4.2. Gastrinom

1.2.3.2.4.3. Glukagonom

1.2.3.2.4.4. Serotonin-üreten NET

1.2.3.2.4.5. Somatostatinoma

1.2.3.2.4.6. VIPoma

1.2.4. Karışık tümörler (asiner, duktal ve/veya endokrin farklılaşması)

1.2.5. Solid-psödopapiller neoplazm (SPN)

1.2.6. Pankreatoblastom

2. EPİTEL KÖKENLİ OLMAYAN TÜMÖRLER

2.1. Mezenkimal tümörler (benin veya malign)

2.2. Lenfanjiom

2.3. Lenfoma

2.4. Olgun kistik teratom

2.5. Sekonder tümörler

3. NEOPLASTİK OLMAYAN TÜMÖRLER VE KİTLELER HALİNDE GÖRÜLEN DİĞER LEZYONLAR

3.1. *Kistik*

3.1.1. Oluk pankreatit (para-ampular duodenal duvar kisti)

3.1.2. Pankreatik psödokist

3.1.3. Duktal retansiyon kisti

3.1.4. Konjenital kist

3.1.5. Ön bağırsak kisti

3.1.6. Lenfoepitelyal kist

3.2. *Solid*

3.2.1. Kronik pankreatitis

3.2.2. Lenfatik skleroz pankreatitis (otoimmün)

3.2.3. Heterotopik dalak

2.2.2. Pankreas kanserinin moleküler mekanizması

Pankreas kanserleri için Jones ve ark. (71)'larının 20.000'den fazla gen analizini yaptıkları çalışmalarında 1561 somatik gen mutasyonu ve 63 genetik değişiklik bulduklarını açıklamışlardır. Toplamda açıklanan 12 adet yolaktan en önemli beş yolak; apoptoz, DNA hasar tamir mekanizması, hücre siklusu G/S faz ilerlemesi, hücre-hücre adezyonu ve invazyon olarak bildirmişlerdir (72).

Pankreas kanseri için tümör oluşum mekanizmasında dönüştürücü (transforming) büyüme faktörü-beta (TGF-β) sinyalizasyonunun bozulmasının önemli olduğu bilinmektedir. Normal şartlarda TGF-β hücresel çoğalma ve farklılaşmayı, sağkalımı ve hücre adezyonunu kontrol ederek doku homeostazisini düzenler. TGF-β sinyalizasyon bozukluğu tümörün homeostatik dengenin etkilenmesi ile tümör büyümesi, invazyon, metastaz ve anjiyogenezin meydana gelmesine neden olur (73). Yapılan çalışmalar TGF-β'nın sitotoksik T lenfosit ve doğal öldürücü hücrelerinin inhibisyonu üzerinden immün sistemi baskılayıcı özelliği olduğunu, aynı zamanda Foxp3+ düzenleyici T lenfosit ve antijen sunan hücreleri etkin hale getirerek immün cevabı tetiklediğini açıklamaktadır (74, 75).

Pankreas kanseri için bir diğer moleküler yolak ise K-RAS pro-onkogen aktivasyonu olarak açıklanmaktadır. K-RAS, önemli bir onkogen olup çoğu insan kanserlerinde mutant olarak yer alır. K-RAS onkogeni, pankreas kanserinde düşük prognoz ile ilişkilendirilmektedir (64).

2.2.3. Pankreas kanseri risk faktörleri

Pankreas kanseri için bu zamana kadar belirlenen risk faktörleri, değiştirilebilen ve değiştirilemeyen olarak iki alt başlık altında incelenmektedir (1).

2.2.3.1. Değiştirilemeyen risk faktörleri

Değiştirilemeyen risk faktörleri arasında kan grubu farklılıkları, yaş, cinsiyet, etnik köken, gut mikrobiyotası, aile hikâyesi-genetik yatkınlık ve diyabet yer almaktadır. Wolpin ve ark (76, 77)'nın Amerikada yaptıkları çalışmalarında, A, B ve AB kan gruplarının 0 grubuna göre daha yüksek risk faktörü olduğunu açıklamışlardır. Sonuçlar, pankreas kanseri kohort konsorsiyumunun karşılaştırdığı 12 topluluk çalışma sonucu ile uyumlu olmuştur. Bununla birlikte vakaların %90'ı 55 yaş ve üzerinde görülmektedir (78). Dünya çapında pankreas kanseri görülme sıklığının, erkeklerde kadınlara göre daha fazla olduğu (erkekte oran 5.0 – kadında oran 4.0) açıklanmıştır (11). Ayrıca, Memba ve ark. (79) pankreas kanseri ve gut mikrobiyotası ile ilgili yaptıkları çalışmada düşük miktarda *Neisseria elongata* ve *Streptococcus mitis* ile yüksek miktarda *Porphyromonas gingivalis* ve *Granulicatella adiacens* bakteri florasının artmış pankreas kanser riski ile doğrudan ilişkili olduğunu belirtmişlerdir. Değiştirilemeyen risk faktörlerinden biri de diyabet olarak görülmektedir, 36 adet araştırmanın meta analiz çalışma sonucuna göre pankreas kanser riski tip 2 diyabetli hastalarda artış göstermiştir (80). Glikolize hemoglobin olan Hb1Ac, pankreas kanserinin erken teşhisinde önem teşkil etmektedir (81).

2.2.3.2. Değiştirilebilir risk faktörleri

Pankreas kanseri için değiştirilebilir risk faktörleri sigara, alkol, kronik pankreatit, obezite, diyet ve beslenme, infeksiyon olarak belirtilmektedir (1). *Helicobacter pylori* ve hepatit C enfeksiyonu da pankreas kanseri için risk faktörü olarak açıklanmıştır (82, 83).

Dünya Kanser Araştırma Fonu (World Cancer Research Fund International, WCRFI)'nun 2012 yılında artan vücut kitle indeksi ve pankreas kanser ilişkisi ile ilgili

açıkladığı 26 çalışmanın sonuçlarına göre cinsiyet fark etmeksizin özellikle obez bireylerde her 5 birim artan vücut kitle indeksi (BMI) %10 oranında pankreas kanseri riskini de arttırmaktadır (1, 84). Bununla birlikte aynı fonun açıklamalarına göre, işlenmiş kırmızı et, alkol tüketimi N-nitrozo gibi karsinojen içeriklerin oluşumuna ve DNA hasarına neden olarak pankreas kanseri için önemli bir risk faktörü haline gelmiştir (84).

2.2.4. Pankreas kanseri tedavileri

Pankreas kanseri, kemoterapi, radyoterapi, immün tedavi ve hedefli tedavi seçeneklerine karşı oldukça dirençlidir. Pankreas kanseri için genel olarak tavsiye edilen ajan sentetik pirimidin nükleozid analoğu olan gemsitabin (2'2'-difluorodeoxycytidine)'dir (85). Metastatik pankreas kanserinde gemsitabin ile nab-paklitaksel birlikte kullanımı bir yıllık sağkalımı %22'den %35'e, iki yıllık sağkalımı ise %4'ten %9'a çıkarmaktadır (86). Pankreas kanserinin 2030 yılında kansere bağlı ölümlerde ikinci sırada yer alacağı öngörülmektedir (16). Metastatik pankreas kanserli hastalarda ikili kemoterapi uygulamaları ancak ~11 ay sağkalım sağlamaktadır. Zaten pankreas kanserinde sağkalım süresi ~11 ay olarak açıklanmıştır (64). Aynı zamanda bu kanserin 45 ve üzeri yaşta görülme sıklığı 45 altına göre 0.86'dan 1.30'a artış göstermektedir (87).

2.3. Pankreatik Duktal Adenokarsinom

Pankreatik duktal adenokarsinom (PDAC) en malign gastrointestinal sistem kanserlerinden biri olup, erken evrede anlaşılması zor olan zayıf prognoza sahip bir kanser çeşididir (88). Pankreas baş, gövde ve kuyruk kısımları ile hem endokrin hem ekzokrin yapıda bir organ olup, dukt, asiner, endokrin hücreler ve bir miktar stroma yapısından meydana gelmektedir. PDAC pankreasta oluşan neoplazmların dukt hücrelerinden köken alması ve duktal sistemde gelişmesi ile tanımlanmaktadır (1). PDAC en sık görülen ekzokrin pankreas kanseri çeşidi olup, duktal öncü lezyonlardan köken alır. Bu aşamalar;

1. Pankreatik intraepitelyal neoplazi: PaIN1,

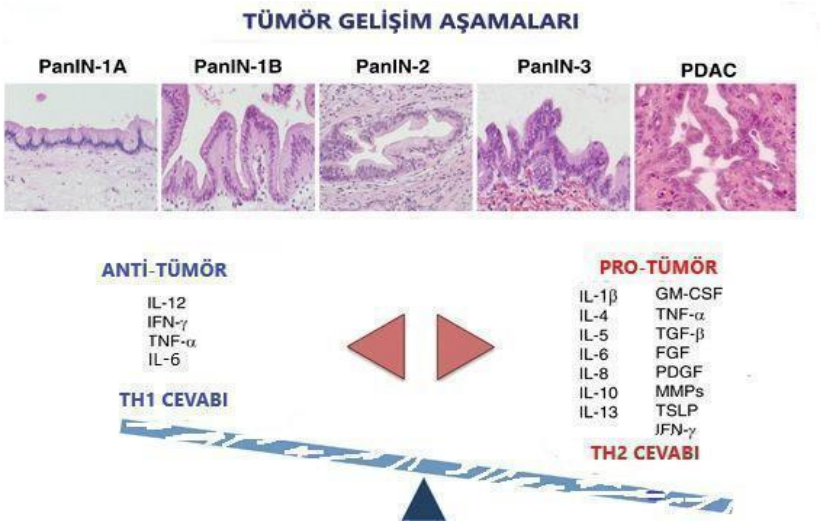
2. Hiperplazi: PaIN1-A/B

3. *İn situ* karsinoma: PaIN3 olarak evrelenebilir (64).

Duktal adenokarsinom tümörleri %70 pankreasın baş kısmında, %20 boyun kısmında ve %10 kuyruk kısmında görülmektedir. Ayrıca duktal adenokarsinomlar asiner tümörlerin aksine amilaz, lipaz, tripsin gibi pankreatik sindirim enzimlerine karşı immün aktivite göstermemektedir. Bu kanser için temel tanımlama, sağlıklı pankreas asinar hücrelerinin adenokarsinoma dönüşümü olarak belirtilmektedir (72, 89). Kronik pankreatit, radyasyon, hidrokarbon benzeri kimyasallara maruz kalma, tip 2 diyabet pankreatik duktal adenokarsinom gelişiminde önemli rol oynamaktadır. Bunlara ek olarak pankreatik kanser ile düşük lif ve yüksek yağ/et ağırlıklı beslenme şekli de ilişkili bulunmaktadır (90). Pankreatik duktal adenokarsinoma sahip hastaların yalnızca %10-20 kısmı cerrahi işlem ile müdahale edilebilir durumda olmakta, 5 yıllık sağ kalım oranı ise %5,5'in altında olarak açıklanmaktadır (91). Duktal adenokarsinomlar pankreas kanserlerinin %90'dan fazla kısmını oluşturmaktadır. Bireylerin radikal rejeksiyon ve adjuvan kemoterapi görmelerine rağmen 5 yıllık sağ kalım oranı %15-25 aralığında kalmaktadır (90, 92).

2.3.1. Pankreatik duktal adenokarsinom moleküler mekanizması

Pankreatik duktal adenokarsinom için açıklanan moleküler sinyal yolaklarından en önemlileri apoptoz, DNA tamir mekanizması, G/S hücre döngüsü ilerlemesi, invazyonun düzenlenmesi, embriyonik sinyalizasyon, mitojenle aktiflenen protein kinaz (MAPK) sinyalizasyonu, TGF-β sinyalizasyonu olarak sayılabilir (93). Şekil 2-2'de görülen PDAC gelişim aşamalarında moleküler sinyal yolakları aracılığıyla farklılaşan immün sistem hücreleri, T hücre-1 (TH1)/T hücre-2 (TH2) immün cevap dengesinin bozulmasına yol açmaktadır. Şekil 2.2. (94).



Şekil 2-2: Pankreatik duktal adenokarsinom (PDAC) gelişimi sırasında immün sistem hücrelerinin immün cevaba etkisi (94).

2.3.1.1. Apoptoz

Programlı hücre ölümü kanser hücresinin direnç nedeni ile hayatta kalmasının önemli bir faktörü olduğundan karsinogenezde temel rolü üstlenmektedir (93). PDAC için apoptozda rol oynayan genler B hücre lenfoma-2 (Bcl-2), miyeloid hücre farklılaşma protein-1 (Mcl-1), fosfoprotein p53, NF-kβ olarak tüm PDAC tümörlerinde farklılaşmış olarak bulunmuştur. Örneğin, apoptotik hücrelerin yüksek fraksiyonu, toplam daha uzun sağ kalım oranı yanı sıra nodal tutulumun olmaması ile ilişkili olarak açıklanmıştır (95-97). Aynı zamanda apoptoz yolaklarında meydana gelen hasar, kemoterapötik ajanlara karşı direnç ile sonuçlanmaktadır (72).

2.3.1.2. DNA hasar tamir mekanizması

Hücrenin ömrü boyunca DNA hasar kontrol genleri hücrede meydana gelen herhangi bir hasarı onaran ve dolayısı ile DNA'nın bütünlüğünü korumaktan sorumlu olan proteinleri kodlar (93). PDAC için DNA hasar onarımında yer alan en önemli protein tümör baskılayıcı role sahip p53 proteinidir. p53, apoptoz ve hücre döngüsü kontrol mekanizmasında yer aldığından ötürü genotoksik strese karşı hücresel yanıtın sorumlusudur. p53 fonksiyonu çoğu insan karsinom çeşitlerinde bozulmakta ve PDAC vakalarının %50-75'inde tümör baskılayıcı p53 kaybı mevcuttur (98, 99).

2.3.1.3. Embriyonik sinyalizasyon

Pankreatik kanser için önemli olduğu belirlenen HedgeHog, Notch ve Wnt embriyonik sinyal yolaklarının düzenlenmesi, pankreas kanser oluşum aşamasında ya da invaziv PDAC'da belirlenmiştir. Aynı zamanda bu yolakların baskılanması, tümör hücrelerinin azalması ve apoptozun artışı ile sonuçlanmıştır. PDAC başta olmak üzere çoğu insan kanserlerinde, Notch yolağının aktivasyonu, hücre çoğalması ve anjiyogenez ile ilişkilendirilmiştir (100). Sonik Hedgehog aktivasyonu pankreatik kanser ve öncü lezyonlarında görülürken, kanser başlangıç ve büyümesinde aracı olarak görev almaktadır. Yapılan bir çalışmada, PanIN benzeri lezyon taşıyan pankreatik endodermde Hedgehog sinyalizasyonu susturulmuş transgenik fareler incelendiğinde, HedgeHog baskılanmasının hem *in vivo* hem de *in vitro* tümör hücrelerini apoptoza götürdüğü ve hücre çoğalmasını bloke ettiği belirtilmiştir (101).

2.3.1.4. MAPK sinyalizasyonu

PDAC oluşum aşamasında, büyüme faktörleri, stres ya da diğer hücre dışı sinyaller tarafından uyarılan/aktive edilen MAP2K kinaz, aktif MAPK'nın birinde fosforilasyona neden olur. Fosforilasyon ile takiben aktive olan ekstraselüler sinyal-düzenleyici kinaz (Erk), c-Jun N-terminal kinaz (JNK/MAPK8) ya da p38 sinyal kaskadı, çoklu onkojenik hücresel fonksiyonların gerçekleşmesini sağlar (102).

2.3.1.5. TGF-β sinyalizasyonu

PDAC başta olmak üzere pankreas kanserleri için TGF-β yolağı doğrudan farklılaşma, çoğalma, apoptoz ve anjiyogenez ile ilişkilidir. TGF-β tip II reseptörü serin/treonin kinazın reseptör I alt ünitesini fosforillemesi ile SMAD transkripsiyon faktörü (özellikle SMAD4) fosforile olarak ilgili bölgede ekspresyonu düzenlemektedir. TGF-β tip II reseptörünün inaktif olduğu PDAC vakalarının yarısında SMAD4 fosforilasyonun azaldığı bildirilmiştir (103).

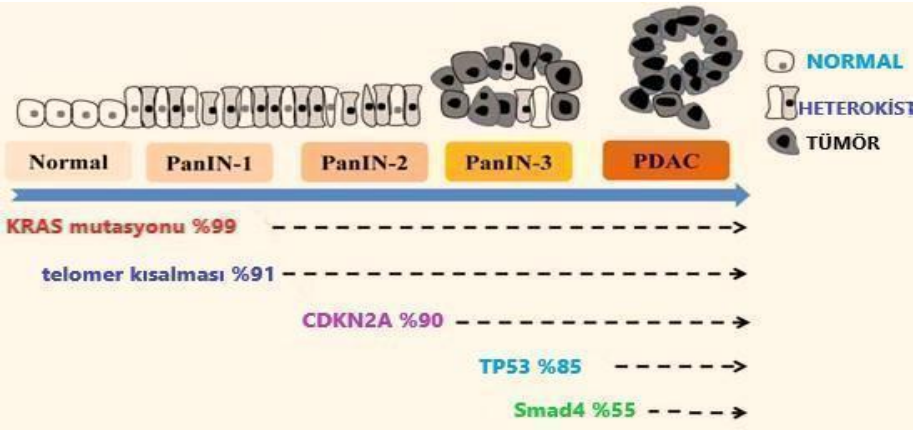
2.3.1.6. K-RAS aktivasyonu

K-RAS (Kirsten sıçan sarkoma viral onkogen) mutasyonu pankreatik karsinogenezdeki en erken olaylara aittir. K-RAS proteinleri çoğalma, farklılaşma ve hayatta kalma gibi çok çeşitli hücresel işlevlere aracılık eden ve sıklıkla insan

kanserlerinde mutasyona uğramış bir sinyal-dönüştürücü GTPaz ailesi içerir. Pankreatik karsinogenezde öne çıkan rolü nedeniyle K-RAS, PDAC tedavisinin çekici bir terapötik hedefi olarak kabul edilse de proteinin biyokimyasal özellikleri bunu zor bir hedef haline getirmektedir (104, 105). K-RAS aktivasyonu, RAF-MAPK kaskadı, proliferasyon, invazyon, metastaz ve hayatta kalmanın uyarılmasıyla sonuçlanan, PDAC ilerlemesini de böylelikle mümkün kılan efektör yolaklarını aktive etmektedir (106, 107).

Onkogenik K-RAS G12D'nin pankreasa özgü ekspresyonu öncü lezyonlarının gelişiminin eşlik ettiği bir proliferasyon patlaması yaratır. Bu öncü lezyonlar ise pozitif yönde hücre yaşlanmasına bağlı β-galaktosidaz ve hücre döngüsü inhibitörlerinin indüksiyonu dâhil olmak üzere pek çok yaşlanma özelliği sergiler (108). PDAC gelişim aşamalarının birinci basamağından itibaren K-RAS aktivasyonu %99 olarak saptanmıştır (Şekil 2-3) (109).

Fare pankreatik duktal adenokarsinom modelinde p53 tümör baskılayıcı gen kaybı, K-RAS onkogeninin erken aşamada %100 penetrans ile sonuçlanan yaşlanmayı yeniden düzenlemesine, böylelikle neoplastik hücrelerde histopatolojik PDAC benzerliği ile karaciğer ve akciğer metastazlarını ortaya çıkmasına yol açmaktadır (110).



Şekil 2-3: Pankreatik duktal adenokarsinom (PDAC) gelişim aşamaları (109). CDKN2A; siklin bağımlı kinaz inhibitör-2A, TP53; fosforile p53, Smad4; dekapentaplejik homolog-4.

2.4. Panc02 Tümör Modeli

Deney hayvanlarında pankreatik duktal adenokarsinom tümör modeli ilk kez 1984 yılında Corbett ve ark tarafından açıklanmıştır. 60 adet Balb/c ve 90 adet C57BL/6 farelerin pankreas dokularına 500 mg/kg 3-metil-kolan-threne (3-MCA) maddesi uygulanarak 150 deney hayvanından toplamda 13 adet duktal adenokarsinom elde edilmiştir. Bunlardan ikisi, C57BL/6 fare pankreas orijinli olup, Panc 02 ve 03 kodları ile kaydedilmiştir. Hücreler elde edildiğinde II. derecede iken, deney hayvanına tekrar verildiğinde, oluşan tümör III. derece olarak açıklanmıştır. Transplante edilebilen bu tümörler, bir grup seri pasajlama ile biyolojik araştırmalarda ve ilaç direnci deneylerinde kullanılabilir hale getirilmiştir (13).

2.4.1. Panc02 tümör modeli çeşitleri

Panc02 tümör hücrelerinin eldesinden bu yana, *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar incelendiğinde, bu hücrelerin deney farelerine verilişinin iki yol ile gerçekleştiği saptanmıştır. Hücrelerin hayvanın pankreas kuyruk kısmına cerrahi yöntem ile verilmesi metastatik model olup, tedaviye başlama süreci oldukça kısadır (111, 112). Bir diğer model ise Panc02 hücrelerinin dermis altına subkutan verilmesi ve tümör gelişiminin dijital kumpas ile izlenerek tedaviye başlanan çeşididir (113).

2.4.1.1. Subkutan Panc02 tümör modeli ilişkili çalışmalar

Panc02 hücrelerinin fareye subkutan enjeksiyonu ile yapılan çalışmalarda, yüksek sıcaklıkta inaktif tümör lizatı dendritik hücreler ile birlikte veya ayrı olarak denenmiştir. Çalışmada en düşük tümör çapı, ikili uygulamanın olduğu grupta saptanmıştır. Aynı zamanda bu grupta sitotoksik T lenfosit cevabı daha güçlü olmuştur (114). Aynı modelin uygulandığı başka bir çalışmada ise *Clostridium Novyi*-NT bakteri sporları fosfat tamponlu tuz çözeltisi içinde intravenöz olarak uygulanmıştır. Bu uygulama sonrasında, sporların toksisitesi ile tümör boyutunun ilişkili olduğu saptanmıştır (115). Bu bakteriyel tedavinin *in vivo* da anti-tümör reaktivitesi olsa da total koruyucu bağışıklık hayvanların yalnızca %20'sinde görülmüştür.

Pilon-Thomas ve ark. (116)'nın çalışmalarında 6-8 haftalık dişi C57BL/6 soyu farelere subkutan Panc02 tümör modeli uygulayıp, kontrol ve tümör grubu hayvanların

dalak dokularında çoğalma, farklılaşma, göç ve programlı hücre ölümünden sorumlu Src homoloji-2 alt ünitesi içeren inositol 5' fosfataz (SHIP-1) ekspresyonu incelenmiş ve tümör grubunda ekspresyonun düştüğü açıklanmıştır. Ancak pro-yaşamsal yolak aktivitesi olarak fosforile Akt-1 ve Bcl-2 protein miktarlarının tümörlü hayvanlarda arttığı saptanmıştır.

Tümör içi immün tedavi hedefli Panc02 *in vivo* model çalışmasında, IL-12, bir polisakkarit olan kitosan ile yeniden formüle edilmiş IL-12, granülosit-makrofaj koloni stimüle edici faktör (GM-SCF) ve IFN-γ tedavileri uygulanmıştır. Sonuçlarda, kitosan/IL-12 tedavisinin tek başına IL-12 tedavisine göre anti-tümör etkisinin anlamlı olduğu açıklanmıştır (117).

Başka bir çalışmada ise, Panc02 subkutan tümör modeli uygulanan deney hayvanlarına hipoksi bağımlı faktör (HIF)-1 alfa inhibitörü olan Px-478, gemsitabin ile birlikte uygulandığında, tedavinin istatistiksel olarak anlamlı şekilde anti-tümör etkiyi şiddetlendirdiği ve tümöre özgü T lenfosit hücre popülasyonunu arttırdığı belirlenmiştir (92).

2.5. İnflamasyon

İnflamasyon vücudun mikrobiyal infeksiyona veya hücre doku ve sistemlere zarar veren vücut içi ve vücut dışı zararlı oluşum/maddelere karşı bir savunma sistemi cevabıdır. Bir başka deyişle inflamasyon, zararlı uyaranlara cevap olarak, enfeksiyöz ajanları ortadan kaldırarak doku homeostazisini düzenleyen ve hayatta kalmaya yardımcı doğal bir koruma mekanizmasıdır. Bu cevap, doku hasarının gerçekleştiği bölgeye lenfoid sıvı, protein ve lökositlerin göçü, kan akışında meydana gelen farklılıklar ve kan damarlarının geçirgenliğinde artış gibi değişimlerden oluşmaktadır (118). Aynı zamanda, inflamasyon mekanik yaralanmalar, yanık/elektrik akımı, ultraviyole ışın (güneş yanığı), kimyasallar (fenoller, asitler ve alkalitler) ve alerjenlere karşı vücut savunma sisteminin oluşturduğu cevaptır.

İnflamatuvar cevap, en fazla birkaç gün sürdüğünde akut inflamasyon olarak tanımlanır. Bu süreden daha uzun süren yanıt ise kronik inflamasyon olarak adlandırılmıştır. İki süreç de biyolojik, kimyasal ve fiziksel uyaranlara verilen karmaşık bir cevaptır (118, 119).

2.5.1. Akut inflamasyon

Akut inflamasyon, immün sistemin kısa süreli cevabıdır. Fonksiyonları ise mikropların öldürülmesi, dokunun enfekte kalıntılardan temizlenmesi ve hasarlı dokunun tamiri olarak sıralanabilir.

Akut inflamasyonda hasarlı bölgeye akut faz proteinleri, sitokinler ve kemokinler gibi çözülebilir aracılar reaksiyon kaskadını gerçekleştirmek üzere göç ederler. Hasar/yaralanma derecesine bağlı olarak, akut inflamasyon, hasarı çözmek ve iyileşme süreçlerini başlatmak için yeterli olabilir (118, 120). Herhangi bir sebeple hücreler hasar gördüğünde, bazofiller ve mast hücreleri aracılığı ile salınan histamin, kapiler ve venlere diffüz ederek vazodilatasyona neden olur. Böylelikle geçirgenlik artar ve bu artış kanın bu hasarlı bölgeye hücumunu hızlandırır. Kan bu bölgeye gerekli içeriklerini bırakır. Bunlardan en önemlileri sitokin ilişkili makrofajlardır. Böylelikle hasarlı ortamda ilişkili sitokin salınımı gerçekleşir. Bu sitokinlerden en önemlisi TNF-α'dır (121).

2.5.2. Kronik inflamasyon

Akut inflamasyonun sonlanmadan devam ederek başta fagositik hücreler olmak üzere savunma sistemi hücrelerinin doku hasarını oluşturması ile uzun süreli devam eden inflamasyon çeşididir. Sürekli inflamasyon, uyarılmanın uzun süre devam ettiği ya da kendi moleküllerine uygun olmayan bir reaksiyonun gelişmesi durumlarında fibroz ve doku hasarının ortaya çıkmasıyla kronik inflamasyon olarak gelişir. Kronik inflamasyonun ateroskleroz, artrit, astım, kanser, otoimmün hastalıklar diyabet olmak üzere birçok hastalığa ve yaşlanma koşullarına katkıda bulunduğu bildirilmiştir (120). Kronik inflamasyon, akut inflamasyonun tamir edilmemesi nedeni ile son bulamamasıdır. Kronik inflamasyon akut inflamasyonun aksine yıllarca sürebilir (121). Akut inflamasyon başladıktan sonra onarım, cerahat ve kronik inflamasyon olarak devam eder (118, 122). İyileşme süreci, çoğalma yeteneğine sahip hasarlı hücrelerin rejenerasyonunu kapsar. Rejenerasyonun başarılı olamadığı durumlarda onarım, endotel hücrelerin yeni kan damarı oluşturması ve fibroblast hücrelerinin kollajen lif üretimi ile yara izi olarak sonuçlanır. Çoğunlukla ölü veya ölmekte olan nötrofillerden, bakteri, ölü/ölmekte olan hücre artıkları pus adı verilen yapıyı oluşturur (123, 124).

2.6. Gram negatif bakteri

Bakterilerin gram negatif (-) veya pozitif (+) olarak iki ana sınıfa ayrılmaları, gram boyasına karşı oluşturdukları tepki ile ilişkilidir. 1884 yılında Christian Gram, bakteri hücre duvarlarının kimyasal yapısı ve yapısal formatı nedeni ile ışık mikroskobunda görüntülenebilir bir boyama sistemi geliştirmiştir. Gram (-) bakteriler, lipid açısından zengin bir dış zara sahip olmaları yanı sıra plazma zarı içerirler. Aynı zamanda ince bir peptidoglikan tabakasına sahiptirler. Gram boyama işleminde renk giderici alkol serileri aşamasında, hücrelerden birinci renk kristal viyole kalıntısı olan mor renk yıkılır. Boyamanın ikinci aşamasında karbol fuksin veya safranin ile hücreler kırmızı renkte görünür. Gram (+) bakteriler, mor rengin yıkımına izin vermeyen daha kalın ve daha esnek hücre duvarları ile örtülüdür. Bu nedenle mor renkte gözlenirler (125, 126).

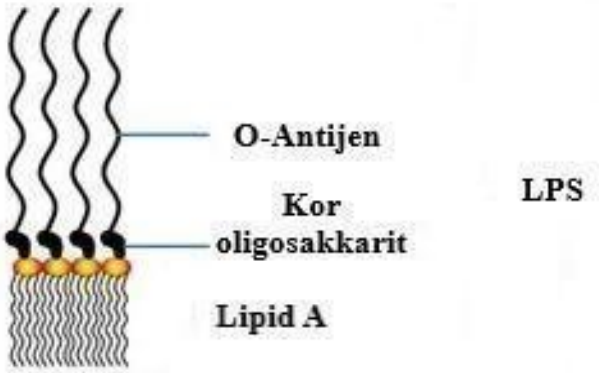
Gram boyamasının etkilerine karşı çıkan bir başka bakteri grubu daha mevcuttur. Bu gruba 'gram-değişken bakteri' adı verilir. Örneğin arkea grubu üyeleri, gram boyaması ile kolay ayırt edilemezler (127).

2.6.1. Lipopolisakkarit (LPS)

Bakteriler, gram (-) ve gram (+) olarak iki ana gruba ayrılırken, virülans faktörleri de lipopolisakkarit (LPS), lipoarabinomannan (LAM), ve lipoteichoic asit (LTA) olarak farklılık göstermektedir. LPS gram (-) bakterilerin hücre duvarında yer alan farklı varyasyonlara sahip heterojen, küçük amfifilik molekül olarak tanımlanmaktadır (128). Aynı zamanda bakterilerin sınıflandırılmasına göre alt serotiplere ayrılır (129). Bu nedenle LPS, sero gruba özgü bir aktif infeksiyon indikatörüdür (130).

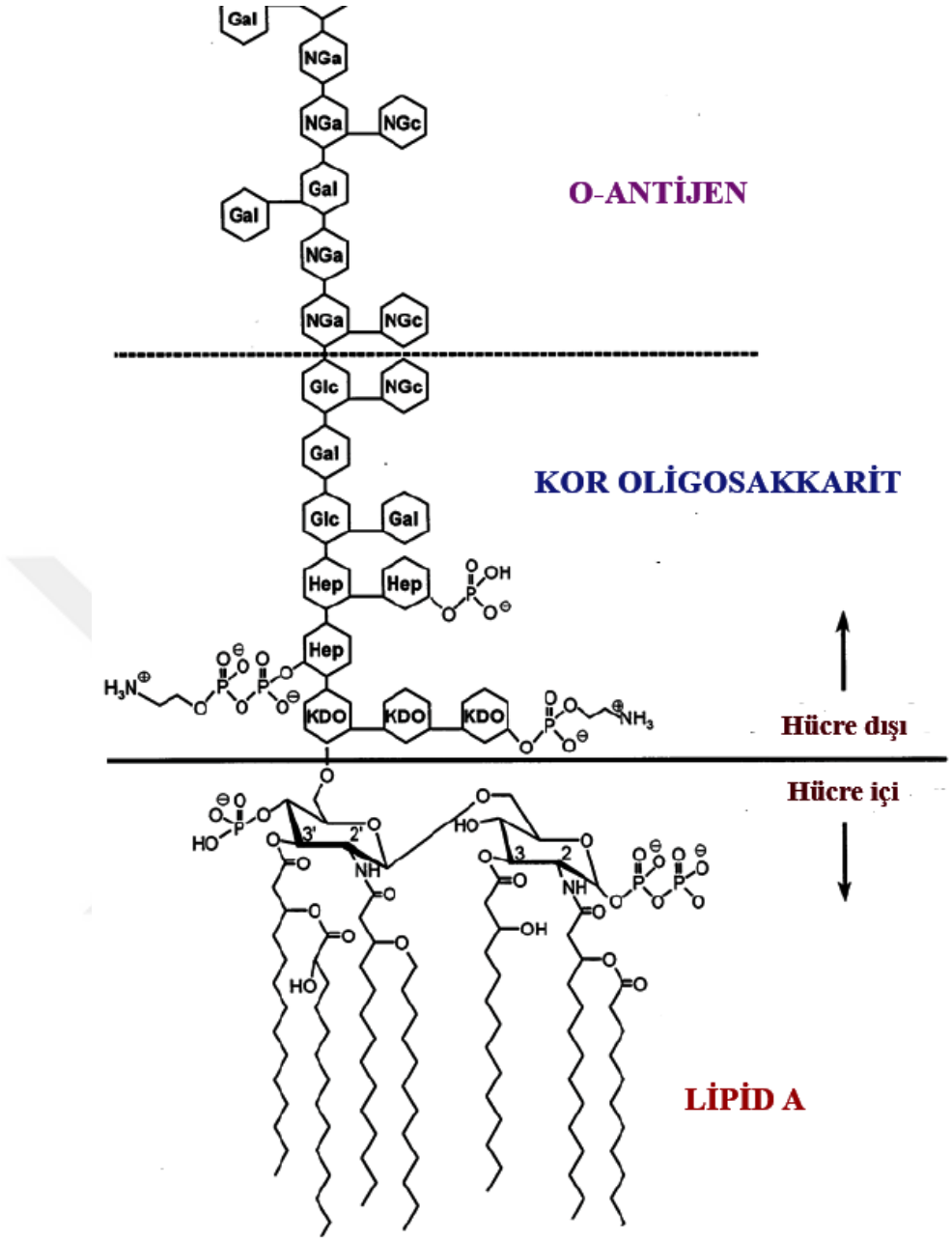
Bakteriyel bir endotoksin olan LPS inflamatuvar düzenleyicilerin ve prostaglandin, lökotrien, platelet aktive edici faktör, süperoksit anyonu, hidrojen peroksit, nitrik oksit, interlökinler özellikle TNF-α'nın da aralarında sayılabileceği immün düzenleyici sitokinlerin üretimini indükler (128,131). Gram (-) bakteri için model organizma olarak belirtilen *Escherichia coli* (*E. Coli*) yaklaşık 3,5 x 10^6 adet LPS molekülü içerir (132). *E. coli* bakterisinin lipid A yapısında 6 adet yağ asidi ve 2 adet fosfat molekülü taşıyan beta-1.6-D-glukozamin disakkariti bulunmaktadır (132).

Her bakteri hücresi ~62 pg LPS içermektedir. Tek bir LPS molekülünün yapısını oluşturan ve varyasyona neden olan önemli bileşenler; çekirdek (kor) polisakkaritleri (~20-40), lipid A (~5-7) ve O-antijen zinciri olarak bilinmektedir (Şekil 2-4) (131, 133, 134). Çekirdek polisakkarit yapısı ise çoğunlukla fosfat ve etanol amin gruplarında fonksiyonel olan heptoz ve 2-deoksi-d-manno oktulosonik asitten meydana gelir (Şekil 2-5) (135, 136). Normalde saklı olan lipid A kısmı, yüksek derecede immünojeniktir ve bu bölgenin septik şok ya da sepsisin gelişimine neden olduğu bilinmektedir. Aynı zamanda doğada kendiliğinden bulunan bakterilere kıyasla mutant bakterilerin lipid A yapıları oldukça fazladır (132).



Şekil 2-4: Bir lipopolisakkaritin O-antijen, kor ve lipid A bölgeleri (134).

LPS'nin 2 farklı formu smooth (S-form) ve rough (R-form) olarak mevcuttur. S-form, LPS'nin bitiş kısmının distalindeki O-polisakkarit antijen zincirinin uzunluğu ile açıklanmakta, virülans özelliğin indikatörü olarak bildirilmektedir. R-form ise O-polisakkarit antijen zincirinden yoksun LPS çeşididir (132). Lipid A bölgesi, endotoksin olarak adlandırılır ve LPS'nin biyolojik özelliklerini ve etkisini göstermesine neden olur (137).



Şekil 2-5: *E.coli* lipopolisakaritinin kimyasal ve immünojenik yapısı (136).

2.6.2. Toll benzeri reseptör-4 (TLR-4)

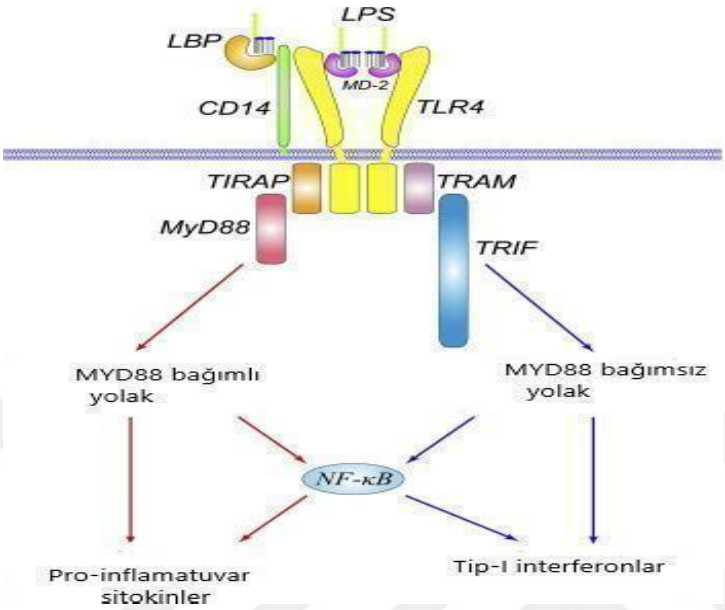
TLR-4 genel olarak LPS için sinyal cevap molekülü olarak tanımlanmıştır. TLR'ler, ekstraselüler lösin açısından zengin zincir tekrarları ve IL-Reseptör 1 (IL-R1) ailesine ait intraselüler bölge olarak iki alt birimden oluşur. Bu alt birimler IL-R1 ve IL-R1 ilişkili kinaz (IRAK) fosforilasyonu ve adaptör molekül olan MYD88 ile iki farklı sinyal yolağı aktifleşmektedir. Bunlardan biri c-jun N-terminal kinaz (JNK), MAP kinaz

ailesi ve NF-κβ transkripsiyon faktörüdür. Bu temel aktivasyon yolağı ile ilişkili yapılan bir çalışmada, MYD88 eksik hücreler, inflamatuvar sitokinleri LPS'ye cevap niteliğinde üretememiştir (138, 139).

