



**OVER KANSERİNDE TOLL-BENZERİ RESEPTÖR 1/2 ARACILI
İLAÇ DİRENCİNİN ARAŞTIRILMASI**

BURAK KÜÇÜK

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI**

DOÇ. DR. ERCAN ÇAÇAN

ARALIK - 2020

Her hakkı saklıdır

**T.C.
TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**OVER KANSERİNDE TOLL-BENZERİ RESEPTÖR 1/2 ARACILI İLAÇ
DİRENCİNİN ARAŞTIRILMASI**

BURAK KÜÇÜK

TOKAT

ARALIK - 2020

Her hakkı saklıdır



Bu tez çalışması,

Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri 2020/20 numaralı proje tarafından desteklenmiştir.

JÜRİ İMZA SAYFASI

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürlüğüne,

189612003 numaralı yüksek lisans öğrencisi Burak KÜÇÜK'ün "OVER KANSERİNDE TOLL-BENZERİ RESEPTÖR 1/2 ARACILI İLAÇ DİRENCİNİN ARAŞTIRILMASI" adlı çalışması 26 Kasım 2020 tarihinde jürimiz tarafından Biyoloji Anabilim Dalı Moleküler Biyoloji Programında yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

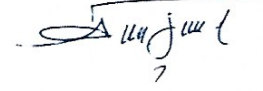
Adı Soyadı

İmza

Başkan: Doç. Dr. Fikret GEVREK

Üye (Tez Danışmanı): Doç. Dr. Ercan ÇAÇAN

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Ahmet Şevki TAŞKIRAN



Onay

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylıyorum.



Prof. Dr. Mustafa ÖNEŞ
Enstitü Müdürü

TEZ BEYANI

Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu yüksek lisans tezinin yazılmasında bilimsel etik kurallarına uyulduğunu, başkalarının çalışmalarından yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdiği yenilik ve sonuçların başka bir referanstan alınmadığını kullanılan verilerde herhangi bir bozma/değiştirme yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

BURAK KÜÇÜK

21.12.2020

ÖZET

OVER KANSERİNDE TOLL-BENZERİ RESEPTÖR 1/2 ARACILI İLAÇ DİRENCİNİN ARAŞTIRILMASI

Over kanseri jinekolojik anlamda en ölümcül kanser türüdür. Kemoterapi uygulamaları önemli bir tedavi yöntemi olmasına rağmen, hastaların büyük çoğunluğunda sonradan gelişen ve düşük sağ kalım değerleriyle ilişkili kemoterapi direnci meydana gelmektedir. Bununla beraber, over kanserinde direnç davranışını tam anlamıyla engelleyebilecek veya ortadan kaldıracabilecek bir küratif uygulama bulunmamaktadır. Toll-benzeri reseptörler (TLR'ler), doğal ve adaptif bağışıklıkta önemli roller üstlenen, lökositlerde pro-inflamatuvar sitokinlerin ve interferonların salınımını uyararak patojenlere ve tümör hücrelerine karşı immün yanıt oluşumuna yardımcı olan moleküllerdir. Bununla beraber, güncel çalışmalar TLR'lerin lökositlerin dışında kanser hücrelerinde de ifade olduklarını göstermektedir. Ayrıca kanser hücreleri bu reseptörler ve ilişkili sinyal yolları ile proliferatif özelliklerini ve kemodirenç mekanizmalarını kayda değer biçimde geliştirebilmektedir. Bağışıklık sisteminde anti-tümör yanıtında önemli rol oynayan TLR'lerin, bazı kanserlerde progresyonu ve kemodirenci arttırması; onların “iki ucu keskin bıçak” şeklinde tanımlanmasına neden olmaktadır. Bu tez çalışmasında, halihazırda literatür için yeni bir konu olan TLR ve over kanseri kemodirenci ilişkisinin detaylıca araştırılması amaçlandı. Bu doğrultuda, heterodimerik yapıdaki TLR1/2 reseptörünün bu kanserin progresyonuna ve kemoterapi direncine olan potansiyel etkileri değerlendirildi. Proliferasyon verileri, TLR1/2 kompleksi ve ilişkili sinyal yollarının over kanseri hücrelerinde bölünmeyi arttırdığını ve bir kemoterapi ajanı olan sisplatin uygulamasına karşı hücreleri duyarsızlaştırdığını gösterdi. Ayrıca, Gerçek-zamanlı PCR deneyleri aracılığıyla bu reseptörün zamana bağlı biçimde BCL2A1, GSTP1 ve ABCB1 gibi kemoterapi direnci ile ilişkili genlerin regülasyonunda değişikliklere neden olabileceği belirlendi. Sonuç olarak bu tez çalışması, over kanserinde kemodirenç mekanizmalarının TLR1/2 ve ilişkili sinyal yolları ile bağlantılı olabileceğini ortaya koymaktadır.

2020, 113 SAYFA

ANAHTAR KELİMELER: Over Kanseri, TLR1/2, Kemodirenç, BCL2A1, GSTP1, ABCB1

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE TOLL-LIKE RECEPTOR 1/2 DEPENDENT DRUG RESISTANCE IN OVARIAN CANCER

Ovarian cancer is the deadliest type of the gynecological cancers. Although chemotherapy applications include efficient treatment methods, the majority of the patients develop chemoresistance associated with poor survival rates. In addition, there is a lack of therapeutic approaches that can properly prevent or eliminate chemoresistance in ovarian cancer. Toll-like receptors (TLRs) are molecules that play important roles in innate and adaptive immunity with stimulating the release of pro-inflammatory cytokines and interferons in leukocytes for helping to establish an immune response against pathogens and tumors. However, current studies have shown that besides the immune cells, cancer cells can also express TLRs. Furthermore, these cells can significantly improve their proliferative properties and chemoresistance mechanisms with these molecules and associated signaling pathways. Since TLRs can play crucial roles in both the immune system and cancer progression with chemoresistance, it is possible to define them “double-edged swords”. In this study, it was aimed to investigate in detail the relationship between TLRs and ovarian cancer chemoresistance, which is currently a new subject for the literature. For this purpose, potential effects of the heterodimeric TLR1/2 on the cancer progression and chemoresistance were evaluated. Proliferation data confirmed that TLR1/2 and associated signaling pathways increase cell division in ovarian cancer cells and desensitize them to the traditional chemotherapy agent cisplatin. In addition, with the Real-Time PCR experiments, it was determined that this receptor can cause changes in the regulation of chemoresistance related genes such as BCL2A1, GSTP1, and ABCB1, depending on the time intervals. Consequently, this study reveals that chemoresistance mechanisms in ovarian cancer can be associated with TLR1/2 mediated signaling pathways.

2020, 113 PAGES

KEYWORDS: Ovarian Cancer, TLR1/2, Chemoresistance, BCL2A1, GSTP1, ABCB1

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimimin başlangıcından son aşamasına kadar beni her zaman destekleyen, sahip olduğu deneyim ve bilgi birikiminden faydalandığım ve ileride de faydalanmaya devam edeceğim danışman hocam Doç. Dr. Ercan ÇAÇAN'a sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca, tez savunmamı değerlendirmeyi kabul eden ve kattıkları değerler doğrultusunda tezimi daha iyi bir çalışma haline getiren sayın jüri üyelerine de teşekkür ederim.

Hayatım boyunca sevgi ve destekleriyle beni her zaman motive etmiş, bana duydukları hoşgörü ve güven duygusu ile her konuda yanımda olmuş ve bugünlere gelmemdeki en önemli pay sahibi aileme müteşekkirim.

Ayrıca, tez çalışmasının bazı aşamalarında sunmuş olduğu laboratuvar olanakları sebebiyle Doç. Dr. Nihal DELİGÖNÜL hocama da teşekkürlerimi sunarım. İş ve sosyal hayatımda beni yalnız bırakmayan ve desteklerini her koşulda hissettiğim değerli arkadaşlarım Arş. Gör. Çağlar BERKEL, Merve USTA, Esra YILMAZ, Muhsine ÖZEN, Beyza KİBAR ve Halilullah DEMİR'e de çok teşekkür ederim.

BURAK KÜÇÜK

21.12.2020

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
ÖNSÖZ	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR	vii
ŞEKİL LİSTESİ	ix
ÇİZELGE LİSTESİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETLERİ.....	5
2.1. Over Kanseri.....	5
2.2. Over Kanseri Epidemiyolojisi	5
2.3. Over Kanseri Etiyolojisi ve Risk Faktörleri	7
2.3.1. Kalıtım.....	7
2.3.2. Yaş.....	7
2.3.3. Doğurganlık ve emzirme	8
2.3.4. Diyet tercihi	8
2.3.5. Sigara kullanımı	9
2.4. Over Kanseri Tanı ve Tedavi	9
2.5. Over Kanseri Sınıflandırma ve Evreleme.....	11
2.6. Epitelyal Over Kanseri Alt Tipleri.....	14
2.6.1. Tip I over kanseri	14
2.6.2. Tip II over kanseri.....	16
2.7. Over Kanseri Kemoterapi Direnci.....	19

2.7.1. BCL2 proteinlerinin apoptozis regülasyonu ve kemoterapi direncindeki rolü.....	20
2.7.2. Efflux pompalarının hücresel işlevleri ve kemoterapi direncindeki rolü.....	22
2.7.3. Glutasyon s-transferaz (GST) proteinlerinin ksenobiyotik metabolizması ve kemoterapi direncindeki rolü.....	23
2.8. Toll-benzeri Reseptör (TLR) Ailesi.....	26
2.9. TLR'lerin Yapısal Özellikleri.....	27
2.10. TLR'lerin Sınıflandırılması	28
2.11. TLR Aracılı Hücresel Sinyal İletimi	30
2.12. TLR'lerin İnflamatuvar Yanıttaki Rollerini	32
2.13. TLR'ler ve Kanseri İlişkisi	34
2.14. TLR1/2 İlişkili Sinyal Yolakları ve Kanseri.....	38
2.15. Over Kanseri TLR'lerin Rolü	40
3. MATERYAL ve YÖNTEM	43
3.1. Hücrelerin Kültüre Edilmesi.....	43
3.2. Hücre Hatlarının Üzerinde Denenecek TLR1/2 Ligandları Olan Pam3CSK4 ve OxPAPC ile Kemoterapi İlacı Sisplatinin Uygun Konsantrasyonlarda Hazırlanması	45
3.3. Kullanılan Solüsyonların Hücre Canlılığı Üzerine Olan Etkilerinin Belirlenmesi ve Sisplatin'e Ait IC ₅₀ Konsantrasyonlarının Hesaplanması	48
3.4. Total RNA Ekstraksiyonu ve Kantitatif Gerçek-Zamanlı PCR Analizleri	49
3.5. İstatistiksel Analizler.....	52
3.6. Görselleştirmeler.....	52
4. BULGULAR ve TARTIŞMA	53
4.1. Hücre Canlılık Testleri	53
4.1.1. Kemoduyarlı ve kemodirençli over kanseri hücre hatlarında sisplatinin sitotoksik etkilerinin belirlenmesi	53

4.1.2. TLR1/2 aktivasyonunun over kanseri hücrelerindeki proliferatif/sitotoksik etkilerinin belirlenmesi	58
4.1.3. TLR1/2 blokajının over kanseri hücrelerinde proliferatif/sitotoksik etkilerinin belirlenmesi	63
4.1.4. TLR1/2 aktivasyonunun sisplatin kaynaklı sitotoksitesiye olan etkilerinin belirlenmesi	69
4.2. Gen Ekspresyon Analizleri: Gerçek Zamanlı PCR (Real-Time PCR) Testleri.....	73
4.2.1. Kemoduyarlı ve kemodirençli over kanseri hücrelerinde direnç ile ilişkili genlerin RNA ekspresyonu bakımından karşılaştırılması	73
4.2.2. OV2008 ve C13 hücrelerinde TLR1/2 aktivasyonunun BCL2A1, GSTP1 ve ABCB1 ekspresyonu üzerine olan etkilerinin belirlenmesi	75
4.2.2. OV2008 ve C13 hücrelerinde TLR1/2 blokajının BCL2A1, GSTP1 ve ABCB1 ekspresyonu üzerine olan etkilerinin belirlenmesi	77
4.2.3. OV2008 ve C13 hücrelerinde TLR1/2 aktivasyonun ve blokajının zamana bağlı BCL2A1, GSTP1 ve ABCB1 ekspresyonlarındaki rolü.....	79
4.3. Verilerin Tartışılması	85
5- SONUÇ ve ÖNERİLER	92
6. KAYNAKLAR	96
ÖZGEÇMİŞ.....	113

SİMGELER VE KISALTMALAR

Kısaltmalar	Açıklama
ABC	ATP bağlayıcı kaset transporter'ı
ATP	Adenozin trifosfat
BHOK	Berrak hücreli karsinom
DAMP	Hasar ilişkili moleküler patern
DC	Dendritik hücre
DDSK	Düşük dereceli seröz karsinom
DNA	Deoksiribonükleik asit
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
EGFR	Epidermal büyüme faktörü reseptörü
EMT	Epitelyal mezenkimal transisyon
ENOK	Endometrioid over kanseri
FBS	Fötal sıgır serumu
FIGO	Uluslararası jinekoloji ve obstetrik federasyonu
GSH	Glutasyon
GST	Glutasyon s-transferaz
HMGB1	High mobility group box 1
HSP60	Isı şok proteini 60
IFN	İnterferon
IL	İnterlökin
LPS	Lipopolisakkarit
MAPK	Mitojenle etkinleşen protein kinaz
MDR	Çoklu ilaç direnci / multi drug resistance
MHC	Majör histokompatibilite kompleksi
miRNA	Mikro RNA
MMR	Yanlış eşleşme tamiri

MOK	Müsinöz over kanseri
MYD88	Miyeloid farklılaştırıcı primer yanıt 88
NER	Nükleotid eksizyon tamiri
NF-κB	Nükleer faktör kappa B
NK	Doğal öldürücü hücresi
OXPA PC	Oksidize 1-palmitoil-2-arakidonil-sn-gliserol-3-fosforilkolin
PAM3CSK4	Pam3CysSerLys4
PAMP	Patojen ilişkili moleküler patern
PBS	Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
PIK3CA	Fosfatidilinositol-4,5-bisfosfat 3-kinaz katalitik altbirim alfa
PRR	Patern tanıma reseptörleri
RNA	Ribonükleik asit
RPM	Dakikadaki devir sayısı
siRNA	Small interfering ribonükleik asit
TIR	Toll-interlökin reseptörü
TIRAP	TIR domaini içeren adaptör protein
TLR	Toll-benzeri reseptör
TME	Tümör mikroçevresi
TNM	Tümör nod metastaz
TRIF	TIR-domaini içeren adaptörle-indüklenen interferon- β
UICC	Uluslararası kanser savaş örgütü
VEGF	Vasküler endotelial büyüme faktörü
YDSK	Yüksek dereceli seröz karsinom
μM	Mikro molar

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil

Sayfa

Şekil 2.1. Türkiye’de kadınlarda en sık teşhis edilen ve ölümlere sebep olan kanser türlerinin yüzdeleri	6
Şekil 2.2. Over kanserlerinin histolojik olarak sınıflandırılması.....	12
Şekil 2.3. GSTP1’in glutatyon ve ksenobiyotik konjugasyonu.....	25
Şekil 2.4. Toll-benzeri reseptörlerin genel yapısı.....	27
Şekil 2.5. Toll-benzeri reseptörler aracılı sinyal iletim yolları.....	31
Şekil 2.6. Tümör mikroçevresinde TLR aktivasyonu ve potansiyel yanıtları.....	38
Şekil 3.1. Kültürdeki over kanseri hücrelerinin mikroskop görüntüsü.....	44
Şekil 3.2. Pam3CSK4 ve OxPAPC’nin moleküler yapısı.....	45
Şekil 4.1. Çeşitli sisplatin konsantrasyonlarında over kanseri hücrelerinin yüzde canlılık verileri	54
Şekil 4.2. 80 µM’lık sisplatin uygulaması sonrası over kanseri hücre hatlarının mikroskop görüntüleri	55
Şekil 4.3. OV2008 ve C13 hücre hatlarında sisplatine ait IC50 dozlarının belirlenmesi	56
Şekil 4.4. IC ₅₀ dozlarındaki sisplatin uygulaması sonrası over kanseri hücre hatlarının mikroskop görüntüleri.....	57
Şekil 4.5. Pam3CSK4’ün (P3C) over kanseri hücre proliferasyonuna etkisi.....	59
Şekil 4.6. 0.1 µg/mL’lik Pam3CSK4 (P3C) uygulaması sonrası OV2008 hücrelerinin mikroskop görüntüsü	60
Şekil 4.7. 0.1 µg/mL’lik Pam3CSK4 (P3C) uygulaması sonrası C13 hücrelerinin mikroskop görüntüsü.....	61
Şekil 4.8. 5 µg/mL’lik Pam3CSK4 (P3C) uygulaması sonrası OV2008 ve C13 hücrelerinin mikroskop görüntüsü	62
Şekil 4.9. OxPAPC uygulamasının over kanseri hücrelerindeki yüzde canlılık verilerine etkisi.....	65

Şekil 4.10. 0.1 µg/mL’lik OxPAPC (OXp) uygulaması sonrası OV2008 hücrelerinin mikroskop görüntüsü	66
Şekil 4.11. 0.1 µg/mL’lik OxPAPC (OXp) uygulaması sonrası C13 hücrelerinin mikroskop görüntüsü.....	67
Şekil 4.12. 5 µg/mL OxPAPC (OXp) uygulaması sonrası OV2008 ve C13 hücrelerinin mikroskop görüntüsü	68
Şekil 4.13. Sisplatin ve Pam3CSK4 kombinasyonunun hücre proliferasyonuna olan etkisi	70
Şekil 4.14. Sisplatin ve Pam3CSK4 (P3C) kombinasyon uygulaması sonrası OV2008 hücrelerinin mikroskop görüntüsü.....	71
Şekil 4.15. Sisplatin ve Pam3CSK4 (P3C) kombinasyon uygulaması sonrası C13 hücrelerinin mikroskop görüntüsü	72
Şekil 4.16. OV2008 ve C13 hücre hatlarında TLR2 ekspresyonunun rölatif olarak kıyaslanması.	73
Şekil 4.17. OV2008 ve C13 hücrelerinin BCL2A1, GSTP1 ve ABCB1 gen ekspresyonları bakımından rölatif olarak kıyaslanması	74
Şekil 4.18. Pam3CSK4 uygulamasının over kanseri hücre hatlarında BCL2A1, GSTP1 ve ABCB1 gen ekspresyonlarına olan etkileri.....	76
Şekil 4.19. OxPAPC uygulamasının over kanseri hücre hatlarında BCL2A1, GSTP1 ve ABCB1 gen ekspresyonlarına olan etkileri.....	78
Şekil 4.20. OV2008 hücrelerinde çeşitli zaman aralıklarında Pam3CSK4 uyarımının BCL2A1 regülasyonuna etkisi	80
Şekil 4.21. C13 hücrelerinde çeşitli zaman aralıklarında Pam3CSK4 uyarımının BCL2A1 regülasyonuna etkisi.....	80
Şekil 4.22. C13 hücrelerinde çeşitli zaman aralıklarında Pam3CSK4 uyarımının GSTP1 ve ABCB1 regülasyonuna etkisi	81
Şekil 4.23. Çeşitli zaman aralıklarında OxPAPC uygulamasının OV2008 hücre hattında BCL2A1 gen ekspresyonuna olan etkisi.....	82
Şekil 4.24. Çeşitli zaman aralıklarında OxPAPC uygulamasının C13 hücre hattında BCL2A1 gen ekspresyonuna olan etkisi	83
Şekil 4.25. Çeşitli zaman aralıklarında OxPAPC uygulamasının C13 hücre hattında GSTP1 ve ABCB1 gen ekspresyonuna olan etkisi	84

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge

Sayfa

Çizelge 2. 1. 100.000 kadında izlenen over kanseri vaka ve mortalite sıklığının belirli yaş aralıklarına göre değerleri	8
Çizelge 2. 2. Over kanserinin FIGO'ya göre evrenlenmesi ve TNM karşılıkları	13
Çizelge 2. 3. Toplam vakalara göre Tip I ve Tip II over kanserlerinin karakteristikleri	18
Çizelge 2. 4. Toll-benzeri reseptörler ve ilgili eksojen kökenli ligandları.....	28
Çizelge 2. 5. Toll-benzeri reseptörler ve ilgili endojen kökenli ligandları	29
Çizelge 2. 6. Klinik verilere göre TLR ekspresyonunun kanser hastaları üzerindeki etkileri	36
Çizelge 3. 1. Kantitatif Gerçek-zamanlı PCR testlerinde kullanılan primer sekansları.....	51

1. GİRİŞ

Over kanseri, kadınlarda izlenen en kötü sağ kalım değerlerine sahip kanser türlerinden bir tanesidir. Ayrıca, kadın üreme sistemiyle ilişkili en ölümcül malignitedir. Teşhis edilen popülasyonunun çoğunlukla ileri evre hastalardan oluşması, over kanserini bu denli tehlikeli kılan faktörlerin başında gelmektedir (Umakanthan ve ark., 2019). Bu durum, invaziv ve metastatik faaliyet gösteren hücreleri kontrol altında tutmanın veya tedavi etmenin oldukça zor olmasından kaynaklanmaktadır. Erken evreli hastalarda süreç genellikle asemptomatik olarak ilerlerken, teşhis için spesifik biyomarkırların yeterli olmamasından söz edilmektedir (Lawrenson ve Gayther, 2009). Dramatik şekilde, 5 yıllık sağ kalım oranının, erken evrelerde %40-90, ileri evrelerde ise %3-19 arasında değişkenlik sergilemesi, bu kanserin teşhis ve tedavisinde yaşanan problemleri özetler niteliktedir (Whitwell ve ark., 2020).

Kemoterapi direnci, anti-tümör etkili ilaçlara karşı hücrelerin duyarlılığını kaybettiği durumda ortaya çıkan bir davranıştır. İstatistikler, kanser kaynaklı ölümlerin %90'lık bir kısmında direnç mekanizmalarının direkt olarak etkili olduğunu göstermektedir (Bukowski ve ark., 2020). Oksidatif stres, epigenetik regülasyon, efflux pompaları, ilaç detoksifikasyonu veya hedef moleküllerdeki değişimler, epitelyal mezenkimal transisyon, hücre ölümünün inaktivasyonu, DNA hasar tamiri ve mutasyonlar gibi çeşitli faktörler bu davranışla ilişkilidir (Housman ve ark., 2014). Over kanserinde ise başlangıçta uygulanan tedavi, hastaların %60-80'lik bölümünde iyi sonuçlar verse de, zamanla bireylerin büyük bir kısmında aşılması mümkün olmayan direnç davranışı gelişmektedir (Ali ve ark., 2013; Cacan ve ark., 2014). Ayrıca, ortalama yaşam süresi 9 ila 12 ay arasında sınırlandığından, kemoterapi direnci mekanizmalarının daha iyi anlaşılmasına ve efektif yöntemlerin geliştirilmesine olanak tanıyacak özgün çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır (van Zyl ve ark., 2018).

Toll-benzeri reseptörler (TLR'ler), patern tanıma reseptörlerinin (PRR) alt üyelerinden biri olup, organizmada ortaya çıkan immün yanıtta etkin bir rol oynamaktadır (Mukherjee ve ark., 2019). Bu yapılar, özellikle doğal bağışıklıkta görevli hücrelerin fonksiyonları için önem arz

etse de, adaptif bağışıklıkta yer alan lökositlerin efektör faaliyetlerini de düzenleyebilen bir regülatör konumundadır. Dendritik hücreler (DC), monositler, makrofajlar, T ve B lenfositleri, doğal öldürücü hücreleri (NK) ve hatta immün olmayan hücreler dahi (fibroblastlar, epitel hücreler gibi) TLR eksprese etme kapasitesi gösterebilmektedir (Liu ve Zhao, 2007; Kawasaki ve Kawai, 2014). Şimdiye kadar insanda karakterize edilen 10 farklı TLR (TLR -1, -2, -3, -4, -5, -6, -7, -8, -9 ve -10), patojen ilişkili moleküler paternleri (PAMP) ve hasar ilişkili moleküler paternleri (DAMP) tanıyarak hücrel alt sinyal yollarının aktivasyonu aracılığıyla savunma yanıtının oluşumuna yardımcı olmaktadır.

TLR ailesinin önemli elemanlarından olan TLR1 ve TLR2, heterodimerik bir yapı oluşturarak TLR1/2 adı verilen kompleksler halinde plazma membranında lokalize olmaktadır. Dimerizasyon sayesinde, ekstraselüler ortamda bulunan PAMP ve DAMP'ların hücreler tarafından algılanabilirliği önemli ölçüde kolaylaşmaktadır. TLR1/2, TLR2'nin oluşturduğu bir diğer yapı olan TLR6/2 ile birlikte, başta eksojen kaynaklı bakteriyel diaçil ve triaçil lipopeptidler ve lipoteikoik asitler olmak üzere, konak kaynaklı (endojen) ısı şok proteinlerini (HSP) ve high mobility group box (HMGB) proteinlerini de tanıyabilmektedir (Jimenez-Dalmaroni ve ark., 2016). İlgili ligandlarını bağlayan bu kompleksler, benzer şekilde nükleer faktör kappa B (NF- κ B) ve mitojenle etkinleşen protein kinaz (MAPK) gibi aşağı akışta yer alan hedef moleküllerin aktivasyonunu sağlayarak pro-inflamatuvar sitokin ve interferonların sentezini ve bu sentez ürünlerinin ekstraselüler ortama sekresyonunu uyarmaktadır. Sekresyonunun olduğu bölgelerde ise çeşitli tipte immün hücre infiltrasyonunu takiben ani ya da kronik inflamatuvar yanıt ortaya çıkmaktadır (Yamamoto ve Takeda, 2010). Bugün diğer TLR'ler için geçerli olduğu gibi, TLR1/2'nin karakteristiği ve sebep olduğu immünite ile ilişkili hücrel yanıtları hakkında pek çok çalışma literatürde yer bulmaktadır. TLR1/2'ye bağlanan sentetik triaçil lipopeptidler sayesinde *in vitro* ve *in vivo* ortamda bu reseptörler ile regüle edilebildiği düşünülen hastalıklarının araştırılması kolaylaşmaktadır. Özellikle anti-viral, anti-bakteriyel ve anti-kanser etkileri bulunan sitotoksik T hücrelerinin, DC'lerin ve NK'lerin proliferasyonunu ve aktivasyonunu sağlamak (Cen ve ark., 2019) ya da B hücrelerinin antijen ve sitokin salınımı yeteneklerini arttırmak; bu kompleksler aracılığıyla organizmada gerçekleşen immünite ile ilişkili olayların tespitini

mümkün kılmaktadır (Agrawal ve Gupta, 2011). Bununla beraber, romatoid artrit, multiple sklerozis, diabet ya da kanser gibi çeşitli hastalıkların seyrinde TLR'lerin de rol oynadığı bilindiğinden, TLR1/2 ya da diğer reseptörlerin aktif ya da inaktif olduğu durumlarda regüle edilen hücresel yanıtlar daha detaylı olarak incelenebilmektedir (Hosseini ve ark., 2015).

İnflamasyon, organizma içerisindeki dokulara ya da enfeksiyon ajanlarına karşı vücut savunma sistemi elemanları tarafından geliştirilen koruyucu bir mekanizmadır. Ancak, kronik ya da ani şekilde ortaya çıkabilen bu davranış, vücut yapılarında çeşitli hasarlara yol açabilmektedir. Hasar gören bölgelerde immün hücrelerin infiltrasyonunu takiben onarımının sağlanması amacıyla yoğun miktarda pro-inflamatuvar sitokin, kemokin ve büyüme faktörlerinin salınımına rastlanmaktadır (Coussens ve Werb, 2010). Rejeneratif etkileri bulunan bu moleküllerin uzun süre ekstraselüler ortamda yer edinmesi, kronik inflamasyona ve zamanla tümör gelişimi ile birlikte tümör mikroçevresinin (TME) şekillenmesine de davetiye çıkarabilmektedir (Charbonneau ve ark., 2014). Bu nedenle, inflamasyonun kanser gelişimini indükleyen en temel faktörlerden bir tanesi olduğu düşünülmektedir (Singh ve ark., 2019). Ayrıca, TLR'lerin de inflamasyon ve TME'de önemli bir role sahip olduğu ortaya koyulmaktadır. Şaşırtıcı şekilde, son yıllarda birçok çalışma kanser hücrelerinin yoğun şekilde TLR eksprese edebildiğini göstermektedir. Bu reseptörler ve ilişkili sinyal yolları ile hücrelerin TME'yi ve lökosit davranışlarını kayda değer biçimde düzenleyebildiklerine, hayatta kalım mekanizmalarını anti-apoptotik proteinlerin ekspresyonu ile sağladıklarına ve anjiyogenez, migrasyon ve büyüme faktörleri ile ilişkili genlerini up-regüle edebildiklerine dikkat çekilmektedir (Sato ve ark., 2009). Normal şartlarda, immün hücrelerde eksprese olduklarında anti-tümör etkili yanıtlar oluşturduğu bilinen TLR'lerin, kanser hücrelerine agresif özellikler kazandırması; literatürde bu yapıların “iki ucu keskin bıçak” şeklinde tanımlanmasına neden olmaktadır. Örneğin; TLR1/2 akciğer kanserli fare modellerinde makrofaj polarizasyonunu sağlayarak anti-tümör yanıtını indüklerken (Deng ve ark., 2019), lenfomada siklin D1 ve D3 artışına neden olarak hücrelere hızlı bölünme yeteneği kazandırmaktadır (Mastorci ve ark., 2016). Ek olarak, TLR7 ve TLR8'in akciğer, TLR4'ün over kanserinde kemoterapi direncini etkileyen genlerin regülatörü olabileceği de gösterilmektedir (Basith ve ark., 2012). Over kanserinde ise

özellikle TLR2, TLR3, TLR4 ve TLR5 hücre yüzey ekspresyonları artan ve fonksiyonel olarak aktif reseptörlerdir (Yang ve ark., 2017). Bu yapılardan TLR5'in, TLR7 ile birlikte epitelyal mezenkimal transisyonu (EMT) kolaylaştırarak, tümörlere metastatik kabiliyetler kazandırabildiği (Park ve Kim, 2017), TLR4 ve ilişkili sinyal yollarının ise taksol bazlı ilaçlara karşı kemodirenç davranışına neden olabileceği tespit edilmiştir (Sun ve ark., 2014). Bununla beraber, TLR1/2 kompleksinin over kanseri üzerinde sergilediği potansiyel etkiler henüz tam anlamıyla bilinmemektedir. Bu yüzden, bu kanserin ve ilişkili mikroçevresinin TLR'ler aracılığıyla geliştirebileceği tümör progresyonu ve kemodirenç mekanizmalarını anlayabilmek için TLR1/2 kompleksinin de dahil olduğu yeni ve daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır (Vlad ve ark., 2018).

Tez çalışmasında, TLR1/2'nin over kanserinin progresyonuna ve kemoterapi direncine neden olan mekanizmalar üzerindeki potansiyel rollerinin aydınlatılması amaçlandı. Bu doğrultuda, kemoduyarlı hücre hattı OV2008'de ve onun kemodirençli klonu C13'te, reseptörün sentetik triaçil lipopeptidler olan Pam3CSK4'ün yardımıyla aktifleştiği (Oliveira-Nascimento ve ark., 2012; Leifer ve Medmedev, 2016) ya da OxPAPC aracılığıyla bloke olduğu (Blüml ve ark., 2005) iki ayrı durumda proliferasyon/sitotoksosite ve dirençle ilişkili genlerin ekspresyonları yorumlandı. Elde edilen sonuçlar, TLR1/2 ve ilişkili sinyal yollarının kanser progresyonuna etki edebileceğini ve direnç davranışını regüle edebileceğini gösterdi. Bu çalışma, gelecekte over kanserinde TLR odaklı potansiyel stratejilerin geliştirilmesinde araştırmacılara katkılar sağlayacak ve literatür için bir referans kaynağı oluşturacaktır.

2. LİTERATÜR ÖZETLERİ

2.1. Over Kanseri

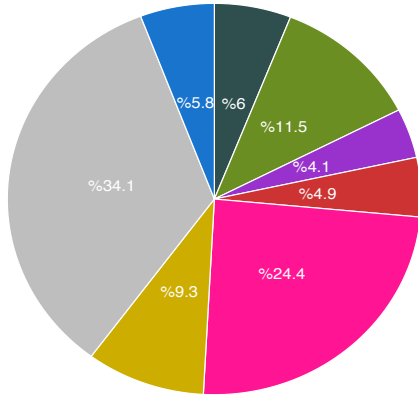
Kadın üreme sisteminin en önemli anatomik elemanlarından biri olan overler (yumurtalıklar) yaklaşık 2-3 cm boyunda ve badem büyüklüğündeki yapılardır. Pelvis boşluğunda lokalize olup, over ligamentleri ile uterusu bağlanırlar. Özellikle oogenez ve hormon üretiminden sorumludurlar. Over yapılanması oositlere farklılaşan endoderm kökenli germ hücreleri, östrojen ve progesteron sentezinden sorumlu endokrin ve interstitial hücreler ile over dokusunu kaplayan epitel hücrelerinden sağlanır. Bu üç farklı hücre tipinin de over kanserinin kökeni olabileceği gösterilmektedir (Romero ve Bast, 2012). Ancak, tüm vakalar değerlendirildiğinde hastalığın çok büyük oranda epitelyumdan kaynaklandığı bir gerçektir. (Latha ve ark., 2014; Nezhat ve ark., 2015). Temel görüş; kanserin overlerde başlayıp tipik yumurtalık hücrelerinden ayrı bir fenotipe diferansiye olması ve metastatik faaliyetlerinden önce pelvis ve abdominal boşluklara invazyonu şeklindedir (Kurman ve Shih, 2008). Bu bilgilere ek olarak, bugün birçok çalışma fallop tüplerinin distal uçlarında gelişen tümörlerin de bu hastalığın kökeni olabileceğini bildirmektedir (Amerikan Kanser Topluluğu, 2018).

2.2. Over Kanseri Epidemiyolojisi

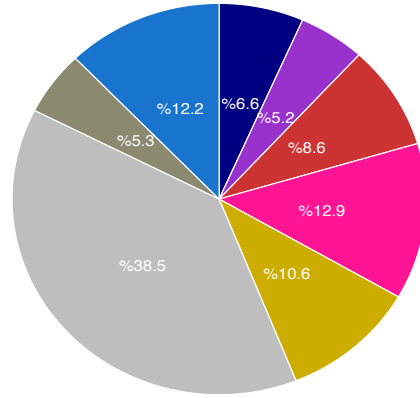
Over kanseri, serviks ve rahim kanserinden sonra dünyada en sık izlenen üçüncü jinekolojik kanser türüdür. Bununla beraber, daha kötü prognoz ve mortalite değerleriyle ilişkilidir (Momenimovahed ve ark., 2019). Her yıl over kanseri sebebiyle yaklaşık 240.000 yeni vaka ve buna bağlı 150.000'den fazla ölüm kayıtlara geçmekte olup, dünya çapında Batı ve Orta Avrupa ülkeleri en çok etkilenen bölgeler olarak ön plana çıkmaktadır (Reid ve ark., 2017). Ayrıca, 2020 yılında kanser ilişkili ölümler arasında her 100 ölümden 5'inin over kanseri sebebiyle olması beklenmektedir (Siegel ve ark., 2020).

Bugün birçok çalışma over kanserinin belirli ırklarda göreceli olarak farklı oranlarda saptandığını göstermektedir. Örneğin, Amerika Birleşik Devletleri'nde en çok teşhis sırasıyla beyazlara (100.000'de 12,2), hispaniklere (100.000'de 10,6), Asya/Pasifik ülke kökenlilerine (100.000'de 9,5) ve siyahlara (100.000'de 9,4) koyulmaktadır (Peres ve ark., 2018). Ülkemizde ise bu hastalık, kadınlarda en yaygın 7. kanser türü olup (100.000'de 6,4), jinekolojik anlamda 2012 - 2016 yılları arasında over kanseri izlenme sıklığı ikinci sıradadır (Şencan ve Keskinlik, 2017). GLOBOCAN verilerine göre Türkiye'deki tahmini over kanseri teşhis ve ilişkili ölüm değerleri Şekil 2.1.'de gösterilmektedir.

En sık teşhis edilen kanser türleri



Kanser türlerinin kanser ilişkili ölümlerdeki yüzdeleri



Kanser Tipi Akciğer Diğer Meme Over Tiroid Beyin/Sinir Kolorektal Mide Pankreas Uterus Korpus

GLOBOCAN 2018 Türkiye - Kadınlarda kanser istatistikleri

Şekil 2. 1. Türkiye'de kadınlarda en sık teşhis edilen ve ölümlere sebep olan kanser türlerinin yüzdeleri (GLOBOCAN, 2018)

2.3. Over Kanseri Etiyolojisi ve Risk Faktörleri

Over kanseri heterojen bir hastalık olup, geç semptom gösteren ve hızlı yayılan bir kanser türüdür. Etiyolojisi günümüzde halen tam anlamıyla açıklanamamaktadır. Bununla beraber, hasta yaşının önemli bir belirleyici olduğu düşünülmektedir. Özellikle 63 yaş ve üzerindeki bireylerin risk grubu dahilinde olduğu bilinmektedir (Assis ve ark., 2018). Kalıtım, etnik köken, ilaç ve sigara kullanımı, diyet, obezite ve doğurganlık gibi çeşitli faktörler de over kanser gelişimiyle ilişkili olabilmektedir.

2.3.1. Kalıtım

Kalıtımın bu hastalığa olan etkisi birçok çalışmada kanıtlanmıştır. Birinci ve ikinci dereceden akrabalarında over kanseri geçmişi olan kişilerin, herhangi bir over kanseri öyküsü olmayanlara nazaran ortalama 3 kat daha fazla riskle karşı karşıya olduğu bildirilmektedir. Ayrıca, kalıtsal kolorektal karsinomlu aile öyküsü olan kadınlarda bu ihtimal %12 daha yüksek iken (Bandera, 2005), meme kanseri belirteçlerinden olan DNA onarımında görevli BRCA1 ve BRCA2 gen mutasyonlarının, bireylerin %10'unda var olduğu ortaya konulmaktadır (Hunn ve Rodriguez, 2012).

2.3.2. Yaş

Over kanseri her yaştan kadında izlenebilecek bir olgu olup, ilerleyen yaşlarla birlikte menopoz sonrası da dahil olmak üzere kanser riski artış göstermektedir. Özellikle orta yaş ve üzeri, kritik yaş aralıkları olarak kabul edilmektedir.

Çizelge 2. 1. 100.000 kadında izlenen over kanseri vaka ve mortalite sıklığının belirli yaş aralıklarına göre değerleri (Michelle ve Evans, 2009)

Yaş aralığı	Vaka sıklığı	Mortalite
0 ve 20	0.7	0.04
20 ve 49	6.6	2
50 ve 64	26.9	16
65 ve 74	48.6	36.1
75 ve üzeri	55.6	55.2

2.3.3. Doğurganlık ve emzirme

Doğurganlık ve emzirmenin over kanseri riskini azalttığı bilinmektedir. Bir çalışma, ilk doğumunu gerçekleştiren ve 6 aya kadar emziren bireylerde epitelyal over kanseri riskinin anlamlı şekilde azaldığını göstermektedir. Ayrıca, iki çocuklu ve emziren bireylerde ise kansere yakalanma riski %50'ye kadar azalmaktadır (Sung ve ark., 2016). Destekleyici olarak, fertilitite/infertilitite gözetmeksizin, 9000 kişi üzerinde gerçekleştirilen bir çalışmada ise nulipar kadınların çocuklu kadınlara kıyasla over kanserine yakalanma ihtimalinin %24 daha fazla olduğu saptanmıştır (Gaitskell ve ark., 2017).

2.3.4. Diyet tercihi

Diyet ve over kanseri ilişkisini araştıran birkaç bilimsel çalışma iki olgu arasında ilişki olabileceğini bildirmektedir. Özellikle yeşil yapraklı sebze tüketen ve diyetine tam tahıllı gıdaları entegre eden bireylerde over kanseri riski, yüksek miktarlarda tatlı ve süt ürünleri tüketenlere göre daha azdır. Ancak, alkol ve over kanseri arasındaki etkileşime dair henüz kesin bir yargıya varılamamaktadır (McLemore ve ark., 2009).

2.3.5. Sigara kullanımı

Sigaranın musinöz kanserlere olan etkisi halihazırda bilinmektedir. Sigara içen kişilerde musinöz over kanseri ve borderline tümör oluşumu da belirgin biçimde artmaktadır (Faber ve ark., 2013). Yaklaşık 30.000 katılımcıya ait veri kümesi içeren bir başka çalışmada beklenildiği gibi, over kanseri hastalarında sigara kullanan bireylerin hiç kullanmamış kişilere göre risk grubunda olduğu gösterilmektedir (Collaborative Group on Epidemiological Studies of Ovarian Cancer, 2012).

2.4. Over Kanseri Tanı ve Tedavi

Over kanserinde semptomlar karsinogenezin başlangıcında genellikle düşük seviyede seyrederken, teşhis edilen hastaların önemli bir kısmı ileri evre hastalarıdır. Oysa ki yapılan çalışmalar, tanı koyulan bireylerin ancak dörtte birini oluşturan I ve II. evre kanser hastalarının tedaviye olumlu yanıt verme şansının %70 ila %90 arasında olduğunu göstermektedir. Ayrıca, III ve IV. evre hastalarına kıyasla, 5 yıllık sağ kalım oranı erken evrelerde 3 kat daha yüksektir (Mathieu ve ark., 2018). Bununla beraber, teşhis olanaklarını kısıtlayan bazı faktörler ise şu şekilde özetlenebilmektedir:

- Kesin tanı için cerrahi yöntemlere ihtiyaç duyulması,
- Malignite için gerekli histolojik prekürsör lezyonların gözlemindeki eksiklik,
- Hastalarda teşhisi kolaylaştırabilecek belirli biyobelirteçlerin erken evrelerde yeterli düzeyde bulunmaması (Rauh-Hain ve ark., 2011).

Over kanseri teşhisinde çeşitli tanı yöntemleri ön plana çıkabilmektedir. Cancer antigen 125 (CA125) malign over kanserinde vücutta seviyesi normale kıyasla önemli oranda artan glikoprotein yapılı bir tümör belirteçidir (Cheung ve ark., 2018). Aynı zamanda, survival analizleri için iyi bir kaynak olup, serum içi seviyelerinin azaldığı durumlarda iyiye giden prognoz değerleri ile ilişkili olmaktadır (Gupta ve Lis, 2009). CA125 over kanserinin teşhisini kolaylaştıracak en güçlü biyobelirteçlerden biri olsa da, bu molekülün erken

evredeki hastalarda tanı açısından tek başına yeterli olmadığı öngörülmektedir. CA125 spesifik olarak ileri evre hastaların büyük çoğunluğunda yükselirken, I. evredeki bireylerin yalnızca yarısında artış göstermektedir (Marcus ve ark., 2014). Ayrıca, serum CA125 seviyeleri yalnızca over kanserine spesifik olmayıp, iyi ve kötü huylu farklı tip tümörlerle, hatta menstrual siklus ve sigara kullanımı gibi durumlarla da ilişkili olabilmektedir (Aust ve Seebacher-Shariat, 2020). Özellikle malign meme, gastrik, non-Hodgkin lenfoma gibi kanser türlerinde de CA125 konsantrasyonu yükselmektedir (Scholler ve Urban, 2007).

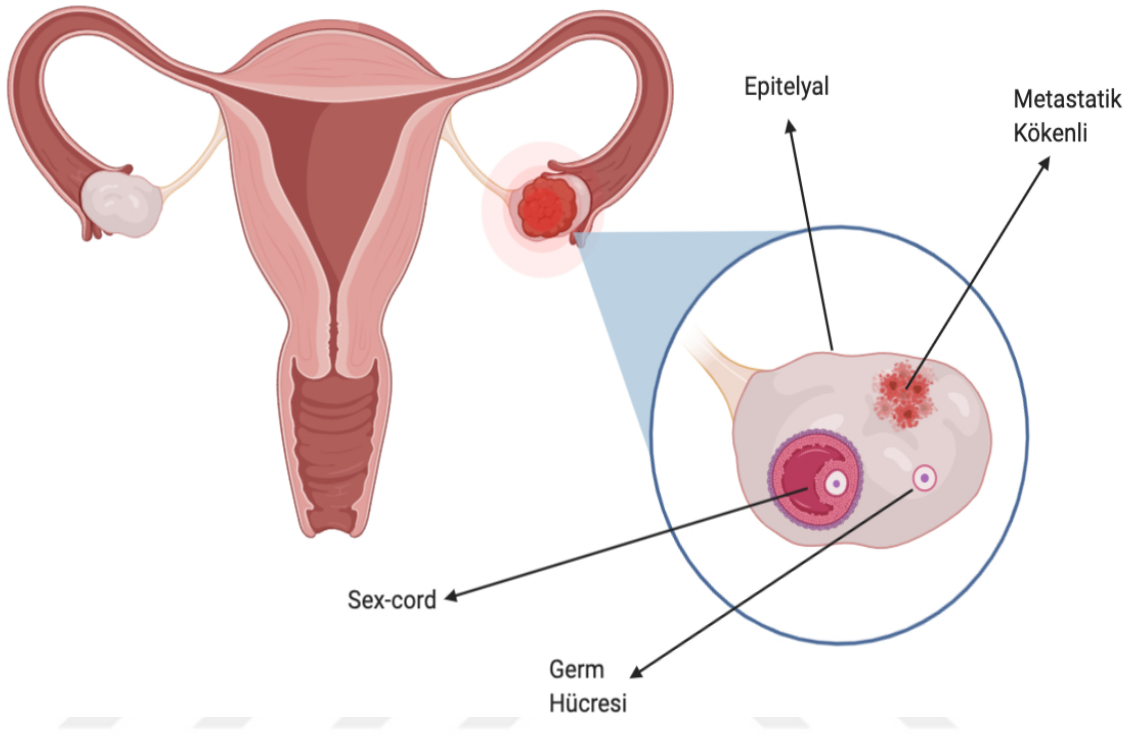
Ultrasonografi ile görüntüleme over kanseri tanısında tercih edilen yöntemlerden biridir. Bu yöntemde cihazdan yayılan ses dalgaları monitöre doku ile ilişkili görüntüleri sunmaktadır. Ultrasonografide transvajinal yöntem tercih edilerek, CA125 verilerinin kombinasyonu şeklinde bir tarama yapılabilir. Görüntüleme işlemi sonrası tümör varlığının tespiti ile CA125 seviyesinin 35U/ml'den fazla olduğu durumlarda malignite indeksi hesaplanmakta ve indeksi 25'ten fazla olan bireyler yüksek kanser riskli hasta kategorisine alınmaktadır (Gupta ve ark., 2019). Ultrasonografi dışında, CT scan (bilgisayarlı tomografi), MRI (manyetik rezonans görüntüleme), PET/CT (pozitron emisyon tomografisi/CT) ve fotoakustik görüntüleme yöntemleri de çeşitli amaçlar doğrultusunda tercih edilebilmektedir (Di Lorenzo ve ark., 2018).

