

**T.C.**  
**HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**PROSTAT KANSERİNDE TLR AGONİSTLERİNİN M1, M2**  
**MAKROFAJ POLARİZASYONUNDA ROLÜ**

**Uzm. Biyolog Somaiyeh MALEKGHASEMİ**

**Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi Programı**  
**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ANKARA**

**2019**

**TC**  
**HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**PROSTAT KANSERİNDE TLR AGONİSTLERİNİN M1, M2**  
**MAKROFAJ POLARİZASYONUNDAROLÜ**

**Uzm. Biyolog Somaiyeh MALEKGHASEMİ**

**Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi Programı**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI**

**Dr. Öğr. Üyesi Gürcan GÜNAYDIN**

**ANKARA 2019**

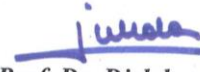
**ONAY SAYFASI****Prostat Kanserinde TLR Agonistlerinin M1, M2 Makrofaj Polarizasyonunda Rolü****Öğrenci: Adı ve Soyadı:** Somaiyeh Malekghasemi**Danışman:** Dr. Öğr. Üyesi Gürcan Günaydın

Bu tez çalışması 11.04.2019 tarihinde jürimiz tarafından “Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi Programı” nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

**Jüri Başkanı:** Prof.Dr. S. Ayşe Kars (Hacettepe Üniversitesi)**Tez Danışmanı:** Dr. Öğr. Üyesi Gürcan Günaydın (Hacettepe Üniversitesi)**Üye:** Prof.Dr. A.Lale Doğan (Hacettepe Üniversitesi)**Üye:** Doç.Dr. Füsun Özmen (Hacettepe Üniversitesi)**Üye:** Prof. Dr. Resul Karakuş (Gazi Üniversitesi)

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

07 Mayıs 2019

  
**Prof. Dr. Diclehan Orhan**  
Enstitü Müdürü

## YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezim kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan "**Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge**" kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- o Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. <sup>(1)</sup>
- o Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren ... ay ertelenmiştir. <sup>(2)</sup>
- o Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. <sup>(3)</sup>

Somaiyeh.MALEKGHASEMİ

(İmza)

Öğrencinin Adı SOYADI

<sup>i</sup>"Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge"

(1) Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.

(2) Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.

(3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, tezin yapıldığı kurum tarafından verilir \*. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, ilgili kurum ve kuruluşun önerisi ile enstitü veya fakültenin uygun görüşü üzerine üniversite yönetim kurulu tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir.

Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir

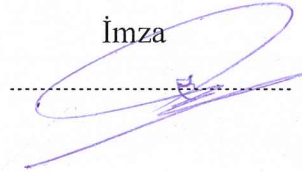
\* Tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu tarafından karar verilir.

## ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Dr. Öğr. Üyesi Gürcan Günaydın danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

**Uzm. Biyolog Somaiyeh Malekghasemi**

İmza



## TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının gerçekleştirilmesini ve tüm olanakları sağlayan Prof. Dr. Dicle Güç'e, Öğr. Gör. Dr. Hande Canpınar'a ve Tez danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Gürcan Günaydın'a, tez çalışmalarım sırasında gösterdikleri büyük ilgi ve yardımlarından dolayı öncelikle teşekkür ederim. Her zaman yardımını ve desteğini gördüğüm Temel Onkoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. A. Lale Doğan'a; birlikte çalışırken çok şey öğrendiğim, her türlü konuda tecrübesine ve bilgisine danıştığım, çalıştığımız dönem içerisinde vermiş oldukları sonsuz desteklerden ve yardımlarından dolayı çalışma arkadaşlarım Emre Gedik'e, Ece Tavukçuoğlu'na, Feyza Özbay'a, Utku Horzum'a ve Alper Kurşunel'e; Temel Onkoloji Anabilim Dalı çalışanlarından Necla Çelik', Burçin Taşbasan'a, Banu Avşar'a, Semra Solmaz'a, Hüseyin Ünal'a ve Halime Mesci'ye; son olarak da tüm hayatım boyunca beni karşılıksız destekleyen, bana güvenen, eğitimime devam etmem için beni cesaretlendiren ve bugünkü bulunduğum noktaya gelmemi sağlayan Annem Jila Farahmand, Babam Behnam MALEKGHASEMİ ve kardeşim Soheil MALEKGHASEMİ'ye en içten teşekkürlerimi sunarım.

## ÖZET

**Somaiyeh Malekghasemi, Prostat Kanserinde TLR Agonistlerinin M1, M2 Makrofaj Polarizasyonunda Rolü, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi Program Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2019.** Prostat kanserinin gelişiminde inflamasyonun etkili olduğu çok iyi bilinmektedir. Tümör mikroçevresinde bulunan makrofajlar pro-inflamatuvar ve tümöre karşı M1 tipi veya tümör gelişimine yardımcı olan M2 tipindeki makrofajlardır. Tümör mikroçevresinde bulunan M2 tipi makrofajlardan gelişen TAM'lerden salınan IL-10 TGF $\beta$ , IL-6 ve IL-8 gibi inflamatuvar sitokinler kanser hücrelerinin gelişimini ve metastazını kolaylaştırırlar. TAM'lar, bir çok tümörde yoğun olarak bulunur ve tümörü infiltre eden TAM'ların sayısı ile hastalığın kötü prognozunu ilişkilili olduğu da bilinmektedir. Bu nedenle TAM'ların kontrolü ve regülasyonu tümörlerin prognozunda anahtar rol oynar. Çeşitli Toll Like Reseptör (TLR) agonistleri, tümöre karşı immün yanıtı yönlendirebildiği için klinik uygulamalarda kullanılmaktadır. Tümörden salınan soluble faktörlerin, TAM'lara dönüşümde etkili olduğu bilinmektedir. Fakat prostat kanseri hücrelerinden salınan soluble faktörlerin makrofaj polarizasyonuna olan etkileri çok iyi bilinmemektedir. Bu nedenle çalışmamızda, TLR4 ve TLR 8 agonistleriyle uyarılmış prostat kanser hücrelerinden salınan faktörlerin makrofajların farklılaşmasına olan etkileri araştırılmıştır. Bunun yanı sıra makrofajlardan salınan sitokinler ve makrofajların fagositoz fonksiyonları değerlendirilmiştir. Çalışma sonuçlarımız, THP-1 hücrelerinin TLR4 ve TLR8 agonistleri ile uyarılmış PC3 hücre kültür süpernatantları varlığında CD206 yüzey ekspresyonunun azaldığını göstermiştir. Bu hücrelerde inflamatuvar sitokinlerden özellikle IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  ve GM-CSF salınımının arttığı bulunmuştur. Bu koşullardaki THP 1 hücrelerinde fagositoz kapasitesinin arttığı ve hücre siklusunun G0/G1 fazını gösterdiği bulunmuştur.

**Anahtar Kelimeler:** prostat kanseri, makrofaj, tümör ile ilişkili makrofajlar, toll like reseptörler

## ABSTRACT

**Somaiyeh Malekghasemi, Role of TLR Agonists in M1, M2 Macrophage Polarization in Prostate Cancer. Hacettepe University Graduate School of Health Sciences Tumor Biology and Immunology Program Master Thesis, Ankara, 2019.** It is well known that inflammation is effective in the development of prostate cancer. Macrophages in the tumor microenvironment are either anti-inflammatory M2-type that help tumor growth or pro-inflammatory M1-type that play an important role in the recognition and destruction of cancer cells. Inflammatory cytokines such as IL-10, TGF $\beta$ , IL-6 and IL-8 that are produced from TAMs in the tumor microenvironment facilitate the development and metastasis of cancer cells. The higher number of TAMs is commonly observed in tumors with poor prognosis. Therefore, control and regulation of TAMs play a key role in the prognosis of tumors. Various Toll Like Receptor (TLR) agonists are used in clinical applications because they can direct the immune response against the tumor. Soluble factors released from the tumor are known to be effective in transformation to TAMs. However, the effects of soluble factors released from prostate cancer cells on macrophage polarization are not well known. Therefore, in our study, the effects of factors released from prostate cancer cells which were treated with TLR 4 and TLR 8 agonists on the differentiation of macrophages were investigated. In addition, phagocytosis functions of macrophages as well as cytokines released from macrophages were evaluated. We found that THP1 cells showed decreased expression of CD206 in the presence of the supernatant from PC3 cells treated with TLR4 and TLR8 agonists. In these cells, the inflammatory cytokines IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  and GM-CSF were increased. In these conditions, the phagocytosis capacity increased in the THP-1 cells and the cell cycle of these cells showed the G0 / G1 phase.

**Keywords:** prostate cancer, macrophages, tumor associated macrophages, toll like receptors



## İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKİR MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İ.ÇİNDEKİLER	ix
<b>1.GİRİŞ</b>	1
<b>2.GENEL BİLGİLER</b>	3
2.1. Monosit ve Makrofaj Gelişimi	3
2.2. Makrofaj Polarizasyonu	4
2.3. Tümör ile ilişkili makrofajlar (TAM'lar)	6
2.3.1. TAM'ların Kaynağı	7
2.3.2. Kanser ve TAM'lar Arasındaki İlişki	9
2.3.3. TAM'ların Metabolizma ve Aktivasyon Yolları	10
2.3.4. TAM'ların Kanser Tanısında Biyobelirteç Olarak Kullanılması	12
2.3.5. TAM'ların İmmünoterapi olarak Kullanılması Yaklaşımları	12
2.3.6. TAM'ların Aktivasyonun Hedeflenmesi	14
2.3.7. TAM'ların Tümöre Karşı Yeniden Programlanması	15
2.4. Toll Like Reseptörler	15
2.4.1. TLR'nin Yapısı ve Fonksiyon	17
2.4.2. TLR' de Sinyal İletimi	17
2.4.3. TLR ve Kanser	19

2.4.4.	TLR Agonistleri	23
2.5.	Prostate Kanseri	24
2.5.1.	Prostat Kanserinde TLR Ekspresyonu	26
2.5.2.	Prostat Kanserinde TLR Sinyal İletimi	28
<b>3.</b>	<b>GEREÇ VE YÖNTEM</b>	<b>31</b>
3.1.	Hücre Kültürü	32
3.2.	TLR Agonistleri ile Hücrelerin Aktivasyonu	33
3.3.	THP-1 Hücrelerinin Morfolojik İncelenmesi	33
3.4.	THP-1 hücrelerinin Makrofaj Polarizasyonun Akım Sitometri Yöntemiyle Belirlenmesi	33
3.5.	Sitokin Salınımının Değerlendirilmesi	33
3.6.	Makrofajlarda Fagositoz Aktivitesinin Değerlendirilmesi	34
3.7.	Hücre Proliferasyonu ve Hücre Döngüsünün Değerlendirilmesi	34
3.8.	Annexin V ile Erken Apoptozisin Değerlendirilmesi	35
3.9.	İstatistik Analiz	35
<b>4.</b>	<b>BULGULAR</b>	<b>36</b>
4.1.	Prostat Kanseri Hücre Kültür Süpernatantlarının THP1 Monositik Hücrelerinin Morfolojisi Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi	36
4.2.	Prostat Kanseri Hücre Kültür Süpernatantlarının THP1 Hücrelerinin Yüzey Belirteçlerine Etkisinin Değerlendirilmesi	40
4.3.	Prostat Kanseri Hücre Kültür Süpernatantlarının THP1 Monositik Hücrelerinden Sitokin Salınımına Etkisinin Değerlendirilmesi	48
4.4.	Prostat Kanseri Hücre Kültür Süpernatantlarının THP1 Hücrelerinin Fagositozuna Olan Etkisinin Değerlendirilmesi	50
4.5.	Prostat Kanseri Hücre Kültür Süpernatantlarının THP1 Hücrelerinde Hücre Siklusuna Etkisinin Değerlendirilmesi	52
4.6.	Makrofajların, Prostat Kanseri Hücrelerinde Apoptozise Olan	

Etkisinin Değerlendirilmesi	55
<b>5.TARTIŞMA</b>	55
<b>6.SONUÇLAR VE ÖNERİLER</b>	62
<b>7.KAYNAKLAR</b>	64
<b>8. EKLER</b>	
<b>Ek-1 Tez Çalışması Etik Kurul İzni</b>	
<b>Ek-2 Tez Çalışması Orjinallik Raporu</b>	
<b>Ek-3 Dijital Makbuz</b>	
<b>9. ÖZGEÇMİŞ</b>	

## SİMGE VE KISALTMALAR

<b>5-HETE</b>	5-Hidroksieikosatetraenoik asit
<b>ADCC</b>	Antikora Bağımlı Hücrel Sitotoksisite
<b>ARG1</b>	Arginaz 1
<b>BCG</b>	Bacillus Calmette Guerin
<b>C5a</b>	Kompleman C5a
<b>CARKL</b>	Karbonhidrat Kinaz Benzeri Protein
<b>CSF-1</b>	Koloni stimüle faktör
<b>CTL</b>	Sitotoksik t hücresi
<b>CXCR7</b>	Kemokin reseptör 7
<b>DAMP</b>	Damage-associated molecular patterns
<b>ECM</b>	Hücre dışı matrisi
<b>EMT</b>	Epiyelyal-mezenkimal geçiş
<b>Etoposide</b>	Kemoterapötik ilaç
<b>FMLP</b>	N-formilmetionin-lösil-fenilalanin
<b>HIF-1<math>\alpha</math></b>	Hipoksi-indüklenbilir faktör 1-alfa
<b>HMGB1</b>	Yüksek mobilite grubu kutu 1 proteini
<b>HPV</b>	İnsan papilloma virüsü
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	İnterferon gama
<b>IL</b>	İnterlökin
<b>İNOS</b>	İndüklenbilir nitrik oksit sentazları
<b>IRAK 4</b>	IL-1R ilişkili kinaz 4
<b>IRF-1</b>	IFN düzenleyici faktör-1
<b>LNCap</b>	İnsan Kafkas prostat karsinom hücre dizisi
<b>M1</b>	Klasik olarak aktive edilmiş makrofajlar
<b>M2</b>	Alternatif aktive edilmiş makrofajlar
<b>MAPK</b>	Mitojenle ilişkili protein kinazı
<b>MCP-1</b>	Monosit kemoatraktan protein-1
<b>M-CSF1</b>	Makrofaj Koloni uyarıcı faktör 1
<b>MENK</b>	Metiyonin ensefalin
<b>MFG-E8</b>	Süt yağı globul-epidermal büyüme faktörü faktörü 8
<b>MIF</b>	Makrofaj göçü inhibe edici faktör

<b>MMP</b>	Matris metaloproteinazlar
<b>MPE</b>	Malign plevral efüzyon
<b>MPL</b>	Monofosforil lipid A
<b>MYD88</b>	Miyeloid Farklılaşma Primer Yanıt Protein
<b>OXE1R</b>	Oxoeicosanoid reseptörü 1
<b>PAMP</b>	Patojen ilişkili moleküler model
<b>PC3</b>	İnsan adenokarsinom prostat kanseri hücre dizisi
<b>PDGF</b>	Trombosit kaynaklı büyüme faktörü
<b>PD-L1</b>	Programlanmış ölüm ligandı 1
<b>PGE2</b>	Prostaglandin E2
<b>PI3K/AKT</b>	Fosfoinositid-3-kinaz-protein kinaz
<b>PITPNM3</b>	Fosfatidilinositol Transfer Proteini, Membran-İlişkili 3
<b>PRR</b>	Model tanıma reseptörleri
<b>SOCS3</b>	Sitokin sinyallemesini baskılayıcı 3
<b>STAT-1</b>	Sinyal transdüsyon ve transkripsiyon aktivatörü 1
<b>TAM</b>	Tümör ile ilişkili makrofajlar
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Transforming büyüme faktörü beta
<b>THP-1</b>	İnsan akut monositik lösemi hücre hattı
<b>Tie2</b>	Tirozin-protein kinaz reseptörü
<b>TIRAP</b>	TIR ilişkili protein
<b>TLR</b>	Toll like reseptör
<b>TLR4L</b>	Toll like reseptör dört ligandi
<b>TLR8L</b>	Toll like reseptör 8 ligandi
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Tümör nekroz faktör alfa
<b>TRAF 6</b>	Tümör nekrozis faktör reseptör ilişkili faktör 6
<b>TRAM</b>	TRIF ile ilişkili adaptör molekül
<b>TRIF</b>	TIR bölgesi IFN-beta indükleyen adaptör proteini
<b>VEGF</b>	Vasküler endotel büyüme faktörü

## ŞEKİLLER

### Şekil

2.1.Makrofajların gelişimi ve farklılaşması (8)	4
2.2.Makrofaj Polarizasyon(18)	6
2.3.TAM'ların tümör mikroçevresindeki kökeni ve polarizasyonu(39)	8
2.4.TAM'ların Tümör Progresyonuna Etkileri (39)	10
2.5.TLR'lerin aktivasyonundan sonra gelişen sinyal iletimi sonucunda hücrede gelişen inflamatuvar yanıtın şematik gösterilmesi(90)	18
2.6.TLR'ler ve immün sistem ilişkisi (101)	21
2.7.TLR'ler ve Tümör ekstrasellüler matriks(ECM) ilişkisi. Tümör hücreleri ECM'e tutunurlar, tümör hücrelerinde TLR ekspresyonunun olması ve B-71 ve B-72 kostimulatörler varlığında, tümörün proliferasyonunu ve invazyonunu artırır.(101)	22
12. 8.CCL2-CCR2 ve CCL22-CCR4 kemokinlerinin TAM'lar ve prostat kanseri hücreleri arasındaki etkileşimlerin şematik gösterimi. (125)	26
2.9.Prostat Kanserinde TLR Dağılımı (135)	28
4.1.THp1 hücrelerinin hücre kültür medyumundaki morfolojik görüntüsü(Kontrol Hücreleri)	37
4.2. PC3 hücrelerinin hücre kültür medyumundaki yuvarlık morfolojik görüntüsü	38
4.3. THp1 hücrelerine PC3 hücrelerinin süpernatant varlığında morfolojik görüntüsü (A), TLR4a varlığında (B),TLR8a (C) ve TLR4+8 agonistlerinin kombine varlığındaki(D) morfolojik görüntüsü	38
4.4. THp1 hücrelerinin PMA uyarımı sonrasındaki morfolojik görüntüsü	39
4.5. THp1 hücrelerinin hücre medyumundaki morfolojik görüntüsü	40
14.6.THp1 hücrelerinin PC3 hücrelerinin süpernatantlarının varlığında CD68, CD206, HLA-DR, CXCR2 ve CXCR7 yüzey ekspresyonlarının grafik olarak dağılımı	42
4.7.THp1 hücrelerinin PC3 hücrelerinin süpernatantları varlığında CD68, CD206, HLA-DR, CXCR2 ve CXCR7 yüzey ekspresyonlarının dağılımını gösteren akım sitometri histogramları	43

- 4.8. THP1 hücrelerinin, TLR4 agonisti ile uyarılmış PC3 hücrelerinin süpernatantları varlığında CD68, CD206, HLA-DR, CXCR2 ve CXCR7 yüzey ekspresyonlarını dağılımının grafik olarak gösterilmesi 43
- 4.9. THP1 hücrelerinin, TLR4 agonisti ile uyarılmış PC3 hücrelerinin süpernatantları varlığında CD68, CD206, HLA-DR, CXCR2 ve CXCR7 yüzey ekspresyonlarını dağılımını gösteren akım sitometri histogramları 44
- 4.10. THP1 hücrelerinin, TLR8 agonisti ile uyarılmış PC3 hücrelerinin süpernatantları varlığında CD68, CD206, HLA-DR, CXCR2 ve CXCR7 yüzey ekspresyonlarını dağılımının grafik olarak gösterilmesi 44
- 4.11. THP1 hücrelerinin, TLR8 agonisti ile uyarılmış PC3 hücrelerinin süpernatantları varlığında CD68, CD206, HLA-DR, CXCR2 ve CXCR7 yüzey ekspresyonlarını dağılımını gösteren akım sitometri histogramları 45
- 4.12. THP1 hücrelerinin, TLR4+TLR8 agonistleri ile uyarılmış PC3 hücrelerinin süpernatantları varlığında CD68, CD206, HLA-DR, CXCR2 ve CXCR7 yüzey ekspresyonlarını dağılımının grafik olarak gösterilmesi 45
- 4.13. THP1 hücrelerinin, TLR4+TLR8 agonistleri ile uyarılmış PC3 hücrelerinin süpernatantları varlığında CD68, CD206, HLA-DR, CXCR2 ve CXCR7 yüzey ekspresyonlarını dağılımını gösteren akım sitometri histogramları 46
- 4.14. MultiArray ELISA yöntemiyle değerlendirilen, THP1 hücrelerinden salınan inflamatuvar sitokinlerin sonuçları pozitif ve negatif kontroller ile birlikte gösterilmiştir 49
- 4.15. THP 1 hücrelerindeki fagositoz aktivitesinin grafik olarak dağılımını gösteren sonuçları 51
- 4.16. THP 1 hücrelerindeki fagositoz aktivitesinin akım sitometri histogramları 52
- 4.17. THP1 hücrelerinde hücre siklusu sonuçlarının grafiksel olarak dağılımı 53
- 4.18. THP1 hücrelerinde hücre siklusu sonuçlarının grafiksel olarak dağılımını gösteren akım sitometri histogramları. A. PC3 süpernatant B. TLR4 agonist içeren PC3 süpernatant C. TLR8 agonist içeren PC3 süpernatant D. TLR4+TLR8 agonistlerini içeren PC3 süpernatant 54
- 4.19. Makrofajların, PC3 prostat kanser hücrelerinde apoptozise olan etkilerini göstermek için yapılan transwell deney düzeneği 56

4.20. PC3 hücrelerinde transwell deneyi sonrasında apoptozis sonuçlarının grafiksel olarak dağılımı	57
4.21. PC3 hücrelerinde transwell deneyi sonrasında apoptozis sonuçlarının akım sitometri histogramları	57



**TABLULAR****Tablo**

2.1.M1, M2 ve TAM makrofajlarının polarizasyonuna yer alan moleküller	11
2.2.Kanser İmmünoterapi Yaklaşımlarının Özeti	14
2.3.TLR ligandları (PAMP'lar) ve ligandların kökenleri	19
2.4.Çeşitli Kanserlerde Kullanılan TLR Agonistleri	24
4.1.TH1-1 hücrelerinin tüm deney koşullarındaki hücre yüzey belirteçlerinin özellikleri	48
4.2.MultiArray ELISA yöntemiyle değerlendirilen, TH1 hücrelerinden salınan inflamatuvar sitokinlerin sonuçları grafik olarak pozitif ve negatif kontroller ile birlikte gösterilmiştir	50

## 1. GİRİŞ

Prostat kanseri, erkeklerde kanser ile ilişkili ölüm nedenleri arasında ikinci sırada yer alan bir kanser tipidir. Prostat kanseri gelişiminde yaş, ırk ve aile hikayesi olması hastalık riski ile ilişkili nedenlerdir. Prostat kanserinin progresyonu karmaşık olup; transformasyon, hipoksi, invazyon, migrasyon ve metastaz gibi bilinen çok aşamalı bir süreç içermektedir. Bu mekanizmaların anlaşılması, kötü hastalık seyri gösteren prostat kanserinin tedavisindeki zorlukların aşılmasında önemli yol gösterici olacaktır. Tümör mikroçevresindeki makrofajlar yani tümör ilişkili makrofajlar (TAM), prostat kanseri mikroçevresinin stromal hücrelerden sonra en belirgin hücreleridir. Çeşitli büyüme faktörleri, sitokinler, kemokinler ve inflamatuvar mediatörler, TAM'ların gelişiminden sorumlu faktörlerdir. Bu faktörlere örnekler, tümörün büyümesi, kötü seyirli olması ve metastazında etkili olan VEGF, PDGF ve IL-10'dur. Bunlara ilaveten tümör mikroçevresinde, yüksek sayıda TAM'ların bulunması prostat kanserinin invazyonunu, anjiogenezini ve erken metastazını kolaylaştıran çok önemli bir belirteçtir. Tümör mikroçevresinde bulunan TAM'lardan salınan IL-10, TGF $\beta$ , IL-6 ve IL-8 gibi inflamatuvar sitokinler kanser hücrelerinin gelişimini ve metastazını kolaylaştırır. M2 tipi makrofajlardan gelişen TAM'lar, birçok tümörde yoğun olarak bulunur ve tümörü infiltre eden TAM sayısının yüksek olması hastalığın kötü prognozu ile de ilişkilidir. Bu nedenle TAM'ların kontrolü ve regülasyonu tümörlerin prognozunu iyileştirmek için anahtar faktörlerden birisidir. Tümöre karşı immün yanıt, antijen sunan hücrelerin üzerindeki TLR aktivasyonu ile tümöre spesifik T hücre cevabını arttırarak gerçekleşmektedir. Bugünkü bilgilere göre, tümör içinde bulunan TAM'ların gelişmesinde tümörden salınan soluble faktörlerin etki mekanizmasının temeli net bilinmemektedir. TAM'ların kontrolü ve düzenlenmesine yönelik yeni tedavi yaklaşımları içinde TLR agonistlerinin kullanımı, potansiyel değer taşımaktadır. TLR agonistleri ile uyarılan tümör hücrelerinden salınan soluble faktörlerin, tümör çevresindeki makrofaj polarizasyonunun M1 yönünde gelişmesini sağlayarak tümöre karşı immün yanıtı arttırabileceği öngörülmektedir. Tümör mikroçevresinde bulunan makrofajların polarizasyonunu tümör hücrelerinden salınan soluble faktörler etkilemektedir. Bu tez çalışmasında, TLR agonistleri ile uyarılan tümör hücrelerinden salınan soluble faktörlerin etkisiyle makrofajların M1 yönünde

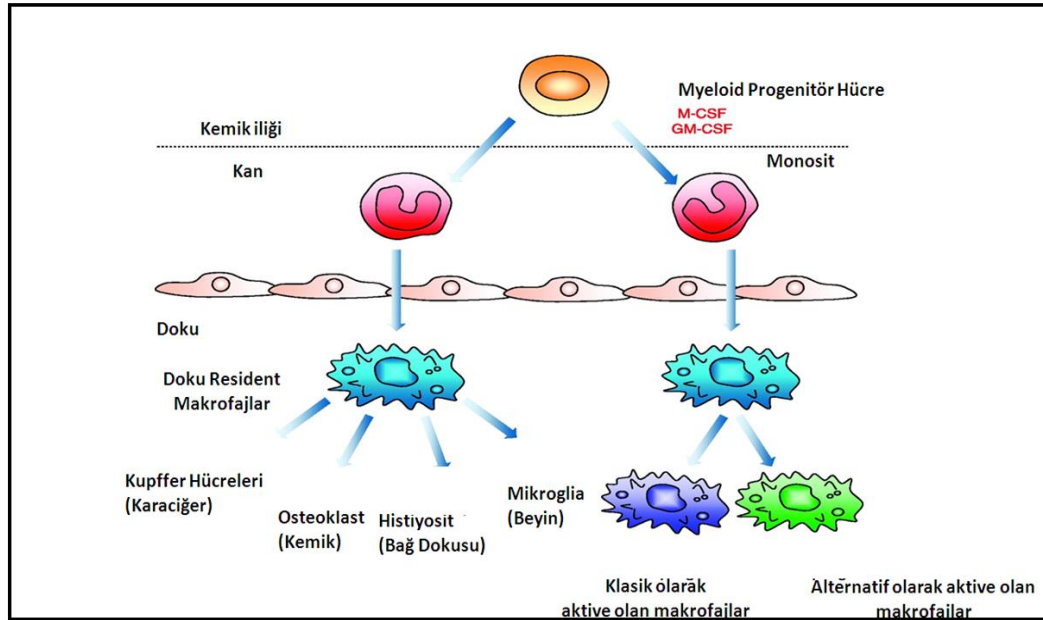
farklılaşmasını sağlayarak tümör hücrelerinin progresyonunun baskılanması araştırılmıştır. Çalışmada, *in vitro* model olarak monosit farklılaşması için insan monositik hücre dizisi olan THP-1 hücreleri ve kanser hücresi olarak da PC3 prostat adenokarsinom kanser hücre dizisi kullanılmıştır. PC3 prostat kanser hücre kültür süpernatantlarının ve TLR4, TLR8 agonistlerinin, makrofaj morfolojisi, farklılaşması, sitokin salınımı, ve fagositoz fonksiyonlarına etkisi araştırılmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Monosit ve Makrofaj Gelişimi

Monositler, inflamasyon ve homeostazda anahtar rol oynayan lökositlerdir. Kemik iliğindeki hematopoetik kök hücre progenitörlerden köken alırlar ve kan dolaşımından periferik dokulara geçerler. Enfeksiyon bölgesinde veya hasarlı dokuda, patojene karşı hem doğal hem de adaptif immün yanıtlara aracılık eden dendritik hücrelere veya makrofajlara dönüşebilirler. Monositler, geniş plastisite ve heterojenite gösterirler ve farklı fonksiyonel fenotiplere farklılaşırlar. Şekil 2.1’de makrofajların gelişimi ve farklılaşması gösterilmiştir. Monositlerin fenotipik özelliklerine göre üç alt sınıfı vardır. 1. Klasik monosit, CD14 hücre yüzey reseptörünün (CD14<sup>++</sup> CD16<sup>-</sup> monosit) yüksek düzeyde ekspresyonu ile karakterize edilir. 2. Klasik olmayan monosit, CD14’ün düşük düzeyli ekspresyonunu ve CD16 reseptörünü (CD14<sup>+</sup> CD16<sup>++</sup> monosit) taşırlar. 3. CD14’ün yüksek düzeyde ekspresyonu ve CD16 (CD14<sup>++</sup> CD16<sup>+</sup> monositler) taşıyan monositlerdir (1). Monositler, hematopoietik kök hücrelerden farklılaşan monoblastlar, bipotent hücreler olarak adlandırılan prekürsörlerden kemik iliği tarafından üretilir. Monositler kan dolaşımında yaklaşık 1-3 gün boyunca dolaşır ve daha sonra tipik olarak makrofajlara ve dendritik hücrelere farklılaşarak dokulara hareket ederler. Kandaki lökositlerin %3’ünü oluştururlar. Monositlerin yaklaşık yarısı, kırmızı-pulp içindeki kümelerde yedek olarak bulunur. Ayrıca, monositler kandaki en büyük korpuslardandır (2). Diğer hücreler tarafından üretilen birçok faktör, kemotaksisi ve monositlerin diğer işlevlerini düzenleyebilir. Bu faktörler arasında, özellikle monosit kemotaktik protein-1 (CCL2) ve monosit kemotaktik protein-3 (CCL7) gibi kemokinler; Lökotrien B4 ve 5-Hidroksialosatetraenoik asit ve OXE1 reseptör agonistlerinin 5-okso-eicosatetraenoik asit familyasının üyeleri gibi bazı araşidonik asit metabolitleri (ör., 5-HETE ve 5-okso-ETE); ve N-formilmetionin leusil-fenilalanin ve diğer N-formile edilmiş oligopeptitler yer alır (3). Diğer bazı mikrobiyal ürünler monositleri doğrudan aktive edebilir ve bu da pro-inflamatuvar sitokinlerin üretimine neden olur. Monositler tarafından üretilen sitokinler, TNF, IL-1 ve IL-12’dir. Faralarda monosit gelişimi, hayatta kalma, koloni stimüle eden faktöre (CSF-1) bağlıdır. CSF1R’den yoksun olan fareler, şiddetli monosit eksikliği

gösterirler (4). Bununla birlikte, TGF- $\beta$ 1, FMLP, MCP-1 ve C5a, inflamatuvar bölgelere monosit geçişi için kritiktir, ancak monosit sağkalımı üzerinde çok az etkilidirler (5). M-CSF, makrofajlara farklılaşmada görev alabilir ve bu faktör hücre döngüsü ile ilişkili siklin A2, B1, B2, D1, D3 ve E2 gibi hücre proliferasyonunun pozitif düzenleyicilerinin transkripsiyonu ile ilişkilidir (6). Transkripsiyon faktörleri hücre kaderinde önemli rol oynar. Transkripsiyon faktörleri-eksik farelerde monosit fagosit sisteminin eksikliği görülür. PU.1 (miyeloid transkripsiyon faktörü) myeloid soyunun en erken adımları için gereklidir (7).

