

**T.C.**  
**İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ**  
**LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

**ORLİSTATIN PANKREAS KANSERİ TÜMÖR MİKROÇEVRESİ**  
**ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Nasma ELABBADY**

**1900005277**

**Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik**

**Program: Moleküler Biyoloji ve Genetik**

**Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Pelin Özfiliz KILBAŞ**

**HAZİRAN 2025**

**T.C.**  
**İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ**  
**LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

**ORLİSTATIN PANKREAS KANSERİ TÜMÖR MİKROÇEVRESİ**  
**ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Nasma ELABBADY**

**1900005277**

**Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik**

**Program: Moleküler Biyoloji ve Genetik**

**Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Pelin Özfiliz KILBAŞ**

**Jüri Üyeleri: Dr. Öğr. Üyesi Burcu Ayhan ŞAHİN**

**Dr. Öğr. Üyesi Gülden BUDAK**

**HAZİRAN 2025**

## ÖNSÖZ

Öncelikle, en sıcak teşekkürlerimi ve minnettarlığımı sunmak istiyorum; bu uzun ve zorlu süreçte her zaman yanımda olan, bilgi ve sabrıyla bana rehberlik eden danışmanım Dr. Öğr. Üyesi PELİN ÖZFİLİZ KILBAŞ'a. Böylesine bir yolculukta, daha iyi bir danışman dileyemezdim.

Bu çalışma süresince sağladığı değerli destek ve katkılarından dolayı Araştırma Görevlisi ENES BAL'a içten teşekkürlerimi sunarım.

Ailem, bana verdikleri sınırsız destek için sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum. Hayatım boyunca attığım her adımda yanımda olan canım annem SAFAA MOUSSA ve babam HOSSAM ELABBADY, sadece sevginizle değil, fedakârlıklarınızla, sabrınızla ve inancınızla da bana güç verdiniz. Bugünlere gelmemde en büyük pay sizindir.

Kardeşlerim BASMA, ABDULRAHMAN ve MOHAMMED ELABBADY, her zaman yanımda olup bana destek oldunuz; sizlere minnettarım. Varlığınız ve yanımda oluşunuz, kendimi daha güçlü, daha güvende ve daha anlamlı hissettirdi.

Ayrıca Anneannem sevgili TETA FATME'ye, bitmek bilmeyen sevgisi ve şefkati için özel teşekkürlerimi sunuyorum.

Bu yolculuğu anlamlı ve unutulmaz kılan, her adımda yanımda olup moral veren sevgili arkadaşlarıma en içten teşekkürlerimi sunuyorum. SALMA, SHAHED, ALBUTAİRI ve BAWAZİR... Varlığınız, sadece bir destek değil; aynı zamanda bu süreci daha keyifli, daha katlanılır ve çok daha özel kıldı. Sizlerle paylaştığım anlar, bu yolculuğun en güzel hatıraları arasında yer alacak.

Bu yolculukta yanımda olan kıymetli yol arkadaşlarıma gönülden teşekkür ederim. HATICE ile lisanstan bu yana yan yana yürüdüğümüz bu yolu birlikte tamamlamak benim için çok kıymetliydi. HANEEN, HANADI, ve GÜNEL bu iki yılı neşeleri ve dostluklarıyla unutulmaz kıldılar.

Ve tüm bunların ötesinde, hayatımda özel bir yere sahip olan, kalbimde her daim sevgiyle taşıdığım tüm sevdiklerime en derin ve en samimi teşekkürlerimi sunuyorum.

## İÇİNDEKİLER

<b>ÖNSÖZ</b> .....	<i>i</i>
<b>KISALTMALAR VE SİMGELER</b> .....	<i>vii</i>
<b>TABLO LİSTESİ</b> .....	<i>x</i>
<b>ŞEKİL LİSTESİ</b> .....	<i>xi</i>
<b>ÖZET</b> .....	<i>xiii</i>
<b>ABSTRACT</b> .....	<i>xiv</i>
<b>1. GİRİŞ VE AMAÇ</b> .....	<i>1</i>
<b>1.1. GİRİŞ</b> .....	<i>1</i>
<b>1.2. AMAÇ</b> .....	<i>2</i>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	<i>3</i>
<b>2.1. Kanser ve Gelişimi</b> .....	<i>3</i>
<b>2.2. Pankreas Kanseri</b> .....	<i>6</i>
<b>2.2.1 Pankreasın Yapısı, İşlevi ve Rolü</b> .....	<i>6</i>
<b>2.2.2. Pankreatik Kanserin Tanımı ve Sınıflandırması</b> .....	<i>9</i>
<b>2.2.3 Pankreas Kanseri Epidemiyolojisi</b> .....	<i>10</i>
<b>2.2.4 Genetik, Çevresel ve Yaşam Tarzı ile İlişkili Risk Faktörleri</b> .....	<i>12</i>
<b>2.2.5 Pankreas Kanseri İlerlemesinde Görevli Moleküler Hedefler ve Sinyal Yolları</b> .....	<i>13</i>
<b>2.2.6 Pankreas Kanseri Teşhis ve Tedavisi</b> .....	<i>15</i>
<b>2.3 Tümör Mikroçevresi (TMC)</b> .....	<i>17</i>
<b>2.3.1 TMC'nin Hücresel Bileşenleri</b> .....	<i>18</i>
<b>2.3.1.1 Kanserle İlişkili Fibroblastlar (CAF'lar)</b> .....	<i>18</i>
<b>2.3.1.2 İmmün hücreleri</b> .....	<i>19</i>

2.3.1.3 Endotelial Hücreler .....	20
2.3.1.4 Mezenkimal Kök Hücreler .....	20
2.3.1.5 Kansere İlişkili Adipositler .....	21
2.3.2 TMC'nin Hücre Dışı Bileşenleri .....	23
2.4. TMC ve Kanser İlişkisi.....	24
2.5 Lipit Metabolizması ve Kanser .....	26
2.5.3 Tümör Mikroçevresinde Lipit Metabolizmasının Rolü .....	26
2.5.4 Pankreas Tümörü Mikroçevresinde Adiposit Dediferansiyasyonu ve Fibrotik Yeniden Şekillenme.....	27
2.5.5 Lipit Metabolizması Aracılı Kanser Tedavi Stratejileri.....	28
2.5.6 Tümör Mikroçevresi ve Lipit Metabolizması.....	29
2.6 Orlistat: Potansiyel Anti-Kanser Etkilere Sahip Bir Lipaz İnhibitörü.....	30
2.6.1 Etki Mekanizması: Pankreatik Lipaz İnhibisyonu.....	30
2.6.2 Orlistat'ın Kanser Hücrelerinde Lipit Metabolizması Üzerindeki Etkisi	30
2.6.3 Orlistat'ın Tümör Mikroçevresini (TME) Değiştiren Bir İlaç Olarak Rolü: Kanser Tedavisi İçin Olası Etkileri.....	31
3. <i>MATERYAL VE METOD</i> .....	33
3.1 <i>MATERYALLER</i> .....	33
3.1.1 Kullanılan Hücre Hattı .....	33
3.1.2 Kullanılan cihazlar.....	34
3.1.3 Kullanılan malzemeler .....	34
3.1.3.1 Hücre Kültürü Ekipmanları .....	34
3.1.3.2 Kullanılan Kimyasallar .....	34
3.2 <i>METODLAR</i> .....	35
3.2.1 Hücre Kültürü .....	35
3.2.2 3T3-L1 Preadipositlerin Olgun Adipositlere Farklılaştırılması .....	35

3.2.3 Conditioned Medium “CM” Hazırlanması .....	36
3.2.4 3T3-L1 ve MIA PaCa-2 ile Ko-Kültür Modeli Oluşturulması.....	36
3.2.5 Oil Red ve BODIPY Testi.....	36
3.2.6 MTT Testi .....	37
3.2.7 Tripan Mavisi Hücre Sağ Kalım/Büyüme Testi.....	38
3.2.8 Floresan Boyama.....	38
3.2.8.1 Diheksiloksakarbosiyenin İyodür (DioC6) Boyama .....	38
3.2.8.2 Propidium İodide (PI) Boyama.....	39
3.2.8.3 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) Boyama .....	39
3.2.9 Yara Kapanması/ Migrasyon Deneyi .....	40
3.2.10 İmmünoablottlama.....	40
3.2.10.1 Protein Konsantrasyonu Belirleme-Bradford Yöntemi .....	41
3.2.11 Akış Sitometresi ile FITC-Annexin V/PI Boyama ve Apoptoz Belirleme .....	41
3.2.12 İstatiksel Analizler .....	42
<b>4. SONUÇLAR .....</b>	<b>43</b>
<b>4.1 3T3-L1 Preadiposit hücrelerinin olgun adiposit hücrelerine farklılaştırılması ve farklılaştırma analizleri .....</b>	<b>43</b>
<b>4.2 MIA PaCa-2 / 3T3-L1 Ortak Kültürlenmesi (Co-culture).....</b>	<b>46</b>
<b>4.3 MIA PaCa-2 pankreas kanseri hücrelerine ilgili doz/sürelerde Orlistat uygulanması, geçerli doz aralığının MTT testi ile belirlenmesi ve morfolojik incelemelerin yapılması .....</b>	<b>47</b>
<b>4.4 Farklılaştırılmış 3T3-L1 olgun adiposit hücrelerine ilgili doz/sürelerde Orlistat uygulanması, geçerli doz aralığının MTT testi ile belirlenmesi ve morfolojik incelemelerin yapılması .....</b>	<b>50</b>

<b>4.5 MIA PaCa-2 pankreas kanseri hücrelerine ilgili doz ve sürelerde CM uygulaması yapılması, MTT analizi ve Oil Red O Tayini ile moleküler analizler .....</b>	<b>52</b>
<b>4.6 MIA PaCa-2 pankreas kanseri hücrelerine ilgili doz ve sürelerde Orlistat-CM uygulaması ve Tripan mavisi hücre sağ kalım/ büyüme testi .....</b>	<b>56</b>
<b>4.7 MIA PaCa-2 pankreas kanseri hücrelerine ilgili doz ve sürelerde Orlistat-CM-Co-Culture uygulaması ve Floresan Boyama Tayinleri .....</b>	<b>57</b>
<b>4.8 MIA PaCa-2 pankreas kanseri hücrelerine ilgili doz ve sürelerde Orlistat-Co-Culture uygulaması ve Testi Yara Kapanması/ Migrasyon.....</b>	<b>61</b>
<b>4.9 MIA PaCa-2 pankreas kanseri hücrelerine ilgili doz ve sürelerde Orlistat-Co-Culture uygulaması ve protein ekspresyonlarına etkisi .....</b>	<b>62</b>
<b>4.10 MIA PaCa-2 Pankreas Kanseri Hücrelerinde Farklı Mikroçevre Koşullarında (Ko-kültür, CM, Orlistat) SREBF1 ve FASN Gen Ekspresyonunun Değerlendirilmesi .....</b>	<b>64</b>
<b>4.11 MIA PaCa-2 pankreas kanseri hücrelerine ve farklılaştırılmış 3T3-41 olgun adiposit hücrelerine ilgili doz ve sürelerde Orlistat uygulaması ve Akış Sitometresi FITC-Annexin V/ PI boyaması ile apoptoz tayini.....</b>	<b>65</b>
<b>5. TARTIŞMA .....</b>	<b>67</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>75</b>
<b>EKLER.....</b>	<b>90</b>
<b>Ek A: Çalışma Süresince Kullanılan Cihazlar .....</b>	<b>90</b>
<b>Ek B: Çalışma Süresince Hücre Kültüründe Kullanılan Materyaller .....</b>	<b>91</b>
<b>Ek C: Çalışma Süresince Kullanılan Kimyasallar .....</b>	<b>92</b>
<b>Ek D: Western sürecince %12'lik Poliakrilamid Jel Hazırlanması .....</b>	<b>94</b>

**6.5 Ek E: Çalışma Süresince Kullanılan Çözümler .....94**



## KISALTMALAR VE SİMGELER

ASR :	Yaşa Göre Standardize Edilmiş İnsidans Oranı
PDAC :	Pankreatik Duktal Adenokarsinom
NEN :	Nöroendokrin Neoplazmlar
FAMMM :	Ailesel Atipik Multipl Benign Melanomlar Sendromu
PIK3CA :	Fosfatidilinozitol 3-Kinaz Katalitik Alfa Alt Birimi
PLC :	Fosfolipaz C
JNK :	c-Jun N-terminal Kinaz
EGFR :	Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
HER :	İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
K-RAS :	Kirsten Rat Sarkoma Virüsü Onkogeni
STAT :	Sinyal İletimi ve Transkripsiyonel Aktivatör
RTK :	Reseptör Tirozin Kinaz
B-Raf :	B-Raf Proto-Onkogen
PI3K :	Fosfatidilinozitol 3-Kinaz
AKT :	Protein Kinaz B
MAP2K :	Mitojenle Aktive Edilen Protein Kinaz
MEKK1-4 :	Mitojenle Aktive Edilen Protein Kinaz Kinaz Kinaz 1-4
Tpl-2 :	Transforming Protein Lymphoma 2 (Lenfoma Dönüştürücü Proteini 2)
DLK :	Dual Leucine Zipper Kinase (Çift Lösün Fermuar Kinaz)
TAK1 :	TGF- $\beta$ -Activated Kinase 1
AP-1 :	Aktivator Protein 1
ATF-2 :	Aktivasyon Transkripsiyon Faktörü 2
GDP :	Guanozin Difosfat
GTP :	Guanozin Trifosfat
TMÇ :	Tümör Mikroçevresi

CAF'ler :	Kanser İlişkili Fibroblastlar
APC :	Antijen Sunan Hücre
MDSC :	Myeloid Kökenli Baskılayıcı Hücre
MSC :	Mezenkimal kök hücreler
CAA :	Kanser İlişkili Adipositler
FABP2 :	Yağ Asidi Bağlayıcı Protein 2
IL-6 :	İnterlökin-6
MMP-11 :	Matriks Metalloproteinaz 1
ECM :	Hücre Dışı Matriks
HIF :	Hipoksi İndüklenebilir Faktör
YA :	Yağ Asidi
OXPPOS :	Oksidatif Fosforilasyon
AA :	Arachidonic Asit
PG :	Prostaglandin
FASN :	Yağ Asidi Sentazı
SCD1 :	Stearoil-CoA Desaturaz
ACC :	Asetil-CoA Karboksilaz
FAO :	Yağ Asidi Oksidasyonu
TAM :	Tümörle İlişkili Makrofajlar
CoA :	Asetil-Koenzim A
ROS :	Reaktif Oksijen Türleri
NO :	Nitrik Oksit
CM :	Koşullandırılmış Ortam
BCS :	Bovine Calf Serum (Sığır Buzağı Serumu)
FBS :	Fetal Bovine Serum (Fetal Sığır Serumu)
IBMX :	3-İzobütil-1-metilksantin

MLK2 ve MLK3 : Mikrotübül İlişkili Protein Kinaz 2 ve 3

ASK1 ve ASK2 : Apoptoz Sinyal Düzenleyici Kinaz 1 ve 2

STAT1 ve STAT3 : Sinyal İletimi ve Transkripsiyonel Aktivatör 1 ve 3



## TABLO LİSTESİ

Tablo A. 1 Kullanılan Cihazların Listesi .....	90
Tablo B. 1 Hücre Kültüründe Kullanılan Materyaller .....	91
Tablo C. 1 Kullanılan Kimyasalların Listesi.....	92
Tablo D. 1 12'lik Alt Jel (Seperating Gel) hazırlama prosedürü.....	94
Tablo D. 2 4'lük Üst Jel (Stacking Gel) hazırlama prosedürü .....	94

## ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2. 1 Kanserin Ayırt Edici Özellikleri .....	6
Şekil 2. 2 Pankreasın yapısı (Fleshman et al, 2025) .....	7
Şekil 2. 3 2018'de Küresel Pankreas Kanseri İnsidansının Yaşa Göre Standardize Edilmiş Dağılımı. (Rawla et al., 2019b).....	11
Şekil 2. 4 Pankreas kanserinde yer alan hücrel sinyal yolları ve hedef tedavi ajanları: Turuncu kutular tüm ajanları, yeşil renk ise klinik uygulamada olanları vurgulamaktadır (Biolabs, 2025).....	15
Şekil 2. 5 Adipositlerin tümör hücreleriyle olan etkileşimi, onların fenotiplerini değiştirerek CAA formuna dönüşmelerine neden olur; bu çift yönlü iletişim, tümör progresyonunu etkiler (Bouche & Quail, 2023).....	22
Şekil 2. 6 : Tümör mikroçevresine genel bir bakış: Tümör hücreleri, zorlu koşullar altında hayatta kalmak ve büyümeyi sürdürmek amacıyla, TME'nin hücrel ve hücrel olmayan kötü huylu olmayan bileşenlerini kendi lehlerine dönüştürür (Baghban et al., 2020) ....	24
Şekil 2. 7: Pankreas tümörleri ile komşu yağ dokusu arasındaki etkileşim, yağ dokusunun fonksiyonunu bozarak tümör progresyonunu destekler .(Lin et al., 2023) .....	28
Şekil 3. 1 3T3-L1 hücre hattının mikroskop altında görüntülenmesi (ATCC) 33	
Şekil 3. 2 MIA PACA-2 hücre hattının mikroskop altında görüntülenmesi (ATCC) .....	34
Şekil 4. 1 3T3-L1 preadiposit hücrelerinin olgun adiposit hücrelerine farklılaştırılması. 44	
Şekil 4. 2 3T3-L1 hücrelerinde adipojenik farklılaşmanın çeşitli boyama yöntemleriyle görselleştirilmesi .....	45
Şekil 4. 3 Ko-kültür sistemi ile koşullandırılmış medyanın (CM) hazırlanması ve uygulanmasının şematik gösterimi.....	46
Şekil 4. 4 MIA PaCa-2 hücrelerinde farklı orlistat dozlarının hücre canlılığı ve morfoloji üzerindeki etkileri.....	49
Şekil 4. 5 3T3-L1 hücrelerinde farklı orlistat dozlarının hücre canlılığı ve morfoloji üzerindeki etkileri.....	51
Şekil 4. 6 3T3-L1'den elde edilen koşullandırılmış medyumun (CM) MIA PaCa-2 hücreleri üzerindeki etkileri. ....	54
Şekil 4. 7 3T3-L1 koşullandırılmış medyum (CM) uygulaması sonrası MIA PaCa-2 hücrelerinde lipit birikiminin Oil Red O boyası ile gösterimi. ....	56
Şekil 4. 8 MIA PaCa-2 hücrelerinde farklı orlistat dozlarının büyüme üzerine etkisinin değerlendirilmesi.....	57
Şekil 4. 9 MIA PaCa-2 hücrelerinde orlistat ve 3T3-L1 koşullandırılmış medyum (CM) uygulamaları sonrası floresan boyamalarla yapılan hücrel analiz. ....	60
Şekil 4. 10 MIA PaCa-2 hücrelerinde kontrol, orlistat, ko-kültür ve ko-kültür + orlistat uygulamaları sonrası yara iyileşme (wound healing) analizinin değerlendirilmesi.....	62
Şekil 4. 11 MIA PaCa-2 hücrelerinde lipogenezle ilişkili proteinlerin western blot analizi .....	63

Şekil 4. 12 MIA PaCa-2 hücrelerinde farklı koşullarda SREBP1 protein ekspresyonunun western blot analizi. ....	64
Şekil 4. 13 100 µM orlistat uygulaması sonrası MIA PaCa-2 ve 3T3-L1 hücrelerinde Annexin V/PI boyası ile apoptoz ve nekroz analizi. ....	66



**Enstitü:** Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

**Anabilim Dalı:** Moleküler Biyoloji ve Genetik

**Program:** Moleküler Biyoloji ve Genetik

**Tez Danışmanı:** Dr. Öğr. Üyesi Pelin Özfiliz KILBAŞ

**Tez Türü ve Tarih:** Yüksek Lisans – HAZİRAN 2025

## ÖZET

Pankreas kanseri, kötü prognozu, yüksek metastaz potansiyeli ve sınırlı tedavi seçenekleri nedeniyle en agresif maligniteler arasında yer almaktadır. Bu hastalığın ilerleyişinde, tümör mikroçevresi ile olan etkileşimler kritik bir rol oynamaktadır. Özellikle, tümörü çevreleyen adipositlerle olan dinamik iletişim, kanser hücrelerinin proliferasyonunu, migrasyonunu ve ilaç direncini artıran metabolik sinyallerin ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Adipositlerin salgıladığı lipitler ve adipokinler, lipit metabolizmasında yeniden programlamaya yol açarak tümör progresyonunu desteklemektedir. Bu bağlamda, bir yağ asidi sentaz (FASN) inhibitörü olan orlistat, kanser karşıtı potansiyeliyle dikkat çeken umut verici bir terapötik ajandır. Orlistat, lipit metabolizmasını hedef alarak pankreas kanseri hücrelerinin adiposit kaynaklı avantajlarını ortadan kaldırmakta ve hücresel düzeyde tümör destekleyici sinyalleri baskılamaktadır. Bu çalışmada, 3T3-L1 olgun adiposit hücreleri ile MIA PaCa-2 pankreas kanseri hücreleri arasındaki metabolik çapraz konuşma incelenmiş, orlistatın bu etkileşim üzerindeki rolü değerlendirilmiştir. SREBP1 düzeylerini inceleyerek, tümör mikroçevresinin lipit metabolizması yoluyla aktive olduğunu ve bu durumun kanser hücrelerinin daha agresif özellikler kazanmasına neden olduğunu gözlemledik. Ancak bu süreç, yağ asidi sentezini hedef alan orlistat uygulamasıyla baskılanabilir; böylece mikroçevrenin kanseri destekleyici etkisi azaltılarak tümörün agresifliği geriletilebilir. Elde edilen bulgular, pankreas kanserinde lipit metabolizmasının hedeflenmesinin yeni ve etkili tedavi stratejileri geliştirilmesinde kilit bir yaklaşım olabileceğini göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Pankreas kanseri, tümör mikroçevresi, adiposit, lipit metabolizması, orlistat.

**University:** Istanbul Kultur University

**Institute:** Institute of Graduate Education

**Department:** Molecular Biology and Genetics

**Program:** Molecular Biology and Genetics

**Supervisor:** Dr. Öğr. Üyesi Pelin Özfiliz KILBAŞ

**Degree Awarded and Date:** MA – JUNE 2025

## ABSTRACT

Pancreatic cancer is among the most aggressive malignancies due to its poor prognosis, high metastatic potential, and limited treatment options. In the progression of this disease, interactions with the tumor microenvironment play a critical role. In particular, the dynamic communication between cancer cells and surrounding adipocytes leads to the emergence of metabolic signals that enhance cancer cell proliferation, migration, and drug resistance. Lipids and adipokines secreted by adipocytes contribute to the reprogramming of lipid metabolism, thereby supporting tumor progression. In this context, orlistat, a fatty acid synthase (FASN) inhibitor, stands out as a promising therapeutic agent with anticancer potential. By targeting lipid metabolism, orlistat eliminates the advantages cancer cells gain from adipocyte-derived signals and suppresses tumor-supportive signaling at the cellular level. In this study, the metabolic crosstalk between 3T3-L1 mature adipocyte cells and MIA PaCa-2 pancreatic cancer cells was examined, and the role of orlistat in this interaction was evaluated. By analyzing SREBP1 levels, we observed that the tumor microenvironment is activated through lipid metabolism, leading to more aggressive characteristics in cancer cells. However, this process can be suppressed through the application of orlistat, which targets fatty acid synthesis; thereby, the tumor-promoting effects of the microenvironment can be diminished, and tumor aggressiveness can be reduced. The findings suggest that targeting lipid metabolism in pancreatic cancer could be a key approach in the development of new and effective therapeutic strategies.

**Keywords:** Pancreatic cancer, tumor microenvironment, adipocyte, lipid metabolism, orlistat

# 1. GİRİŞ VE AMAÇ

## 1.1. GİRİŞ

Pankreas kanseri, agresif biyolojisi, geç teşhisi ve mevcut tedavilere sınırlı yanıtı ile karakterize edilen ölümcül malignitelerden biridir. Kötü prognozuna katkıda bulunan temel faktörler arasında tümör hücrelerinin dikkate değer metabolik adaptasyonu ile özellikle çoğalmayı, hayatta kalmayı ve tedaviye direnci desteklemek için değişen lipit metabolizmasının değişimi yer almaktadır. Tümör çevresindeki adipositler, lipitleri sağlayarak terapötik kaçınmayı destekleyip, metabolik yeniden programlamayı değiştirerek kanseri tetikleyici etki oluşturmaktadırlar. Lipit biyosentezinde merkezi bir enzim olan yağ asidi sentaz (FASN), pankreas kanserinde sıklıkla aşırı ifade edilir ve malign fenotipin korunmasında kritik bir rol oynar. FASN'nin inhibisyonu, kanser hücresi metabolizmasını bozmak ve seçici tümör hücresi ölümünü başlatmak için umut verici bir strateji olarak ortaya çıkmıştır. FDA (Food and Drug Administration) onaylı bir anti-obezite ilacı olan Orlistat'ın, birçok kanser tipinde FASN'i geri döndürülemez şekilde inhibe ederek anti-tümör aktivitesi gösterdiği, yalnızca tümör hücrelerinin metabolik bağımlılıklarını bozmakla kalmayıp, tümör mikroçevresindeki adipositlerin de pro-tümörojenik etkilerine karşı koyduğu bilinmektedir.

Bu tez çalışmasında, adipositlerin pankreas kanseri hücrelerinin canlılığını, proliferasyonunu, lipit alımını ve migrasyonunu artırdığı gözlemlenmiştir. Ancak, tümör mikroçevresinde bu destekleyici etkilerin varlığına rağmen, Orlistat bu süreçleri anlamlı şekilde baskılamaya devam etmiştir. Bu durum, Orlistat'ın lipit açısından zengin ve tümör destekleyici koşullarda bile etkili olduğunu göstermekte ve pankreas kanserinde lipit metabolizmasını hedeflemenin terapötik potansiyelini ortaya koymaktadır. Bu mekanizmanın daha ileri düzeyde araştırılması pankreas kanserinde yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesine katkı sağlayabilir.

## 1.2. AMAÇ

Bu çalışmanın amacı, 3T3-L1 olgun adipositler ile MIA PaCa-2 pankreas kanseri hücreleri arasındaki çift yönlü etkileşimi inceleyerek, tümör mikroçevresine bağlı olarak lipit metabolizmasında meydana gelen değişimlerin tümör hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkilerini araştırmaktır. Ayrıca, yağ asidi sentaz (FASN) inhibitörü Orlistat'ın bu hücreler arasındaki metabolik etkileşimdeki rolünün ve bu etkileşim aracılığıyla pankreas kanseri hücrelerinin canlılığında oluşturduğu değişikliklerin ortaya konması hedeflenmektedir.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Kanser ve Gelişimi

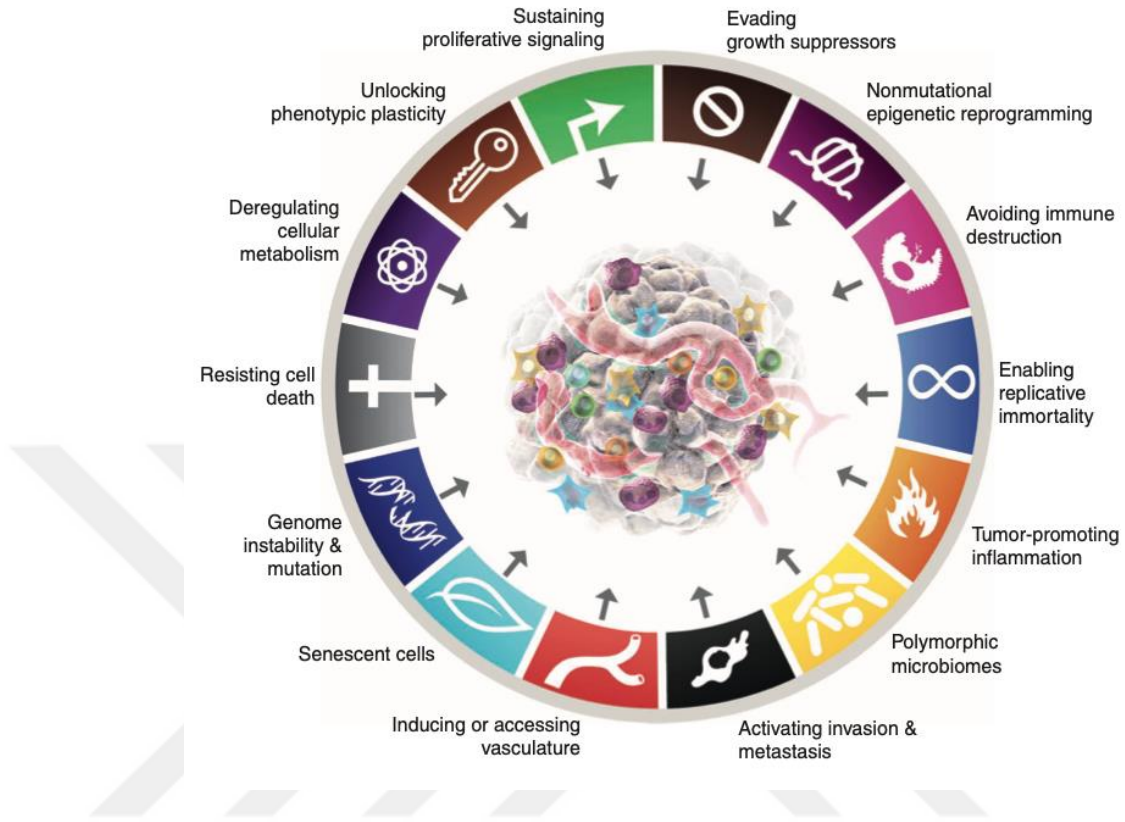
Kanser, küresel sağlık için önemli bir tehdit oluşturan karmaşık ve çok yönlü bir hastalıktır. Vücutta anormal hücrelerin kontrolsüz bir şekilde büyümesi ve yayılması ile karakterizedir ve genellikle normal fizyolojik süreçleri bozar. Kanser, vücudun hücre büyümesi ve bölünmesi için düzenleyici mekanizmalarının işlevsiz hale gelmesi sonucunda ortaya çıkar. Normal şartlarda, insan hücreleri düzenli bir şekilde büyür, bölünür ve kendilerini yenileyerek doku bütünlüğünü ve işlevini korur. Ancak kanserde bu düzenli süreç bozulur ve anormal veya hasarlı hücreler kontrolsüz bir şekilde çoğalır. Bu hücreler genellikle tümör adı verilen doku kütleleri oluşturabilir ve bu tümörler benign (iyi huylu) veya malign (kötü huylu) olarak sınıflandırılabilir (Brown et al., 2023).

2000 yılında, kanser hücrelerinin tümör ilerlemesi sürecinde kazandığı temel biyolojik yetenekleri tanımlayan önemli bir çerçeve ortaya (Hanahan & Weinberg, 2011). Bu kavram, çeşitli genetik ve hücresel değişikliklerin nasıl ortak bir şekilde kanserin gelişimini sağladığını anlamamıza yardımcı olur. Kanser hücreleri, kendi büyüme sinyallerini üreterek veya normal büyüme faktörü yollarını bozarak sürekli çoğalma yeteneği kazanırlar ve böylece normal kontrol mekanizmalarını aşarlar. Aynı zamanda, hücre bölünmesini sınırlandıran p53 gibi tümör baskılayıcı genlerin etkisinden kaçarlar (Symonds et al., 1994). Kanserin önemli bir özelliği, programlanmış hücre ölümü (apoptoz) mekanizmasına direnç göstermeleri olup, bu sayede genetik hasar veya çevresel stres gibi olumsuz koşullara rağmen hayatta kalabilirler. Ayrıca, telomer kısalması nedeniyle normal hücrelerde görülen sınırlı bölünme kapasitesini aşarak sınırsız çoğalma yeteneğine ulaşırlar (Greenberg et al., 1999). Tümörlerin büyümesini sürdürebilmeleri için yeni kan damarları oluşturarak (anjiyogenez) ihtiyaç duydukları oksijen ve besin maddelerini sağlarlar. Kanser hücrelerinin çevre dokulara invaze olabilmeleri ve uzak organlara metastaz yapabilmeleri de kanserin ölümcüllüğünde kritik rol oynar; bu

süreçte hücre adezyon moleküllerindeki değişiklikler, ekstraselüler matriksin proteazlar aracılığıyla parçalanması ve stromal ile inflamatuvar hücrelerle etkileşimler önemli yer tutar (Werb, 1997). Tüm bu özelliklerin temelinde, tümör ilerlemesi için gerekli genetik değişikliklerin birikimini kolaylaştıran genom instabilitesi yer alır. Hücrelerin genom bütünlüğünü korumak için gelişmiş DNA tamir mekanizmaları ve p53 tarafından yönetilen hücre döngüsü kontrol noktaları bulunmasına rağmen, kanser hücrelerinde bu “genom koruyucu” sistemlerin işlev kaybı sıkça görülür ve bu durum mutasyon oranının artmasına, çeşitlenen mutant klonların oluşmasına olanak tanır (Lengauer et al., 1998). Bu yeteneklerin kazanılma sırası ve mekanizmaları kanser türleri ve bireysel tümörler arasında değişiklik gösterse de, bu model kanserin biyolojisini anlamada kapsamlı ve temel bir çerçeve sunmaktadır. Bu paradigm, kanser araştırmalarını ve tedavi stratejilerini derinden etkileyerek, her bir kanser özelliğini hedefleyen tedavilerin geliştirilmesini teşvik etmektedir. Bu altı temel özellik, kanser biyolojisini anlamada önemli bir temel oluşturdu. Ancak, kanserin karmaşık doğası ve ilerleyen araştırmalar, 2011 yılında Hanahan ve Weinberg tarafından bu hallmarks kavramına yeni eklemeler yapılmasını gerektirdi. Böylece kanserin gelişimini ve ilerlemesini daha kapsamlı açıklayan yeni özellikler tanımlandı.