Önerilen yöntemlere rağmen, over kanseri hastalarının büyük çoğunluğu ileri evrelerde teşhis edilebildiğinden tedavi yöntemleri yüksek oranda yanıtız kalmaktadır. Özellikle kanserin histolojik olarak heterojen bir tutum göstermesi uygun tedavi yöntemlerinin dizaynını ve teşhis için gerekli belirteçlerin güvenilirliğini azaltmaktadır. Bununla beraber, tercih edilen tedavinin önceliği kanser progresyonunu kontrol altına alabilmek ve hastalıkla ilişkili semptomları en aza indirmektedir. Erken evrelerde standart terapi, tümör dokusunun sitoreduktif cerrahi ile alınmasını ve ardından uygulanan platin bazlı kemoterapiyi içerirken, ileri evredeki hastalarda (III ve IV. evre) cerrahi her zaman tek seçenek değildir; çünkü kanser çoktan karaciğere yayılım göstermiş vaziyettedir (Cortez ve ark., 2017).

Sitoredüktif cerrahi uygulanan hastalar (II. evre ve üzeri) over kanserinin histolojik tipine göre bir platin bazlı adjuvan kemoterapiye tabii tutulur. Bu adjuvan terapisi, platin bazlı ilaçların (sisplatin ve karboplatin), taksanların (paklitaksel ve dokataksel), anti-anjiyogenik ajanların (bevacizumab, nintedanib, trebananib ve pazopanib) ve diğer ilaçların (lipozobal, doksorubisin ve germisitabin) kombinasyonlarını içermektedir (Matulonis ve ark., 2016). Cerrahi ve takiben kemoterapötik yöntemler, özellikle ileri evre over kanseri hastalarında belirli zaman sonunda işe yaramamaktadır. Hatta, bu bireylerin büyük çoğunluğunda tedavi sonrası 18-24 ay içerisinde nüksetme vakalarına rastlanmaktadır (Ushijama, 2010).

2.5. Over Kanserinde Sınıflandırma ve Evreleme

Over kanseri heterojen bir kanser türü olduğundan uygun şekilde kategorize edilmeli ve evrenmelidir. Sınıflandırma ve evreleme yöntemleri ile hastalarda tümör hücrelerinin karakteristiklerinin bilinmesi, bu karakteristikler doğrultusunda hastalığın seyri hakkında tahminler yürütülmesi, uygun tedavi uygulamalarının organize edilmesi ve ailesel kanser öyküsünün belirlenmesi kolaylaşmaktadır (Duska ve Kohn, 2017). Histolojik olarak sınıflandırıldığında over kanserleri: epitelyal tümörler, sex cord-stromal tümörler, germ hücresi tümörleri ve karışık-hücreli tümörler/metastatik orijinli tümörler olmak üzere 4 kısımda incelenmektedir (Rojas ve ark., 2016; Kurman ve ark., 2014).



Şekil 2. 2. Over kanserlerinin histolojik olarak sınıflandırılması (Kurman ve ark., 2014)

Over kanserinde evreleme histolojik sınıflandırma kadar önem arz eden başka bir konudur. Erken evre kanserlerinin kategorizasyonu tümör progresyonunun tanımlanması ve hastaları alt gruplara ayırarak bu gruplar içerisinde tedavi yöntemlerini ve sağ kalım verilerinin analiz edilmesi açısından gereklidir (Montavon Sartorius ve ark., 2018). Evreleme prosedürü için Uluslararası Jinekoloji ve Obstetrik Federasyonu Komitesi (FIGO) tarafından önerilen sınıflandırma yöntemi tercih edilmektedir. Bu yöntem, Çizelge 2.2.'de ayrıca Uluslararası Kanser Savaş Örgütü (UICC) tarafından sağlanan Tümör Nod Metastaz (TNM) sistemindeki karşılığıyla birlikte belirtilmektedir.

Çizelge 2. 2. Over kanserinin FIGO'ya göre evrenenmesi ve TNM karşılıkları (Prat; FIGO Jinekolojik Onkoloji Komitesi, 2015)

FIGO		TNM
I. Evre	Tümör dokusu over ya da fallop tüpleriyle sınırlıdır	T1 N0 M0
IA	Kapsül içerisinde, tek over ya da fallop tüpünde	T1a N0 M0
IB	Kapsül içerisinde, iki over ya da fallop tüpünde	T1b N0 M0
IC	Kapsül içerisinde, tek ya da her iki over ya da fallop tüpünde:	
IC1	Cerrahi müdahale sonrası kapsül rüptürü	T1c1 N0 M0
IC2	Cerrahi müdahale öncesi kapsül rüptürü	T1c2 N0 M0
IC3	Assit ya da peritonda malign hücreler	T1c3 N0 M0
II. Evre	Tümör tek ya da her iki overde ya da fallop tüpünde ve pelvise yayılmış	T2 N0 M0
IIA	Uterusa fallop tüplerinden ve/veya overlerden yayılım	T2a N0 M0
IIB	Başka pelvik intraperitoneal dokulara yayılım	T2b N0 M0
III. Evre	Tümör tek ya da her iki over/fallop tüpünde ya da primer peritoneal kanser halinde, periton dışına ve lenf nodlarına yayıldığı doğrulanmış	T1/T2 N1 M0
IIIA1	Pozitif retroperitoneal lenf nodları mevcut	
(i)	10 mm'ye kadar metastaz	
(ii)	10 mm'den daha büyük metastaz	
IIIA2	Mikroskobik ekstrapelvik peritoneal metastaz, retroperitoneal lenf metastazı var ya da yok	T3a2 N0/1 M0
IIIB	2 cm'ye kadar makroskobik peritoneal metastaz, retroperitoneal lenf metastazı var ya da yok	T3b N0/1 M0
IIIC	2 cm'den fazla makroskobik peritoneal metastaz, retroperitoneal lenf metastazı var ya da yok, dalak ya da karaciğer kapsülüne uzanım var	T3c N0/N1 M0
IV. Evre	Peritoneal metastazı aşan uzak bölgelere metastaz varlığı	T1/2/3 N0/1 M1
IVA	Plevral efüzyonda tümör	
IVB	Parankimal metastaz ya da ekstra abdominal organlara metastaz	

2.6. Epitelyal Over Kanseri Alt Tipleri

Epitelyal over kanserleri için klinik ve genetik çalışmalar sonunda Tip I ve Tip II olmak üzere iki ana alt tip sınıflandırma yöntemini içeren dualistik model dikkat çekmektedir (Kurman ve Shih, 2010). Tip I over kanserleri, lokal olarak büyüyen ve malign potansiyeli az tümörlerden oluşurken (Lengyel, 2010), Tip II ise yüksek dereceli seröz kanserlerini, karsinosarkomları ve farklılaşmamış (andiferansiye) karsinomları ihtiva etmektedir (Terada ve ark., 2016).

2.6.1. Tip I over kanseri

Tip I tümörleri Tip II'ye kıyasla yavaş bir gelişim göstermektedir. Bununla beraber, borderline tümörlere dönüşebilmekte ve sonunda invaziv özellikler kazanabilmektedir. Ayrıca, bu tip hücreler genomik olarak Tip II'dekilere kıyasla daha kararlı olsa da somatik mutasyonlar içerebilmektedir (Koshiyama ve ark., 2014). Düşük dereceli seröz (DDSK), müsinöz (MOK), endometrioid (ENOK), berrak hücreli karsinomlar (BHOK) ve Brenner tümörleri Tip I grubuna dahildir (Salazar ve ark., 2018).

Düşük dereceli seröz over karsinomu (DDSK)

Düşük dereceli seröz over karsinomu (DDSK), tüm over kanserlerinin %1-3'ünü; seröz karsinomların ise yaklaşık %5'ini oluşturan bir olgudur. Tip II kanser türü olan yüksek dereceli seröz karsinomuna (YDSK) nazaran izlenen yaş aralığı genç (yaklaşık 55), agresifliği daha az, hastaların toplam sağkalım süresi yüksek (yaklaşık iki kat), ancak sisplatin duyarlılıkları daha düşüktür (Gadducci ve Cosio, 2020; Kaldawy ve ark., 2016). Yapılan çalışmalar DDSK'nin YDSK'ye dönüşme potansiyeli gösterebildiğini bildirirse de, bu durumu moleküler anlamda açıklamak oldukça zordur. Ayrıca, DDSK'de p53 proteini mutant olmamasına rağmen, K-ras ve BRAF mutasyonları tümör hücrelerinin borderline formdan karsinom fenotipine geçişine sebebiyet verebilmektedir (Ricciardi ve ark., 2018).

Müsinöz over karsinomu (MOK)

MOK, epitelyal over kanseri tipleri arasında nadir rastlanan bir karsinomdur. Normal over dokusunda müsinöz hücreler olmamasına rağmen, overde yüzey epitelyumunda müsinöz metaplazisi görülebilmesi, MOK'un endometriyozis ile ilişkili olması ve diğer müsinöz karsinoma özgü borderline ve invaziv özelliğe geçişte K-ras ve p53 mutasyonları ile HER2 amplifikasyonunu göstermesi nedeniyle bu sınıfa dahil edilmesinin ana nedenidir (Babaier ve Ghatage, 2020). MOK hastalarının %80'i seröz karsinoma kıyasla büyük oranda erken evrede teşhis edilmektedir. Bunun sebebi tümör dokusunun oldukça büyük yapıda olmasıdır. Dahası, bu bireylerde 5 yıllık sağ kalım oranı %90'ın üzerindedir. Bununla beraber, kanser hücreleri abdominal boşlukta bulunan peritona yayıldığı durumlarda sağ kalım oranı 12-33 ay arasına düşmektedir (Morice ve ark., 2019).

Endometrioid over karsinomu (ENOK) ve berrak hücreli over karsinomu (BHOK)

Endometrioid ve berrak hücreli karsinomların her ikisi de endometriyozis ile ilişkilendirilmektedir. ENOK'un izlenme sıklığı tüm over kanserleri içerisinde yaklaşık %10'dur. ENOK özellikle histolojik ve moleküler anlamda rahim adenokarsinomuna benzemektedir (Pierson ve ark., 2020). Ayrıca, erken menarş, geç menopoz ve infertilitenin ENOK oluşumu riskini arttırdığı düşünülmektedir (Koshiyama ve ark., 2017). Günümüzde erken teşhis edilme sıklığı yüksek olan ENOK, düşük dereceli adenokarsinom ile ilişkili olup, ailesel nonpolipozis kolon kanseri sendromu öyküsü olan bireylerde sıklıkla görülmektedir (Prat, 2012). Ayrıca, seröz over kanseri hastalarına göre 5 yıllık sağ kalım oranı neredeyse 2.5 kat daha fazladır (Bouchard-Fortier ve ark., 2017). BHOK da ENOK gibi erken evrelerde teşhis edilebilen bir epitelyal kanser türüdür. Bununla beraber, ileri evredeki BHOK hastalarında kemoterapiye karşı ortaya çıkan ve kötü prognozla ilişkilendirilen bir direnç mekanizması yer almaktadır. Ayrıca, BHOK p53 ve BRCA mutasyonları sergilemese de ARID1A ve PIK3CA mutasyonlarını içermektedir (Fujiwara ve ark., 2016).

Brenner tümörleri

Brenner tümörleri over neoplazmlarının %1'den daha azlık bir kısmını oluşturmaktadır. Kendi içerisinde benign, borderline ya da malign olarak ayrılmaktadır (Zhang ve ark., 2019). Brenner tümörlerinin %80'inden fazlası 50 yaş ve üzeri kadınlarda izlenirken, bu tümörler karakteristik olarak fibröz stroma tarafından sarmalanmış değişici epitel tabakası şeklinde kümelenir (Zheng ve Heller, 2019).

2.6.2. Tip II over kanseri

Agresif ve metastatik özellik gösteren Tip II over kanserlerinin büyük çoğunluğu yüksek dereceli seröz kanserlerini içermektedir. Bu tümörlerde kromozom instabilitesi bir hayli fazla olup, büyük bir kısmında p53 mutasyonu yer almaktadır. Ayrıca, yüksek oranda fonksiyon kaybına uğrayan veya epigenetik olarak baskılanan BRCA1 ve BRCA2 gibi genler de ön plana çıkmaktadır (Wu ve ark., 2013). Ölüm verilerine bakıldığında yüksek dereceli over kanserleri toplam ölümlerin neredeyse %80'lik bir kısmını oluşturmaktadır (Bowtell ve ark., 2015).

Yüksek dereceli seröz over karsinomu (YDSK)

Yüksek dereceli seröz over karsinomu (YDSK), perotina hızlıca yayılabilen ve genellikle metastatik faaliyetlerini gerçekleştirdikten sonra teşhis edilebilen bir türdür. Şu anki temel düşünce, YDSK'nin over yüzeyi veya fallop tüpü epitelyumundan köken aldığını öne sürmektedir. Ancak bu bölgelerin YDSK gelişimine ve progresyonuna olan etkisi henüz tam olarak aydınlatılamamıştır (Colvin ve Howell, 2020). Yapılan çalışmalar, YDSK'da yoğun biçimde K-ras, BRAF ve ERBB2 mutasyonlarının var olduğunu göstermektedir. Ayrıca DDSK'ye nazaran hastalarda 5-yıllık sağ kalım oranı ortalama iki kat daha azdır (Vang ve ark., 2010).

Karsinosarkomlar ve andiferansiye over karsinomları

Karsinosarkomlar malign Müllerian tümörleri olarak da bilinen ve çok nadir rastalanan Tip II over kanseri türüdür. Sarkomatöz ve karsinomatöz bileşenlerinin karşımı halinde ortaya çıkmaktadır (Daimon ve ark., 2019). Detaylandırmak gerekirse sarkomatöz bileşenler fibrosarkom, leyimiyosarkom, osteosarkom veya liposarkoma tümörlerinden oluşabilirken, karsinomatöz bileşenler endometrioid, berrak hücreleri, seröz şeklinde bulunabilmektedir (Makris ve ark., 2015). Karsinosarkomlar YDSK'ye kıyasla daha kötü bir prognoza sahiptir. Buna göre, hastalarda 5-yıllık sağ kalım oranı yaklaşık %28.2'dir. Ancak, karsinosarkomlar nadir bir over kanseri türü olduğundan henüz epidemiyolojisi hakkında detaylı bilgilere sahip olunamamaktadır (Kim ve ark., 2017).

Andiferansiye over kanserleri, vakalarının yaklaşık %4'ünü oluştururken, herhangi bir şekilde sınıflandırılması yapılamayan, düşük oranda diferansiye olmuş tümör hücrelerinden oluşmaktadır. Bu yüzden, saf bir andiferansiye karsinomuna rastlamak oldukça zordur. Çünkü birçok vakada seröz, glandular ya da geçiş hücreli heterojen tümörler ön plana çıkmaktadır (Silva ve ark., 1991). Bu kanser türü, diğer tüm over kanserleri arasında en kötü prognoz değerlerine sahiptir (Salcedo-Hernandez ve ark., 2012).

Çizelge 2. 3. Toplam vakalara göre Tip I ve Tip II over kanserlerinin karakteristikleri (Salazar ve ark, 2018)

	Tip I				Tip II
	ENOK	BHOK	DDSK	MOK	YDSK
Erken teşhis ihtimali	%50 ve üzeri	%10-50	%50 ve üzeri	%50 ve üzeri	%10 ve altında
Yüksek proliferasyon değeri	%10 ve altında	%10 ve altında	%10 ve altında	%50 ve üzeri	%50 ve üzeri
Platin bazlı kemoterapiye duyarlılık	%10-50	%10-50	%10-50	%10 ve altında	%50 ve üzeri
Görülme sıklığı	%10 ve altında	%10 ve altında	%10 ve altında	%10 ve altında	%50 ve üzeri
Fallop tüpü orijini	Yok	Yok	Bilinmiyor	Yok	Var
Endometriyozis orijini	Var	Var	Yok	Yok	Yok
Kromozom instabilitesi	%10 ve altında	%10-50	%10 ve altında	%10-50	%50 ve üzeri
p53 mutasyonu	%10-50	%10 ve altında	%10 ve altında	%50 ve üzeri	%50 ve üzeri
BRCA mutasyonu	%10-50	%10 ve altında	%10 ve altında	%10 ve altında	%10-50
BRAF mutasyonu	%10-50	%10 ve altında	%10-50	%50 ve üzeri	%10 ve altında
K-ras mutasyonu	%10 ve altında	%10 ve altında	%10-50	%50 ve üzeri	%10 ve altında
ERBB2 mutasyonu/artışı	%10 ve altında	%10-50	%10 ve altında	%10-50	%10 ve altında

2.7. Over Kanserinde Kemoterapi Direnci

Sitoredüktif cerrahi over kanseri terapisinin temelini oluştururken, sonrasında kemoterapi uygulamaları tercih edilmektedir. Çünkü cerrahi yöntemler, malign karakteristik taşıyan bu kanseri tek başına tedavi etmek için yeterli değildir (Javadi ve ark., 2016). Bununla beraber, ileri evre hastalarda küratif seçenekleri ve sağ kalım şansını sınırlayan faktörlerden bir tanesi de nüksetme sorunudur. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) verilerine göre, başlangıçta uygulanan standart terapiye olumlu yanıt veren hastaların %75-80'lik kısmında kanser nüksetmektedir (Pyeon ve ark., 2020). Ayrıca, bu problem genellikle kemoterapi direnci ile ilişkili olup, üstesinden gelebilecek önemli bir yaklaşım henüz sunulamamaktadır (Tapia ve Diaz-Padilla, 2013). Bu yüzden, şimdilik sitoredüktif cerrahi ile birlikte, hastalarda anjiyogenez inhibitörü bevacizumab ve platin bazlı ilaçlardan oluşan ağır bir kemoterapi rejimi tercih edilmektedir (Hilal ve ark., 2016). Ancak, direnç geliştiren hücreler, zamanla platin bazlı ilaçlara ve adjuvan terapisi içerisinde yer alan diğer kombinasyonlarına karşı da duyarsızlaşabilmektedir (Tapia ve Diaz-Padilla, 2013).

Sisplatin, anti-proliferatif etkileri kanıtlanan ve kanser tedavisinde en çok tercih edilen kemoterapi ilaçlarından bir tanesidir. Özellikle mesane, baş ve boyun, akciğer, testis ve over kanserlerinde sıklıkla kullanılmaktadır (Dasari ve Tchounwou, 2014). Çekirdek içindeki genomik DNA molekülünün zincirleri arasına penetre olarak hücre siklusunun durmasını indüklemekte ve apoptozis yollarını aktif etmektedir (Aldossary, 2019). Ancak sisplatin, kemodirenç mekanizmaları nedeniyle her zaman kanser tedavisinde istenilen sonuçları verememektedir. Yapılan çalışmalar, kemoterapi uygulamalarına karşı tümör hücrelerinin DNA tamiri ve ilaç detoksifikasyonu mekanizmalarını geliştirdiklerini, hücresel pH değerlerini yeniden düzenlediklerini, ilaç pompalarının ekspresyonlarını arttırdıklarını ve belirli tümör süpresör genlerin aktivasyonunu sınırladıklarını göstermektedir. Literatürde “Çoklu İlaç Direnci” ya da “Multi Drug Resistance (MDR)” olarak adlandırılan bu davranış, sisplatin ve diğer terapötiklerin etkinliğini önemli ölçüde kısıtlamaktadır (Gao ve ark., 2019). Detaylandırmak gerekirse, over kanserinde MDR ile ilişkili kemodirenç mekanizmaları genel olarak: ilaç metabolizmasının değiştirilmesi, membran transporter'larının düzenlenmesi,

hücre metabolizma düzensizlikleri, ilaç hedeflerinin değiştirilmesi, hücre ölümünün engellenmesi, DNA hasar tamiri, epigenetik düzenlemeler, oksidatif stres, uzun kodlamayan RNA'lar ve onkogenler ile sağlanabilmektedir (Norouzi-Barough ve ark., 2018).

2.7.1. BCL2 proteinlerinin apoptozis regülasyonu ve kemoterapi direncindeki rolü

BCL2 protein ailesi (B-cell lenfoma-2) apoptozis adı verilen programlı hücre ölümünü düzenleyen en önemli regülatörlerden bir tanesidir. Bu aile çeşitli üyelere sahip olup, fonksiyonel anlamda apoptozis inhibitörü ya da indükleyicisi olarak görev yapabilmektedir (Hardwick ve Soane, 2013). BCL2 proteinleri, BH adı verilen homoloji domainleri içeren ve apoptotik yanıtın düzenlenmesinden sorumlu BCL-2, BCL-X_L, BCL-W, MCL1 (miyeloid hücre lösemi sekansı 1), BCL2A1 ve BCL-B apoptozis inhibitörü (anti-apoptotik) yapılardan ve BAX (BCL2 ilişkili X protein,), BAK (BCL2 agonist/killer) ve BOK (BCL2 ilişkili over killer proteini) adı verilen apoptozis indükleyici (pro-apoptotik) proteinlerden meydana gelmektedir (Czabotar ve ark., 2014).

Apoptozis aktivasyonu hücre içinde intrinsik ve ekstrinsik olarak iki farklı şekilde sağlanmaktadır. İntrinsik yolda hücre stres oluşturan reaktif oksijen türevleri, radyasyon, büyüme faktörü eksikliği ve sitotoksik ilaçlar apoptozisi indüklerken, ekstrinsik yolda hücre yüzeyinde bulunan ölüm reseptörleri görev almaktadır (Tzifi ve ark., 2012). Her iki şekilde de BCL2 proteinleri programlı hücre ölümünün kontrolünü sağlarken, özellikle pro-apoptotik BCL2 proteinlerini aktifleştirerek mitokondri membranının geçirgenliğini değiştirmektedir. Böyle bir durumda, apoptozis indükleyicisi sitokrom c ve smac gibi proteinler sitozole yayılarak kaspazların aktivitesini arttırmaktadır (Elmore, 2007). Bir anti-kanser ilacı olarak sisplatin hücre içerisinde programlı hücre ölümünü uyarıcı etkilere sahiptir. Bu etkiler; DNA hasar yanıtının, p53 ve MAPK aktivasyonunun, p73 ilişkili sinyallerin ve hücre siklusu proteinlerinin modülasyonu ile gerçekleşmektedir (Tanida ve ark., 2012). DNA hasar yanıtının oluşması, sisplatinin hücre içine girişi sonrası çeşitli mekanizmalar ile sağlanabilmektedir. Sisplatin direkt olarak nükleik asit zincirleri arasına penetre edip o bölgede geniş lezyonlara sebep olarak nükleotid eksizyon tamiri (NER) ve

yanlış eşleşme tamiri (MMR) gibi mekanizmaların aktivasyonuna vesile olmaktadır. Ancak bu ilaca bağlı olarak gelişen hasar onarılamayacak bir durumda ise p53, MAPK ya da p73 proteinleri ekinleşmek maksadıyla hücreSEL intrinsik ve ekstrinsik apoptotik yolaKların çalışmasını sağlamaktadır (Basu ve Krishnamurthy, 2010).

Kanser hücrelerinde ise sisplatin aracılı apoptozisin düzenlenmesi normal hücrelere kıyasla farklı ilerlemektedir. Tümörlerde çoğunlukla genomik instabilite hakim olsa da apoptotik sinyal oluşturuAcak mekanizmaların düzensizlikleri söz konusu olduğundan programlı hücre ölümü her zaman gerçekleşmemektedir. Bu durum aynı zamanda kanserin “hallmark” olarak tabir edilen karakteristiklerinden; “ölüme karşı direnç” mekanizmalarına örnektir. Sinyal iletimindeki aksaklıkların yanında, engellenen apoptozis; BCL2 proteinlerinin artan ekspresyonu ile de ilişkilendirilmektedir (Al-Bedeary ve ark., 2020). Yapılan çalışmalar, insan kanserlerinde up-regüle olan anti-apoptotik BCL2 proteinlerinin hücreSEL sağ kalım mekanizmalarını aktive ederek ilaç direncine sebep olduğunu bildirmektedir (Garcia-Aranda ve ark., 2018). BCL2A1 (A1), anti-apoptotik BCL2 protein ailesi üyelerinden biri olup, kanser hücreleri içerisinde anti-proliferatif ilaçlara olan duyarlılığı ortadan kaldırmakta ve NF-kB (nükleer faktör kappa B) adı verilen transkripsiyon faktörü ilişkili sinyal iletimine bağımlı olarak hücre içerisinde ekspresyonunu arttırmaktadır (Vogler, 2011). Bu yüzden bu tez çalışmasına, over kanserinde TLR1/2 ilişkili sinyal yolaKlarının aşağı akışında bulunan ve NF-kB transkripsiyon faktörü ile düzenlenebilen BCL2A1 geni de ilave edilmiştir.

2.7.2. Efflux pompalarının hücresel işlevleri ve kemoterapi direncindeki rolü

Hücre zarında görevli membran transporter'ları genellikle kendi içerisinde iyon kanalları, transporter'lar, aquaporin'ler ve ATP bağımlı pompalar olarak dört gruba ayrılmaktadır. ATP bağlayıcı kaset (ABC) transporter'ları ATP-bağımlı pompalara örnektir (Vasiliou ve ark., 2009). ATP-bağımlı pompalar, integral yapılı membran proteinleri olarak çeşitli moleküllerin hücre zarından geçiş sürecini yerine getirmektedir. Bu moleküller arasında, detoksifikasyon için taşınan, hücresel toksinler ve ilaçlar da yer almaktadır (Rees ve ark., 2009). Ancak, ABC transporter'ları genellikle molekülleri tek yönlü olarak taşıma görevi üstlenmekte ve adından da anlaşılacağı üzere fonksiyonları için ATP enerjisine ihtiyaç duymaktadır (Wilkins, 2015). ABC transporter'larının detoksifikasyondan sorumlu üyeleri; ATP bağlayıcı kaset B1 / multidrug resistance proteini 1 (ABCB1/MDR1) ve ATP bağlayıcı kaset C1 (ABCC1), oksidatif strese ve xenobiyotiklerden sorumlu üyeleri; ABCC/MRPs, lipid metabolizmasından sorumlu üyeleri; MDR3, ABCA ve ABCG ailesi ve antijen sunumdan sorumlu üyeleri ise ABCB2/TAP1 ve ABCB3/TAP2 olarak bilinmektedir (Begicevic ve Falasca, 2017).

ABCB1 (MDR1), ABC ailesinin üzerinde en fazla çalışılan üyelerinden bir tanesidir. Bu protein, moleküler ağırlığı 250 ila 4000 arasında değişen çeşitli yapıdaki maddeleri taşımaktadır. Bunlar arasında peptidler, steroid hormonlar, lipidler, fosfolipidler, kolesterol, sitokinler, farmasötikler ve bir takım başka yapılar da yer almaktadır (Hodges ve ark., 2011). ABCB1'in artan ekspresyonu bazı kanserlerde MDR ile ilişkilendirilmektedir. Buna göre, uygulanan kemoterapötik ilaçların hücre içi konsantrasyonları ABCB1 proteini yardımıyla azaltılmakta ve anti-kanser aktiviteleri baskılanmaktadır (Mizaei ve ark., 2018). ABCB1'in yoğun biçimde eksprese olduğu kanser türlerine küçük hücreli akciğer kanserleri, meme kanseri, gastrik kanser, prostat kanseri, over kanseri ve lösemi örnek olarak verilmektedir. Özellikle taksanlar, alkaloidler, antrasiklinler ve tirozin kinaz inhibitörleri ABCB1 için substrat vazifesi görmektedir (Liao ve ark., 2019).

ABCB1'in over kanserindeki rolü ise çeşitli raporlarla ortaya koyulmaktadır. Toplam 8607 örnekli bir meta-analiz çalışması, hastalarda ABCB1 ekspresyonunun kötü sağ kalım değerleriyle ilişkili olduğunu bildirmektedir. Ayrıca, ABCB1'in up-regülasyonu, bu örnekler özelinde direkt olarak kemoterapi direnci ile ilişkilidir (Sun ve ark., 2016). ABCB1'in over kanserlerinde ayrıca taksan uygulamalarına ve PARPi'a (poli adp-riboz polimeraz inhibitörleri) karşı da bir direnç yanıtı ortaya koyabileceği belirtilmektedir (Freimund ve ark., 2018).

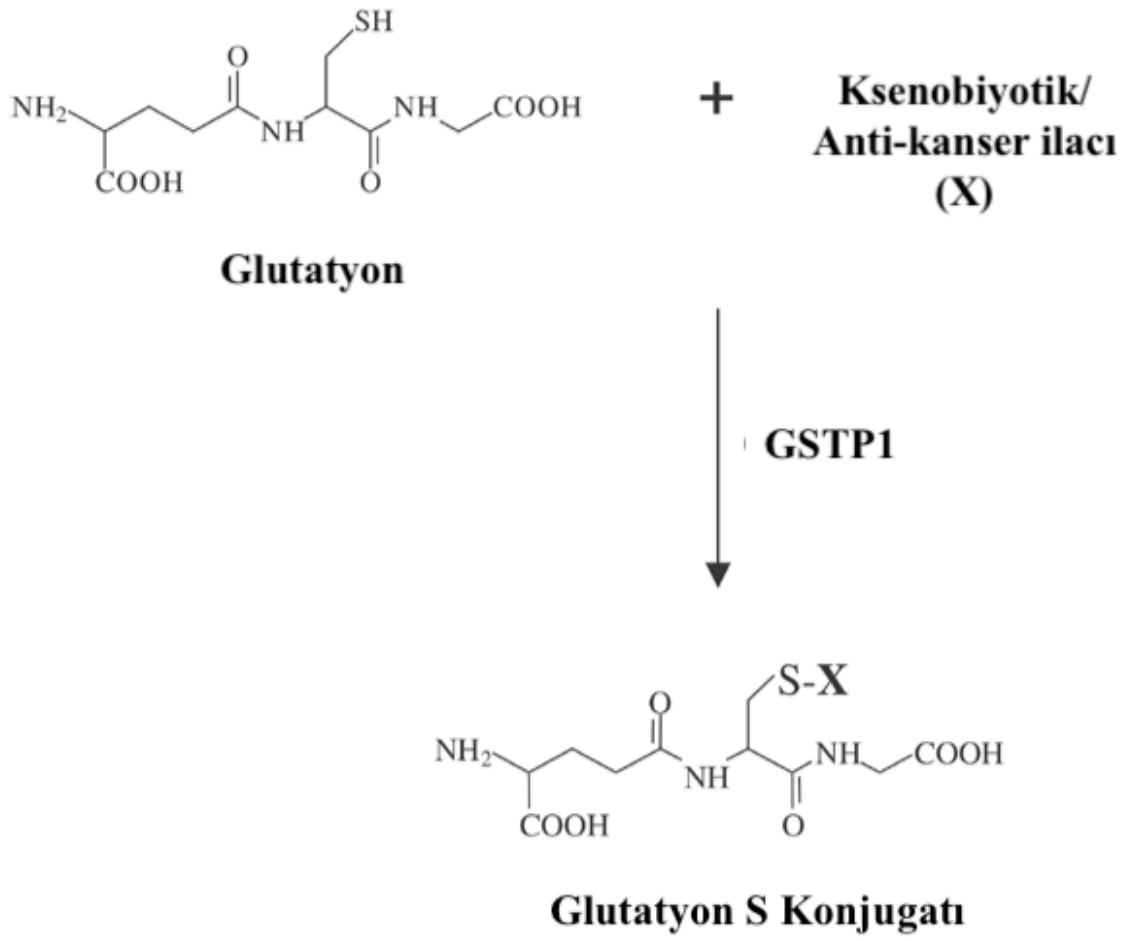
2.7.3. Glutasyon s-transferaz (GST) proteinlerinin ksenobiyotik metabolizması ve kemoterapi direncindeki rolü

Organizmada kanser ilaçları gibi çeşitli ksenobiyotikler belirli aşamalar sonrası metabolize edilebilmektedir. Metabolizasyon, faz I ve faz II adı verilen iki ayrı süreçle yönetilmektedir. Faz I reaksiyonları genellikle molekülün oksidasyon, redüksiyon ya da hidroliz gibi kimyasal tepkimelere; faz II ise glukoronidasyon, sülfonasyon, glisin/glutamin konjugasyonu, asetilasyon, metilasyon ya da glutasyon (GSH) konjugasyonu gibi modifikasyonlara maruz kaldığı basamaklardan oluşmaktadır (Akhdar ve ark., 2011).

Çeşitli kanser türlerinde kemoterapi ilaçları hücrel mekanizmalar neticesinde detoksifikasyona uğrayabilmekte ve bu durum ilaç tedavisine karşı tümör hücrelerinin yanıtsız kalmasına sebep olabilmektedir. Sisplatin direnci ile ilişki olduğu gösterilen önemli metabolik enzimlerden bir tanesi de Glutasyon s-transferazlar'dır (GST). Bu aile, hücrel makromoleküllerin oksidatif stres karşısında reaktif eletrofilik bileşenlere maruz kalmalarını engelleyen proteinlerden meydana gelmektedir. Bu bileşenler özellikle glutasyon (GSH) adı verilen bir molekülle GST proteinleri vasıtasıyla faz II reaksiyonları sonunda konjuge edilir ve hücrelerden atılması kolaylaştırılır (Townsend ve Tew, 2003).

Yapılan çalışmalar, GST ailesi üyelerinin sisplatin metabolizmasına da etki edebildiğine işaret etmektedir. Özellikle meme, kolon, böbrek, akciğer ve over kanserlerinde GST proteinlerindeki aktivasyon artışı, sisplatin direncini direkt olarak indükleyebilmekte ve bu

ilacın sitotoksik işlevlerini yerine getirmesine engel olmaktadır (Verma ve ark., 2019). Sisplatin hücre içerisine alındığı durumlarda, GSTP1 adı verilen bir izoenzim detoksifikasyon işlemini gerçekleştirerek terapi uygulamalarının etkinliğini sınırlamaktadır (Pasello ve ark., 2008). Over kanserinde ise GSTP1'in ekspresyonu ve potansiyel etkileri birçok çalışmada incelenmiştir. GSTP1 düzeyini hasta gruplarında araştıran raporlar, epitelyal over tümörlerinde, borderline ve benign dokularına göre yoğun biçimde GSTP1 ekspresyonuna rastlandığını bildirmektedir. Ayrıca, bu ifadenme özellikle kemoterapi direnci gösteren hastalarda daha yüksektir (Yang ve ark., 2018; Kolwijck ve ark., 2009). Destekleyici şekilde, bir başka grupta yapılan analizlerde, kemoterapi direnci gösteren bireyler için GSTP seviyelerinin yükseldiği doğrulanmaktadır (Tong ve ark., 2019). *In vitro* deneyler özelinde, Sawers ve arkadaşları (2014), GSTP1'in over kanserinde up-regüle olduğunu ileri sürerken, bu düzenleme özellikle tümör hücrelerinin sisplatin ve karboplatine karşı duyarsızlaşması ile ilişkilidir. ShRNA konstrakları kullanılarak A2780 hatlarında gerçekleştirilen GSTP1 knock-down'ı hücre canlılığını, invazyonu ve metastazı istatistiksel olarak anlamlı biçimde azaltmaktadır. Ayrıca bu yöntem, bir diğer kemoterapötik olan paklitaksele karşı duyarlılığın oluşmasını da sağlamaktadır (Feng ve ark., 2020). Ayrıca, yine miRNA (mikro RNA) ve siRNA (small interfering RNA) tabanlı analizler, GSTP1'in over kanseri kemoterapi direncindeki rolünü detaylıca açıklamaktadır (Zong ve ark., 2014; Zhang ve ark., 2005).



Şekil 2. 3. GSTP1'in glutatyon ve ksenobiyotik konjugasyonu (Townsend ve Tew, 2003)

2.8. Toll-benzeri Reseptör (TLR) Ailesi

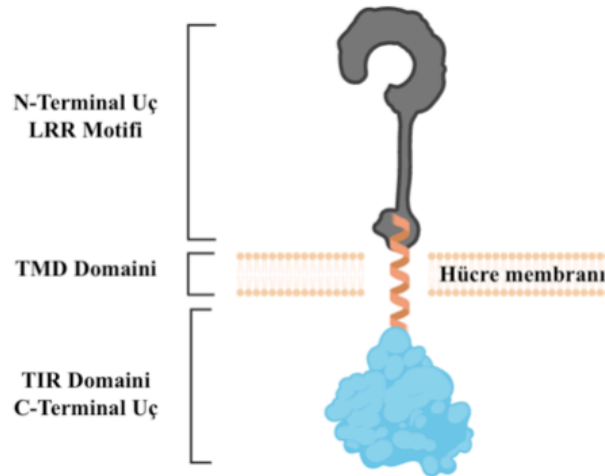
Doğal bağışıklık, vücuda giren mikrobiyal patojenlere karşı savunma sisteminin ilk hattını oluşturmaktadır. Bu hat, patojenlerin vücutta yayılımlarını durdurabilmek adına, adaptif immüniteden farklı olarak non-spesifik mekanizmaları içermektedir. Çeşitli hücrel kompartımanlara sahip nötrofiller, makrofajlar, miyeloid kökenli süpresör ve doğal lenfoid hücreleri doğal bağışıklığın sürdürülebilmesi adına önem arz etmektedirler (Gasteiger ve ark., 2016).

Patern tanıma reseptörleri (PRR), doğal bağışık yanıtın ortaya çıkmasında görev alan yapılardır. Özellikle, mikroplara ait patojen ilişkili moleküler paternleri (PAMP) ve vücudun zarar gören hücrelerinden köken alan hasar ilişkili moleküler paternleri (DAMP) tanıyarak inflamatuvar sitokinlerin, interferonların ve diğer mediatörlerin üretimini indüklemektedir (Kawasaki ve Kawai, 2014). PRR ailesi üyeleri: Toll-benzeri reseptörler (TLR'ler), nükleotid-bağlama oligomerizasyon domaini-benzeri reseptörler (NLR'ler), retionik asit ile indüklenebilir reseptörler I (RIG-I-LR'ler) ve C-tipi lektin reseptörler (CLR'ler) olarak 4 ayrı alt sınıfa ayrılmaktadır (Amarante-Mendes ve ark., 2018).

Toll-benzeri reseptörler (TLR'ler), ilk olarak *Drosophila melanogaster* (sirke sineği) embriyolarında tanımlandığında sineklerin dorsoventral aksis formasyonunda bir takım fonksiyonlara sahip oldukları biliniyordu. Bu reseptörlerle ilişkili olan aşağı akıştaki yollar araştırıldıkça, memelilerde yer alan interlökün 1 reseptörleriyle (IL-1R) benzeşen mekanizmaların olduğu saptandı. Bu benzerlikler, TLR'lerin sinek gelişiminin yanında doğal bağışıklıkta da rol oynayabileceği hipotezini ortaya attı (Medzhitov, 2001) ve 2011 yılına gelindiğinde hipotez genişletilerek neticesinde, Bruce A. Beutler, Jules A. Hoffmann ve Ralph M. Steinman'a TLR'ler ile ilişkili bağışıklık yanıtı üzerinde yaptıkları çığır açıcı çalışmalar neticesinde Nobel ödülü kazandırdı (Volchenkov ve ark., 2011).

2.9. TLR'lerin Yapısal Özellikleri

TLR'ler tip I integral membran reseptörleri formunda olup, birer adet N-terminal ligand tanıma domaini, transmembran heliks yapısı ve C-terminal sitoplazmik sinyalizasyon domaini içermektedir. Sinyalizasyon domaini, interlökin 1 reseptörüyle (IL-1R) benzerlik gösterdiğinden Toll IL-1 reseptörü (TIR) adını almıştır (Botos ve ark., 2011). Bu domain, yaklaşık 150 aminoasitten oluşan bir rezidü olup, sinyalin aşağı akıştaki proteinlere aktarılmasını sağlayan MyD88 (miyeloid farklılaştırıcı primer yanıt protein 88), TIRAP/MAL (TIR-domaini-içeren adaptör protein), TRIF (TIR-domain,-içeren adaptör proteinle indüklenen beta interferon [IFN- β]) ve TRAM (TIR-domaini-içeren adaptör molekül) gibi bir takım adaptör proteinler ile temas halindedir (Jin ve Lee, 2008). Sinyal molekülü yakalamada görevli N-terminal ligand tanıma domaini ise 24 rezidüden oluşan lösin aminoasidi ile zengin tekrarlardan oluşmaktadır (LRR) (Bell ve ark., 2003). Son domain olan transmembran heliks yapısı, adı üzerinde hücre zarını kateden bir protein formudur. Bu heliks şeklindeki yapı (TMD), TLR'lerin buraya yerleşimini kolaylaştırmanın yanında TLR aktivasyonu için gerekli homodimerizasyon veya heterodimerizasyon olayını da sağlamaktadır (Godfroy ve ark., 2012).



Şekil 2. 4. Toll-benzeri reseptörlerin genel yapısı

2.10. TLR'lerin Sınıflandırılması

Çalışmalar insanlarda 10 farklı tipte TLR olduğunu bildirmektedir. Bunlar TLR1'den TLR10'a kadar sıralanmaktadır. Hücre içindeki lokalizasyonlarına göre ayrıldıklarında TLR -1, -2, -4, -5, -6 ve -10 hücre membranında bulunurken, -3, -7, -8 ve -9 endoplazmik retikulum, endozom ve lizozom gibi kompartımanlarda lokalize olmaktadır (Lin ve ark., 2012; Fore ve ark., 2020). Genel olarak bakıldığında, intraselüler kısımlarda yer alan TLR'lerin özellikle viral ya da bakteriyel nükleik asitleri; plazma zarında yer alan TLR'lerin ise lipopolisakkaritler (LPS), lipopeptidler ve flagellin gibi bakteriyel hücre duvarı komponentlerini ligand olarak bağladıkları belirlenmiştir (Gangloff, 2012). TLR ve ilişkili eksojen kaynaklı ligandları detaylı biçimde Çizelge 2.4.'te görülebilir.

Çizelge 2. 4. Toll-benzeri reseptörler ve ilgili eksojen kökenli ligandları (Ishii ve ark., 2006)

TLR	Eksojen kökenli ligandlar
TLR1 / TLR2 heterodimeri	Triaçil lipopeptidler (bakteri)
TLR6 / TLR2 heterodimeri	Diaçil lipopeptidler (bakteri), zimoza (Fungi)
TLR3	Çift zincirli RNA (virüs)
TLR4	LPS (bakteri), taksol (bitki), füzyon proteinleri (virüs)
TLR5	Flagellin (bakteri)
TLR7 ve TLR8	Tek zincirli RNA (virüs), RNA ya da analogları (sentetik)
TLR9	DNA (bakteri, DNA virüsü), hemozin (malaria), oligodeoksiniükleotidler (sentetik)
TLR10	Spesifik ligandları tam olarak bilinmiyor

TLR'ler aynı zamanda endojenik moleküller ile de uyarılabilmektedir. Bu ligandlar genellikle hasar görmüş dokulardan, ölü hücrelerden ve inflamasyonla ilişkili faaliyetler sonucu oluşan hücresel artıklardan köken alan protein, peptid, polisakkarit, proteoglikan, nükleik asit, fosfolipid ya da ekstraselüler matriks bileşenleridir (Yu ve ark., 2010). Endojenik moleküller, TLR'leri uyarmakla birlikte olası patojenlerin organizmadan eliminasyonunu ve hasar görmüş dokuların tamirini de kolaylaştırmaktadır. Ancak, TLR'ler ve ilişkili sinyal yolları üzerindeki etkileri halen tam anlamıyla aydınlatılamamıştır (Bryant ve ark., 2015).