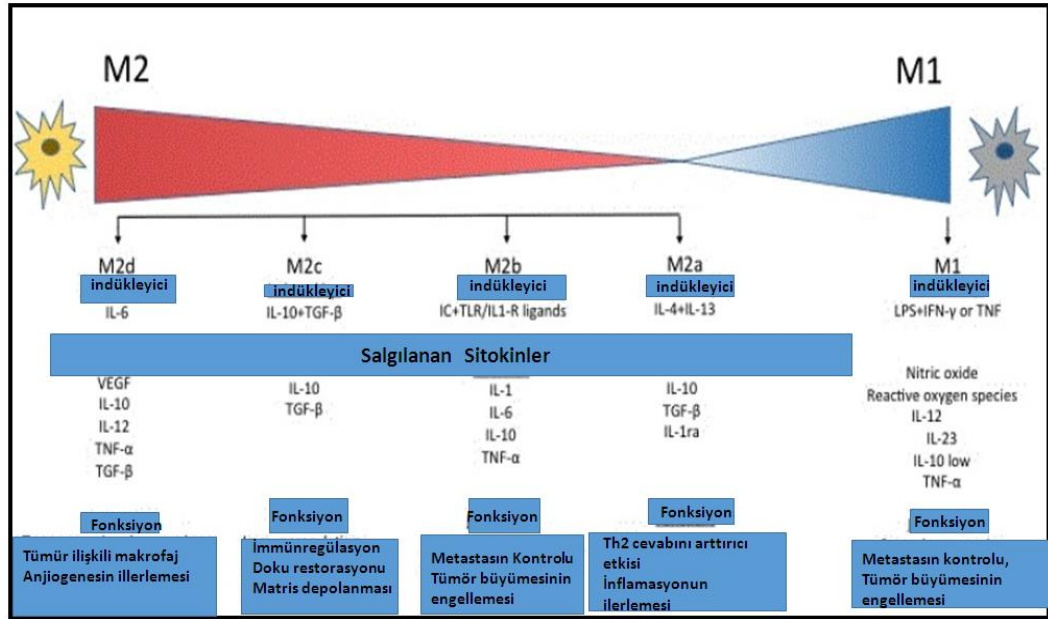


**Şekil 2.1.** Makrofajların gelişimi ve farklılaşması (Referans 8’den uyarlanmıştır).

## 2.2. Makrofaj Polarizasyonu

Makrofajlar myeloid hücre serisinden kaynaklanan hücrelerdir. Doğal immün sistemin hücreleri olup temel görevleri arasında mikropların fagozitozunu yapmak ve ölü / hasarlı hücreleri temizlemek yer almaktadır. Makrofajlar, aldıkları uyarı tipine bağlı olarak, pro-inflamatuvar sitokinlerden anti-inflamatuvar cevaba kadar değişen farklı yanıtlar gösterebilirler (8). Makrofajlar çeşitli alt gruplara ayrılırlar. M1 makrofajlar veya klasik olarak aktive olan makrofajlar fagositoz yapan ve çok

miktarda reaktif oksijen ve azot türevlerini üreten hücreler olup Th1 tipi cevabı aktive ederler (9). M1 makrofajlar, iki önemli inflamatuvar sitokin olan IL-12 ve IL-23 salgırlar. IL-12, yüksek miktarda IL-17 salgılayan Th17 hücrelerinin aktivasyonunu ve klonal çoğalmasını arttırarak inflamasyona katkıda bulunur (10). IFN- $\gamma$  ve LPS gibi sinyaller, *in vitro* olarak makrofajları M1 tipi makrofajlara dönüştürür ve LPS veya IFN- $\gamma$ , Toll benzeri reseptör 4 (TLR4) ile etkileşebilir (11). Bu etkileşimde, Trif ve MyD88 yolakları indüklenir. Makrofajların proinflamatuvar yanıtı başlatmaları ile transkripsiyon faktörlerinden IRF3, AP-1 ve NF $\kappa$ B'nin aktivasyonu ve TNF, interferon, CXCL10, NOS2, IL-12 aktivite artışı görülür (12). Klasik olarak aktive olan makrofajlar, STAT1'in indüksiyonunu başlatarak CXCL9, CXCL10'u hedefleyen transkripsiyon faktörü (IP-10), IFN düzenleyici faktör-1 (IRF-1) ve sitokin baskılayıcı sinyal-1' aktive ederler (13). Kansere karşı makrofaj cevabında, M1 tipi makrofajlar tümöre karşı immün yanıtta rol oynarlar. M2 makrofajlar, inflamasyona karşı, anjiyogenezde ve doku onarımı sürecinde rol oynayan hücrelerdir. Çöpçü (scavenger) reseptörleri taşırlar ve büyük miktarda IL-10 ve diğer anti-inflamatuvar sitokinler üretirler (14). Bazı MHC-II moleküllerinin regülasyonunu sağlarlar. IL-10, M2 makrofaj aracılı Th2 yanıtını arttırır ve Th2 hücrelerinden IL-3 ve IL-4 üretimini artmasına neden olur. IL-4, iyileşme sürecinde önemli bir sitokindir; çünkü ekstraselüler matris üretimine katkıda bulunur (15). M2 makrofajları, farklı molekül setleri ve farklı aktivasyon tepkileri ile indüklenen farklı alt gruplara sahiptir: M2a, M2b, M2c, M2d. M2 makrofajlar genellikle profibrotik özellik taşıyabilir. M2a makrofajları, IL-4 ve IL-13 tarafından indüklenir. IL-4 ve IL-13, IL-4R'ye bağlanır ve Jak / Stat6 yolunu harekete geçirir. CCL17, ARG1, IRF4, IL-10, SOCS3 ekspresyonu artar ve inflamasyona karşı cevap kuvvetlenir. M2b makrofajlar, Th2 aktivasyonu ve immün yanıt düzenlenmesinde rol alır ve genellikle regülatuvar olarak kabul edilir. Bunlara ilave olarak, bu tip makrofajlar IL-10, CCL1, IL-1 ve IL-6 üretirler (16). M2c (IL-10 veya TGF- $\beta$ ) aynı zamanda deaktive olarak da tanımlanan bağışıklık bastırma, doku onarımı ve matris yeniden biçimlendirme ile ilgilidir. M2c makrofajlar, IL-10 ve TGF- $\beta$  varlığında polarize olur. IL-10 ve TGF- $\beta$  üretimini arttırırlar ve CD163 eksprese ederler. M2d makrofajlar, tümöre yardımcı olabilecek fonksiyonlar sergiler. Yeni kan damarlarının büyümesine izin vererek tümör hücre ilerlemesini ve büyümesini arttırırlar (17).



Şekil 2.2. Makrofaj Polarizasyonu (Referans 18'den uyarlanmıştır).

### 2.3. Tümör İle İlişkili Makrofajlar (TAM'lar)

TAM'lar, inflamasyon ve kanser ilişkisinde önemli bir rol oynamaktadır. TAM'lar, tümör hücrelerinin çoğalması, yayılması ve metastazını artırır, tümör anjiyogenezisini uyarabilir ve T hücrelerinin aracılık ettiği tümöre karşı immün yanıtı inhibe edebilir ve böylece tümör progresyonunu teşvik edebilirler (19). TAM'lar ve malign tümörler arasındaki ilişkinin çözülmesiyle, TAM'ların tanı ve prognozda biyolojik belirteç olarak potansiyeli önem kazanabilecektir. Ayrıca, kanser için potansiyel terapötik hedef olarak önem kazanabilirler.

### 2.3.1.TAM'ların Kaynağı

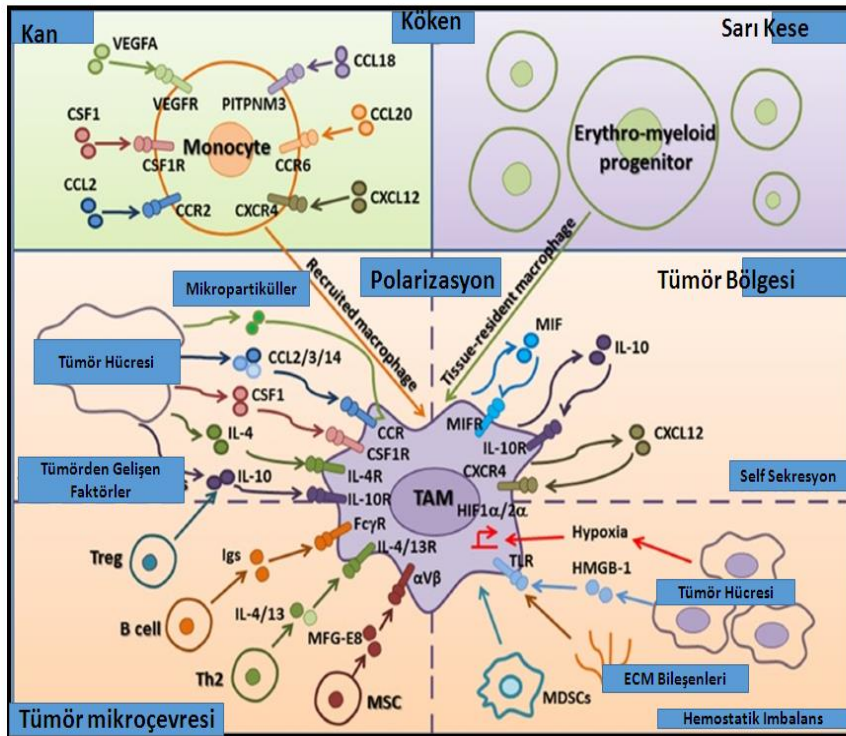
Doku makrofajları kemik iliğinden üretilirler ve yerleştikleri dokuya göre isimlendirilirler. Akciğer alveolar ve peritoneal makrofajlar, karaciğer Kupffer hücreleri, epidermal Langerhans hücreleri ve beyin mikroglia'sı, dokularda bulunan makrofajlardır (20). Kemik iliğinden üretilen monositler periferik kana ve dokulara geçerler. Stromal hücreler ve tümör hücreleri tarafından üretilen kemokinler ve büyüme faktörlerine yanıt olarak TAM'lara dönüşürler (21). Bir glioma tümör modeli ile yapılan çalışmada, kemokin (C-C motifi) ligandı (CCL) 2'nin kemokin (C-C motifi) reseptör (CCR) 2'ye bağlanması sonucunda, primer tümör ve metastazında monositlerin birikiminin gerçekleştiği gösterilmiştir (22). Xenograft modelli başka bir çalışmada da, IL-4 varlığında, vasküler endotelial büyüme faktörü A (VEGFA) monositler için kemotaktik faktör olarak etki göstermiştir. Bunun sonucunda da TAM'ların farklılaşmasının desteklendiği gösterilmiştir (23). İnsan meme kanseri modellerinde, CCL18'in reseptörü PTPN3'e bağlanmasının, CSF2 ile birlikte makrofajların alınmasına aracılık ettiği gösterilmiştir (24). Kolon kanser modellerinde, makrofajların tümör mikroçevresinde birikimine de, CCL20'nin reseptörü CCR6'ya bağlanması aracılık etmektedir (25). Kolon kanseri hücresi kökenli CSF 1'in, makrofajların toplanmasında etkili olduğu gösterilmiştir (26). CCL2, 3 ve 14 kemokinleri de multipl myelomda makrofaj proliferasyonunu ve polarizasyonu uyarır (27). IL-10 sitokini de makrofajlarda, pro-inflamatuar sitokinlerin ve kemokinlerin üretimini inhibe eder (28). Prostat kanserinden türetilmiş katelisinler, makrofajların M2-benzeri fenotipe uyarılmasına aracılık eder (29). Hipoksik kanser hücresinden üretilen Onkostatin M ve Eotaksin de makrofajların M2 tipinde polarizasyonunu sağlar (30). Soluble MHC I zincirine bağlı molekül, STAT3'ün aktivasyonu yoluyla makrofajları TAM'lara farklılaştırmaktadır (31).

Th2 CD4<sup>+</sup> hücrelerinden salınan IL-4, düzenleyici T hücrelerinden (Treg'ler) salınan IL-10 ve B hücrelerinden üretilen immünoglobülinler (Ig), makrofaj polarizasyonunun protümöral fenotipte gerçekleşmesinde etkili olur (32). Mezenşimal stromal hücre kaynaklı epitelyal büyüme faktörü 8 proteininin (MFG-E8) makrofajların M2 tipinde polarizasyonunu arttırdığı gösterilmiştir (33). Melanom tümörü oluşturulan farelerde, makrofaj göç inhibe edici faktörün (MIF) TAM



polarizasyonunun önemli bir belirleyici olduğu rapor edilmiştir (34). Bir başka çalışmada ise otokrin CXCL12 üretiminin, monositlerin proanjijojenik ve immünoşüpresif fenotipini modüle ettiği gösterilmiştir (35).

Hipoksi, esas olarak hipoksi indüklenabilir faktör HIF-1 $\alpha$  ve HIF-2 $\alpha$  aracılığıyla, malign dönüşümü ve metastazı desteklemektedir. Bu iki faktörün de, makrofaj fonksiyonunu düzenleyici rolleri olduğu gösterilmiştir (36). TLR2 ve TLR6 sinyali, makrofajların tümör nekroz faktörü- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) üretimini indükleyerek akciğer kanseri progresyonunu teşvik edebilir (37). Hyaluronan gibi tümör kaynaklı ekstrasellüler matris (ECM) bileşenleri, TAM polarizasyonunu TLR2 ve TLR4 yoluyla yönlendirmede potansiyel önemli faktörler arasında kabul edilmektedir (37).

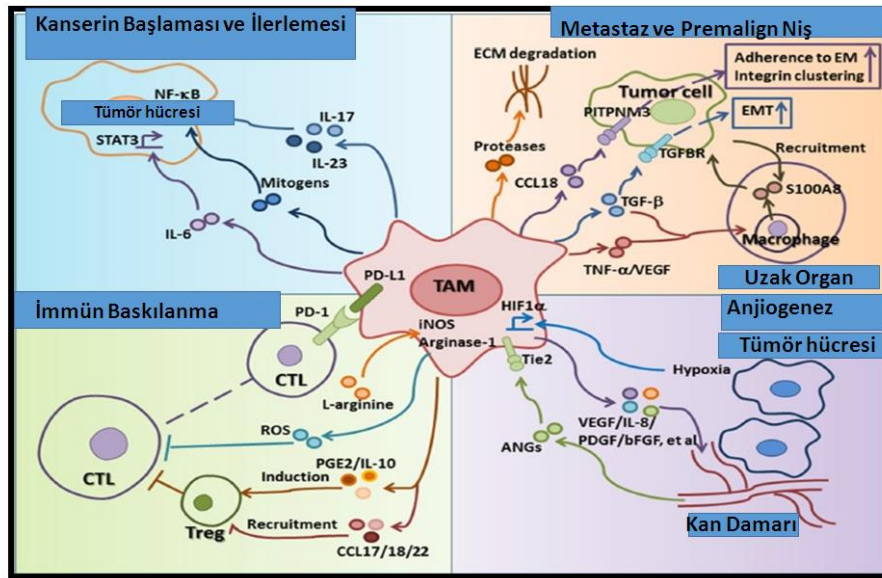


**Şekil 2.3.** TAM'ların tümör mikroçevresindeki kökeni ve polarizasyonu (Referans 38'dan uyarlanmıştır).

### 2.3.2.Kanser ve TAM'lar Arasındaki İlişki

TAM'lar, tümörün başlangıcında ve ilerlemesinde, immün baskılamada, metastazda, premalign niş oluşturma ve anjiyogenezde rol oynamaktadır. TAM'lardan üretilen inflamatuvar sitokinler olan IL-23 ve IL-17'nin tümör progresyonu ile yakından ilişkili olduğu gösterilmiştir (39). Kupffer hücreleri, nükleer faktör  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) bağımlı sinyal mekanizması yoluyla hepatoselüler karsinomun gelişiminde gerekli mitojenleri sağlayabilmektedir (40). Son yıllardaki verilere göre, TAM'lardan gelişen IL-6'nın hepatoselüler karsinom oluşumunu ve gelişmesini STAT3 sinyali yoluyla desteklediği göstermiştir (41). TAM'lar tümörlerdeki başlıca immün düzenleyici hücrelerdendir ve tümör mikroçevresindeki sitotoksik T lenfosit (CTL) yanıtlarını inhibe ederler. Sıçan tümör modellerinde yapılan çalışmada, CD8<sup>+</sup> T hücre artışının TAM'lar tarafından baskılandığı gösterilmiştir (42). TAM'lardan üretilen prostaglandin E2 (PGE2), IL-10 ve indolamin 2,3-dioksijenaz, T-reg'lerin indüksiyonunda önemli rol oynamaktadır. TAM'lardan salgılanan CCL17, CCL18 ve CCL22, T-regler için kemotaktik faktörler olarak rol oynamaktadırlar (43). TAM'ların solid tümör gelişimini desteklediği en kapsamlı mekanizma, metastazı arttıran faktörlerin salınması ve malign hücrelerin nişinin oluşturulmasıdır. İnsan xenograft modellerinde, integrin kümelemesinde rol oynayan CCL18'in, tümör hücresi invazyonu ve metastazı için de gerekli olduğu bulunmuştur (44). TAM'lar; katepsin B, MMP-2, MMP-7 ve MMP-9 proteazlarını üreterek ECM'yi parçalayabilirler. Böylece tümör hücrelerinin invazyonu için ortam oluştururlar. Epitel-mezenkimal geçiş (EMT), TAM'lar ve tümör hücreleri arasındaki etkileşimin önemli bir sonucudur. EMT, tümörün ilerlemesi ve metastazında temel bir rol oynamaktadır. Biriken kanıtlar, TAM'ların kanserlerde EMT'nin düzenlenmesinde kritik bir rol oynadığını düşündürmektedir. TAM kaynaklı faktörler EMT başlangıcında ve ilerlemesinde önemli rol oynamaktadır (45). Yapılan çalışmalar, TAM sayılarının tümörlerde bulunan damarların sayısı ile yakından ilişkili olduğunu göstermiştir. Hipoksi, tümör anjiyogenezinde önemli rol oynar. Makrofajlar, tümörün hipoksik alanlarında ve özellikle nekrotik dokuda bulunur. Makrofajlarda bulunan HIF-1 $\alpha$ , hipoksik bölgelerde, anjiyogenez ile ilişkili VEGF gibi birçok genin transkripsiyonunu düzenler. TAM'lar; VEGF, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8 (CXCL8), trombosit kökenli büyüme faktörü (PDGF), basık fibroblast büyüme

faktörü (bFGF), timidin fosforilaz, MMP'ler ve diğer bazı molekülleri üretirler bu moleküller tümör anjiyogenezini artırarak tümörün büyümesi için intratümöral kan damarı oluşumunu teşvik ederler (46). Şekil 2.4'te TAM'ların tümör progresyonuna etkileri şematik olarak gösterilmiştir. Tie2<sup>+</sup> TAM'lar tümör vaskülarizasyonu ile yakından ilişkilidir ve bu hücrelerin ortotopik ve transgenik tümör modellerinde anjiyogenezde çok önemli rolü bulunmaktadır (47).



Şekil 2.4. TAM'ların Tümör Progresyonuna Etkileri (Referans 38'dan uyarlanmıştır).

### 2.3.3. TAM'ların Metabolizması ve Aktivasyon Yolları

Makrofaj polarizasyonunda çoklu metabolik yollar önemli rol oynamaktadır. Akt1 ve Akt2 gibi protein kinazlar, tümör hücrelerinin hayatta kalmasına, çoğalmasına ve metabolizmayı etkileyerek makrofaj polarizasyonunu değiştirir (48). Diğer protein kinazlar, glikolizinin artırılması ve oksijen tüketiminin azaltılması

yoluyla makrofaj polarizasyonunu glikoz metabolizması yolu aracılığıyla yönlendirebilmektedir. L-arjinin metabolizması ayrıca makrofajlarda sitokin üretimi için önemlidir ve TAM-tümör hücresi etkileşimlerini regüle eden farklı metabolik yollara örnek oluşturur (49). Klasik olarak aktive olan M1 tipi makrofajlar, indüklenabilir nitrik oksit (iNOS) sentezi gerçekleştirir. iNOS, sitotoksik nitrik oksit (NO) üretir ve dolayısıyla hücreler anti-tümör cevabı oluştururlar. Alternatif olarak aktive edilmiş M2 tipi makrofajlarda arjinaz yolağı etkilidir ve tümör hücresi büyümesine katkıda bulunan üre ve L-ornitin üretildiği gösterilmiştir (50). Metabolik yolların doğrudan manipülasyonu, makrofaj polarizasyonunu değiştirebilmektedir. CARKL, RNAi tarafından devreden çıkarıldığında, makrofajlar M1 benzeri bir metabolik yol izlemeye eğilim gösterirler (metabolizma glikoliz ve oksijenin daha az tüketimi), oysa CARKL aşırı eksprese edildiğinde, makrofajlar M2 tipi benzeri bir metabolizma (düşük glikolitik aktivite ve daha fazla oksijen tüketimi) gösterir (51). Tablo 2.1’de Makrofaj polarizasyonunda yer alan moleküller gösterilmiştir.

**Tablo2.1.** M1, M2 ve TAM makrofajlarının polarizasyonunda yer alan moleküller (Referans 52'den uyarlanmıştır).

	M1	M2	TAM
<b>INOS Üretimi</b>	↑	-	+
<b>MHC II Ekspresyonu</b>	↑	↓	↓
<b>CD163 Ekspresyonu</b>	-	+	+
<b>CD200R</b>	-	+	-
<b>Makrofaj C tip</b>	↓	↑	↑
<b>Lectinler</b>			
<b>Uyarana Cevap</b>	IFN-γ, LPS, GM-CSF	IL-4, IL-13, M-CSF, helmint'	Tümör
<b>Arjinaz 1</b>	-	↑	<u>Mikrocevresi</u>
<b>Sitokin Üretimi</b>	IL-18, IL-12, IL-1, TNF	IL-10, IL-12	+
<b>STAT Molekülleri</b>	STAT1, STAT2	STAT3, STAT6	IL-10, TGF-β, CCL2, CCL5
<b>IRAF</b>	IRF5	IRF4	STAT1
<b>NFκB</b>	p65	p50	↑ <sup>IRF3</sup>
<b>PI3K</b>	+	+	p50
<b>Genler</b>	<i>Nos2, Ciita, Il12</i>	<i>Arg1, Ym1, Il10, Mcr1, Fizz1</i>	<i>Ccl2, Ccl5, Il10, CD81, H2Eb</i>

“+” Var, “-” Yok ↑ Yüksek ekspresyon veya üretim, ↓ Düşük ekspresyon veya üretim

### **2.3.4.TAM'ların Kanser Tanısında Biyobelirteç Olarak Kullanılması**

TAM'lar ile malign tümörler arasındaki ilişkinin daha net olarak anlaşılmasından sonra TAM'ların kanser tanısında ve prognozunda rolü olduğunu düşünülmüştür ve TAM'lar potansiyel tedavi hedefleri arasına alınmıştır. TAM'lar yaygın olarak CD163 veya CD206 yüzey belirleyicileri ile tanımlanırlar. Daha önce yapılan çalışmalarda, CD163<sup>+</sup> CD14<sup>+</sup> makrofajların malign plevral efüzyon (MPE) için potansiyel immün tanısal belirteçler olduğu gösterilmiştir (53). Buna ek olarak, 1.8 mg / L'lik bir serum CD163 değerinin, multipl myelomalı hastaların hayatta kalma analizinde sınır değeri olduğu gösterilmiştir (54). Bu veriler, TAM'ların ilerlemiş hastalığın biyolojik belirteçleri olarak kullanılabileceği hipotezini desteklemekte ve TAM'ların tümör hücresi göçünde bir rol oynadığına işaret etmektedir. Çeşitli insan tümör dokuları kullanan immünohistokimyasal çalışmalarda, %80'den fazla TAM sayısının kötü klinik prognoz ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. TAM'ların özofageal skuamöz hücreli karsinomda bağımsız bir prognostik faktör olduğu yapılan bir çalışma ile gösterilmiştir (55). Yüksek yoğunluklu TAM'lar, gastrik kanserin agresif özellikleri ile ilişkilidir ve mide kanseri hastalarında bağımsız bir prognostik belirteç olarak görünmektedir (56). Makrofaj fenotipleri (CD68, MAC387 ve CLEVER-1 / Stabilin-1) özellikle mesane kanserlerinde prognoza yönelik bilgi verebilir (57).

### **2.3.5.TAM'ların İmmünoterapide Kullanımı**

Tümör dokularındaki monosit birikiminin engellenmesi TAM'ların tümör çevresinden uzaklaştırılmasında bir tedavi stratejisi oluşturur. CCL2-CCR2 kemokinlerinin hedeflenmesi, tümör mikroçevresindeki TAM'ların uzaklaştırılması nedeniyle umut verici olmaktadır. Bir CCL2 bloke edici ajanının (Carlumab, CNTO88,) hayvan modellerinde çeşitli kanserlerin gelişimini inhibe ettiği gösterilmiştir. Metastatikdirençli prostat kanseri hastalarında Carlumab ile yapılan faz II çalışmasında, bu antikörün iyi tolere edildiği gösterilmiştir Ancak, metastatik kanser hastalarında CCL2 / CCR2'yi bloke etmediği veya tek başına antitümör aktivite göstermediği tespit edilmiştir. CCR2 antagonisti (PF-04136309),

fare modeli pankreas kanserinde kemik iliği kaynaklı CCR2<sup>+</sup> monositlerin mobilizasyonunu bloke edebildiği ve TAM'ların azalmasına neden olarak tümör büyümesinin ve uzak metastazın inhibisyonuna neden olabildiği gösterilmiştir (58). CCR2 antagonisti (PF-04136309), Folfinox kemoterapötik ilaç ile birlikte, bir Faz 1b denemesi sonucunda iyi tümör yanıtı elde edilmiş olarak bulunmuştur (59). IFN- $\alpha$  ve IFN- $\beta$ 'nin, farklılaşmayı ve apoptozu indükleyerek tümör ilerlemesini inhibe ettiği gösterilmiştir(60). IFN tedavileri anti-proliferatiftir ve hücre döngüsünde S fazını artırabilir.Zhang ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, nude farelerde insan prostat kanseri hücrelerini hedeflemek için IFN- $\beta$  gen tedavisi yapıldı. Adenovirüs aracılığı ile verilen IFN- $\beta$  gen tedavisinin makrofajları aktive ederek tümörün büyümesini ve metastazını inhibe ettikleri gösterildi (61). Kanser immünoterapisinde kullanılabilen bir başka sitokin de makrofaj inhibisyon faktördür (MIF). MIF genellikle solid tümörlerde daha çok salgılanır tümörün kötü prognozu ile ilişkilidir. MIF, agresif makrofaj fonksiyonunu inhibe eder ve bu nedenle makrofajları M2 tipi farklılaşmaya indükler. M2 tipi makrofajlarda tümörün büyümesine ve ilerlemesine yardım eder (62). Tümör mikroçevresindeki M2 tipindeki makrofajları yok etmeye yönelik lipozomlar ile de çalışmalar yapılmıştır. Yüksek düzeyde IL-1 $\beta$  eksprese eden tümör hücreleri daha hızlı büyür ve *in vivo* daha fazla anjiyogenezi indükler. Kimura ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada,IL-1 $\beta$  eksprese eden tümör hücrelerine maruz bırakılan makrofajlar, anjiyojenik faktörler ve kemokinler, vasküler endotelial büyüme faktörü A(VEG-A) ), IL-8, monosit kemoatraktan protein'ler artar. Makrofajları yok etmek için klodronat lipozom kullanıldığında,tümör hücrelerinin daha azIL-1 $\beta$  ürettiği gösterilmiştir (63). Metionin enkefalin (MENK) gibi bileşikler *in vivo* ve *in vitro* antitümör özelliklere sahiptir. MENK, CD64, MHC-II'yi ve nitrik oksit (M1 işaretleri) üretimi arttırırken, CD206 ve argininaz-1'in (M2 belirteçleri) regülasyonunu azaltarak M2 tipindeki makrofajları M1 tipi makrofajlara polarize etme özelliğine sahiptir(64). Yakın zamanda yapılan çalışmalarda, M2 makrofajlarının potansiyel bir inhibitörü olarak bisfosfonatlar kullanılmaya başlanmıştır. Bisfosfonatlar, metastatik meme kanseri hastalarında, kemik rezorpsiyonu gibi iskeletkomplikasyonlarının önlenmesinde kullanılır(65). Bifosfonatlar kemiklere bağlandıklarında, kemik matrisi bifosfonatları endositoz ile alır ve sitoplazmada bifosfonatlar proteinin prenilasyonunu inhibe ederler bu

durum integrin sinyalizasyonunu ve endozomal geçişi engeller ve hücreyi apoptotik hale getirmeye zorlar(66). Bisfosfonat kullanan bir başka çalışma ise farelerde oluşturulan meme tümörlerini hedeflenmesinde zoledronik asit (ZA) kullanılmıştır. Spontan metastatik meme tümörleri geliştiren ve 4 hafta boyunca haftada bir kez intravenöz olarak ZA uygulanan dişi BALB-neuT fareleri ile kontrol fareleriyle (serum fizyolojik enjeksiyonları) karşılaştırıldığında, ZA ile tedavi edilen farelerde sağkalımın arttığı ve tümör büyüme hızının azaldığı gösterilmiştir. Kontrol grubu fareler ile meme tümörlü fareler karşılaştırıldığında, TAM sayısında da azalma gözlenmiş olup ZA'nın tümör alanındaki TAM'ların birikimi, anjiyojeniz ve VEGF salınımını azalttığını göstermişlerdir(67). Tablo 2.2. Makrofajlar ile Kanser İmmünoterapi Yaklaşımları gösterilmiştir.

