



T.C.  
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HİDATİK KİST SIVISI UYGULAMASININ  
KOLOREKTAL ADENOKARSİNOM (CACO-2)  
HÜCRE HATTINDA İNFLAMATUAR YANITLAR VE  
EPİTELYAL-MEZENKİMAL GEÇİŞ ÜZERİNE  
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Emin YAĞMUR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOKİMYA ANA BİLİM DALI

KAHRAMANMARAŞ 2024

T.C.  
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ BİYOKİMYA ANA BİLİM DALI

HİDATİK KİST SIVISI UYGULAMASININ KOLOREKTAL  
ADENOKARSİNOM (CACO-2) HÜCRE HATTINDA İNFLAMATUAR  
YANITLAR VE EPİTELYAL-MEZENKİMAL GEÇİŞ ÜZERİNE  
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

**Emin YAĞMUR**  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Fatma İNANÇ TOLUN

Jüri Üyesi

Dr. Öğr. Üyesi Hasan DAĞLI

Jüri Üyesi

Dr. Öğr. Üyesi Ömer ERDOĞAN

KAHRAMANMARAŞ-2024

## TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada, alıntı yapılan her türlü kaynağa eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Emin YAĞMUR

Bu araştırma, 2023/6-4 YLS kodlu proje olarak Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından desteklenmiştir.

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

## ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesinde ve yüksek lisans dönemim boyunca katkı ve yardımlarını esirgemeyen bilgi ve deneyimleriyle bana hep yol gösteren KSÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya ABD öğretim üyelerinden, çok değerli saygı değer danışman hocam Prof. Dr. Fatma İNANÇ TOLUN'a

Tez projemin planlanmasında ve konumun belirlenmesi aşamasında, aynı zamanda laboratuvar imkanlarını ve malzemelerini bana mükemmel bir şekilde sunan ve deneylerimi yaparken tecrübeleriyle her zaman ve her koşulda bana destek veren, öte yandan hedef ve ideallerimin genişlemesine katkı sağlayan, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Meslek Yüksek Okulu öğretim üyelerinden çok değerli ve saygıdeğer hocalarım Doç. Dr. İpek BAYSAL'a ve Doç. Dr. Serra ÖRSTEN'e

Tez çalışmalarım süresince katkı ve yardımlarını esirgemeyen KSÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya ABD öğretim üyelerinden saygı değer hocalarım Prof. Dr. Ergül BELGE KURUTAŞ'a, Prof. Dr. Metin KILINÇ'a, Dr.Öğr. üyesi Muhammed SEYİTHANOĞLU'na ve Dr.Öğr.üyesi Hasan DAĞLI'ya

Laboratuvarda beraber çalışmaktan mutluluk duyduğum değerli arkadaşlarım, Merve Nur SARIKAYA'ya ve Onur BOZKURT'a

Son olarak ise beni topluma yararlı bir birey olarak yetiştirip büyütme gayesinde olan ve yüksek lisans eğitimim boyunca maddi ve manevi desteklerini her an üzerimde hissettiğim değerli AİLEM'e teşekkürü bir borç bilirim.

**Eylül 2024**

**Emin YAĞMUR**

# HİDATİK KİST SIVISI UYGULAMASININ KOLOREKTAL ADENOKARSİNOM (CACO-2) HÜCRE HATTINDA İNFLAMATUAR YANITLAR VE EPİTELYAL-MEZENKİMAL GEÇİŞ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Yüksek Lisans Tezi

Emin YAĞMUR

ÖZET

Bu tez çalışmasında, İnsan kolorektal adenokarsinom (Caco-2) hücre hattı ve sağlıklı kolon epitel (CoEpi) hücre hattı kullanılacaktır. Caco-2 ve CoEpi hücreleri üzerinde, çeşitli konsantrasyonlar da, Hidatik Kist Sıvısı (HKS) uygulamasının, çalışılan hücre gruplarının proliferasyonu üzerine etkisi incelenecektir. Ardından olası, hücre içi proinflamatuvar ve antiinflamatuvar sitokinlerin (TNF-alfa, IL-4, TGF- $\beta$ ) salınımında etkisinin, Enzyme – Linked Immunosorbent Assay (ELISA) yöntemiyle konsantrasyonlarının belirlenmesi ve total RNA izole edilerek sinyal proteinlerinin ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

HKS uygulamasından sonra Caco-2 hücrelerinin Epitelyal Mezenkimal Geçiş (EMT) sürecinde, EMT'yi indükleyici etkiye sahip TGF- $\beta$  sinyal proteininin ELISA yöntemiyle konsantrasyonunun belirlenmesi ve sonrasında qRT-PCR yoluyla ekspresyon düzeyi belirlenecektir.

Bu bağlamda vimentin ve e-kaderin gen ekspresyonlarıyla karşılaştırılarak inflamatuvar sinyal proteinlerinin ve EMT arasındaki direnç mekanizmasının aydınlatılması hedeflenmektedir. HKS uygulaması sonucunda proinflamatuvar sitokinlerin ve antiinflamatuvar sitokinlerin, hücre proliferasyonuna etkisini, hücre proliferasyon deneyi XTT yöntemiyle belirlenecektir. Bunun yanı sıra hücre içi inflamatuvar yolların düzenlenmesi basamağında ise total bazda, sinyal proteinlerinin ekspresyonu ve hücre proliferasyonu üzerine etkisini değerlendirerek Caco-2 ve CoEpi hücre hattında olası anti-kanserojen veya kanserojen etkisinin, *in vitro* olarak araştırılması hedeflenmektedir.

Proje sonrasında erişilecek çıktılar; Hücre proliferasyon deneyi sonucunda hücrenin genel durumu şematize edilerek, hücredeki belirlenen sinyal proteinlerin ekspresyon profilleriyle ilgili sonuçlar karşılaştırılacak olup metastaz sürecine dair pozitif veya negatif yönde çıkarımların yapılması planlanacaktır. TNF- $\alpha$  ve IL-4 sitokinlerinin birbirlerine karşı antagonistik bir şekilde çalıştığı bilinmektedir. Ayrıca TNF- $\alpha$  ve TGF- $\beta$  sinyal proteininin EMT programının aktif veya pasif hale gelmesinde iki önemli etken olarak da ele alınmaktadır.

Hücrede IL-4 düzeyi düşük, TNF- $\alpha$  ve TGF- $\beta$  konsantrasyonlarının yüksek olması kötü prognozla ilişkilendirilecektir. Aksi takdirde sonuçlar ters yönde akış gösterdiğinde, negatif bir sonuca ulaşılacaktır.



**Anahtar Kelimeler :** Kolorektal Kanser , EMT, Hidatik kist sıvısı, İnflamasyon, Sitokin

**Sayfa Adedi** : 76

**Danışman** : Prof. Dr. Fatma İNANÇ TOLUN

**INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF HYDATIC CYST FLUID APPLICATION  
ON INFLAMMATION RESPONSES AND EPITHELIAL-MEENCHYMAL  
TRANSITION IN COLORECTAL ADENOCARCINOMA (CACO-2) CELL LINE**

**Master Thesis**

**Emin YAĞMUR**

**ABSTRACT**

In this thesis study, human colorectal adenocarcinoma (Caco-2) cell line and healthy colon epithelial (CoEpi) cell line will be used. The effects of Hydatid Cyst Fluid (HCF) application at various concentrations on the proliferation of the studied cell groups will be examined on Caco-2 and CoEpi cells. Then, the potential effects on the release of intracellular proinflammatory and anti-inflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-4, TGF- $\beta$ ) will be determined by measuring their concentrations using the Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) method, and total RNA will be isolated to determine the expression levels of signal proteins.

After the application of Hydatid Cyst Fluid (HCF), the concentration of the TGF- $\beta$  signaling protein, which has an EMT-inducing effect, will be determined by the ELISA method during the Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) process of Caco-2 cells, and subsequently, its expression level will be determined by qRT-PCR.

In this context, by comparing the gene expressions of vimentin and E-cadherin, the aim is to elucidate the resistance mechanism between inflammatory signaling proteins and EMT. The effects of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines on cell proliferation following HCF application will be determined by the XTT cell proliferation assay. Additionally, in the regulation step of intracellular inflammatory pathways, the expression of signaling proteins and their effect on cell proliferation will be evaluated in total, and the potential anti-carcinogenic or carcinogenic effect on Caco-2 and CoEpi cell lines will be investigated in vitro.

The expected outcomes of the project are: As a result of the cell proliferation assay, the overall condition of the cell will be schematized, and the results related to the expression profiles of the identified signaling proteins in the cell will be compared. This will allow for positive or negative inferences regarding the metastasis process. TNF- $\alpha$  and IL-4 cytokines are known to work antagonistically against each other. Additionally, TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$  signaling

proteins are considered two important factors in the activation or inactivation of the EMT program. Low IL-4 levels and high concentrations of TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$  in the cell will be associated with a poor prognosis. Otherwise, if the results show the opposite trend, a negative outcome will be reached.



**Keywords** : Colorectal Cancer, EMT, Hydatid Cyst Fluid, Cytokine , Inflammation

**Number of Pages** : 76

**Supervisor** : Prof. Dr. Fatma İNANÇ TOLUN

# İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR .....	I
ÖZET.....	II
ABSTRACT .....	IV
İÇİNDEKİLER.....	VI
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	IX
1. GİRİŞ VE AMAÇ .....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Dünya Kanser İstatistiği Verileri.....	2
2.2. Kalın Bağırsak (Kolon) Ve Rektum .....	3
2.3. Kolorektal Kanser .....	4
2.3.1. Kolorektal kanserin teşhisi ve tanı yöntemleri .....	4
2.3.1.1. Dışkıda gizli kan testi (DGKT) .....	5
2.3.1.2. Fleksibl sigmoidoskopi (FS) .....	5
2.3.1.3. Kolonoskopi .....	5
2.3.1.4. Çift kontrastlı Ba grafisi .....	5
2.4. Kanserlerin Karakteristik Özellikleri .....	6
2.4.1. Hücre çoğalması ve büyümesinin düzenlenmesi .....	6
2.4.2. Kanser hücresinin metabolizmasının programlanması .....	7
2.4.3. Glikoz ve Glutamin metabolizması.....	8
2.4.4. Onkogenik süreç.....	9
2.5. Kanser Mikroçevresi Ve İmmün Sistem .....	9
2.5.1. Tümör hücrelerinde inflamasyon .....	11
2.6. Sitokinler .....	12
2.6.1. Sitokinlerin sınıflandırılması.....	13
2.6.2. Anti ve proinflamatuvar sitokinler .....	13
2.6.3. İnterlökin-4 (IL-4).....	14
2.6.4. IL-4 Reseptörü ve sinyal modeli .....	15
2.6.5. Tümör nekrotizan faktör- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ).....	17
2.6.6. TNF- $\alpha$ Reseptör yapısı ve sinyal modeli.....	17
2.7. Dönüştürücü büyüme faktörü – $\beta$ (TGF- $\beta$ ) .....	19
2.7.1. TGF- $\beta$ reseptörleri ve sinyal modeli .....	19
2.8. Epitelyal Mezenkimal Geçiş (EMT) .....	21

2.8.1. Kanser hücresinin metastazı.....	22
2.8.2. Tümör hücre – hücre adezyonu.....	23
2.8.2.1. E-kaderin.....	23
2.8.2.2. Vimentin.....	25
2.9. Parazit İnvazyonu Ve İmmün Yanıt.....	26
2.9.1. <i>Echinococcus granulosus</i> ve konak mikro çevresi.....	26
2.9.2. Hidatik kist ve veziküllerin yapısı.....	28
2.9.3. Parazit hücresinin yüzey bileşenleri ve ortak antijenler.....	29
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	31
3.1. Kullanılan Malzemeler ve Cihazlar.....	31
3.2. Hücre Hatlarının Çözdürülüp, Pasajlanması.....	32
3.3. Hücre hatlarının Kültürü.....	32
3.4. Caco-2 Ve CoEpi Hücre Hattının Hidatik Kist Sıvısıyla Muamelesi.....	33
3.5. XTT Hücre Proliferasyon Testi.....	34
3.6. Hücre Gruplarından Total RNA İzolasyonu.....	35
3.7. İzole Edilen Total RNA'ların Saflık ve Kalitesinin Belirlenmesi.....	36
3.8. Revers transkriptaz PCR (RT-PCR) ile cDNA sentezinin hazırlanması.....	37
3.8.1. cDNA PCR protokolü.....	38
3.9. qRT-PCR ile Gen Ekspresyon Profillerinin Araştırılması.....	39
3.9.1. Kullanılan primerler.....	40
3.9.2. qRT-PCR Reaksiyon bileşenleri.....	40
3.10. ELISA Testlerinin Yapılması.....	41
3.10.1. Yöntemin prensibi.....	41
3.10.2. Standart dilüsyonlarının hazırlanması.....	42
3.10.3. IL-4, TNF- $\alpha$ ve TGF- $\beta$ ELISA testlerinin uygulanması.....	43
3.11. BCA Protein Miktarı Tayini.....	44
4. BULGULAR.....	46
4.1. Hidatik Kist Sıvısı Muamelesinin Caco-2 ve CoEpi Hücre Hatlarındaki Hücre Canlılığına Etkisinin XTT Yöntemiyle Belirlenmesi.....	46
4.2. CoEpi Ve Caco-2 Hücre Hatlarına Ait Mikroskop Görüntüleri.....	47
4.3. ELISA Testlerinin BCA Protein Miktarı Testi ile Oranlanmış sonuçları.....	48
4.3.1. IL-4 ELISA sonuçları.....	48
4.3.2. TGF- $\beta$ ELISA sonuçları.....	49
4.3.3. TNF- $\alpha$ ELISA sonuçları.....	50
4.4. qRT-PCR Rölatif Gen Ekspresyonu Sonuçları.....	51
4.4.1. IL-4 rölatif gen ekspresyonu sonuçları.....	51
4.4.2. TGF- $\beta$ 1 rölatif gen ekspresyon sonuçları.....	52

4.4.3. TNF- $\alpha$ Rölatif gen ekspresyonu .....	53
4.4.4. Vimentin gen ekspresyon sonuçları .....	54
4.4.5. Caco-2 E-Kaderin gen ekspresyon sonuçları .....	55
5. TARTIŞMA .....	56
6. SONUÇ VE ÖNERİLER .....	62
7. KAYNAKÇA .....	64
8. TABLOLAR DİZİNİ .....	71
9. ŞEKİLLER DİZİNİ .....	72
10. EKLER DİZİNİ .....	74
11. EKLER .....	75
12. ÖZGEÇMİŞ .....	76



## SİMGELER VE KISALTMALAR

<b>AJCC</b>	:American Join Commite of Cancer
<b>KE</b>	:Kistik Ekinokokkozis
<b>HKS</b>	:Hidatik Kist Sıvısı
<b>CACO-2</b>	:Kolorektal Adenokarsinom Hücre Hattı
<b>CoEpi</b>	:Kolon Epitel Hücre Hattı
<b>KRK</b>	:Kolorektal Kanser
<b>EMT</b>	:Epitelyal Mezankimal Geçiş
<b>MET</b>	:Mezenkimal Epitelyal Geçiş
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	:Tümör Nekroz Faktörü alfa
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	:Tümör Dönüşüm Faktörü beta
<b>IL-4</b>	:Interlökin-4
<b>IARC</b>	:Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı
<b>DSÖ</b>	:Dünya Sağlık Örgütü
<b>HNPCC</b>	:Herediter Nonpolipozis Kolorektal Kanser
<b>FAP</b>	:Familiyal Adenomatöz
<b>ÜK</b>	:Ülseratif Kolit
<b>DGKT</b>	:Dışkıda gizli kan testi
<b>FS</b>	:Fleksibl sigmoidoskopi
<b>kD</b>	:kilo Dalton
<b>MCT4</b>	:Monocarboxylate Transporter 4
<b>CTLs</b>	:Sitotoksik T Hücreleri
<b>DNA</b>	:Deoksiribonükleik Asit
<b>RNA</b>	:Ribonükleik Asit
<b>NK</b>	:Natural Killer
<b>VCAM</b>	:Vasküler Hücre adezyon molekülü
<b>GM-CSF</b>	:Granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör
<b>JAK</b>	:Janus Kinaz

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Antitümör immün yanıtlar ve bazı patojen türleri, tümör oluşum riskini azaltıcı bir dizi sinyal veya kanserin gerilemesine yol açabilen etkiler gösterebilmektedir. Enfeksiyöz ajanlar ve bunların ürünleri, kanser gelişimini veya büyümesini pozitif veya negatif olarak modüle edebilen çok çeşitli konakçı yapıların, immün yanıtlarını düzenleyebildiği, çeşitli araştırmalarda bildirilmiştir. Enfeksiyon aracılı bağışıklığın karsinogenez üzerindeki bu, ikili etkisini yönlendiren faktörler tam olarak anlaşılmamıştır. Patojen mikroorganizmalar konak hücresinde karsinogenez öncüsü inflamatuvar sürecin aktivasyonuna yol açmaları nedeniyle kanser gelişimi ile ilişkilendirilmiştir (1). Kistik Ekinokokkozis (KE), *Echinococcus granulosus sensu lato* tür kompleksi içerisinde bulunan parazitlerin larva formunun ara konaklarda ve insanlarda neden olduğu zoonotik bir enfeksiyon hastalığıdır (2). *E. granulosus* ve bazı tümör tiplerinde bulunan ortak antijenler, bağışıklık yanıtlarını modüle ettiği ve kanser karşıtı aktiviteyi teşvik ettiği bildirilmektedir. Ancak, elde edilen sonuçlar farklı hücre kültürü veya hayvan modellerinde anti-kanserojen veya kanserojen etkisi olabileceğini göstermektedir (3).

Hidatik kist sıvısının (HKS), Caco-2 hücre hattının Epitelyal-mezenkimal geçişi (EMT) tetiklediği bazı çalışmaların raporlarında sunulmuştur (4). Ancak bu dönüşümün aşamalarının, inflamatuvar süreçteki rolü araştırılmamıştır. Kanser gelişiminde inflamatuvar süreçlerin araştırılması önem taşımaktadır. Sitokinler bağışıklık, inflamasyon ve hematopoeze aracılık eden ve aracı kısımları düzenleyen sinyal proteinleridir. İnflamatuvar sitokinler hücre içerisinde çeşitli yolakları modüle ederek hücredeki inflamasyon mekanizmasının başlamasını ve ilerlemesini indüklerler (5). EMT, embriyonik gelişimin, yara iyileşmesinin ve tümör hücresi göçünün merkezi bir unsurudur. Antiinflamatuvar ve proinflamatuvar sitokinlerin EMT geçişinin desteklenmesinde önemli antagonist işlevlerinin olduğu literatürde sıkça belirtilmektedir (6). Bu çalışmanın amacı, çeşitli konsantrasyonlardaki HKS uygulamasının Caco-2 ve CoEpi hücre hattının proliferasyonu üzerine etkisinin incelenmesini takiben, inflamatuvar sitokinler TNF- $\alpha$ , IL-4 ve EMT geçişinin düzenleyici sinyal yolağı TGF- $\beta$  aktivitelerinin sırasıyla ELISA ve qRT-PCR ile sitokin ve ekspresyon düzeyinde incelenmesini amaçlamaktadır. Çalışma kapsamında, HKS'nin Caco-2 ve CoEpi hücre hattında olası kanserojen etkileri karşılaştırılarak, moleküler düzeyde araştırılması planlanmaktadır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Dünya Kanser İstatistiği Verileri

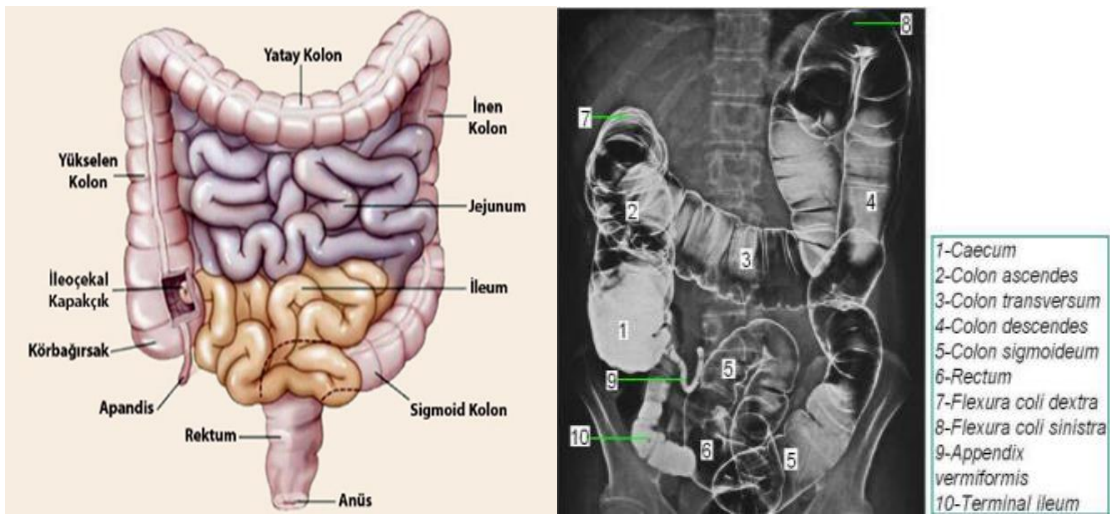
Dünya sağlık örgütü (DSÖ) tarafından 2019'da yapılan tahminlere göre kanser, 183 ülkeden 112'sinde 70 yaşından önce yaşanan ölümlerin birinci veya ikinci önde gelen sebepleri arasına girmektedir. Diğer 23 ülkede ise üçüncü ve dördüncü sırada yer almaktadır. Ulusal kanser Araştırma merkezi 2020 yılında kanser insidansı ve mortalite tahminlerine dayanarak, dünya geneli kanser yükü raporunu sunmuştur. Bu rapora göre dünya genelinde 2020 de 19.3 milyon yeni kanser vakası bildirilmiştir. Bunun yanı sıra yaklaşık olarak 10 milyon insanın kanser nedeniyle ölümü meydana gelmiştir. Kadınlarda meme kanseri tahmini olarak 2.3 milyon yeni vaka (%11.2) ile akciğer kanserini aşarak en sık teşhis konulan kanser türü haline gelmiştir. Sırasıyla Akciğer (%11.4), kolorektal (%10.0), prostat (%7.5), mide kanseri (%5.0) oranları meme kanserini izledi. Akciğer kanseri, tahmini 1.8 milyon ölümlerle (%18), kanser ölümlerinin başında yer aldı; akciğer kanserini sırasıyla kolorektal (%9.4), karaciğer (%8.3), mide (%7.7) ve kadın meme (%6.9) kanserleri takip etti. Bunun yanı sıra Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (IARC) verilerine göre ise kolorektal kanser, dünya genelinde kansere bağlı ölümlerin %9.4'ünü oluşturmaktadır. Bu bağlamda kansere bağlı ölümlerin ikinci en yaygın sebebini oluşturmaktadır (7).

Küresel kanser insidansı raporlarına göre, 2020'ye oranla %47 artışla 2040 yılında 28.4 milyon vakaya ulaşması öngörülmektedir. Bu vakalar demografik değişikliklerden kaynaklanan geçiş yapan ülkelerde (%64 ila %95) geçiş yapmış ülkelerdeki (%32 ila %56) artıştan daha büyük olacaktır. Ancak bunun küreselleşme ve büyüyen ekonomi ile ilişkilendirilen risk faktörlerinin artmasının da etkisi olabilir (8). Genel olarak kanser insidansı ve mortalite yükü dünya genelinde hızla artmaktadır. Bu hem nüfusun yaşlanması ve büyümesi hem de kanserin ana risk faktörlerindeki prevalansı ve dağılımındaki değişiklikleri yansıtmaktadır (9).

## 2.2. Kalın Bağırsak (Kolon) Ve Rektum

Kalın bağırsak, gastrointestinal sistemde ince bağırsaktan sonra bulunan 1,5 ila 2 metre arasında içi boşluklu bir organdır. Temel görevi; mide, ince bağırsak, pankreas ve safra kesesinden gelen günlük 2 litre civarındaki su, besin artıkları ve vücut salgılarından zengin bağırsak içeriğindeki suyu ve moleküllerin emilimini sağlamak, sonrasında geri kalan posadan dışkı oluşturmak ve bunun dışarıya atılımını kontrol etmektir. Kalın bağırsağın diğer bir adı ise kolondur. Kolonun son 25 ila 30 cm aralığında ki olan kısmına ise Rektum adı verilmektedir. Kolonun epitelyal yüzey alanı ince bağırsaktan daha azdır. Boyu da İnce bağırsaktan daha kısadır. Kolonun sağ yarısı su ve elektrolit emiliminden sorumluyken diğer sol yarısı ise dışkı oluşumundan sorumludur. Dışkılama kontrolü ise temel olarak rektum ve anüs' ün görevidir. Kolonda yaşayan bakterilerin emilimi de yine burada gerçekleşmektedir (10).

Rektum 13 ila 15 cm uzunluğunda, sigmoid kolon ile anal kanal üst sınırı arasında kalan gastrointestinal sistemin son parçası konumundadır. Rektum pelvis içerisinde yer alır. Enterik yolun bu kısmı kolondan farklıdır. Rektumun lümen içerisinde 2 veya 3 eğriliği vardır. Bu eğrilikler, Houston valfleri adı verilen submukozal kıvrımlar tarafından oluşturulmaktadır. Rektumun yan ve ön tarafının üçte birini periton tabakası kaplamaktadır. Periton tabakasıyla kaplanmayan diğer kısım ise periton örtüsü kaplanmadan kalır. Endopelvik fasya rektumun bu kaplanmayan kısmını sarmaktadır. Rektumu saran bu fasyanın yan kısmına ayrıca lateral rektal sap da denir. Rektum bu bağlamda sakral kemiğinin ön yüzeyinden uzanan güçlü bir endopelvik fasyaya bağlı olarak bulunur (Şekil 1) (11).



Şekil 1. Kolon ve rektumun anatomik yapısı (11).

## 2.3. Kolorektal Kanser

Kolorektal kanser dünya çapında en sık rastlanılan 3. Kanser türü arasında yer almaktadır. Kadınlarda ve erkeklerde eşit sıklıkta vakalar bildirildiği saptanmıştır. Kolorektal kanser de (KRK) hastalığın seyri için son yıllardaki raporlarla karşılaştırıldığında, kolon karsinomlarının yerleşim bölgesinde sağ yönde kayma olduğu bildirilmektedir. KRK gelişiminde hem genetik olarak hem de çevresel faktörlerin etkilerinin, büyük oranda hastalığa yatkınlığı artırıcı bulgular içermektedir. Genetik yakınlığın KRK riskini önemli düzeyde artırdığı bilinmekle birlikte öte yandan KRK'lerin çoğu ailesel değil sporadiktir. Familiyal adenomatöz (FAP) ve herediter nonpolipozis kolorektal kanser (HNPCC), total alana bakıldığında tüm KRK'lerin ortalama olarak %5 gibi bir oranını içermektedir. Ülseratif kolit (ÜK) gibi hastalarda özellikle tüm kolon tutulumu varsa bu bağlamda ayrıca hastalık uzun süre boyunca devam ettiyse, bu durum KRK gelişme riskini önemli ölçüde artırmaktadır. Daha önce hastalık geçmişinde KRK gelişimi olan hastalar diğer popülasyonlara göre 3 kat, tekrar kanser gelişimi açısından daha fazla risk altında olduğu da raporlarda sunulmaktadır. KRK'da en sık tespit edilen bulgular şöyledir;

- Karın ağrısı
- Bağırsak florasında ve akışkanlığında değişiklik
- Güç kaybı, halsizlik
- Kilo kaybı
- Hematokezya

gibi bulgular kanserin yerleştiği bölgeyle beraber, kısmen farklılıklar gösterse de genel bir ön tanıyı teşkil etmektedir (12).

### 2.3.1. Kolorektal kanserin teşhisi ve tanı yöntemleri

Kolorektal karsinomun gelişimi ile ilişkilendirilen genetik durumlar, klinisyenin kolorektal karsinom tanısı düşünmesini gerektiren durumlar olarak görülmektedir. Tanının koyulması sırasında hastaya ait yaş ve etnik köken, primer karsinomun yerinin teşhisi noktasında önemli veriler sunmaktadır. Kolorektal karsinomda hastalığın seyri ve hastanın yaşı, birbirine antagonist etkiye sahiptir. Genç (40 yaş) hastalar, orta yaşlı (55 yaş) hastalara göre daha kötü

sonuçlara sahip olabilir. Ancak 70 yaş üstü hastalar daha erken evre hastalıkla başvuru yapmaktadırlar.

#### 2.3.1.1. Dışkıda gizli kan testi (DGKT)

DGKT'nin temel prensibi polip ya da daha küçük bir kitlenin yüzeyinde az miktarda meydana gelen kanamaları saptamaktır. Günümüzde en çok kullanılan test guaiac tabanlı, peroksidaz aktivitesiyle temelli olan testlerdir.

#### 2.3.1.2. Fleksibl sigmoidoskopi (FS)

Tarama yapan klinisyenin kolonu direkt olarak görmesi ve oluşan lezyonlardan biyopsi örneklerinin alınabilmesi açısından büyük kolaylık sağlar. Taramanın maliyeti ve komplikasyon oranı düşüktür. FS taramalarında 1 cm'den büyük polipler veya herhangi bir çapta adenomatöz polip saptandığı takdirde klonoskopi yapılması uygun görülür.

#### 2.3.1.3. Kolonoskopi

Tanı ve tarama konusunda kullanılan en popüler yöntemlerden birisidir. Aynı zamanda Kolonoskopi de 1 cm boyutunun altındaki poliplerin çoğu zaman teşhis edilemediği de görülmektedir. Kolonoskopi, bir adenomun kansere dönüşme süresi boyunca deneysel araştırmalarla beraber yaklaşık 10 yıl sürdüğü için bu bağlamda kolonoskopi tarama aralığı 10 yıl şeklinde önerilmektedir.