Çizelge 2. 5. Toll-benzeri reseptörler ve ilgili endojen kökenli ligandları (Duffy ve O'Reilly, 2016; Bryant ve ark., 2015)

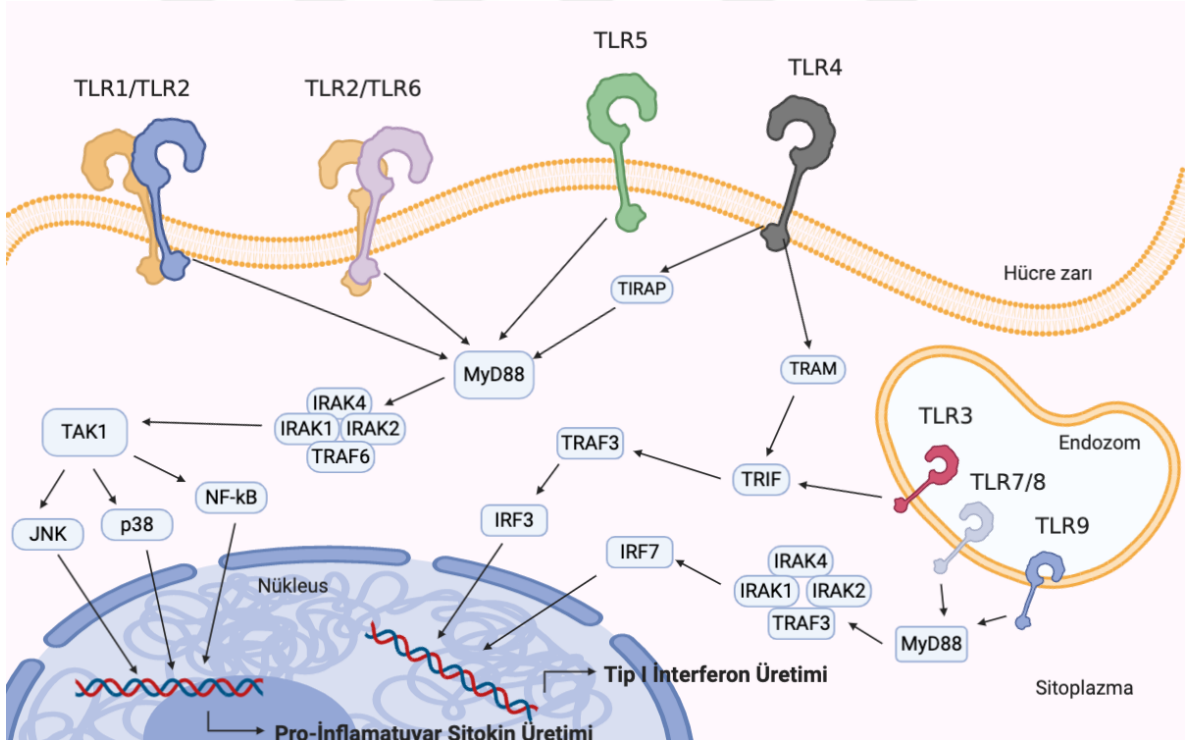
TLR	Endojen kökenli ligandlar
TLR2	Serum amiloid A, Amiloid B, endoplazmin, fibronektin, biglikan, monosodyum ürat kristalleri, High mobility group box 1 (HMGB1), ısı şok proteinleri (hsp60, 70),
TLR3	mRNA
TLR4	HMGB1, hsp20, hsp60, hsp70, hsp96, biglikan, fibrinojen, alfa ve beta defensin, ürik asit
TLR2/6	Versican, hsp60, hsp70, hsp96, çözünebilen tüberküloz faktörleri
TLR7, TLR8	siRNA, ssRNA
TLR9	HMGB1, osteopontin

2.11. TLR Aracılı Hücresel Sinyal İletimi

TLR'ler bir ligand ile LRR bölgelerinden uyarıldıklarında, TIR domaini aracılığıyla aşağı akıştaki bir takım proteinlerin aktivasyonu sayesinde sinyal iletimini gerçekleştirmektedir. TIR genel olarak MyD88, TRIF, TIRAP/MAL ve TRAM adı verilen adaptör proteinlerini düzenlemektedir. MyD88, TLR3 hariç diğer tüm TLR'ler için ortak bir adaptör olsa da, TRIF, TLR3 ve TLR4'ün, TRAM ve TIRAP ise TLR4'ün TIR domaini ile etkileşim halindedir (Hug ve ark., 2018).

TLR'ler ligand ile uyarılmadıkları durumda ise hücre zarında monomerik formda bulunmaktadır. Özellikle spesifik mikrobiyal paternlere maruz kalan reseptörler, sinyal iletimi için monomerik formdan diğer TLR'ler ile etkileşerek dimer formuna geçiş yapmaktadır. Örneğin: TLR2 sırasıyla triaçil ve diaçil lipopeptidlerle uyarıldığında TLR1 ve TLR6 ile heterodimerize olurken, bakteriyel flagellinler TLR5 homodimerizasyonuna neden olmaktadır (Gay ve ark., 2014). Aktifleşen reseptörler, MyD88'i devreye sokarak IRAK (IL-1 receptor-associated kinase) adı verilen bir protein ailesi üyelerini bir kompleks oluşturması için uyarmaktadır. Kompleks içerisinde yer alan IRAK1, ardından E3 ubiquitin ligaz TRAF6 (tümör nekroz faktörü [TNF] reseptör-ilişkili faktör 6) ile etkileşerek TAK1 (transforme edici büyüme faktörü β -aktive edici kinaz 1) protein kinaz ile TAB1, TAB2 ve TAB3 düzenleyici alt ünitelerini bir komplekste birleştirmektedir. TAK1 ise NF- κ B (nükleer faktör kappa B) ve MAPK (mitojenle-aktifleşen protein kinaz) yollarının uyarılmasını sağlayarak inflamatuvar yanıtın ortaya çıkmasına ön ayak olmaktadır (Satoh ve Akira, 2016).

MyD88'den bağımsız yürüyen yollarda ise TRIF ya da TRAM adaptör proteinleri önemli roller oynamaktadır. Yapılan araştırmalar, özellikle TLR3 ve TLR4'ün MyD88 bağımsız yolak içerisinde sinyal transdüksiyonunda görev alabildiğini göstermektedir (Premkumar ve ark., 2010). TLR4 aracılı sinyal yolağında uyarılan TRAM, TRIF'i de sinyal iletim sürecine dahil ederken, TLR3 TRIF adaptör proteinini direkt olarak etkinleştirebilmektedir. Ardından bu süreci TRAF3'ün indüksiyonu ve IRF3'ün (interferon regulatory factor 3) fosforilasyonu takip etmektedir. Sonuçta, IRF3'ün nükleer lokalizasyonu sayesinde anti-viral etkileri bulunan interferon genlerinin ekspresyonu gerçekleşirken, TRIF ve TRAF6 aracılığıyla NF-kB ve MAPK ilişkili yolların da uyarılabildikleri gösterilmektedir (Vidya ve ark., 2017). Şekil 2.5.'te TLR aracılı sinyal yolları detaylı biçimde görselleştirilmiştir.



Şekil 2. 5. Toll-benzeri reseptörler aracılı sinyal iletim yolları

2.12. TLR'lerin İnflamatuvar Yanıttaki Roller

Mikrobiyal patojenlere ait PAMP'ların TLR'lerce tanınması enfeksiyonlara karşı immün yanıt oluşumda önemli bir yere sahiptir. Örneğin: gram negatif bakterilere ait LPS ya da endotoksinler TLR4, gram pozitif bakterilere ait lipoteikoik asit ve peptidoglikan gibi bakteriyel bileşenler TLR2 ile tanınarak inflamatuvar yanıt ile ilişkili moleküllerin sentezini indüklemektedir (Vijay, 2018). Doğal öldürücü hücreleri (NK), dendritik hücreler, monositler ve nötrofiller doğal bağışıklıkta rol oynayan önemli savunma hücreleridir. Bu hücrelerin hepsinde TLR'lerin eksprese oldukları bilinmektedir. Bunun yanı sıra, adaptif bağışıklıkta görevli T ve B lenfositleri de bu reseptörleri ihtiva etmektedir (El-Zayat ve ark., 2019).

NK, T lenfositlerine kıyasla antijen sunumuna ihtiyaç duymadan sitotoksik aktivitelerini uygulayabilen bir hücre türüdür (Abel ve ark., 2018). NK'ların özellikle TLR2, -3, -5 ve -6'yı yoğun biçimde eksprese ettikleri bilinmektedir. TLR3 viral enfeksiyonlarda NK aktivitesini değiştiren önemli bir reseptör olup, IFN- γ (interferon gamma) ve pro-inflamatuvar sitokinler olan IL-6 ve IL-8 üretimini de indüklemektedir (Guo ve Zhang, 2012). Ayrıca, *Mycobacterium bovis* ve *Helicobacter pylori* PAMP'larının NK üzerinde, TLR2 ilişkili kompleksler aracılığıyla TNF (tumor necrosis factor) ve IFN- γ salınımını uyardıkları belirlenmiştir (Noh ve ark., 2020).

Dendritik hücreler (DC) antijen sunucu hücreler olarak lenfositlerin aktivasyonunda önemlidir. Bunun dışında, doğal ve adaptif immünitinin homeostazis koşullarında başlaması, yönetilmesi ve sonuçlandırılması açısından da özel fonksiyonları bulunmaktadır (Patente ve ark., 2019). Tüm DC tipleri plazma zarında büyük ölçekte TLR1, -2, -4, -5 ve -6 içerirken, endozomlarında TLR3 ve TLR8 eksprese etmektedir. Özellikle TLR1/2 ve TLR6/2 heterodimerlerinin DC matürasyonuna sebep olduğu ve IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 ve TNF- α salınımını arttırdıkları bildirilmektedir (Schreibelt ve ark., 2010). Ayrıca çalışmalar, reseptör aktivasyonunun DC'lerin antijen sunma kapasitelerini değiştirdiğini; TLR ve ilişkili

yolakların DC hücrelerinde ekstraselüler ortamdan antijen alımını ve MHC proteinleri ile bu antijen sunumunu düzenleyebildiklerini göstermektedir (Watts ve ark., 2010).

TLR'lerin adaptif immün yanıtı da önemli ölçüde regüle edebildikleri bilinmektedir. Mürin CD8⁺ T hücrelerinin yoğun biçimde TLR2 ifade ederek, DC hücreleri tarafından herhangi bir ko-stimülatör etkilere ihtiyaç duymadan kendi proliferasyonunu ve efektör faaliyetlerini arttırdıkları bilinmektedir (Mercier ve ark., 2009). Ayrıca, TLR2, -3 ve -9'un uyarıldıkları durumlarda antijen alımında ko-stimülatör faaliyetleri olan CD28 molekülüne gerek duyulmadan efektör fonksiyonlarının indüklendiği ve IL-2 ve INF- γ gibi moleküllerinin up-regüle olduğu bildirilmektedir (Rahman ve ark., 2009). Ek olarak, TLR1, -2, -5, -6, -7, -8 ve -9'un ise T-reg hücrelerinde immünoşüpresif mekanizmaları azaltırken, TLR4'ün T-reg'lerin sitotoksik hücreler üzerinde regülatör görevlerini arttırdığı ortaya koyulmaktadır (Jin ve ark., 2012).

TLR'ler'in B hücreleri üzerinde de önemli etkileri bulunmaktadır. Hematopoietik hücrelerden köken alan B hücreleri farklılaşmaları sırasında TLR aracılı sinyal yollarının aktivasyonuna ihtiyaç duymaktadır. Ayrıca, olgun B hücrelerinin proliferasyonu ve plazma hücrelerine dönüşümü için de bu aktivasyon önemlidir (Hua ve Hou, 2013). Bununla beraber, B hücrelerinde antikor sunumunun ve pro-inflamatuvar sitokin üretiminin artması ve ekstraselüler ortama yoğun miktarda immünoglobulin (Ig) sekresyonunun gerçekleşmesi önemli ölçüde TLR4 ve TLR9 ile sağlanmaktadır (Buchta ve Bishop, 2014).

Bu kompleksler ayrıca immün olmayan hücrelerde de yoğun miktarda eksprese olarak savunma yanıtının düzenlenmesine yardımcı olabilmektedir. Örneğin; vasküler endotel hücreler PAMP ve DAMP gibi ligandları, ihtiva ettikleri TLR'ler ile tanıyarak immün yanıtın ilk hattında inflamatuvar sitokinlerin salınımını sağlamakta ve hasar görmüş damar dokularının rejenerasyonu için gerekli stimülanların üretimini gerçekleştirmektedir (Salvador ve ark., 2016).

2.13. TLR'ler ve Kanser İlişkisi

İmmün sistem, kanser gelişimini kontrol altında tutan en önemli organizasyondur. Buna rağmen, kanser hastalarında tümör hücrelerinin immün gözetimden kaçmak için çeşitli mekanizmalar geliştirdikleri bilinmektedir. Bu mekanizmalar, kanserin “hallmark” olarak tabir edilen karakteristik özelliklerinden bir tanesidir (Ribatti, 2017).

Tümör mikroçevresi (TME) tümör ve ilişkili yapılardan oluşan kompleks bir ortamdır. Bu bölgede tümör dokusunun yanı sıra, T ve B lenfositleri, DC'ler, NK hücreleri, fibroblastlar, makrofajlar, tümör stroması, kan damarları ve çeşitli sitokin ve kemokinler bulunmaktadır. İmmün gözetimden kaçan tümör hücreleri TME'yi pro-karsinojenik çıkarları konusunda yöneterek, burada dominant bir rol üstlenmektedir (Whiteside, 2008). Ayrıca, tümör gelişimi boyunca ortamdaki anti-kanserojenik etkilerini yitirmiş immün hücrelerin kronik inflamasyona sebep olarak, kanser gelişimini arttırdıkları gözlenmektedir (Gonzalez ve ark., 2018).

TLR'lerin immün yanıtındaki rolleri ise kritiktir. Ancak, sistemik lupus eritematozus (SLE), romatoid artrit (RA), multiple sklerozis (MS), ateroskleroz, hipertansiyon, iskemi, diyabet gibi inflamasyon ve otoimmünite ile ilişkili olan hastalıklarda bu yapıların kötü bir şöhrete sahip olduğu belirtilmektedir (Hosseini ve ark., 2015; Salvador ve ark., 2016). Ayrıca, TLR'lerin TME'deki fonksiyonları ise tartışmalıdır. Çünkü, burada normal şartlarda immün hücrelerin efektör faaliyetlerini modüle eden bir görev üstlenmektedir. TME'de, özellikle TLR ilişkili sinyal yolları aracılığıyla üretilen kemokin ve sitokin gibi moleküller, infiltre olan immün hücrelerinin TGF β (transforme edici büyüme faktörü β), IL-8, CXCR4 (c-x-c kemokin reseptörü tip-4), ICAM-1 (intraselüler adezyon molekülü I) ve VEGF (vasküler endotelial büyüme faktörü) gibi pro-inflamatuvar, pro-anjiyogenik ve büyüme sinyali oluşturan moleküllerin sekresyonunu kayda değer biçimde arttırmalarına sebep olmaktadır. Sonuçta bu durum, tümör progresyonunu ve metastatik faaliyetleri sınırlamaktadır (Cen ve ark., 2018).

Ancak son yıllarda, TLR ve ilişkili yolları yardımıyla sağlanan inflamatuvar yanıtın tümör progresyonunu arttırabileceğine işaret edilmektedir. TME içerisindeki karmaşık işlevleri yüzünden, bu reseptörler kanser ilişkili çalışmalarda “iki ucu keskin bıçak” şeklinde tanımlanmaktadır (Du ve ark., 2016). TLR’ler ve kanser progresyonu arasındaki durumu daha da karmaşıklaştıran bir başka faktör; tümör hücrelerinin yüzeylerinde bu reseptörleri eksprese edebilme kapasitesi sergilemesidir. Ayrıca, bu olgu direkt olarak hastalığın seyrini değiştirebilmektedir. Bazı kanser türlerinde TLR ekspresyonları ve ilişkili olduğu sağ kalım verileri Çizelge 2.6.’da yer almaktadır.

Kanser hücrelerinde TLR ekspresyonunun kanser gelişimine olan fonksiyonel etkileri halen tam olarak anlaşılamasa da birçok çalışmada bu konu detaylıca tartışılmaktadır. TLR eksprese eden kanser hücrelerinin hayatta kalım ve anti-apoptotik sinyallerini, tümör gelişimini, anjiyogenezi ve hücre göçünü indükleyici sitokin genlerinin ifade düzeylerini arttırabildikleri gösterilmiştir (Yusuf, 2014). Meme kanseri Kanser Genom Atlası (TCGA) verilerini içeren bir çalışma, TLR’lerin normale kıyasla tümör hücrelerinde inflamatuvar sitokinler olan IL-1 β , TNF- α , INF β gibi molekülleri up-regüle ettiği gözlemlenirken, TLR4 ve TLR7’deki ifade artışının direkt olarak daha kötü sağ kalım verileriyle ilişkili olduğu ortaya konulmaktadır (Shi ve ark., 2020). Meme kanseri hücre hattı MDA-MB-231 normal şartlar altında yüksek proliferatif karakteristik ve adaptif immüniteye karşı direnç mekanizmaları sergileyebilmektedir. Ancak, TLR4 geni knock-down edildiğinde hücre canlılığının azalmasının yanında, MDA-MB-231’e karşı sitotoksik T hücresi ve NK hücresi aktivitesinin arttığı anlaşılmıştır (Bhatelia ve ark., 2014). Ayrıca, MCF7 hücre hattında TLR4 ligandı olan LPS (lipopolisakkarit) uygulamaları, matriks metalloproteazlar olan MMP2 ve MMP9 gibi enzimleri ve anjiyogenezi faktörlerini hücresel düzeyde up-regüle ederek MCF7’nin potansiyel metastatik ve invaziv kabiliyetlerine yön vermektedir (Yang ve ark., 2014).

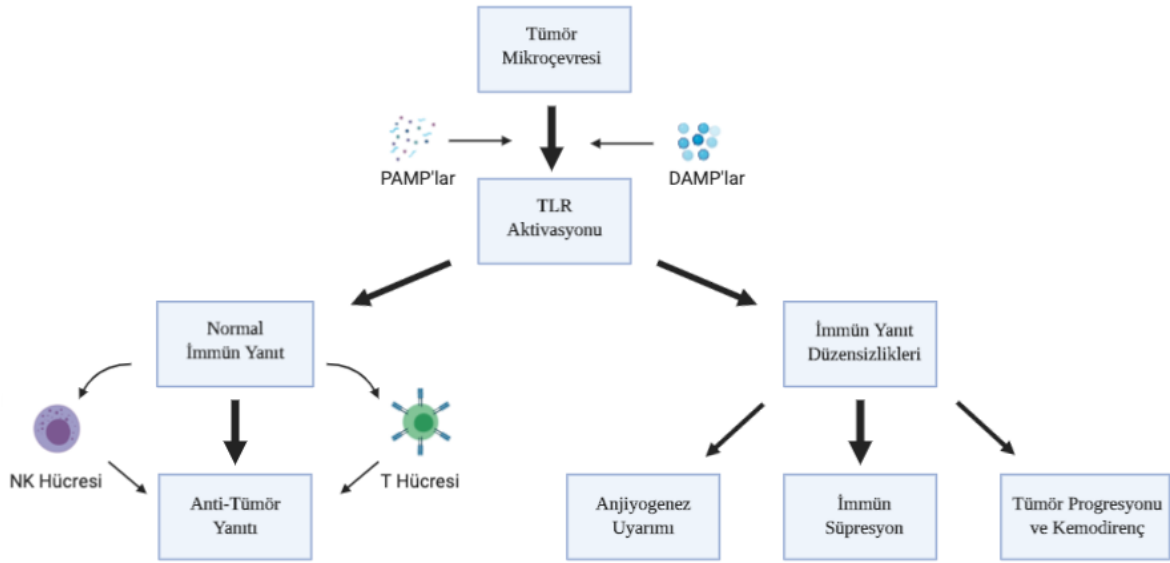
Çizelge 2. 6. Klinik verilere göre TLR ekspresyonunun kanser hastaları üzerindeki etkileri (Urban-Wojciuk ve ark., 2019)

Kanser türü	TLR	Gözlem
Özofagus kanseri	TLR -3, -4, -7, -9	TLR -3, -4, -7 ve -9 kanserde yoğun eksprese olur; TLR9 direkt olarak yüksek proliferasyon ve ileri kanser evreleri ile ilişkilidir.
Akciğer kanseri	TLR -4, -5, -7, -8, -9	TLR -4, -5, -7, -8 ve -9 akciğer kanserinde yoğun eksprese olur; TLR5 iyi prognozla, TLR7 kötü prognozla ilişkilidir.
Melanoma	TLR -7 ve -8	Daha iyi genel survival değerleri ile ilişkilidir.
Pankreas kanseri	TLR -7 ve -8	Kanser hücrelerinde normal hücrelere nazaran daha çok eksprese olurlar.
Meme kanseri	TLR9	TLR9 down-regülasyonu daha kötü survival verileri ile ilişkilidir.
Renal hücreli karsinom	TLR9	TLR9 daha iyi survival verileriyle ilişkilidir.
Glioma	TLR9	TLR9 artan ekspresyonu daha kötü survival verileriyle ilişkilidir.
Prostat kanseri	TLR9	TLR9 daha kötü survival verileri ile ilişkilidir.
15 solid kanser türünde yapılan bir meta analiz	TLR4	TLR4 ekspresyonundaki artış daha kötü survival verileri ile ilişkilidir.

Akciğer kanserinde ise TLR2, -4, -7, -8 ve -9 düzeyleri normal dokuya kıyasla yüksektir. TLR2, -4 ve -9'un akciğer kanserinde anti-inflamatuvar proteinler olan TGF β ve IL-10'u ve büyüme faktörleri olan VEGF ve fibroblast-büyüme faktörünü (FGF2) up-regüle ettiği bilinmektedir. Ayrıca, TLR4 direkt olarak epidermal büyüme faktörü reseptörünün (EGFR) aktivasyonunu da uyarabilmektedir (Pinto ve ark., 2011). TLR9'un ise özellikle VEGF ve büyüme faktörlerinin üretimi ile ilişkili olduğu belirlenmiştir. Bu özellik, EGFR inhibitörü cetuximab kullanıldığında TLR9 ilişkili sinyal yollarının tümör gelişimine olan etkisini de

sınırlandırmaktadır (Arora ve ark., 2019). Fabbri ve arkadaşları ise (2012), Lewis akciğer kanseri hücre hattı olan LLC hücrelerinde kanser ilişkili eksozomal mikro RNA'ların (miRNA) TLR8'i uyarmak maksadıyla inflamatuvar moleküller olan TNF- α ve IL-6'yı arttırdığını, ayrıca *in vivo* akciğer kanserleri fare modelinde bu miRNA'ların TLR7 aracılığıyla metastatik faaliyetlerini geliştirdiklerini bildirmektedir.

İnflamasyon, kolorektal kanseri için büyük bir risktir. Kalın bağırsak ve çevresinde gelişebilen bu mekanizma, sporadik ve kalıtsal kökenli karsinogenez sürecini direkt olarak indükleyebilmektedir (Terzic ve ark., 2010). TLR'lerin ifade artışı kronik inflamasyonla ilişkilendirilmekte olup, TLR4 özellikle karaciğere metastaz yapan tümör hücrelerinde işlevsellik göstermektedir (Yesudhas ve ark., 2014). Bununla beraber, TLR9'un ise kolorektal kanserin progresyonunu azaltıcı bir biçimde rol oynayabileceği düşünülmektedir. Yapılan çalışmalar, karsinogeneze meyilli poliplerin TLR9 ekspresyonunu önemli ölçüde azalttığını gösterse de bu reseptörün fonksiyonel olarak nasıl bir etkiye sahip olduğu tam olarak bilinmemektedir (Li ve ark., 2014). Ayrıca, bu komplekslere ait bir takım mutasyonların kolorektal kanseri ile ilişkili olabilmesi de mümkündür. Metastatik kolorektal kanseri hastaları ve sağlıklı bireyleri içeren bir çalışma, TLR2, -4 ve -9 polimorfizmlerinin hastalarda yüksek olduğunu ve bu durumun kanser progresyonu ile ilişkili olduğunu vurgulamaktadır (Messaritakis ve ark., 2018). Ayrıca, bir başka klinik veri seti, TLR2 ve TLR4'teki genetik varyasyonların kolorektal kanseri, TLR3'teki değişimlerin ise rektal kanser ile bağdaştığını belirtmektedir (Slattery ve ark., 2011).



Şekil 2. 6. Tümör mikroçevresinde TLR aktivasyonu ve potansiyel yanıtları. Tümör mikroçevresinde eksprese olan TLR'ler ortamdaki PAMP ve DAMP'ları bağlamak maksadıyla aktif hale gelir. Bu aktivasyon normalde immün hücreler tarafından anti-tümör yanıtına sebep olurken, immüniteyi regüle eden tümör hücreleri, TLR aktivasyonu ile anjiyogeneze, immün süpresyona, tümör progresyonuna ve kemodirenç sebep olabilmektedir (Husseinadeh ve Davenport, 2014)

2.14. TLR1/2 İlişkili Sinyal Yolakları ve Kanser

TLR2, TLR ailesinin üyelerinden biri olup genellikle lipid içerikli ligandlara karşı yüksek afinite göstermektedir. Plazma zarında sinyal iletimi için gerekli dimerizasyonu TLR1 veya TLR6 ile sağlayarak heterodimerik kompleksler oluşturmaktadır (Botos ve ark., 2011). TLR1/2 ve TLR6/2'nin potansiyel ligandları arasında PAMP ilişkili lipoteikoik asit, lipoproteinler, peptidoglikanlar, maya mannanları, lipoarabinomannan yer alırken, ısı şok proteini (hsp) -60 ve -70, high mobility group box 1 protein (HMGB1), HMGB1-nükleozom kompleksleri, β -defensin-3 ve eozinofil kökenli nörotoksinler gibi DAMP ilişkili moleküller de bulunmaktadır (Blikslager ve ark., 2007; Piccinini ve Midwood, 2010). Ayrıca, bu reseptörler ve ilişkili sinyal yolaklarını uyaran endojen kaynaklı β -defensin-3, hsp ve HMGB1 gibi DAMP molekülleri hasar görmüş dokulardan, nekrozisten ve kanser

hücrelerinden köken alan “alarmin” yapıları olarak adlandırılmaktadır (Oliveira-Nascimento ve ark., 2012).

HMGB1, normal şartlarda DNA’ya bağlanmak suretiyle transkripsiyon regülasyonu sağlayan bir protein olarak görev yapmaktadır. Bununla beraber, nekrotik ya da apoptotik hücrelerden salgılandığında, bir pro-inflamatuvar sitokin gibi işlev görerek immün yanıtı uyarabilmektedir (Yu ve ark., 2006). Aynı zamanda, TLR ve ilişkili yollar için bir DAMP ligandı olarak görülmektedir. Çeşitli hücrelerde eksprese olan TLR1/2 ve TLR6/2, hücre dışı ortamdaki HMGB1’i bağlamak suretiyle inflamasyon ile ilişkili yollarını uyarmaktadır (Li ve ark., 2012). Bugün bir çok çalışma, solid kanser türlerinde HMGB1 ekspresyonunun arttığını göstermekte ve bu proteinin kanser hücrelerinin gelişimine ve EMT özelliklerine katkı yaptığını bildirmektedir (Sims ve ark., 2010). Ayrıca, DAMP ilişkili karsinogenezi arttırdığı bilinen hsp60, hsp70 gibi ısı şok proteinleri de ayrıca TLR2 ilişkili reseptörlere bağlanabilmektedir (Murshid ve ark., 2012).

TLR1/2 ilişkili sinyal yolları genellikle NF-kB adı verilen bir transkripsiyon faktörü kompleksinin aktivasyonunu içeren bir dizi protein etkileşimleri içermektedir. Bu etkileşimler, NF-kB’nin nükleusa lokalizasyonunu sağlayarak, inflamatuvar yanıtın regülasyonunda görevli çeşitli genlerin transkripsiyona açık hale gelmesine yardımcı olmaktadır (Qiu ve ark., 2016). NF-kB, inflamasyonda rol oynayan en önemli transkripsiyon faktörü ailelerinden bir tanesidir. Yapısal olarak, p50, p52, p65, RelB ve c-Rel olmak üzere çeşitli üyeleri bulunmaktadır. Bu moleküllerin aktivasyonu için genellikle PRR ailesi üyeleri TLR’lere, RIG-I-like reseptörlere, NLR’lere ve C-type lectin-like reseptörlerine ihtiyaç duyulmaktadır (Liu ve ark., 2012). Bugün birçok kanser türünde NF-kB’nin fonksiyonundaki düzensizliklerin tümör progresyonu ile ilişkili olduğu ortaya koyulmaktadır (Liu ve ark., 2017). Ayrıca, NF-kB aktivitesi meme, kolon ve lenfatik kanserlerde metastaz ve kemoterapi direnci ile de bağdaştırılmaktadır (Xia ve ark., 2018). TLR2 ilişkili reseptörlerin aşağı akışında bulunan, NF-kB gibi inflamasyon ve kanser progresyonu ile ilişkili olabilecek diğer transkripsiyon faktörleri ise p38 ve JNK’dir (Cicenas ve ark., 2017).

2.15. Over Kanserinde TLR'lerin Rolü

İnflamasyon, over kanseri gelişiminde önemli bir faktör olarak görülmektedir. Özellikle tümör dokusuna karşı ortaya çıkarak kronik ya da ani şekilde etkisini sergileyebilmektedir. Ani inflamasyon, overlerde doku hasarı oluştururken, rejenerasyon ihtiyacı gereği bölgedeki hücreler proliferatif özellikler kazanmaktadır. Kronik durumda ise eksojen ya da endojen kaynaklı faktörler over dokusu etrafında devamlı artan bir immün yanıt oluşturarak bölgedeki hücrelerin uzun süre reaktif oksijen türevlerine ve çeşitli sitokinlere maruz kalmasına neden olmaktadır. Böylece hücrelerde DNA hasarları birikmekte ve pro-karsinojenik sinyal iletimi uyarılmaktadır (Charbonneau ve ark., 2014). İnflamasyon ve over kanseri gelişimi arasındaki ilişkiyi anlatan en tutarlı hipotezlerden bir tanesi ovaluasyon teorisidir. Buna göre, ovaluasyonun gerçekleştiği bölgeye yakın konumdaki epitel hücreleri uzun süre oksidatif strese maruz kaldıklarında malign forma dönüşebilmektedir. Ayrıca, ovaluasyon sonunda doku tamirinin gerçekleşmesi için bölgede artan sitokin ve kemokin konsantrasyonu ilgili konuma pro-inflamasyon ile ilişkili immün hücreleri de çekmektedir. Tüm bu durumlar özelinde, şu an için inflamasyonunun over kanseri gelişimine bu şekilde etki edebileceği varsayılmaktadır (Maccio ve ark., 2012).

Over kanserinde tümör mikroçevresi (TME), inflamatuvar sitokinleri, matriks metalloproteazları, kanser ve kök hücrelerini, endotel hücrelerini, kanser ilişkili fibroblastları ve immün hücrelerini içeren kompleks bir ortamdır (Yang ve ark., 2020). Tümör hücreleri TME'yi regüle eden en önemli oluşumdur. Öyle ki, tümör-tümör etkileşimleri bölgedeki yoğun sitokin ve büyüme faktörü varlığından sorumludur. Ayrıca TME, VEGF, bFGF (temel fibroblast büyüme faktörü), IL-6, NO (nitrik oksit), M-CSF (makrofaj koloni uyarıcı faktör), TNF ailesi üyeleri gibi tümör progresyonunu ve kemoterapi direncini arttırıcı moleküllerin bulunduğu bir bölge konumundadır (Mansoori ve ark., 2017). Araştırmalar, bu moleküllerin TLR ilişkili sinyal yolları yardımıyla up-regüle olduğunu göstermektedir (Varoga ve ark., 2006; Wu ve ark., 2018; Abdul-Cader ve ark., 2016). Böylece tümörlerde, immün ve stromal hücrelerde ifade olan TLR'ler, bu ortama daha agresif bir karakteristik kazandırmaktadır (Ridnour ve ark., 2013). Dolayısıyla, TLR eksprese eden hücrelerin ve TLR ilişkili

moleküllerin yoğunluğu, kanser progresyonu ve kemodirenç ile direkt olarak ilişkilendirilmektedir.

Kanser hücrelerinin TLR eksprese edebilme kapasiteleri, over kanserinde bu reseptörlerin potansiyel rolünün araştırılması amacıyla klinik ve *in vitro* deneyler için bir çalışma alanı oluşturmaktadır. Şu ana kadar en yaygın bilgi, benign veya malign tümör dokusunda TLR2, -3, -4 ve -5'in yoğun biçimde ifade olduğudur (Zhou ve ark., 2009). Öyle ki, TLR4 ekspresyonunun, Li ve arkadaşlarının yürüttüğü 500 kişilik hasta grubunu içeren bir çalışmada (2016), direkt olarak daha kısa sağ kalım değerleri ile ilişkili olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, bu bireylerin serumunda diğer TLR'ler için de ligand vazifesi gösteren hsp -60, -70, beta 2 defensin ve HMGB1 gibi endojenik yapılara da rastlanmıştır. Destekleyici şekilde, peritoneal karsinomatöz ya da asit sıvısında TLR4 ortalama değeri, ileri evre over kanseriyle ve kısa hayatta kalım verileriyle ilişkilendirilmektedir (Vlad ve ark., 2018). Bununla beraber, 5263 adet hasta örnekleri içeren başka bir raporda ise, TLR4'ün YDSK'de hayatta kalım değerlerine direkt etki etmediği, ancak adaptörü MyD88'in aşırı ekspresyonunun önemli ölçüde genel sağ kalımı azalttığını göstermektedir. İlginç bir şekilde, düşük dereceli seröz karsinomlarda ise TLR4'ün up-regülasyonunun daha iyi sağ kalım değerleriyle ilişkili olabileceği de ortaya koyulmaktadır (Block ve ark., 2018). Sonuç olarak literatürdeki kısıtlı bilgilere göre, over kanserinde TLR4 ekspresyonu ileri evre hastalarda daha kötü hayatta kalım mekanizmalarıyla ilişkiliyken, erken evreli hastalarda iyi prognoz değerlerine aracılık edebilmektedir.

TLR2 ise progresif etkilere sahip bir başka reseptör olarak dikkat çekmektedir. Kanser kök hücreleri, normal dokuya kıyasla andiferansiye olmuş güçlü rejeneratif yeteneklere ve tümör arttırıcı özelliklere sahip yapılardır. Bu hücrelerin metastaz, nüks ve kemoterapi direnci yetenekleri oldukça yüksektir (Kenda Suster ve Virant-Klun, 2019). TLR2 ve ilişkili reseptörlerini eksprese eden over kanseri kök hücrelerinde, MyD88 aracılığıyla cerrahi ya da kemoterapi uygulamaları sonrasında nükseden vakalar ile bağlantı kurulmaktadır. Ayrıca, TLR2-MyD88-NF-kB yolağı direkt olarak pro-inflamatuvar sitokin salınımı uyararak tümör dokusunun rejenerasyonunu da arttırmaktadır (Chefetz ve ark., 2013).

EMT, epitel hücrelerin bağlı olduğu bazal yüzeyden çeşitli proteinlerin ekspresyonunu değiştirmek suretiyle ayrıldığı ve migrasyon, invazivite apoptozis direnci gibi özellikler kazandığı bir hücresel davranıştır (Kalluri ve Weinberg, 2009). EMT ayrıca, YDSK'de kanser başlatıcısı olduğu ve progresyonu arttırıcı etkiler üstlendiği bildirilmektedir (Loret ve ark., 2019). TLR5 ve TLR7, over kanseri hücrelerinde uyarıldığında özellikle EMT ilişkili proteinler olan Wiskott-Aldrich sendromu protein verprolin-homolog 3 (WAVE3) ve mezotelin/CA125 seviyelerini önemli ölçüde arttırmaktadır. Ayrıca, bu proteinlere ait olan genler knock-down edildiklerinde hücrelerin ivazivite ve mezenkimal karakteristikleri de baskılanmaktadır (Park ve Kim, 2017). Bir başka çalışma ise, EMT ile ilişkili olarak TLR9'un over kanserindeki rolünü tanımlamaktadır. TLR9, over kanseri hücrelerinde uyarıldıklarında önemli oranda NF-kB aktivitesine sebep olup, hücrelerin EMT fenotipini arttırmaktadır (Berger ve ark., 2010).

Sonuç olarak, over kanserinde TLR'lerin kanser progresyonuna ve kemoterapi direncine direkt olarak etki edebildiğini söylemek mümkündür. Ancak, literatürde bu reseptörler ve over kanseri arasındaki etkileşimi kapsamlı ve fonksiyonel olarak açıklayabilecek yeterli kaynak sayısı çok azdır. Dolayısıyla, iki olgu arasındaki durumu kavrayabilmek, hem TLR ve bağlantılı sinyal yollarının hem de kanser immünolojisinin daha iyi anlaşılmasına olanak tanıyacaktır. Bu doğrultuda tez çalışmasında, TLR1/2 membran reseptörünün over kanseri hücrelerindeki proliferatif yanıt ve kemoterapi direnci davranışlarına olan potansiyel etkilerinin aydınlatılması amaçlandı.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

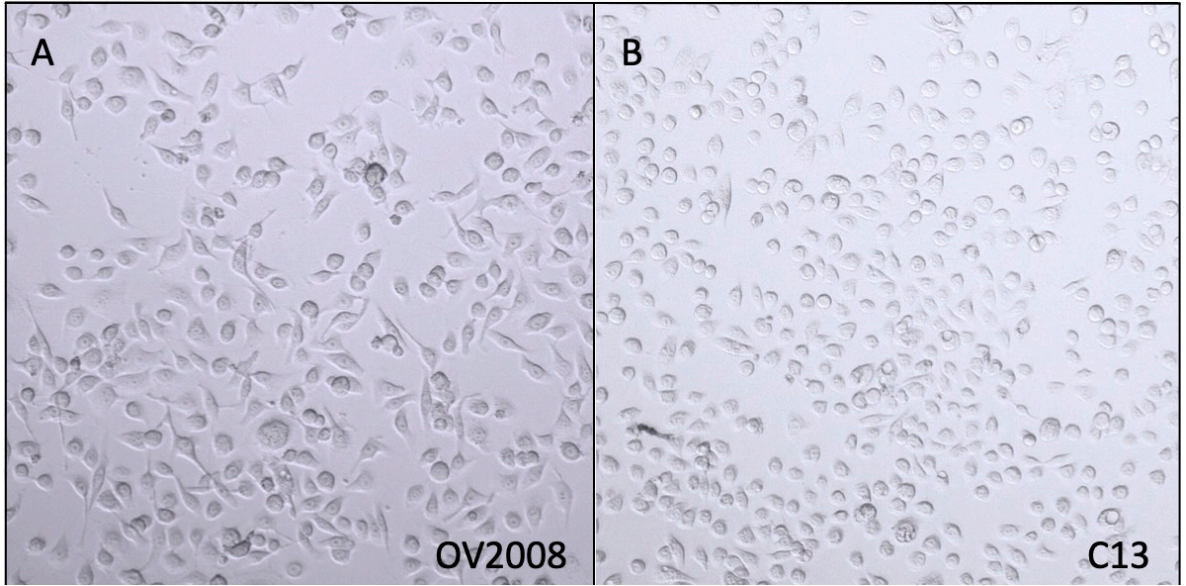
3.1. Hücrelerin Kültüre Edilmesi

Tüm hücre kültürü işlemleri güvenlik kabininde (ESCO, Class II, Type A2) gerçekleştirildi. Hücre kültürü laboratuvarı kontaminasyon riskini en aza indirmek için deney öncesi ve sonrası morötesi ışın uygulaması yapıldı. Çalışma alanı ve malzemeler %70'lik etanol ile temizlenerek kullanıldı. Ayrıca, kabin ortamı ve kullanılmış sarf malzemeler %10'luk çamaşır suyu ile düzenli olarak temizlenirken, tek kullanımlık materyaller otoklavlanarak uzaklaştırıldı.

Bu çalışmada, Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünde, kanser araştırma laboratuvarı stoklarında mevcut olan over kanseri hücre hattı OV2008 (*Heterozygous for PIK3CA p.Glu545Lys (c.1633G>A)*) ve onun kemodirençli klonu C13 hücreleri kullanıldı. Kültür işlemleri için %10'luk fetal sıgır serumu (FBS, Biological Industries) ve 5 mM'lık penisilin-streptomisin (Biological Industries) solüsyonu ile zenginleştirilen RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) besiyeri tercih edildi. -80°C sıcaklıktaki soğutucudan çıkarılan cryovial'lerdeki hücreler, 50 ml'lik santrifüj tüpleri içerisinde besiyeri yardımıyla çözündürülerek, 3000 RPM'de 3 dakika santrifüj işlemi sonrası dibe çöktürüldü. Oluşan peletten besiyeri uzaklaştırılarak, yaklaşık 15 ml taze medya ile süspanse hale getirildi ve çözelti 75 cm²'lik kültür kaplarına (Corning) aktarıldı. Ardından, kaplar 37°C, %5 CO₂ ve %80-90'lık nem saturasyonuna sahip inkübatör ortamına alınarak hücrelerin adherent haline geçmesi ve çoğaltılması amaçlandı. İnkübasyon işleminin üçüncü günü ortamdaki besiyeri uzaklaştırıldı ve 1X fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) ile yıkaması sonrası içerisine tekrar taze besiyeri aktarıldı. Ayrıca, kemodirençli C13'ün kültür işlemleri 1.5 µM konsantrasyonunda sisplatin (Koçak Farma) içeren ortamda devam ettirildi. Hücreler konfluent hale ulaştıklarında pasaj işlemlerine geçildi. Bu amaçla, kültür kapları önce PBS ile yıkandı ve içerisine yaklaşık 5 ml tripsin-EDTA solüsyonu ilave edildi. Sonra, tabandan ayırma işlemi ve ortama taze besiyeri ilavesi ile resüspanسیون sağlandı. OV2008 ve C13'ün bir kısmı hemositometre yardımıyla sayılarak 1.000.000/15 ml olacak olacak şekilde yeni

kültür ortamlarına aktarılarak pasaj işlemi gerçekleştirildi. Pasaj sonrası yaklaşık 4-5 gün sonunda konfluent hale gelen hücrelerin mikroskop görüntüleri Şekil 3.1.'de yer almaktadır.

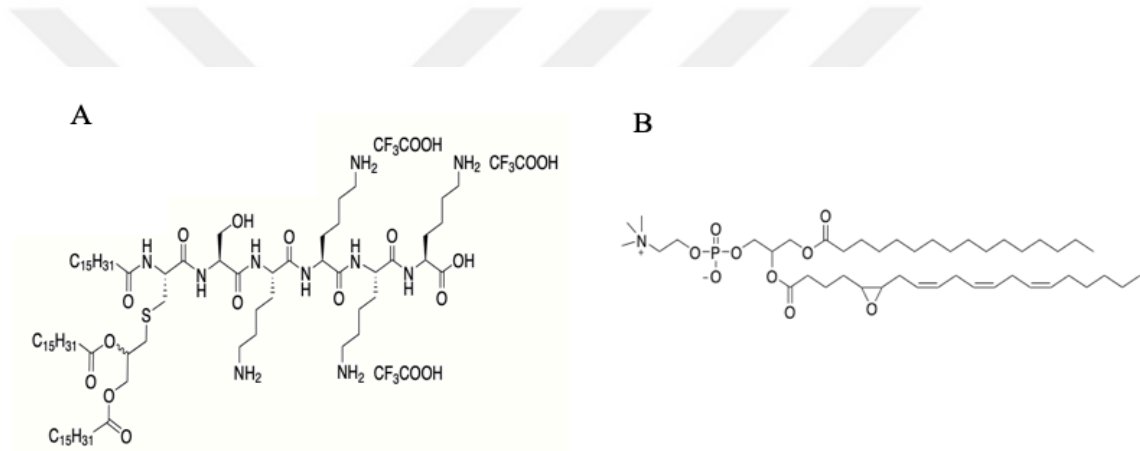
İlk pasaj işlemine spesifik olarak, sayım sonrası artan hücreler 150 cm²'lik yeni kültür kaplarına alındı ve hücre dondurma işlemi için inkübasyona bırakıldı. Pasajlama işlemindeki adımlar tekrar edilerek, farklı olarak 1.000.000/ml'lik hücre konsantrasyonu freezing medium (dondurma solüsyonu; Biological Industries) içerisinde cryovial tüplere transfer edildi. Cryovial tüpler -20°C'de yarım saat bekletildikten sonrası, uzun süreli saklama işlemi için -80°C'lik dondurucuya aktarıldı.



Şekil 3. 1.Kültürdeki over kanseri hücrelerinin mikroskop görüntüsü. A- Kemoduyarlı OV2008 hücre hattı, B- Kemodirençli C13 hücre hattı (10x'lik objektif, 200 µm ölçek)

3.2. Hücre Hatlarının Üzerinde Denenecek TLR1/2 Ligandları Olan Pam3CSK4 ve OxPAPC ile Kemoterapi İlacı Sisplatinin Uygun Konsantrasyonlarda Hazırlanması

Laboratuvar çalışmaları boyunca OV2008 ve C13 hücre hatları çeşitli konsantrasyonlardaki Toll-benzeri reseptör 1/2 (TLR1/2) agonisti Pam3CSK4 (Invivogen), antagonisti OxPAPC (Invivogen) ve kemoterapi ilacı sisplatin ile muamele gördü.



Şekil 3. 2.Pam3CSK4 ve OxPAPC'nin moleküler yapısı. A- Pam3CSK4'ün (P3C), B- OxPAPC'nin (OXp) moleküler yapısı (Invivogen, 2020)

Pam3CSK4 (N-Palmitoil-S-[2,3-bis(palmitoiloksi)-(2RS)-propil]-[R]-sisteinil-[S]-seril-[S]-lizil-[S]-lizil-[S]-lizil-[S]-lizil-[S]-lizin), TLR1/2 heterodimer kompleksi için tanımlanmış sentetik bir triaçil lipopeptid olup, yapısı bakımından iki zinciri TLR2'ye, bir zinciri ise TLR1'e bağlanan üç zincirli yağ asidi moleküllerine sahiptir (Jin ve ark., 2007). İlgili reseptörüne bağlandığında özellikle NF-kB transkripsiyon faktörü ile ilişkili yolların aktivasyonuna sebep olmaktadır (Funderburg ve ark., 2011; Kim ve ark., 2018). OxPAPC (oksidize 1-palmitoil-2-arakidonil-sn-glisero-3-fosforilkolin) ise bakteriyel lipopeptidler aracılığıyla oluşturulan sinyalleri engelleyen bir fonksiyona sahiptir. Özellikle TLR2 ve TLR4 gibi reseptörlerle ilişkili dimerik yapıların oluşumuna yardımcı olan CD14, LBP ya da MD2 aksesuar proteinlerini taklit ederek reseptör dimerizasyonun önüne geçmektedir (Erridge ve ark., 2008). Bu sayede, TLR2 ve TLR4'ün ligand bağlama ve ilişkili sinyal yollarını

aktivite edebilme kapasitesini baskılamaktadır (Blüml ve ark., 2005). Sisplatin (*cis*-diamindikloroplatinum (II)) mesane, baş ve boyun, akciğer, testis ve over gibi kanserlerin tedavisinde ise uzun yıllardır en aktif biçimde kullanılan kemoterapi ilaçlarından bir tanesidir. DNA zincirleri arasına penetre ederek hücre siklusunun durmasına sebep olmakta ve hücreleri apoptozis yolağına sokmaktadır (Helm ve States, 2009; Dasari ve Tchounwou, 2014). Ayrıca, sitotoksik etkileri iyi karakterize edildiğinden uzun yıllardır hücre kültürü çalışmalarında yaygın şekilde kullanılmaktadır (Prabhakaran ve ark., 2013).

