



T.C.
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TRANSGENİK SALMONELLA İMMUNOTOKSİNİNİN İNSAN
MEME TÜMÖRÜ ÜZERİNDE ANTIKANSER ETKİNLİĞİ
MEKANİZMASI**

**SEVGİ BETÜL KAYABAŞI
VETERİNER PATOLOJİ ANABİLİM DALI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**DANIŞMAN
Dr. Öğr. Üyesi TUĞÇE ANTEPLİOĞLU**

KIRIKKALE-2024

Sevgi Betül KAYABAŞI tarafından hazırlanan “TRANSGENİK SALMONELLA İMMUNOTOKSİNİNİN İNSAN MEME TÜMÖRÜ ÜZERİNDE ANTİKANSER ETKİNLİĞİ MEKANİZMASI” adlı tez çalışması, aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ / OY ÇOKLUĞU ile Kırıkkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veteriner Patoloji Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Tuğçe ANTEPLİOĞLU
Veteriner Patoloji Anabilim Dalı, Kırıkkale Üniversitesi
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum. İmza:

Başkan: Prof Dr Oğuz KUL
İmza:
Veteriner Patoloji Anabilim Dalı, Kırıkkale Üniversitesi
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.

Üye: Prof Dr Begüm YURDAKÖK DİKMEN
İmza:
Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji, Ankara Üniversitesi
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.

Tez Savunma Tarihi: 12/01/2024
Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Yüksek Lisans Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

Unvanı Adı SOYADI
..... Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYANI

Kırıkkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu, bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

İmza:

Ad Soyad: Sevgi Betül KAYABAŞI

Tarih: 02/01/2024

ÖZET

TRANSGENİK SALMONELLA İMMUNOTOKSİNİNİN İNSAN MEME TÜMÖRÜ ÜZERİNDE ANTİKANSER ETKİNLİĞİ MEKANİZMASI

Kırıkkale Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Veteriner Patoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi
Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Tuğçe ANTEPLİOĞLU
OCAK 2023, 40 sayfa

Anti-kanser tedaviler özellikle de mevcut meme kanseri tedavileri iştahsızlık; enfeksiyonlara karşı direnç kaybı, halsizlik ve yorgunluk, kilo alımı, erken menopoz ve tümöre dirençli gelişme gibi kritik yan etkileri içermektedir. Bu sebeple; kanserin oluşturduğu potansiyel tehdidi önlemek için teşhis ve tedavide yeni yaklaşımlara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu çalışmada; *Pseudomonas* Ekzotoksin (PE38) ile zayıflatılmış *Salmonella Typhimurium*'un insan meme adenokarsinomu (MCF-7) üzerindeki anti-tümör etkinliğinin makroskobik ve mikroskobik olarak değerlendirilmesi, uygulanan immunoterapotik tedavinin anti-tümöral etkinliğinin mekanizmasının araştırılması için için apoptoz (Kaspaz 3, 8 ve 9) ve piroptoz (Kaspaz 1, 11 ve GasderminE) varlığının gösterimi ve yollarının incelenmesi amaçlanmıştır. Sunulan bu çalışmada, MCF-7 hücre hattının in-vitro pasajlanmasının ardından Atimik Nude farelere implantasyonu gerçekleştirildi. Tümör oluşum ve çapı düzenli kontrol edilerek her birinin çapı 200mm³'ün üzerine çıktığında *Pseudomonas* ekzotoksin (PE38) ile TGF α ve PE38 ihtiva eden avirüent *Salmonella Typhimurium* (Δ ppGpp; relA, spoT and Glm mutant) ile immunoterapi uygulandı. Tedavi sonrası ötenazileri gerçekleştirilen farelerin sistemik nekropsileri yapılarak, oluşan tümöral dokular histopatolojik ve immunohistokimyasal incelemeler için fikse edildi. Buna göre histopatolojik olarak; kontrol grubu farelerde sadece adenokarsinom ilişkili tümöral hücrelere rastlanırken, tedavi uygulanan farelerin tümör dokularında neoplastik epitel hücrelere eşlik eden bakteri kümeleri, nekrotik ve apoptotik figürlere sahip ölü hücre popülasyonları ve yangı hücresi infiltrasyonuna rastlandı. Yine tedavi grubunda yoğun anti-kaspaz 3 ve 11 aktivitesine rastlanırken, orta şiddette anti- kaspaz 1,8 ve 9 aktivitesine, hafif anti-Gasdermin E immunoreaktivitesine rastlandı. Buna karşın kontrol grubunda hiçbir immun-reaksiyona rastlanmadı. Sunulan bu çalışma ile, avirüent *Salmonella Typhimurium*' un anti-tümöral etkinliği kanıtlanmış ve bu anti-tümöral mekanizmada; nekroz, apoptoz ve piroptoz varlığı tümör hücrelerinin ölüm mekanizmaları olarak gösterilmiştir. Buna göre; meme kanseri tedavisinde başarılı bir alternatif yöntemin geliştirilmesi ve diğer kanser tedavileri için de temel oluşturacak etki mekanizmalarının belirlenmesi için temel niteliktedir.

Anahtar Sözcükler: Anti-tümöral etkinlik, Apoptoz, İmmunohistokimya, MCF-7, Piroptoz, *Salmonella Typhimurium*.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE MECHANISM OF TRANSGENIC SALMONELLA IMMUNOTOXIN ANTICANCER EFFICIENCY ON HUMAN MAMMARY TUMOR

Kırıkkale University
Institute Of Health Sciences
Department of Veterinary Pathology, Master's Thesis
Supervisor: Asst Prof Tuğçe ANTEPLİOĞLU
JANUARY 2023, 40 page

Anti-cancer treatments, especially current breast cancer therapies, encompass critical side effects such as appetite loss, resistance to infections, weakness and fatigue, weight gain, early menopause, and development of resistance to tumors. Therefore, there is a need for new approaches in diagnosis and treatment to prevent the potential threats posed by cancer. In this study, the anti-tumor efficacy of attenuated *Salmonella Typhimurium* with Pseudomonas Exotoxin (PE38) was evaluated both macroscopically and microscopically on human breast adenocarcinoma (MCF-7) and the mechanism of the applied immunotherapeutic treatment was investigated by demonstrating the presence and pathways of apoptosis pyroptosis. In this presented study, after in vitro passage of the MCF-7 cell line, implantation was performed in Atimic Nude mice. Tumor formation and diameter were regularly monitored, and when each reached a diameter above 200 mm³, immunotherapy with avirulent *Salmonella Typhimurium* containing Pseudomonas exotoxin (PE38) and TGF α and PE38 (Δ ppGpp; relA, spoT, and Glm mutant) was applied. After treatment, systemic necropsies of euthanized mice were performed, and the tumor tissues were fixed for histopathological and immunohistochemical examinations. Histopathologically, while only adenocarcinoma-associated tumoral cells were observed in the control group mice; bacterial clusters accompanying neoplastic epithelial cells, necrotic and apoptotic figures, and inflammatory cell infiltration were found in the tumor tissues of treated mice. While intense anti-caspase 3 and 11 activities were detected in the treatment group, moderate anti-caspase 1, 8, and 9 activities, as well as mild anti-Gasdermin E immunoreactivity, were observed. In contrast, no immunoreaction was found in the control group. With this presented study, the anti-tumoral activity of avirulent *Salmonella Typhimurium* has been demonstrated. In this anti-tumoral mechanism, the presence of necrosis, apoptosis, and pyroptosis has been shown as the mechanisms of cell death for tumor cells. Accordingly, this is of fundamental nature for the development of a successful alternative method in breast cancer treatment and for establishing the underlying mechanisms that will serve as a basis for other cancer treatments.

Keywords: Anti-tumoral activity, Apoptosis, Immunohistochemistry, MCF-7, Pyroptosis, *Salmonella Typhimurium*.

TEŐEKKÜR

Bu alıőmanın yürütölmesi sırasında desteğini esirgemeyen danıőmanım Dr.Öğr. Üyesi Tuğçe ANTEPLİOğLU'na bu çalışmanın başarılı bir şekilde tamamlanmasında sağladığı rehberlik için, sevgili jüri üyelerim Prof. Dr. Oğuz KUL ve Prof. Dr. Begüm YURDAKÖK DİK MEN'e, çalıőmamızda kullandığımız avirölent bakteri suőlarını bize temin eden Prof. Dr. Hyon E. Choy'a bu çalışmanın geliőtirilmesinde verdikleri emek için, Sayın Erva ESER'e istatistik hesapları konusunda destek verdiği için, Sayın Murat Eser AKYÜREK'e (Atlas Biyoteknoloji) őirketinin laboratuvar olanaklarından yararlanmamı sağladığı için ve çalıőmalarım sırasında görevi olmadığı halde bana destek veren, bu süreçte bana sağladıkları moral ve motivasyon için Gözde YALDIZ, Tilbe Su YAPICI ve Gözde ÖZTÜRK AYDOęDU' ya sonsuz teőekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ.....	1
1.1. MEME TÜMÖRLERİ	3
1.2. Meme Tümörü Modelleri.....	4
1.3. Meme Tümörleri Tedavisi.....	6
1.4. İMMUNOTERAPİ	7
1.4.1. BAKTERİYOTERAPİ.....	7
1.4.1. Bakteriyoterapide <i>Salmonella</i>	9
1.4.2. Bakterilerin Salgıladığı Toksinler ve Kanser Tedavisi	11
1.5. Programlı Hücre Ölümü Yolları.....	14
1.5.1. Apoptoz	14
1.5.2. Piroptoz.....	16
2. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	18
2.1. Bakterilerin İnkübasyonu	18
2.2. Hücre Kültürü.....	18
2.3. Deney Hayvanları ve Ksenograft Tümör Modeli	18
2.4. Deney Düzeni.....	19
2.5. Patolojik İncelemeler	19
2.6. Hematoksilen-Eosin İnceleme	20
2.6.1. Hematoksilen-Eosin Boyama Protokolü	20
2.7. İmmunohistokimyasal İnceleme	20
2.7.1. İmmunohistokimyasal Boyama Protokolü.....	20
2.9. İmmunofloresan İnceleme.....	22
2.9.1. İmmunofloresan Boyama Protokolü	22
2.10. Veri ve İstatistiksel Analiz	23
3. SONUÇLAR ve TARTIŞMA.....	24
3.1. Makroskobik Bulgular.....	24
3.2. Mikroskobik Bulgular.....	25
3.2.1. Hematoksilen-Eosin Bulguları.....	25
3.2.2. İmmunohistokimyasal Bulgular	30
3.2.3. İmmunofloresan Bulgular.....	33
3.3 TARTIŞMA	35

ÇİZELGELER

Sayfa

TABLO 1.1 BAKTERİLER TARAFINDAN SENTEZLENEN TOKSİNLER VE ÇEŞİTLİ KANSER HÜCRELERİNE KARŞI ETKİSİ (YAGHOUBİ VE VD., 2019).....	13
TABLO 2.1 DENEY DÜZENİ.....	19
TABLO 2.2 KULLANILAN ANTİKORLARIN MARKA, DİLÜSYON VE TESPİT ETTİĞİ PROGRAMI HÜCRE ÖLÜM ÇEŞİDİ.....	21
TABLO 3.1 UYGULAMA METOTLARI VE TÜMÖR ÇAPLARININ ÖLÇÜMÜ.....	25



ŞEKİLLER

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
ŞEKİL 1. 1 APOPTOZ İNTRİNSİK (İÇSEL) VE EKSTRİNSİK (DIŞSAL) YOLAK (LORETO VE VD., 2014).	15
ŞEKİL 1. 2 PİROPTOZUN KLASİK VE KLASİK OLMAYAN YOLAKLARI (ZHENG VE VD., 2021).	17
ŞEKİL 3. 1 TÜMÖR OLUŞTURULAN FARELERİN MAKROSKOBİK GÖRÜNTÜSÜ. (A) (B) CAUDAVENTRAL BÖLGENİN MEDİALİNDE YUVARLAK ŞEKİLLİ TÜMÖRAL OLUŞUM.....	24
ŞEKİL 3. 2 EKSPİRTE EDİLEN TÜMÖRLERİN MAKROSKOBİK GÖRÜNTÜSÜ. (A)YAKLAŞIK 1,5 X 0,5 CM BOYUTUNDA ŞEKİLSİZ YAPIDA, TEN-BOZ RENKLİ EKSTİRPE EDİLEN TÜMÖRÜN MAKROSKOBİK GÖRÜNTÜSÜ. TGF-ALFA ATAÇMANLI TEDAVİ GRUBU. (B) YAKLAŞIK 1 X 0,5 CM BOYUTUNDA SERT VE YUVARLAK YAPIDA KOYU RENKLİ EKSTİRPE EDİLEN TÜMÖRÜN MAKROSKOBİK GÖRÜNTÜSÜ. TGF-ALFA ATAÇMANSIZ TEDAVİ GRUBU.....	24
ŞEKİL 3. 3 KONTROL GRUBU. TÜMÖR DOKUSUNDA YÜKSEK MİTOTİK İNDEKS (OK). BÜYÜTME: 200X. HEMATOKSİLEN VE EOZİN BOYAMA.....	26
ŞEKİL 3. 4 KONTROL GRUBU. STROMAL DOKU ÜZERİNE OTURMUŞ; ANİZOSİTOZİS, ANİZOKARYOZİS VE YÜKSEK MİTOTİK İNDEKS GÖSTEREN TÜMÖRAL HÜCRELER. BÜYÜTME: 400X. HEMATOKSİLEN VE EOZİN BOYAMA	27
ŞEKİL 3. 5 TGF-ALFA (-) TEDAVİ GRUBU. TÜMÖR DOKUSUNDA YOĞUN NEKROZ ALANLARI (YILDIZ), BAKTERİ KÜMELERİ, NÖTROFİL LÖKOSİT VE MAKROFAJ İNFİLTRASYONU (OK). BÜYÜTME: 100X. HEMATOKSİLEN VE EOZİN BOYAMA.....	27
ŞEKİL 3. 6 TGF-ALFA (-) TEDAVİ GRUBU. TÜMÖR DOKUSUNDA APOPTOTİK FİĞÜR (OK). BÜYÜTME: 400X. HEMATOKSİLEN VE EOZİN BOYAMA	28
ŞEKİL 3. 7 TGF-ALFA (+) TEDAVİ GRUBU. TÜMÖR DOKUSUNDA NEKROZ ALANLARI (OK) VE YANGI HÜCRESİ İNFİLTRASYONU (ASTERİKS). BÜYÜTME: 200X. HEMATOKSİLEN VE EOZİN BOYAMA	28
ŞEKİL 3. 8 TGF-ALFA (+) TEDAVİ GRUBU. TÜMÖR DOKUSUNDA APOPTOTİK FİĞÜR (OK). BÜYÜTME:200X. HEMATOKSİLEN VE EOZİN BOYAMA.....	29
ŞEKİL 3. 9 KSENOGREFT MODELİNDE ANİ-KANSER TEDAVİ GRUPLARINA GÖRE PİROPTOZ VE APOPTOZ YOLAKLARINI GÖSTEREN İMMUNOPEROKSİDAZ BULGULAR. (A) TGF-ALFA (+) TEDAVİ GRUBU. YÜKSEK KASPAZ-3 İMMUNOREAKTİVİTESİ. AEC KROMOJEN. ZIT BOYAMA HEMATOKSİLEN. BÜYÜTME: 400X (B) TGF-ALFA (-) TEDAVİ GRUBU. YÜKSEK KASPAZ-3 İMMUNOREAKTİVİTESİ. AEC KROMOJEN. ZIT BOYAMA HEMATOKSİLEN. BÜYÜTME: 400X. (C) TGF-ALFA (+) TEDAVİ GRUBU. HAFİF-ORTA KASPAZ-8 İMMUNOREAKTİVİTESİ. AEC KROMOJEN. ZIT BOYAMA HEMATOKSİLEN. BÜYÜTME: 400X. (D) TGF-ALFA (-) TEDAVİ GRUBU. HAFİF KASPAZ-8 İMMUNOREAKTİVİTESİ. AEC KROMOJEN. ZIT BOYAMA HEMATOKSİLEN. BÜYÜTME: 400X. (E) TGF-ALFA (+) TEDAVİ GRUBU. ORTA KASPAZ-9 İMMUNOREAKTİVİTESİ. AEC KROMOJEN. ZIT BOYAMA HEMATOKSİLEN. BÜYÜTME: 400X. (F) TGF-ALFA (-) TEDAVİ GRUBU. ORTA KASPAZ-9 İMMUNOREAKTİVİTESİ. AEC KROMOJEN. ZIT BOYAMA HEMATOKSİLEN. BÜYÜTME:400X.....	31

ŞEKİL 3. 10 (A) TGF-ALFA (+) TEDAVİ GRUBU. ORTA KASPAZ-1 İMMUNOREAKTİVİTESİ. AEC KROMOJEN. ZIT BOYAMA HEMATOKSİLEN. BÜYÜTME: 200X. (B) TGF-ALFA (-) TEDAVİ GRUBU. HAFİF KASPAZ-1 İMMUNOREAKTİVİTESİ. AEC KROMOJEN. ZIT BOYAMA HEMATOKSİLEN. BÜYÜTME: 200X. (C) TGF-ALFA (+) TEDAVİ GRUBU. ORTA KASPAZ-11 İMMUNOREAKTİVİTESİ. AEC KROMOJEN. ZIT BOYAMA HEMATOKSİLEN. BÜYÜTME:400X. (D) TGF-ALFA (-) TEDAVİ GRUBU. ORTA KASPAZ-11 İMMUNOREAKTİVİTESİ. AEC KROMOJEN. ZIT BOYAMA HEMATOKSİLEN. BÜYÜTME:400X. (E) TGF-ALFA (+) TEDAVİ GRUBU. ORTA GASE İMMUNOREAKTİVİTESİ. AEC KROMOJEN. ZIT BOYAMA HEMATOKSİLEN. BÜYÜTME:400X. (F) TGF-ALFA (-) TEDAVİ GRUBU. GASE İMMUNOREAKTİVİTESİ. AEC KROMOJEN. ZIT BOYAMA HEMATOKSİLEN. BÜYÜTME:400X..... 32

ŞEKİL 3. 11 İMMUNOHİSTOKİMYASAL BULGULARIN İSTATİKSEL ANALİZİ (GRAPHPAD PRİSM 9.5.1)..... 33

ŞEKİL 3. 12 KSENOGREFT MODELİNDE ANİ-KANSER TEDAVİ GRUPLARINA GÖRE PİROPTOZ VE APOPTOZ YOLAKLARININ ÇAKIŞMALARINI GÖSTEREN İMMUNOFLORESAN BULGULAR. (A) TGF-ALFA (+) TEDAVİ GRUBUNDA GSDME (FITC) İMMUNREAKTİVİTESİ. BÜYÜTME: 100X (B) TGF-ALFA (+) TEDAVİ GRUBUNDA KASPAZ-11 (TEXAS RED) İMMUNOREAKTİVİTESİ. BÜYÜTME: 100X (C) TGF-ALFA (+) TEDAVİ GRUBUNDA GSDME KASPAZ-11 İMMUNREAKTİVİTESİNİN ÇAKIŞMASI (SARI NOKTALAR). BÜYÜTME: 100X (D) TGF-ALFA (+) TEDAVİ GRUBUNDA GSDME (FITC) İMMUNREAKTİVİTESİ. BÜYÜTME: 100X (E) TGF-ALFA (+) TEDAVİ GRUBUNDA KASPAZ-3 (TEXAS RED) İMMUNOREAKTİVİTESİ. BÜYÜTME: 100X (F) TGF-ALFA (+) TEDAVİ GRUBUNDA KASPAZ-3, GSDME İMMUNREAKTİVİTESİNİN ÇAKIŞMA GÖRÜNTÜSÜ (SARI NOKTALAR). BÜYÜTME: 100X (G) TGF-ALFA (-) TEDAVİ GRUBUNDA KASPAZ-8 (FITC) İMMUNOREAKTİVİTESİ. BÜYÜTME: 100X (H) TGF-ALFA (-) TEDAVİ GRUBUNDA KASPAZ-3 (TEXAS RED) İMMUNOREAKTİVİTESİ. BÜYÜTME: 100X. (I) TGF-ALFA (-) TEDAVİ GRUBUNDA KAPAZ-3, GSDME İMMUNREAKTİVİTESİNİN ÇAKIŞMA GÖRÜNTÜSÜ (SARI NOKTALAR). BÜYÜTME: 100X..... 34

SİMGELER VE KISALTMALAR

4T1:	Fare Meme Kanseri
BCG:	Bacillus Calmette-Guerin
Bcl-2:	B hücreli lenfoma 2
CT26:	Fare kolorektal karsinom
DAMP:	Hasarla Bağlantılı Moleküler Paternler
DT:	Difteri toksini
EF-2:	Elongasyon Faktörü-2
EGFR:	Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
ER:	Östrojen Reseptörü
FDA:	Gıda Ve İlaç İdaresi
GSDME:	Gasdermine
GSDME-NT:	Gasdermin E N-Terminal Fragmanı
H2O2:	Hidrojen Peroksit
HCC:	Hepatoselüler Karsinom
HE:	Hematoksilen Ve Eozin
HNSCC:	Baş Ve Boyun Skuamöz Hücreli Karsinom
IFN:	İnterferon
IL-1β:	İnterlökin-1 β
LB:	Luria-Bertani
MCF-7:	İnsan Meme Adenokarsinomu
NK:	Doğal Öldürücü Hücreler
NMIBC:	Kasa İnvaze Olmayan Mesane Kanseri
MLKL:	Karışık Soy Kinaz Alanı Benzeri Psödokinazı
PAMP:	Patojen Bağlantılı Moleküler Paternler
PARP:	Poli ADP-Riboz Polimeraz
PCD:	Programlı Hücre Ölümü
PE:	Pseudomonas Ekzotoksin
PE38:	Pseudomonas Ekzotoksin A
PI:	Propidium İyodür
ppGpp:	Guanozin Tetra Ve Pentafosfat
SD:	Standard Deviation
TNF:	Tümör Nekroz Faktör
TNF-α:	Tümör Nekroz Faktör Alfa
TUNEL:	Terminal Deoksinükleotidil Transferaz dUTP Nick-End Etiketleme
VEGF:	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

1. GİRİŞ

Kanser, malign transformasyona uğramış hücrelerin normal sınırlarını aşır bitişik dokulara aşırı bir şekilde çoğalması, büyümesi ve sızması ile karakterize edilir (Pulumati ve vd., 2023). Kanser, küresel halk sağlığı için ciddi bir sorundur ve görülme sıklığı 1990'dan beri birçok ülkede artmıştır. Bu eğilim, özellikle karmaşık ve pahalı kanser tedavileriyle başa çıkmak için yeterli donanıma sahip olmayan sağlık sistemlerinin bulunduğu ülkeler için bir tehdittir (Fitzmaurice ve vd., 2015). Gelişmekte olan ülkelerin çoğunda olduğu gibi Türkiye'de de kanser insidansı ve ölüm oranları artmaktadır (Yılmaz ve vd., 2011)

Belirli kanserler için önleme ve tedavi seçenekleri konusunda son yıllarda önemli ilerlemeler kaydedilmiştir (Allemani ve vd., 2015, Coleman ve vd., 2003). Bununla birlikte, bu gelişmelere rağmen dünya genelindeki nüfus artışı ve yaşlanma ile; sigara, obezite ve beslenme alışkanlıkları gibi risk faktörleri de kanser yükünün giderek artmasında etkili olmaktadır (Fitzmaurice ve vd., 2015).

Dünya çapında en yaygın dört kanser türü; meme (kadınlarda), akciğer, bağırsak (anüs dahil) ve prostat kanserleridir ve tüm yeni vakaların onda dördünden fazlasını (%43) oluşturur (World Health Organization, 2020). En çok tanı koyulan kanser türü olan akciğer kanserinin yerini alan meme kanseri, bugün 8 kanser teşhisinden 1'ini ve her iki cinsiyette toplam 2,3 milyon yeni vakayı oluşturmaktadır (Sung ve vd., 2021). 2040 yılına kadar, yeni teşhis edilen meme kanseri sayısının %40' ın üzerinde artarak her yıl yaklaşık 3 milyon vakaya ulaşacağı tahmin edilmektedir. Benzer şekilde, meme kanserinden ölümlerin %50' den fazla artarak 2020'de 685.000'den 2040'ta 1 milyona çıkacağı öngörülmektedir (Arnold ve vd., 2022). Meme kanseri kadınlar arasındaki tüm kanser vakalarının %10,4' ünü oluşturur ve bu da onu cilt dışı kanserlerin (akciğer kanserinden sonra) ikinci en yaygın türü ve kansere bağlı ölümlerin en yaygın beşinci nedeni yapar (Sharma ve vd., 2010).