#### 2.3.1.4. Çift kontrastlı Ba grafisi

Çift kontrastlı Ba grafisi, DGKT ve FS taramalarından daha sık kullanılan bir yöntemdir. Ba grafisinde pozitif bir bulgu saptandığı takdirde kolonoskopi yapılmasına gerek duyulmaktadır (12).

## 2.4. Kanserlerin Karakteristik Özellikleri

Kanserlerin belirgin ve baskın bir takım özellikleri mevcuttur. Bu özellikler proliferatif sinyali sürdürme, tümör büyüme baskılayıcılardan kaçınma, hücre ölümünden kaçınma ve replikatif ölümsüzlüğe yatkın olma, invazyonu aktif etme ve metastazı harekete geçirme gibi birtakım gelişmiş durumları içermektedir. Tümörlerin sadece proliferasyon geçiren hücrelerden ibaret olmadığı bilinmektedir. Aksine birbiriyle heterotipik etkileşimlere katılan çeşitli hücre tiplerinden meydana gelen karmaşık yapıdaki mekanizmalardan oluşmaktadır. Kanser hücrelerinin en temel özellikleri arasında kronik çoğalmı sürdürme yetenekleri ön plan da tutulmaktadır. Normal dokular, büyüme teşvik eden sinyallerin üretimini ve salınımı kontrol etmektedir. Bu sinyaller hücrenin, büyüme ve bölünme döngüsüne girişini ve ilerlemesini yönlendiren temel dizilerden oluşmaktadır. Böylece hücre sayısının hemoostazisi korunması ve normal dokuların fonksiyonlarının sürdürülmesini sağlamış olur (13).

Kanser biyolojisinin yoğun ve karmaşık özellikleri altı temel belirgin hat üzerinde belirlenmeye çalışılmıştır. Bunlar;

- Büyüme sinyallerine bağımsızlık,
- Anti büyüme sinyallerine duyarsızlık,
- Apoptozdan kaçma
- Sürekli anjiogenezle birlikte doku invazyonu
- Kanser hücre metabolizmasının yeniden programlanması

Şeklinde sıralanmaktadır. Daha sonrasında ise kanserin bu karakteristik özelliklerine iki yeni model daha eklenerek, Genom istikrarsızlığı ve mutasyon ile tümörü teşvik eden iltihap şeklinde genişletilmiştir (14).

### 2.4.1. Hücre çoğalması ve büyümesinin düzenlenmesi

Kanser hücrelerinin temel özelliklerinden birisi de sürekli bir şekilde hücre çoğalması ve hücre büyüme - durdurma mekanizmasının önlenmesidir. Bu süreçte birçok gen ve protein özellikle kinaz ve kinaz reseptörleri önemli bir alan teşkil etmektedir (15).

Hücre bölünmesini düzenleyen ve kontrol eden mekanizmadaki bozukluk, Kontrolsüz hücre bölünmesine ve aşırı hücre çoğalmasına neden olur. Hücre büyümesinden ve

bölünmesinden sorumlu biyokimyasal düzenleyiciler, hücre çekirdeğindedir ve ekstrasellüler moleküllerle (mitojenler) yönlendirilir. Hücre büyümesini uyaran moleküller sitokinler ve büyüme faktörleridir. Büyüme faktörleri ise hücre büyümesinin ve proliferasyonunun başlamasında önemli rolü olan; hücre büyümesini uyaran, inhibe eden veya farklı özelleşmiş hücre tiplerine dönüşümünü başlatan peptid molekülleridir (16).

#### **2.4.2. Kanser hücresinin metabolizmasının programlanması**

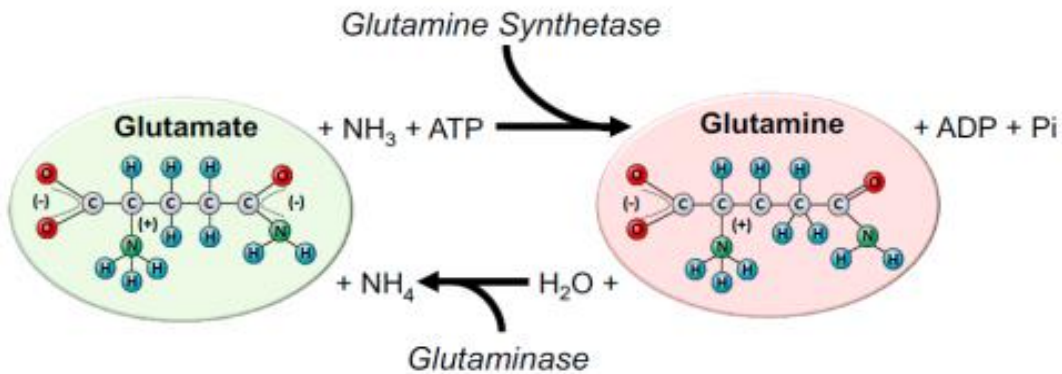
Birçok araştırma, kanserin iki önemli özelliğini daha ortaya çıkarmıştır. Bunlar; yeniden programlanmış enerji metabolizması ve bağışıklık aracılı yok edilmeye karşı direnç olarak ele alınmaktadır (17). Tümör hücreleri, enerji sağlamak için aerobik koşullar altında bile glikozu kullanır. Bu da pirüvatın ekstrasellüler laktata dönüşmesine neden olmaktadır (18). Hipoksi tümörlerde laktat üretimini uyarır. Hipoksi ayrıca laktatı, hücre mebranları boyunca taşıyan, protonla eşleşmiş bir taşıyıcı olarak işlev gösteren Monocarboxylate Transporter-4'ün (MCT4) ifadesini de indükler (19).

Bu nedenle hipoksi tümör hücreleri tarafından yüksek laktat salınımından sorumlu, warburg etkisini artırır. Metabolik yeniden programlamayla, oksidatif fosforilasyondan glikoza değişim, fırsatçı besin alımı modlarını kullanma ve artan lipid biyosentezinde değişiklikler meydana gelir. Kanser hücrelerinde warburg etkisi de dahil olmak üzere birçok metabolik değişiklik tümör mikroçevresini önemli ölçüde etkilemektedir (20). Yüksek besin tüketim oranlarına bağlı olarak, tümör mikroçevresinde besin ve oksijen azlığı görülmektedir. Bu nedenle metabolik plastisite ile kanser hücreleri metabolik yolları tekrar yapılandırır. Alternatif besinler kullanma ve diğer hücrelerle etkileşime geçerek ve bu stres ortamını doğru yöneterek hayatta kalmayı başarırlar. Bu bağlamda proliferatif etkinlikleri devam eder. Metabolik genlerdeki mutasyonlar veya ekspresyonundaki değişiklikler, metabolik yolları yeniden programlar. Normal bir hücre grubunun diğer kaynaklardan sentezleyebileceği nonesansiyel besinlere kanser hücreleri bağımlılıklarını geliştirir. Ayrıca bu enzimlerin aktivite kaybı, metabolit ara ürünleri ve prekürsörleri etkilediği gibi ikinci olarak, nonmetabolik fonksiyonları da etkiler (21).

### 2.4.3. Glikoz ve Glutamin metabolizması

Basit bir şeker olan glikoz yaşam için en önemli karbonhidratlardan biridir. Hücreler glikozu bir enerji kaynağı ve metabolik reaksiyonlarda bir ara ürün olarak kullanmaktadır. Glikoz katabolizması, glikoz ve trikarboksilik asit döngüsü basamaklarını içermektedir. Glikoz tepkimelerinde glikoz pruvata çevrilirken ortaya bir miktar enerji açığa çıkmaktadır. Açığa çıkan pruvat matrikste oksidatif dekarboksilasyonla asetil CoA'ya dönüşür. Çeşitli metabolik yollarda oluşan asetil CoA'nın tamamen oksitlenmesi için trikarboksilik asit döngüsüne girmesi gerekir. Döngü sonunda kanser hücresinin kullanabildiği karbondioksit, su ve enerji açığa çıkar. Kanser hücreleri sürekli proliferasyon geçirdiklerinden dolayı özellikle yaşamsal faaliyetlerini devam ettirebilmek için glukozu pek fazla ihtiyaç duyarlar. Bu nedenle hücrenin proliferasyonu ile ilgili biyosentez gerektiren ihtiyaçlarını karşılamak için dışarıdan besin alımını artırmak zorunda kalmaktadırlar (22).

Glutamin kanda en çok bulunan nötral esansiyel bir amino asittir. Vücuttaki birçok doku glutamin sentezleyebildiği için normal metabolik durumlarda esansiyel olmayan bir aminoasit olarak da kabul edilmektedir. Ancak bazı durumlarda metabolik tüketim hızı sentez hızından yüksek olmaktadır bu durumda vücutta üretilen glutamin yetersiz kalır. Buna bağlı olarak esansiyel konuma geçerek dışarıdan alınması sağlanır. Glutamin yapısında amin grubu bulundurduğu için, buna bağlı olarak nükleik asit sentezinde, nitrojen taşıyıcısı olarak önemli bir görev alır. Glutamin metabolizmasının bir yan ürünü olan glutatyon hücre içerisinde bulunan ve en yoğun antioksidanlardan biridir. Glutamin azotun organlar arasında taşınmasında da önemli roller oynar. Enerji ve nitrojen taşıma görevlerinde bulunduğu gibi glikoneogenez ve protein sentezinin de önemli düzenleyicileri arasındadır ( Şekil 2.) (23).



**Şekil 2.** Glutamin sentetaz kaynak olarak glutamat ve amonyak (NH<sub>4</sub>) kullanarak biyosentezi katalizler. Reaksiyon boyunca 1 ATP tüketilmektedir (24).

#### **2.4.4. Onkogenik süreç**

Kanserlerin birçoğu hücrenin kalıtsal faaliyetlerindeki değişiklikler ile ilgili olarak ortaya çıkmaktadır. Diğer yandan ise karsinogenezin başlatılmasını ve canlı hücrelerdeki DNA'nın canlılığının hayatı boyunca mutajenlerle olan maruziyeti sırasında kalıcı hasarlara yol açılarak, DNA tamir mekanizmasının dışında replikasyon hataları oluşmasıyla şekillendiği bilinmektedir. Spontan veya kalıcı replikasyon hataları sonucunda gelişen mutasyonlar, tümör hücrelerinin büyümesi ve çoğalmasını etkileyerek proliferasyon yeteneği gelişmiş bir kanser klonunun oluşmasını sağlar. Onkogenik süreç neoplastik dönüşüm ve neoplastik gelişim şeklinde iki başlık altında incelenmektedir. Genetik değişiklik replikasyon aracılığı ile hücrede kalıcı hale geldiği için, normal süreçten uzak bir şekilde çoğalan ve dönüşen hücreler bu mutasyonların sonucudur. Mutasyonların ana sebebi ise DNA daki hataların onarılmayarak replikasyon sonucu kalıcı hale gelmesinden kaynaklanır. Replikasyon esnasında kalıcılığı belirlenen kritik mutasyonlar ise hücre büyüme genlerinde, protoonkogenlerde, tümör baskılayıcı genler ve tümör baskılayıcı genlerin düzenleyici bölgelerinde ortaya çıkan hücre için hayati öneme sahip mutasyonlardır. Kanser oluşumunda ki birçok faktörün tümör oluşum döngüsünün içinde yer aldığını bilinmektedir. Bakteri ve virüs enfeksiyonları, kalıtsal ve çevresel faktörler, beslenme alışkanlıkları ve endokrin bozucu birçok kimyasal etmenin bu süreçte rol oynadığı ayrıca bilinmektedir (25).

#### **2.5. Kanser Mikroçevresi Ve İmmün Sistem**

İmmünite (bağışıklık) hastalıklar ve daha çok enfeksiyon hastalıklarına karşı direnç olarak tanımlanmaktadır. İmmün sistemin temel işlevi enfeksiyonları engellemek ve aynı zamanda iç ve dış patojenlerin verdiği zararlara karşı immün yanıtları harekete geçiren, kompleks bir savunma mekanizmasıdır. İmmün sistemin belirgin özelliği, özgüllük olup, bu özgüllüğün temelinde, çeşitli yabancı antijenlerin spesifik hücreler olarak tanınmasıdır. Bağışıklık yanıtlarının temel görevi malign hücreleri tanıma ve yok etme hedefini taşımasıdır. Bağışıklık hücresi ve yabancı bir patojen arasındaki doğal ayırım hücrelerdeki DNA ve glikoprotein yapısı da dahil olmak üzere birçok biyokimyasal özelliklerle gerçekleştiği bilinmektedir. En küçük yabancı bir antijen bile bağışıklık sistemi tarafından tespit edilebilir. İmmün sistem, Doğal (innate) ve adaptif (edinilmiş) bağışıklık sistemi olmak üzere iki genel grup altında incelenmektedir Doğuştan gelen bağışıklık yabancı antijenleri, özgül olarak tanıyarak tepki

mekanizmasını oluşturur. Doğuştan gelen bağışıklığın erken savunma mekanizması sayesinde adaptif bağışıklığın savunma spesifikliğini artırır ve güçlenmesini sağlar (26). Doğal bağışıklık çok sayıda hücre, kemokin-sitokin kompleks yapıda bir sistem tarafından düzenlenmektedir. Doğal bağışıklığın hücresel bileşenleri, makrofajlar ,monositler , doğal öldürücü (Natural Killer/NK) hücreler ve nötrofiller gibi fagositoz yeteneği olan hücrelerden meydana gelir (27).

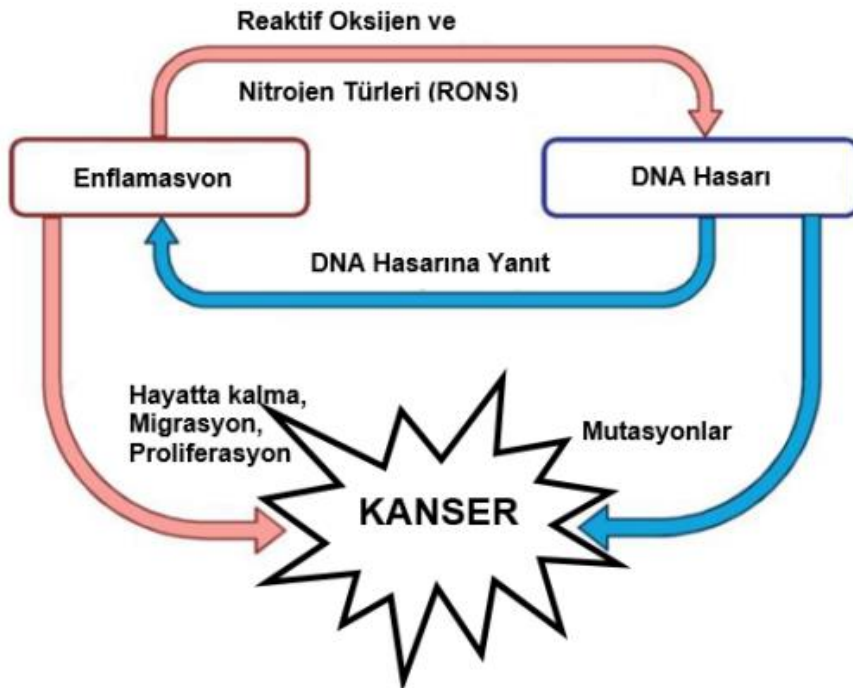
Doğal bağışıklık, adaptif bağışıklık kadar spesifik değildir. Adaptif bağışıklık patojen, toksinler veya tümörler dahil olmak üzere, yabancı ajanlara maruz kalarak gelişmektedir. Adaptif bağışıklığın temel hücre bileşenlerini T-lenfositleri ve B-lenfositleri oluşturmaktadır. T ve B lenfositleri özelleşmiş olarak patojen antijenlerini tanır ve çoğalır. Antijene karşı bir savunma mekanizması geliştirir. Lenfositler ayrıca enfeksiyona karşı yapılan savunmanın immünolojik hafızasını da oluşturmaktadırlar (27). Adaptif immün sistemin içerisinde yer alan, Lenfositler hedefe karşı spesifik bir yanıt geliştirmek için salınır ve patojeni ortadan kaldırmaya yönelik çalışır. Timusta olgunlaşan lenfositlere T-lenfositleri adı verilmektedir. T-lenfositleri hücre aracılı bağışıklık reaksiyonlarından sorumlu olmanın yanı sıra, B hücreleri de dahil olmak üzere çeşitli hücre tiplerinin de fonksiyonel aktivasyonunu koordine etmekten sorumludur. T hücreleri, hücre yüzeyinde bulunan antijen-spesifik reseptörlere bağlı olarak iki tipe ayrılır. Bunlar sitotoksik ve öldürücü T hücreleridir (28). Bu hücreler virüs enfekte veya tümör hücrelerini öldürebilir. Olgun T hücreleri ifade ettikleri T hücre reseptörlerine göre  $\gamma\delta$  ve  $\alpha\beta$  olmak üzere iki ana gruba ayrılır.  $\alpha\beta$ T hücreleri ise  $CD8^+$  sitotoksik T hücreleri (CTLs) ve  $CD4^+$  T yardımcı hücreleri (Th) olarak işlevsel mekanizmalarına göre ayrıntılı bir şekilde sınıflandırılmaları mevcuttur. Yardımcı T hücreleri;  $Th_1$ ,  $Th_2$ ,  $Th_{17}$ , T regülatör ve ayrıca doğal öldürücü T (Natural Killer T / NKT) hücrelerini de içermektedir (29).

Kemik iliğinde oluşan lenfositlere B-Lenfositler adı verilir. B-lenfositleri bağışıklık yanıtları için vücudun antikor üretim merkezi olarak ta bilinmektedir. Aynı zamanda T yardımcı hücreleri için ise, antijen sunan hücreler olmasıyla büyük bir öneme sahiptir. T yardımcı hücreleri ve diğer immün sistem hücreleri tepkisel aktiviteyi daha verimli hale getirmek için doğrudan temas veya kemokin ve sitokinlerin üretimi aracılığıyla iletişim kurarlar. T lenfositlerinin protümörejenik fonksiyonları sitokinler tarafından iletilirken aynı zamanda hem sitokinler hem de sitotoksik mekanizmalar T lenfositlerinin tümör baskılayıcı fonksiyonel ifadelerini de iletmektedirler (30). Otokrin veya parakrin salgılanma biçimleriyle tümör büyümesi ve metastazını kontrol ederler ve şekillendirirler. Tümör mikro çevresinde bulunan çeşitli bağışıklık mediyatörlerinin etki ifadeleri, aynı zamanda ise farklı hücresel aktivatörlerin fazla bir şekilde bulunması tümör hücresinin dengesinin şekillenmesinde, anti-tümör bağışıklık

ifadesiyle mi yoksa protümörülenik bir ifadenin mi teşvik edileceğine büyük oranda karar verilmesini sağlar (31).

### 2.5.1. Tümör hücrelerinde inflamasyon

Akut faz yanıtı (kronik inflamasyon) tümör hücresinin proliferasyonunun ve neoplastik dönüşüm yanıtının uyarılmasıyla ilişkilidir. inflamasyon temelli tümörler hücrelerin ve ortamdaki inflamatuvar uyarıcıların varlığı ile karakterizedir. İnflamasyon karsinogenezin önemli bir ön aşamasıdır (32). Kronik inflamasyon diğer inflamasyon türleriyle kıyaslandığında %25 daha fazla, kanseri tetikleyen sebepler ile ilişkili bulunmaktadır. İnflamasyon gelişen dokular da reaktif oksijen ve diğer azot vb. gibi etkenlerin DNA'nın yapısını bozarak hasar vermesinden kaynaklanmaktadır. Bu durum karşısında DNA tamir mekanizması yetersiz bir hale geldiğinde, oluşan mutasyonlar kanser oluşumunu ve büyümesini teşvik etmektedir (33).



Şekil 3. İnflamasyon ve kanser arasındaki ilişki (33).

## 2.6. Sitokinler

Sitokinler çeşitli hücre tipleri tarafından üretilen, salgılanan ve tek bir polipeptid zincirinden oluşan monomerik veya multimerik yapılardır. Boyutları yaklaşık olarak 25 kDa'dır. Sitokinler inflamasyon, hücre büyümesi ve gelişmesi, patojenik enfeksiyonlar gibi bir takım kompleks hücresel olayları düzenlemekle görevlidirler. Diğer yandan hücreler arası sinyal taşıyan mediatörlerdir. Sitokinler doğal ve adaptif immünitinin efektör kısmında lenfositler, makrofajlar ve monositler gibi hücreler tarafından üretilirler. İnflamatuvar yanıtların ve antijene karşı verilecek bağışıklık yanıtlarının oluşmasını ve düzenlenmesini sağlarlar. Bunların yanı sıra sadece immün sistemin düzenlenmesine rol almazlar, ayrıca hormon benzeri büyüme ve farklılaşma faktörleri olarak ta görev yapmaktadırlar. Sitokin salınımı kısa ve öz bir şekilde ilerler. Kısa zaman aralıklarında ve çok düşük yoğunlukta salgılanarak hareket ederler ve Depolanamazlar. Sitokinler genlerin aktivasyonunu ve sitokin-reseptör ilişkisini etkileyen moderetör bir konumdadır (34). Sitokinler birbirlerine karşı zıt (antagonist) veya benzer (redundant) bir etkileşim içerisinde olabilirler. Hormonlarda da olduğu üzere, sitokinler de hücre yüzeyindeki özel mebran reseptörlerini tanıyarak bağlanırlar. Aktivasyonu başlatmak için transmebran proteinlerinden oluşan bu özel reseptörler, bağlanan sitokini, hormonu veya büyüme faktörlerini tanıma işlemi yaparak, aktivasyonunu gerçekleştirir ve ilişki kuran sitokin türüne göre hücresel aktivasyon cevabı şekillenir. Tümör mikroçevresininin sitokin profili, spesifik bağışıklık hücresinin ekspresyon profilinden daha önemli olabilmektedir (31). Hücrenin sitokin salgılama özellikleri ise üç başlık altında incelenebilir;

- Otokrin etki
- Parakrin etki
- Endokrin etki

Otokrin etki, sitokini hücrenin kendisinin salgıladığı durumlarda oluşan etki şeklindedir. Üretilen sitokinin kendisinden başka bir komşu hücreden salgılandığında oluşan diğer bir etki şekli ise parakrin etki modelidir. Endokrin etki , immün sistem hücreleri tarafından dolaşıma salınan ve sistematik olarak uzak bölgelerdeki hücreleri de etkileyebilen bir diğer salgılanma şeklindedir (35).

### **2.6.1. Sitokinlerin sınıflandırılması**

Sitokinler için birçok farklı sınıflandırmalar mevcuttur. Temel olarak fonksiyonel özelliklerine ve salgılandıkları hücresel kaynağa göre ayrılırlar. Sitokinler kendi içerisinde benzer moleküle sahip üç temel grup içerisinde ele alınabilir; proinflamatuvar, antiinflamatuvar sitokinler ve büyüme faktörleri olmak üzere sınıflandırmaları yapılabilmektedir. Aynı zamanda doğal immüniteye aracılık eden ve lenfosit aktivasyonu gibi T lenfositlerinin spesifik antijenleri tanımalarına yönelik yanıt temin eden sitokinler olmak üzere de ek bir ayırım yapılmaktadır. İltihap oluşumunun prognoz süreci, pro ve anti iltihabi sitokinlerin salınmasıyla gerçekleşmektedir. (Tablo 1.) (36).

**Tablo 1.** Sitokinlerin sınıflandırılması (36).

<b>Sitokinler</b>		
<b>Pro-İnflamatuvar</b>	<b>Anti-İnflamatuvar</b>	<b>Çift Etkili</b>
TNF- $\alpha$	IL-1ra	IL-6
TNF- $\beta$	IL-4	TGF- $\beta$
IL-1	IL-10	
IL-2	IL-11	
IL-17	IL-13	
INF- $\gamma$	TGF- $\beta$	

### **2.6.2. Anti ve proinflamatuvar sitokinler**

Anti-iltihabi sitokinler iltihaplanmanın lokal kontrolün sağlanması ve önlenmesine yönelik olarak hareket eder. Lokal kontrolün kaybı sistematik bir şekilde gerçekleşen iltihaba ve potansiyel olarak kötü prognozla ilişkilendirilir (36).

Aynı zamanda Proinflamatuvar sitokinlerin düzenlenmesinde de görevleri vardır. Vücudun sepsis ve endotoksin kaynaklı şoklardan da koruduğu bilinmektedir. Antiinflamatuvar

ve proinflamatuvar sitokinler bağımsızlık, inflamatuvar ortam ve tümör mikroçevresini kontrol ettiği açıklanmaktadır. Hücrenin izoformunun değişmesi veya invazyon karakterinin oluşması açısından önemlidir. En önemlisi kanserin proliferasyonu ve hayatta kalma süreci üzerinde birçok biyokimyasal olaylara müdahalesi mevcuttur (37).

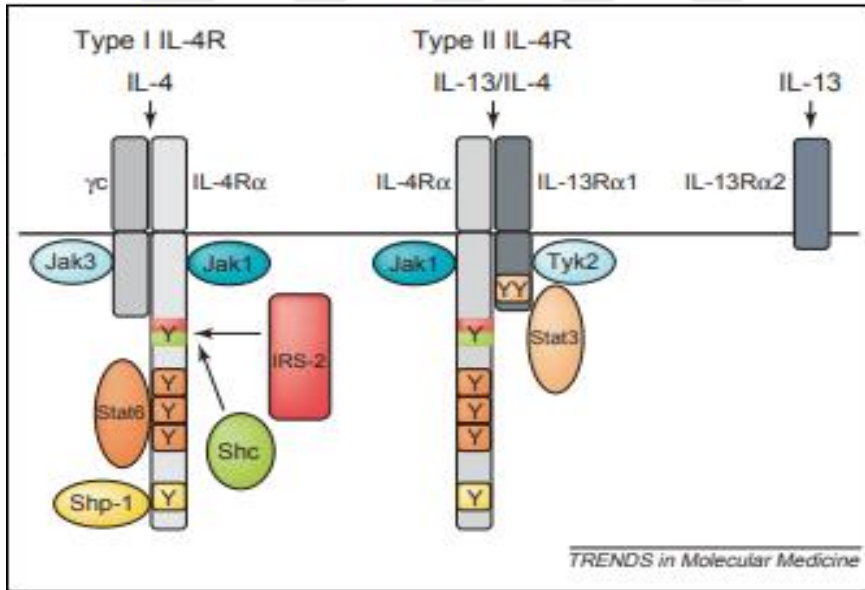
### **2.6.3. İnterlökin-4 (IL-4)**

IL-4, 15 kD ağırlığında glikoprotein yapıda bir polipeptittir. IL-4 yapısal konfigürasyon olarak, dört heliks demet yapısına sahip olmakla beraber üç disülfid köprüsü içermektedir. IL-4'ün cDNA'sı 15.4 kDa'lık bir protein olan, 153 aminoasitlik olgun bir protein dizisi kodlamaktadır. İnsanlardaki IL-4 sitokinini kodlayan genler, ilgili bir sitokin gen kümesi içerisinde kromozom 5q31'de bulunur. IL-4 kodlayan söz konusu gen kümesi dört ekzon ve üç intron bölgesi içermektedir. IL-4 parazit enfeksiyonlarında kritik rol oynadığı bilinmektedir. Antijenle stimüle olmuş CD4+ T lenfositlerinin Th2 alt dizin grubundan salınan bir sitokindir. Mast hücreleri, bazofil hücreler ve CD8+ T lenfosit hücreleri de IL-4 üretiminden sorumlu olabilir. İlgili bazı durumlarda kemik iliği stromal hücrelerinin de IL-4 üretebildiği ve bu duruma bağlı olarak B lenfosit progenitör hücrelerinin çoğalmasında ve farklılaşmasında görev alabilmektedir. IL-4 B hücre proliferasyonunu, eozinofiller, makrofajlar, bazofillerin ve mast hücrelerinin aktivasyonunda etkilidirler (38,39). Ayrıca fibroblastların kollajen üretimin de rol oynamaktadır ve bu durum da endotel hücrelerinde ise vasküler hücre adezyon molekülünün (VCAM-1) ekspresyonunu indükler (40).

IL-4 sitokini Th<sub>1</sub> lenfosit hücreleri tarafından sentezlenen proinflamatuvar bağımsızlık yanıtlarını antagonize etme kapasitesine sahiptir. Bu kanalda sentezlenen birçok proinflamatuvar sitokinin, IL-1, IL-6, IL-10, IL-12, TNF- $\alpha$  ve makrofaj migrasyon inhibe edici faktör (MIF) gibi moleküler işlevleri olan bu polipeptit moleküllerinin sentezlenmesini aktif olarak düzenlerler (41). Antijenle uyarılmış olan T hücrelerinin farklılaşmasının düzenlenmesinde de IL-4'ün önemli rollerinin olduğu bilinmektedir. Söz konusu bu farklılaşma gerçekleştiğinde T hücreleri sitokin üretebilen Th2 hücrelerine benzer fonksiyonlar kazanabilmektedir (42). Bunların yanı sıra granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör (GM-CSF), prostaglandinler, metalloproteazlar, serbest radikallerden reaktif oksijen ve azot ürünleri gibi diğer inflamasyonda etkili aracı faktörleri de baskıladıkları bilinmektedir (43).

#### 2.6.4. IL-4 Reseptörü ve sinyal modeli

IL-4 ve IL-13, Tip II olarak adlandırılan reseptörü ortak olarak kullanmaktadırlar. Tip II reseptörü aynı zamanda bir IL-4 reseptörü  $\alpha$  (IL-4R $\alpha$ ) ve birde IL-13 $\alpha$  reseptörü (IL-13R $\alpha$ ) alt birimi içeren heterodimer bir reseptör yapısına sahiptir. IL-4 $\alpha$  alt birimi aynı zamanda IL-13'den hariç olarak sadece IL-4 ile etkileşime giren Tip I reseptörünün alt bileşeni olarak bulunur. IL-4'ün Tip II reseptörünün alt birimi olan 140 kDa'lık IL-4R $\alpha$  yüksek afiniteyle IL-4'ü bağlayarak, trozin kinaz proteinlerinden Janus kinaz (JAK) ailesinin JAK-1, JAK-2, JAK-3'le etkileşimiyle beraber bu bağlamda trozin kinaz 2 (TYK2)'yi aktive eder. IL-4R $\alpha$  reseptör zinciri sitoplazmik işlevsel yanıt olarak, üzerinde üç farklı bağlanma noktası içermektedir. İlk noktada JAK proteinlerinin etkileşimi için, ikinci olarak ise proliferatif sinyal yollarının aktivasyonu için, diğeri de regülatör gen ifadesinin indükleyen sinyal mekanizması için bir aktivasyon noktasını bulundurmasıdır (Şekil 4.)(44).