2011 yılında yapılan güncellemeyle, kanserin temel biyolojik yeteneklerine ek olarak, tümörlerin gelişimi ve progresyonunda rol oynayan yeni “yardımcı” özellikler ve “güçlendirici” karakteristikler tanımlandı (Hanahan & Weinberg, 2011). Bu kapsamda, kronik enflamasyonun tümör mikroçevresinde tümör ilerlemesini destekleyen kritik bir faktör olduğu vurgulandı. Ayrıca, kanser hücrelerinin metabolik yollarını yeniden programlayarak, enerji ihtiyaçlarını karşılamak ve hızlı proliferasyonlarını sürdürmek için aerobe glikoliz (Warburg etkisi) gibi alternatif metabolik stratejiler benimsedikleri gösterildi. Bunlara ek olarak, bağışıklık sisteminden kaçınma yeteneği, tümörlerin evrimsel süreçte aşması gereken önemli bir engel olarak tanımlandı. Bu bağlamda, tümör hücreleri immün denetim mekanizmalarını devre dışı bırakmak veya baskılamak suretiyle, bağışıklık yanıtından kaçabilirler. Bu yeni kavramlar, kanserin yalnızca hücre içi değişikliklerden ibaret olmadığını, aynı zamanda tümör ile çevresindeki stromal, bağışıklık ve vasküler hücreler arasındaki karmaşık etkileşimlerin kanserin seyrinde kritik rol oynadığını ortaya koydu.

2022 yılında ise kanser araştırmalarındaki daha yeni gelişmeler ışığında hallmarks kavramına yeni boyutlar eklenmiştir. Bu güncellemede, klasik sekiz temel yeteneğe ek olarak dört önemli parametre daha ön plana çıkmıştır. Bunlar hücre sel plastisite, mutasyona bağlı olmayan epigenetik yeniden programlama, organ ve doku mikrobiomlarındaki polimorfizm ve senescent hücrelerin tümör mikroçevresindeki işlevleri. Hücre sel plastisite, kanser hücrelerinin çevresel faktörlere ve tedavi baskılarına karşı fenotipik esneklik göstererek farklılaşabilme ve adaptasyon sağlama yeteneğini ifade eder; bu da tümör heterojenitesinin ve tedavi direncinin temel sebeplerinden biridir (Yuan et al., 2019). Mutasyona bağlı olmayan epigenetik yeniden programlama, DNA dizisinde değişiklik olmadan gen ekspresyon profillerinin değişmesiyle kanser hücrelerinin davranışlarının şekillenmesini açıklar (Thienpont et al., 2016). Polimorfik mikrobiomlar, yani bireylerin organ ve dokularındaki mikrobiyal çeşitlilik, tümör gelişimi ve immün yanıt üzerinde etkili olabilmekte ve dolayısıyla kanser patogenezi yeni bir perspektif getirmektedir (Gopalakrishnan et al., 2018). Son olarak, senescent hücreler, kanser hücreleri ve stromal hücrelerde farklı şekillerde bulunmakla birlikte, tümör mikroçevresinde hem tümör ilerlemesini destekleyici hem de engelleyici roller stlenebilmektedirler (He & Sharpless, 2017) . Bu yeni kavramlar, kanser biyolojisini daha bütünsel ve çok boyutlu anlamamıza yardımcı olmakta, yeni hedeflerin keşfi ve tedavi stratejilerinin geliştirilmesi için geniş bir alan açmaktadır (Hanahan, 2022). (şekil 2. 1)



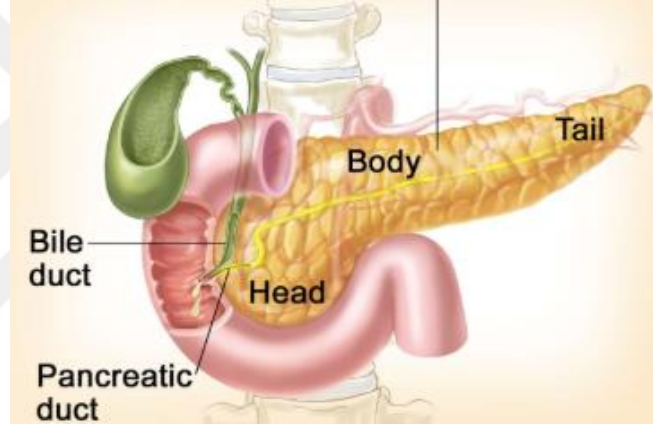
Şekil 2. 1 Kanserın Ayırt Edici Özellikleri

## 2.2. Pankreas Kanseri

### 2.2.1. Pankreasın Yapısı, İşlevi ve Rolü

Pankreas, sindirim ve kan şekeri düzenlenmesinde merkezi bir rol oynayan hayati bir organdır. Mide arkasında, üst sol karın bölgesinde yer alır. Küçük bağırsak, karaciğer ve dalak gibi çeşitli diğer organlarla çevrilidir (Slack, 1995). Yapısal olarak, onbeş ila yirmi cm uzunluğunda, düz bir armut şeklinde, baş, boyun/gövde ve kuyruk olmak üzere üç bölüme ayrılmış süngerimsi bir organdır (Şekil 2. 2). Baş kısmı, pankreasın en geniş bölümüdür ve duodenumun C şeklindeki kıvrımında yer alır. Safra kanalı, yüzeyinde bir yarık boyunca ya da içinde yerleşmiş olarak bulunur (Talathi et al., 2023). Baş kısmı, pankreasın kısmen sindirilmiş besinlere sindirim enzimleri salgıladığı mide ve ince bağırsak birleşiminde bulunur. Üst mezenterik arter ve ven, portal ven ve çölyak ekseni gibi ana kan damarlarıyla çevrili olan pankreas, büyük oranda (%95) protein, karbonhidrat

ve yağların sindirimine yardımcı olan tripsin, kimotripsin, amilaz ve lipaz gibi enzimleri salgılayan ekzokrin dokudan oluşur. Pankreasın geri kalan %5'i, doğrudan kan dolaşımına önemli hormonlar üreten ve salgılayan Langerhans adacıklarından oluşur. Pankreasın ana hormonlarından ikisi, kan şekerini düşüren insülin ve kan şekerini yükselten glukagondur. Kan şekerinin uygun seviyelerde tutulması, beyin, karaciğer ve böbrekler gibi hayati organların düzgün çalışması için kritiktir. Pankreasın ekzokrin ve endokrin işlevleri bir arada değerlendirildiğinde, bu organın genel sağlık ve metabolik dengeyi korumadaki vazgeçilmez rolü açıkça ortaya çıkar (Slack, 1995).



Şekil 2. 2 Pankreasın yapısı (Fleshman et al, 2025)

Bazı pankreas disfonksiyonları, pankreas dokusunun yapısını ve işlevini bozarak, iltihaplanmayı artırarak veya genetik hasara zemin hazırlayarak pankreas kanserinin gelişimine katkıda bulunmaktadır. Kronik pankreatit, genellikle alkol kullanımı, genetik mutasyonlar (örneğin PRSS1) veya otoimmün nedenlerle ortaya çıkan uzun süreli bir pankreas iltihabıdır (Goosenberg & Lappin, 2025). Sürekli hücre hasarı ve doku skarlaşması (fibrozis) ile karakterizedir. Bu durum, zamanla hücre yenilenmesi üzerindeki baskıyı artırarak DNA mutasyonlarına ve neoplastik dönüşümlere zemin hazırlar. Kronik pankreatit, özellikle pankreas kanserine dönüşme potansiyeli açısından yüksek risk taşır (Kirkegård et al., 2017). Benzer şekilde, pankreatik kistler, özellikle intraduktal papiller müsinöz neoplaziler (IPMN), öncül lezyonlar olarak kabul edilir. Pankreas kanallarında gelişen ve müsin üreten bu kistik yapılar, düşük dereceli displaziden yüksek dereceli

displaziye ve invaziv karsinomlara kadar ilerleyebilir (Puckett et al., 2023). Belirli yapısal ya da moleküler özellikler taşıyan IPMN'ler, malign dönüşüm açısından daha yüksek risklidir (de la Fuente et al., 2023). Diyabet, özellikle uzun süreli tip 2 diyabet, pankreas kanseriyle yakından ilişkili önemli bir metabolik bozukluktur (Scherübl, 2021). Tip 2 diyabetin karakteristik özelliği olan kronik hiperglisemi (sürekli yüksek kan şekeri düzeyleri) ve hiperinsülinemi (artmış insülin düzeyleri), pankreas çevresindeki mikroçevrede hem inflamasyonu artırır hem de hücre düzeyde proliferasyonu (hücre çoğalması) destekler. Bu durum, hücrelerde stres oluşturur ve DNA hasarına neden olarak tümör oluşumu için uygun bir ortam yaratır (Ihara et al., 1999). Ayrıca, insülin direnci gibi metabolik düzensizlikler, kanser hücrelerinin büyümesi ve hayatta kalması için gerekli olan büyüme faktörlerinin (örneğin IGF-1) salınımını da artırır. Bu biyolojik etkiler, diyabeti pankreas kanserinin hem doğrudan bir risk faktörü hem de kanserin ilerlemesini destekleyen bir durum haline getirir. İlginç bir şekilde, 50 yaş üzeri bireylerde yeni gelişen diyabet, altta yatan gizli bir pankreas tümörünün ilk belirtisi olabilir. Çünkü gelişen tümör, pankreasın endokrin kısmını etkileyerek insülin üretimini ve glukoz düzenlemesini bozabilir (Ling et al., 2020). Diğer yandan, ekzokrin pankreas yetmezliği (EPI), pankreasın dış salgı yapan hücrelerinin yeterli miktarda sindirim enzimi üretememesi sonucu ortaya çıkar. Bu durum genellikle yağların, proteinlerin ve karbonhidratların yeterince sindirilememesine, dolayısıyla malabsorpsiyon ve beslenme yetersizliklerine yol açar (Capurso et al., 2019). EPI, çoğu zaman kronik pankreatit gibi uzun süreli hasar oluşturan hastalıkların veya doğrudan pankreas kanserinin bir belirtisidir. Çünkü ilerleyen bir tümör, pankreas dokusunu tahrip ederek enzim salgılayan hücreleri etkileyebilir. Bu nedenle EPI, sadece mevcut pankreas hastalıklarının sonucu olmakla kalmaz, aynı zamanda pankreasın ilerleyici hasar gördüğünü ve potansiyel olarak malign dönüşüm sürecinde olduğunu gösteren önemli bir biyolojik işaret olabilir (Moore et al., 2021). Sonuç olarak, diyabet ve ekzokrin pankreas yetmezliği gibi pankreatik disfonksiyonlar sadece pankreasın normal işlevlerini bozmakla kalmaz, aynı zamanda iltihap, hücre hasarı, metabolik stres ve doku değişiklikleri gibi biyolojik mekanizmalar üzerinden kanserleşme sürecine doğrudan katkı sağlar. Bu durum, bu tür disfonksiyonların pankreas kanseri açısından neden dikkatle takip edilmesi gerektiğini açıkça ortaya koymaktadır.

### 2.2.2. Pankreatik Kanserinin Tanımı ve Sınıflandırması

Pankreas kanseri, genellikle tek bir hastalık gibi ele alınsa da, biyolojik davranışları ve prognostik özellikleri bakımından farklılık gösteren çeşitli histopatolojik ve moleküler alt tiplere sahiptir. Pankreas tümörleri başlıca ekzokrin ve nöroendokrin olmak üzere iki ana gruba ayrılır (J. Zhou et al., 2010). Ekzokrin pankreas kanserleri, pankreasın sindirim enzimlerini üreten hücrelerinden kaynaklanır ve pankreatik duktal adenokarsinom (PDAC) en yaygın formudur. PDAC, ekzokrin pankreas tümörlerinin %90'ından fazlasını oluşturur ve çoğunlukla "başka türlü sınıflandırılmayan" (NOS) olarak tanımlanır; bu sınıflama klinik kararlar açısından evreleme dışında sınırlı bilgi sunmaktadır (Lüttges et al., 2004). Adenoskuamöz karsinom ( $\geq$ %15 skuamöz farklılaşma içeren), kolloid karsinom ve asinar hücreli karsinom gibi daha nadir histolojik varyantlar ise bazı morfolojik ve prognostik farklılıklar göstermelerine rağmen, tedavi açısından ayırt edici olarak ele alınmamaktadır (Kardon et al., 2001).

Öte yandan, nöroendokrin pankreas tümörleri (PNET'ler), pankreasın hormon salgılayan endokrin hücrelerinden köken alır ve klinik davranışları ile prognozları ekzokrin tümörlerden farklıdır. Nöroendokrin tümörler, iyi diferansiye olan ve genellikle daha yavaş seyir gösteren iyi huylu ya da düşük dereceli malign tümörler ile yüksek dereceli nöroendokrin karsinomlar arasında geniş bir spektrumda yer alır. PNET'ler, hormon salgılama durumlarına göre fonksiyonel (insülinoma, gastrinoma vb.) veya non-fonksiyonel olarak sınıflandırılır ve tedavi stratejileri buna göre şekillenir (Basturk et al., 2015).

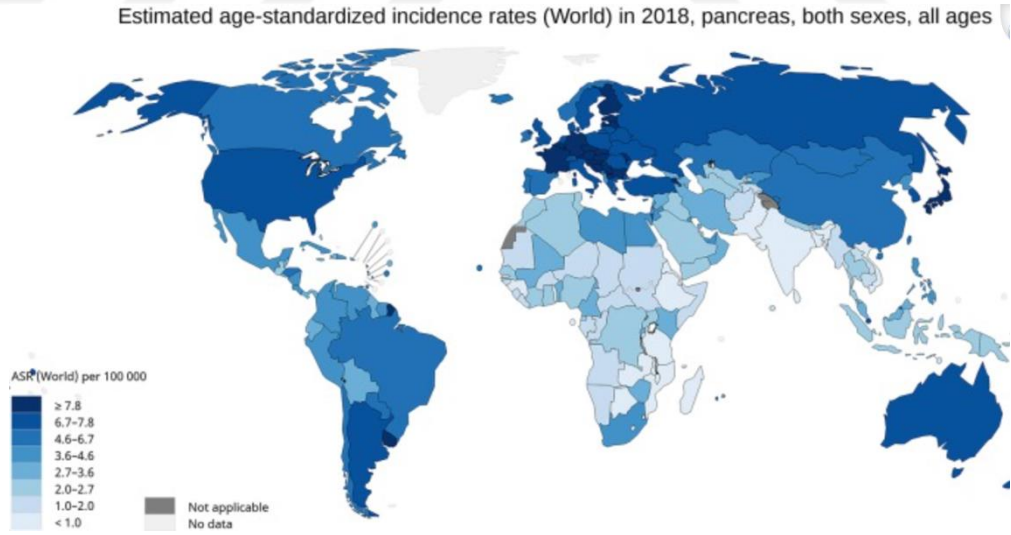
Son yıllarda PDAC'nin altında yatan heterojenliği daha iyi anlamak adına moleküler düzeyde sınıflandırmalara da yönelinmiştir. Yapılan transkriptom analizleri, PDAC'nin çeşitli moleküler alt tiplerini ortaya koymuştur. Collisson ve arkadaşları, üç alt tip tanımlamıştır: Klasik, Kuazi-mezenkimal (QM-PDA) ve Ekzokrin-benzeri; bu sınıflandırmada QM-PDA alt tipi, yüksek tümör derecesi ve kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir (Collisson et al., 2011). Daha sonra Moffitt ve arkadaşları, Bazal-benzeri ve Klasik olmak üzere iki tümör alt tipi ile birlikte, Stromal içerikleri baz alan İki ek sınıf (Aktive ve Normal stroma) tanımlamıştır; bu durum tümör mikrosim çevresinin

önemini vurgulamaktadır (Sivapalan et al., 2022). Bu sınıflandırmaların ötesine geçen Bailey ve arkadaşları ise, genomik, transkriptomik ve epigenomik verileri birleştirerek Dört alt tip tanımlamıştır: Skuamöz, Pankreatik Progenitör, İmmünojenik ve ADEX (Aberrant Farklılaşmış Endokrin Ekzokrin) (Bailey et al., 2016). Özellikle Skuamöz alt tip, Bazal-benzeri ve QM-PDA alt tipleriyle örtüşmekte ve pankreatik soya özgü GATA6 ve HNF4A gibi genlerin epigenetik olarak susturulmasıyla karakterize edilmekte olup, en kötü prognozla ilişkilidir. İmmünojenik alt tip ise belirgin bağışıklık hücresi infiltrasyonu ile öne çıkmakta olup, immünoterapi açısından potansiyel taşıyabilir (Bailey et al., 2016). Pankreatik Progenitör ve Klasik alt tipler normal endodermal farklılaşma belirteçlerini korurken, ADEX/Ekzokrin-benzeri gruplar CPA1 ve PRSS1 gibi olgun pankreas dokusuna özgü genleri ifade etmektedir; ancak bu ifadenin gerçek bir tümör alt tipine mi yoksa örnek kontaminasyonuna mı ait olduğu konusunda tartışmalar sürmektedir (Decker et al., 2006). Bu sınıflandırmalar bir bütün olarak PDAC'nin biyolojik çeşitliliğini gözler önüne sermekte ve histolojik tanılamamanın ötesine geçerek, klinik olarak uygulanabilir bir moleküler taksonomi oluşturulmasının, tanı, prognoz ve tedavi süreçlerinde önemli katkılar sağlayabileceğini göstermektedir.