Sisplatin ve TLR ilişkili moleküllerin, literatür taraması sonucu ve ilgi firma protokolünde yer alan öneriler yardımıyla belirli konsantrasyon aralıklarında hücreler üzerindeki potansiyel etkileri test edildi. Bu amaçla sisplatin, öncelikle enjektör yardımıyla stok çözeltisinden toplandı ve 0.22 µm'lik membran filtreden geçirilerek (Millipore, Merck), fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) içerisinde dilüye edildi. Elde edilen seyreltilmiş konsantrasyonlar oda sıcaklığında ve ışısız ortamda saklandı. Liyofilize formda gelen Pam3CSK4 için alikot ve dilüsyon işlemleri endotoksin-free su (Invivogen) ile; OxPAPC için alikot işlemi kloroform, gerekli dilüsyon işlemleri ise RPMI besiyeri yardımıyla sağlandı. Pam3CSK4 çözeltileri -20°C'de muhafaza edildi. OxPAPC çözeltileri ise ilk olarak kloroform ile alikotlanarak steril ependorflara bölüştürüldü. Ardından, tüp içerisinde bulunan kloroformun sıvı nitrojen akımından geçirilerek uçması sağlandı. Kloroform uzaklaştıktan sonra OxPAPC molekülleri film tabakası halinde ependorf tabanına yerleşti. Tüpler, moleküllerin uzun süreli saklanması için -80°C'lik dondurucuya aktarıldı. Sitotoksite ya da proliferasyon ölçümleri için kullanılan her bir solüsyona ait konsantrasyonlar ise şu şekildedir: Pam3CSK4: 0.01, 0.05, 0.1, 1, 5 µg/ml; OxPAPC: 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5 µg/ml; sisplatin: 2.5, 5, 10, 20, 40 ve 80 µM (OV2008 için) ile 10, 20, 40, 80, 160 ve 320 µM (C13 için). Ayrıca, satın alınan ürünün manuelinde yer alan bilgiler doğrultusunda OxPAPC uygulaması sonrası kültür ortamına ayrıca 0.1 µg/ml Pam3CSK4 ilave edilerek, OxPAPC'nin potansiyel etkileri yalnızca 0.1 µg/mL Pam3CSK4 ilavesi içeren hücre kontrol gruplarıyla kıyaslandı. Ayrıca, sisplatin ve Pam3CSK4'ün birlikte kullanıldığı testlerde ise Pam3CSK4 solüsyonu ile hücreler ilk olarak 4 saat ön uygulama görüp, ardından IC₅₀

konsantrasyonunda belirlenmiş sisplatin ortama dahil edilerek 24 saat inkübasyon işlemi gerçekleştirildi.

OV2008 ve C13 üzerinde denenecek moleküllerin potansiyel sitotoksik ya da proliferatif etkilerini belirlemek için hücreler 96-kuyucuklu kültür kaplarına transfer edildi. Bunun için konfluent haldeki hücreler alt kültür işleminde olduğu gibi tripsin muamelesi sonrası sayılarak, belirlenen konsantrasyonlarda dilüye edildi. 96-kuyucuklu kültür kaplarına kuyucuk başına 7500 hücre/200 µl olacak şekilde, %10 fötal sığır serumu (FBS) içeren RPMI besiyeri içerisinde ekim yapıldı. Sonra hücreler bir gece inkübasyona bırakılarak tabana yapışmaları sağlandı. Ertesi gün %10'luk FBS içeren besiyeri kuyucuklardan uzaklaştırıldı ve yapışmayan ya da ölü durumdaki hücreler ve besiyeri artıklarını uzaklaştırmak için fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) yıkaması gerçekleştirildi. PBS muamelesi sonrası her bir kuyucuğa hazırlanan solüsyonların hücresel etkilerini daha iyi gösterebilmeleri ve hücrelerin serum starvasyonu (serum açlığı) yaşamaları için FBS içermeyen RPMI besiyeri transfer edildi. Çünkü bazı çalışmalar hücre kültüründe kullanılan FBS'in tedavi amaçlı tercih edilen kemoterapötiklerin etkisini baskılayabildiğini göstermektedir (Larsson ve ark., 2020). Ayrıca, serum starvasyonu serum içeriğinin veya içerik konsantrasyonlarının tam olarak tayin edilmemesi nedeniyle yanlış pozitif sonuçlara engel olarak kültür içerisindeki hücre proliferasyonunu homojen tutmakta ve tüm hücreleri belirli bir zaman sonrasında G₀/G₁ fazına sokmaktadır (Pirkmajer ve Chibalin, 2011). Sonuç olarak, denenecek ligandların ve sisplatinin etkinliğini arttırmak ve yalın sonuçlar elde etmek amacıyla hücreler ayrıca bir gece FBS içermeyen besiyerinde inkübe edildi. Ertesi gün ise çeşitli konsantrasyonlarda hazırlanan moleküllerin uygulamaları gerçekleştirildi. Çalışmalar boyunca OV2008 ve C13 hücre hatları Pam3CSK4, OxPAPC ve sisplatin ile 24 saat boyunca muamele gördü.

3.3. Kullanılan Solüsyonların Hücre Canlılığı Üzerine Olan Etkilerinin Belirlenmesi ve Sisplatin'e Ait IC₅₀ Konsantrasyonlarının Hesaplanması

Sisplatin, Pam3CSK4 ve OxPAPC'nin hücreler üzerindeki potansiyel etkilerini belirleyebilmek adına MTT (Metiltiazoldifenil-tetrazolyum bromid) testleri gerçekleştirildi. MTT testi hücre kültürü çalışmalarında hücresel sitotoksitenin, canlılığının ya da proliferasyonunun ölçülmesinde sıklıkla kullanılan bir yöntemdir (Stockert ve ark., 2012). Bir tetrazolyum tuzu olarak, metabolik olarak aktif hücrelerin içerisine girdiğinde mitokondriyal süksinat dehidrogenaz enzimi yardımıyla mor formazan kristallerine indirgenmiştir. Bu kristaller hücrelerin boyanmasına sebep olmakta ve boyanan hücreler canlılık gösteren hücreler olarak tayin edilmektedir (Rai ve ark., 2018). MTT'nin çeşitli çözücüler yardımıyla çözünür hale geçmesi sağlandıktan sonra spektrofotometrik yöntemlerle belirli dalga boylarında ışınlar kullanılarak deney grupları arasındaki hücre canlılığı karşılaştırılmaktadır.

24 saat boyunca çeşitli konsantrasyonlardaki ligand ve sisplatin solüsyonlarına maruz bırakılan hücreler inkübasyon sürecinin ardından MTT testlerine tabii tutuldu. Bu doğrultuda olarak, 96-kuyucuklu kültür kaplarındaki deney solüsyonlarını içeren eski besiyerleri uzaklaştırılarak fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) ile bir kez yıkandı. Ardından, kuyucuklara 90 µl hacminde fenol kırmızısı ve fetal sıgır serumu (FBS) içermeyen renksiz taze besiyeri ilave edildi. Sonrasında, 1mg/1ml (12 mM) konsantrasyonunda PBS içerisinde çözdürülen MTT boyası 10 µl hacimde kuyucuklara ilave edildi (%10 MTT; %90 besiyeri). Bu işlem sonunda hücreler 4 saat boyunca inkübasyona tabii tutuldu. Sürecin ardından canlı hücreler mavi/mor renge büründü. Bir sonraki aşamada ise kuyucuklardan 75 µl hacminde MTT/besiyeri karışımı uzaklaştırılarak içerisine 75 µl DMSO çözücüsü (dimetilsülfoksit) eklendi ve boyanın çözünmesi sağlandı. DMSO ilavesi sonrası orbital shaker'da 1 saat tutulan MTT çözeltisinin bir defa de pipetaj edilmesi sağlandı. 450 nm'lik dalga boyunda kuyucuk içerisindeki MTT çözeltisinin absorbans değerleri spektrofotometrik yöntem (Multiskan GO mikropate reader; ThermoScientific) ile ölçülerek ham veriler elde edildi. Verilerin analizi için kontrol grubu hücrelerindeki absorbans değerlerinin ortalaması alınarak

%100 hücre canlılığı verisi olarak kabul edildi. Bu grup referans alınmak maksadıyla solüsyon uygulaması yapılan kuyucuklardaki hücre canlılıkları yüzde canlılık verisi olarak hesaplandı. Sisplatin uygulaması sonrası IC₅₀ dozunun belirlenmesi için ise MTT deneyleri sonunda doz-tepki eğrileri çizildi. Bu amaçla, bir RStudio (RStudio Team, 2020) paketi olan drc (Ritz ve ark., 2015) tercih edildi. Daha sonra belirlenen sisplatin IC₅₀ konsantrasyonları Pam3CSK4 ile kombinasyon halinde hücre profilasyon testlerinde kullanıldı.

3.4. Total RNA Ekstraksiyonu ve Kantitatif Gerçek-Zamanlı PCR Analizleri

OV2008 ve C13 hücre hatlarında TLR2, BCL2A1, GSTP1 ve ABCB1 kodlayan genlere ait transkriptlerin analizi Gerçek-zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qReal-Time PCR) aracılığıyla yapıldı. Ayrıca, Beta-Actin genine ait transkriptler bu aşamada kontrol ve deney grupları arasındaki normalizasyon işleminde kullanıldı. PCR deneylerinin uygulanabilmesi adına ilk olarak over kanseri hücrelerinden QIAzol (Qiagen) reagent'ı yardımıyla total RNA ekstraksiyonu gerçekleştirildi. Bu amaçla, hücreler kuyucuk başına 1.000.000 adet olacak şekilde 6-kuyucuklu kültür kapları içerisinde, %10 FBS içeren RPMI besiyeri ortamında bir gece inkübe edildi. Ertesi gün serum starvasyonu işlemi için besiyeri ortamdan toplanarak FBS içermeyen RPMI ile değiştirildi. Bir gece daha inkübasyonun ardından kuyucuklara ilgili ligandların yer aldığı solüsyonlar aktararak 24 saat boyunca inkübasyon işlemi gerçekleştirildi. Deney solüsyonları ile muamele aşaması bittikten sonra ise RNA izolasyonu protokolüne geçildi. Uygulanan protokole göre ilk olarak buz üzerinde kuyucuklardan eski besiyeri uzaklaştırıldı ve soğuk PBS ile kuyucuklar yıkandı. Ardından kuyucuklara 1 ml'lik QIAzol eklendi ve pipetaj işlemiyle homojenizasyon sağlandı. QIAzol hücre bütünlülüğü bozduğu için hücre içi moleküllerin dış ortama geçmesi kolaylaştı. Sonraki aşamada kuyucuklardan homojenatlar toplanarak ependorf içerisine aktarıldı. Ependorf tüplere 200' er µl kloroform eklenerek 12.000 RPM'de 15 dakika santrifüj işlemi gerçekleştirildi. Santrifüj sonunda oluşan süpernatant yeni ependorflara transfer edildi ve üzerine 500 µl isopropanol eklenerek 10 dakika inkübasyona bırakıldı. Tüpler tekrar 12.000 RPM'de 10 dakika santrifüj işlemine tabi tutuldu. Santrifüj sonunda RNA peleti görünür hale geldi ve isopropanol uzaklaştırıldı. Ardından, RNA'nın yıkanması amacıyla ependorflara 300 µl %75'lik etanol

eklendi. 12.000 RPM’de 3 dakikalık santrifüjün ardından pelet üzerindeki etanolün tamamen uçması için tüpler ağzı açık şekilde kurumaya bırakıldı. Alkol ayrıştıktan sonra, RNAaz/DNAaz-free su ile pelet çözdürüldü ve çözeltiler 1’er µl’lik hacimde mikrolaka okuyucusuna yüklendi. RNA konsantrasyonları belirlerken 260 nm dalga boyu kullanılarak elde edilen absorbans değerleri 40 ile çarpıldığında örneğin ng/µl cinsinden konsantrasyonları elde edildi. RNA’lar uzun süre saklanmak adına -80°C’lik dondurucuya transfer edildi.

Kantitatif Gerçek-zamanlı PCR deneyleri için ilgili transkriptleri amplifiye edecek primerler önceden sipariş edildi (MacroGen). Deneyler süresince araştırmacılara tek adımlı PCR imkanı tanıyan 1Step Magic SYBR Kit’i (Procomcure) kullanıldı. Ayrıca, bu kite ait önerilen protokol ve bileşen konsantrasyonları tercih edildi.

Buna göre her bir reaksiyon için:

- 10 µl 2x qPCR Mix’i,
- 0.4 µl VitaScript™ 50X,
- 0.4 µl F (0.8 µM)
- 0.4 µl R primerler (0.8 µM)
- ve içerisinde 10 ng RNA bulunan RNA su çözeltisiyle toplam hacim kapiler PCR tüpleri (Roche) içerisinde 20 µl’ye tamamlandı.

Kantitatif Gerçek-Zamanlı PCR deneyinin gerçekleştirilmesi için Roche LightCycler 1.5 Instrument (Roche Diagnostics GmbH) cihazı kullanıldı.

Tek adımlı PCR işlemi için gereken koşullar ise şu şekilde ayarlandı:

- Ters Transkripsiyon Aşaması (55°C, 30 dakika),
- Başlangıç Denatürasyonu (95°C, 15 dakika),
- 40 tekrarlı Amplifikasyon Aşaması (Denatürasyon, 95°C, 15 saniye; Bağlanma, 55°C, 30 saniye, Amplifikasyon, 72°C, 35 saniye)
- Soğuma (37°C, 30 saniye).

Deney tamamlandıktan sonra elde edilen C_t değerlerine göre analiz işlemi gerçekleştirildi. Buna göre, gruplar arasındaki rölatif gen ekspresyonlarını belirlemede Beta-Actin geni kalibratör olarak kullanıldı. Rölatif gen ekspresyonu için Livak (2^{-ddC_t}) metodu uygulandı (Livak ve Schmittgen, 2002). PCR deneylerinde kullanılan primerlere ait sekanslar ise aşağıdaki gibidir:

Çizelge 3. 1. Kantitatif Gerçek-zamanlı PCR testlerinde kullanılan primer sekansları

Beta-Actin	Forward: 5'- AACTCCATCATGAAGTGTGA -3' Reverse: 5'- ACTCCTGCTTGCTGATCCAC-3'
TLR2	Forward: 5'-GGCGTTCTCTCAGGTGACTG-3' Reverse: 5'-CTTCCTTGGAGAGGCTGATG-3'
BCL2A1	Forward: 5'-ATGGATAAGGCAAAACGGAGG-3' Reverse: 5'-TATGGAGTGTCTTTCTGGTAA-3'
GSTP1	Forward: 5'- TATTTCCCAGTTCGAGGCCG-3' Reverse: 5'- TCCTGCTGGTCCTTCCCATA-3'
ABCB1	Forward: 5'-GTTCGCAACCCCAAGATCCT-3' Reverse: 5'-CAATGGTGGTCCGACCTTTT-3'

3.5. İstatistiksel Analizler

Tez çalışması boyunca, MTT testlerinde deney ve kontrol grupları kıyaslandı. Bu amaçla, kontrollere ait hücre canlılıkları %100 olarak kabul edilerek, deney gruplarındaki değişimler incelendi. Gerçek-zamanlı PCR testlerinde ise Livak (2^{-ddCt}) metodu ile analiz yöntemi tercih edildi. Buna göre, kalibratörlere ait sonuçlar 1'e eşitlendi ve hedef genlerdeki ekspresyonel değişimin miktarı belirlendi. İstatistiksel karşılaştırmalar için ise referans grup ve diğer gruplar arasında *Student's t-test*'i (*two-tailed, unpaired*) uygulandı. *P* değerinin 0.05 ve altında olduğu durum istatistiksel olarak anlamlı kabul edilerek yıldız simgeleriyle betimlendi (****: $P \leq 0.0001$; ***: $P \leq 0.001$; **: $P \leq 0.01$; *: $P \leq 0.05$). 0.05 ve üzerindeki değerler ise grafiklere dahil edilmedi. Ayrıca IC_{50} analizi için oluşturulan sigmoid eğri %95'lik güven aralığı (confidence interval; CI) düzeyinde incelendi. Tez çalışması boyunca yapılan istatistiksel analizlerin tamamı açık kaynaklı R programı (R Core Team, 2020) ve RStudio v.4.0.1 yazılımı (RStudio Team, 2020) ve ilgili paketleri tidyverse (Wickham ve ark., 2019), readxl (Wickham ve Bryan, 2019), ggpubr (Kassambara, 2020), Rmisc (Wickham ve Bryan, 2013), drc (Ritz ve ark., 2015), multcomp (Hothorn ve ark., 2008) ile gerçekleştirildi.

3.6. Görselleştirmeler

Görselleştirmeler için RStudio v.4.0.1 (RStudio Team, 2020) tercih edildi. Bar grafiklerinde hata çubukları +SEM, dağılım grafiklerinde ise $\pm$ SEM değerini bildirmektedir. Mikroskop görüntüleri ise, kimyasal uygulamalarından 1 ve 24 saat sonraki süreçlerde Leica DM IL LED ile incelenip, Leica DFC295 dijital kamera ile yakalandı. Bu işlemler, bilgisayar ortamında Leica Application Suite v4 yazılımı tarafından yürütüldü (LAS, demo version). Hücrelere ait fotoğraflar 10x'lik objektif kullanılarak, 200 μ m bar ölçeğinde gösterildi. Ayrıca, Şekil 2.2., 2.4, 2.5 ve 2.6 için BioRender (BioRender, 2020) online illüstrasyon programı tercih edildi.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

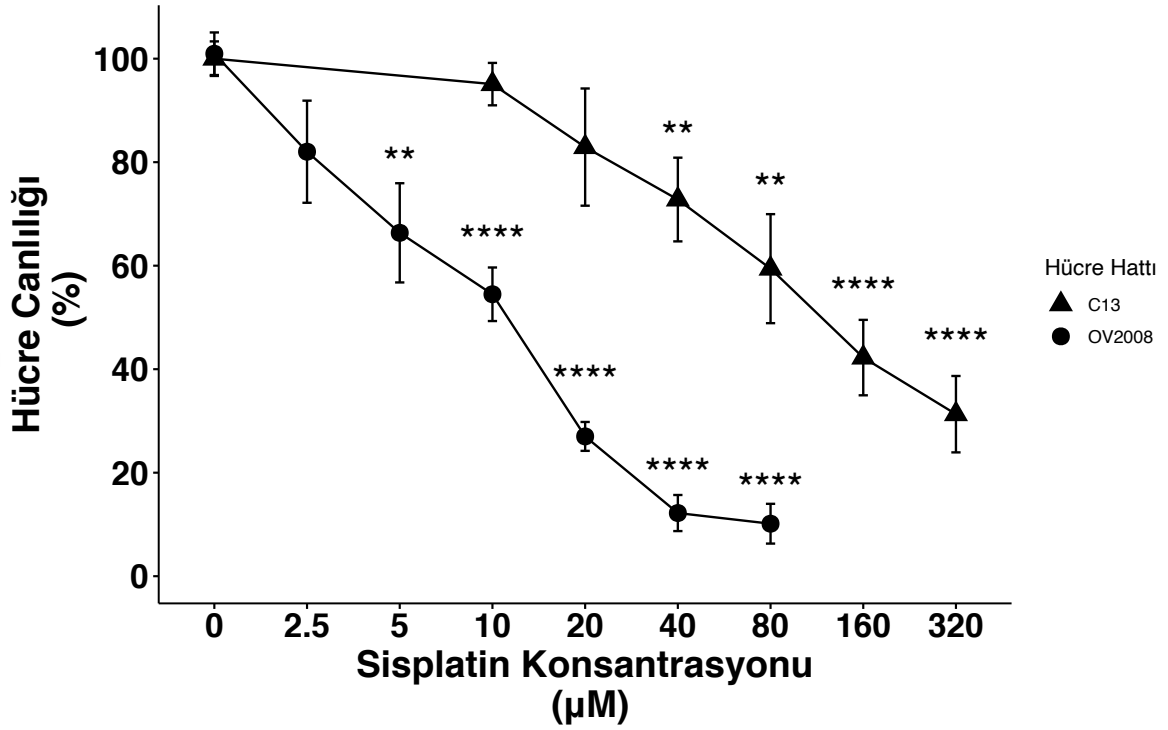
4.1. Hücre Canlılık Testleri

4.1.1. Kemoduyarlı ve kemodirençli over kanseri hücre hatlarında sisplatinin sitotoksik etkilerinin belirlenmesi

Hücre kültürü çalışmalarında ilk olarak, kemoduyarlı olduğu bilinen OV2008 ve onun kemodirençli alt klonu C13 hücre hatlarının farklı dozlarda uygulanmış geleneksel kemoterapi ajanı sisplatin karşısındaki hayatta kalım yanıtları araştırıldı. Bu amaçla, OV2008 sırasıyla 2.5, 5, 10, 20, 40 ve 80 μM , C13 ise 10, 20, 40, 80, 160 ve 320 μM 'lık sisplatin ile 24 saat boyunca muamele edildi.

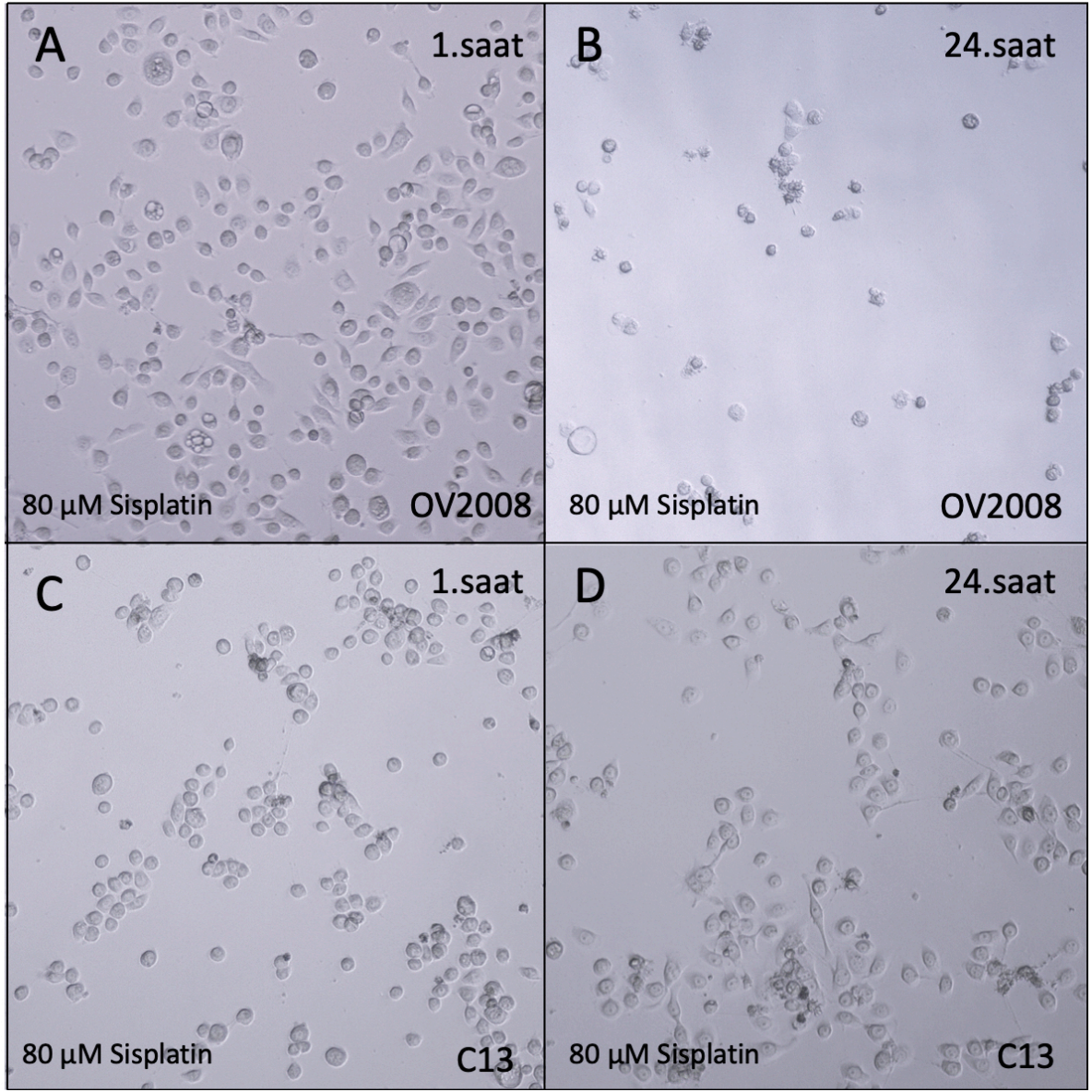
Sisplatin uygulaması sonrası hücrelerin yüzde canlılık oranları MTT testleri ile belirlendi. Kemoduyarlı OV2008'de sisplatin 2.5 μM konsantrasyonda yaklaşık %20'lik bir sitotoksisite oluştururken, 5 μM ve üzeri konsantrasyonlarda canlılık istatistiksel olarak anlamlı biçimde azaldı (Şekil 4.1.). Özellikle 20 μM 'lık dozdan sonra hücre canlılığının %30'un altına düştüğü gözlemlendi.

Kemodirençli C13'te ise artan konsantrasyonlarda dahi sağ kalım miktarı yüksek seviyelerde seyretti. Bununla beraber, sisplatinin 40 μM ve üzerinde anlamlı bir sitotoksisite oluşturduğu gözlemlendi. Oldukça yüksek olan 320 μM uygulamasında ise canlılık yaklaşık %30 seviyelerine ancak indi. Bu sonuçlar özelinde, C13'ün kemoduyarlı OV2008'e nazaran düşük dozlardaki sisplatine karşı belirgin biçimde direnç gösterdiği belirlendi. Ayrıca, 80 μM 'lık sisplatin uygulaması sonrası hücrelerin deney gruplarında incelenen değişimler mikroskop görüntüleri eşliğinde Şekil 4.2.'de gösterildi.

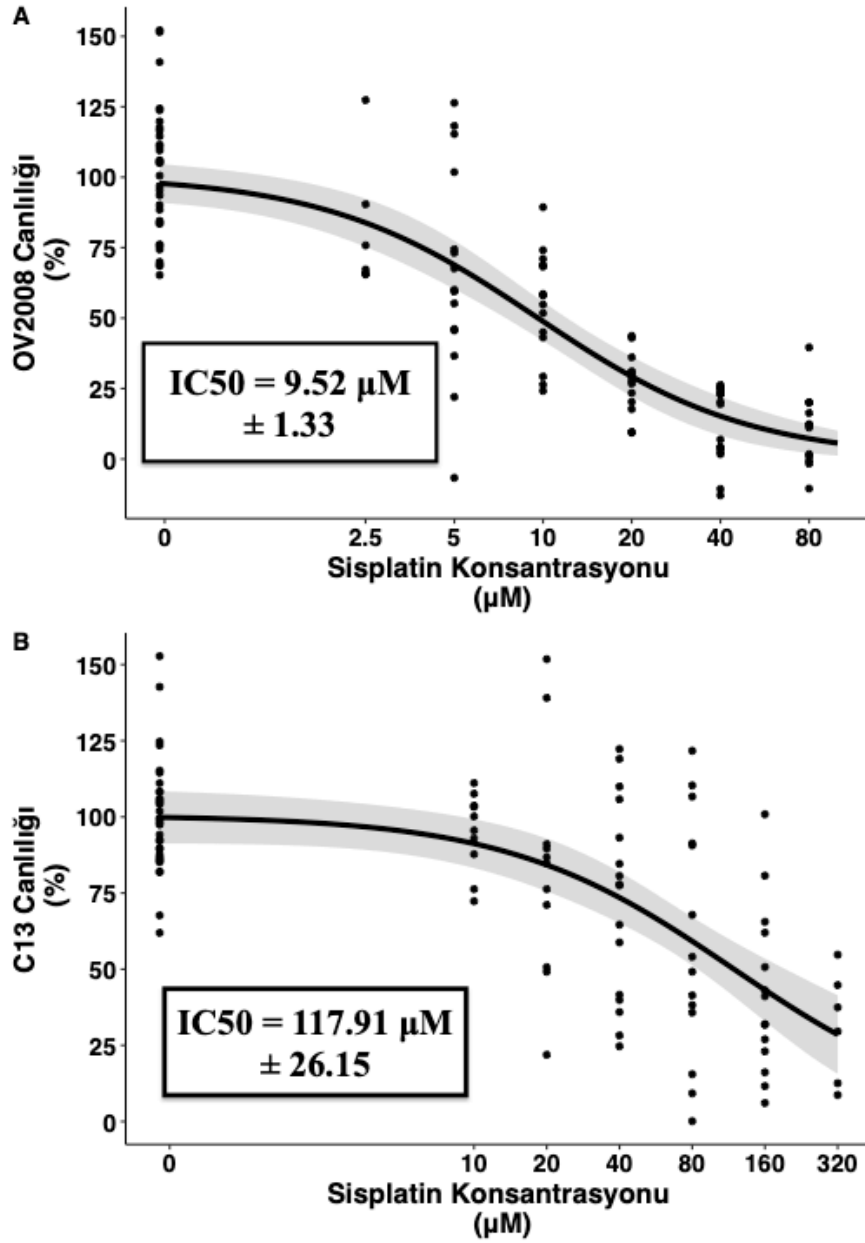


Şekil 4. 1. Çeşitli sisplatin konsantrasyonlarında over kanseri hücrelerinin yüzde canlılık verileri. OV2008 (daire) hücreleri için sırasıyla 2.5, 5, 10, 20, 40 ve 80; C13 (üçgen) hücreleri için 10, 20, 40, 80, 160 ve 320 μM sisplatin konsantrasyonları kullanıldı. Her bir nokta kullanılan doz ve karşılığı olan hücre canlılık ortalamasını göstermektedir. Hata çubukları $\pm\text{SEM}$ değerini belirtmektedir. İstatistiksel analiz kontrol grubu referans alınarak sağlandı (****: $P \leq 0.0001$; **: $P \leq 0.01$)

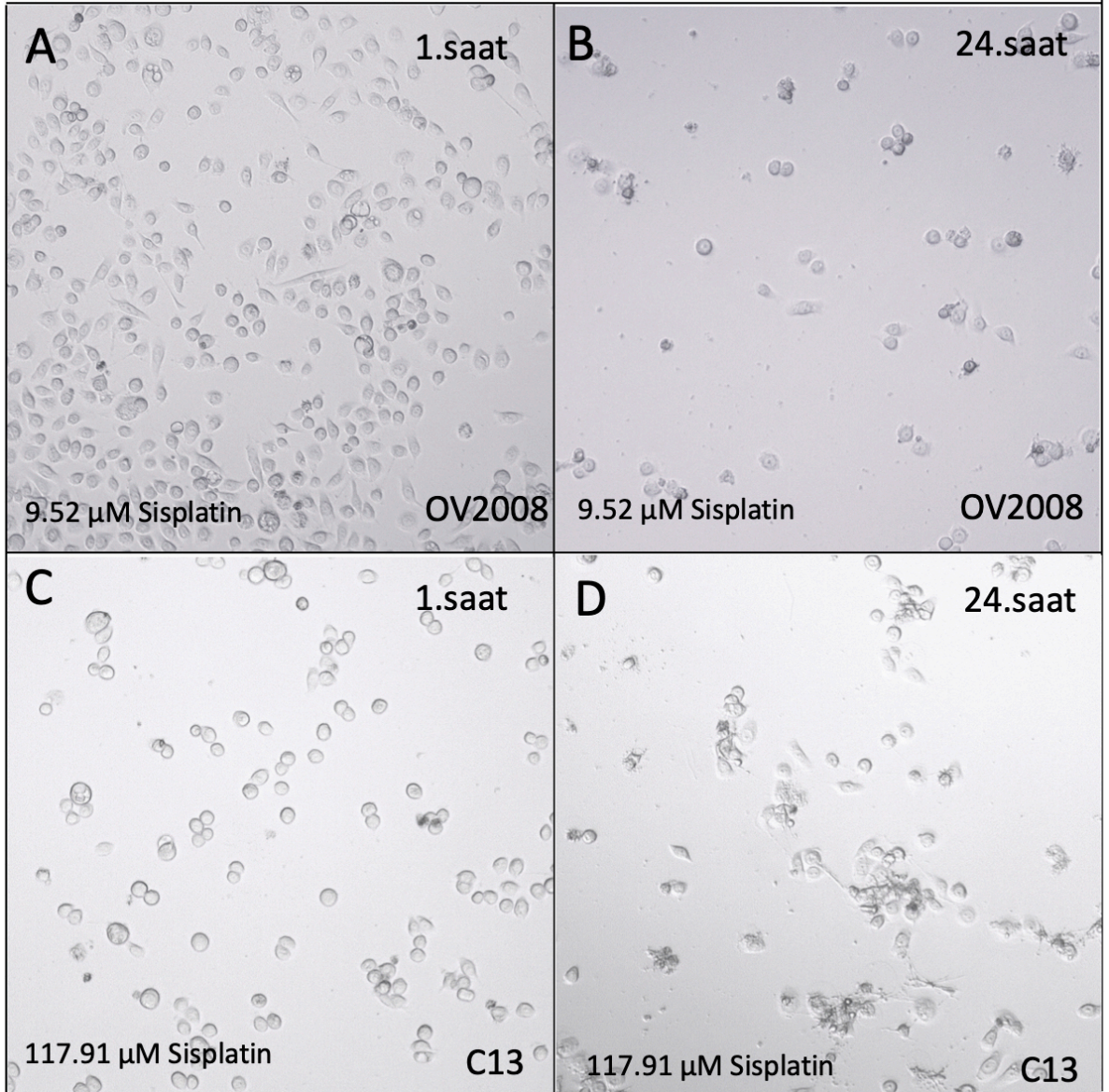
Ayrıca, sisplatin muamelesi sonrası elde edilen canlılık verileri de analiz edilerek sisplatine ait IC_{50} dozları belirlendi. Bu dozlar, diğer çalışmalarda kullanılacak konsantrasyonlar için referans olarak seçildi. OV2008 ve C13 arasında yapılan karşılaştırmada, kemoduyarlı hücre hattının %50'sini inhibe edebilecek sisplatin dozu $9.52 \mu\text{M} \pm 1.33$ olarak belirlenirken, kemodirençli hücre hattı C13'te ise $117.91 \mu\text{M} \pm 26.15$ olduğu tespit edildi (Şekil 4.3.). Bu hücrelere ait deney gruplarında IC_{50} uygulamalarını içeren mikroskop görüntüleri Şekil 4.4.'te belirtildi.



Şekil 4. 2. 80 µM'lık sisplatin uygulaması sonrası over kanseri hücre hatlarının mikroskop görüntüleri. A- 1 saatlik sisplatin uygulaması sonrası OV2008 hücrelerinin mikroskopik görüntüsü B- 24 saatlik sisplatin uygulaması sonrası OV2008 hücrelerinin mikroskopik görüntüsü C- 1 saatlik sisplatin uygulaması sonrası C13 hücrelerinin mikroskopik görüntüsü D- 24 saatlik sisplatin uygulaması sonrası C13 hücrelerinin mikroskopik görüntüsü (10x'lik objektif, 200 µm ölçek)



Şekil 4. 3. OV2008 ve C13 hücre hatlarında sisplatine ait IC₅₀ dozlarının belirlenmesi. A- OV2008 IC₅₀ eğrisi. B- C13 IC₅₀ eğrisi. Dose/response (doz/yanıt) eğrisi %95'lik güven aralığında gösterildi. Her bir siyah nokta ilgili sisplatin dozunun denk geldiği hücre canlılık verilerini göstermektedir.

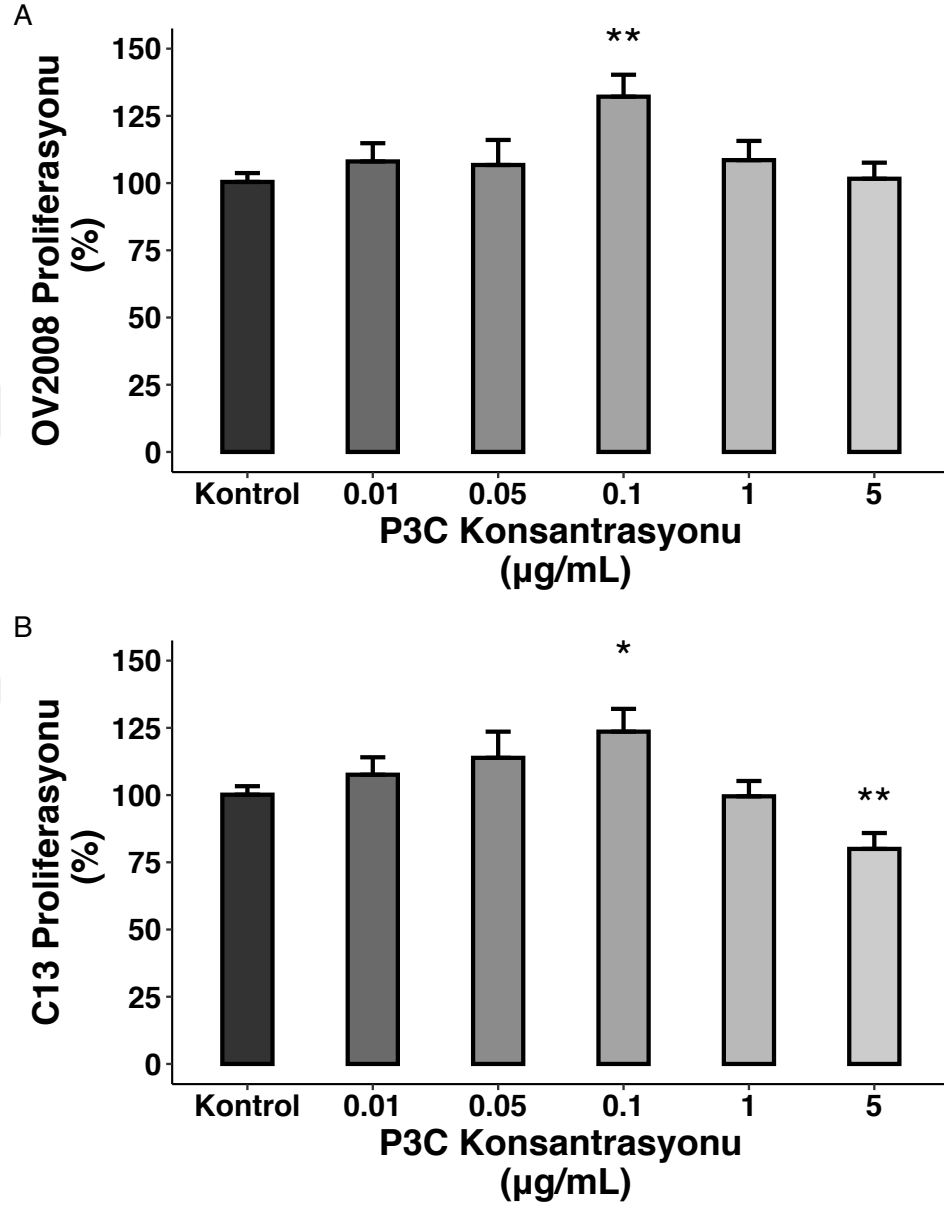


Şekil 4. 4. IC₅₀ dozlarındaki sisplatin uygulaması sonrası over kanseri hücre hatlarının mikroskop görüntüleri. A- 1 saatlik sisplatin IC₅₀ (9.52 µM) uygulaması sonrası OV2008 hücrelerinin mikroskopik görüntüsü B- 24 saatlik sisplatin IC₅₀ (9.52 µM) uygulaması sonrası OV2008 hücrelerinin mikroskopik görüntüsü C- 1 saatlik sisplatin IC₅₀ (117.91 µM) uygulaması sonrası C13 hücrelerinin mikroskopik görüntüsü D- 24 saatlik sisplatin IC₅₀ (117.91 µM) uygulaması sonrası C13 hücrelerinin mikroskopik görüntüsü (10x'lik objektif, 200 µm ölçek)

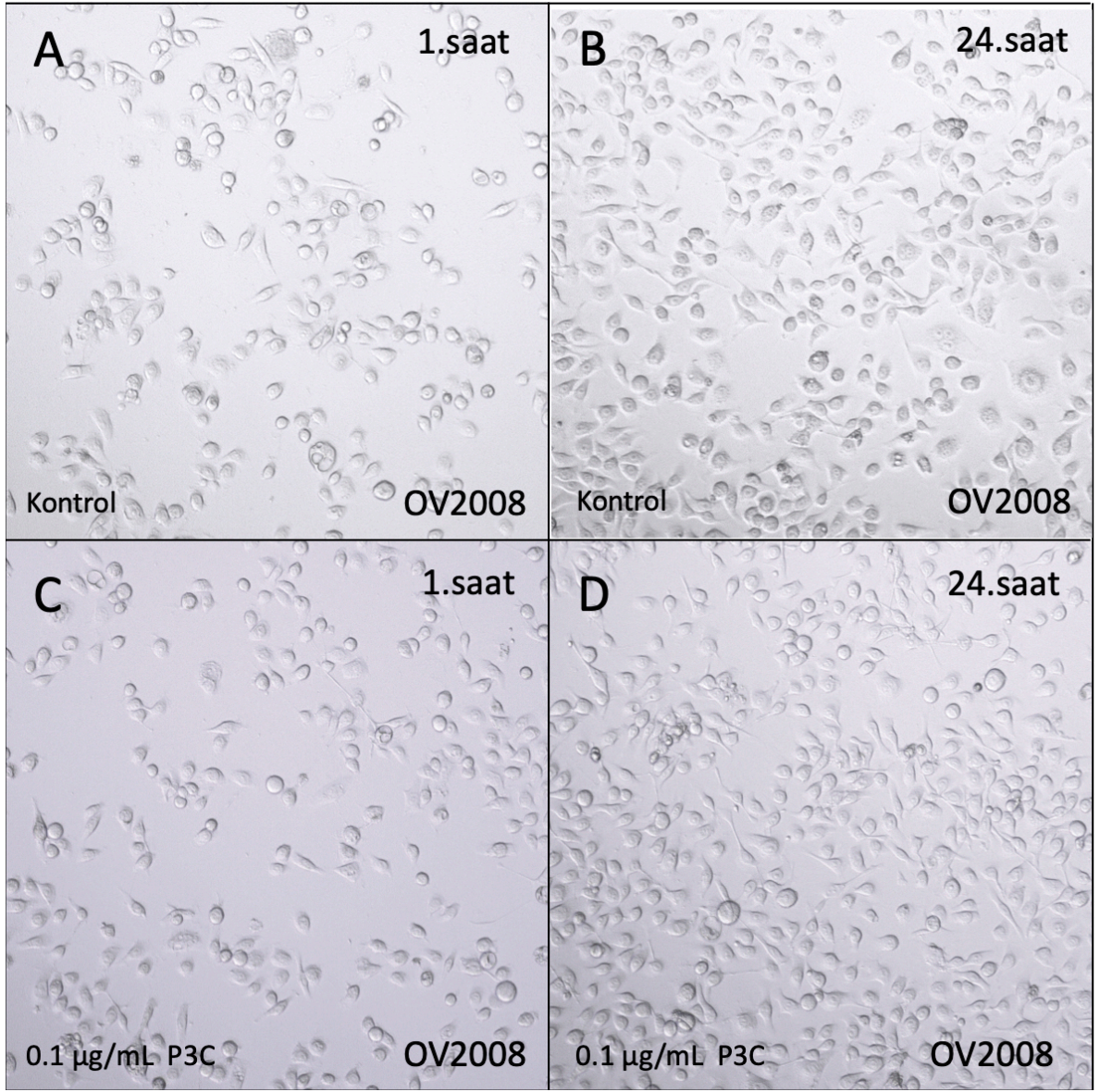
4.1.2. TLR1/2 aktivasyonunun over kanseri hücrelerindeki proliferatif/sitotoksik etkilerinin belirlenmesi

TLR1/2 uyarımının, over kanseri hücrelerinde proliferasyonu arttırıcı etkilere sahip olup olmadığını belirlemek için MTT testi uygulamalarına devam edildi. Bu amaçla OV2008 ve C13, TLR1/2 agonisti sentetik triaçil lipopeptid Pam3CSK4 ile muamele gördü. Pam3CSK4 (P3C; şekillerde belirtildiği kısaltmasıyla) için tavsiye edilen prosedür gereği hücreler, içerisinde %10'luk FBS bulunan besiyerinde bir gece inkübasyona bırakıldıktan sonra ek bir gece boyunca serum starvasyonu yaşaması için FBS içermeyen ortama alındı. Bu sürecin ardından, P3C uygulamaları gerçekleştirildi.