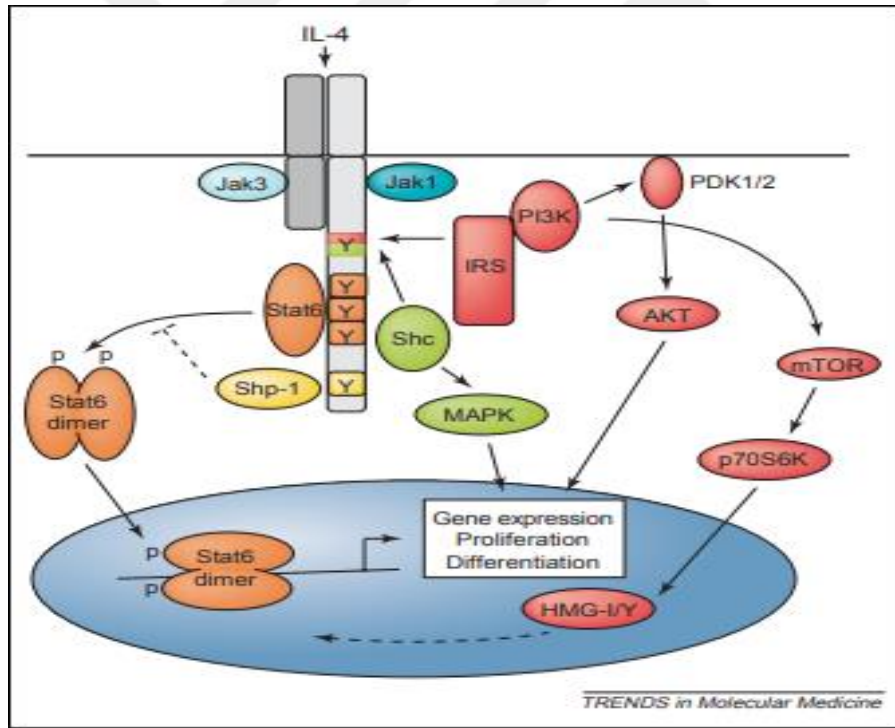


Şekil 4. Tip I IL-4R ve tip II IL-4R reseptörlerinin yapıları (45).

Sitokin reseptörlerinin dimerleşmesi ligantlar tarafından indüklenerek, hücrel subsrat proteinlerinin fosforilasyonunun yapılması ve bu süreçte, sinyal kaskadlarını başlatan trozin kinazların aktif edilmesiyle devam etmektedir. IL-4R $\alpha$  reseptörleri söz konusu sinyal iletiminin başlatılabilmesi için reseptörle ilişkili olan kinazlara ihtiyaç duymaktadır (46).

TYK ve JAK'ın aktive edilmesi sonucunda sinyal transdüktör ve aktivatör görevini yürüten (STAT6)'nın fosforilasyonu gerçekleşerek, çekirdeği taşınması başlatılır. STAT6 aktivasyonunun yanı sıra IL-4, IRS-2 molekülü ile etkileşim kurarak, IRS-2'nin de aktive edilmesini sağlar (46). Bu bağlamda JAK1 ve JAK3 IL-4R $\alpha$ ' ya bağlanan IRS-2'yi fosforile eder. IRS-2'nin aktivasyonu sağlandıktan sonra sırasıyla fosfoinositit 3-kinaz (PI3K) ve aşağı ilerleyiş protein grubu olan serin/treonin kinaz Akt'nin aktive edilmesine neden olur. Söz konusu bu yolağın aktif hale gelmesinin birçok hücre tipinde büyüme ve hayatta kalma sinyallerini düzenlediği bilinmektedir (47).

Tip II reseptör kompleksi aynı zamanda birçok hücre ve doku tipinde ifade edilmektedir. Bunlar; Eozinofiller, hemotopoetik, hepatosit, endotel hücreler, epitelial hücreler ve düz kas hücreleri olarak ilgili reseptörün ifade edildiği bir takım hücre ve doku tipi çeşitleridir (47).



**Şekil 5.** IL-4R $\alpha$  tarafından aktivasyonun gerçekleştirilen sinyal aktivasyon modeli. STAT6, hücrenin gen ekspresyonunu aynı zamanda proliferasyon ve hücre farklılaşmasını destekleyen IL-4R $\alpha$ 'nın efektör işlevlerini stimüle etmek için diğer yollarla birlikte çalışır (45).

### **2.6.5. Tümör nekrotizan faktör- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )**

TNF nonglikolize bir transmembran glikoprotein çeşididir. Molekül ağırlığı 17 kDa'dır. TNF ailesinde çeşitli biyolojik fonksiyonel mekanizmaları düzenleyebilecek yapısal çeşitliliği mevcuttur. TNF süper ailesi 19 ligand ve 29 reseptör proteini ihtiva etmektedir. TNF süper ailesinin bir üyesi olan, TNF- $\alpha$  çeşitli hücre tipleri üzerinde pleotropik etkiler gösteren güçlü yapısal özellikleri üzerinde barındıran proinflamatuvar bir sitokindir (48).

TNF- $\alpha$ 'nın hücrel etkileri özel olarak birçok kritik süreçle ilişkilendirilmiştir. Bunların arasında Hücre apoptozunun düzenlenmesi, hücrenin proliferasyonu ve epitelyal-mezenkimal geçiş farklılaşmasının kısmen kontrolünün sağlanması gibi birçok biyokimyasal süreç birlikte yer almaktadır. Tümörün ilerlemesinde ve viral enfeksiyonların replikasyonuna öncülük etmesiyle beraber TNF- $\alpha$ , proinflamatuvar yanıt sistemin gelişimine büyük oranda aracılık eder (49). TNF- $\alpha$ 'nın sentezlenmesi birçok hücre tipi tarafından gerçekleştirilebilir. Uyarılması ve salınmasının başlıca kaynakları, gram-pozitif bakteriler, virüsler, parazitler ve tümör hücreleri gibi immün sistemin kompleks molekülleri aracılığıyla gerçekleştirilmektedir. TNF ailesinin birçok üyesinin adaptif ve edinilmiş bağışıklığı düzenlemede de önemli yetenekleri olduğu da bilinmektedir. TNF- $\alpha$  makrofajlar, nötrofiller, monositler, T hücreleri ve nötrofiller gibi birçok hücre tipi tarafından sentezi sağlanmaktadır (49).

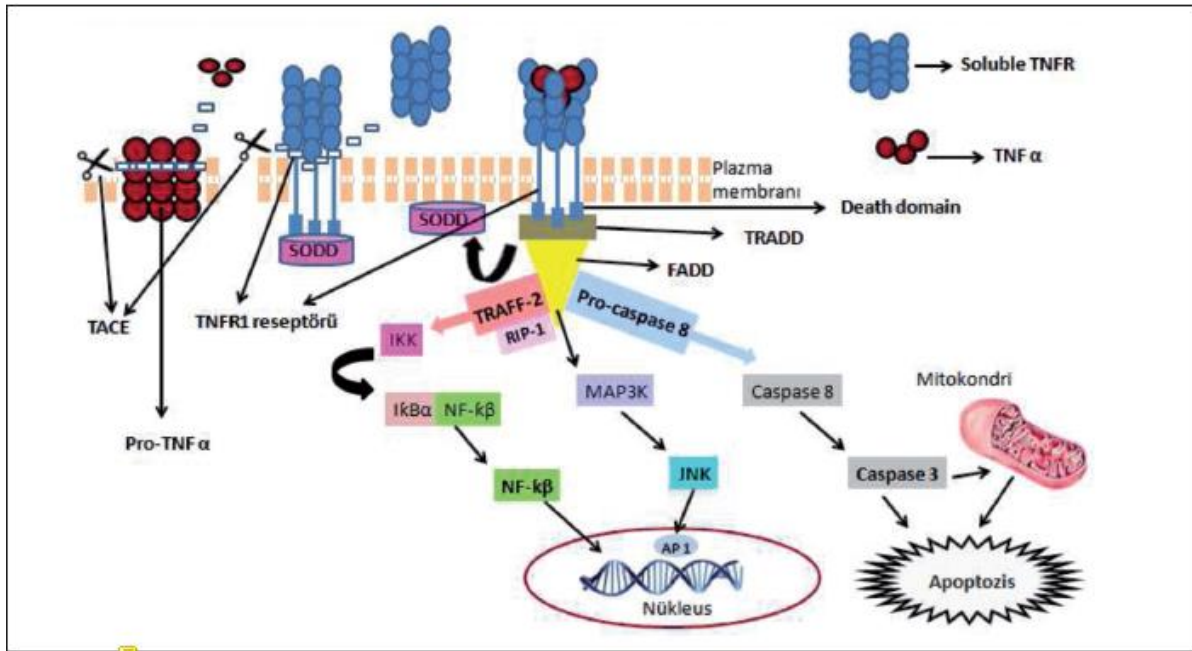
### **2.6.6. TNF- $\alpha$ Reseptör yapısı ve sinyal modeli**

Sitokinlerin sinyal aktivitesi ve hücrel reaksiyonların indüklenmesi, hücre yüzeyinde bulunan reseptör ligand yapısal birlikteliği ile şekillenmektedir. TNF süper ailesinin şuna kadar tanımlanmış 19 reseptörü bulunmaktadır. Diğer sitokinler gibi TNF de kritik sinyal yollarının aktif edilmesinde ve protümörjenik aktivitelerin sinyalizasyonunda reseptör ligand etkileşimini sağlayarak, reseptörleri aracılığıyla sinyal yanıtlarını düzenler (50).

TNF- $\alpha$  sitokinini kodlayan gen HLA-B ve HLADR gen bölgelerinin arasında bulunan kromozom 6 bölge kompleksinin alt sınıfının III. Gen bölgesinde yer aldığı bilinmektedir. Bunun yanı sıra 212 aminoasitten oluşmaktadır. TNF- $\alpha$  hedef hücrelere bağlanmasında iki tip reseptör molekülü ile işlevsel hale gelmektedir. Bunlar; TNFR Tip – I ve TNFR Tip – II olmak üzere

iki kısım reseptör proteininden oluşmaktadır (51). TNF- $\alpha$  bu reseptörlere bağlanarak, proinflatuar yolların aktif edilmesini sağlar. Proinflatuar mekanizmanın işlevsel hale getiren NF- $\kappa$ B ve MAP kinaz aktivatörlerini indükleyerek hücrenin proliferasyonu ve hayatta kalmasını destekler (52).

TNF- $\alpha$  reseptörleri, mebrana bağlı ve çözünür formda bulunabilmektedirler. Çözünür formu, 17 kDa büyüklüğünde ve kovalent olmayan bir üçlü bileşenin oluşturduğu transmembran proteini şeklindedir. TNF reseptörleri trimerik TNF- $\alpha$ 'yı tanıyarak onu bağlar ve stabilize eder. TNF- $\alpha$  reseptör üzerinde bulunan CRD-2 ve CRD-3 ligantlarının bulunduğu bölgelere tutunarak, belirli değişimler gerçekleşir ve hemen sonrasında sinyal üretimi başlar. Sinyal aktivasyonu oluşturulmayan durumlar da reseptörün sitoplazmik domain kısmına, silencer of death domain (SODD) adı verilen bir protein, reseptör üzerindeki domain kısmına bağlanarak, yanlış veya gereksiz sinyal akışının düzenlenmesini kontrol etmektedir. TNF- $\alpha$  sinyal akımı esnasında SODD proteini reseptör üzerinden ayrılarak, yerine TNFR associated death domain proteini (TRADD) bağlanmaktadır (Şekil 6.) (53). Daha sonrasında hücre içi mediatörlerin sırasıyla NF- $\kappa$ B yolağını aktive eden IK $\beta$  kinazların aktive olmasıyla beraber, bir takım pro-iltihabi medyatörlerin devreye girmesi indüklenir. Bununla beraber sinyal kaskatı, taşıdığı bilgilerle çekirdek kısmına kadar iletilmesi sağlanmış olur (54).



**Şekil 6.** TNF- $\alpha$  sitokini ve sinyal aktivasyonu sonucu ortaya çıkan hücresel aksiyonların şeması (54).

## 2.7. Dönüştürücü büyüme faktörü – $\beta$ (TGF- $\beta$ )

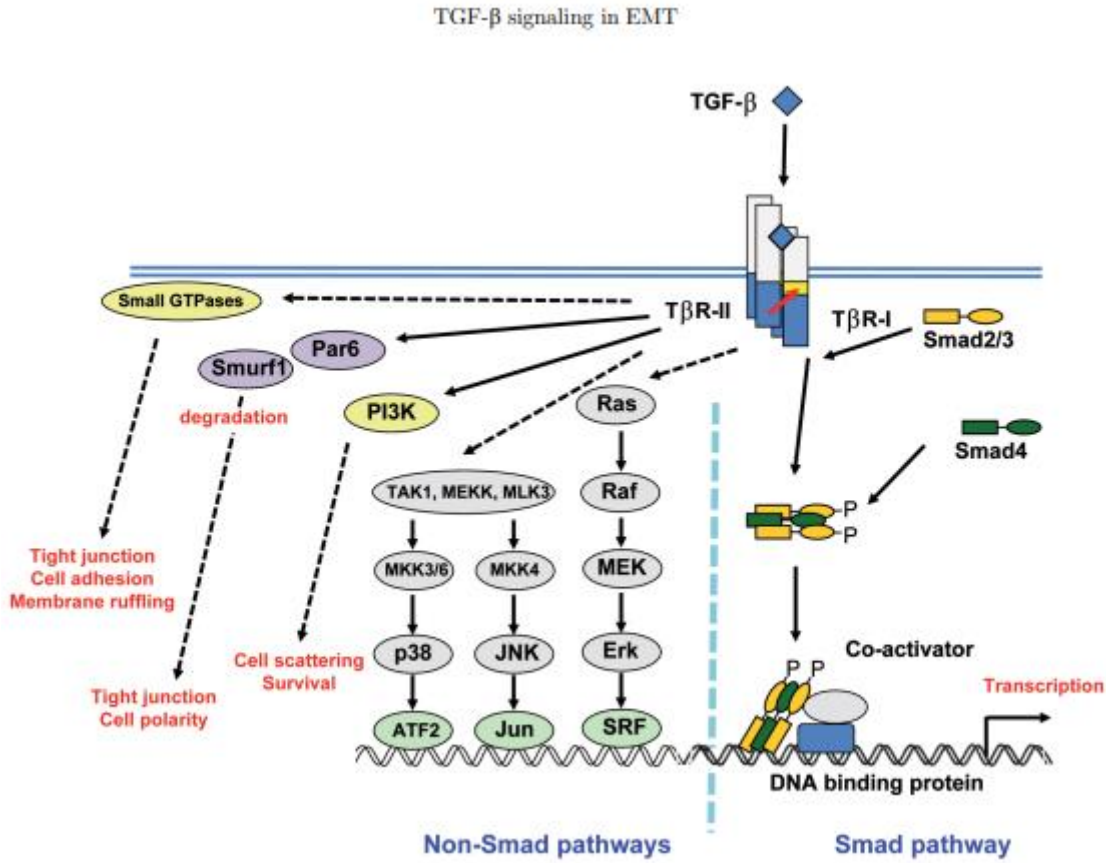
Dönüştürücü büyüme faktörü- $\beta$  (TGF- $\beta$ )'nın kendi ailesi içerisinde 3 farklı izoformu mevcuttur. Bunlar sırasıyla TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 ve TGF- $\beta$ 3'tür. TGF- $\beta$ 'ya homodimerinin yanı sıra bir polipeptit bölgesi içeren temel protein molekülleri olarak belirli bir takım hücrelerde sentezleri gerçekleştirilmektedir. TGF- $\beta$  ilk zamanlarda epidermal büyüme faktörü (EGF) varlığında, fibroblastlarının gelişmesini başlatan bir sitokin olarak salgılandığı bildirilmiştir. Embriyonik gelişim sırasında çok fazla eksprese edilen TGF- $\beta$ , çeşitli sinyal aktiviteleriyle kanser ve fibrozisin gelişiminde dahil olmak üzere çoğu hastalık ile ilişkili bir aksiyon modeline sahiptir (55). Tümör üzerinde çok yönlü etkileri modüle eden TGF- $\beta$ , sinyal mekanizmasının aksiyonunu düzenleyebilmesi, tümör mikro çevresindeki evreye bağlıdır. Erken evrede işlevi yüksek bir tümör inhibitörü olarak aksiyon gösterebilir. Diğer yandan ise tümör metastatik fenotipinin geç evrelerinde hücredeki EMT geçişini indükleyebilir (56). TGF- $\beta$  sinyal yolağının anjiyogenez, hücre içi proliferasyonun artması, hareketlilik, hücre göçü ve invazyon kapasitesinin yükselmesi gibi hücre için hayati öneme sahip aktivasyon mekanizmalarını düzenlediği bilinmektedir. Sinyal uyumlu yanıtlar (sitotoksik T hücreleri ve hücre sel bağışıklık T hücreleri) gibi edinilmiş bağışıklık yanıtlarının yanı sıra, parazit enfeksiyonu gibi vb. durumlarda konak direnç mekanizmasının düzenlenmesinde anahtar rol oynamaktadır. TGF- $\beta$ 'nın fonksiyonel olarak aynı zamanda parakrin ve otokrin salgılanması mevcuttur (57).

### 2.7.1. TGF- $\beta$ reseptörleri ve sinyal modeli

Sitoplazmik bölgelerinde serin/treonin kinazları içeren TGF $\beta$ RI ve TGF $\beta$ RII olmak üzere iki reseptörü vardır. Ayrıca kinaz aktivitesi bulunmayan bir de TGF $\beta$ RIII reseptörü bulunmaktadır. TGF- $\beta$  ,TGF $\beta$ RII reseptörüne bağlanarak TGF $\beta$ I ile heterotetramer bir yapı oluşturur. TGF $\beta$ RIII reseptör ise temel reseptör görevini yürüten TGF $\beta$ RII'ye, ligantların bağlanması artırmak için koenzim olarak görev alır. Daha sonra aşağı akış efektörlerinden SMAD molekülleri devreye girerek intraselüler sinyal mekanizması başlatılır (57). SMAD molekülleri ile aktive olan TGF $\beta$ RII reseptör kompleksi, Reseptör / SMAD (R-SMAD)'ları fosforile ederek diğer sinyal yolaklarının aktivasyonunu başlatır (58).

Sinyaller, efektör MAD peptitleri tarafından taşınır. Bu bağlamda TGF- $\beta$ 'sinyal aktivasyonu SMAD7 proteini tarafından aktif olarak düzenlenir. Normal şartlarda çekirdekte

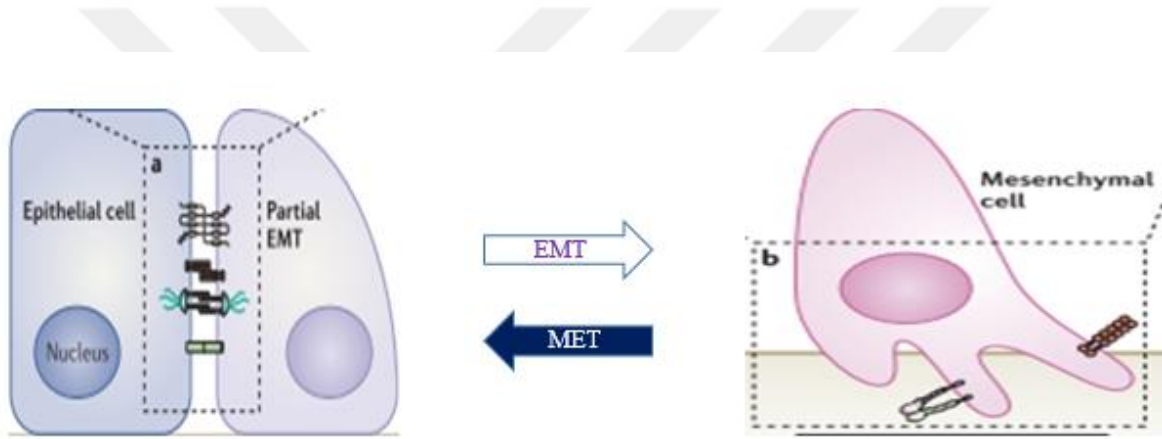
bulunan ama reseptör kompleksinin oluşmasıyla beraber hücre zarına geçen SMAD7'nin, TGF- $\beta$  üzerindeki temel rolü ise TGF $\beta$ RII reseptör kompleksinin R-SMAD'la birleşmesini engelleyerek sinyal yanıtının inhibisyonu sağlayabilir. Öte yandan R-SMAD'lar SMAD4 ile birleşerek Aktive SMAD komplike yapısını oluşturur. Aktive olmuş SMAD komplike yapısı ise çekirdeğe taşınarak, promotör DNA metilasyonunu indükler ve ilgili gen ekspresyonunu düzenler (Şekil 7.)(57,59) .



**Şekil 7.** TGF- $\beta$  SMAD veya SMAD dışı yolla sinyal iletimini gerçekleştirir. TGF- $\beta$ 'nın hücre zarındaki TGF $\beta$ RII reseptörüne bağlanarak TGF $\beta$ R1 tetramer komplike yapısını oluşturur. TGF $\beta$ R kompleksi aşağı akış yolu boyunca R-SMAD'ı (SMAD2 ve SMAD3) fosforile eder ve fosforillenen yapı ise SMAD4 ile heterodimerik bir yapı oluşturarak çekirdeğe iletilir. TGF- $\beta$  SMAD dışı yolda, birçok sinyal kaskadı aracılığıyla sinyal iletimini gerçekleştirir. TGF $\beta$ RII vasıtasıyla Erk, JNK, p38 gibi MAP kinazlarının aktivasyonu sağlanır ve sinyal çekirdeğe iletilir (57).

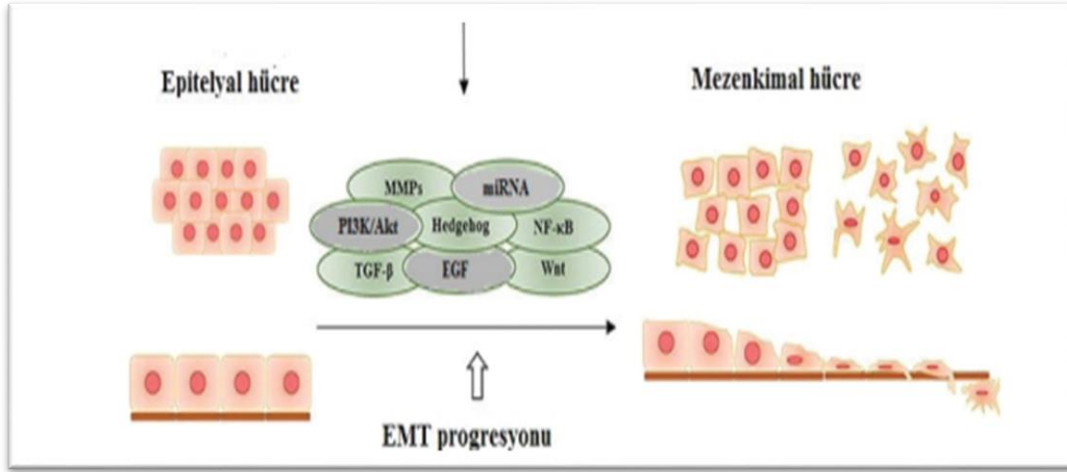
## 2.8. Epitelyal Mezenkimal Geçiş (EMT)

Epitel hücrelerinin nadiren veya tamamen mezenkimal hücrelere geçiş yapabilme yeteneği, epitel fenotipin kendi içerisinde konformasyonel olarak özelleşebileceğini göstermektedir. Epitel hücreler, bazal membran üzerinde yer alan tek hücre katmanlı yapılardan oluşmaktadır. EMT öncesinde epitel hücreler yapısal özgüllüğünü ve apikal bazal polaritelerini kaybeder. Bunun yanı sıra hücrenin ön-arka polaritesinin ise kazanılmasıyla beraber, bu durum hücrenin hareketini, esnekliğini ve şeklinin korunmasını sağlayan sitoskelet yapısının yeniden regülasyonuna neden olmaktadır. Hücrenin şeklinin ve yapısal izoformunun farklılaşması işlevsel sinyal yollarını da aktif olarak yeniden programlanmasını sağlar (Şekil 8.) (60).



**Şekil 8.** Epitel hücresinin şeklinin ve yapısal izoformunun farklılaşması (60).

Epitel hücrelerinin patolojik olarak mezankimal hücrelere farklılaşması bir dizi özelleşmiş korunan sinyal aktivitelerine, hücre tipine ve dokusal bağlanma uyumuna göre reaksiyon gösterir. Epitel hücrelerin gen ekspresyon seviyelerinin düşürülmesiyle beraber mezenkimal hücrelerin tanınmasını sağlayan genlerin aktivasyonu, hücresel uzantılarını artırır. Bu bağlamda EMT programının ilerlemesi fenotip olarak hücrenin invaziv gelişimini destekler. EMT'nin indüklenmesinde birçok neden yer alabilir. Bunlar, yara iyileşmesi, fibröz ve kanser metastaz süreci gibi durumlarda EMT'yi indüklemektedir (Şekil 9.) (5).

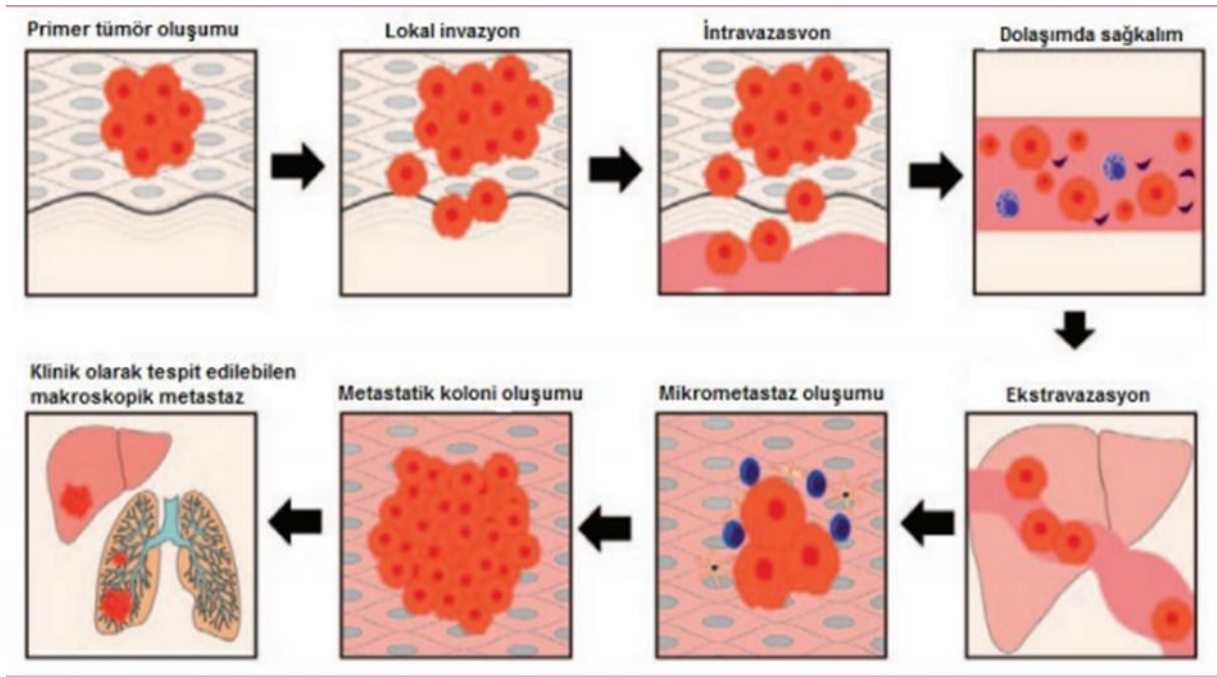


Şekil 9. EMT progresyonu ile epitelyal hücre yapısının konformasyonunu kaybetmesi (5).