### **2.2.3. Pankreas Kanseri Epidemiyolojisi**

Pankreas kanseri, zorlu bir malignite olup sanayileşmiş ülkelerde küresel kanser ölümlerinin yedinci en yaygın nedeni olarak yer almaktadır. GLOBOCAN 2018 tahminlerine göre, pankreas kanseri 458.918 yeni vaka ve 432.242 kanser kaynaklı ölüm ile en yaygın görülen 11. kanser olarak tespit edilmiştir. Küresel insidans ve mortalite, yaşla birlikte artış göstermekte olup erkeklerde kadınlara kıyasla biraz daha yaygındır (*Global Cancer Observatory*, n.d.). Pankreas kanserinin insidansı artarken, 2040 yılına kadar 355.317 yeni vaka öngörülmektedir (Bray et al., 2018). Pankreas kanseri, bölgelere ve popülasyonlara göre farklılıklar gösteren bir hastalıktır (Şekil 2. 3). Yaşa göre standardize edilmiş insidans oranı (ASR) en yüksek olarak 100.000 kişide 7,7 ile Avrupa'da ve 7,6 ile Kuzey Amerika'da gözlemlenmiştir. En düşük insidans oranı ise 100.000 kişide 2,2 ile Afrika'da kaydedilmiştir (Rawla et al., 2019a). PDAC insidansı, yüksek gelirli bölgelerde daha yüksek oranlar gösterirken, düşük gelirli bölgelerde düşük oranlar göstermektedir. Avrupa, Kuzey Amerika, Avustralya/Yeni Zelanda ve Japonya gibi yüksek gelirli bölgelerde PDAC insidans oranları 100.000 kişi başına 7,9 ile 9,9

arasında değişirken, Afrika, Orta Amerika ve Güney Asya gibi düşük gelirli bölgelerde bu oranlar 1,5 ile 4,6 arasında bildirilmiştir. Bu farklar, alkol tüketimi, obezite, diyabet ve yaşlanan nüfus gibi risk faktörlerinin daha yaygın olduğu varlıklı toplumlarla ilişkilendirilebilir. Ayrıca, düşük gelirli bölgelerde ileri teşhis araçlarına ve görüntüleme teknolojilerine erişimin sınırlı olması, gerçek insidansın eksik tahmin edilmesine yol açarak PDAC'nin küresel epidemiyolojisinde bir tutarsızlığa işaret edebilir (Liew et al., 2023). Birleşik Krallık'ta pankreatik nöroendokrin neoplazmlar (NEN'ler) için 1 yıllık genel sağkalım oranı yaklaşık %80'dir. Bu veri, 2013-2015 yılları arasında teşhis konulan 1.415 hastayı kapsayan ve British Journal of Cancer, 2019'da yayımlanan İngiltere Halk Sağlığı çalışmasına dayanmaktadır. Uzun vadeli sağkalım oranları ise daha düşüktür; 2000-2002 yılları arasında teşhis edilen hastaları içeren bir Avrupa çalışmasına göre, hastaların yalnızca yaklaşık %40'ı beş yıl veya daha uzun süre hayatta kalmıştır. Bu veriler, pankreas kanserinin agresif doğasını ve erken teşhis ile tedavi sonuçlarını iyileştirme konusundaki devam eden zorlukları vurgulamaktadır (Leiphrakpam et al., 2025).



Şekil 2. 3 2018'de Küresel Pankreas Kanseri İnsidansının Yaşa Göre Standardize Edilmiş Dağılımı. (Rawla et al., 2019b)

#### 2.2.4. Genetik, Çevresel ve Yaşam Tarzı ile İlişkili Risk Faktörleri

Pankreas kanseri, genetik, yaşam tarzı, tıbbi ve çevresel risk faktörlerinin etkileşimiyle ortaya çıkan multifaktöriyel bir hastalıktır. Genetik yatkınlık, hastalığın gelişiminde önemli bir rol oynar. BRCA1, BRCA2, PALB2, ATM, TP53, CDKN2A ve STK11 gibi genlerdeki kalıtsal mutasyonlar pankreas kanseri riskini önemli ölçüde artırır (Bailey et al., 2016). Lynch sendromu, Peutz-Jeghers sendromu ve ailesel atipik multipl ben melanomu (FAMMM) sendromu olan bireyler daha yüksek risk altındadır. Ayrıca, birinci derece akrabalarda pankreas kanseri öyküsü riski artırır ve kalıtsal vakalar tüm pankreas kanseri vakalarının yaklaşık %5-10'unu oluşturur. Yaşam tarzı faktörleri, pankreas kanseri gelişimi ile güçlü bir şekilde ilişkilidir. Sigara kullanımı, hastalığın en bilinen risk faktörlerinden biridir. Obezite ve hareketsiz yaşam tarzı, kronik inflamasyon ve insülin direncine yol açarak tümör oluşumunu teşvik eder. Yağ oranı yüksek, kırmızı ve işlenmiş et içeren beslenme alışkanlıkları ile lif, meyve ve sebze açısından yetersiz diyetler pankreas kanseri ile ilişkilendirilmiştir. Aşırı alkol tüketimi, özellikle kronik pankreatit gelişimine neden olarak dolaylı yoldan pankreas kanseri riskini artırır. Kronik pankreatit, pankreasın uzun süreli iltihaplanmasıyla karakterizedir ve kanser için bilinen bir öncül hastalıktır. Bazı tıbbi durumlar da pankreas kanseri riskini artırmaktadır. Kronik pankreatit, özellikle kalıtsal veya tekrarlayan vakalar, sürekli inflamasyon ve hücre hasar nedeniyle kansere yakalanma olasılığını ciddi şekilde yükseltir. Tip 2 diyabet, hem bir risk faktörü hem de bazı durumlarda pankreas kanserinin erken belirtisi olabilir. Bununla birlikte, insülin direnci, obezite ve lipit dengesizlikleri gibi metabolik sendromlar da artan pankreas kanseri riski ile ilişkilidir. Karaciğer sirozu, safra taşları ve kolesistektomi (safra kesesi alınması) gibi tıbbi durumların da pankreas kanseri gelişimi ile bağlantılı olabileceği düşünülmektedir. Yaş ve cinsiyet değiştirilemez risk faktörleridir. Vakaların çoğu 60 yaş üstünde teşhis edilir ve pankreas kanseri erkeklerde kadınlara kıyasla sık görülmektedir. Etnik köken de pankreas kanseri risk grubunda rol oynayabilir; örneğin, Afrika kökenli Amerikalılarda pankreas kanseri riski daha yüksektir. Bu artış, genetik yatkınlık, çevresel maruziyetler ve yaşam tarzı faktörlerinin birleşimiyle açıklanabilir. Çevresel maruziyetler de pankreas kanseri gelişimine katkıda bulunabilir. Uzun süreli endüstriyel kimyasallar, pestisitler, benzen, asbest ve ağır metallerle temas, özellikle metal sanayi, kuru temizleme ve petrol ile ilgili sektörlerde çalışan kişilerde

artmış risk ile ilişkilendirilmiştir. Son araştırmalar, bağırsak mikrobiyotasının pankreas kanseri üzerindeki olası rolüne dikkat çekmektedir. Bağırsak mikroorganizma dengesizliklerinin inflamasyonu artırarak tümör gelişimini teşvik edebileceği düşünölmektedir. Ayrıca, *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) enfeksiyonu ve hepatit B ve C virüsleri gibi enfeksiyonların, sistemik inflamasyon ve karaciğer fonksiyonlarını etkileyerek pankreas kanseri riskini artırabileceği öne sürölmektedir. Bu risk faktörlerinin anlaşılması, erken teşhis, önleme stratejileri ve kişiselleştirilmiş tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesi açısından kritik öneme sahiptir. Pankreas kanseri genellikle ileri evrelerde teşhis edildiğinden, yüksek risk taşıyan bireylerin genetik tarama, yaşam tarzı değişiklikleri ve tıbbi takip ile belirlenmesi, erken müdahale ve genel sağkalım oranlarını iyileştirebilir (J. H. Xu et al., 2013)

#### **2.2.5. Pankreas Kanseri İlerlemesinde Görevli Moleküler Hedefler ve Sinyal Yolları**

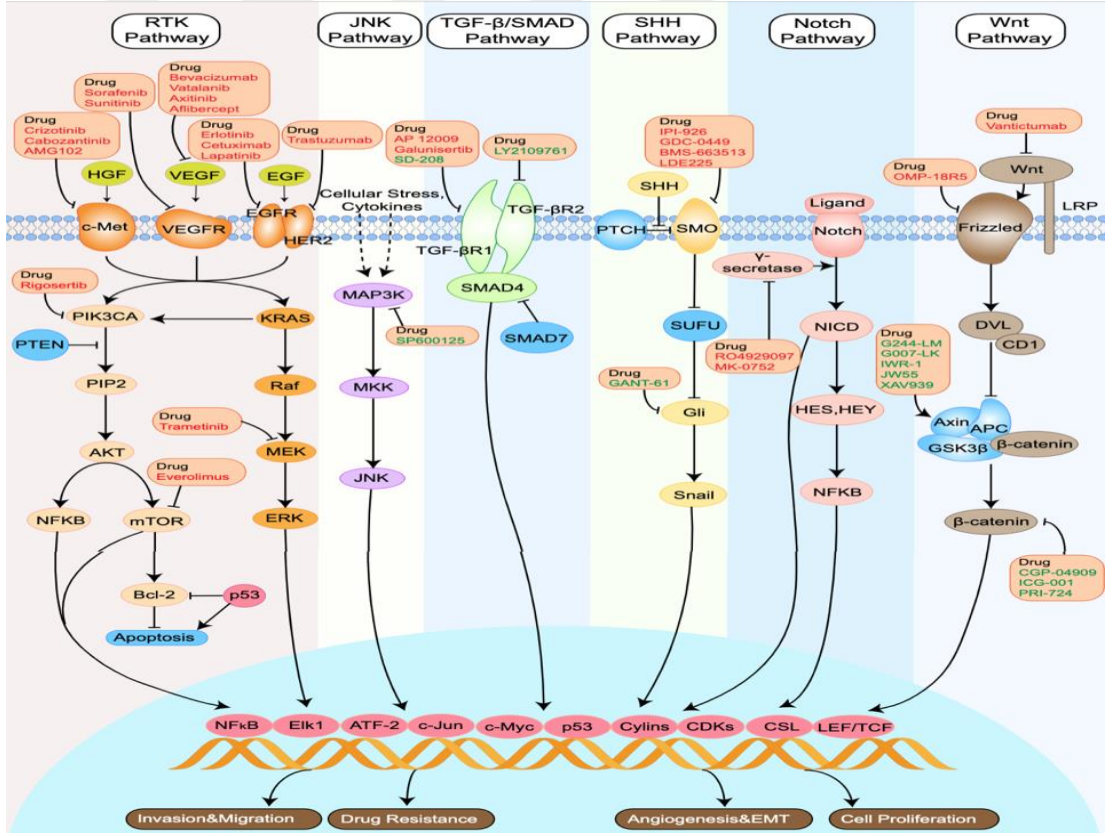
DNA mutasyonları kanser gelişimine katkıda bulunan yolak değişikliklerinin başlıca tetikleyicilerinden biridir (Basu, 2018). Pankreas kanseri hücrelerinin genomunu inceleyen araştırmacılar, her hastada ortalama 119 yapısal mutasyon tespit etmiştir. En yaygın mutasyonlar, aynı kromozomda meydana gelen delesyonlar, insersiyonlar, inversiyonlar ve yeniden düzenlemelerdir. Bu mutasyonlar, pankreas tümörlerinin %67 ile %100'ünde en az 12 temel hücrenel sinyal yolunu etkileyerek, kanserin ilerlemesinde doğrudan bir rol oynadıklarını göstermektedir. (Jones et al., 2008) Günümüzde pankreas kanserinin başlıca onkojenik yolları arasında RTK yolu, JNK sinyal yolları, TGF- $\beta$ /SMAD yolu, Wnt sinyal yolu, SHH yolu ve Notch sinyal yolu bulunmaktadır (Şekil 2. 4).

K-Ras mutasyonu, pankreas kanserinin en erken belirtilerinden biridir ve pankreas kanseri hastalarının %90'ına kadar olan bir kısmında K-Ras mutasyonları tespit edilmiştir. K-Ras, reseptör tirozin kinazları (örneğin EGFR) gibi alt sinyal yollarını indükleyen bir GTPaz'dır. K-Ras onkogen mutasyonu, hücre dışı sinyalle düzenlenen MAPK kinaz yolunun (MAPK; ERK'ler) aktivasyonunu artırır. ERK aktive olduktan sonra çekirdeğe taşınır ve hücrelerin hayatta kalması, büyüme ve çoğalma ile ilgili hedef genlerin transkripsiyonel aktivitesini teşvik eder (Drosten & Barbacid, 2020). Ras geninin hedeflerinden biri olan Fosfatidilinozitol-3-OH kinaz (PIK3CA), hücre döngüsünün G1

fazında protein sentezi için önemli bir sinyal iletim molekülüdür. PIK3CA, K-Ras ve EGFR gibi büyüme uyarıcı reseptörler tarafından aktive edildiğinde, tümör hücresi büyümesini destekler ve hücrelerin büyüme döngüsünün bir sonraki aşamasına geçmesine neden olur (S. Li & Li, 2021). Buna ek olarak, K-Ras geni c-Jun N-terminal kinaz (JNK) ve protein kinaz C (PKC)'yi de aktive ederek hücre büyümesini teşvik eder. K-Ras'ın sinyal iletim yolları serisi, pankreas kanseri hücrelerindeki sinyal ağı yapısının son derece karmaşık olduğunu göstermektedir. Kanser hücresinin büyüme uyarımıyla ilişkili hayatta kalma yolu aktive olduğunda, hücresel stres ve mikroçevredeki değişikliklerle başa çıkmak için diğer hücresel yanıtlar da başlatılır.

Pankreas kanserinde çeşitli sinyal yollarının bozulması, tümör oluşumu, ilerlemesi ve tedavi direnci açısından kritik öneme sahiptir. EGFR (Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü), pankreas dahil birçok epitel tümörde aşırı ekspresyon gösterir ve Ras, PI3K, AKT gibi yollar üzerinden hücre çoğalması ve invazyonunu teşvik eder (Sergina & Moasser, 2007; Oliveira-Cunha et al., 2011; H. H. Yang et al., 2021). JNK (c-Jun N-terminal kinaz) sinyal yolu; hücre büyümesi, apoptoz ve inflamasyonda rol oynar. c-Jun gibi transkripsiyon faktörlerini aktive ederek tümör progresyonuna katkı sağlar. JNK1'in özellikle pankreas kanserinde tümör büyümesi ve ilaç direnci ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Kalli et al., 2022; Wei et al., 2013). TGF- $\beta$  yolu, erken evrede tümör baskılayıcı işlev görürken, ileri evrelerde EMT ve anjiyogenezi teşvik ederek tümör destekleyici hale gelir. Ras-MAPK ve PI3K/Akt yollarıyla etkileşimleri, bu geçişi kolaylaştırır (Ahmed et al., 2017). Wnt sinyalleme,  $\beta$ -katenin üzerinden gen ekspresyonunu artırarak hücre proliferasyonu, invazyon ve metastazı destekler. Bu yol, özellikle pankreas kanser kök hücrelerinde aktiftir (Makena et al., 2019). SHH (Sonic Hedgehog) sinyalleme Gli1 aracılığıyla EMT, kök hücre belirteçleri ve tümör büyümesini düzenleyen genleri aktive eder. Hipoksi gibi koşullarda da aktifleşerek agresif tümör davranışlarını destekler (Dosch et al., 2010). Notch sinyal yolu, farklılaşma ve apoptoz gibi süreçleri düzenler. Aktive olduğunda hedef genlerin transkripsiyonunu başlatarak pankreas kanseri kök hücrelerinin sürdürülmesine ve metastaza katkı sağlar (Gao et al., 2017).

Pankreatik duktal adenokarsinom (PDAC), hastalığın ilerlemesiyle ilişkili dört ana mutasyonla karakterizedir: KRAS (%50), TP53(%60-70), CDKN2A (>%50), ve SMAD4 (Luo, 2021). *KRAS* mutasyonları, K-Ras proteininin sürekli aktif kalarak hücre proliferasyonunu kontrolsüz hale getirmesine neden olur ve bu durum kötü prognozla ilişkilidir (Addissie et al., 2015; Castagnola & Giaretti, 2005). *TP53* mutasyonları, DNA onarımı ve apoptoz gibi tümör baskılayıcı işlevleri bozar; PDAC vakalarının yaklaşık %70'inde görülür (Raphael et al., 2017; Amelio & Melino, 2020). *CDKN2A* geni, hücre döngüsünü düzenleyen p16 ve p14 proteinlerini kodlar; bu genin kaybı hem sporadik hem de kalıtsal PDAC gelişiminde önemli rol oynar (Lim et al., 2014; Kimura et al., 2021). *SMAD4* ise TGF- $\beta$  yolunda görev alır; kaybı vakaların %55'inde gözlemlenir ve kötü prognozla ilişkilidir (Singh et al., 2011).