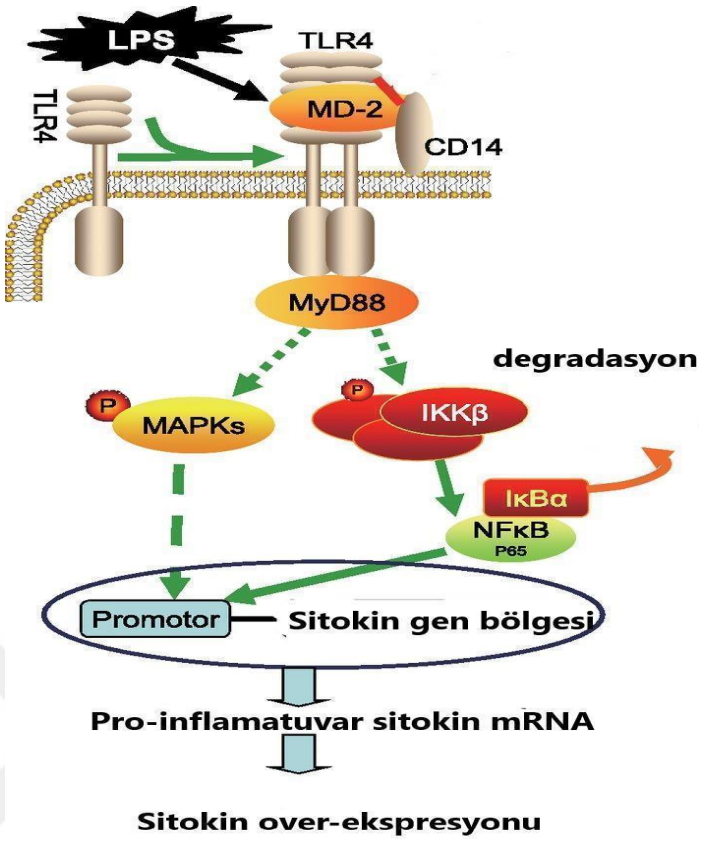
Araştırmalar glioma hücrelerinde sitoplazma ve membranda bulunan TLR-4 üzerinden LPS tedavisinin intrakranial tümör hücre büyümesini baskıladığını göstermiştir. Aynı zamanda hücrelerin immün fenotiplerinde 6 saatlik LPS uygulaması sonrası MHC-I, MHC-II CD80 ve CD86 ileriye dönük düzenlenmesi üzerinden farklılaşma kaydedilmiştir (140).

2.6.3. Lipopolisakkarit (LPS) aktivasyonunun moleküler mekanizması

LPS mononüklear fagositleri *in vivo* ve *in vitro* olarak aktifleyerek, bu hücrelerin fonksiyonel kapasitelerini arttırmaktadır (141). LPS'nin monosit ve makrofaj hücrelerinin aktivatörü olmasının nedeni lipid A bölgesinin uzunluğundan kaynaklanmaktadır (142). Lipid A bölgesi uzun yağ asit zincirleri ile fosforile diglukozamin alt ünitesinden meydana gelmektedir (123). LPS immün sistem hücrelerinden monosit ve makrofaj hücrelerinin yüzeylerinde bulunan TLR-4 ile etkileşime girerek, bu hücrelerin uyarılmasına neden olmaktadır (26). Bu sinyal kaskadı, lipid A kısmının akut faz proteini olan LPS-bağlayan protein ile etkileşime girmesi ile başlamaktadır. Böylelikle serbest LPS monosit ve bazı makrofajlarda bulunan CD14 yüzey antijen yapısı ile etkileşir ve TLR-4/MD2 (myeloid farklılaşma faktörü-2) reseptörüne bağlanarak TLR-4'ün aktifleşmesini sağlar. TLR-4 aktifleşmesi erken aşamada MYD88 bağımlı ve MYD88 bağımsız olup TNF reseptör ilişkili faktör (TRIF) ve TIR-ilişkili adaptör protein (TRAM) gibi moleküller yardımı ile gerçekleşmektedir. LPS, dimerize TLR-4 adaptör proteini MYD88'in aktifleşmesini sağlar. Şekil 2-6'da görüldüğü gibi, LPS, MYD88 bağımlı ve bağımsız yolaklar üzerinden NF-κβ'nın aktivasyonunu sağlayarak pro-inflamatuvar sitokinler ve tip I interferonların salınımını uyarır (143). Bununla birlikte MYD88, NF-κβ'nın alt ünitesi olan IκK aracılığı ile IK-β alt ünitesi, proteozomlarda fosforilasyon ve ubikitinasyon bağımlı yıkıma uğrar. Böylelikle sağ kalım ve inflamasyondan sorumlu NF-κβ'nın p50-p65 heterodimer formu serbest hale geçer ve sitoplazmadan nukleusa taşınarak proinflamatuvar sitokinlerin transkripsiyonunu düzenler (132, 144, 145) (Şekil 2-7).



Şekil 2-6: NF-κβ'nin MYD88 bağımlı/bağımsız aktivasyonu (143). TRIF; TIR (Toll-interlökin-1 receptör) alt ünitesi içeren adaptör interferon beta, TRAM; TRIF ilişkili adaptör protein, TIRAP; TIR alt ünitesi içeren adaptör protein, NF-κβ; nüklear kaktör kappa beta, LPS; lipopolisakkarit, MYD88; miyeloid farklılaşma birincil yanıt 88.



Şekil 2-7: MYD88 aracılı NF-κβ ve ilişkili sitokin aktivasyonu (132). MAPK; Mitojenle aktiflenen Protein Kinaz, TLR-4; Toll Benzeri Reseptör-4, CD14; Farklılaşma küme 14, MYD88; Miyeloid farklılaşma birincil yanıt 88, IκK; inhibitör kappa kinaz, NF-κβ; Nüklear Faktör kappa beta, LPS; lipopolisakkarit.

2.6.4. LPS fonksiyonu ve ilişkili çalışmalar

In vivo ve *in vitro* çalışmalar, bakteriyel lipopolisakkaritlerin sitotoksisite ve inflamasyon ilişkili toksik cevaba neden olduğunu açıklamaktadır. İnsan hepatoma HepG2 hücreleri üzerine LPS uygulanarak inflamatuvar yanıt ve bununla birlikte sitotoksik etki meydana getirilmiştir (146). LPS hayvan sepsis modeli için yüksek miktarda tek doz olarak uygulanmaktadır. Yapılan bir çalışmada, LPS aracılı sepsis modelindeki M1 ve M2 makrofajların rolleri araştırılmış, *E.coli* kaynaklı LPS (100 mg/kg), deney hayvanlarına intraperitoneal uygulanmış 12 saatte bir akciğer infiltrasyonu ölçülerek sepsis modeli oluşturulduğu açıklanmıştır (26).

Akut faz reaksiyonu için genel bir model ajanı olarak da LPS kullanılmaktadır. *E. coli* bakterisinin 3 farklı suşu olan O55:B5, O127:B8 ve O11:B4 serotip LPS'ler, 2,

50 ve 250 µg/kg dozları belirlenerek sıçanlara intraperitoneal olarak uygulanmıştır. LPS verilmesi, serotip ve doz farklılığına bağlı olarak sıçanlarda vücut sıcaklığını arttırmaktadır (147). Yapılan başka bir çalışmada, *E. coli* ve *P. aeruginosa* bakterilerinin çeşitli serotiplerinin akciğer fibroblast hücrelerinde nötrofil kemotaksisine olan etkileri incelendiğinde, A549 hücreleri üzerine *P. aeruginosa* LPS aktivitesi, *E. coli*' den yüksek olarak belirlenmiş ve nötrofil kemotaksisi 12. ve 24. saatlerde artarken sonrasında sabit seviyede devam etmiştir (141).

LPS, aynı zamanda TLR-4 aktivatörü olarak görev almaktadır. *Spirulina* bakterisinden elde edilen LPS 'nin meme tümörü üzerine olumlu etkisi olduğu belirlenmiştir. TLR-4 yolağı üzerinden tümör büyümesinin LPS ile baskılandığı bildirilmiştir. Aynı zamanda LPS tedavisinin serum IL-17 ve IL-23 sitokin seviyelerini geriye dönük olarak düzenlediği ancak TLR-4 yolağında IFN-γ üretimini arttırdığı açıklanmaktadır (148). LPS'nin tümör baskılayıcı etkisini açıklayan bir başka çalışmada, insan hepatoma HepG2 hücreleri 1 µg/ml LPS ile 24 saat inkübe edilmesi ile LPS'nin tümör hücrelerinin mitokondriyal fonksiyonunu engellediği ve hücreleri ROS üzerinden apoptoza götürdüğü belirtilmektedir (146).

Bir başka çalışmada, pankreas kanseri hücre soyları olan PANC-1, MIA PaCa-2, CFPAC-1, Sw 1990, JF305 ve MIA PaCa-1 hücreleri üzerine farklı dozlarda (10, 50 ve 100 ng/ml) 24 saatlik LPS uygulanmıştır. 10 ng/ml LPS dozunun apoptoza karşı etkisiz olduğu ancak 50 ng/ml LPS dozunun tümör hücrelerinde göçü arttırıcı etki gösterdiği açıklanmıştır (149). Panc-1 ve AsPC-1 insan pankreatik kanser hücre soyları üzerine 16 saatlik 1 µg/ml LPS uygulaması ile hücrelerdeki invaziv yetenek TLR/MYD88/NF-κβ yolağı üzerinden artmaktadır (150).

2.7. İnflamasyon ve kanser

Uzun yıllardır süren çalışmalar, inflamasyonun kanser patogenezinde önemli rol oynadığını açıklar niteliktedir. Kommensal ya da patojenik mikroplar doğal immün sistem ve inflamasyonun kritik düzenleyicileridir (151). Virchow ~150 yıl önce neoplastik dokuda lökositleri göstererek inflamasyonun kanser ile ilişkisini ortaya çıkarmıştır (152). Çalışmalar devam ettiğinde kronik inflamasyonun kanser riskini arttırdığı gösterilmiştir. Tüm kanserlerin %10-20'si sıklıkla kronik inflamasyonla ilişkili

olup bunlardan en sık görülenler arasında hepatit ve hepatosellüler karsinom, kolon kanseri ve inflamatuvar bağırsak hastalığı (IBD), *H. pylori* ilişkili gastrit ve mide kanseri yer almaktadır (153). Bunların ortak nedeni ise kronik inflamasyonun tümör oluşumu ve gelişiminde rol oynayan bazı sitokin ve büyüme faktörlerini aktive ediyor olmasıdır (151). Örneğin; doku yaralanmasında, dokunun yenilenmesi sırasında hücre çoğalması artar. Yabancı ajanın ortamdan uzaklaştırılması veya yenilenmenin tamamlanması sonucu çoğalma ve inflamasyon azalır. Buna karşılık DNA hasarını ve/veya mutajenik saldırıyı ve etkilerini sürdüren çoğalan hücreler, inflamatuvar hücrelerce zengin mikro-ortamlarda, sağ kalım ve büyümeyi destekleyen faktörler ile (büyüme faktörleri ve özellikle kemokinler) çoğalmaya devam ederler. Bir anlamda tümörler bir türlü iyileşmeyen yaraları taklit eder (154, 155).

2.8. İmmünite

İmmünite (bağışıklık) bir organizmanın enfekte ajanları/patojenleri tanıma ve kendini onlara karşı savunma kabiliyeti olarak tanımlanmaktadır. İmmünite, doğal ve kazanılmış bağışıklık olarak iki ana alt grupta incelenmektedir:

2.8.1. Doğal bağışıklık

Doğal bağışıklık genetik immünite olarak tanımlanmakta ve bireye özgü karakterde ortaya çıkmaktadır. Bireyin doğuştan gelen genetik özellikleri ile şekillenen bu sistemde o türe ait her bireyde ortak olarak görülen ‘tür immünitesi’ adlı bir alt immünite tanımlanmıştır. İnsanlar, hayvan ve bitkilerde hastalık oluşturan birçok enfekte ajana karşı doğal olarak bağışıktır. Aynı şekilde insanlarda görülen bazı hastalıklara karşı hayvanların dirençli olması gibi, hastalık ilişkili reseptör bölgesinin yokluğu bu durumu açıklar. Doğal immüniteye örnek olarak *Mycobacterium avium* bakterisi, kuşlarda tüberküloza neden olmakta fakat insanlarda nadiren AIDS virüsü ile ortaya çıkmaktadır (121).

2.8.2. Kazanılmış Bağışıklık

Doğal bağışıklığın aksine, enfekte edici ajanlara karşı sonradan kazanılan bağışıklıktır. Bu durum çoğunlukla özel bir hastalık sonucu ortaya çıkmaktadır. Hastalığın varlığı aşamasında immün sistem ilişkili antijenik yapılara karşı oldukça hassastır ve bu yapılara özel antikor üretimini başlatır. B lenfosit hücreleri tarafından üretilen antikorlar sayesinde aynı antijenik yapı hafıza hücreleri ile tanınır hale gelir. Sonradan edinilen bağışıklık aynı zamanda anneden fetusa antikor transferi ile de gerçekleşebilmektedir (121, 156).

Sonradan kazanılmış bağışıklık aktif ve pasif olarak iki alt gruba ayrılmaktadır. Hem aktif hem pasif immünite ise kendi aralarında doğal ve yapay olarak sınıflandırılır. Aktif immünite doğal yolla enfekte ajanlarla karşılaşıldığında ortaya çıkarken, yapay olarak ise immünizasyon ile meydana gelmektedir. Pasif immünite ise doğal yolla anne kaynaklı antikorlar ile edinilir iken, yapay olarak dış ortamdan alınan antikorlar ile meydana gelmektedir (121).

2.9. İmmün savunma sistemleri

Yaşamın sürdürülebilmesi için savunma sistemi, görevini gerçekleştirebilmek adına bazı mekanizmalar ile çalışmaktadır. Bunlardan en önemlileri;

1- Fiziksel engel: deri, mukus, membran.

2- Kimyasal engel: vücut sıvılarında bulunan antimikrobiyal sistemler, mukus, gastrik sıvı.

3- Hücresel savunma: fagositik özelliği olan hücreler

4- İnflamasyon: vücut sıcaklığında artış, hücrelerin enfekte bölgeye göçü

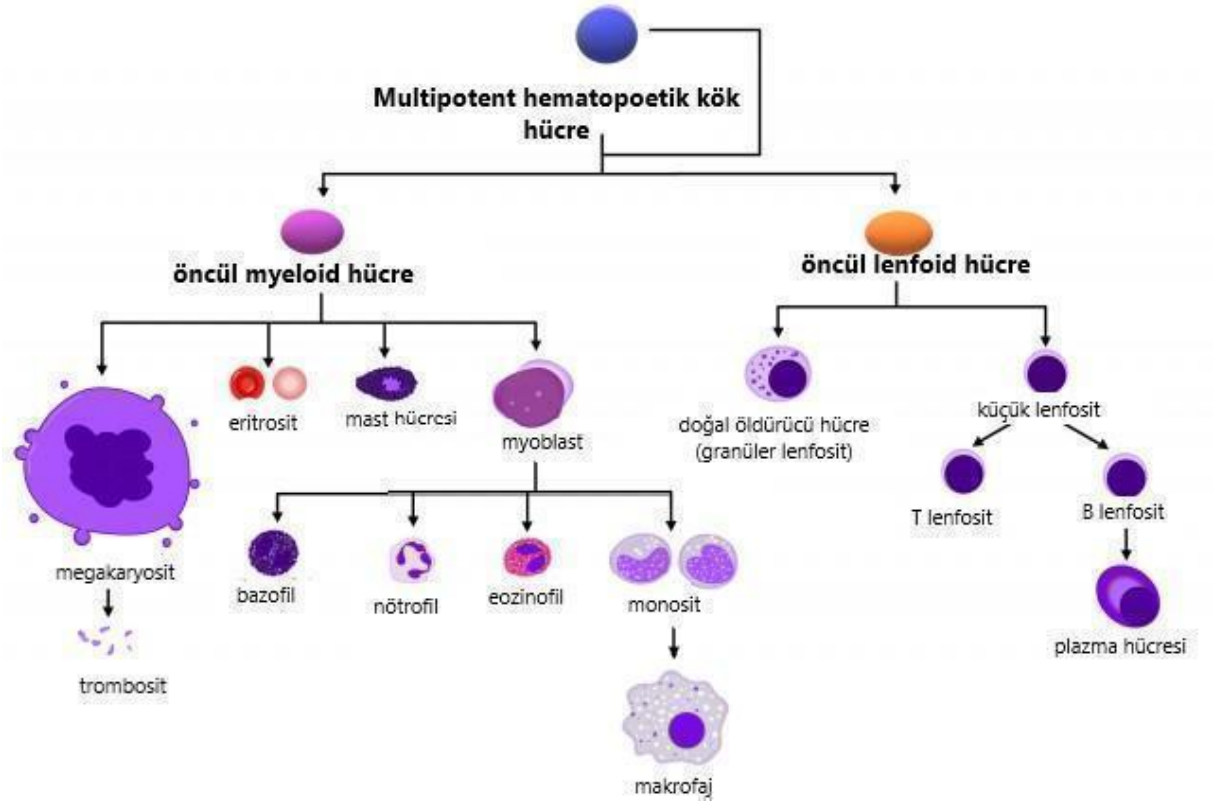
5- Ateş: yabancı yapıları öldürme ya da toksik ürünlerin etkisini yok etme mekanizması

6- Moleküler savunma: IFN ya da kompleman sistemi gibi mikropları yıkma fonksiyonu sayılabilir.

Fiziksel ve kimyasal engeller patojenlerin vücut içine girişini engellemeye ve vücuttan çıkışını sağlamaya yönelik iken, sonraki mekanizmalar ise patojenlerin yıkıma uğratılması ya da bu yapıların ürünlerinin etkisiz olmasını sağlar (156).

2.9.1. İmmün sistem hücreleri

Hücresel savunma sistemi kanda ve vücudun diğer dokularında bulunan özel hücreleri kullanır. Bu özel hücreler, kemik iliğinde yer alan pluripotent kök hücrelerin farklılaşması ile meydana gelmektedir. Pluripotent kök hücreler, myeloid ve lenfoid kök hücrelere farklılaşır. Myeloid hücreler, birçok lökosit çeşidi olan granülosit ve agranülosit hücrelere farklılaşırken, lenfoid kök hücreler, B lenfosit, T lenfosit ve doğal öldürücü hücrelerin oluşumunu sağlar. Böylelikle doğal ve edinsel bağışıklık sistemi tamamlanır (Şekil 2-8) (69).



Şekil 2-8: Multipotent hematopoetik kök hücrenin öncül myeloid ve lenfoid hücrelere farklılaşarak immün sistem hücrelerini oluşturması (69).

1. Granülositler: Granüler sitoplazmaya ve düzensiz boyutlu lobüler nukleusa sahip hücrelerdir. Myeloid kök hücrelerden farklılaşırlar. Hücre grubu olarak bazofiller, mast hücreleri, eozinofil ve nötrofilleri kapsarlar.

2. Agranülositler: Bu hücreler, granüler sitoplazmadan yoksun ve tek nukleus ile karakterizedir. Monosit ve lenfositler bu grup hücrelerdir ancak monositler öncül

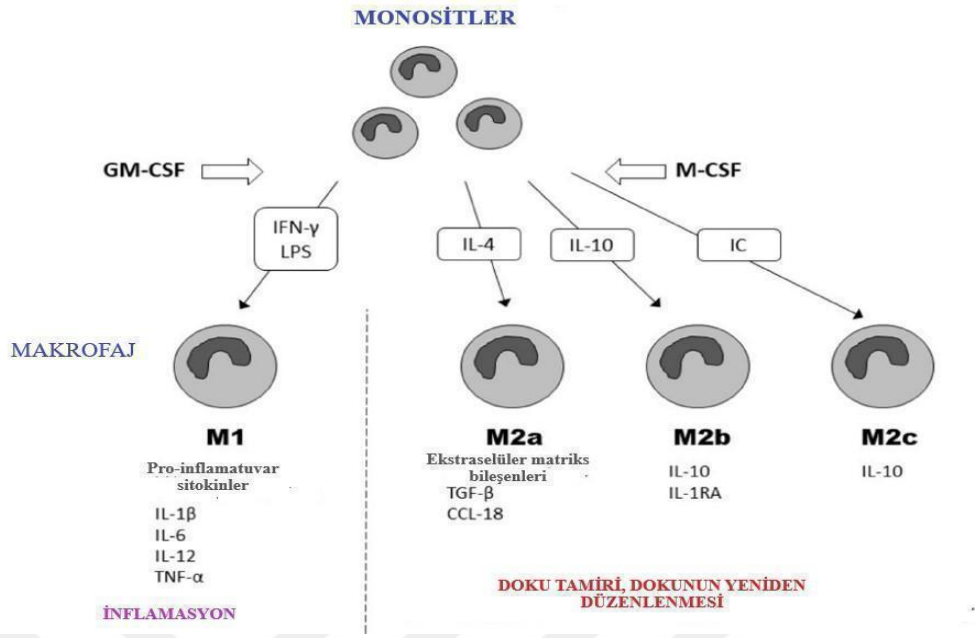
myeloid kök hücrelerden, lenfositler ise öncül lenfoid kök hücrelerden farklılaşır. Nötrofil ve monositler spesifik olmayan savunma sisteminin en önemli elemanları olup fagositler ya da fagositik hücreler olarak adlandırılırlar (156).

2.9.1.1. Fagositik hücreler

Fagosit kelimesi yunanca phago (yemek) ve cyte (hücre) kelimelerinden türemiştir. Fagositik hücreler vücutta belli bir bölgede kalabilir ya da hareketli halde dolaşabilir. Fagositlerin başlıca görevi ölü hücrelerin parçalanması ve atımıdır. Fagositik hücrelerden biri olan monositler, kemik iliğini terk edip kana geçtiklerinde bazı hücresel farklılaşma aşamaları geçirerek olgun makrofaj hücrelerini oluştururlar. Doku hasarına cevaben mononüklear fagositler (makrofaj öncül hücreleri) venöz sistemden hasarlı bölgeye göç eder. Bu hücreler hasarlı dokuya PF-4, TGF-β, PDGF, monosit kemoataktran protein 1, 2, 3 (MCP1/CCL2, MCP2/CCL8 ve MCP3/CCL7), makrofaj inflamatuvar protein-1α ve -1β (MIP-1α/CCL3, MIP-1β/CCL4), IL-1β ve TNF-α aracılığı ile giderler (157, 158). Sadece mikroorganizmaları etkisiz hale getirmekle kalmayıp, daha büyük partikülleri yıkıma uğratabilirler. Fagositik hücreler nötrofillerden daha uzun süre ve daha fazla sayıda enfekte bölgede kalabilirler (121).

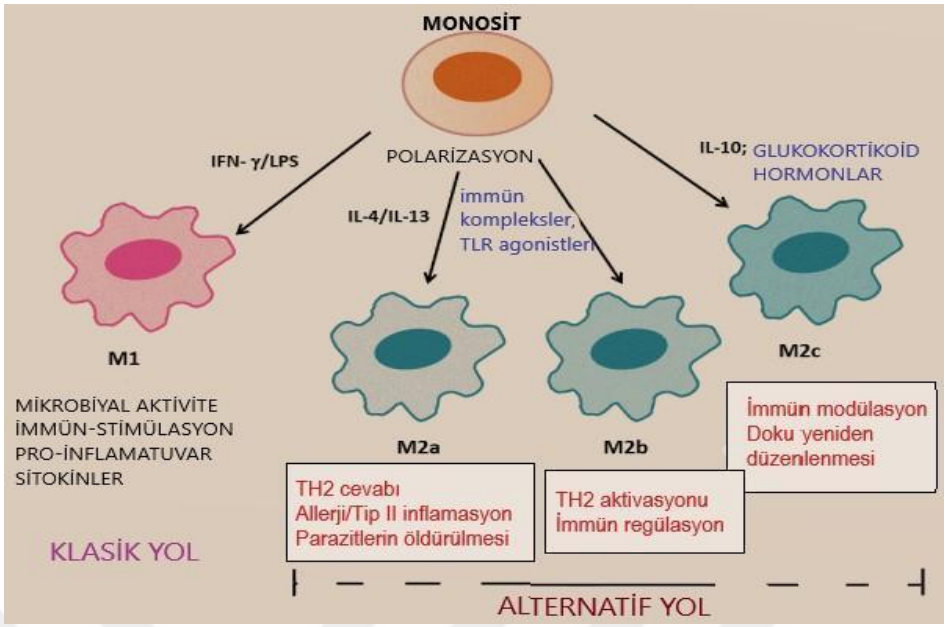
2.9.1.2. Makrofajlar

Monosit/makrofajlar, savunmada birincil görevde olup, monositler periferal insan kanı mononüklear hücrelerinin %10'unu oluşturmaktadır (159). Makrofaj hücreleri dokuya göre çeşitli tiplerde bulunabilirler. Akciğer-alveolar makrofaj, bağ doku-histiosit, karaciğer-kupffer hücresi, nöral doku-mikroglial hücre, kemik-osteoklast, dalak- sinüzoidal hücreler olarak sayılabilir (121). Makrofajlar, doğal bağışıklık sistemi savunma hücreleri olup inflamasyona aracılık ederler. Aynı zamanda doku harabiyetinde tamir görevi üstlenirler. Monositlerin M1 ve M2 makrofaja farklılaşmasında anahtar role sahip IL-6, IL-10 gibi önemli sitokinler ve transkripsiyon faktörleri mevcuttur (Şekil 2-9) (160).



Şekil 2-9: M1 ve M2 makrofaj farklılaşmasında görevli transkripsiyonel faktörler (160). GM-SCF; granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör, M-SCF; makrofaj koloni uyarıcı faktör, IL, interlökin, IFN-γ; interferon gama, IC; interlökin destekleyici, LPS; lipopolisakkarit, TGF-β; dönüştürücü büyüme faktörü-beta, CCL18; kemokin CC motif ligand 18.

Makrofajlar özellikle tümör hücrelerine ve bu hücrelerin terapötik ajanlara olan cevaplarına karşı primer cevap oluşturma görevindedir. Tümör mikro çevresindeki tümör ilişkili makrofajlar (TAM) iki alt popülasyona ayrılır: Tümöridikal makrofajlar ve tümör oluşumunu destekleyici (tumor promoter) makrofajlar. M1 makrofajlar aynı zamanda pro-inflamatuvar özellikte olup mikrobiyal aktivite gösterir. M2 makrofajlar ise anti-inflamatuvar özellik gösterirken, alerji, parazitlerin öldürülmesi, immün sistemin düzenlenmesi, doku tamiri gibi fonksiyonlara sahiptir. M1 makrofajlar klasik yoldan, M2 makrofajlar ise alternatif yol üzerinden aktifleşir (Şekil 2-10) (161, 162).



Şekil 2-10: Makrofaj alt tiplerinin immün sistemde klasik ve alternatif yol üzerinden fonksiyonları (162).

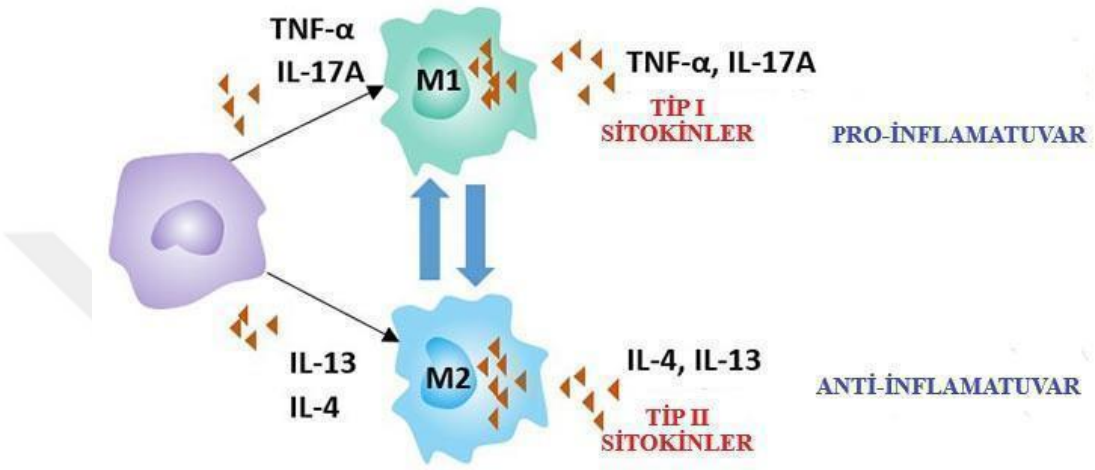
1. M1 makrofajlar

Klasik olarak aktifleşen M1 makrofajlar, immün sistemin hücresel komponentleridir. İmmün cevabı tetikleyerek hücre içi patojen ve kanser hücrelerinden koruyucu rol üstlenirler (163). M1 makrofajlar, monosit hücrelerinden, GM-CSF, IFN-γ ya da mikrobiyal aktifleyici olan LPS ile uyarılarak köken alırlar. Bu makrofajlar yüksek miktarda IL-12, IL-1, IL-6, IL-23 ve TNF-α sitokinlerini, CXCL10 kemokini üreterek sitotoksik aktivite gösterirler ve İNOS üretimi yaparlar. M2 makrofajların aksine tamir edici/yapıcı özellikleri yoktur, bunun yerine yok edici fonksiyon gösterirler (164, 165) (Şekil 2-11).

2. M2 makrofajlar

M2 makrofajlar ise, alternatif yolak üzerinden aktifleşen, iyileştirmeye yönelik fonksiyon gösteren makrofajlardır (161). Makrofaj stimüle edici faktör (M-CSF), IL-4, IL-13, IL-10 sitokinleri ya da immünsupresif ajanlardan kortikosteroidler, D3 vitamini, prostoglandinlerin etkisi ile orijinlenirler. M2 makrofajlar CCL17, CCL22, CCL18 kemokinlerini ve IL-10, IL-1Ra, IL-1 sitokinlerini salgılar. Aynı zamanda IL-10 aracılı TGF-β, CCL1 ve CCL2 kemokin salgısını düzenlerler. Bu makrofajlar doku

tamiri ve anjiyogenez yeteneğini yüksek derecede göstermektedir. Ayrıca yüksek oranda arjinin üretimi yaparlar. Tümör ilişkili makrofaj olarak bilinen bu grup yardımcı (helper) T2 hücre üzerinden immün cevabı aktifleştirir ve aynı zamanda tümör büyümesini ve metastazı tetikler (Şekil 2-11) (161, 166-169).



Şekil 2-11: M1 ve M2 makrofaj aktifleşme yolakları (169).

2.10. İmmün tedavi

Kanser ile savaş stratejileri 1896 yılında radyoterapi ile başlamış, 1942 yılından itibaren kemoterapi ile devam etmiştir ve en güncel olan tedavi sistemi, 1976 yılında başlayan ve günümüzde önemli bir yere sahip olan immün tedavi olmuştur. İmmün tedavi, 1996 yılında monoklonal antikor tedavisi ile devam etmiş ve 2010 yılında ilk hücresel immün tedavi olan terapötik aşı uygulaması başlamıştır (170, 171).

Kanserde immün tedavinin amacı, immün sistemin aktivasyonunu sağlayarak, tümör hücrelerini ayırt etme ve onlara karşı cevap oluşturma yeteneğini tamir ederek iyileştirmektir (172). Tümöre özgü immün cevap, immün sistem hücrelerinin tümörü, normal sağlıklı dokudan ayırt etmesi prensibine dayanır. Enfeksiyona sebep olan bakteriler ve allojenik insan hücrelerinin aksine tümör hücreleri normal konak hücrelere benzerlik gösterir. Burnett tarafından 1970 yılında öne sürülen immün takip prensibine göre, immün sistem hücreleri tümör hücrelerini algılama ve ortadan kaldırma

yeteneğine sahiptir. Fakat geçen yıllar ile bu prensip bazı değişikliklere uğramış ve immüno-editing stratejisi ortaya çıkmıştır (173).

2.10.1. Bağışıklık kazandırma ve immün takip

Kanser immunoediting adı verilen immün sistem stratejisi, eleme-denge-kaçış fazları olarak üç ana sistemi hedeflemektedir. Eleme fazı dört alt fazdan oluşmaktadır. Bunlar; anti-tümör immün faz, bağışıklık sistemi hücrelerinin tümör hücrelerini büyüme faktörü aracılı tanıması fazı, hedef dokuda immün cevap sebepli hasar oluşum fazı ve doğal immün sistemin makrofajlar, dendritik hücreler, doğal öldürücü ve T hücreleri aracılı inflamatuvar sinyal kaskadının aktivasyon fazı olarak sayılabilir (170, 174, 175).

Eleme fazının ilk aşaması doğuştan gelen bağışıklık sisteminin hücrelerinin dokuya zarar veren lokal bir tümör kitlesi saptandıktan sonra stromal yeniden modellemeden geçerek anti-tümör immün yanıtını başlatması olarak açıklanmaktadır. Bu aşamada, makrofajlar, dendritik hücreler, doğal öldürücü hücreler ve IFN-γ salgılayan doğal öldürücü T hücreleri gibi infiltre edici lenfositler gibi doğuştan gelen bağışıklık sisteminin tümör hücrelerine hücum edecek hücreleri aktive edici inflamatuvar sinyalleri uyarır.

IFN-γ içeren eleme fazının ikinci alt fazı, immünojenik nekrotik tümör hücresi ölümünü indükleyen ve anjiogenezi inhibe eden CXCL9, CXCL10 ve CXCL11 gibi kemokinlerin salınmasını aktifleyerek dendritik hücreler tarafından immünojenik tümör hücre ölümünü fagositik olarak uyarır.

Eleme fazının üçüncü alt fazında IL-12 ve IFN-γ sitokinlerinin serbest bırakılması makrofajları ve doğal öldürücü hücreleri aktive ederek apoptoz ile tümör hücre ölümünü artırır ve reaktif oksijen ve nitrojen ara maddelerini serbest bırakılmasını sağlar. Lenf düğümlerindeki tümöre özgü dendritik hücreler, öldürücü T hücrelerinin veya CD+8 T hücrelerinin üretimine aracılık eden yardımcı T1 hücrelerinin farklılaşmasını etkinleştirir.

Eleme fazının dördüncü alt aşamasında, tümöre özgü sitolitik T lenfositleri CD +4 ve CD +8 T hücreleri, tümöre özgü veya tümörle ilişkili antijenleri, örneğin B hücreleriyle işbirliği içinde olan MHC sınıf I ve sınıf II moleküllerini tanımlandıktan sonra tümör bölgesine geçer. IgG, IgA, IgM, IgD ve IgE gibi antikorlar üreten,

immünojenik tümör hücresi ölümüne yol açan sitokinlerin salınımına aracılık eden doğuştan gelen ve sonradan kazanılan bağışıklık mekanizmalarını kolaylaştırır (170, 175).

2.10.2. Tümör kaynaklı immün baskılama ve immün direnç

Antijenik epitoplarda değişiklikler tümör hücrelerini ortadan kaldırabilecek kapasitede olsa da, birçok immün dirençli varyant immünsupresif moleküller ve hücresel mekanizmalar ile bağışıklık sistemine karşı immün direnç oluşturur. İmmün sistemde tümör hücrelerinin tedaviye rağmen kaçış mekanizmasının ilk adımı, anti-kanser tedavi seçeneklerine ve immün yanıta karşı dirençli olan tümör kök hücrelerdir. Bunun sebebi, bu hücrelerin kendi kendini yenileme, çoğalma, tamamlanmamış farklılaşma özellikleri ve baskılanmış apoptoz özellikleri olarak düşünülebilir (176). Bir diğer mekanizma ise tümör hücre membranlarının üzerindeki anormal antijenik yapıların kaybı olarak açıklanmaktadır. Farklı tümörlerde sitotoksik T lenfositlerin antijenik varlıklarını gizlemek amacı ile mutasyonla beraber epitop kayıplarının gözlenmesi immün sistem kaçışını kolaylaştırmaktadır (177). Ayrıca başka bir mekanizma da, tümör hücrelerinde çok fazla eksprese olan ölüm ligandı FasL ile aktif T hücrelerinin membranında bulunan ölüm reseptörü bağlanması ile dolaşımdaki T hücrelerinin apoptoza uğramasıdır (178).

Tümör aracılı immün baskılama, tümör hücre yüzeylerinde insan lökosit antijen (HLA) ekspresyonunun geriye dönük düzenlenmesi yoluyla da gerçekleşmektedir. Aynı zamanda antijen sunucu hücrelerin geriye yönelik düzenlenmesi, sitotoksik T lenfositlerin lizisine neden olarak immün baskılama sebebidir. Tümör mikro çevresinde doğal öldürücü hücrelerin baskılanması ve bu nedenle IFN-γ, TNF-α gibi sitokinlerin salınımının baskılanması immün sistemi de baskılamaktadır (179).