### 2.8.1. Kanser hücresinin metastazı

Metastaz, kanser mikro çevresinde hayati bir rol oynamaktadır. Metastaz kaskadının her süreci tümör hücrelerinin mikro çevresinde ki unsurlarla ilişkisinden meydana gelir. Metastazın, invazyon ve yayılma mekanizmalarının başında EMT programının önemli aktif bir işlevi bulunmaktadır. Kanser hücreleri metastatik aktiviteleri gerçekleştirmek için üç tip EMT süreci ile ilişkilendirilmiştir. Embriyogenez Tip I EMT modeli, doku rejenerasyon ve onarımın da, Tip II EMT modeli tümör metastazının geri dönüşüm aşamasında ve Tip III EMT modeli ise metastatik hücrelerin kolonileşmesi ve patolojik sürecinde yer almaktadır. Bu bağlamda epitel hücrelerin hücre poleritesinin kaybıyla beraber mezenkimal hücre adezyon moleküllerinin regülasyonu artarak kanser mezenkimal-kök hücre (CSC) görünümünde bir yapı halini alır. EMT destekli metastaz sisteminde CSC benzeri kanser hücreleri hareket kabiliyeti kazandığı için bazal mebran ve lamina propria bariyerini geçerek farklılaşmamış diğer normal hücrelerin de dönüşümünü başlatır. Sinyal yollarının ve reseptörlerin tümör mikroçevresi ile çeşitli heterotipik etkileşimlere girerek konformasyonel değişiklikler sağlanır. Bu durumda kanser hücreleri dolaşıma geçerek diğer dokulara geçişi sağlanır (61). Tüm bu aşamalar aşağıda ki verilen basamaklarla sıralanabilir;

1. Primer tümör oluşumu
2. Lokal invazyon
3. İntravazasyon
4. Dolaşımda sağ kalım
5. Ekstravazasyon
6. Mikrometastaz oluşumu
7. Metastatik koloni oluşumu



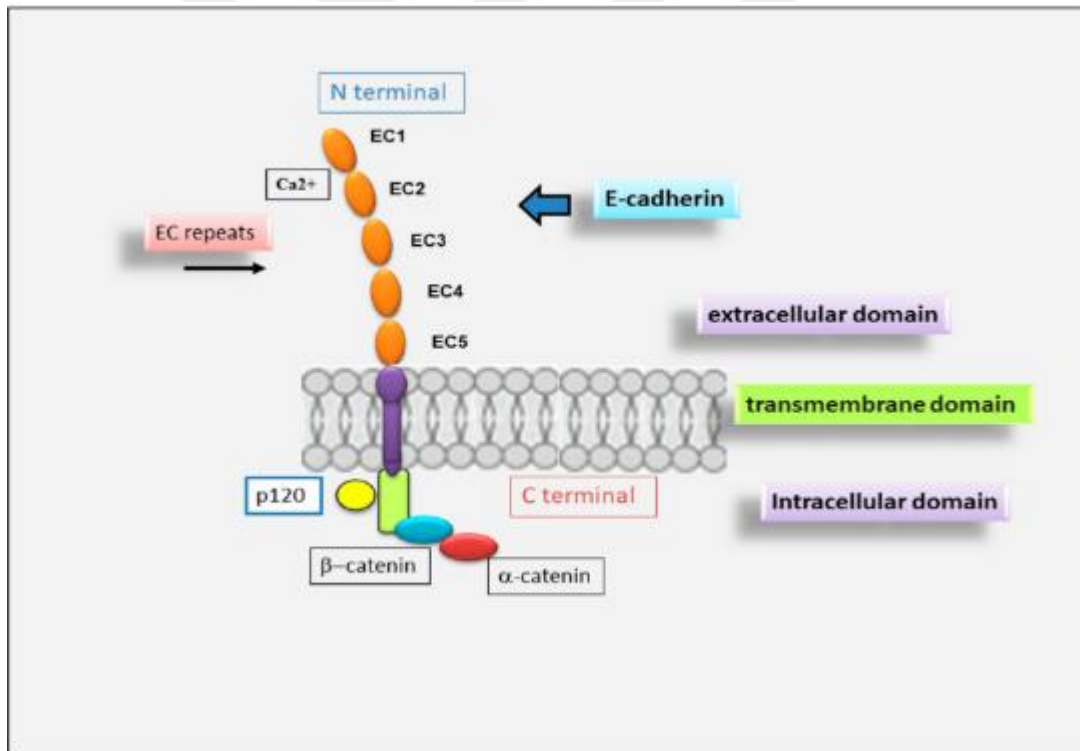
**Şekil 10.** Tümör metastazının gelişim sürecine dair basamaklar (61).

## **2.8.2. Tümör hücre – hücre adezyonu**

### **2.8.2.1. E-kaderin**

Tümör hücreleri diğer hücrelere göre farklı glikozilasyon çeşitleri içermektedir. Protein glikozilasyonu hücrenin fonksiyonel olarak değişiklik gösterme yapısını artırmaktadır. Bu bağlamda glikan modifikasyonları farklı bir proteine, dokuya veya hücreye özel bir karakter geliştirebilir. Epitel hücrelerindeki hücre-hücre konformasyonu, hücrelerin birbiri arasında sağlam hatlar oluşmasını sağlar. Tümörlerin proliferasyonu ve gelişmesi tümör hücrelerinin

hücre-hücre adezyonu aşamasıyla çevresindeki dokuyu istila etmesi (metastaz) kabiliyetiyle karakterizedir. Kalsiyum bağımlı bir transmebran protein olan Epitelyal – Kaderin (e-kaderin) hücre hatları arasında kaderin-katenin adı altında komplike bir yapı sağlayarak hücre invazyonu, adezyonu, hücre farklılaşması ve hareketliliğini kontrol etmektedir. Glikanlar bu durumda e- kaderin molekülünün fonksiyonel yapısına etki ederek, hücre adezyonunda temel etkileşimler oluşturabilirler. Glikan modifikasyonu ile e-kaderin kompleks yapısı içerisindeki kaderin molekülünün fosforilasyonu düşer. Düşen fosforilasyonla ters orantılı olarak tümör hücresinin baskılanması ile ilişkilendirilir (62). E-kaderin EMT'nin temel efektörü olarak kabul edilir. E-kaderin' in anormal düzeydeki ekspresyonu sıklıkla malign tümör hücrelerinde ortaya çıkar. Bu yüzden e-kaderin güçlü bir tümör baskılayıcı proteindir. Bu bağlamda e-kaderin EMT ve Mezenkimal Epitelyal geçiş (MET) modellerin arasındaki geçişlerde önemli düzeyde gen ekspresyon profilleri içermektedir (63).

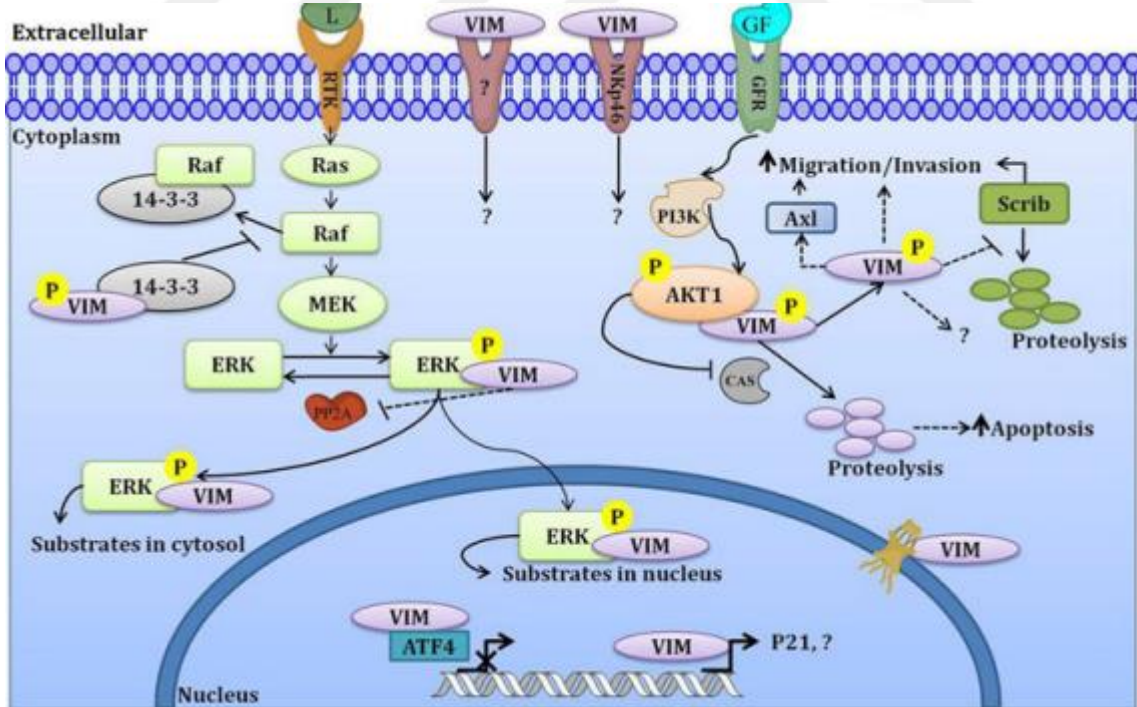


**Şekil 11.** E-Kaderin molekülünün yapısal şematik görseli. E-kaderin 5 tekrar bölgesi, Ca<sup>2+</sup> bağlama bölgesi, transmebran alanı ayrıca  $\beta$ -katenin,  $\alpha$ -katenin kompleks yapısına bağlanma alanı içerir (63).

### 2.8.2.2. Vimentin

Vimentin tip III IF protein sınıfının 466 aminoasitten oluşan en yaygın ve en korunmuş polipeptididir.  $\alpha$ -helikal bir alan şeklinde korunmuştur. Yapısal olarak bu kısım  $\alpha$  heliks N- ve C- terminal uçları baş ve kuyruk kısımları ile çevrilmiştir. Vimentin kromozom 10p13 lokasyonunda bulunur ayrıca tek kopya bir gen tarafından kodlanır.

Vimentin sertoli hücreleri, embriyonik hücreler, nöronal öncü hücreler, fibroblastlar, endotel hücreler, mikrotübüler hücreler ve mezenkimal hücreler gibi birçok hücre tipinde bulunduğu için, epitelyal hücrelerin mezenkimal fenotip kazandığı EMT ve MET geçişinde aktif bir belirteç olarak bilinmektedir. Vimentin, TNF- $\alpha$  sitokini ve NF- $\kappa$ B yolağı tarafından EMT'nin aktive edilmesi konusunda önemli bir gen profilini teşkil eder. (64) vimentin hücresel yollardaki sinyal proteinleri ve diğer efektör proteinlerle oluşturduğu kompleks yapı şekil 12'de verilmiştir. Hücre göçü ve invazyonu ile ilişkili bir protein olan Scrib proteini vimentin ile kurduğu etkileşim sonucunda proteozomal yıkımdan korunur. Bu durumda scrib proteininin stabilitesi sağlanır ve EMT sırasında vimentin ekspresyonu artarak, hücre göçünün ve hücrenin istilacı etkisinin kapasitesini artırılır (65).



**Şekil 12.** Vimentin molekülünün hücre sinyal yolları üzerindeki etkisi. AKT1 vimentinin fosforilasyonunu sağlayarak, kaspaz kaynaklı proteoliz aktivitesinden korur. Bu sayede vimentin hücrenin göç ve invazyon kaynaklı proliferasyon süreçlerinde rol oynamaktadır (65).

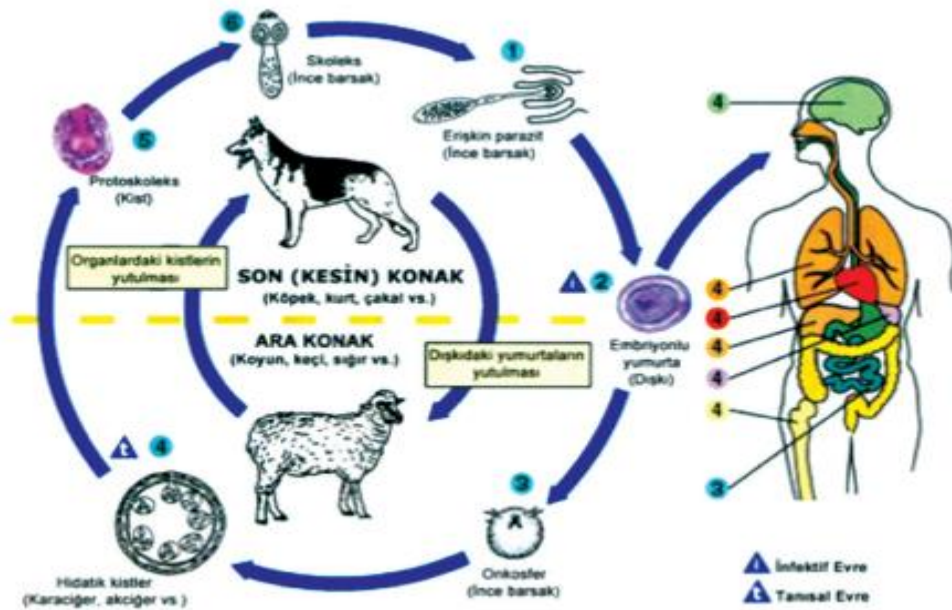
## 2.9. Parazit İnvazyonu Ve İmmün Yanıt

Kanser hücreleri ve parazitler arasında apoptoza dirençli bir yapısal benzerlik vardır. Konak hücreye yerleşen parazitin konağın apoptoz yolaklarını sitümüle ettiği bilinmektedir. Parazit ve kanser hücreleri konak hücrenin bağışıklık sisteminden kaçarak, dokulara metastaz yoluyla ve yeni konakçıl yapılar edinerek yayılırlar. Bu bağlamda konak üzerinde hayatta kalmak isteyen parazitler, konak hücrenin immün sistem yanıtını düzenleyen hücrelerin apoptozunu indükler aynı zamanda ise konak hücrenin apoptoz mekanizmasını önleyerek canlılık kapasitelerini artırmış olurlar. Diğer yandan ise bazı parazitlerin (*Echinococcus granulosus*) gibi tümörün apoptozunu indükleyerek metastaz gerçekleştirmesini engeller ve inflamatuvar yolakları kısmi şekilde düzenleyerek bazı sitokinlerin sinyal aktivasyonlarında rol oynarlar (66). Kanser hücrelerinde ve bazı parazitlerin yüzeyinde aynı veya benzer antijenlerin ihtiva edildiği bilinmektedir. Söz konusu antijenler müsin tipi Tn, TF, sial Tn ve Tk antijenleri olarak eksprese edilmektedir. Parazit ve kanser hücresinde ortak olarak bulunan antijenler kanser hücrelerinin tutunmasında, invazyonunda ve proliferasyonun da önemli rol oynar. Kronik parazit enfeksiyonları doğal bağışıklık sinyallerinin antikanser aktivitesini artırmaktadır. Denritik hücreler (DC) patojenleri ve Toll benzeri reseptörleri (TLR), C tipi lektinler (CLR) ve hücre içi Nod benzeri reseptörler (NLR), çeşitli reseptör tanıma sistemleri tarafından tanınır. Bu bağlamda DC'ler, doğal bağışıklık aracılığıyla gelişen lenfosit aktivasyonlarını, NK hücreleri de dahil olmak üzere etkileyerek sitokin salgılayıcı T ve B hücrelerinin yanıtlarını da aktif bir şekilde regüle eder (66,67).

### 2.9.1. *Echinococcus granulosus* ve konak mikro çevresi

*Echinococcus granulosus* cinsi parazit türü genellikle evcil hayvanlar veya yabani hayvanlar arasında yaygın bir parazit türüdür. *E. Granulosus* parazitinin erişkin formu konakla enfekte olduğu zaman konağın ince bağırsağına uygun koşullarda yerleşmekte ve yumurtalarını dolaşıma yayılmasını sağlayarak konağı istila etmektedir. Yumurtalar ise normal şartlar altında uzun süre yok olmadan efektif olarak kalabilmektedirler. Yumurtaların bağırsağa yerleşmesinin ardından metasestod adı verilen bir evreyle larvalar gelişimini sürdürür. Metasestodlar belirli olgunluğa ulaştıktan sonra birçok Protoskoleks üretir ve her biri ağız yoluyla alındıktan sonra konak dokuya ulaştığı aşamada, yetişkin bir tenya olma kapasitesine sahip olur. İnsan bu döngüde rastlantısal olarak ara konakçıl bir yapıyı teşkil etmektedir (68). Evcil veya yabani

hayvanların salyalarında ve dışkılarında bulunan parazit yumurtalarının ağız yoluyla alınmasının ardından bulaşın ilk aşaması gerçekleşmiş olur. Yumurtalardan çıkan onkosferler sistemik dolaşım ile birlikte, gelişimini tamamlayan metasestodların genellikle karaciğer ve akciğer gibi organlara ulaşması sağlanır. Birbirinden farklı doku ve organlara yerleşen erişkin metasestodlar, kistik ekinokokkozis (KE) olarak bilinen ve hidatik kist (HK) adı verilen yapıyı oluşturmasıyla beraber ölümcül olabilen ciddi bir hastalığa yol açarlar (69). Genel bir ifadeyle insanlarda görülen üç ekinokokkozis türü vardır bunlar; kistik ekinokokkozis, alveolar ekinokokkozis ve polikistik ekinokokkozistir. Enfeksiyon sürecinde KE’de HK yapısının içerisinde bulunan antijen yönünden zengin olan berrak bir sıvı, *Echinococcus granulosus*’un metasestod evresi aracılığıyla üretilir. Konak dokular üzerinde gelişen kistlerin boyutları ortalama 1 ila 15 cm arasında değişebilmektedir. İnsan konak dokusunda kist yapısının gelişimi için belirli bir süre olmamasıyla birlikte enfeksiyondan sonra 10 aydan daha fazla zamanda kistlerin gelişebileceği bilinmektedir (68,70).



Şekil 13. *E. Granulosus* parazitinin yaşam döngüsü (71).

## 2.9.2. Hidatik kist ve veziküllerin yapısı

*E. Granulosus* parazitinin ara konaklarda oluşturduğu yapıya ise hidatik kist adı verilmektedir. Hidatik kist yapısal olarak iki şekilde doku ve organlarda yaygınlığını korur. Bunlar, Uniloküler ve multiveziküler olmak üzere iki tipte bulunmaktadır. Uniloküler kistler sadece tek bir kist kesesi yapısından oluşur ama içerisinde de birden fazla kist kesesi (küçük veziküller) içerebilmektedir. Multiveziküler kistler ise ana keseye ve birbirine bitişik aynı zamanda birbirlerinden bağımsız olarak da bulunan kistler kümesidir. İnsanlarda genellikle Uniloküler kistler görülür. Kistlerin yerleştiği organ ise akciğer ve dalağa nazaran sıklıkla karaciğerdir. Hidatik kist kesesinin yapısı genellikle konak doku veya organ tarafından oluşturulan fibröz bir yapısal formdan ve germinatif bir katmandan oluşmaktadır. Germinatif katmandan kopan bazı kist hücreleri lenf ve damar yoluyla kendilerine yeni konak dokular bulabilmektedir. Tümör hücresiyle parazit bu bağlamda birbirine benzemektedir. Tümör hücrelerini metastaz yoluyla kontrolsüz büyümesi, *E. Granulosus* parazitinin ise yeni konaklara yayılması ile açıklanmaktadır (69).



**Şekil 14.** Hidatik kist ameliyatı sonrasında erkek bir çocuğun beyininde oluşan sekonder kist vezikül yapılarından örnekler (69).

### **2.9.3. Parazit hücresinin yüzey bileşenleri ve ortak antijenler**

Bakteriyel enfeksiyonlarda parazitin dış yüzey tabakasının konak hücreleri ile doğrudan temas etmektedir. Konak hücrelerin adaptif ve doğal bağışıklığını aktivasyonunda rol oynayan çeşitli antijenik yapıları içerir. Parazitler bu durumda konak hücresinin savunmasından kaçınmak için çeşitli gelişmiş yüzey modifikasyonlarına sahiptir (72). Kanser hücresi yerleştiği konağın bağışıklığından yüksek oranda kaçma yeteneğine sahiptir. Kronik olarak gelişen enfeksiyon modelini taklit edici mekanizmalar geliştirmişlerdir. Kanser ve *E. granulosus* arasında ortak olarak saptanan antijenlerinden en etkilisi  $\alpha$ -N-asetilgalaktozamin-O-serin/treonin (Tn) antijenidir. İnsan kolorektal karsinomlarında ise yüksek oranda eksprese edilen antijen Tk antijenidir. Tn antijeni ise hem kanser dokusunda hem de karaciğer kistik ekinokokkozunda tespit edilmiştir (3). Konak immün sistemi tarafından ilgili kanser hücresinin tanınmasıyla beraber Th<sub>1</sub> polarize lenfositler Sitotoksik T hücrelerini ve makrofajların uyarılmasını başlatır. Ekinokokkozis 'in erken evrelerinde Th<sub>1</sub> bağışıklık yanıtı daha baskın bir yol izlemektedir. Bu bağlamda ancak kistin organa veya dokuya yerleşmesi ve büyümesi sonucunda immün sistem tarafından Th<sub>2</sub> yanıtı artırılarak, parazitin yok olmasına giden süreçte ise hızlıca azalarak yerini Th<sub>1</sub> yanıtına bırakmaktadır (73).

Genel bir ifadeyle *E. granulosus*'un ihtiva ettiği antijenlerin belirli kanserler üzerindeki ortak antijenlere karşı aksiyon oluşturabilmesi, bağışıklık hücrelerinin uzun süreli hafızasına göre düzenlenmektedir. Sonrasında *E. granulosus* onkosferinde bulunan antijenik yapı, konak immün sistemi tarafından tanınarak ilgili antikör bağımlı hücre vasıtasıyla aksiyon yanıtını düzenler. Spesifik tümör antijenlerinin immün sistem tarafından tanınması antitümör sinyal yanıtının salgılanmasında en önemli aşamadır. Bu bağlamda parazit ve tümörde bulunan birbiriyle ilişkilendirilmiş antijenlerin bağışıklık sistemi tarafından önceden tanınmış olması antitümör bağışıklık yanıtının oluşmasında kritik bir rol oynar (72). Parazitlerin yerleştiği konak da aktive ettiği antitümör ümmün yanıtlar, tümörün mikroçevresine bağlı olarak ve kanser türünü de kapsayarak etkilediği antitümör hücrel sinyaller aynı etkide olmayabilir. Buradan yola çıkarak ortak antijenler kanser türüne ve konak yapısına bağlı olarak kanserin gelişimini engelleyebilmelerinin yanı sıra bazı sistemlerde ise kanser gelişimini artırabilirler. Örnek olarak *E. granulosus* onkosferinin yüzeyinde yüksek oranda üretilen EgKI-1 proteini bir proteaz inhibitörüdür. EgKI-1 proteininin yapılan araştırmalarda kanser hücrelerini direk olarak durdurabilme kapasitesine sahiptir.

**Tablo 2.** Parazit ve kanser hücreleri arasındaki ortak antijen tipleri (72).

Kanser antijeni	İfade edildiği parazit
Tn antijen	<i>Echinococcus granulosus</i>
	<i>Schistosoma mansoni</i>
Tk antijen	<i>Taenia hydatigena</i> , <i>T. crassiceps</i> , <i>Mesocostoides vogae</i> , <i>S. mansoni</i>
Sial Tn antijeni	<i>E. granulosus</i> (hem larva hem de erişkin)
TF antijeni	<i>E. granulosus</i> , <i>Fasciola hepatica</i> , <i>S. mansoni</i>
Non-glikosile 27 kDa molekülü	<i>E. granulosus</i>
Heat shock proteini 70 (HSP70)	<i>E. granulosus</i>
40 kDa'lık bir antijen	<i>E. granulosus</i>

### 3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu tez çalışması 2023/6-4 YLS kodlu proje olarak Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından desteklenmiştir. Araştırma kapsamında yapılan tüm deneyler için kullanılan laboratuvarlar, Hacettepe Üniversitesi ve Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi işbirliği çerçevesinde kullanılmıştır.

#### 3.1. Kullanılan Malzemeler ve Cihazlar

**Tablo 3.** Çalışmalarda kullanılan malzemelerin ve cihazların listesi.

Hücre kültürü	Cihazlar	Biyokimya
<ul style="list-style-type: none"><li>• Caco-2</li><li>• CoEpi</li><li>• Tripsin –EDTA</li><li>• PBS</li><li>• DMEM</li><li>• DMSO</li><li>• 6 kuyucuklu flask</li><li>• 96 kuyucuklu plate</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Steril kabin</li><li>• PCR cihazı</li><li>• İnkübatör</li><li>• İvert Mikroskop</li><li>• Mikropipet</li><li>• Santrifüj</li><li>• ELISA plaka okuyucu</li><li>• Vorteks</li><li>• -20 °C Dolap</li><li>• -80 °C Dolap</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• XTT Solüsyonu</li><li>• BCA Reaktifleri</li><li>• RNA izolasyon kiti</li><li>• cDNA sentez kiti</li><li>• SYBR Green Master mix</li><li>• ROX</li><li>• ELISA IL-4 kit</li><li>• ELISA TGF-<math>\beta</math> kit</li><li>• ELISA TNF-<math>\alpha</math> kit</li><li>• Primer sentezi</li><li>• RNas içermeyen su</li><li>• RiboEx</li></ul>

### 3.2. Hücre Hatlarının Çözdürülüp, Pasajlanması

Hücre kültürleri, birçok canlıdan elde edilen doku, organ vs. gibi yapılardan kültürlenmiş hücre soylarından oluşmaktadır. Genel bir ifadeyle kanser tedavilerin çalışmalarında da, virüs ve parazit kaynaklı enfeksiyonlara karşı geliştirilen aşılar ve gen tedavilerinde, hücre hatları biyokimyasal moleküller ve modeller ile beraber geniş bir yelpazede *in vitro* şekilde yaygın olarak kullanılmaktadır. Hücreler dondurularak muhafaza edildiği veya dondurulmuş olarak temin edildiği için çözdürülmesi yapıldıktan sonra hücrelerin kültüre alınma protokolü ile çoğaltılması sağlanır.

Dondurulmuş olarak muhafazası sağlanan yerden kriyoviyal, kuru buz içerisinde de çıkarıldıktan sonra 37 °C'lik su banyosunda hafifçe çalkalayarak buz kristalleri çözdürülür. Buz kristalleri çözdürüldükten sonra kriyoviyal çekilerek, işlemlerin sonrasında sterilizasyon için %70'lik alkol ile çalışılan alan dekontamine edilir.

Çözünen kriyoviyalin kapağı açılıp steril mikropipet yardımıyla 9 ml besiyerine nazikçe transferi gerçekleştirilir. Daha sonra 1200 rpm' de 5 dk boyunca santrifüj yapılarak hücreler çöktürülür. Santrifüj esnasında kriyoprotektan süpernatanta ayrılacaktır. Süpernatant atılır ve pellet başka bir (1-2 ml) taze besiyerine süspansiyon edilerek, hücrelerin yıkama aşaması tamamlanır. Ekim yapılacak kültür plakaları etiketlenerek (hücre hattı/kodu /tarih vs.) ekim sonrasında bırakılacak olan inkübatör içerisinde plakalara uygun miktarda besiyeri ile yerleştirilir. Hücrelerin düzenli olarak çoğalma aşamaları incelenmiş olup, besi ortamı hücrelere yetersiz görüldüğü durumda, besiyerlerinde ki hücrelerin çoğalmaları durdurularak pasajlama protokolü uygulanır.

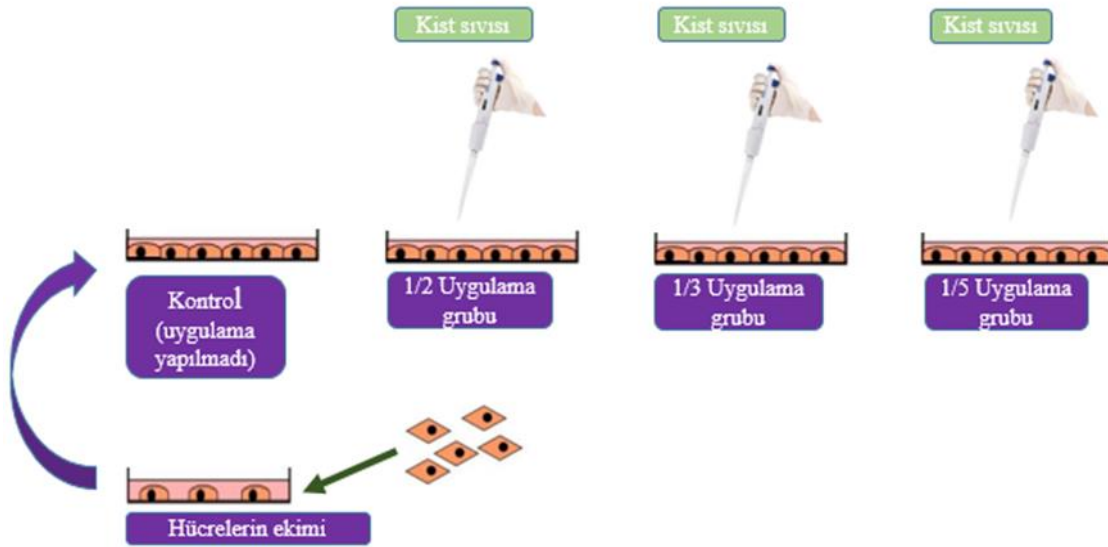
### 3.3. Hücre hatlarının Kültürü

Çalışmada kullanılan hücre soyları Caco-2 (insan kolorektal adenokarsinom, ATCC® HTB-37™) hücre hattı ve CoEpi (kolon epitel hücresi, ATCC® CRL-1459™) kullanılmıştır. Hücreler, antibiyotikler ile desteklenen (100 U/ml penisilin, 100 µg/ml streptomisin), %10 PBS içeren DMEM besiyeriyle süspansiyon edilmiştir. Hücrelerin ekimi 6 kuyucuklu flasklara yapılmıştır. Sonrasında %5'lik CO<sub>2</sub> içeren alanda inkübe edilerek büyümeye bırakılmıştır. Hücre kültürü çalışmalarının tüm aşamaları steril kabinde (Laminer Flow, Holten Lamin Air

Biosafe 1.2) gerçekleştirilmiştir. Flask yüzeyine hücrelerin tutunmaları ve konfluent olma durumlarına göre hücreler sürekli kontrol edilmiştir.

### 3.4. Caco-2 Ve CoEpi Hücre Hattının Hidatik Kist Sıvısıyla Muamelesi

Çalışmada kullanılan HKS mezbahaneler de rutin kesimler sırasında hidatik kist olduğu belirlenen hayvanlardan, aseptik koşullarda şırınga yardımı ile aspire edilerek temin edilmiştir. Flasklara ekimi yapılan CaCo-2 ve CoEpi hücre hattına HKS'den 1/2, 1/3 ve 1/5 hacimli seyreltme dozları ayarlanarak muamelesi yapılmıştır. Sonrasında hücrelerin metabolik aktivitelerini düzenlemeleri için 24 saat %5 CO<sub>2</sub> içeren ortam da, 37 °C'de inkübasyona bırakılmıştır.