Kanser gibi malign hastalıklar, genellikle kontrolsüz ve aşırı hücre çoğalmasının olduğu durumlar olarak bilinir. Ancak, sadece aşırı hücre çoğalması değil, azalmış

apoptotik hücre ölüm indeksinin de malignite gelişimine katkıda bulunduğu gözlemlenmiştir. Normal olarak apoptozise geçemeyen ve bu nedenle daha uzun süre yaşayan hücreler, genomlarındaki mutasyonlar sonucunda malign hücrelere dönüşme potansiyeli taşırlar (Ulukaya, 2003). Apoptoz programlanmış hücre ölümü (PCD) veya hücre intiharı olarak tanımlanır (D'Arcy, 2019). Uzun yıllar boyunca programlı hücre ölümü denilince akla sadece apoptoz gelmiştir. Ancak bazı tümörlerdeki yüksek apoptoz direnci prevalansı nedeniyle, diğer PCD yollarının varlığı ve fizyolojik önemi son yıllarda artan bir ilgi toplamıştır (Wong, 2011). Apoptozdan farklı olarak litik ve enflamatuar süreçlere sahip olan bir diğer programlanmış hücre ölüm yolu olan piroptoz, klinik olarak kullanılma ve bu sorunları ele alma potansiyeli nedeniyle kanser patogenezi ve tedavi çalışmalarında adını geçirmeye başlamıştır. Yapılan son çalışmalar tümör hücrelerinde piroptoz indüksiyonunun güçlü bir enflamatuar yanıt oluşturduğunu ve belirgin bir tümör regresyonu sağladığını göstermektedir (Loveless ve vd., 2021).

Bununla birlikte, son çalışmalar, birçok bakterinin konak hücrede PCD'yi tetikleyebildiğini göstermiştir (Grassme ve vd., 2001). Kanser tedavilerinin yetersiz kaldığı durumlarda, genetik olarak modifiye edilmiş veya edilmemiş bakterilerin ve metabolitlerinin kullanılması, kanser hücrelerini hedefleme, tedavi etme ve metastazları önleme potansiyeline sahiptir; bu bakteriler, selektif hedefleme, doğal yönlendirme, mikroçevre algılama ve dış sinyallere tepki verme yetenekleriyle "robot fabrikalar" olarak adlandırılmaktadır (Altıntaş Kazar, 2019). Şu anda kansere karşı potansiyel olarak olumlu terapötik etkilerle ilişkilendirilen canlı bakteriler arasında, bir dizi araştırmacı tarafından tümör hedefli özellikleri nedeniyle incelenen *Salmonella* bulunmaktadır (Forbes, 2010, Hoffman, 2015). *Pseudomonas* ekzotoksin A (ToxA), zayıflatılmış *Salmonella* tarafından salgılanan ve kanser hücrelerini öldürme yeteneğine sahip bir proteindir ve kanser hücreleriyle doğrudan temas halinde olduklarında lokal olarak apoptozu indüklemeye kabiliyetine sahiptir ve çeşitli araştırmacılar tarafından gösterilmiştir (Ganai ve ark. 2011, Swofford ve ark. 2014). Bununla birlikte, bazı tümör hücrelerinin apoptozu dirençli olmaları da terapötik yaklaşımı olumsuz etkileyen durumlar arasında yer almaktadır. Bununla birlikte özellikle son 5 yıldır yapılan araştırmalar piroptozun litik anti-enflamatuar yanıtı tetiklemesiyle birlikte çok daha güçlü bir anti-tümöral etki gösterdiğini ortaya

koymuştur (Loveless ve ark. 2021). Ancak şu ana kadar yapılan çalışmalar Pseudomonas ekzotoksinin anti-tümöral etki mekanizmasının apoptoz üzerinden yürüdüğünü göstermiştir. Bu nedenle bu çalışmada, uygulanan immunoterapotikce oluşan anti-tümöral etkinliğin kullandığı hücre ölümü yolağının araştırılması primer hedef olarak belirlenmiştir.

1.1. MEME TÜMÖRLERİ

Meme kanseri, meme dokusundan türeyen hücrelerin anormal bir şekilde büyümesi ve çoğalması durumunu ifade eder (Khuwaja ve Abu-Rezq, 2004). Dünya çapında meme kanseri, kadınlar arasında yüksek mortalite ve morbidite insidansı ile en yaygın kanser olarak kaydedilmiştir (Arzmi ve vd., 2023). Dünya Sağlık Örgütü raporlarına göre, orta yaş grubundaki kadınlarda en sık görülen meme kanseri; toplam kanser tanılarının yaklaşık %23' ünü oluştururken ölüm nedenlerinin ise %14' ünü oluşturur (Boyle, Levin, 2008, Samarghandian ve vd., 2016, Siegel ve vd., 2020).

Metastatik bir kanser türü olan meme kanseri sıkça; kemik, karaciğer, akciğer ve beyin gibi organlara yayılabilir, bu da esas olarak tedavi edilemezliğini açıklar (Sun vd., 2017). Meme adenokarsinomları ise kadınlarda en sık görülen meme kanserleridir. Genellikle yavaş büyüyen bu tümörler, bazen tüm prognoz ve tedavi girişimlerine meydan okuyarak geniş bir klinik seyir yelpazesi sunar (Gioanni ve vd., 1990). Östrojen ise, kanser hücrelerinin büyümesinde ve gelişmesinde önemli bir rol oynar. Meme kanseri türleri arasında, östrojen reseptörü (ER+) pozitif meme kanseri, %70' in üzerinde bir insidansa sahiptir (Lumachi ve vd., 2013).

Günümüzde meme kanseri tedavisinde cerrahi, kemoterapi, hormonal tedavi ve son zamanlarda nanoteknoloji ve gen tedavisi gibi yapılabilecek pek çok tedavi yaklaşımı bulunmaktadır ancak bunlar ciddi yan etkiler ve yüksek maliyetleride beraberinde getirmektedir (Sharma ve vd., 2010, Lee ve vd., 2018). Bu nedenle kanser tedavisinde daha etkin ve ekonomik olarak uygulanabilir yeni yaklaşımlara ihtiyaç vardır (Lu ve vd., 2020).

1.2. Meme Tumorü Modelleri

Hücre kültürleri, laboratuvar araştırmalarının birçok alanında ve özellikle kanser çalışmalarında yaygın olarak tercih edilen *in vitro* modellerdir (Burdall ve vd., 2003). Meme karsinomlarına ilişkin bilgilerimizin önemli bir kısmı meme kanseri hücre (BCC) dizileri ile yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalara dayanmaktadır (Lacroix ve Leclercq, 2004). Hücre dizilerinin avantajları arasında farmakolojik ve genetik manipülasyonun göreceli kolaylığı, mevcut fonksiyonel analizlerin çeşitliliği ve bazı çalışmalar için kanserli epitel popülasyonunun saflığı (ve stromal hücre kontaminasyonunun olmaması) yer alır (Kao ve vd., 2009).

Meme kanseri hücre hatları, meme kanserinin patobiyolojisini anlamak ve yeni tedavi yöntemlerini araştırmak amacıyla sıkça tercih edilmektedir (Lacroix ve Leclercq, 2004, Vargo-Gogola ve Rosen, 2007). Meme kanseri moleküler olarak heterojen bir hastalıktır ve bu çeşitliliğin ne kadar iyi ve hangi hücre hatlarında en iyi modellendiğini anlamak önemlidir (Kao ve vd., 2009). Meme kanseri hücre dizileri, çeşitli meme kanseri alt tiplerini temsil etmek de dahil olmak üzere, insan meme kanserlerinin genetik ve genomik özelliklerinin çoğunu paylaşır (Vargo-Gogola ve Rosen, 2007). Kurulan ilk meme kanseri hücre dizisi 1958'de BT-20'dir (Lasfargues ve Ozzello, 1958). 1973 yılında Michigan Kanser Vakfı tarafından pleural efüzyondan üretilen ve dünyada en yaygın olarak kullanılan meme kanseri hücre dizisi MCF-7 (adını da buradan almaktadır) ile, çok sayıda başka hücre dizisi de bulunmaktadır (Burdall ve vd., 2003).

Meme hücrelerinin luminal epitelyal fenotipini koruyan hücre hatları arasında; MCF7, T-47D ve ZR-75-1, zayıf bir luminal epitelyal benzer fenotipe sahip olanlar; MDA-MB-453 ve SK-BR-3 hücre hatları, epitelyal markerları ifade etmeyen ancak yüksek seviyede vimentin (mezenkimal hücrelerde bulunan bir marker) gösteren hücre hatları arasında MDA-MB-231 yer almaktadır (Lacroix ve Leclercq, 2004). Tümör biyolojisi ve hormon etki mekanizması çalışmaları için en yaygın olarak kullanılan insan meme kanseri hücre dizisi MCF-7'dir (Osborne, Hobbs ve Trent, 1987).

İnsan meme kanseri için fare modelleri, üç ana gruba ayrılabilir; ksenograft modeller, kimyasal olarak indüklenmiş, virüs tarafından indüklenmiş veya iyonlaştırıcı radyasyon tarafından indüklenmiş modeller ve transgenikler ve knock-out'lar gibi

genetik mühendislik modelleri (GEM). Meme kanserine yönelik fare modelleri arasında ksenogreftler klinik öncesi deneylerde hala baskın rol oynamaktadır. Bunun birçok sebebi vardır. Birincisi, ksenogreft modelleri nispeten ucuzdur ve üretilmesi kolaydır. Ayrıca, immünesupresif alıcılara tümörojenik insan meme kanseri hücrelerinin, örneğin metastatik insan meme adenokarsinoma hücreleri (MCF-7) veya metastatik insan meme duktal karsinoma hücreleri (T-47D), subkutan veya ortotopik enjeksiyonu, nispeten kısa bir latent süre sonrasında katı tümörlerin oluşumuna yol açar (Wagner, 2003).

Genetiği değiştirilmiş fare modelleri, kanser biyolojisi anlayışımıza önemli ölçüde katkıda bulunmuştur (Cheon ve Orsulic, 2011). Kanser hücresi ksenografları, iyi karakterize edilmiş özellikleri, laboratuvarlar arası karşılaştırma olasılığı ve tekrarlanabilirliği nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır (Marangoni ve vd., 2007). İnsan meme tümörü ksenografları, endokrinolojik, immünolojik ve tümör-stroma etkileşimleri dahil olmak üzere tümör ve konak dokuları arasındaki çeşitli önemli etkileşimleri inceleme fırsatı sağlar (Clarke, 1996). Ayrıca, çoğu kimyasal olarak indüklenmiş ve transgenik modellere karşı, birçok insan meme kanseri hücre hattından türetilen ksenogreftler ER+ olup in vivo hormon bağımlılığı gösterir (Welsh, 2013). Her modelin avantajları ve dezavantajları vardır ve özel tercih, incelenen meme kanseri türüne ve araştırmacının ele aldığı belirli sorunlara bağlı olacaktır. Heterojen kanserler, örneğin meme kanseri gibi durumlarda, bazı modeller insan hastalığının belirli alt tiplerini veya evrelerini daha yakından taklit edebilir. Bu faktörler fare suşunun genetik yapısı, bağışıklık sisteminin önemi, araştırmacının tedavi mi yoksa önleme odaklı mı olduğu ve metastazın modellenip modellenmeyeceği gibi unsurları içerir (Welsh, 2013). Genel olarak, BALB/c, FVB ve C3H genetik geçmişine sahip fareler meme tümörü oluşturma konusunda oldukça duyarlıdır, bununla birlikte C57BL genetik geçmişine sahip olanlar oldukça dirençlidir (Medina, 2010). Aynı zamanda C3H, A ve DBA/2 gibi belirli inbreed fare suşları, yüksek bir spontan meme tümörü prevalansına sahiptir. BALB/c, C57BL ve AKR gibi diğer suşların prevalansı ise daha düşüktür (Fox, 2015). Bağışıklık sistemi yetersiz olan kemirgenler, insan kaynaklı kanser hücrelerinin ksenogreft olarak büyümesine ev sahipliği yapabilir; bu, tümörojenisiteyi test etmek ve yeni terapötikleri değerlendirmek amacıyla yaygın olarak kullanılan bir modeldir (Clarke,

1996, Mollard ve vd., 2011). En çok kullanılan iki model, *scid* (ciddi kombine bağışıklık yetersizliği) ve çıplak fare türleridir (Clarke, 2009). Nu mutasyonuna sahip kemirgenlere genellikle "atimik çıplak" kemirgenler de denir (Mollard ve vd., 2011).

1.3. Meme Tümörleri Tedavisi

Metastatik olmayan meme kanserindeki tedavinin ana hedefi, tümörün memeden ve bölgesel lenf düğümlerinden temizlenmesi ve metastatik nüksün önlenmesi iken, metastatik meme kanseri için terapötik hedefler genellikle yaşam süresini uzatma ve semptomları hafifletme odaklıdır. Ne yazık ki, mevcut durumda metastatik meme kanseri olan hastaların büyük çoğunluğu tedavi edilemez durumdadır (Waks ve Winer, 2019).

Tüm meme kanseri alt tiplerinin tedavisinde cerrahi, radyoterapi ve kemoterapi rutin olarak kullanılmaktadır (Nofech-Mozes ve ark., 2009). Fakat meme kanseri hastalarının tedavisinde kullanılan bu yöntemler tamamlayıcı stratejilerdir. Bu nedenle radyoterapi veya kemoterapinin her ikisinde, tüm meme kanseri moleküler alt tiplerini etkili bir biçimde tedavi etme yeteneğine sahip olmadığından, yetersizdir (Burguin, Diorio ve Durocher, 2021).

Geleneksel kanser radyasyon terapisi, tümörleri tedavi etmek için çeşitli iyonlaştırıcı radyasyon türlerini (x-ışınları, gama ışınları veya elektron ışınları) kullanır. İyonlaştırıcı radyasyon hem tümör hem de sağlıklı hücrelerin DNA'sına zarar verir, karmaşık biyokimyasal reaksiyonları tetikler ve sonunda hücre ölümüyle sonuçlanır (Terasawa ve ark, 2009).

Kemoterapi, birçok kanser türünde genel sağkalımı önemli ölçüde artırmış olmasına rağmen, sitotoksik yan etkiler, diğer etkili tedavilerin klinik uygulamasını ciddi şekilde sınırlayan önemli bir faktördür (Xue ve ark, 2011, Iwamoto, 2013). Kemoterapi gören hastalarda deri döküntüleri, alopesi ve mukozit en gözle görülür yan etkilerdir (Thorpe, Stringer ve Butler, 2013, McQuade ve ark, 2016). Radyasyonun da bu zayıflatıcı değişikliklere önemli ölçüde katkısı vardır. Birçok hastada gözlemlenen genel bir sorun; depresyon, anemi, yüksek dozda radyasyon tedavisi vb. gibi birçok faktöre bağlı olarak ortaya çıkabilen yorgunluktur (Bower, 2014). Kemoterapötik ilaçlar ayrıca doğrudan kemik iliğine zarar verebilir ve kan

hücresi sayısında keskin bir düşüşe neden olarak hastaları diğer birçok olası enfeksiyon türüne maruz bırakabilir (Wang, Probin ve Zhou, 2006).

Standart meme cerrahisi yaklaşımları; memenin tamamen çıkarılması (mastektomi), ardından genellikle meme rekonstrüksiyonu veya meme koruyucu cerrahidir (lumpektomi) (Burguin, Diorio ve Durocher, 2021). Ancak kullanılan bu tekniklere aksiller lenf nodu drenajı da eşlik edebilir ve bu da üst ekstremitelerde lenfödeme neden olabilir (e Guirro, 2002, Borges, 2006). Lenfödem meme kanseri cerrahisi ve radyoterapi sonrası en önemli sorunlardan biridir. Azaltılması ve kontrol altına alınması için alternatif arayışlar son derece önemlidir (Leal ve ark, 2009). Bu nedenle, her bir meme kanseri alt grubunu etkili bir şekilde tedavi etmek için yeni stratejik tedaviler geliştirmek çok önemlidir (Burguin, Diorio ve Durocher, 2021).

1.4. İMMUNOTERAPİ

Son zamanlarda ortaya çıkan bir tedavi stratejisi olan immünoterapi, tümör hücrelerinin antijenitesini artırarak ve bağışıklık hücrelerinin tümör öldürücü etkisini güçlendirerek insan bağışıklık sistemini tümör hücrelerini öldürmesi için uyarmaktadır (Liu ve vd 2023). Spesifik patofizyolojik hedeflere odaklanan hedefe yönelik tedavi, çeşitli meme kanseri alt tipleriyle mücadelede daha etkili ve yeni bir terapötik yaklaşım için yeni bir umut sunmaktadır (Masoud ve Pagès, 2017).

1.4.1. BAKTERİYOTERAPİ

Kemoterapi, radyoterapi ve kanserli olmayan hücrelere toksisite, ilaçların derin tümör dokusuna ulaşmaması ve tümör hücrelerinde artan ilaç direnci, alternatif kanser tedavilerinin olumsuz etkileri gibi mevcut kanser tedavi yöntemlerinde çok sayıda zorlukla karşılaşılmaktadır. Bu zorluklar, tümör hücrelerine karşı daha fazla seçicilik ve etkinliğe sahip alternatif yaklaşımların geliştirilmesine olan talebi artırmaktadır (Gupta ve vd., 2021). Birçok bakterinin patojenik olduğu ve hatta bazılarının tümör gelişimiyle ilişkilendirildiği bilinmesine rağmen; son araştırmalar, bazı bakterilerin kanser tedavisi için potansiyele sahip olabileceğini göstermiştir. Bazı canlı, zayıflatılmış veya genetiği değiştirilmiş bakteriler, tümörlerde çoğalma ve büyümeleri engelleme yeteneğine sahiptir (Yaghoubi ve vd., 2019). Genetiği

değiştirilmiş patojenik olmayan bakteri türlerinden bazıları, normal hücreler için düşük toksisite ile kanser hücrelerine seçicilikleri nedeniyle daha başarılı sonuçlar vermiştir (Song ve vd., 2018).

Tümörlerde kan damarı yapısının fonksiyonel olarak anormal olması, doku boyunca düzensiz kan akışına neden olarak oksijen yoksunluğuna yol açar, bu kan damarlarının neden olduğu hipoksi, anaerobik bakterilerin gelişmesi için eşsiz bir niş oluşturur (Ryan ve vd., 2009, Jain ve Forbes, 2001). Bu nedenle, kemoterapiye karşı oldukça dirençli olan tümör bölgeleri bile artık mikroorganizmalar ile özel olarak hedeflenebilir (Cheong ve Zhou, 2009). *Clostridia*, *Lactococcus*, *Bifidobacteria*, *Shigella*, *Vibrio*, *Listeria*, *Escherichia* ve *Salmonella*'nın farklı suşları, hayvan modellerinde kansere karşı değerlendirilmiştir (Song ve vd., 2018). Örneğin *Bifidobacterium longum* ve *Clostridium novyi* suşları, tümörün hipoksik alanını kolonize edebilir ve tümör hücrelerini yok edebilir (Roberts ve vd., 2014, Fujimori, 2006). En etkili antitümör bakterilerinden biri olan *Salmonella Typhimurium*'un zayıflatılmış oksotrofik mutantları ise, in vitro olarak birçok kanser hücrelerini istila edip yok edebilir ve hipoksik tümör bölgelerinde çoğalabilir (Zhao ve vd., 2006).

Bakteriyoterapi ilk kez, bir kemik cerrahı olan William B. Coley tarafından, Coley toksinleri olarak bilinen bakterileri kanser tedavisinde kullanmasıyla denenmiştir. Isı ile inaktive edilmiş iki farklı bakteri olan *Streptococcus pyogenes* ve *Serratia marcescens* karışımını, maligniteli 1000'den fazla hastaya enjekte etmiş ve birçok hastada tümörün gerilediğini, 30 vakanın ise tamamen iyileştiğini gözlemlemiştir (Nauts ve vd., 1946). *Bacillus Calmette-Guerin (BCG)*, *Mycobacterium bovis*'in zayıflatılmış bir suşudur ve 1970'lerin sonlarından beri, kasa invaze olmayan mesane kanserinin (NMIBC) tedavisi için Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından onaylanan tek bakteriyel ajandır. BCG standart olarak kullanılmıştır ve yüksek riskli NMIBC için en etkili tedavidir (Gontero ve vd., 2010, Zlotta ve vd., 2009).

Kanser bakteriyoterapisinin klinik uygulaması çok kullanışlı ve rutin olmasa da bu yaklaşım gelecekte umut verici olabilir (Yaghoubi ve vd., 2019). Günümüzde, bakteriler, basit genetik mühendislik veya sentetik biyomühendislik yöntemleriyle kanser tedavisini desteklemek amacıyla yönlendirilebilmektedir. Ayrıca, bakteri bazlı kanser tedavisi, daha iyi klinik sonuçlar için ya bir monoterapi olarak ya da diğer

antikanser tedavileri ile kombinasyon halinde kullanılabilir (Gupta ve vd., 2021). Kemoterapi gibi meme kanserine karşı mücadelede geleneksel tedaviler, etkinlikleri açısından sorgulanmaktadır. Bu nedenle, daha yüksek oranda sağkalım elde etmek için meme kanseri tedavisine yönelik stratejilerin sürekli olarak iyileştirilmesi gerekliliği doğmuştur (Yaghoubi ve vd., 2019). Bu nedenle de özellikle son yıllarda yapılan çalışmalar kemoterapinin komplikasyonları nedeniyle, düşük toksisiteye sahip ve/veya normal hücreler üzerinde herhangi bir yan etkisi olmayan yeni kanser ilaçları yapmak için bakteri ve ürünlerini kullanma potansiyelini incelemeye odaklanmıştır (Yaghoubi ve ark., 2019).

1.4.1. Bakteriyoterapide *Salmonella*

Bakteriyel tedaviler, kanseri tedavi etmek için standart yöntemlerle gerçekleştirilemeyen birçok benzersiz mekanizmaya sahiptir. Bakteriler spesifik olarak tümörleri hedefleyebilir, aktif olarak dokuya nüfuz edebilir, kolayca tespit edilebilir ve kontrol edilebilir bir şekilde sitotoksositeye neden olabilir (Forbes, 2010).

Kanser tedavisi bağlamında en sık kullanılan bakteri türleri *Clostridium*, *Bifidobacterium* ve *Salmonella*'dır (Pal, 2022). Genetik mühendisliği; bu bakterilerin genetiğini değiştirerek patojenitelerinin azaltılmasına ve kanser tedavisinde kullanılabilir hale getirilmesini sağlamıştır (Mayakrishnan ve vd., 2022). Ayrıca zayıflatılmış bakteriler metabolik olarak aktiftir ve tümör dokularında spesifik aktiviteler gerçekleştirebilmektedir, bu da onları kimyasal ve biyolojik ilaçlardan farklı kılmaktadır (Zheng ve Min, 2016).

Salmonella enterica serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*), insanlarda gastroenterite neden olan Gram-negatif bir bakteridir (Akoachere ve vd., 2009). *S. Typhimurium*; tümörleri algılama ve hedefleme yeteneği, tercihen tümöre özgü mikro ortamda büyüme, iyi intratümöral penetrasyon, düşük sitotoksosite, immünojenite ve çok yönlü programlanabilirlik özellikleri sayesinde yeni tedavi stratejilerinde çoğunlukla tercih edilmektedir (Forbes, 2010). *S.Typhimurium* aynı zamanda hem aerobik hem de anaerobik ortamlarda büyüebilmesi ve dolayısıyla hem hipoksik olmayan hem de hipoksik tümörlerde kolonileşebilmesi nedeniyle popüler bir hedeftir (Semenov ve vd., 2011). Zayıflatılmış *S.Typhimurium*, hayvan kanseri

modellerinde ve insan hastalardaki Faz I klinik denemelerinde geniş çapta incelenmiştir. Genleri kolaylıkla manipüle edilebilme özelliği sayesinde çeşitli zayıflatılmış suşları, fare modellerinde güvenli bir profil sergileyerek tümör hedefli terapötikler veya ilaç dağıtım araçları olarak tasarlanıp üretilmiştir (Zheng ve Min, 2016). *S. Typhimurium*, tümörlerin varlığına karşı bağışıklık tepkisini indükleyerek, Kaspaz-3'ü doğrudan aktive etmek için bakteriyel toksinleri kullanarak ve ayrıca anti-kanser bileşiklerinin tümör bölgelerine iletilmesinde bir vektör olarak kullanılarak tümörleri spesifik olarak hedefleyebilir ve yok edebilir (Enejiyon ve vd., 2020).