2.10.3. İmmünmodülasyon ve tedavi

Tümör hücrelerinin immün sistemden kaçışını engelleme amaçlı kazanılmış immünitenin aktivasyonu, CTL-A, PD-1, TIM-3 adenozin A2A reseptör ve LAG-3 T hücre kontrol noktası moleküllerini IMP321, BMS-986016, pembrolizumab, nivolumab, pidilizumab, AMP-, ipilimumab, tremelimumab gibi ajanlarla baskılama gibi tedavi

seçenekleri de mevcuttur. Bir diğer tedavi stratejisi ise doğal öldürücü hücrelerin inhibitör reseptörlerinin (KIP) aktivasyonu ve dendritik hücrelerin, makrofajların aktivasyonunu sağlayan TLR-2 /4, TLR-7, TLR-7 /8, TLR-9 agonistleri olmuştur. Bunlar; hiltonol, imiquimod, resiquimod, lirilumab olarak sayılabilir (174).

2.10.4. Kontrol noktası inhibitörleri

Antijenik yapıya karşı immün cevap T hücre aracılı aktivatör ve inhibitör sinyaller ve bu sinyallerin dengesi ile düzenlenmektedir. Kanser bağışıklık siklusunda ölü kanser hücreleri dendritik hücreler tarafından yakalanan yeni antijenleri serbest bırakır ve T hücrelerine sınıf I MHC ve II MHC antijenlerini sunar. Sitotoksik T hücreleri MHC I antijenik yapı ile tümör hücrelerini tanıyarak tümör bölgesine göç eder ve sinyal mekanizmaları ile bölgeyi tahrip eder. Serbest kalan antijenler bir sonraki T lenfosit cevabını arttırır (180).

Aktivasyonu ve inhibisyonu düzenleyen T hücre yüzey molekülleri;

1. Sitotoksik T lenfosit ilişkili antijen-4 (CTLA-4)
2. Programlı ölüm ligandı-1 (PD-L1)
3. Programlı ölüm-1 (PD-1)

Bu moleküller ilişkili ligandları ile karşılaştığında inhibe olur. Yani T hücre cevabı susturulmuş olur. Hedefli tedavide amaç ise yüzey moleküllerine özgü antikor ile T hücrelerinin inhibisyonunu engellemek, kanserde T hücre cevabını sürekli aktif tutmaktır. Son yıllarda faz I ve faz II çalışmalarında, PD-1 için cemiplimab, pembrolizumab, nivolumab, PD-L1 için atezolizumab, avelumab, durvalumab, CTLA-4 için ise, ipilimumab, tremelimumab antikorları kullanılmaktadır. Bu antikorların tek başına ya da birlikte kullanımının özellikle akciğer kanseri, böbrek tümörleri, melanoma/melanoma ilişkili olmayan metastatik olmayan beyin tümörleri, meme ve ovaryum kanseri üzerine sağkalımı arttırıcı etkileri açıklanmış olsa da, ortaya çıkan toksik etkileri halen araştırılmaktadır (181-186).

2.10.5. Kalori kısıtlaması

Kalori kısıtlaması günlük alınması gereken total kalori miktarının %20-40 aralığında vitamin, mineral, esansiyel yağ asitleri ve amino asit gibi besin miktarlarının eşit değerlerinin değişmeksizin azaltılmasıdır. Kalori kısıtlaması gün boyunca öğün kısıtlaması ya da belirli zamanlarda açlık olarak uygulanmaktadır (187). Besin yetersizliği olmadan model organizma ve sıçanlar üzerine uygulanan kalori kısıtlamasının yaşlanmayı yavaşlattığı ve yaşam süresinin ortalamasını arttırdığı saptanmıştır (188).

Kalori kısıtlamasının hücresel, metabolik ve fiziksel birçok yolağı mevcuttur. Çalışmalarda kalori kısıtlamasının, karnitin sentezi ve yolağında, sfingozin-1-fosfat (S1P) sinyalizasyonunda ve metiyonin metabolizmasında etkili olduğu belirtilmektedir. Buna bağlı olarak L-karnitin, S1P, sfingomiyelin; leptin, insülin benzeri büyüme faktörü (IGF-1) ve vücut indeksi ile negatif yönde ilişkilidir. Bu genetik olmayan yöntemin yaşam süresini olumlu etkilediği ve yaşın ilerlemesi ile ilişkili hastalıkları azalttığı yönünde sonuçlar bildirilmiştir fakat bu sonuçların mekanizmaları halen tam anlamıyla açıklanamamıştır (189).

2.10.5.1. Kalori kısıtlaması ve kanser

Kalori kısıtlamasının obezite, hipertansiyon, diyabet ve kardiyovasküler bozukluklar ve insülin direnci gibi hastalıkları önlediği, buna ek olarak çeşitli kanserlerin gelişimini ya da yayılımını baskıladığı bildirilmektedir (51, 188). Aynı zamanda kanser tedavisinin olası yan etkilerini de azalttığı belirtilmektedir (190).

Deney hayvanları modellerinde kalori kısıtlamasının antikanser etkileri dolaşımda serbest halde bulunan ve tümör oluşumunda seviyesi artan (IGF-1) seviyesini anlamlı bir şekilde düşürmesi ile ilişkilendirilmektedir (51, 191). Yine kalori kısıtlamasının adenozin trifosfat/adenozin difosfat (ATP/ADP), asetile ve asetile olmayan koenzim A oranlarını azalmış seviyede büyüme faktörleri üzerinden düzenlediği belirtilmektedir. Bu bilgilere ek olarak kalori kısıtlamasının apoptoz ve otofajiyi, besin kısıtlamasının ise serum glukokortikoidler üzerinden hormonal dengeyi, anti-stres ve anti-inflamatuvar yolakları düzenlediği öne sürülmektedir (26, 192-194). Bir başka çalışmada ise kalori kısıtlamasında açlığın olumlu etkisi kemoterapi ve

radyoterapi ile birlikte açıklanmış, özellikle ketojenik diyetin anti-kanser üzerinde etkisi olabileceği belirtilmiştir (195). Kadınlarda daha sık görülen anoreksiya nervoza hastalığı ile ilgili bir araştırmada, meme kanseri insidansının, hayatının bir döneminde anoreksiya hastalığına yakalanmış kadınlarda %50 daha düşük olduğu saptanmıştır. Aynı zamanda kalori kısıtlamasının, beyin tümörleri, meme, bağırsak, deri ve ovaryum kanserlerinin insidansını düşürdüğü açıklanmıştır (190, 196, 197).

2.11. Oksidatif stres

Elektron sisteminde en dış orbitalde bir adet eşleşmemiş elektrona sahip moleküller yüksek enerjiye sahip olup reaktif oksijen türleri (ROS)'ni oluşturur. Bu yapılar serbest ve serbest olmayan radikaller olarak iki alt gruba ayrılmaktadır. Serbest radikaller OH •, $NO^{\bullet}$, $O_2\bullet^-$, ROOH•, R•, RO• ve disülfitler (RSSR) olarak sayılabilir iken, serbest olmayan radikaller hidrojen peroksit, singlet oksijen ($^1O_2$) ozon, trioksijen (O_3), peroksinitrit, hipoklorid ve dinitrojen dioksit olarak açıklanmaktadır (198, 199). Reaktif türevlerin oluşumunda ise, peroksizom aktivitesinde artış, bozulan mitokondri aktivitesi, reseptör sinyal mekanizmasında artış ve birçok enzim aktivasyon kaskadında fonksiyon dışı azalış ya da artış gibi nedenler sayılabilir (198). ROS'un düşük ya da dengede miktarı mutajenik ajanlara karşı hücre içi savunma, koruma ve sinyal cevap mekanizmalarının düzenlenmesini sağlarken, aşırı üretimi hücre tarafından yok edilemez ve böylece oksidatif stres oluşur. Oksidatif stres ile hücre içinde biriken ROS'lar, hücre membranına, lipid ve protein yapılara, organellere ve DNA'ya zarar verirler. Kimyasal zincir reaksiyonları sonucu oluşan toksik bir yapı olan malondialdehit (MDA), DNA yapısında bulunan bazlar ile reaksiyona girerek, hasara hatta DNA kırıklarına yol açabilir (200, 201).

2.12. Antioksidan sistem

Vücutta hücresel olaylar sonucu oluşan serbest radikallerin etkilerini azaltmak, toksik etkilerine karşı hücreleri korumak ile görevli savunma elemanlarının bütününe antioksidan sistem denir. Bu yapılar ROS ile reaksiyona girerek onları etkisiz hale getirir. Antioksidanlar endojen ve ekzojen olarak iki ana gruba ayrılır (202, 203).

Endojen antioksidanlar süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx) ve glutatyon redüktaz (GR) enzimatik grubu oluştururken, glutatyon (GSH), melatonin, bilirubin, selenyum, koenzim Q10, ürik asit, albumin, alfa-lipoik asit, seruloplazma ve transferrin enzimatik olmayan alt grubu oluşturur. Ekzojen grup ise vitaminler ve ilaç olarak kullanılanlar olarak iki ana alt gruba ayrılmaktadır. Vitaminler, alfa tokoferol, beta karoten, askorbik asit ve folik asit olup, ilaç olarak kullanılanlar ksantin oksidaz ve NADPH oksidaz inhibitörleri, tralax-c, nötrofil adezyon kuvvet inhibitörleri, desferroksantin olarak sayılabilir (204-206).

SOD: İki süperoksit molekülü iki proton aldığında hidrojen peroksit ve oksijene katalizleyen enzimatik bir antioksidandır. İnsanda Cu/Zn (Bakır/Çinko) SOD sitozolde, Mn (Manganez) SOD mitokondride ve ekstraselüler (EC) SOD hücre dışında olacak şekilde üç farklı çeşitte bulunur. İki alt üniteli Cu/Zn SOD, 32 kDa olup, Mn SOD 80 kDa, EC SOD ise 135.000 kDa molekül ağırlığına sahiptir. EC SOD homotetramer yapıda bulunurken multimer, dimer formlarda da olabilir. EC SOD fibroblast, glia hücreleri ve endotel hücrelerden salgılanır (207-209).

CAT: Dört protein alt üniteden oluşur ve her alt ünite bir hem grubu bir de NADPH molekülü içerir. Katalaz, fazla miktarda peroksizomlarda daha düşük miktarda ise mitokondri ve endoplazmik retikulumda mevcuttur. CAT temel olarak hidrojen peroksitin su ve oksijene dönüşümünü katalizlemektedir. Aynı zamanda Cu^{++} ve Fe^{++} iyon aracılı Fenton reaksiyonu ile hidroksil radikali ($OH^{\bullet}$) oluşumunda rol oynamaktadır (209-211).

GSH (γ-glutamil-sisteinil-glisin): Redoks homeostazının korunmasında, detoksifikasyon fonksiyonunda, eikosanoidlerin sentezi ve hücre sinyal mekanizmasının düzenlenmesinde, gen ekspresyonu ve apoptozda rol oynayan trimerik yapıda enzimatik olmayan antioksidandır. GSH'ın % 85-90 sitozolde bulunur (212). Oksidatif stres sürecinde GSH düzeyi azalırken, okside glutatyon (GSSG) seviyesi artar. Hidrojen peroksiti detoksifiye edici yolak; glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve glutatyon redüktaz (GR) sistemidir. Glutatyon redüktaz (GR) ise flavin-adenin (FAD) içeren flavoproteindir. Bu flavoprotein NADPH yardımıyla GSSG'nin GSH'a indirgenmesini katalize eder (202, 206, 213, 214).

$$2GSSG + NADPH + H^+ \Rightarrow 2GSH + NADP^+$$

2.13. Gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR)

Gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu, DNA'nın belirlenen gen bölgesinin çoğalımını görünür hale getirebilen boya ya da işaretli probların kullanıldığı kantitatif bir analiz yöntemidir (215, 216). İstenen bölgenin mRNA sentez seviyesinin sayısal olarak belirlenebilmesidir. PCR'nin kullanım alanları DNA hasar tespiti, tek nükleotid polimorfizm (SNP) analizi, metilasyon, kromozom hasar tespiti, patojen saptanması olarak sayılabilir. qRT-PCR özgül ve özgül olmayan yöntem, hibridizasyon prob ve moleküler boncuk yöntemleri olarak alt gruplara ayrılmaktadır (216, 217).

2.13.1. Özgül olmayan belirleme sistemi

2.13.1.1. SYBR Green yöntemi

Bu sistemde kullanılan floresan boya yalnızca çift iplikli DNA'ya bağlanır. Reaksiyon boyunca artan çift zincirli DNA miktarı ile doğru orantılı olarak cihazda okunan floresan ışıma miktarı da artar. Reaksiyon için belirli bir değerde optimize edilmiş cDNA ürünü, SYBR master karışım ve hedef bölge için oluşturulmuş primer diziler gerekmektedir. SYBR Green I en çok kullanılan boya olup 497 nm dalga boyunda yükseltgenip, 520 dalga boyunda indirgenir (217, 218).

2.13.2. Özgül belirleme sistemi

2.13.2.1. TaqMan prob yöntemi

Bu sistemde çoğaltılmak istenen DNA bölgesine tamamlayıcı floresan işaretli prob kullanılır. Probun 5' ucuna fluorophore (6-karboksi floresein) 6-FAM ve 3' ucuna 6-karboksi tetrametil-rodamin (TAMSA) eklenir. Taq DNA polimeraz enzimi 5 ⇒ 3' yönünde nükleaz aktivitesi ile FAM'ı probdan ayırır, böylelikle serbest kalan FAM sinyal oluşturur (219).

2.13.2.2. Hibridizasyon prob yöntemi

Bu yöntemde iki farklı probdan birinin 3’ ucuna floresan işaretli boya, 5’ ucuna ise alıcı boya eklenir. Bu iki işaretli prob sentez reaksiyonu sırasında birbirlerine yaklaştığında enerji yayılımı meydana gelir. Buna floresan işaretli boyadan alıcı boyaya enerji transferi anlamına gelen floresans rezonans enerji transferi (FRET) adı verilir. Sentezlenen ürün miktarının artmasına bağlı olarak enerji de artar (220).

2.13.2.3. Moleküler boncuk yöntemi

Saç tokası modelindeki yapının uç kısmı belirlenen DNA bölgesine tamamlayıcı olarak oluşturulur. Reaksiyon sırasında bu iki bölge karşılaştığında konformasyonel olarak değişerek düz hale gelir. İçeriğinde florokrom boya uzaklaşarak ışıma yapar. Bu yöntemde oluşan floresanın ölçümüne dayanmaktadır (221).

2.14. İmmünohistokimya yöntemi

İmmünohistokimya (IHC) hücre veya doku örneklerinde protein ve makromoleküller gibi organik ve inorganik yapıları mikroskobik görüntülemeye dayanan bir yöntemdir. Bu teknik ile farklı hücre tiplerindeki hedef protein yapıların lokalizasyonu belirlenebilir. Protein haricinde amino asitler, nükleoproteinler, karbonhidratlar, lipidler, aldehit ve ketonlar, enzimler, pigmentler, inorganik oluşumlar, vitaminler gibi kimyasal maddelerin gösterilmesi mümkündür. IHC ilk kez Coons ve ark. tarafından 1941 yılında açıklanmıştır (222, 223).

Bu yöntem özellikle patoloji alanında, hasta ve sağlıklı hücrelerde rol oynayan protein yapıların karşılaştırılmasında önemli bir gelişme olarak ortaya çıkmış ve geliştirilmiştir. Tekniğin prensibi, tek bir proteine özgü olan epitoplara uygun işaretli antikor kullanılarak antijenin saptanmasına dayanır. Antijenin işaretli birinci antikor ile bağlanması yani direkt yöntemde antikor, florokrom, enzim, altın tanecikleri ile işaretlenebilir. İndirekt yöntemde bağlanmayı daha güçlü hale getirmek amacı ile işaretsiz birinci antikoru yüksek özgüllük ile bağlayabilen işaretli ikinci antikor kullanılır.

Streptavidin Biotin Yöntemi: Streptavidin *Streptomyces avidinii* adlı bakteriden elde edilen bir protein olup biotin işaretleme ile birden fazla streptavidin molekülüne bağlanarak oluşan bu indirekt yöntem streptavidin-biotin-peroksidaz olarak adlandırılmaktadır. Direkt yöntem zaman olarak avantajlı olsa da reaksiyon şiddetinde azalmaya sebep olabilir. İndirekt yöntemde ise birinci antikora birden fazla ikinci antikor bağlandığından daha güçlü bir reaksiyon gözlemlenir. İmmünohistokimyasal işaretlemenin görünür hale gelmesi için enzim-substrat reaksiyonu sonucu ortaya çıkan son ürünün mikroskopda gözlenmesini sağlayacak kromojenlere ihtiyaç vardır. En çok kullanılan 3-amino-9 etil karbazol (AEC) kromojeni kırmızı renk verir (224-227).

2.15. Akan hücre ölçer (Flow sitometri) yöntemi

Sitometri terimi, hücrelerin fiziksel ya da kimyasal özelliklerine göre ölçülerek ayrılması anlamına gelmektedir. Flow sitometri ise akan bir sıvıda hücrelerin ölçümü olarak tanımlanır. Akan hücre ölçer yönteminin amacı, hücrelerin boyut, şekil, sitoplazmik ve membran içeriği, granülite yapısı, yüzey antijenleri, lektin bağlama kapasitesi, pigment içeriği, sülfidril grupları yönünden değerlendirilmesidir (228, 229). Flow sitometri cihazı, akış sistemi, ışık (lazer) kaynağı, filtreler ve sinyal dedektörleri ile yazılım programları ve ayırma mekanizmasından oluşmaktadır (230). Analiz için sistemde forward scatter=Dar açı (FS), side scatter=Dik açı (SS) ve floresan dedektörler bulunur. Bu şekilde FS hücrelerin büyüklüğü, SS hücre yapısı ve granüllenmesine göre dağılımlarını verir. Akan hücre ölçer yönteminde çok sayıda floresan işaretli antikorlar kullanılarak, tek bir hücrede farklı antijenlerin saptanması ile çoklu analiz yapılabilir (230, 231).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada kullanılan deney hayvanları, Bezmialem Vakıf Üniversitesi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edildi ve deneyler bu merkezde gerçekleştirildi. Daha sonra deney hayvanlarından elde edilen doku örnekleri İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda bulunan Hücre Analizleri Laboratuvarı (HAL) ve Multidisipliner Laboratuvarında çalışıldı. Çalışmanın *in vitro* bölümü ise Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda bulunan Doku Kültürü Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. Etik kurul onayı Bezmialem Vakıf Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından 20.07.2017 tarihinde 2017-190 sayı ile verildi.

3.1. Panc02 hücre soyu

C57BL/6 fare pankreas duktal adenokarsinom dokusundan izole edilerek elde edilen Panc02 hücreleri Greifswald Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Cerrahi Bölümü'nde görevli Dr. Christine Hackbarth ve Dr. Lars Ivo Partecke'dan temin edildi. Hücreler teslim alındıktan sonra İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Temel Tıp Bilimleri, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda mikoplazma testine tabi tutuldu. Üç farklı katı besiyeri ve bir sıvı besiyerine ekilen hücreler 96 saatlik inkübasyon sonucu mikoplazma testinde negatif sonuç verdi.

Panc02 hücreleri %10 (v/v) fetal bovine serum (FBS) %1 (v/v) penisilin/streptomisin antibiyotikleri içeren Dulbecco's Modifiye Edilmiş Eagle's Medyumu ve besleyici karışım Ham's F12 (DMEM/F12:1/1) besiyeri içerisinde çoğaltılarak %10'luk dimetil sülfoksit (DMSO) çözeltisinde dondurulup çalışma gününe kadar sıvı azotta saklandı.

3.2. Panc02 hücreleri üzerine doz çalışması

Panc02 hücreleri ölüme yönlendirecek LPS dozunun belirlenmesi düşük glukoz (1.5 g/L) ve yüksek glukoz (4 g/L) içeren besiyeri ortamında üç tekrarlı olarak yapıldı. Çalışma konsantrasyonları LPS'nin 24 saat inkübasyonu için 1, 5, 10, 25 ve 50 µg/ml olarak belirlendi. Besiyeri %1 penisilin-streptomisin ve %10 FBS içerecek şekilde hazırlandı.

Hücreler sıvı azottan alınarak 37 °C'lik su banyosunda çözdürüldü. Sonrasında DMEM-F12 besiyeri içerisinde 25'lik ve 75'lik flasklara pasajlandı. Pasajdan 1 saat sonra besiyeri değiştirildi ve hücreler çoğalmaya bırakıldı.

Hücreler tripsin ile ortalama 5 dakika muamele edilerek flasktan kaldırıldı. 4000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Thoma lamında iki tekrarlı sayım yapıldıktan sonra 6 kuyucuklu plakalara her kuyuda 50.000 hücre olacak şekilde ekildi. 6 kuyudan biri kontrol olarak seçildi ve herhangi bir uygulama yapılmadı. Kalan kuyulara 1, 5, 10, 25 ve 50 µg/ml LPS hem düşük hem de yüksek glukozlu besiyeri ortamında (ayrı iki 6'lı kuyucuklu plaka) 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon bittikten sonra hücreler tripsin ile kaldıralarak santrifüj sonrası thoma lamında iki tekrarlı sayıldı. Deney üç kez tekrarlandı. Her sayım sonrası hücre sayı grafiği ile en düşük hücre sayısının görüldüğü LPS dozları belirlendi. Üç tekrar sonunda uygun LPS dozu 24 saat için 10 µg/ml olarak belirlendi.

3.3. Panc02 hücre LPS uygulaması

Hücreler 6 kuyucuklu plaka içerisine yerleştirilen lamellerin (cover-slip) üzerine ekildikten sonra, hücrelerin üzerine yüksek ve düşük glukoz besiyeri içerisinde 10 µg/ml LPS uygulandı ve 24 saat inkübasyonu sağlandı. Uygulama sonrası cover-slip üzerindeki hücreler metanol ile fikse edildi. Fiksasyon sonrası soğuk fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) ile üç kez yıkandıktan sonra immünohistokimya deneyi için +4 °C'de saklandı.

3.4. Panc02 tümör modeli ve hayvan grupları

Çalışmada erkek C57BL/6 farelerde subkutan Panc02 hücre enjeksiyonu ile deri altı tümör modeli, ön denemeler sonucunda $1x10^6$ tümör hücre sayısı ile oluşturuldu (19). Çalışmada, 40 adet 10-13 haftalık C57BL/6 erkek fareler, 8'erli olacak şekilde 5 gruba ayrıldı.

LPS (L) grubu: Sağlıklı hayvanlara 1 hafta 0.5 mg/kg ve ardından 1 hafta 1 mg/kg LPS intraperitoneal (i.p.) olarak uygulandı. Hayvanlar deney süresi boyunca günlük ortalama 5 g yem ile beslendi.

LPS+kalori kısıtlaması (L+K) grubu: Hayvanlara önce 1 hafta 0.5 mg/kg, takiben 1 hafta 1 mg/kg LPS i.p. olarak uygulandı. Hayvanlar deney süresi boyunca günlük ~3 g yem ile beslendi (189).

Panc02 (P) grubu: Hayvanlara sol bacağın üst kısmından subkutan olarak $1x10^6$ adet Panc02 hücresi verildi. Tümör gelişimi haftada 3 kez dijital kumpas ile ölçüldü. Tümör çapı 60 mm^3 değerini geçtikten 2 hafta sonra hayvanlar sakrifiye edildi. Hayvanlar deney süresi boyunca günlük ~5 g yem ile beslendi.

Panc02+LPS (P+L) grubu: Farelere tümör çapı 60 mm^3 değerini geçtikten sonra, 1 hafta 0.5 mg/kg, takiben 1 hafta 1 mg/kg LPS i.p. olarak uygulandı. Hayvanlar deney süresi boyunca günlük ~5 g yem ile beslendi.

Panc02+LPS+kalori kısıtlaması (P+L+K) grubu: Tümör çapı 60 mm^3 değerini geçen hayvanlara önce 1 hafta 0.5 mg/kg, sonrasında 1 hafta 1 mg/kg LPS i.p. olarak uygulandı. Deney süresi boyunca deney hayvanları günlük ~3 g yem ile beslendi.

Deney ortalama 15 günlük tümör gelişimi, ardından toplam 14 günlük LPS tedavisini takiben sonlandırıldı. Hayvanların deney süresi boyunca haftada 3 kez ağırlık ölçümü yapıldı. Aynı zamanda haftada 3 kez dijital kumpas ile tümör çapı ölçüldü. Kalp kanı EDTA'lı tüpe alındı. Alınan kan örnekleri 4000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Plazma örnekleri deney gününe kadar -80 °C'de saklandı. Sakrifikasyon sonrası hayvanların tümör ve pankreas dokuları dikkatlice çıkarılarak tartıldı. Tümör ve pankreas dokuları ikiye bölünerek bir kısmı moleküler ve biyokimyasal çalışmalar için sıvı azotta fikse edildikten sonra deney gününe kadar -80 °C'de saklandı. Doku örneklerinin kalan kısmı ise %10'luk nötral formalinde bir gece fikse edildi. Ardından örnekler 2 saat boyunca çeşme suyunda 3 kez değiştirilerek yıkandıktan sonra sırası ile %70, %90, %96 ve %100'lük alkol serilerinden geçirilerek 3x3 dakika toluol muamelesi sonrası önce 90 dakika yumuşak ardından 90 dakika sert parafinde bekletildi. Bu aşamalardan sonra dokular sert parafine gömülerek bloklar hazırlandı.

3.5. NF-κβ, IL-6 ve JNK mRNA ekspresyonunun saptanması

3.5.1. RNA izolasyonu

Pankreas ve tümör doku örneklerinden RNA izolasyonu için Hibrigen RNA izolasyon Kit'inin (Kat No: MG-RNA-01-100) protokolü takip edildi. -80 °C'de saklanan doku örneklerinden 75 mg tartıldı ve üzerine 1 ml RL (liziz) tamponu eklenerek steril bistüri ile mekanik olarak parçalandı. Elde edilen doku homojenatları steril mikrotüplere alınarak oda ısısında 5 dakika inkübe edildi. Ardından 5 dakika boyunca 12.000 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant farklı bir mikrotüpe alındı ve üzerine 200 µl kloroform eklendi. Yaklaşık 20 saniye iyice karıştırıldıktan sonra 3 dakika oda ısısında inkübasyona bırakıldı. Sonrasında 10 dakika süresince 12.000 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası mikrotüpte 3 farklı faz gözlemlendi ve en üst faz dikkatlice farklı bir steril mikrotüpe alındı. Alınan süpernatant miktarının yarısı kadar absolü etanol eklendi ve hızlıca karıştırıldı. Ardından karışımın tümü toplama tüpünün üzerinde bulunan kolona aktarıldı. Kolon 12.000 rpm'de 30 saniye santrifüj edildi ve altta bulunan toplama tüpü atıldı. Filtre yeni bir toplama tüpüne alındı ve üzerine 500 µl RPI yıkama tamponu eklendi. Kolon 12.000 rpm'de 30 saniye santrifüj edildi. Altta kalan toplama tüpü atılarak filtre temiz bir toplama tüpüne alındı ve üzerine 500 µl RW yıkama tamponu eklendi. Kolon oda ısısında bir dakika inkübe edildikten sonra 12.000 rpm'de 30 saniye santrifüj edildi. Bu aşama iki kez tekrarlandı. Filtrenin iyice kuruması için kolon iki dakika 12.000 rpm'de santrifüj edildi. Filtreler RNAz içermeyen mikrotüplere aktarıldı. Filtre üzerine 40 µl DEPC içeren su eklendi ve iki dakika oda ısısında inkübe edildi. Örnekler iki dakika 12.000 rpm'de santrifüj edildi ve filtreler atılarak mikrotüpler içerisinde elde edilen RNA – 20°C' de birkaç saat bekletildikten sonra – 80°C'ye alındı.

3.5.2. RNA saflık/miktar tayini ve cDNA sentezi

Elde edilen total RNA'ların saflık ve miktar tayinleri için nanodrop cihazında 260/280 ve 260/230 nm dalga boylarında absorbans ölçümleri yapıldı. Ölçüm sonuçları 1.8 ila 2.0 arasındaki örnekler deneyde kullanıldı.

cDNA sentezi için her bir örnekten gerekli RNA miktarı alınıp RNAz içermeyen su ile 10 µl'ye tamamlandı. Her bir reaksiyon için Tablo 3-1'de bulunan karışım hazırlanarak RNA üzerine eklendi.

Tablo 3-1: cDNA reaksiyon karışımı.

Reaksiyon karışımı	Miktar (µl)
10X tampon	2 µl
25X dNTP	0.8 µl
10X random primer	2 µl
Reverse transkriptaz	1 µl
Nükleaz içermeyen su	4.2 µl

Thermal cycler cihazı Tablo 3-2'de belirtilen sıcaklık ve sürelere göre ayarlandı. Deney sonrası elde edilen cDNA örnekleri, önce birkaç saat -20 °C daha sonra ise -80 °C' de saklandı.

Tablo 3-2: cDNA reaksiyonu için bir siklusun süreleri.

Süre (dk)	**10 dk**	**120 dk**	**5 dk**	**∞**
Sıcaklık (°C)	25 °C	37 °C	85 °C	4 °C

3.5.3. Gerçek zamanlı Polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR)

Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) için cDNA 1:4 oranında sulandırılarak her örnek için 200 ng RNA olacak şekilde kullanıldı. Nüklear faktör-kappa β (NF-κβ), İnterlökin (IL)-6 ve Jun terminal kinaz (JNK) gen bölgeleri çalışıldı. Housekeeping gen olarak β-Aktin kullanıldı (Tablo 3-3).

Tablo 3-3: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu için kullanılan primer dizileri.

mRNA	Primer dizileri
NF-κβ	Forward - 5'CCGGGAGCCTCTAGTGAGA 3'
	Reverse - 5'CATTTGTGACCAACTGAACGA 3'
JNK	Forward - 5' GATTTTGGACTGGCGAGGACT 3'
	Reverse - 5' TAGCCCATGCCGAGAATGA 3'
IL-6	Forward- 5'ACCACCCACAACAGACCAGT 3'
	Reverse- 5'TTTGGAAGCATCCATCATTTC 3'
β-Aktin	Forward - 5' GGGAATGGGTCAGAAGGACT 3'
	Reverse - 5' TTTGATGTCACGCACGATTT 3'

Liyofilize primerler üzerine 250 µl RNAz içermeyen su eklenerek µl başına 250 pmol olacak şekilde dilue edilerek vortekslendi ve alikotlandı. Ardından her bir primer 1:10 oranında farklı bir mikrotüpte dilüe edilerek deneyde her bir reaksiyon için 30 pmol olacak şekilde hazırlandı.

96'lık plakaya 2 µl cDNA konuldu ve üzerine Tablo 3-4'te belirtilen reaksiyon karışımı eklenerek toplam hacmin 20 µl olması sağlandı. Negatif kontrol için ise numune yerine RNAz içermeyen su kondu. Plaka, kapatıcı film ile dikkatlice kapatıldı. Plaka, BioRad CFX96 Real-time PCR cihazına yerleştirildi ve Tablo 3-5' te belirtilen süre ve sıcaklıklarda 40 döngü süresince PCR devam ettirildi.

Tablo 3-4: Her örnek doku için polimeraz zincir reaksiyonu karışımı.

Reaksiyon karışımı	Miktar (µl)
Master Mix (SYBR Green)	10 µl
Forward primer	0.6 µl
Reverse primer	0.6 µl
cDNA	2 µl
Nükleaz içermeyen su	6.8 µl

Tablo 3-5: Polimeraz zincir reaksiyonunda bir siklusun süreleri.

Sıcaklık (°C)	**95** °C	**95** °C	**59** °C	**72** °C
Süre	**3 dk**	**15 sn**	**25 sn**	**30 sn**

3.6. Biyokimyasal analizler

Biyokimyasal analiz için -80 ºC'de saklanan tümör/pankreas doku örnekleri -20 ºC'ye alınarak yavaşça çözünmesi sağlandı. Doku örnekleri hassas terazide tartıldı ve üzerlerine ağırlıklarının 10 katı kadar serum fizyolojik eklendi. Dokular serum fizyolojik içinde homojenize edilerek biyokimyasal parametrelerin ölçümü için hazırlandı.

3.6.1. Protein miktarının belirlenmesi

Homojenattaki total protein miktarı Bradford yöntemine göre analiz edildi (232). Yöntem hem seyreltilmemiş tümör dokuları hem de seyreltilmiş pankreas dokuları üzerine uygulandı. Commassie Brillant Blue G-250 boyası, %95'lik etanol ve %85'lik fosforik asit kullanılarak hazırlanan Bradford reaktifi filtre kağıdından süzüldükten sonra kullanıldı. 40 µl örnek üzerine 1 ml Bradford reaktifi eklenerek oda ısısında 10 dakika boyunca karanlıkta inkübe edildi. Standart için bovine serum albumin (BSA) stok hazırlanarak 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125 ve 0.0625 mg/ml

dilüsyonlarda olacak şekilde kullanıldı. Örnek ve standartların ölçümü 595 nm dalga boyunda yapıldı. Hesaplama standart eğri formülü kullanılarak mg/ml olarak belirtildi.

3.6.2. Katalaz (CAT) aktivitesi

Katalaz aktivitesinin tayini Aebi yöntemine göre yapıldı (233). Deney için seyreltilmemiş tümör ve seyreltilmiş pankreas doku homojenatları kullanıldı. Homojenatlar serum fizyolojik ile 30 kat seyreltildi. 30 mM hidrojen peroksit solüsyonu, %30'luk hidrojen peroksitin 50 mM fosfat tamponu (pH 7.0) içerisinde çözündürülmesi ile elde edildi. 150 µl seyreltilmiş doku homojenatı ile 600 µl 30 mM hidrojen peroksit solüsyonu karıştırılarak kuvartz küvetler içerisinde 240 nm dalga boyunda köre karşı 0. ve 1. dakikalardaki absorbansları ölçüldü. Sonuçlar aşağıdaki formüle göre belirlendi ve protein miktarına göre U/mg olarak hesaplandı.

CAT (U/L) = (Δ Absorbans/0.0436) X (Toplam hacim) / (Örnek hacmi) X seyreltme katsayısı

3.6.3. Malondialdehit (MDA) aktivitesi

Malondialdehit (MDA) analizi Ledwozyw yöntemine göre yapıldı (234). Yöntem seyreltilmemiş tümör dokuları ve seyreltilmiş pankreas dokuları üzerine uygulandı. Dokuda MDA tayini için, cam tüpler içerisindeki 250 µl doku örneği üzerine %30'luk trikloroasetik asit (TCA) çözeltisinden 1 ml, 5 M hidroklorik asit (HCI) çözeltisinden 200 µl, % 0.75 tribarbitürik asit (TBA) çözeltisinden ise 1.5 ml eklendi. Hazırlanan cam tüpler vorteks yardımıyla iyice karıştırılıp oda sıcaklığında 15 dakika inkübasyona bırakıldı. Sonrasında daha önceden hazırlanan 95-100°C'deki su banyosunda tüpler 40 dakika boyunca ağızları sıkıca kapalı olarak kaynatıldı. Süre sonunda kapakları açılarak havası alınan cam tüplerde oluşan pembe renkli çözelti santrifüj edildi ve berrak olan üst sıvı alınarak 532 nm dalga boyunda köre karşı okundu. Aşağıdaki formüle göre belirlenen sonuçlar protein miktarına oranlanarak nmol/mg olarak hesaplandı.

MDA (mikromol/L)= (Absorbans/1.56 X 10^5) x (Total hacim / Örnek hacim) X (10^6)

3.6.4. Glutatyon (GSH) Miktar tayini

Glutatyon aktivitesinin tayini Beutler metoduna göre belirlendi (235). Deneyde hem seyreltilmemiş tümör dokuları hem de seyreltilmiş pankreas dokuları kullanıldı. Deney tüpüne 75 µl çöktürme çözeltisi (1,67 g glasiyel metafosforik asit, 0,2 g EDTA-Na_2HPO_4 ve 30 g NACl distile su ile 100 ml' ye tamamlanarak hazırlandı) ve 50 µl doku homojenatı konularak vorteks ile iyice karıştırıldıktan sonra 5 dakika oda ısısında bekletilerek 4000 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası çökelti ayrıldı. Süpernatanttan 50 µl alınarak temiz bir tüpe konuldu üzerine 200 µl sekonder sodyum fosfat (0,3 M) ve 25 µl DTNB (%1'lik sodyum sitrat çözeltisi içerisinde hazırlandı) çözeltileri eklendi. Tüpler iyice karıştırıldıktan sonra oda ısısında 5 dakika bekletildi ve ardından örneklerin absorbansları 412 nm dalga boyunda köre karşı okundu. Redükte glutatyon ile hazırlanmış (mikromol/L) standart eğri grafiğine göre glutatyon miktarı hesaplandı. Dokunun protein konsantrasyonuna oranlanarak glutatyon miktarı nmol/mg olarak ifade edildi.

3.6.5. Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi tayini

SOD aktivitesi Sun yöntemine göre yapıldı (236). Tümör doku homojenatından 500 µl alınıp, üzerine 500 µl absolü alkol ve 300 µl kloroform eklenerek hazırlanan karışım, 1 dakika vortekslendi ve 10.000 rpm'de +4 ºC'de 20 dakika süresince santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında, oluşan pellet atıldı ve süpernatant kullanıldı. Süpernatanttan 125 µl alınıp, üzerine pH'sı 10,2 olan 600 µl substrat çözeltisi (400 mmol/L Na_2CO_3 + 0,6 mmol/L Na_2EDTA + 150 µmol/L NBT + 0,86 mg/ml BSA) ve 25 µl ksantin oksidaz (XO) eklendi. Oda ısısında 20 dakika boyunca karanlık bir ortamda inkübe edildi. Reaksiyonu durdurmak için tüplere 50 µl $CuCl_2.2H_2O$ (0,8 mmol/L) eklendi. Örneklerin absorbansı, 560 nm dalga boyunda ölçüldü.

Hesaplama; 1 ünite SOD aktivitesinin % 50 oranında XO aktivitesini inhibe ettiği kabul edilerek SOD enzimi % inhibisyonları hesaplandı.