Şekil 2. 4 Pankreas kanserinde yer alan hüresel sinyal yolları ve hedef tedavi ajanları: Turuncu kutular tüm ajanları, yeşil renk ise klinik uygulamada olanları vurgulamaktadır (Biolabs, 2025)

## 2.2.6. Pankreas Kanseri Teşhis ve Tedavisi

Pankreas kanserinin teşhis ve evreleme süreci; MRI, BT, PET taramaları ve ultrason (EUS ve ERCP gibi endoskopik yöntemler dahil) gibi ileri görüntüleme tekniklerini, CA 19-9

gibi tümör belirteçleri için kan testlerini, biyopsileri ve laparoskopiyi içerir. Bu adımlar, kanserin evresinin belirlenmesi ve tedavi kararlarının yönlendirilmesi açısından hayati önem taşır (Duncan et al., 2023). Pankreas kanserinin erken teşhisi, hastalığın başlangıç evrelerinde asemptomatik doğası, pankreasın retroperitoneal konumu ve güvenilir, spesifik biyobelirteçlerin eksikliği nedeniyle önemli bir klinik zorluk olmaya devam etmektedir. Görüntüleme teknikleri genellikle küçük, cerrahi olarak çıkarılabilir tümörleri tespit etmekte başarısız olur ve yüksek maliyetlerle ilişkilendirilir, bu da onları popülasyon çapında tarama için pratik olmaktan çıkarır. Bir çalışma, erken tespitin kademeli bir tarama yaklaşımıyla iyileştirilebileceğini öne sürmüştür (Koltai, 2023) Bu, başlangıçta tanımlanmış kriterlere göre yüksek riskli kişileri belirlemeyi, bu grubu daraltmak için düşük maliyetli tarama yöntemlerini uygulamayı ve son olarak seçilmiş yüksek riskli kişilerde MRI ve endoskopik ultrason (EUS) gibi gelişmiş görüntüleme tekniklerini kullanmayı içerir. Bu strateji, "ultra erken" tespiti mümkün kılmayı ve böylece pankreas kanseri hastalarında klinik sonuçları ve sağkalım oranlarını iyileştirmeyi amaçlamaktadır (Koltai, 2023). Pankreas kanserinin kötü seyretmesinin başlıca nedenlerinden biri genellikle geç teşhis edilmesidir. Kanser çoğu zaman oldukça ileri bir evrede olur. Pankreas kanserinin tedavi şansı en yüksek yöntemi olan cerrahi uygulanabilen hasta sayısı, her 100 kişiden yalnızca yaklaşık 10'dur (Q. Li et al., 2022).

Pankreas kanseri, özellikle pankreatik duktal adenokarsinom (PDAC), tedavi açısından son derece zorlu bir kanser türüdür ve klasik kemoterapi ajanları halen tedavi protokollerinin temelini oluşturmaktadır. (Oberstein & Olive, 2013)En yaygın kullanılan ajanlardan biri olan gemcitabin, bir nükleozid analogu olarak DNA sentezini inhibe eder ve hücre proliferasyonunu engelleyerek kanser hücrelerinin çoğalmasını yavaşlatır (Heinemann, 2001). Tek başına veya diğer ilaçlarla kombinasyon halinde kullanıldığında, gemcitabin hastaların yaşam süresini belirgin şekilde uzatmakla birlikte, etkinliği sınırlı olup hastaların büyük bir kısmında tedaviye direnç gelişmektedir. Bu nedenle, daha agresif ve çoklu ajanlı tedavi protokolleri geliştirilmiştir. FOLFIRINOX rejimi, 5-fluorourasil (5-FU), irinotekan, oksaliptatin ve leucovorin kombinasyonunu içerir ve özellikle iyi performans durumu olan hastalarda tercih edilmekte, tedavi etkinliğini ve sağkalımı artırmaktadır. Ancak bu kombinasyonun yan etkileri daha belirgindir ve tolerans açısından sınırlayıcı olabilir (Lee et al., 2014). Diğer yandan, nab-paklitaksel

(albumine bağılı paklitaksel) ile gemcitabinin kombinasyonu, tümör mikroçevresindeki yoğun stromal bariyeri aşarak kemoterapi ajanlarının tümör hücrelerine daha iyi ulaşmasını sağlar ve böylece tedavi etkinliğini artırır. Buna karşın, pankreas kanserinin karakteristik özelliği olan yoğun desmoplastik reaksiyon ve mikroçevresel heterojenite, kemoterapiye direnç gelişiminde önemli rol oynar (Alzhrani et al., 2021). Ayrıca, klasik kemoterapiler genellikle yan etkilerle ilişkilendirildiğinden, hastaların genel durumu tedavi seçiminde kritik bir faktördür. Günümüzde pankreas kanseri tedavisinde klasik kemoterapiler, cerrahi rezeksiyon ve radyoterapi ile multidisipliner yaklaşımlar içinde kullanılmakta; aynı zamanda moleküler hedeflere yönelik yeni ilaç geliştirme ve immünoterapi stratejileri üzerine yoğun araştırmalar sürmektedir. Bu yeni tedavi yaklaşımlarının, pankreas kanserinin yüksek mortalitesini azaltmada ve hastaların yaşam kalitesini artırmada önemli katkılar sağlaması umut edilmektedir (Ullman et al., 2022).

### **2.3. Tümör Mikroçevresi (TMÇ)**

Kanserler, tümör hücreleri ve değiştirilmiş bir ekstraselüler matris içinde gömülü birçok kanser dışı hücreden oluşan karmaşık ekosistemlerdir (Şekil 2. 6). Tümörler yalnızca kanser hücrelerinden değil, aynı zamanda birçok başka dönüşmemiş hücreden ve salgılanan hücre dışı bileşenlerden de oluşur. Kanser ve kanser olmayan hücreler arasındaki etkileşim, TMÇ'deki sinyal ortamını oluşturarak kanser patogenezinde ve tümör progresyonunda kritik rol oynar (Whiteside, 2008). TMÇ'deki dönüşmemiş hücreler arasında bağışıklıkla ilişkili hücreler, fibroblastlar, nöronal hücreler, endotelial hücreler ve stromal hücre yer alır. TMÇ'nin hem bileşimi hem de işlevleri, farklı kanser türleri ve hastalık evreleri arasında oldukça dinamik ve çeşitlidir. (Shen & Kang, 2018). Bu çeşitlilik, tümörün oluştuğu organ, kanser hücrelerinin içsel özellikleri, tümör evresi ve hasta özelliklerine bağlı olarak geniş ölçüde değişkenlik gösterir (de Visser & Joyce, 2023).

Yirminci yüzyılın ikinci yarısına kadar kanser tedavisinde tümör hücresine odaklanan bir yaklaşım benimsenirken, 2000'li yıllardan itibaren TMÇ'nin tümör ilerlemesi, hasta prognozu ve tedavi yanıtı üzerindeki önemini ortaya çıkaran çalışmalar öne çıkmıştır (M. Z. Jin & Jin, 2020). Kanserinin yalnızca genetik bir hastalık olmadığı, aksine TMÇ

içerisinde yer alan hücre gruplarının etkileşimleriyle şekillenen heterojen bir hastalık olduğu belirlenmiştir (de Visser & Joyce, 2023b).

### **2.3.1. TMC'nin Hücresel Bileşenleri**

TMC, yalnızca kanser hücrelerinden ibaret olmayıp; fibroblastlar, bağışıklık hücreleri, endotelial hücreler ve adipositler gibi birçok farklı hücre tipini barındıran karmaşık ve dinamik bir yapıdır. Bu hücreler, tümör progresyonunu destekleyen çeşitli sinyaller, büyüme faktörleri ve metabolitler aracılığıyla tümör hücreleriyle etkileşime girerek, tümörün büyümesi, invazyonu ve tedaviye karşı direnci üzerinde önemli rol oynamaktadır.

#### **2.3.1.1. Kanserle İlişkili Fibroblastlar (CAF'lar)**

TMC'nin en önemli üyelerden biri olan kanserle ilişkili fibroblastlar (CAF'lar), hücre dışı matris bileşenlerini salgılayarak stromal hücrelerin en büyük kısmını oluştururlar. CAF'ların kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinden, yerleşik fibroblastlardan, kanser hücrelerinden veya endotelial hücrelerden köken aldığı bilinmektedir (Pradip et al., 2021). CAF'lar reaktif oksijen türleri (ROS) ve TGF- $\beta$ 1'e bağımlı ya da bağımsız mekanizmalarla uyarıldığında farklılaşabilirler (Tommelein et al., 2015). CAF'ların, vasküler endotelial büyüme faktörü A (VEGFA), CXCL12, interlökin 6 (IL-6) gibi çeşitli sitokinleri salgılamaları ve ECM'nin fiziksel yeniden şekillendirilmesi yoluyla tümör büyümesini ve progresyonunu, invazyonu ve metastazı etkilediği bildirilmiştir (Orimo & Weinberg, 2006). Normal fibroblastlarla karşılaştırıldığında, CAF'lar oldukça heterojendir ve malign özelliklerle ilişkili olan trombosit kaynaklı büyüme faktörü reseptörleri (PDGFR'ler) ve membrana bağlı jelatinaz olan fibroblast aktivasyon proteini (FAP) gibi belirteçleri aşırı ifade ederler (Erez et al., 2010). Aşırı aktive olmuş fibroblastların hücresel göçü artırdığı (Tommelein et al., 2015), pro-anjiyojenik sitokin sinyallemesini yükselttiği (Orimo et al., 2005), ayrıca kanser kök hücrelerinin plastisitesini düzenlediği (Erez et al., 2010), inflamasyonu kolaylaştırdığı ve epitel tümör hücrelerinin metabolizmasında görev aldığı gösterilmiştir (Lau et al., 2016; Su et al., 2018).

### 2.3.1.2. İmmün hücreleri

TMÇ, tümör hücrelerinin hızla genetik mutasyonlar biriktirdiği ve immün kaçış geliştirdiği potansiyel bir ortam oluşturur. Kanserin erken evrelerinde, TMÇ'deki bağışıklık hücrelerinin ürettiği bağışıklık yanıtı, tümör karşıtı özellikler gösterir (Helfen et al., 2018). NK hücreleri, CD8+ sitotoksik T hücreleri, M1 makrofajları, T yardımcı-1 hücreleri ve antijen sunan hücreler (APC'ler) tümöre karşı savaşan ve tümör büyümesini baskılayan hücrelerdir. Yapılan çalışmalar, TMÇ'nin nötrofiller, tümörle ilişkili makrofajlar (TAM'lar), CD4+ T yardımcı-2 hücreleri ve düzenleyici T hücreleri (Treg'ler) gibi çok sayıda tümör destekleyici bağışıklık hücresinden oluştuğunu ve bu hücrelerin bağışıklık baskılayıcı ortamı şekillendiren, tümör hücrelerinin hayatta kalmasını ve metastazını mümkün kılan, ayrıca bağışıklık sisteminin yok etmesinden kaçışını teşvik eden temel unsurlar olduğunu göstermektedir (Gao et al., 2017). CD8+ sitotoksik T hücreleri, INF- $\gamma$  salarak apoptoz, nekroz ve büyümenin durmasını indükler; ardından APC'ler, apoptoza uğrayan hücrelerin artık proteinlerini fagosite eder ve bu proteinler lenfoid organlarda olgunlaşmakta olan lenfositlere sunulur (Matsushita et al., 2015). Buna karşılık, Treg'ler CD8+ hücrelerin proliferasyonunu azaltır, APC'leri ve makrofajları inhibe eder ve NK hücrelerinin yıkıcı aktivitesini düşürür (Matsushita et al., 2015). Son zamanlarda, anti-CD25 monoklonal antikor olan daklizumab, Treg'leri baskılayarak tümör karşıtı yanıtı artırmak için potansiyel bir ajan olarak değerlendirilmiştir (Clarke et al., 2006). Kanseri gelişimi süresince, makrofajlar, dendritik hücreler (DC'ler) ve myeloid öncülleri içeren myeloid kökenli baskılayıcı hücreler (MDSC'ler), IL-6, IL-10 ve TGF- $\beta$  gibi sitokinler üreterek T hücrelerini ve NK hücrelerini baskılamak ve hipoksik koşullarda TAM'lara dönüşmek yoluyla tümör progresyonunu ve anjiyogenezi desteklemede rol oynarlar. Makrofajlar, M1 (proinflamatuvar) ve M2 (antiinflamatuvar) olmak üzere iki alt tipe ayrılır. M1 makrofajları karakteristik olarak IL-1 ve TNF- $\alpha$  dahil olmak üzere proinflamatuvar sitokinler salgılar ve bu sayede tümör karşıtı yanıtı teşvik ederler. Buna karşılık, M2 makrofajları, yani tümörle ilişkili makrofajlar (TAM'lar), IL-10 gibi immünsüpresif sitokinler salgılayarak tümör oluşumunu kolaylaştırır. Ayrıca, TAM'lar hücre dışı veziküller (EV'ler) içinde onkojenik miR-233'ü taşıyarak tümörün invazivliğini düzenlemede rol oynar. Son zamanlarda, TAM'ların EV yoluyla HIF-1- $\alpha$ 'yı stabilize eden

uzun kodlamayan RNA (HISLA) aktarımıyla malign tümörün aerobik glikolizini ve apoptoz direncini düzenlediği ortaya konmuştur (Chen et al., 2019).

### **2.3.1.3. Endotelyal Hücreler**

TMÇ'deki endotelyal hücrelerin de kanser hücrele(Choi & Moon, 2018)nde olduğu düşünülmektedir (Choi & Moon, 2018). Son zamanlarda, tümör endotelyal hücrelerinden salınan adezyon molekülleri ve kemokinler gibi maddeleri tanımlayan “anjyokrin faktörler” kavramı ortaya çıkmıştır ve bu faktörlerin tümör progresyonu ve metastazı için hayati olduğu kabul edilmektedir (Maishi & Hida, 2017). Endotelyal hücrelerden salgılanan hücre dışı veziküller (EV'ler), CD106 ve CD49a gibi anjiyojenik yükleri taşıyabilir ve bu sayede anjiyogenez kapasitesini artırabilir (Nazarenko et al., 2010). İlginç bir şekilde, tümör hücreleri bazik fibroblast büyüme faktörü (bFGF) ve vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) gibi birçok faktör salgılayarak endotelyal hücreleri tüp oluşumu ve damar gelişimini desteklemeleri için uyarabilir; bu süreç genellikle Akt ve NF- $\kappa$ B yollarının aktivasyonu aracılığıyla gerçekleşir (Ferrara, 2002). Glioma karsinomunda, kanser hücrelerinden salgılanan EV'ler, EGFRvIII ve TF/VIIa gibi RNA ve proteinleri doğrudan endotelyal hücrelere aktararak anjiyogenez ve metastazı teşvik eder. Yapılan çalışmalar, endotelyal hücrelerin sitokin salınımını hedefleyen antikanser tedavilerin kemoterapötik ajanlar açısından yeni bir atılım olabileceğini araştırmaktadır (Choi & Moon, 2018).

### **2.3.1.4. Mezenkimal Kök Hücreler**

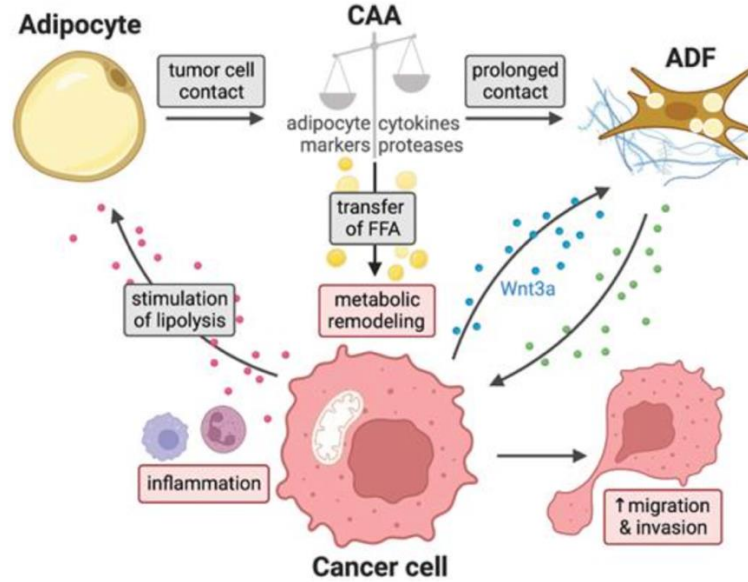
Mezenkimal kök hücreler (MSC'ler), esas olarak kemik iliği, kıkırdak ve yağ dokuları gibi mezenkimal dokularda bulunan stromal hücrelerden oluşur (Ridge et al., 2017) . MSC'ler, osteositler, kondrositler ve adipositler dahil olmak üzere birçok hücre tipine farklılaşabilir. Ayrıca MSC'ler, tümör hücreleri için premetastatik niş oluşturarak kanser hücrelerinin durgun kalmasını ve ilaç direncini destekleyebilir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, MSC'lerin inflamasyon bölgelerine doğru göç ettiği ve tümör dokusuna entegre olduğu gösterilmiştir. MSC'ler ile kanser hücreleri arasındaki etkileşimin, kanser ilerleyişinin birçok aşamasında metastazın gerçekleşmesi ve epitelden mezenkimal geçişin (EMT) desteklenmesi açısından kritik olduğu bildirilmektedir. Ayrıca, kanser hücrelerinden türetilen ekzomların, SMAD sinyal yolunu aktive ederek MSC'lerin miyofibroblastlara

farklılaşmasını indüklediği ve böylece tümör büyümesini tetiklediği rapor edilmiştir(Usuki et al., 2012).