Tedavi modeli olarak bakterilerin kullanılması sırasında, konak bağışıklık sistemine karşı bakteriyel virülansın kontrol altına alınması oldukça kritiktir. Bu nedenle, bir suşun anti-tümör aktivitesini değiştirmeden zayıflatılması, tedavinin etkinliği açısından büyük önem taşımaktadır (Gupta ve vd., 2021). Bu yaklaşım, tedavi sürecinde istenmeyen immünolojik tepkileri en aza indirerek, bakterilerin güvenli ve etkili bir şekilde kullanılmasını sağlamayı hedefler. Anti-tümör spesifikliği açısından geniş çapta incelenen *Salmonella Typhimurium* suşu VNP20009, *msbB* ve *purI* dahil olmak üzere ana virülans genlerinin silinmesiyle değiştirilmiştir (Lee ve vd., 2014). Bu silme işlemi, konakta veya deney hayvanlarında hastalık veya toksik şok oluşumunu önlemek için bu bakterileri nihai olarak zayıflatılmasını amaçlamaktadır (Rommasi, 2022). *Salmonella spp.*'den *relA*- ve *SpoT*'un silinmesiyle oluşturulan mutantlar ise bakterilerde stres yanıtında gerçekleşen gen ekspresyonunda rol oynayan bir sinyalleme molekülü olan ppGpp (guanozin tetra ve pentafosfat)'nin sentezinde bozulmaya yol açar; ancak, mutant suş daha az toksik özellik sergiler. Avirüent Δ ppGpp suşunun antitümör yanıtları olduğu ve inflamazom NLRP3 ve IPAF'ı aktive ettiği, ayrıca tümör inhibitör sitokinlerinin (IL-1 β ve IL-18, TNF- α) ifadesini artırdığı, metastazı engellemek için bağışıklık hücrelerini topladığı ve tümör hücrelerinde doğrudan apoptozu indüklediği bilinmektedir (Na ve vd., 2006, Jiang ve vd., 2013, Kim ve vd., 2015, Phan ve vd., 2015). *Salmonella* ile hasar görmüş kanser hücrelerinin doğrudan etkileşimi sonucunda, kemik iliğinden türetilmiş makrofajların aktif Kaspaz-1 p10 gibi inflamazom ile ilişkili proteinleri eksprese ettiği gösterilmiştir; bu süreçte, hasar görmüş kanser hücreleri tarafından salınan ATP'nin inflamazom aktivasyonunun öncü sinyali olarak işlev görebileceği belirlenmiştir

(Liang ve vd., 2019). Jeong ve diğeri (2008), ppGpp'nin *Salmonella*'nın konak hücreye invaze olması için zorunlu olduğunu belirtmişlerdir; ppGpp olmadan, *Salmonella* ekstraselüler bir bakteri gibi işlev görecektir. Bununla birlikte, tümör hedefleme etkileri ve antitümör etkiler, böyle bir zayıflatmanın etkisinden etkilenmemektedir (Wang, 2021). Kim ve ark. (2015) avirulent ΔppGpp *Salmonella* tarafından kolonize edilen fare CT26 tümör modelinde IL-1β ve TNF-α seviyelerinin belirgin bir şekilde artarak tümör gerilemesine yol açtığını gözlemlemiştir. Lim ve ark. (2017); epidermal büyüme faktörü reseptörüne (EGFR) bağlanan ve PE38 adlı güçlü bir sitotoksik protein içeren bir immünotoksini (TGFA-PE38) ifade eden *Salmonella Typhimurium* ile fare kolon ve meme kanseri hücrelerinde kanser büyümesinin baskılandığını göstermiştir.

Fakat *Salmonella* bakterileri ile kanserle mücadelede daha umut verici stratejilerden yararlanmak için hala çözülmeyi bekleyen birçok sorun vardır (Liang ve vd., 2019). Malesef, ΔppGpp *Salmonella* tedavisinin tek başına uygulanması tümörün tamamen eradikasyonu ile sonuçlanmamakta ve tümör nüksü ile metastaz durumları sıkça raporlanmaktadır (Liang ve vd., 2019). *Salmonella* tedavisinde konağın bağışıklık tepkilerinin daha iyi anlaşılması, özellikle çeşitli stratejiler bakteriyoterapi ile birleştirildiğinde belirli bir ilacın başarısını artırabilir ancak toksik kemoterapiye ihtiyaç duymadan tasarlanmış bakterilerle kanseri iyileştirmenin ve metastazların hedeflenmesinin klinik potansiyeli de göz ardı edilmemelidir (Kim ve vd., 2015, Hayashi ve vd., 2009).

1.4.2. Bakterilerin Salgıladığı Toksinler ve Kanser Tedavisi

Kanser bakteriyoterapisinde bakteriler tek başına veya konvansiyonel yöntemlerle kombine edilerek kullanılmaktadır. Son zamanlarda, toksinler, peptitler, bakteriyosinler, sporlar ve enzimler gibi farklı bakteriyel ürünler, kanser tedavisi için umut verici ajanlar olarak dikkat çekmektedir (Yaghoubi ve vd., 2019). Bakteriyel toksinler, çeşitli hücre içi proteinleri hedeflemek ve konağın bağışıklık tepkilerini modüle etmek için konak hücrelerine girebilme yeteneğine sahiptir (Adkins ve vd., 2012). Bakteriler tarafından sentezlenen bu toksinler insan vücudundaki, bazıları aşağıda açıklanan çeşitli kanser hücrelerine karşı etki gösterebilir (Tablo 1.1) (Rommasi, 2022). Kanser hücrelerini hedef alan bakteriyel toksinler arasında , rekombinant tek zincirli veya çift zincirli füzyon toksinleri oluşturmaya çok uygun

olan *Pseudomonas* ekzotoksin (PE) ve difteri toksini (DT) yer alır (Kreitman ve Pastan, 1998).

İmmünotoksinler ise; bir büyüme faktörü, monoklonal antikor veya bir protein toksinene bağlı antikor fragmanı gibi bir ligand içerir. Ligand alt birimi hedef hücrenin yüzeyine bağlandıktan sonra molekül internalize olur ve toksin hücreyi öldürür (Kreitman ve Pastan, 1998). Hücresel internalizasyondan sonra, bu oldukça güçlü toksinler, protein sentezinin inhibisyonu yoluyla hücresel sitotoksiteyi indükler. Ayrıca çok küçük miktarlarda aktiftirler (Yamaizumi vd., 1978). *Pseudomonas* ekzotoksin A, birçok immünotoksinin öldürücü kısmı için kullanılan güçlü bir toksindir (Mazor ve Pastan, 2020). *Pseudomonas* ekzotoksini, gram negatif bir bakteri olan fırsatçı patojen *Pseudomonas aeruginosa*'nın en toksik virülans faktörüdür (Michalska ve Wolf, 2015, Wolf ve Elsässer-Beile, 2009). Ekzotoksin A, 66 kDa büyüklüğünde bir peptid olup, konakçı hücrelerin protein sentezini; elongasyon faktörü-2'yi (EF-2) ADP-ribosilasyon yoluyla inhibe ederek engeller (Wolf ve Elsässer-Beile, 2009, Yates ve vd., 2005). Sonuç olarak, dışsal ve içsel apoptoz yolları etkinleştirilir ve bu da hücre ölümüyle sonuçlanır (Du ve vd., 2010, Jenkins ve vd., 2004). Son yıllarda PE'nin hücresel yolaklarının moleküler mekanizmalarına açıklık getiren çalışmalar yapılmıştır (Wolf ve Elsässer-Beile, 2009).

Reseptör ligandları, spesifik hedef reseptörleri eksprese eden hücreleri öldürmek üzere toksinleri yönlendirmek için de kullanılabilir (Antignani ve FitzGerald, 2013). Bu reseptörleri PE ile spesifik olarak hedefleyerek, kanserleri ortadan kaldırırken aynı zamanda genel kemoterapötik stratejilerle sıklıkla ilişkilendirilen normal dokuya yönelik toksisiteyi de önleyebiliriz (Weldon ve Pastan, 2011). Lim ve arkadaşları 2017 yılında aynı immünotoksini ihtiva eden avirüent *Salmonella Typhimurium* ile CT26 (fare kolorektal karsinom) ve 4T1 (fare meme kanseri) hücre hatlarında tümör büyümesinin önemli ölçüde engellendiğini göstermişlerdir. PE38 toksininin aktif sitozolik formu; EGFR ligandını hedeflemek için, TGF-a'ya kaynaştırılmıştır (Phillips ve vd., 1994). Bu sebeple, yalnızca EGFR'yi eksprese eden hücreler, düşük seviyelerde EGFR'yi eksprese etmeyen veya göstermeyen normal hücrelere karşı minimum toksisiteyle füzyon proteinini internalize edecektir (Thomas ve vd., 2004)

Toksinler	Kaynak	Meme Kanseri Hücre Hattı	Diğer İnsan Kanseri Hücreleri/Hücre Hatları	Referans
Difteri toksini	Corynebacterium difteri	MCF-7	Adrenokortikal karsinom (H295R), glioblastomalar (U118MG, U373MG, U87MG), kutanöz T hücreli lenfomalar (CTCL), servikal adenokarsinom (HeLa), kolon kanseri (SW480, SW620, HCT116, CaCo-2 ve HT-29)	Lewis ve vd., 2017, Lutz ve vd., 2014, Holmes, 2000.
Botulinum nörotoksini tip A	<i>Clostridium botulinum</i>	T47D, MDA-MB231, MDA-MB-453	Prostat kanseri (PC-3, LNCaP), nöroblastom (SH-SY5Y)	Bandala ve vd., 2015, Ansiaux ve vd., 2006.
Ekzotoksin A	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	MCF-7, BT-20, CAMA-1, SKBR-3	Pankreas kanseri (PaCa-2), melanomlar (FEMX, Melmet-1, Melmet-5, Melmet-44, MeIRM, MM200), baş ve boyun skuamöz karsinomları, Burkitt lenfomasi (Daudi, CA46), lösemiler (EHEB, MEC1)	Hemmati ve vd., 2017, Bjorn, Groetsema ve Scalapino, 1986.
Ekzotoksin T	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	MDA-MB231, EMT6, 4T1	Fare kaynaklı fibrosarkom hücre dizisi (MCA-205), insan melanomu (A375), insan akciğer adenokarsinomu (Calu-3), fare akciğer karsinomu (LLC1), insan yumurtalık adenokarsinomu (SK-OV-3), insan servikal adenokarsinomu (HeLa)	Goldufsky ve vd., 2015.
Hyaluronidazlar (Hyaller)	<i>Streptococcus pyogenes</i>	Hs578T, MDA-MB-231, MCF-7		Lee ve vd., 2010.

Tablo 1.1 Bakteriler tarafından sentezlenen toksinler ve çeşitli kanser hücrelerine karşı etkisi (Yaghoubi ve vd., 2019).

1.5. Programlı Hücre Ölümü Yolları

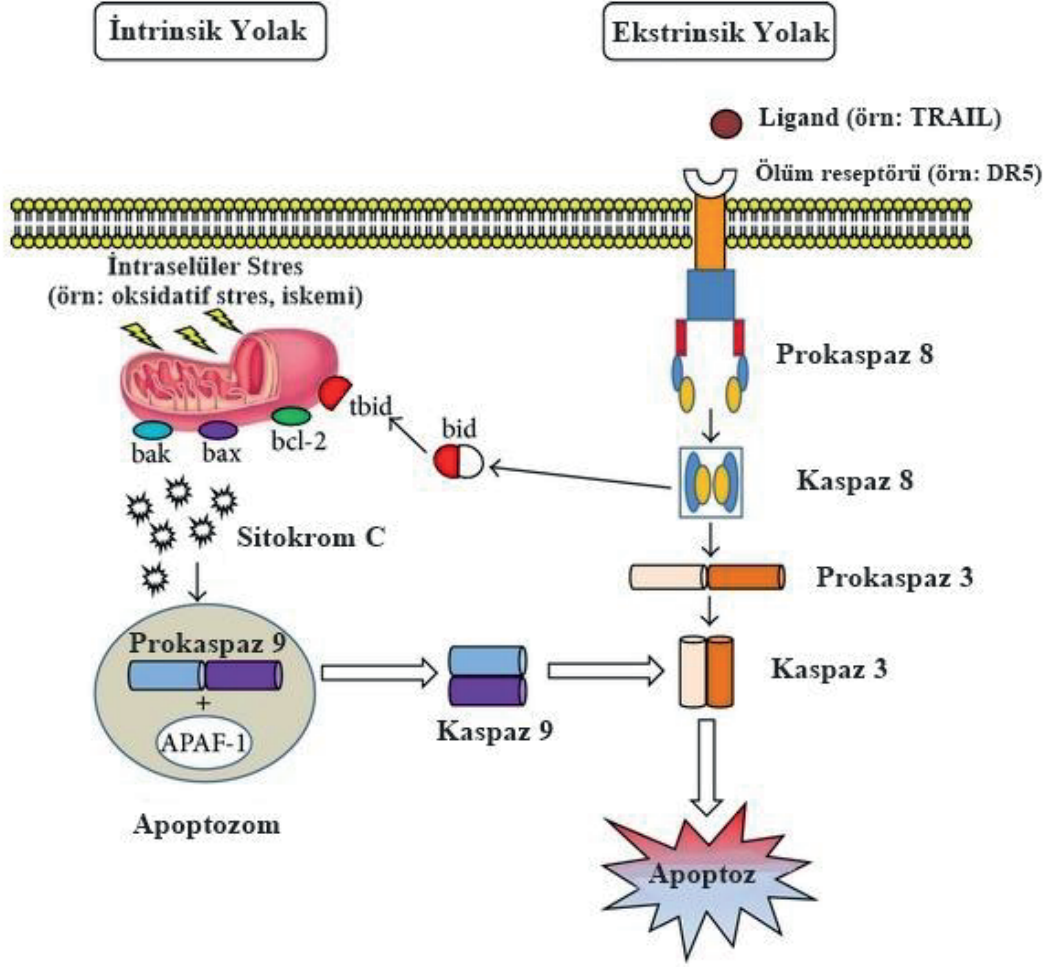
Programlanmış hücre ölümü (PCD), çoğu organ sisteminde gereksiz ve hasarlı hücrelerin uzaklaştırılmasında rol oynar (Kroemer ve vd.,1995). Programlanmış hücre ölümü yolları, tüm çok hücreli organizmaların büyümesinde, hayatta kalmasında, homeostazisinde ve doğuştan gelen bağışıklığında önemli fizyolojik rollere sahiptir (Rogers ve vd., 2017). Yaygın olarak incelenen PCD türleri; apoptoz, piroptoz, nekroptoz ve ferroptozdur (Tang ve vd., 2019). Hücre ölümünün şekli ne olursa olsun, sonuçta beklenen şey, normal hücreler hayatta kalırken tümör hücreleri gibi anormal hücrelerin ortadan kaybolmasıdır (Xu ve vd., 2023). Son 5 yılda yapılan bazı çalışmalar piroptoz, nekroptoz ve ferroptozun antitümör immünitesi ile sıkı bir şekilde ilişkili olduğunu ortaya çıkarmıştır (Tang ve vd., 2020).

1.5.1. Apoptoz

Apoptoz programlanmış hücre ölümü veya hücre intiharı olarak tanımlanmaktadır (D'Arcy, 2019). Apoptoz, normal hücre döngüsü, bağışıklık sisteminin düzgün gelişimi ve işleyişi, hormona bağlı atrofi, embriyonik gelişim ve kimyasal kaynaklı hücre ölümü dahil olmak üzere çeşitli süreçlerin hayati bir bileşeni olarak kabul edilmektedir (Elmore, 2007).

Apoptoz enerjiye bağımlı ve fizyolojik bir olay olabilmektedir (Adamkov, 2019). Apoptozda başlıca 5 farklı yolak kullanılır; metabolik ve hipoksik stres ile tetiklenen intrinsik (içsel) yolak ve Fas-L ya da tümör nekroz faktörü- α gibi dış uyaranlar ile tetiklenen ekstrinsik (dışsal) yolak (Şekil 1.1), DNA hasarı üzerine p53 ile aktive olan Kaspaz-2 bağımlı yolak, kaspazın doğrudan aktivasyonu ile granzim-B yolağı ve DNA fragmentasyonu ile başlayan granzim-A yolağıdır (Grilo ve Mantalaris, 2019).

Hücre ölümü reseptörleri aktive edildiğinde dışsal apoptoz meydana gelirken, hücresel stres mitokondriyal yolu aktive ettiğinde içsel apoptoz meydana gelir (Purnama ve vd., 2023). DNA hasarı, büyüme faktörünün tükenmesi, hipoksi, katlanmamış proteinlerin birikmesi veya sitotoksik ilaçlar gibi hücre içi sinyaller, içsel veya mitokondriyal apoptotik yolu başlatabilir. Bu yolda Kaspaz-9 başlatıcı kaspazdır, B hücreli lenfoma



Şekil 1. 1 Apoptoz intrinsik (içsel) ve ekstrinsik (dışsal) yolak (Loreto ve vd., 2014).

2 (Bcl-2) protein ailesi ise ana düzenleyiciler olarak görev yapar (Dasgupta ve vd., 2016). Kaspaz-9'un aktivasyonu kaspaz-3, -6/7'nin aktivasyonuna yol açar ve bu daha sonra kaspazla aktive edilen DNAz ve laminin inhibitörü olan poli ADP-riboz polimeraz (PARP) gibi çeşitli hücrel hedefleri böler. Bu biyokimyasal reaksiyonlar sonuçta hücrel denatürasyona ve ölüme yol açar (Degterev, Boyce ve Yuan, 2003). Dışsal apoptotik yol; aktive edilmiş T hücreler, doğal öldürücü (NK) hücreler ve makrofajların hedef hücrenin zarındaki ölüm reseptörlerine bağlanması ile başlatılır (Nagata, 1997, Falschlehner, Schaefer ve Walczak, 2009, Sedger ve McDermott, 2014). Fas ve tümör nekroz faktör (TNF) reseptörü integral proteinlerdir. Komplementer ölüm aktivatörleri olan FasL ve tümör nekroz faktör alfanın (TNF- α) bağlanması ile Prokaspaz-8 Kaspaz-8'e dönüşür. Böylece kaspaz kaskadı aktivasyonu başlatılmış olur (Choo, Loh ve Chen, 2019). Apoptozun son aşamasında

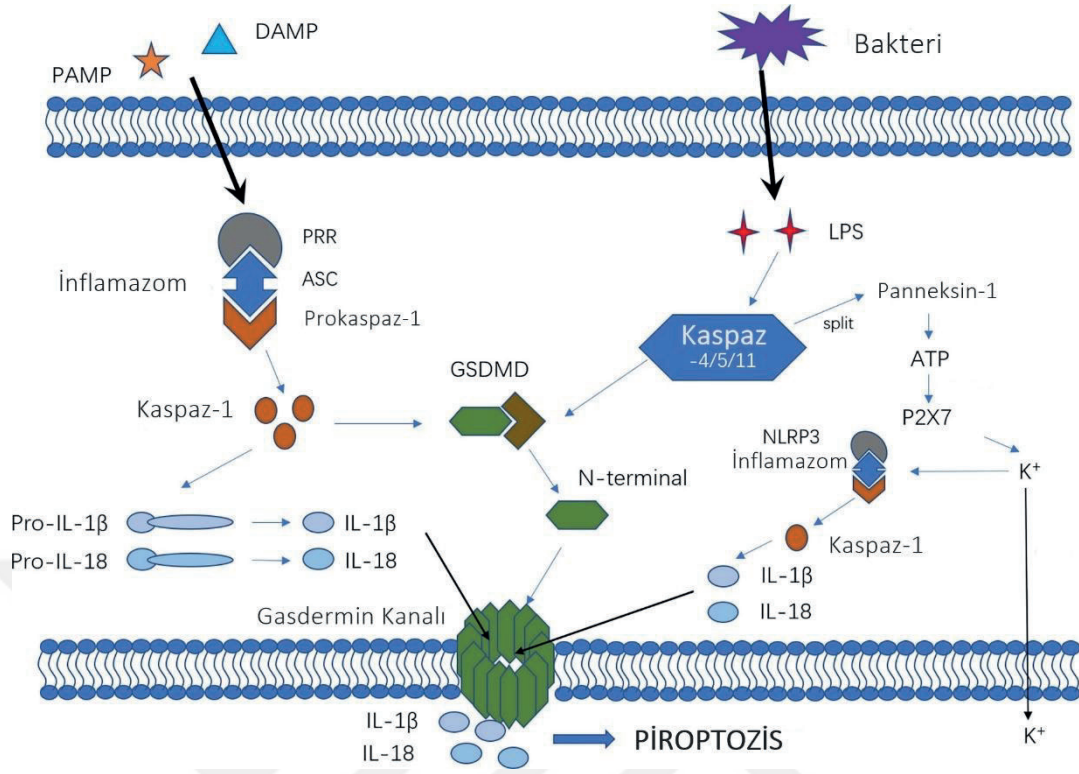
hücreler, makrofajlar veya nötrofiller gibi temizleyici hücreler tarafından in vivo olarak fagosite edilir (Silva, Do Vale ve dos Santos, 2008).

1.5.2. Piroptoz

"Piroptoz" terimi ilk olarak; 2001 yılında *Salmonella* ile enfekte makrofajlarda kaspaz-1'e bağlı proinflamatuvar PCD modelini keşfeden Amerikalı bilim adamları Cookson ve Brennan tarafından ortaya atılmıştır (Brennan ve Cookson, 2000, Cookson ve Brennan, 2001). Piroptoz, hücrelerin şişmesi ve çözünmesi ile karakterize edilen ve çeşitli proinflamatuvar faktörlerin salınımının eşlik ettiği bir tür litik enflamatuvar programlanmış hücre ölümüdür. (Jia ve vd., 2023). Piroptoz ve apoptozun özellikleri, her ikisinin de genlerin düzenlenmesi yoluyla meydana gelen hücre ölümleri olması bakımından benzerdir (Ji ve vd., 2021).

Spesifik morfolojik özellikler piroptozu apoptozdan ayırır. Piroptotik hücreler kromatin yoğunlaşmasına ve DNA fragmantasyonuna maruz kalmasına rağmen çekirdekleri sağlam kalır (Purnama ve vd., 2023).

Piroptoz, genellikle hücre içi patojen enfeksiyonlarıyla tetiklenir ve konak savunma sisteminin bir parçasıdır. İki farklı yolakla uyarılır: klasik ve klasik olmayan enflamatuvar yollar. Klasik piroptoz, hasarla ilişkili moleküler patenler (ATP, IL-1 α) ve patojen ilişkili moleküler patenler tarafından tetiklenen kaspaz-1 aracılığıyla gerçekleşirken, klasik olmayan piroptoz insan kaspaz-4/-5 ve fare kaspaz-11 bağımlıdır ve hücre içi lipopolisakkaritler tarafından uyarılır (Şekil 1.2) (Lamkanfi ve Dixit, 2014). Piroptoz esas olarak kaspaz-1 tarafından aktive edilir (Nagarajan ve ark. 2019). Son zamanlarda yapılan araştırmalar, aktive edilmiş kaspaz-3'ün, plazma zarında gözenekler oluşturarak ikincil nekroz/piroptoz gerçekleştiren N-terminal fragmanını (GSDME-NT) oluşturmak için gasdermin E'yi (GSDME) parçalayabildiğini ortaya koymuştur (Wang ve ark. 2017, Rogers ve ark. 2017). Piroptoz, aktif gasdermin ailesi üyeleri (GSDM'ler) tarafından plazma zarı gözenek oluşumu yoluyla gerçekleştirilir (Gong ve vd., 2023). Apoptoz uyarımı üzerine, GSDME ekspresyonu olmayan hücreler nekroza ilerlemeden apoptoza girerken, yüksek veya orta GSDME seviyelerine sahip olanlar doğrudan GSDME aracılı piroptoz maruz kalır (Rogers ve ark. 2017). Bu nedenle, GSDME ifadesinin apoptoz ve nekroz/piroptoz arasındaki geçişi yönetebileceği düşünülmektedir (Wang ve ark. 2017).