3.6.6. Protein karbonil (PCO) miktarının belirlenmesi

Reznick ve Packer yöntemine göre yapıldı (237). Deney tüplerine seyreltilmemiş tümör ve seyreltilmiş pankreas olmak üzere 200 µl doku homojenatı

kondu ve üzerine 800 µl 2,5 M HCl içerisinde hazırlanan 10 mM 2,4-dinitrofenilhidrazin (DNPH) çözeltisinden eklendi. Bir saat karanlıkta inkübasyon gerçekleştirilen deney tüpleri 15 dakikalık aralıklarla vorteks yardımıyla karıştırıldı. Proteinleri çöktürmek için deney tüplerine 1 ml % 20'lik TCA ilave edildi ve vortekslendi. Bu işlemin ardından, örnekler 5000 g'de 5 dakika +4 ºC'de santrifüj edildi. Süpernatant fraksiyonu, pellet kaybı olmamasına dikkat edilerek atıldı. Yıkama için kalan pellet üzerine 800 µl % 10'luk TCA eklendi ve vortekslendi. Vorteks işlemini takiben 5000 g' de 5 dakika +4ºC'de santrifüj yapıldı. Elde edilen pelletler 2 ml etanol: etil asetat (1:1) ile yıkandı. Bu aşama üç kez tekrarlandı. Yıkama sonrası elde edilen pellet üzerine 400 µl 6M guanidin-HCl çözeltisi ilave edilerek vortekslendi ve çözünmesi sağlandı. Tüm içinde çözünmeyen partiküllerin çözünmesi için 37 ºC'deki su banyosunda 10 dakika boyunca bekletildi ardından homojenat içermeyen reaktif körüne karşı 360 nm dalga boyunda okuma yapıldı. Elde edilen sonuçlar kromoforik hisrazonların molar ekstinksiyon katsayısı olan 22000 M^{-1} cm^{-1}'den faydalanılarak PCO konsantrasyonu hesaplandı.

3.6.7. Glutatyon –S transferaz (GST) aktivitesi tayini

GST aktivitesi Habig yöntemine göre yapıldı (238). Yöntem yalnızca pankreas dokuları üzerine uygulandı. Deney tüpüne 500 µl seyreltilmiş pankreas doku homojenatı eklendi ve üzerine 1,5 ml 0,2 M potasyum fosfat, 900 µl distile su, 50 µl 60 mM GSH ve 50 µl 60 mM 1-kloro-2,4-dinitroklorobenzen (CDNB) ilave edilerek vorteksle iyice karıştırıldı. Örneklerin 5 dakika boyunca 340 nm dalga boyunda absorbanslar homojenat içermeyen reaktif körüne karşı okundu. Elde edilen değerler GSH ve CDNB nin konjugasyonu sonucu oluşan ürün için saptanmış olan ekstinksiyon katsayısı olan 9.6 mM^{-1} x cm^{-1} den faydalanılarak hesaplandı. Sonuçlar ünite/ mg protein olarak ifade edildi.

3.6.8. Glutatyon peroksidaz (GP-X) aktivitesi tayini

GP-X tayini Paglia ve Valentine yöntemine göre yapıldı (239). Bu yöntemde hidrojen peroksit varlığında redükte glutatyonun okside glutatyona yükseltgenmesini indükleyen enzim olan glutatyon redüktaz kullanıldı. Yöntem yalnızca seyreltilmiş

pankreas doku homojenatları üzerine uygulandı. Deney tüpüne 100 µl numune eklendi ve üzerine 200 µl 0,25 M fosfat tamponu, 50 µl 10 mM GSH, 50 µl 2,5 mM NADPH eklendi. Ardından 50 µl 6 U/ml glutatyon redüktaz ve 50 µl 12 mM hidrojen peroksit eklenerek 366 nm'de 1. ve 5. dakikalarda absorbanslar homojenat içermeyen reaktif körüne karşı ölçüldü. Sonuçlar aşağıdaki formüle göre hesaplandı ve ünite/ mg protein olarak ifade edildi.

Enzim aktivitesi (U/ml) = [Δ (Absorbans numune) - Δ (absorbans kör)] / 6.22 X [500 / 100] X seyreltme katsayısı.

3.7. TH1/TH2 sitokin panel ölçümü

Plazmada 8 farklı sitokinin (IFN-γ, TNF-α, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13) boncuk yardımı ile akan hücre ölçer yönteminde konsantrasyonlarının belirlenmesi prensibine dayanır. Çalışma LEGENDplex™ Mouse Th Cytokine Panel Kit (Kat No:740029) protokol içeriğine uygun olarak yürütüldü. Tüm solüsyonlar kullanmadan önce oda ısısına getirildi. -80 ºC'de saklanan plazma örnekleri 1:1 kit standart solüsyonu ile dilüe edildi. Boncuklar sonikatör ile bir dakika kadar standart tampon içerisinde muamele edildi. Ardından 30 saniye vortekslendi. Her örnek için 25 µl boncuk tampon eklendi. Standart hazırlanmasında ise 25 µl standart solüsyonu + 25 µl matriks B solüsyonu eklenerek standartlar hazırlandı.

Tüm tüpler toplam hacim 75 µl olacak şekilde hazırlandı ve 800 rpm'de karıştırıcıda yaklaşık 2 saat oda ısısında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası örnekler 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek süpernatantları atıldı. Ardından 200 µl yıkama solüsyonunda bir dakika bekletilerek yıkama yapıldı ve tekrar 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj ve süpernatant atılımını takiben her örnek için tüplere 25 µl antikor karışımı eklendi. Yine karıştırıcıda 800 rpm'de 1 saat karanlıkta inkübasyon gerçekleştirildi. İnkübasyon sonrası tüpler yıkanmadan her örnek tüpünün içerisine 25 µl SA-PE solüsyonu (streptavidin-sekonder) eklendi. Karıştırıcıda 800 rpm'de 30 dakika karanlıkta inkübasyona bırakıldı. Sonrasında yıkama ve santrifüj aşamaları tekrarlandı. Son aşamada 150 µl yıkama tamponu eklenerek pipetaj ile çift lazerli flow sitometri cihazında her örnek için okuma gerçekleştirildi. 1 ml plazmadaki

sitokin miktarı LEGENDPLEX software programında Cubic-loG yöntemine göre pikogram cinsinden hesaplandı.

3.8. Morfolojik boyama yöntemi

Parafin bloklardan 5 µm kalınlığında doku kesitleri kızaklı mikrotom yardımıyla kesildi. Pankreas ve tümör dokusu kesitlerine Hematoksilen+Eozin ikili boyama ve Masson trikrom üçlü boyama yöntemleri uygulandı. Boyamalar için doku kesitleri deparafinize ve dehidrate edildi. Kesitlere 35 dakika Hematoksilen boyası ile muamele edildikten sonra 15 dakika akar suda yıkanması sağlandı. Sonrasında 8 saniye süresince Eozin boyası uygulandı. Boyanan kesitler yükselen alkol serilerinden (%70, %96 ve %100) geçirilerek toluole alındı ve entellan ile kapatıldı.

Masson trikrom boyama için 20 dakika demirli hematoksilen uygulanan kesitler 10 dakika boyunca akar suda bekletildi. Ardından 4 dakika poncue-fuksin ve 3.5 dakika ışık yeşili boyaları ile doku kesitleri muamele edildi. Boyanan lamlar yükselen alkol serilerinden geçirilerek toluole alındı. Kesitleri daimi preparat haline getirmek için kapama solüsyonu olarak entellan kullanıldı.

3.9. İmmünohistokimya

Parafin bloklardan kızaklı mikrotom cihazında yaklaşık 5 µm kalınlığında doku kesitleri alındı. İmmünohistokimya kit (Invitrogen 859043) ve AEC substrat kit (Invitrogen 00-2007) üretici firma protokollerine göre uygulandı. Kesitlere aşağıdaki protokoller göre hücre nükleer çoğalma antijeni (PCNA, Thermo MS-106-P), c-Jun N-terminal kinaz (JNK, Santa Cruz sc-7345), nükleer faktör kappa beta (NF-kβ, Santa Cruz 8414), interlökin-6 (IL-6, Santa Cruz sc-1265-R), ve hücreler için kaspaz-3 (Santa Cruz sc-98785) ve NF-kβ antikorları kullanılarak streptavidin-biotin-peroksidaz immünohistokimya yöntemi uygulandı. Tüm antikorlar için dokunun parafinin giderilmesi amacı ile kesitler toluolde bekletildi. Daha sonra kesitler azalan alkol serilerinden (%100, %96, %70) geçirilerek distile suya alındı.

3.9.1. PCNA protokolü

- Kesitlere sitrat buffer ile 3x5 dakika antijen iyileştirme uygulandı.
- %3'lük hidrojen peroksit 10 dakika uygulandı ve 3x5 dakika PBS ile yıkama yapıldı.
- 20 dakika süresince bloklama solüsyonu uygulandı.
- Kesitler PCNA antikoru (1: 300 dilüsyon) ile 2 gece + 4 ºC'de ve 1 saat oda ısısında inkübe edildi.
- 3x5 dakika PBS ile yıkanan kesitlere 20 dakika boyunca biotin ile işaretlenmiş sekonder antikor uygulandı.
- Kesitler 3x5 dakika PBS ile yıkandıktan sonra 22 dakika süresince streptavidin-peroksidaz uygulandı.
- 2x5 dakika PBS ile yıkanan kesitlere 5 dakika boyunca AEC kromojeni uygulandı.
- Mayer's hematoksilen (1 dakika) ile zıt (nukleus) boyama yapıldı ve kapama medyumu olarak gliserin jel kullanıldı.

3.9.2. JNK protokolü

- Antijen iyileştirme için kesitlere 4x5 dakika sitrat buffer ile muamele edildi.
- Sonrasında kesitlere %3'lük hidrojen peroksit 10 dakika süresince uygulandı ve 3x5 dakika PBS yıkaması yapıldı.
- Kesitlere 20 dakika bloklama solüsyonu uygulandı.
- JNK primer antikoru 1: 30 dilüe edilerek uygulandı. Kesitler bir gece + 30 ºC'de nemli bir ortamda inkübe edildi.
- 3x5 dakika PBS ile yıkama yapıldıktan sonra 20 dakika biotin ile işaretlenmiş sekonder antikor ile muamele edildi.
- 3x5 dakika PBS ile yıkanan kesitler 22 dakika streptavidin-peroksidaz ile inkübe edildi.
- 2x5 dakika PBS ile yıkandı.

- AEC kromojeni ile renk reaksiyonu 5 dakika'da alındıktan sonra kesitler distile suya alınarak reaksiyonun durması sağlandı.
- Mayer's hematoksilen ile zıt boyama yapılan kesitler çeşme suyu alınarak yıkandı ve gliserin jel ile kapatıldı.
-

3.9.3. NF-kβ protokolü

- Kesitlere sitrat buffer ile 4x5 dakika antijen iyileştirme uygulandı.
- %3'lük hidrojen peroksit 10 dakika muamele edildi ve 3x5 dakika PBS ile yıkandı.
- Bloklama solüsyonu 20 dakika boyunca uygulandı.
- Kesitler NF-kβ antikoru (1: 40 dilüsyon) ile 2 gece +4 ºC'de nemli bir ortamda inkübe edildi.
- 3x5 dakika PBS ile yıkanan kesitlere 20 dakika biotin ile işaretlenmiş sekonder antikor uygulandı.
- 3x5 dakika PBS ile yıkama yapıldı ve 22 dakika streptavidin-peroksidaz uygulandı.
- 2x5 dakika PBS ile yıkandı.
- AEC kromojeni uygulanan tüm kesitler 12 dakika sonunda distile suya alınarak reaksiyon durduruldu.
- Mayer's hematoksilen ile zıt boyama uygulandı ve kesitler kapama medyumu gliserin jel ile kapatıldı.

3.9.4. IL-6 protokolü

- Kesitlere sitrat buffer ile 3x5 dakika antijen iyileştirme uygulandı.
- %3'lük hidrojen peroksit 10 dakika muamele edildi ve 3x5 dakika PBS ile yıkandı.
- 20 dakika bloklama solüsyonu uygulandı.
- Kesitler IL-6 antikoru (1: 50 dilüsyon) ile 1 gece +4 ºC'de inkübe edildi.

- 3x5 dakika PBS ile yıkandı ve 20 dakika biotin ile işaretlenmiş sekonder antikor uygulandı.
- 3x5 dakika PBS ile yıkandı ve 22 dakika streptavidin-peroksidaz uygulandı.
- 2x5 dakika PBS ile yıkandı.
- AEC kromojeni uygulanan tüm kesitlerde 9 dakikada reaksiyon durduruldu.
- Mayer's hematoksilen (1 dakika) ile zıt boyama uygulandı ve kapama medyumu gliserin jel ile kapatıldı.

3.9.5. *İn vitro* NF-kβ ve kaspaz-3 protokolü

Düşük ve yüksek glukozlu besiyerinde LPS uygulanan ve uygulanmayan olmak üzere toplam 4 grup hücre kullanıldı. NF-kβ ve kaspaz-3 antijen-antikor eşleşmesi için bir saat %5'lik BSA bloklamasını takiben 1: 100 antikor dilüsyonları kullanılarak 2 gece +4 ºC'de inkübasyona bırakıldı. Ardından hücrelere 30 dakika sekonder antikor ve 20 dakika streptavidin-peroksidaz konjugatı uygulandı. Reaksiyon AEC kromojeni ile görünür hale getirildi ve örneklere Mayer's hematoksilen zıt boyaması yapıldı. Distile su ile muameleden sonra hücreler kapama medyumu olarak gliserin jel kullanılarak kapatıldı.

3.10. İstatistiksel analiz

İmmünohistokimya uygulanan her deney hayvanına ait bir kesitte rastgele seçilen 10 alanda immün pozitif hücreler sayılarak değerlendirildi. Nikon Eclipse 80i model ışık mikroskobu kullanılarak NIS Elements D 3.1 ölçüm programı ile immün pozitif hücreler sayıldı ve fotoğraflandı. İstatistiksel analizler ve grafik çizimleri için SPSS.21 ve Graphpad 5 yazılım programları kullanıldı. Shapiro-Wilk normalite testi ile değişkenlerin kontrolü yapıldı. Normal dağılıma sahip olan değişkenlerin çoklu kıyaslamaları One-way ANOVA ve ikili kıyaslamaları ise Tukey testi ile belirlendi. Normal dağılıma sahip olmayan değişkenler için ise Kruskal Wallis ve Mann-Whitney *U* testleri kullanıldı. P değeri < 0.05 ise anlamlı, < 0.01 ise ileri derecede anlamlı ve < 0.001 ise çok ileri derecede anlamlı olarak kabul edildi.

3.11. Kullanılan cihazlar

1. Etüv, Elektro-Mag M420B
2. Hassas terazi, Radwag, AS60/220.R2
3. Manyetik karıştırıcı, Elektro-Mag M21
4. Mikrodalga fırın, Beko 1550
5. Mikropipet 1-10 µl, 10-100 µl 100-1000 µl, Thermo Fisher,
6. Mikropipet 20-100 µl ve 100-1000 µl, İsolab.
6. pH metre, Scheat pH-meter CG825
7. Saf su cihazı, Millipore Elix3
8. Işık mikroskobu- Olympus/ CX21
9. Işık Araştırma mikroskobu, Nikon Eclipse 80i.
10. Su banyosu, Köttermann
11. Mikrotom, Reichert 390965
12. Buzdolabı, Vestel Eco NF465
13. PCR cihazı, Bio-rad CFX96
14. Nanodrop, Thermo-Fisher
15. Akan hücre ölçer cihazı, Thermo-Fisher
16. Derin dondurucu, ELCOLD EL-19
17. Santrifüj cihazı, Beckman Coulter Allegra 64R, X-30R
18. Spektrofotometre, Shimadzu, 1800
19. Homojenizatör, IKA RW16

3.12. Kullanılan kimyasal maddeler

Toluol, Merck 1.08323.2500

Parafin, Merck 1.07337.1000

Asetik asit, Atabay AA 002 L50

Gliserin, Atabay AS040L50

Jelatin, Sigma G-8150

Ethanol, Merck 1.00986.2500

Metanol, İsolab 67-56-1

Lipopolisakkarit Sigma L8274

Dimetilsülfoksit Sigma D5879

Na_2HPO_4, Fluka 71640

NaH_2PO_4 Fluka 71496

$NaH_2PO_4H_20$, Merck 6345.1000

$Na_2HPO_42H_20$, Merck 1.06576.1000

NaCl, Merck 6400.1000

Trikloroasetik asit, Sigma T9159

Triklorobarbitürik asit, Merck 108180

2-nitrobenzoik asit, Sigma D8130

2,4-dinitrofenilhidrazin, Sigma D19893

Guanidin -HCI Sigma, G7284

Nitro-blue tetrazolium, Sigma N5514

Kloroform Sigma SK.R.24216

Ksantin oksidaz Sigma SB.X1875

Poly-L-lysine Sigma S.B.P8920

Sodyum Sitrat, Sigma S4641

Sitrik Asit, Riedel 27102

Rompun %2, Bayer,

Ketamin, Pfizer

DMEM-F12 besiyeri Sigma D0697

DMEM high glucose besiyeri Sigma D5796

DMEM low glucose besiyeri Sigma D6046

Streptomisin antibiyotik Sigma P4333

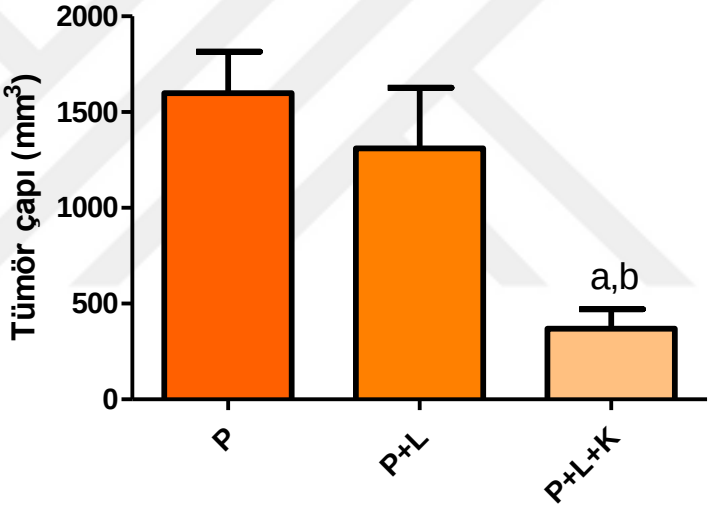
Fetal bovine serum Sigma F9665

4. BULGULAR

4.1. Deney hayvanları

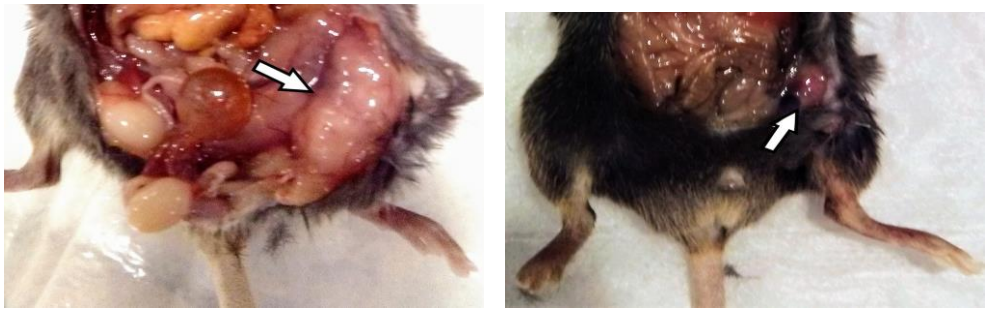
4.1.1. Tümör çap ölçüm sonuçları

Deneyin son günü yapılan hayvanların tümör çap ölçümlerinin P, P+L ve P+L+K grupları arasında ileri derecede anlamlı olduğu saptandı ($p < 0,01$) (Şekil 4-1). En düşük tümör çapı P+L+K grubunda saptandı (Şekil 4-2). P ve P+L grupları arasında tümör çapının anlamlı olmayan bir azalma gösterdiği gözlendi ($p > 0,05$). P+L+K grubunun tümör çap ölçümünün P grubuna kıyasla istatistiksel olarak çok ileri derecede anlamlı, P+L grubuna kıyasla ise ileri derecede anlamlı olarak azaldığı tespit edildi ($p < 0,001$ ve $p < 0,01$, sırasıyla).



Şekil 4-1: Hayvanların son gün tümör çap ölçümleri (n=8). Sonuçlar ± SEM olarak ifade edildi. [a]p < 0,001 P grubuna göre, [b]p < 0,01 P+L grubuna göre.

P+L grubu **P+L+K grubu**

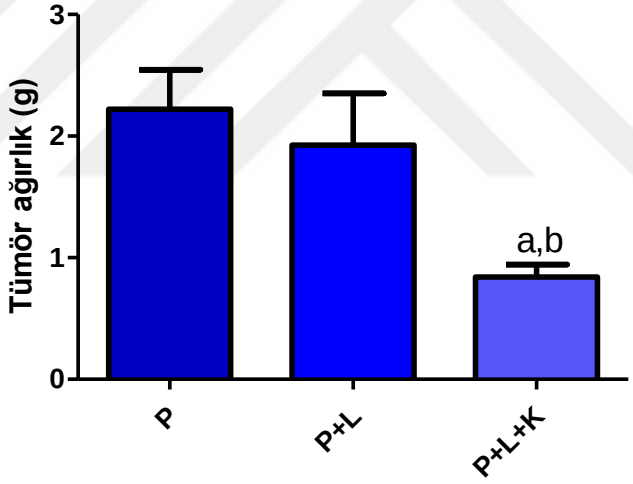


Şekil 4-2: C57BL/6 farelerde Panc02 tümör yerleşimi ve boyutu.

4.1.2. Tümör ağırlık ölçüm sonuçları

Hayvanların son gün belirlenen tümör ağırlık ölçüm sonuçlarına göre; P, P+L ve P+L+K grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık vardı ($p < 0,05$), (Şekil 4-3). En düşük tümör ağırlığı P+L+K grubunda ölçüldü. Tümör çap ölçümlerine benzer olarak, P ve P+L grupları karşılaştırıldığında P+L grubunda anlamlı olmayan bir azalma tespit edildi ($p > 0,05$). P+L+K grubunun tümör ağırlık sonucu ise P grubuna kıyasla çok ileri derecede anlamlı, P+L grubuna göre ise anlamlı olarak düşüş gösterdi ($p < 0,001$, $p < 0,05$ sırasıyla).

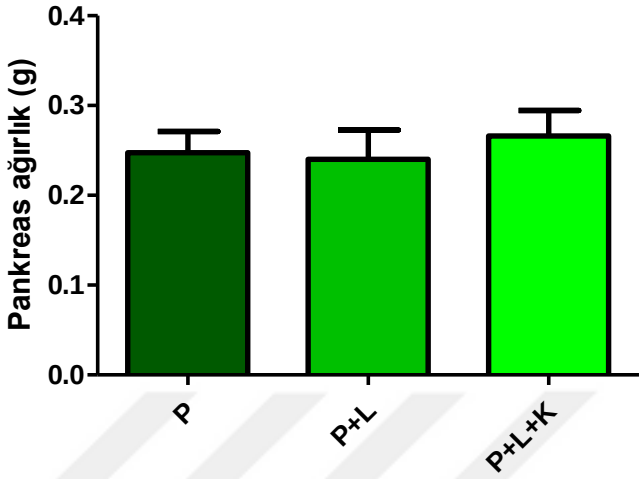
Tümör çap ve ağırlık ölçüm bulgularına göre, PDAC tümör modelinde LPS ve %40 kalori kısıtlamasının birlikte uygulanmasının tümör gelişimi üzerinde önemli derecede geriletici etkisi olduğu gösterildi.



Şekil 4-3: Hayvanların son gün tümör ağırlık ölçümleri (n=8). Sonuçlar ± SEM olarak ifade edildi. [a]p < 0,001 P grubuna göre; [b]p < 0,05 P+L grubuna göre.

4.1.3. Total pankreas ağırlık sonuçları

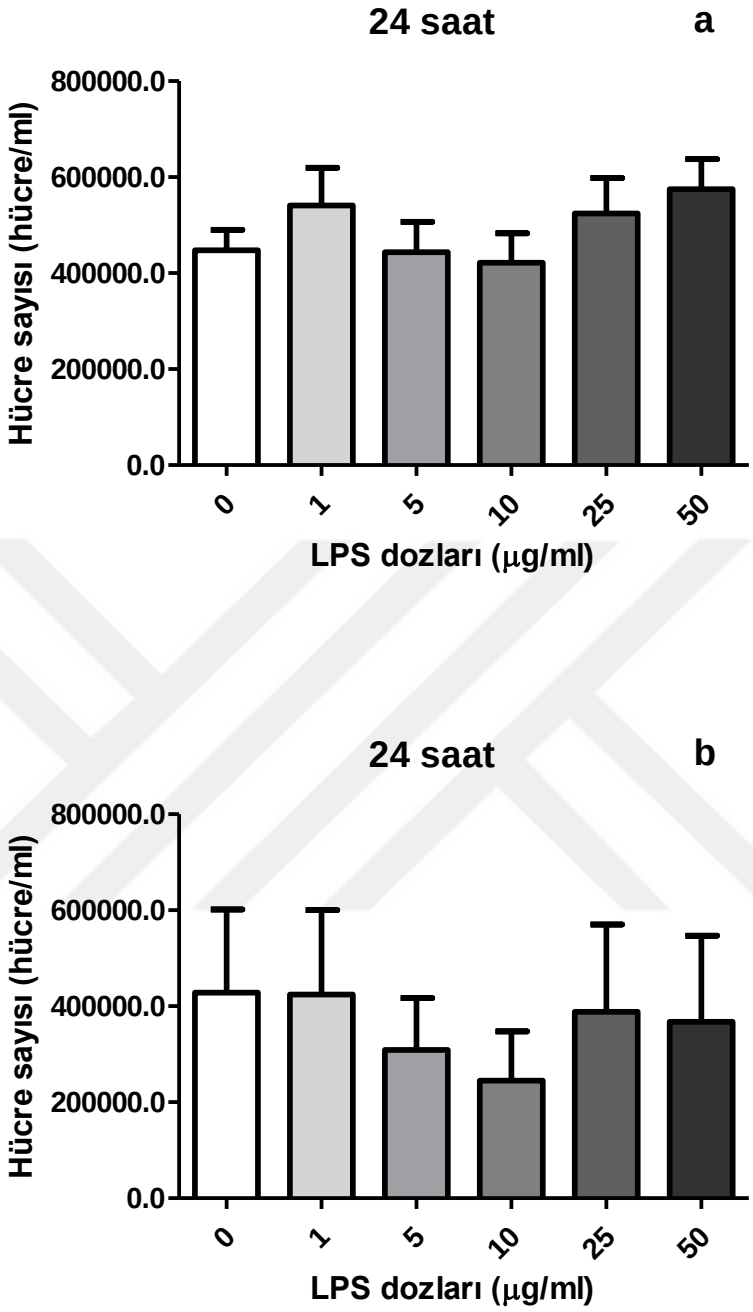
Deney hayvanlarının total pankreas ağırlık sonuçları kıyaslandığında 3 grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik saptanmadı ($p > 0,05$), (Şekil 4-4). P ve P+L gruplarının total pankreas ağırlık ölçümleri arasında ise belirgin bir fark bulunmazken, P+L+K grubunun pankreas ağırlık değerinde hem P hem de P+L gruplarına kıyasla anlamlı olmayan bir artış görüldü ($p > 0,05$).



Şekil 4-4: Hayvanların total pankreas ağırlık ölçümleri **(n=8). Sonuçlar ± SEM olarak ifade edildi.**

4.2. *İn vitro* LPS konsantrasyon bulguları

İn vivo modele benzer olarak, Panc02 hücreleri düşük ve yüksek glukoz içerikli besiyerlerinde farklı konsantrasyonlarda (0 - 50 µg/ml) LPS ile 24 saat muamele edildi. Şekil 4-5'de görüldüğü üzere en düşük canlı hücre sayısı, yüksek ve düşük glukoz içerikli besiyerleri için benzer olarak 10 µg/ml LPS konsantrasyonu uygulandığında bulundu.



Şekil 4-5: Yüksek glukoz (a) ve düşük glukoz (b) içerikli besiyerlerinde Panc02 hücrelerine farklı konsantrasyonda LPS uygulaması (n=3). Sonuçlar ± SEM olarak ifade edildi.

4.3. NF-kβ, JNK ve IL-6 mRNA ekspresyon seviyeleri

4.3.1. Tümör dokusunda mRNA ekspresyon analiz sonuçları

Bulgularımıza göre, NF-κβ mRNA ekspresyon seviyesi P ve P+L gruplarında benzerdi. P+L+K ve P+L grupları kıyaslandığında, P+L+K grubunun NF-κβ mRNA ekspresyon seviyesinin P+L grubundan 1,8 kat daha fazla olduğu belirlendi.

JNK mRNA seviyesi ise P+L grubunda P grubuna kıyasla 2 kat artış gösterdi. En Düşük mRNA ekspresyonu P grubunda görüldü. P+L+K grubunun JNK mRNA seviyesi P+L grubu ile kıyaslandığında, P+L+K grubunda 2,5 kat artış saptandı.

Tümör dokusunda IL-6 mRNA seviyesi JNK mRNA seviyesi ile benzerlik gösterdi. P+L grubunda P grubuna kıyasla IL-6 mRNA seviyesinin 2 kat arttığı belirlendi. P+L+K grubunda ise IL-6 mRNA seviyesi P+L grubuna kıyasla 2,25 kat daha fazlaydı.

4.3.2. Pankreas dokusu mRNA ekspresyon analiz sonuçları

NF-κβ mRNA bulgularımıza göre; L+K grubunun NF-κβ mRNA ekspresyon seviyesi L grubuna kıyasla 1,33 kat daha yüksekti. P grubu ile L grubu kıyaslandığında, P grubunun NF-κβ mRNA seviyesinin L grubuna göre 1,25 kat arttığı gözlendi. P ve P+L gruplarında NF-κβ mRNA seviyesinde bir farklılık saptanmadı. P+L+K grubunun mRNA seviyesinin ise P+L grubu ile karşılaştırıldığında 1,47 kat daha fazla olduğu tespit edildi.

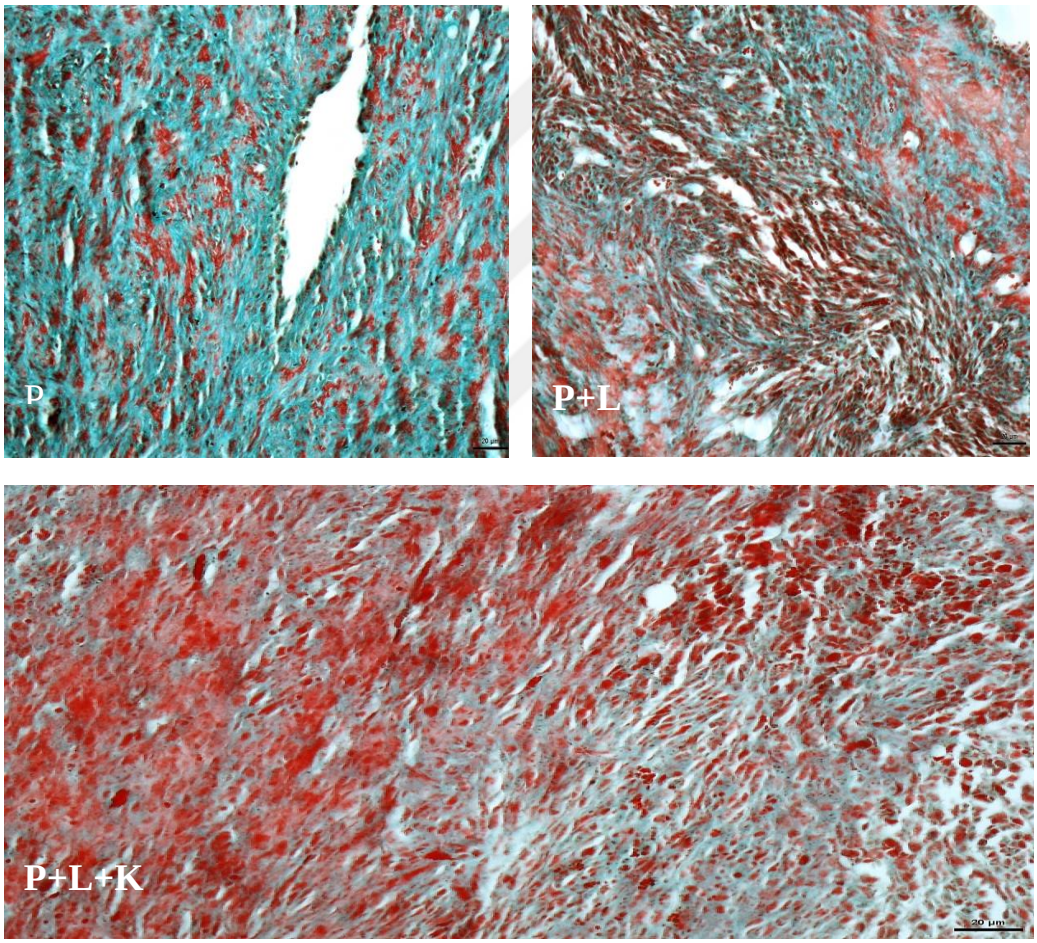
JNK mRNA seviyesinin L+K grubunda L grubuna kıyasla 1,65 kat daha fazla olduğu saptandı. L grubu ile P grubu karşılaştırıldığında L grubunun P grubundan 1,2 kat daha fazla olduğu görüldü. P ve P+L grubu kıyaslandığında, her iki grubun JNK mRNA seviyesinin benzer sonuçlar gösterdiği belirlendi. P+L+K grubunun JNK mRNA seviyesinin ise P+L grubundan 1,15 kat kadar daha az olduğu tespit edildi. En düşük JNK mRNA ekspresyon seviyesi P+L+K grubunda görüldü.

IL-6 mRNA ekspresyon seviyesi L grubunda L+K grubuna kıyasla 3 kat fazlaydı. P grubunun pankreas IL-6 mRNA ekspresyon seviyesi de L grubu ile karşılaştığında 5,5 kat daha az olduğu belirlendi. P grubunun IL-6 mRNA ekspresyon seviyesinin P+L grubu ile kıyaslandığında ise 1,59 kat daha düşük olduğu saptandı. P+L

ve P+L+K grupları kıyaslandığında, P+L+K grubunun pankreas IL-6 mRNA seviyesinin 1,69 kat daha fazla olduğu tespit edildi.

4.3.3. Morfolojik boyama bulguları

Tümör dokularına uygulanan Masson trikrom boyama ışık mikroskobik inceleme sonuçlarına göre, P grubunda P+L ve P+L+K gruplarına kıyasla ışık yeşili ile boyanan daha fazla bağ doku olduğu görüldü. En az bağ doku miktarı ise P+L+K grubunda gözlendi (Şekil 4-6).



Şekil 4-6: Gruplara ait fare tümör dokuları (n=8)**, Masson trikrom boyama. P+L+K grubunda P grubuna kıyasla çok daha az bağ doku ve ven görülmekte.**

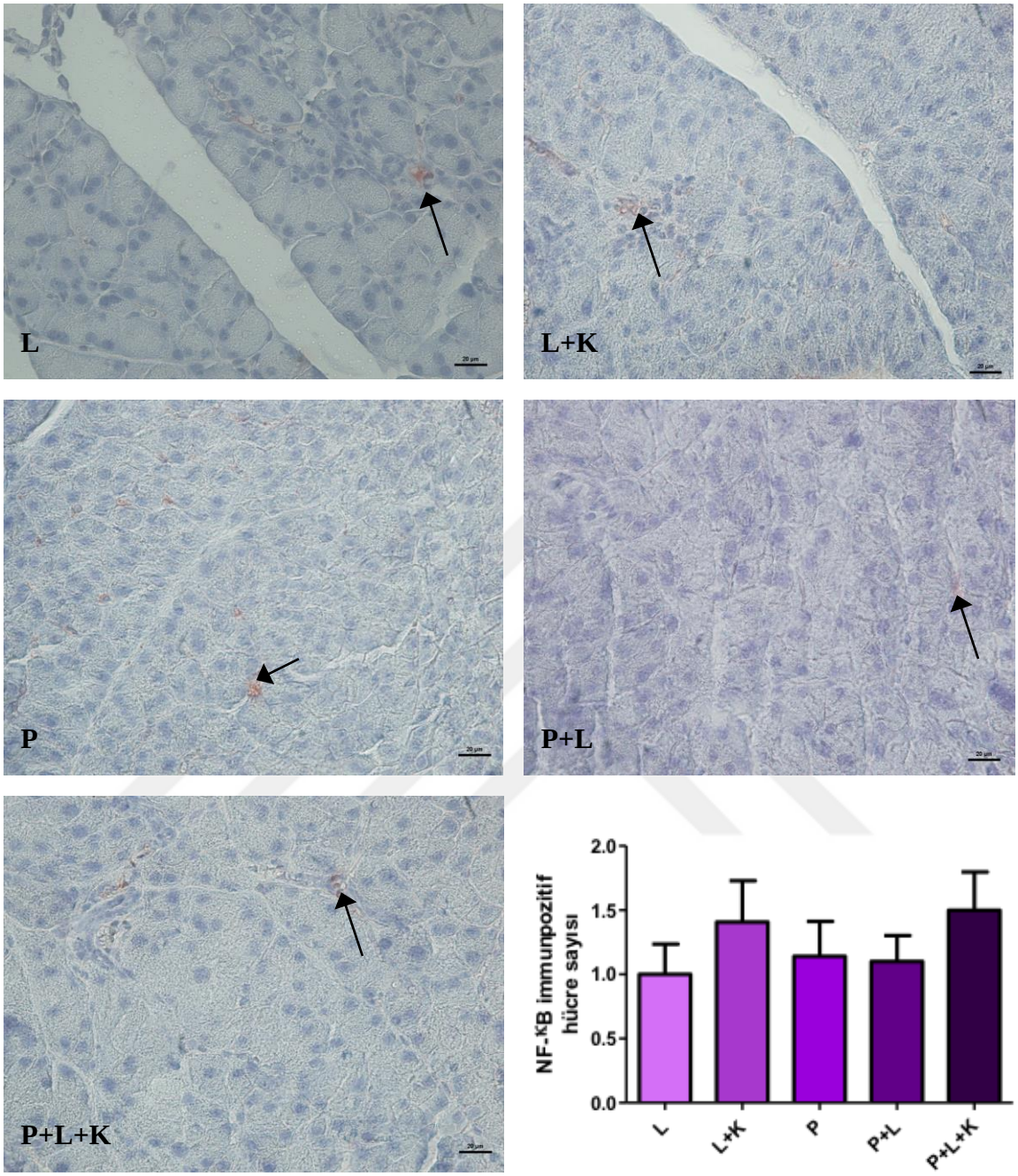
4.3.4. İmmünohistokimya bulguları

İmmünohistokimya bulgularımıza göre, NF-κβ immünpozitif hücre sayısının beş grup arasında anlamlı bir değişiklik göstermediği belirlendi ($p > 0,05$). Fakat L+K grubunun L grubuna, P+L+K grubunun ise P ve P+L gruplarına kıyasla NF-κβ immünpozitif hücre sayısının daha yüksek olduğu gözlendi. P ve P+L gruplarının NF-κβ immünpozitif hücre sayısının ise benzerlik gösterdiği saptandı. (Şekil 4-7).