### **2.3.1.5. Kanserle İlişkili Adipositler**

Adipositler, çeşitli dokularda bulunan stromal hücre türleridir ve TMÇ'de aktif bir rol oynarlar. 1994 yılında leptinin keşfiyle birlikte, adipoz doku yalnızca enerji depolayan pasif bir yapı olmaktan çıkmış; aynı zamanda endokrin işlevlere sahip, salgı yapan fonksiyonel bir organ olarak tanımlanmaya başlanmıştır (Feijóo-Bandín et al., 2015). Bu bağlamda, kanserle ilişkili adipositler (CAAs), invaziv tümör sınırında konumlanan ve kötü huylu bir fenotip sergileyen hücreler olarak tanımlanmıştır. Bu hücreler, adiposit kökenli öncül hücrelerin, kanser hücreleriyle olan çift yönlü iletişimi aracılığıyla dönüşüme uğramasıyla oluşur (Yao & He, 2021a). Adipoz dokunun, 50'den fazla sitokin, kemokin ve hormon benzeri faktör salgılayarak proinflamatuvar mikroçevreyi yeniden programladığı ve böylece tümörün büyümesi ve ilerlemesine katkı sağladığı gösterilmiştir (Helfen et al., 2018). Yapılan çalışmalar, kanser hücreleriyle birlikte kültüre edilen adipositlerin, lipit içeriğinde azalma ve adiponektin, leptin, FABP2 gibi adiposit belirteçlerinde düşüş gibi morfolojik ve fonksiyonel değişiklikler geçirdiğini göstermiştir (Dirat et al., 2011). Meme kanseri hücreleriyle kokültüre edilen adipositlerin daha agresif bir tümör fenotipi oluşturduğu ve bunun ekzosomal miR-15 aracılığıyla gerçekleştiği belirlenmiştir. Bu mikroRNA, hücre metabolizmasını yeniden programlayan onkogenik bir sinyal olarak da görev yapar (Muller, 2013). Aktive olmuş adipositlerde, yani CAAs olarak adlandırılan hücrelerde, IL-6, IL-1 ve MMP-11'in aşırı ifadesi gözlemlenmiştir. Olgun adipositler, az sayıda mitokondri içeren, büyü(Fujisaki et al., 2015; Scheja & Heeren, 2019)(Fujisaki et al., 2015; Scheja & Heeren, 2019). Ancak CAAs, bu yapısal bütünlüğünü kaybederek düzensiz morfoloji, küçük lipit damlacıkları ve azalmış hacim gibi özellikler sergiler. Lipoliz sürecinden sonra, FABP4 ve adiposit p2 gibi farklılaşma belirteçlerinin ifadesi de azalır (Zhao et al., 2020). Kanser hücrelerinin varlığı altında, özellikle invaziv sınırdaki adipositler lipitlerini gliserol ve serbest yağ asitlerine ayırarak fenotipik bir dönüşüm geçirir ve adiposit kökenli fibroblastlara (adipocyte-derived fibroblasts) dönüşürler. Bu hücreler, kanserle ilişkili fibroblastlar (CAFs) ailesinin bir parçası olarak tümörün malign progresyonuna katkıda bulunur. Özellikle meme, mide, kolon ve over kanserlerinde tümör büyümesi ve metastaz, çoğunlukla adipositlere komşu

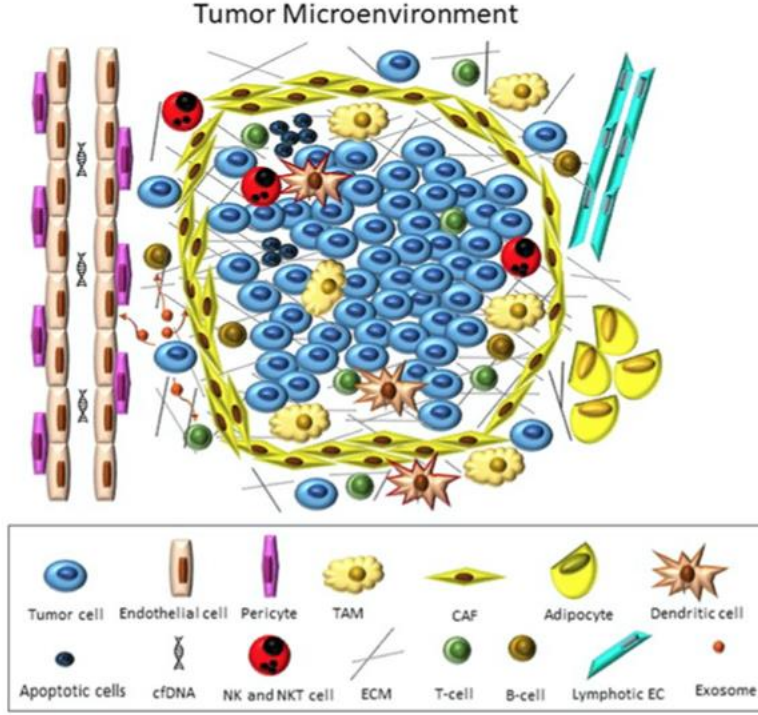
bölgelerde görülür (Nieman et al., 2013). CAA'lar, parakrin ve endokrin yolla CCL2, CCL5, IL-6, TNF $\alpha$ , VEGF ve leptin gibi birçok adiposit kaynaklı faktör salgılamakta, adiponektin düzeyleri belirgin şekilde azalır. Bu salgılar, inflamasyonu artırarak tümörün ilerlemesini kolaylaştırabilir (Wu et al., 2019). Son dönem bulgular, adipositlerin sadece enerji deposu değil, aynı zamanda meme kanseri gibi çeşitli kanserlerin ilerlemesinde kilit bir mikroçevresel aktör olduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca, CAA'lar tarafından yürütülen malign fonksiyonlar bu döngüyü daha da kuvvetlendirerek tedaviye yanıtı azaltabilir (Yao & He, 2021b). Metabolik düzeyde bakıldığında, CAA'lar yüksek enerjili metabolitler (laktik asit, pirüvik asit, serbest yağ asitleri ve keton cisimcikleri) salgılayarak katabolik süreçleri artırır (Wu et al., 2019). Bu hücreler, dışsal yağ asitleri salgılayarak tümör hücrelerinin metabolik yeniden programlanmasını tetikler ve böylece yeterli enerji sağlarlar (Pérez-Escuredo et al., 2016). Kanser hücrelerinden gelen sinyaller, adipositlerde lipolizi uyarır ve CAA oluşumunu teşvik eder (Şekil 2. 5) (Yang et al., 2020). Sonuç olarak, CAA'lar yalnızca pasif yağ hücreleri değil, tümör ilerlemesini, metastazı ve tedaviye direnç mekanizmalarını kolaylaştıran aktif bir mikroçevre bileşeni olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu nedenle, CAA'ların oluşumunun ve işlevlerinin detaylı olarak anlaşılması, yeni nesil anti-kanser tedavi stratejileri açısından kritik öneme sahiptir.



Şekil 2. 5 Adipositlerin tümör hücreleriyle olan etkileşimi, onların fenotiplerini değiştirerek CAA formuna dönüşmelerine neden olur; bu çift yönlü iletişim, tümör progresyonunu etkiler (Bouche & Quail, 2023).

### 2.3.2. TMÇ'nin Hücre Dışı Bileşenleri

TMÇ'de tümör ilerlemesinde aktif rol oynayan çeşitli hücre tiplerine ek olarak, yapısal destek sağlayan ve hücre davranışını düzenleyen hücresel olmayan birçok unsur da yer almaktadır. Bu hücresel olmayan bileşenler arasında ekstraselüler matriks (ECM), sitokinler, kemokinler ve büyüme faktörleri gibi çözünür sinyal molekülleri bulunur. Ayrıca, pH, oksijen düzeyleri ve mekanik stres gibi fiziksel faktörler de TMÇ'nin şekillenmesinde önemli rol oynar. Hücre dışı bileşenler TMÇ'nin yapısal bütünlüğünü korumakla kalmaz, aynı zamanda kanser gelişimi, invazyonu ve tedaviye yanıt süreçlerini de aktif olarak etkiler (Sejda et al., 2020). ECM, TMÇ'nin önemli bir yapısal bileşenidir ve kolajenler, lamininler, elastin ve elastik lifler, glikoproteinler ve proteoglikanlardan oluşan üç boyutlu bir ağdan meydana gelir. Normal dokularda ECM, hücrelere yapısal destek sağlar ve aynı zamanda büyüme, göç, farklılaşma, hayatta kalma, homeostaz ve morfogenez gibi birçok hücresel süreci düzenleyici bir rol oynar. Her doku (örneğin bağ dokusu, kıkırdak veya kemik) kendine özgü bir ECM bileşimine sahiptir ve ECM'nin bileşenleri, dokunun ihtiyaçlarına uygun olarak o dokuda bulunan hücreler tarafından üretilir ve düzenlenir (Piperigkou et al., 2021). Kanserin ilerlemesi sırasında, karsinom hücreleri konak stromal hücreleri kendilerine çeker. Bu stromal hücreler özelliklerini ve metabolizmalarını değiştirir ve birlikte çevresel matrisi yeniden şekillendirmek ve tümör istilasını desteklemek için benzersiz bir mikroçevre oluştururlar (Ye et al., 2020). Matriks metalloproteinazlar (MMP'ler) gibi proteolitik enzimler tarafından yönlendirilen ECM'nin yeniden şekillendirilmesi (Piperigkou et al., 2021), ECM proteinlerinin modifikasyonu ve çapraz bağlanmasını kontrol eden enzimler (örneğin lizosil oksidazlar (LOX)) tarafından (Popova & Jücker, 2022) ECM sertliği artar ve bileşimi değişir. Tümör hücreleri ayrıca nükleik asitler, lipitler ve proteinler içeren ekstraselüler veziküller salgılar; bu veziküller tümör ilerlemesi ve davranışında, tümör ortamının yeniden şekillendirilmesi, fibroblast aktivasyonu, anjiyogenez, immünmodülasyon veya pre-metastatik nişlerin oluşumu gibi süreçlerde rol oynayabilir (Piperigkou et al., 2018).



Şekil 2. 6 : Tümör mikroçevresine genel bir bakış: Tümör hücreleri, zorlu koşullar altında hayatta kalmak ve büyümeyi sürdürmek amacıyla, TME'nin hücrel ve hücrel olmayan kötü huylu olmayan bileşenlerini kendi lehlerine dönüştürür (Baghban et al., 2020)

#### 2.4. TMC ve Kanser İlişkisi

Tümörler gelişimleri süresince enerji üretiminde değişikliklere yol açan metabolik zorluklarla karşılaşır; bu durum genellikle Warburg etkisi olarak gözlemlenir. Warburg etkisi için en güçlü açıklamalardan biri, değişmiş metabolizmanın kanser hücrelerine özgün tümör mikroçevresinde hayatta kalma ve çoğalma konusunda seçici bir avantaj sağlamasıdır. Tümörler büyüdükçe, yerel kan damarlarının sağladığı oksijeni karşılayamaz hale gelir ve bu da hipoksi (düşük oksijen) ortamı oluşturur. Bu düşük oksijen koşulları, hücrelerin hipoksik strese uyum sağlamasına yardımcı olan genleri aktive eden bir transkripsiyon faktörü olan hipoksi-indüklenebilir faktörün (HIF) stabilizasyonuna neden olur. HIF, glikolitik enzimlerin, glikoz taşıyıcılarının ve mitokondriyal metabolizmanın inhibitörlerinin ifadesini artırarak hücrel enerji üretimini oksidatif fosforilasyondan glikolize kaydırır. Bu metabolik yeniden programlama, düşük oksijen koşullarında bile enerji üretimi ve hücre yapımı için gerekli bileşenlerin devamını sağlar. İlginçtir ki, Warburg etkisi, tümör büyümesini destekleyen lipit metabolizması gibi

kanser hücrelerinde değişmiş diğer metabolik yollara da bağlanmaktadır (Hsu & Sabatini, 2008).

Kanserle ilişkili ölümlerin başlıca nedeni olan metastaz, lokal invazyon, dolaşıma giriş (intravasasyon), dolaşımda hayatta kalma, uzak dokulara geçiş (ekstravasasyon) ve ikincil tümörlerin oluşumu gibi birbirini izleyen karmaşık ve dinamik aşamaları içeren bir süreçtir. Metastazın erken evrelerinde önemli bir olay olan epitel-mezenkimal geçiş (EMT), epitel hücrelerin polarizasyonunu ve hücre-hücre bağlantılarını kaybederek mezenkimal özellikler kazanmasıyla birlikte artan hücre hareketliliği ve invazyon yeteneğini ifade eder. EMT yalnızca tümör hücrelerine ait genetik değişikliklerle değil, aynı zamanda TMC bileşenleri tarafından da güçlü şekilde yönlendirilir. TMC’de görev alan inflamatuvar sinyalleşme, EMT’nin indüklenmesinde ve sürdürülmesinde merkezi bir rol oynar. TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 ve TGF- $\beta$  gibi sitokinler; NF- $\kappa$ B, JAK/STAT3 ve PI3K/Akt gibi yolları aktive ederek Snail, Slug, Twist ve ZEB1 gibi EMT transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonunu artırır. IL-6’nın, STAT3 yolunu aktive ederek epitel belirteç olan E-kaderin’in baskılanmasına ve mezenkimal belirteç olan vimentin ekspresyonunun artmasına yol açarak hücrelerin plastisitesini ve göç kabiliyetini arttırdığı belirlenmiştir (Yadav et al., 2011). TGF- $\beta$ ’nın ise başlangıçta tümör baskılayıcı özellik gösterse de ilerleyen evrelerde EMT’yi desteklediği ve bağışıklık sisteminden kaçış, hücre göçü ve kanser kök hücre özelliklerinin kazanımını teşvik ettiği belirlenmiştir (J. Xu et al., 2009). M2 fenotipine yönelmiş tümörle ilişkili makrofajlar (TAM’lar), CCL18, IL-6 ve TNF- $\alpha$  gibi moleküller salgılayarak EMT’yi uyarır ve tümör hücreleriyle pozitif geri besleme döngüleri oluşturarak mezenkimal durumun korunmasına katkı sağlar (Basak et al., 2023).

ECM, yapısal bir iskelet olmanın yanında, mekanik sinyaller ve integrinler aracılığıyla EMT üzerinde etkili bir düzenleyici olarak işlev görür. ECM moleküllerinden kolajen I; Rac1 ve JNK yolakları aracılığıyla EMT’yi teşvik ederken, laminin-111  $\alpha$ 6-integrin etkileşimi yoluyla EMT’yi baskılayabilir (Shintani et al., 2008) Ek olarak, TMC içindeki hipoksi durumu da HIF-1 $\alpha$  stabilizasyonu aracılığıyla EMT’yi destekler, metabolizmayı değiştirir ve EMT transkripsiyon faktörleriyle birlikte çalışarak tümör hücrelerinin invazivliğini artırır (Tam et al., 2020). Tüm bu faktörler, EMT’yi hem başlatan hem de sürdüren karmaşık ve karşılıklı etkileşimlere sahip bir aę oluşturarak, metastatik yayılım

ve koloni oluşumu için tümör hücrelerine elverişli bir mikroçevre sunar. Bu etkileşimlerin anlaşılması, EMT'nin hedeflenmesine yönelik tedavi stratejilerinin geliştirilmesi ve metastazın engellenmesi açısından büyük önem taşımaktadır.

## **2.5. Lipit Metabolizması ve Kanser**

Lipit metabolizması, hücrelerin enerji üretimi, zar sentezi ve sinyal iletimi gibi temel biyolojik süreçlerde kritik rol oynar. Son yıllarda yapılan araştırmalar, özellikle hızlı çoğalan kanser hücrelerinin lipit metabolik yolu yeniden programladığını ve artan lipit ihtiyacını karşılamak için lipogenezde belirgin bir artış gösterdiğini ortaya koymuştur. Bu artış, tümör hücrelerinin büyümesini, hayatta kalmasını ve metastaz potansiyelini destekler. Bu nedenle lipit metabolizması, kanser tedavisinde hedeflenebilecek önemli bir zayıf nokta olarak değerlendirilmektedir (Beloribi-Djefafia et al., 2016).

Kanserleşme sürecinde, tümör hücreleri kontrol kaybıyla sonsuz çoğalma, invazyon ve metastaz gibi malign özellikler kazanır (C. Cheng et al., 2018). Ayrıca, tümör hücreleri anormal derecede aktif glikoliz yolu, aktif glutamin metabolizması ve anormal lipid metabolizması ile de karakterizedir. Kanserde lipid metabolizması büyük ölçüde yeniden programlanmıştır. İnsan kanserlerinde, zar biyosentezi için artan talebi karşılamak amacıyla yağ sentezi belirgin şekilde yukarı regüle edilir. Kanserle ilişkili lipid metabolizmasındaki değişiklikler; artan lipogenez, ekstraselüler mikroçevreden lipid alımı ve hücre içi lipid damlacıklarından (LD) lipid depolanması ile mobilizasyonun artmasıdır. Kanser agresifliğinin bir belirteci olarak lipid bileşimi ve bolluğundaki değişiklikler, hücre zarlarının lipid paketlenme yoğunluğu, zar akışkanlığı veya yüzey yükü gibi fiziksel özellikleri üzerinde güçlü bir etkiye sahip olabilir ve sinyal iletimi sırasında biyoaktif lipid araçlara dönüşebilir.