Şekil 1. 2 Piroptozun klasik ve klasik olmayan yolları (Zheng ve vd., 2021).

Apoptozdan farklı olarak PCD yollarının varlığı ve fizyolojik önemi, uzun süredir keşfedilmemiş olsa da bazı tümörlerdeki yüksek apoptoz direnci prevalansı nedeniyle son yıllarda artan bir ilgi toplamıştır (Wong, 2011). Piroptoz, klinik olarak kullanıma ve bu sorunları ele alma potansiyeli nedeniyle kanser araştırmacıları arasında kayda değer bir ilgi uyandırmıştır. Son kanıtlar, tümör hücrelerinde piropnoz indüksiyonunun güçlü bir enflamatuvar yanıtı ve belirgin tümör gerilemesine yol açtığını göstermektedir (Loveless ve ark. 2021). İmmünoterapinin de ortaya çıkışıyla birlikte piropnoz, immün kontrol noktası inhibitörlerinin antitümör etkinliğini arttırdığı gösterilmiştir (Jia ve vd., 2023). Piroptozun daha fazla araştırılması, yeni antitümör tedavilerinin geliştirilmesine yardımcı olacaktır (Jia ve vd., 2023).

2. GEREÇ VE YÖNTEMLER

2.1. Bakterilerin İnkübasyonu

Liyofilize formdaki bakteri suşları Prof. Dr. Hyon Choy (Chonnam National University Medical School, Republic of Korea)' dan temin edilmiştir. Suşlar; Luria-Bertani (LB) (Thermo Scientific, Kat.No: 22700025) (Jeffrey, 1972) sıvı besi yerinde %1 NaCl, %5 CO₂ ve %95 nemli havada 37°C 'de (Krieg ve Holt, 1984) inkübe edildi ve katı destek ortamı için %1,5 oranında granül agar (Atlas, 2010) eklendi.

2.2. Hücre Kültürü

Arşivimizdeki MCF-7 (ATCC, ABD) (13. pasaj) insan meme kanseri hücre hattı sıvı nitrojenden çıkarılıp, flasklara ekim yapılmak üzere 37°C'lik su banyosunda çözdürüldü. Çözdürülen bu hücre hattı; %90 RPMI-1640 (Gibco), %10 fetal buzağı serumu (Gibco) ve %1 penisilin/streptomisin (Gibco) ihtiva eden besi yeri (Peng ve vd., 2017) içine ekildi ve %5 CO₂ ve 95% nemli havaya sahip etüvde 37 °C'de inkübasyona bırakıldı.

2.3. Deneysel Hayvanlar ve Ksenograft Tümör Modeli

Çalışma kapsamında, 10 adet Atimik Nude fare (5-6 hafta yaşlı, 16-18 g ağırlığında) kullanıldı. Uygulanan tüm aşamalar için, Kırıkkale Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulunu'ndan onay alındı (23/02/04). Tüm hayvanlar çalışma boyunca, Kırıkkale Üniversitesi Hüseyin Aytemiz Deneysel Hayvanlar Ünitesinde, uygun sıcaklık ve nem koşullarında ve spesifik patojenlerden arı ortamda barındırıldı.

Ksenograft modeli için; 3×10^6 MCF-7 hücresi içeren 0.1ml RPMI besiyeri 0.1 ml matrigel içine eklenerek deri altı yolla sağ caudoabdominal bölgeden farelere implante edildi. Tümörler düzenli olarak takip edilerek boyutları 200mm³ olduğunda çalışma grupları oluşturuldu ve tablo 2.1'de belirtilen biçimde tedavi uygulamaları yapıldı. Buna göre TGF α ihtiva eden ve etmeyen 2 farklı tedavi grubu oluşturuldu ve PE38 ekzotoksinli avirulent *S.Typhimurium* her 1.5ml' de 5×10^7 olacak biçimde ayarlanarak ve her bir fareye intra-tümöral olarak 0.2ml uygulandı.

2.4. Deney Düzeni

Deney düzeni Tablo 2.1’de gösterilmiştir. Araştırma sürecinde; yerine getirme, azaltma ve iyileştirme (3R) prensiplerine bağlı kalarak, deneysel prosedürleri en aza indirecek şekilde gerekli minimum hayvan sayısını kullandık (Brønstad ve Berg, 2011).

Tablo 2.1 Deney Düzeni.

Fare	Uyguma	Açıklama
GI (n=3)	APP TGF- 0,3 ml	TGF α ve Pseudomonas ekzotoksin (PE38) ihtiva eden avirüilent <i>Salmonella Typhimurium</i> (Δ ppGpp; relA, spoT and Glm mutant)
GII (n=3)	APP- 0,3 ml	Pseudomonas ekzotoksin (PE38) ihtiva eden avirüilent <i>Salmonella Typhimurium</i> (Δ ppGpp; relA, spoT and Glm mutant)
III (n=4)	-	Tedavi Uygulanmadı

2.5. Patolojik İncelemeler

Tedavi uygulamalarından 2 gün sonra tüm gruplardaki hayvanlara karbondioksit solutma yöntemi uygulanarak ötenazileri gerçekleştirildi. Sonrasında tümör çapları ölçülerek, kaydedildi. Ardından sistemik nekropsileri yapılarak histopatolojik değerlendirme için, tümör örnekleri alındı. Tümör örnekleri histopatolojik incelemeler için %4’ luk PBS tamponlu paraformaldehit içinde 48-72 saat boyunca tespit edildi. Alınan örnekler 2mm kalınlığında trimlendi ve kasetlenerek akan çeşme suyu altında 24 saat yıkandı. Rutin doku takip amacıyla, otomatik doku takip cihazında dereceli alkol (sırasıyla 50, 70, 80, 96 ve 99,6) ve ksilol serilerinden geçirilip, parafin emdirilerek yine parafin ile bloklandı (Humason, 1962). Bloklanan dokulardan, adezivli ve pozitif şarjlı lamlara 4-5 μ kalınlığında seri kesitler alındı. Kesitler sırasıyla deparafinize ve rehidre edildi ardından rutin Hematoksilen ve Eozin (HE) ile boyanarak, histopatolojik yönden incelendi.

2.6. Hematoksilen-Eosin İnceleme

2.6.1. Hematoksilen-Eosin Boyama Protokolü

Mikrotom kullanılarak 4-5 μ kalınlığında alınan kesitler, üç seri ksilolde toplamda 5'er dakika süreyle deparafinize edildi. Ardından, kesitler sırasıyla 3 dakika boyunca absolut alkolde, 2'er dakika boyunca %96, %80, %70 ve %50'lik alkolde bekletildi. Alkol serisinden çıkan doku preparatları distile su içerisinde 2 dakika bekletildi. Mayer's Hematoksilen (HistoPlus, Kat.No: HST-HEM-0500) solüsyonunda 6 dakika boyunca boyanan kesitler, akan çeşme suyu altında yıkandı. Daha sonra, 1 dakika boyunca Eosin (HistoPlus, Kat.No: HST-EOA-0500) solüsyonunda bekletilen kesitler, sırasıyla yine dereceli alkol serilerinden geçirildikten sonra son olarak, 3 seri ksilolde 5'er dakika boyunca bekletildi (Thompson, 1966). Boyanan preparatlar Entellan (Merck, Kat.No: 107961) damlatılarak lamel ile kapatıldı. Daha sonra tüm kesitlerin, histopatolojik yönden değerlendirilmesi yapıldı ve Olympus BX51 (Japonya) trinoküler mikroskop ve DP25 dijital kamera kullanılarak mikrofotografı çekildi.

2.7. İmmunohistokimyasal İnceleme

2.1. İmmunohistokimyasal Boyama Protokolü

İmmunohistokimyasal boyama sırasında, tüm doku örnekleri için pozitif ve negatif doku örnekleri kullanıldı. Bu amaçla; kullanılan primer antikorların veri sayfalarında yazılı olan pozitif kontrol doku örnekleri üzerlerine primer antikor damlatılarak pozitif kontrol olarak, universal keçi serumu damlatılarak ise negatif kontrol olarak kullanıldı. HE boyamada bahsedilen deparafinizasyon ve rehidrasyon işlemlerine tabii tutulan preparatlar daha sonra, antijen açığa çıkarma işlemi için sitrat solüsyonu (pH:6.0) (Thermo Scientific, USA) içerisinde mikrodalga fırında en yüksek derecede 20 dakika boyunca kaynatıldı ve preparatlar tampon içerisinde oda ısısına gelene kadar bekletildi ve PBS (Capricorn Scientific, Kat.No: PBS-1A) içerisinde 15 dakika boyunca yıkandı. Ardından hazırlanan kesitler, endojen peroksidaz aktivitesini bloke etmek amacıyla, %0,3' lük metanol (Merck, Kat.No: 106009) içerisinde hazırlanan hidrojen peroksit (H₂O₂) (Merck, Kat.No: 108600) solüsyonu içerisinde 15 dakika boyunca bekletildi. Daha sonra preparatlar, PBS ile her 15 dakika boyunca yıkandı.

Dokuların çevresi, hidrofobik kalem kullanılarak sınırlandırıldı (Abcam, Kat.No: ab2601). Spesifik olmayan bağlantıların önüne geçebilmek için, protein Bloklama Solüsyonu (Ultra V Block UltraVision Detection System Large Volume Anti-Polyvalent, HRP (RTU), ThermoScientific; Ref.No: TP-125-HL) (Shi ve vd., 1999) preparatlara damlatıldı ve oda sıcaklığında 10 dakika boyunca inkübe edildi. Preparatlar yıkanmadı, yalnızca Protein Bloklama solüsyonu döküldü. Daha sonra, antikor sulandırma solüsyonu (ThermoScientific Kat.No: 003218) ile sulandırılan ve Tablo 2.2’de sulandırılma oranları verilen Primer Antikorlar preparatlara damlatıldı ve 1 gece boyunca 4°C’de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında preparatlar PBS ile 2x5’lik sürelerle yıkandı. Biotinli Sekonder Antikor (Biotinli Goat Anti-Polyvalent) preparatlara damlatıldı ve 30 dakika boyunca oda sıcaklığında bekletildi (UltraVision Detection System Large Volume Anti-Polyvalent, HRP (RTU), ThermoScientific; Ref.No: TP-125-HL). Daha sonra preparatlar, PBS ile 3x5 dakika boyunca yıkanarak işlem tamamlandı. Son olarak, Streptavidin Peroksidaz damlatılarak 30 dakika bekletildi ve bu şekilde konjugasyon, biotinli sekonder antikora bağlandı. Preparatlar, PBS ile 3x5 dakika boyunca yıkandıktan sonra kromojen olarak AEC (ThermoScientific Kat.No: 001122) ile kaplandı ve Mayer’s Hematoksilen ile karşıt boyamaları yapılarak su bazlı yapıştırıcı (Sigma Kat.No: M1289) ile lamlar kapatıldı. Olympus BX51 trinoküler mikroskop kullanılarak incelenen dokuların, DP25 dijital kamera kullanılarak mikrofotografı çekildi skorlandı (Knoblaugh vd., 2018)’ye göre 20X objektifte 3 farklı alan seçilerek boyanma alanı ve şiddetine göre: 0; yok, 1; hafif, 2; orta, 3; şiddetli olarak değerlendirilip, semikantitatif olarak skorlandı.

Tablo 2.2 Kullanılan antikorların marka, dilüsyon ve tespit ettiği programı hücre ölüm çeşidi.

ANTİKOR	HOST	REAKTİVİTE	MARKA	DİLÜSYON	PCD
CASPASE 3 Kat.No: STJ96569	Tavşan	İnsan, Fare	St. John’s	1:200	Apoptoz/ Piroptoz

CASPASE 8 Kat.No: STJ97394	Fare	İnsan, Fare	St. John's	1:300	Apoptoz
CASPASE 9 Kat.No: STJ96979	Fare	İnsan, Fare	St. John's	1:100	Apoptoz
CASPASE 1 Kat.No: STJ922017	Tavşan	İnsan, Fare	St. John's	1:200	Piroptoz
CASPASE 11 Kat.No: DF7609	Tavşan	İnsan, Fare	Affinity	1:100	Piroptoz
GSDME Kat.No: SC-393162	Fare	İnsan, Fare	Santa Cruz	1:200	Piroptoz

2.9. İmmunofloresan İnceleme

2.9.1. İmmunofloresan Boyama Protokolü

Doku bloklarından alınan seri kesitler, ticari indirekt immunoperoksidaz streptavidin/biotin immunoperoksidaz kiti (ThermoScientific, Massachusetts, USA) ve immunofloresan boyalar ile kit protokollerine uygun biçimde boyandı. Bunun için; kesitler önce ksilol serilerinden geçirilerek deparafinize edildi daha sonra dereceli alkol serilerinden geçirip distile suda bekletilerek rehidre edildi. Ardından

dokular metanolde hazırlanmış %0,3' lik hidrojen peroksit çözeltisinde 10 dakika bekletilerek endojen peroksidaz aktivitesinin yok edilmesi sağlandı. Antijen açığa çıkarma yöntemi olarak; Tris/EDTA solüsyonu içinde yüksek ısıya maruz bırakılma kullanıldı. Daha sonra; protein bloke edici serumla 10 dakika muamele edilen preparatlar yıkanmadan primer antikor (Anti- Caspase 1, Anti-caspase-3, Anti-Caspase 8, Anti- Caspase 9, Anti- Caspase 11, Anti-GasderminE (GSDME)) ile gece boyunca 4 °C' de bekletildi. Aynı anda birden fazla belirtecin gösterilmesi amacıyla; FITC anti-mouse IgG, Texas Red anti-mouse IgG, FITC anti-rabbit IgG, Texas Red anti-rabbit IgG antikorları sekonder basamakta farklı kombinasyonlarla kullanıldı. Sonrasında kesitler yıkanıp gliserin ile kaplanarak floresan ataçmanlı Leica SP8 3X STED Lazer Konfokal mikroskop altında incelendi ve mikrofotografı çekildi.

2.10. Veri ve İstatiksel Analiz

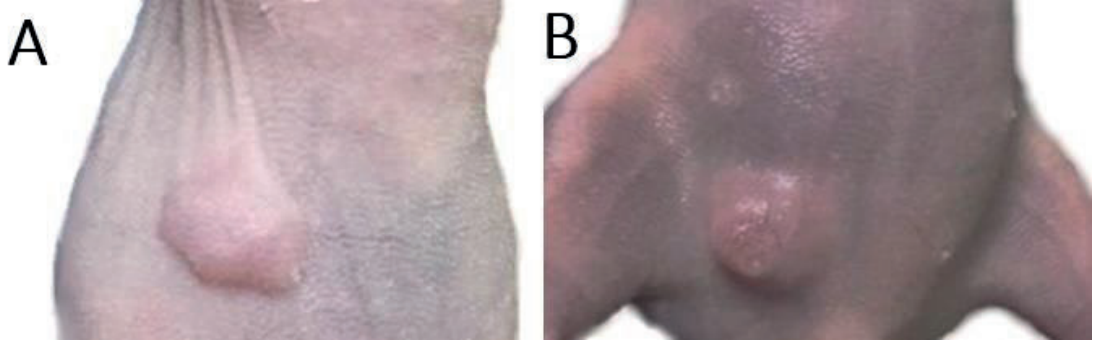
İmmunoperoksidaz test sonuçları dijital görüntü analizi programı (Image J) yardımı ile alan analizi yapılarak kantitatif veriler elde edilerek değerlendirildi. Bezdirici vd (2024)'e göre; boyanan dokulardan rastgele seçilen 3 farklı alandan, x20 objektifte mikrofotografı elde edildi. Tüm immunopozitif alanların optik yoğunluğu ölçüldü ve ortalama Cas3, Cas8, Cas9, Cas1, Cas11 ve GSDME pozitif alanlar ile toplam alan hesaplandı. Böylece immunopozitif alanın oranı, tüm alana göre (% piksel cinsinden) hesaplandı.

Çalışmada, TGF-alfa (+), TGF-alfa (-) ve kontrol gruplarının arasındaki farklılıkların değerlendirilmesinde ANOVA testi kullanıldı. Sonuçların grafikleri ise Graphpad Prism 9.5.1 programında yapıldı. Sonuçların yorumlanmasında 0,05' ten küçük p değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3. SONUÇLAR ve TARTIŞMA

3.1. Makroskobik Bulgular

Deney süresince tüm atimik nude fareler, uygulama bölgesi ve genel görünüş açısından herhangi bir makroskobik anormallik göstermedi. Fiziksel görünüşlerinde veya davranışlarında herhangi bir rahatsızlık belirtisi gözlemlenmedi. Deri altı enjeksiyon yapılan sağ caudoabdominal bölgede kızarıklık, şişlik, morarma, akıntı veya yara izi gibi herhangi bir bulguya rastlanmadı. MCF-7 hücre hattı ile ksenograft tümör modeli oluşturulan farelerde yaklaşık 3 hafta içerisinde boyutları en az 200mm³ olmak üzere tümöral şişkinlik geliştirdiği gözlemlendi. Tümöral yapıların; abdominal bölgenin kaudaventral ve lateralinde şekillendiği (Şekil 3.1), yuvarlak ve



Şekil 3. 1 Tümör oluşturulan farelerin makroskobik görüntüsü. (A) (B) Caudaventral bölgenin medialinde yuvarlak şekilli tümöral oluşum.



Şekil 3. 2 Ekspirte edilen tümörlerin makroskobik görüntüsü. (A)Yaklaşık 1,5 x 0,5 cm boyutunda şekilsiz yapıda, ten-boz renkli ekstirpe edilen tümörün makroskobik görüntüsü. TGF-alfa ataçmanlı tedavi grubu. (B) Yaklaşık 1 x 0,5 cm boyutunda sert ve yuvarlak yapıda koyu renkli ekstirpe edilen tümörün makroskobik görüntüsü. TGF-alfa ataçmansız tedavi grubu.

ovoid yapıda (Şekil 3.2) olduğu dikkat çekti. Tedavi gruplarında ise; uygulamayı takiben 2 gün içerisinde TGF-alfa ataçmanlı immunotoksin uygulanan grupta tümör çaplarının küçüldüğü (~0,1cm) belirlendi (Tablo 3.1). Bununla birlikte; yapılan sistemik nekropsi sırasında makroskopik olarak herhangi bir metastatik oluşuma rastlanmadı.

Tablo 3.1 Uygulama metotları ve tümör çaplarının ölçümü.

	Uygulama	Uygulama Öncesi Çap	Uygulama Sonrası Çap
I	APP TGF- 0,3 ml	0,5cm	0,4cm
II	APP TGF- 0,3 ml	0,6cm	0,5cm
III	APP TGF- 0,3 ml	0,4cm	0,5cm
IV	APP- 0,3 ml	0,6cm	0,6cm
V	APP- 0,3 ml	Boy:1,2cm En: 0,3cm	Boy: 1,2cm En: 0,3cm
VI	APP- 0,3 ml	0,5cm	0,4cm
Kont I	-	0,2cm	0,3cm
Kont II	-	0,4cm	0,4cm
Kont III	-	0,3cm	0,3cm
Kont IV	-	0,3cm	0,4cm

3.2. Mikroskopik Bulgular

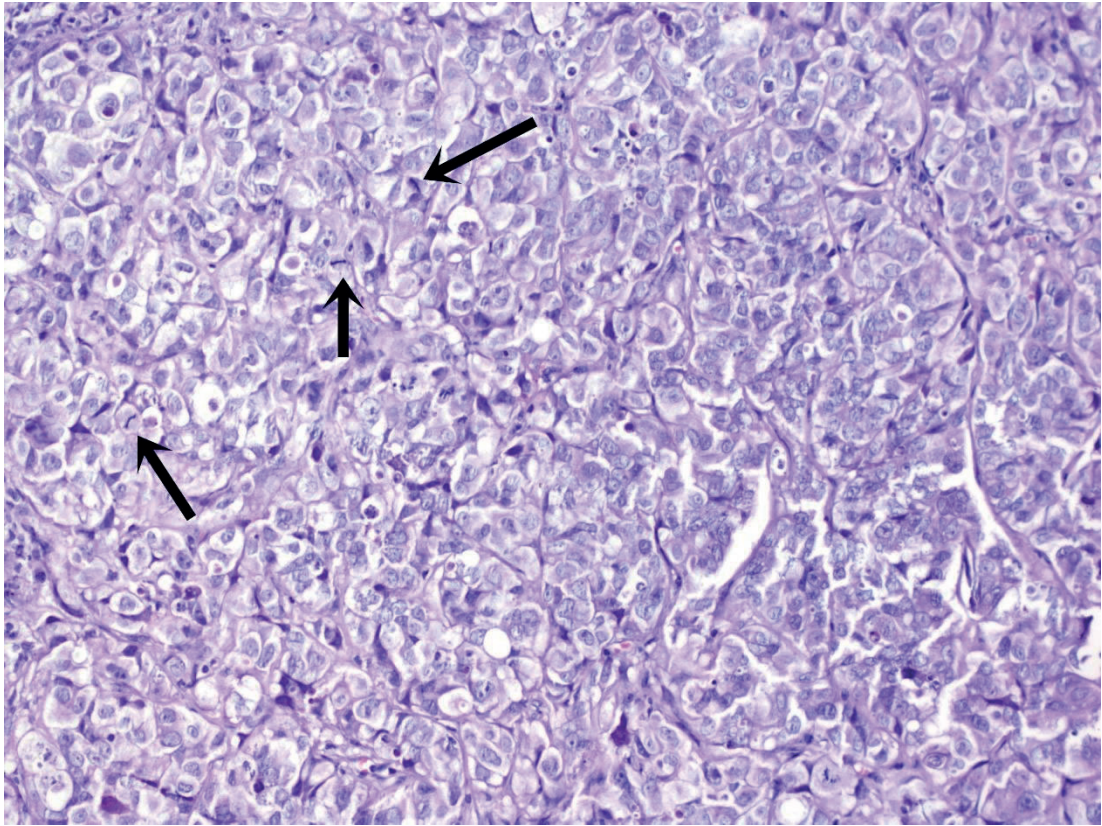
3.2.1. Hematoksilen-Eosin Bulguları

İncelenen doku örneklerinin histopatolojik görüntüleri aşağıda verilmiştir. Buna göre;

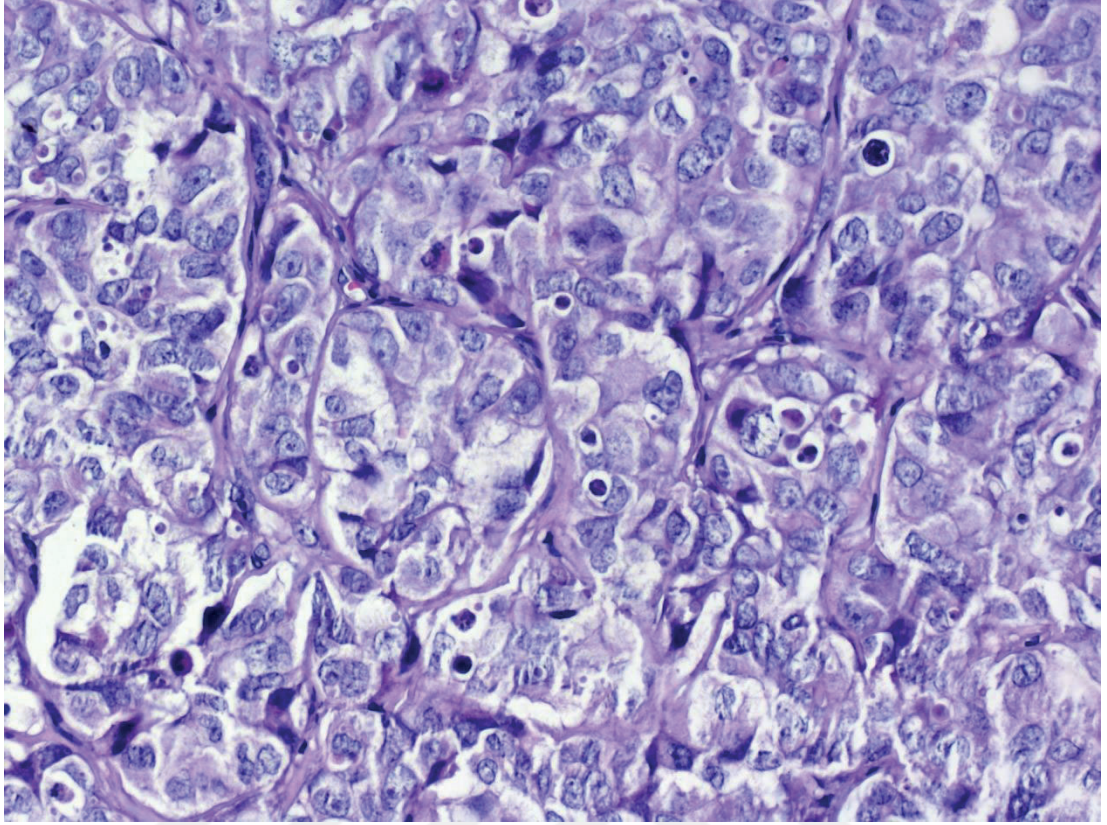
Kontrol grubunda; fare-kökenli stroma üzerine oturmuş pleomorfizm gösteren atipik epitel hücreleri (Şekil 3.4) ve çok sayıda mitotik figür (Şekil 3.3) gözlemlendi. Tedavi uygulanan farelerin tamamında neoplastik epitel hücrelere eşlik eden bakterik kümeleri ve geniş nekroz alanlarına rastlandı (Şekil 3.5, Şekil 3.6, Şekil 3.7, Şekil

3.8). Özellikle; TGF-alfa ataçmanlı immunotoksin uygulanan tedavi grubunda nekroz ve yangısal hücre infiltrasyonu orta şiddette gözlenirken (Şekil 3.7, Şekil 3.8), TGF-alfa ataçmansız tedavi uygulanan farelerde şiddetli ve geniş nekroz odakları ve yoğun yangı hücresi infiltrasyonuna rastlandı (Şekil 3.5, Şekil 3.6). Ayrıca; hem TGF-alfa ataçmanlı hem de TGF-alfa ataçmanı olmayan tedavi gruplarında apoptotik figürelere rastlandı.