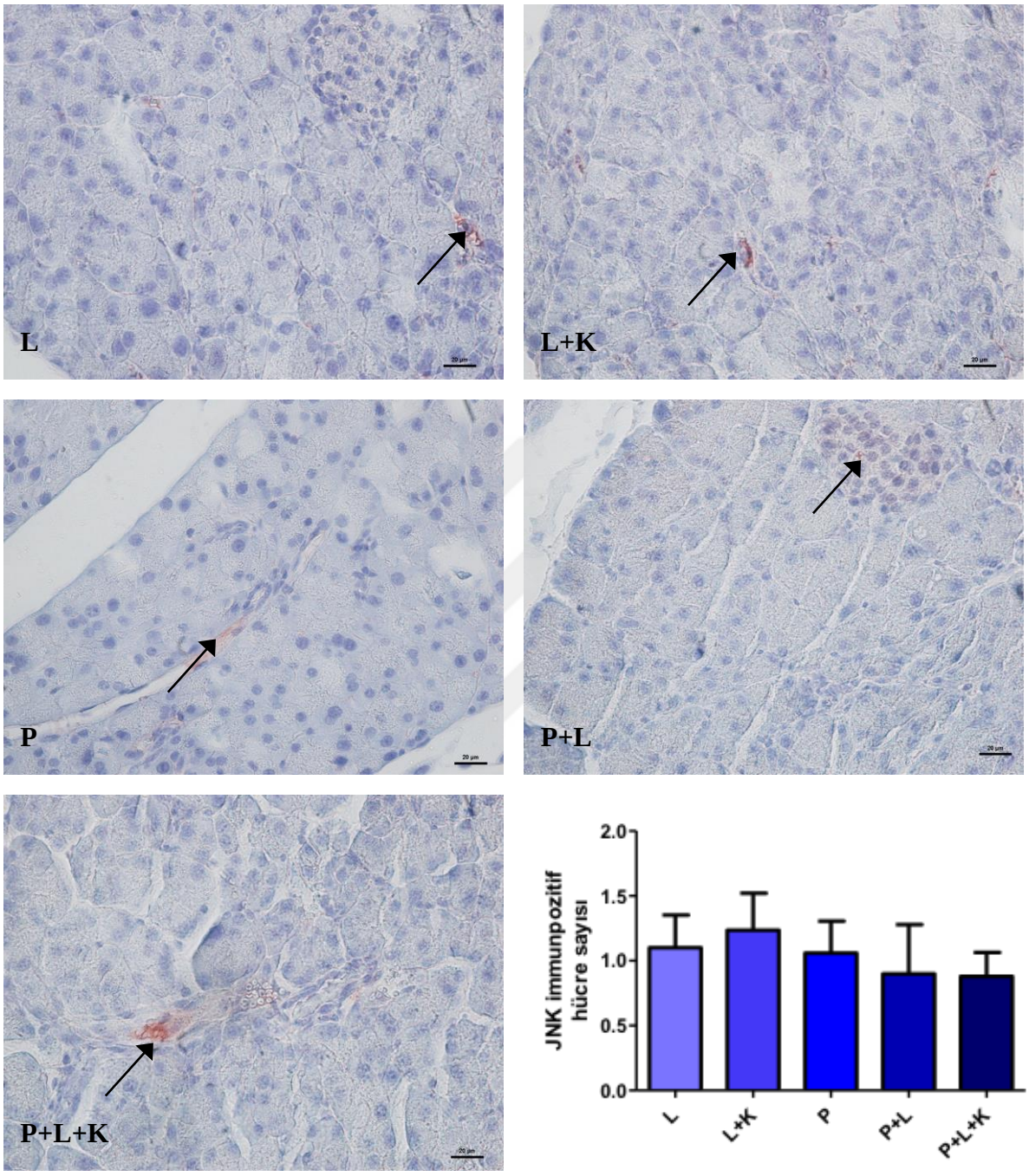
Beş grup arasında JNK immünpozitif hücre sayısının istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik göstermediği saptandı ($p > 0,05$). L grubunun JNK immünpozitif hücre sayısının L+K grubuna göre çok az daha düşük olduğu görüldü. P grubunun JNK immünpozitif hücre sayısının P+L ve P+L+K grubunun kıyasla biraz daha yüksek olduğu ve P ve P+L gruplarının JNK immünpozitif hücre sayısının ise birbirlerine yakın olduğu belirlendi (Şekil 4-8).

IL-6 immünpozitif hücre sayısı tüm gruplar arasında kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı olmayan farklılıklar gözlendi ($p > 0,05$). L+K grubunun IL-6 immünpozitif hücre sayısının L grubuna kıyasla daha düşük olduğu görüldü. P+L grubunun IL-6 immünpozitif hücre sayısının P grubundan biraz daha fazlaydı. P+L+K grubunda ise IL-6 immünpozitif hücre sayısı P ve P+L grubuna göre daha yüksekti (Şekil 4-9).

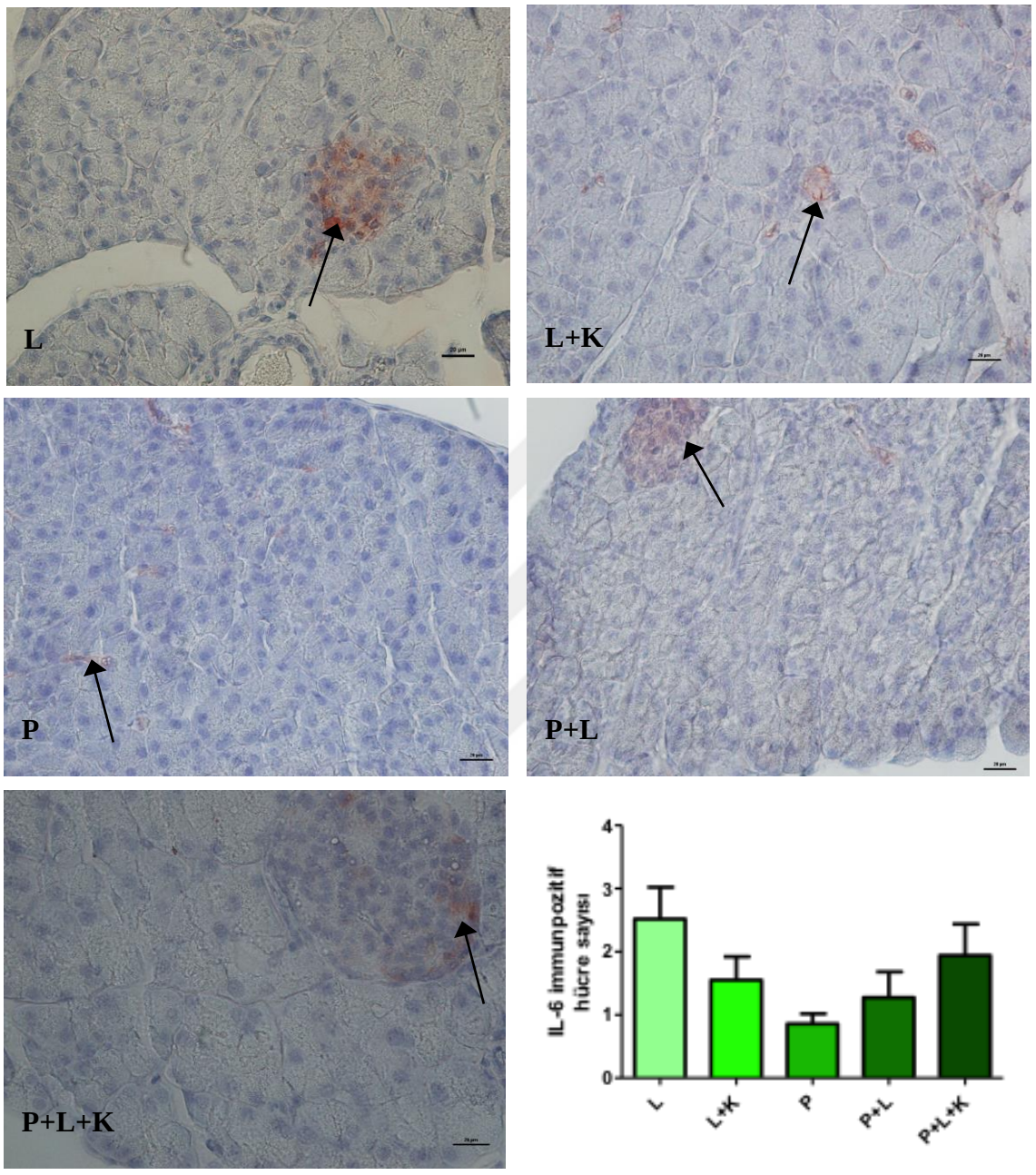
PCNA immünpozitif hücre sayısının gruplar arası kıyaslamasının istatistiksel olarak çok ileri derecede anlamlı olduğu tespit edildi ($p < 0,001$). L+K, P ve P+L gruplarının PCNA immünpozitif hücre sayısının L grubuna kıyasla çok ileri derecede anlamlı olduğu gözlendi ($p < 0,001$). P grubu P+L grubu ile karşılaştırıldığında, PCNA immünpozitif hücre sayısının P+L grubunda anlamlı olarak daha düşük olduğu belirlendi ($p < 0,05$). P+L+K grubunun PCNA immünpozitif hücre sayısının ise P grubuna göre çok ileri derecede anlamlı, P+L grubuna göre de anlamlı olarak daha düşük olduğu saptandı ($p < 0,001$ ve $p < 0,05$, sırasıyla) (Şekil 4-10).



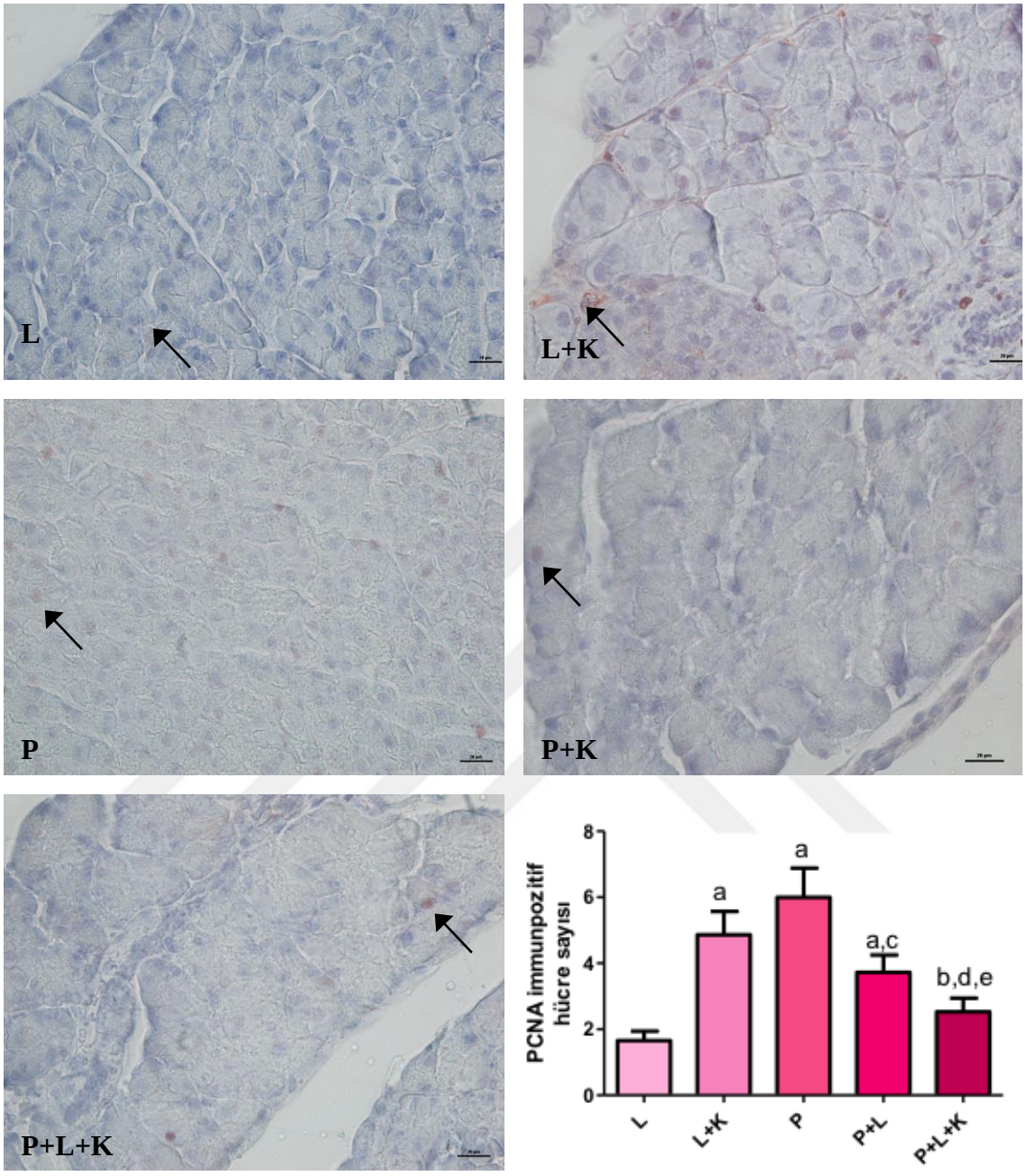
Şekil 4-7: Fare pankreas dokusunda Nüklear faktör kappa beta (NF-κβ) immünpozitif hücreler (ok) (n=8). Streptavidin-biotin-peroksidaz tekniği, hematoksilen zıt boyama. Veriler ± SEM olarak ifade edildi.



Şekil 4-8: Fare pankreas dokusunda c-Jun N-terminal kinaz (JNK) immünpozitif hücreler (ok) (n=8). Streptavidin-biotin-peroksidaz tekniği, hematoksilen zıt boyama. Veriler ±SEM olarak ifade edildi.



Şekil 4-9: Fare pankreas dokusunda interlökin-6 (IL-6) immünpozitif hücreler (ok) (n=8). Streptavidin-biotin-peroksidaz tekniği, hematoksilen zıt boyama. Veriler ± SEM olarak ifade edildi.

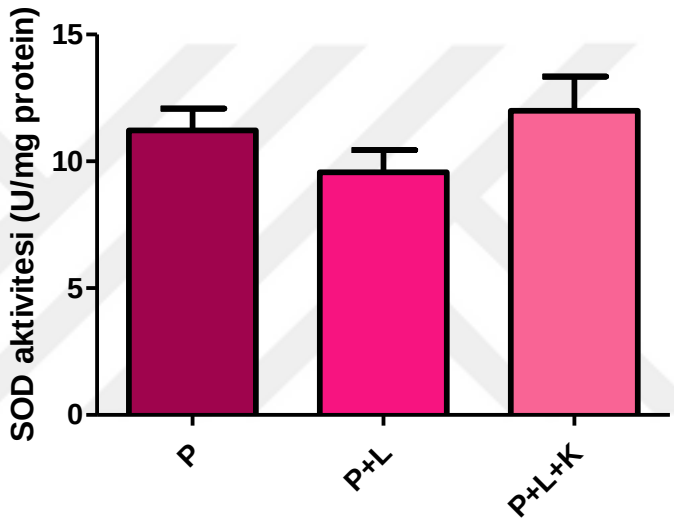


Şekil 4-10: Fare pankreas dokusunda hücre nükleer çoğalma antijeni (PCNA) immünpozitif hücreler (ok) (n=8). Streptavidin-biotin-peroksidaz tekniği, hematoksilen zıt boyama. Veriler ±SEM olarak ifade edildi. $^{a}p < 0,001$ L grubuna göre, $^{b}p < 0,05$ L+K grubuna göre, $^{c}p < 0,05$ P grubuna göre, $^{d}p < 0,001$ P grubuna göre, $^{e}p < 0,05$ P+L grubuna göre.

4.4. Biyokimya sonuçları

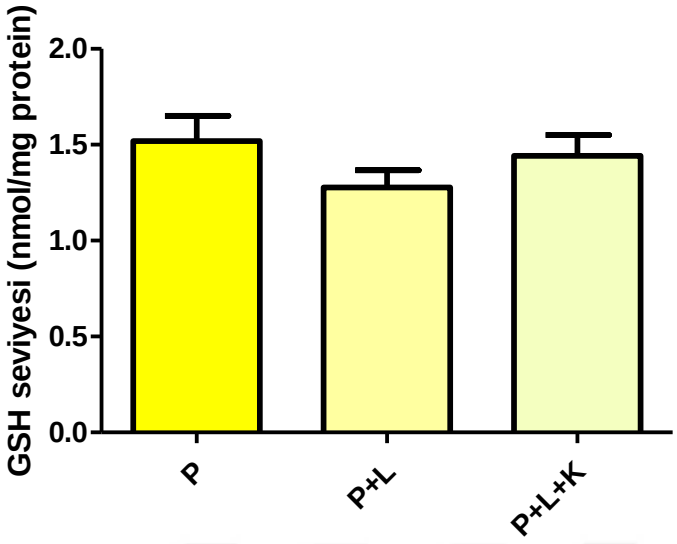
4.4.1. Tümör dokusu biyokimya sonuçları

Tümör dokularında yapılan süperoksit dismutaz aktivite tayini sonuçlarına göre; P, P+L ve P+L+K grupları arasında anlamlı bir fark saptanmadı ($p > 0,05$), (Şekil 4-11). P+L grubunun tümör SOD aktivitesinin P ve P+L+K gruplarına kıyasla daha düşük olduğu gözlendi ($p > 0,05$). Diğer taraftan tümör SOD aktivitesi P+L+K grubunda P grubuna göre çok az daha yüksekti ($p > 0,05$)



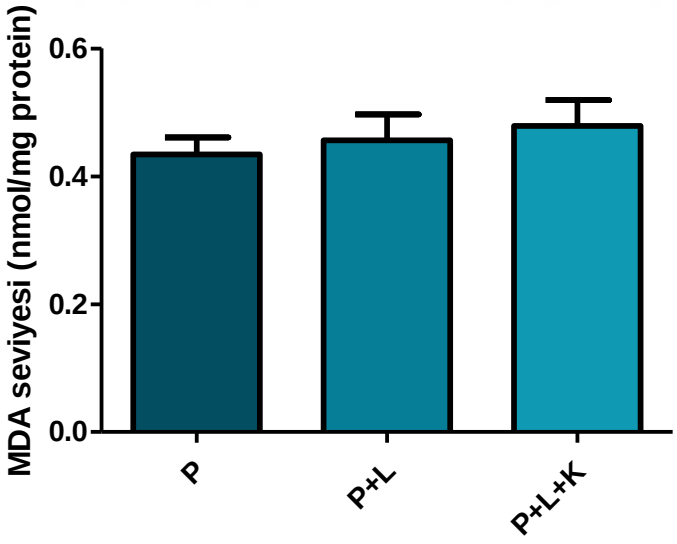
Şekil 4-11: Tümör dokusu süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi (n=8). Sonuçlar ±SEM olarak ifade edildi.

Tümör glutatyon (GSH) seviyesinin de P, P+L ve P+L+K grupları arasında anlamlı olarak değişmediği gözlendi ($p > 0,05$), (Şekil 4-12). En düşük tümör GSH seviyesi ise P+L grubunda saptandı ($p > 0,05$).



Şekil 4-12: Tümör dokusunda glutatyon (GSH) seviyesi (n=8). Sonuçlar ± SEM olarak ifade edildi.

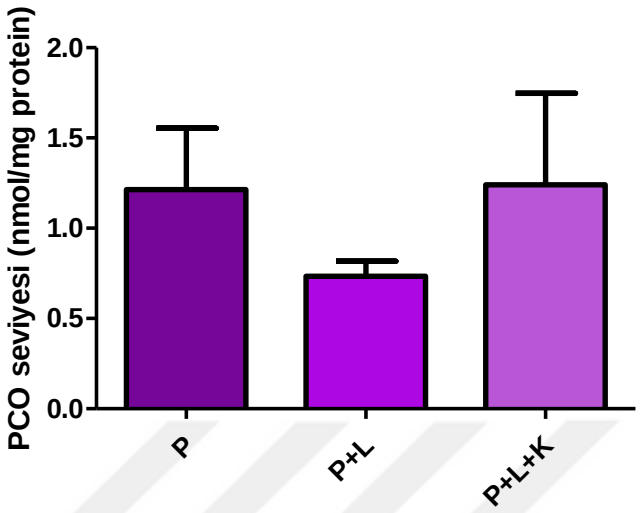
P, P+L ve P+L+K gruplarının tümör dokularında malondialdehit (MDA) seviyesi anlamlı bir değişiklik göstermedi ($p > 0,05$), (Şekil 4-13).



Şekil 4-13: Tümör dokusunda malondialdehit (MDA) seviyesi (n=8). Sonuçlar ± SEM olarak ifade edildi.

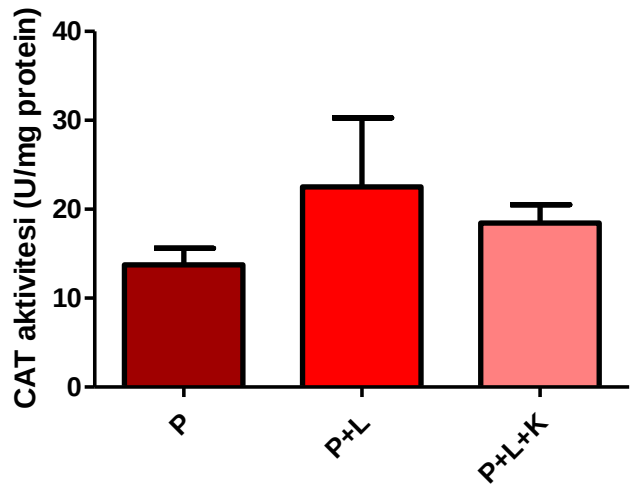
Tümör protein karbonil (PCO) seviyesi için üç grup arasında anlamlı bir farklılık görülmedi ($p > 0,05$) (Şekil 4-14). Fakat en düşük tümör PCO seviyesi P+L

grubunda görüldü (p > 0,05). P ve P+L+K grupları arasında ise tümör PCO seviyesi benzerdi (p > 0,05).



Şekil 4-14: Tümör dokusunda protein karbonil (PCO) seviyesi (n=8). Sonuçlar ± SEM olarak ifade edildi.

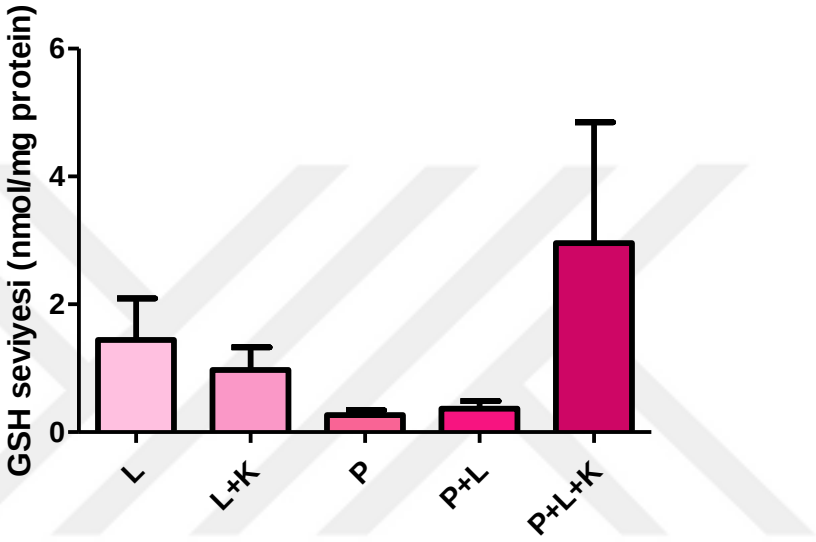
Tümör katalaz (CAT) aktivitesinde tüm gruplar birbirleriyle kıyaslandığında anlamlı bir farklılık olmadığı saptandı (p > 0,05) (Şekil 4-15). Fakat P grubunun tümör CAT aktivitesi P+L ve P+L+K gruplarına göre daha düşüktü (p > 0,05).



Şekil 4-15: Tümör dokusunda katalaz (CAT) aktivitesi (n=8). Sonuçlar ± SEM olarak ifade edildi.

4.4.2. Pankreas dokusu biyokimya sonuçları

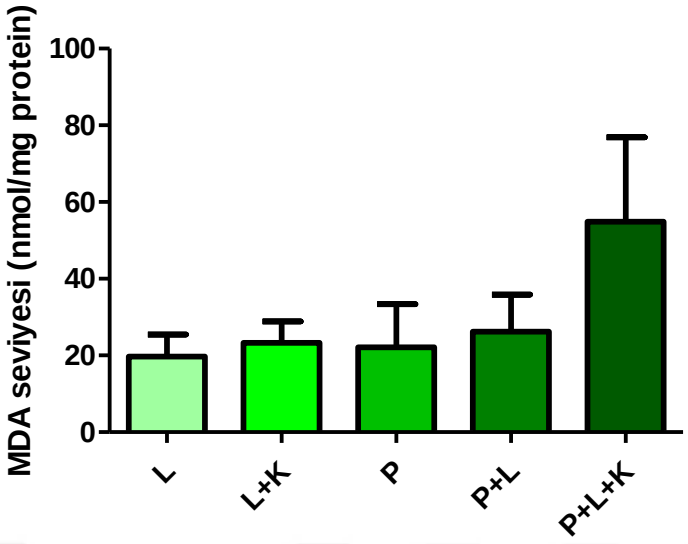
L, L+K, P, P+L ve P+L+K grupları birbirleriyle karşılaştırıldığında, gruplar arasında pankreas GSH seviyesinin anlamlı olarak değişmediği gözlendi ($p > 0,05$), (Şekil 4-16). P+L+K grubunun pankreas GSH seviyesinin diğer gruplara kıyasla anlamlı olmayan bir artış gösterdiği belirlendi ($p > 0,05$).



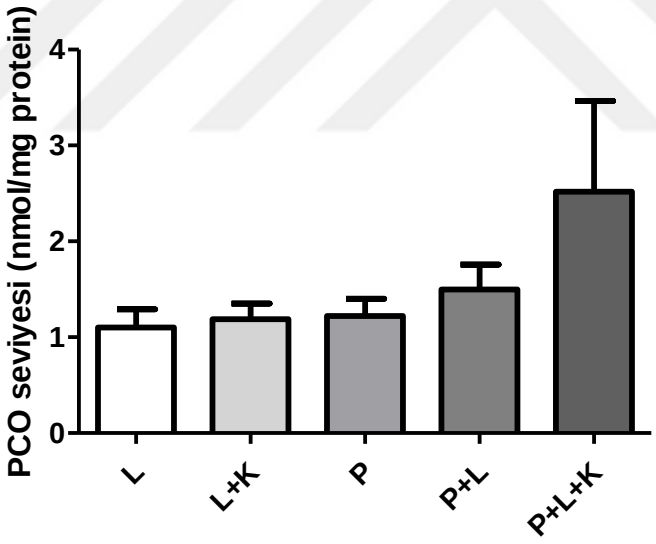
Şekil 4-16: Pankreas dokusunda glutatyon (GSH) seviyesi (n=8). Sonuçlar ± SEM olarak ifade edildi.

Tüm gruplar birbirleri arasında kıyaslandığında, pankreas MDA seviyesinin anlamlı bir değişiklik göstermediği saptandı ($p > 0,05$), (Şekil 4-17). Fakat P+L+K grubunun pankreas MDA seviyesinin diğer gruplara göre anlamlı olmayan bir artış gösterdiği tespit edildi ($p > 0,05$).

Pankreas PCO seviyesi için beş grup arasında anlamlı bir farklılık görülmedi ($p > 0,05$) (Şekil 4-18). L, L+K, P ve P+L gruplarının pankreas PCO seviyesi birbirlerine çok yakınken P+L+K grubunun pankreas PCO seviyesi bu dört gruba kıyasla biraz daha fazlaydı ($p > 0,05$).



Şekil 4-17: Pankreas dokusunda malondialdehit (MDA) seviyesi (n=8). Sonuçlar ± SEM olarak ifade edildi.

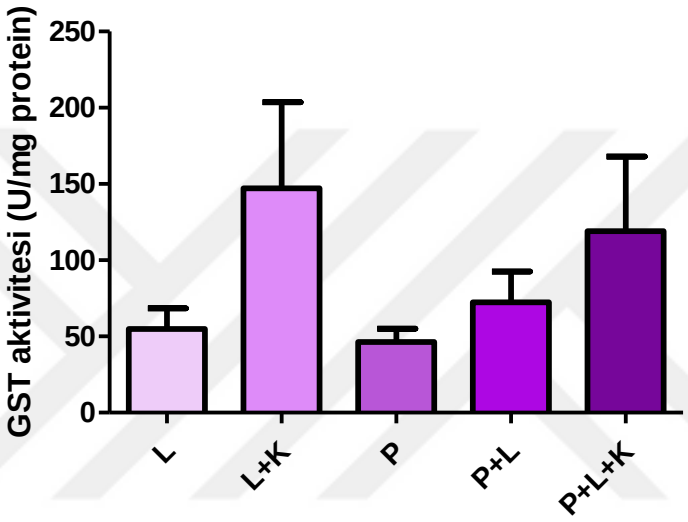


Şekil 4-18: Pankreas dokusunda protein karbonil (PCO) seviyesi (n=8). Sonuçlar ± SEM olarak ifade edildi.

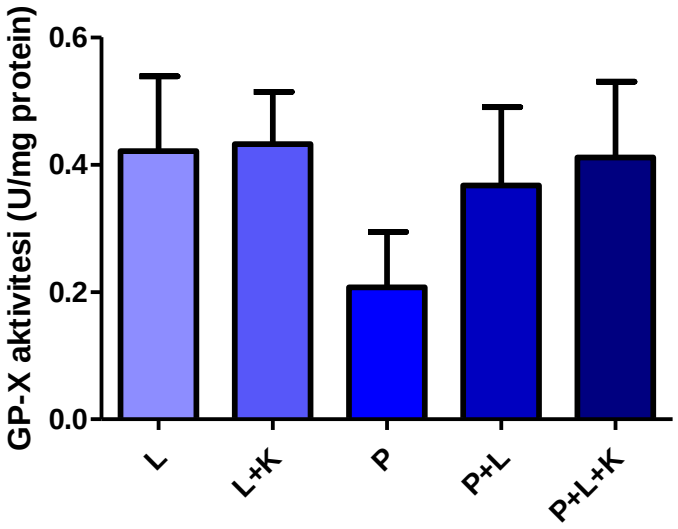
Beş grup birbirleri arasında kıyaslandığında, pankreas glutatyon–S transferaz (GST) aktivitesinde anlamlı bir fark yoktu ($p > 0,05$), (Şekil 4-19). L+K grubunun pankreas GST aktivitesi L grubuna, P+L+K grubunun pankreas GST aktivitesi ise P ve P+L gruplarına göre daha yüksekti ($p > 0,05$).

Pankreas glutatyon peroksidaz (GP-X) aktivitesinin de beş grup arasında anlamlı olarak değişmediği gözlendi ($p > 0,05$), (Şekil 4-20). Fakat P grubunun pankreas GP-X aktivitesinin diğer 4 gruba kıyasla daha düşük olduğu belirlendi ($p > 0,05$).

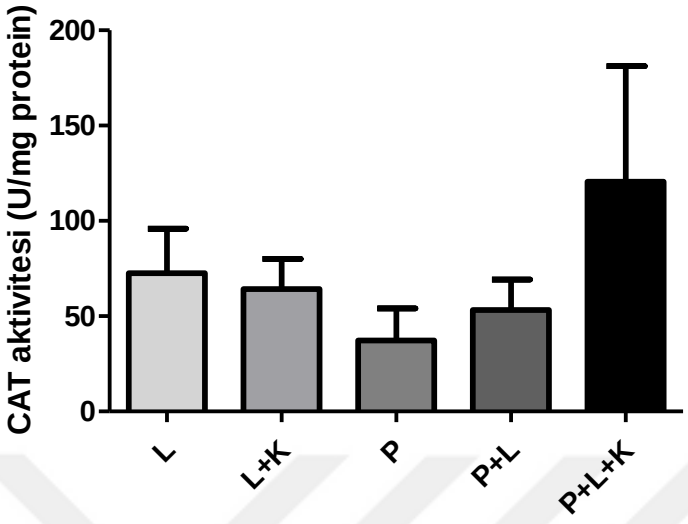
Pankreas katalaz (CAT) aktivitesi tüm gruplar birbirleriyle kıyaslandığında anlamlı bir farklılık olmadığı saptandı ($p > 0,05$) (Şekil 4-21). Fakat P+L+K grubunun pankreas CAT aktivitesi diğer tüm gruplara göre daha yüksekti ($p > 0,05$).



Şekil 4-19: Pankreas dokusunda glutatyon–S transferaz (GST) aktivitesi (n=8). Sonuçlar ± SEM olarak ifade edildi.



Şekil 4-20: Pankreas dokusunda glutatyon peroksidaz (GP-X) aktivitesi (n=8). Sonuçlar ± SEM olarak ifade edildi.

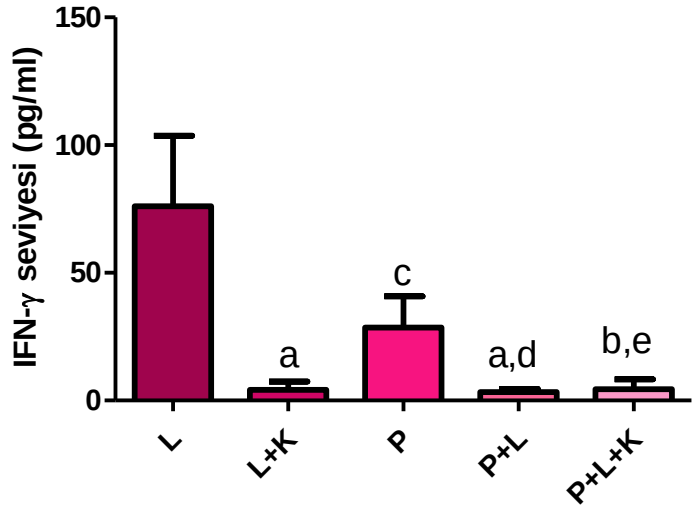


Şekil 4-21: Pankreas dokusunda katalaz (CAT) aktivitesi (n=8). Sonuçlar ± SEM olarak ifade edildi.

4.5. TH1/TH2 sitokin panel ölçüm sonuçları

Flow sitometri tekniği kullanılarak belirlenen plazma IFN-γ, TNF-α, IL-2, IL-4, IL-5 IL-6, IL-10, IL-13 sitokin seviyeleri Şekil 4-22 - Şekil 4-29'de sunuldu.

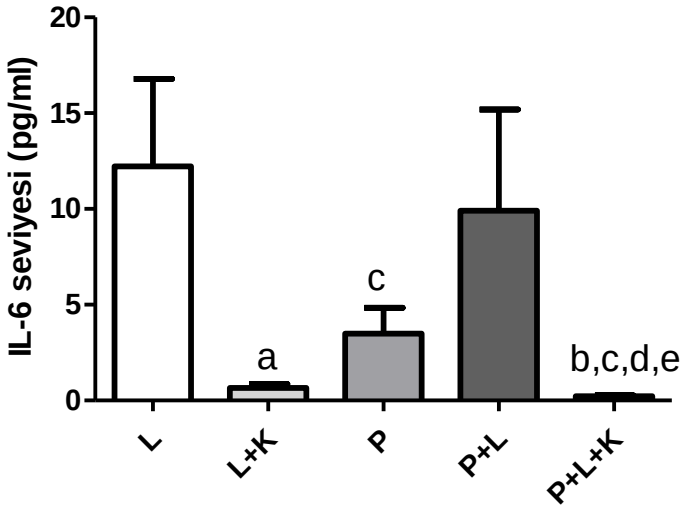
Plazma IFN-γ seviyesinin L, L+K, P, P+L ve P+L+K grupları arasında istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı farklılık gösterdiği belirlendi ($p < 0,01$). L+K grubunun plazma IFN-γ seviyesi L grubuna kıyasla anlamlı olarak daha düşüktü ($p < 0,05$). P+L grubunun IFN-γ seviyesinin P grubuna kıyasla anlamlı olarak azaldığı gözlendi ($p < 0,05$). P+L+K grubunun IFN-γ seviyesinin de P grubuna göre ileri derecede anlamlı olarak daha düşük olduğu tespit edildi ($p < 0,01$). P+L ve P+L+K gruplarının ise IFN-γ seviyesinin benzer olduğu gözlendi.