**Tablo2.3.** Makrofajlar ile Kanser İmmünoterapi Yaklaşımlarının Özeti (Referans 68'den uyarlanmıştır)

Makrofajlar ile Kanser İmmünoterapi Yaklaşımları		
Tip	İsim	Fonksiyonu
Sitokin/Kemokin	IFN $\alpha\beta$	Tümör Progresyonunun İnhibisyonu Kanser Hücrelerinin Apoptozisinin İndüklenmesi
	CCR2	Monosit Birikiminin Önlenmesi
	Anti MIF shRNA	M2 Makrofajların Tümör Bölgesinden Uzaklaştırılması
İnorganik Moleküller	MENK	M2 makrofajların Polarizasyonu
		CD206, Arjinaz 1 ve IL-10 Regülasyonunda Azalma
		CD64, MHC II, TNF $\alpha$ , NO Regülasyonunda Artım
	Bifosfonatlar	TAM'ların Apoptozisinin İndüklenmesi
		TAM Sayısının Azalması
		Anjiyojeniz Bozulması
Katyonik Polimerler	TH1 Cevabının Artımı	
	CD4+ T Hücrelerin Proliferasyonu	
	IL-12 Regülasyonunu Artırması	
Vesiküller	Lipozomlar	IL-1 $\beta$ Üreten Tümör Hücrelerinin Deplesyonu
		Anjiyojenik Faktörlerin İnhibisyonu

### 2.3.6. TAM'ların Aktivasyonun Hedeflenmesi

TAM'lar, çeşitli stratejileri kullanarak aktivasyon seviyesinde hedeflenebilir. CSF1 / CSF1 reseptörü (CSF1R) sinyali, kemik iliğinde monosit öncülerinin üretilmesinde ve tümör dokularında TAM polarizasyonu için kritik önem taşır. Bu

nedenden dolayı, CSF1 / CSF1R sinyali kanser tedavisi için önemli bir hedefdir. CSF1'in genetik kaybı, meme ve nöroendokrin tümör modellerinde metastazın ve tümör progresyonunun gecikmeli olarak azaltılmasına neden olmaktadır (69). miR-26a ekspresyonu, hepatoselüler karsinomda CSF1 ekspresyonunu azaltır. Bu sonuçlara dayanarak, CSF1/CSF1R inhibitörleri klinik çalışmalarda denenmektedir (70). Makrofaj yüzey belirleyicilerinden mannoz reseptör CD206, makrofaja spesifik bir hedef olarak kullanılabilir (71). Yapılan bir çalışmada da heat shock protein ve asparajin endopeptidazında TAM'lerde aşırı ekspresyonu olduğunda etkili bir tedavi hedefi olabileceği gösterilmiştir (72).

### 2.3.7. TAM'ların Tümöre Karşı Yeniden Programlanması

Makrofajların en önemli özelliklerinden birisi de tümör mikroçevresinde fenotiplerini değiştirmelerini sağlayan plastisitedir. Bu nedenle, TAM'ları antitümör bir fenotipe yeniden programlanması cazip tedavi stratejisi olmaktadır. Yapılan çalışmalarda, malign plevral effüzyonu olan solid tümörlü hastalarda CD163<sup>+</sup> TAM'lerin yeniden programlanması potansiyel tedavi için umut verici olduğu gösterilmiştir (73). Nanoparçacıklar TAM'ların tümöre karşı polarizasyonunda kullanılmaktadır. Yakın zamanda Zanganeh ve arkadaşları, Ferumoksitin farelerde subkutanöz adenokarsinomların büyümesini belirgin bir şekilde inhibe ettiğini ve tümör büyümesinin engellenmesine tümör dokularında proinflatuar M1 makrofajlarda bir artıma yol açtığını göstermişlerdir (74). CD40, sitotoksik fonksiyonları inhibe etmek için kullanılabilen makrofajların yüzey belirleyicisidir. Rezeke edilemeyen pankreatik kanserde bir CD40 agonisti ile gemsitabin kombinasyonunun verilmesi tümörlerin regresyonuna neden oldukları gösterilmiştir (75). Yapılan başka bir çalışmada da, TLR agonistleri, anti-CD40 ve IL-10 monoklonal antikorları ile NF- $\kappa$ B yolağı aktive edilmiş bunun sonucunda da makrofajların tümöre karşı M1 tipi fenotip tipinde farklılaşmaya dönüştükleri gösterilmiştir. Bir maya türevi polisakarit olan  $\beta$ -glukanın, TAM'leri M1 fenotipine farklılaştırdığı gösterilmiştir ve kansere karşı güçlü bir immünomodülatör ajandır (75).



## 2.4.Toll Like Reseptörler

Doğal immünte, mikrobiyal ajanlara karşı olan hızlı ve önemli bir savunma mekanizmasıdır.Doğal immün cevapta, Toll like reseptörler (Toll benzeri reseptörler;TLR), mikroorganizmaları patojenle ilişkili moleküler patenler (pathogen associated molecular patterns, PAMPs) ile tanıyarak konakçı savunmasında önemli rol oynayan proteinler olarak bilinirler (76). Toll-like reseptörler (TLR), birçok patojene karşı doğal immün cevabın oluşmasını sağlayan bir grup tip 1 transmembran proteindir. Aynı zamanda adaptif immün cevabın da aktive olmasını sağlayarak konak immünitesinde çok önemli role sahiptirler. İmmün sistem, doğal ve adaptif olarak ayrılan iki kısımda incelenebilen bir savunma sistemidir. Bu iki sistem birbiriyle çok hassas bir denge içerisinde ve yardımlaşma ile çalışarak konağı patojenlere karşı korumaktadır. Doğal immünte, bir patojenle karşılaşınca ilk cevabı doğumdan itibaren oluşturabilen ve konağın kendisine ait olan ve olmayan antijenik yapıyı tanıma kapasitesine sahip olan savunma sistemidir. Adaptif immün sistem, spesifik ve antijenle tekrarlayan karşılaşmalarda daha hızlı ve güçlü cevap oluşturma gibi üstünlüklere sahiptir. Doğal immün sistem, hücreleri; polimorfonükleer lökosit, monosit, makrofaj, eozinofil, mast hücre ve bazofiller, çözümler faktörler ise sitokinler, akut faz reaktanları ve kompleman sisteminden oluşur (77). Organizmanın enfeksiyonlarla mücadelesinde doğal immün sistem, adaptif immünteyle kıyaslandığında patojenleri tanıyan reseptörler açısından daha kısıtlı bir repertuara sahiptir. Adaptif immün sistemin, antijen tanıma kapasitesi çok geniş bir reseptör repertuarıyla spesifiteyi sağlarken, doğal immün sistem patojenlerde ortak olan bir dizi moleküler yapıyı tanıyabilmekte ve böylece konağı ait olan ve olmayanı belirleyerek savunmayı başlatabilmektedir. Patojenler üzerinde bu evrimsel olarak korunmuş moleküler yapılara “hastalık etkenleri ile ilişkili moleküler yapılar (PAMP)” denilmektedir. Doğal immün sistem hücreleri üzerinde bunları tanıyan reseptörlere de “Patern Tanıma Reseptörleri (PRR)” adı verilmektedir. Bu reseptörler, endositik, sekrete edilen ve sinyal ileten olmak üzere üç gruba ayrılır. Sinyal ileten reseptör grubunu TLR ailesi oluşturmaktadır (78). TLR’ler, mikrobiyal ajanlar tarafından üretilen PAMP’ları tanırlar. Bir grup PRR olan ve patojen tanınmasında, inflamatuvar ve immün sistem cevabının başlatılmasında oldukça önemli bir role sahip olan TLR, karakteristik olarak

ekstraselüler lösinden zengin tekrar bölgeleri (LRR) ve intraselüler toll/interlökin (IL-1) reseptör (TIR) domaininden oluşur. TLR, PAMP ile bağlandığında, intrasitoplazmik TIR domaini aracılığı ile bir dizi sinyal iletim yolağı aktive olur. Bunun sonucu olarak da antimikrobiyal proteinlere karşı inflamatuvar sitokinler sentezlenmektedir. İnsanda 10 tane TLR fonksiyonel olarak tanımlanmıştır. Her bir TLR'in ligand spesifitesi farklıdır (79). TLR'ler hem lenfoid hem de lenfoid olmayan dokuda eksprese olmaktadır (80). TLR'inbulunuğu hücre tipleri, Tablo-2.3'de TLR ligandları gösterilmektedir.

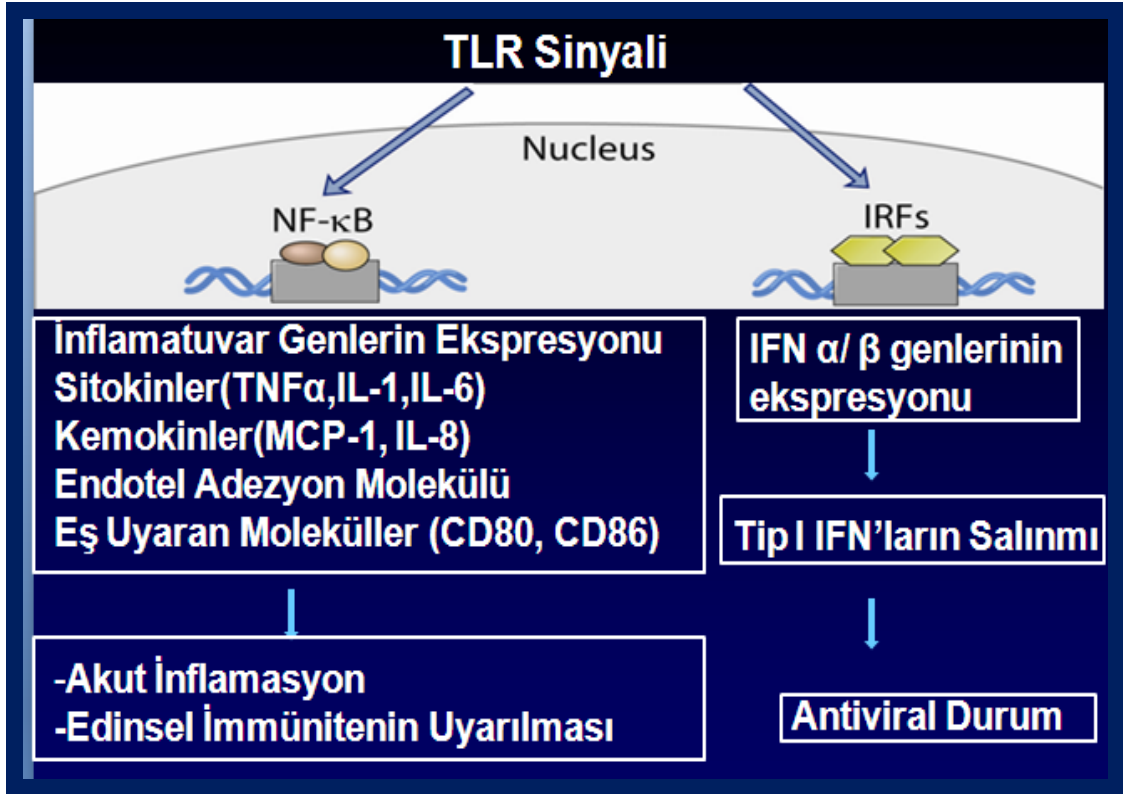
#### **2.4.1.TLR'nin Yapısı ve Fonksiyon**

TLR, sitoplazmik ve ekstrasellüler bölgeden oluşan bir transmembran proteinidir. Sitoplazmik bölgesi, IL-1 reseptörü ile yüksek derecede benzerlik gösterir ve bu nedenle Toll/IL-1 reseptör (TIR) bölgesi olarak adlandırılır. Reseptörlerin ekstrasellüler bölgesinde her biri 24-29 amino asit içeren, lösinden zengin tekrar (LRR) motifleri bulunur.Bu LRR bölgelerinin farklı patojenlerin tanınmasından sorumlu olduğu düşünülür. İnsanlarda TLR ailesinin tanımlanmış10 üyesi (TLR1-10) mevcuttur. TLR 1,2,4,5,6,10 tipleri hücre yüzeyinde, TLR 3, 7, 8, 9 sitoplazmada özellikle endozomlarda bulunur. Doğal immün sistem hücrelerinde bulunan TLR'ler "patojenle ilişkili moleküler patternler" adı verilen bölgeleri taşıyan endojen veya eksojen ligandlar tarafından uyarılır (Tablo2.3). TLR aktivasyonu sonucu patojenlere karşı konakçı cevabı ve otoimmün yanıt oluşur.

#### **2.4.2.TLR' de Sinyal İletimi**

TLR sinyalizasyonunda, myeloid differensiyasyon faktör 88'e (MyD88) bağımlı ve bağımsız sinyal yolu olmak üzere 2 yol tanımlanmıştır. Bu sinyal yollarında başlıca dört adaptör molekül rol oynar: MyD88, TIR bölgesi IFN-beta indükleyen adaptör proteini (TRIF), TRIF ile ilişkili adaptör molekül (TRAM) ve TIR ilişkili protein (TIRAP). MyD88,TLR3 dışındaki tüm TLR tiplerinde, TLR aracılığı ile oluşan doğal immün yanıtın aktivasyonu için başlıca elemandır. Ligandın bağlanması ile uyarılan TLR'nin TIR bölgesi MyD88 ile birleşir. Bu birleşmeyle uyarılan IL-1R ilişkili kinaz 4 (IRAK 4) ve tümör nekrozis faktör reseptör ilişkili faktör 6 (TRAF 6) aracılığıyla Nüklear faktör-kappaB (NFkB),mitojenle ilişkili

protein kinazı (MAPK) aktive eder ve inflamatuvar cevaba neden olur. MyD88 bağımsız sinyal yolu ise başlıca TLR 3 ve 4 tarafından kullanılmaktadır. Bu sinyal yolunda TLR 3, TRIF üzerinden TRAF ve IRF3'üTIRAPproinflamatuvar sitokinlerin (TNF-alfa, IL-1beta, IL-6, IL-8, IL-10), TRIF ve TRAM ise interferonların yapımından sorumludur (Şekil2.5) (81).



**Şekil 2.5.** TLR'lerin aktivasyonundan sonra gelişen sinyal iletimi sonucunda hücrede gelişen inflamatuvar yanıtın şematik gösterilmesi(Referans 81'dan uyarlanmıştır).

**Tablo 2.4.** TLR ligandları (PAMP'lar) ve ligandların kökenleri(Referans 82'den uyarlanmıştır)

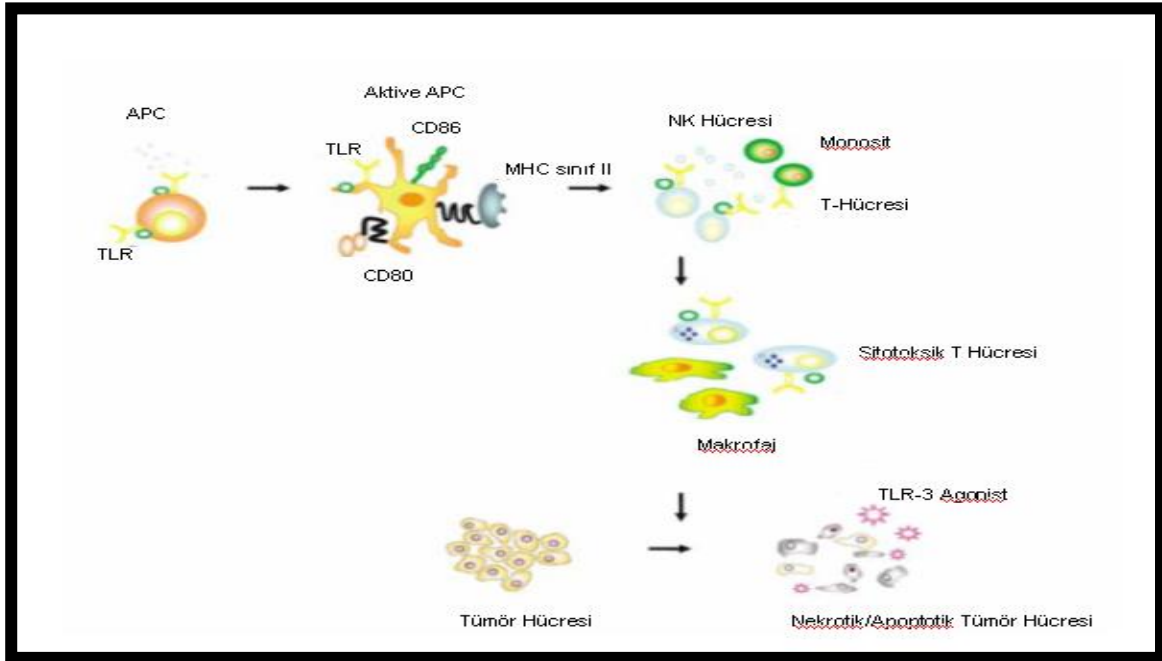
<b>Toll-Like Reseptörler ve Ligandları</b>		
<b>Reseptör</b>	<b>Ligand (PAMPs)</b>	<b>Ligandın Kökeni</b>
TLR1	Triagil lipopeptidler Soluble faktörler	Bakteri ve Mycobacteria <i>Neisseria meningitidis</i>
TLR2	Heat Shock protein 70 Peptidoglycan Lipoprotein/lipopeptides HCV core protein	Konak Gram-positif bakteri Hepatitis C Virus
TLR3	Çift sarmal RNA	Virüser
TLR4	Lipopolysaccharides Envelope protein Taxol	Gram-negatif bakteri Mouse mammary-tumor virus
TLR5	Flagellin	Bakteri
TLR6	Zymosan Lipoteichoic acid Diacyl lipopeptides	Fungi Gram-positive bacteria Mycoplasma
TLR7	Tek sarmal RNA (ssRNA) Imidazoquinoline	Virüsler Sentetik bileşikler
TLR8	Tek sarmal RNA (ssRNA) Imidazoquinoline	Virüsler Sentetik bileşikler
TLR9	CpG-containing DNA	Bakteri, Malaria and Virüsler
TLR10	Tanımlanmadı	Tanımlanmadı
TLR11	Profilin-like molecule	<i>Toxoplasma gondii</i>

### 2.4.3.TLR ve Kanser

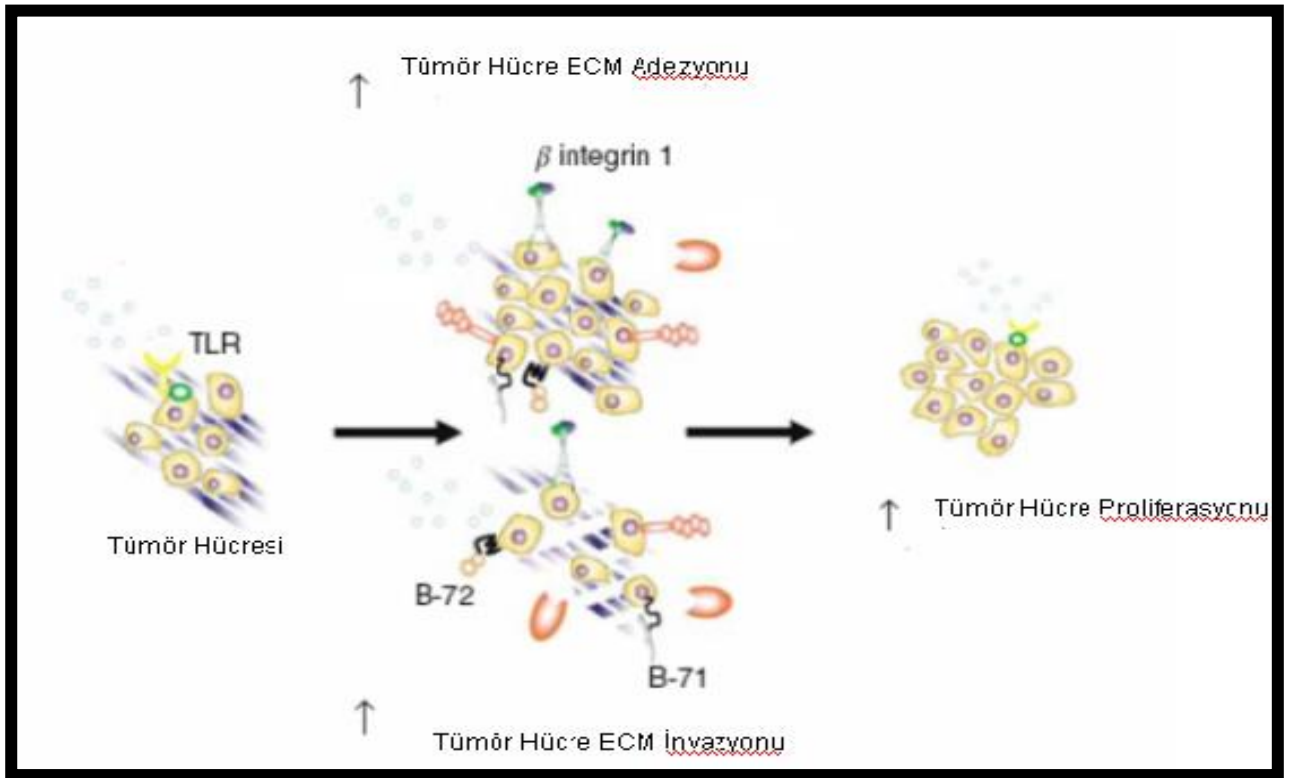
Kanserde; sitokin, kemokin, büyüme faktörleri ve toll like reseptör ligandlarının fonksiyonları önemli rol oynar. Bu faktörler, tümör hücrelerinin proliferasyonunu ve apoptozisini düzenleyen önemli proteinler olup kanser progresyonununu artırır . TLR'ler tümör hücrelerinde metastaz ve kemorezistans gelişiminde anahtar regülatör olarak görev alırlar. TLR'ler hücre yüzeyinde "sensor" olarak bulunurlar ve TLR ligandlarına bağlanmasıyla hücrede sinyal iletim yolları aktif hale gelerek tümör hücrelerinin proliferasyonu, apoptozisin inhibisyonu ve kemoterapötik ilaçlara karşı direnç gelişimine neden olurlar (83). Son yıllarda yapılan çalışmalar, meme kanseri, glioma, gastrointestinal sistem ve larinks kanser hücrelerindeki TLR'lerin tümörün immün sistem denetiminden kaçarak, invazyon ve

metastazdaki önemini göstermiştir. Fare metastatik meme kanser modelinde, lipopolisakkarit (LPS) ile indüklenen tümör hücrelerinde anjiogenez, damar geçirgenliğinde artım sonucu tümör hücre invazyonunda artım bulunmuştur (84). Tümör hücrelerinin progresyonunda, beta 1 integrinin ekstrasellüler matriks proteinlerine adezyonu ile direkt ilişkili olduğu gösterilmiştir (85). TLR4'lerin blokajı ile de tümör büyümesinde gerileme olduğu gösterilmiştir. TLR'lerin tümör hücrelerindeki varlığı tümör gelişimi üzerine fayda sağlasa da, uygun adjuvanlar kullanılarak tümör antijenlerine karşı immün cevabın artırılması sonucunda etkin antikör üretimi ve NK hücre fonksiyonları artmaktadır. Öyle ki dendritik hücreler (DC) üzerinde bulunan TLR3, çift sarmal RNA (dsRNA) ile aktive olur ve bunun sonucunda DC'ler tip I IFN salgılayarak, NK hücre sitotoksitesini arttırlar sonuçta tümör hücreleri apoptozise gider. Yine benzer şekilde B hücreli lenfoma hücreleri TLR9 taşırlar. TLR9 CpG ODN ile tanıyarak lenfoma tedavisinde kuvvetli bir adjuvan tedavi olarak etki gösterir. "Imiquimod" bir TLR 7 agonisti olup bazal hücreli karsinom'un tedavisinde kullanılması onaylanan bir ajandır (86). TLR7 agonistlerinin de KLL'de faz I çalışmalarında kullanımı da iyi sonuçlar vermiştir. KLL'de yüksek oranda TLR7 ve TLR9 ekspresyonu bulunur (Tablo2.3). Bunların agonistleri ile TLR7 ve 9'un uyarılması sonucunda NK ve sitotoksik T hücre aktivitesi artar ve sonuçta KLL hücreleri apoptozise giderek ortadan kaldırılır. TLR agonistleri, aynı zamanda tümör mikroçevresini değiştirerek anjiogenezi inhibe eder. TLR7, 8 ve 9'un aktivasyonu tip I IFN sentezi artımı ile antijen sunumu kuvvetlenir. Bunun sonucunda da sitotoksik T hücrelerinin aktivasyonu ile Th1 cevabının artımı yönünde etkin immün cevap gelişir (87). Kronik inflamatuvar hastalıkların TLR sinyal yoluyla kanser gelişiminde katkısı olduğu gösterilmiştir (88). Yapılan çalışmalarda farklı tümör hücre tiplerinde TLR ekspresyonunun artmış olduğu rapor edilmiştir. Knockout farelerle yapılan inflamasyonla ilişkili kanser modellerinde, TLR veya TLR adaptör molekülleri eksikliğinde tümör sayısının, büyüklüğünün ve displazinin azaldığı gözlenmiştir. İnflamatuvar hücrelerden salınan çeşitli endojen TLR ligandları, prekanseröz hücrelerdeki TLR sinyal yolunu aktive ederek sitokinlerin, büyüme faktörlerinin, anjiogenik faktörlerin ve ekstrasellüler matriksi yıkan proteazların açığa çıkmasını sağlar (89). Böylece kanser gelişimini ve kanserin ilerlemesini destekleyen mikro çevresel şartları oluşturur. Hem onkogen

hem de tümör süpresörlerini posttranskripsiyonel düzeyde regüle eden mikroRNA'lar ile TLR arasındaki ilişki de kanser oluşumunda önemlidir. Çeşitli kanser türlerinde ekspresyonu artan mikroRNA'ların TLR 2, 3, 4 ve 9 ile ilişkili olduğu gösterilmiştir .TLR'nin NF-kB'ı uyarması sonucu antiapoptotik protein düzeylerinde artma, proapoptotik protein düzeylerinde azalma belirlenmiştir (90). Bu etki sonucunda oluşan kanser hücrelerinin artan yaşam süreleri, kemoterapi tedavisine rezistansın gelişmesine ve tümörün ilerlemesine katkıda bulunur. Şekil 2.6'da TLR'ler ve immün sistem ile ilişkisi şematik olarak gösterilmiştir.Şekil 2.2.TLR'ler ve Tümör ekstrasellüler matriks(ECM) ilişkisişematik olarak gösterilmiştir



Şekil 2.6. TLR'ler ve immün sistem ilişkisi( Referans 91'den uyarlanmıştır).



**Şekil 2.7.** TLR'ler ve Tümör ekstrasellüler matrisi(ECM) ilişkisi. Tümör hücreleri ECM'e tutunurlar, tümör hücrelerinde TLR ekspresyonunun olması ve B-71 ve B-72 kostimulatörler varlığında, tümörün proliferasyonunu ve invazyonunu artırır(Referans 91'den uyarlanmıştır)

TLR'ler birden fazla sitokin üretimini indükleyerek ve immün sistem hücrelerinin aktivasyonunu sağlarlar (92). IL-2 ve IFN- $\gamma$  gibi diğer sitokinler, konakçadaki tümör spesifik sitotoksik T lenfositinin (CTL) tümör hücrelerini tanıma ve öldürme kapasitesini artırır. TLR aktivasyonu ile antijen sunan hücrelerde MHCII, CD88 ve CCR7'nin ekspresyonu artar. Artan ekspresyon tümör antijeninin tanınmasını ve sunumunu artırır. Ayrıca, CD8<sup>+</sup> CTL'ler üzerinde etki gösteren TLR1 / 2, tümör hücrelerinin yok edilmesinde önemli bir rol oynayan CD8<sup>+</sup> T hücreleri tarafından granzim B ve perforinin salınımı için IFN- $\gamma$ , TNF-a ve IL-2 salınımını artırır(93). TLR'lerin tümörlerde yüksek ekspresyonu çoğu zaman immün baskılanmaya neden olur ve tümörlerin invazyonunu artırır. Çalışmalarda, TLR sinyal yolunun aktivasyonunun, IL-10 ve TGF- $\beta$ 'nin artmış salınımına neden

olabileceğini göstermiştir (94). Buna ek olarak, TLR'lerin aktivasyonu, PD-L1 ve HLA-G ekspresyonunu artırır. Farelerde oluşturulan kolon kanserinde, TLR4, programlanmış ölüm ligandı 1 (PD-L1 / B7-H1), (B7-H2) 'nin regülasyonu artırarak tümör hücrelerinin hayatta kalma süresini uzattığı gösterilmiştir (95).

#### 2.4.4. TLR Agonistleri

TLR3, çeşitli kanserlerdeki tümör hücrelerinin ölümünü artırdığı yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir. Paone ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, TLR3 agonisti poli I: C'nin, protein kinazları aktive etmesi sonucunda prostat kanseri hücrelerinin proliferasyonu inhibe ederek apoptozisi arttığı gösterilmiştir. Poli I: C ve 5-fluorourasil (5-FU) veya IFN- $\alpha$ 'nın etkili bir kombinasyonu insan kolon kanser hücrelerinde apoptozisi arttırdığı gösterilmiştir. Melanom hastalarında TLR3 ekspresyonunun artması, proliferasyonu inhibe edebilir ve tip I IFN'nin ön tedavisi ile tümör hücrelerinin ölümünü indükleyebilmektedir (96). Baş-boyun kanserlerinde, flagellin ile aktif hale gelen TLR5' de tümör hücre çoğalmasını azaltır ve tümör hücrelerinin apoptozisine neden olur. Ayrıca, meme kanserinde de, TLR5'in aktivasyonu sonucunda siklin B1, siklin D1 ve siklin E2'nin regülasyonunu azaltarak tümör hücrelerinin çoğalmasını inhibe ettiği gösterilmiştir (97). Glioma tümörlerinde de, CpG oligodeoksinükleotitler (CpG ODN) 107 ve radyoterapi sonrasında TLR9 sinyal yolağı, hücre döngüsünü durdurmakta ve NF- $\kappa$ B yolaklarını aktive ederek tümör hücrelerinin çoğalmasını inhibe ettiği gösterilmiştir (98). TLR9 agonistlerinin, nöroblastomda da tümör hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiği ve kaspaz bağımlı apoptozisi arttığı gösterilmiştir (99). Endojen matriks proteoglikan versikan ve ısı şok proteinleri (HSP'ler) TLR2 / 6, TLR2 ve TLR4 tarafından tanınmaktadır. Bu ligandlar arasında, TLR2 / 4 agonist Bacillus Calmette-Guérin (BCG), TLR4 agonist monofosforil lipid A (MPL) ve TLR7 agonist imiquimod, kanser tedavisinde kullanımı için onay alınan TLR agonistleridir (100). Tablo 2.4.de onay alınıp kullanılan TLR agonistleri gösterilmektedir.