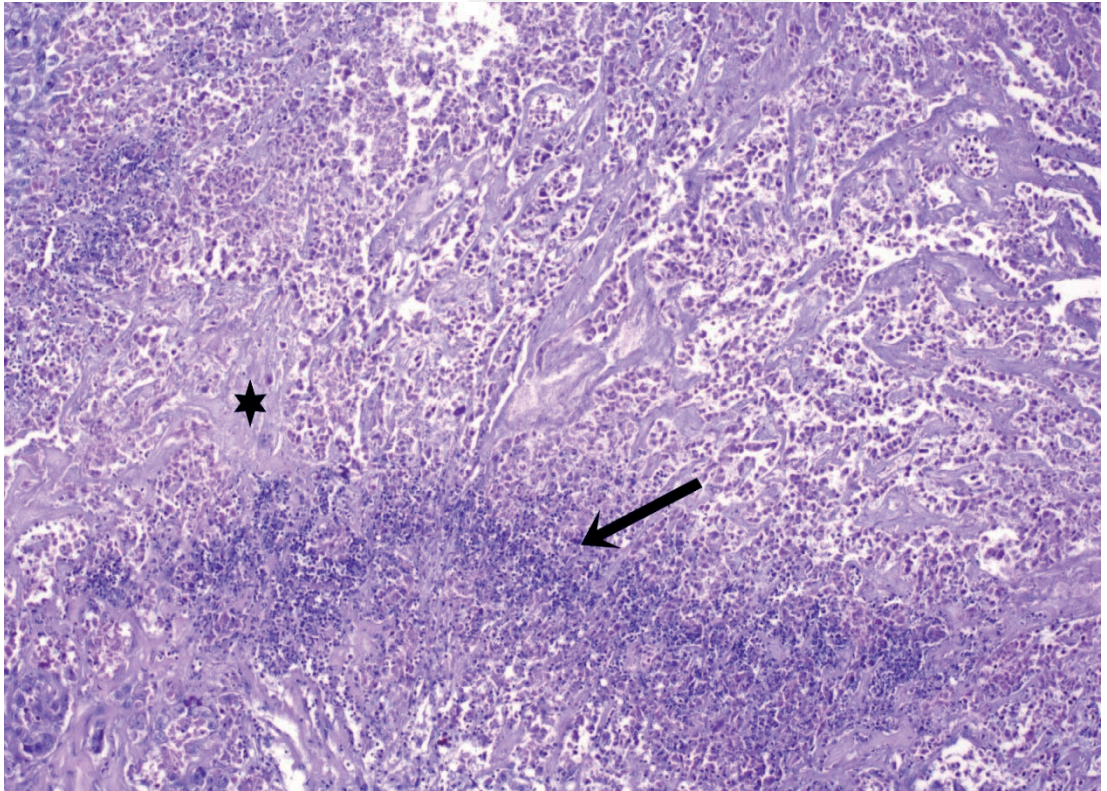
Bu tümöral bulguların yanı sıra gerek kontrol grubunda gerekse tedavi gruplarında toplanan doku örneklerinin histopatolojik incelemesinde hiçbir metastatik bir oluşuma rastlanmadı.



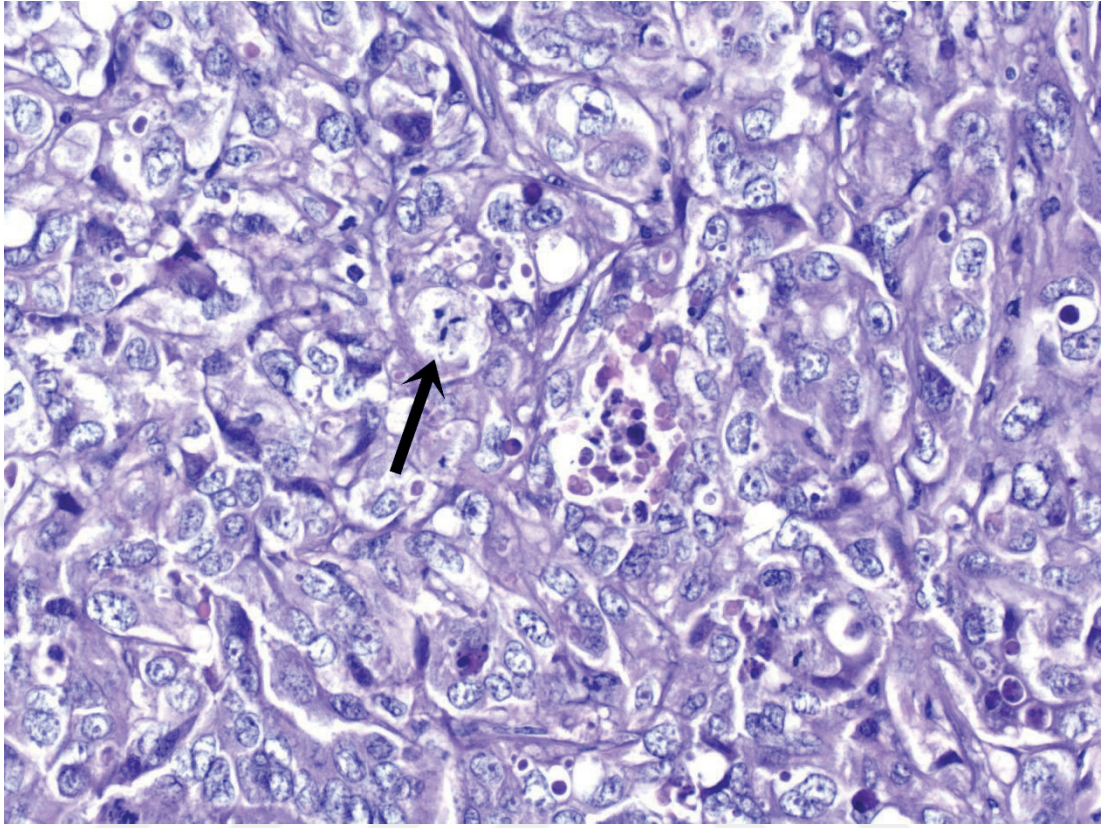
Şekil 3. 3 Kontrol grubu. Tümör dokusunda yüksek mitotik indeks (ok). Büyütme: 200X.
Hematoksilen ve Eozin Boyama.



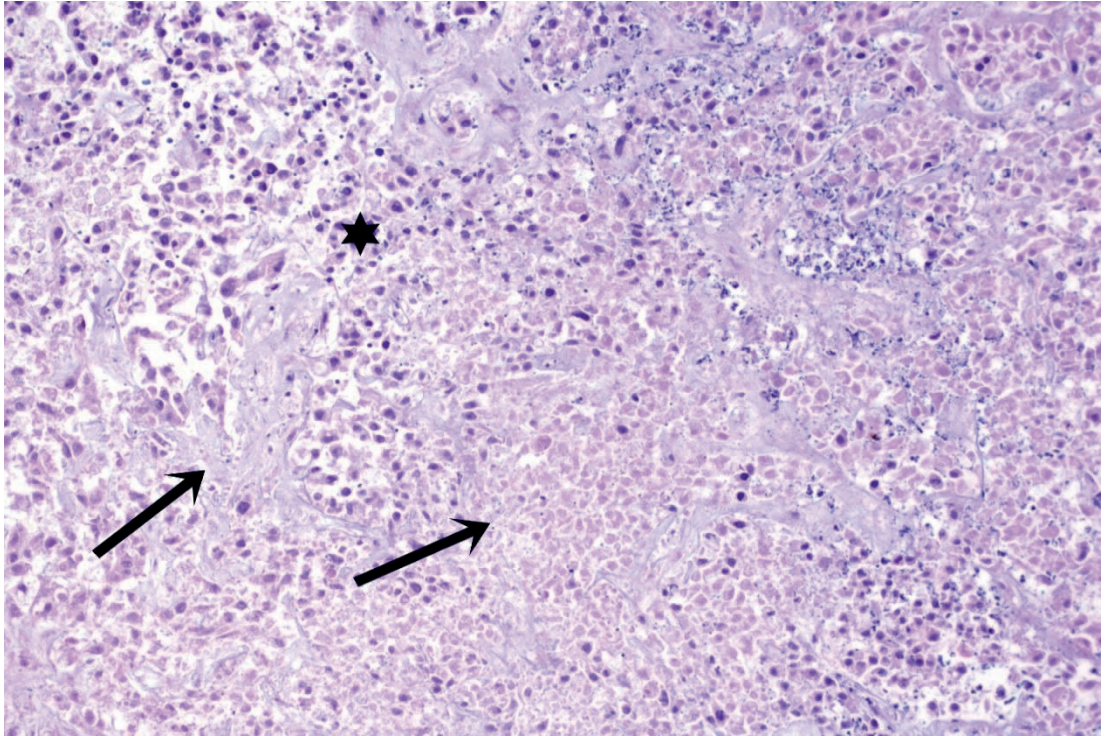
Şekil 3. 4 Kontrol grubu. Stromal doku üzerine oturmuş; anizositozis, anizokaryozis ve yüksek mitotik indek gösteren tümöral hücreler. Büyütme: 400X. Hematoksilen ve Eozin Boyama.



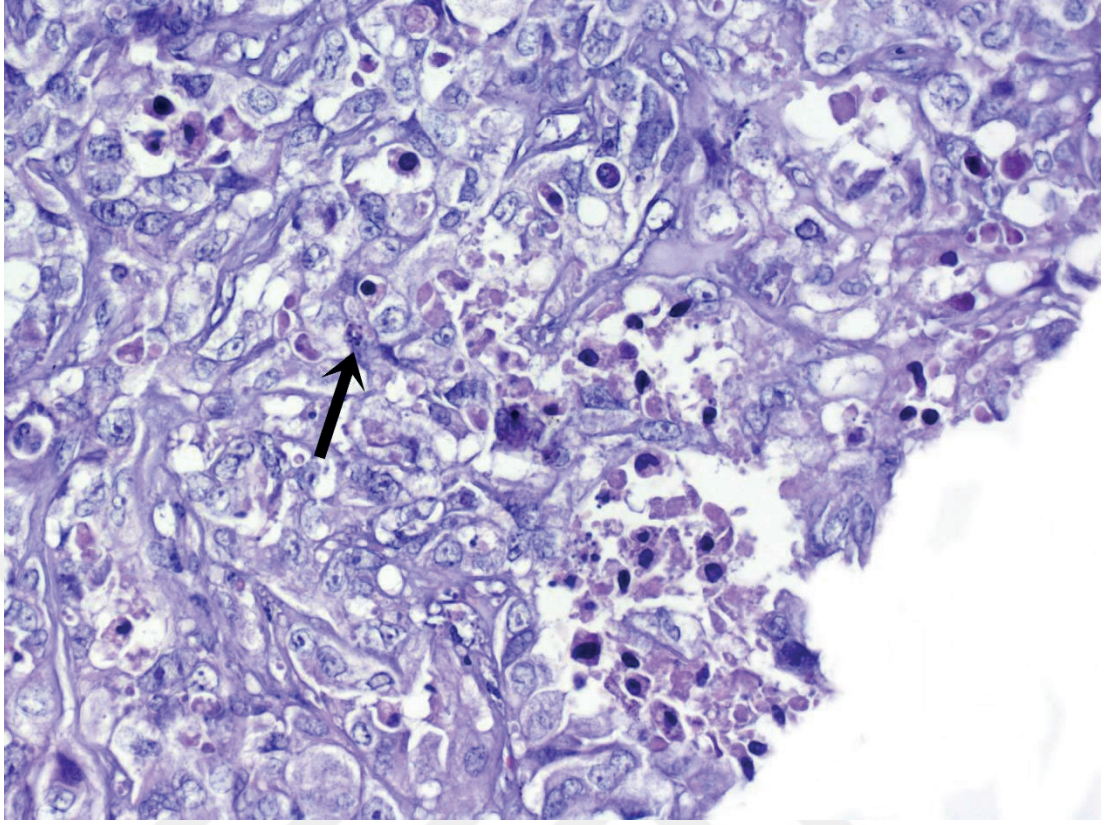
Şekil 3. 5 TGF-alfa (-) tedavi grubu. Tümör dokusunda yoğun nekroz alanları (yıldız), bakteri kümeleri, nötrofil lökosit ve makrofaj infiltrasyonu (ok). Büyütme: 100X. Hematoksilen ve Eozin Boyama.



Şekil 3. 6 TGF-alfa (-) tedavi grubu. Tümör dokusunda apoptotik figür (ok). Büyütme: 400X. Hematoksilen ve Eozin Boyama.



Şekil 3. 7 TGF-alfa (+) tedavi grubu. Tümör dokusunda nekroz alanları (ok) ve yangı hücresi infiltrasyonu (asteriks). Büyütme: 200X. Hematoksilen ve Eozin Boyama.

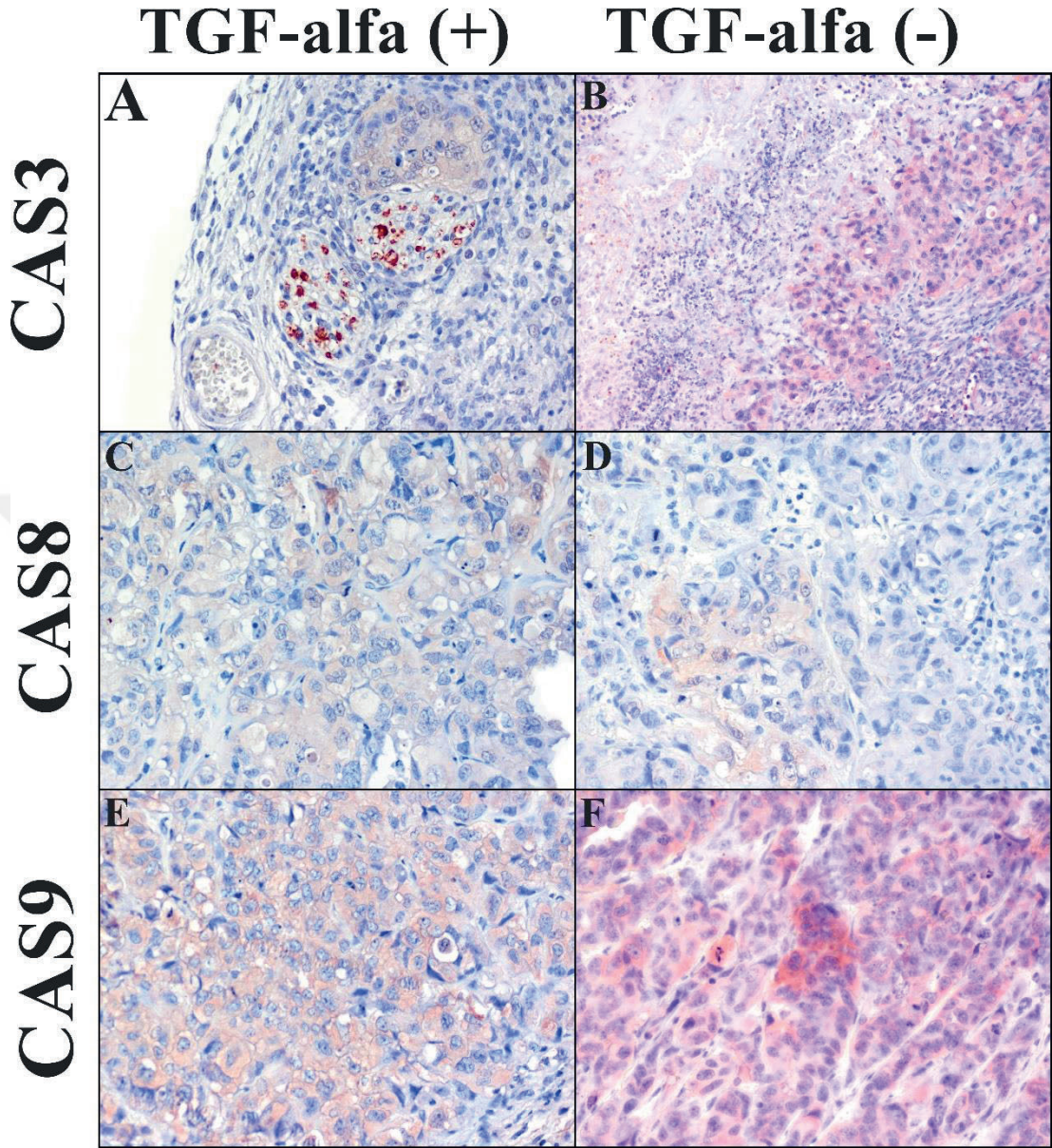


Şekil 3. 8 TGF-alfa (+) tedavi grubu. Tümör dokusunda apoptotik figür (ok). Büyütme:200X.
Hematoksilen ve Eozin Boyama.

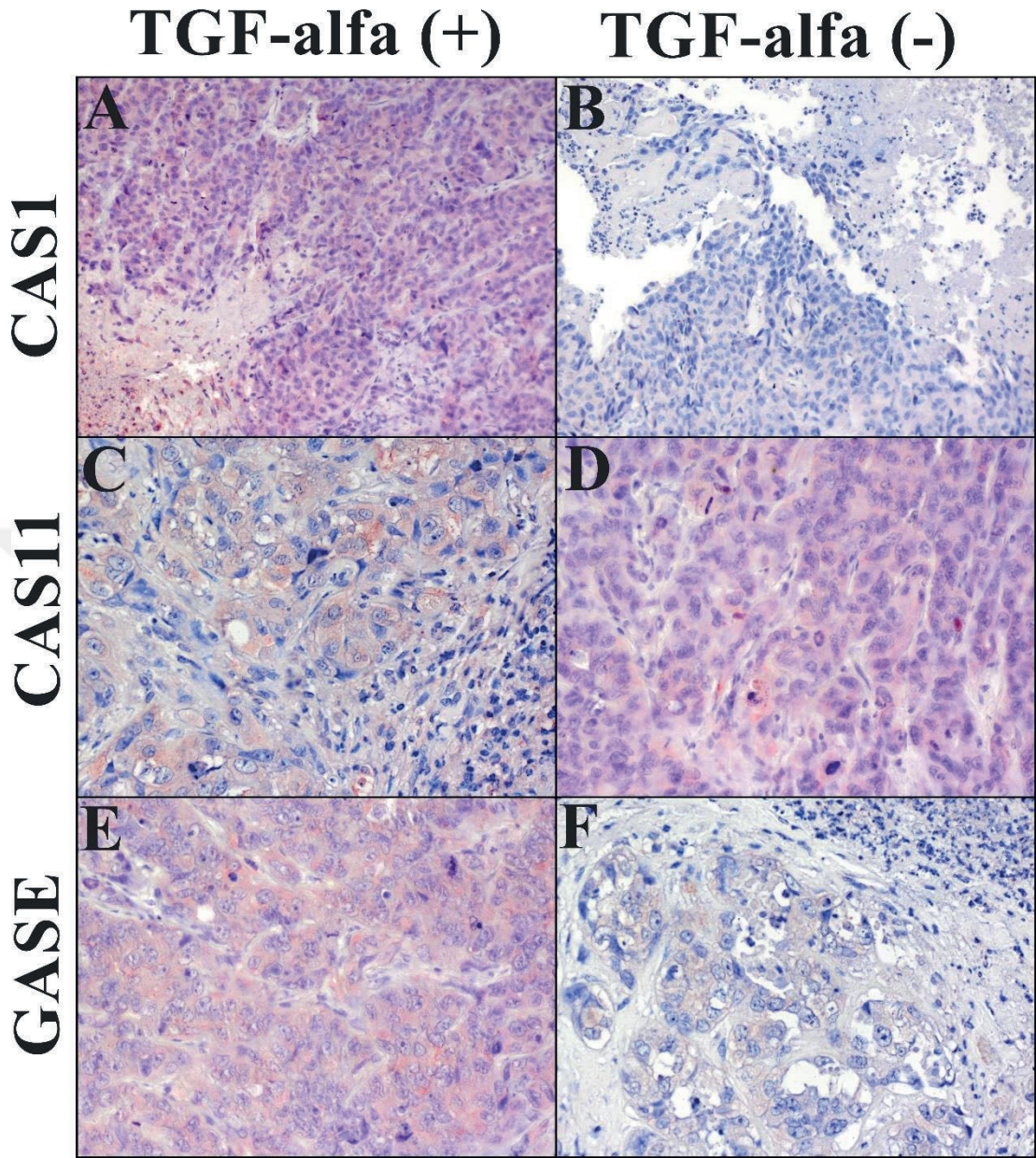
3.2.2. İmmunohistokimyasal Bulgular

İmmunohistokimyasal boyamada kontrol grubuna ait hiçbir tümör dokusunda immunopozitiflik saptanmadı (Tablo 3.2). Kaspaz-3, hem TGF-alfa ataçmanlı hem de TGF-alfa ataçmansız gruplarda yüksek immunopozitiflik gösterdi (Şekil 3.9A-B). Apoptozun bir belirteci olan Kaspaz 8, TGF-alfa (-) grubunda çok düşük immünoreaktivite gösterdi (Şekil 3.9D); benzer şekilde TGF-alfa (+) grubunda hafif ila orta derecede immünopozitiflik kaydedildi (Şekil 3.9 C). Bir diğer apoptoz yolu göstergesi olan Kaspaz 9, TGF-alfa (-) grubunda (Şekil 3.9F) orta ila şiddetli immunopozitiflik ve TGF-alfa (+) grubunda (Şekil 3.9E) orta derecede immunopozitiflik gösterdi.