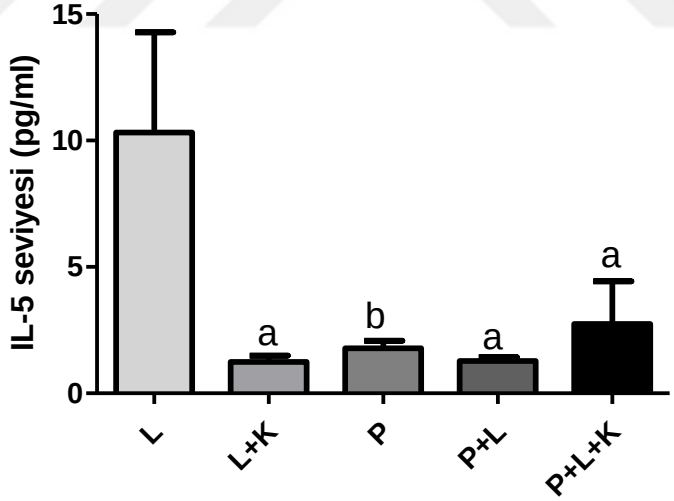
Şekil 4-22: Plazma interferon-gama (IFN-γ) seviyesi (pg/ml) (n=8). Sonuçlar ± SEM olarak ifade edildi. [a] p < 0,05 L grubuna göre, [b] p < 0,01 L grubuna göre, [c]p < 0,01 L+K grubuna, [d]p < 0,05 P grubuna göre, [e] p < 0,01 P grubuna göre.

Plazma IL-6 seviyesi 5 grup arasında istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı bir farklılık gösterdi ($p < 0,01$). L+K grubunun plazma IL-6 seviyesinin L grubuna kıyasla ileri derecede anlamlı bir azalma gösterdiği belirlendi ($p < 0,01$). P+L grubunun IL-6 seviyesinin P grubuna kıyasla anlamlı olmayan bir artış gösterdiği belirlendi ($p > 0,05$). P+L+K grubunun plazma IL-6 seviyesi ise L, L+K, P ve P+L gruplarına göre anlamlı bir azalma gösterdi ($p < 0,001$, $p < 0,05$, $p < 0,001$, $p < 0,05$, sırasıyla).

Gruplar birbirleriyle kıyaslandığında plazma IL-5 seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik saptandı ($p < 0,05$). Plazma IL-5 seviyesi L+K grubunda L grubuna kıyasla daha düşüktü ($p < 0,01$). P grubunun plazma IL-5 seviyesi de L grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olarak daha azdı ($p < 0,05$). P ve P+L grupları arasında plazma IL-5 seviyesi bakımında önemli bir değişiklik yoktu. P+L+K grubunda ise plazma IL-5 seviyesi P ve P+L gruplarına göre anlamlı olmayan bir yükselme gösterdi ($p > 0,05$).



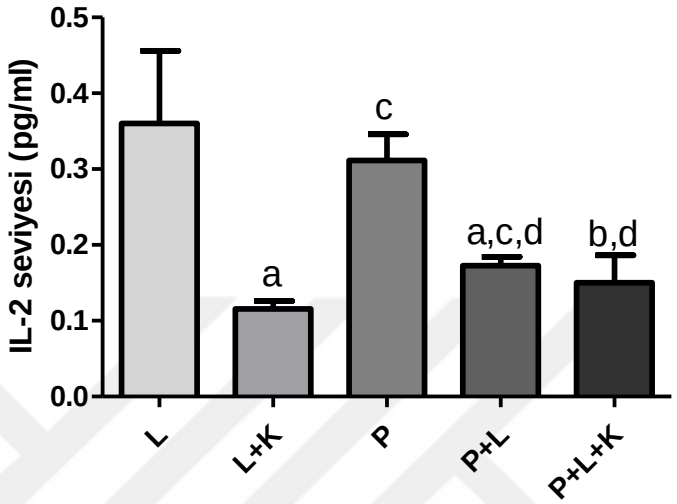
Şekil 4-23: Plazma interlökin-6 (IL-6) seviyesi (n=8). Sonuçlar ±SEM olarak ifade edildi. [a]p < 0,01 L grubuna göre, [b]p < 0,001 L grubuna göre, [c]p < 0,05 L+K grubuna göre, [d]p < 0,001 P grubuna göre, [e]p < 0,05 P+L grubuna göre.



Şekil 4-24: Plazma interlökin-5 (IL-5) seviyesi (pg/ml) (n=8). Sonuçlar ± SEM olarak ifade edildi. [a]p < 0,01 L grubuna göre, [b]p < 0,05 L grubuna göre.

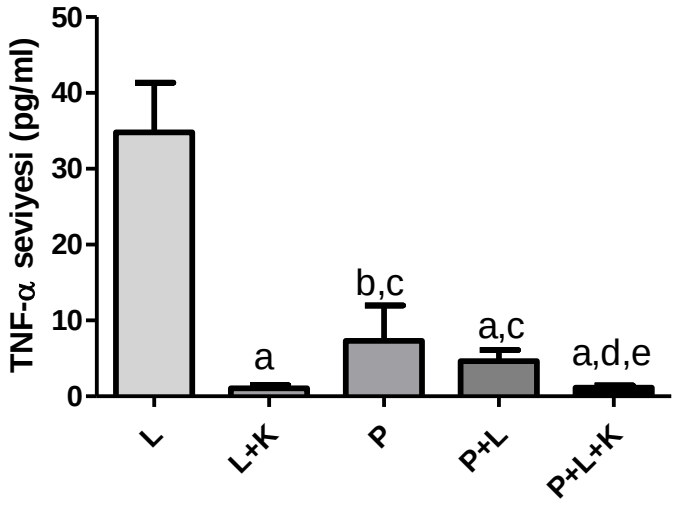
Tüm gruplar birbiriyle kıyaslandığında plazma IL-2 seviyesinin istatistiksel olarak çok ileri derecede anlamlı değişiklik gösterdiği saptandı (P < 0,001). L+K grubunda plazma IL-2 seviyesinin L grubuna göre anlamlı olarak azaldığı belirlendi (p < 0,001). Benzer

olarak P+L ve P+L+K gruplarının plazma IL-2 seviyesi de L grubuna kıyasla daha azdı ($p < 0,001$ ve $p < 0,01$, sırasıyla). P+L ve P+L+K gruplarının plazma IL-2 seviyelerinin P grubuna kıyasla istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı bir azalma gösterdiği saptandı ($p < 0,01$).



Şekil 4-25: Plazma interlökin-2 (IL-2) seviyesi (n=8). Sonuçlar ± SEM olarak ifade edildi. [a]p < 0,001 L grubuna göre, [b]p < 0,01 L grubuna göre, [c]p < 0,01 L+K grubuna göre, [d]p < 0,01 P grubuna göre.

Plazma TNF-α seviye tüm gruplar kıyaslandığında, çok ileri derecede anlamlı değişiklik gösterdiği bulundu ($p < 0,001$). Plazma TNF-α seviyesi L grubuna kıyasla L+K grubunda istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı olarak düştüğü gözlendi ($p < 0,01$). Plazma TNF-α seviyesi P, P+L ve P+L+K gruplarında da L grubuna kıyasla anlamlı olarak azalma gösterdi ($p < 0,05$, $p < 0,01$ ve $p < 0,01$, sırasıyla). P+L+K grubu P ve P+L grupları ile karşılaştırıldığında, P+L+K grubunun plazma TNF-α seviyesinin anlamlı olarak azaldığı tespit edildi ($p < 0,05$ ikisi için).

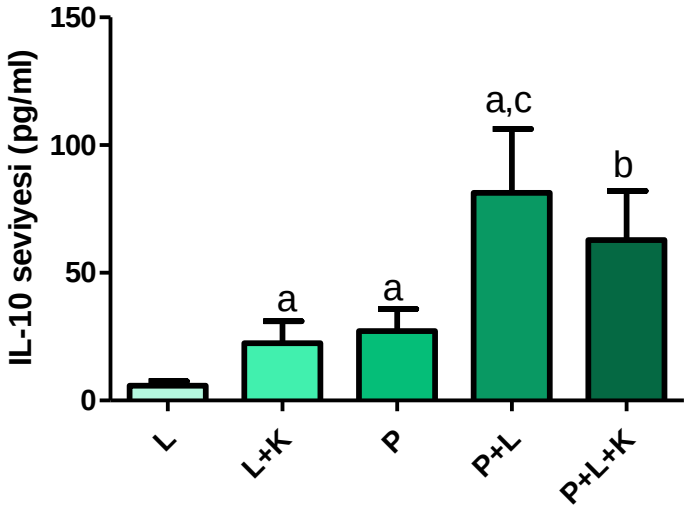


Şekil 4-26: Plazma tümör nekroz faktörü-alfa (TNF-α) seviyesi (n=8). Sonuçlar ±SEM olarak ifade edildi. [a]p < 0,01 L grubuna göre, [b]p < 0,05 L grubuna göre, [c]p < 0,05 L+K grubuna göre, [d]p < 0,05 P grubuna göre, [e]p < 0,05 P+L grubuna göre.

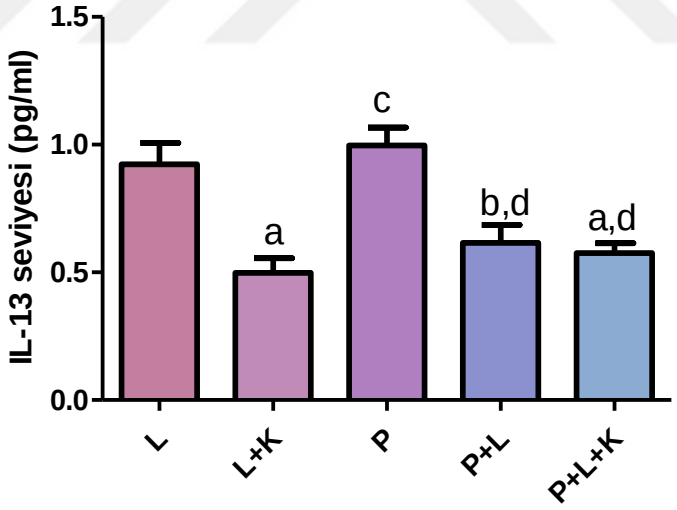
Plazma IL-10 seviyesinin de gruplar arasında istatistiksel olarak farklılık gösterdiği belirlendi ($p < 0,01$). P, P+L ve L+K gruplarının plazma IL-10 seviyeleri L grubuna kıyasla ileri derecede, P+L+K grubu ise çok ileri derecede anlamlı bir artış gösterdi ($p > 0,01$ ve $p > 0,001$). P+L ve P+L+K gruplarının plazma IL-10 seviyesi P grubuna göre anlamlı olmayan bir artış gösterdiği saptandı ($p > 0,05$).

Plazma IL-13 seviyesinin beş grup arasında çok ileri derecede anlamlı olarak değişiklik gösterdiği belirlendi ($p < 0,001$). L+K grubunda plazma IL-3 seviyesi L grubuna kıyasla düşüktü ($p < 0,01$). L ve P grupları plazma IL-13 seviyesi bakımından benzerdi. P grubunun IL-3 seviyesi L+K grubununkinden yüksekti ($p < 0.001$). P+L ve P+L+K gruplarında P grubuna kıyasla plazma IL-13 seviyesi ileri derecede anlamlı bir azalma gösterdi ($p < 0,01$).

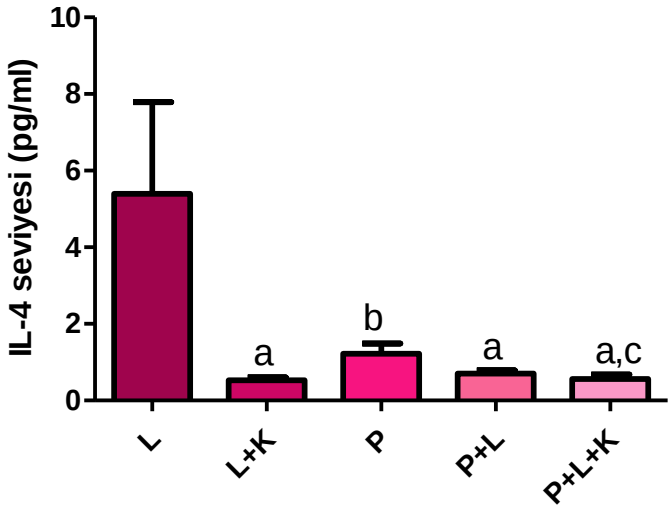
Deney grupları birbiri ile karşılaştırıldığında plazma IL-4 seviyesinde ileri derecede anlamlı bir değişiklik olduğu gözlendi ($p < 0,01$). L grubunun plazma IL-4 seviyesinin L+K, P ve P+L+K gruplarına kıyasla anlamlı olarak yüksek olduğu belirlendi ($p < 0,01$ tümü için). P grubuna kıyasla P+L grubunda plazma IL-4 seviyesinde anlamlı olmayan bir azalma varken, P+L+K grubunun IL-4 seviyesi istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldı ($p > 0,05$ ve $p < 0,05$, sırasıyla).



Şekil 4-27: Plazma interlökin-10 (IL-10) seviyesi (n=8). Sonuçlar ±SEM olarak ifade edildi. [a]p < 0,01 L grubuna göre, [b]p < 0,001 L grubuna göre, [c]p < 0,05 L+K grubuna göre.



Şekil 4-28: Plazma interlökin-13 (IL-13) seviyesi (n=8). Sonuçlar ± SEM olarak ifade edildi. [a]p < 0.01 L grubuna göre, [b]p < 0.05 L grubuna göre, [c]p < 0.001 L+K grubuna göre, [d]p < 0.01 P grubuna göre.



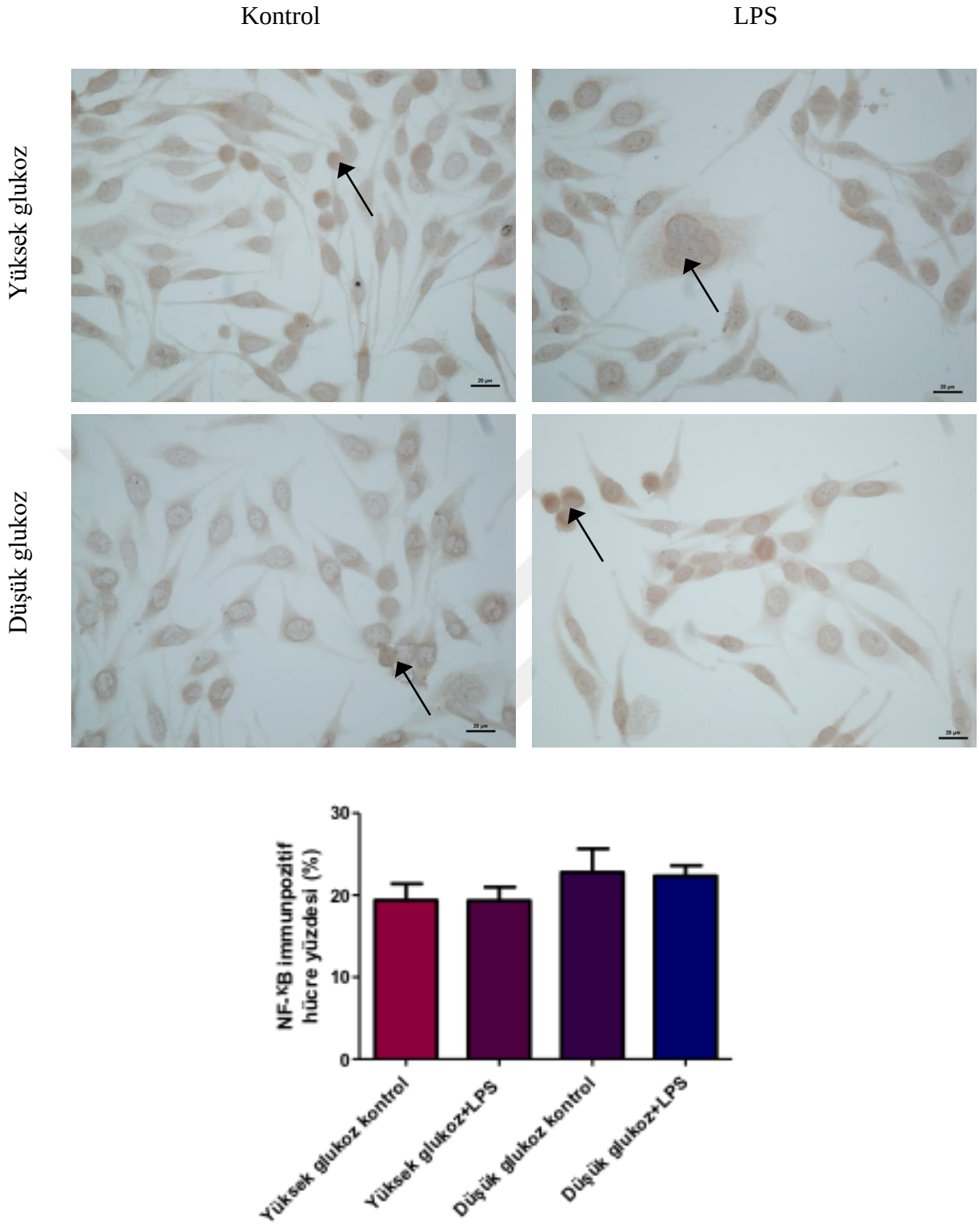
Şekil 4-29: Plazma interlökin-4 (IL-4) seviyesi (n=8). Sonuçlar ±SEM olarak ifade edildi. [a]p < 0,01 L grubuna göre, [b]p < 0,05 L+K grubuna göre, [c]p < 0,05 P grubuna göre.

4.6. *İn vitro* immünohistokimya bulguları

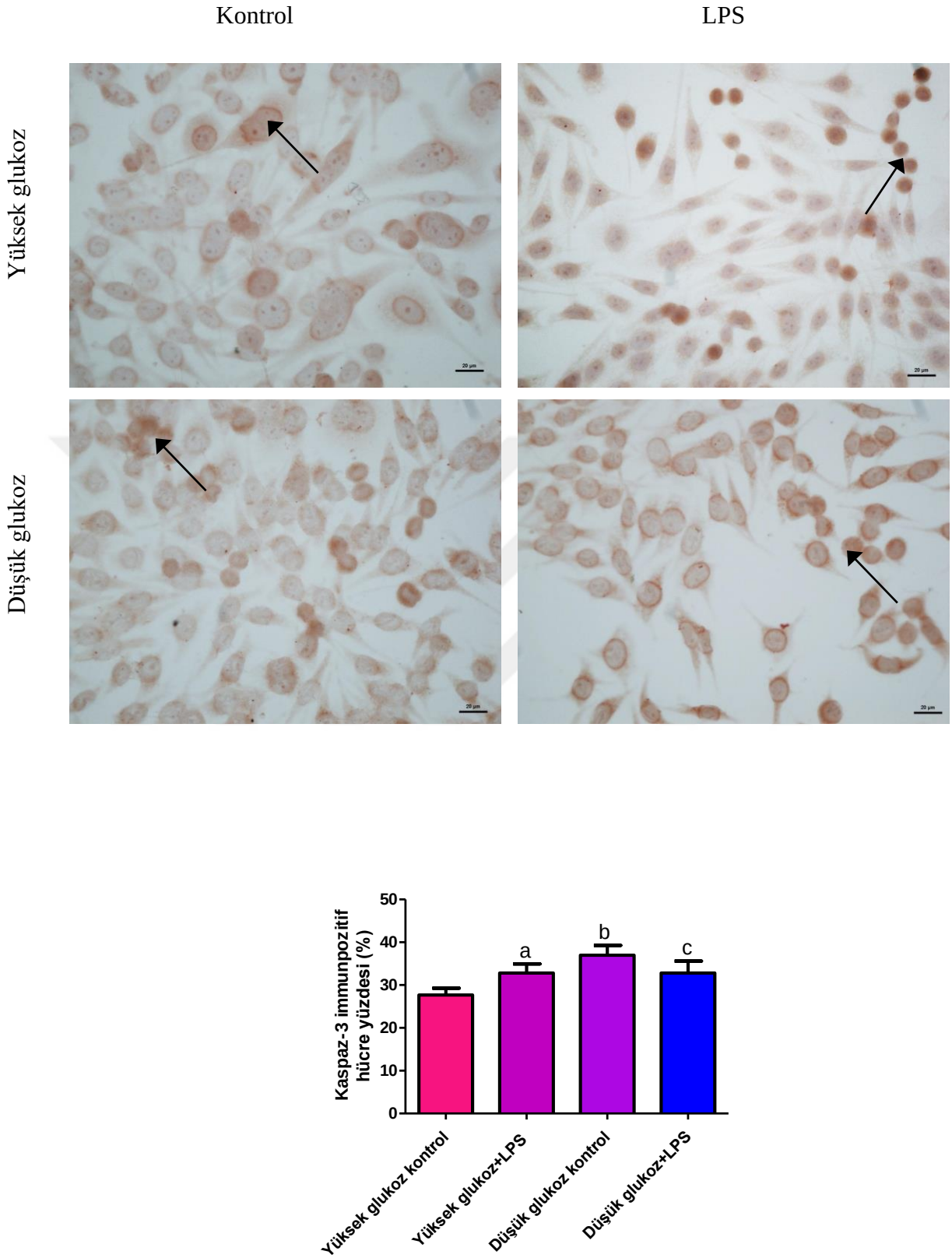
Düşük ve yüksek glukozlu besiyerinde Panc02 hücrelerine LPS (µg/ml) uygulamasının NF-κβ ve kaspaz-3 immünpozitif hücre yüzdesine etkisi şekil 4-30 ve 4-32'da gösterilmiştir.

NF-κβ immünpozitif hücre yüzdesine 4 grup arasında anlamlı bir değişiklik göstermedi ($p > 0,05$). Yüksek glukozlu besiyerlerinde LPS uygulanan grubun NF-κβ immünpozitif hücre yüzdesi uygulanmayan grup ile benzerdi. Bu durum düşük glukozlu besiyeri için de aynıydı. Fakat NF-κβ immünpozitif hücre yüzdesi düşük glukozlu besiyeri ortamında yüksek glukozlu besiyeri ortamına göre biraz fazla idi ($p > 0,05$).

Kaspaz-3 immünpozitif hücre yüzdesi gruplar arasında anlamlı farklılık gösterdi ($p < 0,05$). Yüksek glukozlu besiyerlerinde LPS uygulanan hücre grubunun kaspaz-3 immünpozitif hücre yüzdesi uygulanmayan gruba göre anlamlı bir artış gösterdi ($p < 0,05$). Düşük glukozlu ortamdaki hücrelerin kaspaz-3 immünpozitif hücre yüzdesi yüksek glukozlu besiyeri ortamındaki hücrelere kıyasla ileri derecede anlamlı olarak artış gösterdi ($p < 0,01$). Fakat, düşük glukoz LPS grubunun kaspaz-3 immünpozitif hücre yüzdesi düşük glukoz kontrol grubuna göre daha düşüktü ($p < 0,05$).



Şekil 4-30: Panc02 hücrelerinde nüklear faktör kappa beta (NF-κβ) immünpozitif hücreler (ok) (n=3). Streptavidin-biotin-peroksidaz tekniği, hematoksilen zıt boyama. Veriler ±SEM olarak ifade edildi.



Şekil 4-31: Panc02 hücrelerinde kaspaz-3 immünpozitif hücreler (ok) (n=3). Streptavidin-biotin-peroksidaz tekniği, hematoksilen zıt boyama. Veriler ±SEM olarak ifade edildi. [a]p < 0,05 Yüksek glukoz kontrol grubuna göre, [b]p < 0,01 Yüksek glukoz kontrol grubuna göre, [c]p < 0,05 Düşük glukoz kontrol grubuna göre.

5. TARTIŞMA

Pankreatik duktal adenokarsinom (PDAC) kemoterapide kullanılan farmakolojik ajanlara karşı oldukça dirençlidir. Bu nedenle PDAC hastalarının kötü olan sağkalım oranları son 40 yılda pek değişmemiştir (240, 241). Bu çalışmada Panc02 hücreleri kullanılarak PDAC subkutan tümör modeli oluşturulan C57BL/6 fareler üzerine artan doz LPS ve %40 kalori kısıtlamasının birlikte uygulamasının tedavi edici etkileri, *in vitro* kalori kısıtlama ve LPS uygulaması ile desteklenerek oksidatif stres, sağ kalım, apoptoz ve inflamasyon yolakları üzerinden moleküler yöntemler ile açıklanarak ilk kez gösterilmiştir.

Yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda bakteriyel LPS'nin prostat ve kolorektal kanser türleri gibi kanser hücrelerinin çoğalma ve göçünü teşvik ettiği rapor edilmiştir (242, 243). Bunun aksine, düşük dozda LPS uygulamasının tümörün ilerlemesini baskılayabileceğini savunan çalışmalar da bulunmaktadır (244, 245). Honda ve Inegawa (246) bir derleme çalışmalarında düşük doz LPS ile yüksek doz LPS'nin etkilerinden farklı olduğunu bildirmişlerdir. Düşük doz LPS'nin makrofajların farklı işlevlerini indükleyerek dokulardaki inflamatuar değişiklikleri düzenleyebileceğini ve böylece düşük doz LPS tedavisinin, kronik inflamasyonu önleyerek kanser ve otoimmün hastalıklar için terapilerin geliştirilmesinde faydalı olabileceğini önermişlerdir. Güncel bir çalışmada ise beş farklı polisakkarit bileşeninin meme kanser hücre soyundaki etkileri araştırılırken, makrofaj inflamasyonunu tetiklemek için *E.coli* LPS uygulaması yapılmıştır. LPS ile indüklenen makrofajlarda pro-inflamatuvar TNF-α, IL-6, IL-1β ve anti-inflamatuvar IL-10 sitokinlerinin salınımının istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı bildirilmiştir (247).

Kalori kısıtlamasının kanser dahil birçok hastalığı önlemede en etkili yöntemlerden biri olduğu düşünülmektedir. Pankreas kanserinde kalori kısıtlamasının doymuş yağ asitlerini doymamış yağ asitlerine çeviren enzimin aktivitesini düşürerek tümör mikro çevresinde diyete bağlı değişime ve böylece tümör büyümesinin baskılanmasına neden olduğu ileri sürülmüştür (248). Fare kanser modeli oluşturulan başka bir çalışmada orta dereceli %15 kronik kalori kısıtlamasının aralıklı olarak uygulanan kalori kısıtlamasına kıyasla daha etkili sonuç verdiği rapor edilmiştir (249). Lope ve ark. (250)'nın kadınlar üzerinde yaptıkları bir araştırmada, yüksek enerji alımı meme kanseri riskini artırırken, orta dereceli kalori kısıtlamasının koruyucu olabileceği

ve düzenli fiziksel aktivite ile birlikte meme kanserinin önlenmesi için iyi bir strateji olabileceği vurgulanmıştır. Lashinger ve ark. (251) çalışmalarında kalori kısıtlamasının PanIN lezyonlarının PDAC'ye ilerlemesini geciktirdiğini pankreas desmoplazisini ve metastazları azalttığını belirtmiştir. Mevcut çalışmada Panc02 hücreleri ile PDAC subkutan tümör modeli oluşturulan farelere artan düşük dozda LPS iki hafta boyunca %40 kalori kısıtlaması ile birlikte uygulandığında P+L+K grubunda P+L grubuna kıyasla tümör çapında önemli bir düşüşe sebep olduğu gözlendi. Tümör ağırlık ölçüm sonuçları da tümör çap sonuçlarına benzer olarak hem LPS hem de kalori kısıtlaması uygulanan grupta daha düşüktü. P+L+K grubu tümör doku kesitlerinde bağ doku azlığının anjiyogenezin azalmasına katkıda bulunduğu söylenebilir. Ayrıca kalori kısıtlamasının PDAC tümörünün gerilemesinde önemli bir rol oynadığını gösterdi. Pankreas ağırlık sonuçlarında ise P+L+K grubunda diğer gruplara kıyasla anlamlı olmayan hafif bir artış vardı. Tümör ağırlığının en az olduğu P+L+K grubunda pankreas ağırlık artışının olması tümörün ilerlemesinin bu grupta diğerlerine kıyasla daha az olduğunu düşündürdü. *İn vitro* çalışmamıza göre ise, düşük ve yüksek glukoz içerikli ortamda bulunan Panc02 hücrelerine 24 saat LPS muamelesi sonucunda LPS'nin aynı dozlarda uygulanmasının düşük glukoz ortamındaki Panc02 hücre sayısını yüksek glukoz ortamına kıyasla daha da düşürdüğü gözlendi. Ayrıca, 0 - 50 µg/ml arasında LPS konsantrasyonlarının uygulaması sonucunda en düşük hücre sayısı LPS'nin 10 µg/ml konsantrasyonda uygulanmasıyla elde edildi. Bu sonuçlar *in vivo* çalışmamız ile uyumlu olarak LPS'nin kalori kısıtlaması ile birlikte uygulanmasının tümör hücrelerinin çoğalmasını ve tümör gelişimini önlemede daha etkili olduğunu göstermektedir.

İnflamasyon, pankreas kanseri dahil birçok kanserin gelişiminde rol oynar. İnflamasyon, immünsupresif özelliklere sahip IL-4 ve IL-10 veya prokarsinojenik aktiviteye sahip IL-6 ve TNF-α gibi sitokinlerin üretimiyle sonuçlanır. Ayrıca NF-κβ, inflamasyon ve tümörigenez arasındaki bağlantıyı sağlar (252, 253). Yapılan bir çalışmada tümör hücreleri ve kanser ilişkili fibroblastların doğrudan etkileşimi ile çok çeşitli inflamatuvar modülatörlerin aktive olduğu ileri sürülmüştür (254).

NF-κβ yolaklarının PDAC gelişimi, ilerlemesi ve direncinde çok önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir (252). Pankreatik tümör hücreleri üzerine yapılan bir araştırma, U0126 ve kafeik asit fenetil ester (CAPE)'in MAPK ve NF-κβ hayatta kalma yolaklarının inhibisyonuna neden olduğunu ve apoptotik ölümü indüklemeden

pankreatik tümör hücresinin büyümesini inhibe ettiğini ortaya koymuştur (255). Bir derlemeye göre, tümör ilerlemesi sırasında NF-κβ'nin ikili bir işlevinin olduğu belirtilmiştir. Erken aşamalarda, NF-κβ'nin tümör büyümesini inhibe ettiğini ancak diğer mutasyonlar tümör baskılayıcı ekspresyonunda bir kayba yol açtıkça NF-κβ'nin onkojenik fonksiyonlarının serbest kalarak tümörigeneze aktif olarak katkıda bulunmasına neden olabileceği öne sürülmüştür (256). Mevcut çalışmada tümör dokusunda NF-κβ mRNA ekspresyonu sadece LPS verilen grupta herhangi bir farklılık oluşturmadı fakat LPS ile birlikte kalori kısıtlaması NF-κβ mRNA ekspresyonu biraz arttırdı. Benzer sonuçlar pankreas dokusunda görüldü. *İn vitro* uygulamamızda bu sonuçları destekler niteliktedir. LPS uygulanması aynı beslenme koşullarına sahip hücrelerde NF-κβ immünpozitif hücre yüzdesinde bir değişiklik göstermezken, düşük glukoz şartları hücrede NF-κβ immünpozitif hücre yüzdesinde az da olsa bir artışa neden oldu. NF-κβ mRNA ekspresyonu artan P+L+K grupta tümör çapı ve ağırlığının daha düşük olması, NF-κβ ekspresyon seviyesindeki artışın inflamasyonla ilişkili olup tümör küçültmesine katkısının olabileceğini göstermektedir.

Martins ve ark. (253) meme tümör modeli oluşturulan dişi köpekler üzerinde yaptıkları çalışmalarında tümörün ilerlemesi ile çoklu tümör yerleri, bol vaskülarizasyon ve metastazı olan hayvanlarda NF-*κ*β ekspresyonunun yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca araştırıcılar NF-*κ*β ekspresyonunun meme tümörlerinde IL-6 ve TNF-α ekspresyon seviyeleri ile pozitif ilişkili olduğunu göstermişlerdir. Bunun aksine, IL-4 ve IL-10'un daha yüksek seviyelerinin daha iyi prognoz özellikleriyle ilişkili olduğu ve TNF-α protein ekspresyonu ile hayatta kalma süresinin negatif, IL-4 ekspresyonu ile hayatta kalma süresinin pozitif korelasyon gösterdiği öne sürülmüştür. Chen ve ark. (257) PDAC hücrelerinde M2 makrofajları tarafından TLR4/TRIF/NF-κβ sinyalleşmesi yoluyla IL-1β salınımının indüklendiğini ve artan IL-1β'nın da epitelyal-mezenkimal geçişi uyararak PDAC hücrelerinin metastazını teşvik ettiğini bildirmişlerdir. Balkan ve ark. (258)'nın hepatosellüler karsinoma hücre hattı olan HepG2 hücrelerine IL-6 uygulamasının kaspaz aktivasyonu üzerine etkilerini araştırdıkları çalışmalarında, IL-6 uygulamasının HepG2 hücrelerinde ekstrinsik apoptotik yolak üzerinden apoptozu indüklediğini ileri sürmüşlerdir. Çalışmada tümör IL-6 mRNA seviyesi LPS verilmesiyle artarken hem LPS hem de kalori kısıtlaması ile daha da artış gösterdi. Pankreas IL-6 mRNA ekspresyon seviyesinde de L grubuna göre daha düşük olan P grubu P+L grubunda daha yüksekti ve

bu seviye P+L+K grubunda daha da arttı. Pankreas IL-6 mRNA sonuçları ile IL-6 immünpozitif hücre sayısı bulguları paraleldi. Bununla birlikte hücre proliferasyon belirteci olan PCNA'nın immünohistokimya bulgularına göre, PCNA immünpozitif hücre sayısının P+L ve P+L+K gruplarında P grubuna göre daha düşük olduğu saptandı. Balkan ve ark. (258)'larının çalışmasıyla uyumlu olarak, IL-6 ekspresyon seviyesindeki artışın hücre proliferasyonu ile zıt olduğu belirlendi. Böylece, LPS ve kalori kısıtlamasının IL-6 ekspresyon seviyesi üzerinden hücre proliferasyonunu azaltıcı etkisi olduğunu söyleyebiliriz.

JNK1$^{-/-}$ knockout ve sağlıklı farelere K399 hücre soyu enjekte edilerek oluşturulan PDAC modelinde tümör çap ölçümlerinin JNK1$^{-/-}$ knockout farelerde önemli ölçüde daha düşük olduğu rapor edildi. Aynı çalışmada JNK aktivasyonunun, sadece tümör hücrelerinde değil, aynı zamanda tümör stromasında, özellikle fibroblastlarda pankreas tümörünün ilerlemesini desteklemek için önemli olduğunu bildirilmiştir (259). Sato ve ark. (259)'nın çalışmasına benzer olarak, ERK1/2 ve JNK sinyal yolaklarının insan pankreas kanseri hücrelerinin çoğalmasını ve büyümesini arttırdığı rapor edilmiştir (260). Zhang ve ark. (261)'nın bulgularına göre ise moscatilin pankreas kanser hücrelerinde ROS oluşumunu arttırır ve böylece Bax/Bcl2 oranını modüle eden JNK/Stresle Aktifleşen Protein Kinaz (SAPK) yolunu aktive eder ve bunun sonucunda da kaspaz bağımlı mitokondriyal apoptotik yolağı aktif hale geçer. Dhanasekaran ve Reddy (262)'de JNK'ların, nekroptoz, ferroptoz, piroptoz ve otofaji dahil olmak üzere apoptotik ve apoptotik olmayan programlanmış hücre ölüm mekanizmalarında rol oynadığı ve JNK'lerin tümörijenik düzenleyici işlevlerinin çoğunun bu programlanmış hücre ölüm mekanizmaları yolakları ile ilişkili olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Çalışmamızda, LPS ve kalori kısıtlamasının birlikte uygulandığı grupta tümör JNK mRNA seviyesinin P+L grubuna göre arttığı gözlendi. Fakat pankreas JNK ekspresyon seviyesi P+L+K grubunda P+L grubuna göre 1,15 kat azalma gösterdi. Bu durum, farelere uygulanan artan doz LPS ve kalori kısıtlamasının çeşitli hücre ölüm yolları ile öncelikle tümör hücrelerini hedeflemesinden dolayı olabilir. Aynı zamanda bu tedavinin inflamasyonu JNK üzerinden baskıladığı görülmektedir.

Babic ve ark. (263)'nın 446 pankreas kanseri hasta üzerinde yaptıkları klinik bir araştırmanın sonuçlarına göre; dolaşımdaki inflamatuar sitokin düzeylerinin artması, pankreas kanserli hastaların sağkalımının önemli ölçüde azalması ile ilişkilidir.

Prospektif bir çalışma teşhis öncesi plazma C-reaktif protein (CRP), IL-6 ve TNF-αR2 seviyelerinin pankreas kanseri riski ile ilişkili olmadığını ortaya koymaktadır (264). Ramsey ve ark. (265)'nın çalışmasına göre, dolaşımdaki IL-6 seviyeleri ilerlemiş kanser evresi ile ilişkilidir. Kruger ve ark. (266) 131 siyah Güney Afrika'lı PDAC ve benign kontrol hastaları üzerinde 38 sitokinin plazma seviyelerini ölçtükleri çalışmalarında, IFN-γ, IL-4, IL-5, IL-15 ve IL-17 seviyelerinin PDAC grubunda azaldığını bunun aksine IL-8, CXCL10 (IP-10) ve MIP-1β arttığını, IL-2, IL-6, IL-7, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-21, IL-22 ve IL-23 seviyelerinin ise değişiklik göstermediğini rapor etmişlerdir. Piro ve ark. (267) çalışmalarında rezektabl PDAC hastalarında 23 sitokinin preoperatif ekspresyon düzeylerinin sağ kalım için öngörücü olup olmayacağını araştırmışlar ve TH2 sitokinleri IL-4, IL-5, IL-6'nın cerrahi öncesi yüksek plazma seviyelerinin ve TH1 sitokin TNF-α ve IFN-γ düşük plazma seviyelerinin, en kötü hastaların sonuçlarıyla önemli ölçüde ilişkili olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca, araştırmacılar TH2 immün yanıtının dolaşımdaki belirteçlerinin, özellikle IL-4'ün, rezektabl PDAC hastalarında erken metastatik relaps ve kötü prognoz için öngörücü olabileceğini ve böylece gereksiz rezeksiyonu önleyebileceğini vurgulamışlardır. Yapılan çalışmalar dolaşımdaki inflamatuar sitokin düzeylerinin PDAC hastalarında hala tartışmalı olduğunu göstermektedir. Çalışmamızda da, tümör modeli oluşturulan farelerin plazma IL-5 ve TNF-α seviyelerinin oluşturulmayanlara göre azaldığını buna karşın IL-10 seviyesinin arttığını saptadık. LPS'nin yalnızca pro-inflamatuvar sitokinleri değil, anti-inflamatuvar sitokinleri de aktive ettiği bilinmektedir. Buna göre, plazma sitokin seviyelerinin tümör evresine göre değişebileceğini ve kesin bir belirteç olamayacağını söyleyebiliriz.