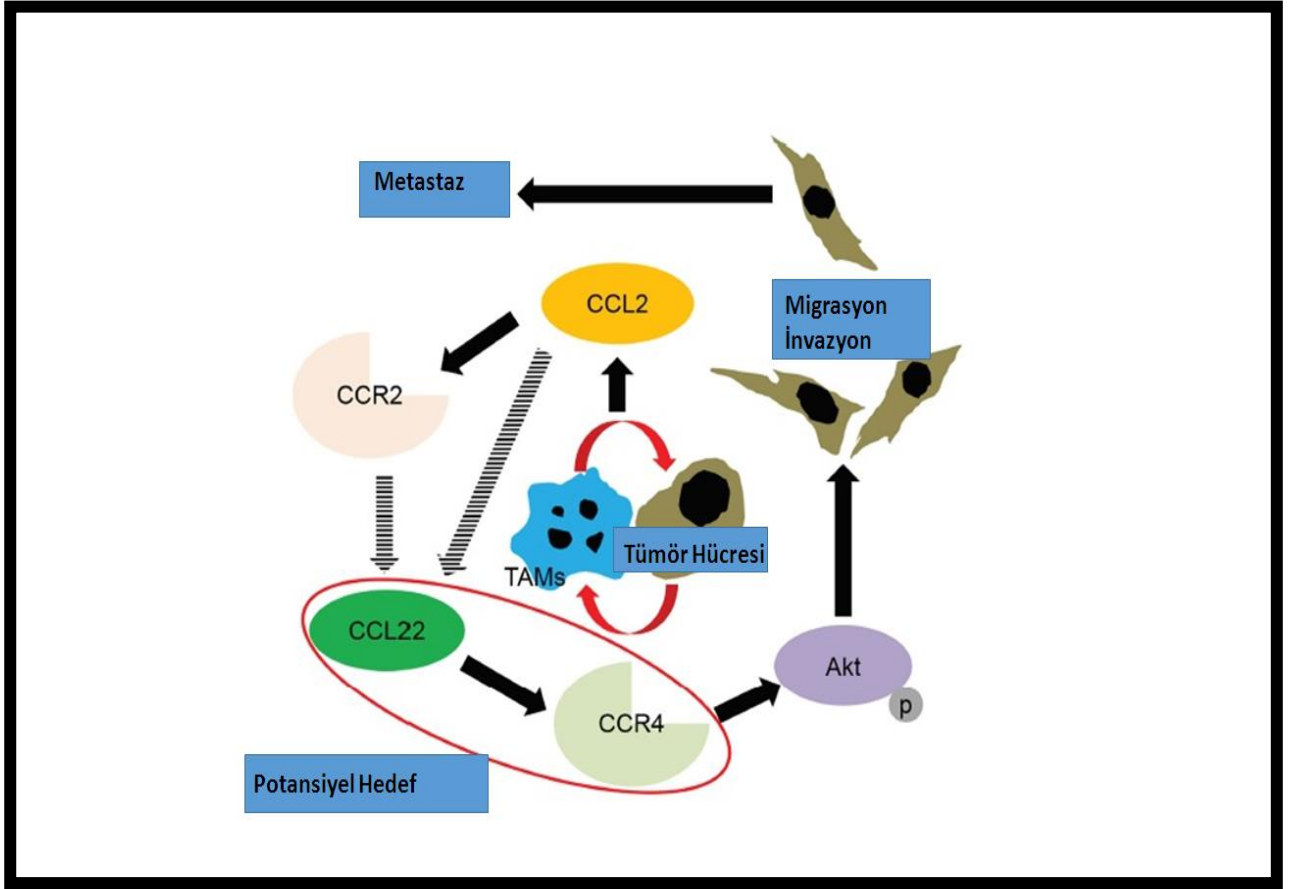
**Tablo2.5.** Çeşitli Kanserlerde Kullanılan TLR Agonistleri (101).

Ajanlar	Reseptörler	Kanser Tipleri
Bacillus Calmette-Guérin (BCG)	TLR2/4	Mesane Serviks Meme Hepatoma Hematolojik Malignansi Glioblastom Çeşitli Kanser Tipleri
monophosphoryl lipid A(MPL)	TLR4	
Imiquimod	TLR7	
Flagellin-derived CBLB502 (Entolimod)	TLR5	
852A	TLR7	
CpG ODN	TLR9	
poly(I:C)/poly-ICLC	TLR3	

### 2.5.Prostat Kanseri

Prostat kanseri, erkeklerde kanser ile ilişkili ölüm nedenleri arasında ikinci sırada yer alan bir kanser tipidir. Prostat kanseri, kanser hücrelerinin fenotipik ve fonksiyonel olarak farklı alt popülasyonlarından oluşan heterojen bir malignitedir (102). Prostat, prostatik kanalların üç hücre tipiyle kaplandığı bir ekzokrin bezdir: sekresyon luminal hücreleri, bazal hücreler ve nadir nöroendokrin hücreler (103). PCa'nın hem bazal hem de luminal hücre kaynaklı olup luminal hücrelerin tümörigenezise daha duyarlı olduğu bilinmektedir (104). Prostat kanseri tedavisinde, kemoterapi ve radyoterapi kullanılan tedavilerdir. Ancak prostat kanserli hastalarda nüks ve metastaz sıklıkla gelişmektedir. Bu nedenle, prostat kanserinin tedavisinde yeni tedavi arayışları içinde immünoterapi bir seçenek olarak umut vaad etmektedir. İmmün sistemi modüle etmeye yönelik potansiyel bir yaklaşım, doğal bağışıklık sisteminin reseptörleri olan patern tanıma reseptörlerinden (PRR) TLR agonistlerinin tümöre karşı etkili olduğu yapılan çalışmalar ile potansiyel bir tedavi yaklaşımının olabileceğini göstermiştir (105).

İmmün sistemin, tümör ilerlemesi ve hasta progresyonunda birçok önemli rolleri bulunur (106). Örneğin, makrofajların ve lenfositlerin farklı alt grupları benzersiz ve bazen zıt etkileresahiptir. Bir yandan, akut enflamasyon cevabı, T-yardımcı 1 (Th1) ve sitotoksik T lenfositlerin (CTL'lerin) alımını ve aktivasyonunu düzenleyen, proinflatuarsitokinlerin (örneğin, IL1 $\beta$ , IL6, IL12, ve TNF) ve kemokinler (örneğin, CCL5, CCL7, CXCL9, CXCL10 ve CXCL16) antijen sunumu ve salgılanmasında önemli işlevleri olan M1 makrofajların aktivasyonu neden olur (107). Akut inflamatuvar yanıt, tümör öldürücü aktiviteye sahiptir ve konakçı savunmasının merkezi bir parçasını oluşturur. Diğer yandan, akut inflamatuvar bir reaksiyon çözülmezse, kronik hale gelebilir. Kronik inflamasyon bağışıklık sistemini baskılayarak tümör gelişimine zemin hazırlar. Kronik inflamasyon, M2 tipinde makrofaj farklılaşmasına, yara iyileşmesi, fagositoz ve immün baskılayıcı sitokinlerin salgılanması (TGF- $\beta$  and IL10) ve kemokinler CCL17, CCL22 ve CCL24 ile baskılayıcı etkisini göstererek de CTL'lerin aktivitesini inhibe eden Th2 ve Treg hücrelerinin artımına neden olur (108). Makrofajlar, çevredeki uyarılara çabuk tepki veren ve birçok farklı şekilde ve işlevleri yapabilen plastisitesi olan hücrelerdir (109). Kanserde makrofaj farklılaşması tümörün mikroçevresindeki faktörler tarafından kontrol edilir, bunların bazıları tümör hücreleri tarafından salgılanır (110). Prostat tümör hücrelerinin mikroçevresinde M2 tipi makrofajların infiltrasyonu oluşur ve M2 makrofaj infiltrasyonu, ileri evreli prostat tümörlerinde metastaz insidansının artması ve hasta prognozunun kötüleşmesi ile ilişkilidir (111). Prostat tümörlerinden salınan faktörler, M2 tipi makrofajlardan gelişen TAM'lara dönüşümü kolaylaştırdığı bulunmuştur. Yapılan çalışmalar, tümörle ilişkili makrofajların (TAM'lar), CCL2-CCR2 ekseninin aktivasyonu ile prostat kanseri metastazını arttırdığını göstermiştir (112). CCR4'ün yüksek affiniteli ligandları olan CCL17 ve CCL22, TAM'lar tarafından salgılanır ve immün baskılayıcı fonksiyonunu görür (Şekil 2.3). TAM'lardan salınan kemokinlerin tümör gelişimi üzerine olan etkisi gösterilmiştir (113).

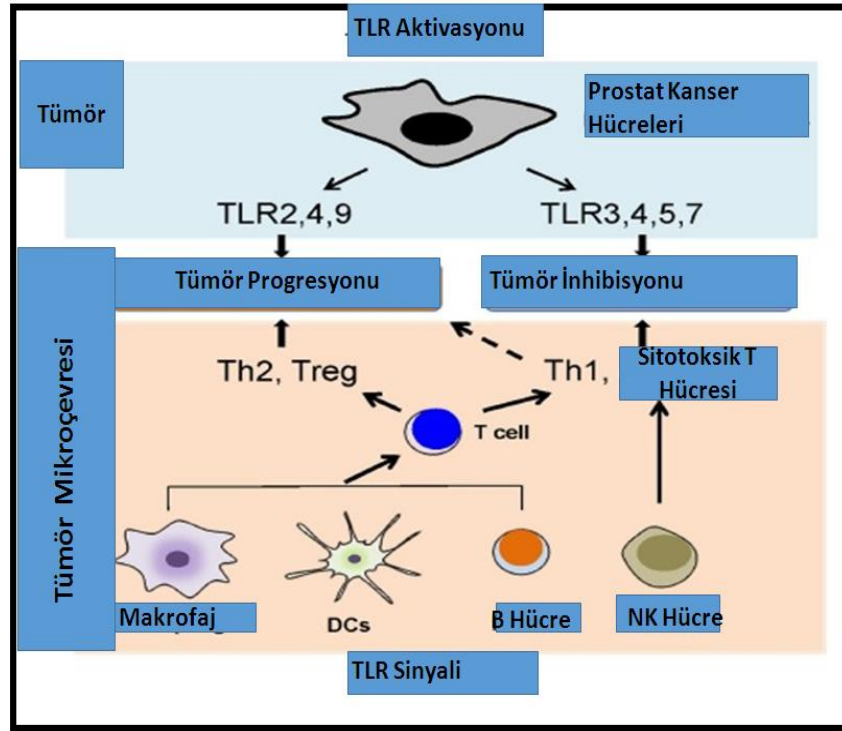


**Şekil 2.8.** CCL2-CCR2 ve CCL22-CCR4 kemokinlerinin TAM'lar ve prostat kanseri hücreleri arasındaki etkileşimlerin şematik gösterimi.(Referans 114'den uyarlanmıştır).

### 2.5.1.Prostat Kanserinde TLR Ekspresyonu

TLR, çoğunlukla dendritik hücreler, makrofajlar ve doğal öldürücü (NK) hücreleri gibi doğal immün hücrelerde eksprese olur.Bu hücrelerdeki TLR'lerin aktivasyonu, doğal immüitenin aktivasyonuna yol açar ve pro-inflamatuar sitokinler, kemokinler ve bunun yanı sıra adezyon moleküllerini üretimini sağlar ve adaptif immüitenin aktivasyonunu kolaylaştırır (115). TLR'ler tümör hücrelerinde de eksprese edilmektedir.Tümör hücrelerindeTLR aktivasyonu tümör ilerlemesinin etkisinde "çift taraflı keskin kılıç" gibi rol oynayabilir.Çoğu durumda, prostat kanserinde TLR sinyalizasyonunu aktive edecek belirli bir patojeni bulmak zordur.Endojen bir TLR ligandı, hasarlı ve / veya nekrotik dokulardan salınan DAMP'ler,önemli bir rol oynayabilmektedir. Tümör hücrelerinde, endojen TLR

ligand olarak HMGB1, TLR2 ve TLR4'ü aktive edebilir ve versican, bir TLR2 agonisti olarak davranabilir (116). Peroxiredoxin1 (Prx1), prostat kanseri gelişiminde TLR4'ün agonisti gibi görünmektedir(117). TLR3'ün prostat kanseri hücrelerinde eksprese edildiği gösterilmiştir(118). TLR3 mRNA, üç prostat kanseri hücresi dizisinde LNCaP, PC3 ve DU-145 bulunur. TLR3 mRNA seviyesi, prostat kanseri hücrelerinde, poli (I: C) ile uyarılarak, prostat kanserinde TLR3'ün işlevsel bir rolü olduğunu göstermiştir .TLR3, LNCaP veDU-145 hücrelerinde benzer düzeylerde bulunur, PC3 hücrelerinde biraz daha düşük ekspresyonu vardır (119). Poli (I: C) ile stimülasyon,prostat tümörü büyümesini in vivo olarak inhibe eder bu etkiyi de tip bir IFN'ye bağlı T hücre ve NK hücrelerinin artmış infiltrasyonu nedeniyle gerçekleştirmektedir (120). Prostat kanserli hastalarda yapılan çalışmada, 112 prostat kanserihastanın 85'indeTLR3'ün pozitif ekspresyonu bulunmuş olup yüksek TLR3 ekspresyon seviyesi, prostat kanseri nüksü ile ilişkili olduğunu gösterilmiştir (121). Paone ve arkadaşları da yaptıkları çalışmada, TLR3 prostat kanseri hücrelerinde anjiyojenez ve apoptoz sürecinihipoksi ile indüklenebilir faktör 1(HIF-1a) ve PKC'ye bağlı Mekanizma aracılığı ile düzenleyebileceğini göstermişlerdir. TLR5, LNCap ve DU-145'te eksprese olur, NK hücreleri ve sitotoksik CD8 hücrelerinden kemokinlerin üretimini tetikleyerek tümör hücrelerinin inhibisyonuna neden olmaktadır (122). Prostat kanserinde TLR4 ekspresyonu da kuvvetli olarak bulunmaktadır.TLR4, DU-145, PC3 ve normal prostat stroma ve epiteline eksprese edilmektedir (123). Yapılan çalışmalarda, prostat kanseri de dahil olmak üzere çeşitli tümör hücrelerinde işlevsel olarak TLR9'u bulunmaktadır(124). Joanna ve arkadaşları, TLR9'un LnCaP, C4-2B, Du-145,PC3 insan prostat kanseri hücre çizgileri ve prostat kanseri klinik örneklerinde immünhistokimya ve western blot ile göstermişlerdir (125). DC'ler, makrofajlar ve B hücreleri gibi antijen sunan hücrelerdeki TLR'lerin aktivasyonu, Th1 ve CTL yanıtlarına veya Th2 veTreg yanıtlarına yol açabilmektedir. Prostat kanseri hücrelerinde TLR2, 4, ve 9'un aktive edilmesi promotor olarak görev yaptığı halde TLR3, 4, 5 ve 7'nin aktivasyonu prostat kanseri inhibe edebileceği gösterilmiştir (Şekil 2.10).



**Şekil 2.4.** Prostat Kanseri TLR Dağılımı (Referans 126'den uyarlanmıştır).

### 2.5.2. Prostat Kanseri TLR Sinyal İletimi

TLR sinyel aktivasyon yolağında, TLR ligasyonu ile MyD88, TRIF, Mal ve TRAM gibi proteinler, TIR domaini ile etkileşim göstererek sinyel iletimini gerçekleştirir. TLR3 dışındaki TLR'ler, MyD88'e bağlı bir sinyel aktivasyon yolunu kullanır. MyD88, tümör nekroz faktörü reseptör ilişkili faktör (TRAF6) ile etkileşen IL-1 reseptör ilişkili kinazı (IRAK) aktive eder ve MAPK ve NF-kB sinyelinin aktivasyonunu sağlar. TLR3 ve TLR4, MyD88'den bağımsız sinyel yolunu etkinleştirir. TRIF uyarılması ile aktivasyon başlar ve NF-kB ve tip I IFN'nin sinyalizasyonunun aktivasyonuna yol açar. TLR3 prostat kanseri hücrelerinde aktive olabilese de, moleküler sinyel yolağı tam olarak aydınlatılamamıştır. İnsan prostat kanseri hücrelerinde yapılan yeni bir araştırma, TLR3 sinyel aktivasyonunun, kısmen PI3K / Akt yolağının inaktivasyonu yoluyla kısmen LNCaP hücrelerinin apoptozis ve büyümesini durdurduğunu ortaya koymaktadır. SiklinD1, c-Myc, p53 ve NOXA'lar, poli (I: C) ile tedavi edilen LNCaP hücrelerde önemli rol oynamaktadır (127). Diğer çalışmalarda ise HIF-1a, poli (I: C) ile tedavi edilen prostat kanseri

hücrelerinde PKC'ye bağlı bir mekanizma yoluyla apoptozis kolaylaştırır. Poli (I: C) ile TLR3 aktivasyonu, JNK ve p38'i PKC-a aracılığıyla aktive eder ve apoptozisi bir kaspaz-8'e aracılığı ile tetikler (128). LNCap hücrelerinde poli (I: C) tedavisi, kitlesel NK hücresi ve CD8T hücre kemotaksisiniindükleyen CCL3, CCL4, CCL5, CCL8, CXCL9 ve CXCL10 kemokinlerini arttırmaktadır. TLR5 agonist flagellin, LNCaP ve DU145 hücrelerinde NF-kB sinyal yolağını aktive ederek pro-inflamatuvar sitokinlerinüretimine yol açar (129). DU145 hücrelerinde TLR4'ün LPS tarafından stimüle edilmesi, MyD88'e bağımlı yoldan IL-6 ve IL-1 $\beta$  gibi proinflamatuvar sitokinlerin üretilmesine neden olan NF-kB sinyal yolağını aktive eder (130). Buna ek olarak, TLR4 aktivasyonu PC3 hücrelerinde VEGF ve TGF  $\beta$ 1 ekspresyonunu artırır, bu da tümör gelişimini artırır. TLR agonistleri veya antagonistleri ile prostat kanserine karşı immünoterapi uygulamalarını gündeme getirmiştir. TLR'lerintedavide kullanılan üç ilaç Food and Drug Administration (FDA) tarafından kanser hastalarında kullanılmaktadır. Bu ilaçlar, basel calmette-guérin (BCG), monofosforil lipid A (MPL) veimiquimod'den oluşmaktadır (131). BCG, zayıflatılmış bir Mycobacterium bovis soyundan hazırlanan ve TLR2 / 4'ü aktive eden bir ajandır. BCG, tüberkülozun önlenmesinde, aynı zamanda in situ mesane kanserinin tedavisinde bir aşı olarak kullanılır. LPS'den güçlü bir TLR4 agonisti olarak türetilen monofosforil lipid A, kansere neden olan insan papilloma virüsüne (HPV) karşı kullanılan Cervarix'in aktif bir bileşenidir (132). TLR'leri hedefleyen en başarılı ilaçlardan biri olan imiquimod de,TLR7 eksprese eden bazal hücre karsinomu ve bowen hastalığı gibi deri kanseritedavisinde yaygın olarak kullanılan sentetik bir imidazokinolinidir (133). Imiquimod, IFN $\alpha$  IL-6 ve TNF $\alpha$  gibi proinflamatuvar sitokinleri indükler (134). TLR7 / 8'in aktivasyonu Th1 yanıtını ve IFN $\gamma$ 'ya bağlı tümöre karşı aktivitesini artırır (135). TLR3 aktivasyonu, insan prostat kanseri hücrelerinin apoptozisini doğrudan tetikler. Bu nedenle TLR3 agonistlerinin tümöre karşı terapötik ajanlar olarak geliştirilmesi potansiyeline sahiptir. Nitekim, poli (I: C) (bir TLR3 agonisti) oluşan Ampligen'in, erken klinik çalışmalarda çeşitli tümör büyümelerini inhibe ettiği gösterilmiştir. (Polyl (I: C) 'nin özel bir formülasyonu olan Hiltonolun, güvenliği ve etkililiği değerlendirildiği Faz / II klinik araştırmasında kullanılmaktadır (136). Prostat kanseri tedavisinde BCG aşısı kullanan faz 2 klinik çalışması (NCT00514072) da devam

etmektedir. Imiquimod 'in içinde bulunduğu çoklu-peptit, çift-adjuvan bir telomeraz aşısı da (GX301) prostat kanseri hastalarında daha az toksik ve yüksek seviyede immünojenik olduğu gösterilmiştir; ancak klinik etkinliğini belirlemek için yapılacak çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır (137). Yapılan çalışma sonuçlarına göre, TLR genlerindeki polimorfizm, geniş bir enfeksiyöz ve inflamatuvar hastalıkların duyarlılığına bağlıdır. Artan kanıtlar, kronik intra-prostatik inflamasyonun prostat kanseri progresyonuna katkıda bulunduğunu göstermiştir (138). TLR4'teki tek nükleotid polimorfizmlerin (SNP'ler), birçok çalışmada prostat kanseri riski ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (139). TLR gen kümesindeki sekans varyantlarının (TLR6-TLR1-TLR10) ayrıca prostat kanseririski ile ilişkili olduğu da yapılan çalışmalarda bildirilmiştir. Periferik kan mononükleer hücrelerinin (PBMC) VTX-2337 ile in vitro tedavisi NK hücrelerini aktive eder, trastuzumab, rituksimab ve setuksimab aracılı ADCC'yi güçlendirir ve tümörün öldürmeyi NKG2D gibi diğer tanıma yolları yoluyla artırır (140). NK hücre fonksiyonunun, TLR8 agonistleri tarafından modülasyonu, klinik olarak onaylanmış monoklonal antikorların terapötik etkinliğini arttırmaktadır. NK hücreleri tarafından artmış ADCC, kısa sürede daha güçlü bir tümöre karşı yanıtı yol açabilir ve bu durumda tümöre yöneltile adaptif immün yanıtların uzun süreli ve dayanıklı klinik yanıt potansiyelini oluşturur (141).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, Hacettepe Üniversitesi Kanser Enstitüsü Temel Onkoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında 15 Şubat 2018 - 15 Ocak 2019 tarihleri arasında yapılmıştır.

#### **Çalışmada Kullanılan Hücre Dizileri**

PC3 Hücre Dizisi (Prostat Adenokarsinom Hücreleri, ATCC; USA)

THP-1 (Akut Monositik Lösemi Hücreleri, ATCC; USA)

#### **Hücre Kültüründe Kullanılan Reaktifler**

Fetal Bovine Serum (FBS, Biochrom, Deutschland)

L-Glutamine (Biochrom, Deutschland)

Penicillin-Streptomycin (Biochrom, Deutschland)

RPME-1640 (Sigma, R-0883)

Phorbol Myristate Acetate (PMA P 8139 Sigma-Aldrich, USA)

Etoposid (Sigma E 1383)

#### **Akım Sitometride Kullanılan Monoklonal Antikorlar**

CD68 PE (Katalog no:333806, Clone Y1/82A BioLegend)

CD11bPE (Katalog no:101208, Clone M1/70 BioLegend)

CD206 FITC (Katalog no:321106, Clone 15-2 BioLegend)

HLA-DR PE (Katalog no:307606, Clone L243 BioLegend)

CXCR2 PE (Katalogno:320706,Clone5P8/CXCR2BioLegend)

CXCR7 FITC (Katalog no:331104,Clone 8F1-M1b BioLegend)

#### **İzotipik Kontroller**

MsIgG1 FITC (BioLegend)

MsIgG1PE (BioLegend)



**Fagositoz Kiti**

Cayman Chemical Phagocytosis Assay Kit(IgGFITC)  
(Catalog no:500290, USA)

**Hücre Döngüsü Analizinde Kullanılan Reaktifler**

Propidium Iodide (Sigma, P-4170)  
RNase (Sigma, R-4875)  
Phosphate Buffer Solution (Sigma)

**TLR Ligandları**

TLR4 agonist- (Gram negatif E.Coli LPS, InvivoGen,USA),  
TLR8 agonist- (ssRNA40, InvivoGen,USA)

**ELISA**

Multi-Analyte ELISArray ELISA Kit (Qiagen,www.Qiagen.com)

**Apoptozis**

Annexin V Apoptosis Detection Kit ( Katolog no: 556547BD Pharmingen, USA)

**3.1.Hücre Kültürü**

Çalışmada, Temel Onkoloji Anabilim Dalı Kriyobiyoloji laboratuvarında bulunan hücre dizisi koleksiyonundan prostat adenokarsinom evre IV kanser hücre dizisi olan PC3 hücreleri ile THP-1 monositik hücre dizileri kullanıldı. PC3ve THP-1 hücreleri adherent olarak büyüyen hücrelerdir. Hücreler %10 FBS, %1 Penisillin-Streptomisin ve %1 L-Glutamin içeren RPMI1640 medyumunda içinde %5 CO<sub>2</sub> ve 37°C etüvde kültür ortamında çoğaltıldı. PC3 ve THP-1 hücreleri adherent hücre özelliğinde olmaları nedeniyle tripsin EDTA ile hücre kültür flaskından sökülüp tüplere alınarak deneyler yapıldı.

### **3.2. TLR Agonistleri ile Hücrelerin Aktivasyonu**

PC3 hücreleri, 100 ng/ml TLR 4 agonisti Gram-negatif lipopolysaccharide (LPS) ve 100 ng/ml TLR8 agonisti ssRNA40/LyoVec ile 48 saat süre ile inkübe edildi. Ayrıca kontrol olarak da hücreler TLR agonist olmadan da inkübe edildi. THP-1 hücrelerinin farklılaşmasını kontrol etmek için de hücreler, 200nM Phorbolmyristate asetat (PMA) ile uyarılarak monosit farklılaşması değerlendirildi. İnkübasyon öncesinde hücreler serumsuz medyumda bekletildi. TLR agonistleri ile inkübe edilen PC3 hücrelerinin süpernatantları toplanmadan önce hücrelerin besiyeri uzaklaştırıldı, hücreler 5 kez serumsuz besiyeri ile yıkandı ve hücreler serum starvasyonuna alındı. Toplanan süpernatantlar santrifüj aracılığıyla klarifiye edildi. Süpernatantlar, daha önceden 6 kuyulu plaklara ekilen THP-1 hücreleri üzerine ilave edilerek 48 saat süre ile inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda hücre deneyleri yapıldı. Hücre kültür süpernatantları da toplanarak sitokin salınımı ölçümüne kadar -80°C’de saklandı.

### **3.3.TH P-1 Hücrelerinin Morfolojik İncelenmesi**

THP-1 hücrelerinin PC3 hücre süpernatantları ile 48 saatlik inkübasyon sonucunda, TLR agonistine maruz bırakılmış PC3 hücre süpernatantlarının THP-1 hücrelerinin morfolojileri üzerine olan etkileri ışık mikroskopunda incelendi.

### **3.4.TH P-1 Hücrelerinin Makrofaj Polarizasyonunun Akım Sitometri Yöntemiyle Belirlenmesi**

TLR agonistleri ile aktive edilen PC3 prostat kanser hücrelerinin süpernatantları ile THP-1 monositlerin inkübasyonu sonucunda, makrofaj polarizasyonunu belirlemek için CD11b, CD68, CXCR7, HLA-DR, CD206, CXCR2 ve HLA-DR yüzey markerları için boyama, spesifik monoklonal antikolar ile gerçekleştirildi ve akım sitometri cihazında 10.000 hücre sayılarak değerlendirildi.

### **3.5.Sitokin Salınımın Değerlendirilmesi**

TLR agonistleri ile aktive edilen prostat kanser hücrelerinin süpernatantları ile THP-1 monositlerinin inkübasyonu sonucunda makrofajlardan salınan sitokinlerin

değerlendirilmesi için THP-1 hücrelerinden süpernatantlar toplandı (hücrelerin yıkanması ve serum starvasyonu sonrasında) ve TNF $\alpha$ , IL1b, IL6, IL12, IL17A, IL8, MCP-1, RANTES, MIP-1a, MIP-1b, MDC, Eotaxin Multiarray ELISA yöntemiyle değerlendirildi.

### **3.6.Makrofajlarda Fagositoz Aktivitesinin Değerlendirilmesi**

TLR agonistleri ile aktive edilen prostat kanseri hücrelerinin süpernatantları ile THP-1 monositlerin inkübasyonu sonucunda, hücrelerin fagositoz kapasitesi Fagotest kiti kullanılarak değerlendirildi. Öncelikle, TLR agonistleri ile aktive edilen PC3 prostat kanseri hücrelerinin süpernatantları ile THP-1 monositlerin inkübasyonu sonucunda,  $2 \times 10^5$  /ml monosit/makrofaj hücresi tüplere konuldu. Her bir koşuldaki hücreler üzerine medyum içinde final dilüsyonu 1:100 olacak oranda lateks beads rabbit IgG-FITC kompleks ilave edildi. Daha sonra hücreler, 37°C'de 24 saat süre ile inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası hücreler santrifüj edildi, süpernatant atıldı ve hücreler üzerine 500 $\mu$ l assay buffer eklenerek akım sitometri cihazında analiz edildi.

### **3.7. Hücre Proliferasyonu ve Hücre Döngüsünün Değerlendirilmesi**

TLR agonistleri ile aktive edilen prostat kanseri hücre süpernatantları ile THP-1 monositlerin inkübasyonu sonucunda, TLR ligand varlığında ve yokluğunda prostat kanseri hücrelerinin makrofajların hücre proliferasyonu sentez fazı ve hücre döngüsüne olan etkileri akım sitometri yöntemiyle değerlendirildi. Monositler / makrofajlar inkübasyon sonrası 6 kuyulu plaklardan söküldü. Daha sonra santrifüj edildi, sonrasında %95'lik etil alkol içinde fikse edildi ve bir gece +4°C'da inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası hücreler PBS ile yıkandı ve hücrelerin üzerine daha sonra 70  $\mu$ l RNase ilave edildi. Sonrasında da 70  $\mu$ l propidium iodide boyası ilave edildi. 30 dakika oda ısında karanlıkta inkübasyona bırakıldı, inkübasyondan sonra hücreler akım sitometri cihazında 10.000 hücre sayılarak değerlendirildi. Sonuçlar, iki değişkenli histogramlarda hücre sayısı ve hücrelerin floresan yoğunluğunu ölçen histogramlardan Mcycle yazılım programı kullanılarak hücrelerin, hücre döngüsü fazları ve oranlarının değerlendirilmesi yapıldı.

### **3.8. Transwell Deneyi ile Erken Apoptozisin Değerlendirilmesi**

Makrofajlardan salınan sitokinler ve etoposid'in PC3 prostat kanser hücrelerinde apoptozise olan etkilerini araştırmak için, 3 koşulda makrofajlar ile deney yapıldı. Birinci koşulda, THP1 hücreleri PMA ile uyarıldı, ikinci koşulda, hücreler PC3 prostat kanser hücre süpernatantları ile konuldu ve üçüncü koşul olarak da TLR4 agonisti ile uyarılmış PC3 hücrelerinin süpernatantları varlığında deney yapıldı. Daha sonra transwell üzerindeki kuyulara  $1 \times 10^6$  /ml'de olacak sayıda monosit/makrofaj ilave edildi ve yıkandıktan sonra 16 saat serumsuz medyumda inkübe edildi. Transwell altındaki kuyulara ise  $1 \times 10^6$  /ml'de olacak sayıda PC3 prostat kanser hücresi konuldu daha sonra bu hücreler üzerine 50  $\mu$ M etoposid ilave edildi ve 24 saat süre ile inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası, PC3 hücreleri toplandı ve Annexin V FITC ile işaretlendi. 10.000 hücre sayılarak hücreler değerlendirildi.