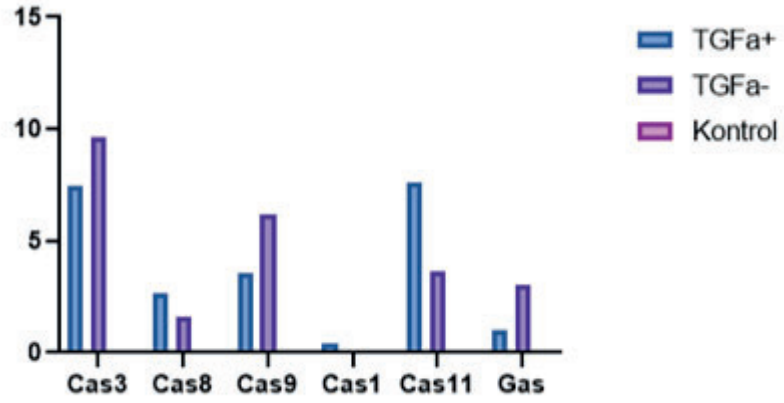
Bu bulgulara ek olarak TGF-alfa (+) grubunda piroptoz belirteçleri olan Kaspaz-1 çok hafif, GasderminE ise düşük immunopozitiflik (Şekil 3.10A-D) gösterirken, TGF-alfa (-) grubunda ise çok hafif immunopozitiflik gösterdi (Şekil 3.10B, F). Kaspaz 11, her iki tedavi grubunda da benzer orta ila şiddetli immünoreaktivite gösterdi (Şekil 3.10C-D). İmmunohistokimyasal bulguların alan analizi ImageJ programı kullanılarak yapıldı.



Şekil 3. 9 Ksenograft modelinde ani-kanser tedavi gruplarına göre piroptoz ve apoptoz yollarını gösteren immunoperoksidaz bulgular. (A) TGF-alfa (+) tedavi grubu. Yüksek kaspaz-3 immunoreaktivitesi. AEC kromojen. Zıt boyama hematoksilen. Büyütme: 400X (B) TGF-alfa (-) tedavi grubu. Yüksek kaspaz-3 immunoreaktivitesi. AEC kromojen. Zıt boyama hematoksilen. Büyütme: 400X. (C) TGF-alfa (+) tedavi grubu. Hafif-orta kaspaz-8 immunoreaktivitesi. AEC kromojen. Zıt boyama hematoksilen. Büyütme: 400X. (D) TGF-alfa (-) tedavi grubu. Hafif kaspaz-8 immunoreaktivitesi. AEC kromojen. Zıt boyama hematoksilen. Büyütme: 400X. (E) TGF-alfa (+) tedavi grubu. Orta kaspaz-9 immunoreaktivitesi. AEC kromojen. Zıt boyama hematoksilen. Büyütme: 400X. (F) TGF-alfa (-) tedavi grubu. Orta kaspaz-9 immunoreaktivitesi. AEC kromojen. Zıt boyama hematoksilen. Büyütme:400X.



Şekil 3. 10 (A) TGF-alfa (+) tedavi grubu. Orta kaspaz-1 immunoreaktivitesi. AEC kromojen. Zıt boyama hematoksilen. Büyütme: 200X. (B) TGF-alfa (-) tedavi grubu. Hafif kaspaz-1 immunoreaktivitesi. AEC kromojen. Zıt boyama hematoksilen. Büyütme: 200X. (C) TGF-alfa (+) tedavi grubu. Orta kaspaz-11 immunoreaktivitesi. AEC kromojen. Zıt boyama hematoksilen. Büyütme:400X. (D) TGF-alfa (-) tedavi grubu. Orta kaspaz-11 immunoreaktivitesi. AEC kromojen. Zıt boyama hematoksilen. Büyütme:400X. (E) TGF-alfa (+) tedavi grubu. Orta GasE immunoreaktivitesi. AEC kromojen. Zıt boyama hematoksilen. Büyütme:400X. (F) TGF-alfa (-) tedavi grubu. GasE immunoreaktivitesi. AEC kromojen. Zıt boyama hematoksilen. Büyütme:400X.



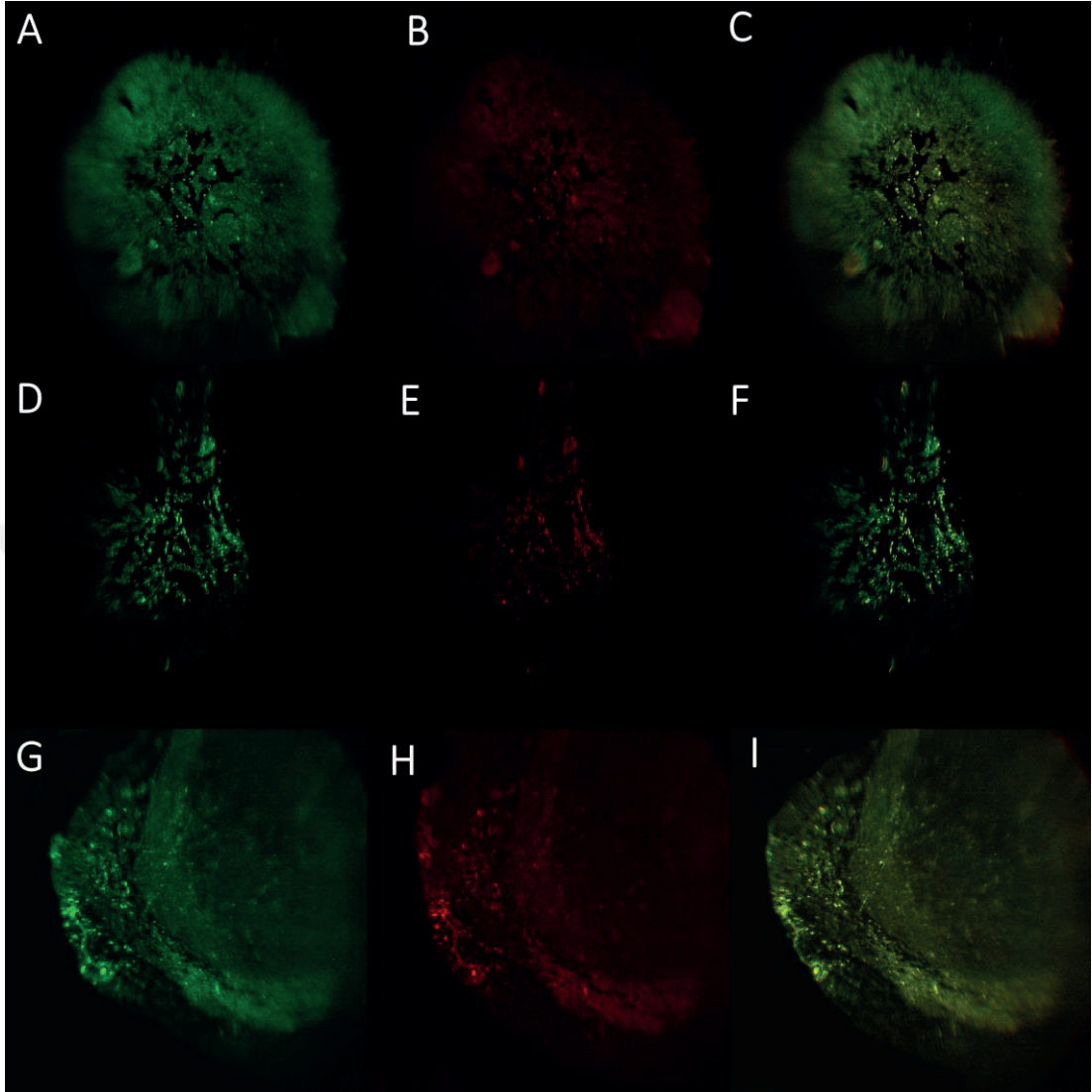
Şekil 3. 11 İmmunohistokimyasal bulguların istatistiksel analizi (Graphpad Prism 9.5.1).

Tablo 3.2 ANOVA istatistik tablosu.

ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Treatment (between columns)	61,27	2	30,64	F (1.786, 8.9) = 11,33	P=0,001
Residual (within columns)	46,54	10	4,654		
Total	169,2	17			

3.2.3. İmmunofloresan Bulgular

İmmunofloresan boyamada TGF-alfa (+) tedavi grubunda pirotozun Kaspaz-3 ile aktive edilen yolağının analizi için; Kaspaz-3 ve GSDME ile pirotozun klasik olmayan yolağının analizi için; Kaspaz-11 ve GSDME antikorlarının (Şekil 3. 12 A, B, C) çakışmaları gösterildi. TGF-alfa (-) tedavi grubunda ise apoptozun dışsal yolak tayini için; Kaspaz-3 ve Kaspaz-8 antikorlarının çakışmaları (Şekil 3.12 D) gösterildi.



Şekil 3. 12 Ksenograft modelinde ani-kanser tedavi gruplarına göre piroptoz ve apoptoz yollarının çakışmalarını gösteren immunofloresan bulgular. (A) TGF-alfa (+) tedavi grubunda GSDME (FITC) immunreaktivitesi. Büyütme: 100X (B) TGF-alfa (+) tedavi grubunda Kaspaz-11 (Texas Red) immunreaktivitesi. Büyütme: 100X (C) TGF-alfa (+) tedavi grubunda GSDME Kaspaz-11 immunreaktivitesinin çakışması (Sarı noktalar). Büyütme: 100X (D) TGF-alfa (+) tedavi grubunda GSDME (FITC) immunreaktivitesi. Büyütme: 100X (E) TGF-alfa (+) tedavi grubunda Kaspaz-3 (Texas Red) immunreaktivitesi. Büyütme: 100X (F) TGF-alfa (+) tedavi grubunda Kaspaz-3, GSDME immunreaktivitesinin çakışma görüntüsü (Sarı noktalar). Büyütme: 100X (G) TGF-alfa (-) tedavi grubunda Kaspaz-8 (FITC) immunreaktivitesi. Büyütme: 100X (H) TGF-alfa (-) tedavi grubunda Kaspaz-3 (Texas Red) immunreaktivitesi. Büyütme: 100X. (I) TGF-alfa (-) tedavi grubunda Kaspaz-3, GSDME immunreaktivitesinin çakışma görüntüsü (Sarı noktalar). Büyütme: 100X

3.3 TARTIŞMA

Güvenli bir bakteri aracılı kanser terapisi, kanser sitotoksitesisi veya immunojenisite, sağlam hücrelere yönelik toksisiteyi azaltma, kanser seçiciliği ve ayrıca insan vücudu koşullarında stabilite gibi özelliklerine sahip olmalıdır (Ebrahimzadeh ve vd., 2021). Genetik mühendisliği; bu bakterilerin genetiğini değiştirerek patojenitelerinin azaltılmasına ve kanser tedavisinde kullanılabilir hale getirilmesine yol açmıştır (Mayakrishnan ve vd., 2022). Ayrıca zayıflatılmış bakteriler metabolik olarak aktif ve tümör dokularında spesifik aktiviteler gerçekleştirebilmektedir, bu da onları kimyasal ve biyolojik ilaçlardan farklı kılmaktadır (Zheng ve Min, 2016). Şu anda kansere karşı potansiyel olarak olumlu terapötik etkilerle ilişkilendirilen canlı bakteriler arasında, bir dizi araştırmacı tarafından tümör hedefli özellikleri nedeniyle incelenen *Salmonella* bulunmaktadır (Forbes, 2010, Hoffman, 2015).

Aynı zamanda; toksin, peptitler, bakteriyosinler, sporlar ve enzimler gibi farklı bakteriyel ürünler, kanser tedavisinde umut verici ajanlar olarak dikkat çekmektedir (Yaghoubi ve vd., 2019). *Pseudomonas* ekzotoksin A (PE), gram negatif bir bakteri olan fırsatçı patojen *Pseudomonas aeruginosa'nın* en toksik virülans faktörüdür ve PE'nin apoptozu indükleyebildiği bilinmektedir (Michalska ve Wolf, 2015, Wolf ve Elsässer-Beile, 2009, Keppler-Hafkemeyer ve vd., 1998) ve kanser tedavilerine yönelik araştırmalar için umut verici bir adaydır. Ancak tümör hücrelerinin apoptoza karşı direnç göstermesi, kanser tedavisindeki zorlukları arttırmaktadır. Bu durum, geleneksel tedavi yöntemlerinin sıklıkla yetersiz kalmasına ve tümörlerin direnç geliştirmesine yol açmaktadır. Apoptoza karşı oluşan bu direnç sebebiyle; piroptozu indüklemeyi amaçlayan yeni stratejilerin geliştirilmesi, daha etkili kanser tedavisi seçenekleri sağlayabilir (Dasgupta ve vd., 2016, Huang ve vd., 2018). Piroptoz; apoptozun aksine, enflamasyon ve immun yanıtı arttırdığından kanser hücrelerine karşı, daha etkili tedavi seçenekleri sunabileceği düşünülmektedir. Örneğin Go ve arkadaşlarının 2020 yılında yaptığı bir çalışmada; hepatoselüler karsinom (HCC) hücrelerinde, NLRP3 enflamatuvar aktivasyonu yoluyla piroptoz indüksiyonunun, bir fare ksenograft modelinde in vitro metastatik oluşumları baskıladığı ve in vivo tümör büyümesini önemli ölçüde engellediği bulunmuştur. Bu nedenle, piroptozu indüklemeyi amaçlayan stratejiler, tümör hücrelerinin direncini aşma potansiyeline sahiptir.

Safari ve arkadaşlarının 2014 yılında yaptığı bir çalışmada; birçok kanser türünde yüksek düzeylerde ifade edilen VEGF (vasküler endotelyal büyüme faktörü) reseptörüne özgü anti-VEGFR2/PE38 immünotoksininin, HUVEC ve MCF-7 hücre hatları üzerindeki anti-tümöral etkinliği kanıtlanmış ve bu etkinin büyük ölçüde apoptoz yoluyla gerçekleştiği gösterilmiştir. 2004 yılında Thomas ve arkadaşları yine tümör hücreleri tarafından yüksek düzeyde eksprese edilen EGFR (epidermal büyüme faktörü reseptörü) reseptörünü hedefleyen TGFa-PE38 immünotoksini ile HNSCC (baş ve boyun skuamöz hücreli karsinom) ksenograft tümör modelinde; sistemik toksisite gözlenmeden, anti-tümöral etkinliğin apoptoz üzerinden yürüdüğünü göstermişlerdir. Ancak bu çalışmalarda kullanılan apoptoz tayin yöntemleri çoğunlukla piroptoz ile karıştırılabilecek metodlar içermektedir. Piroptotik hücre ölümü mekanizması plazma zarını yırttığından, fosfatidilserinin Annexin V boyaması apoptoz, piroptoz veya nekroptoz arasında ayırım yapamaz (Gong ve ark. 2017, Zargarian ve ark. 2017, Wang ve ark. 2013). Apoptoza benzer şekilde piroptotik hücreler çekirdek yoğunlaşması ve DNA parçalanmasına maruz kalmaktadır (Albert, 2004). Apoptotik hücre ölümünde olduğu gibi, piroptozun DNA hasarına neden olması, terminal deoksiniükleotidil transferaz dUTP nick-end etiketleme (TUNEL) testini pozitif hale getirir (Brennan ve Cookson, 2000, Fink ve Cookson, 2006). Bu nedenle, DNA bozulması hücre ölümünde önemli bir olay iken, bunun ölü hücrelerde saptanması, ölümün altında yatan mekanizmayı spesifik olarak gösteremez (Fink ve Cookson, 2005). Bununla birlikte, apoptozun aksine, piroptoz ayrıca hücre şişmesi, proinflatuar hücre içi içeriğin salınması ve hücre zarında gözenek oluşumu ile de ilişkilidir, böylece piroptoz, propidium iyodür (PI) boyaması içinde pozitif hale gelir (Brennan ve Cookson, 2000, Fink ve Cookson, 2006). Bu bağlamda, hücre ölümüne eşlik eden belirli morfolojik ve biyokimyasal değişikliklerin benzerliği nedeniyle, apoptoz ile piroptozun karıştırılabilir olduğu öngörülmektedir. Bu nedenle; piroptoz ve diğer programlı hücre ölüm yollarının keşfi ve mekanizmalarının açığa çıkartılmasından önce gerçekleştirilen çalışmaların çoğunda, apoptoz ile ilişkilendirilen hücre ölümlerinin diğer PCD türlerine ait olabileceği düşünülebilir.

2017 yılında, epidermal büyüme faktörü reseptörüne (EGFR) bağlanan ve PE38 adlı güçlü sitotoksik bir protein içeren immünotoksini (TGFa-PE38) ifade eden

Salmonella Typhimurium ile fare kolon ve meme kanseri hücrelerinde kanser büyümesinin baskılandığı gösterilmiştir (Lim ve vd., 2017). Pseudomonas ekzotoksin A'nın (PE) kesik bir versiyonu olan PE38; immünotoksinlerin gelişimi için en yaygın olarak uygulanan toksinlerden biridir (Kreitman ve vd., 1992, Weldon ve Pastan, 2011). Bu çalışma ise, TGF-alfa ataçmanı olan ve olmayan, PE38 toksini içeren avirulent *Salmonella Typhimurium*'un kullanıldığı iki farklı tedavi grubunu içermektedir. Yapılan bu çalışmada, biyoteknolojik yöntemler kullanılarak oluşturulan bir transgenik suşun, Atimik çıplak farelerde oluşturulan ve EGFR eksprese eden MCF-7 hücre hattı ksenograft tümör modeli üzerindeki anti-tümör etkileri araştırılmıştır. Çalışmada aynı zamanda türün anti-tümör aktivitesiyle ilişkili hücre ölümü yolları da araştırılmıştır. Makroskobik olarak, tedavi edilmeyen farelerin tümör boyutu artarken, TGF-alfa ataçmanı olmayan tedavi grubunda sabit kalmış, TGF-alfa ataçmanlı olan grupta ise azaldığı gözlenmiştir. Histopatoloji bulguları da bu sonuçlar ile uyumludur. Kontrol grubunda mitotik indeksi yüksek pleomorfik tümör hücrelerinden oluşan tümöral yapılar gözlenmiştir. Bununla birlikte her iki tedavi grubunda da nekrotik alanlar ile apoptotik figürler görülmüştür. İmmünotoksin tedavisi, tümör hücrelerinin ölümünü indükleyerek tümör büyümesini etkili bir şekilde durdurmuş ve hatta TGF-alfa ile tedavi edilen grupta tümörün küçülmesine neden olmuştur. Bu bulgular, modern kanser tedavisinde hücrenel hedefleme yaklaşımının doğruluğunu göstermektedir.

Salmonella Typhimurium'un sitotoksik etkisinin, tümör hücrelerinde nekrozu veya apoptozu indüklediği gösterilmiştir (Chen ve vd., 2022). Piroptozun da hücrenel ölüme katkıda bulunabileceği ve bu katkının *Salmonella* tarafından tetiklenebileceği öne sürülmektedir ancak bu doğrulanmamıştır (Badie, 2021). Bu çalışmanın hem histopatolojik hem de immunohistokimyasal sonuçları, PE38 içeren transgenik *Salmonella Typhimurium*'un apoptozu, piroptozu ve nekrozu uyararak anti-tümöral etkileri indüklediğini göstermektedir. Apoptozun yolaklarında önemli bir proteaz olan Kaspaz-3, hem TGF-alfa (-) hem de TGF-alfa (+) tedavi gruplarında immunohistokimyasal analizde önemli immunoreaktivite sergilemiştir ($p < 0,0193$). Transgenik *Salmonella* immünotoksininin, meme tümörü hücrelerinde apoptotik hücre ölümünü indükleyerek antikanser etkinliğini arttırdığı görülmektedir. Ancak dışsal apoptoz yolağı olan anti-Kaspaz-8 ekspresyonunun her iki grupta da çok hafif

olduğu bulunmuştur ($p<0,0193$). Kaspaz-8 aracılı apoptozun indüklenmesinin genellikle hücre yüzey reseptörlerinin aktive olmasıyla başladığı göz önüne alındığında, bu durum; her iki tedavi grubunda *Salmonella* aracılı apoptotik hücre ölümünün minimum düzeyde yüzey reseptörleri ile tetiklendiğini göstermektedir. Aynı zamanda içsel apoptoz yolağının bir belirteci olan Kaspaz-9, TGF-alfa (+) grupta orta derecede immunopozitiflik ve TGF-alfa (-) grupta yüksek immunopozitiflik göstermiştir ($p<0,0193$). Bu durum; TGF-alfa (-) tedavi grubunda yüksek düzeyde doğal apoptotik sürecin işlemiş olabileceği, bu nedenle; TGF-alfa (+) tedavi grubunda gerçekleşen Kaspaz-9 aracılı ölümün TGF-alfa ataçmanından bağımsız gerçekleştiğini düşündürmektedir.

Kaspaz-3'ün her iki tedavi grubunda da yüksek immunopozitiflik vermesi karşın Kaspaz-8 ve -9'un Kaspaz-3'e göre düşük şiddetli boyanması apoptoz harici bir programlı hücre ölümü varlığına işaret edebileceğini göstermektedir ($p<0,0193$). Kaspaz-3'ün rol aldığı bilinen hücre ölüm şekilleri arasında apoptoz ve piroptoz yer almaktadır. Kaspaz-3'ün piroptoz üzerinde rol almış olması kuvvetle muhtemeldir. Yapılan immunofloresan testindeki ikili (Kaspaz-3/GSDME) boyamada bu antikörlerin varlığı aynı anda gösterilmiştir. Mevcut araştırmalar Kaspaz-3'ün GasderminE (GSDME) mevcut olduğunda piroptozu tetiklediğini ve GSDME ekspresyonu yetersiz olduğunda apoptoza yöneldiği gösterilmiştir (Wang ve vd., 2017; Jiang ve vd., 2020). Bu çalışmada Gasdermin E'nin ekspresyonunu her iki grupta da yüksek oranda eksprese edilen Kaspaz-3 ile ilişkisini değerlendirildi. İlginç bir şekilde, TGF-alfa (+) grupta hafif derecede olan anti-Gasdermin E ekspresyonunun, TGF-alfa (-) grupta orta derecede immunopozitiflik gösterdiği bulunmuştur ($p<0,0193$). Hücre ölümü araştırmaları alanında Kaspaz-3/GSDME sinyal yolu, apoptoz ve piroptozdan ayrı, PCD' nin farklı bir formunu temsil eden nispeten yeni bir keşiftir (Bhat ve vd., 2023).

Bu yol, GSDME' yi parçalayan Kaspaz-3' ün aktivasyonu ile başlatılır (Li ve vd., 2022, Wang ve vd., 2023). Ancak; sunulan bu çalışmada GSDME'nin Kaspaz-3'e göre düşük yoğunlukta olması ($p<0,0193$) tümör hücrelerinde GSDME harici diğer GSDM protein ailesine ait üyelerin varlığı olduğu düşünülebilir. Kaspaz-3'ün piroptozda rol aldığını doğrulamak için; ortamdaki diğer GSDM üyelerinin daha detaylı incelenmesi gerekmektedir.

İmmünohistokimyasal analizlere dayanarak, daha önce Kaspaz-3 ekspresyonu yoluyla değerlendirilen apoptotik hücre ölümünün aslında piroptozun neden olduğu hücre ölümü veya apoptoz ve piroptozun etkileşimi olabileceği ortaya çıkmaktadır. İkili immunofloresan boyamalarında GSDME proteininin hem Kaspaz-3 ile hem de Kaspaz-11 ile yol aldığı gösterilmiştir.

Piroptozun öteki yollarına odaklanıldığında, Kaspaz-11'in yer aldığı klasik olmayan yolda, Kaspaz-11' in gram negatif bakterilerin uyarımı sonucu hücre ölümünü başlatmaktadır (Viganò ve vd., 2015, Shi ve vd., 2014). Her iki tedavi grubunda da Kaspaz-11' in yüksek immunopozitifliği, piroptozun transgenik *Salmonella* tarafından indüklenebileceğini düşündürmektedir. GasderminE' nin bu yoldaki immunopozitifliği TGF-alfa (-) tedavi grubunda TGF-alfa (+) tedavi grubuna göre daha yüksek olmasına rağmen Kaspaz-11'e göre daha düşük düzeydedir ($p < 0,0193$). TGF-alfa (+) tedavi grubunda immunohistokimyasal ve immunofloresan bulgular karşılaştırıldığında Kaspaz-11 immunopozitifliği her zaman GSDME immunopozitifliği ile eşleşmemektedir. Bu, Gasdermin protein ailesinin diğer üyelerinin de yolda rol oynayabileceğini ve piroptozun zaten litik enflamatuar tepkiye aracılık etmiş olabileceğini düşündürmektedir. Bu yolların daha kapsamlı araştırılmasıyla açıklığa kavuşturulabilir.