Aşırı ROS üretimi oksidatif strese neden olduğu gibi proinflamatuar sitokin ekspresyonunu indükler (268, 269). Bunun tersine Matsuda ve ark. (270) inflamasyonun pankreas dokusundaki oksidatif stresi aktive ettiği ve böylece PDAC'da tümörigeneze hassasiyet kazandırdığı ileri sürmüşlerdir. ROS'un, proliferasyon, apoptoz ve tümör hücrelerinin invazyonunun düzenlenmesindeki yolakları etkileyerek tümörün ilerlemesini ve saldırganlığını etkinleştirebileceği öne sürülmüştür. Böylece, farklı kanser türlerinde tümör büyümesini inhibe etmek için oksidatif stresin inhibisyonunun hedef olabileceği belirtilmiştir (269). Bunun aksine, Mohammed ve ark. (271) artmış oksidatif stresi ve aynı zamanda antioksidan kapasiteyi bozmanın PDAC için etkili bir terapötik yaklaşım olabileceğini önermişleridir.

Kolorektal kanserli 50 ve sağlıklı 40 hasta üzerinde yapılan bir çalışmada, kontrol grubuna kıyasla kolorektal kanserli hastaların serumunda SOD aktivitesi daha yüksek iken, CAT aktivitesinin daha düşük olduğu bildirilmiştir. Plazma GSH ve MDA seviyeleri kolorektal kanserli hastalara kıyasla sağlıklı bireylerde daha yüksek olduğu rapor edildi. Bunlara ek olarak kolorektal kanser hastalarında değerlendirilen tüm protein modifikasyon belirteçlerinin (ileri glikasyon son ürünleri; AGE'ler, ileri oksidasyon protein ürünleri; AOPP), kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde daha yüksek olduğu belirtilmiştir. Araştırmacılar ayrıca yaptıkları alıcı işletim karakteristik (ROC) analiz sonucunda CAT ve MDA'nın tümör invazyon derinliğini veya lenf nodu metastaz varlığını gösteren potansiyel invazif olmayan biyobelirteçler olabileceğini önermişlerdir (272). Bu çalışmayla uyumlu olarak Lepara ve ark. (273)'da çalışmalarında, serum MDA seviyesinin mesane kanseri tanısında ve ilerlemesinin izlenmesinde bir biyobelirteç olarak önemli bir rol oynayabileceğini rapor etmiştir. 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) uygulanarak oluşturulan sıçan meme kanseri modelinde, hem doku hem de plazmada MDA seviyesinin kontrol grubuna kıyasla arttığı, bunun aksine doku ve eritrosit GSH seviyelerinin ise azaldığı bildirilmiştir (274). Çalışmamızda, tümör dokusunda SOD ve CAT aktivitelerinde LPS tedavisinin ve kalori kısıtlamasının birlikte uygulandığı grupta diğer gruplara göre biraz anlamsız artış vardı bununla birlikte GSH, MDA ve PCO seviyeleri de değişmedi. Pankreas dokusunda ise MDA ve PCO seviyeleri P+L+K grubunda, P grubuna göre daha yüksekti. Benzer olarak GSH seviyesi ve GST, GP-X ve CAT aktiviteleri de P+L+K grubunda yüksekti. Bulgular, PCNA immünpozitif hücre sayısı ile uyumlu olarak, uygulanan ikili tedavinin, oksidatif stresi arttırarak hücreleri ölüme yönlendirdiğini düşündürmektedir. Ayrıca, artmış oksidatif stresle birlikte antioksidan enzimlerde artış olması, sağlıklı hücrelerin korunması için ikili tedavinin daha uygun olduğunu göstermektedir.

İn vitro koşullarda Panc02 hücrelerine yüksek glukoz + LPS grubunun kaspaz-3 immünpozitif hücre yüzdesi, düşük glukoz + LPS grubu ile benzerlik gösterdi. Bu durum, yalnızca kalori kısıtlamasının uygulanmasının hücre ölümünü teşvik etmek için yeterli olmayacağını göstermektedir.

Tüm bulgular değerlendirildiğinde;

- Pankreas adenokarsinom modeli ve Panc02 hücrelerinde M1 makrofaj göstergesi olan pro-inflamatuvar sitokin IL-6 ekspresyon seviyelerinin artışının tek başına LPS tedavisine kıyasla ikili tedavide NF-κβ üzerinden tümör büyümesini azalttığını ayrıca IL-6 ekspresyon seviyesindeki artış ile hücre çoğalması arasında negatif ilişki bulunması, LPS ve kalori kısıtlamasının IL-6 ekspresyon seviyesi üzerinden hücre çoğalmasına azaltıcı etki yaptığını söyleyebiliriz.

- Plazma TNF-α ekspresyon seviyelerinin gruplar arasındaki değişimi ile PCNA çoğalma belirteci arasında pozitif ilişki pankreas tümör inhibisyonunu desteklemektedir.

- M2 makrofaj farklılaşmasında önemli anti-inflamatuvar olan IL-10 protein seviyesinin LPS ve kalori kısıtlamasının birlikte uygulanan grupta artışı tümör büyümesi ve hastalığın seyrinde LPS'den çok kalori kısıtlamasının önemini göstermektedir.

- Pankreas kanser hücrelerinde ROS oluşumunun ve plazma inflamatuar sitokin düzeylerinin artmasının sağ kalım ile ilişkili olması nedeni ile pankreas adenokarsinom modelinde birlikte değerlendirilmelerinin uygun olacağını söyleyebiliriz.

Sonuç olarak LPS ve kalori kısıtlamasının birlikte uygulanmasının PDAC modeli oluşturulan farelerin pankreası üzerindeki etkisinin yalnız LPS uygulamasına göre daha güçlü terapötik etki gösterdiğini söyleyebiliriz. Bu birlikte uygulamanın tümörün çoğalmasını önleyebileceğini düşünmekteyiz.

Çalışmamızın sınırlılıkları, kullanılan hayvanlardaki pankreas dokusunun yeterli olmayışından dolayı daha fazla oksidatif belirteçlerin tespiti yapılamaması ve yine plazma seviyesindeki eksiklik nedeniyle kalori kısıtlamasının desteklenmesi için düşünülen pankreas hormon seviyelerinin ölçülememesidir.

Bu çalışmanın bir sonraki aşamasında LPS ve kalori kısıtlamasının Panc02 C57BL-6 fare modelinde ikili tedavi olarak uzun dönem uygulasının pankreatik hücrelerdeki hücre ölüm yolaklarının moleküler mekanizması üzerindeki etkilerinin araştırılması bu konuya katkıda bulunacaktır.

KAYNAKLAR

1. McGuigan A. Kelly P. Turkington RC. Jones C. Coleman HG. ve McCain RS. Pancreatic cancer: A review of clinical diagnosis, epidemiology, treatment and outcomes. *World J Gastroenterol* 2018; **24(43):** 4846-4861.

2. Li KY. Yuan JL. Trafton D. Wang JX. Niu N. Yuan CH. ve ark. Pancreatic ductal adenocarcinoma immune microenvironment and immunotherapy prospects. *Chronic Dis Transl Med* 2020; **6(1):** 6-17.

3. Zhou F. Yang J. Zhang Y. Liu M. Lang ML. Li M. ve ark. Local phototherapy synergizes with immunoadjuvant for treatment of pancreatic cancer through induced immunogenic tumor vaccine. *Clin Cancer Res* 2018; **24(21):** 5335-5346.

4. Ghaneh P. Costello E. ve Neoptolemos JP. Biology and management of pancreatic cancer. *Gut* 2007; **56:** 1134-1152.

5. Feldmann G. Beaty R. Hruban RH. ve Maitra A. Molecular genetics of pancreatic intraepithelial neoplasia. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2007; **14:** 224-232.

6. Amuel N. ve Hudson TJ. The molecular and cellular heterogeneity of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2011; **9:** 77–87.

7. Storz P. Acinar cell plasticity and development of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2017; **14(5):** 296-304.

8. Habbe N. Shi G. ve Meguid RA. Spontaneous induction of murine pancreatic intraepithelial neoplasia (mPanIN) by acinar cell targeting of oncogenic Kras in adult mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; **105:** 18913–18918.

9. Gupta S. Prajapati A. Gulati M. Gautam S. Kumar S. ve Dalal V. Irreversible and sustained upregulation of endothelin axis during oncogene-associated pancreatic inflammation and cancer. *Neoplasia* 2020; **22(2):** 98–110.

10. Soldano S. Pizzorni C. ve Paolino S. Alternatively activated (M2) macrophage phenotype is inducible by endothelin-1 in cultured human macrophages. *PLoS One* 2016; **11(11):** e0166433.

11. Midha S. Chawla S. ve Garg PK. Modifiable and non-modifiable risk factors for pancreatic cancer: A review. *Cancer Lett* 2016; **381:** 269–277.

12. Mohammed S. Van Buren G. ve Fisher WE. Pancreatic cancer: advances in treatment. *World J Gastroenterol* 2014; **20:** 9354-9360.

13. Corbett TH. Roberts BJ. Leopold WR. Peckham JC. Wilkoff LJ. Griswold DP. Jr ve ark. Induction and chemotherapeutic response of two transplantable ductal adenocarcinomas of the pancreas in C57BL/6 mice. *Cancer Res* 1984; **44(2):** 717-726.

14. Wang P. Li X. ve Wang J. Re-designing Interleukin-12 to enhance its safety and potential as an anti-tumor immunotherapeutic agent. *Nat Commun* 2017; **8:** 1395.

15. Basso D. ve Plebani M. Cytokines and exocrine pancreatic cancer: is there a link? *JOP J Pancreas* 2016; **1:** 19–23.

16. Collignon A. Silvy F. Robert S. Trad M. Germain S. Nigri J. ve ark. Dendritic cell-based vaccination: powerful resources of immature dendritic cells against pancreatic adenocarcinoma. *Oncoimmunology* 2018; **7(12):** e1504727.

17. Zhang J. Wolfgang CL. ve Zheng L. Precision immuno-oncology: prospects of individualized immunotherapy for pancreatic cancer. *Cancers (Basel)* 2018; **10(2):** 39.

18. Fan JQ. Wang MF. Chen HL. Shang D. Das JK. ve Song J. Current advances and outlooks in immunotherapy for pancreatic ductal adenocarcinoma. *Mol Cancer* 2020; **19(1):** 32.

19. Sarantis P. Koustas E. Papadimitropoulou A. Papavassiliou AG. ve Karamouzis MV. Pancreatic ductal adenocarcinoma: Treatment hurdles, tumor microenvironment and immunotherapy. *World J Gastrointest Oncol* 2020; **12(2):** 173-181.

20. Mace TA. Shakya R. Pitarresi JR. Swanson B. McQuinn CW. Loftus S. ve ark. IL-6 and PD-L1 antibody blockade combination therapy reduces tumour progression in murine models of pancreatic cancer. *Gut* 2018; **67(2):** 320-332.

21. Allen KN. ve Imperiali B. Structural and mechanistic themes in glycoconjugate biosynthesis at membrane interfaces. *Curr Opin Struct Biol* 2019; **59:** 81-90.

22. Brown GC. The endotoxin hypothesis of neurodegeneration. *J Neuroinflammation* 2019; **16(1):** 180.

23. Sood AK. Burbank AJ. Duran CG. Enders K. Zhou H. Peden DB. ve ark. Gamma tocopherol effect on LPS-induced sputum neutrophilia is not modified by BMI or GSTM1 genotype. *J Allergy Clin Immunol* 2019; **143:** 1937–1939.

24. Tang Y. Wang C. Wang Y. Zhang J. Wang F. Li L. ve ark. Isoliquiritigenin attenuates LPS-induced AKI by suppression of inflammation involving NF- κB pathway. *Am J Transl Res* 2018; **10:** 4141–4151.

25. Auer GK. ve Weibel DB. Bacterial cell mechanics. *Biochemistry* 2017; **56(29):** 3710- 3724.

26. Lee JW. Park S. Han HK. Um SH. ve Moon EY. Polarized macrophages treated with nonylphenol differently regulate lipopolysaccharide-induced sepsis. *Environ Toxicol* 2016; **31(12):** 2081-2089.

27. Gomes JMG. Costa JA. ve Alfenas RCG. Metabolic endotoxemia and diabetes mellitus: A systematic review. *Metab Clin Exp* 2017; **68:** 133-144.

28. Oliveira J. ve Reygaert WC. *Gram negative bacteria.* StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2019. Erişim 10.07.2019, [http://www.ncbi.nlm. nih.gov/books /NBK538213/].

29. Morris MC. Gilliam EA. ve Li L. Innate immune programming by endotoxin and its pathological consequences. *Front Immunol* 2015; **5:** 680.

30. Wynn JL. ve Wong HR. Pathophysiology and treatment of septic shock in neonates. *Clin Perinatol* 2010; **37(2):** 439-479.

31. Osipov A. Murphy A. ve Zheng L. From immune checkpoints to vaccines: the past, present and future of cancer immunotherapy. *Adv Cancer Res* 2019; **143:** 63–144.

32. Feig C. Gopinathan A. Neesse A. Chan DS. Cook N. ve Tuveson DA. The pancreas cancer microenvironment. *Clin Cancer Res* 2012; **18(16):** 4266-4276.

33. Patel SP. ve Kurzrock R. PD-L1 Expression as a predictive biomarker in cancer immunotherapy. *Mol. Cancer Ther* 2015; **14:** 847–856.

34. Feig C. Jones JO. Kraman M. Wells RJ. Deonarine A. Chan DS. ve ark. Targeting CXCL12 from FAP-expressing carcinoma-associated fibroblasts synergizes with anti-PD-L1 immunotherapy in pancreatic cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; **110(50):** 20212-20217.

35. Church DN. Stelloo E. Nout RA. Valtcheva N. Depreeuw J. ter Haar N. ve ark. Prognostic significance of POLE proofreading mutations in endometrial cancer. *J Natl Cancer Inst* 2014; **107(1):** 402.

36. Shang B. Liu Y. Jiang S. ve Liu Y. Prognostic value of tumor-infiltrating FoxP3+ regulatory T cells in cancers: A systematic review and meta-analysis. *Sci Rep* 2015; **5:** 15179.

37. Fridman WH. Pagès F. Sautès-Fridman C. ve Galon J. The immune contexture in human tumours: Impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer* 2012; **12:** 298–306.

38. Galon J. Costes A. Sanchez-Cabo F. Kirilovsky A. Mlecnik B. Lagorce-Pagès C. ve ark. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 2006; **313:** 1960–1964.

39. Tsujikawa T. Kumar S. Borkar RN. Azimi V. Thibault G. Chang YH. ve ark. Quantitative multiplex immunohistochemistry reveals myeloid-inflamed tumor-immune complexity associated with poor prognosis. *Cell Rep* 2017; **19:** 203–217.

40. Zhang L. Conejo-Garcia JR. Katsaros D. Gimotty PA. Massobrio M. Regnani G. Makrigiannakis A. ve ark. Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med* 2003; **348:** 203-213.

41. Castejón M. Plaza A. Martinez-Romero J. Fernandez-Marcos PJ. Cabo R. ve Diaz-Ruiz A. Energy restriction and colorectal cancer: A call for additional research. *Nutrients* 2020; **12(1):** 114.

42. Kuhla A. Lange S. Holzmann C. Maass F. Petersen J. Vollmar B. ve ark. Lifelong caloric restriction increases working memory in mice. *PLoS One* 2013; **8(7):** e68778.

43. Varlamov O. Western-style diet, sex steroids and metabolism. *Biochim et Biophys Acta (BBA)-Mol Basis Dis* 2017; **1863:** 1147–1155.

44. Waldman M. Nudelman V. Shainberg A. Zemel R. Kornwoski R. Aravot D. ve ark. The role of heme oxygenase 1 in the protective effect of caloric restriction against diabetic cardiomyopathy. *Int J Mol Sci* 2019; **20(10):** 2427.

45. Xu X. Cai G. Bu R. Wang W. Bai W. Sun X. ve ark. Beneficial effects of caloric restriction on chronic kidney disease in rodent models: A meta-analysis and systematic review. *PLoS One* 2015; **10(12):** e0144442.

46. Fontana L. ve Klein S. Aging, adiposity, and calorie restriction. *JAMA* 2007; **297:** 986–994.

47. Velingkaar N. Mezhnina V. Poe A. Makwana K. Tulsian R. ve Kondratov RV. Reduced caloric intake and periodic fasting independently contribute to metabolic effects of caloric restriction. *Aging Cell* 2020; **19(4):** e13138.

48. Yamada K. Takizawa S. Ohgaku Y. Asami T. Furuya K. Yamamoto K. ve ark. MicroRNA 16-5p is upregulated in calorie-restricted mice and modulates inflammatory cytokines of macrophages. *Gene* 2020; **725:** 144191.

49. Messaoudi I. Fischer M. Warner J. Park B. Mattison J. Ingrami NK. ve ark. Optimal window of caloric restriction onset limits its beneficial impact on T-cell senescence in primates. *Aging Cell* 2008; **7:** 908–919.

50. Wright H. Handu M. Jankeel A. Messaoudi I. ve Varlamov O. Short-term caloric restriction attenuates obesity-induced pro-inflammatory response in male rhesus macaques. *Nutrients* 2020; **12(2):** 511.

51. Harvey AE. Lashinger LM. Otto G. Nunez NP. ve Hursting SD. Decreased systemic IGF-1 in response to calorie restriction modulates murine tumor cell growth, nuclear factor-κB activation, and inflammation-related gene expression. *Mol Carcinog* 2013; **52:** 997–1006.

52. Kannen V. Fernandes CR. Stopper H. Zanette DL. Ferreira FR. Frajacomo FT. ve ark. Colon preneoplasia after carcinogen exposure is enhanced and colonic serotonergic system is suppressed by food deprivation. *Toxicology* 2013; **312:** 123–131.

53. Wheatley KE. Williams EA. Smith NC. Dillard A. Park EY. Nunez NP. ve ark. Low-carbohydrate diet versus caloric restriction: effects on weight loss, hormones, and colon tumor growth in obese mice. *Nutr Cancer* 2008; **60(1):** 61-8.

54. Zhou Q. ve Melton DA. Pancreas regeneration. *Nature* 2018; **557(7705):** 351-358.

55. Kierszenbaum AL. ve Tres LL. *Histology and cell biology: An introduction of pathology.* 3th edition. Elsevier; 2011.

56. Gray H. ve Lewis WH. *Gray's anatomy of the human body.* 30th edition; 2000.

57. Monti V. Carlson JJ. Hunt SC. ve Adams TD. Relationship of ghrelin and leptin hormones with body mass index and waist circumference in a random sample of adults. *J Am Diet Assoc* 2006; **106(6):** 822-828.

58. Yıldırım M. *İnsan anatomisi.* Nobel Tıp Yayınevi; 2005.

59. *Anatomy Medicine.* Erişim 10.09.2020, [https://anatomy-medicine.com/digestive-system/33-the-pancreas.html].

60. Motta PM. Macchiarelli G. Nottola SA. ve Correr S. Histology of the exocrine pancreas. *Microsc Res Tech* 1997; **37(5-6):** 384-398.

61. Baskin DG. A historical perspective on the identification of cell types in pancreatic islets of Langerhans by staining and histochemical techniques. *J Histochem Cytochem* 2015; **63(8):** 543-558.

62. Gardner DG. *Greenspan temel ve klinik endokrinoloji*. 9. Baskı, Lange; 2019.

63. Andralojc KM. Mercalli A. Nowak KW. Albarello L. Calcagno R. Luzi L. ve ark. Ghrelin-producing epsilon cells in the developing and adult human pancreas. *Diabetologia* 2009; **52(3):** 486-493.

64. Vasseur R. Skrypek N. Duchêne B. Renaud F. Martínez-Maqueda D. Vincent A. ve ark. The mucin MUC4 is a transcriptional and post-transcriptional target of K-ras oncogene in pancreatic cancer. Implication of MAPK/AP-1, NF-κB and RalB signaling pathways. *Biochim Biophys Acta* 2015; **1849(12):** 1375-1384.

65. Shen Z. Tian L. ve Wang X. Treatment of pancreatic head cancer with obstructive jaundice by endoscopy ultrasonography-guided gastrojejunostomy: A case report and literature review. *Medicine (Baltimore)* 2018; **97(28):** e11476.

66. Jemal A. Bray F. Center MM. Ferlay J. Ward E. ve Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011; **61(2):** 69-90.

67. Whittle MC. Izeradjene K. Rani PG. Feng L. Carlson MA. DelGiorno KE. ve ark. RUNX3 controls a metastatic switch in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cell* 2015; **161:** 1345-1360.

68. Ellermeier J. Wei J. Duewell P. Hoves S. Stieg MR. Adunka T. ve ark. Therapeutic efficacy of bifunctional siRNA combining TGF-β1 silencing with RIG-I activation in pancreatic cancer. *Cancer Res* 2013; **73(6):** 1709-1720.

69. [https://teachmephysiology.com/immune-system/cells-immune-system/t-cells/].

70. Tirado CA. Shabsovich DS. Ji J. ve Dawson D. Pancreatic tumors: an overview. published in atlas of genetics and cytogenetics in oncology and haematology; 2014.

71. Jones S. Zhang X. Parsons DW. Lin JC. Leary RJ. Angenendt P. ve ark. Cor signaling pathways in human pancreatic cancer revealed by global genomic analyses. *Science* 2008; **321(5897):** 1801-1806.

72. Heßmann E. Baumgart S. Chen N. Singh S. Singh G. König A. ve ark. The molecular frame of pancreatic carcinogenesis (2014). Erişim 08.08.2020. [https://cdn.intechopen.com/pdfs/46391.pdf.].

73. Massagué J. TGFbeta in cancer. *Cell* 2008; **134(2):** 215-230.

74. Shevach EM. Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity* 2009; **30(5):** 636-645.

75. Yang L. Pang Y. ve Moses HL. TGF-beta and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression. *Trends Immunol* 2010; **31(6):** 220-227.

76. Wolpin BM. Chan AT. Hartge P. Chanock SJ. Kraft P. Hunter DJ. ve ark. ABO blood group and the risk of pancreatic cancer. *J Natl Cancer Inst* 2009; **101(6):** 424-431.

77. Wolpin BM. Kraft P. Gross M. Helzlsouer K. Bueno-de-Mesquita HB. Steplowski E. ve ark. Pancreatic risk and ABO blood group alleles: results from the pancreatic cancer cohort consortium. *Cancer Res* 2010; **70(3):** 1015-1023.

78. *International Agency for Research on Cancer,* World Health Organization. Global Cancer Observatory 2018, Erişim 10.08.2020, [http://gco.iarc.fr/].

79. Memba R. Duggan SN. Ni Chonchubhair HM. Griffin OM. Bashir Y. O'Connor DB. ve ark. The potential role of gut microbiota in pancreatic disease: A systematic review. *Pancreatology* 2017; **17:** 867–874.

80. Huxley R. Ansary-Moghaddam A. Berrington de González A. Barzi F. ve Woodward M. Type-II diabetes and pancreatic cancer: a meta-analysis of 36 studies. *Br J Cancer* 2005; **92:** 2076–2083.

81. Grote VA. Rohrmann S. Nieters A. Dossus L. Tjønneland A. Halkjær J. ve ark. Diabetes mellitus, glycated haemoglobin and C-peptide levels in relation to pancreatic cancer risk: a study within the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) cohort. *Diabetologia* 2011; **54:** 3037–3046.

82. Guo Y. Liu W. ve Wu J. Helicobacter pylori infection and pancreatic cancer risk: A meta-analysis. *J Cancer Res Ther* 2016; **12:** C229–C232.

83. El-Serag HB. Engels EA. Landgren O. Chiao E. Henderson L. Amaratunge HC. ve ark. Risk of hepatobiliary and pancreatic cancers after hepatitis C virus infection: A population-based study of US veterans. *Hepatology* 2009; **49:** 116–123.

84. World Cancer Research Fund International. *Pancreatic cancer statistics* 2015. Erişim 04.05.2020, [http://www.wcrf.org/int/cancer-facts-figures/data-specific-cancers/pancreatic-cancer -statistics.].

85. Burris HA. Moore MJ. Andersen J. Green MR. Rothenberg ML. Modiano MR. ve ark. Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. *J Clin Oncol* 1997; **15:** 2403-2413.

86. Riley C. Villafane N. ve Van Buren G. *The improvement of care in patients with pancreatic cancer* 2017. Erişim 06.07.2020, [https://www.intechopen.com/books/challenges-in-pancreatic-pathology/the-improvement-of-care-in-patients-with-pancreatic-cancer].

87. Mathers CD. Boschi-Pinto C. Lopez AD. ve Murray CJL. Cancer incidence, mortality and survival by site for 14 regions of the world 2001. Erişim 08.08.2020, [https://www.who.int/healthinfo/paper13.pdf].

88. Pokrzywa CJ. Abbott DE. Matkowskyj KA. Ronnekleiv-Kelly SM. Winslow ER. Weber SM. ve ark. Natural history and treatment trends in pancreatic cancer subtypes. *J Gastrointest Surg* 2019; **23(4):** 768-778.

89. Erickson LA. Pancreatic ductal adenocarcinoma. *Mayo Clin Proc* 2017; **92(9):** 1461-1462.

90. Kleeff J. Korc M. Apte M. La Vecchia C. Johnson CD. Biankin AV. ve ark. Pancreatic cancer. *Nat Rev Dis Primers* 2016; **2:** 16022.

91. Wen S. Li Z. Feng J. Bai J. Lin X. ve Huang H. Metabonomic changes from pancreatic intraepithelial neoplasia to pancreatic ductal adenocarcinoma in tissues from rats. *Cancer Sci* 2016; **107(6):** 836-845.

92. Zhao T. Ren H. Jia L. Chen J. Xin W. Yan F. ve ark. Inhibition of HIF-1α by PX-478 enhances the anti-tumor effect of gemcitabine by inducing immunogenic cell death in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncotarget* 2015; **6(4):** 2250-2262.

93. Ottenhof NA. de Wilde RF. Maitra A. Hruban RH. ve Offerhaus GJA. Molecular characteristics of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Patholog Res Int* 2011; **620601:** 1-16.

94. Wörmann SM. Diakopoulos KN. Lesina M. ve Algül H. The immune network in pancreatic cancer development and progression. *Oncogene* 2014; **33(23):** 2956-2967.

95. Vikajärvi N. Pääkkö P. ve Soini Y. Apoptotic index and apoptosis influencing proteins bcl-2, mcl-1, bax and caspases 3, 6 and 8 in pancreatic carcinoma. *Histopathology* 1998; **33(5):** 432-439.

96. Evans JD. Cornford PA. Dodson A. Greenhalf W. Foster CS. ve Neoptolemos JP. Detailed tissue expression of bcl-2, bax, bak and bcl-x in the normal human pancreas and in chronic pancreatitis, ampullary and pancreatic ductal adenocarcinomas. *Pancreatology* 2001; **1(3):** 254-262.

97. Magistrelli P. Coppola R. Tonini G. Vincenzi A. Santini D. Borzomati D. ve ark. Apoptotic index or a combination of Bax/Bcl-2 expression correlate with

survival after resection of pancreatic adenocarcinoma. *J Cell Biochem* 2006; **97(1):** 98-108.

98. Redston MS. Caldas C. Seymour AB. Hruban RH. da Costa L. Yeo CJ. ve ark. p53 mutations in pancreatic carcinoma and evidence of common involvement of homocopolymer tracts in DNA microdeletions. *Cancer Res* 1994; **54(11):** 3025-3033.

99. Barton CM. Staddon SL. Hughes CM. Hall PA. O'Sullivan C. Klöppel G. ve ark. Abnormalities of the p53 tumour suppressor gene in human pancreatic cancer. *Br J Cancer* 1991; **6:** 1076-1082.

100. Mullendore ME. Koorstra JA. Li YM. Offerhaus GJ. Fan X. Henderson CM. ve ark. Ligand-dependent Notch signaling is involved in tumor initiation and tumor maintenance in pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 2009; **15(7):** 2291-2301.

101. Thayer SP. di Magliano MP. Heiser PW. Nielsen CM. Roberts DJ. Lauwers GY. ve ark. Hedgehog is an early and late mediator of pancreatic cancer tumorigenesis. *Nature* 2003; **425(6960):** 851-856.

102. Maitra SM. Precursor lesions of pancreatic cancer molecular pathology and clinical applications. *Pancreatology* 2007; **7(1):** 9-19.

103. Shi Y. ve Massagué J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 2003; **113(6):** 685-700.

104. Downward J. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2003; **3(1):** 11-22.

105.Malumbres M. ve Barbacid M. RAS oncogenes the first years. *Nat Rev Cancer* 2003; **3(6):** 459-465.

106.Grant TJ. Hua K. ve Singh A. Molecular pathogenesis of pancreatic cancer. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2016; **144:** 241-275.

107.Maitra A. Kern SE. ve Hruban RH. Molecular pathogenesis of pancreatic cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2005; **9(9):** 1191-1203.

108.Collado M. ve Serrano M. Senescence in tumours evidence from mice and humans. *Nat Rev Cancer* 2010; **10(1):** 51-57.

109.Tanaka S. Molecular pathogenesis and targeted therapy of pancreatic cancer. *Ann Surg Oncol* 2016; **23(2):** S197-205.

110.Hingorani SR. Wang L. Multani AS. Combs C. Deramaudt TB. Hruban RH. ve ark. TRPRH and KrasGD2 cooperate to promote chromosomal instability and widely metastic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice. *Cancer Cell* 2005; **7(5):** 469-483.

111.Ahn KS. Hwang JY. Han HS. Kim ST. Hwang I. ve Chun YO. The impact of acute inflammation on progression and metastasis in pancreatic cancer animal model. *Surg Oncol* 2018; **27(1):** 61-69.

112.Little EC. Wang C. Watson PM. Watson DK. Cole DJ. ve Camp ER. Novel immunocompetent murine models representing advanced local and metastatic pancreatic cancer. *J Surg Res* 2012; **176(2):** 359-366.

113.Yan Y. Rubinchik S. Wood AL. Gillanders WE. Dong JY. Watson DK. ve ark. Bystander effect contributes to the antitumor efficacy of CaSm antisense gene

therapy in a preclinical model of advanced pancreatic cancer. *Mol Ther* 2006; **13(2):** 357-365.

114. Kim HS. Choo YS. Koo T. Bang S. Oh TY. Wen J. ve ark. Enhancement of antitumor immunity of dendritic cells pulsed with heat-treated tumor lysate in murine pancreatic cancer. *Immunol Lett* 2006; **103(2):** 142-148.

115. Maletzki C. Linnebacher M. Kreikemeyer B. ve Emmrich J. Pancreatic cancer regression by intratumoural injection of live Streptococcus pyogenes in a syngeneic mouse model. *Gut* 2008; **57(4):** 483-491.

116. Pilon-Thomas S. Nelson N. Vohra N. Jerald M. Pendleton L. Szekeres K. ve ark. Murine pancreatic adenocarcinoma dampens SHIP-1 expression and alters MDSC homeostasis and function. *PLoS One* 2011; **6(11):** e27729.

117. Zaharoff DA. Hance KW. Rogers CJ. Schlom J. ve Greiner JW. Intratumoral immunotherapy of established solid tumors with chitosan/IL-12. *J Immunother* 2010; **33(7):** 697-705.

118. Benly P. Role of histamine in acute inflammation *J Pharm Sci Res* 2015; **7(6):** 373-378.

119. Ferrero-Miliani L. Nielsen O. Andersen P. ve Girardin S. Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1β generation *Clin Exp Immunol* 2007; **147(2):** 227-235.

120. Germolec DR. Shipkowski KA. Frawley RP. ve Evans E. Markers of inflammation. *Methods Mol Biol* 2018; **1803:** 57-79.

121.Black JG. *Microbiology, principles and explorations.* 5.Edition, John Wiley & Sons, Inc., New York; 2002.

122.Bach JF. *Immunology*. 2nd.Edition, John Wiley & Sons, Inc. New York; 1982.

123.Biedroń R. Peruń A. ve Józefowski S. CD36 differently regulates macrophage responses to smooth and rough lipopolysaccharide. *PLoS One* 2016; **11(4):** e0153558.

124.Fatima R. ve Aziz M. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) 2018. Erişim 10.08.2020, [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK519509/].

125.Beveridge TJ. Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. *J Bacteriol* 1999; **181:** 4725-4733.

126.Beveridge TJ. Mechanism of gram variability in select bacteria. *J Bacteriol* 1990; **172:** 1609–1620.

127.Beveridge TJ. ve Schultze-Lam S. The response of selected members of the archaea to the gram stain. *Microbiology* 1997; **142:** 2887–2895.

128.Koyama S. Sato E. Nomura H. Kubo K. Miura M. Yamashita T. ve ark. The potential of various lipopolysaccharides to release monocyte chemotactic activity from lung epithelial cells and fibroblasts. *Eur Respir J* 1999; **14(3):** 545-552.

129.Stromberg LR. Hengartner NW. Swingle KL. Moxley RA. Graves SW. Montaño GA. ve ark. Membrane insertion for the detection of lipopolysaccharides: Exploring the dynamics of amphiphile in lipid assays. *PLoS One* 2016; **11:** e0156295.

130. Munford RS. Sensing gram-negative bacterial lipopolysaccharides: A human disease determinant? *Infect Immun* 2008; **76:** 454-465.

131. Stromberg LR. Mendez HM. ve Mukundan H. *Detection methods for lipopolysaccharides: past and present* 2017, Erişim 10.07.2020. [https://www.intechopen.com/books/-i-escherichia-coli-i-recent-advances-on-physiology-pathogenesis-and-biotechnological-applications/detection-methods-for-lipopolysaccharides-past-and-present].

132. Nijland R. Hofland T. ve van Strijp JA. Recognition of LPS by TLR4: potential for anti-inflammatory therapies. *Mar Drugs* 2014; **12(7):** 4260-4273.

133. Peterson AA. ve McGroarty EJ. High-molecular-weight components in lipopolysaccharides of Salmonella typhimurium, Salmonella minnesota, and Escherichia coli. *J Bacteriol* 1985; **162(2):** 738-745.

134. [Microbewiki.kenyon.edu/index.php].

135. Raez CRH. ve Whitield C. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem* 2002; **71:** 635-700.

136. Ohno N. ve Morrison DC. Lipopolysaccharide interaction with lysozyme: binding of lipopolysaccharide to lysozyme and inhibition of lysozyme enzymatic activity. *J Biol Chem* 1989; **264:** 4434–4441.

137. Meredith TC. Aggarwal P. Mamat U. Lindner B. ve Woodard RW. Redefining the requisite lipopolysaccharide structure in Escherichia coli. *ACS Chem Biol* 2006; **1:** 33-42.

138.Kawai T. Takeuchi O. Fujita T. Inoue J. Mühlradt PF. Sato S. ve ark. Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes. *J Immunol* 2001; **167(10):** 5887-5894.

139.Poltorak A. He X. Smirnova I. Liu MY. Van Huffel C. Du X. ve ark. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 1998; **282(5396):** 2085-2088.

140.Han S. Wang C. Qin X. Xia J. ve Wu A. LPS alters the immuno-phenotype of glioma and glioma stem-like cells and induces in vivo antitumor immunity via TLR4. *J Exp Clin Cancer Res* 2017; **36(1):** 83.

141.Koyama S. Sato E. Nomura H. Kubo K. Miura M. Yamashita T. ve ark. The potential of various lipopolysaccharides to release IL-8 and G-CSF. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000; **278(4):** L658-666.

142.Kumar H. Kawai T. ve Akira S. Pathogen recognition by the innate immune system. *Int Rev Immunol* 2011; **30:** 16-34

143.Lu YC. Yeh WC. ve Ohashi PS. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine* 2008; **42(2):** 145-151.

144.Luo JL. Kamata H. ve Karin M. IKK/NF-kappaB signaling: balancing life and death- a new approach to cancer therapy. *J Clin Invest* 2005; **115(10):** 2625-2632.

145.Pålsson-McDermott EM. ve O'Neill LA. Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4. *Immunology* 2004; **113(2):** 153-162.

146.Raza H. John A. ve Shafarin J. Potentiation of LPS-ınduced apoptotic cell death in human hepatoma HepG2 cells by aspirin via ROS and mitochondrial dysfunction: protection by N-acetyl cysteine. *PLoS One* 2016; **11(7):** e0159750.

147.Dogan MD. Ataoglu H. ve Akarsu ES. Effects of different serotypes of Escherichia coli lipopolysaccharides on body temperature in rats. *Life Sci* 2000; **67(19):** 2319-2329.

148.Okuyama H. Tominaga A. Fukuoka S. Taguchi T. Kusumoto Y. ve Ono S. Spirulina lipopolysaccharides inhibit tumor growth in a Toll-like receptor 4-dependent manner by altering the cytokine milieu from interleukin-17/interleukin-23 to interferon-γ. *Oncol Rep* 2017; **37(2):** 684-694.