**Şekil 15.** Caco-2 ve CoEpi hücre hatlarının hidatik kist sıvısıyla muamele edilmesi.

İnkübasyondan sonra flasklar steril hava akışlı kabin içerisine alınmıştır. Caco-2 ve CoEpi hücre hatlarının muamelesinin yapıldığı flasklardan qRT-PCR ve ELISA testi yapılacak hücreler ayrı ayrı etiketlenerek muhafaza edilmiştir. Flaskların içindeki 1ml'lik besi yeri mikropipet yardımıyla ortamdaki uzaklaştırılarak, kuyucuğun içerisine 1ml Trizol eklendi ve birkaç defa yıkamak suretiyle hücreler bir araya toplanması sağlandı. Daha sonra ependorf

tüplere alındı ve etiketlenerek muhafaza edildi. ELISA testi yapılacak olan hücre hatlarında ise 1ml'lik besi yerleri mikropipet yardımıyla alındı daha sonra 1ml Fosfat tampon solüsyonu (PBS) eklendi. Hücrelerin tutunduğu yüzeyden ayrılması için yavaşça kazıma yapıldı ve PBS solüsyonuyla beraber yıkanarak epondorf tüplere transfer edildi.



Şekil 16. Caco-2 ve CoEpi hücrelerinin uygulama gruplarına ait deney düzeni

### 3.5. XTT Hücre Proliferasyon Testi

XTT Hücre proliferasyon deneyi, herhangi bir *in vitro* modelde ki hücre canlılığının artışı veya aşağı yönde azalışı hakkında yüzdesel bir oran ile bilgi sağlanmasına aracılık eden bir testtir. Deney prosedürü ise XTT'nin mitokondride üretilen NADH tarafından trans - plazma membran elektron taşıma sistemi ve bir elektron aracılığı ile ekstraselüler olarak indirgenmesine dayanmaktadır. XTT'nin indirgenmesi ilave bir çözücü ajana olan ihtiyacı ortadan kaldırır. Bu bağlamda doğrudan kültür ortamı içerisinde suda çözünür bir formazan üretimi gerçekleşir.

XTT Temel olarak suda çözünen bir yapıdadır. XTT testlerinde hücrelerdeki mitokondriyel dehidrogenazların metabolik aktivitesi sonucu oluşan formazanların, suda çözünür olması yapılan testin güvenilirliğini artırmaktadır. Bu bağlamda üretilen formazan 450 nm’de absorbanans vererek, hücrenin canlılığı hakkında bilgi verir.

- Hücreler 96 kuyucuklu hücre kültürü plaklarına her kuyucukta,  $5 \times 10^4$  oranında hücre olacak şekilde hücrelerin ekimi gerçekleştirildi. Caco-2 ve CoEpi Hücre grupları belirlenen hidatik kist sıvısı seyreltme dozlarında muamele edildikten sonra 24 saat boyunca %5’lik, CO<sub>2</sub> içeren ortamda inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyon işleminden sonra her kuyucuk başına 50 µl XTT çözeltisi eklenmiştir.
- Çözeltinin eklenmesinin ardından hücreler 2 saat boyunca 37 °C’de tekrar inkübasyona bırakılmıştır.
- İnkübasyondan sonra çalışılan grupların, optik yoğunlukları (Optical Density, OD) ELISA plaka okuyucuda, 450 nm dalga boyunda okuması işlemi yapılarak kaydedilmiştir. Sonuçlar kontrol grubu değerleriyle oranlanarak normalize edilmiştir.

### 3.6. Hücre Gruplarından Total RNA İzolasyonu

Hücre uygulama gruplarından total RNA izolasyonu yapmak için Hybrid-R™ Lot. No:30521J29036 (GeneAll®, Seoul, Korea) kiti kullanılmıştır. Hücrelerden RNA izolasyonu yapılırken, kiti üretici firmanın belirlediği prosedür dikkate alınarak izolasyon yapılmıştır. RNA izolasyonu sırasında kullanılan Buffer solüsyonları (Buffer RBI, SWI ve RNW) kullanılmadan önce kitin protokolünde belirtilen ölçüde, %96’lık Etil alkol eklenerek kullanıma hazırlanmıştır.

- Caco-2 ve CoEpi hücreleri 6 kuyucuklu hücre kültürü plaklarına yaklaşık  $3 \times 10^5$  hücre/kuyucuk olacak şekilde ekilmiştir. Hücrelerin ekili olduğu flasklardan öncelikle besiyerleri alınarak, sonrasında ise her bir kuyucuğa 1ml RiboEx™ eklendi. Yıkama ve hücre kazıma çubuğu ile hafifçe kazımlar yapılarak yüzeye tutunan tüm hücreler bir araya toplandı. Toplanan hücreler bir eppendorf tüpüne alındı.

- RiboEx™ eklenmiş olan hücrelerin üzerine 200 µl kloroform eklenerek vorteks cihazı ile karıştırma işlemi yapıldı ve 15 saniye oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyon aşamasının bitmesini takiben 15 dk boyunca, +4 °C’de 12.000 g’de santrifüj yapılmıştır.
- Santrifüj işleminden sonra oluşan üst faz steril bir ependorf tüpe aktarıldı.
- Alınan üst faz miktarı oranında, tüpün içerisine Buffer RBI (yaklaşık 900 µl) eklendi. Daha sonra alt üst yapılarak karışması sağlandı.
- Örnekler F Tipi Mini Kolona en fazla 700 µl olacak şekilde transfer edildi. Daha sonra oda sıcaklığında 10.000g’de 30 saniye boyunca santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra toplama kolonunun üst tarafı ayrılarak kolondan tüpe akan kısım boşaltıldı. Yapılan işlemler, çalışılan örnek yaklaşık 900 µl olduğu için bir kez daha tekrar edildi.
- Örnek yükleme işlemi bittikten sonra Mini Kolona 500 µl Buffer SWI eklendi. Oda sıcaklığında 30 saniye boyunca 10.000g’de santrifüj edildi. Toplama tüpüne biriken kısım boşaltıldı.
- Daha sonra Mini Kolona 500 µl Buffer RNW eklenerek, oda sıcaklığında 30 saniye boyunca 10.000g’de tekrar santrifüj edildi. Ardından toplama tüpüne biriken kısım boşaltıldı. Sonrasında ise Mini Kolon tekrar 10.000g’de oda sıcaklığında 1 dakika boyunca santrifüj edildi.
- Santrifüjden sonra toplama tüpü atılarak Mini Kolon 1.5 ml’lik temiz bir ependorfa alındı. Sonrasında kolonun üzerine 60 µl RNase içermeyen su eklendi ve 1 dakika bekletildi. Bekleme aşamasını takiben tüp oda sıcaklığında 10.000g’de 1 dakika boyunca santrifüj edildi. Ependorf’un dip kısmına kolondan biriken RNA, daha sonrasında kullanılacak olan zamana kadar -20 °C dolapta (Vestel RT 455) muhafaza edilmek üzere kaldırıldı.

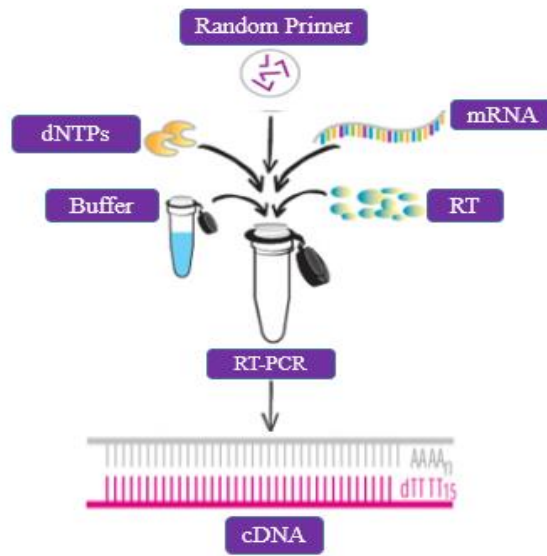
### **3.7. İzole Edilen Total RNA’ların Saflık ve Kalitesinin Belirlenmesi**

RNA izolasyonu deneyinden sonra elde edilen RNA’ların saflıklarının belirlenmesi komplementer DNA (cDNA) sentezinin kalitesi bakımından önemlidir. RNA’nın kalitesinin belirlenmesinde kullanılan klasik, spektrofotometrik bir yöntem olan OD ölçümüdür. Bu yöntemin temel prensibi RNA’nın saflığı, çalışılan örneklerin farklı dalga boylarında verdiği optik dansiteye bakılarak tayin edilmektedir. RNA saflığının belirlenmesinde genellikle

örneklerin 260 nm dalga boyundaki absorpsiyonunun, 280 nm dalga boyunda ( $OD_{260/280}$ ) okunan absorpsiyon değerine oranlanarak bulunmaktadır. Ölçümler oranlandığında bu oranın 1.8-2.0 arasında olması protein, fenol vb. gibi kontaminasyonların olmadığını gösterir ve bu ortalama ise RNA'nın kalitesi açısından iyi bir sonuçtur. Elde edilen RNA'lar spektrofotometre'de Epoch Micro-Volume Spectrophotometer System (BioTek, Winooski, United States) ölçülerek absorpsiyon oranları belirlenmiştir. Daha sonrasında cDNA yapılmak üzere tüm örneklerin aynı konsantrasyonda reaksiyona girmesi için gerekli seyreltmeleri yapılmıştır.

### 3.8. Revers transkriptaz PCR (RT-PCR) ile cDNA sentezinin hazırlanması

RNA izolasyon deneyiyle birlikte izole edilen mRNA'dan, cDNA sentezinin yapımında Appliedbiosystems™ (TermoFisher, Lithuania) cDNA RT kit kullanılmıştır. cDNA sentezinin temel prensibi, ilk ipliğin sentezi sırasında ters Transkriptaz enzimi mRNA kalıbının bir kopyasını yaparken, ipliği uzatmak için primere ihtiyaç duyar. Bu primerler genellikle oligo(dT)'den ya da rastgele hexamerlerden (Random primer) oluşmaktadır. cDNA sentezi için gerekli organik bazları dNTPs'ler sağlamaktadır. İçerisinde adenin (dATP), sitozin (dCTP), guanin (dGTP) ve timin (dTTP) gibi bazları bulundurmaktadır. Bu dNTPs'ler cDNA oluşurken uygun bazı zincire ekleyerek döngünün devam etmesini sağlar. Kullanılan buffer (tampon) ise enzimlerin ve diğer komponentlerin stabil olarak çalışması için uygun pH koşullarını sağlamaktadır. Bu yöntem sayesinde hızlı ve hassas bir şekilde cDNA sentezlenerek, gen ekspresyonları belirlenebilmektedir.



### Şekil 17. cDNA sentezinin kısımları

cDNA sentezi yapılacak her bir RNA örneği (10 µl) için, tek basamaktan oluşan RT-PCR reaksiyon karışımı, buz üzerinde tüm bileşenlerin belirlenen miktarlarda eklemeleri yapılarak kısa pipetajlar halinde hazırlandı. Hazırlanan karışım her bir reaksiyonun total hacmi 20 µl olacak şekilde tüm örneklerle 10 µl dağıtıldı.

**Tablo 4.** cDNA sentezi için kullanılan bileşenler.

Sentez Bileşenleri	Hacim (µl)	Konsantrasyon
Reaksiyon Buffer	2 µl	-
dNTPs	0.8 µl	100 mM
Random Primer	2 µl	50 µM
Revers Trankriptaz	1 µl	200 U/µl
RNas İnhibitör	1 µl	40 U/µl
RNas içermeyen su	3.2 µl	-
Total RNA	10 µl	2 µg
Son Hacim	20 µl	-

Karışımlar hazırlandıktan sonra PCR cihazında (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA), cDNA sentezi için kullanılan kitin talimatları doğrultusunda döngü sayıları ve basamak sıcaklıkları ayarlanarak program çalıştırıldı. PCR reaksiyonu tamamlandıktan sonra sentezlenen cDNA'lar qRT-PCR çalışılacağı zamana kadar -20 °C'de muhafaza edildi.

#### 3.8.1. cDNA PCR protokolü

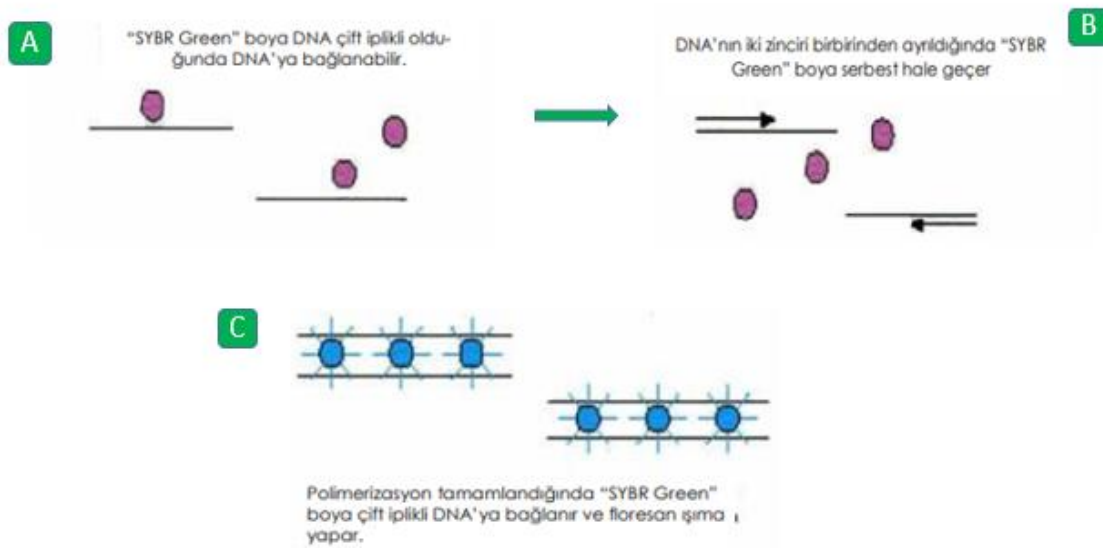
**Tablo 5.** cDNA sentezi için PCR cihazında çalıştırılmış olan protokol.

Basamak	Sıcaklık (°C)	Zaman (dakika)	Döngü
Basamak 1	25	10	1

Basamak 2	37	120	1
Basamak 3	85	5	1
Basamak 4	4	$\infty$	1

### 3.9. qRT- PCR ile Gen Ekspresyon Profillerinin Araştırılması

Eş zamanlı RT-PCR (qRT-PCR) ile eser miktarda mRNA örneklerinde ve gen ifadelerinin arasındaki farklılıkların saptanmasında, kullanılan gelişmiş bir yöntemdir. qRT-PCR kalıp DNA'nın başlangıç noktasını spesifik, hassas bir şekilde tespit eder. Bu yöntemle birlikte DNA'nın kopya sayısını sayısal verilere dönüştürme ve mRNA düzeyinin ise yine sayısal olarak belirlenmesi, yöntemin özelliğini vurgular. DNA'nın boyanarak görüntülenmesinin temel prensibi, çift sarmal yapıdaki DNA'ya bağlanabilen bir ajan olan SYBR green, bağlandıktan hemen sonra ışımaya yapmaya başlar ve yaptığı ışıma değerinin, aşıldığı nokta ile floresan değeri belirlenir. Her bir döngüde meydana gelen floresan miktarı kaydedilerek, döngüdeki ilk anlamlı artışın görüldüğü ekspanensiyal faz görüntülenir. Kaydedilen ışımının sınır (Ct, Cp) değeri, başlangıç materyalinin miktarıyla oranlanarak incelenir.



Şekil 18. SYBR Green boyasının DNA'ya bağlanması

### 3.9.1. Kullanılan primerler

qRT-PCR analizi 96 kuyucuklu şeffaf plastik plate ile SYBR Green PCR Master Mix kullanılarak Vii7 Real Time PCR (Applied Biosystems) cihazı ile gerçekleştirilmiştir. qRT-PCR işleminde, kullanılan primerler aşağıdaki Tablo 6’da verilmiştir. Yapılan tüm deneylerde araştırılan genin değeri, kontrol genin (housekeeping gene, GAPDH) değerlerine göre oranlanarak normalize edilmiştir.

**Tablo 6.** qRT-PCR için kullanılan primer dizileri.

Primerler	Sekanslar
• GAPDH	F: 5'-ATGGGCAGCCGTTAGGAAA-3' R: 5'-GCATCGCCCCACTTGATTTT-3'
• IL-4	F: 5'-CATGCATGGAGCTGCCTGTA-3' R: 5'-AATTCCAACCCTGCAGAAGGT-3'
• TNF- $\alpha$	F: 5'-ATCCTGGGGGACCCAATGTA-3' R: 5'-AAAAGAAGGCACAGAGGCCA-3'
• TGF- $\beta$ 1	F: 5'-TGGTGGAAACCCACAACGAA-3' R: 5'-AGAAGTTGGCATGGTAGCCC-3'
• Vimentin	F: 5'-CCAAGACACTATTGGCCGCCTGC-3' R: :5'-GCAGAGAAATCCTGCTCTCCTCGC-3'
• E-Kaderin	F: 5'-TGGGCCAGGAAATCACATCCTACA-3' R: 5'-TTGGCAGTGTCTCTCCAAATCCGA-3'

### 3.9.2. qRT-PCR Reaksiyon bileşenleri

qRT-PCR için kullanılacak karışım steril kabin altında çalışarak hazırlanmıştır. Karışım için gereken bileşenler, reaksiyon kurulmadan önce oda sıcaklığına getirilerek kullanılmıştır.

cDNA'lar Rnaz içermeyen su ile seyreltilerek, 96 kuyucuklu şeffaf qRT-PCR plate yüklenmiştir. Daha sonrasında Hazırlanan karışım 15µl olacak şekilde cDNA'ların yüklendiği kuyucuklara pipetlenmiştir.

**Tablo 7.** qRT-PCR için kullanılan reaksiyon bileşenleri.

<b>Reaksiyon Bileşenleri</b>	<b>Kullanılan hacim (µl)</b>
Rnaz/Dnaz içermeyen su	3.8
SYBR Green ROX Mastermix	10
Forward Primer (10 µM)	0.6
Reverse Primer (10 µM)	0.6
cDNA	5
Total	20

### **3.10. ELISA Testlerinin Yapılması**

#### **3.10.1. Yöntemin prensibi**

ELISA yönteminin prensibi özgül antijen-antikor arasındaki reaksiyona dayanmaktadır. ELISA temel olarak, antijen-antikor kompleks yapısındaki antikora alkalen fosfataz veya bir peroksidaz gibi bir enzimin bağlanmasıyla, substrat molekülünü renkli bir hale geçirmesi esasına dayanan bir immünokimyasal ölçüm tekniğidir. Bu çalışmada sandwich ELISA tekniği kullanılmıştır. Bu yöntemde antikorlar 96 kuyucuklu plakanın kuyucuklarına önceden immobilize edilir. Antijeni içeren örnek ilave edildikten sonra antijen-antikor kompleksinin oluşması sağlanır. Yıkama işlemleriyle ortamdan bağlanmamış antikorlar uzaklaştırılır ve substrat eklenir. Substrat antikora bağlı enzimle reaksiyona girerek mavi renk oluşturur. Durdurma solüsyonunun eklenmesiyle birlikte ortamın Ph'ı değişir ve mavi rengin sarı renge dönüşümünü sağlar. Sandwich ELISA ile yapılan uygulamada gözlemlenen renk değişimi

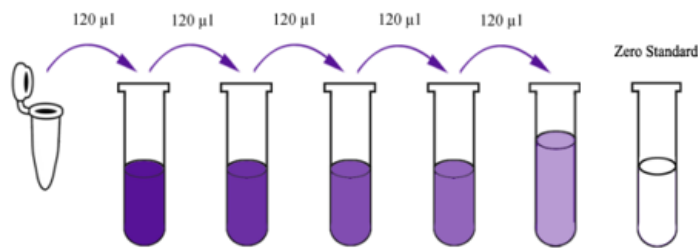
antijenin varlığını göstermektedir. Aşağıda ki tablo 8.'de deneyde kullanılan komponentlerin listesi verilmiştir.

**Tablo 8.** ELISA testlerinde kullanılan komponentler.

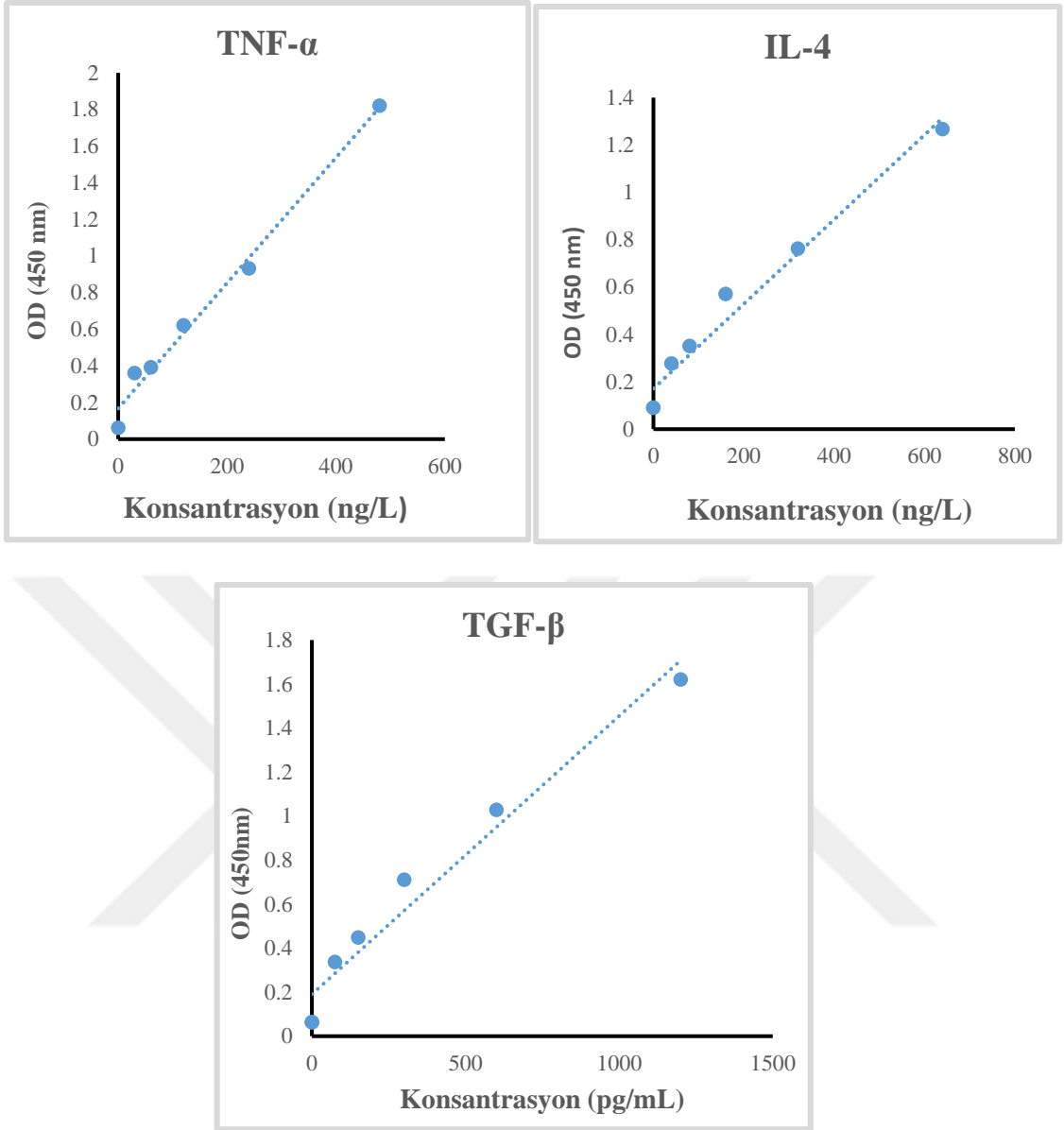
<b>Kullanılan komponentler</b>	
Standart solüsyonu ( ng/L)	Subsrat solüsyonu A
ELISA plate	Subsrat solüsyonu B
Standart seyreltici	Yıkama buffer
Streptavidin-HRP	Biotinylated human TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IL-4
Durdurma solüsyonu	Plate filmi

### **3.10.2. Standart dilüsyonlarının hazırlanması**

Standartlar hazırlanırken 120  $\mu$ l ana standart (960 ng/L) ile 120  $\mu$ l standart seyreltici (0 ng/L) karıştırılarak konsantrasyonu 480 ng/L olacak şekilde stok çözeltisi hazırlanmıştır. Stok standart çözeltisinin (480 ng/L) standart seyreltici ile 1/2 oranında seri şekilde seyreltilmesi yapılarak sırasıyla, 240 ng/L, 120 ng/L, 60 ng/L, 30 ng/L konsantrasyonları oluşturularak standart çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanacak olan TNF- $\alpha$  ,TGF- $\beta$ , IL-4 standartlarına ait her bir konsantrasyonun birim değeri birbirinden farklıdır ve kullanılan standartlar ayrı ayrı ve günlük olarak hazırlanmıştır



**Şekil 19.** Standartların seri dilüsyonlar şeklinde hazırlanışı.



**Şekil 20.** TNF- $\alpha$  , IL-4 ve TGF- $\beta$  ELISA testlerinin standartlarına ait doğrusal eğri grafikleri.

### **3.10.3. IL-4, TNF- $\alpha$ ve TGF- $\beta$ ELISA testlerinin uygulanması**

ELISA testleri için BT LAB ELISA kiti (China) kullanılmıştır. Kit kullanılmadan önce reaktifler ve örnekler kitin talimatları doğrultusunda oda sıcaklığına getirilerek, kullanılacak standartların dilüsyonu yapıldı. Kitin deney prosedürü ise aşağıda verilmiştir.

- İlk etapta 96 kuyucuklu plate üzerine şeritler çekilerek, sıra numaraları belirlendi. Her bir ELISA setinde kullanılan ayrı ayrı standartlar 6 epondorf tüp içerisinde hazırlandı. Sonrasında standart kuyucuklarına 50 µl dilüsyonu hazırlanmış olan standarttan eklendi.
- Ardından örnek kuyucuklarına 40 µl hücre kültürü örneklerinden eklendi. Daha sonra üzerine 10 µl TNF- $\alpha$ , (TGF- $\beta$  , IL-4) antikoru eklenmiştir.
- TNF- $\alpha$  antikoru eklenmesinin ardından 50 µl streptavidin-HRP örnek ve standart kuyularına eklenir (standart kontrol kuyucuğuna eklenmedi).Plate içerisinde iyice pipetaj yapıldıktan sonra, plate kapağı kapatılarak 60 dk boyunca 37 °C’de inkübasyona bırakılmıştır.
- İnkübasyondan sonra her yıkama için kuyucuklara 300 µl yıkama tamponu koyularak 30 sn bekletildi. Bu işlem 5 defa olmak şartıyla tüm kuyucuklar yıkandı. Daha sonrasında emici bir, kâğıt havlu yardımıyla plate kurulandı.
- Yıkama işleminden sonra her kuyuya 50 µl subsrat solüsyon A eklendi ardından ise subsrat solüsyon B eklenmiştir. Sonrasında plate karanlık bir ortamda 10 dk boyunca 37 °C’de inkübe edildi.
- İnkübasyondan sonra her kuyuya durdurma çözeltisi eklenerek mavi rengin sarı renge dönüşümü gözlemlendi ve sonrasında OD değerini tespit etmek için 450 nm dalga boyunda spektrofotometre aracılığıyla ölçümü yapıldı.

### 3.11. BCA Protein Miktarı Tayini

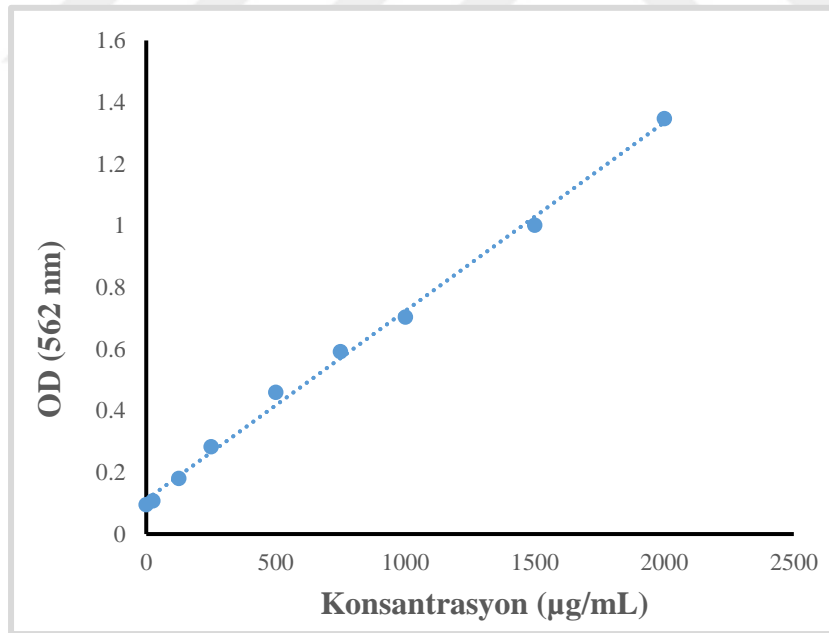
BCA protein testi için ABP biosciences (katalog Num: P011, USA) protein test kiti kullanılmıştır. Testin genel prosedürü şöyledir;

Kullanılan örneğin içerisindeki protein miktarına bağlı olarak renk değişime dayanan deterjanlarla uyumlu bir reaksiyon oluşumu içermektedir. Deney bikinkonik asit (BCA) kullanılarak gerçekleştirilir. Proteinlerin alkali bir ortamda Cu<sup>2+</sup> iyonunu Cu<sup>1+</sup> iyonuna indirgenmesi ve renk değişiminin seçici bir şekilde spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Deneyde kullanılan özel bir reaktif BCA içerir. Reaksiyon sonucunda 2 BCA molekülü ile Cu iyonu şelat yapısı oluşturur. Deney sonunda oluşan bu kompleks yapı 562 nm

dalga boyunda çok yüksek bir absorbans verir. Absorbans değeri geniş bir çalışma aralığında (20 ng/mL ila 2,000 ng/mL ) protein konsantrasyonları arasında doğrusal bir ilişki göstermektedir.