Kaspaz-11 aracılı yolda NLRP3 inflamozomunda yer alan Kaspaz-1 inaktif formdadır. Buda piroptozun Kaspaz-11 üzerinden ilerlediğini düşünürsek, Kaspaz-1'in düşük şiddetli boyanmasını açıklamaktadır. Her iki grupta da Kaspaz-1'in Kaspaz-11'e kıyasla daha düşük immunopozitifliği, piroptoz yollarının bu kaspazdan daha az etkilendiğini göstermektedir. Bu, transgenik *Salmonella* ile immünotoksin arasındaki etkileşim mekanizmalarının spesifik kaspazları hedef aldığını veya bu kaspazlar arasındaki aktivasyon modelinin farklı olduğunu gösterebilir.

2017'de Rogers ve ekibi, aktif Kaspaz-3'ün GSDME'yi parçalayarak N-terminal fragmanı (GSDME-NT) oluşturabildiğini keşfetmiştir. Ancak bu işlemin, apoptozu başarıyla tamamlayan hücrelerin ortamdan temizlenmemesi durumunda hücre piroptozunu tetiklemek amacıyla gerçekleştiği belirlenmiştir. Apoptotik hücrelerin ortamdan uzaklaştırılmaması, hücre piroptozuna, yani litik ve enflamatuar bir aşamaya doğru ilerlemesine neden olmaktadır. TGF-alfa (-) tedavi grubunda elde

ettiğimiz nispeten yüksek anti-GSDME immunopozitifliği; hücre ölüm mekanizmalarında, apoptoz ve piroptozun ortak görev almış olabileceğini gösterebilir. Piroptoz; içsel veya dışsal yolak farketmeksizin apoptoza eşlik edebilir (Nagarajan ve vd., 2019). TGF-alfa (+) grupta Kaspaz-9 ve GSDME' nin orta şiddetli boyanması piroptotik reaksiyonların kısmen içsel apoptoz yolağına eşlik ettiğini düşünülebilir. Literatürle uyumlu olarak, apoptotik hücrelerin ortamdaki temizlenmemesi durumunda piroptozun indüklenmiş olabileceği, ancak anti-tümöral etki mekanizmasında bu ikili hücre ölüm yolağının aktif bir rol almadığı görülmektedir.

Kanserler düzensiz hücre ölümü ve enflamatuar yanıtlarla karakterize edildiğinden, mevcut tedavi stratejilerinin çoğu, malign olmayan hücrelere zarar vermeden kanser hücrelerinde hücre ölümünü seçici olarak indüklemeyi amaçlamaktadır (Chen ve vd., 2021). Toksinler ve bunların rekombinant türevleri, güçlü antikanser özelliklere sahiptir ve tümör hücrelerini spesifik ve seçici bir şekilde hedefleyebilir (Weerakkody ve Witharana, 2019). *Pseudomonas aeruginosa* tarafından salgılanan Ekzotoksin A (PE38), mRNA translasyonunu etkileyerek kanser hücrelerine karşı sitotoksiteyi teşvik eder (Wu ve vd., 2021). Bununla birlikte klinik deneyler, bir immunotoksinin güçlü antitümör aktivitesinin fareden insana her zaman kolayca aktarılamayacağını göstermektedir (Wolf ve Elsässer-Beile, 2009). PE' den türetilen immunotoksinlerin klinik çalışmalarda terapötik etkinliği, PE' nin immunojenisitesi, hedef dışı sistemik toksisite ve tedaviye direnç gelişimi açısından istenmeyen özellikleri nedeniyle sınırlı olmaktadır (Dieffenbach ve Pastan, 2020, Cai ve vd., 2021). Çalışmada tedavi gruplarında gerçekleşen nekroz oluşumunun PE38 toksini ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Nekrozun; TGF-alfa (+) tedavi grubunda TGF-alfa (-) tedavi grubuna göre kısmen daha az olmasına karşın, her iki tedavi grubunda da geniş nekroz alanları görülmüştür. Her iki tedavi grubunda yer alan PE38 toksininin tümör hücrelerinde yüksek sitotoksite göstererek nekroza neden olduğu düşünülmektedir. Her ne kadar immunotoksinlerin daha yeni versiyonları geliştirilmiş, güvenle oluşturulmuş ve çeşitli kanserlerin tedavisinde etkili olduğu gösterilse de etkili terapötik sonuçlara ulaşmak için uygulanan doz, esas olarak immunotoksinle ilişkili yan etkilerden dolayı sınırlıdır (Mei ve vd., 2019). İntrinsik hücre bağlama alanı olmayan PE38, rekombinant toksin içindeki TGF-alfa kısmı

yoluyla EGFR eksprese eden kanser hücrelerine bağlanır. TGFa-PE38 füzyon proteininin, in vitro ve ksenograft fare modellerinde EGFR eksprese eden tümör hücrelerine karşı sitotoksik olduğu gösterilmiştir (Siegall, FitzGerald ve Pastan, 1990, Wright ve vd., 2014). Ancak; yüksek seviyelerde TGFa-PE38' in sistemik olarak uygulandığında doz sınırlayıcı hepatotoksisite göstermesi gibi bazı sınırlamalar vardır (Wright ve vd., 2014). İlacın direkt intra-tümöral olarak uygulamasının, intrakraniyal glioblastoma dahil olmak üzere katı tümörlerin tedavisi için TGFa-PE38'in başarılı bir şekilde uygulanmasını sağlayabileceği öne sürülmüştür (Lim ve vd., 2017). Düşük immunojenite, hedef dışı toksisite ve ilaç direnci, gelecekte daha etkili PE38 bazlı immunotoksinlerin geliştirilmesini gerektirmektedir (Dieffenbach ve Pastan, 2020). Geliştirilen bakteriyel toksinlerin; geleneksel tedaviler ile kombinasyon halinde kullanılması ve tümör hedefli stratejiler geliştirilerek daha güvenli bir şekilde tedavi metotları oluşturulması sağlanabilir. Bununla birlikte, tasarlanmış bakteriler tümörleri hedeflemek için yüksek terapötik potansiyel kazanmış olsa da kanserlerin moleküler ve histolojik düzeylerdeki yüksek heterojenliği nedeniyle, tek bir anti-kanser ajanı tek başına tedavi sağlayamayabilir. Bu nedenle umut verici bir anti-kanser tedavisi geliştirmek için kombinatoriyal bir yaklaşım gerekebilir (Gupta ve vd., 2021).

Bu çalışmada, TGF-alfa ataçmanlı ve ataçmazsız, PE38 toksini içeren avirüalent *Salmonella Typhimurium*'un MCF-7 hücre hattı ksenograft tümör modelinde anti-tümör aktivitesi araştırılmıştır. Çalışmanın bulguları, transgenik *Salmonella*'nın, tümör hücrelerinde apoptoz, piroptoz ve nekroz yoluyla anti-tümöral etkinliği indüklediğini göstermektedir. Nekroz, tümör hücrelerinde yaygın olarak görülen bir hücre ölüm şeklidir. Çalışmada, her iki tedavi grubunda da nekroz alanları görülmüştür. Nekrozun, PE38 toksininin tümör hücrelerinde yüksek sitotoksisite göstermesi nedeniyle meydana geldiği düşünülmektedir. Çalışmada, her iki tedavi grubunda da Kaspaz-3 ekspresyonunun yüksek olduğu görülmüştür. Bu durum, transgenik *Salmonella*'nın, tümör hücrelerinde apoptozu indüklediği düşündürmektedir. Çalışmada, her iki tedavi grubunda da Kaspaz-11 ve GSDME ekspresyonunun yüksek olduğu görülmüştür. Bu durumda, transgenik *Salmonella*'nın, tümör hücrelerinde piroptozu indüklediği kanısına varılabilir. TGF-alfa (+) grupta, TGF-alfa (-) gruptan daha az nekroz ve daha fazla piroptoz

rastlanması; TGF-alfa'nın transgenik *Salmonella*'nın piroptotik etkisini indüklediğini düşündürmektedir. Sonuç olarak, bu çalışma, transgenik *Salmonella*'nın, tümör hücrelerinde apoptoz, piroptoz ve nekroz yoluyla anti-tümöral etkileri indüklediğini göstermektedir.

Bu sonuçlar spesifik ve yönlendirilmiş bir şekilde hareket eden TGF-alfa ataçmanlı ve PE38 toksini ihtiva eden transgenik *Salmonella*'nın, kanser tedavisinde sağlıklı doku ve organlarda daha az hasar bırakan, tümörleri seçici olarak hedef alan ve birden fazla hücre ölüm mekanizmasını aktive eden potansiyel bir tedavi ajanı olarak kullanılabilceğini ve güncel kanser tedavilerine ek ya da kombine tedaviler şeklinde kullanılabilceği yönünde umut vermektedir.



KAYNAKLAR

- Adamkov, M. (2019). Logical complexity of Bcl-2 family proteins function in the intrinsic immunity. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 40(1), 1-14
- Adkins, I., Holubova, J., Kosova, M., & Sadilkova, L. (2012). Bacteria and their toxins tamed for immunotherapy. *Current pharmaceutical biotechnology*, 13(8), 1446-1473.
- Akoachere, J. F. T., Tanih, N. F., Ndip, L. M., & Ndip, R. N. (2009). Phenotypic characterization of *Salmonella typhimurium* isolates from food-animals and abattoir drains in Buea, Cameroon. *Journal of health, population, and nutrition*, 27(5), 612.
- Albert, M. L. (2004). Death-defying immunity: do apoptotic cells influence antigen processing and presentation?. *Nature Reviews Immunology*, 4(3), 223-231.
- Allemani, C., Weir, H. K., Carreira, H., Harewood, R., Spika, D., Wang, X. S., ... & Coleman, M. P. (2015). Global surveillance of cancer survival 1995–2009: analysis of individual data for 25 676 887 patients from 279 population-based registries in 67 countries (CONCORD-2). *The Lancet*, 385(9972), 977-1010.
- Altıntaş Kazar, G. (2019). *Bakterilerin antitümörojenik aktivitesi* (Master's thesis, Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü).
- Ansiaux, R. G., Baudelet, C., Cron, G. O., Segers, J. R. M., Dessy, C., Martinive, P., ... & Gallez, B. (2006). Botulinum toxin potentiates cancer radiotherapy and chemotherapy. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 12(4), 1276-1283.
- Antignani, A., & FitzGerald, D. (2013). Immunotoxins: the role of the toxin. *Toxins*, 5(8), 1486-1502.
- Arnold, M., Morgan, E., Rungay, H., Mafra, A., Singh, D., Laversanne, M., ... & Soerjomataram, I. (2022). Current and future burden of breast cancer: Global statistics for 2020 and 2040. *The Breast*, 66, 15-23.
- Arzmi, M. H., PP Abdul Majeed, A., Muazu Musa, R., Mohd Razman, M. A., Gan, H. S., Mohd Khairuddin, I., & Ab. Nasir, A. F. (2023). Epidemiology, Detection and Management of Cancer: An Overview. *Deep Learning in Cancer Diagnostics: A Feature-based Transfer Learning Evaluation*, 1-7.
- Badie, F., Ghandali, M., Tabatabaei, S. A., Safari, M., Khorshidi, A., Shayestehpour, M., ... & Mirzaei, H. (2021). Use of *Salmonella* bacteria in cancer therapy: direct, drug delivery and combination approaches. *Frontiers in Oncology*, 11, 624759.
- Bandala, C., Cortés-Algara, A. L., Mejía-Barradas, C. M., Ilizaliturri-Flores, I., Dominguez-Rubio, R., Bazán-Méndez, C. I., ... & Lara-Padilla, E. (2015). Botulinum neurotoxin type A inhibits synaptic vesicle 2 expression in breast cancer cell lines. *International journal of clinical and experimental pathology*, 8(7), 8411.

- Bezdirici D., Hendek MK, Özcan G, Kul O, Anteplioğlu T, Olgun E. (2024). Prophylactic and therapeutic effects of (6) shogaol on alveolar bone loss in experimental periodontitis. *Eur Oral Res* 2024; 58(1): 37-43.
- Bhat, A. A., Thapa, R., Afzal, O., Agrawal, N., Almalki, W. H., Kazmi, I., ... & Gupta, G. (2023). The pyroptotic role of Caspase-3/GSDME signalling pathway among various cancer: A Review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 124832.
- Bjorn, M. J., Groetsema, G., & Scalapino, L. (1986). Antibody-Pseudomonas exotoxin A conjugates cytotoxic to human breast cancer cells in vitro. *Cancer research*, 46(7), 3262-3267.
- Borges, F. D. S. (2006). Dermato-funcional: modalidades terapêuticas nas disfunções estéticas. *São Paulo: Phorte*, 6.
- Bower, J. E. (2014). Cancer-related fatigue—mechanisms, risk factors, and treatments. *Nature reviews Clinical oncology*, 11(10), 597-609.
- Boyle, P., & Levin, B. (2008). *World cancer report 2008*. IARC Press, International Agency for Research on Cancer.
- Brennan, M. A., & Cookson, B. T. (2000). Salmonella induces macrophage death by caspase-1-dependent necrosis. *Molecular microbiology*, 38(1), 31-40.
- Brønstad, A., & Berg, A. G. T. (2011). The role of organizational culture in compliance with the principles of the 3Rs. *Lab animal*, 40(1), 22-26.
- Burdall, S. E., Hanby, A. M., Lansdown, M. R., & Speirs, V. (2003). Breast cancer cell lines: friend or foe?. *Breast cancer research*, 5(2), 1-7.
- Burguin, A., Diorio, C., & Durocher, F. (2021). Breast cancer treatments: updates and new challenges. *Journal of personalized medicine*, 11(8), 808.
- Cai, Y., Yu, S., Chi, X., Radoshitzky, S. R., Kuhn, J. H., & Berger, E. A. (2021). An immunotoxin targeting Ebola virus glycoprotein inhibits Ebola virus production from infected cells. *Plos one*, 16(1), e0245024.
- Chen, X., Kang, R., Kroemer, G., & Tang, D. (2021). Broadening horizons: the role of ferroptosis in cancer. *Nature reviews Clinical oncology*, 18(5), 280-296.
- Cheon, D. J., & Orsulic, S. (2011). Mouse models of cancer. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 6, 95-119.
- Cheong, I., & Zhou, S. (2009). Tumor-specific liposomal drug release mediated by liposomase. *Methods in enzymology*, 465, 251-265.
- Choo, Z. E., Loh, A. H. P., & Chen, Z. X. (2019). Destined to die: Apoptosis and pediatric cancers. *Cancers*, 11(11), 1623.
- Clarke, R. (1996). Human breast cancer cell line xenografts as models of breast cancer—the immunobiologies of recipient mice and the characteristics of several tumorigenic cell lines. *Breast cancer research and treatment*, 39, 69-86.
- Clarke, R. (2009). The role of preclinical animal models in breast cancer drug development. *Breast Cancer Research*, 11(3), 1-3.

- Coleman, M. P., Gatta, G., Verdecchia, A., Esteve, J., Sant, M., Storm, H., ... & Berrino, F. (2003). EURO CARE-3 summary: cancer survival in Europe at the end of the 20 th century. *Annals of oncology*, 14(90005), 128-149.
- Cookson, B. T., & Brennan, M. A. (2001). Pro-inflammatory programmed cell death. *Trends in microbiology*, 9(3), 113-114.
- D'arcy, M. S. (2019). Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell biology international*, 43(6), 582-592.
- Dasgupta, A., Nomura, M., Shuck, R., & Yustein, J. (2016). Cancer's Achilles' heel: apoptosis and necroptosis to the rescue. *International journal of molecular sciences*, 18(1), 23.
- Degterev, A., Boyce, M., & Yuan, J. (2003). A decade of caspases. *Oncogene*, 22(53), 8543-8567.
- Dieffenbach, M., & Pastan, I. (2020). Mechanisms of resistance to immunotoxins containing pseudomonas exotoxin a in cancer therapy. *Biomolecules*, 10(7), 979.
- Du, X., Youle, R. J., FitzGerald, D. J., & Pastan, I. (2010). Pseudomonas exotoxin A-mediated apoptosis is Bak dependent and preceded by the degradation of Mcl-1. *Molecular and cellular biology*, 30(14), 3444-3452.
- e Guirro, G. (2002). Fisioterapia Dermato-Funcional.
- Ebrahimzadeh, S., Ahangari, H., Soleimani, A., Hosseini, K., Ebrahimi, V., Ghasemnejad, T., ... & Eyvazi, S. (2021). Colorectal cancer treatment using bacteria: focus on molecular mechanisms. *BMC microbiology*, 21(1), 1-12.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*, 35(4), 495-516.
- Enejiyon, S. O., Adabara, N. U., Wuma, M. M., & Fasasi, R. A. (2020). Salmonella Typhimurium as a potential anticancer agent: A Review.
- Falschlehner, C., Schaefer, U., & Walczak, H. (2009). Following TRAIL's path in the immune system. *Immunology*, 127(2), 145-154.
- Fink, S. L., & Cookson, B. T. (2005). Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infection and immunity*, 73(4), 1907-1916.
- Fink, S. L., & Cookson, B. T. (2006). Caspase-1-dependent pore formation during pyroptosis leads to osmotic lysis of infected host macrophages. *Cellular microbiology*, 8(11), 1812-1825.
- Fitzmaurice, C., Dicker, D., Pain, A., Hamavid, H., Moradi-Lakeh, M., MacIntyre, M. F., ... & Global Burden of Disease Cancer Collaboration. (2015). The global burden of cancer 2013. *JAMA oncology*, 1(4), 505-527.
- Forbes, N. S. (2010). Engineering the perfect (bacterial) cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 10(11), 785-794.
- Fox, J. G. (2015). Laboratory animal medicine. Elsevier.

- Fujimori, M. (2006). Genetically engineered bifidobacterium as a drug delivery system for systemic therapy of metastatic breast cancer patients. *Breast cancer*, 13(1), 27-31.
- Ganai, S., Arenas, R. B., Sauer, J. P., Bentley, B., & Forbes, N. S. (2011). In tumors Salmonella migrate away from vasculature toward the transition zone and induce apoptosis. *Cancer gene therapy*, 18(7), 457-466.
- Gioanni, J., Le Francois, D., Zanghellini, E., Mazeau, C., Ettore, F., Lambert, J. C., ... & Dutrillaux, B. (1990). Establishment and characterisation of a new tumorigenic cell line with a normal karyotype derived from a human breast adenocarcinoma. *British journal of cancer*, 62(1), 8-13.
- Goldufsky, J., Wood, S., Hajihossainlou, B., Rehman, T., Majdobe, O., Kaufman, H. L., ... & Shafikhani, S. H. (2015). Pseudomonas aeruginosa exotoxin T induces potent cytotoxicity against a variety of murine and human cancer cell lines. *Journal of medical microbiology*, 64(Pt 2), 164.
- Gong, L., Huang, D., Shi, Y., Liang, Z. A., & Bu, H. (2023). Regulated cell death in cancer: from pathogenesis to treatment. *Chinese Medical Journal*, 136(06), 653-665.
- Gong, Y. N., Guy, C., Olauson, H., Becker, J. U., Yang, M., Fitzgerald, P., ... & Green, D. R. (2017). ESCRT-III acts downstream of MLKL to regulate necroptotic cell death and its consequences. *Cell*, 169(2), 286-300.
- Gontero, P., Bohle, A., Malmstrom, P. U., O'Donnell, M. A., Oderda, M., Sylvester, R., & Witjes, F. (2010). The role of bacillus Calmette-Guérin in the treatment of non-muscle-invasive bladder cancer. *European urology*, 57(3), 410-429.
- Grassme, H., Jendrossek, V., & Gulbins, E. (2001). Molecular mechanisms of bacteria induced apoptosis. *Apoptosis*, 6, 441-445.
- Grilo, A. L., & Mantalaris, A. (2019). Apoptosis: A mammalian cell bioprocessing perspective. *Biotechnology advances*, 37(3), 459-475.
- Gupta, K. H., Nowicki, C., Giurini, E. F., Marzo, A. L., & Zloza, A. (2021). Bacterial-based cancer therapy (BBCT): Recent advances, current challenges, and future prospects for cancer immunotherapy. *Vaccines*, 9(12), 1497.
- Hayashi, K., Zhao, M., Yamauchi, K., Yamamoto, N., Tsuchiya, H., Tomita, K., & Hoffman, R. M. (2009). Cancer metastasis directly eradicated by targeted therapy with a modified Salmonella typhimurium. *Journal of cellular biochemistry*, 106(6), 992-998.
- Hemmati, M., Tarighi, P., Amoozadeh, S., & Farajollahi, M. M. (2017). Expression and purification of the recombinant pseudomonas exotoxin a conjugated to herceptin and its anti-proliferation effects on sk-br-3. *Multidisciplinary Cancer Investigation*, 1, 0-0.
- Hoffman, R. M. (2015). Back to the future: are tumor-targeting bacteria the next-generation cancer therapy?. *Gene Therapy of Solid Cancers: Methods and Protocols*, 239-260.

- Holmes, R. K. (2000). Biology and molecular epidemiology of diphtheria toxin and the tox gene. *Journal of Infectious Diseases*, 181(Supplement_1), S156-S167.
- Huang, X., Xiao, F., Li, Y., Qian, W., Ding, W., & Ye, X. (2018). Bypassing drug resistance by triggering necroptosis: recent advances in mechanisms and its therapeutic exploitation in leukemia. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 37, 1-15.
- Humason, G. L. (1962). Animal tissue techniques. *Animal tissue techniques*.
- Iwamoto, T. (2013). Clinical application of drug delivery systems in cancer chemotherapy: review of the efficacy and side effects of approved drugs. *Biological and pharmaceutical bulletin*, 36(5), 715-718.
- Jain, R. K., & Forbes, N. S. (2001). Can engineered bacteria help control cancer?. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(26), 14748-14750.
- Jeffrey, H. M. (1972). Experiments in molecular genetics. *Cold Spring Harbour Laboratory, NY*, 37-46.
- Jenkins, C. E., Swiatoniowski, A., Issekutz, A. C., & Lin, T. J. (2004). Pseudomonas aeruginosa exotoxin A induces human mast cell apoptosis by a caspase-8 and-3-dependent mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, 279(35), 37201-37207.
- Jeong, J. H., Song, M., Park, S. I., Cho, K. O., Rhee, J. H., & Choy, H. E. (2008). Salmonella enterica serovar Gallinarum requires ppGpp for internalization and survival in animal cells. *Journal of bacteriology*, 190(19), 6340-6350.
- Ji, N., Qi, Z., Wang, Y., Yang, X., Yan, Z., Li, M., ... & Zhang, J. (2021). Pyroptosis: a new regulating mechanism in cardiovascular disease. *Journal of inflammation research*, 14, 2647.
- Jia, Y., Wang, X., Deng, Y., Li, S., Xu, X., Qin, Y., & Peng, L. (2023). Pyroptosis provides new strategies for the treatment of cancer. *Journal of Cancer*, 14(1), 140.
- Jiang, M., Qi, L., Li, L., & Li, Y. (2020). The caspase-3/GSDME signal pathway as a switch between apoptosis and pyroptosis in cancer. *Cell death discovery*, 6(1), 112.
- Jiang, S. N., Park, S. H., Lee, H. J., Zheng, J. H., Kim, H. S., Bom, H. S., ... & Min, J. J. (2013). Engineering of bacteria for the visualization of targeted delivery of a cytolytic anticancer agent. *Molecular Therapy*, 21(11), 1985-1995.
- Kao, J., Salari, K., Bocanegra, M., Choi, Y. L., Girard, L., Gandhi, J., ... & Pollack, J. R. (2009). Molecular profiling of breast cancer cell lines defines relevant tumor models and provides a resource for cancer gene discovery. *PloS one*, 4(7), e6146.
- Keppler-Hafkemeyer, A., Brinkmann, U., & Pastan, I. (1998). Role of caspases in immunotoxin-induced apoptosis of cancer cells. *Biochemistry*, 37(48), 16934-16942.