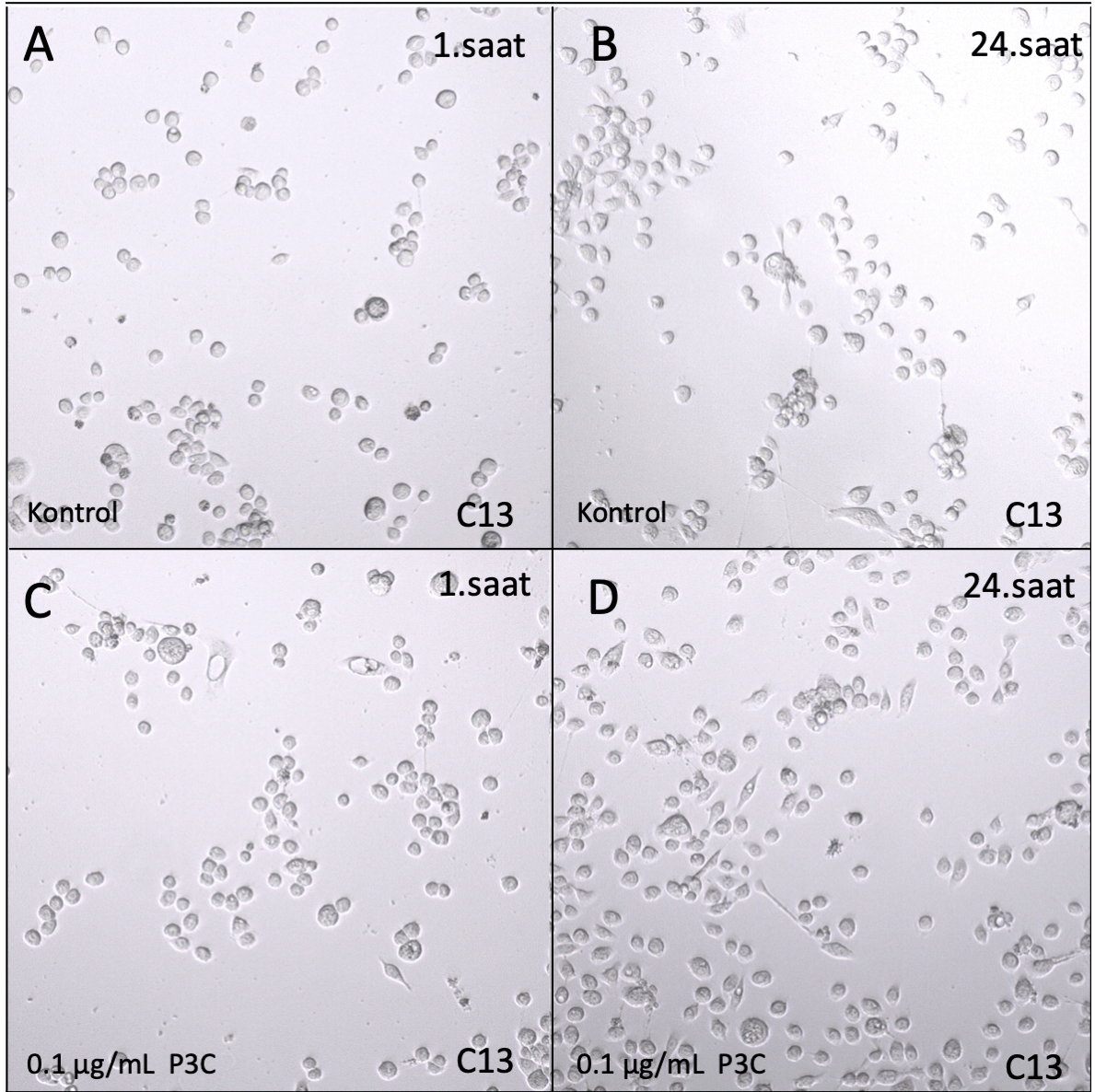
Öncelikli olarak, sağlayıcı firmanın önerdiği protokolü ve yapılan literatür taramasını referans alarak belirli doz aralıklarındaki P3C, over kanseri hücrelerine 24 saatlik zaman dilimi boyunca uygulandı. Bu bağlamda, sırasıyla 0.01, 0.05, 0.1, 1 ve 5 µg/mL'lik ligand solüsyonları kullanıldı. Kayda değer biçimde, belirli konsantrasyondaki agonist uygulaması her iki hücre hattında da proliferasyonunu arttırırken, büyük ölçekli bir sitotoksiste meydana getirmedir. Kemoduyarlı OV2008'de 0.01, 0.05, ve 1 µg/mL'lik ligand kullanımı anlamlı bir canlılık/proliferasyon grafiği oluşturmazken, 0.1 µg/mL'lik muamele bu hücrelerde yaklaşık %30'luk bir çoğalmaya sebep oldu ($P \leq 0.01$). Kemodirençli C13'te ise benzer şekilde, 0.1 µg/mL'den daha düşük dozlarda önemli bir farklılık izlenmeyip, 0.1 µg/mL'de yaklaşık %20'lik bir artış gözlemlendi ($P \leq 0.05$). İlginç şekilde daha yüksek ligand konsantrasyonları kullanıldığında, C13 üzerinde sitotoksik etkilerin ortaya çıkabileceği belirlendi. Şekil 4.6, 4.7 ve 4.8'de düşük ve yüksek dozda P3C uygulaması sonrası kontrol gruplarına nazaran hücre ortamında gerçekleşen değişimler mikroskop görüntüleri ile zenginleştirildi.



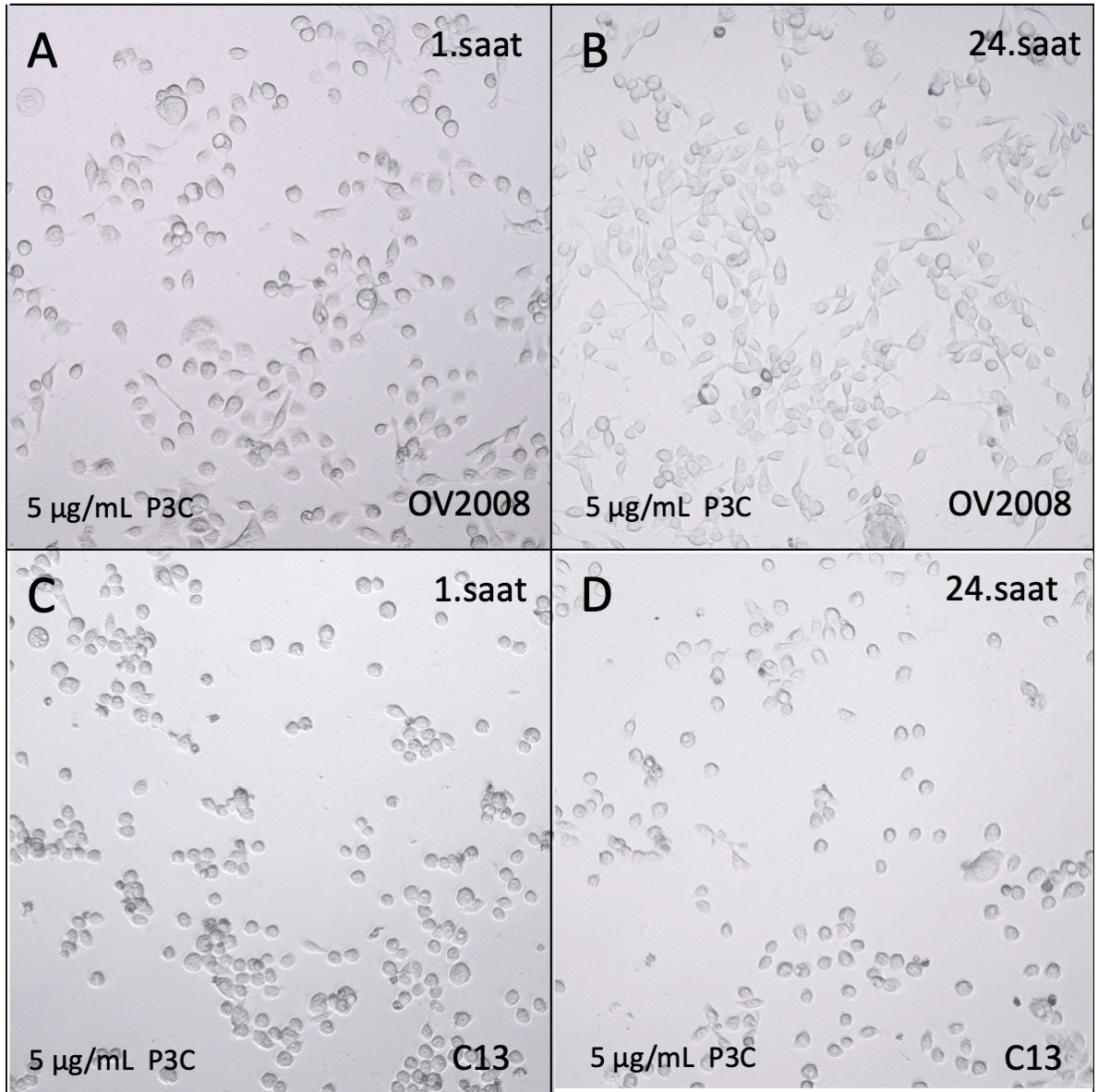
Şekil 4. 5. Pam3CSK4'ün (P3C) over kanseri hücre proliferasyonuna etkisi. A- OV2008'in 0.01, 0.05, 0.1, 1 ve 5 µg/mL P3C uygulaması sonrası değişen yüzde proliferasyon verisi. B- C13'ün 0.01, 0.05, 0.1, 1 ve 5 µg/mL P3C uygulaması sonrası değişen yüzde proliferasyon verisi. Bar çubukları yüzde proliferasyonun ortalamasını, hata çubukları ise +SEM değerini göstermektedir. İstatistiksel kıyaslamalar kontrol grubu referans alınarak gerçekleştirildi (**: $P \leq 0.01$; *: $P \leq 0.05$)



Şekil 4. 6. 0.1 µg/mL’lik Pam3CSK4 (P3C) uygulaması sonrası OV2008 hücrelerinin mikroskop görüntüsü. A- P3C uygulaması yapılmayan OV2008 hücreleri B- P3C uygulaması yapılmayan OV2008 hücrelerinin 24 saat sonundaki görüntüsü C- 1 saat boyunca 0.1 µg/mL P3C uygulanan OV2008 hücreleri D- 24 saat boyunca 0.1 µg/mL P3C uygulanan OV2008 hücreleri (10x’lik objektif, 200 µm ölçek)



Şekil 4. 7. 0.1 µg/mL’lik Pam3CSK4 (P3C) uygulaması sonrası C13 hücrelerinin mikroskop görüntüsü. A- P3C uygulaması yapılmayan C13 hücreleri B- P3C uygulaması yapılmayan C13 hücrelerinin 24 saat sonundaki görüntüsü C- 1 saat boyunca 0.1 µg/mL P3C uygulanan C13 hücreleri D- 24 saat boyunca 0.1 µg/mL P3C uygulanan C13 hücreleri (10x’lik objektif, 200 µm ölçek)



Şekil 4. 8. 5 µg/mL'lik Pam3CSK4 (P3C) uygulaması sonrası OV2008 ve C13 hücrelerinin mikroskop görüntüsü. A- 1 saat boyunca 5 µg/mL P3C uygulanan OV2008 hücreleri B- 24 saat boyunca 5 µg/mL P3C uygulanan OV2008 hücreleri C- 1 saat boyunca 5 µg/mL P3C uygulanan C13 hücreleri D- 24 saat boyunca 5 µg/mL P3C uygulanan C13 hücreleri (10x'lik objektif, 200 µm ölçek)

4.1.3. TLR1/2 blokajının over kanseri hücrelerinde proliferatif/sitotoksik etkilerinin belirlenmesi

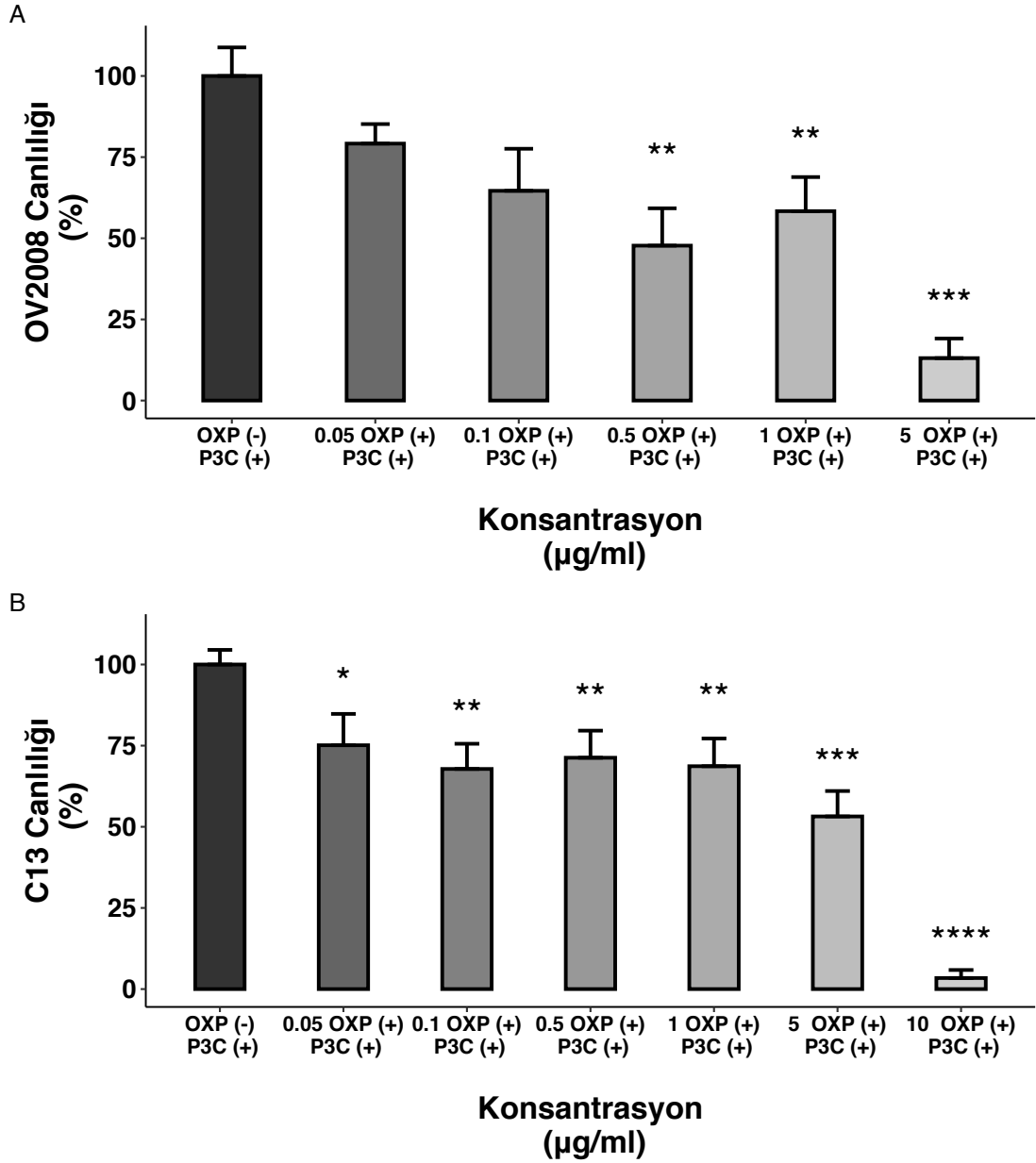
TLR1/2 uyarımının over kanseri hücrelerinde proliferatif etkilere sebep olabileceği gösterildikten sonra, OxPAPC adı verilen ve TLR1/2 de dahil TLR2 ilişkili reseptörlerin dimerizasyonunu bloke eden bir inhibitör/antagonist molekülü hücreler üzerinde denendi.

Sağlayıcı firmaya ait protokol uygulandığında, tek konsantrasyonda kullanılması önerilen OxPAPC (30 µg/mL), bu durumda her iki hücre hattında da yüksek sitotoksik etkilere sebep oldu. Bu yüzden, P3C uygulamalarında yapıldığı gibi OxPAPC (OXp; şekillerde belirtildiği kısaltmasıyla) için belirli doz aralıkları seçilerek canlılıklar tekrar değerlendirildi. Antagonistin potansiyel etkilerini belirlemek adına, OV2008 için 0.05, 0.1, 0.5, 1 ve 5 µg/mL; C13 için ise 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5 ve 10 µg/mL konsantrasyonları kullanıldı. Ayrıca, literatür ve ilgili firma tavsiyesi üzerine yarışmalı olarak işlev gören OXP'nin P3C ile birlikte kullanılmasında karar kılındı. Bu bağlamda, 1 saatlik antagonist uygulaması sonrası, kültür ortamlarına ayrıca 0.1 µg/mL P3C ilave edildi. Toplamda bu ligandların karışımını içeren besiyerinde over kanseri hücreleri 24 saatlik inkübasyona maruz bırakıldı. Elde edilen sonuçlar, P3C uygulaması ile ilişkili verilerin referans kabul edildiği kontrol grubuyla kıyaslandı.

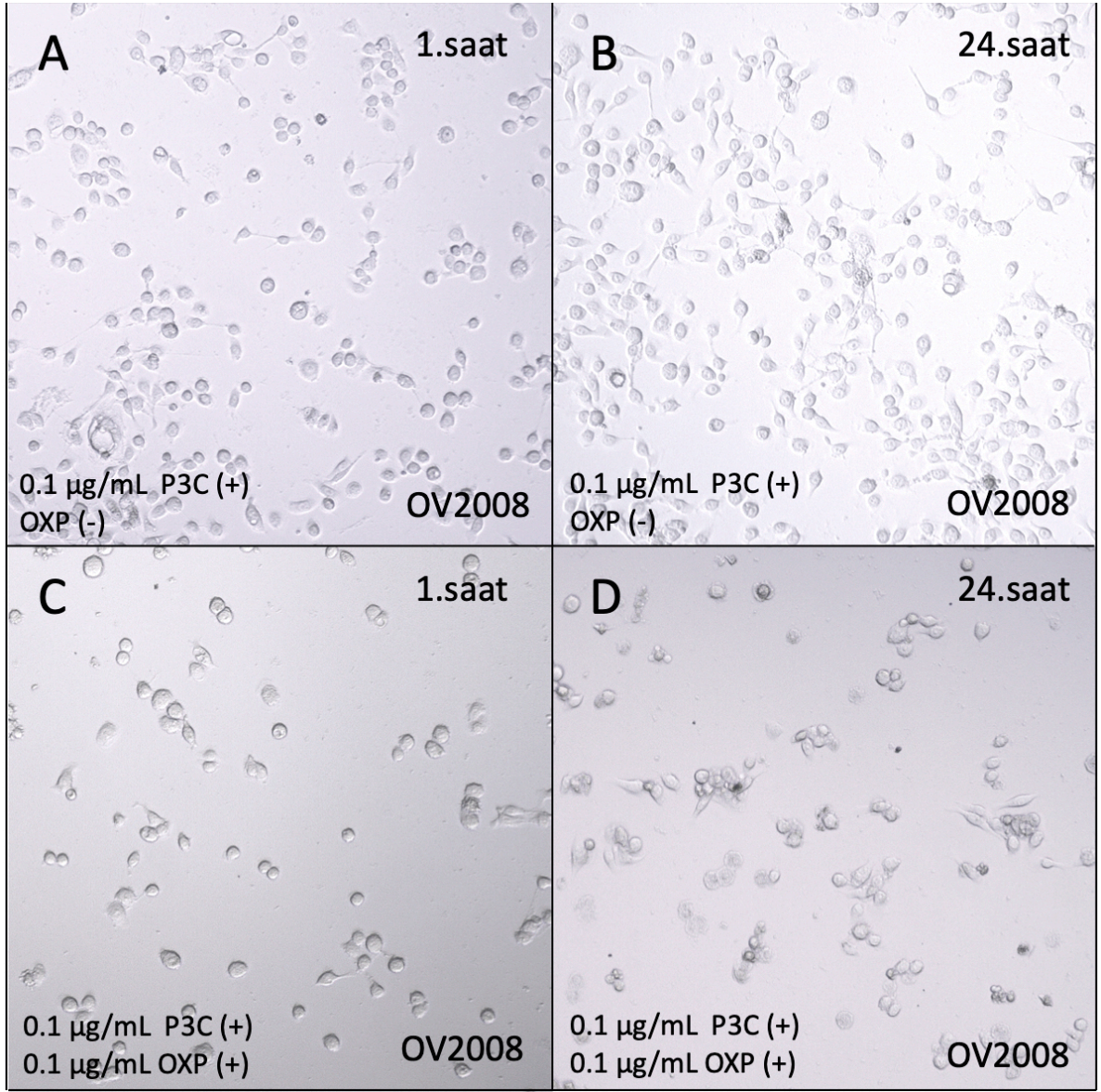
Şekil 4.9.'dan da anlaşılacağı üzere, OXP uygulaması artan dozlarla beraber her iki hücre hattında da güçlü sitotoksik etkiler gösterdi. Genel olarak yorumlandığında, kemodirençli C13, kemoduyarlı OV2008'e göre antagoniste karşı daha dayanıklı bir cevap gösterdi. Ancak, her iki hücre hattı da özellikle 5 µg/mL ve üzerindeki uygulamalarından sonra önemli ölçüde inhibe oldu. OV2008, 0.5 µg/mL ile beraber istatistiksel olarak anlamlı biçimde canlılığını düşürürken, 5 µg/mL'lik konsantrasyonda C13'e ait değerler %50'nin üzerindeydi. Bununla beraber, daha yüksek bir konsantrasyon olan 10 µg/mL'de C13'ün neredeyse tamamı inhibe oldu. Sonuç olarak, TLR1/2 aktivasyonunu sağlayan Pam3CSK4 uygulaması ile artan bir proliferasyon grafiği gösteren over kanseri hücreleri, TLR2 ve ilişkili

reseptörlerin blokajına neden olan OxPAPC uygulaması sonrası canlılıklarını yitirdi. Ayrıca, Şekil 4.10., 4.11. ve 4.12.'de düşük ve yüksek dozdaki OXP uygulaması sonrası OV2008 ve C13'e ait mikroskop görüntüleri sunulmaktadır.

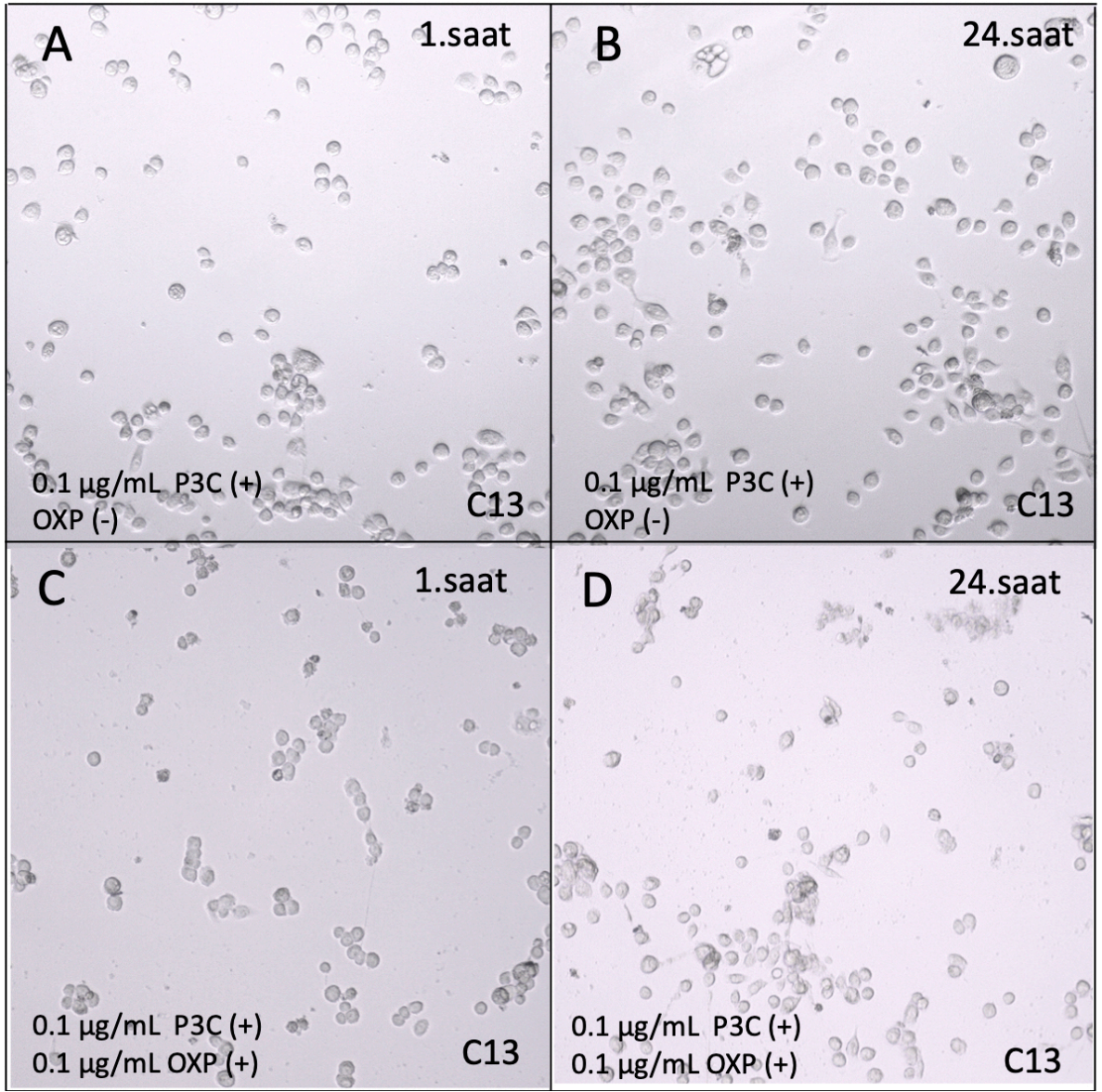
Sonuç olarak elde edilen veriler neticesinde, PCR testlerinde kullanmak üzere her iki hücre hattı için de ortak bir doz MTT testleriyle belirlendi. Bu doğrultuda, hücrelerde büyük oranda sitotoksik etki oluşturmada RNA düzeyinde çalışmalar yapılabilmesi için 1 µg/mL'lik OXP konsantrasyonu seçildi. PCR testlerinde ise OXP'ye ilaveten 0.1 µg/mL'lik P3C agonisti de ortama ilave edildi.



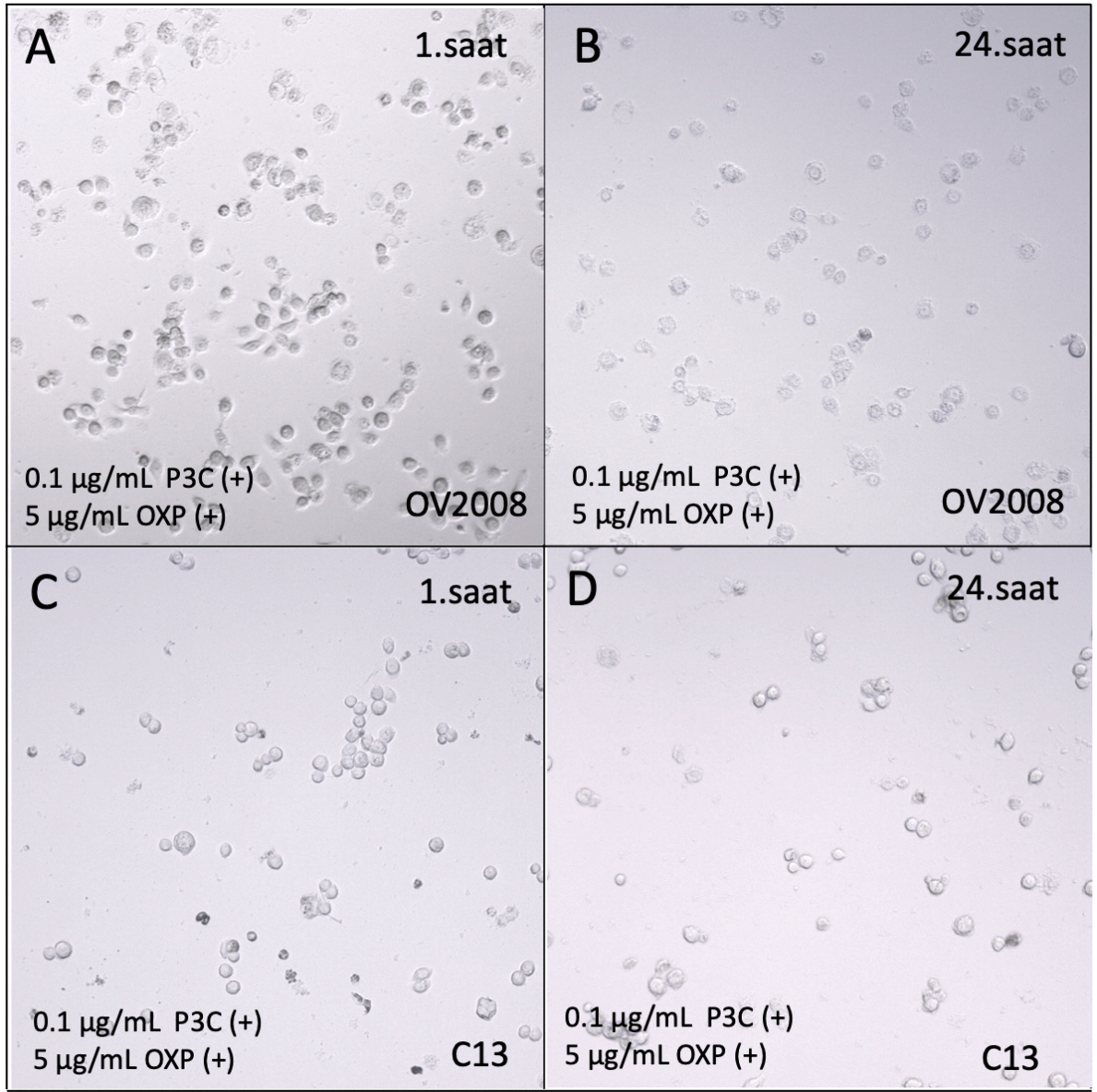
Şekil 4.9. OxPAPC uygulamasının over kanseri hücrelerindeki yüzde canlılık verilerine etkisi. A- OV2008 hücre hattının sırasıyla 0.05, 0.1, 0.5, 1 ve 5 µg/mL; B- C13 hücre hattının sırasıyla 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5 ve 10 µg/mL OxPAPC (OXP) uygulaması sonrası yüzde canlılık ortalamaları. Kontrol grubu da dahil tüm gruplara ayrıca 0.1 µg/mL Pam3CSK4 (P3C) ilave edildi. Bar çubukları yüzde canlılık ortalamalarını, hata çubukları ise +SEM değerini göstermektedir. İstatistiksel kıyaslamalar kontrol grubu referans alınarak gerçekleştirildi (****: $P \leq 0.0001$; ***: $P \leq 0.001$; **: $P \leq 0.01$; *: $P \leq 0.05$)



Şekil 4.10. 0.1 µg/mL’lik OxPAPC (OXP) uygulaması sonrası OV2008 hücrelerinin mikroskop görüntüsü. A- 1 saat boyunca 0.1 µg/mL’lik P3C uygulanan ancak OXP uygulanmayan OV2008 hücreleri (Kontrol) B- 24 saat boyunca 0.1 µg/mL’lik P3C uygulanan ancak OXP uygulanmayan OV2008 hücreleri (Kontrol) C- 0.1 µg/mL’lik OXP ile ön muamele edilen ve 1 saat boyunca 0.1 µg/mL P3C uygulanan OV2008 hücreleri D- 0.1 µg/mL’lik OXP ile ön muamele edilen ve 24 saat boyunca 0.1 µg/mL’lik P3C uygulanan OV2008 hücreleri (10x’lik objektif, 200 µm ölçek)



Şekil 4. 11. 0.1 µg/mL’lik OxPAPC (OXP) uygulaması sonrası C13 hücrelerinin mikroskop görüntüsü. A- 1 saat boyunca 0.1 µg/mL’lik P3C uygulanan ancak OXP uygulanmayan C13 hücreleri (Kontrol) B- 24 saat boyunca 0.1 µg/mL’lik P3C uygulanan ancak OXP uygulanmayan C13 hücreleri (Kontrol) C- 0.1 µg/mL’lik OXP ile ön muamele edilen ve 1 saat boyunca 0.1 µg/mL P3C uygulanan C13 hücreleri D- 0.1 µg/mL’lik OXP ile ön muamele edilen ve 24 saat boyunca 0.1 µg/mL’lik P3C uygulanan C13 hücreleri (10x’lik objektif, 200 µm ölçek)



Şekil 4. 12. 5 µg/mL OxPAPC (OXP) uygulaması sonrası OV2008 ve C13 hücrelerinin mikroskop görüntüsü. A- 5 µg/mL’lik OXP ile ön muamele edilen ve 1 saat boyunca 0.1 µg/mL’lik P3C uygulanan OV2008 hücreleri B- 5 µg/mL’lik OXP ile ön muamele edilen ve 0.1 µg/mL’lik P3C uygulanan OV2008 hücrelerinin 24 saat sonundaki görüntüsü C- 5 µg/mL’lik OXP ile ön muamele edilen ve 1 saat boyunca 0.1 µg/mL’lik P3C uygulanan C13 hücreleri D- 5 µg/mL’lik OXP ile ön muamele edilen ve 0.1 µg/mL’lik P3C uygulanan C13 hücrelerinin 24 saat sonundaki görüntüsü (10x’lik objektif, 200 µm ölçek)

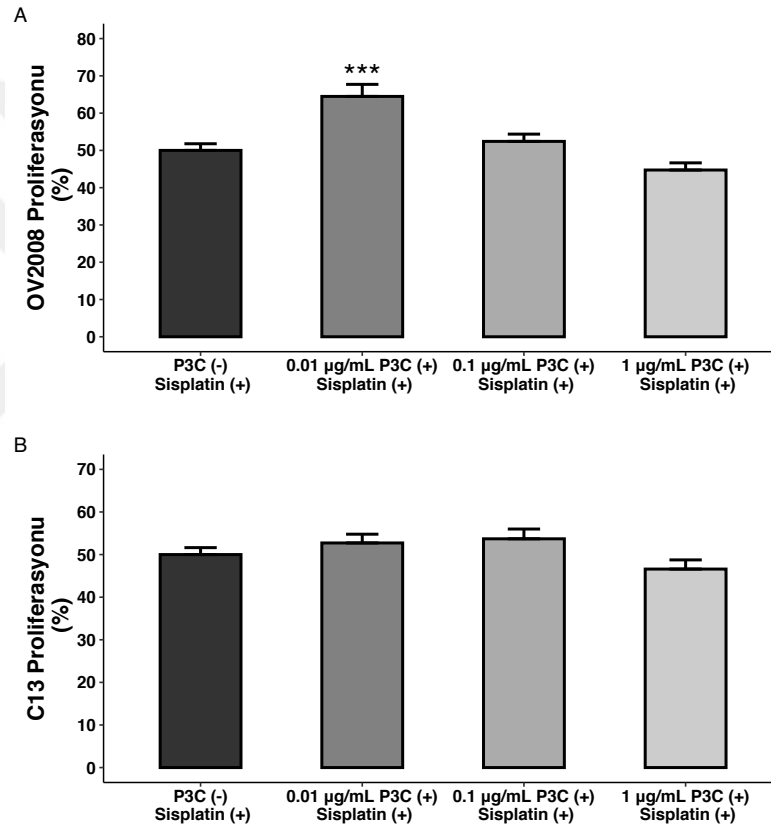
4.1.4. TLR1/2 aktivasyonunun sisplatin kaynaklı sitotoksitesiye olan etkilerinin belirlenmesi

Tez çalışmasının amaçları kapsamında, TLR1/2 ilişkili sinyal yollarıyla gelişebilecek kemodirenç mekanizmalarını yorumlayabilmek adına, P3C ve sisplatinin kombinasyon halinde hücreler üzerinde uygulanması planlandı. Her iki hücre hattında da belirli konsantrasyonlarda proliferatif etkiler gösteren P3C ile birlikte, besiyeri ortamına IC₅₀ dozlarında sisplatin ilave edildi. Bu sayede, kemoterapi ilacının neden olduğu sitotoksitenin TLR1/2 aktivasyonu ile değişip değişmediği araştırıldı. Çalışmaya 0.1 µg/mL'nin yanı sıra, 10 kat seyrek ve 10 kat derişik P3C (0.01 µg/mL ve 1 µg/mL) solüsyonları da dahil edildi.

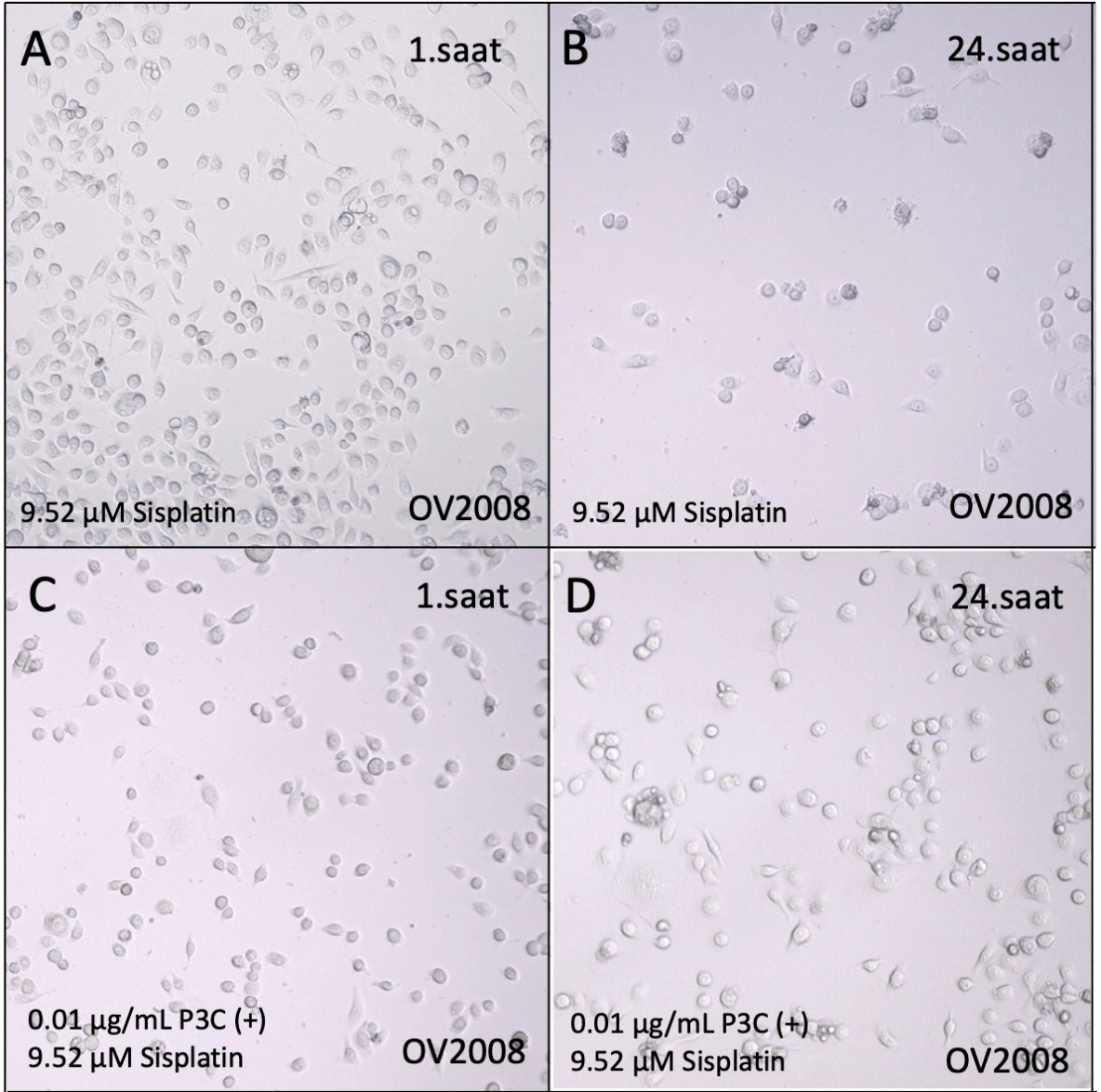
Şekil 4.13.'te gösterildiği gibi, "P3C (-) ve Sisplatin (+)" olarak belirtilen kontrol grubu için OV2008 ve C13 hücrelerine sırasıyla 9.52 µM ve 117.91 µM'lık sisplatin uygulanarak elde edilen veriler %50'ye eşitlendi. Bu gruba, kıyaslamaların yapılabilmesi adına herhangi bir P3C ilavesi yapılmadı. Diğer durumlar için ortama IC₅₀ dozlarına ek olarak 0.01, 0.1 ve 1 µg/mL'lik P3C uygulandı. Bunun için bir gecelik serum starvasiyonuna bırakılan hücreler ertesi gün 4 saat boyunca P3C ile muamele gördükten sonra besiyerine sisplatin dahil edildi. Ardından 24 saat daha inkübasyon işlemi gerçekleştirildi.

Elde edilen sonuçlara göre OV2008 hücre hattında, 0.01 µg/mL P3C ve sisplatinin kombinasyon halindeki uygulaması hücre proliferasyonunda önemli bir artışa sebep oldu ($P \leq 0.001$). Bu artış, hücre canlılığının %50'den yaklaşık %65'e çıktığını gösterdi. Böylece, 0.01 µg/mL P3C ile ön muamele edilen OV2008 hücrelerinin yarısını inhibe etmek için gereken ilaç dozunun daha fazla olması gerektiği ortaya koyuldu. Farklı gruplar incelendiğinde ise, 0.01 µg/mL'nin aksine 0.1 µg/mL ve 1 µg/mL konsantrasyonunda anlamlı bir değişim izlenmedi.

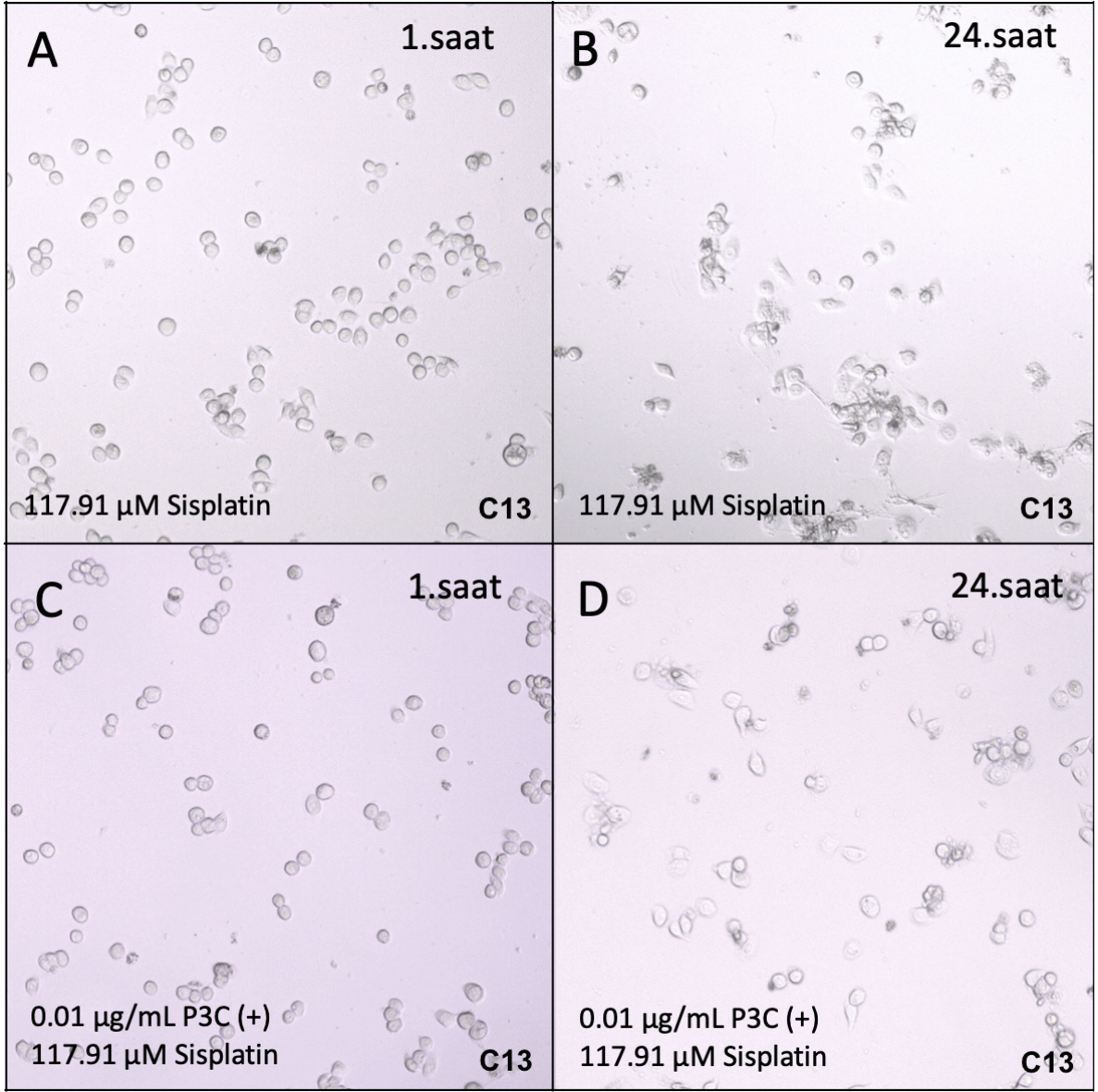
Kemodirençli hücre hattı C13'te ise 0.01 ve 0.1 µg/mL P3C konsantrasyonlarında canlılık az da olsa %50'nin üzerinde seyretse bile, önemli bir değişimi yansıtmamaktadır. Sonuç olarak, OV2008 hücrelerinde P3C uygulaması ile TLR1/2 aktivasyonunun sisplatin direncine neden olabileceği ve hücre canlılığını IC₅₀ dozu uygulanan gruplara kıyasla arttırabileceği tespit edildi.