Deneyin aşamaları;

- Deney gerçekleştirilmeden önce örnekler oda sıcaklığına getirilmiştir. Kullanılacak olan standartlar seri dilüsyonlar şeklinde hazırlanmıştır. 96 kuyucuklu plate kullanılmıştır.
- İlk aşamada BCA reaktifi her bir standart ve örnek kuyularına 200 µl harcanacak bir şekilde hesaplanması yapılarak deneyden hemen önce hazırlanmıştır.
- Sonrasında standartlar ve örnekler her kuyucuğa 20 µl olacak şekilde dağıtılmıştır. Hemen sonra 200 µl BCA reaktifi tüm kuyucuklara eklenerek pipetaj yapıldı. Bu işlemden sonra 37 °C’de 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır.
- İnkübasyondan hemen sonra mor renk gözlemlenmiştir ve 562 nm dalga boyunda absorbansı ölçülmüştür. Absorbansı ölçüldükten sonra standart eğrisinin grafiği çizilmiştir.

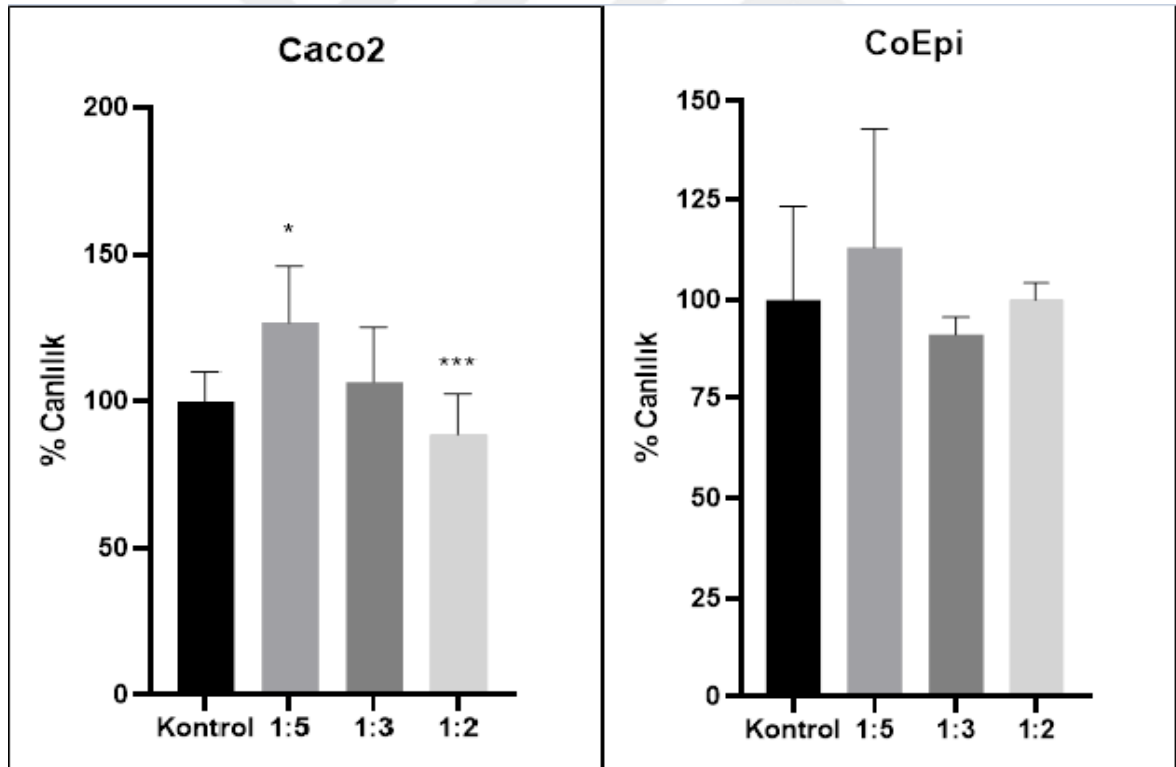


Şekil 21. BCA protein miktar tayin testi için oluşturulan standart eğrisi.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Hidatik Kist Sıvısı Muamelesinin Caco-2 ve CoEpi Hücre Hatlarındaki Hücre Canlılığına Etkisinin XTT Yöntemiyle Belirlenmesi

Caco-2 ve CoEpi hücre hatları 96 kuyucuklu plate üzerinde ekimi yapılarak, HKS ile 1/2, 1/3 ve 1/5 (5 µl, 15 µl, 25µl) hacimleri ile sulandırılarak muamelesi yapılmıştır. Uygulama yapıldıktan sonra ise 37°C'de CO<sub>2</sub>'li bir ortamda 24 saat boyunca hücrelerin metabolik aktivitelerini düzenlemeleri için inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra XTT prosedürü uygulanmıştır. Daha sonrasında ise spektrofotometrede ölçülerek absorbans değerleri, , her iki hücre hattının da kontrol grubu baz alınarak normalize edilmiştir.



Şekil 22. Hidatik kist sıvısı uygulanmış Caco-2 ve CoEpi hücre hattına ait XTT sonuçları.

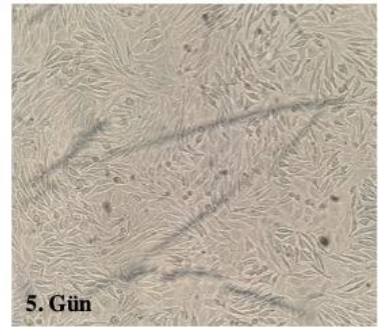
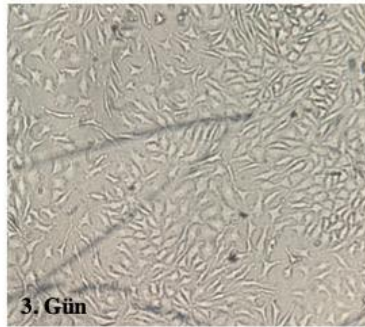
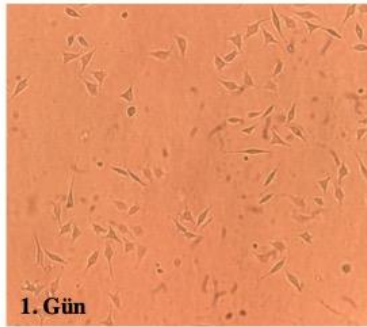
HKS ile muamele edilmiş olan Koleraktal kanser hücreleri ve sağlıklı kolon epitel hücrelerinin XTT sonuçları Şekil 22.'de gösterildiği üzere, HKS'nin Caco-2 hücre hattı

üzerindeki hücre canlılığına etkisi, kontrol grubuyla mukayese edildiğinde de 1/5 uygulama grubunda, hücre canlılığındaki artış seviyesi anlamlı bulunmuştur (\* $P < 0.05$ ). Öte yandan 1/3 uygulama grubundaki hücre canlılığı ise istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur ( $P > 0.05$ ). 1/2 hacimli uygulama grubunda ise kontrol grubuna oranla hücre canlılığındaki düşüş anlamlı olarak saptanmıştır (\*\*\*) $P < 0.001$ ). CoEpi hücre hattında ise hücre canlılığı yüzdeleri anlamsız olarak bulunmuştur ( $P > 0.05$ ).

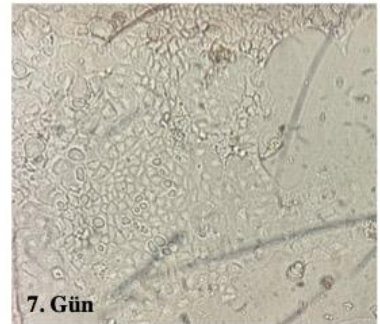
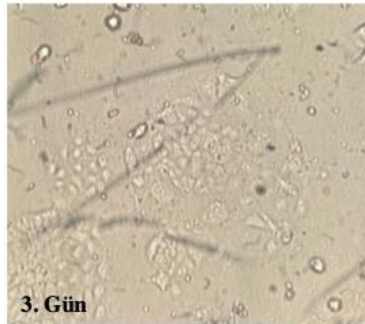
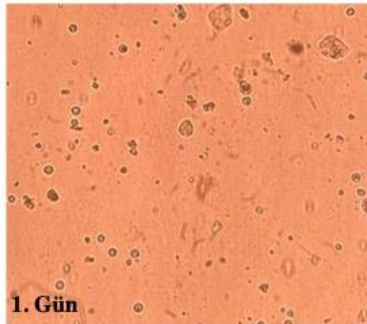
X eksenini, hücre hattı üzerindeki uygulama gruplarını, Y eksenini ise % canlılık oranlarını ifade etmektedir. % Canlılık oranları her bir örneğin absorbans değerleri baz alınarak hesaplanmıştır. Yüzde canlılık =  $[ABS(\text{ortalama}) \times 100] / ABS(\text{kontrol})$  formülü ile hesaplanması yapılmıştır.

#### 4.2. CoEpi Ve Caco-2 Hücre Hatlarına Ait Mikroskop Görüntüleri

##### Sağlıklı İnsan Kolon Epitel Hücreleri (CoEpi)



##### İnsan Kolorektal Adenokarsinom Hücreleri (Caco-2)

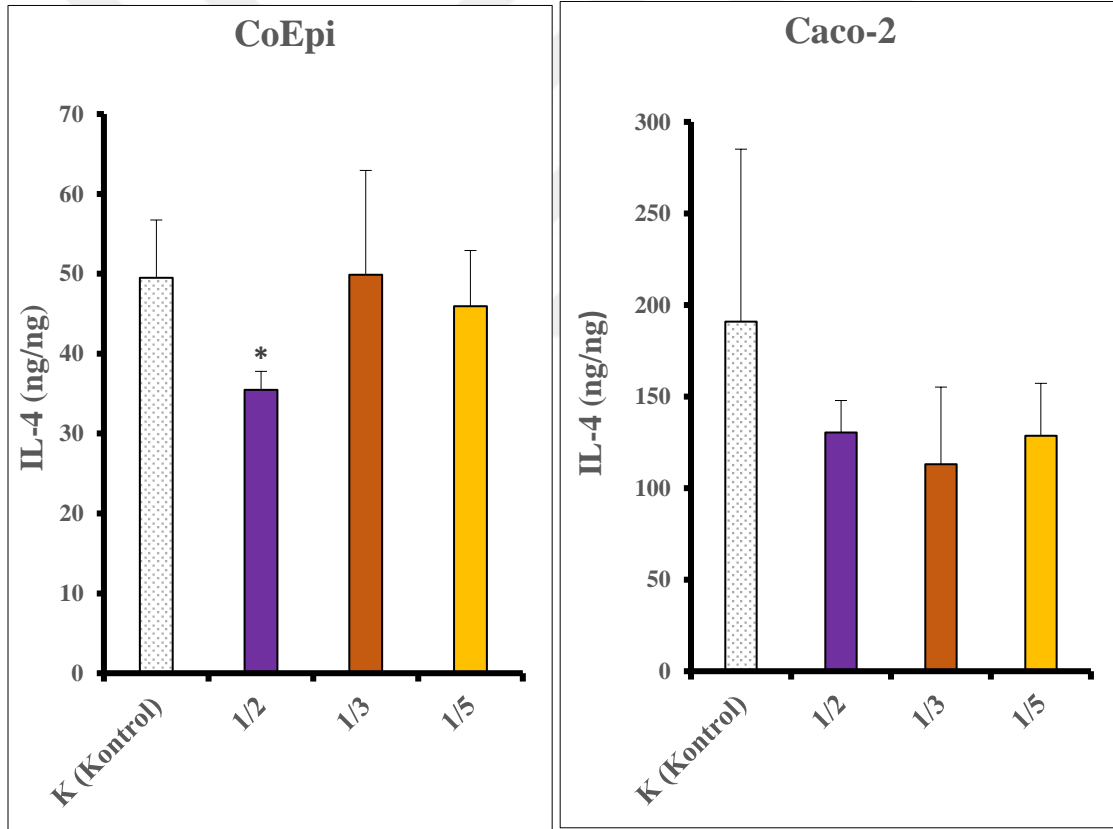


**Şekil 23.** Caco-2 ve CoEpi hücrelerinin belirli aralıklarla çekilmiş, proliferasyonuna ait invert mikroskop görüntüleri.

### 4.3. ELISA Testlerinin BCA Protein Miktarı Testi ile Oranlanmış sonuçları

ELISA testleri yapıldıktan sonra uygulama yapılan hücre gruplarındaki protein miktarının tespiti için BCA protein tayin testi yapılmıştır. ELISA deneyinde belirlenen her bir sitokin miktarı BCA protein seviyesiyle oranlanarak, analiz sonuçlarına ulaşılmıştır.

#### 4.3.1. IL-4 ELISA sonuçları



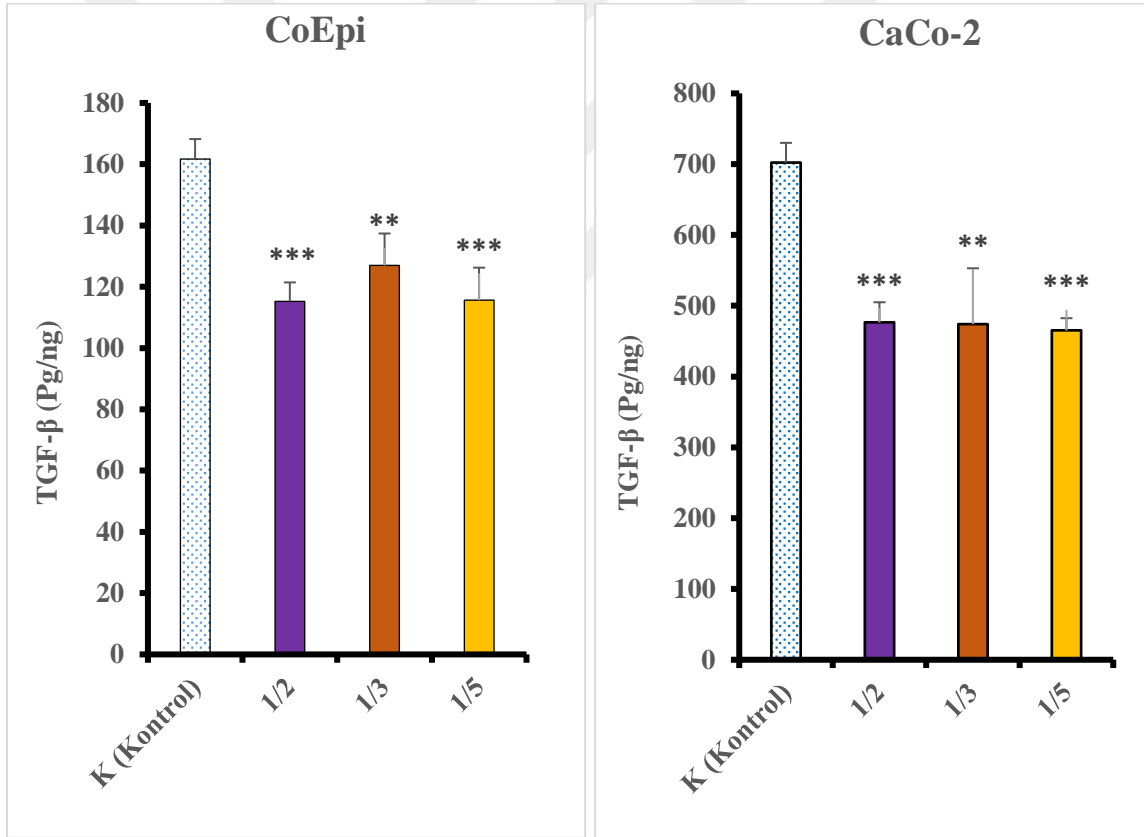
Şekil 24. CoEpi ve Caco-2 hücre hatlarına ait uygulama dozları ve IL-4 sitokini ELISA sonuçları.

CoEpi hücre hattına ait Kontrol grubunda IL-4 konsantrasyonu (49,49 ng/L) , 1/2 uygulama dozunda (35,47 ng/L), 1/3 uygulamasında (49,87 ng/L) 1/5 uygulama grubunda ise

(45,94 ng/L) değerleri bulunmuştur. IL-4 sitokin konsantrasyonu değerlerinde 1/2 hacimli uygulama grubunda kontrole oranla anlamlı bir fark saptanmıştır (\*  $P < 0.05$ ).

Caco-2 hücre hattına ait ELISA IL-4 kontrol grubunun sitokin konsantrasyonu (190,91 ng/L) , 1/2 hacimli uygulama grubu (130,36 ng/L) , 1/3 hacimli uygulama grubu (113,03 ng/L) ve 1/5 hacimli uygulama grubunda ise (128,58 ng/L) sonuçlarına ulaşılmıştır. Kontrol grubuna kıyasla, Caco-2 hücre hattında IL-4 sitokin konsantrasyonu tüm uygulama gruplarında İstatiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir ( $P > 0.05$ ).

#### 4.3.2. TGF- $\beta$ ELISA sonuçları

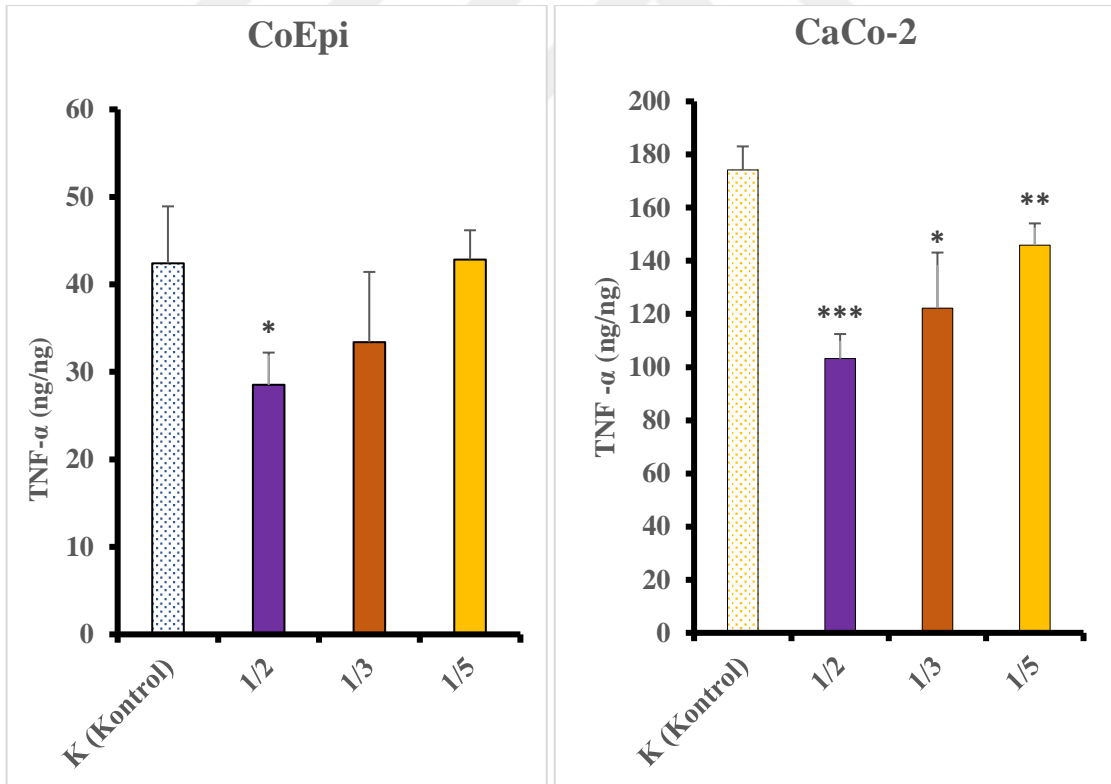


**Şekil 25.** CoEpi ve Caco-2 hücre hattındaki uygulama dozları ve TGF- $\beta$  sitokini ELISA sonuçları.

CoEpi Kontrol grubunda TGF- $\beta$  konsantrasyonu (161,69 pg/mL), 1/2 hacimli uygulama grubunda (115,23 pg/mL), 1/3 hacimli uygulama grubunda (126,98 pg/mL) ve 1/5 hacimli uygulama grubunda ise (115,63 pg/mL) sonuçlarına ulaşılmıştır. Kontrol grubuna kıyasla sırasıyla, 1/2, 1/3 ve 1/5 uygulama gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanarak, aşağı yönde bir eğilim korelasyonu elde edilmiştir (\*\*\* P<0.001, \*\* P<0.05).

Caco-2 hücre hattına ait TGF- $\beta$  kontrol grubunda konsantrasyon düzeyi (702,30 pg/mL), 1/2 hacimli uygulama grubunda (476,65 pg/mL), 1/3 hacimli uygulama grubunda (474,09 pg/mL), 1/5 hacimli uygulama grubunda ise (465,32 pg/mL) verilerine ulaşılmıştır. TGF- $\beta$  sitokin seviyelerinde kontrol grubuna kıyasla sırasıyla 1/2, 1/3 ve 1/5 uygulama gruplarında aşağı yönde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma farkı tespit edilmiştir (\*\*\* P<0.001, \*\* P<0.05).

#### 4.3.3 TNF- $\alpha$ ELISA sonuçları



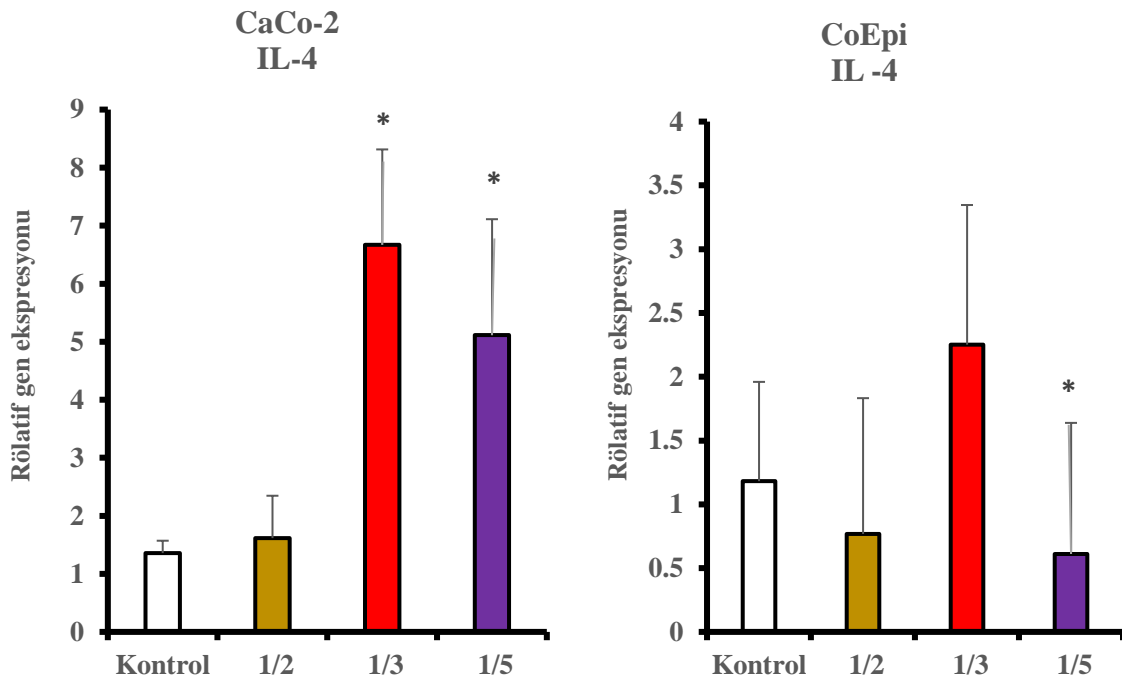
**Şekil 26.** CoEpi ve Caco-2 hücre hatlarına ait uygulama dozlarında TNF- $\alpha$  sitokini ELISA sonuçları.

CoEpi hücre hattındaki 0 uygulama yapılan kontrol grubunda TNF- $\alpha$  konsantrasyonu, (37,00 ng/L), 1/2 hacimli uygulama grubunda (28,53 ng/L), 1/3 hacimli uygulama grubunda (33,40 ng/L) ve 1/5 hacimli uygulama grubunda (42,84 ng/L) verilerine ulaşılmıştır. İstatiksel olarak 1/2 hacimli uygulama grubunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir fark saptanmıştır (\* P<0.05).

Caco-2 hattındaki 0 uygulama yapılan kontrol grubunda TNF- $\alpha$  konsantrasyonu sırasıyla (174,19 ng/L), 1/2 hacimli uygulama grubunda (134,17 ng/L), 1/3 hacimli uygulama grubunda (145,98 ng/L), 1/5 hacimli uygulama grubunda ise (155,05 ng/L) sonuçlarına ulaşılmış olup uygulama gruplarında istatiksel olarak anlamlı bir fark saptanmıştır (\*\*\*) P<0.001, \*\* P<0.01, \* P<0.05).

#### 4.4 qRT-PCR Rölatif Gen Ekspresyonu Sonuçları

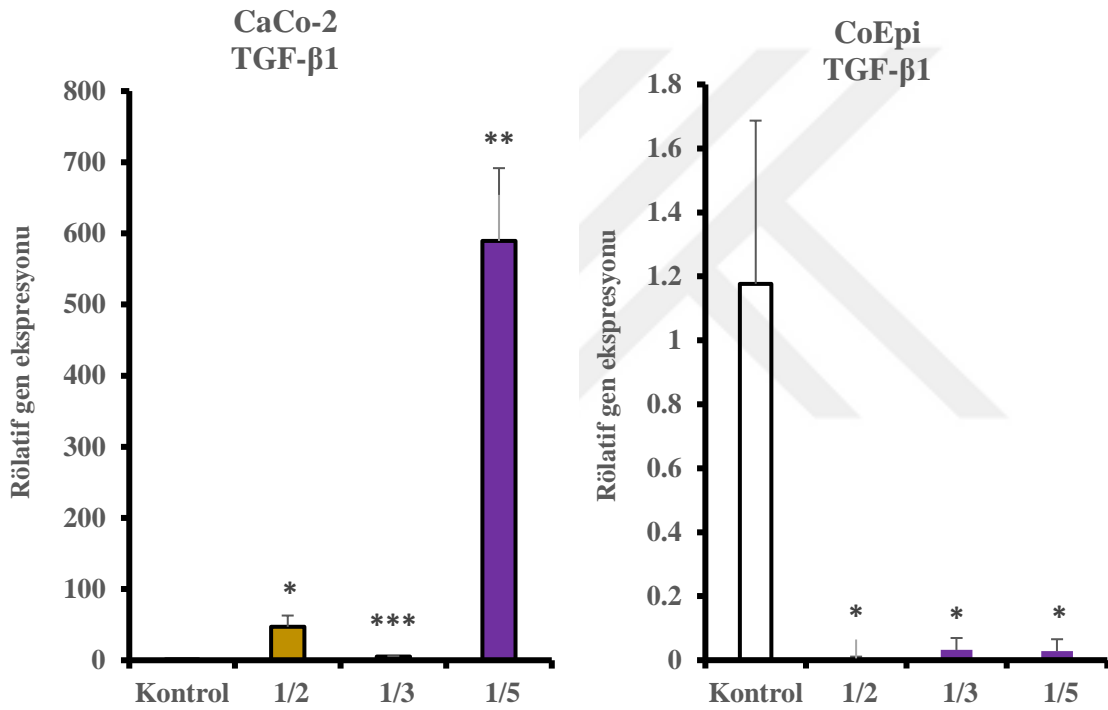
##### 4.4.1 IL-4 rölatif gen ekspresyonu sonuçları



Şekil 27. Caco-2 ve CoEpi hücre hatlarında HKS uygulama gruplarının IL-4 relatif gen ekspresyon seviyeleri.

Şekilde belirtildiği üzere IL-4 gen ifade düzeyi CoEpi hücre hattı ve CaCo-2 hücre hattı üzerindeki uygulama gruplarıyla beraber kıyaslamalı olarak gösterilmiştir. IL-4 gen ekspresyonu Caco-2 hücre hattında 1/2 hacim oranı kontrolle aynı kalırken, 1/3 ve 1/5 hacimli HKS uygulamasında gen ifade düzeyi yükselmiştir (\* P<0.05). CoEpi hücre hattında ise kontrol grubuna kıyasla 1/5 hacimli uygulama grubunda IL-4 gen ekspresyon seviyesinde düşüş anlamlı olarak bulunmuştur (\* P<0.05).

#### 4.4.2. TGF-β1 rölatif gen ekspresyon sonuçları



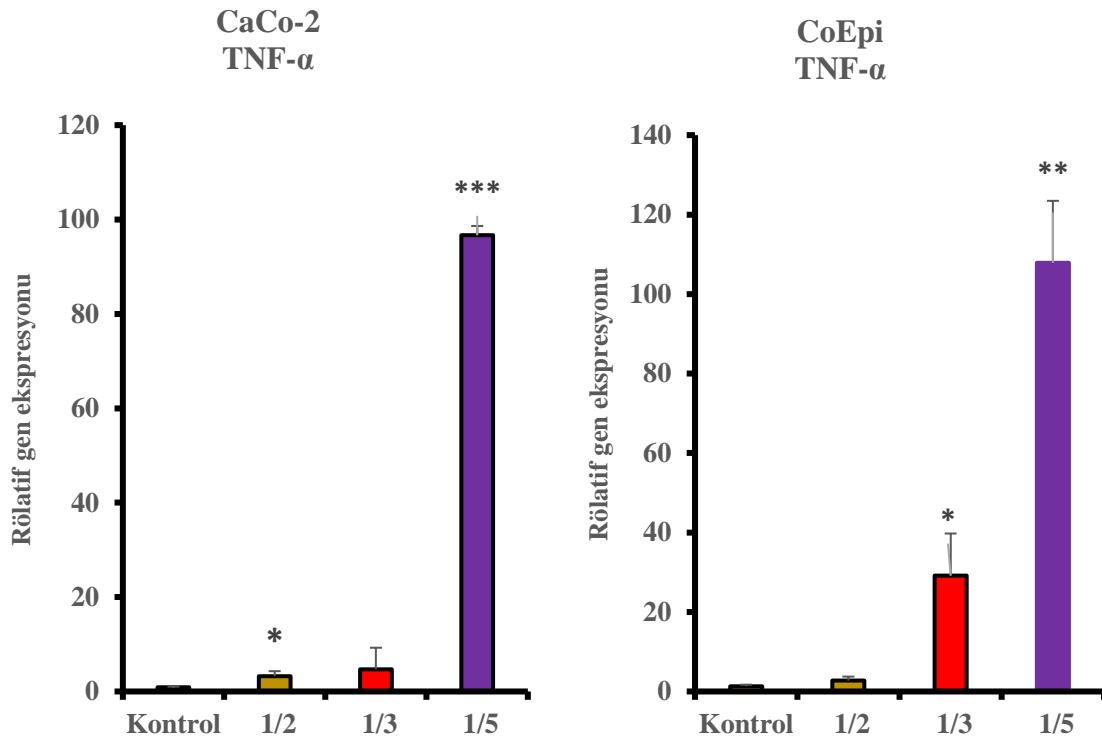
**Şekil 28.** CoEpi hücre hattı ve Caco-2 hücre hattına ait uygulama gruplarında TGF-β1 rölatif gen ekspresyon seviyeleri.