### **3.9. İstatistik Analiz**

İstatistiksel analizler "t-test" ve "anova tek yönlü" test ile gerçekleştirildi.

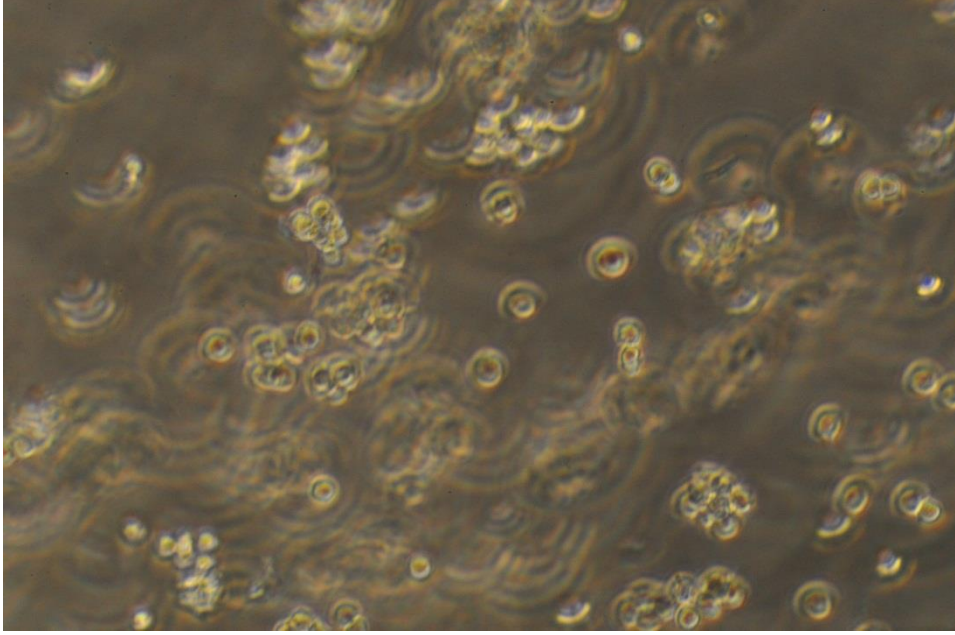
## 4. BULGULAR

Bu çalışmada, PC3 prostat kanser hücre dizisi ile THP 1 monositik hücre dizisi kullanıldı. PC3 prostat kanseri hücreleri TLR4 ve TLR8 agonistleri ile ayrı olarak veya TLR4+TLR8 agonistleri birlikte kombine olarak uyarıldı. Daha sonra tüm koşullardaki PC3 hücre kültür süpernatantları toplandı ve THP 1 hücreleri üzerine ilave edilerek 48 saat süre ile inkübasyona bırakıldı. Ayrıca, THP1 hücreleri makrofaj farklılaşmasını göstermek için de PMA ile de uyarıldı.

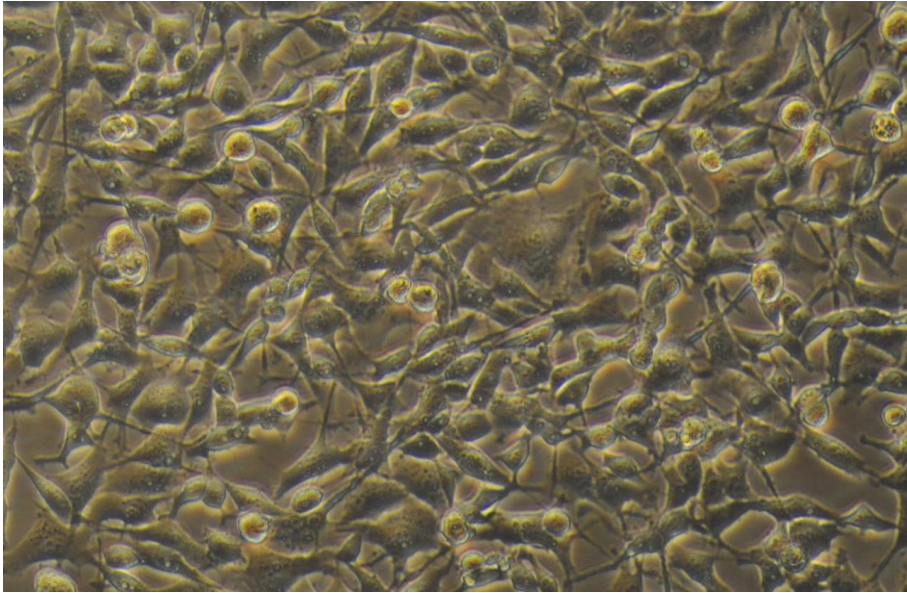
### 4.1. Prostat Kanseri Hücre Kültür Süpernatantlarının THP1 Monositik Hücrelerinin Morfolojisi Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi

Prostat kanseri hücre kültür süpernatantlarının THP1 monositik hücrelerinin morfolojisi üzerine etkisini değerlendirmek için PC3 prostat kanseri hücreleri TLR4 ve TLR8 agonistleri ile ayrı olarak, TLR4+TLR8 agonistleri birlikte kombine olarak uyarıldı. Daha sonra tüm koşullardaki PC3 hücre kültür süpernatantları toplandı ve THP 1 hücreleri üzerine ilave edilerek 48 saat süre ile inkübasyona bırakıldı. Ayrıca, THP1 hücrelerinde makrofaj farklılaşmasını göstermek için de PMA ile de uyarıldı. THP1 hücreleri mikroskopik olarak normalde yuvarlak olarak bulunurken, TLR agonistleri varlığında çoğu hücrelerin uzamış iğsi morfolojiye benzer morfolojiye dönüştüğü izlendi. Şekil 4.1’de ve Şekil 4.5’te THP1 hücrelerinin hücre kültür medyumundaki morfolojik görüntüsü bulunmaktadır. PC3 hücre kültür süpernatantlarının ve TLR agonistlerinin, THP1 hücrelerinin adezyonunu arttırdığı gözlemlendi.

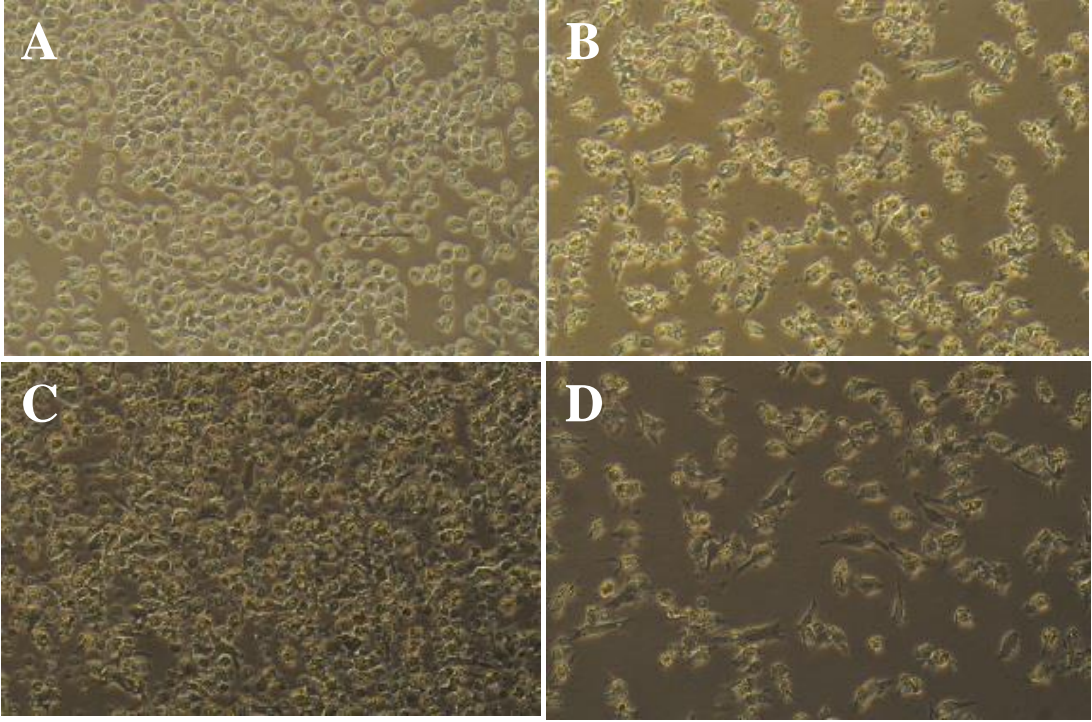
THP1 hücrelerinin PC3 hücre kültür süpernatantı ile inkübasyonu sonrasındaki morfolojik görüntüsü şekil 4.2’de, THP1 hücrelerine PC3 hücrelerinin TLR4 ve TLR8 agonistleri ile aktivasyonundan sonra toplanan kültür süpernatantı ile inkübasyonu sonrasındaki morfolojik görüntüsü Şekil 4.3 B,C’de gösterilmiştir. THP1 hücrelerine PC3 hücrelerinin TLR4+8 agonistlerinin kombine aktivasyonundan sonra toplanan kültür süpernatantı ile inkübasyonu sonrasındaki morfolojik görüntüsü Şekil 4.3D’de gösterilmiştir. THP1 hücrelerinin PMA ile uyarımı sonrasındaki morfolojik görüntüsü Şekil 4.4’te gösterilmiştir. Şekil 4.5’te THP1 hücrelerinin hücre medyumundaki morfolojik görüntüsü gösterilmiştir.



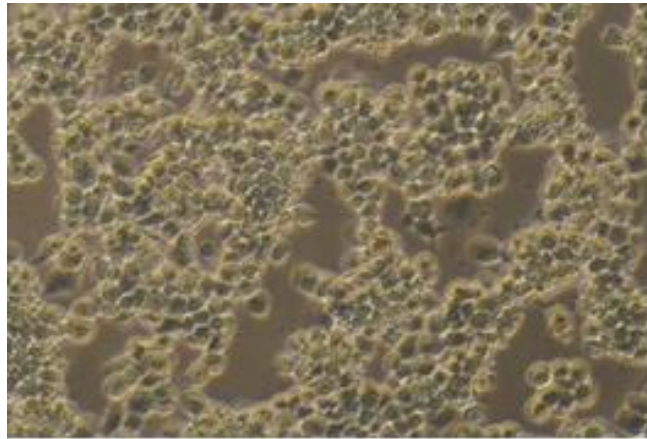
**Şekil 4.1** THP1 hücrelerinin hücre kültür medyumundaki yuvarlak morfolojik görüntüsü.



**Şekil 4.2.** THP1 hücrelerinin PC3 hücre kültür süpernatanı ile inkübasyonu sonrasındaki morfolojik görüntüsü

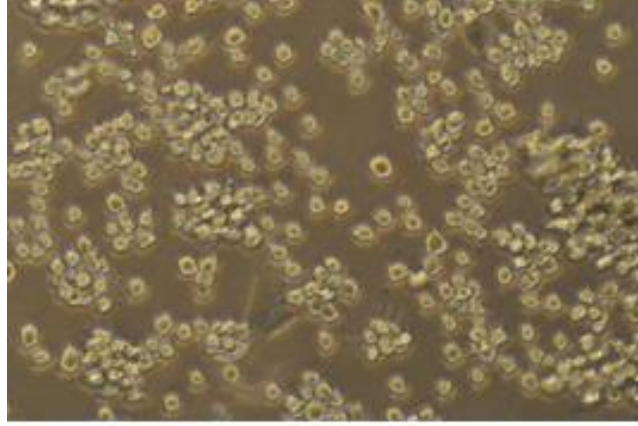


**Şekil 4.3.** THP1 hücrelerinin hücre medyumundaki morfolojik görüntüsü (A), TLR4 agonisti ile uyarılmış PC3 hücre kültür süpernatant varlığında morfolojik görüntüsü (B), TLR8 agonisti ile uyarılmış PC3 hücre kültür süpernatant varlığında morfolojik görüntüsü (C) ve TLR4+8 agonistleri ile kombine uyarılmış PC3 hücre kültür süpernatant varlığında morfolojik görüntüsü (D). THP1 hücrelerinin yuvarlak morfolojiden uzamış iğsi morfolojiye dönüştükleri izlenmiştir.



**Şekil 4.4.** THP1 hücrelerinin, PMA ile uyarımı sonrasındaki morfolojik görüntüsü.





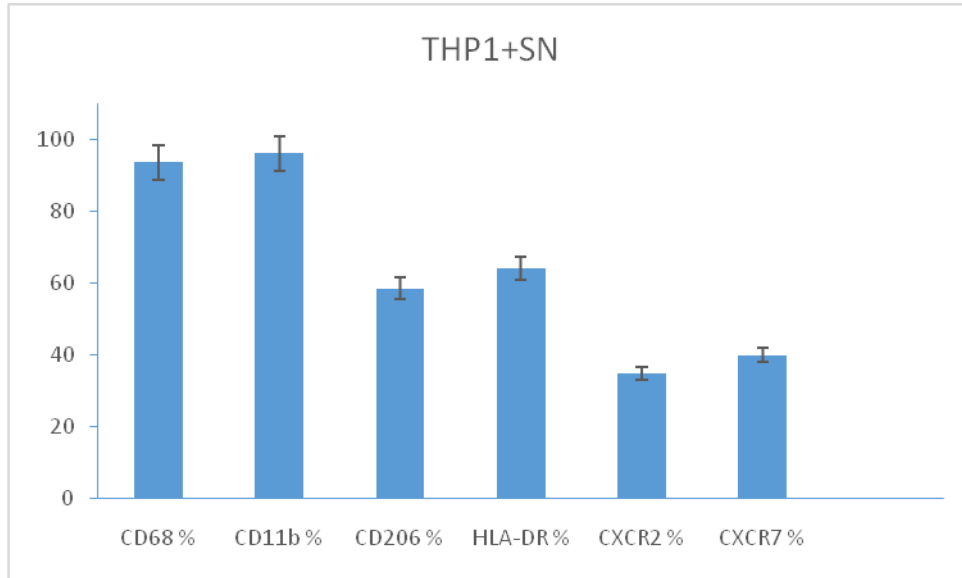
**Şekil 4.5.**THP1 hücrelerinin hücre medyumundaki morfolojik görüntüsü.

#### **4.2.Prostat Kanser Hücre Kültür Süpernatantlarının THP1 Hücrelerinin Yüzey Belirteçlerine Etkisinin Değerlendirilmesi**

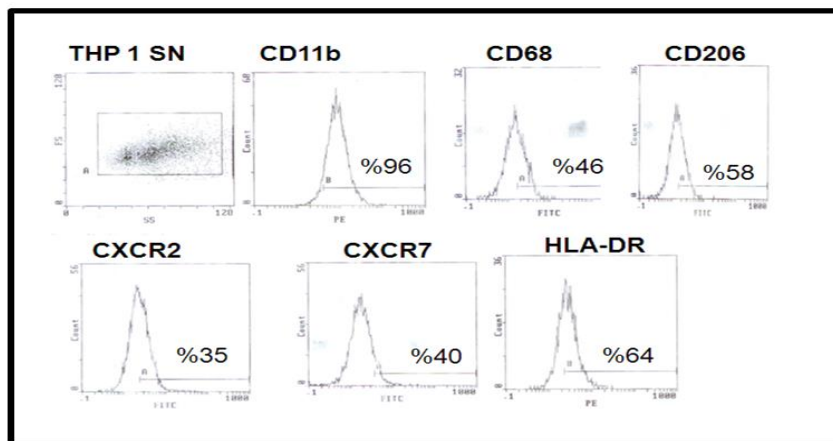
THP-1 hücrelerinin; TLR4 agonisti, TLR8 agonisti, TLR4+TLR8 agonistleri ile uyarılmış PC3 hücre kültür süpernatantı varlığında M1 ve M2 hücre yüzey belirteçleri, akım sitometri yöntemiyle değerlendirildi. Yüzey belirteçleri olarak CD68, CD11b, CD206, HLA-DR ve kemokin reseptörleri olarak CXCR2 ve CXCR7 spesifik monoklonal antikorlar ile işaretlenerek değerlendirildi. Tablo-4.1’de THP-1 hücrelerinin tüm deney koşullarında hücre yüzey belirteçlerinin özellikleri gösterilmiştir. THP 1 hücrelerinin TLR4 agonisti, TLR8 agonisti veya TLR4+TLR8 agonistleri ile uyarılan PC3 süpernatantları ile inkübasyonu sonucunda, CD206 makrofaj hücre yüzey belirteç ekspresyonunda, PC3 hücre kültür süpernatantı koşuluyla kıyaslandığında azalma bulundu ( $p<0.05$ ). Şekil 4.6’da THP1 hücrelerinin PC3 hücrelerinin süpernatantlarının varlığında CD68, CD206, HLA-DR, CXCR2 ve CXCR7 yüzey ekspresyonlarının grafikleri, şekil 4.7’de akım sitometri histogramlarının dağılımı gösterilmiştir. Şekil 4.8’de THP-1 hücrelerinin TLR4 agonisti ile uyarılmış PC3 hücre kültür süpernatantı varlığında CD68, CD206, HLA-DR, CXCR2 ve CXCR7 yüzey ekspresyonlarının grafik olarak dağılımı, Şekil 4.9’da THP-1 hücrelerinin TLR4 agonisti ile uyarılmış PC3 hücre kültür süpernatantı varlığında CD68, CD206, HLA-DR, CXCR2 ve CXCR7 yüzey ekspresyonlarını gösteren akım sitometri histogramları, Şekil 4.10’da THP-1 hücrelerinin



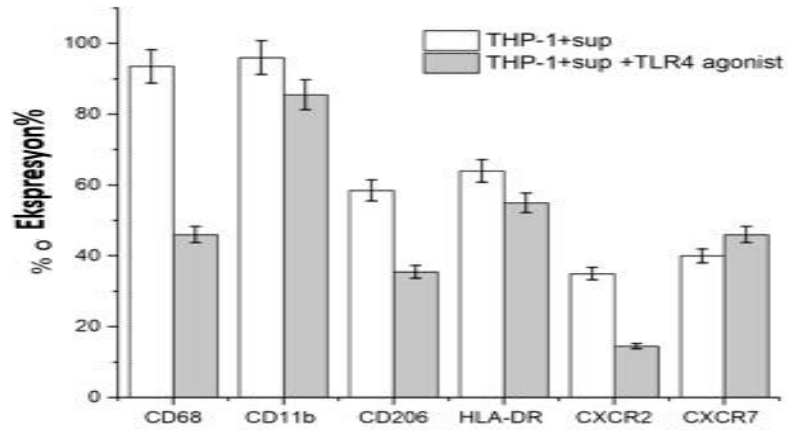
TLR8 agonisti ile uyarılmış PC3 hücre kültür süpernatanı varlığında CD68, CD206, HLA-DR, CXCR2 ve CXCR7 yüzey ekspresyonlarının grafik olarak dağılımı, Şekil 4.11'de THP-1 hücrelerinin TLR8 agonisti ile uyarılmış PC3 hücre kültür süpernatanı varlığında CD68, CD206, HLA-DR, CXCR2 ve CXCR7 yüzey ekspresyonlarını dağılımını gösteren akım sitometri histogramları, Şekil 4.12'de THP-1 hücrelerinin TLR4+TLR8 agonistleri ile uyarılmış PC3 hücre kültür süpernatanı varlığında CD68, CD206, HLA-DR, CXCR2 ve CXCR7 yüzey ekspresyonlarının grafik olarak dağılımı, Şekil 4.13 'de THP-1 hücrelerinin TLR4+TLR8 agonistleri ile uyarılmış PC3 hücre kültür süpernatanı varlığında CD68, CD206, HLA-DR, CXCR2 ve CXCR7 yüzey ekspresyonlarını dağılımını gösteren akım sitometri histogramları gösterilmiştir.



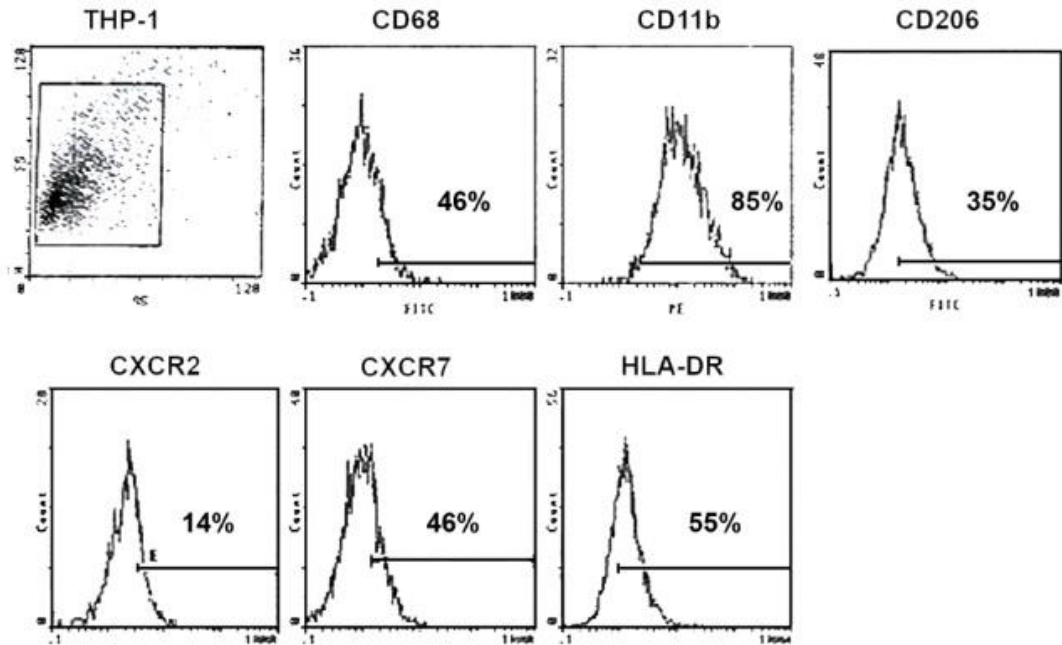
**Şekil 4.6.** THP1 hücrelerinin, PC3 hücrelerinin süpernatanlarının varlığında CD68, CD206, HLA-DR, CXCR2 ve CXCR7 yüzey ekspresyonlarının grafik olarak dağılımı.



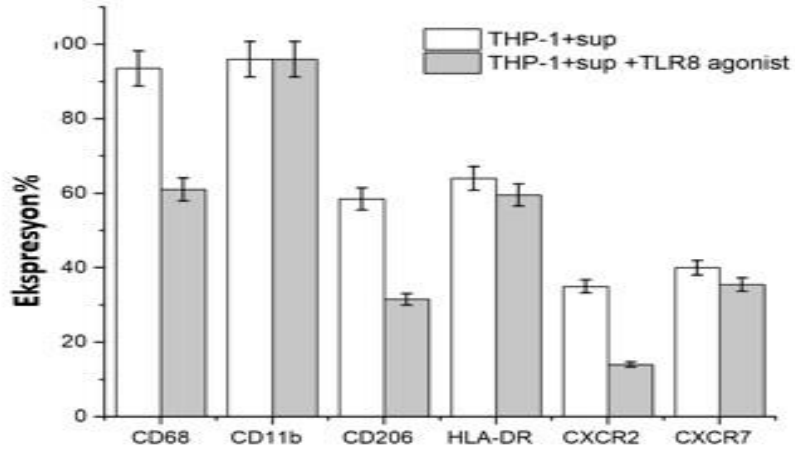
**Şekil 4.7.** THP1 hücrelerinin, PC3 hücrelerinin süpernatanları varlığında CD68, CD206, HLA-DR, CXCR2 ve CXCR7 yüzey ekspresyonlarını dağılımını gösteren akım sitometri histogramları.



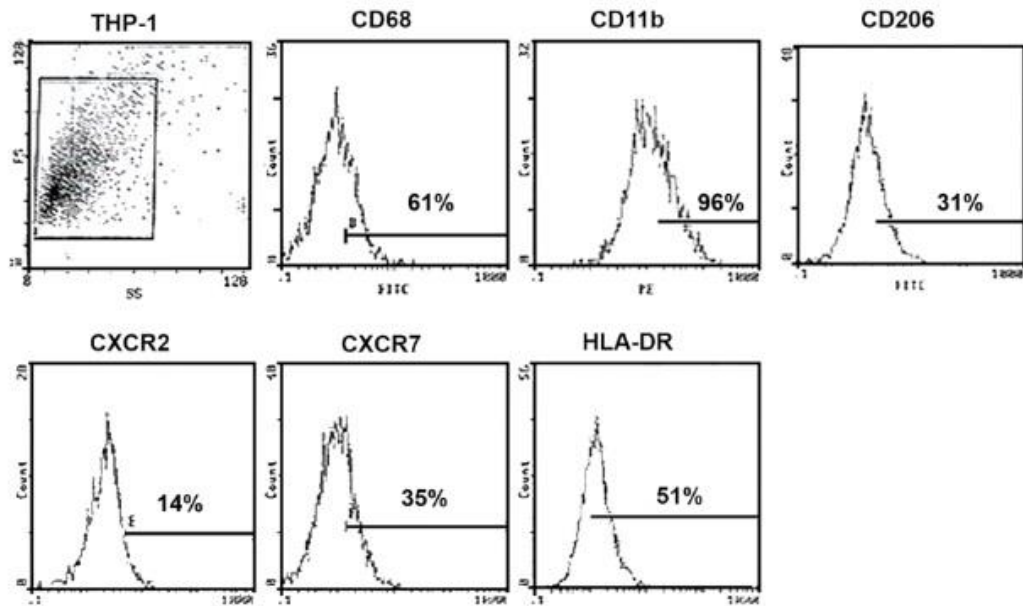
**Şekil 4.8.** THP1 hücrelerinin, TLR4 agonisti ile uyarılmış PC3 hücrelerinin süpernatantları varlığında CD68, CD206, HLA-DR, CXCR2 ve CXCR7 yüzey ekspresyonlarını dağılımının grafik olarak gösterilmesi.



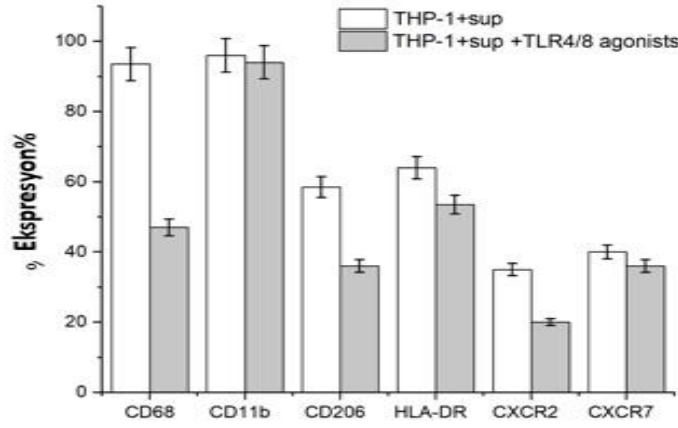
**Şekil 4.9.** THP1 hücrelerinin, TLR4 agonisti ile uyarılmış PC3 hücrelerinin süpernatantları varlığında CD68, CD206, HLA-DR, CXCR2 ve CXCR7 yüzey ekspresyonlarını dağılımını gösteren akım sitometri histogramları.



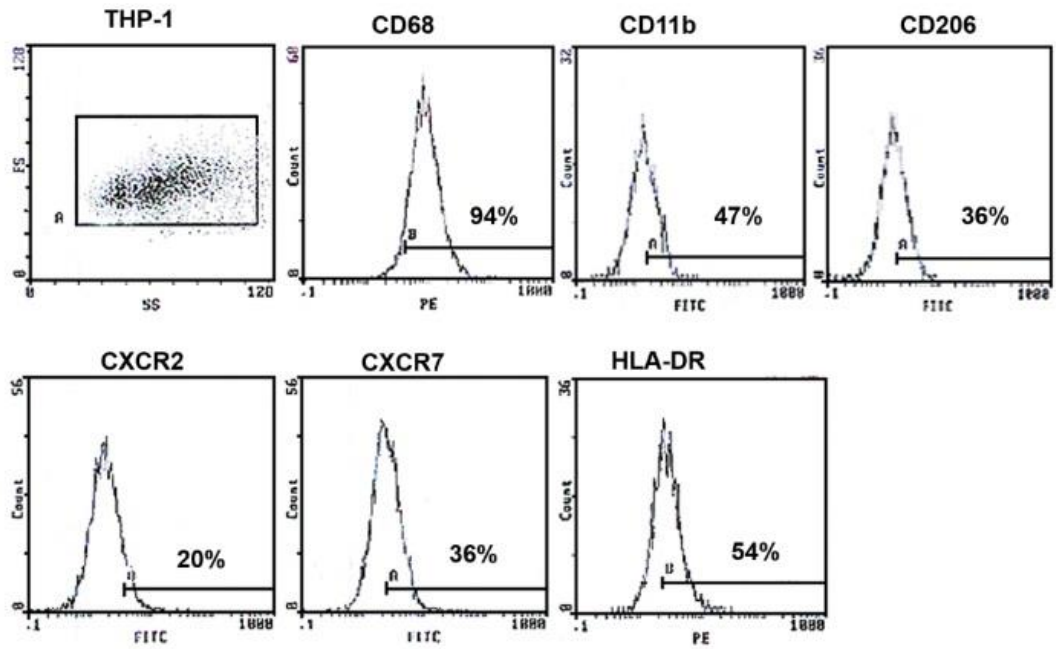
**Şekil 4.10.** THP1 hücrelerinin, TLR8 agonisti ile uyarılmış PC3 hücrelerinin süpernatantları varlığında CD68, CD206, HLA-DR, CXCR2 ve CXCR7 yüzey ekspresyonlarını dağılımının grafik olarak gösterilmesi.



**Şekil 4.11.** THP1 hücrelerinin, TLR8 agonisti ile uyarılmış PC3 hücrelerinin süpernatantları varlığında CD68, CD206, HLA-DR, CXCR2 ve CXCR7 yüzey ekspresyonlarını dağılımını gösteren akım sitometri histogramları.



**Şekil 4.12.** THP1 hücrelerinin, TLR4+TLR8 agonistleri ile uyarılmış PC3 hücrelerinin süpernatantları varlığında CD68, CD206, HLA-DR, CXCR2 ve CXCR7 yüzey ekspresyonlarını dağılımının grafik olarak gösterilmesi.



**Şekil 4.13.** THP1 hücrelerinin, TLR4+TLR8 agonistleri ile uyarılmış PC3 hücrelerinin süpernatantları varlığında CD68, CD206, HLA-DR, CXCR2 ve CXCR7 yüzey ekspresyonlarını dağılımını gösteren akım sitometri histogramları.

	CD68%	CD11b %	CD206 %	HLA-DR %	CXCR2 %	CXCR7 %
THP1+SN	93,5±6.36	96±2.82	58,5±2.61	64±2.82	35±5.65	40±2.40
THP1+SN+TLR4L	46±14.8	85,5±14.8	35,5±2.12	55±18.3	14,5±2.12	46±1.41
THP1+SN+TLR8L	61±2,82	96±1,41	31,5±12,02	59,5±2,12	14±1,41	35,5±7,77
THP1+SN+TLR4+8L	47±7,07	94±5,65	36±4,24	53,5±2,12	20±1,41	36±2,82

**Tablo 4.1.** PC3 hücre kültür süpernatantları ve TLR4 ve TLR8 agonistleri varlığında THP-1 hücrelerindeki makrofaj hücre yüzey belirteçlerinin özellikleri.