Şekil 4. 13. Sisplatin ve Pam3CSK4 kombinasyonunun hücre proliferasyonuna olan etkisi. A- OV2008 hücre hattında sisplatin ve Pam3CSK4 (P3C) kombinasyonu uygulaması; B- C13 hücre hattında sisplatin ve P3C kombinasyonu uygulaması. Her iki hücre hattı için belirlenen sisplatin IC₅₀ dozu (OV2008, 9.52 µM; C13, 117.91 µM) ve 0.01, 0.1 ve 1 µg/mL P3C dozları kombinasyon biçiminde uygulandı. Deney grupları sisplatinin yalnız kullanıldığı kontrol grubuna kıyaslandı. Bar çubukları yüzde proliferasyon ortalamasını, hata çubukları ise +SEM değerini göstermektedir. İstatistiksel kıyaslamalar kontrol grubu referans alınarak gerçekleştirildi (***: $P \leq 0.001$)



Şekil 4. 14. Sisplatin ve Pam3CSK4 (P3C) kombinasyon uygulaması sonrası OV2008 hücrelerinin mikroskop görüntüsü. A- 1 saat boyunca yalnızca sisplatin IC₅₀ konsantrasyonu (9.52 µM) ile muamele gören OV2008 hücreleri B- 24 saat boyunca yalnızca sisplatin IC₅₀ konsantrasyonu (9.52 µM) ile muamele gören OV2008 hücreleri C- 0.01 µg/mL P3C ile ön muamele gören ardından 1 saatlik sisplatin IC₅₀ konsantrasyonu (9.52 µM) uygulanan OV2008 hücreleri D- 0.01 µg/mL P3C ile ön muamele gören ardından 24 saatlik sisplatin IC₅₀ konsantrasyonu (9.52 µM) uygulanan OV2008 hücreleri (10x'lik objektif, 200 µm ölçek)

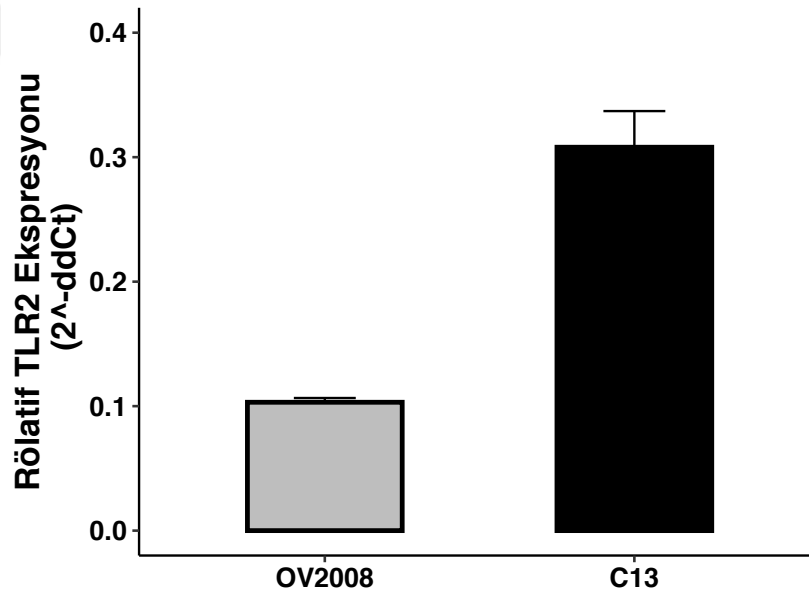


Şekil 4. 15. Sisplatin ve Pam3CSK4 (P3C) kombinasyon uygulaması sonrası C13 hücrelerinin mikroskop görüntüsü. A- 1 saat boyunca yalnızca sisplatin IC₅₀ konsantrasyonu (117.91 µM) ile muamele gören C13 hücreleri B- 24 saat boyunca yalnızca sisplatin IC₅₀ konsantrasyonu (117.91 µM) ile muamele gören C13 hücreleri C- 0.01 µg/mL P3C ile ön muamele gören ardından 1 saatlik sisplatin IC₅₀ konsantrasyonu (117.91 µM) uygulanan C13 hücreleri D- 0.01 µg/mL P3C ile ön muamele gören ardından 24 saatlik sisplatin IC₅₀ konsantrasyonu (117.91 µM) uygulanan C13 hücreleri (10x'lik objektif, 200 µm ölçek)

4.2. Gen Ekspresyon Analizleri: Gerçek Zamanlı PCR (Real-Time PCR) Testleri

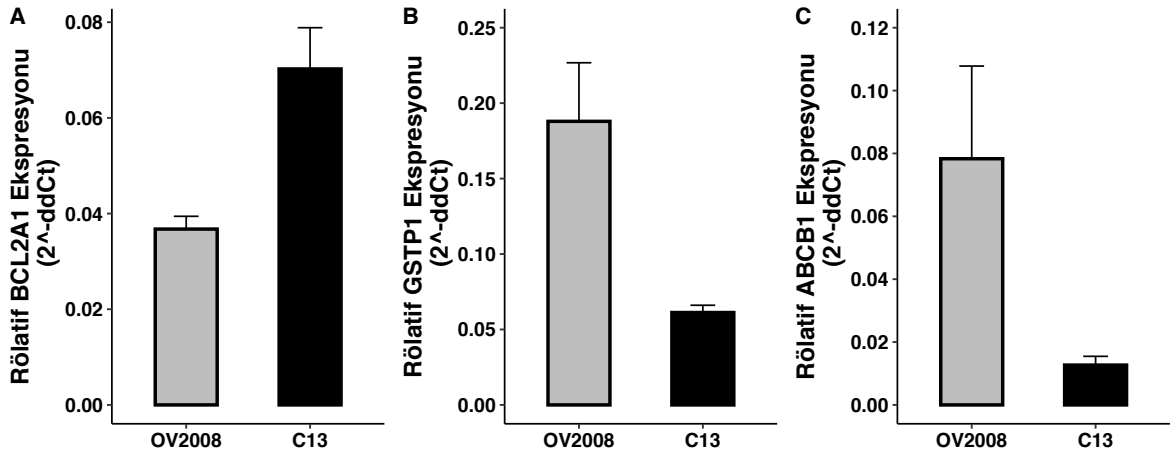
4.2.1. Kemoduyarlı ve kemodirençli over kanseri hücrelerinde direnç ile ilişkili genlerin RNA ekspresyonu bakımından karşılaştırılması

Hücre canlılık testlerinin ardından, TLR1/2 sinyal yolağıyla ilişkili olabilecek ilaç direnci mekanizmalarını düzenleyen genlerin over kanseri hücrelerinde gen ekspresyonu bakımından değerlendirildiği aşamaya geçildi. İlk olarak her iki hücre hattında TLR2 geninin karşılaştırmalı bir analizi yapıldı. Elde edilen sonuçlara göre, C13, OV2008'e kıyasla mRNA bakımından yaklaşık 3 kat daha fazla TLR2 ekspresyonuna sergiledi.



Şekil 4. 16. OV2008 ve C13 hücre hatlarında TLR2 ekspresyonunun rölatif olarak kıyaslanması. Kıyaslamalar için Livak (2^{-ddCT}) metodu kullanıldı. Bar çubukları 2^{-ddct} değerini, hata çubukları ise +SEM değerini göstermektedir.

Ayrıca, over kanserinde ilaç direnciyle ilişkili genler olan BCL2A1, GSTP1 ve ABCB1'in karşılaştırması da yapıldı. Bu analiz sonucunda over kanseri hücre hatlarında ilaç direnci ile ilişkili genlerin farklı düzeyde eksprese oldukları belirlendi. Buna göre, C13'ün OV2008 hücrelerine kıyasla anti-apoptotik bir gen olan BCL2A1'i daha fazla; ilaç konjugasyonu ve detoksifikasyonundan sorumlu GSTP1 ile efflux proteini olan ABCB1'i ise yaklaşık 4'er kat daha az ifade ettiği ortaya koyuldu.



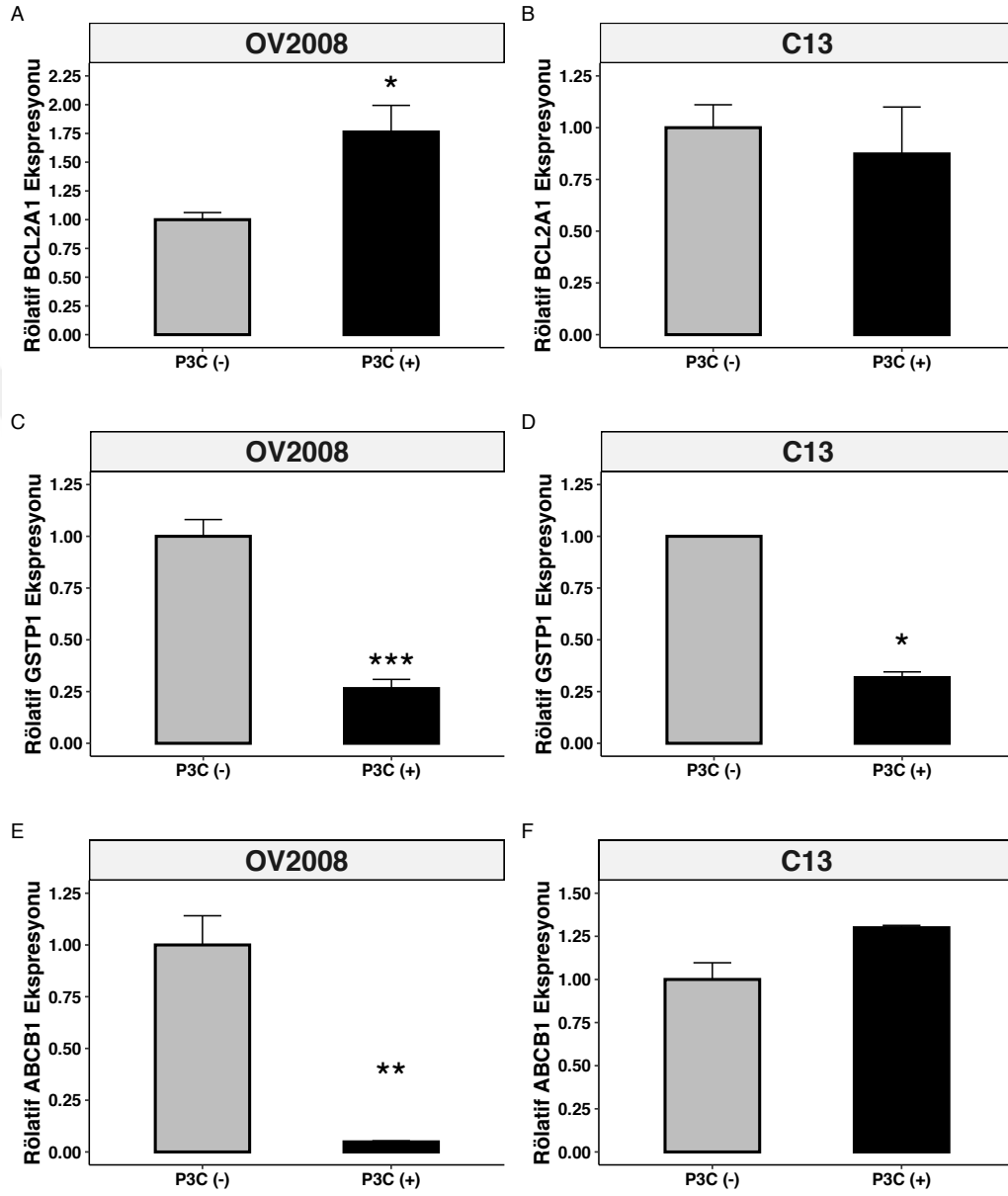
Şekil 4. 17. OV2008 ve C13 hücrelerinin BCL2A1, GSTP1 ve ABCB1 gen ekspresyonları bakımından rölatif olarak kıyaslanması. A- BCL2A1, B- GSTP1, C- ABCB1 gen ekspresyonlarının OV2008 ve C13 hücrelerinde rölatif olarak kıyaslanması. Kıyaslamalar için Livak (2^{-ddCT}) metodu kullanıldı. Bar çubukları 2^{-ddCt} değerini, hata çubukları ise +SEM değerini göstermektedir

4.2.2. OV2008 ve C13 hücrelerinde TLR1/2 aktivasyonunun BCL2A1, GSTP1 ve ABCB1 ekspresyonu üzerine olan etkilerinin belirlenmesi

Sıradaki deneylerde, TLR1/2 uyarımı sonrası ilaç direnci ile ilişkili genlerin regülasyonundaki değişimler araştırıldı. TLR1/2 aktivasyonunun BCL2A1, GSTP1 ve ABCB1 geni üzerindeki potansiyel etkilerini belirlemek için MTT testleri sonucunda üzerinde karar kılınan 0.1 µg/mL'lik P3C konsantrasyonu, deney protokolünde herhangi bir değişikliğe gidilmeden OV2008 ve C13 hücreleri üzerinde uygulandı. MTT testlerinden farklı olarak 24 saatlik inkübasyon sonunda RNA izolasyonu aşamasına geçilerek Gerçek-zamanlı PCR analizleri için hücrelerden RNA örnekleri toplandı. Ayrıca, P3C kullanılan gen ekspresyonu analizlerinde kontrol grubuna herhangi bir kimyasal muamelesi yapılmadı.

PCR analizleri sonucunda OV2008 hücre hattında 24 saatlik P3C uygulaması kontrol grubuna kıyasla BCL2A1 geninde bir artışa sebep oldu ($P \leq 0.05$). Ancak, bunun aksine GSTP1 ve ABCB1 genlerinin down-regüle oldukları gözlemlendi (GSTP1, $P \leq 0.001$; ABCB1, $P \leq 0.01$).

OV2008'in ardından, C13 hücre hattında da kemodirenç ile ilişkili genlerin ekspresyonel analizleri gerçekleştirildi. C13 için TLR1/2 aktivasyonunun bu üç gen için birbirinden farklı profillerde gen ekspresyonu regülasyonuna sebep olduğu belirlendi. BCL2A1 ve GSTP1, P3C uygulaması sonrası down-regüle olurken, bu durum yalnızca GSTP1 için istatistiksel olarak bir anlam ifade etti ($P \leq 0.05$). ABCB1 ekspresyonu ise TLR1/2 ligandı varlığında yaklaşık 1.25 katlık bir artış gösterdi.

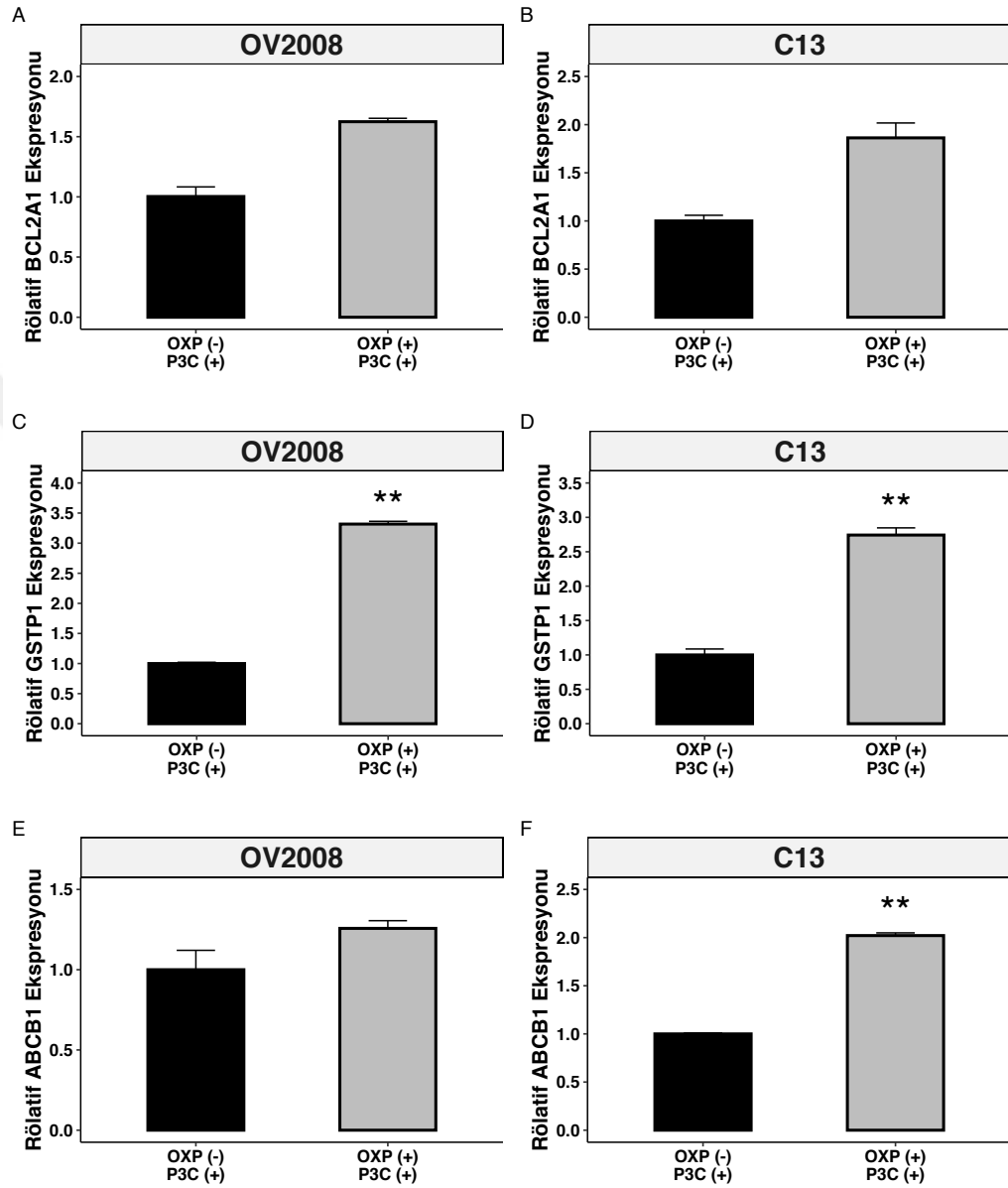


Şekil 4. 18. Pam3CSK4 uygulamasının over kanseri hücre hatlarında BCL2A1, GSTP1 ve ABCB1 gen ekspresyonlarına olan etkileri. A, C, E- OV2008 hücre hatlarında sırasıyla BCL2A1, GSTP1 ve ABCB1 genlerinin Pam3CSK4 (P3C) uygulaması sonrası rölatif olarak değişimleri. B, D, F- C13 hücre hatlarında sırasıyla BCL2A1, GSTP1 ve ABCB1 genlerinin P3C uygulaması sonrası rölatif olarak değişimleri. Kıyaslamalar için P3C uygulanmayan kontrol grubu referans alındı (***: $P \leq 0.001$; **: $P \leq 0.01$; *: $P \leq 0.05$). Analiz için Livak (2^{-ddCT}) metodu kullanıldı. Kontrol grubunun değeri ise 1'e eşitlendi. Hata çubukları +SEM değerini göstermektedir

4.2.2. OV2008 ve C13 hücrelerinde TLR1/2 blokajının BCL2A1, GSTP1 ve ABCB1 ekspresyonu üzerine olan etkilerinin belirlenmesi

Reseptör aktivasyonu aracılığıyla ilaç direnci ile ilişkili genlerin ekspresyonel analizleri tamamlandıktan sonra, TLR1/2 blokajının bu genler üzerinde herhangi bir değişikliğe sebep olup olmadığı OxPAPC (OXP) kullanımıyla belirlendi. TLR1/2 blokajı için, hücreler üzerinde MTT testlerinde karar kılınan 1 µg/mL'lik OXP konsantrasyonu kullanıldı. OXP uygulamasından 1 saat sonra ise ortama 0.1 µg/mL'lik P3C eklendi. Elde edilen veriler 0.1 µg/mL P3C içeren kontrol grubuyla kıyaslandı. İlginç bir şekilde, OV2008 hücrelerinde TLR1/2 blokajı tüm genlerin ekspresyonunu arttırdı. Bu durum, artan BCL2A1 ekspresyonunun reseptör blokajı ile de sağlanabileceğini gösterdi. TLR1/2 uyarımı sonucu, BCL2A1'in aksine anlamlı biçimde down-regüle olan GSTP1 ve ABCB1 genlerine ait transkriptlerin bu deneyler sonucunda miktarlarında çoğalma olduğu saptandı. Özellikle GSTP1'in OXP uygulaması sonrası kontrol grubuna kıyasla yaklaşık üç kat arttığı belirlendi ($P \leq 0.01$).

Benzer sonuçlar C13 hücrelerinde de tespit edildi. OXP uygulaması, kontrol grubuna kıyasla tüm genlerde up-regülasyona sebep oldu. Önceki deneylerde gösterildiği gibi; P3C uygulanan durumlarda azalan BCL2A1 ve GSTP1 ekspresyonu, OXP uygulaması sonrası arttı (GSTP; $P \leq 0.01$). Bununla beraber, TLR1/2 aktivasyonu sonunda yükselen ABCB1 ifadesi, blokaj sonrası daha büyük ölçekli bir artış grafiği yansıttı ($P \leq 0.01$).



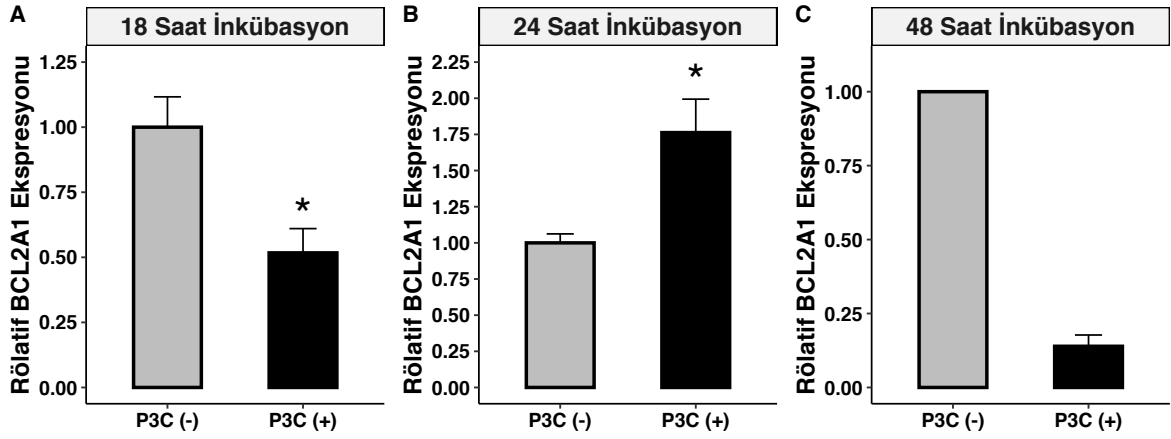
Şekil 4. 19. OxPAPC uygulamasının over kanseri hücre hatlarında BCL2A1, GSTP1 ve ABCB1 gen ekspresyonlarına olan etkileri. A, C, E- OV2008 hücre hatlarında sırasıyla BCL2A1, GSTP1 ve ABCB1 genlerinin OxPAPC (OXP) uygulaması sonrası rölatif olarak değişimleri. B, D, F- C13 hücre hatlarında sırasıyla BCL2A1, GSTP1 ve ABCB1 genlerinin OXP uygulaması sonrası rölatif olarak değişimleri. Karşılaştırmalar için OXP uygulanmayan ancak P3C uygulanan kontrol grubu referans alındı (**: $P \leq 0.01$). Analiz için Livak ($2^{-\Delta\Delta CT}$) metodu kullanıldı ve kontrol grubunun değeri 1'e eşitlendi. Hata çubukları +SEM değerini göstermektedir

4.2.3. OV2008 ve C13 hücrelerinde TLR1/2 aktivasyonun ve blokajının zamana bağlı BCL2A1, GSTP1 ve ABCB1 ekspresyonlarındaki rolü

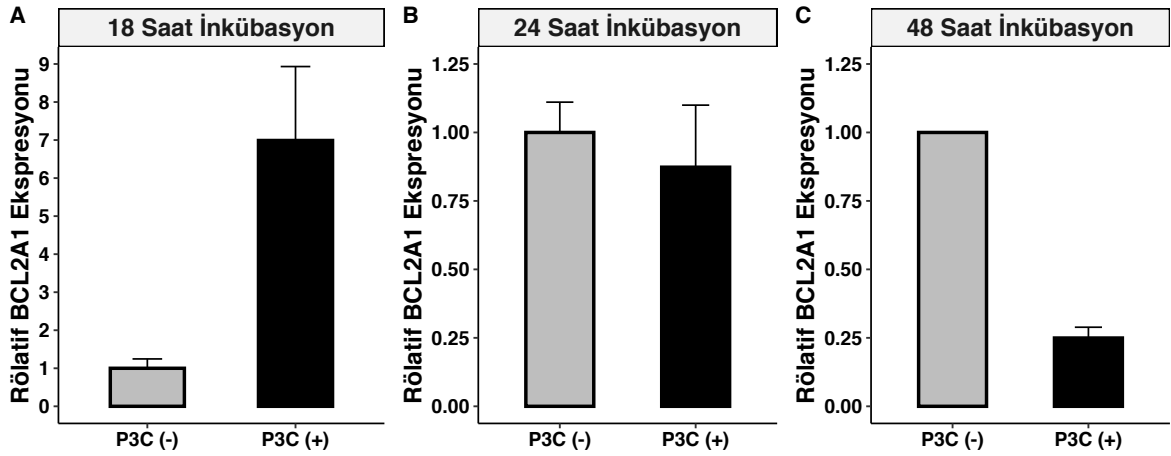
24 saatlik inkübasyon süresi dışında, P3C'nin gen ekspresyonuna olan potansiyel etkileri 18 ve 48. saat aralıklarında da hücre hatları üzerinde değerlendirildi. Elde edilen sonuçlar şaşırtıcı biçimde TLR1/2 aktivasyonunun farklı zaman aralıklarında ilaç direnci ile ilişkili genlerin ekspresyonunu önemli ölçüde değiştirebileceğini gösterdi.

OV2008 hücre hattında BCL2A1'in gen ekspresyon verileri 18, 24 ve 48 saatlik P3C uyarımı sonrası tartışıldı. 18. saat sonunda BCL2A1'in mRNA ekspresyonu, kontrol grubuna kıyasla daha az iken ($P \leq 0.05$), 24 saatlik inkübasyon sonunda arttı ($P \leq 0.05$). 48 saatlik P3C muamelesi ise OV2008 hücrelerinde düşük miktardaki BCL2A1 ekspresyonuna neden oldu.

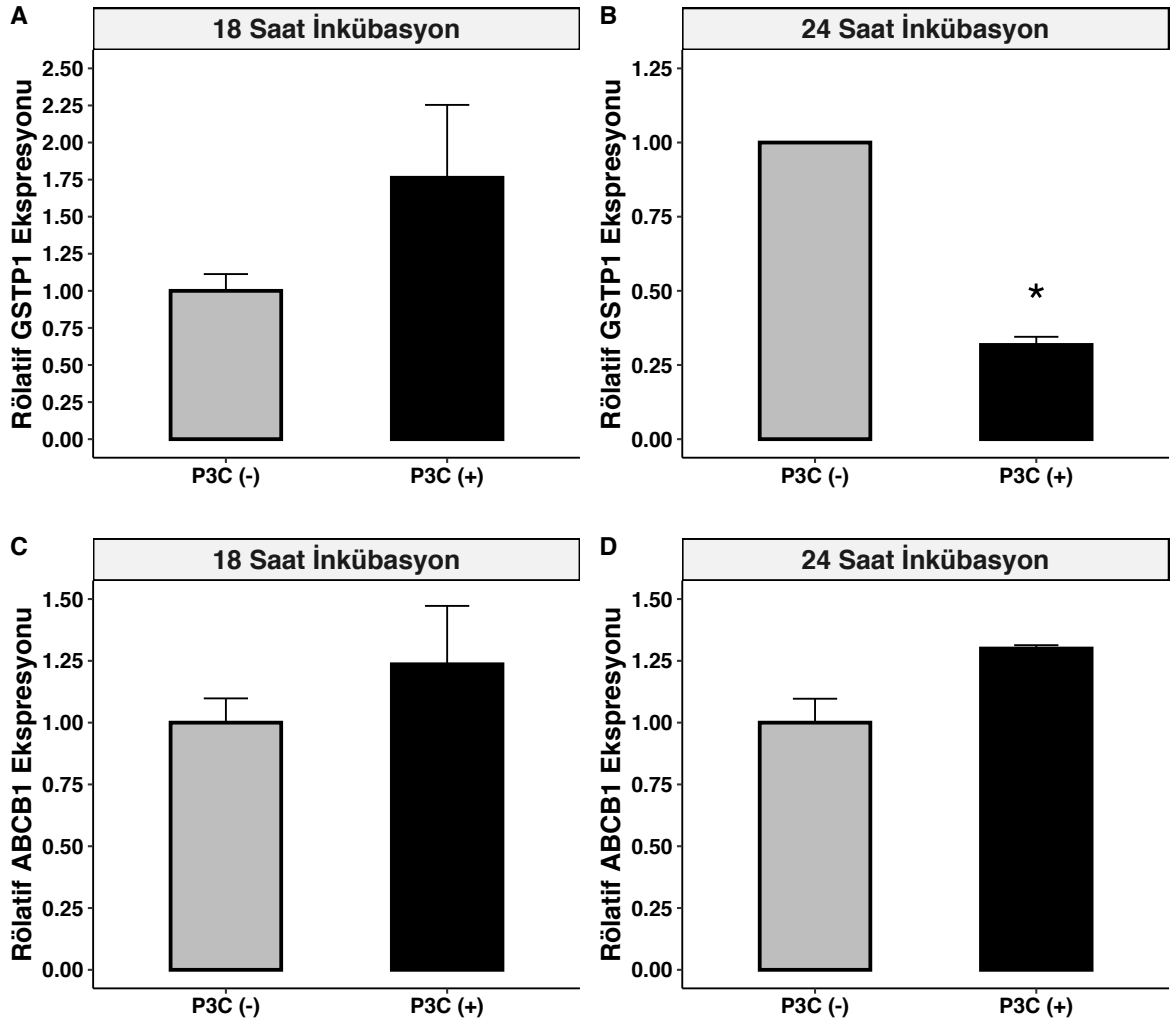
C13 hücrelerinde ise, ligand uygulaması 18. saatte BCL2A1 ekspresyonunu neredeyse 7 kat yükseltirken, 24 saatlik inkübasyon sonunda bu gen kontrol grubuna kıyasla daha az ekspresyona uğradı. Ayrıca, 48 saatlik inkübasyonda, OV2008'de olduğu gibi BCL2A1 ekspresyonunun büyük oranda düştüğü tespit edildi. Bu sonuçlar, BCL2A1'in zamana bağlı kemoduyarlı ve kemodirençli hücrelerde TLR1/2 aktivasyonu ile düzenlenebileceğini gösterdi. GSTP1 ise 18. saatte P3C uygulanmış grupta artış gösterirken, 24 saat sonunda anlamlı biçimde down-regüle oldu ($P \leq 0.05$). Bununla beraber, ABCB1 ekspresyonunda P3C uygulaması ile farklı zaman aralıklarında up-regülasyon grafiği izlenirken anlamlı bir değişim gözlemlenmedi.



Şekil 4. 20. OV2008 hücrelerinde çeşitli zaman aralıklarında Pam3CSK4 uyarımının BCL2A1 regülasyonuna etkisi. A- 18, B-24, C-48 saatlik 0.1 µg/mL Pam3CSK4 (P3C) uyarımının P3C uygulanmayan gruplara kıyasla BCL2A1 ekspresyonuna olan etkisi. Karşılaştırmalar için P3C uygulanmayan kontrol grubu referans alındı. Analiz için Livak (2^{-ddCT}) metodu kullanıldı ve kontrol grubunun değeri 1'e eşitlendi

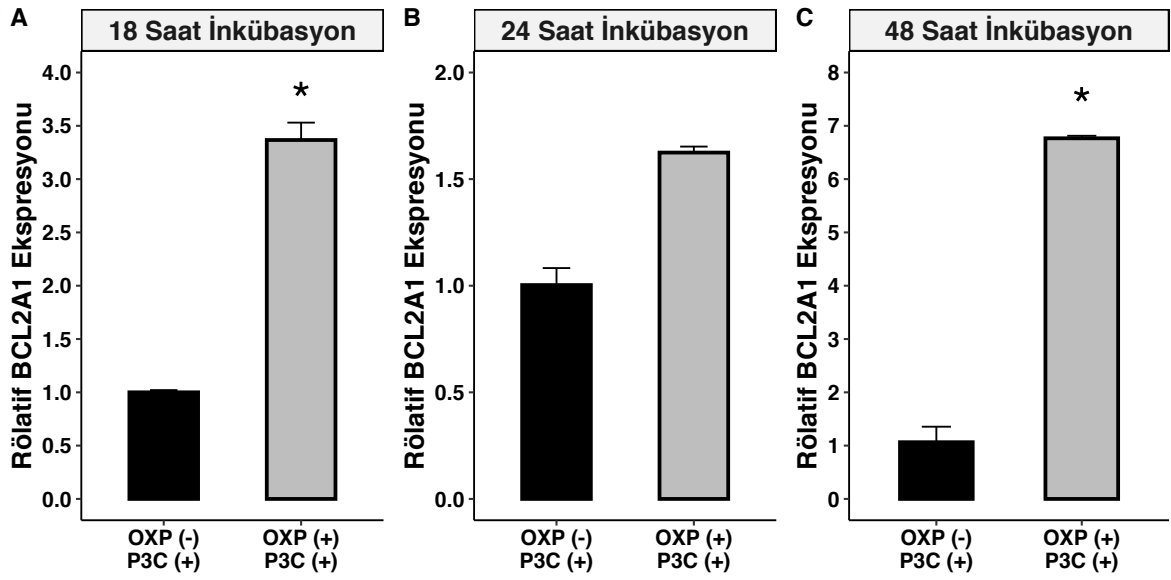


Şekil 4. 21. C13 hücrelerinde çeşitli zaman aralıklarında Pam3CSK4 uyarımının BCL2A1 regülasyonuna etkisi. A- 18, B-24, C-48 saatlik 0.1 µg/mL Pam3CSK4 (P3C) uyarımının P3C uygulanmayan gruplara kıyasla BCL2A1 ekspresyonuna olan etkisi. Karşılaştırmalar için P3C uygulanmayan kontrol grubu referans alındı. Analiz için Livak (2^{-ddCT}) metodu kullanıldı ve kontrol grubunun değeri 1'e eşitlendi



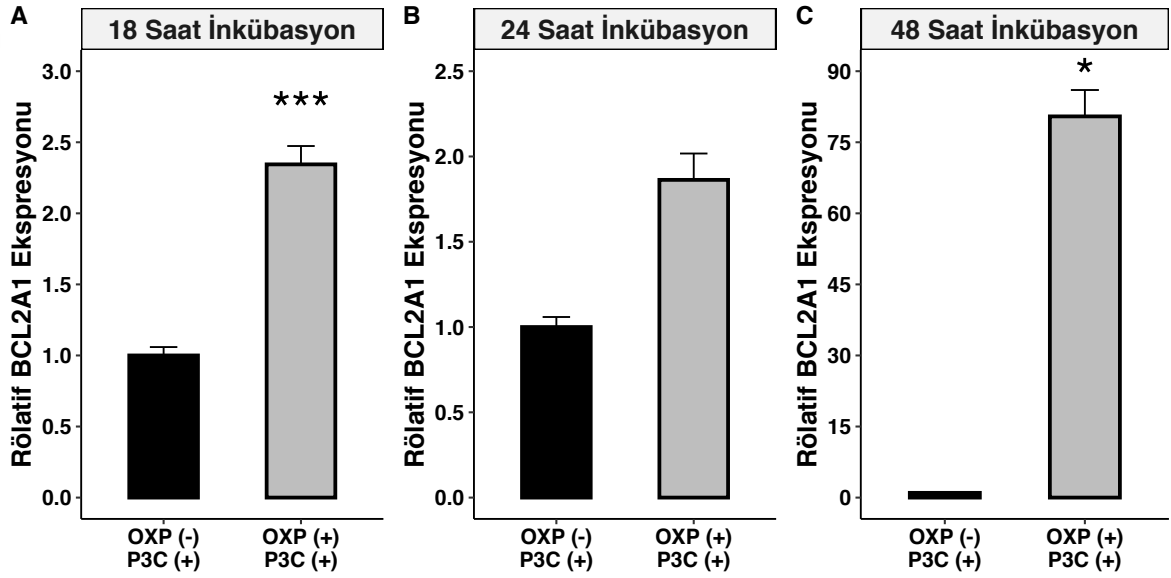
Şekil 4. 22. C13 hücrelerinde çeşitli zaman aralıklarında Pam3CSK4 uyarımının GSP1 ve ABCB1 regülasyonuna etkisi. A- 18, B-24 saatlik 0.1 $\mu\text{g/mL}$ Pam3CSK4 (P3C) uyarımının P3C uygulanmayan gruplara kıyasla GSP1 ekspresyonuna olan etkisi. C- 18, D-24 saatlik 0.1 $\mu\text{g/mL}$ Pam3CSK4 (P3C) uyarımının P3C uygulanmayan gruplara kıyasla ABCB1 ekspresyonuna olan etkisi. Karşılaştırmalar için P3C uygulanmayan kontrol grubu referans alındı ($P \leq 0.05$). Analiz için Livak ($2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$) metodu kullanıldı ve kontrol grubunun değeri 1'e eşitlendi. Hata çubukları ise +SEM değerini göstermektedir

Zamana bağılı P3C uygulaması sonrası ekspresyonel olarak regülasyona uğrayan genlerin durumu, aynı zamanda 18, 24 ve 48 saatlik OXP uygulamasının ardından da değerlendirildi. Şekil 4.23.'te gösterildiği gibi OV2008 hücrelerinde BCL2A1'in, OXP uygulaması sonrası tüm zaman dilimlerinde kontrol grubuna göre up-regüle olduğu tespit edildi.

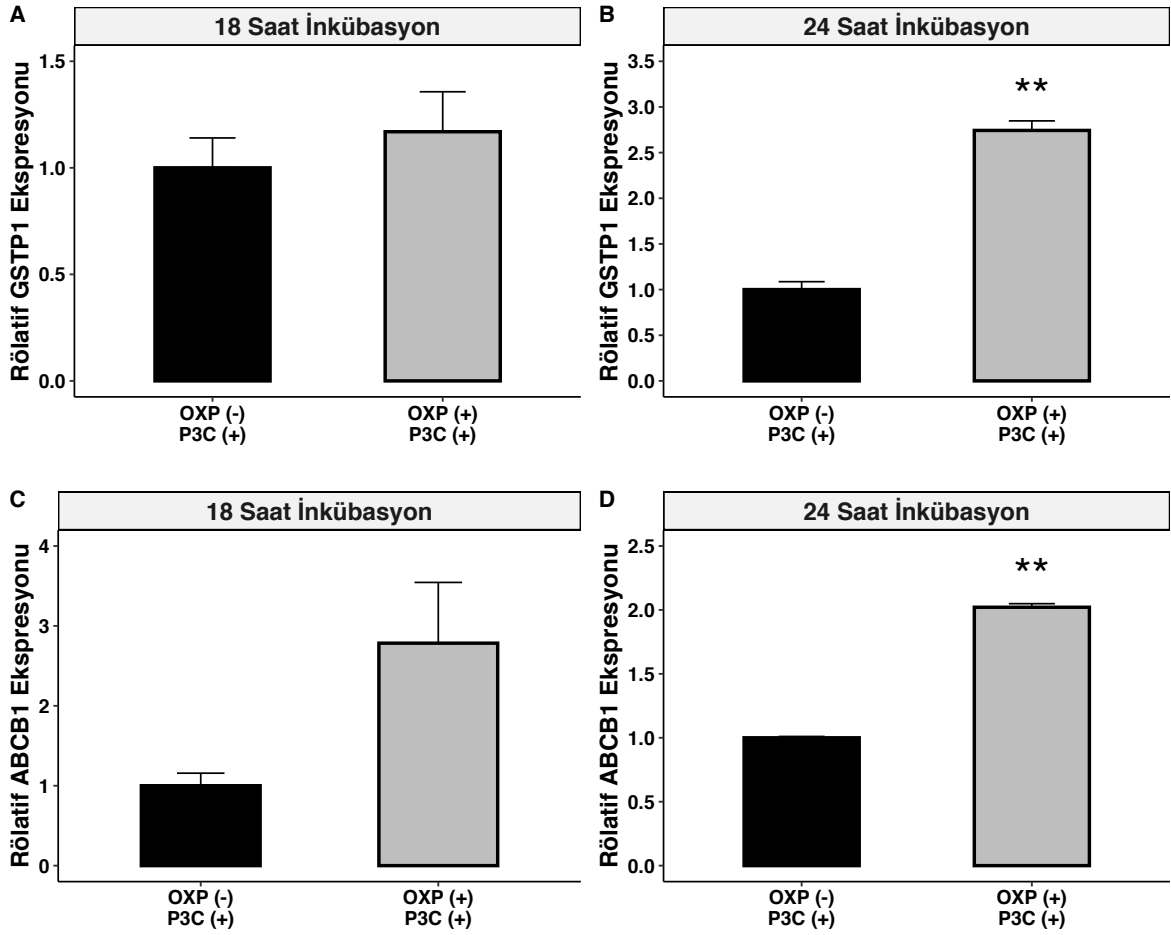


Şekil 4. 23. Çeşitli zaman aralıklarında OxPAPC uygulamasının OV2008 hücre hattında BCL2A1 gen ekspresyonuna olan etkisi. A, B, C- sırasıyla 18, 24 ve 48. saatte OV2008 hücre hatlarında BCL2A1'in OxPAPC (OXP) uygulaması sonrası rölatif olarak değişimleri. Deney gruplarına 1 µg/mL OXP ve 0.1 µg/mL P3C eklendi. Kıyaslamalar için ise OXP uygulanmayan ancak P3C uygulanan kontrol grubu referans alındı (**: $P \leq 0.01$). Analiz için Livak (2^{-ddCT}) metodu kullanıldı ve kontrol grubunun değeri 1'e eşitlendi. Hata çubukları ise +SEM değerini göstermektedir

Benzer şekilde C13 hücre hattında da, BCL2A1, tüm zaman aralıklarında up-regülasyona uğradı. Ayrıca, 48 saatlik OXP muamelesi C13 hücrelerinde BCL2A1 ekspresyonunu kontrole kıyasla 75 katın üstünde arttırdı ($P \leq 0.05$). İlave olarak, GSTP1 ve ABCB1'in de zamana bağlı değişimleri Şekil 4.25.'te gösterilmektedir.



Şekil 4. 24. Çeşitli zaman aralıklarında OxPAPC uygulamasının C13 hücre hattında BCL2A1 gen ekspresyonuna olan etkisi. A, B, C- sırasıyla 18, 24 ve 48. saatte C13 hücre hatlarında BCL2A1'in OxPAPC (OXP) uygulaması sonrası rölatif olarak değişimleri. Deney gruplarına 1 µg/mL OXP ve 0.1 µg/mL P3C eklendi. Kıyaslamalar için ise OXP uygulanmayan ancak P3C uygulanan kontrol grubu referans alındı (***: $P \leq 0.001$, *: $P \leq 0.05$). Analiz için Livak (2^{-ddCT}) metodu kullanıldı ve kontrol grubunun değeri 1'e eşitlendi. Hata çubukları ise +SEM değerini göstermektedir



Şekil 4. 25. Çeşitli zaman aralıklarında OxPAPC uygulamasının C13 hücre hattında GSTP1 ve ABCB1 gen ekspresyonuna olan etkisi. A, B- sırasıyla 18 ve 24. saatte C13 hücre hatlarında GSTP1'in OxPAPC (OXP) uygulaması sonrası rölatif olarak değişimleri. C, D- sırasıyla 18, 24. saatte C13 hücre hatlarında ABCB1'in OxPAPC (OXP) uygulaması sonrası rölatif olarak değişimleri. Deney gruplarına 1 µg/mL OXP ve 0.1 µg/mL P3C eklendi. Kıyaslamalar için ise OXP uygulanmayan ancak P3C uygulanan kontrol grubu referans alındı (**: $P \leq 0.01$). Analiz için Livak (2^{-ddCT}) metodu kullanıldı ve kontrol grubunun değeri 1'e eşitlendi. Hata çubukları ise +SEM değerini göstermektedir

4.3. Verilerin Tartışılması

Bu tez çalışmasında ilk olarak, over kanseri hücre hatları OV2008 ve onun kemodirençli klonu C13'ün geleneksel bir kemoterapi ajanı olan sisplatin karşısındaki duyarlılıkları test edildi. MTT sonuçları ile, C13'ün OV2008'e kıyasla sisplatine karşı daha agresif bir fenotip sergilediği saptandı. Ardından, elde edilen veriler yardımıyla doz/yanıt eğrisi adı verilen sigmoid bir IC₅₀ grafiği oluşturuldu. IC₅₀ grafiğine göre, %50'lik inhibisyon oluşturacak sisplatin dozları OV2008 için 9.52 µM, C13 için ise 117.91 µM olarak belirlendi. Ayrıca, bu değerler sisplatin uygulamasını da içeren sıradaki testlerde kullanıldı.