Şekilde belirtildiği üzere Caco-2 hücre hattına ait HKS uygulama grubunda kontrole kıyasla 1/2 ve 1/3 hacimli uygulama gruplarında TGF-β1 gen ekspresyon seviyesindeki düşüş anlamlı olarak bulunmuştur (\* P<0.05 , \*\*\* P<0.001). Aynı zamanda 1/5 hacimli uygulama grubunda ise TGF-β1 gen ekspresyon seviyesindeki artış anlamlı olarak saptanmıştır (\*\* p<0.01).

CoEpi hücre hattına ait HKS uygulama gruplarında kontrole oranla, 1/2, 1/3 ve 1/5 hacimli gruplarda sırasıyla gen ekspresyon seviyesinde ki aşağı yöndeki düşüş anlamlı olarak

bulunmuştur (\*  $P < 0.05$ ). Uygulama yapılan gruplardaki tüm değerler GAPDH genine oranlanarak normalize edilmiştir.

#### 4.4.3. TNF- $\alpha$ Rölatif gen ekspresyonu

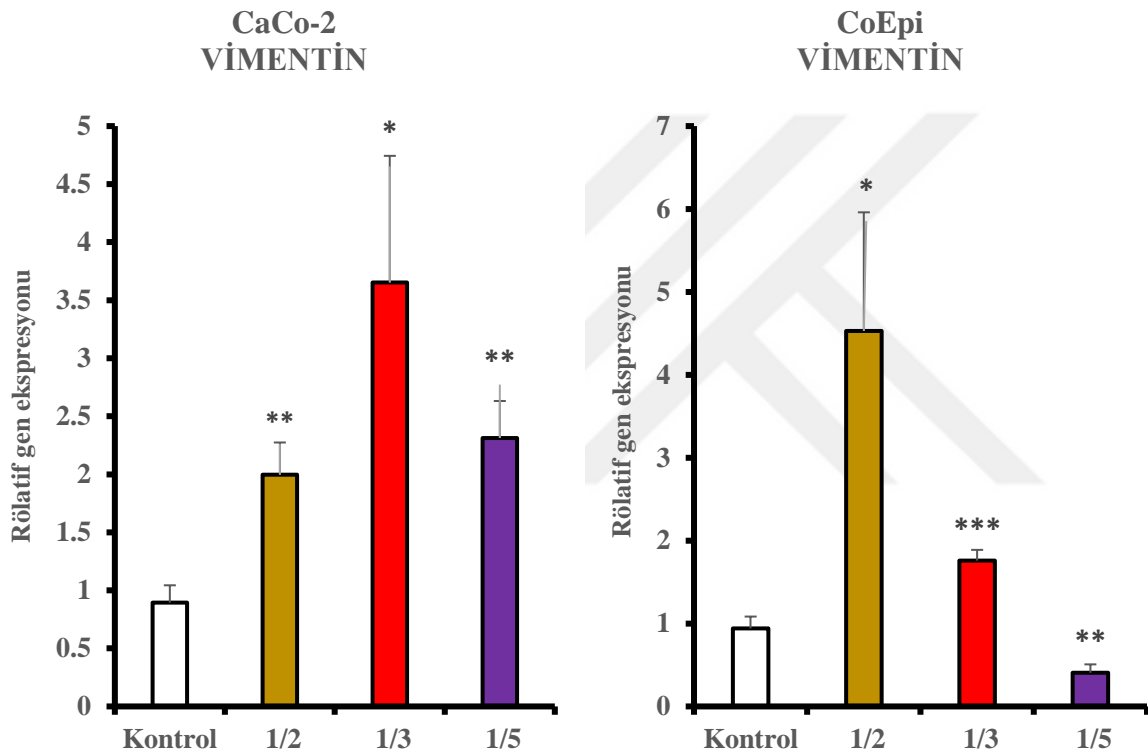


**Şekil 29.** Caco-2 hücre hattı ve CoEpi hücre hattına ait uygulama gruplarında TNF- $\alpha$  gen ekspresyon seviyeleri.

Caco-2 ve CoEpi hücre hattındaki kontrol gruplarında ki hücelere herhangi bir HKS uygulaması yapılmamıştır. Şekil 29.'da belirtildiği üzere Caco-2 hücre hattında kontrole kıyasla sırasıyla, 1/2 hacimli uygulama grubunda, gen ekspresyon seviyesindeki artış anlamlı bulunmuştur (\*  $P < 0.05$ ). 1/3 hacimli uygulama grubundaki ekspresyon seviyesi anlamsız olarak bulunmuştur ( $P > 0.05$ ). Bunların yanı sıra 1/5 hacimli uygulama grubunda ise gen ekspresyon seviyesindeki artış anlamlı olarak artış göstermiştir (\*\*\*  $P < 0.001$ )

CoEpi hücre hattında gen ekspresyon seviyeleri kontrol grubuna kıyasla 1/2 hacimli uygulama grubunda anlamsız olarak bulunmuştur ( $P>0.05$ ). 1/3 ve 1/5 hacimli uygulama gruplarında ise sırasıyla TNF- $\alpha$  gen ekspresyon seviyesindeki artışlar ise istatistiksel olarak anlamlı sonuçlara ulaşılmıştır (\*  $P<0.05$ , \*\*  $P<0.01$ ). Uygulama yapılan gruplardaki tüm değerler GAPDH genine oranlanarak normalize edilmiştir.

#### 4.4.4. Vimentin gen ekspresyon sonuçları

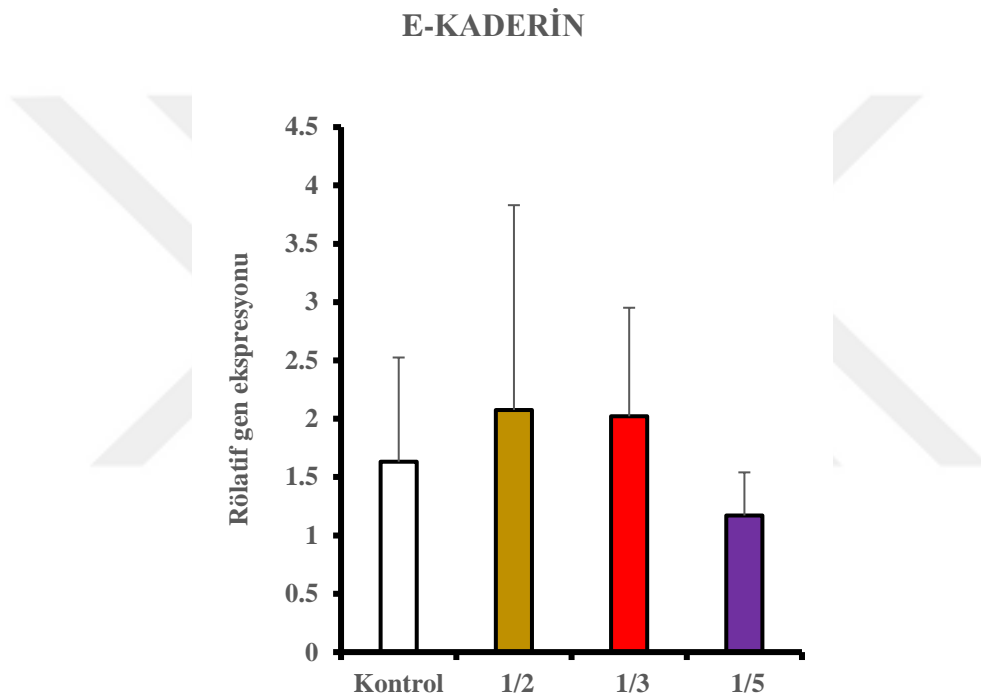


**Şekil 30.** Caco-2 ve CoEpi hücre hattına ait uygulama gruplarında vimentin gen ekspresyon seviyeleri.

Caco-2 ve CoEpi hücre hattındaki kontrol gruplarında ki hücrelere herhangi bir HKS uygulaması yapılmamıştır. Şekil 30.'da belirtildiği üzere Caco-2 hücre hattına ait uygulama gruplarında vimentin gen ekspresyon seviyeleri kontrol grubuna kıyasla 1/2 ve 1/5 hacimli uygulama gruplarında artış, birbirine yakın bir seviyede istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (\*\*  $P<0.01$ ). 1/3 hacimli uygulama grubunda ise diğer grupların gen ekspresyon seviyelerinden daha fazla artış göstermesi anlamlı olarak bulunmuştur (\*  $P<0.05$ ).

CoEpi hücre hattındaki uygulama gruplarında vimentin gen ekspresyon seviyeleri kontrol grubuna kıyasla 1/2 hacimli uygulama grubunda anlamlı olarak, vimentin gen ekspresyon seviyesi yüksek bulunmuştur (\*  $P < 0.05$ ).

#### 4.4.5. Caco-2 E-Kaderin gen ekspresyon sonuçları



**Şekil 31.** Caco-2 hücre hattı uygulama grubunda E-Kaderin gen ekspresyon seviyeleri.

Caco-2 hücre hattındaki kontrol gruplarında ki hücrelere herhangi bir HKS uygulaması yapılmamıştır. Şekil 31.'de belirtildiği üzere Caco-2 hücre hattına ait uygulama gruplarında e-kaderin gen ekspresyon seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir sonuca erişilememiştir ( $P > 0.05$ ). Kontrol grubuna kıyasla grafikteki ekspresyon seviyelerini değerlendirdiğimizde 1/2 ve 1/3 hacimli uygulama gruplarında, 1/5 hacimli uygulama grubuna göre daha fazla ekspresyon seviyesi tespit edilmiştir.

## 5.TARTIŞMA

*Echinococcus granulosus* parazitinden dolayı kaynaklanan zoonotik bir hastalık olan kist hidatik enfeksiyonu, Dünyanın pek çok endemik noktasında görülen paraziter bir hastalık türüdür. Genellikle akdeniz ülkelerinde görülme sıklığı, diğer ülkelerdeki görülme sıklığına kıyasla daha fazladır. Türkiye hidatik kist görülen endemik ülkeler arasında yer almaktadır. Bazı paraziter enfeksiyonların, yapılan çalışmalarla beraber bir takım tümör oluşumunu baskıladığı belirtilmiştir. Bunların yanı sıra *Echinococcus granulosus* kaynaklı enfeksiyon da ise Yakın zamanda yapılan çalışmaların verilerine göre solid tümörlü kanser hastalarında rastgele olarak tanı koyulmuş kist hidatik vakalarının diğer vakalara göre daha düşük olduğu saptanmıştır (74). Diğer yandan *Echinococcus* ve kanser arasındaki ilişkiler bazı çelişkili sonuçlarla beraber hala belirsizliğini korumaya devam etmektedir. Birçok farklı grubun yaptığı çalışmalarda ise hidatik kist protoskolekslerinin kanser aktivitesinde direk veya indirek olarak tümör mikroçevresinde anti-kanser etkisinin belirlenmiş olduğu literatürde mevcuttur (75).

Hidatik kist protoskoleksleri WEHI-164 fibrosarkom hücrelerinde hücre ölümünü tetikleyerek anti-kanser aktivitesi sergilemiştir (76). Bunların yanı sıra kist hidatiğin hücre ölümü ve inflamatuvar yolakların sinyallerinin yapılandırılması arasındaki yol tam olarak net değildir. HKS, araştırmalara göre vücudun bağışıklık hücrelerini aktif hale getirici içerisinde çeşitli antijenlerin bulunduğu bir sıvıdır. Yakın bir zamanda fareler üzerinde yapılan bir araştırmada, HKS ve 78 kDa fraksiyonu ile farelerin aşılmasının sonucunda tümör taşıyıcı farelerin hayatta kalma sürelerinin artışı ve tümör hücresinin proliferasyonunun ve metastaz aktivitesinin inhibe olduğu ortaya çıkmıştır. Aynı zamanda interlökin seviyelerinde artış tespit edilmiştir (77). Başka bir çalışmaya göre ise A549 (akciğer kanseri) hücre hattında HKS uygulamasının direk olarak hücre çoğalmasını engellemesiyle beraber, A549 kanser hücrelerinin apoptoza karşı duyarlı hale geldiği saptanmıştır (78). Caco-2 hücre hattı ile muamele edilen HKS ile yapılan diğer bir çalışmada ise p53 ekspresyonunun azalmasıyla birlikte hücre proliferasyonunda artış gözlemlenmiştir. Apoptozda ise azalma bulgularına ulaşılmıştır (4). Öte yandan HKS kanser hücrelerin de apoptozun inhibe edilmesi açısından önemli immünolojik bir araç olabilir. Ancak değinilen süreçte kullanılan spesifik sinyaller ve yolaklar yüksek ölçüde belirsizliğini korumaktadır. Bu bağlamda parazit yüzeyinde eksprese olan çeşitli antijen tiplerinin tümör mikro çevresiyle kurduğu, tümör inflamasyonunu destekleyici sinyaller arasındaki mekanizmalar tam olarak bilinmemektedir. Kanser

hücresindeki anti-inflamatuar ve pro-inflamatuar sinyal yollarının belirlenmesi ve tümör proliferasyonu üzerinde ve metastaz mekanizmasını destekleyici EMT geçişi hakkındaki biyokimyasal süreçlerin araştırılması önem arz etmektedir.

HKS uygulaması sonucunda Caco-2 hücre hattında EMT geçişi arasındaki ilişki çeşitli araştırmalarda vurgulanmıştır. Tümör metastazının gerçekleşmesi ve devam etmesi için söz konusu tümör hücresinin bir takım biyokimyasal yolları aktif etmesi veya inhibe etmesi gerekmektedir. EMT progresyonu epitel hücelere hareketli ve invaziv bir karakter kazandırdığı için metastaza yüksek oranda katkı sağlar. İnvaziv karakter kazanan tümör hücresi kötü prognozla ilişkilendirilmektedir. EMT ayrıca çeşitli anti-inflamatuar ve pro-inflamatuar sitokinler tarafından düzenlenebilen bir mekanizmaya sahiptir (79,80). Buradan yola çıkarak kanser hücrelerinin proliferasyonu ve metastaz yeteneğini kullanırken hücre içi bir takım sitokinlerin salgılanmasıyla söz konusu anti veya pro-inflamatuar yolların aktif edilmesi sağlanır. Direkt olarak parazit antijenleri tarafından başlatılan antikanser sinyaller, konak savunmasının aktivasyonunu etkileyerek bir takım immünolojik mekanizmaların devreye alınmasını sağlar. Yayınlanan birçok raporda parazit ve tümör antijenleri arasındaki ortak ilişkiye değinilmiştir. Mevcut raporların ifadelerinde *e.granulosus* kaynaklı HKS moleküllerinin anti-tümör etkiyi indükleyebileceğine yüksek oranda değinilmektedir (81,82,83).

Tümör progresyonunun EMT modeline dönüşümünde en önemli belirteçlerden birisi olan, e-kaderin molekülünün aşağı yönde düzenlenmesi, EMT'yi tespit edebilmek açısından önemlidir. E-kaderinin epitel hücrelerde ekspresyon düzeyinin yüksek olarak ifade edildiği ve mezenkimal dönüşümde ise ifade düzeyinin düştüğü çeşitli araştırma raporlarında sunulmuştur (84). Çalışmamızda Caco-2 ve CoEpi hücre hattı kullanılmıştır. Caco-2 ve CoEpi hücrelerinde HKS uygulaması sonrasında kontrol grubuna kıyasla e-kaderin gen ekspresyon seviyesinde anlamlı bir fark bulunamamıştır ( $P>0.05$ ). Öte yandan Caco-2 hücrelerinde grafik verilerini değerlendirdiğimizde 1/5 hacimli uygulama grubunda e-kaderin seviyesi düşüş gösterirken, 1/2 hacimli uygulama grubunda ise kontrole oranla artış kaydedilmiştir. E-kaderine kıyasla, vimentin molekülünün ise EMT modeline dönüşümünden sonra mezenkimal hücrelerdeki ekspresyon profili, mezenkimal hücre karakterini belirlemek için önemlidir. Vimentin ise Caco-2 hücre hattında kontrole kıyasla 1/2 ve 1/5 uygulama gruplarında hacim oranından bağımsız olarak gen ekspresyon seviyesi artmıştır ( $P<0.01$ ). 1/3 hacimli uygulama grubunda ise gen ekspresyon seviyesindeki artış diğer gruplardan daha yüksek bir şekilde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $P<0.05$ ). CoEpi hücreleri ile kıyaslırsak vimentin Caco-2 hücrelerine

göre 1/5 hacimli uygulama grubundaki düşüş anlamlı olarak saptanmıştır ( $P<0.01$ ). Yakın zamanda Caco-2 hücre hattı kullanılarak yapılmış olan bir çalışmanın raporuna göre, mezenkimal hücre modelinde, 0.gün ve 30.gün baz alınarak deneysel ortamda dönüşüm gerçekleştirildiğinde, 30.günde vimentin gen ekspresyon değerinde önemli düzeyde artış kaydedilmiştir. Çalışmamızda ise gen ekspresyon sonuçları ile tutarlı olarak Caco-2 hücre hattında XTT hücre proliferasyon testi sonucunda 1/5 hacimli uygulama grubunda hücre canlılığı anlamlı olarak yükselmiştir ( $P<0.05$ ). Bu durumda Caco-2 hücre hattında HKS uygulaması sonucunda 1/5 hacimli uygulama grubunda EMT geçişi söz konusu olabilir. Bu bağlamda EMT kanser hücrelerinin yenilenmesinde ve daha dirençli hale gelmesinde belirleyici bir unsurdur. Diğer yandan tümör mikro çevresinde inflamatuvar ortamın kötü prognozla seyretmesine sebep olmaktadır (85).

Daha sonra çalışmamızda EMT için önemli başka bir belirteç olan TGF- $\beta$ 1, e-kaderin ve vimentin arasındaki ilişki araştırılmıştır. Caco-2 hücrelerinde CoEpi hücrelerine kıyasla 1/2 hacimli HKS uygulama grubunda ELISA testindeki TGF- $\beta$ 1 sitokin değerlerinde ki düşüş anlamlı olarak bulunmuştur ( $P<0.001$ ). Ek olarak 1/2 hacimli uygulama grubunda TGF- $\beta$ 1 gen ekspresyon seviyesindeki azalmada ise anlamlı bir fark saptanmıştır ( $P<0.05$ ). Diğer yandan 1/5 uygulama grubunda, TGF- $\beta$ 1 gen ekspresyon seviyesi ise ELISA testiyle bağlantılı olarak düşük sonuç alınmıştır ( $P<0.01$ ). XTT hücre canlılığı testinde belirttiğimiz sonuçları takiben, 1/2 uygulama grubunda canlılık anlamlı olarak azalırken ( $P<0.001$ ), 1/5 uygulama grubunda ise anlamlı olarak hücre canlılığı artış göstermiştir ( $P<0.05$ ). Kanser hücrelerinde e-kaderin, vimentin ve TGF- $\beta$ 1 sitokini, EMT'nin aktif olarak önemli düzenleyicileri arasında bildirilmektedir. TGF- $\beta$ 1 salınımından sonra TGF- $\beta$ RII reseptörü SMAD molekülleri tarafından uyarılarak aktive edilir. Aktive olan TGF- $\beta$ RII, R-SMAD'ları fosforile ederek sinyal yanıtının aşağı akış yönü oluşturulur. Bu bağlamda SMAD4 komplike yapısı çekirdeğe ulaşır ve gen ekspresyonunu düzenlenir.

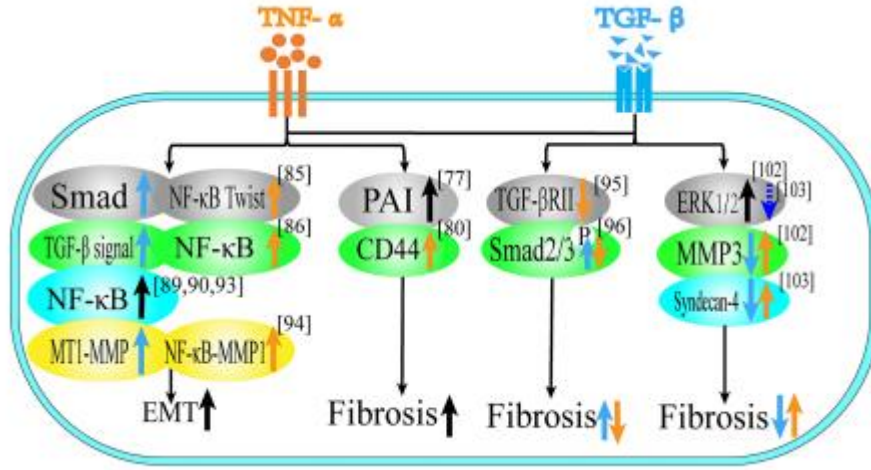
Birçok çalışma TGF- $\beta$ 1 sinyal moleküllerinin, *in vitro* modellerde EMT üzerindeki rolünü araştırmıştır. Orta ve geç evrelerde TGF- $\beta$ 1 kanser hücrelerinde EMT'yi indükleyici etkiye sahip olduğu ve bu bağlamda proinflamatuvar olarak kanserin ilerlemesini ve invaziv yeteneğinin artmasına sebep olduğu bildirilmiştir. Bu durumda çalışmamızda, hücre gruplarının HKS ile muamelesi sonucunda TGF- $\beta$ 1, CoEpi hücre hattı ile kıyaslandığında Caco-2 hücreleri üzerinde proinflamatuvar bir etki göstererek 1/5 uygulama grubunda vimentin ve e-kaderin gen ekspresyon seviyeleriyle ve hücre proliferasyon testi ile bağlantılı olarak EMT geçişini desteklediği söylenebilir. Diğer yandan TGF- $\beta$ 1'in çift yönlü çalıştığını ve erken evrede siklin

- bağımlı kinaz inhibitörleri aracılığıyla tümör hücrelerinin proliferasyonu durdurması ve tümör baskılayıcı olarak ilgili yolları düzenlemesiyle beraber hücre apoptozunu sağladığını ve böylece tümörlerin gelişimini engellediği kaydedilmiştir (86,87). TGF- $\beta$ 1 ile çıkan sonuçlar neticesinde yaptığımız çalışmada raporda bahsedilen ifadeyi destekler nitelikte bir etki saptanmamıştır.

TNF- $\alpha$  ve TGF- $\beta$ 1'in ayrıca tümör mikro çevresindeki sinyal mekanizmasının bir takım reseptör unsurlarını, birbiriyle ilişkili bir şekilde düzenlediğine dair önemli kanıtlar olduğu çeşitli raporlarda sunulmaktadır. Bu bağlamda TNF- $\alpha$ 'nın çoğu malign tümörde çeşitli inflamatuvar mediatörlerin ve kemokinlerin transkripsiyonunu artırdığını ve tümör hücrelerinin invaziv karakter kazanmasını sağlayarak, hücrelerin ilerlemesini teşvik ettiği gösterilmiştir (88). Caco-2 hücre hattında HKS uygulamasından sonra TNF- $\alpha$ , CoEpi hücre hattına kıyasla 1/2 hacimli uygulama grubunda azalma kaydedilmiştir ( $P < 0.05$ ). ELISA TNF- $\alpha$  sitokin testinde ise 1/2 uygulama grubundaki azalış kontrol grubuna göre anlamlı bulunmuştur ( $P < 0.001$ ). Proinflamatuvar bir sitokin olan TNF- $\alpha$  değerleri, XTT testi ile tutarlı olarak 1/2 hacimli uygulama grubunda hücre canlılığında düşüş kaydedilmiştir. Diğer yandan 1/5 hacimli HKS uygulama grubunda ise Caco-2 hücrelerinde ki kontrol grubuna kıyasla gen ekspresyon seviyesi yüksek bulunmuştur ( $P < 0.001$ ). Caco-2 hücrelerini ise CoEpi hücreleri ile karşılaştırdığımızda Caco-2 hücrelerinin tüm uygulama gruplarında TNF- $\alpha$  sitokin değerleri daha yüksek çıkmıştır. ELISA testinde ise, Caco-2 hücrelerinde 1/5 hacimli uygulamada TNF- $\alpha$  sitokin düzeyi kontrole oranla düşük bulunmuştur ( $P < 0.01$ ). Önceki çalışmalardan elde edilen verilere göre TNF- $\alpha$  ve TGF- $\beta$ 1 birbirlerinin üretimi teşvik edebilir. Aynı zamanda birçok hücre ve dokuda TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1 ekspresyonunu etkilediği gösterilmiştir. Çalışmamızda TNF- $\alpha$  ve TGF- $\beta$ 1 gen ekspresyon seviyeleri ve sitokin seviyeleri birbiriyle korelasyon halindedir. Bu bağlamda araştırmalar TGF- $\beta$ 1 ve TNF- $\alpha$ 'nın *in vitro* yapılan deneylerde birbirlerinin aktivasyonunu başlatabileceğini desteklemektedir (89).

TNF- $\alpha$ 'nın inflamasyonu destekleyici unsurları arasında yer alan NF- $\kappa$ B ve MAP kinaz aktivatörlerini indükleyerek, İnflamatuvar faktörlerin salınımının ortak kontrolü ve tümör hücrelerinin proliferasyonun da yapılan bu iş birliği, immün sistem için sinyal yolları üzerinde önemli etkilere sahip olabilir. Mezenkimal kök hücrelerde ise yapılan çalışmaların raporlarına göre TNF- $\alpha$ 'nın yüksek oranda ekspresyonu TGF- $\beta$ 1'i proinflamatuvar bir sitokine dönüştürerek immün yanıtların aktivitesini düşürdüğünü ve inhibisyonunu sağladığı bildirilmiştir. TNF- $\alpha$  ve TGF- $\beta$ 1'in metastazdaki ve doku invazyonu üzerindeki ortak işlevleri Şekil 32.'de şematik görünümü verilmiştir (88,90). Bu durumda Caco-2 hücrelerinde HKS

uygulama konsantrasyonları arttıkça (1/2) TGF- $\beta$ 1 ve TNF- $\alpha$  seviyelerinde ve hücre canlılığındaki düşüş belirgin olarak ifade edilmiştir. HKS konsantrasyonu azaldıkça (1/5) ise hücre canlılığı artarken TGF- $\beta$ 1 ve TNF- $\alpha$  seviyelerinde artış görülmektedir.



**Şekil 32.** TNF- $\alpha$  ve TGF- $\beta$ 'nin EMT, doku invazyonu ve metastazındaki karşılıklı işlevleri. Şekilde siyah oklarla gösterilen kısımlar, TNF- $\alpha$  ve TGF- $\beta$ 'nin ortak etkisine işaret ederken, turuncu oklar TNF- $\alpha$ 'nın etkisini ve mavi oklar ise TGF- $\beta$ 'nin etkisini işaret etmektedir (88).

IL-4, T<sub>H1</sub> bağışıklık hücreleri tarafından antiinflamatuvar bir sitokin olarak salgılanmaktadır. IL-4, TGF- $\beta$ 1 ve TNF- $\alpha$  ile antagonist bir şekilde çalışarak inflamatuvar yolları düzenlediği bir takım araştırmalarda sunulmuştur. Bağışıklık yanıtının dengelenmesi ve immün mediatör hücrelerinin gelişimi için sitokinler önemli uyarıcı bir yapıyı teşkil etmektedir. Mast hücreleri üzerinde yapılan araştırmalarda TGF- $\beta$ 1 afinite değeri yüksek olan IgE reseptörü olan Fc $\epsilon$ RI'nın ifadesini baskıladığı bildirilmektedir. Bu duruma karşı olarak ise IL-4 Fc $\epsilon$ RI reseptörünün ifadesini artırmaktadır. Bu bağlamda IL-4, TGF- $\beta$ 1 ile antagonist bir etki göstererek, sinyalizasyonu etkilediğini ve mast hücrelerinin hayatta kalmasını ve çoğalmasını destekleyebilir (91,92). Öte yandan Galon ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmanın sonuçlarına göre ise kolorektal kanser hastalarında sağlıklı bireylere kıyasla IL-4 seviyeleri önemli ölçüde yüksek bulunmuştur (93). Diğer taraftan ise *in vitro* yapılan başka bir çalışmanın sonuçları bu ifadeyi doğrulamamaktadır. Kanser hücreleri ve sağlıklı kontrol hücreleri arasında IL-4 seviyesi açısından herhangi bir fark bulunamamıştır (94).

Çalışmamızda IL-4 sitokini Caco-2 hücrelerinde 1/2 ve 1/5 hacimli uygulama gruplarının yanı sıra 1/3 hacimli HKS uygulama grubunda gen ekspresyonu seviyesi daha yüksek çıkmıştır ( $P<0.05$ ). Diğer taraftan Caco-2 hücrelerinde 1/3 hacimli uygulama grubunda TGF- $\beta$ 1 ekspresyon değerleri ile arasında IL-4'e oranla düşüş olmuştur ( $P<0.001$ ). CoEpi hücre hattında HKS uygulama gruplarının tümünde IL-4 seviyeleri arasında anlamlı bir fark gösterilememiştir ( $P>0.05$ ). Ayrıca IL-4, TNF- $\alpha$  ve hücre proliferasyonu arasında etkileşime işaret eden anlamlı bir fark da saptanmamıştır. Kanei ve arkadaşlarının çalışmasına göre ise IL-4'ün, EMT geçişinde önemli bir görevi olan e-kaderin molekülünün ekspresyon ifadesini azaltarak colo205 (kolon kanseri) hücrelerinde hücre-hücre adezyon yapısını düşürdüğü rapor edilmiştir. Çalışmamızda IL-4 ve e-kaderin arasında bu ifadeyi destekler nitelikte anlamlı bir ilişkiye ulaşılamamıştır (95).



## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Söz konusu yaptığımız çalışmada Caco-2 ve CoEpi hücre hatları kullanılmıştır. Caco-2 ve CoEpi hücrelerine HKS ile muamele sonrasında EMT mekanizmasının düzenleyicilerinden e-kaderin, vimentin ve TGF- $\beta$ 1'in gen ekspresyon değerleri incelenmiştir. Aynı zamanda proinflamatuvar bir sitokin olan TNF- $\alpha$ , antiinflamatuvar sitokin olan IL-4 ve çift etki modeline sahip TGF- $\beta$ 1 sitokinlerinin ELISA yöntemiyle seviyelerinin belirlenmesi ve sonrasında gen ekspresyon profilleri belirlenerek kanser hücrelerindeki inflamatuvar mekanizmanın EMT ile ilişkisi *in vitro* olarak araştırılmıştır. Daha önce literatürde hiçbir çalışmada HKS uygulamasının, kanser hücrelerindeki EMT ve inflamatuvar mekanizmasının sinyal molekülleri arasındaki ilişkiye değinilmemiştir.

Sonuç olarak yaptığımız çalışmada, Caco-2 hücre hattında HKS uygulaması sonucunda 1/5 ve 1/3 hacimli uygulama gruplarında ELISA, qRT-PCR ve hücre proliferasyon testi ile bağlantılı olarak EMT geçişi söz konusu olabilir. Diğer yandan hücre mikro çevresine bağlı olarak proinflamatuvar sinyal mekanizmasını kontrol eden TGF- $\beta$ 1, TNF- $\alpha$  seviyelerinde ve hücre canlılığındaki düşüş arasında doğrusal bir ilişki gösterilmiştir. HKS konsantrasyonu azaldıkça (1/5) hücre canlılığı artarken, TGF- $\beta$ 1 ve TNF- $\alpha$  seviyelerinde artış görülmektedir. Caco-2 hücrelerinde HKS uygulama konsantrasyonları arttıkça (1/2) TGF- $\beta$  ve TNF- $\alpha$  seviyelerinde ve hücre canlılığındaki düşüş belirgin olarak ifade edilmiştir. Bu bağlamda HKS uygulaması sonrası *Echinococcus granulosus*'a ait parazit antijenlerinin Caco-2 hücreleri üzerinde anti-kanser aktivitesi ve inflamatuvar mediatörlerin daha derinlemesine anlaşılabilmesi açısından, çalışmamız temel bir unsuru teşkil edebilir. TGF- $\beta$ 1 ve TNF- $\alpha$ 'nın Caco-2 hücrelerinde, metastatik fenotipi artırabileceği ve inflamatuvar mediatörlerinin salınımını başlatabileceği söylenebilir. Diğer yandan hücre proliferasyonu üzerinde antagonistik bir etki modeline sahip olabileceğini de düşünmekteyiz. Bu bağlamda *E.granulosus* ve kanser arasındaki ortak antijen-reseptör yapısının, immün sistem hücrelerini etkileyerek tümör hücrelerinin progresyonu için düzenlediği bağışıklık yanıtının sinyallerini modüle edebilir. Antijen-reseptör yapısının kanser hücrelerinin proliferasyonun durdurulması ve apoptozun indüklenmesiyle çapraz koruyuculuğu sağlayabileceği açısından, immünolojik bir araç olarak esas alınabilir. Çalışmamızda yapıldığı üzere parazit ve kanser arasındaki ilişkiyi araştıran çalışmalar, kanser ve parazitlerin birbirleri ile ortak yönlü özelliklerinden yola çıkarak tümör hücrelerinin kontrolünün sağlandığı, bir takım hedef molekülleri belirleyebilir. Öte yandan

sinyal yolaklarının ve hedef moleküllerinin belirlenmesi, kanserin kontrolü ve tedavisi açısından farklı ve yeni ilaçların veya aşuların keşfedilmesine olanak sağlayabilir.



## 7. KAYNAKÇA

1. Ranasinghe SL, McManus DP. Echinococcus granulosus: Cure for Cancer Revisited. *Front Med* . 2018 Mar 1 ;5.
2. Tamarozzi F, Akhan O, Cretu CM, Vutova K, Akinci D, Chipeva R, et al. Prevalence of abdominal cystic echinococcosis in rural Bulgaria, Romania, and Turkey: a cross-sectional, ultrasound-based, population study from the HERACLES project. *Lancet Infect Dis*. 2018 ;18(7):769–78.
3. Daneshpour S, Bahadoran M, Hejazi S, Eskandarian A, Mahmoudzadeh M, Darani H. Common antigens between hydatid cyst and cancers. *Adv Biomed Res*. 2016;5(1):9.
4. Baysal İ, Örsten S. Echinococcus Granulosus Sensu Stricto Kaynaklı Hidatik Kist Sıvısı Uygulamasının Caco-2 Hücre Hattında Epitelyal-Mezenkimal Geçiş Ve Apoptoz Üzerin Etkisi. *Ankem Derg*. 2022;36(1):1–8.
5. Taki M, Abiko K, Ukita M, Murakami R, Yamanoi K, Yamaguchi K, et al. Tumor immune microenvironment during epithelial- mesenchymal transition. *Clin Cancer Res*. 2021;27(17):4669–79.
6. Mittal V. Epithelial Mesenchymal Transition in Tumor Metastasis. *Annu Rev Pathol Mech Dis*. 2018;13:395–412.
7. Bochen Cao, Gretchen A. Stevens JH and DMF. WHO methods and data sources for country-level causes of death. *World Heal Organ* . 2020;(December):1–59.
8. Gersten O, Wilmoth JR. The cancer transition in Japan since 1951. *Demogr Res*. 2002 ;7:271–306.
9. Omran AR. The Epidemiologic Transition: A Theory of the Epidemiology of Population Change. *Milbank Q*. 2005;83(4):731.
10. Esteva M, Leiva A, Ramos M, Pita-Fernández S, González-Luján L, Casamitjana M, et al. Factors related with symptom duration until diagnosis and treatment of symptomatic colorectal cancer. *BMC Cancer*. 2013;13:87.
11. Barleben A, Mills S. *Anorectal Anatomy and Physiology*. 2010 ;90(1):1–15.
12. Soytürk M. Kolorektal kanser epidemiyoloji ve risk faktörleri. *Tüberküloz ve Toraks Derg*. 2019;52(2):130–6.
13. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646–74.
14. Fouad YA, Aanei C. Revisiting the hallmarks of cancer. *Am J Cancer Res* . 2017

- ;7(5):1016.
15. Roosbroeck K Van, Calin GA. Cancer Hallmarks and MicroRNAs : The Therapeutic Connection . 1st ed. Vol. 135, miRNA and Cancer. Elsevier Inc.; 2017. 119–149 .
  16. Eser Y. Emerk K. Onat T. Palme İnsan Biyokimyası . Basım, Palme yayınevi, İstanbul, 2024 .
  17. Kato Y, Maeda T, Suzuki A, Baba Y. Cancer metabolism: New insights into classic characteristics. *Jpn Dent Sci Rev* . 2018 ;54(1):8.
  18. Dimmer KS, Friedrich B, Lang F, Deitmer JW, Broer S. The low-affinity monocarboxylate transporter MCT4 is adapted to the export of lactate in highly glycolytic cells. *Biochem J* . 2000 ;350:219.
  19. Le Floch R, Chiche J, Marchiq I, Naïken T, Ilk K, Murray CM, et al. CD147 subunit of lactate/H<sup>+</sup> symporters MCT1 and hypoxia-inducible MCT4 is critical for energetics and growth of glycolytic tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* . 2011 Oct 4;108(40):16663–8.
  20. Ramapriyan R, Caetano MS, Barsoumian HB, Mafra ACP, Zambalde EP, Menon H, et al. Altered cancer metabolism in mechanisms of immunotherapy resistance. *Pharmacol Ther* . 2019 Mar 1 ;195:162–71.
  21. Garcia-Bermudez J, Williams RT, Guarecuco R, Birsoy K. Targeting extracellular nutrient dependencies of cancer cells. *Mol Metab* . 2020 ;33:67–82.
  22. Ada S, Ertürk C, Uçar A, Akyüz S, Doğan F, Yücel B. Kanser Hücre Metabolizması Özet *Cancer Cell Metabolism*. 2021
  23. Cruzat V, Rogero MM, Keane KN, Curi R, Newsholme P. Glutamine: Metabolism and immune function, supplementation and clinical translation. *Nutrients*. 2018;10(11):1–31.
  24. Cruzat V, Rogero MM, Keane KN, Curi R, Newsholme P. Glutamine: Metabolism and Immune Function, Supplementation and Clinical Translation. *Nutrients*. 2018 Nov 1 ;10(11).
  25. Williams GM. Mechanisms of chemical carcinogenesis and application to human cancer risk assessment. *Toxicology*. 2001;166(1–2):3–10.
  26. Abbott M, Ustoyev Y. Cancer and the Immune System: The History and Background of Immunotherapy. *Semin Oncol Nurs* . 2019;35(5):150923.
  27. Diniz G, Yaşın Y, Çoban C, Evcimen Ş, Karakayalı M. Immune System: Is a Trusted Friend, is a Collaborative Enemy? *Forbes J Med*. 2022;3(1):1–9.
  28. Immunotherapy T, Gasparri ML, Ruscito I, Taghavi K. Molecular Oncology: Underlying Mechanisms and Translational Advancements. *Mol Oncol Underlying Mech Transl Adv*. 2017;5.

29. DeNardo DG, Barreto JB, Andreu P, Vasquez L, Tawfik D, Kolhatkar N, et al. CD4(+) T cells regulate pulmonary metastasis of mammary carcinomas by enhancing protumor properties of macrophages. *Cancer Cell* . 2009 ;16(2):91–102.
30. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, Inflammation, and Cancer. *Cell* . 2010 Mar 3 ;140(6):883.
31. Lin WW, Karin M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *J Clin Invest* . 2007 ;117(5):1175.
32. Dymicka-piekarska Akokhk V. From inflammation to cancer. *Irish J Med Sci (1971 -)*. 2017;186(1):57–62.
33. Kay J, Thadhani E, Samson L, Engelward B. Inflammation-Induced DNA Damage, Mutations and Cancer. *DNA Repair (Amst)* . 2019 Nov 1 ;83:102673.
34. Arai KI, Lee F, Miyajima A, Miyatake S, Oko Arai N, Yokota T. Cytokines: Coordinators Of Immune And Inflammatory Responses. 2003 Nov 28 ;59(1):783–836.
35. Akdoğan M, Mehmet Akdoğan S, Yöntem M. Sitokinler. *Online Türk Sağlık Bilim Dergisi*. 2018 ;3(1):36–45.
36. Jaffer U, Wade RG, Gourlay T. Cytokines in the systemic inflammatory response syndrome: a review. *HSR Proc Intensive Care Cardiovasc Anesth* . 2010 ;2(3):161.
37. Annane PD, Bellissant PE, Cavaillon JM. Septic shock. *Lancet*. 2005 Jan 1;365(9453):63–78.
38. Iwaszko M, Biały S, Bogunia-Kubik K. Significance of Interleukin (IL)-4 and IL-13 in Inflammatory Arthritis. 2021 Nov 1 ;10(11).
39. Wills-Karp M, Finkelman FD. Untangling the Complex Web of IL-4-and IL-13-Mediated Signaling Pathways HHS Public Access. 2015 [cited 2024 Jan 31];
40. Schnyder B, Lugli S, Feng N, Etter H, Lutz RA, Ryffel B, et al. Interleukin-4 (IL-4) and IL-13 Bind to a Shared Heterodimeric Complex on Endothelial Cells Mediating Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Induction in the Absence of the Common  $\gamma$  Chain. *Blood*. 1996 ;87(10):4286–95.
41. Seder RA, Paul WE, Davis MM, Barbara BF. The presence of interleukin 4 during in vitro priming determines the lymphokine-producing potential of CD4+ T cells from T cell receptor transgenic mice. *J Exp Med*. 1992 Oct 1 ;176(4):1091–8.
42. Khurana Hershey GK. IL-13 receptors and signaling pathways: An evolving web. *J Allergy Clin Immunol*. 2003 Apr 1;111(4):677–90.
43. Van Roon JAG, Lafeber FPJG, Bijlsma JWJ. Synergistic Activity of Interleukin-4 and Interleukin-10 in Suppression of Inflammation and Joint Destruction in Rheumatoid

- Arthritis. . 2001 ;44(1):3–12.
44. Nelms K, Keegan AD, Zamorano J, Ryan JJ, Paul WE. The IL-4 Receptor: Signaling Mechanisms and Biologic Functions. 2003 ;17:701–38.
  45. Chatila TA. Interleukin-4 receptor signaling pathways in asthma pathogenesis. Trends Mol Med 2004 ;10(10):493–9.
  46. Miyajima A, Kitamura T, Harada N, Yokota T, Arai KI. Cytokine Receptors and Signal Transduction. 2003 ;10:295–331.
  47. Keegan AD, Nelms K, White M, Wang LM, Pierce JH, Paul WE. An IL-4 receptor region containing an insulin receptor motif is important for IL-4-mediated IRS-1 phosphorylation and cell growth. Cell. 1994 Mar 11;76(5):811–20.
  48. Aggarwal BB, Gupta SC, Kim JH. Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey. Blood 2012 ;119(3):651–65.
  49. Aggarwal BB. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. Nat Rev Immunol . 2003 ;3(9):745–56.
  50. Koni PA, Sacca R, Lawton P, Browning JL, Ruddle NH, Flavell RA. Distinct Roles in Lymphoid Organogenesis for Lymphotoxins  $\alpha$  and  $\beta$  Revealed in Lymphotoxin  $\beta$ -Deficient Mice. Immunity. 1997 ;6(4):491–500.
  51. Rennert PD, Browning JL, Mebius R, Mackay F, Hochman PS. Surface lymphotoxin alpha/beta complex is required for the development of peripheral lymphoid organs. J Exp Med 1996 Nov 11 ;184(5):1999.
  52. El-Tahan RR, Ghoneim AM, El-Mashad N. TNF- $\alpha$  gene polymorphisms and expression. Springerplus. 2016;
  53. Çayakar A. What is Tumor Necrosis Factor Alpha? Turkiye Klin J Intern Med. 2018;3(2):67–76.
  54. Balkwill F. TNF- $\alpha$  in promotion and progression of cancer. Cancer Metastasis Rev. 2006;25(3):409–16.
  55. Derynck R, Akhurst RJ. Differentiation plasticity regulated by TGF- $\beta$  family proteins in development and disease. Nat Cell Biol 2007 ;9(9):1000–4.
  56. Hu Q, Hisamatsu T, Haemmerle M, Cho MS, Pradeep S, Rupaimoole R, et al. Role of platelet-derived Tgf $\beta$ 1 in the progression of ovarian cancer. Clin Cancer Res 2017 Sep 9;23(18):5611.
  57. Syed V. TGF- $\beta$  Signaling in Cancer. J Cell Biochem. 2016;117(6):1279–87.
  58. Massagué J. TGFbeta signalling in context. Nat Rev Mol Cell Biol. 2014;13(10):616–30.

59. Robert Cronin Yung Peng, Rose Khavari ND. 乳鼠心肌提取 HHS Public Access. *Physiol Behav.* 2017;176(3):139–48.
60. Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014 Mar ;15(3):178.
61. Özkara G, Öztürk O, Aydoğan HY. Cancer and Metastasis: Importance of Cell Adhesion Molecules and Cell Junctions. *Experimed.* 2020;10(1):38–48.
62. Türker NP, Bakar E. Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi. 2021;2021(6):145–61.
63. Sisto M, Ribatti D, Lisi S. E-Cadherin Signaling in Salivary Gland Development and Autoimmunity. *J Clin Med.* 2022;11(8).
64. Satelli A, Li S. Vimentin as a potential molecular target in cancer therapy Or Vimentin, an overview and its potential as a molecular target for cancer therapy. *Cell Mol Life Sci.* 2011;68(18):3033–46.
65. Satelli A, Li S. Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy. *Cell Mol Life Sci.* 2011;68(18):3033–46.
66. Relationship C. Parazit ve Kanser İlişkisi. 2022;46(2):150–62.
67. Noya V, Bay S, Festari MF, García EP, Rodriguez E, Chiale C, et al. induce antitumor activity. 2020;775–84.
68. Eckert J, Deplazes P. Biological , Epidemiological , and Clinical Aspects of Echinococcosis , a Zoonosis of Increasing Concern. 2004;17(1):107–35.
69. Yalçınkaya İ. Akciğer Hidatik Kisti. s.164, Basım ,TÜSAD Eğitim Kitapları Serisi,İstabil, 2008.
70. Brunetti E, Mccloskey C. Cystic Echinococcosis. 2016;54(3):518–23.
71. Demirel A. Yalçınkaya İ. Akciğer Hidatik Kisti. , s 1-10 ,İstanbul , 2013.
72. Çelik F, Şimşek S. Parasite and Cancer Relationship. *Turkiye Parazitoloji Derg.* 2022;46(2):150–62.
73. Hewitson JP, Grainger JR, Maizels RM. Helminth immunoregulation: The role of parasite secreted proteins in modulating host immunity. *Mol Biochem Parasitol* 2009;167(1):1–11.
74. Daneshpour S, Kefayat AH, Mofid MR, Rad SR, Darani HY. Effect of Hydatid Cyst Fluid Antigens on Induction of Apoptosis on Breast Cancer Cells. *Adv Biomed Res.* 2019;8(1):27.
75. Sier CFM, Blasi F, Sidenius N, Shariat SF, Lerner SP, Casella R. Urinary Levels of

- Urokinase-Type Plasminogen Activator and Its Receptor in the Detection of Bladder Carcinoma [1] (multiple letters). *Cancer*. 2003;98(9):1995.
76. Yousofi Darani H, Soozangar N, Khorami S, Taji F, Yousofi M, Shirzad H. Hydatid cyst protoscolices induce cell death in WEHI-164 fibrosarcoma cells and inhibit the proliferation of baby hamster kidney fibroblasts in vitro. *J Parasitol Res*. 2012;2012.
  77. Davoudi-Kiakalayeh A, Mohammadi R, Pourfathollah AA, Siery Z, Davoudi-Kiakalayeh S. Alloimmunization in thalassemia patients: New insight for healthcare. *Int J Prev Med*. 2017;8:1–7.
  78. Baysal I, Örsten S. Evaluation of the effect of hydatid cyst fluid on the apoptosis pathway in BEAS-2B and A549 cell lines. *Mikrobiyol Bul*. 2021;55(2):248–55.
  79. Zhao L, Li C, Zhou B, Luo C, Wang Y, Che L, et al. Crucial role of serum response factor in renal tubular epithelial cell epithelial-mesenchymal transition in hyperuricemic nephropathy. 2019;11(22):10597–609.
  80. Zhong X, Tang J, Li H, Shi X, Wu Y, Xia D. MiR-3175 promotes epithelial-mesenchymal transition by targeting Smad7 in human conjunctiva and pterygium. 2020;594:1207–17.
  81. Guan W, Zhang X, Wang X, Lu S, Yin J, Zhang J. Employing parasite against cancer: A lesson from the canine tapeworm *Echinococcus granulosus*. *Front Pharmacol*. 2019;10:1–8.
  82. Li H, Song T, Shao Y, Wen H. Cystic echinococcosis accompanied by hepatocellular carcinoma in a female herdsman. *Int J Clin Exp Med*. 2015;8(2):2985–8.
  83. Oikonomopoulou K, Brinc D, Kyriacou K, Diamandis EP. Infection and cancer: Reevaluation of the hygiene hypothesis. *Clin Cancer Res*. 2013;19(11):2834–41.
  84. Figueroa A. Epithelial-mesenchymal transition and CRC. *Found Color Cancer*. 2021;118:543–50.
  85. Turk S, Baysal I, Ucar G. Glutathione S-transferase- $\pi$  levels of in vitro generated epithelial mesenchymal transition model in caco-2 cell line. *Hacettepe Univ J Fac Pharm*. 2019;39(1):10–6.
  86. Miyazono K. Transforming growth factor- $\beta$  signaling in epithelial-mesenchymal transition and progression of cancer. *Proc Japan Acad Ser B Phys Biol Sci*. 2009;85(8):314–23.
  87. Bierie B, Moses HL. *Cancer. Cytokine*. 2011;21(1):49–59.
  88. Liu ZW, Zhang YM, Zhang LY, Zhou T, Li YY, Zhou GC, et al. Duality of Interactions Between TGF- $\beta$  and TNF- $\alpha$  During Tumor Formation. *Front Immunol*. 2022;12:1–14.

89. Paduch R, Niedziela P. TGF-beta1 influence on TNF-alpha production and sTNF-Rs shedding in a coculture of colon carcinoma cell spheroids with normal cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2009;45(7):371–7.
90. Guo NF, Cao YJ, Chen X, Zhang Y, Fan YP, Liu J, et al. Lixisenatide protects doxorubicin-induced renal fibrosis by activating wNF-κB/TNF-α and TGF-β/Smad pathways. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2019;23(9):4017–26.
91. Gomez G, Ramirez CD, Rivera J, Patel M, Norozian F, Wright H V., et al. TGF-β1 Inhibits Mast Cell FcεRI Expression. *J Immunol.* 2005;174(10):5987–93.
92. Gonenc B, Gehlbach P, Handa J, Taylor RH, Iordachita I. 基因的改变NIH Public Access. *Int Conf Biomed Robot Biomechatron.* 2014;23(1):244–51.
93. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pagès C, et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* . 2006 Sep 29 [cited 2024 Jul 8];313(5795):1960–4.
94. Marszałek A, Szyłberg Ł, Wiśniewska E, Marlena J. Impact of COX-2, IL-1β, TNF-α, IL-4 and IL-10 on the process of carcinogenesis in the large bowel. *Polish J Pathol.* 2012;63(4):221–7.
95. Kanai T, Watanabe M, Hayashi A, Nakazawa A, Yajima T, Okazawa A, et al. Regulatory effect of interleukin-4 and interleukin-13 on colon cancer cell adhesion. *Br J Cancer.* 2000;82(10):1717–23.

## 8. TABLOLAR DİZİNİ

### Sayfa No

<b>Tablo 1.</b> Sitokinlerin sınıflandırılması (36). .....	13
<b>Tablo 2.</b> Parazit ve kanser hücreleri arasındaki ortak antijen tipleri (72).....	30
<b>Tablo 3.</b> Çalışmalarda kullanılan malzemelerin ve cihazların listesi. ....	31
<b>Tablo 4.</b> cDNA sentezi için kullanılan bileşenler.....	38
<b>Tablo 5.</b> cDNA sentezi için PCR cihazında çalıştırılmış olan protokol. ....	38
<b>Tablo 6.</b> qRT-PCR için kullanılan primer dizileri.....	40
<b>Tablo 7.</b> qRT-PCR için kullanılan reaksiyon bileşenleri.....	41
<b>Tablo 8.</b> ELISA testlerinde kullanılan komponentler.....	42

## 9. ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa No

<b>Şekil 1.</b> Kolon ve rektumun anatomik yapısı.....	3
<b>Şekil 2.</b> Glutamin esas olarak glutamin sentetaz enzimi tarafından sentezi yapılır ve glutaminaz enzimiyle ise hidrolize edilmektedir. Glutamin sentetaz kaynak olarak glutamat ve amonyak (NH <sub>4</sub> ) kullanarak biyosentezi katalizler. Reaksiyon boyunca 1 ATP tüketilmektedir (24). .....	8
<b>Şekil 3.</b> İnflamasyon ve kanser arasındaki ilişki (33). .....	11
<b>Şekil 4.</b> Tip I IL-4R ve tip II IL-4R reseptörlerinin yapıları(45) .....	15
<b>Şekil 5.</b> IL-4Ra tarafından aktivasyonun gerçekleştirilen sinyal aktivasyon modeli. STAT6, hücrenin gen ekspresyonunu aynı zamanda proliferasyon ve hücre farklılaşmasını destekleyen IL-4Ra'nın efektör işlevlerini stimüle etmek için diğer yollarla birlikte çalışır (45). .....	16
<b>Şekil 6.</b> TNF- $\alpha$ sitokini ve sinyal aktivasyonu sonucu ortaya çıkan hücresel aksiyonların şeması (54). .....	18
<b>Şekil 7.</b> TGF- $\beta$ SMAD veya SMAD dışı yolla sinyal iletimini gerçekleştirir. TGF- $\beta$ 'nın hücre zarındaki TGF $\beta$ RII reseptörüne bağlanarak TGF $\beta$ RI tetramer kompleksi oluşturur. TGF $\beta$ R kompleksi aşağı akış yolu boyunca R-SMAD'ı (SMAD2 ve SMAD3) fosforile eder ve fosforillenen yapı ise SMAD4 ile heterodimerik bir yapı oluşturarak çekirdeğe iletilir. TGF- $\beta$ SMAD dışı yolda, birçok sinyal kaskadı aracılığıyla sinyal iletimini gerçekleştirir. TGF $\beta$ RII vasıtasıyla Erk, JNK, p38 gibi MAP kinazlarının aktivasyonu sağlanır ve sinyal çekirdeğe iletilir(57). .....	20
<b>Şekil 8.</b> Epitel hücrelerinin şeklinin ve yapısal izoformunun farklılaşması (60). .....	21
<b>Şekil 9.</b> EMT progresyonu ile epitelyal hücre yapısının konformasyonunu kaybetmesi (5)...	22
<b>Şekil 10.</b> Tümör metastazının gelişim sürecine dair basamaklar (61). .....	23
<b>Şekil 11.</b> E-Kaderin molekülünün yapısal şematik görseli. E-kaderin 5 tekrar bölgesi, Ca <sup>2+</sup> bağlama bölgesi, transmembran alanı ayrıca $\beta$ -katenin, $\alpha$ -katenin kompleks yapısına bağlanma alanı içerir (63). .....	24
<b>Şekil 12.</b> Vimentin molekülünün hücre sinyal yolları üzerindeki etkisi. AKT1 vimentinin fosforilasyonunu sağlayarak, kaspaz kaynaklı proteoliz aktivitesinden korur. Bu sayede vimentin hücrenin göç ve invazyon kaynaklı proliferasyon süreçlerinde rol oynamaktadır (65). .....	25

<b>Şekil 13.</b> E. Granulosus parazitinin yaşam döngüsü (71). .....	27
<b>Şekil 14.</b> Hidatik kist ameliyatı sonrasında erkek bir çocuğun beyninde oluşan sekonder kist vezikül yapılarından örnekler (69). .....	28
<b>Şekil 15.</b> Caco-2 ve CoEpi hücre hatlarının hidatik kist sıvısıyla muamele edilmesi. ....	33
<b>Şekil 16.</b> Caco-2 ve CoEpi hücrelerinin uygulama gruplarına ait deney düzeneği .....	34
<b>Şekil 17.</b> cDNA sentezinin kısımları.....	38
<b>Şekil 18.</b> SYBR Green boyasının DNA'ya bağlanması.....	39
<b>Şekil 19.</b> Standartların seri dilüsyonlar şeklinde hazırlanışı. ....	42
<b>Şekil 20.</b> TNF- $\alpha$ , IL-4 ve TGF- $\beta$ ELISA testlerinin standartlarına ait doğrusal eğri grafikleri. ....	43
<b>Şekil 21.</b> BCA protein miktar tayin testi için oluşturulan standart eğrisi. ....	45
<b>Şekil 22.</b> Hidatik kist sıvısı uygulanmış Caco-2 ve CoEpi hücre hattına ait XTT sonuçları... 46	
<b>Şekil 23.</b> Caco-2 ve CoEpi hücrelerinin belirli aralıklarla çekilmiş, proliferasyonuna ait invert mikroskop görüntüleri. ....	47
<b>Şekil 24.</b> CoEpi ve Caco-2 hücre hatlarına ait uygulama dozları ve IL-4 sitokini ELISA sonuçları. ....	48
<b>Şekil 25.</b> CoEpi ve Caco-2 hücre hattındaki uygulama dozları ve TGF- $\beta$ sitokini ELISA sonuçları. ....	49
<b>Şekil 26.</b> CoEpi ve Caco-2 hücre hatlarına ait uygulama dozlarında TNF- $\alpha$ sitokini ELISA sonuçları. ....	50
<b>Şekil 27.</b> CaCo-2 ve CoEpi hücre hatlarında HKS uygulama gruplarının IL-4 relatif gen ekspresyon seviyeleri. ....	51
<b>Şekil 28.</b> CoEpi hücre hattı ve CaCo-2 hücre hattına ait uygulama gruplarında TGF- $\beta$ 1 rölatif gen ekspresyon seviyeleri.....	52
<b>Şekil 29.</b> Caco-2 hücre hattı ve CoEpi hücre hattına ait uygulama gruplarında TNF- $\alpha$ gen ekspresyon seviyeleri .....	53
<b>Şekil 30.</b> Caco-2 ve CoEpi hücre hattına ait uygulama gruplarında vimentin gen ekspresyon seviyeleri .....	54
<b>Şekil 31.</b> Caco-2 hücre hattı uygulama grubunda E-Kaderin gen ekspresyon seviyeleri. ....	55
<b>Şekil 32.</b> TNF- $\alpha$ ve TGF- $\beta$ 'nın EMT, doku invazyonu ve metastazındaki karşılıklı işlevleri. Şekilde siyah oklarla gösterilen kısımlar, TNF- $\alpha$ ve TGF- $\beta$ 'nın ortak etkisine işaret ederken, turuncu oklar TNF- $\alpha$ 'nın etkisini ve mavi oklar ise TGF- $\beta$ 'nin etkisini işaret etmektedir (88). ....	60

## 10. EKLER DİZİNİ

Sayfa No

**EK 1.** Deneylere ait fotoğraflar.....76



## 11. EKLER

### EK 1. Deneylere ait fotoğraflar