### **2.5.3. Tümör Mikroçevresinde Lipit Metabolizmasının Rolü**

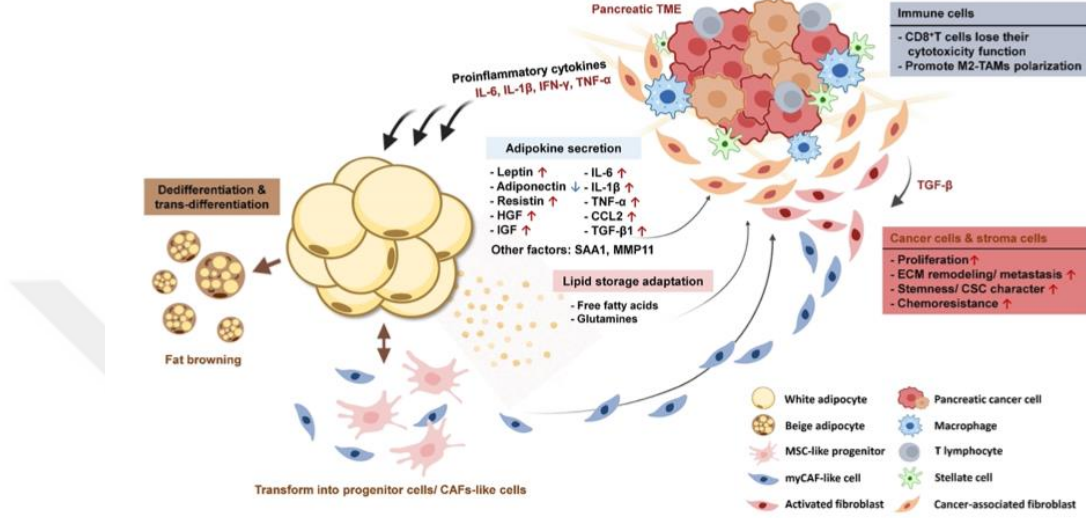
Metabolik yeniden programlama, kanser hücrelerinde çok faktörlü süreçlerin sonucu olarak ortaya çıkar ve tümör mikroçevresi (TMC) bu süreçte kritik bir rol oynar. TMC'de görülen hipoksi, asidoz ve besin eksiklikleri, tümör hücrelerinde lipid metabolizmasını değiştirerek tümör oluşumunu ve ilerlemesini destekler. Hipoksi, kanser hücrelerinde glikozun pirüvat yolunu engeller, asetil-CoA üretimi için alternatif karbon kaynakları olan

glutamin ve asetat kullanımını artırır; ayrıca HIF-1 $\alpha$  ve HIF-2 $\alpha$  faktörleri aracılığıyla yağ asidi katabolizmasını (FAO) baskılayarak lipid damlacıklarında yağ birikimini teşvik eder (Hinshaw & Shevde, 2019). Benzer şekilde, asidik mikroçevre laktat birikimiyle birlikte FAO'yu enerji üretimi için artırırken(Kondo et al., 2017), CD36 ve DGAT gibi proteinlerin ekspresyonunu yükselterek dış kaynaklı lipid alımını ve lipid damlacığı oluşumunu destekler, böylece tümörün metastatik potansiyelini artırır(Hinshaw & Shevde, 2019). Besin yetersizliği durumunda ise, özellikle obezite varlığında, TMC'de adipositlerde lipid birikimi artar ve kanser hücreleri, çevredeki adipositlerden serbest yağ asitlerini CD36 ve FABP3/4 aracılığıyla alarak enerji kaynağı olarak kullanır; bu süreç, adipositlerin lipoliz yoluyla serbest yağ asitlerini salmasını teşvik eden tümör kaynaklı sitokinler sayesinde hızlanır (H. R. Jin et al., 2023a). Ayrıca, ekstraselüler veziküller yoluyla lipid transferi de tümör hücrelerinin enerji ihtiyacını karşılamasında önemli bir mekanizmadır. Tüm bu mekanizmalar, TMC'nin lipid metabolizmasını yeniden şekillendirerek kanser hücrelerinin hayatta kalmasını, büyümesini ve agresif davranışlar sergilemesini sağlar (H. Cheng et al., 2022).

#### **2.5.4. Pankreas Tümörü Mikroçevresinde Adiposit Dediferansiyasyonu ve Fibrotik Yeniden Şekillenme**

Pankreas kanseri (PC) ilerledikçe, adipositler belirgin morfolojik ve işlevsel değişiklikler geçirerek fibrotik ve tümör destekleyici bir mikroçevrenin oluşmasına katkıda bulunur. PC hücreleriyle yakın etkileşim içinde olan adipositler, lipid içeriklerini kaybeder ve fibroblast benzeri bir fenotipe dönüşür; adiponektin, leptin, resistin ve FABP4 gibi adipogenez belirteçlerinin ifadesi azalırken,  $\alpha$ -SMA, S100A4, FSP-1 ve çeşitli MMP'ler gibi fibroblastla ilişkili proteinlerin ifadesi artar. Bu dediferansiyasyon süreci, genellikle PPAR- $\gamma$  gibi adipogenez düzenleyicilerinin eksikliği ve tümör kaynaklı IL-6 ile TGF- $\beta$ 'nin uyardığı Wnt5a-c-Jun/AP-1 gibi yolların aktive olmasıyla gerçekleşir (Şekil 2. 7). Ayrıca, adipositler pluripotent kök hücrelere özgü Oct3/4 ve Sox2 gibi genleri ifade ederek kök hücre benzeri özellikler kazanabilir ve mezenkimal hücre soylarına farklılaşma potansiyeli gösterebilir. Bu dönüşmüş adipositler, kanserle ilişkili fibroblastlar (CAF) gibi işlev görenek ekstraselüler matriksin yeniden düzenlenmesine, kemorezistansın artmasına ve metastaza katkıda bulunur. Fibrozis, sadece yağ dokusuyla sınırlı kalmayıp iskelet ve düz kas dokularında da görülür ve bu durum tümör dostu bir ortamın oluşumunu pekiştirir.

Obeziteye bağılı durumlar ya da yüksek yağlı diyet modellerinde, tümör çevresindeki yağ dokusu, tümörün agresifliğini önemli ölçüde artırır ve lokal adipositlerin pankreas tümör mikroçevresi üzerindeki belirleyici rolünü ortaya koyar.



Şekil 2. 7: Pankreas tümörleri ile komşu yağ dokusu arasındaki etkileşim, yağ dokusunun fonksiyonunu bozarak tümör progresyonunu destekler. (Lin et al., 2023)

### 2.5.5. Lipit Metabolizması Aracılı Kanser Tedavi Stratejileri

Yağ asidi sentezine katılan enzimlerin aşırı ifade edilmesi, birçok kanser türünde yaygın olarak gözlemlenmektedir. Özellikle FASN (Fatty Acid Synthase), kolorektal, melanom, prostat ve lenfoma gibi çeşitli kanserlerde yüksek düzeyde bulunur. FASN'nin baskılanması, tümör büyümesini ve metastazı azaltmaktadır. TVB-2640 gibi ikinci nesil FASN inhibitörleri, prelinik çalışmalarda umut verici sonuçlar vermiş ve ileri evre meme, kolon ve over kanserleri gibi solid tümörler için klinik denemelere geçmiştir (Gupta et al., 2024a). Buna paralel olarak, Stearoil-CoA Desaturaz (SCD1) enzimi de prostat, meme, pankreas, glioblastoma, küçük hücre dışı akciğer kanseri ve mide kanseri gibi birçok kanserde artmış şekilde bulunur. SCD1, tekli doymamış yağ asitlerinin sentezini sağlayarak kanser hücrelerinin çoğalmasını artırır ve apoptozu engeller. A-939572 ve CAY10566 gibi küçük moleküllü inhibitörlerle yapılan çalışmalar, tümör büyümesini ve metastazı azaltmada etkili olmuştur (Gupta et al., 2024b). Bir diğer önemli hedef ise Asetil-CoA Karboksilaz (ACC) enzimidir. Bu enzim de novo lipogenezde rol

oyunar ve akut miyeloid lösemi, akciğer, karaciğer ve meme kanseri gibi pek çok kanserde yükselmiştir. ND-654 ve TOFA gibi ACC inhibitörleri, prelinik modellerde tümör gelişimini azaltıp sağkalımı artırmıştır. Ancak bazı çalışmalar, ACC inhibitörlerinin tümör destekleyici etkiler gösterebileceğini ve hiperlipitemi gibi metabolik yan etkilere yol açabileceğini bildirmiştir.(Terry & Hay, 2024) Yağ asidi oksidasyonu (FAO) da kanser hücreleri tarafından enerji üretimi amacıyla aktif olarak kullanılır. Bu yolda hız kısıtlayıcı bir enzim olan CPT1'i hedef alan etomoksir gibi inhibitörler, kemoterapi ajanlarının etkinliğini artırmakta ve ilaç direncini kırmaktadır. Ancak, bu ilaçların karaciğer toksisitesi gibi önemli güvenlik sorunları klinik uygulamayı sınırlamaktadır. Son olarak, kanser hücreleri aşırı yağ asidini lipit damlacıklarında depolayarak lipotoksiteyi önler. Bu depolamayı sağlayan DGAT ve ACAT gibi enzimlerin inhibisyonu, tümör büyümesini engelleyebilir. Örneğin, DGAT inhibitörü PF-06424439 ve ACAT-1 inhibitörü avasimibe, prelinik çalışmalarda anti-tümör etkiler göstermiştir. Bu yollar birlikte değerlendirildiğinde, lipit metabolizması üzerindeki bu çok yönlü müdahalelerin entegre bir şekilde uygulanması, kanser hücrelerinin adaptif metabolik stratejilerini bozarak tedavi etkinliğini artırabilir. Ancak her müdahalenin yan etkileri ve dokuya özgü etkileri dikkate alınmalı; bu nedenle bu stratejiler, kişiselleştirilmiş tıbbi yaklaşımlarla desteklenmelidir.

### **2.5.6. Tümör Mikroçevresi ve Lipit Metabolizması**

TMC'de lipit metabolizmasını hedeflemek, tümör dışı hücreleri yeniden programlamak ve antitümör bağışıklığı artırmak için umut verici bir strateji olarak ortaya çıkmıştır. CD36, FASN ve SCD1 gibi temel lipitle ilişkili enzimler ve taşıyıcılar yalnızca tümör hücrelerinde değil, aynı zamanda TME içindeki bağışıklık ve stromal hücrelerde de ifade edilir; bunlara düzenleyici T hücreleri (Treg), tümörle ilişkili makrofajlar (TAM), dendritik hücreler (DC) ve endotelial hücreler dahildir. Treg ve TAM hücrelerinde CD36'nın inhibisyonu, bu hücreleri proinflamatuvar bir fenotipe yeniden programlar, CD8+ T hücre fonksiyonunu artırır ve tümör büyümesini baskılar. Ancak, endotelial hücrelerde CD36 kaybı anjiyogenezi teşvik edebilir; bu da bağlama bağlı etkileri ortaya koyar. Dendritik hücrelerde FASN inhibisyonu, antijen sunumunu ve T hücresi aktivasyonunu geliştirerek immün kontrol noktası inhibitörlerine verilen yanıtları güçlendirir. Benzer şekilde, SCD1'in DC ve Treg hücrelerinde baskılanması,

immünsüpresif aktiviteyi azaltır ve antitümör bağışıklığı destekler. Genel olarak, lipit metabolizması aracılığıyla TME bileşenlerinin metabolik yeniden programlanması, yalnızca tümörü destekleyen işlevleri bozmakla kalmaz, aynı zamanda immünoterapinin etkinliğini de artırır (H. R. Jin et al., 2023b).

## **2.6. Orlistat: Potansiyel Anti-Kanser Etkilere Sahip Bir Lipaz İnhibitörü**

### **2.6.1. Etki Mekanizması: Pankreatik Lipaz İnhibisyonu**

Orlistat, ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanmış bir anti-obezite ilacıdır. Bu ilaç, *Streptomyces toxytricini* adlı bakteride bulunan endojen lipstatinden türetilmiş doymuş bir türevidir. Orlistat, obeziteyi yönetmek amacıyla mide ve pankreas lipazlarını bağırsak içinde geri dönüşümlü olarak inhibe eder. Lipaz, trigliseritleri emilebilir serbest yağ asitlerine ve monogliseritlere parçalar. Orlistat, lipazların aktif bölgelerindeki serin kalıntılarına kovalent olarak bağlanarak bu enzimleri etkisiz hale getirir. Bu inaktivasyon, trigliseritlerin hidrolizini engelleyerek serbest yağ asitlerinin emilimini azaltır (Ellrichmann et al., 2007). Orlistat'ın temel etkisi, bağırsaklardaki lokal lipaz inhibisyonudur; bu nedenle sistemik emilim, etkinliği için gerekli değildir. Önerilen dozda orlistat, diyetle alınan yağın emilimini yaklaşık %30 oranında engeller. Amerikan Kalp Derneği'ne (AHA) göre, bu oranda kilo kaybı aynı zamanda hafif bir kan basıncı düşüşü ile de ilişkilidir (Hall et al., 2021).

### **2.6.2. Orlistat'ın Kanser Hücrelerinde Lipit Metabolizması Üzerindeki Etkisi**

Orlistat, genellikle pankreatik lipaz aktivitesini inhibe etme özelliğiyle bilinse de kilo kontrolünün ötesine geçen pleiotropik etkilere de sahiptir. Yapılan çalışmalar, Orlistat'ın yağ asidi sentazının (FASN) tiyosteraz domenini inhibe eden yeni bir inhibitör olduğunu ortaya koymuştur. FASN, tümör ilerlemesiyle güçlü bir şekilde ilişkilendirilmiş bir enzimdir (Kridel et al., 2004). Yağ asidi sentaz (FASN), asetil-koenzim A (CoA) ve malonil-CoA'dan uzun zincirli yağ asitlerinin üretiminde ve lipogenezde rol oynayan önemli bir biyosentetik enzimdir. Glukozun kanser hücrelerine alınması, glikoliz yoluyla pirüvat üretimine yol açar. Pirüvat, mitokondride Krebs döngüsü aracılığıyla ATP üretiminde kullanılır; bu süreçte oluşan ürünlerden biri olan asetil-CoA, neoplastik lipogenez için bir substrat görevi görür. Karaciğer ve yağ dokusu dışındaki normal hücrelerde FASN ifadesi ve aktivitesi düşük olup, diyet, hormonlar ve büyüme faktörleri

tarafından sıkı şekilde düzenlenir (Menendez & Lupu, 2007). Ancak, hızla çoğalan kanser hücrelerinde, zar oluşumu için lipit sağlamak ve  $\beta$ -oksidasyon ile enerji üretimi ve proteinlerin lipit modifikasyonu için yağ asitleri de novo olarak sentezlenebilir. Bu nedenle FASN, prostat, over, meme, endometriyal, tiroid, kolorektal, mesane, akciğer, oral, dil, özofagus, hepatoselüler, pankreas ve mide kanserleri ile malign melanom, mezotelyoma, nefroblastom, retinoblastom, yumuşak doku sarkomu (Swinnen et al., 2006), gastrointestinal stromal tümör, vulva Paget hastalığı (Rossi et al., 2006) ve multipl miyeloma gibi birçok kanserde yüksek oranda eksprese edilir (Flavin et al., 2010). FASN inhibe edildiğinde veya engellendiğinde, kanser hücrelerindeki lipit sentezi bozulur ve bu da hücrelerin büyüme, hayatta kalma ve enerji metabolizmalarının aksamasına yol açar. Bu durum, Orlistat'ı kanser hedefli tedaviler için ilgi çekici bir aday haline getirir. FASN inhibisyonu yalnızca tümör hücrelerinin çoğalmasını veya enerji metabolizmasını bozmakla kalmaz, aynı zamanda lipit tükenmesi ve metabolik stres, reaktif oksijen türlerinin (ROS) birikmesine neden olarak hücre içi apoptotik (programlanmış hücre ölümü) yolları tetikler (Swierczynski et al., 2014). Pankreas kanseri üzerine özel olarak yapılan bir başka çalışmada, Orlistat'ın merkezi bir ferroptozis düzenleyicisi olan GPX4'ün ifadesini azalttığı gösterilmiştir. GPX4'ün baskılanması, lipit peroksidlerinin detoksifikasyonunu engelleyerek hücre zarlarında kontrolsüz oksidatif hasara ve buna bağlı olarak ferroptotik hücre ölümüne yol açmaktadır (W. Zhou et al., 2021).

### **2.6.3. Orlistat'ın Tümör Mikroçevresini (TME) Değiştiren Bir İlaç Olarak Rolü: Kanser Tedavisi İçin Olası Etkileri**

Tümör mikroçevresini (TME) hedeflemek, kanser tedavisinin etkinliğini iyileştirmede kritik bir strateji olarak ortaya çıkmıştır. Yapılan bir çalışma, orlistatın birden fazla mekanizma aracılığıyla TME değiştirici bir ajan olarak etki ettiğini göstermiştir. Yağ asidi sentazını (FASN) inhibe ederek orlistat, membran biyosentezini bozarak tümör hücrelerinde apoptozu başlatır ve bu da tümör hücresi kırılabilirliğini artırır. Ek olarak, orlistat nitrik oksit (NO) ve reaktif oksijen türleri (ROS) gibi pro-apoptotik medyatörleri yukarı düzenleyerek, sitokin dengesini tümör destekleyici IL-10'dan tümör baskılayıcı IFN- $\gamma$ 'ye kaydırarak ve pH düzenleyiciler MCT-1 ve V-ATPase'nin aşağı düzenlenmesi yoluyla tümör asidozunu normalleştirerek TME'yi değiştirir. Bu modifikasyonlar toplu olarak tümör büyümesini engeller ve çoklu ilaç direnci (MDR) proteinlerinin

ekspresyonunu azaltır, böylece tümörün sisplatin gibi kemoterapötik ajanlara duyarlılığını artırır. Tümör mikroçevresinin bu kapsamlı yeniden şekillenmesi, orlistatin kanser tedavilerinin etkinliğini artırmak için ek bir tedavi olarak potansiyelini destekleyen güçlü kanıtlar sunmaktadır (Kant et al., 2014).