Ardından, TLR1/2 yüzey reseptörünün over kanseri üzerinde herhangi bir proliferatif ya da sitotoksik etkiye sebep olup olmayacağı araştırıldı. Bu amaçla, reseptör aktivasyonunu sağlayan Pam3CSK4 (P3C) ve TLR2 ilişkili komplekslerin blokajına neden olan OxPAPC (OXP) isimli iki ayrı sentetik ligandın hücre canlılıkları üzerindeki etkileri değerlendirildi. Daha önce literatürde gösterildiği gibi, gastrik kanseri (AZ521 ve NUGC4) ya da kolon kanseri hücre hatlarında (HCT116, SW480 ve RKO) proliferatif etkileri bulunan P3C'nin (West ve ark., 2017; Liu ve ark., 2018), bu tez çalışması sonunda OV2008 ve C13'te de çoğalmaya sebep olduğu ortaya koyuldu. Bununla beraber, geniş bir doz aralığında denenen (0.01, 0.05, 0.1, 1 ve 5 µg/mL) agonistin yalnızca 0.1 µg/mL konsantrasyonunda önemli bir proliferasyona sebep olduğu anlaşıldı. Böylece, TLR1/2 aktivasyonunun hücre bölünmesini spesifik dozlarda uyarabileceği belirlendi. Buna karşın, C13'te 5 µg/mL'lik P3C uygulamasının sitotoksik bir kondisyon oluşturabileceği de anlaşıldı. Bu durum, daha önce Abdi ve arkadaşlarının (2013; 2014) miyeloma hücrelerinde gösterdiği gibi; yüksek dozdaki P3C uygulaması ile artan NF-kB aktivitesi ve pro-apoptotik sinyal iletimi ile ilişkilendirildi. Ancak nihayetinde, 0.1 µg/mL'lik ligand muamelesinin proliferatif özellikte olduğu tespit edildikten sonra bu doz, sisplatin kombinasyonu uygulanacak testlerde ve Gerçek-zamanlı PCR çalışmalarında referans olarak seçildi.

P3C aracılığıyla sağlanan TLR1/2 aktivasyonunun hücreler üzerindeki etkisi belirlendikten sonra, reseptörün bloke olduğu durumların, kontrole kıyasla canlılık verilerinde bir değişim

oluşturup oluşturmayacağı araştırıldı. Bu amaçla, TLR2 ile ilişkili reseptörlerin aktivitesini engelleyen OXP antagonist molekülünün kullanımı tercih edildi. OXP'nin TLR1/2 stimülasyonunu sağlayan moleküllerin etkisini yarışmalı biçimde baskıladığı ve dimerizasyonda görevli CD14 ve MD2 gibi proteinleri taklit ederek reseptör aktivasyonunu ortadan kaldırdığı bilindiğinden (Erridge ve ark., 2008), deney gruplarına 0.1 µg/mL'lik P3C de ilave edildi. Bu sayede, hücre bölünmesine sebep olan P3C'nin kontrol olarak kabul edildiği OXP uygulamasını içeren deneylerde, canlılığının TLR1/2 reseptörlerinin blokajıyla ne denli değişebileceğinin de yorumlanması amaçlandı. Invivogen firmasının sağladığı protokollerde önerilen 30 µg/mL'lik OXP, over kanseri hücrelerinin büyük oranda inhibe olmasına neden oldu. İnhibisyon verisi, bu molekülün oksidize formda bir yağ asidi olmasıyla ve potansiyel bir reaktif oksijen türevi kaynağı gibi davranarak hücre canlılığına olumsuz yönde etkilemesiyle ilişkilendirildi (Iuchi ve ark., 2019). Dolayısıyla, önerilenin aksine daha düşük antagonist dilüsyonları hazırlanarak canlılığın çok azalmadığı, ancak, molekülün TLR kompleksleri üzerindeki etkisini sergileyebileceği düşünülen bir aralık belirlenmeye çalışıldı. Bu amaçla, hücreler üzerinde 0.05, 0.1, 0.5, 1, ve 5 µg/mL'lik OXP uygulamaları yapılmasında karar kılındı. Deney aşamasına geçildiğinde her iki hücre hattında da azalan canlılık oranları dikkat çekti. OV2008, 5 µg/mL'lik OXP konsantrasyonunda güçlü bir şekilde inhibe olurken, kemodirenç davranışı sergileyen C13 sağ kalımını yaklaşık %50 kadar sürdürmeye devam etti. Bu yüzden, bu hücreler için ayrıca 10 µg/mL'lik ilave bir uygulama gerçekleştirildi. Uygulamanın ardından C13'te canlılığının büyük ölçüde ortadan kalktığı anlaşıldı. Ayrıca, gen ekspresyon çalışmalarında kullanılmak üzere ortak bir doz belirleyebilmek adına sonuçlar dikkatlice incelendi. İncelemelerdeki kıstas, TLR1/2'yi bloke edebilecek en yüksek OXP uygulamasını bulurken, mümkün olduğunca az hücrel sitotoksiste oluşturmaktı. Bu doğrultuda en uygun konsantrasyonun 1 µg/mL olduğu kararlaştırıldı.

Önceki testlerde P3C aracılığıyla gerçekleşen reseptör uyarımının kanser hücrelerinin proliferasyonunu arttırdığı belirlendiğinden, bu durumun tez çalışmasının amacı kapsamında sisplatin direncine olan etkileri tartışıldı. Kemoterapi ilacı sisplatin için daha önce belirlenen IC₅₀ dozları çalışmanın bu bölümünde kullanıldı. TLR1/2 aktivasyonunun ve sisplatin tedavisinin kombinasyonel etkisini ölçebilmek adına, hücreler ilk olarak 4 saat boyunca P3C ile muamele edildi. Ardından OV2008 için 9.52 µM, C13 için ise 117.91 µM'lık ilaç kültür ortamına dahil edildi. Reseptör uyarımının etki edeceği proliferasyon verisini farklı P3C dozları bakımından karşılaştırmak adına bu aşamada ayrıca 0.01, 0.1 ve 1 µg/mL'lik agonist kullanıldı. Sonuçlar, OV2008 ve C13'te P3C uygulamasının sisplatinin neden olduğu inhibisyonu azalttığını gösterse de, değişim deney gruplarının hepsi için istatistiksel olarak anlamlı değildi. Bununla beraber, OV2008'de 0.01 µg/mL'lik P3C konsantrasyonunun sisplatinin etkinliğini belirli oranda sürprese edebildiği anlaşıldı. Özellikle ilacın yalnız başına uygulandığı kontrol grubunda oluşturduğu %50'lik inhibisyon, agonist kullanımı ile %15 oranında azalma sergiledi. Böylece 0.01 µg/mL P3C bulunan deney ortamındaki hücre canlılığı yaklaşık olarak %65 civarında kaldı. Yeni durumda, P3C ön muamelesi gören ve TLR1/2 aktivasyonuna sahip OV2008'in yarısını inhibe edebilecek sisplatin dozunun daha yüksek olması gerektiği belirlendi.

MTT testleri tamamlandıktan sonra, PCR aşamasında kullanımı için karar kılınan 0.1 µg/mL'lik P3C ve 1 µg/mL'lik OXP konsantrasyonları over kanseri hücre hatları üzerinde belirli zaman aralıklarında denendi. İlaç direnci ile ilişkilendirilen BCL2A1, GSTP1 ve ABCB1, teoride TLR1/2 uyarımı ile birlikte ekspresyona açık hale gelmektedir. Çünkü bu genlerin, TLR1/2 aracılı sinyal yolağının aşağı akışında bulunan NF-kB transkripsiyon faktörüyle düzenlenebildiği bilinmektedir (Vogler, 2012; Morceau ve ark., 2004; Wang ve ark., 2007). Bu doğrultuda, P3C ile gerçekleşen TLR1/2 aktivasyonunun ilaç direnci ile ilişkili etkileri ilk olarak BCL2A1 özelinde tartışıldı. Buna göre 24 saatlik inkübasyon sonunda BCL2A1, OV2008 hücrelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterirken, C13'te kontrol grubuna kıyasla büyük farklar gözlemlenmedi. Bu sonuç, OV2008 için reseptör aracılığıyla NF-kB yolağının aktivasyonu ile BCL2A1'in up-regüle olması görüşünü destekledi. Buna karşın, GSTP1 genine ait transkriptlerin hücrelerin her ikisinde de down-

regüle olduğu belirlendi. Son olarak, P3C uyarımı ile ABCB1'in düzenlenmesi yorumlandı. İlginç bir şekilde ABCB1 ifadesi kemoduyarlı OV2008 hücrelerinde azalırken, kemodirençli C13 hücrelerinde az da olsa artış gösterdi. Bu durumun, over kanseri hatları üzerinde TLR4 tabanlı yapılan başka bir çalışma ile benzerlik gösterdiği anlaşıldı. Sun ve arkadaşlarına (2014) göre, paclitaxel adı verilen bir kemoterapi ilacına direnç gösteren SKOV3'de TLR4 aktivitesinin yükselen ABCB1 ekspresyonu ile ilişkili olduğu bildirilirken, paclitaxel'e duyarlı başka bir SKOV3 klonunda TLR4'ün knock-down edilmesi ABCB1 down-regülasyonuna yol açmaktadır. Böylelikle, TLR4'teki işlev kaybının paclitaxele duyarlı hücrelerde ABCB1 ekspresyonunu dirençlilere kıyasla düşük tutulmasında önemli olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, kemodirençli C13, paclitaxel'e dirençli SKOV3'de geçerli olduğu gibi TLR uyarımı sonrası ABCB1 ekspresyonunu da arttırmaktadır.

24 saatlik inkübasyon süresinin dışında, farklı zaman aralıklarında P3C'nin over kanseri hücrelerinde kemodirençle ilişkili genlerin transkripsiyonu üzerindeki etkileri de araştırıldı. BCL2A1, P3C uygulamasının 18. saatinde OV2008'de kontrol grubuna göre azalırken, 24. saatte tersi şekilde artış gösterdi. C13'te ise 18. saat sonunda TLR1/2 aktivasyonunu içeren deney grubu bu anti-apoptotik genin ifadesini 7 kat arttırırken, 24. saatte her iki grup neredeyse eşit hale geldi. Dolayısıyla, kemoterapi uygulamalarına ayrı şekilde yanıt veren over kanseri hücrelerinde, çeşitli zaman aralıklarında gerçekleşen TLR1/2 uyarımının BCL2A1 üzerindeki regülatör etkilerini farklı yönde sergileyebileceği anlaşıldı. Ayrıca, 48 saatlik inkübasyonun sonunda OV2008 ve C13'te BCL2A1 ekspresyonunun kontrole nazaran büyük ölçüde düştüğü de gözlemlendi. Elde edilen sonuçlar, TLR1/2 reseptörü ve ilişkili sinyal yolları dışında farklı bir mekanizmanın daha gen ifadesi üzerinde etkisinin bulunabileceği izlenimini uyandırdı. Ligand uygulamasını içeren grupların bulunduğu besiyerinin serum içermemesi, hücrelerin TLR1/2 aktivasyonuna rağmen BCL2A1 ifadesini 48. saate kadar arttıramayacağı ihtimalini güçlendirmektedir. Bu görüşle ilgili olarak, daha önce Huang ve arkadaşları tarafından (2018) BCL2 ailesi üyelerinin uzun süreli serum starvasyonu sonunda down-regüle olabileceği ve böylece hücrelerin pro-apoptotik faaliyetlerini arttırabileceği bildirilmiştir. Tez çalışması özelinde, 48 saatlik P3C uygulaması sonunda elde edilen BCL2A1 ile ilgili verilerin serum starvasyonu ile bağlantılı olabileceği

tahmin edilmektedir. Zamana bağılı regülasyonu değişen GSTP1 ifadesinin ise, C13'te 18. saatte up-regülasyonu gösterilirken, 24 saat sonunda azalan bir eğilimde olduğu tespit edildi. Ayrıca ABCB1 genine ait transkriptler için, 18 ve 24. saatlerde anlamlı olmasa da bir artış grafiği belirlendi. Agonist uygulamaları ile TLR2 ve ilişkili reseptörlerinin uyarımının ABCB1'in ifadesine üzerine olan bu etkisi halihazırda farklı hücrelerde elde edilen çeşitli raporlardaki gözlemleri de desteklemektedir (Frank ve ark., 2015; Mizuno ve ark., 2017).

Gerçek-zamanlı PCR analizlerinde son olarak OXP'nin etkileri değerlendirildi. Sonuçlar her iki hücre hattında da BCL2A1, GSTP1 ve ABCB1'in ekspresyonel olarak up-regüle olduklarını gösterdi. Bu mekanizma, MTT testleriyle orantılı bir durum gibi görünmeyip ilaç direnci davranışının TLR2 etkileşimi içeren reseptörlerinin blokajıyla sağlanabileceği ihtimalini azaltmaktadır. Farklı bir perspektiften değerlendirildiğinde, MTT testlerinde de gösterildiği gibi, OXP ile ortaya çıkan sitotoksosite ve stres yanıtına karşı hücrelerin hayatta kalma amaçlı anti-apoptotik veya ilaç direnci ile ilişkili genleri up-regüle etmesi mümkündür. Literatürde birçok çalışma TLR2 ilişkili reseptörlerin blokajını sağlayan OXP'nin aynı zamanda oksidatif strese yol açabileceğini ya da oksidatif stres yanıtı ile ilişkili genlerin up-regülasyonu uyurabileceğini göstermektedir (Li ve ark., 2007; Yan ve ark., 2014; Iuchi ve ark., 2019). Oksidatif stres reaktif oksijen türevleri (ROS) ve serbest radikallerin hücre içerisinde biriktiği durumlarda ortaya çıkan fizyolojik bir durumdur. Normal şartlarda metabolik yollar aracılığıyla da oluşabilen ROS ve serbest radikallerin, hücrelerde yoğun biçimde biriktiği durumlarda DNA mutasyonlarına rastlandığı ve protein veya lipid yapılarının hasar gördüğü tespit edilmektedir. Ayrıca artan strese bağılı olarak zamanla gelişen DNA mutasyonlarının karsinogeneze sebep olabileceği de bilinmektedir (Saha ve ark., 2017). Bu durumu destekler biçimde, kanser hücreleri yüksek miktarda ROS üretimi ile pro-tümörjenik faaliyetlerini sürdürmektedir. Çalışmalar, tümörlerin ROS ve serbest radikallerin yapımıyla anti-oksidan etkili mekanizmalarını up-regüle edebileceğini göstermektedir (Hayes ve ark., 2020). Ayrıca bu mekanizmalara "Multi Drug Resistance" (MDR) ile ilişkili genlerin düzenlenmesi de dahildir (Norouzi-Barough, 2017). Bu bilgiler ışığında, OXP uygulamasını içeren sonuçlar incelendiğinde, BCL2A1 ekspresyonunun her iki hücre hattında da 18 ve 24. saatler sonunda anlamlı biçimde yükseldiği, hatta C13'te 48

saatlik inkübasyon sonunda kontrole kıyasla çok daha fazla olduğu gözlemlendi. Bu durum, literatürde önceki raporlarda stres karşısında hücrelerin sağ kalmak için arttırabileceği gösterilen BCL2 ailesi üyelerinin up regülasyonu ile benzerlik göstermektedir (Antony ve ark., 2005). Bununla beraber sonuçlar, OXP'nin GSTP1 ekspresyonunu da regüle edebileceğini gösterdi. GSTP1'in artan ifadesi de normal şartlarda antagonist ile elde edilen sitotoksikite verileri ile korelasyon göstermemektedir. Ancak çalışmalar, bu genin kodladığı enzimin ilaç detoksifikasyonunun yanında farklı bir hücresel fonksiyonunun daha olabileceğini bildirmektedir. Literatüre göre, TLR2 ilişkili sinyal yollarının hücre içi nitrik oksit (NO) miktarını arttırabileceği bildirmiştir. Artan NO ise oksidatif strese sebep olarak, hücrelerden detoksifiye edilebilmesi için GST proteinlerinin aktivasyonunu ve transkripsiyonel regülasyonunu uyarmaktadır (Li ve ark., 2019). Bir diğer raporda ise, reseptörlerden bağımsız olarak, normal şartlarda strese karşı pro-apoptotik faaliyetlerde görevli bir transkripsiyon faktörü JNK (c-Jun N-terminal kinase) ile etkileşim halinde bulunan GSTP1, JNK'nin inhibitörü gibi davranmaktadır. Ancak, reaktif oksijen türevlerinin hücre içi konsantrasyonlarının arttığı durumlarda GSTP1 kompleksten ayrılarak detoksifikasyon sürecine dahil olurken, JNK aktif pozisyona geçebilmektedir. Bunun sonucunda da apoptozis yollarını uyarabilmektedir (Laborde, 2010; Kanwal ve ark., 2014). Bu durum, kanser hücrelerinin OXP uygulaması sonrası GSTP1 ifadelerini arttırması; oksidatif strese karşı hayatta kalımı sürdürmek için oluşturduğu “survival” faaliyetlerinin bir parçası olma potansiyeli taşımaktadır. BCL2A1 ve GSTP1 için ortaya koyulan sonuçlara paralel olarak, ABCB1 transkriptlerinde de antagonist uygulaması sonrasında kontrole kıyasla bir yükseliş olduğu gözlemlendi. 24 saatlik OXP uyarımı, her iki hücre hattında da bu efflux pompasının ifadesini arttırırken, C13'te yaklaşık 2 katlık bir up-regülasyon durumu dikkat çekti. Özellikle TLR1/2 aktivasyonu ile ABCB1 mRNA miktarlarını azaltan OV2008; blokajı sağlayan OXP içeren ortamda tersine transkripsiyonunu uyardı. C13 ise agonist ya da antagonist uygulaması fark etmeksizin ABCB1 ifadesini yüksek tutma eğilimi sergiledi. Bu veri özelinde de, tıpkı BCL2A1 ve GSTP1 için önerilen; oksidatif strese bağlı hücrelerin koruyucu mekanizmalarını arttırması durumunun geçerli olabileceği uygun görüldü. Destekler biçimde, literatürde oksidatif strese ve ABCB1 up-regülasyonu ilişkisini ortaya koyan benzer görüşler de halihazırda yer almaktadır. Buna göre, ABCB1'in ifadesinin

ROS'lara bağlı olarak yükselebileceği ve bu durumun kanserde MDR mekanizmalarının bir parçası olabileceği gösterilmektedir (Callaghan ve ark., 2013; Kuo 2009). Dolayısıyla, over kanseri hücrelerinde oksidize yapıdaki antagonist uygulamaları ile sağlanan kemodirenç ilgili genlerdeki ifade artışıının TLR1/2 ve ilgili sinyal yolaklarından bağımsız bir şekilde gerçekleşmiş olma ihtimali de bulunmaktadır.



5- SONUÇ ve ÖNERİLER

TLR'ler, doğal ve adaptif bağışıklıkta önemli roller üstlenen yapılardır. Özellikle, vücuda giren patojenlere ait molekülleri tanıyarak bu organizmalara karşı bir immün yanıt oluşturulmasını sağlamaktadır. Bir diğer faaliyetleri ise kanser hücrelerinin vücuttan eliminasyonuna yardımcı olmaktır. Kanser gelişiminin olduğu bölgelerde “alarmin” adı verilen hasar ilişkili moleküllerin artışı, immün hücrelerde ifade olan TLR'lerin uyarılmasına neden olmaktadır. Dolayısıyla, ilişkili sinyal yollarının aktivasyonu ile birlikte, savunma hücreleri aracılığıyla pro-inflamatuvar sitokinlerin ekstraselüler ortama salınımı da büyük ölçüde kolaylaşmaktadır. Özetlemek gerekirse, organizma içerisinde eşsiz bir rol üstlenen bu proteinlerin, patojen ilişkili enfeksiyonların veya karsinogenezin önlenmesi ve iyileştirilmesi konusunda önemi büyüktür. Bu doğrultuda, halihazırda TLR7 ve TLR8 agonisti imiquimod, kullanımı deri tümörleri ve deri altı metastazlarında Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylı bir sentetik ligandır (Bubna, 2015). Ayrıca, çeşitli solid tümörlerinde, küçük hücreli akciğer, kolorektal ve over kanserlerinde tedaviye yönelik klinik faz çalışmaları için, immün kontrol noktası inhibitörlerine ek olarak TLR3, -4, -7, -8 ve -9'u aktive eden agonist moleküllerinin etkinlikleri de test edilmekte ve özgün TLR odaklı stratejilerin geliştirilmesi amaçlanmaktadır (Braunstein ve ark., 2018).

Ancak son yıllarda, immünite açısından önemli fonksiyonları bildirilen TLR'lerin, çeşitli hastalıkların seyrinde olumsuz etkilere sahip olabileceği de vurgulanmaktadır. Örneğin; TLR1 ve TLR6 ile heterodimerik bir kompleks oluşturan TLR2'nin romatoid artrit, tip I diyabet, inflamatuvar bağırsak hastalığı, iskemi-reperfüzyon hasarı ve ateroskleroz ile ilişki olduğu ortaya koyulmaktadır (Jazierska ve ark., 2017). Bu durum, bazı oto-immün hastalıkların gelişiminde ve sürdürülmesinde TLR'lerin de rol alabileceği izleminin doğrulamaktadır. Bu reseptörlerle bağdaştırılan bir diğer olgu ise kanser progresyonudur. Normal şartlarda, anti-tümör etkili mekanizmaları hassas biçimde düzenleyen TLR'lerin, tümör mikroçevresinde (TME) pro-inflamatuvar sitokinlerin ve büyüme faktörlerinin salınımına yardımcı olarak tam tersi biçimde tümör gelişimini arttırabileceğine dikkat çekilmektedir (Rakoff-Nahoum ve Medzhitov, 2008). Bilim insanları tarafından bu sorun,

TLR'lerin immünoşüpresif mekanizmaları regüle ederek anti-tümör faaliyetleri bulunan lökositleri inaktif etmesi ve kronik inflamasyona sebep olan elementlerin TME'de yoğun biçimde bulunmasını sağlamasıyla ilişkilendirilmektedir (Lu ve ark., 2019). Böylece TLR'lerin, modölatör etkilerini immün hücreler üzerinde gösteremediği, hatta tümör hücreleri için proliferasyon ve metastaz ile ilişkili molekül sekresyonunu indükledikleri bildirilmektedir. Tüm sonuçlar değerlendirildiğinde literatür, kanser hastalığında Toll-benzeri reseptörler için "iki ucu keskin bıçak" tanımını yakıştırmaktadır (Basith ve ark., 2012). TLR'lerin, progresyonunda etkin bir rol üstlendiği bir diğer hastalık ise over kanseridir. Bu kanserin gelişiminde önemli bir risk faktörü olarak tanımlanan kronik inflamasyon (Savant ve ark., 2018), ayrıca bu proteinler ile de ilişkilendirilmektedir (Joosten ve ark., 2016). TME'ye infiltre olan savunma hücrelerinde immünoşüpresif sitokinlerin, anjiyogenez, proliferasyon ve metastaz ile ilişkili moleküllerin ifadesi kronik inflamasyona ve pro-tümörijenik sinyal iletimine yol açmaktadır (Muccioli ve ark., 2012). Bununla beraber, immün hücrelerin dışında over kanseri hücreleri de TLR eksprese edebilmekte ve bu yapıları kendi gelişimlerini yönetmede kullanabilmektedir. Tez çalışmasının giriş kısmında da belirtildiği gibi; TLR -2, -3, -4 ve -5 ekspresyonu over kanseri hücrelerinde yoğun şekilde var olurken, TLR -4, -5, -7 ve -9'un kanser gelişimine fonksiyonel olarak etki edebildikleri kanıtlanmıştır. Bununla beraber, literatürde halen TLR ve over kanseri ilişkisini inceleyen orijinal çalışmaların eksikliği dikkat çekmektedir.

Plazma membranında lokalize olan TLR1 ve TLR2, lipopeptid molekülleri ile karşılaştıklarında TLR1/2 olarak adlandırılan heterodimerik bir kompleks yapısı oluşturmaktadır. Bu dimerizasyon, sinyal iletim yollarında bulunan diğer proteinlerin aktivasyonunu uyarmak için yeterlidir. TLR1/2 ve ilişkili hücresel yollarının analizini içeren birçok çalışma, *in vitro* ve *in vivo* deneylerde reseptör uyarımının sentetik triaçil lipopeptidlerle uygun şekilde sağlanabileceğini ortaya koymaktadır (Jin ve ark., 2007). Bu moleküllerin dahil olduğu çalışmalar, immün hücrelerde gözlemlenen anti-tümör davranışları hakkında çeşitli raporlar sunmaktadır. Örneğin; Cen ve arkadaşları (2019), lösemili fare modelinde bir TLR1/2 agonisti kullanımı ile sitotoksik T hücresi ve NK hücresi proliferasyonunun uyarılabildiğine ve bu sayede tümörlerin ortadan kaybolduğuna vurgu

yapmaktadır. Benzer şekilde, Pam3CSK4, melanomalı farelerde Treg adı verilen regülatör T hücrelerinin, sitotoksik lenfositler üzerindeki süpresif etkilerini baskılayabilmektedir (Sharma ve ark., 2019). Aynı zamanda, hücrelerin antijen sunma kapasitesini arttırmakta (Liu ve ark., 2013) ve adjuvan terapisi için siklik dinükleotidler ile birlikte immün yanıt oluşumunu sağlayarak (Hu ve ark., 2020) anti-tümör etkili lökositleri etkinleştirilebilmektedir. Bu bilgiler bir kenara, lipopeptidler ve TLR1/2 sinyal yolları için önerilen başka bir mekanizma, çeşitli tümör hücrelerinde ifade edildiğinde terapötik etkilerinin aksine pro-karsinojenik faaliyetlerde yer almalarıyla ilişkilidir. Örneğin: adrenokortikal karsinomda IL-8 üretimini sağlamak maksadıyla (Kanczkowski ve ark., 2007), akciğer adenokarsinom ve adenoskuamöz hücrelerinde proliferatif sinyal oluşumu yardımıyla (Gergen ve ark., 2020) ve gliomada migrasyon ile bağlantılı metalloproteazların up-regülasyonu (Wang ve ark., 2015) karsinogenezi önemli ölçüde arttırmaktadır. Ayrıca, lenfoma ve kolon kanseri hücre hatlarında da benzer sonuçlar ön plana çıkmaktadır (Mastorci ve ark., 2016; Liu ve ark., 2018). Bu yüzden TLR1/2'nin immün yanıt kadar, tümör gelişiminde de önemli roller oynayabileceğini belirtmek kaçınılmazdır.

Bu tez çalışmasında ise, kadınlarda sık izlenen ve en ölümcül jinekolojik malignite olarak tanımlanan over kanserinin, TLR1/2 ile organize edebileceği potansiyel proliferatif sinyallerin ve kemodirenç mekanizmalarının aydınlatılması amaçlandı. Bu doğrultuda, OV2008 (kemoduyarlı) ve C13 (kemodirençli) adında iki farklı epitelyal over kanseri hücre hattında Pam3CSK4 adı verilen bir lipopeptid yardımıyla reseptör uyarımı sağlandı. MTT testleri ile reseptör aktivasyonunun proliferatif sinyal oluşumuna neden olabileceği gösterilirken, kemoduyarlı OV2008 geleneksel kemoterapi ajanı sisplatine karşı ligand kullanımı sonrası daha agresif bir davranış sergiledi. Böylelikle literatürde ayrı raporlarla gösterilen, TLR4'ün (Szajnik ve ark., 2009; Sun ve ark., 2018; Wang ve ark., 2013; Park ve ark., 2017), TLR5 ve TLR7'nin (Park ve Kim, 2017) ve TLR8'in (Xu ve ark., 2020) neden olduğu over kanserine spesifik pro-tümörijenik ve direnç ilişkili etkilerin benzer şekilde TLR1/2 ile de sağlanabileceği ortaya koyuldu. Bununla beraber tez çalışmasının sınırları özelinde, daha önce TLR1 ve TLR2'nin over epitel dokusunda lokalize olabileceği ve CAOv3 gibi hücre hatlarında sitokin sentezini sağlayabileceği gösterilmiş olsa da (Zhou ve

ark., 2009), OV2008 ve C13 hücrelerinde TLR1/2 ifadesini içeren protein ekspresyonu yöntemlerinin sunulması faydalı olacaktır (Eiro ve ark., 2014). Bir diğer nokta ise Pam3CSK4'ün bu reseptörlere olan afinitesi ile ilgilidir. Her ne kadar, TLR1/2'nin ve ilişkili sinyal yollarının diğer reseptörlerden farklı olarak Pam3CSK4'e olan spesifitesi, TLR2 knock-down edilen hücrelerde kanıtlanırsa da (Invivogen, 2020), agonist molekülünün bu komplekse bağlandığını ve iletim yollarını aktif ettiğini gösteren stratejiler (Rammensee ve ark., 2019) bu tez çalışmasıyla elde edilen verileri daha güçlü hale getirecektir. Ayrıca deney verileri incelendiğinde, OxPAPC ile TLR1/2 blokajının hücrelerin inhibisyonuna etki edebileceği de gösterildi. Bu durum, daha önce kolon kanseri hücre hatlarında benzer şekilde ortaya koyulduğundan beklenen bir sonuçtur (Liu ve ark., 2018). Bununla beraber, Gerçek-zamanlı PCR analizlerinde, ilaç direnci ile ilişkili genlerin TLR1/2 uyarımından daha güçlü biçimde, blokaj işlemiyle up-regüle olabileceği de tespit edildi. Blokaj durumunun etkisi için litetür taraması yapıldığında, bu antagonistin reseptör inaktivasyonu haricinde, kemodirenç davranışını oksidatif stres sebebiyle düzenleyebildiği anlaşıldı. Tez çalışmasında MTT verileri, antagonist muamelesi sonrası canlılığın önemli biçimde azaldığını halihazırda gösterirken, PCR analizlerinin sonucunda edinilen ilaç direnci ile ilişkili genlerin ekspresyonundaki artış, muhtemelen hücrelerin yoğun strese karşı hayatta kalma mekanizmalarını devreye sokması ile ilgili olabilecektir. Bu yüzden, gelecek çalışmalarda ilave olarak OxPAPC'nin sebep olduğu oksidatif stresin (Iuchi ve ark., 2019), OV2008 ve C13 hücre hatlarında da belirlenebilmesi (Belotte ve ark., 2014) ve ilgili genlere ait protein ekspresyonlarının bu koşullarda yorumlanması; TLR1/2 inaktivasyonu ve potansiyel ilaç direnci ile ilişkili mekanizmaların tutarlılığını destekleyecektir.

Sonuç olarak, MTT testlerinde ve Gerçek-zamanlı PCR verilerinde TLR1/2 aktivasyonun ve blokajının potansiyel over kanseri kemodirenç mekanizmalarına etki edebileceği bu çalışmayla sunulmuş oldu. Buradaki en önemli nokta, TLR1/2 aracılığıyla gerçekleşen spesifik mekanizmaların over kanserinde literatür için önemli referans bilgileri oluşturacağıdır.

6. KAYNAKLAR

- Abdi, J., Mutis, T., Garssen, J. ve Redegeld, F.A., 2013. Stimulation of Toll-like receptor-1/2 combined with Velcade increases cytotoxicity to human multiple myeloma cells. *Blood Cancer J*, 3 (5), e119.
- Abdi, J., Mutis, T., Garssen, J. ve Redegeld, F.A., 2014. Toll-like receptor (TLR)-1/2 triggering of multiple myeloma cells modulates their adhesion to bone marrow stromal cells and enhances bortezomib-induced apoptosis. *PLoS One*, 9 (5), e96608.
- Abdul-Cader M.S., Amarasinghe, A. ve Abdul-Careem, M.F., 2016. Activation of toll-like receptor signaling pathways leading to nitric oxide-mediated antiviral responses. *Arch Virol*, 161 (8), 2075-86.
- Abel, A.M., Yang, C., Thakar, M.S. ve Malarkannan, S., 2018. Natural Killer Cells: Development, Maturation, and Clinical Utilization. *Front Immunol*, 9, 1869.
- Agrawal, S. ve Gupta, S., 2011. TLR1/2, TLR7, and TLR9 signals directly activate human peripheral blood naive and memory B cell subsets to produce cytokines, chemokines, and hematopoietic growth factors. *J Clin Immunol*, 31 (1), 89-98.
- Akhdar, H., Legendre, C., Aninat, C. ve More, F., 2012. Anticancer Drug Metabolism: Chemotherapy Resistance and New Therapeutic Approaches, *Topics on Drug Metabolism*, James Paxton, IntechOpen.
- Al-Bedeary, S., Getta, H.A. ve Al-Sharafi, D., 2020. The hallmarks of cancer and their therapeutic targeting in current use and clinical trials. *Iraqi J Hematol*, 9, 1-10.
- Aldossary, S.A., 2019. Review on Pharmacology of Cisplatin: Clinical Use, Toxicity and Mechanism of Resistance of Cisplatin. *Biomed Pharmacol J*, 12 (1).
- Amarante-Mendes, G.P., Adjemian, S., Branco, L.M., Zanetti, L.C., Weinlich, R. ve Bortoluci, K.R., 2018. Pattern Recognition Receptors and the Host Cell Death Molecular Machinery. *Front Immunol*, 9, 2379.
- Amerikan Kanser Topluluğu, 2018. What is ovarian cancer?. The American Cancer Society medical and editorial content team, <https://www.cancer.org/cancer/ovarian-cancer/about/what-is-ovarian-cancer.html> (01.10.2020).
- Antony, R., Hardy, M. ve Bazan, N.G., 2005. Oxidative Stress Triggers the Expression of Bcl-2 Family Proteins in Retinal Pigment Epithelial Cells (RPE). *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 46, 5357.
- Arora, S., Ahmad, S., Irshad, R. ve ark., 2019. TLRs in pulmonary diseases. *Life Sci*, 233, 116671.
- Assis, J., Pereira, D., Nogueira, A. ve Medeiros, R., 2018. Ovarian Cancer Overview: Molecular Biology and Its Potential Clinical Application, *Ovarian Cancer - From Pathogenesis to Treatment*, Omer Devaja and Andreas Papadopoulos, IntechOpen, DOI: 10.5772/intechopen.73863.
- Aust, S. ve Seebacher-Shariat, V., 2020. Screening for ovarian cancer: is there still hope?. *memo13*, 189–192.
- Babaier, A. ve Ghatage, P., 2020. Mucinous Cancer of the Ovary: Overview and Current Status. *Diagnostics (Basel)*, 10 (1), 52.

- Bandera, C.A., 2005. Advances in the understanding of risk factors for ovarian cancer. *J Reprod Med*, 50 (6), 399-406.
- Basith, S., Manavalan, B., Yoo, T.H., Kim, S.G. ve Choi, S., 2012. Roles of toll-like receptors in cancer: a double-edged sword for defense and offense. *Arch Pharm Res*, 35 (8), 1297-316.
- Basu, A. ve Krishnamurthy, S., 2010. Cellular responses to Cisplatin-induced DNA damage. *J Nucleic Acids*, 2010, 201367.
- Begicevic, R.R. ve Falasca, M., 2017. ABC Transporters in Cancer Stem Cells: Beyond Chemoresistance. *Int J Mol Sci*, 18 (11), 2362.
- Bell, J.K., Mullen, G.E., Leifer, C.A., Mazzoni, A., Davies, D.R. ve Segal, D.M., 2003. Leucine-rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors. *Trends Immunol*, 24 (10), 528-33.
- Belotte, J., Fletcher, N.M., Awonuga, A.O., Alexis, M., Abu-Soud, H.M., Saed, M.G., Diamond, M.P. ve Saed, G.M., 2014. The role of oxidative stress in the development of cisplatin resistance in epithelial ovarian cancer. *Reproductive sciences (Thousand Oaks, Calif.)*, 21(4), 503–508.
- Berger, R., Fiegl, H., Goebel, G., Obexer, P., Ausserlechner, M., Doppler, W., Hauser-Kronberger, C., Reitsamer, R., Egle, D., Reimer, D., Müller-Holzner, E., Jones, A. ve Widschwendter M., 2010. Toll-like receptor 9 expression in breast and ovarian cancer is associated with poorly differentiated tumors. *Cancer Sci*, 101 (4), 1059-66.
- Bhatelia, K., Singh, K. ve Singh, R., 2014. TLRs: linking inflammation and breast cancer. *Cell Signal*, 26 (11), 2350-7.
- BioRender, 2020. *BioRender: "Created with BioRender.com", BioRender: Create Professional Science Figures in Minutes*. <https://biorender.com> (10.10.2020).
- Blikslager, A.T., Moeser, A.J., Gookin, J.L., Jones, S.L. ve Odle, J., 2007. Restoration of barrier function in injured intestinal mucosa. *Physiol Rev*, 87 (2), 545-64.
- Block, M.S., Vierkant, R.A., Rambau, P.F., Winham, S.J., Wagner, P., Traficante, N., Toloczko, A., Tiezzi, D.G., Taran, F.A., Sinn, P., Sieh, W., Sharma, R., Rothstein, J.H., Ramón Y Cajal, T., Paz-Ares, L., Oszurek, O., Orsulic, S., Ness, R.B., Nelson, G., Modugno, F., Menkiszak, J., McGuire, V., McCauley, B.M., Mack, M., Lubiński, J., Longacre, T.A., Li, Z., Lester, J., Kennedy, C.J., Kalli, K.R., Jung, A.Y., Johnatty, S.E., Jimenez-Linan, M., Jensen, A., Intermaggio, M.P., Hung, J., Herpel, E., Hernandez, B.Y., Hartkopf, A.D., Harnett, P.R., Ghatage, P., García-Bueno, J.M., Gao, B., Fereday, S., Eilber, U., Edwards, R.P., de Sousa, C.B., de Andrade, J.M., Chudecka-Głaz, A., Chenevix-Trench, G., Cazorla, A., Brucker, S.Y.; Australian Ovarian Cancer Study Group, Alsop, J., Whittemore, A.S., Steed, H., Staebler, A., Moysich, K.B., Menon, U., Koziak, J.M., Kommoss, S., Kjaer, S.K., Kelemen, L.E., Karlan, B.Y., Huntsman, D.G., Høgdall, E., Gronwald, J., Goodman, M.T., Gilks, B., García, M.J., Fasching, P.A., de Fazio, A., Deen, S., Chang-Claude, J., Candido Dos Reis, F.J., Campbell, I.G., Brenton, J.D., Bowtell, D.D., Benítez, J., Pharoah, P.D.P., Köbel, M., Ramus, S.J., Goode, E.L., 2018. MyD88 and TLR4 Expression in Epithelial Ovarian Cancer. *Mayo Clin Proc*, 93 (3), 307-320.
- Blüml, S., Kirchberger, S., Bochkov, V.N., Krönke, G., Stuhlmeier, K., Majdic, O., Zlabinger, G.J., Knapp, W., Binder, B.R., Stöckl, J. ve Leitinger, N., 2005. Oxidized

- phospholipids negatively regulate dendritic cell maturation induced by TLRs and CD40. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950), 175 (1), 501–508.
- Botos, I., Segal, D.M. ve Davies, D.R., 2011. The structural biology of Toll-like receptors. *Structure*, 19 (4), 447-59.
- Bouchard-Fortier, G., Panzarella, T., Rosen, B., Chapman, W. ve Gien, L.T., 2017. Endometrioid Carcinoma of the Ovary: Outcomes Compared to Serous Carcinoma After 10 Years of Follow-Up. *J Obstet Gynaecol Can*, 39 (1), 34-41.
- Bowtell, D.D., Böhm, S., Ahmed, A.A. ve ark., 2015. Rethinking ovarian cancer II: reducing mortality from high-grade serous ovarian cancer. *Nat Rev Cancer*, 15 (11), 668-679.
- Braunstein, M.J., Kucharczyk, J. ve Adams, S., 2018. Targeting Toll-Like Receptors for Cancer Therapy. *Targ Oncol*, 13, 583–598.
- Bryant, C.E., Gay, N.J., Heymans, S., Sacre, S., Schaefer, L. ve Midwood, K.S., 2015. Advances in Toll-like receptor biology: Modes of activation by diverse stimuli. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 50 (5), 359-79.
- Bubna A.K., 2015. Imiquimod - Its role in the treatment of cutaneous malignancies. *Indian journal of pharmacology*, 47 (4), 354–359.
- Buchta, C.M. ve Bishop, G.A., 2014. Toll-like receptors and B cells: functions and mechanisms. *Immunol Res*, 59, 12–22.
- Bukowski, K., Kciuk, M. ve Kontek, R., 2020. Mechanisms of Multidrug Resistance in Cancer Chemotherapy. *Int J Mol Sci*, 21 (9), 3233.
- Cacan, E., Mourad, A.W., Boyd, N.H., Hooks S.B. ve Greer, S.F., 2014. Inhibition of HDAC1 and DNMT1 Modulate RGS10 Expression and Decrease Ovarian Cancer Chemoresistance. *Plos One*, 9 (1), 87455.
- Callaghan, R., Crowley, E., Potter, S. ve Kerr, I.D., 2008. P-glycoprotein: so many ways to turn it on. *Journal of clinical pharmacology*, 48 (3), 365–378.
- Cen, X., Zhu, G., Yang, J., Yang, J., Guo, J., Jin, J., Nandakumar, K. S., Yang, W., Yin, H., Liu, S. ve Cheng, K., 2019. TLR1/2 Specific Small-Molecule Agonist Suppresses Leukemia Cancer Cell Growth by Stimulating Cytotoxic T Lymphocytes. *Advanced science* (Weinheim, Baden-Wurttemberg, Germany), 6 (10), 1802042.
- Cen, X., Liu, S. ve Cheng, K., 2018. The Role of Toll-Like Receptor in Inflammation and Tumor Immunity. *Front Pharmacol*, 9, 878.
- Charbonneau, B., Goode, E.L., Kalli, K.R., Knutson, K.L. ve Derycke, M.S., 2013. The immune system in the pathogenesis of ovarian cancer. *Crit Rev Immunol*, 33 (2), 137-164.
- Chefetz, I., Alvero, A.B., Holmberg, J.C. ve ark., 2013. TLR2 enhances ovarian cancer stem cell self-renewal and promotes tumor repair and recurrence. *Cell Cycle*, 12 (3), 511-521.
- Cheung, A., Gong, M., Bellanti, R., ve ark., 2018. Cancer antigen-125 and risk of atrial fibrillation: a systematic review and meta-analysis. *Heart Asia*, 10 (1), e010970.
- Cicenas, J., Zalyte, E., Rimkus, A., Dapkus, D., Noreika, R. ve Urbonavicius, S., 2017. JNK, p38, ERK, and SGK1 Inhibitors in Cancer. *Cancers* (Basel), 10 (1), 1.
- Collaborative Group on Epidemiological Studies of Ovarian Cancer, Beral, V., Gaitskell, K., ve ark., 2012. Ovarian cancer and smoking: individual participant meta-analysis

- including 28,114 women with ovarian cancer from 51 epidemiological studies. *Lancet Oncol*, 13 (9), 946-956.
- Colvin, E.K. ve Howell, V.M., 2020. Why the dual origins of high grade serous ovarian cancer matter. *Nat Commun*, 11 (1), 1200.
- Cortez, A.J., Tudrej, P., Kujawa, K.A. ve Lisowska, K.M., 2018. Advances in ovarian cancer therapy. *Cancer Chemother Pharmacol*, 81 (1), 17-38.
- Coussens, L.M. ve Werb, Z., 2002. Inflammation and cancer. *Nature*, 420 (6917), 860 -867.
- Czabotar, P.E., Lessene, G., Strasser, A. ve Adams, J.M., 2014. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15 (1), 49-63.
- Daimon, A., Fujiwara, S., Tanaka, Y. ve ark., 2019. A rare case of ovarian carcinosarcoma with squamous cell carcinoma. *J Ovarian Res*, 12, 32.
- Dasari, S. ve Tchounwou, P.B., 2014. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol*, 740, 364-378.
- Deng, Y., Yang, J., Qian, J., Liu, R., Huang, E., Wang, Y., Luo, F. ve Chu, Y., 2019. TLR1/TLR2 signaling blocks the suppression of monocytic myeloid-derived suppressor cell by promoting its differentiation into M1-type macrophage. *Mol Immunol*, 112, 266-273.
- Di Lorenzo, G., Ricci, G., Severini, G.M., Romano, F. ve Biffi, S., 2018. Imaging and therapy of ovarian cancer: clinical application of nanoparticles and future perspectives. *Theranostics*, 8 (16), 4279-4294.
- Du, B., Jiang, Q.L., Cleveland, J., Liu, B.-R. ve Zhang, D., 2016. Targeting Toll-like receptors against cancer. *Journal of Cancer Metastasis and Treatment*, 2 (12), 463.
- Duffy, L. ve O'Reilly, S.C., 2016. Toll-like receptors in the pathogenesis of autoimmune diseases: recent and emerging translational developments. *Immunotargets Ther*, 5, 69-80.
- Duska, L.R. ve Kohn, E.C., 2017. The new classifications of ovarian, fallopian tube, and primary peritoneal cancer and their clinical implications. *Ann Oncol*, 28 (suppl_8), viii8-viii12.
- Eiró, N., Altadill, A., Juárez, L.M., Rodríguez, M., González, L.O., Atienza, S., Bermúdez, S., Fernandez-Garcia, B., Fresno-Forcelledo, M.F., Rodrigo, L. ve Vizoso, F.J. 2014. Toll-like receptors 3, 4 and 9 in hepatocellular carcinoma: Relationship with clinicopathological characteristics and prognosis. *Hepatology research : the official journal of the Japan Society of Hepatology*, 44 (7), 769–778.
- El-Zayat, S.R., Sibaii, H. ve Mannaa, F.A., 2019. Toll-like receptors activation, signaling, and targeting: an overview. *Bull Natl Res Cent*, 43, 187.
- Elmore, S., 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*, 35 (4), 495-516.
- Erridge, C., Kennedy, S., Spickett, C.M. ve Webb, D.J., 2008. Oxidized phospholipid inhibition of toll-like receptor (TLR) signaling is restricted to TLR2 and TLR4: roles for CD14, LPS-binding protein, and MD2 as targets for specificity of inhibition. *J Biol Chem*, 283 (36), 24748-24759.