### 4.3. Prostat Kanseri Hücre Kültür Süpernatantlarının THP1 Monositik Hücrelerinden Sitokin Salınımına Etkisinin Değerlendirilmesi

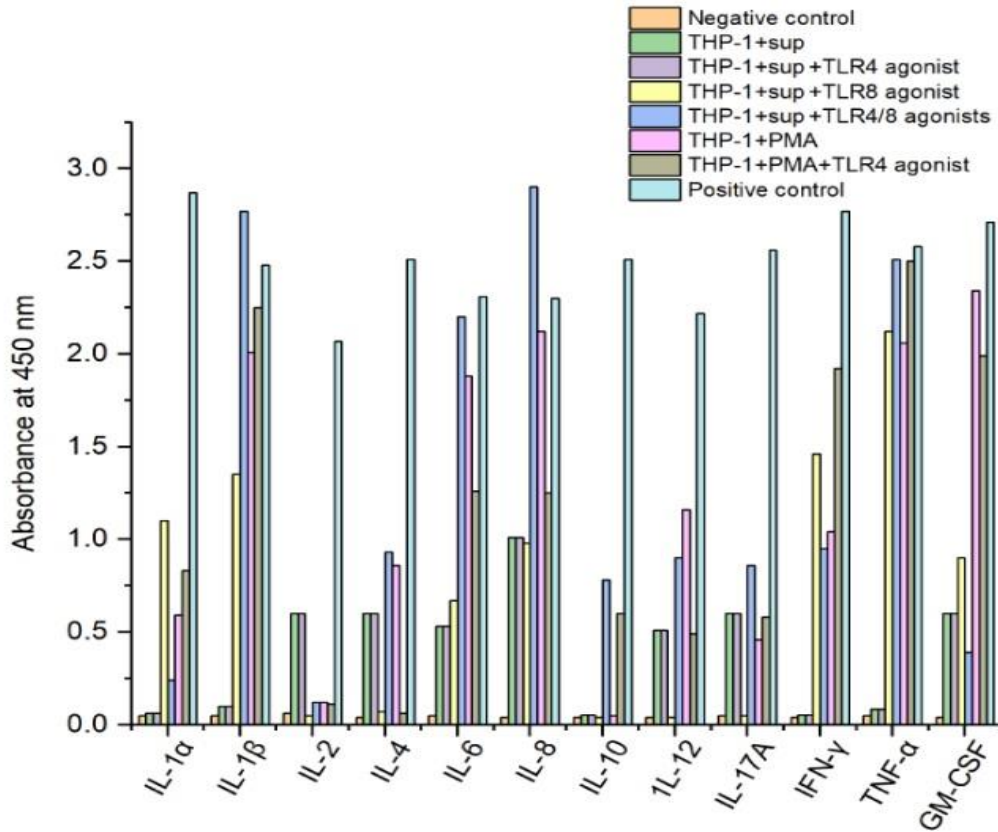
PC3 prostat kanseri hücrelerinin kültür medyum süpernatantlarına TLR4, TLR8 agonistlerini ile ayrı olarak ve TLR4+8 agonistlerini ile kombine olarak 24 saat süre ile uyarımdan sonra hücre kültür süpernatantları toplandı ve THP 1 hücreleri üzerine ilave edildi ve 48 saat süre ile inkübasyona bırakıldı. Ayrıca, THP1 hücreleri, PMA ve/veya TLR agonistiyle de inkübe edildi. İnkübasyon sonunda serum starvasyonu sonrasında süpernatantlar toplandı ve -80°C’da çalışma yapılacağı zamana kadar saklandı. PC3 süpernatant, PC3 süpernatant+TLR4 agonist, PC3 süpernatant+TLR8 agonist, PC3 süpernatant+TLR4+8 agonistleri koşullarında toplanan hücre kültür süpernatantlarında multiarray sitokin ELISA yöntemiyle analiz yapıldı. IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8,IL-10,IL-12, IL-17A, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , GM-CSF incelemeleri yapıldı. THP1 hücrelerinin prostat kanseri hücreleri süpernatantları ile inkübasyonu sonucunda inflamatuvar sitokinlerin varlığı düşük oranlarda bulunmuştur. Buna karşılık THP1 hücrelerinin, TLR4 ve/ya TLR8 agonistleri ile uyarılmış PC3 hücrelerinin süpernatantları varlığında bazı inflamatuvar sitokinlerin salımı belirgin olarak tespit edildi. Özellikle TLR4+8 agonistlerinin kombine kullanımının makrofajlardan bazı sitokinlerinin salınımını arttırdığı bulundu. Şekil 4.14’de ve Tablo-4.2’ de multiArray ELISA’da çalışılan THP1 hücrelerinden salınan inflamatuvar sitokinlerin sonuçları pozitif ve negatif kontroller ile birlikte gösterilmiştir.

**Inflammatuvar Sitokinler**

	IL-1 $\alpha$	IL-1 $\beta$	IL-2	IL-4	IL-6	IL-8	IL-10	IL-12	IL-17A	IFN- $\gamma$	TNF $\alpha$	GM-CSF	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
<b>A</b>	0.05	0.05	0.06	0.04	0.05	0.04	0.04	0.04	0.05	0.04	0.05	0.04	Negatif Kontrol
<b>B</b>	0.06	0.10	0.60	0.60	0.53	1.01	0.052	0.51	0.60	0.051	0.083	0.60	THP1 SN
<b>C</b>	1.10	1.35	0.05	0.07	0.67	0.98	0.04	0.04	0.05	1.46	2.12	0.90	THP1 SN TLR4
<b>D</b>	0.09	2.76	1.20	0.59	0.32	0.97	0.06	0.60	0.06	0.27	0.36	1.25	THP1 SN TLR8
<b>E</b>	0.24	2.77	0.12	0.93	2.20	2.90	0.78	0.90	0.86	0.95	2.51	0.39	THP1 SN TLR4+8
<b>F</b>	0.59	2.01	0.12	0.86	1.88	2.12	0.05	1.16	0.46	1.04	2.06	2.34	THP1PMA
<b>G</b>	0.83	2.25	0.11	0.06	1.26	1.25	0.60	0.49	0.58	1.92	2.50	1.99	THP1PMA+TLR4
<b>H</b>	2.87	2.48	2.07	2.51	2.31	2.30	2.51	2.22	2.56	2.77	2.58	2.71	Pozitif Kontrol

Copyright © 2009 Edita Aksamitene

**Şekil 4.14.** MultiArray ELISA yöntemiyle değerlendirilen, THP1 hücrelerinden salınan inflammatuvar sitokinlerin sonuçları pozitif ve negatif kontroller ile birlikte gösterilmiştir.



**Tablo 4.2** MultiArray ELISA yöntemiyle değerlendirilen, THP1 hücrelerinden salınan inflamatuvar sitokinlerin sonuçları grafik olarak pozitif ve negatif kontroller ile birlikte gösterilmiştir.

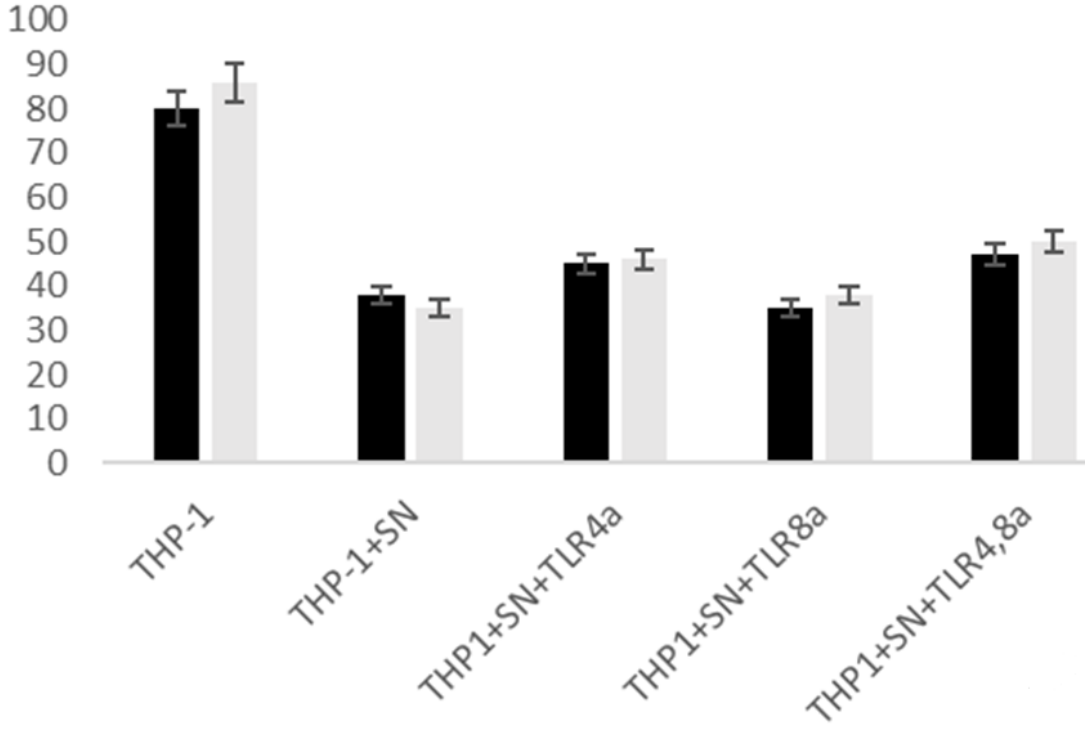
#### 4.4. Prostat Kanseri Hücre Kültür Süpernatlarının THP1 Hücrelerinde Fagositoza Olan Etkisinin Etkisinin Değerlendirilmesi

PC3 prostat kanseri hücrelerinin kültür medyum süpernatları; TLR4, TLR8 agonistleri ile ayrı olarak ve TLR4+8 agonistleri ile kombine olarak uyarımdan ve serum starvasyonundan sonra toplandı ve THP 1 hücreleri üzerine ilave edildi. Daha sonra 48 saat süre ile inkübasyona bırakıldı. THP1 hücrelerinde fagositoz aktivitesi akım sitometri yöntemiyle değerlendirildi.

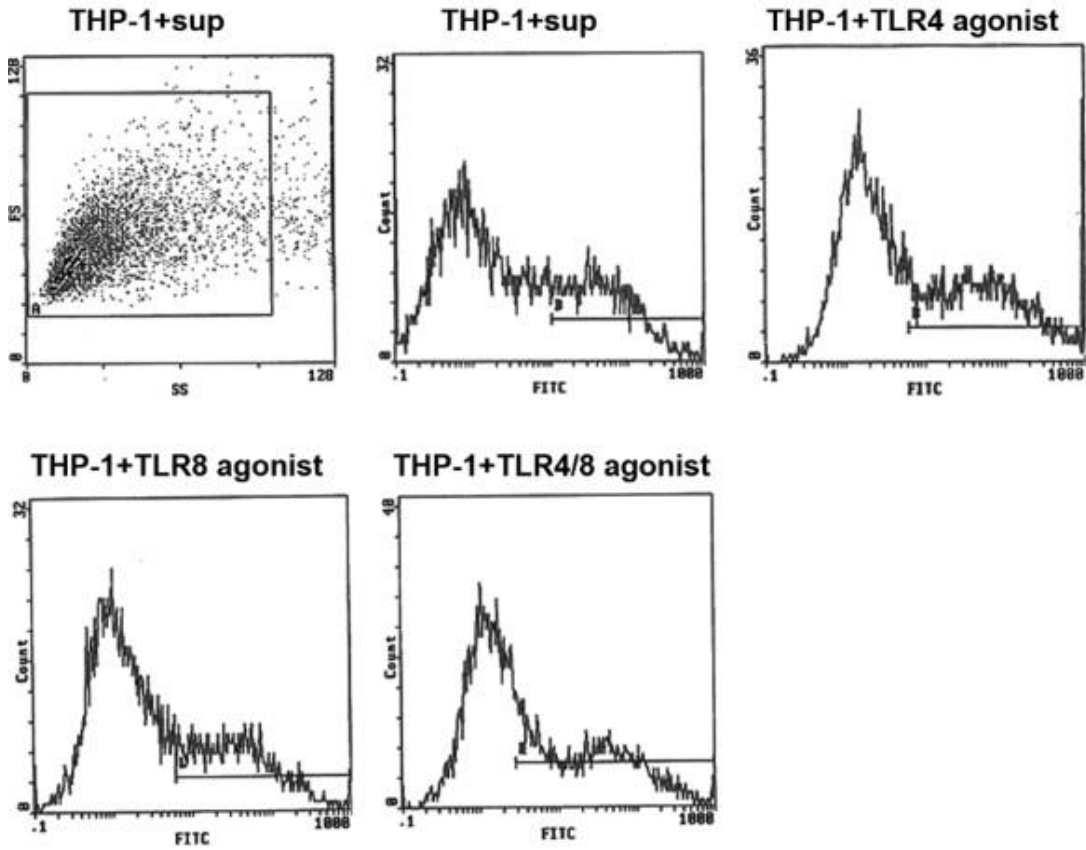
PC3 hücre süpernatına maruz bırakılan THP 1 hücrelerinin fagositoz aktiviteleri ile; TLR4+TLR8 agonistleri ile uyarılmış PC3 hücrelerinin süpernatlarına maruz bırakılan THP 1 hücrelerinin fagositoz aktiviteleri kıyaslandığında, TLR4+8 agonistleri ile kombine olarak uyarılan THP 1 hücrelerinde



fagositoz kapasitesinin artığı bulundu ( $p<0.05$ ). Bu bulgular, M2 tipi makrofajların azaldığını düşündürmektedir. Şekil-4.15'te THP 1 hücrelerindeki fagositoz aktivitesinin grafik olarak dağılımını gösteren sonuçlar, Şekil-4.16'da akım sitometri histogramları gösterilmiştir.



**Şekil 4.15.** THP 1 hücrelerindeki fagositoz aktivitesinin grafik olarak dağılımını gösteren sonuçları.

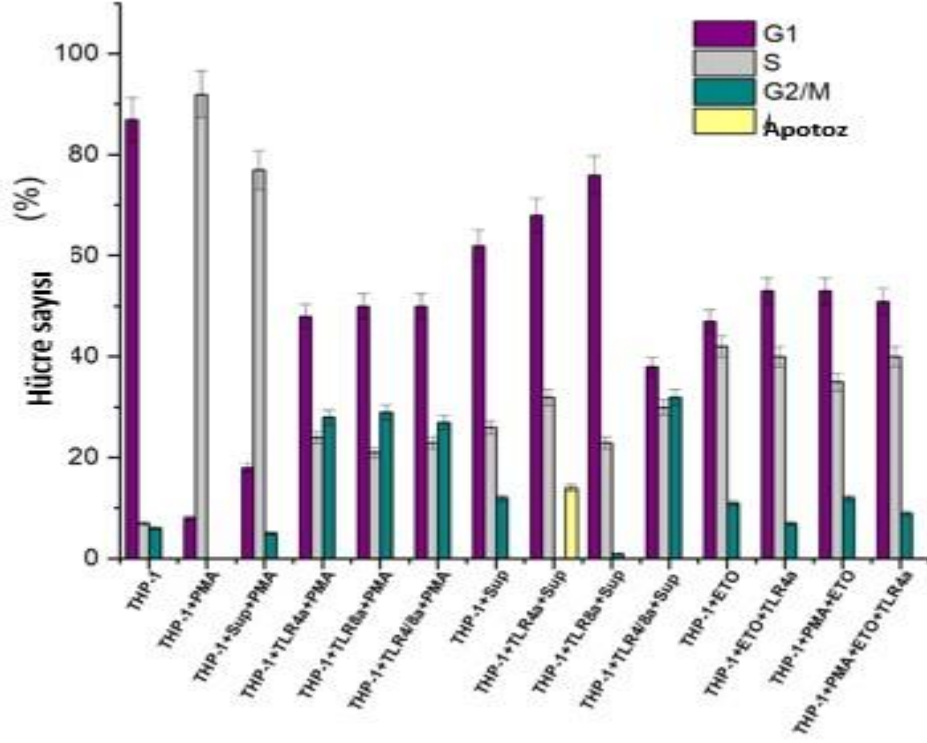


**Şekil 4.16.** THP 1 hücrelerindeki fagositoz aktivitesinin grafik olarak dağılımını gösteren akım sitometri histogramları.

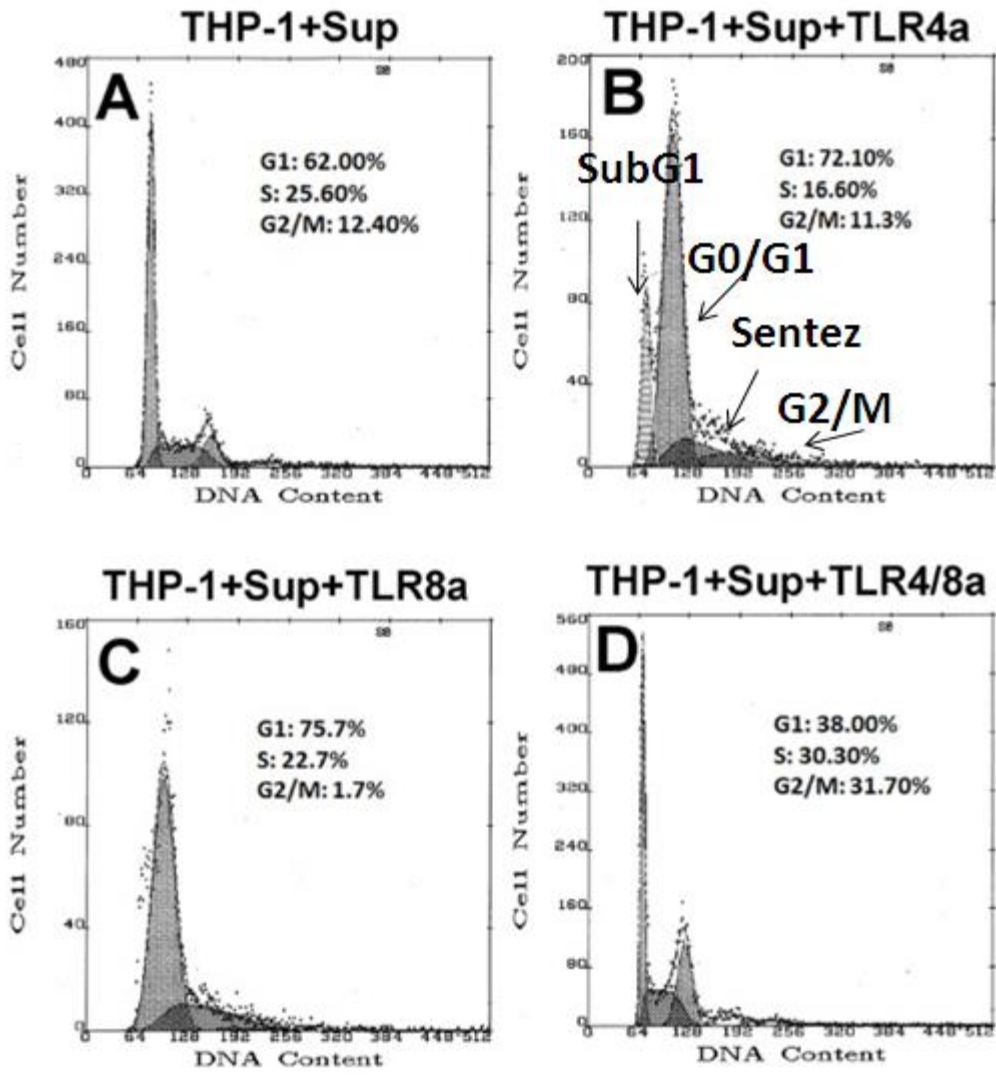
#### **4.5. Prostat Kanseri Hücre Kültür Süpernatanlarının THP1 Hücrelerinde Hücre Siklusuna Etkisinin Değerlendirilmesi**

PC3 prostat kanseri hücrelerinin kültür medyum süpernatanları; TLR4, TLR8 agonistleri ile ayrı olarak ve TLR4+8 agonistleri ile kombine olarak uyarımını takiben serum starvasyonu sonrasında toplandı ve THP 1 hücreleri üzerine ilave edilerek inkübasyona bırakıldı. Ayrıca, THP1 hücreleri PMA ve etoposid veya TLR agonistleriyle de inkübe edildi. Daha sonra THP 1 hücrelerinde hücre siklusu ve DNA analizi akım sitometri yöntemiyle değerlendirildi. THP 1 hücrelerinin PC3 hücre kültür süpernatanı ile uyarıldığı koşuldaki hücre siklusu fazları ile kıyaslandığında, THP 1 hücrelerinde özellikle TLR8 agonisti ile uyarılmış PC3 hücrelerinin süpernatanları varlığında G0/G1 fazında hücrelerin birikiminin anlamlı

olarak arttığı bulundu ( $p < 0.05$ ). Diğer bazı koşullarda, THP 1 hücrelerinin hücre siklusunda S fazında ilerleyerek proliferasyon gösterdikleri bulundu.



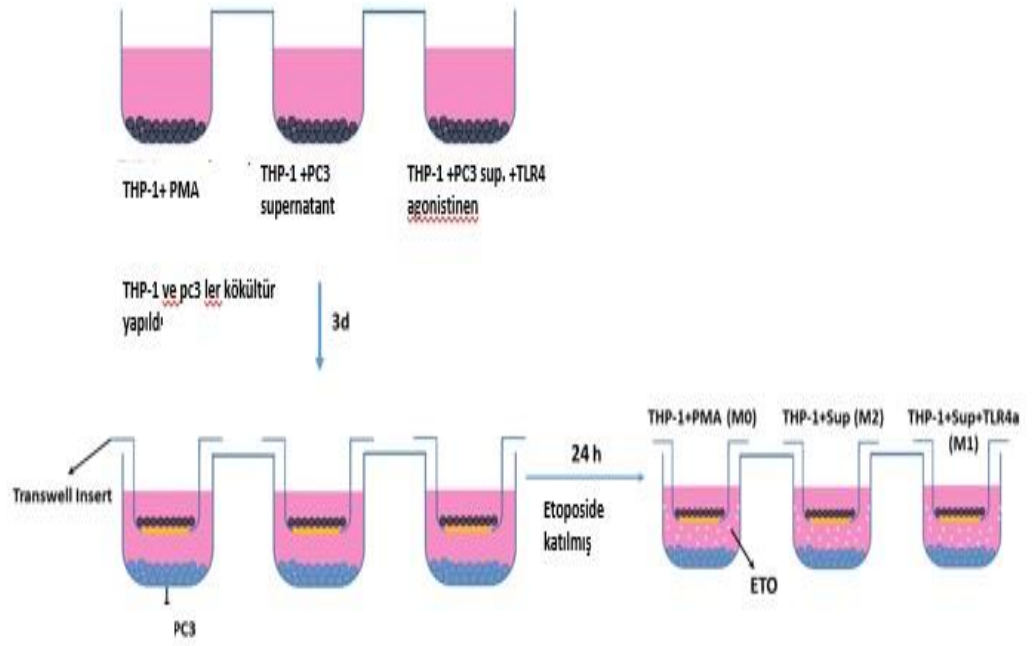
Şekil 4.17. THP1 hücrelerinde hücre siklusu sonuçlarının grafiksel olarak dağılımı



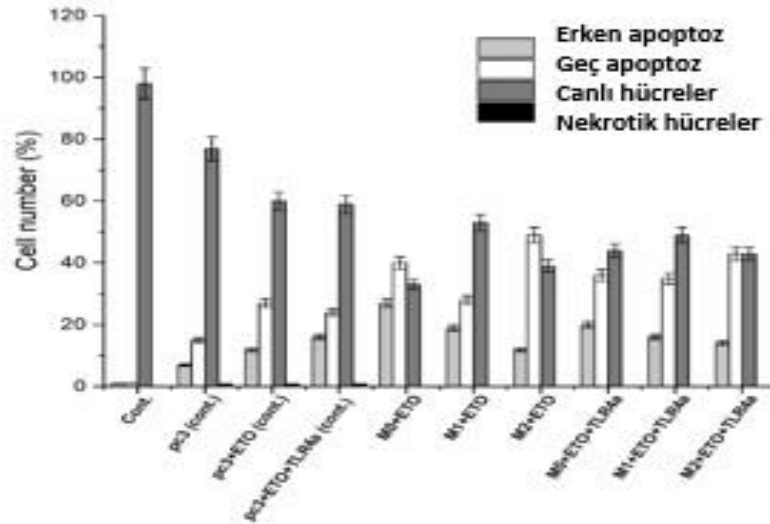
**Şekil 4.18.** THP1 hücrelerinde hücre siklusu sonuçlarının grafiksel olarak dağılımını gösteren akım sitometri histogramları. A. PC3 süpernatan B. TLR4 agonist içeren PC3 süpernatan C. TLR8 agonist içeren PC3 süpernatan D. TLR4+TLR8 agonistlerini içeren PC3 süpernatan.

#### **4.6. Makrofajların, Prostat Kanseri Hücrelerinde Apoptozise olan Etkisinin Değerlendirilmesi**

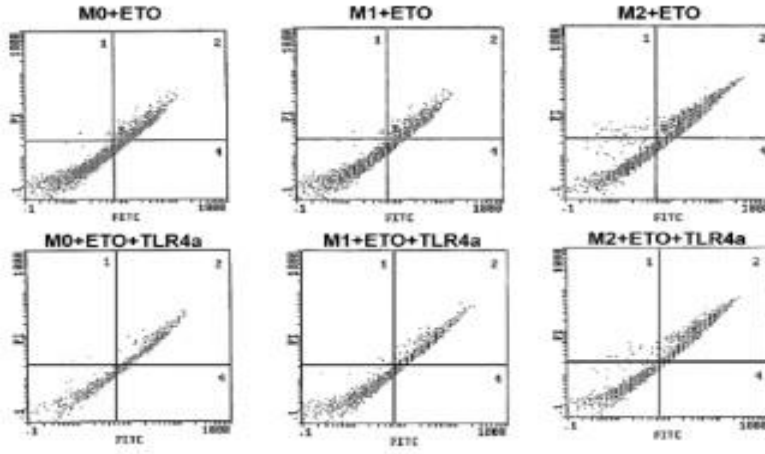
Makrofaj polarizasyonunun, PC3 prostat kanser hücrelerinde apoptozise olan etkilerini araştırmak için, 3 koşulda makrofajlar ile deney yapıldı (Şekil 4.19). Birinci koşulda, THP1 makrofajları PMA ile uyarıldı (M0 fenotipi), ikinci koşulda, makrofajlar PC3 prostat kanser hücre süpernatantları ile uyarıldı ve üçüncü koşul olarak da TLR4 agonisti ile uyarılmış PC3 hücrelerinin süpernatantları varlığında uyarıldı. Daha sonra transwell üzerindeki kuyulara  $1 \times 10^6$  /ml'de olacak sayıda monosit/makrofaj ilave edildi ve Transwell altındaki kuyulara ise  $1 \times 10^6$  /ml'de olacak sayıda PC3 prostat kanser hücresi konuldu ve 16 saat serumsuz medyumda inkübe edildi. Daha sonra PC3 hücreleri üzerine 50  $\mu$ M etoposid ilave edildi ve 24 saat süre ile inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon sonrası, PC3 hücreleri toplandı ve Annexin V FITC ile işaretlendi. 10.000 hücre sayılarak hücreler değerlendirildi. Şekil 4.20'de, PC3 hücrelerinde transwell deneyi sonrasında apoptozis sonuçlarının grafiksel olarak dağılımı gösterilmiştir. Şekil 4.21'de PC3 hücrelerinde, transwell deneyi sonrasında apoptozis sonuçları akım sitometri histogramları gösterilmiştir.



**Şekil 4.19.** Makrofaj farklılaşmasının PC3 prostat kanser hücrelerinde apoptoze olan etkilerini göstermek için yapılan transwell deney düzeniği.



**Şekil 4.20.** PC3 hücrelerinde transwell deneyi sonrasında apoptozis sonuçlarının grafiksel olarak dağılımı.



**Şekil 4.21.** PC3 hücrelerinde transwell deneyi sonrasında apoptozis sonuçlarının akım sitometri histogramları olarak gösterilmesi.

## 5. TARTIŞMA

Prostat kanseri, erkeklerde kanser ile ilişkili ölüm nedenleri arasında ikinci sırada yer alan bir kanser tipidir. Prostat kanseri aile hikayesi olması, hastalık riskini arttıran nedenlerdendir (142). Bu faktörler dışında, prostat kanserinin gelişimi çok aşamalı ve faktörlü bir süreçtir. Çift DNA kırıkları içeren genomik rearanjmanlar, tümör hücrelerinin metabolik değişimleri ve proinflamatuvar mikroçevrenin oluşumu sonucunda prostat kanserinin gelişimi ile progresyonunu destekleyen faktörler ortaya çıkmaktadır (143). Prostat kanser hücrelerinin mikroçevresindeki değişimler tümör gelişimini hızlandırmaktadır. Tümör mikroçevresinde bulunan makrofajlar, tümörlerden salınan sitokin, kemokin ve büyüme faktörleri fonksiyonel çeşitlilik ve fenotipik farklılaşmada etkili olurlar (144). Bu çalışmada, TLR agonistleri ile inkübe edilen prostat kanseri hücrelerinin salgıladıkları faktörleri içeren süpernatantlarının makrofaj hücrelerinin farklılaşmasına olan etkileri ile fonksiyonel özellikleri değerlendirilmiştir. Çalışmamızda öncelikle, prostat kanseri hücre dizisi PC3 kültür süpernatantları ile TLR4 ve TLR8 agonistleri varlığında ve TLR4+8 agonistlerinin kombine olarak varlığında, THP1 monositik hücrelerin morfolojileri değerlendirildi.

THP1 monositik hücreleri, prostat kanseri hücre kültür süpernatantları ve TLR agonistleri varlığında, yuvarlak morfolojiden içsi benzeri uzamış adezyon gösteren bir morfolojik görünüm gösterdikleri gözlenmiştir. Prostat kanser hücre süpernatantlarının, makrofajların morfolojilerindeki değişimi benzer olarak akciğer, kolorektal, meme, servikal kanserlerde yapılan çalışmalarda da gözlenmiştir (145). Tümör hücresi kültür süpernatantlarının tümör mikroçevresindeki makrofajların çevresinde toplanmasını sağlayarak tümör hücrelerinin yaşamalarına destek oldukları bilinmektedir (145). Makrofajlar, M1 (klasik olarak aktive olan) ve M2 (alternatif olarak aktive olan) olarak farklılaşırlar. M1 tipi farklılaşma gösteren makrofajlar, immün sistemin hücresel önemli bir bileşenini oluşturur. M1 tipi makrofajlar hücre içi patojenler ve kansere karşı koruyucu rol oynarlar. M1 tipi makrofajlar toll like reseptörlerin aktivasyonu sonucunda IFN $\gamma$  ve TNF $\alpha$  sitokinlerin salınımını uyararak inflamatuvar cevabı başlatırlar ve IL-1, IL-6, IL-12, IL-23 ve TNF $\alpha$  salgılayarak mikroorganizmalar ve kanser hücrelerine karşı sitotoksik etki göstererek Th1 cevabını arttırlar (146). M1 makrofajları, antijen sunan hücre olarak da tümöre karşı



immün yanıt oluştururlar. M2 tipi makrofajlar da tümör ile ilişkili makrofajlar olarak bilinir ve tümör büyümesi ve metastazını kolaylaştırırlar. CD68 M1 makrofajları belirleyen yüzey antijeni belirleyicisi; CD163 ve CD206 da M2 makrofajları belirleyen yüzey antijeni belirleyicisi olarak kullanılmaktadır. Çok sayıda yapılan çalışmaların sonuçları, tümör tipi ve lokalizasyonuna göre TAM'ların kötü klinik seyir ile ilişkili olduğunu göstermiştir (147).