149.Liu J. Xu D. Wang Q. Zheng D. Jiang X. ve Xu L. LPS induced miR-181a promotes pancreatic cancer cell migration via targeting PTEN and MAP2K4. *Dig Dis Sci* 2014; **59(7):** 1452-1460.

150.Ikebe M. Kitaura Y. Nakamura M. Tanaka H. Yamasaki A. Nagai S. ve ark. Lipopolysaccharide (LPS) increases the invasive ability of pancreatic cancer cells through the TLR4/MyD88 signaling pathway. *J Surg Oncol* 2009; **100(8):** 725-731.

151.Francescone R. Hou V. ve Grivennikov SI. Microbiome, inflammation, and cancer. *Cancer J* 2014; **20(3):** 181-189.

152. Virchow R. An address on the value of pathological experiments. *Br Med J* 1881; **2:** 198–203.

153. Grivennikov SI. Greten FR. ve Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* 2010; **140:** 883-899.

154. Coussens LM. ve Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* 2002; **420(6917)** 860-867.

155. Dvorak HF. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med* 1986; **315:** 1650–1659.

156. Abbas AK. ve Lichtman AH. *Temel İmmünoloji*, İstanbul Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2007.

157. DiPietro L. Wound healing: the role of the macrophage and other immune cells. *Shock* 1995; **4:** 233–240.

158. Fritsch C. Simon-Assmann P. Kedinger M. ve Evans GS. Cytokines modulate fibroblast phenotype and epithelial-stroma interactions in rat intestine. *Gastroenterology* 1997; **112:** 826–838.

159. Li H. Tu Z. The role of monocytes/macrophages in HBV and HCV infection 2017. Erişim 10.06.2020. [https://www.intechopen.com/books/biology-of-myelomonocytic-cells/the-role-of-monocytes-macrophages-in-hbv-and-hcv-infection].

160. Orekhov AN. Orekhova VA. Nikiforov NG. Myasoedova VA. Grechko AV. Romanenko EB. ve ark. Monocyte differentiation and macrophage polarization. *Vessel Plus* 2019; **3:** 10.

161. Atri C. Guerfali FZ. ve Laouini D. Role of human macrophage polarization in inflammation during infectious diseases. *Int J Mol Sci* 2018; **19(6):** 1801.

162. Zanluqui NG. Wowk PF. ve Pinge-Filho P. Macrophage Polarization in Chagas Disease. *J Clin Cell Immunol* 2015; **6:** 317.

163. Obeid E. Nanda R. Fu YX. ve Olopade OI. The role of tumor-associated macrophages in breast cancer progression (review). *Int J Oncol* 2013; **43(1):** 5-12.

164. Maldonado RF. Sá-Correia I. ve Valvano MA. Lipopolysaccharide modification in gram-negative bacteria during chronic infection. *FEMS Microbiol Rev* 2016; **40(4):** 480-493.

165. Murray PJ. Allen JE. Biswas SK. Fisher EA. Gilroy DW. Goerdt S. ve ark. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity* 2014; **41(1):** 14-20.

166. Hirota K. Oishi Y. Taniguchi H. Sawachi K. Inagawa H. Kohchi C. ve ark. Antitumor effect of inhalatory lipopolysaccharide and synergetic effect in combination with cyclophosphamide. *Anticancer Res* 2010; **30(8):** 3129-3134.

167. Jenke A. Wilk S. Poller W. Eriksson U. Valaperti A. Rauch BH. ve ark. Adiponectin protects against Toll-like receptor 4-mediated cardiac inflammation and injury. *Cardiovasc Res* 2013; **99(3):** 422-431.

168. Salinas-Carmona MC. Zúñiga JM. Pérez-Rivera LI. Segoviano-Ramírez JC. ve Vázquez-Marmolejo AV. Nocardia brasiliensis Modulates IFN-gamma, IL-10,

and IL-12 cytokine production by macrophages from BALB/c Mice. *J Interferon Cytokine Res* 2009; **29(5):** 263-271.

169.[https://www.cusabio.com/c-20938.html.].

170.Dunn GP. Bruce AT. Ikeda H. Old LJ. ve Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 2002; **3(11):** 991-998.

171.Vajdic CM. ve van Leeuwen MT. Cancer incidence and risk factors after solid organ transplantation. *Int J Cancer* 2009; **125(8):** 1747-1754.

172.Maletzki C. Gock M. Klier U. Klar E. ve Linnebacher M. Bacteriolytic therapy of experimental pancreatic carcinoma. *World J Gastroenterol* 2010; **16(28):** 3546-3552.

173.Kyi C. ve Postow M. Checkpoint blocking antibodies in cancer immunotherapy. *FEBS Letters* 2014; **588(2):** 368-376.

174.Giannios JN. *Immunoediting, immunosurveillance, tumor-induced immunosuppression and immunoresistance, immunomodulation, immunotherapy, and immunonutrition in personalized and precision cancer medicine* 2015, Erişim 23. 07.2020. [https://www.intechopen.com/books/immunopathology-and immunomodulation/immunoediting-immunosurveillance-tumor-induced-immunosuppression-and-immunoresistance-immunomodulatin].

175.Zitrogel L. Tesniere A. ve Kroemer G. Cancer despite immunosurveillance immunoselection and immunosubversion. *Nat Rev Immunol* 2006; **6(10):** 715-727.

176.Tsuda H. Gene and chromosomal alterations in sporadic breast cancer correlation with histopathological features and implications for genesis and progression. *Breast Cancer* 2009; **16:** 186-201.

177.Zhou BB. Zhang H. Damelin M. Geles KG. Grindley JC. ve Dirks PB. Tumour-initiating cells challenges and opportunities for anticancer drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 2009; **8(10):** 806-823.

178.Whiteside TL. Immune response to malignancies. *J Allergy Clin Immunol* 2010; **125(2):** 5272-5283.

179.Campoli M. Chang CC. ve Ferrone S. HLA class I antigen loss, tumor immune escape and immune selection. *Vaccine* 2002; **20(4):** A40-A45.

180.Dine J. Gordon R. Shames Y. Kasler MK. ve Barton-Burke M. Immune checkpoint inhibitors: an innovation in immunotherapy for the treatment and management of patients with cancer. *Asia Pac J Oncol Nurs* 2017; **4(2):** 127-135.

181.Berghoff AS. Venur VA. Preusser M. ve Ahluwalia MS. Immune checkpoint ınhibitors in brain metastases: from biology to treatment. *Am Soc Clin Oncol Educ Book* 2016; **35:** e116-122.

182.Di Giacomo AM. Ascierto PA. Pilla L. Santinami M. Ferrucci PF. Giannarelli D. ve ark. Ipilimumab and fotemustine in patients with advanced melanoma

(NIBIT-M1): an open-label, single-arm phase 2 trial. *Lancet Oncol* 2012; **13:** 879-886.

183. Johnson DB. Chandra S. ve Sosman JA. Immune checkpoint inhibitor toxicity in 2018. *JAMA* 2018; **320(16):** 1702-1703.

184. Velcheti V. Schalper KA. Carvajal DE. Anagnostou VK. Syrigos KN. Sznol M. ve ark. Programmed death ligand-1 expression in non-small cell lung cancer. *Lab Invest* 2014; **94:** 107-116.

185. Konishi J. Yamazaki K. Azuma M. Kinoshita I. Dosaka-Akita H. ve Nishimura M. B7-H1 expression on non-small cell lung cancer cells and its relationship with tumor-infiltrating lymphocytes and their PD-1 expression. *Clin Cancer Res* 2004; **10:** 5094-5100.

186. Gunderson AJ. Yamazaki T. McCarty K. Phillips M. Alice A. Bambina S. ve ark. Blockade of fibroblast activation protein in combination with radiation treatment in murine models of pancreatic adenocarcinoma. *PLoS One* 2019; **14(2):** e0211117.

187. Lashinger LM. Harvey AE. Hays D. Harrison LM. Lewis K. Fischer SM. ve ark. Calorie restriction decreases murine and human pancreatic tumor cell growth, nuclear factor-κB activation, and inflammation-related gene expression in an insulin-like growth factor-1-dependent manner. *PLoS One* 2014; **9(5):** e94151.

188. Al-Regaiey KA. The effects of calorie restriction on aging: a brief review. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2016; **20(11):** 2468-2473.

189. Green CL. Mitchell SE. Derous D. Wang Y. Chen L. Han JJ. ve ark. The effects of graded levels of calorie restriction: IX. Global metabolomic screen reveals modulation of carnitines, sphingolipids and bile acids in the liver of C57BL/6 mice. *Aging Cell* 2017; **16(3):** 529-540.

190. Lashinger LM. Malone LM. Brown GW. Daniels EA. Goldberg JA. Otto G. ve ark. Rapamycin partially mimics the anticancer effects of calorie restriction in a murine model of pancreatic cancer. *Cancer Prev Res (Phila)* 2011; **4(7):** 1041-1051.

191. Bellone G. Smirne C. Mauri FA. Tonel E. Carbone A. Buffolino A. ve ark. Cytokine expression profile in human pancreatic carcinoma cells and in surgical specimens: implications for survival. *Cancer Immunol Immunother* 2006; **55(6):** 684-698.

192. Fontana L. Villareal DT. Das SK. Smith SR. Meydani SN. Pittas AG. ve ark. CALERIE Study Group, Effects of 2- year calorie restriction on circulating levels of IGF-1, IGF-binding proteins and cortisol in nonobese men and women: a randomized clinical trial, *Aging Cell* 2016; **15:** 22–27.

193. Kopeina GS. Senichkin VV. ve Zhivotovsky B. Caloric restriction - A promising anti-cancer approach: From molecular mechanisms to clinical trials. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* 2017; **1867(1):** 29-41.

194. Lee C. Raffaghello L. Brandhorst S. Safdie FM. Bianchi G. Martin-Montalvo A. ve ark. Fasting cycles retard growth of tumors and sensitize a range of cancer cell types to chemotherapy. *Sci Transl Med* 2012; **4(24):** 124ra27.

195. O'Flanagan CH. Smith LA. McDonell SB. ve Hursting SD. When less may be more: calorie restriction and response to cancer therapy. *BMC Med* 2017; **15(1):** 106.

196. Michels KB. ve Ekbom A. Caloric restriction and incidence of breast cancer. *JAMA* 2004; **291:** 1226–1230.

197. Zhu Z. Aref AR. ve Cohoon TJ. Inhibition of KRAS-driven tumorigenicity by interruption of an autocrine cytokine circuit. *Cancer Discov* 2014; **4:** 452–465.

198. Ciftci N. Oksidatif stresin kanserdeki rolü: Antioksidanlar kanser progresyonunun yakıtı olabilir mi? *Ahi Evran Tıp Dergisi* 2017; **1:** 8-13.

199. Liou GY. ve Storz P. Reactive oxygen species in cancer. *Free Radic Res* 2010; **44(5):** 479–496.

200. Marnett LJ. Oxy radicals, lipid peroxidation and DNA damage. *Toxicology* 2002; **181-182:** 219-222.

201. Valko M. Leibfritz D. Moncola J. Cronin MTD. Mazura M. ve Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; **39:** 44-84.

202. Karabulut H. ve Gulay MS. Antioksidanlar. *MAE Vet Fak Derg* 2016; **1(1):** 65-76.

203. Shinde A. Ganu J. ve Naik P. Effect of free radicals & antioxidants on oxidative stress: A Review. *J Dent Allied Sci* 2012; **1(2):** 6366.

204. Aydemir B. ve Karadağ-Sarı E. Antioksidanlar ve büyüme faktörleri ile ilişkisi. *Kocatepe Vet J* 2009; **2(2):** 56-60.

205. Pham-Huy LA. He H. ve Pham-Huy C. Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int J Biomed Sci* 2008; **4(2):** 89-96.

206. Sen S. ve Chakraborty R. The Role of Antioxidants in Human Health 2011. Erişim18.09.2020, [https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/bk-2011-1083.ch001.].

207. Gao F. Kinnula VL. Myllärniemi M. ve Oury TD. Extracellular Superoxide dismutase in pulmonary fibrosis. *Antioxid Redox Signal* 2008; **10(2):** 343-354.

208. Nordberg J. ve Arner SJ. Reactive oxygen species, antioxidant, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med* 2001; **31(11):** 1287-1312.

209. Young IS. ve Woodside JV. Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol* 2001; **54(3):** 176-186.

210. Cheung CCC. Zheng GJ. Li AMY. Richardson BJ. ve Lam PKS. Relationship between tissue concentrations of polycylic aromatic hydrocarbons and antioxidative responses of marine mussels, Perna viridis. *Aquat Toxicol* 2001; **52(3-4):** 189-203.

211. Limon-Pacheco J. ve Gonsebatt ME. The role of antioxidants and antioxidantrelated enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutat Res* 2009; **674(1-2):** 137-147.

212. Green RM. Graham M. O'Donovan MR. Chipman JK. ve Hodges NJ. Subcellular compartmentalization of glutathione: correlations with parameters of oxidative stress related to genotoxicity. *Mutagenesis* 2006; **21(6):** 383-390.

213.Pei S. Minhajuddin M. Callahan KP. Balys M. Ashton JM. Neering SJ. ve ark. Targeting aberrant glutathione metabolism to eradicate human acute myelogenous leukemia cells. *J Biol Chem* 2013; **288(47):** 33542–33558.

214.Lagman M. Ly J. Saing T. Kaur Singh M. Vera Tudela E. Morris D. ve ark. Investigating the causes for decreased levels of glutathione in individuals with type ıı diabetes. *PLoS One* 2015; **10(3):** e0118436.

215.Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using realtime reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 2000; **25:** 169-193.

216.Gunel T. Gen anlatımının kantitatif analizi. *Turkiye Klinikleri J Med Sci* 2007; **27:** 763-767.

217.Kubista M. Andrade JM. Bengtsson M. Forootan A. Jonák J. Lind K. ve ark. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med* 2006; **27:** 95-125.

218.van der Velden VH. Hochhaus A. Cazzaniga G. Szczepanski T. Gabert J. ve van Dongen JJ. Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: Principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia* 2003; **17:** 1013-1034.

219.Cacherill FR. ve Uhl JR. Applications and challenges of real time PCR for the clinical microbiology laboratory. In: Reischl U. Wittwer C. Cockerill FR. Editor *Rapid Cycle Real-Time PCR. Methods and Applications*. 1st ed. Germany: Heidelberg; 2001. p.11.

220.Tyagi S. ve Kramer FR. Molecular beacons: Probes that fluoresce upon hybridization. *Nat Biotechnol* 1996; **14:** 303-308.

221.Chaplin BE. Rasmussen RP. Bernard PS. ve Wittwer CT. LightCyclerTM hybridization probes the most direct way to monitor PCR amplification and mutation detection. *Biochemica* 1999; **1:** 5-8.

222.Coons AH. Creech HJ. ve Jones RN. Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. *Exp Biol Med* 1941; **47(2):** 200-202.

223.Miki Y. Iwabuchi E. Ono K. Sasano H. ve Ito K. Exploring protein-protein interaction in the study of hormone-dependent cancers. *Int J Mol Sci* 2018; **19(10):** 3173.

224.Adın Çınar S. *Akan hücre cihazında veri analizi.* İstanbul: Medya Tower: 2009.

225.Demir R. Ed *Histolojik Boyama Teknikleri,* Başvuru kitabı, Ankara: R. Palme yayıncılık: 2001.

226.[https://www.proteinatlas.org/learn/method/immunohistochemistry].

227.Temizkan G ve Arda N. *Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler.* İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri: 2004.

228.Demirel D. Flow sitometrik DNA analizinin temel prensipleri. *Türk Patoloji Dergisi* 1995; **11(2):** 64-65.

229.Wood B. 9-color and 10-color flow cytometry in the clinical laboratory. *Arch Pathol Lab Med* 2006; **130:** 680-690.

230.Kanev G. ve Muranlı FD. Flow sitometri ve kullanım alanları. *SAÜ Fen Bil Der* 2016; **20(1):** 33-38.

231.Villas BH. Flow cytometry: an overview. *Cell Vis* 1998; **5:** 56-61.

232.Bradford MA. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; **72:** 248-254.

233.Aebi H. Catalase *in vitro*. *Methods Enzymol* 1984; **105:** 121-126.

234.Ledwozyw A. Michalak J. Stepień A. ve Kadziolka A. The relationship between plasma triglycerides, cholesterol, total lipids and lipid peroxidation products during human atherosclerosis. *Clin Chim Acta* 1986; **155:** 275–283.

235.Beutler E. Duron O. ve Kelly BM. Improved method for the determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med* 1963; **51:** 882–888.

236.Sun Y. Oberley LW. ve Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 1988; **34:** 497–500.

237.Reznick AZ. ve Packer L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Method Enzymol* 1994; **233:** 357-363.

238.Habig WH. ve Jakoby WB. Assays for differentiation of glutathione- S-transferases. *Methods Enzymol* 1981; **77:** 398-405.

239.Paglia DE. ve Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967; **70(1):** 158-169.

240. Weizman N. Krelin Y. Shabtay-Orbach A. Amit M. Binenbaum Y. Wong RJ. ve ark. Macrophages mediate gemcitabine resistance of pancreatic adenocarcinoma by upregulating cytidine deaminase. *Oncogene* 2014; **33(29):** 3812-3819.

241. Kandimalla R. Tomihara H. Banwait JK. Yamamura K. Singh G. Baba H. ve ark. A 15-gene immune, stromal, and proliferation gene signature that significantly associates with poor survival in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2020; **26(14):** 3641-3648.

242. Jain S. Dash P. Minz AP. Satpathi S. Samal AG. Behera PK. ve ark. Lipopolysaccharide (LPS) enhances prostate cancer metastasis potentially through NF-κB activation and recurrent dexamethasone administration fails to suppress it *in vivo. Prostate* 2019; **79(2):** 168-182.

243. Jiang Y. Ji X. Liu K. Shi Y. Wang C. Li Y. ve ark. Exosomal miR-200c-3p negatively regulates the migration and invasion of lipopolysaccharide (LPS)-stimulated colorectal cancer (CRC). *BMC Mol Cell Biol* 2020; **21(1):** 48.

244. Honda T. ve Inagawa H. Molecular response of human monocytes following interaction with colon cancer cells by pre-treatment with low-dose lipopolysaccharide. *Anticancer Res* 2015; **35(8):** 4473-4477.

245. Raza H. John A. ve Shafarin J. Potentiation of LPS-induced apoptotic cell death in human hepatoma HepG2 Cells by aspirin via ROS and mitochondrial dysfunction: Protection by N-Acetyl Cysteine. *PLoS One* 2016; **11(7):** e0159750.

246. Honda T. ve Inagawa H. Usefulness of monocytes/macrophages activated with low-dose lipopolysaccharide in tumor tissue and adipose tissue of obesity. *Anticancer Res* 2019; **39(8):** 4475-4478.

247. Lin HC. ve Lin JY. M1 Polarization but anti-LPS-induced inflammation and anti-MCF-7 breast cancer cell growth effects of five selected polysaccharides. *Evid Based Complement Alternat Med* 2020; **2020:** 9450246.

248. Lien EC. Westermark AM. Li Z. Sapp KM. ve Vander Heiden MG. Caloric restriction alters lipid metabolism to contribute to tumor growth inhibition. *Biorxiv* 2020; doi: https://doi.org/10.1101/2020.03.09.984302.

249. Cicekdal MB. Tuna BG. Charehsaz M. Cleary MP. Aydin A. ve Dogan S. Effects of long-term intermittent versus chronic calorie restriction on oxidative stress in a mouse cancer model. *IUBMB Life* 2019; **71(12):** 1973-1985.

250. Lope V. Martín M. Castelló A. Ruiz A. Casas AM. Baena-Cañada JM. ve ark. Overeating, caloric restriction and breast cancer risk by pathologic subtype: the EPIGEICAM study. *Sci Rep* 2019; **9(1):** 3904.

251. Lashinger LM. Harrison LM. Rasmussen AJ. Logsdon CD. Fischer SM. McArthur MJ. ve ark. Dietary energy balance modulation of Kras- and Ink4a/Arf+/--driven pancreatic cancer: the role of insulin-like growth factor-I. *Cancer Prev Res (Phila)* 2013; **6(10):** 1046-1055.

252. Pramanik KC. Makena MR. Bhowmick K. ve Pandey MK. Advancement of NF-κB signaling pathway: A novel target in pancreatic cancer. *Int J Mol Sci* 2018; **19(12):** 3890.

253. Martins GR. Gelaleti GB. Moschetta MG. Maschio-Signorini LB. ve Zuccari DA. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines mediated by NF-κB factor as prognostic markers in mammary tumors. *Mediators Inflamm* 2016; 9512743.

254. Arwert EN. Milford EL. Rullan A. Derzsi S. Hooper S. Kato T. ve ark. STING and IRF3 in stromal fibroblasts enable sensing of genomic stress in cancer cells to undermine oncolytic viral therapy. *Nat Cell Biol* 2020; **22(7):** 758-766.

255. Papademetrio DL. Lompardía SL. Simunovich T. Costantino S. Mihalez CY. Cavaliere V. ve ark. Inhibition of survival pathways MAPK and NF-kB triggers apoptosis in pancreatic ductal adenocarcinoma cells via suppression of autophagy. *Target Oncol* 2016; **11(2):** 183-195.

256. Perkins ND. NF-kappaB: tumor promoter or suppressor? *Trends Cell Biol* 2004; **14(2):** 64-69.

257. Chen Q. Wang J. Zhang Q. Zhang J. Lou Y. ve Yang J. Tumour cell-derived debris and IgG synergistically promote metastasis of pancreatic cancer by inducing inflammation via tumour-associated macrophages. *Br J Cancer* 2019; **121(9):** 786-795.

258. Balkan BM. Kısmalı G. Turan D. Balkan AB. ve Sel T. IL-6 ilavesi HEPG2 hücrelerinde kaspaz aktivitelerini nasıl etkiler? *MAKÜ Sag Bil Enst Derg* 2017; **5(2):** 85-92.

259. Sato T. Shibata W. Hikiba Y. Kaneta Y. Suzuki N. Ihara S. ve ark. c-Jun N-terminal kinase in pancreatic tumor stroma augments tumor development in mice. *Cancer Sci* 2017; **108(11);** 2156-2165.

260. Choi JH. Ji YG. Ko JJ. Cho HJ. ve Lee DH. Activating P2X7 receptors increases proliferation of human pancreatic cancer cells via ERK1/2 and JNK. *Pancreas* 2018; **47(5):** 643-651.

261. Zhang L. Fang Y. Xu XF. ve Jin DY. Moscatilin induces apoptosis of pancreatic cancer cells via reactive oxygen species and the JNK/SAPK pathway. *Mol Med Rep* 2017; **15(3):** 1195-1203.

262. Dhanasekaran DN. ve Reddy EP. JNK-signaling: A multiplexing hub in programmed cell death. *Genes Cancer* 2017; **8(9-10):** 682-694.

263. Babic A. Schnure N. Neupane NP. Zaman MM. Rifai N. Welch MW. ve ark. Plasma inflammatory cytokines and survival of pancreatic cancer patients. *Clin Transl Gastroenterol* 2018; **9(4):** 145.

264. Bao Y. Giovannucci EL. Kraft P. Qian ZR. Wu C. Ogino S. ve ark. Inflammatory plasma markers and pancreatic cancer risk: a prospective study of five U.S. cohorts. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2013; **22(5):** 855-861.

265. Ramsey ML. Talbert E. Ahn D. Bekaii-Saab T. Badi N. ve Bloomston PM. Circulating interleukin-6 is associated with disease progression, but not cachexia in pancreatic cancer. *Pancreatology* 2019; **19(1):** 80-87.

266. Kruger D. Yako YY. Devar J. Lahoud N. ve Smith M. Inflammatory cytokines and combined biomarker panels in pancreatic ductal adenocarcinoma: Enhancing diagnostic accuracy. *PLoS One* 2019; **14(8):** e0221169.

267. Piro G. Simionato F. Carbone C. Frizziero M. Malleo G. Zanini S. ve ark. A circulating T_H2 cytokines profile predicts survival in patients with resectable pancreatic adenocarcinoma. *Oncoimmunology* 2017; **6(9):** e1322242.

268. Özcan O. Erdal H. Çakırca G. ve Yönden Z. Oksidatif stres ve hücre içi lipit, protein ve DNA yapıları üzerine etkileri. *JCEI* 2015; **6(3):** 331-336.

269. Martinez-Useros J. Li W. Cabeza-Morales M. ve Garcia-Foncillas J. Oxidative stress: A new target for pancreatic cancer prognosis and treatment. *J Clin Med* 2017; **6(3):** 29.

270. Matsuda R. Miyasaka Y. Yamada Y. Kawata J. Sakihama K. Yamamoto T. ve ark. Chronic inflammatory changes and oxidative stress in the background of "pancreatic ductal adenocarcinoma concomitant with intraductal papillary mucinous neoplasm". *Virchows Arch* 2020; doi:10.1007/s00428-020-02844-2.

271. Mohammad J. Singh RR. Riggle C. Haugrud B. Abdalla MY. ve Reindl K. M. JNK inhibition blocks piperlongumine-induced cell death and transcriptional activation of heme oxygenase-1 in pancreatic cancer cells. *Apoptosis* 2019; **24(9-10):** 730-744.

272. Zińczuk J. Maciejczyk M. Zaręba K. Romaniuk W. Markowski A. Kędra B. ve ark. Antioxidant barrier, redox status, and oxidative damage to biomolecules in patients with colorectal cancer. Can malondialdehyde and catalase be markers of colorectal cancer advancement? *Biomolecules* 2019; **9(10):** 637.

273. Lepara Z. Lepara O. Fajkić A. Rebić D. Alić J. ve Spahović H. Serum malondialdehyde (MDA) level as a potential biomarker of cancer progression for patients with bladder cancer. *Rom J Intern Med* 2020; **58(3):** 146-152.

274. Gulbahce-Mutlu E. Baltaci SB. Menevse E. Mogulkoc R. ve Baltaci AK. The effect of zinc and melatonin administration on lipid peroxidation, IL-6 levels, and element metabolism in DMBA-induced breast cancer in rats. *Biol Trace Elem Res* 2020; doi:10.1007/s12011-020-02238-0.

ETİK KURUL KARARI

BEZMİÂLEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ

T.C.
BEZMİÂLEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
KARAR METNİ

SAYI: 2017/130 20.07.2017
KONU: Sn. Prof. Dr. Sema BOLKENT

Sayın, Prof. Dr. Sema BOLKENT

"Pankreas adenokarsinom modeli ve Panc02 hücrelerinde düşük kalori ve lipopolisakkarit tedavisi" başlıklı projenize ait başvurunuz 20.07.2017 tarihinde yapılan Yerel Etik Kurul toplantısında değerlendirilmiş ve onanmıştır.

Doç. Dr. Fahri AKBAŞ
Etik Kurul Başkanı

Prof. Dr. Ahmet BELCE
Üye

Prof. Dr. Erhan AYŞAN
Üye

Prof. Dr. İsmail MERAL
Üye

Yrd. Doç.Dr.Fatemeh BAHADORİ
KATILMADI
Üye

Yrd.Doç.Dr. Ömer UYSAL
Üye
KATILMADI

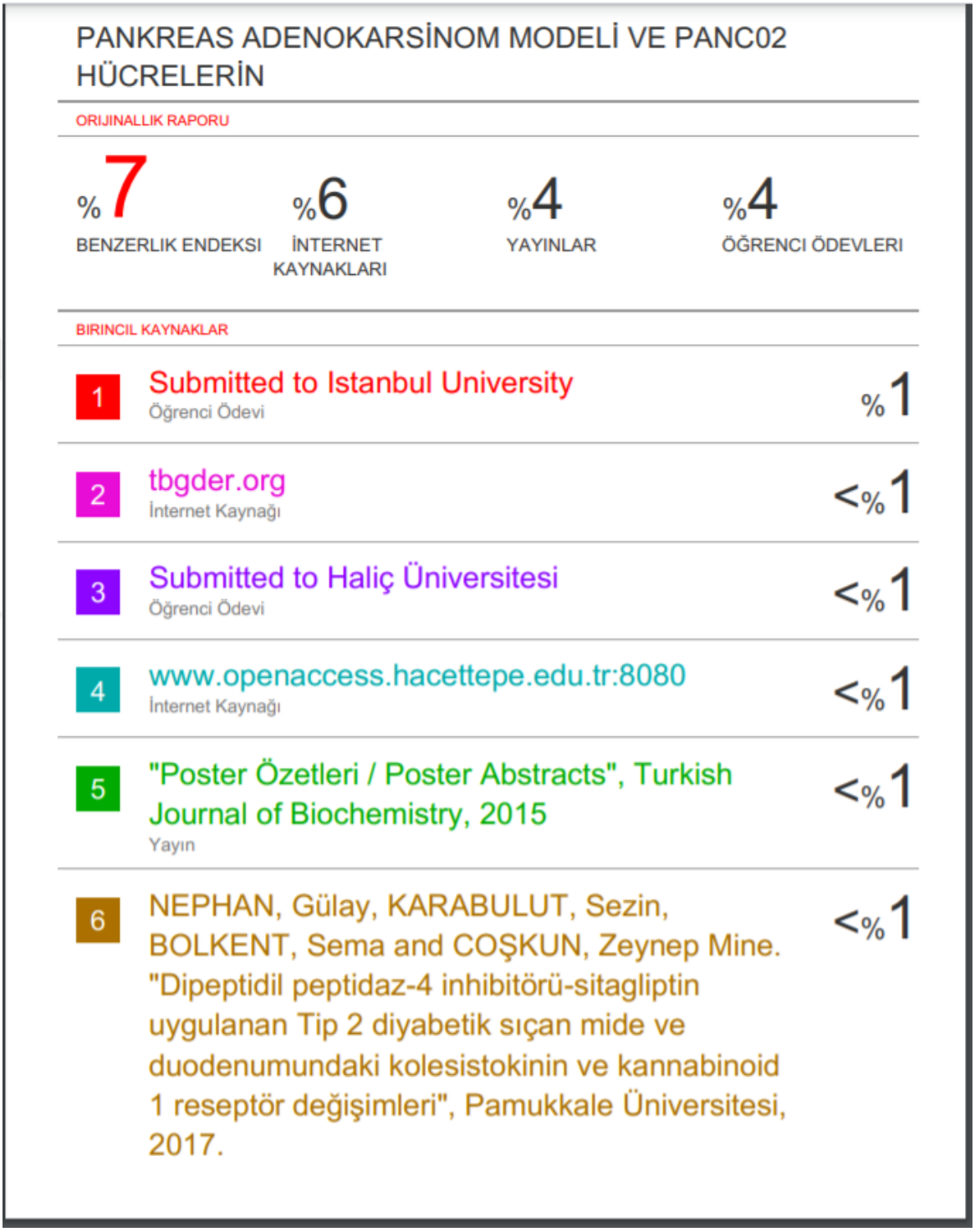
Vet. Hek. Mert ÇELİKTEN
Üye

Harun SARIKAMIŞ
Üye

Serife GÖNCÜ
Üye

- Etik kurulumuzdan onam alan her proje için, çalışma başlamadan üç ay önce çalışılacak hayvan rezervinin uygunluğunu (tür, yaş, cinsiyet) belirlemek amacıyla Deney Hayvanları Laboratuvarına başvurulmalıdır.

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI



PANKREAS ADENOKARSİNOM MODELİ VE PANC02 HÜCRELERİN

ORIJINALLIK RAPORU

%7	%6	%4	%4
BENZERLIK ENDEKSI	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCI ÖDEVLERI

BIRINCIL KAYNAKLAR

1	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	%1
2	tbgder.org İnternet Kaynağı	<%1
3	Submitted to Haliç Üniversitesi Öğrenci Ödevi	<%1
4	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<%1
5	"Poster Özetleri / Poster Abstracts", Turkish Journal of Biochemistry, 2015 Yayın	<%1
6	NEPHAN, Gülay, KARABULUT, Sezin, BOLKENT, Sema and COŞKUN, Zeynep Mine. "Dipeptidil peptidaz-4 inhibitörü-sitagliptin uygulanan Tip 2 diyabetik sıçan mide ve duodenumundaki kolesistokinin ve kannabinoid 1 reseptör değişimleri", Pamukkale Üniversitesi, 2017.	<%1

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Alişa Bahar	**Soyadı**	Beydogan
Doğ.Yeri	Ludwigshafer/Almanya	**Doğ.Tar.**	25.09.1987
Uyruğu	T.C.	**TC Kim No**	34900876984
Email	baharbeydogan@gmail.com	**Tel**	0554 709 4487

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	**Mez. Yılı**
Doktora	İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa	2020
Yük.Lis.	İstanbul Üniversitesi	2014
Lisans	Uludağ Üniversitesi	2010
Lise	Bahçeşehir Atatürk Anadolu Lisesi	2005

Yabancı Dilleri	**Okuduğunu Anlama***	**Konuşma***	**Yazma***	**KPDS/ÜDS Puanı**	**(Diğer) Puanı**
İngilizce	iyi	iyi	iyi	62.500	
Almanca	orta	zayıf	orta		

***Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	**Eşit Ağırlık**	**Sözel**
LES Puanı	74	77	76
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	**Kullanma becerisi**
Microsoft office	iyi
SPSS/Graphed	iyi
Endnote	orta

Yayınları/Tebligleri Sertifikaları/Ödülleri

1. **Beydoğan AB**, Çolak DK, Bilge BN, Bolkent S. The effects of COVID-19 on immune system and diabetes. Cerrahpasa Med J **2020**; 44: 65-73.

2. Coskun ZM, **Beydogan AB**, Bolkent S. Changes in the expression levels of CB1 and GLP-1R mRNAs and microRNAs 33a and 122 in the liver of type 2 diabetic rats treated with ghrelin J Biochem Mol Toxic **2019**; 33(10) DOI: 10.1002/jbt.22388
3. Yanar K, Coskun ZM, **Beydogan AB**, Aydin S, Bolkent S. The effects of delta-9-tetrahydrocannabinol on Krüppel-like factor-4 expression, redox homeostasis, and inflammation in the kidney of diabetic rat. J Cell Biochem. **2019** ;120(9):16219-16228.
4. **Beydogan AB,** Coskun ZM, Bolkent S. The protective effects of Δ(9) tetrahydrocannabinol against inflammation and oxidative stress in rat liver with fructose-induced hyperinsulinemia. J Pharm Pharmacol. Nov 14. **2018**
5. Coşkun ZM, **Beydogan AB**, Bolkent S. The effect of ghrelin treatment on cell survival and inflammation in type 2 diabetic rat liver. Okmeydani Tıp Derg. **2017;**33(4): 253-260.
6. **Beydogan AB**, Bolkent S. The effects of silibin administration for different time periods on mouse liver with Ehrlich ascites carcinoma. Pharmacol Rep. **2016**;68(3):543-9.

Uluslararası Bildiriler

1. **Beydoğan AB**, Işıldar B, Coskun ZM, Koyutürk E, Koyutürk M, Bolkent S. Effects of Δ-9 tetrahydrocannabinol on the small intestine altered by high fructose diet, 14th Multinational Congress on Microscopy, 15-20 September 2019, Belgrad, Serbia (Poster sunum)
2. Bolkent S, **Beydoğan AB**. Apoptotic changes by silibin in Ehrlich ascites tumor-bearing mouse liver, 4th World Congress on Cancer Science & Therapy, 20-22 October 2014, Chicago, ABD. (Poster sunum)
3. Bolkent S, **Beydoğan AB,** Karabulut S. Small intestinal mucosa of diabetic rats treated with sitagliptin, IDF2013, 2-6 December 2013, Melbourne, Australia.

Ulusal Bildiriler

1. **Beydoğan AB,** Coşkun ZM, Bolkent S. Fruktoz ile oluşturulan insülin direnci sıçan modelinde ghrelinin rolü: İmmünohistokimyasal ve biyokimyasal çalışma, XVI. Uluslararası katılımlı Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, 27-30 Ekim 2019, Bodrum. (Sözlü sunum)
2. Bilge BN, Coşkun ZM, **Beydoğan AB**, Bolkent S. Ghrelin tedavisi tip 2 diyabetik sıçanlarda kannabinoid-1 ve glukagon benzeri peptid-1 reseptörlerinin ekspresyonlarını azaltır. XVI. Uluslararası katılımlı Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, 27-30 Ekim 2019, Bodrum. (Sözlü sunum)

Sertifikalar

- İstanbul Maltepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi Kanser Kök Hücreleri İstanbul, 2016
- Acıbadem Tıp Fakültesi, Tip 2 Diyabet Semineri, İstanbul 2013.
- İlaç tasarım ve Etik konulu Sertifikalı Eğitim Programı, Istanbul, 2013
- Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Asım Cenani Sempozyumu, Istanbul, 2012
- Bogaziçi Üniversitesi Tıbbi Genetik Kongresi, Istanbul, 2012
- Transilvanya Üniversitesi, ERASMUS Patoloji Eğitim Programı, Braşov, Romanya, 2012
- İstanbul Bağcılar Eğitim ve Araştırma Hastanesi Deney Hayvanları Kullanım ve Uygulama Sertifika Programı, 2011
- Uludağ Üniversitesi 3. Ulusal Biyoloji Toplulukları Kongresi, Bursa, 2010
- Atık Su Arıtma ve Kullanım Eğitimi, Bursa, 2010
- Omurgalı Hayvanların Morfoloji ve Sistematiğinin incelenmesi - Uludağ Kanyon Gezisi, Bursa 2010
- İstanbul Üniversitesi 6. Moleküler Biyoloji ve Genetik Kış Okulu, 2010
- Uludağ Üniversitesi 2. Ulusal Biyoloji Toplulukları Kongresi, Bursa, 2009
- Orta Doğu Teknik Üniversitesi Uluslararası Genetik Kongresi, Ankara 2008
- Uludağ Üniversitesi 1. Ulusal Biyoloji Toplulukları Kongresi, Bursa, 2008

Özel İlgi Alanları (Hobileri):

Biyoloji, moleküler biyoloji, onkoloji, immunoloji, immünoterapi, tümör immünolojisi.

Şiir ve serbest yazı, kara kalem, yağlı boya, cam boyama, felsefe, psikoloji, bilim ve teknoloji tarihi.