- Khuwaja, G. A., & Abu-Rezq, A. N. (2004). Bimodal breast cancer classification system. *Pattern analysis and applications*, 7(3), 235-242
- Kim, J. E., Phan, T. X., Nguyen, V. H., Dinh-Vu, H. V., Zheng, J. H., Yun, M., ... & Min, J. J. (2015). Salmonella typhimurium suppresses tumor growth via the pro-inflammatory cytokine interleukin-1 β . *Theranostics*, 5(12), 1328.
- Knoblauch, SE., and Himmel, LE. (2018). Keeping Score: Semiquantitative and Quantitative Scoring Approaches to Genetically Engineered and Xenograft Mouse Models of Cancer. *Veterinary Pathology*, 56 (1), 24-32.
- Kreitman, R. J., & Pastan, I. (1998). Immunotoxins for targeted cancer therapy. *Advanced drug delivery reviews*, 31(1-2), 53-88.
- Kreitman, R. J., Siegall, C. B., Chaudhary, V. K., FitzGerald, D. J., & Pastan, I. (1992). Properties of chimeric toxins with two recognition domains: interleukin 6 and transforming growth factor. alpha. at different locations in Pseudomonas exotoxin. *Bioconjugate chemistry*, 3(1), 63-68.
- Krieg, N. R., & Holt, J. G. (1984). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Yi Hsien Publishing Co.
- Kroemer, G., Petit, P., Zamzami, N., Vayssière, J. L., & Mignotte, B. (1995). The biochemistry of programmed cell death. *The FASEB Journal*, 9(13), 1277-1287.
- Lacroix, M., & Leclercq, G. (2004). Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update. *Breast cancer research and treatment*, 83, 249-289.
- Lamkanfi, M., & Dixit, V. M. (2014). Mechanisms and functions of inflammasomes. *Cell*, 157(5), 1013-1022.
- Lasfargues, E. Y., & Ozzello, L. (1958). Cultivation of human breast carcinomas. *Journal of the National Cancer Institute*, 21(6), 1131-1147.
- Leal, N. F. B. D. S., Carrara, H. H. A., Vieira, K. F., & Ferreira, C. H. J. (2009). Physiotherapy treatments for breast cancer-related lymphedema: a literature review. *Revista latino-americana de enfermagem*, 17, 730-736.
- Lee, C. H., Lin, S. T., Liu, J. J., Chang, W. W., Hsieh, J. L., & Wang, W. K. (2014). Salmonella induce autophagy in melanoma by the downregulation of AKT/mTOR pathway. *Gene Therapy*, 21(3), 309-316.
- Lee, J. C., Ahn, S., Cho, I. K., Lee, J., Kim, J., & Hwang, J. H. (2018). Management of recurrent pancreatic cancer after surgical resection: a protocol for systematic review, evidence mapping and meta-analysis. *BMJ open*, 8(4), e017249.
- Lee, J. H., Moore, L. D., Kumar, S., Pritchard, D. G., Ponnazhagan, S., & Deivanayagam, C. (2010). Bacteriophage hyaluronidase effectively inhibits growth, migration and invasion by disrupting hyaluronan-mediated Erk1/2 activation and RhoA expression in human breast carcinoma cells. *Cancer letters*, 298(2), 238-249.

- Lewis, D. J., Dao Jr, H., Nagarajan, P., & Duvic, M. (2017). Primary cutaneous anaplastic large-cell lymphoma: Complete remission for 13 years after denileukin diftitox. *JAAD case reports*, 3(6), 501-504.
- Li, R. Y., Zheng, Z. Y., Li, Z. M., Heng, J. H., Zheng, Y. Q., Deng, D. X., ... & Xu, L. Y. (2022). Cisplatin-induced pyroptosis is mediated via the CAPN1/CAPN2-BAK/BAX-caspase-9-caspase-3-GSDME axis in esophageal cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 361, 109967.
- Liang, K., Liu, Q., Li, P., Luo, H., Wang, H., & Kong, Q. (2019). Genetically engineered Salmonella Typhimurium: Recent advances in cancer therapy. *Cancer letters*, 448, 168-181.
- Lim, D., Kim, K. S., Kim, H., Ko, K. C., Song, J. J., Choi, J. H., ... & Choy, H. E. (2017). Anti-tumor activity of an immunotoxin (TGF α -PE38) delivered by attenuated Salmonella typhimurium. *Oncotarget*, 8(23), 37550.
- Liu, Y., Hu, Y., Xue, J., Li, J., Yi, J., Bu, J., ... & Gu, X. (2023). Advances in immunotherapy for triple-negative breast cancer. *Molecular cancer*, 22(1), 145.
- Loreto, C., La Rocca, G., Anzalone, R., Caltabiano, R., Vespasiani, G., Castorina, S., ... & Sansalone, S. (2014). The role of intrinsic pathway in apoptosis activation and progression in Peyronie's disease. *BioMed research international*, 2014.
- Loveless, R., Bloomquist, R., & Teng, Y. (2021). Pyroptosis at the forefront of anticancer immunity. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 40(1), 1-14.
- Lu, C. H., Kuo, Y. Y., Lin, G. B., Chen, W. T., & Chao, C. Y. (2020). Application of non-invasive low-intensity pulsed electric field with thermal cycling-hyperthermia for synergistically enhanced anticancer effect of chlorogenic acid on PANC-1 cells. *Plos one*, 15(1), e0222126.
- Lumachi, F., Brunello, A., Maruzzo, M., Basso, U., & Mm Basso, S. (2013). Treatment of estrogen receptor-positive breast cancer. *Current medicinal chemistry*, 20(5), 596-604.
- Luna, L. G. (1968). Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology. In *Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology* (pp. xii-258).
- Lutz, M. B., Baur, A. S., Schuler-Thurner, B., & Schuler, G. (2014). Immunogenic and tolerogenic effects of the chimeric IL-2-diphtheria toxin cytotoxic agent Ontak $\text{\textcircled{R}}$ on CD25 $^{+}$ cells. *Oncoimmunology*, 3(3), e28223.
- M Atlas, R. (2010). Handbook of microbiological media.
- Marangoni, E., Vincent-Salomon, A., Auger, N., Degeorges, A., Assayag, F., De Cremoux, P., ... & Poupon, M. F. (2007). A new model of patient tumor-derived breast cancer xenografts for preclinical assays. *Clinical cancer research*, 13(13), 3989-3998.
- Masoud, V., & Pagès, G. (2017). Targeted therapies in breast cancer: New challenges to fight against resistance. *World journal of clinical oncology*, 8(2), 120.

- Mayakrishnan, V., Kannappan, P., Tharmalingam, N., Bose, R. J., Madheswaran, T., & Ramasamy, M. (2022). Bacterial cancer therapy: A turning point for new paradigms. *Drug Discovery Today*, 27(8), 2043-2050.
- Mazor, R., & Pastan, I. (2020). Immunogenicity of immunotoxins containing Pseudomonas exotoxin A: causes, consequences, and mitigation. *Frontiers in immunology*, 11, 1261.
- McQuade, R. M., Stojanovska, V., Abalo, R., Bornstein, J. C., & Nurgali, K. (2016). Chemotherapy-induced constipation and diarrhea: pathophysiology, current and emerging treatments. *Frontiers in pharmacology*, 7, 414.
- Medina, D. (2010). Of mice and women: A short history of mouse mammary cancer research with an emphasis on the paradigms inspired by the transplantation method. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2(10), a004523.
- Mei, X., Chen, J., Wang, J., & Zhu, J. (2019). Immunotoxins: targeted toxin delivery for cancer therapy. *Pharmaceutical Fronts*, 1(01), e33-e45.
- Michalska, M., & Wolf, P. (2015). Pseudomonas Exotoxin A: optimized by evolution for effective killing. *Frontiers in microbiology*, 6, 963.
- Mollard, S., Mousseau, Y., Baaj, Y., Richard, L., Cook-Moreau, J., Monteil, J., ... & Sturtz, F. G. (2011). How can grafted breast cancer models be optimized?. *Cancer biology & therapy*, 12(10), 855-864.
- Mollard, S., Mousseau, Y., Baaj, Y., Richard, L., Cook-Moreau, J., Monteil, J., ... & Sturtz, F. G. (2011). How can grafted breast cancer models be optimized?. *Cancer biology & therapy*, 12(10), 855-864.
- Na, H. S., Kim, H. J., Lee, H. C., Hong, Y., Rhee, J. H., & Choy, H. E. (2006). Immune response induced by Salmonella typhimurium defective in ppGpp synthesis. *Vaccine*, 24(12), 2027-2034.
- Nagarajan, K., Soundarapandian, K., Thorne, R. F., Li, D., & Li, D. (2019). Activation of pyroptotic cell death pathways in cancer: an alternative therapeutic approach. *Translational oncology*, 12(7), perspective. *Biotechnology advances*, 37(3), 459-475. presentation? *Nature Reviews Immunology*, 4(3), 223-231.
- Nagata, S. (1997). Apoptosis by death factor. *cell*, 88(3), 355-365.
- Nauts, H. C., Swift, W. E., & Coley, B. L. (1946). The treatment of malignant tumors by bacterial toxins as developed by the late William B. Coley, MD, reviewed in the light of modern research. *Cancer research*, 6(4), 205-216.
- Nofech-Mozes, S., Trudeau, M., Kahn, H. K., Dent, R., Rawlinson, E., Sun, P., ... & Hanna, W. M. (2009). Patterns of recurrence in the basal and non-basal subtypes of triple-negative breast cancers. *Breast cancer research and treatment*, 118, 131-137.
- Osborne, C. K., Hobbs, K., & Trent, J. M. (1987). Biological differences among MCF-7 human breast cancer cell lines from different laboratories. *Breast cancer research and treatment*, 9, 111-121.

- Pal, A. (2022). Bacteriotherapy: understanding bacterial species specialization based on the established hallmarks of cancer. *Intersect: The Stanford Journal of Science, Technology, and Society*, 15(2).
- Peng, S. J., Li, J., Zhou, Y., Tuo, M., Qin, X. X., Yu, Q., ... & Li, Y. M. (2017). In vitro effects and mechanisms of lycopene in MCF-7 human breast cancer cells. *Genet. Mol. Res*, 16(2), 13.
- Phan, T. X., Nguyen, V. H., Duong, M. T. Q., Hong, Y., Choy, H. E., & Min, J. J. (2015). Activation of inflammasome by attenuated *Salmonella typhimurium* in bacteria-mediated cancer therapy. *Microbiology and immunology*, 59(11), 664-675.
- Phillips, P. C., Levow, C., Catterall, M., Colvin, O. M., Pastan, I., & Brem, H. (1994). Transforming Growth Factor- α —*Pseudomonas* Exotoxin Fusion Protein (TGF- α -PE38) Treatment of Subcutaneous and Intracranial Human Glioma and Medulloblastoma Xenografts in Athymic Mice. *Cancer Research*, 54(4), 1008-1015.
- Pulumati, A., Pulumati, A., Dwarakanath, B. S., Verma, A., & Papineni, R. V. (2023). Technological advancements in cancer diagnostics: Improvements and limitations. *Cancer Reports*, e1764.
- Purnama, C. A., Meiliana, A., Barliana, M. I., & Lestari, K. (2023). Update of cellular responses to the efferocytosis of necroptosis and pyroptosis. *Cell Division*, 18(1), 5.
- Roberts, N. J., Zhang, L., Janku, F., Collins, A., Bai, R. Y., Staedtke, V., ... & Hadden, S. (2014). Intratumoral injection of *Clostridium novyi*-NT spores induces antitumor responses. *Science translational medicine*, 6(249), 249ra111-249ra111.
- Rogers, C., Fernandes-Alnemri, T., Mayes, L., Alnemri, D., Cingolani, G., & Alnemri, E. S. (2017). Cleavage of DFNA5 by caspase-3 during apoptosis mediates progression to secondary necrotic/pyroptotic cell death. *Nature communications*, 8(1), 1-14.
- Rogers, C., Fernandes-Alnemri, T., Mayes, L., Alnemri, D., Cingolani, G., & Alnemri, E. S. (2017). Cleavage of DFNA5 by caspase-3 during apoptosis mediates progression to secondary necrotic/pyroptotic cell death. *Nature communications*, 8(1), 14128.
- Rommasi, F. (2022). Bacterial-based methods for cancer treatment: What we know and where we are. *Oncology and Therapy*, 10(1), 23-54.
- Ryan, R. M., Green, J., Williams, P. J., Tazzyman, S., Hunt, S., Harmey, J. H., ... & Lewis, C. E. (2009). Bacterial delivery of a novel cytolysin to hypoxic areas of solid tumors. *Gene therapy*, 16(3), 329-339.
- Safari, E., Hosseini, A. Z., Hassan, Z., Khajeh, K., Ardestani, M. S., & Baradaran, B. (2014). Cytotoxic effect of immunotoxin containing the truncated form of *Pseudomonas* exotoxin A and anti-VEGFR2 on HUVEC and MCF-7 cell lines. *Cell Journal (yakhteh)*, 16(2), 203.

- Samarghandian, S., Azimi-Nezhad, M., Borji, A., Hasanzadeh, M., Jabbari, F., Farkhondeh, T., & Samini, M. (2016). Inhibitory and cytotoxic activities of chrysin on human breast adenocarcinoma cells by induction of apoptosis. *Pharmacognosy magazine*, 12(Suppl 4), S436.
- Sedger, L. M., & McDermott, M. F. (2014). TNF and TNF-receptors: From mediators of cell death and inflammation to therapeutic giants—past, present and future. *Cytokine & growth factor reviews*, 25(4), 453-472.
- Semenov, A. V., van Overbeek, L., Termorshuizen, A. J., & van Bruggen, A. H. (2011). Influence of aerobic and anaerobic conditions on survival of *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in Luria–Bertani broth, farm-yard manure and slurry. *Journal of environmental management*, 92(3), 780-787.
- Sharma, G. N., Dave, R., Sanadya, J., Sharma, P., & Sharma, K. (2010). Various types and management of breast cancer: an overview. *Journal of advanced pharmaceutical technology & research*, 1(2), 109.
- Shi, J., Zhao, Y., Wang, Y., Gao, W., Ding, J., Li, P., ... & Shao, F. (2014). Inflammatory caspases are innate immune receptors for intracellular LPS. *Nature*, 514(7521), 187-192.
- Shi, S. R., Guo, J., Cote, R. J., Young, L. L., Hawes, D., Shi, Y., ... & Taylor, C. R. (1999). Sensitivity and detection efficiency of a novel two-step detection system (PowerVision) for immunohistochemistry. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*, 7(3), 201.
- Siegall, C. B., FitzGerald, D. J., & Pastan, I. (1990, October). Selective killing of tumor cells using EGF or TGF alpha-Pseudomonas exotoxin chimeric molecules. In *Seminars in Cancer Biology* (Vol. 1, No. 5, pp. 345-350).
- Siegel, R. L., Miller, K. D., Goding Sauer, A., Fedewa, S. A., Butterly, L. F., Anderson, J. C., ... & Jemal, A. (2020). Colorectal cancer statistics, 2020. *CA: a cancer journal for clinicians*, 70(3), 145-164.
- Silva, M. T., Do Vale, A., & dos Santos, N. M. (2008). Secondary necrosis in multicellular animals: an outcome of apoptosis with pathogenic implications. *Apoptosis*, 13, 463-482.
- Song, S., Vuai, M. S., & Zhong, M. (2018). The role of bacteria in cancer therapy—enemies in the past, but allies at present. *Infectious agents and cancer*, 13(1), 1-7.
- Sun, Y. S., Zhao, Z., Yang, Z. N., Xu, F., Lu, H. J., Zhu, Z. Y., ... & Zhu, H. P. (2017). Risk factors and preventions of breast cancer. *International journal of biological sciences*, 13(11), 1387.
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 71(3), 209-249.
- Swofford, C. A., St. Jean, A. T., Panteli, J. T., Brentzel, Z. J., & Forbes, N. S. (2014). Identification of *Staphylococcus aureus* α -hemolysin as a protein drug

- that is secreted by anticancer bacteria and rapidly kills cancer cells. *Biotechnology and bioengineering*, 111(6), 1233-1245.
- Tang, D., Kang, R., Berghe, T. V., Vandenabeele, P., & Kroemer, G. (2019). The molecular machinery of regulated cell death. *Cell research*, 29(5), 347-364.
- Tang, R., Xu, J., Zhang, B., Liu, J., Liang, C., Hua, J., ... & Shi, S. (2020). Ferroptosis, necroptosis, and pyroptosis in anticancer immunity. *Journal of hematology & oncology*, 13, 1-18.
- Terasawa, T., Dvorak, T., Ip, S., Raman, G., Lau, J., & Trikalinos, T. A. (2009). Systematic review: charged-particle radiation therapy for cancer. *Annals of internal medicine*, 151(8), 556-565.
- Thomas, S. M., Zeng, Q., Epperly, M. W., Gooding, W. E., Pastan, I., Wang, Q. C., ... & Grandis, J. R. (2004). Abrogation of head and neck squamous cell carcinoma growth by epidermal growth factor receptor ligand fused to Pseudomonas exotoxin transforming growth factor α -PE38. *Clinical cancer research*, 10(20), 7079-7087.
- Thompson, S. W. (1966). Selected histochemical and histopathological methods. (No Title).
- Thorpe, D., Stringer, A., & Butler, R. (2013). Chemotherapy-induced mucositis: the role of mucin secretion and regulation, and the enteric nervous system. *Neurotoxicology*, 38, 101-105.
- Ulukaya, E. (2003). Apoptozis Ders Notları Ankara.
- Vargo-Gogola, T., & Rosen, J. M. (2007). Modelling breast cancer: one size does not fit all. *Nature Reviews Cancer*, 7(9), 659-672.
- Viganò, E., Diamond, C. E., Spreafico, R., Balachander, A., Sobota, R. M., & Mortellaro, A. (2015). Human caspase-4 and caspase-5 regulate the one-step non-canonical inflammasome activation in monocytes. *Nature communications*, 6(1), 8761.
- Wagner, K. U. (2003). Models of breast cancer: quo vadis, animal modeling?. *Breast Cancer Research*, 6(1), 1-8.
- Waks, A. G., & Winer, E. P. (2019). Breast cancer treatment: a review. *Jama*, 321(3), 288-300.
- Wang, Q., Imamura, R., Motani, K., Kushiya, H., Nagata, S., & Suda, T. (2013). Pyroptotic cells externalize eat-me and release find-me signals and are efficiently engulfed by macrophages. *International immunology*, 25(6), 363-372.
- Wang, T. (2021). Salmonella-based cancer therapy and the stabilizing methods (Doctoral dissertation).
- Wang, X., Qian, J., Meng, Y., Wang, P., Cheng, R., Zhou, G., ... & Liu, C. (2023). Salidroside ameliorates severe acute pancreatitis-induced cell injury and pyroptosis by inactivating Akt/NF- κ B and caspase-3/GSDME pathways. *Heliyon*, 9(2).

- Wang, Y., Gao, W., Shi, X., Ding, J., Liu, W., He, H., ... & Shao, F. (2017). Chemotherapy drugs induce pyroptosis through caspase-3 cleavage of a gasdermin. *Nature*, 547(7661), 99-103.
- Wang, Y., Probin, V., & Zhou, D. (2006). Cancer therapy-induced residual bone marrow injury: mechanisms of induction and implication for therapy. *Current cancer therapy reviews*, 2(3), 271-279.
- Weerakkody, L. R., & Witharana, C. (2019). The role of bacterial toxins and spores in cancer therapy. *Life sciences*, 235, 116839.
- Weldon, J. E., & Pastan, I. (2011). A guide to taming a toxin–recombinant immunotoxins constructed from *Pseudomonas* exotoxin A for the treatment of cancer. *The FEBS journal*, 278(23), 4683-4700.
- Welsh, J. (2013). Animal models for studying prevention and treatment of breast cancer. In *Animal models for the study of human disease* (pp. 997-1018). Academic Press.
- Wolf, P., & Elsässer-Beile, U. (2009). *Pseudomonas* exotoxin A: from virulence factor to anti-cancer agent. *International Journal of Medical Microbiology*, 299(3), 161-176.
- Wong, R. S. (2011). Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 30(1), 1-14. 1013-1022.925-931.
- World Health Organization. (2020). International Agency for Research on Cancer GLOBOCAN 2020. *World Health Organization*.
- Wright, S. E., Rewers-Felkins, K. A., Quinlin, I., Chowdhury, N. I., Ahmed, J., Eldridge, P. W., ... & Pastan, I. (2014). TGF α -PE38 enhances cytotoxic T-lymphocyte killing of breast cancer cells. *Oncology Letters*, 7(6), 2113-2117.
- Wu, Q., Ma, J., Wei, J., Meng, W., Wang, Y., & Shi, M. (2021). lncRNA SNHG11 promotes gastric cancer progression by activating the Wnt/ β -catenin pathway and oncogenic autophagy. *Molecular Therapy*, 29(3), 1258-1278.
- Xu, J., Li, Y., Kang, M., Chang, C., Wei, H., Zhang, C., & Chen, Y. (2023). Multiple forms of cell death: A focus on the PI3K/AKT pathway. *Journal of Cellular Physiology*, 238(9), 2026-2038.
- Xue, H., Sawyer, M. B., Wischmeyer, P. E., & Baracos, V. E. (2011). Nutrition modulation of gastrointestinal toxicity related to cancer chemotherapy: from preclinical findings to clinical strategy. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 35(1), 74-90.
- Yaghoubi, A., Khazaei, M., Hasanian, S. M., Avan, A., C. Cho, W., & Soleimanpour, S. (2019). Bacteriotherapy in breast cancer. *International journal of molecular sciences*, 20(23), 5880.
- Yaghoubi, A., Khazaei, M., Hasanian, S. M., Avan, A., C. Cho, W., & Soleimanpour, S. (2019). Bacteriotherapy in breast cancer. *International journal of molecular sciences*, 20(23), 5880.

- Yamaizumi, M., Mekada, E., Uchida, T., & Okada, Y. (1978). One molecule of diphtheria toxin fragment A introduced into a cell can kill the cell. *Cell*, *15*(1), 245-250.
- Yates, S. P., Taylor, P. L., Jørgensen, R., Ferraris, D., Zhang, J., Andersen, G. R., & Merrill, A. R. (2005). Structure–function analysis of water-soluble inhibitors of the catalytic domain of exotoxin A from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemical Journal*, *385*(3), 667-675.
- Yılmaz, H. H., Yazihan, N., Tunca, D., Sevinc, A., Olcayto, E. Ö., Özgül, N., & Tuncer, M. (2011). Cancer trends and incidence and mortality patterns in Turkey. *Japanese journal of clinical oncology*, *41*(1), 10-16.
- Zargarian, S., Shlomovitz, I., Erlich, Z., Hourizadeh, A., Ofir-Birin, Y., Croker, B. A., ... & Gerlic, M. (2017). Phosphatidylserine externalization, “necroptotic bodies” release, and phagocytosis during necroptosis. *PLoS biology*, *15*(6), e2002711.
- Zhao, M., Yang, M., Ma, H., Li, X., Tan, X., Li, S., ... & Hoffman, R. M. (2006). Targeted therapy with a *Salmonella typhimurium* leucine-arginine auxotroph cures orthotopic human breast tumors in nude mice. *Cancer research*, *66*(15), 7647-7652.
- Zhao, M., Yang, M., Ma, H., Li, X., Tan, X., Li, S., ... & Hoffman, R. M. (2006). Targeted therapy with a *Salmonella typhimurium* leucine-arginine auxotroph cures orthotopic human breast tumors in nude mice. *Cancer research*, *66*(15), 7647-7652.
- Zheng, J. H., & Min, J. J. (2016). Targeted cancer therapy using engineered *Salmonella typhimurium*. *Chonnam medical journal*, *52*(3), 173-184.
- Zheng, X., Chen, W., Gong, F., Chen, Y., & Chen, E. (2021). The role and mechanism of pyroptosis and potential therapeutic targets in sepsis: a review. *Frontiers in immunology*, *12*, 711939.
- Zlotta, A. R., Fleshner, N. E., & Jewett, M. A. (2009). The management of BCG failure in non-muscle-invasive bladder cancer: an update. *Canadian Urological Association Journal*, *3*(6-S4), S199-S205.