İnsan THP1 hücreleri, *in vivo* monositlere/makrofajlara benzeyen biyolojik davranışları nedeniyle araştırmalarda sıklıkla kullanılan bir hücre dizisidir. Bu özelliklerinden dolayı, çalışmamızda THP1 hücre hattını, prostat kanseri hücrelerinden salgılanan faktörlerin makrofaj farklılaşmasının gösterilmesinde kullandık. Çalışmamızda prostat kanser hücre dizisi olan PC3 hücrelerini kullandık. Prostat kanser hücrelerinin kültür süpernatantlarının, THP 1 monositik hücreler ile inkübasyonu sonucunda, CD206 ve CXCR2 kemokin hücre yüzey ekspresyonları tespit edildi. Ayrıca, PC3 süpernatantına maruz kalan monositlerde/makrofajlarda fagositoz kapasitesinin azaldığı bulundu. Bu sonuçlar, prostat kanseri hücrelerinden salınan soluble faktörlerin M2 tipinde makrofaj polarizasyonunda etkisi olabileceğini göstermektedir (148).

M2 tipi makrofajlar, yüksek oranda CD206 (Mannoz reseptörü), ve CD68 eksprese ederler. Aynı zamanda M2 tipi makrofajlar, IL-10<sup>high</sup>, IL-12<sup>low</sup>, IL-23<sup>low</sup> olarak da inflamatuvar sitokinleri salgırlar (149). M2 tipi makrofajlardan gelişen TAM'lar tümör hücrelerinin proliferasyonu, apoptozisi ve anjiogenezisi ile ilişkili süreçlerde ve hücre fonksiyonlarda etkili olurlar. Proinflamatuvar sitokinler, tümörlerin biyolojik davranışlarını içeren süreç içinde esas rol oynarlar. Bu süreç içinde IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 en iyi bilinen sitokinler olarak çoklu fonksiyon gösteren yüksek biyolojik aktivite ile inflamasyon, immün yanıt ve tümör gelişimi gibi fizyolojik ve patolojik cevaba katılırlar. Kemokin (C-C motif ) ligand (CCL)2, CCL5, CCL7 ve kemokin (C-X3-C motif) ligand (CX3CL91 gibi çeşitli kemokinler ve buna ilaveten makrofaj koloni stimule edici faktör (M-CSF), granülosit–makrofaj koloni stimule edici faktör ve vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) gibi tümör hücreleri tarafından üretilen sitokinler monosit ve makrofajların tümör içindeki infiltrasyonunu artırır (150). İnflamatuvar stimülasyonun çeşitli kanserlerin

gelişiminde ve ilerlemesinde etkisi olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Fakat proinflatuvar sitokin üretiminin temelini oluşturan mekanizma tam olarak anlaşılammıştır. Bugüne kadar yapılan çalışmalardan elde edilen bilgilere göre tümör stroması içinde bulunan TAM'ların önemli bir hücre popülasyonu olduğu gösterilmiştir. TAM'lar M2 makrofaj fenotipine sahiptirler. M2 makrofajlar Th2 tipi hücre cevabını arttırır. M2 makrofajlar farklı sitokinler ile uyarıldıklarında üç farklı alt gruba ayrılırlar. M2a (alternatif ) tipi makrofajlar IL-4 ve IL-13 maruziyeti ile gelişirler, M2b makrofajları da immün kompleksler ile indüklenirler. Hem M2a hem de M2b makrofajları Th2 tipi cevabı aktive ederek Th2 tipi sitokinlerin ve T helper 2 hücrelerin birikimini sağlar. Hem M2a hem de M2b makrofajları inflamasyona karşı yanıt geliştirerek protümorojenik özellik gösterir. M2c tipi makrofaj alt grubu da IL-10 ve glukokortikoid hormonları ile aktive olur ve M2c makrofaj cevabı inflamasyonun baskılanmasından sorumludur (151).

Prostat kanserli hastalarda, IL-6 serum düzeyi yüksekliği ileri evre metastatik tümörlerin bir belirleyicisi olmuştur. Çalışmamızda, makrofaj farklılaşmasında tümör hücre süpernatantlarının etkisini göstermek için multiarray ELISA yöntemiyle çeşitli sitokinleri araştırdık. Özellikle, çeşitli sitokinlerin belirgin olarak salgılandıklarını gösterdik. İnflatuvar sitokinler, tümör hücrelerinden salınan faktörlerin etkisiyle M2 tipi makrofaj polarizasyonunda fonksiyonel olarak yer aldığını göstermektedir (152). THP1 makrofajların PMA ile aktive edilmesinden sonra da bazı inflamatuvar sitokinler salgılanmaktadır.

Prostat kanseri hücre kültür süpernatantları, THP 1 hücrelerinde, süpernatansız kontrol grubu hücrelerine kıyasla, fagositoz kapasitesinde azalmaya neden olmuştur. M2 makrofajlarda, fagositoz kapasitesinin azalması tümör hücrelerinin gelişimine katkı sağlayan diğer bir özellik olabilir (153).

Son yıllarda yapılan çalışmalar, meme kanseri, glioma, gastrointestinal sistem ve larinks kanser hücrelerindeki TLR'lerin, invazyon ve metastazdaki önemini göstermiştir . Fare metastatik meme kanser modelinde, lipopolisakkarit (LPS) ile indüklenen tümör hücrelerinde anjiogenez, damar geçirgenliğinde artım sonucu tümör hücre invazyonunda artım bulunmuştur (154).

Kanserde Toll like reseptörlerin makrofaj farklılaşma sürecinde aldığı roller oldukça ilgi çekicidir. Bu doğrultuda biz de çalışmamızda, prostat kanseri hücrelerinin TLR agonistleri ile uyarılmasından sonra makrofaj polarizasyonundaki etkisini araştırdık. Bu amaçla, prostat kanseri hücreleri TLR4 ve TLR8 agonistleri ile tek olarak veya TLR4+8 agonistleri ile kombine olarak inkübe edildikten sonra toplanan hücre kültür süpernatantlarının THP1 monositik hücrelerinin polarizasyonuna olan etkisini araştırdığımızda, TLR agonistlerinin M1/M2 tipi karışık makrofaj farklılaşmasında etkili olduğunu gözlemledik. TLR4 ve TLR8 agonistlerinin varlığında prostat kanseri hücrelerinin süpernatantlarının, M1/M2 tipi makrofaj farklılaşmasını etkilediğini ve M2 tipindeki makrofajlarda azalma olduğunu gösterdik.

Prostat kanseri hücrelerinin TLR agonistleriyle uyarılması ile toplanan hücre kültür süpernatantları THP 1 hücrelerde inflamatuvar sitokin salınımını da etkilemektedir. Bazı proinflamatuvar sitokinlerde artış olduğu ve bu sitokinlerin tümöre karşı (antitümör) etki gösterebileceği düşünülmüştür.

Genel bilgiler doğrultusunda, M1 tipine farklılaşan hücrelerde, fagositoz kapasitesinin de artmış olması tümör mikroçevresindeki debrislerin temizlenmesi ve tümöre ve kronik inflamasyona karşı savunma mekanizmalarının fonksiyonel olarak çalıştığını düşündürülebilir. Tümör mikroçevresinde bulunan M1 tipi makrofajlarda, tümör hücrelerinde eksprese olan TLR'lerin makrofajlar ile interaksiyonu sonucu da fagositoz aktivitesinin uyarılmasına neden olabilir. Literatürde şimdiye kadar yapılan çalışmalarda, özellikle TLR2/6 ve TLR4'ün prostat kanseri hücrelerinde ekspresyonu gösterilmiştir (155). TLR ekspresyonu yüksek olan tümörlerde, tümör gelişime destek olan TAM'ların TLR agonistleri ile M1 tipi makrofajlara farklılaşmasıyla salgıladıkları sitokinler ile antitümör yanıtı yol açmaktadır. Çalışmamızdaki bulgularımız, TLR agonistlerinin makrofajlardan salgılanan sitokinlerin prostat kanserinde proinflamatuvar cevabı etkilediğini ve inflamatuvar mikroçevredeki immün hücrelerden sitokin salınımının değiştiğini göstermiştir. Bu bulgular, M2'den gelişen TAM'ların gelişiminin engellenmesinde TLR agonistleri aracılığı ile düzenleyen yeni bir mekanizma ile değerlendirilebilir. Çalışmamızda, kullandığımız TLR4 agonisti, E.coli'den elde edilen lipopolisakkaridten oluşan bir endotoksin olup hücre membrandaki TLR4'e bağlanır. Hücredeki NF-k B transkripsiyon faktörünü

uyararak proinflamatuvar sitokinlerin salınımını artırır. Th1 sitokinleri ile çeşitli kemokinlerin salınımını arttırarak *in vivo* ortamda tümör mikroçevresinde başta makrofajlar olmak üzere diğer immün sistem hücrelerinin toplanmasına yardımcı olabilir.

TLR4 agonistleri, edinsel immün yanıt için adjuvant etkisinden dolayı kansere karşı kullanılan ajanlar içinde büyük bir potansiyele sahiptir. LPS gibi mikrobiyal moleküller ve aynı zamanda HSP'ler, fibrinojen ve HMGB1 endojen ligandlar aracılığı ile TLR4 stimülasyonu IL-6, TGF- $\beta$ 1, TNF- gibi pro-inflamatuvar sitokin üretimini indükler. TLR4 normal ve malign prostat epitelyal hücreleri üzerinde eksprese edilir. Prostat hücrelerinde TLR4 sinyal yolağının aktivasyonu sonucunda doğal immün sistem aktive olur. Bununla birlikte, prostat epitelyal hücrelerinde TLR4 hücre sinyal yolunun uzun süreli aktivasyonu, tümör hücresi aktivasyonunu, proliferasyonunu, hayatta kalmasını ve tümör transformasyonunu destekleyebilir. Buna ilave olarak, TLR sinyal yolaklarının aktivasyonu sonucunda IL-6, IL-8 ve IL-10 sitokinleri, prostat kanseri gelişmesine ve hastalığın ilerlemesine aracılık eder (156). TLR4 ligand stimülasyonu, prostat epitel hücreleri NF- $\kappa$ B, TGF- $\beta$ 1 ve VEGF'yi artımına yol açar. Ayrıca, IL-8'in de prostat kanserinde arttığı gösterilmiştir. Bu durum da prostat hücrelerinin, muhtemelen, LPS gibi bakteriyel ürünlere yanıt olarak, kalıcı yüksek inflamasyonla ilişkili olduğunu göstermektedir. Yapılan çalışmalarda, TLR4 knockout PC3 prostat kanseri hücrelerinde tümör hücre göçü ve invazyonunun azaldığı gösterilmiştir. TLR4 genindeki tek bir nükleotid polimorfizminin de prostat kanseri riski ile ilişkili olabileceği gösterilmiştir (157). Peroksiredoksin-1, TLR4 agonistidir. Fare kanser modelinde, kanser anjiyogenezinin kronik aktivasyonu yoluyla prostat tümör hücresi büyümesini destekleyerek TLR4 ile etkileştiği gösterilmiştir. Bu nedenle, TLR4 ile ilişkili doğal immün yanıtın aktivasyonu ve inflamasyon, prostat kanserinin etiyolojisi ve progresyonunda rol oynayabilmektedir (158).

Çalışmamızda, kullandığımız TLR8 agonisti de ssRNA'da IFN $\alpha$  ve TNF $\alpha$  sitokinlerinin salınımını ve CXCL9, CXCL10 gibi kemokinlerin ekspresyonunu da arttırarak immün hücrelerin tümör mikroçevresinde toplanmasında etkili olabilir (159).

M2 makrofajlar ve TAM'lar, çeşitli tümörleri infiltre eder ve tümörlerin kötü prognozu ile ilişkilidir. Bundan dolayı M2 ve TAM'ların kontrolü ve regülasyonu tümörlerin prognozu için anahtar faktör oluşturur. Toll like Reseptör agonistleri olan TLR 4 agonisti LPS'in ve TLR8 agonisti sRNA40/LyoVec'in makrofaj polarizasyonuna olan etkileri üzerine yapılan çalışmalar oldukça azdır. Çalışmamızda, M1 ve M2 tipi farklılaşma gösteren makrofajlarda, prostat kanseri hücre kültür süpernatanlarının ve TLR agonistleri varlığında prostat kanseri hücre kültür süpernatanlarının, THP1 hücrelerinde hücre siklusu ve hücre proliferasyonuna olan etkileri de değerlendirildi. TLR8 agonistinin hücre siklusunda G0/G1 fazında birikime neden olduğunu diğer bazı koşullarda ise makrofajların hücre siklusunun sentez fazında ilerleyerek proliferasyon gösterdikleri izlendi. Kanser hücreleri sıklıkla immünojen olmayan, immün denetimden kaçan hücrelerdir. Bu nedenle, son zamanlarda yapılan çalışmalarda, immün sistem tarafından kanser hücrelerinin tanınması için yeni hedefler araştırılmaya başlanmıştır. Bu hedefler içinde de tümör mikroçevresindeki tümör ile ilişkili makrofajlar, TLR'lerin varlığı ve aktivasyonu yer almaktadır. TLR aktivasyon sinyali ile arttırılan sitotoksik immün cevap, prostat kanser hücrelerinin ölümüne ve tümör hücrelerinin gerilemesi ve proliferasyonunun durmasına yol açabilmektedir (160).

Çalışmamızda, makrofajların/monositlerin, prostat kanser hücrelerinde etoposid varlığında apoptozisi etkileyebildiği bulunmuştur. Bu doğrultuda, ileride yapılacak çalışmaların sonucunda daha net bilgiler edinildikçe, prostat kanser hücrelerine karşı kullanılan kemoterapötik ajanların yanında kombine olarak TLR4 ligandlarının da kullanılabileceğini, böylece tümör hücrelerine karşı sitotoksik etkinin arttırılmasında etkin bir ajan olabileceğini düşündürmektedir.

Çalışma sonuçları, TLR agonisti varlığında PC3 prostat kanser hücre kültür süpernatanlarının THP1 hücrelerinde makrofaj fenotipi farklılaşmasında etkili olduğunu göstermekte olup tümör mikroçevresinde M1/M2 tipinde bulunan karışık makrofaj populasyonunun inflamatuvar sitokin salınımı ve fagositoz kapasitesinin fonksiyonel özelliklerinin belirlenmesinde ve TAM'lar ile ilgili araştırmalar için uygun bir *in vitro* deney modeli olabileceği yönünde umut vermektedir.

**Sonuç**

Çalışma sonuçlarımız, TLR4 agonistleri ile uyarılan prostat kanserinden salınan soluble faktörlerin makrofaj polarizasyonunda rol oynayabildiklerini düşündürmektedir. Makrofajların, inflamatuvar sitokin salımında ve fagositoz kapasitesinde değişimler izlenmiştir.

## 6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

1. PC3 prostat kanser hücre kültür süpernatantları, TLR4 ve TLR8 agonisti içeren PC3 prostat kanser hücre kültür süpernatantları, THP1 hücrelerinin morfolojilerini değiştirir. Uzamış iğsi benzeri hücre morfolojisine dönüşüm ve hücrelerin adezyonunun arttığı izlenmiştir.
2. PC3 prostat kanser hücrelerinin TLR4 ve TLR8 agonistleriyle inkübasyonu sonucunda elde edilen hücre kültür süpernatantlarının, THP1 hücrelerini M1/M2 karışık tipinde farklılaştırdığı ve M2 makrofaj yüzey belirtecinde azalmaya neden olduğu bulunmuştur.
3. PC3 prostat kanser hücre kültür süpernatantı ile THP1 hücrelerinin inkübasyonu sonucunda, bazı inflamatuvar sitokinleri yüksek miktarda bulunurken; diğer bazı inflamatuvar sitokinler düşük miktarda bulunmuştur. Buna karşılık, THP1 hücrelerinin, PC3 prostat kanser hücrelerinin TLR4 ve TLR8 agonistleriyle ve TLR4+8 agonistlerinin kombine inkübasyonu sonucunda çeşitli inflamatuvar sitokinlerin belirgin olarak arttığı bulunmuştur.
4. TLR4 ve TLR8 agonistleri ile ayrı olarak veya TLR4+8 agonistleri ile kombine olarak uyarılan PC3 hücre kültür süpernatantı varlığında, THP 1 hücrelerinde fagositoz kapasitesinin arttığı bulunmuştur.
5. TLR4 ve TLR8 agonistleri ile ayrı olarak veya TLR4+8 agonistleri ile kombine olarak uyarılan PC3 hücre kültür süpernatantı varlığında, THP 1 hücrelerinde hücre siklusunda değişimler görülmüştür. TLR8 agonisti ile uyarılmış PC3 hücrelerinin süpernatantları varlığında THP 1 hücrelerinin, hücre siklusunun G0/G1 fazında biriktiği bulunmuştur.
6. Makrofaj farklılaşmasının PC3 prostat kanser hücrelerinde apoptozis üzerinde etkisi olabileceği bulunmuştur.
7. Bundan sonraki çalışmalarda, prostat kanserli hastalarının prostat tümör dokusundan alınacak biyopsi örneklerinden yapılacak olan tümör hücre kültürlerinin TLR4 ve TLR8 agonistleri ile uyarılmasından sonra elde

edilecek süpernatantların, THP1 hücrelerinin farklılaşmasına etkileri araştırılabilir.

8. Çalışmada multiarray ELISA yöntemiyle değerlendirilen proinflamatuvar sitokinlerden yüksek olanların miktarları, sitokin spesifik ELISA'lar ile değerlendirilebilir.
9. TLR4 ve TLR8 agonistleri ile ayrı olarak ve TLR4+8 agonistleriyle kombine olarak uyarılan prostat kanseri hücrelerinde TLR sinyal iletim yollarının araştırılması daha sonra yapılacak çalışmalara değer katabilecektir.



## 7. KAYNAKLAR

1. Cole CR, Ziegler TR. Small bowel bacterial overgrowth: a negative factor in gut adaptation in pediatric SBS. *Curr Gastroenterol Rep.* 2007;9(6):456-62.
2. Collin M, Bigley V, Haniffa M, Hambleton S. Human dendritic cell deficiency: the missing ID? *Nat Rev Immunol.* 2011;11(9):575-83.
3. Tolouei Semnani R, Moore V, Bennuru S, McDonald-Fleming R, Ganesan S, Cotton R, et al. Human monocyte subsets at homeostasis and their perturbation in numbers and function in filarial infection. *Infect Immun.* 2014;82(11):4438-46.
4. Sistla R, J VSV, Afroz T. Malignant Pigmented Villonodular Synovitis-A Rare Entity. *J Orthop Case Rep.* 2014;4(4):9-11.
5. Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med.* 1994;179(4):1109-18.
6. Passlick B, Flieger D, Ziegler-Heitbrock HW. Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood.* 1989;74(7):2527-34.
7. Mangan DF, Wahl SM. Differential regulation of human monocyte programmed cell death (apoptosis) by chemotactic factors and pro-inflammatory cytokines. *J Immunol.* 1991;147(10):3408-12.
8. Ingersoll MA, Platt AM, Potteaux S, Randolph GJ. Monocyte trafficking in acute and chronic inflammation. *Trends Immunol.* 2011;32(10):470-7.
9. Aziz A, Soucie E, Sarrazin S, Sieweke MH. MafB/c-Maf deficiency enables self-renewal of differentiated functional macrophages. *Science.* 2009;326(5954):867-71.
10. Hao NB, Lu MH, Fan YH, Cao YL, Zhang ZR, Yang SM. Macrophages in tumor microenvironments and the progression of tumors. *Clin Dev Immunol.* 2012;2012:948098.
11. Urban JL, Shepard HM, Rothstein JL, Sugarman BJ, Schreiber H. Tumor necrosis factor: a potent effector molecule for tumor cell killing by activated macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986;83(14):5233-7.
12. Baccala R, Hoebe K, Kono DH, Beutler B, Theofilopoulos AN. TLR-dependent and TLR-independent pathways of type I interferon induction in systemic autoimmunity. *Nat Med.* 2007;13(5):543-51.

13. Hardison SE, Herrera G, Young ML, Hole CR, Wozniak KL, Wormley FL, Jr. Protective immunity against pulmonary cryptococcosis is associated with STAT1-mediated classical macrophage activation. *J Immunol.* 2012;189(8):4060-8.
14. Biswas SK, Gangi L, Paul S, Schioppa T, Saccani A, Sironi M, et al. A distinct and unique transcriptional program expressed by tumor-associated macrophages (defective NF-kappaB and enhanced IRF-3/STAT1 activation). *Blood.* 2006;107(5):2112-22.
15. Stetson DB, Mohrs M, Mallet-Designe V, Teyton L, Locksley RM. Rapid expansion and IL-4 expression by Leishmania-specific naive helper T cells in vivo. *Immunity.* 2002;17(2):191-200.
16. Cai X, Yin Y, Li N, Zhu D, Zhang J, Zhang CY, et al. Re-polarization of tumor-associated macrophages to pro-inflammatory M1 macrophages by microRNA-155. *J Mol Cell Biol.* 2012;4(5):341-3.
17. Chanmee T, Ontong P, Konno K, Itano N. Tumor-associated macrophages as major players in the tumor microenvironment. *Cancers (Basel).* 2014;6(3):1670-90.
18. Davis MJ, Tsang TM, Qiu Y, Dayrit JK, Freij JB, Huffnagle GB, et al. Macrophage M1/M2 polarization dynamically adapts to changes in cytokine microenvironments in *Cryptococcus neoformans* infection. *MBio.* 2013;4(3):e00264-13.
19. Pereira TA, Xie G, Choi SS, Syn WK, Voietta I, Lu J, et al. Macrophage-derived Hedgehog ligands promotes fibrogenic and angiogenic responses in human schistosomiasis mansoni. *Liver Int.* 2013;33(1):149-61.
20. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell.* 2010;140(6):883-99.
21. Van Overmeire E, Laoui D, Keirsse J, Bonelli S, Lahmar Q, Van Ginderachter JA. STAT of the union: dynamics of distinct tumor-associated macrophage subsets governed by STAT1. *Eur J Immunol.* 2014;44(8):2238-42.
22. De I, Steffen MD, Clark PA, Patros CJ, Sokn E, Bishop SM, et al. CSF1 Overexpression Promotes High-Grade Glioma Formation without Impacting the Polarization Status of Glioma-Associated Microglia and Macrophages. *Cancer Res.* 2016;76(9):2552-60.
23. Linde N, Lederle W, Depner S, van Rooijen N, Gutschalk CM, Mueller MM. Vascular endothelial growth factor-induced skin carcinogenesis depends on recruitment and alternative activation of macrophages. *J Pathol.* 2012;227(1):17-28.

24. Su SY, Bell D, Hanna EY. Esthesioneuroblastoma, neuroendocrine carcinoma, and sinonasal undifferentiated carcinoma: differentiation in diagnosis and treatment. *Int Arch Otorhinolaryngol*. 2014;18(Suppl 2):S149-56.
25. Nandi B, Shapiro M, Samur MK, Pai C, Frank NY, Yoon C, et al. Stromal CCR6 drives tumor growth in a murine transplantable colon cancer through recruitment of tumor-promoting macrophages. *Oncoimmunology*. 2016;5(8):e1189052.
26. Wang H, Shao Q, Sun J, Ma C, Gao W, Wang Q, et al. Interactions between colon cancer cells and tumor-infiltrated macrophages depending on cancer cell-derived colony stimulating factor 1. *Oncoimmunology*. 2016;5(4):e1122157.
27. Li Y, Zheng Y, Li T, Wang Q, Qian J, Lu Y, et al. Chemokines CCL2, 3, 14 stimulate macrophage bone marrow homing, proliferation, and polarization in multiple myeloma. *Oncotarget*. 2015;6(27):24218-29.
28. Ambade A, Satishchandran A, Saha B, Gyongyosi B, Lowe P, Kodys K, et al. Hepatocellular carcinoma is accelerated by NASH involving M2 macrophage polarization mediated by hif-1 $\alpha$ -induced IL-10. *Oncoimmunology*. 2016;5(10):e1221557.
29. Cha HR, Lee JH, Hensel JA, Sawant AB, Davis BH, Lee CM, et al. Prostate cancer-derived cathelicidin-related antimicrobial peptide facilitates macrophage differentiation and polarization of immature myeloid progenitors to protumorigenic macrophages. *Prostate*. 2016;76(7):624-36.
30. Tripathi C, Tewari BN, Kanchan RK, Baghel KS, Nautiyal N, Shrivastava R, et al. Macrophages are recruited to hypoxic tumor areas and acquire a pro-angiogenic M2-polarized phenotype via hypoxic cancer cell derived cytokines Oncostatin M and Eotaxin. *Oncotarget*. 2014;5(14):5350-68.
31. Xiao G, Wang X, Sheng J, Lu S, Yu X, Wu JD. Soluble NKG2D ligand promotes MDSC expansion and skews macrophage to the alternatively activated phenotype. *J Hematol Oncol*. 2015;8:13.
32. DeNardo DG, Barreto JB, Andreu P, Vasquez L, Tawfik D, Kolhatkar N, Coussens LM. CD4(+) T cells regulate pulmonary metastasis of mammary carcinomas by enhancing protumor properties of macrophages. *Cancer Cell*. 2009;16:91–102.
33. Yamada K, Uchiyama A, Uehara A, Perera B, Ogino S, Yokoyama Y, et al. MFG-E8 Drives Melanoma Growth by Stimulating Mesenchymal Stromal Cell-Induced Angiogenesis and M2 Polarization of Tumor-Associated Macrophages. *Cancer Res*. 2016;76(14):4283-92.

34. Yaddanapudi K, Putty K, Rendon BE, Lamont GJ, Faughn JD, Satoskar A, et al. Control of tumor-associated macrophage alternative activation by macrophage migration inhibitory factor. *J Immunol.* 2013;190(6):2984-93.
35. Sánchez-Martín L, Estecha A, Samaniego R, Sánchez-Ramón S, Vega MÁ, Sánchez-Mateos P. The chemokine CXCL12 regulates monocytemacrophage differentiation and RUNX3 expression. *Blood.* 2011;117:88–97.
36. Doedens AL, Stockmann C, Rubinstein MP, Liao D, Zhang N, DeNardo DG, et al. Macrophage expression of hypoxia-inducible factor-1 alpha suppresses T-cell function and promotes tumor progression. *Cancer Res.* 2010;70(19):7465-75.
37. Kim S, Takahashi H, Lin WW, Descargues P, Grivennikov S, Kim Y, et al. Carcinoma-produced factors activate myeloid cells through TLR2 to stimulate metastasis. *Nature.* 2009;457(7225):102-6.
38. Li Yang and Yi Zhang. Tumor-associated macrophages: from basic research to clinical application. *Journal of Hematology & Oncology* (2017) 10:58 DOI 10.1186/s13045-017-0430-2
39. Grivennikov SI, Wang K, Mucida D, Stewart CA, Schnabl B, Jauch D, et al. Adenoma-linked barrier defects and microbial products drive IL-23/IL-17-mediated tumour growth. *Nature.* 2012;491(7423):254-8.
40. Greten FR, Karin M. The IKK/NF-kappaB activation pathway-a target for prevention and treatment of cancer. *Cancer Lett.* 2004;206(2):193-9.
41. Kong L, Zhou Y, Bu H, Lv T, Shi Y, Yang J. Deletion of interleukin-6 in monocytes/macrophages suppresses the initiation of hepatocellular carcinoma in mice. *J Exp Clin Cancer Res.* 2016;35(1):131.
42. Lu T, Ramakrishnan R, Altiok S, Youn JI, Cheng P, Celis E, et al. Tumor-infiltrating myeloid cells induce tumor cell resistance to cytotoxic T cells in mice. *J Clin Invest.* 2011;121(10):4015-29.
43. Bingle L, Brown NJ, Lewis CE. The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. *J Pathol.* 2002;196(3):254-65.
44. Finkernagel F, Reinartz S, Lieber S, Adhikary T, Wortmann A, Hoffmann N, et al. The transcriptional signature of human ovarian carcinoma macrophages is associated with extracellular matrix reorganization. *Oncotarget.* 2016;7(46):75339-52.

45. Deng YR, Liu WB, Lian ZX, Li X, Hou X. Sorafenib inhibits macrophage-mediated epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*. 2016;7(25):38292-305.
46. Tomita T, Sakurai Y, Ishibashi S, Maru Y. Imbalance of Clara cell-mediated homeostatic inflammation is involved in lung metastasis. *Oncogene*. 2010;30:3429–39.
47. Mazziere R, Pucci F, Moi D, Zonari E, Ranghetti A, Berti A, et al. Targeting the ANG2/TIE2 axis inhibits tumor growth and metastasis by impairing angiogenesis and disabling rebounds of proangiogenic myeloid cells. *Cancer Cell*. 2011;19(4):512-26.
48. Arranz A, Doxaki C, Vergadi E, Martinez de la Torre Y, Vaporidi K, Lagoudaki ED, et al. Akt1 and Akt2 protein kinases differentially contribute to macrophage polarization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(24):9517-22.
49. Mills CD, Shearer J, Evans R, Caldwell MD. Macrophage arginine metabolism and the inhibition or stimulation of cancer. *J Immunol*. 1992;149(8):2709-14.
50. Van Ginderachter JA, Movahedi K, Hassanzadeh Ghassabeh G, Meerschaut S, Beschin A, Raes G, et al. Classical and alternative activation of mononuclear phagocytes: picking the best of both worlds for tumor promotion. *Immunobiology*. 2006;211(6-8):487-501
51. Haschemi A, Kosma P, Gille L, Evans CR, Burant CF, Starkl P, et al. The sedoheptulose kinase CARKL directs macrophage polarization through control of glucose metabolism. *Cell Metab*. 2012;15(6):813-26.
52. Sang, Y., Miller, L. C., and Blecha, F. (2015). Macrophage polarization in virus-host interactions. *J. Clin. Cell Immunol*. (2015).6:311.doi:10.4172/2155-9899.1000311
53. Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol*. 2000;164(12):6166-73.
54. Noy R, Pollard JW. Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy. *Immunity*. 2014;41(1):49-61.
55. Wang F, Yang L, Gao Q, Huang L, Wang L, Wang J, et al. CD163+CD14+ macrophages, a potential immune biomarker for malignant pleural effusion. *Cancer Immunol Immunother*. 2015;64(8):965-76.
56. Andersen MN, Abildgaard N, Maniecki MB, Moller HJ, Andersen NF. Monocyte/macrophage-derived soluble CD163: a novel biomarker in multiple myeloma. *Eur J Haematol*. 2014;93(1):41-7.