- Fabbri, M., Paone, A., Calore, F. ve ark., MicroRNAs bind to Toll-like receptors to induce prometastatic inflammatory response. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109 (31), E2110-E2116.
- Faber, M.T., Kjær, S.K., Dehlendorff, C., ve ark., 2013. Cigarette smoking and risk of ovarian cancer: a pooled analysis of 21 case-control studies. *Cancer Causes Control*. 24 (5), 989-1004.
- Feng, Q., Li, X., Sun, W., Sun, M., Li, Z., Sheng, H., Xie, F., Zhang, S. ve Shan, C., 2020. Targeting G6PD reverses paclitaxel resistance in ovarian cancer by suppressing GSTP1. *Biochem Pharmacol*, 178, 114092.
- Fore, F., Indriputri, C., Mamutse, J. ve Nugraha, J., TLR10 and Its Unique Anti-Inflammatory Properties and Potential Use as a Target in Therapeutics. *Immune Netw*, 20 (3), e21.
- Frank, M., Hennenberg, E.M., Eyking, A., Rünzi, M., Gerken, G., Scott, P., Parkhill, J., Walker, A.W. ve Cario, E., 2015. TLR signaling modulates side effects of anticancer therapy in the small intestine. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 194 (4), 1983–1995.
- Freimund, A.E., Beach, J.A., Christie, E.L. ve Bowtell, D.D.L., 2018. Mechanisms of Drug Resistance in High-Grade Serous Ovarian Cancer. *Hematol Oncol Clin North Am*, 32 (6), 983-996.
- Fujiwara, K., Shintani, D. ve Nishikawa, T., 2016. Clear-cell carcinoma of the ovary. *Ann Oncol*, 1, i50-i52.
- Funderburg, N.T., Jadowsky, J.K., Lederman, M.M., Feng, Z., Weinberg, A. ve Sieg, S.F., 2011. The Toll-like receptor 1/2 agonists Pam(3) CSK(4) and human β -defensin-3 differentially induce interleukin-10 and nuclear factor- κ B signalling patterns in human monocytes. *Immunology*, 134 (2), 151–160.
- Gadducci, A. ve Cosio, S., 2020. Therapeutic Approach to Low-Grade Serous Ovarian Carcinoma: State of Art and Perspectives of Clinical Research. *Cancers (Basel)*, 12 (5), 1336.
- Gaitskell, K., Green, J., Pirie, K., Barnes, I., Hermon, C., Reeves, G.K. ve Beral, V., 2018. Million Women Study Collaborators. Histological subtypes of ovarian cancer associated with parity and breastfeeding in the prospective Million Women Study. *Int J Cancer*, 142 (2), 281-289.
- Gangloff, M., 2012. Different dimerisation mode for TLR4 upon endosomal acidification?. *Trends Biochem Sci*, 37 (3), 92-98.
- Gao, B., Yang, F., Chen, W., Li, R., Hu, X., Liang, Y. ve Li, D., 2019. Multidrug resistance affects the prognosis of primary epithelial ovarian cancer. *Oncol Lett*, 18 (4), 4262-4269.
- García-Aranda, M., Pérez-Ruiz, E. ve Redondo, M., 2018. Bcl-2 Inhibition to Overcome Resistance to Chemo- and Immunotherapy. *Int J Mol Sci*, 19 (12), 3950.
- Gasteiger, G., D'Oswaldo, A., Schubert, D.A., Weber, A., Bruscia, E.M. ve Hartl, D., 2017. Cellular Innate Immunity: An Old Game with New Players. *J Innate Immun*, 9 (2), 111-125.
- Gay, N., Symmons, M., Gangloff, M., ve ark., 2014. Assembly and localization of Toll-like receptor signalling complexes. *Nat Rev Immunol*, 14, 546–558.

- Gergen, A.K., Kohtz, P.D., Halpern, A.L., Li, A., Meng, X., Reece, T.B., Fullerton, D.A. ve Weyant, M.J., 2020. Activation of Toll-Like Receptor 2 Promotes Proliferation of Human Lung Adenocarcinoma Cells. *Anticancer research*, 40(10), 5361–5369.
- GLOBOCAN, 2018. *GLOBOCAN 2018: estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2018*. World Health Organization International Agency for Research on Cancer (IARC). <https://gco.iarc.fr/today/home> (01.10.2020).
- Godfroy, J.I.3rd., Roostan, M., Moroz, Y.S., Korendovych, I.V. ve Yin, H., 2012. Isolated Toll-like receptor transmembrane domains are capable of oligomerization. *PLoS One*. 7 (11), e48875.
- Gonzalez, H., Hagerling, C. ve Werb, Z., Roles of the immune system in cancer: from tumor initiation to metastatic progression. *Genes Dev*, 32 (19-20), 1267-1284.
- Guo, Q. ve Zhang, C., 2012. Critical role of Toll-like receptor signaling in NK cell activation. *Chin. Sci. Bull*, 57, 3192–3202.
- Gupta, D. ve Lis, C.G., 2009. Role of CA125 in predicting ovarian cancer survival - a review of the epidemiological literature. *J Ovarian Res*, 2, 13.
- Gupta, K.K., Gupta, V.K. ve Naumann, R.W., 2019. Ovarian cancer: screening and future directions. *Int J Gynecol Cancer*, 29 (1), 195-200.
- Hayes, J.D., Dinkova-Kostova, A.T. ve Tew, K.D., 2020. Oxidative Stress in Cancer. *Cancer Cell*, 38 (2), 167-197.
- Helm, C.W. ve States, J.C., 2009. Enhancing the efficacy of cisplatin in ovarian cancer treatment - could arsenic have a role. *Journal of ovarian research*, 2, 2.
- Hilal, Z., Schultheis, B., Hartmann, F., Dogan, A., Cetin, C., Krentel, H., Schiermeier, S. ve Tempfer, C.B., 2016. What Characterizes Long-term Survivors of Recurrent Ovarian Cancer? Case Report and Review of the Literature. *Anticancer Res*, 36 (10), 5365-5371.
- Hope, R.M., 2013. Rmisc: Rmisc: Ryan Miscellaneous. R package version 1.5, <https://CRAN.R-project.org/package=Rmisc>.
- Hothorn, T., Bretz, F. ve Westfall P., 2008. Simultaneous inference in general parametric models. *Biom J*, 50 (3), 346-63.
- Housman G, Byler S, Heerboth S, et al. Drug resistance in cancer: an overview. *Cancers (Basel)*, 6 (3), 1769-1792.
- Hu, H.G., Wu, J.J., Zhang, B.D., Li, W. H. ve Li, Y.M., 2020. Pam3CSK4-CDGSF Augments Antitumor Immunotherapy by Synergistically Activating TLR1/2 and STING. *Bioconjugate chemistry*, 31 (11), 2499–2503.
- Hua, Z. ve Hou, B., 2013. TLR signaling in B-cell development and activation. *Cell Mol Immunol*, 10, 103–106.
- Huang, Y., Fu, Z., Dong, W., Zhang, Z., Mu, J. ve Zhang, J., 2018. Serum starvation-induces down-regulation of Bcl-2/Bax confers apoptosis in tongue coating-related cells in vitro. *Molecular medicine reports*, 17 (4), 5057–5064.
- Hug, H., Mohajeri, M.H. ve La Fata, G., 2018. Toll-Like Receptors: Regulators of the Immune Response in the Human Gut. *Nutrients*, 10 (2), 203.
- Hunn, J. ve Rodriguez, G.C., 2012. Ovarian cancer: etiology, risk factors, and epidemiology. *Clin Obstet Gynecol*, 55 (1), 3-23.

- Husseinzadeh, N. ve Davenport, S.M., 2014. Role of toll-like receptors in cervical, endometrial and ovarian cancers: a review. *Gynecol Oncol*, 135 (2), 359-63.
- Invivogen, 2020. Pam3CSK4 and OxPAPC TDS Files. <https://www.invivogen.com/pam3csk4>; <https://www.invivogen.com/oxpapc> (01.12.2020)
- Ishii, K.J., Uematsu, S. ve Akira, S., 2006. 'Toll' gates for future immunotherapy. *Curr Pharm Des*, 12 (32), 4135-42.
- Iuchi, K., Ema, M., Suzuki, M., Yokoyama, C. ve Hisatomi, H., 2019. Oxidized unsaturated fatty acids induce apoptotic cell death in cultured cells. *Mol Med Rep*, 19 (4), 2767-2773.
- Javadi, S., Ganeshan, D.M., Qayyum, A., Iyer, R.B. ve Bhosale, P., 2016. Ovarian Cancer, the Revised FIGO Staging System, and the Role of Imaging. *AJR Am J Roentgenol*, 206 (6), 1351-60.
- Jezierska, A., Kolosova, I.A. ve Verin, A.D., 2011. Toll Like Receptors Signaling Pathways as a Target for Therapeutic Interventions. *Current signal transduction therapy*, 6 (3), 428-440.
- Jiménez-Dalmaroni, M.J., Gerswhin, M.E. ve Adamopoulos, I.E., 2016. The critical role of toll-like receptors--From microbial recognition to autoimmunity: A comprehensive review. *Autoimmun Rev*, 15 (1), 1-8.
- Jin, M.S., Kim, S.E., Heo, J.Y., Lee, M.E., Kim, H.M., Paik, S.G., Lee, H. ve Lee, J.O., 2007. Crystal structure of the TLR1-TLR2 heterodimer induced by binding of a tri-acylated lipopeptide. *Cell*, 130 (6), 1071-1082.
- Jin, B., Sun, T., Yu, X.H., Yang, Y.X. ve Yeo, A.E., 2012. The effects of TLR activation on T-cell development and differentiation. *Clin Dev Immunol*, 2012, 836485.
- Jin, M.S. ve Lee, J.O., 2008. Structures of the toll-like receptor family and its ligand complexes. *Immunity*, 29 (2), 182-91.
- Joosten, L., Abdollahi-Roodsaz, S., Dinarello, C.A., O'Neill, L. ve Netea, M.G., 2016. Toll-like receptors and chronic inflammation in rheumatic diseases: new developments. *Nat Rev Rheumatol*, 12, 344-357.
- Kaldawy, A., Segev, Y., Lavie, O., Auslender, R., Sopik, V. ve Narod, S.A., 2016. Low-grade serous ovarian cancer: A review. *Gynecol Oncol*, 143 (2), 433-438.
- Kalluri, R., Weinberg, R.A., 2010. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Inves*, 119 (6), 1420-1428.
- Kanczkowski, W., Morawietz, H., Ziegler, C.G., Funk, R.H., Schmitz, G., Zacharowski, K., Mohn, C.E., Ehrhart-Bornstein, M. ve Bornstein, S.R., 2007. Pam3CSK4 and LTA-TLRs ligands associated with microdomains induce IL8 production in human adrenocortical cancer cells. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et métabolisme*, 39 (6), 457-460.
- Kanwal, R., Pandey, M., Bhaskaran, N., MacLennan, G.T., Fu, P., Ponsky, L.E. ve Gupta, S., 2014. Protection against oxidative DNA damage and stress in human prostate by glutathione S-transferase P1. *Molecular carcinogenesis*, 53(1), 8-18.
- Kassambara, A., 2020. ggpubr: 'ggplot2' Based Publication Ready Plots. R package version 0.3.0, <https://CRAN.R-project.org/package=ggpubr>.
- Kawasaki, T. ve Kawai, T., 2014. Toll-like receptor signaling pathways. *Front Immunol*, 25 (5), 461.

- Kelly, M.G., Alvero, A.B., Chen, R., Silasi, D.A., Abrahams, V.M., Chan, S., Visintin, I., Rutherford, T. ve Mor, G., 2006. TLR-4 signaling promotes tumor growth and paclitaxel chemoresistance in ovarian cancer. *Cancer Res*, 66 (7), 3859-68.
- Kenda Suster, N. ve Virant-Klun., 2019. I. Presence and role of stem cells in ovarian cancer. *World J Stem Cells*, 11 (7), 383-397.
- Kim, H.J., Lee, H.M., Kim, M.K. ve ark., 2017. Prognostic assessment of sarcomatous histologic subtypes of ovarian carcinosarcoma. *Obstet Gynecol Sci*, 60 (4), 350-356.
- Kim, J., Durai, P., Jeon, D., Jung, I. D., Lee, S. J., Park, Y. M., ve Kim, Y., 2018. Phloretin as a Potent Natural TLR2/1 Inhibitor Suppresses TLR2-Induced Inflammation. *Nutrients*, 10 (7), 868.
- Kolwijck, E., Zusterzeel, P.L., Roelofs, H.M., Hendriks, J.C., Peters, W.H. ve Massuger, L.F., 2009. GSTP1-1 in ovarian cyst fluid and disease outcome of patients with ovarian cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 18 (8), 2176-81.
- Koshiyama, M., Matsumura ve N., Konishi, I., 2017. Subtypes of Ovarian Cancer and Ovarian Cancer Screening. *Diagnostics (Basel)*, 7 (1), 12.
- Koshiyama, M., Matsumura, N. ve Konishi, I., 2014. Recent concepts of ovarian carcinogenesis: type I and type II. *Biomed Res Int*, 2014, 934261.
- Kurman, R.J. ve Shih, I., 2008. Pathogenesis of ovarian cancer: lessons from morphology and molecular biology and their clinical implications. *Int J Gynecol Pathol*, 27 (2), 151-160.
- Kurman, R.J., Carcangiu, M.L., Herrington, C.S. ve Young, R.H., 2014. WHO Classification of Tumours of Female Reproductive Organs. WHO, 4 (6), 307-316.
- Kurman, R.J., Shih, I., 2010. The origin and pathogenesis of epithelial ovarian cancer: a proposed unifying theory. *Am J Surg Pathol*, 34 (3), 433-43.
- Kuo M.T., 2009. Redox regulation of multidrug resistance in cancer chemotherapy: molecular mechanisms and therapeutic opportunities. *Antioxidants & redox signaling*, 11 (1), 99–133.
- Laborde, E., 2010. Glutathione transferases as mediators of signaling pathways involved in cell proliferation and cell death. *Cell Death Differ*, 17, 1373–1380.
- Larsson, P., Engqvist, H., Biermann, J., Werner Rönnerman, E., Forssell-Aronsson, E., Kovács, A., Karlsson, P., Helou, K. ve Parris, T.Z., 2020. Optimization of cell viability assays to improve replicability and reproducibility of cancer drug sensitivity screens. *Sci Rep*. 10 (1), 5798.
- Latha, T.S., Panati, K., Gowd, D.S.K, Reddy, M.C., ve Lomada, D., 2014. Ovarian Cancer Biology and Immunotherapy, *International Reviews of Immunology*, 33 (5), 428-440.
- Lawrenson, K. ve Gayther, S.A., 2009. Ovarian cancer: a clinical challenge that needs some basic answers. *PLoS Med*, 6 (2), e25.
- Leifer, C.A. ve Medvedev, A.E., 2016. Molecular mechanisms of regulation of Toll-like receptor signaling. *J Leukoc Biol*, 100 (5), 927-941.
- Lengyel, E., 2010. Ovarian cancer development and metastasis. *Am J Pathol*, 177 (3), 1053-64.
- Li, R., Chen, W., Yanes, R., Lee, S. ve Berliner, J.A., 2007. OKL38 is an oxidative stress response gene stimulated by oxidized phospholipids. *Journal of lipid research*, 48 (3), 709–715.

- Li, M., Song, L., Gao, X., Chang, W. Qin, X., 2012. Toll-like receptor 4 on islet β cells senses expression changes in high-mobility group box 1 and contributes to the initiation of type 1 diabetes. *Exp Mol Med*, 44 (4), 260-7.
- Li, X., Jiang, S. ve Tapping, R.I., 2010. Toll-like receptor signaling in cell proliferation and survival. *Cytokine*, 49 (1), 1-9.
- Li, T.T., Ogino, S. ve Qian, Z.R., 2014. Toll-like receptor signaling in colorectal cancer: carcinogenesis to cancer therapy. *World journal of gastroenterology*, 20 (47), 17699–17708.
- Liao, D., Zhang, W., Gupta, P. ve ark., 2019. Tetrandrine Interaction with ABCB1 Reverses Multidrug Resistance in Cancer Cells Through Competition with Anti-Cancer Drugs Followed by Downregulation of ABCB1 Expression. *Molecules*, 24 (23), 4383.
- Lin, Y.T., Verma, A. ve Hodgkinson, C.P., 2012. Toll-like receptors and human disease: lessons from single nucleotide polymorphisms. *Curr Genomics*, 13 (8), 633-645.
- Liu, G. ve Zhao, Y., 2007. Toll-like receptors and immune regulation: their direct and indirect modulation on regulatory CD4+ CD25+ T cells. *Immunology*, 122 (2), 149-156.
- Liu, T., Zhang, L., Joo, D. ve ark., NF- κ B signaling in inflammation. *Sig Transduct Target Ther*, 2, 17023.
- Liu, Y.D., Ji, C.B., Li, S.B., Yan, F., Gu, Q.S., Balic, J.J., Yu, L. ve Li, J.K., 2018. Toll-like receptor 2 stimulation promotes colorectal cancer cell growth via PI3K/Akt and NF- κ B signaling pathways. *Int Immunopharmacol*, 59, 375-383.
- Liu, Y.X., Wang, G.D., Wang, X., Zhang, Y.L. ve Zhang, T.L., 2017. Effects of TLR-2/NF- κ B signaling pathway on the occurrence of degenerative knee osteoarthritis: an in vivo and in vitro study. *Oncotarget*, 8 (24), 38602-38617.
- Livak, K.J. ve Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method, *Methods*, 25 (4), 402-408.
- Loret, N., Denys, H., Tummers, P. ve Berx, G., 2019. The Role of Epithelial-to-Mesenchymal Plasticity in Ovarian Cancer Progression and Therapy Resistance. *Cancers (Basel)*. 11 (6), 838.
- Lu, C., Rong, D., Zhang, B., Zheng, W., Wang, X., Chen, Z. Weiwei, T., 2019. Current perspectives on the immunosuppressive tumor microenvironment in hepatocellular carcinoma: challenges and opportunities. *Mol Cancer*, 18, 130.
- Macciò, A. ve Madeddu, C., 2012. Inflammation and ovarian cancer. *Cytokine*, 58 (2), 133-47.
- Makris, G.M., Siristatidis, C., Battista, M.J. ve Chrelias, C., 2015. Ovarian carcinosarcoma: a case report, diagnosis, treatment and literature review. *Hippokratia*, 19 (3), 256-259.
- Mansoori, B., Mohammadi, A., Davudian, S., Shirjang, S. ve Baradaran, B., 2017. The Different Mechanisms of Cancer Drug Resistance: A Brief Review. *Adv Pharm Bull*, 7 (3), 339-348.
- Marcus, C.S., Maxwell, G.L., Darcy, K.M., Hamilton, C.A. ve McGuire, W.P., 2014. Current approaches and challenges in managing and monitoring treatment response in ovarian cancer. *J Cancer*, 5 (1), 25-30.
- Masterci, K., Muraro, E., Pasini, E., Furlan, C., Sigalotti, L., Cinco, M., Dolcetti, R. ve Fratta, E., 2016. Toll-Like Receptor 1/2 and 5 Ligands Enhance the Expression of Cyclin D1

- and D3 and Induce Proliferation in Mantle Cell Lymphoma. *PLoS One*, 11(4), e0153823.
- Mathieu, K.B., Bedi, D.G., Thrower, S.L., Qayyum, A. ve Bast, R.C.Jr., 2018. Screening for ovarian cancer: imaging challenges and opportunities for improvement. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 51 (3), 293-303.
- Matulonis, U., Sood, A., Fallowfield, L. ve ark., 2016. Ovarian cancer. *Nat Rev Dis Primers*, 2, 1606.
- McLemore, M.R., Miaskowski, C., Aouizerat, B.E., Chen, L.M. ve Dodd, M.J., Epidemiological and genetic factors associated with ovarian cancer. *Cancer Nurs*, 32 (4), 281-290.
- Medzhitov, R., 2001. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 1, 135–145.
- Mercier, B.C., Cottalorda, A., Coupet, C.A., Marvel, J. ve Bonnefoy-Berard, N., 2009. TLR2 engagement on CD8 T cells enables generation of functional memory cells in response to a suboptimal TCR signal. *J Immunol*, 182, 1860–1867.
- Messaritakis, I., Stogiannitsi, M., Koulouridi, A. ve ark., 2018. Evaluation of the detection of Toll-like receptors (TLRs) in cancer development and progression in patients with colorectal cancer. *PLoS One*, 13 (6), e0197327.
- Mirzaei, S.A., Reiisi, S., Ghiasi, Tabari, P., Shekari, A., Aliakbari, F., Azadfallah, E. ve Elahian, F., 2018. Broad blocking of MDR efflux pumps by acetylshikonin and acetoxisovalerylshikonin to generate hypersensitive phenotype of malignant carcinoma cells. *Sci Rep*, 8 (1), 3446.
- Mizuno, K., Akimoto, N., Kawamura, M., Nakase, K., Noguchi, N. ve Sato, T., 2017. Involvement of adenosine triphosphate-binding cassette subfamily B member 1 in the augmentation of triacylglycerol excretion by *Propionibacterium acnes* in differentiated hamster sebocytes. *The Journal of dermatology*, 44 (12), 1404–1407.
- Mohammad Hosseini, A., Majidi, J., Baradaran, B. ve Yousefi, M., 2015. Toll-Like Receptors in the Pathogenesis of Autoimmune Diseases. *Adv Pharm Bull*, 5 (Suppl 1), 605-614.
- Momenimovahed, Z., Tiznobaik, A., Taheri, S. ve Salehiniya, H., 2019. Ovarian cancer in the world: epidemiology and risk factors. *Int J Womens Health*, 11, 287-299.
- Montavon Sartorius, C., Mirza, U., Schötzau, A., Mackay, G., Fink, D., Hacker, N.F. ve Heinzelmann-Schwarz, V., 2018. Impact of the new FIGO 2013 classification on prognosis of stage I epithelial ovarian cancers. *Cancer Manag Res*.
- Morceau, F., Duvoix, A., Delhalle, S., Schnekenburger, M., Dicato, M. ve Diederich, M., 2004. Regulation of glutathione S-transferase P1-1 gene expression by NF-kappaB in tumor necrosis factor alpha-treated K562 leukemia cells. *Biochem Pharmacol*, 67 (7), 1227-38.
- Morice, P., Gouy, S. ve Leary, A., 2019. Mucinous Ovarian Carcinoma. *N Engl J Med*, 380 (13), 1256-1266.
- Muccioli, M., Sprague, L., Nandigam, H., Pate, M. ve Benencia, F., 2012. Toll-like receptors as novel therapeutic targets for ovarian cancer. *ISRN oncology*, 2012, 642141.
- Mukherjee, S., Huda, S. ve Sinha Babu, S.P., 2019. Toll-like receptor polymorphism in host immune response to infectious diseases: A review. *Scand J Immunol*, 90 (1), e12771.

- Murshid, A., Gong, J., Stevenson, M.A. ve Calderwood, S.K., 2011. Heat shock proteins and cancer vaccines: developments in the past decade and chaperoning in the decade to come. *Expert Rev Vaccines*, 10 (11), 1553-1568.
- Nezhat, F.R., Apostol, R., Nezhat, C. ve Pejovic, T., 2015. New insights in the pathophysiology of ovarian cancer and implications for screening and prevention. *Am J Obstet Gynecol*, 213 (3), 262-7.
- Noh, J.Y., Yoon, S.R., Kim, T.D., Choi, I. ve Jung, H., 2020. Toll-Like Receptors in Natural Killer Cells and Their Application for Immunotherapy. *J Immunol Res*, 2020, 2045860.
- Norouzi-Barough, L., Sarookhani, M.R., Sharifi, M., Moghbelinejad, S., Jangjoo, S. ve Salehi, R., 2018. Molecular mechanisms of drug resistance in ovarian cancer. *J Cell Physiol*, 233 (6), 4546-4562.
- Pasello, M., Michelacci, F., Scionti, I., Hattinger, C.M., Zuntini, M., Caccuri, A.M., Scotlandi, K., Picci, P. ve Serra, M., 2008. Overcoming glutathione S-transferase P1-related cisplatin resistance in osteosarcoma. *Cancer Res*, 68 (16), 6661-8.
- Park, G.B., Chung, Y.H. ve Kim, D., 2017. Induction of galectin-1 by TLR-dependent PI3K activation enhances epithelial-mesenchymal transition of metastatic ovarian cancer cells. *Oncology reports*, 37 (5), 3137–3145.
- Park, G.B. ve Kim, D., 2017. TLR5/7-mediated PI3K activation triggers epithelial-mesenchymal transition of ovarian cancer cells through WAVE3-dependent mesothelin or OCT4/SOX2 expression. *Oncology reports*, 38 (5), 3167–3176.
- Patente, T.A., Pinho, M.P., Oliveira, A.A., Evangelista, G.C.M., Bergami-Santos, P.C. ve Barbuto, J.A.M., 2019. Human Dendritic Cells: Their Heterogeneity and Clinical Application Potential in Cancer Immunotherapy. *Front Immunol*, 9, 3176.
- Peres, L. C., Risch, H., Terry, K. L. ve ark., 2018. Racial/ethnic differences in the epidemiology of ovarian cancer: a pooled analysis of 12 case-control studies. *Int J Epidemiol*, 47 (2), 460-472.
- Piccinini, A.M. ve Midwood, K.S., 2010. DAMPening inflammation by modulating TLR signalling. *Mediators Inflamm*, 2010, 672395.
- Pierson, W.E., Peters, P.N., Chang, M.T., Chen, L.M., Quigley, D.A., Ashworth, A. ve Chapman, J.S., 2020. An integrated molecular profile of endometrioid ovarian cancer. *Gynecol Oncol*, 157 (1), 55-61.
- Pinto, A., Morello, S. ve Sorrentino, R., 2011. Lung cancer and Toll-like receptors. *Cancer Immunol Immunother*, 60, 1211.
- Pirkmajer, S. ve Chibalin, A.V., 2011. Serum starvation: caveat emptor. *Am J Physiol Cell Physiol*, 301 (2), C272-9.
- Prabhakaran, P., Hassiotou, F., Blancafort, P. ve Filgueira, L., 2013. Cisplatin induces differentiation of breast cancer cells. *Frontiers in oncology*, 3, 134.
- Prat, J., 2012. New insights into ovarian cancer pathology. *Ann Oncol*, 10, 111-7.
- Premkumar, V., Dey, M., Dorn, R. ve Raskin, I., 2010. MyD88-dependent and independent pathways of Toll-Like Receptors are engaged in biological activity of Triptolide in ligand-stimulated macrophages. *BMC Chem Biol*, 10, 3.
- Pyeon, S.Y., Han, G.H., Ki, K.D., Lee, K.B. ve Lee, J.M., 2020. Effect of delayed palliative chemotherapy on survival of patients with recurrent ovarian cancer. *PLoS One*, 15 (7), e0236244.

- Rahman, A.H., Taylor, D.K. ve Turka, L.A., 2009. The contribution of direct TLR signaling to T cell responses. *Immunol Res*, 45 (1), 25-36.
- Rai, Y., Pathak, R., Kumari, N., Sah, D.K., Pandey, S., Kalra, N., Soni, R., Dwarakanath, B.S. ve Bhatt, A.N., 2018. Mitochondrial biogenesis and metabolic hyperactivation limits the application of MTT assay in the estimation of radiation induced growth inhibition. *Sci Rep*, 8 (1), 1531.
- Rakoff-Nahoum, S. ve Medzhitov, R., 2009. Toll-like receptors and cancer. *Nat Rev Cancer* 9, 57–63.
- Rammensee, H.G., Wiesmüller, K.H., Chandran, P.A., Zelba, H., Rusch, E., Gouttefangeas, C., Kowalewski, D.J., Di Marco, M., Haen, S.P., Walz, J.S., Gloria, Y.C., Bödder, J., Schertel, J.M., Tunger, A., Müller, L., Kießler, M., Wehner, R., Schmitz, M., Jakobi, M., Schneiderhan-Marra, N. Ve Löffler, M.W., 2019. A new synthetic toll-like receptor 1/2 ligand is an efficient adjuvant for peptide vaccination in a human volunteer. *Journal for immunotherapy of cancer*, 7 (1), 307.
- Rauh-Hain, J.A., Krivak, T.C., Del Carmen, M.G. ve Olawaiye, A.B., 2011. Ovarian cancer screening and early detection in the general population. *Rev Obstet Gynecol*, 4 (1), 15-21.
- Rees, D., Johnson, E. ve Lewinson, O., 2009. ABC transporters: the power to change. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10, 218–227.
- Reid, B.M., Permuth, J.B. ve Sellers, T.A., 2017. Epidemiology of ovarian cancer: a review. *Cancer Biol Med*, 14 (1), 9-32.
- Ribatti D. The concept of immune surveillance against tumors. The first theories. *Oncotarget*. 2017;8(4):7175-7180. doi:10.18632/oncotarget.12739
- Ricciardi, E., Baert, T., Ataseven, B., ve ark., 2018. Low-grade Serous Ovarian Carcinoma. *Geburtshilfe Frauenheilkd*, 78 (10), 972-976.
- Ridnour, L.A., Cheng, R.Y., Switzer, C.H., Heinecke, J.L., Ambs, S., Glynn, S., Young, H.A., Trinchieri, G. ve Wink, D.A., 2013. Molecular pathways: toll-like receptors in the tumor microenvironment--poor prognosis or new therapeutic opportunity. *Clin Cancer Res*, 19 (6), 1340-6.
- Ritz, C., Baty, F., Streibig, J.C. ve Gerhard, D., 2015. Dose-Response Analysis Using R. *PLoS One*, 10 (12), e0146021.
- Roett, M.A. ve Evans, P., 2009. Ovarian cancer: an overview. *Am Fam Physician*, 80 (6), 609-16.
- Rojas, V., Hirshfield, K.M., Ganesan, S. ve Rodriguez-Rodriguez, L. Molecular Characterization of Epithelial Ovarian Cancer: Implications for Diagnosis and Treatment. *Int J Mol Sci*, 17(12):2113.
- Romero, I. ve Bast, R.C.Jr., 2012. Minireview: human ovarian cancer: biology, current management, and paths to personalizing therapy. *Endocrinology*, 153 (4), 1593-1602.
- R Core Team, 2020. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- RStudio Team, 2020. RStudio: Integrated Development for R. RStudio, PBC, Boston, MA, URL <http://www.rstudio.com/>.

- Saha, S.K., Lee, S.B., Won, J., Choi, H.Y., Kim, K., Yang, G.M., Dayem, A.A. ve Cho, S. G., 2017. Correlation between Oxidative Stress, Nutrition, and Cancer Initiation. *International journal of molecular sciences*, 18(7), 1544.
- Salcedo-Hernández, R.A., Lino-Silva, L.S., Cantú de León, D., Pérez-Montiel, M.D. ve Luna-Ortiz, K., 2012. Ovarian undifferentiated carcinoma with voluminous mesenteric presentation. *Int J Surg Case Rep*, 3 (11), 551-554.
- Salvador, B., Arranz, A., Francisco, S., Córdoba, L., Punzón, C., Llamas, M.Á. ve Fresno, M., 2016. Modulation of endothelial function by Toll like receptors. *Pharmacol Res*, 108, 46-56.
- Savant, S.S., Sriramkumar, S. ve O'Hagan, H.M., 2018. The Role of Inflammation and Inflammatory Mediators in the Development, Progression, Metastasis, and Chemoresistance of Epithelial Ovarian Cancer. *Cancers*, 10 (8), 251.
- Sato, Y., Goto, Y., Narita, N. ve Hoon, D.S., 2009. Cancer Cells Expressing Toll-like Receptors and the Tumor Microenvironment. *Cancer Microenviron*, 2 Suppl 1(Suppl 1), 205-214.
- Satoh, T. ve Akira, S., 2016. Toll-Like Receptor Signaling and Its Inducible Proteins. *Microbiol Spectr*, 4 (6).
- Sawers, L., Ferguson, M.J., Ihrig, B.R. ve ark., 2014. Glutathione S-transferase P1 (GSTP1) directly influences platinum drug chemosensitivity in ovarian tumour cell lines. *Br J Cancer*, 111 (6), 1150-1158.
- Scholler, N. ve Urban, N., 2007. CA125 in ovarian cancer. *Biomark Med*, 1 (4), 513-523.
- Schreibelt, G., Tel, J., Sliepen, K.H., Benitez-Ribas, D., Figdor, C.G., Adema, G.J. ve de Vries, I.J., 2010. Toll-like receptor expression and function in human dendritic cell subsets: implications for dendritic cell-based anti-cancer immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother*, 59 (10), 1573-82.
- Sharma, N., Vacher, J. ve Allison, J.P., 2019. TLR1/2 ligand enhances antitumor efficacy of CTLA-4 blockade by increasing intratumoral Treg depletion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116 (21), 10453–10462.
- Shi, S., Xu, C., Fang, X. ve ark., 2020. Expression profile of Toll-like receptors in human breast cancer. *Mol Med Rep*, 21 (2), 786-794.
- Siegel, R.L., Miller, K.D. ve Jemal, A., 2020. Cancer statistics, 2020. *CA Cancer J Clin*, 70 (1), 7-30.
- Silva, E.G., Tornos, C., Bailey, M.A. ve Morris, M., 1991. Undifferentiated carcinoma of the ovary. *Arch Pathol Lab Med*, 115 (4), 377-81.
- Singh, N., Baby, D., Rajguru, J., Patil, P.B., Thakkannavar, S.S. ve Pujari, V.B., 2019. Inflammation and cancer. *Annals of African medicine*, 18 (3), 121-126.
- Slattery, M.L., Herrick, J.S., Bondurant, K.L. ve Wolff, R.K., 2011. Toll-like receptor genes and their association with colon and rectal cancer development and prognosis. *Int J Cancer*, 130 (12), 2974-80.
- Stockert, J.C., Blázquez-Castro, A., Cañete, M., Horobin, R.W. ve Villanueva, A., 2012. MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. *Acta Histochem*, 114 (8), 785-96.

- Sun, N.K., Huang, S.L., Chang, T.C. ve Chao, C.C., 2018. TLR4 and NF κ B signaling is critical for taxol resistance in ovarian carcinoma cells. *J Cell Physiol*, 233(3):2489-2501.
- Sun, S., Cai, J., Yang, Q., Zhu, Y., Zhao, S. ve Wang, Z., 2016. Prognostic Value and Implication for Chemotherapy Treatment of ABCB1 in Epithelial Ovarian Cancer: A Meta-Analysis. *PLoS One*, 11 (11), e0166058.
- Sung, H.K., Ma, S.H., Choi, J.Y. ve ark., 2016.. The Effect of Breastfeeding Duration and Parity on the Risk of Epithelial Ovarian Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. *J Prev Med Public Health*, 49 (6), 349-366.
- Szajnik, M., Szczepanski, M.J., Czystowska, M., Elishaev, E., Mandapathil, M., Nowak-Markwitz, E., Spaczynski, M. ve Whiteside, T.L., 2009. TLR4 signaling induced by lipopolysaccharide or paclitaxel regulates tumor survival and chemoresistance in ovarian cancer. *Oncogene*, 28 (49), 4353–4363.
- Şencan, İ. ve Keskinçilic B., 2017. Türkiye kanser istatistikleri. T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu.
- Tanida, S., Mizoshita, T., Ozeki, K., Tsukamoto, H., Kamiya, T., Kataoka, H., Sakamuro, D. ve Joh, T., 2012. Mechanisms of Cisplatin-Induced Apoptosis and of Cisplatin Sensitivity: Potential of BIN1 to Act as a Potent Predictor of Cisplatin Sensitivity in Gastric Cancer Treatment. *Int J Surg Oncol*, 2012, 862879.
- Tapia, G. ve Diaz-Padilla, I., 2013. Molecular Mechanisms of Platinum Resistance in Ovarian Cancer, *Ovarian Cancer - A Clinical and Translational Update*, Iván Díaz-Padilla, IntechOpen.
- Tapia, G. ve Diaz-Padilla, I., 2013. Molecular Mechanisms of Platinum Resistance in Ovarian Cancer. In: Iván Díaz-Padilla I. editor. *Ovarian Cancer - A Clinical and Translational Update*. InTech, 2013.
- Terada, K.Y., Ahn, H.J. ve Kessel, B., 2016. Differences in risk for type 1 and type 2 ovarian cancer in a large cancer screening trial. *J Gynecol Oncol*, 27 (3), e25.
- Terzić, J., Grivennikov, S., Karin, E. ve Karin, M., 2010. Inflammation and colon cancer. *Gastroenterology*, 138 (6), 2101-2114.e5.
- Tong, X., Zhao, J., Zhang, Y., Mu, P. ve Wang, X., 2019. Expression levels of MRP1, GST- π , and GSK3 β in ovarian cancer and the relationship with drug resistance and prognosis of patients. *Oncol Lett*, 18 (1), 22-28.
- Townsend, D. ve Tew, K., 2003. The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene*, 22, 7369–7375.
- Tzifi, F., Economopoulou, C., Gourgiotis, D., Ardavanis, A., Papageorgiou, S. ve Scorilas, A., 2011. The Role of BCL2 Family of Apoptosis Regulator Proteins in Acute and Chronic Leukemias. *Adv Hematol*, 2012, 524308.
- Umakanthan, S., Chattu, V.K. ve Kalloo, S., 2019. Global epidemiology, risk factors, and histological types of ovarian cancers in Trinidad. *J Family Med Prim Care*, 8, 1058-64.
- van Zyl, B., Tang, D. ve Bowden, N.A., 2018. Biomarkers of platinum resistance in ovarian cancer: what can we use to improve treatment. *Endocr Relat Cancer*, 25 (5), R303-R318.

- Vang, R., Shih, I. ve Kurman, R.J., 2009. Ovarian low-grade and high-grade serous carcinoma: pathogenesis, clinicopathologic and molecular biologic features, and diagnostic problems. *Adv Anat Pathol*, 16 (5), 267-282.
- Varoga, D., Paulsen, F., Mentlein, R., Fay, J., Kurz, B., Schütz, R., Wruck, C., Goldring, M.B. ve Pufe, T., 2006. TLR-2-mediated induction of vascular endothelial growth factor (VEGF) in cartilage in septic joint disease. *J Pathol*, 210 (3), 315-24.
- Vasiliou, V., Vasiliou, K. ve Nebert, D.W., 2009. Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family. *Hum Genomics*, 3 (3), 281-290.
- Verma, H., Singh Bahia, M., Choudhary, S., Kumar Singh, P., Silakari, O., 2019. Drug metabolizing enzymes-associated chemo resistance and strategies to overcome it. *Drug Metab Rev*, 51 (2), 196-223.
- Vijay, K., 2018. Toll-like receptors in immunity and inflammatory diseases: Past, present, and future. *Int Immunopharmacol*, 59, 391-412.
- Vlad, C., Dina, C., Kubelac, P., Vlad, D., Pop, B. ve Achimas Cadariu, P., 2018. Expression of toll-like receptors in ovarian cancer. *J BUON*, 23 (6), 1725-1731.
- Vogler, M., 2012. BCL2A1: the underdog in the BCL2 family. *Cell Death Differ*, 19, 67-74.
- Volchenkov, R., Sprater, F., Vogelsang, P. ve Appel, S., 2012. The 2011 Nobel Prize in physiology or medicine. *Scand J Immunol*, 75 (1), 1-4.
- Wang, A.C., Ma, Y.B., Wu, F.X., Ma, Z.F., Liu, N.F., Gao, R., Gao, Y.S. ve Sheng, X.G., 2014. TLR4 induces tumor growth and inhibits paclitaxel activity in MyD88-positive human ovarian carcinoma in vitro. *Oncology letters*, 7 (3), 871-877.
- Wang, Y., Liu, X., Zhang, H.T., Yu, M. ve Wang, H., 2007. NF-kappaB regulating expression of mdrl gene and P-gp to reverse drug-resistance in leukemic cells. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*, 15 (5), 950-4.
- Wang, F., Zhang, P., Yang, L., Yu, X., Ye, X., Yang, J., Qian, C., Zhang, X., Cui, Y.H. ve Bian, X.W., 2015. Activation of toll-like receptor 2 promotes invasion by upregulating MMPs in glioma stem cells. *American journal of translational research*, 7 (3), 607-615.
- Watts, C., West, M.A. ve Zaru, R., 2010. TLR signalling regulated antigen presentation in dendritic cells. *Curr Opin Immunol*, 22, (1), 124-30.
- West, A., Tang, K., Tye, H. ve ark., 2017. Identification of a TLR2-regulated gene signature associated with tumor cell growth in gastric cancer. *Oncogene*, 36, 5134-5144.
- Whiteside, T.L., 2008. The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. *Oncogene*, 27 (45), 5904-5912.
- Whitwell, H.J., Worthington, J., Blyuss, O., ve ark., 2020. Improved early detection of ovarian cancer using longitudinal multimarker models. *Br J Cancer*, 122, 847-856.
- Wickham, H. ve Bryan, J., 2019. readxl: Read Excel Files. R package version 1.3.1., <https://CRAN.R-project.org/package=readxl>.
- Wickham, H., ve ark., 2019. Welcome to the tidyverse. *Journal of Open Source Software*, 4 (43), 1686.
- Wilkens, S., 2015. Structure and mechanism of ABC transporters. *F1000Prime Rep*, 7, 14.
- Wu, J., Ding, Y., Wang, J., Wang, F., 2018. Staphylococcus aureus induces TGF- β_1 and bFGF expression through the activation of AP-1 and NF- κ B transcription factors in bovine mammary epithelial cells. *Microb Pathog*, 117, 276-284.

- Wu, R., Baker, S.J., Hu, T.C., Norman, K.M., Fearon, E.R. ve Cho, K.R., 2013. Type I to type II ovarian carcinoma progression: mutant Trp53 or Pik3ca confers a more aggressive tumor phenotype in a mouse model of ovarian cancer. *Am J Pathol*, 182 (4), 1391-1399.
- Xia, L., Tan, S., Zhou, Y. ve ark., 2018. Role of the NF κ B-signaling pathway in cancer. *Onco Targets Ther*, 11, 2063-2073.
- Xia, X., Ma, Q., Li, X., Ji, T., Chen, P., Xu, H., Li, K., Fang, Y., Weng, D., Weng, Y., Liao, S., Han, Z., Liu, R., Zhu, T., Wang, S., Xu, G., Meng, L., Zhou, J. ve Ma, D., 2011. Cytoplasmic p21 is a potential predictor for cisplatin sensitivity in ovarian cancer. *BMC Cancer*, 11, 399.
- Xu, Q., Lin, Y.B., Li, L. ve Liu, J., 2020. LncRNA TLR8-AS1 promotes metastasis and chemoresistance of ovarian cancer through enhancing TLR8 mRNA stability. *Biochemical and biophysical research communications*, 526 (4), 857–864.
- Yamamoto, M. ve Takeda, K., 2010. Current views of toll-like receptor signaling pathways. *Gastroenterol Res Pract*, 2010, 240365.
- Yan, X., Lee, S., Gugi, B.G., Koroniak, L., Jung, M.E., Berliner, J., Cheng, J. ve Li, R., 2014. Fatty acid epoxyisoprostane E2 stimulates an oxidative stress response in endothelial cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 444 (1), 69–74.
- Yang, F., Gao, B., Chen, W. ve ark., 2018. Expression of resistance gene and prognosis of chemotherapy in primary epithelial ovarian cancer. *Medicine (Baltimore)*, 97 (41), e12364.
- Yang, H., Wang, B., Wang, T., Xu, L., He, C., Wen, H., Yan, J., Su, H. ve Zhu, X., 2014. Toll-like receptor 4 prompts human breast cancer cells invasiveness via lipopolysaccharide stimulation and is overexpressed in patients with lymph node metastasis. *PLoS One*, 9 (10), e109980.
- Yang, X., Cheng, Y. ve Li, C., 2017. The role of TLRs in cervical cancer with HPV infection: a review. *Sig Transduct Target Ther*, 2, 17055.
- Yang, Y., Yang, Y., Yang, J., Zhao, X. ve Wei, X., 2020. Tumor Microenvironment in Ovarian Cancer: Function and Therapeutic Strategy. *Front Cell Dev Biol*, 11 (8), 758.
- Yesudhas, D., Gosu, V., Anwar, M.A. ve Choi, S., 2014. Multiple roles of toll-like receptor 4 in colorectal cancer. *Front Immunol*, 5, 334.
- Yu, M., Wang, H., Ding, A., Golenbock, D.T., Latz, E., Czura, C.J., Fenton, M.J., Tracey, K.J. ve Yang, H., 2006. HMGB1 signals through toll-like receptor (TLR) 4 and TLR2. *Shock*, 26 (2), 174-9.
- Yusuf, N., 2014. Toll-like receptor mediated regulation of breast cancer: a case of mixed blessings. *Front Immunol*, 5, 224.
- Zhang, T., Guan, M., Jin, H.Y. ve Lu, Y., 2005. Reversal of multidrug resistance by small interfering double-stranded RNAs in ovarian cancer cells. *Gynecol Oncol*, 97 (2), 501-7.
- Zhang, Y., Staley, S.A., Tucker, K. ve Clark, L.H., 2019. Malignant Brenner tumor of the ovary: Case series and review of treatment strategies. *Gynecol Oncol Rep*, 28, 29-32.
- Zheng, R. ve Heller, D.S., 2019. Borderline Brenner Tumor: A Review of the Literature. *Arch Pathol Lab Med*, 143 (10), 1278-1280.

- Zhou, M., McFarland-Mancini, M.M., Funk, H.M., Husseinazadeh, N., Mounajjed, T. ve Drew, A.F., 2009. Toll-like receptor expression in normal ovary and ovarian tumors. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*, 58 (9), 1375–1385.
- Zong, C., Wang, J. ve Shi, T.M., 2014. MicroRNA 130b enhances drug resistance in human ovarian cancer cells. *Tumour Biol*, 35 (12), 12151-6.



ÖZGEÇMİŞ

2018 yılında Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi (TOGÜ) Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nden mezun oldu. Aynı yıl, TOGÜ'de Biyoloji Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji Programı'nda yüksek lisans eğitime başladı ve 2020 yılında bu programdan mezun oldu. Ayrıca 2019'dan bu yana TOGÜ, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı'na Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktadır.