57. Shigeoka M, Urakawa N, Nakamura T, Nishio M, Watajima T, Kuroda D, et al. Tumor associated macrophage expressing CD204 is associated with tumor aggressiveness of esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Sci.* 2013;104(8):1112-9.
58. Pienta KJ, Machiels JP, Schrijvers D, Alekseev B, Shkolnik M, Crabb SJ, et al. Phase 2 study of carlumab (CNTO 888), a human monoclonal antibody against CC-chemokine ligand 2 (CCL2), in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Invest New Drugs.* 2013;31(3):760-8.
59. Sanford DE, Belt BA, Panni RZ, Mayer A, Deshpande AD, Carpenter D, et al. Inflammatory monocyte mobilization decreases patient survival in pancreatic cancer: a role for targeting the CCL2/CCR2 axis. *Clin Cancer Res.* 2013;19(13):3404-15.
60. Lokshin A, Mayotte JE, Levitt ML. Mechanism of interferon beta-induced squamous differentiation and programmed cell death in human non-small-cell lung cancer cell lines. *J Natl Cancer Inst.* 1995;87(3):206-12.
61. Qin XQ, Runkel L, Deck C, DeDios C, Barsoum J. Interferon-beta induces S phase accumulation selectively in human transformed cells. *J Interferon Cytokine Res.* 1997;17(6):355-67.
62. Simpson KD, Templeton DJ, Cross JV. Macrophage migration inhibitory factor promotes tumor growth and metastasis by inducing myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment. *J Immunol.* 2012;189(12):5533-40.
63. Kimura YN, Watari K, Fotovati A, Hosoi F, Yasumoto K, Izumi H, et al. Inflammatory stimuli from macrophages and cancer cells synergistically promote tumor growth and angiogenesis. *Cancer Sci.* 2007;98(12):2009-18.
64. Chen H, Li P, Yin Y, Cai X, Huang Z, Chen J, et al. The promotion of type 1 T helper cell responses to cationic polymers in vivo via toll-like receptor-4 mediated IL-12 secretion. *Biomaterials.* 2010;31(32):8172-80.
65. Rogers TL, Holen I. Tumour macrophages as potential targets of bisphosphonates. *J Transl Med.* 2011;9:177.
66. Junankar S, Shay G, Jurczyk J, Ali N, Down J, Pocock N, et al. Real-time intravital imaging establishes tumor-associated macrophages as the extraskelatal target of bisphosphonate action in cancer. *Cancer Discov.* 2015;5(1):35-42.
67. Coscia M, Quaglino E, Iezzi M, Curcio C, Pantaleoni F, Riganti C, et al. Zoledronic acid repolarizes tumour-associated macrophages and inhibits mammary carcinogenesis by targeting the mevalonate pathway. *J Cell Mol Med.* 2010;14(12):2803-15.

68. Evita Weigel, Curren Smith, Ping Guo Liu, Richard Robison and Kim O'Neill. Macrophage Polarization and Its Role in Cancer. Weigel et al., *J Clin Cell Immunol* 2015, 6:4
69. Ahn GO, Tseng D, Liao CH, Dorie MJ, Czechowicz A, Brown JM. Inhibition of Mac-1 (CD11b/CD18) enhances tumor response to radiation by reducing myeloid cell recruitment. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(18):8363-8.
70. Chai ZT, Zhu XD, Ao JY, Wang WQ, Gao DM, Kong J, et al. microRNA-26a suppresses recruitment of macrophages by down-regulating macrophage colony-stimulating factor expression through the PI3K/Akt pathway in hepatocellular carcinoma. *J Hematol Oncol.* 2015;8:56.
71. Pyonteck SM, Gadea BB, Wang HW, Gocheva V, Hunter KE, Tang LH, et al. Deficiency of the macrophage growth factor CSF-1 disrupts pancreatic neuroendocrine tumor development. *Oncogene.* 2012;31(11):1459-67.
72. Movahedi K, Schoonooghe S, Laoui D, Houbracken I, Waelput W, Breckpot K, Bouwens L, Lahoutte T, De Baetselier P, Raes G, et al. Nanobody-based targeting of the macrophage mannose receptor for effective in vivo imaging of tumor-associated macrophages. *Cancer Res.* 2012;72:4165–77.
73. Adams DL, Martin SS, Alpaugh RK, Charpentier M, Tsai S, Bergan RC, et al. Circulating giant macrophages as a potential biomarker of solid tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(9):3514-9.
74. Zanganeh S, Hutter G, Spitler R, Lenkov O, Mahmoudi M, Shaw A, et al. Iron oxide nanoparticles inhibit tumour growth by inducing pro-inflammatory macrophage polarization in tumour tissues. *Nat Nanotechnol.* 2016;11(11):986-94.
75. Johnson P, Challis R, Chowdhury F, Gao Y, Harvey M, Geldart T, et al. Clinical and biological effects of an agonist anti-CD40 antibody: a Cancer Research UK phase I study. *Clin Cancer Res.* 2015;21(6):1321-8.
76. Botos I, Segal DM, Davies DR. The structural biology of Toll-like receptors. *Structure.* 2011;19(4):447-59.
77. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell.* 2006;124(4):783-801.
78. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol.* 2010;11(5):373-84.
79. Celhar T, Magalhaes R, Fairhurst AM. TLR7 and TLR9 in SLE: when sensing self goes wrong. *Immunol Res.* 2012;53(1-3):58-77.

80. Regan T, Nally K, Carmody R, Houston A, Shanahan F, Macsharry J, et al. Identification of TLR10 as a key mediator of the inflammatory response to *Listeria monocytogenes* in intestinal epithelial cells and macrophages. *J Immunol*. 2013;191(12):6084-92.
81. Harashina N, Inao T, Imamura R, Okano S, Suda T, Harada M. Roles of the PI3K/Akt pathway and autophagy in TLR3 signaling-induced apoptosis and growth arrest of human prostate cancer cells. *Cancer Immunol Immunother* (2012) **61**(5):667–76. doi:10.1007/s00262-011-1132-1
82. Lee MS, Kim YJ. Signaling pathways downstream of pattern-recognition receptors and their cross talk. *Annu Rev Biochem*. 2007;76:447-80.
83. Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol* (2004) **5**(10):987–95. doi:10.1038/ni1112.
84. Kim S, Takahashi H, Lin WW, Descargues P, Grivennikov S, Kim Y, et al. Carcinoma-produced factors activate myeloid cells through TLR2 to stimulate metastasis. *Nature* (2009) **457**(7225):102–6. doi:10.1038/nature07623.
85. Andrews EJ, Wang JH, Winter DC, Laug WE, Redmond HP. Tumor cell adhesion to endothelial cells is increased by endotoxin via an upregulation of beta-1 integrin expression. *J Surg Res*. 2001;97(1):14-9
86. Kim YM, Brinkmann MM, Paquet ME, Ploegh HL. UNC93B1 delivers nucleotide-sensing toll-like receptors to endolysosomes. *Nature*. 2008;452(7184):234-8.
87. Saitoh T, Satoh T, Yamamoto N, Uematsu S, Takeuchi O, Kawai T, et al. Antiviral protein Viperin promotes Toll-like receptor 7- and Toll-like receptor 9-mediated type I interferon production in plasmacytoid dendritic cells. *Immunity*. 2011;34(3):352-63.
88. Kay E, Scotland RS, Whiteford JR. Toll-like receptors: Role in inflammation and therapeutic potential. *Biofactors*. 2014;40(3):284-94.
98. Ou L, Lin S, Song B, Liu J, Lai R, Shao L. The mechanisms of graphene-based materials-induced programmed cell death: a review of apoptosis, autophagy, and programmed necrosis. *Int J Nanomedicine*. 2017;12:6633-46.
89. Pradere JP, Dapito DH, Schwabe RF. The Yin and Yang of Toll-like receptors in cancer. *Oncogene*. 2014;33(27):3485-95.
90. Whitmore MM, DeVeer MJ, Edling A, Oates RK, Simons B, Lindner D, et al. Synergistic activation of innate immunity by double-stranded RNA and CpG DNA promotes enhanced antitumor activity. *Cancer Res*. 2004;64(16):5850-60.



91. SD Killeen, JH Wang, EJ Andrews and HP Redmond. Exploitation of the Toll-like receptor system in cancer: a double-edged sword? *British Journal of Cancer* (2006) 95, 247 – 252
92. Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity*. 2011;34(5):637-50.
93. Geng D, Zheng L, Srivastava R, Asprodites N, Velasco-Gonzalez C, Davila E. When Toll-like receptor and T-cell receptor signals collide: a mechanism for enhanced CD8 T-cell effector function. *Blood*. 2010;116(18):3494-504.
94. Huang B, Zhao J, Li H, He KL, Chen Y, Chen SH, et al. Toll-like receptors on tumor cells facilitate evasion of immune surveillance. *Cancer Res*. 2005;65(12):5009-14.
95. Dong H, Strome SE, Salomao DR, et al. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med* 2002.8:793-800.
96. Taura M, Fukuda R, Suico MA, Eguma A, Koga T, Shuto T, et al. TLR3 induction by anticancer drugs potentiates poly I:C-induced tumor cell apoptosis. *Cancer Sci*. 2010;101(7):1610-7.
97. Salaun B, Lebecque S, Matikainen S, Rimoldi D, Romero P. Toll-like receptor 3 expressed by melanoma cells as a target for therapy? *Clin Cancer Res*. 2007;13(15 Pt 1):4565-74.
98. Cai Z, Sanchez A, Shi Z, Zhang T, Liu M, Zhang D. Activation of Toll-like receptor 5 on breast cancer cells by flagellin suppresses cell proliferation and tumor growth. *Cancer Res*. 2011;71(7):2466-75.
99. Li X, Liu D, Liu X, Jiang W, Zhou W, Yan W, et al. CpG ODN107 potentiates radiosensitivity of human glioma cells via TLR9-mediated NF-kappaB activation and NO production. *Tumour Biol*. 2012;33(5):1607-18.
100. Dybdahl B, Wahba A, Lien E, Flo TH, Waage A, Qureshi N, et al. Inflammatory response after open heart surgery: release of heat-shock protein 70 and signaling through toll-like receptor-4. *Circulation*. 2002;105(6):685-90.
101. Kay E, Scotland RS, Whiteford JR. Toll-like receptors: Role in inflammation and therapeutic potential. *Biofactors*. 2014;40(3):284-94.
102. Liu X, Chen X, Rycaj K, Chao HP, Deng Q, Jeter C, et al. Systematic dissection of phenotypic, functional, and tumorigenic heterogeneity of human prostate cancer cells. *Oncotarget*. 2015;6(27):23959-86.

103. Qin J, Liu X, Laffin B, Chen X, Choy G, Jeter CR, et al. The PSA(-/lo) prostate cancer cell population harbors self-renewing long-term tumor-propagating cells that resist castration. *Cell Stem Cell*. 2012;10(5):556-69.
104. Collins AT, Habib FK, Maitland NJ, Neal DE. Identification and isolation of human prostate epithelial stem cells based on alpha(2)beta(1)-integrin expression. *J Cell Sci*. 2001;114(Pt 21):3865-72.
105. Wang ZA, Toivanen R, Bergren SK, Chambon P, Shen MM. Luminal cells are favored as the cell of origin for prostate cancer. *Cell Rep*. 2014;8(5):1339-46.
106. Fridman WH, Pages F, Sautes-Fridman C, Galon J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(4):298-306.
107. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol*. 2004;25(12):677-86.
108. Biswas SK, Mantovani A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat Immunol*. 2010;11(10):889-96.
109. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(12):958-69.
110. Ruffell B, Affara NI, Coussens LM. Differential macrophage programming in the tumor microenvironment. *Trends Immunol*. 2012;33(3):119-26.
111. Edin S, Wikberg ML, Dahlin AM, Rutegard J, Oberg A, Oldenborg PA, et al. The distribution of macrophages with a M1 or M2 phenotype in relation to prognosis and the molecular characteristics of colorectal cancer. *PLoS One*. 2012;7(10):e47045.
112. Loberg RD, Ying C, Craig M, Day LL, Sargent E, Neeley C, et al. Targeting CCL2 with systemic delivery of neutralizing antibodies induces prostate cancer tumor regression in vivo. *Cancer Res*. 2007;67(19):9417-24.
113. Hefetz-Sela S, Stein I, Klieger Y, Porat R, Sade-Feldman M, Zreik F, et al. Acquisition of an immunosuppressive protumorigenic macrophage phenotype depending on c-Jun phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(49):17582-7.
114. Aerken Maolake<sup>1</sup>, Kouji Izumi<sup>1</sup>, Kazuyoshi Shigehara<sup>1</sup>, Ariunbold Natsagdorj<sup>1</sup>, Hiroaki Iwamoto<sup>1</sup>, Suguru Kadomoto<sup>1</sup>, Yuta Takezawa<sup>1</sup>, Kazuaki Machioka<sup>1</sup>, Kazutaka Narimoto<sup>1</sup>, Mikio Namiki<sup>1</sup>, Wen-Jye Lin<sup>2</sup>, Guzailinuer Wufuer<sup>3</sup>, Atsushi Mizokami<sup>1</sup>. Tumor-associated macrophages promote prostate cancer migration through activation of the CCL22-CCR4 axis. *Oncotarget*, 2017, Vol. 8, (No. 6), pp: 9739-9751.

115. Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, Obeid M, Ortiz C, Criollo A, et al. Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat Med.* 2007;13(9):1050-9.
116. Grimmig T, Moench R, Kreckel J, Haack S, Rueckert F, Rehder R, et al. Toll Like Receptor 2, 4, and 9 Signaling Promotes Autoregulative Tumor Cell Growth and VEGF/PDGF Expression in Human Pancreatic Cancer. *Int J Mol Sci.* 2016;17(12).
117. Wood ZA, Schroder E, Robin Harris J, Poole LB. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem Sci.* 2003;28(1):32-40.
118. Dixit E, Kagan JC. Intracellular pathogen detection by RIG-I-like receptors. *Adv Immunol.* 2013;117:99-125.
119. Harashima N, Inao T, Imamura R, Okano S, Suda T, Harada M. Roles of the PI3K/Akt pathway and autophagy in TLR3 signaling-induced apoptosis and growth arrest of human prostate cancer cells. *Cancer Immunol Immunother.* 2012;61(5):667-76.
120. Chin AI, Miyahira AK, Covarrubias A, Teague J, Guo B, Dempsey PW, et al. Toll-like receptor 3-mediated suppression of TRAMP prostate cancer shows the critical role of type I interferons in tumor immune surveillance. *Cancer Res.* 2010;70(7):2595-603
121. Gonzalez-Reyes S, Fernandez JM, Gonzalez LO, Aguirre A, Suarez A, Gonzalez JM, et al. Study of TLR3, TLR4, and TLR9 in prostate carcinomas and their association with biochemical recurrence. *Cancer Immunol Immunother.* 2011;60(2):217-26.
122. Paone A, Starace D, Galli R, Padula F, De Cesaris P, Filippini A, et al. Toll-like receptor 3 triggers apoptosis of human prostate cancer cells through a PKC-alpha-dependent mechanism. *Carcinogenesis.* 2008;29(7):1334-42.
123. Pei Z, Lin D, Song X, Li H, Yao H. TLR4 signaling promotes the expression of VEGF and TGFbeta1 in human prostate epithelial PC3 cells induced by lipopolysaccharide. *Cell Immunol.* 2008;254(1):20-7.
124. Vaisanen MR, Vaisanen T, Jukkola-Vuorinen A, Vuopala KS, Desmond R, Selander KS, et al. Expression of toll-like receptor-9 is increased in poorly differentiated prostate tumors. *Prostate.* 2010;70(8):817-24.
125. Di JM, Pang J, Sun QP, Zhang Y, Fang YQ, Liu XP, et al. Toll-like receptor 9 agonists up-regulates the expression of cyclooxygenase-2 via activation of NF-kappaB in prostate cancer cells. *Mol Biol Rep.* 2010;37(4):1849-55.

126. Shu Zhao, Yifan Zhang, Qingyuan Zhang, FenWang and Dekai Zhang. Toll-like receptors and prostate cancer. doi: 10.3389/fimmu.2014.00352.
127. Saponaro C, Cianciulli A, Calvello R, Dragone T, Iacobazzi F, Panaro MA. The PI3K/Akt pathway is required for LPS activation of microglial cells. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2012;34(5):858-65.
128. Paone A, Galli R, Gabellini C, Lukashev D, Starace D, Goriach A, et al. Toll-like receptor 3 regulates angiogenesis and apoptosis in prostate cancer cell lines through hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Neoplasia*. 2010;12(7):539-49.
129. Galli R, Starace D, Busa R, Angelini DF, Paone A, De Cesaris P, et al. TLR stimulation of prostate tumor cells induces chemokine-mediated recruitment of specific immune cell types. *J Immunol*. 2010;184(12):6658-69.
130. Gatti G, Quintar AA, Andreani V, Nicola JP, Maldonado CA, Masini-Repiso AM, et al. Expression of toll-like receptor 4 in the prostate gland and its association with the severity of prostate cancer. *Prostate*. (2009) 69(13):1387-97. doi:10.1002/pros.20984.
131. Vacchelli E, Galluzzi L, Eggermont A, Fridman WH, Galon J, Sautes-Fridman C, et al. Trial watch: FDA-approved Toll-like receptor agonists for cancer therapy. *Oncoimmunology*. 2012;1(6):894-907.
132. Mata-Haro V, Cekic C, Martin M, Chilton PM, Casella CR, Mitchell TC. The vaccine adjuvant monophosphoryl lipid A as a TRIF-biased agonist of TLR4. *Science*. 2007;316(5831):1628-32.
135. O'Neill LA, Bryant CE, Doyle SL. Therapeutic targeting of Toll-like receptors for infectious and inflammatory diseases and cancer. *Pharmacol Rev*. 2009;61(2):177-97.
136. Galluzzi L, Vacchelli E, Eggermont A, Fridman WH, Galon J, Sautes-Fridman C, et al. Trial Watch: Experimental Toll-like receptor agonists for cancer therapy. *Oncoimmunology*. 2012;1(5):699-716.
137. Fenoglio D, Traverso P, Parodi A, Tomasello L, Negrini S, Kalli F, et al. A multi-peptide, dual-adjuvant telomerase vaccine (GX301) is highly immunogenic in patients with prostate and renal cancer. *Cancer Immunol Immunother*. 2013;62(6):1041-52.
138. Zhang Y, Wang Y, Yuan J, Qin W, Liu F, Wang F, et al. Toll-like receptor 4 ligation confers chemoresistance to docetaxel on PC-3 human prostate cancer cells. *Cell Biol Toxicol*. 2012;28(4):269-77.
139. Zheng SL, Augustsson-Balter K, Chang B, Hedelin M, Li L, Adami HO, et al. Sequence variants of toll-like receptor 4 are associated with prostate cancer risk:

- results from the CAncer Prostate in Sweden Study. *Cancer Res.* 2004;64(8):2918-22.
140. Chen X, Trivedi PP, Ge B, Krzewski K, Strominger JL. Many NK cell receptors activate ERK2 and JNK1 to trigger microtubule organizing center and granule polarization and cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(15):6329-34.
  141. Srivastava RM, Lee SC, Andrade Filho PA, Lord CA, Jie HB, Davidson HC, et al. Cetuximab-activated natural killer and dendritic cells collaborate to trigger tumor antigen-specific T-cell immunity in head and neck cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2013;19(7):1858-72.
  142. Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. Cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin.* 2014;64(1):9-29.
  143. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011;144(5):646-74.
  144. De Marzo AM, Platz EA, Sutcliffe S, Xu J, Gronberg H, Drake CG, et al. Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nat Rev Cancer.* 2007;7(4):256-69.
  145. Beyer M, Mallmann MR, Xue J, Staratschek-Jox A, Vorholt D, Krebs W, et al. High-resolution transcriptome of human macrophages. *PLoS One.* 2012;7(9):e45466.
  146. Franklin RA, Liao W, Sarkar A, Kim MV, Bivona MR, Liu K, Pamer EG, Li MO. The cellular and molecular origin of tumor-associated macrophages. *Science.* 2014; 344: 921-5. doi: 10.1126/science.1252510
  147. Biswas SK, Mantovani A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nature Immunology.* 2010; 11: 889-96. doi: 10.1038/ni.1937.
  148. Sánchez-Reyes K, Bravo-Cuellar A, Hernández-Flores G, Lerma-Díaz J, Jave-Suárez L. Cervical Cancer Cell Supernatants Induce a Phenotypic Switch from U937-Derived Macrophage-Activated M1 State into M2-like Suppressor Phenotype with Change in Toll-like Receptor Profile. *BioMed Res Internat* 2014; 2014: 683–694.
  149. Reinartz S, Schumann T, Finkernagel F, Wortmann A, Jansen JM, Meissner W, Krause M, Schworer AM, Wagner U, Muller-Brusselbach S, Muller R. Mixed-polarization phenotype of ascites-associated macrophages in human ovarian carcinoma: correlation of CD163 expression, cytokine levels and early relapse. *International Journal of Cancer.* 2014; 134: 32-42. doi: 10.1002/ijc.28335.

150. Reinartz S, Schumann T, Finkernagel F, Wortmann A, Jansen JM, Meissner W, Krause M, Schworer AM, Wagner U, Muller-Brusselbach S, Muller R. Mixed-polarization phenotype of ascites-associated macrophages in human ovarian carcinoma: correlation of CD163 expression, cytokine levels and early relapse. *International Journal of Cancer*. 2014; 134: 32-42. doi: 10.1002/ijc.28335.
151. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol*. 2008;8:958–969
152. Mantovani A, Biswas SK, Galdiero MR, Sica A, Locati M. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. *J Pathol*. 2013;229(2):176-85.
153. Mosser DM, Edwards JP . Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* (2008)8: 958–969.
154. Zaki MA, Wada N, Ikeda J, Shibayama H, Hashimoto K, Yamagami T, Tatsumi Y, Tsukaguchi M, Take H, Tsudo M, Morii E, Aozasa K. Prognostic implication of types of tumor-associated macrophages in Hodgkin lymphoma. *Virchows Arch*. 2011 Oct; 459(4):361-6.
155. Kazma R, Mefford JA, Cheng I, Plummer SJ, Levin AM, Rybicki BA, Casey G, Witte JS. Association of the innate immunity and inflammation pathway with advanced prostate cancer risk. *PLoS One*. 2012; 7(12):e51680.
156. Kelly MG, Alvero AB, Chen R, Silasi DA, Abrahams VM, Chan S, Visintin I, Rutherford T, Mor G. TLR-4 signaling promotes tumor growth and paclitaxel chemoresistance in ovarian cancer. *Cancer Res*. 2006 Apr 1; 66(7):3859-68.
157. Cheng I, Plummer SJ, Casey G, Witte JS. Toll-like receptor 4 genetic variation and advanced prostate cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2007 Feb; 16(2):352-5.
158. Riddell JR, Maier P, Sass SN, Moser MT, Foster BA, Gollnick S. Peroxiredoxin 1 stimulates endothelial cell expression of VEGF via TLR4 dependent activation of HIF-1 $\alpha$ . *PLoS One*. 2012; 7(11):e50394.
159. Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest*. 2012;122(3):787-95.
160. A.U. Hasan, G. Trinchieri, J. Vlach. Toll-like receptor signaling stimulates cell cycle entry and progression in fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, 280 (21) (2005), pp. 20620-20627

## 9. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı :Somaiyeh MALEKGHASEMI

Doğum Yeri : TEHRAN

Doğum Tarihi : 25.02.1982

Adres :HacettepeÜniversitesi, Kanser Enstitüsü, Temel Onkoloji Anabilim Dalı, 06100, Ankara

Telefon : 05539216345

Email :somaiyeh.mgh@gmail.com

### **Eğitim Durumu:**

Lisans: Lisans Laboratuvar bilimleri 2008–2009

Üniversite: Tebriz tıp bilimi üniversitesi – İran

Yüksek Lisans: İmmunoloji Anabilim Dalı, Tıp Fakültesi Kerman Üniversitesi İran  
2011-2014

Yüksek Lisans :Hacettepe Üniversitesi'nde Tümör Biyolojisi ve İmmünoloji Temel Onkoloji Anabilim Dalı 2017-

### **Mesleki Deneyimleri**

Öğretim Görevlisi, Tebriz Üniversitesi, Hemşirelik Bölümü, (2004-2005)

“Genel Kimya ve Mikrobiyoloji Laboratuvarı- Antikor dersi için

Öğretim Görevlisi, Kerman Üniversitesi, Tıp Anabilim Dalı (2011-2012)

Nitrobluetetrazolium testi (NBT) ile tek radyal immünodifüzyon deneyi (SRID) ve Kronik granülomatöz hastalığı (CGD)

**Katıldığı Kongre ve Eğitim Kursları**

12th International Congress of Immunology and allergy, 29 April-2May 2014, Tehran, Iran

□ 8th National Congress of parasitology and parasitic disease, 16-18 Oct 2012, Kerman, Iran

13th International Congress of Immunology and allergy, 29 April-2May 2016, Tabriz, Iran

12. Hacettepe Üniversitesi kanser enstitüsü sempozyumu 17-18 Kasım 2016

**İlgi Alanları**

(Dog) IgG'nin İyon Değişimi Kromatografisi ile Saflaştırılması

SDS-PAGE and western blotting

Saflaştırmış IgG'nin Konjugatı FITC ile

Tampon Yapımı

Parazitlerin ve kanser hücrelerinin kültürlenmesi

Real time PCR ile çalışmak

ELISA

Akım Sitometri (hücre yüzeyi analizi, apoptozis, hücre döngüsü analizi)

DNA Aşısı Katılım Belgesi

Üniversitede en iyi öğrenci sayısı 17,76 (3,55 üzerinden 4)





**T.C.**  
**HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ**  
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı : 16969557 - 287

Konu :

ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU

**Toplantı Tarihi** : 06 ŞUBAT 2018 SALI  
**Toplantı No** : 2018/04  
**Proje No** : GO 18/140 (Değerlendirme Tarihi: 06.02.2018)  
**Karar No** : GO 18/140- 10

Üniversitemiz Kanser Enstitüsü Temel Onkoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Öğr. Gör. Dr. Hande CANPINAR' ın sorumlu araştırmacı olduğu ve Somaiyeh MALEKGHAŞEMİ' nin yüksek lisans tezi olan, GO 18/140 kayıt numaralı, "**Prostat Kanserinde TLR Agonistlerinin M1, M2 Makrofaj Polarizasyonunda Rolü**" başlıklı proje önerisi araştırmamızın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş olup, etik açıdan uygun bulunmuştur.

- |   |  |
|---|--|
| 1. Prof. Dr. Nurten AKARSU (Başkan)     | 10 Prof. Dr. Oya Nuran EMİROĞLU (Üye)      |
| 2. Prof. Dr. Sevdâ F. MÜFTÜOĞLU (Üye)   | 11 Yrd. Doç. Dr. Özay GÖKÖZ (Üye)          |
| İZİNLİ                                  |  |
| 3. Prof. Dr. M. Yıldırım SARA (Üye)     | 12. Doç. Dr. Gözde GİRGİN (Üye)            |
| 4. Prof. Dr. Necdet SAĞLAM (Üye)        | İZİNLİ                                     |
| 5. Prof. Dr. Hatice Doğan BUZOĞLU (Üye) | 13. Doç. Dr. Fatma Visal OKUR (Üye)        |
| 6. Prof. Dr. R. Köksal ÖZGÜL (Üye)      | İZİNLİ                                     |
| 7. Prof. Dr. Ayşe Lale DOĞAN (Üye)      | 14. Doç. Dr. Can Ebru KURT (Üye)           |
| 8. Prof. Dr. Elmas Ebru YALÇIN (Üye)    | 15. Yrd. Doç. Dr. H. Hüsrev TURNAGÖL (Üye) |
| 9. Prof. Dr. Mintaze Kerem GÜNEL (Üye)  | 16. Yrd. Doç. Dr. Müge DEMİR (Üye)         |
|   | 17. Öğr. Gör. Meltem ŞENGELEN (Üye)        |
|   | 18. Av. Meltem ONURLU (Üye)                |

# Prostat Kanserinde TLR Agonistlerinin M1, M2 Makrofaj Polarizasyonunda Rolü

*by* Somaiyeh Malekghasemi

---

**Submission date:** 07-May-2019 02:18PM (UTC+0300)  
**Submission ID:** 1126368189  
**File name:** S\_meyye\_Tez\_18.4.2019\_SON\_GG.doc (6.96M)  
**Word count:** 17113  
**Character count:** 120530

## Prostat Kanserinde TLR Agonistlerinin M1, M2 Makrofaj Polarizasyonunda Rolü

### ORIGINALITY REPORT

<b>8%</b>	<b>7%</b>	<b>2%</b>	<b>4%</b>
SIMILARITY INDEX	INTERNET SOURCES	PUBLICATIONS	STUDENT PAPERS

### PRIMARY SOURCES

<b>1</b>	<a href="http://www.journalagent.com">www.journalagent.com</a> Internet Source	<b>2%</b>
<b>2</b>	<a href="http://www.tip.hacettepe.edu.tr">www.tip.hacettepe.edu.tr</a> Internet Source	<b>2%</b>
<b>3</b>	Submitted to Istanbul University Student Paper	<b>&lt;1%</b>
<b>4</b>	<a href="http://katalog.hacettepe.edu.tr">katalog.hacettepe.edu.tr</a> Internet Source	<b>&lt;1%</b>
<b>5</b>	<a href="http://tel.archives-ouvertes.fr">tel.archives-ouvertes.fr</a> Internet Source	<b>&lt;1%</b>
<b>6</b>	<a href="http://www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080">www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080</a> Internet Source	<b>&lt;1%</b>
<b>7</b>	<a href="http://abstractpicker.com">abstractpicker.com</a> Internet Source	<b>&lt;1%</b>
<b>8</b>	<a href="http://www.omicsonline.org">www.omicsonline.org</a> Internet Source	<b>&lt;1%</b>
<b>9</b>	<a href="http://link.springer.com">link.springer.com</a>	



## Digital Receipt

This receipt acknowledges that Turnitin received your paper. Below you will find the receipt information regarding your submission.

The first page of your submissions is displayed below.

Submission author: Somaiyeh Malekghasemi  
Assignment title: MsC TEZ  
Submission title: Prostat Kanserinde TLR Agonistler...  
File name: S\_meyye\_Tez\_18.4.2019\_SON\_GG..  
File size: 6.96M  
Page count: 97  
Word count: 17,113  
Character count: 120,530  
Submission date: 07-May-2019 02:18PM (UTC+0300)  
Submission ID: 1126368189

TC  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Prostat Kanserinde TLR Agonistlerinin M1, M2 Makrofaj  
Polarizasyonunda Rolü

Ym. Bıyık Somaiyeh Malekghasemi

Yeni Bıyık, ve İmmünojenik Prostat  
Yüksek Lisans Tezi

ANKARA 2019