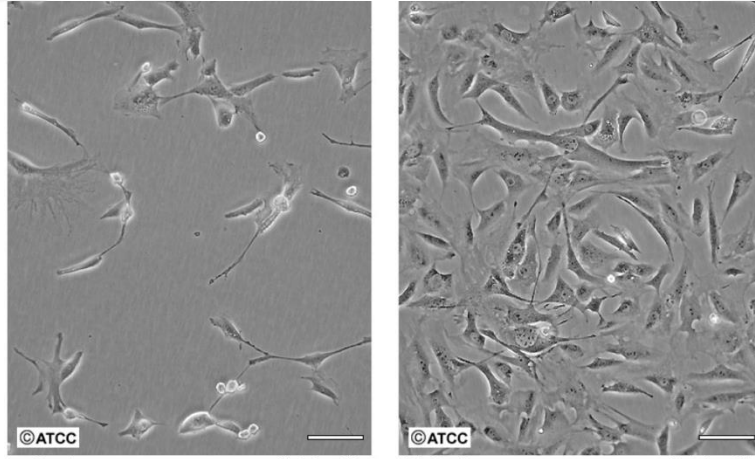


### 3. MATERYAL VE METOD

#### 3.1. MATERYALLER

##### 3.1.1. Kullanılan Hücre Hattı

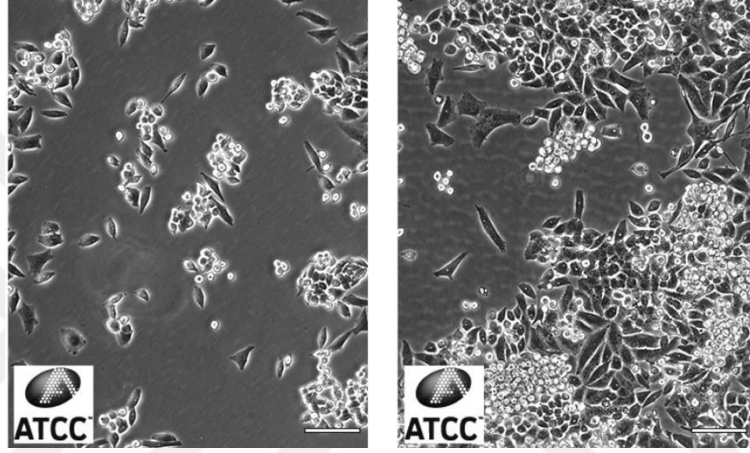
3T3-L1 (ATCC numarası CL-173™), 3T3-L1, fare embriyosundan izole edilmiş bir fibroblast hücre hattıdır. Bu hücre hattı, diyabet, obezite ve ilgili hastalıklarla ilişkili temel hücresel mekanizmaları incelemek için kullanılır. Hücreler, hızlı bölünen bir yapıdan, temasla durdurulmuş ve konflüente ulaşıttan sonra ön-adipositten adiposit benzeri yapıya dönüşür. Ortamdaki yüksek serum içeriği, yağ birikimini artırır. Hücrelerin çoğalma süresi yaklaşık 29 saattir.



Şekil 3. 1 3T3-L1 hücre hattının mikroskop altında görüntülenmesi (ATCC) (3T3-L1- CL-173 | ATCC, n.d.)

MIA PACA-2 (ATCC numarası: CRL-1420™) , 65 yaşındaki beyaz bir erkekten alınan pankreas tümör dokusundan türetilmiş epitel hücre hattıdır. Kanser araştırmalarında kullanılan bu hücre hattının çoğalma süresi 30-40 saattir. Hücreler yuvarlak, epitel morfolojisine sahiptir ve kültürde yapışkandır. CK5.6, AE1/AE3, E-kaderin, vimentin,

kromogranin A, sinaptofizin, SSTR2 ve NTR1 ifade ederken, CD56 ifade etmezler. MIA PaCa-2, onlarca yıldır pankreas kanseri modeli olarak kullanılmakta; karsinogenez mekanizmalarının aydınlatılmasına, IgG üretimini hedefleyen kanser hücre lizatlarının geliştirilmesine ve kuantum nokta temelli ilaç taşıma yöntemlerinin ilerletilmesine katkı sağlamaktadır.



Şekil 3. 2 MIA PACA-2 hücre hattının mikroskop altında görüntülenmesi (ATCC) (*MIA PaCa-2 - CRL-1420 / ATCC, n.d.*)

### 3.1.2. Kullanılan cihazlar

Kullanılan cihazlar olarak Ek A’da verilmiştir.

### 3.1.3. Kullanılan malzemeler

#### 3.1.3.1. Hücre Kültürü Ekipmanları

Hücre kültüründe kullanılan malzemeler olarak Ek B’de verilmiştir.

#### 3.1.3.2. Kullanılan Kimyasallar

Çalışma süresince kullanılan kimyasallar Ek C’de verilmiştir.

## 3.2. METODLAR

### 3.2.1. Hücre Kültürü

MIA PaCa-2 (CRL-1420) ve 3T3-L1 (CL-173) hücre hatları ATCC'den (Manassa, USA) satın alınmıştır. MIA PaCa-2 insan pankreas kanseri hücre hattı %10 fetal sığır serumu (FBS) ve %1 Penisilin (100 U/ml) -Streptomisin ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) içeren RPMI-1640 besiyerinde, 37 °C ve %5 CO<sub>2</sub> içeren ortamda kültüre edilmiştir. Conditioned Medium "CM" ve ko-kültür modeli oluşturmak için kullanılacak olan 3T3-L1 fare preadiposit hücre hattı da %10 BCS ve %1 Penisilin (100 U/ml) -Streptomisin ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) içeren DMEM besiyerinde, 37 °C ve %5 CO<sub>2</sub> içeren ortamda kültüre edilemiştir. Pasajlama işlemi, %80 yoğunluğa ulaşan hücrelerin 1xPBS (Phosphate-buffered saline, PAN Biotech, Germany) ile yıkanarak ve %0,25 tripsin/EDTA kullanılarak kaldırılması ile gerçekleştirilmiştir.

### 3.2.2. 3T3-L1 Preadipositlerin Olgun Adipositlere Farklılaştırılması

Farklılaştırılabilir preadiposit hücre hattı olan 3T3-L1 hücreleri, %10 bovine calf serum (BCS) içeren DMEM besiyeri kullanılarak 60mm hücre petrilere  $3 \times 10^4$  hücre/oyuk yoğunluğunda ekilmiştir. Hücreler yaklaşık %80 konfluens seviyesine ulaştığında, farklılaştırma protokolü başlatılmış ve bu nokta farklılaşmanın "0. günü" olarak kabul edilmiştir. Bu aşamada hücreler, "Ortam I" olarak tanımlanan indüksiyon besiyerinde kültüre edilmiştir. Dört günün sonunda, hücreler "Ortam II" adı verilen farklı bir besiyerine aktarılmıştır. Ortam II uygulaması sonrası, olgun adiposit fenotipine geçişi desteklemek amacıyla hücre kültürü toplam 13 gün boyunca sürdürülmüş ve bu süre zarfında besiyeri her 3 günde bir taze olarak değiştirilmiştir.

Kullanılan besiyeri içerikleri aşağıdaki gibidir:

Ortam I: 25 mM glikoz, 0.5 mM 3-izobütil-1-metilksantin (IBMX, Sigma), 0.2  $\mu\text{M}$  deksametazon (Sigma) ve %10 FBS içeren DMEM.

Ortam II: 25 mM glikoz, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  insülin ve %10 FBS içeren DMEM.

### **3.2.3. Conditioned Medium “CM” Hazırlanması**

Olgun adiposit hücrelerinin ekstraselüler matrikse salgıladığı bileşenlerin pankreas kanseri hücreleri üzerindeki etkilerini inceleyebilmek amacıyla, insan vücudundaki hücreler arası etkileşimi taklit eden bir koşullu ortam (Conditioned Media, CM) modeli oluşturulmuştur. Bu kapsamda, farklılaştırılmış 3T3-L1 olgun adiposit hücrelerinden eski medya uzaklaştırılarak 1X PBS ile iki kez yıkama yapılmıştır. Sonrasında FBS (-) medya eklenerek hücreler 1 gün 37 °C ve %5 CO<sub>2</sub> içeren ortamda kültüre edilmiştir. 24 saatlik inkübasyon süresinin ardından, hücrelerin bulunduğu ortamdan elde edilen sıvı koşullu besiyeri olarak işleme alınmıştır. Toplanan besiyeri, ölü hücre kalıntılarından arındırmak amacıyla 10 dakika boyunca 500 × g’de santrifüj edilmiş sonrasında 0.2µM hücre kültürü uyumlu filtreden geçirilmiştir. Elde edilen sıvı yeni bir tüpe alınarak “%100 CM” olarak etiketlenmiş ve -80°C’de saklanmıştır.

### **3.2.4. 3T3-L1 ve MIA PaCa-2 ile Ko-Kültür Modeli Oluşturulması**

Pankreas kanserinin tümör mikroçevresinde yer alan kanser ilişkili adipositleri (cancer-associated adipocytes, CAAs) taklit edebilmek ve fizyolojik koşullara daha yakın bir in vitro model elde edebilmek amacıyla, transwell sistemine dayalı bir ko-kültür modeli oluşturulmuştur. Bu modelde 0.4 µm gözenek boyutuna sahip geçirgen zar içeren 24 oyuklu transwell plakalar kullanılmıştır. İlk olarak 3T3-L1 preadiposit hücreleri, daha önce belirtilen farklılaştırma protokolü doğrultusunda olgun adipositlere dönüştürülmüştür. Ardından, elde edilen olgun adiposit hücreleri ve insan pankreas kanseri hücre hattı MIA PaCa-2, transwell plakasının sırasıyla alt (well) ve üst (insert) bölmelerine 5 × 10<sup>3</sup> hücre/oyuk yoğunluğunda eklenmiştir. Bu konfigürasyon, hücreler arasında doğrudan fiziksel temas olmaksızın parakrin sinyalleşme yoluyla çift yönlü etkileşimlerin gerçekleşmesine olanak sağlamaktadır.

### **3.2.5. Oil Red ve BODIPY Testi**

Farklılaştırma süreci ve planlanan tedavi uygulamalarının ardından, olgun 3T3-L1 adiposit hücrelerinde oluşan lipit birikimini değerlendirmek amacıyla Oil Red O boyama

yöntemi uygulanmıştır. Lipit damlacıklarının mikroskopik olarak görselleştirilmesi için hücreler öncelikle PBS ile yıkanmış ve ardından oda sıcaklığında %10 paraformaldehit çözeltisi ile 30 dakika süreyle sabitlenmiştir. Fiksasyon işlemi takiben, hücreler 10 dakika boyunca Oil Red O çözeltisi ile boyanmıştır. Bu boya, 12 mL Oil Red O'nun 8 mL PBS(1X) içerisinde 20 dakika bekletilir sonra filtreden geçirilip hazırlanmıştır. Boyama sonrasında hücreler ışık mikroskobu altında incelenmiş ve lipit içeriği ayrıca spektrofotometrik olarak değerlendirilmiştir. Yine farklılaştırma süreci ve planlanan tedavi uygulamalarının ardından hücrelere 1X PBS yıkaması sonrasında %4 PFA (paraformaldehid) ile fikse edilmiştir. Oda sıcaklığında 30 dakika fiksasyondan sonra 1X soğuk PBS ile yıkama yapılmıştır. %0.1 Triton X-100 uygulaması sonrasında oda sıcaklığında 10 dakika permeabilizasyon yapılmış olup BODIPY 493/503 çözeltisi (1 µg/ml) her kuyuya uygulanmıştır. Oda sıcaklığında 15–30 dakika inkübasyon sonrasında tüm örneklerden floresan mikroskobunda görüntüleme yapılmıştır.

### **3.2.6. MTT Testi**

MIA PaCa-2, 3T3-L1 ve ko-kültür gruplarına ait hücreler, her biri  $5 \times 10^3$  hücre olacak şekilde 96 oyuklu hücre kültür plaklarına eklenmiştir. Hücreler, belirlenen tedavi koşulları doğrultusunda (koşullu ortam [CM], ko-kültür sistemi ve Orlistat uygulamaları) ilgili doz ve sürelerde muamele edilmiştir. Tedavi süresinin sonunda her oyuğa 10 µL MTT çözeltisi (5 mg/mL; Sigma) eklenmiş ve hücreler 4 saat inkübe edilmiştir. MTT'nin canlı hücreler tarafından formazan kristallerine dönüştürülmesini takiben, her oyuğa 100 µL DMSO (Sigma) eklenerek kristaller çözüldürülmüştür. Elde edilen çözeltiler 5 dakika boyunca karanlık ortamda bekletilmiş ve ardından absorbans değerleri 570 nm dalga boyunda Bio-Rad mikropilaka okuyucu ile ölçülmüştür. Her deney en az dört teknik tekrarla yürütülmüş, biyolojik geçerliliği sağlamak amacıyla da deneyler üç bağımsız hücre kültürü tekrarı ile gerçekleştirilmiştir.

### **3.2.7. Tripan Mavisi Hücre Sağ Kalım/Büyüme Testi**

Tüm hücre modelleri (MIA PaCa-2, 3T3-L1 ve ko-kültür grubu),  $5 \times 10^4$  hücre/kuyu yoğunluğunda 6 oyuklu kültür kaplarına eklenmiştir. Hücrelere, deney planı kapsamında belirlenen tedaviler (koşullu ortam [CM], ko-kültür ve Orlistat uygulamaları) uygulanmıştır. Tedavi sonrası hücre proliferasyonu 72 saat boyunca, her 24 saatte bir olmak üzere hemasitometre yöntemi ile değerlendirilmiştir. Sayım işlemi için hücreler tripsin ile ortamdaki uzaklaştırılmış, ardından 3 dakika boyunca 2.000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası üst faz atılmış ve hücre pelletine 50 µL Tripan mavisi çözeltisi eklenerek canlılık boyaması yapılmıştır. Boyanan hücreler Neubauer hemasitometre kullanılarak sayılmış ve toplam hücre sayısı ile canlı hücre oranları belirlenmiştir.

### **3.2.8. Floresan Boyama**

Floresan boyama, hücre veya doku örneklerinde spesifik yapıların, proteinlerin veya moleküllerin mikroskop altında görünür hale getirilmesini sağlayan bir görüntüleme yöntemidir. Bu teknikte, floresan özellik gösteren boyalar veya antikolar kullanılarak hedef moleküller işaretlenir. Işık mikroskobu yerine floresan mikroskopları ile yapılan bu gözlemler sayesinde, hücre içi organizasyon, protein ekspresyonu ve hücresel süreçler detaylı şekilde analiz edilebilir. Yüksek özgüllük ve hassasiyet sunan bu yöntem, özellikle kanser biyolojisi, immünoloji ve moleküler biyoloji çalışmalarında yaygın olarak tercih edilmektedir.

#### **3.2.8.1. Diheksiloksakarbosiyenin İyodür (DioC6) Boyama**

DeneySEL grUplara ait hücreler,  $1 \times 10^5$  hücre/kuyu yoğunluğunda 6 oyuklu kültür kaplarına eklenmiş ve hücrelerin yüzeye yapışabilmesi için gece boyunca 37 °C sıcaklıkta ve %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde inkübe edilmiştir. Ertesi gün, hücrelere planlanan tedavi protokolleri (koşullu ortam [CM], ko-kültür ve Orlistat) uygulanmış ve ilgili doz ile sürelerde işleme tabi tutulmuştur. Tedavi sürecinin ardından mitokondriyal membran potansiyelini değerlendirmek amacıyla hücrelere 4 nM DiOC<sub>6</sub> (3,3'-diheksiloksakarbositiyanin iyodür) içeren kültür medyumuna eklenmiş ve hücreler 15 dakika boyunca 37 °C'de inkübe edilmiştir. DiOC<sub>6</sub> boyası, sağlıklı mitokondriye özgü olarak membran potansiyeline bağlı şekilde biriktirmektedir. İncelenen hücreler, 488 nm

eksitasyon ve 525 nm emisyon dalga boylarında floresan mikroskop kullanılarak görüntülenmiş ve mitokondriyal bütünlük değerlendirilmiştir.

### **3.2.8.2. Propidium İodide (PI) Boyama**

Hücre ölüm oranlarını değerlendirmek amacıyla gerçekleştirilen bu deneyde, hücreler  $1 \times 10^5$  hücre/kuyu yoğunluğunda 6 oyuklu kültür kaplarına eklenmiş ve yüzeye yapışmalarını sağlamak amacıyla gece boyunca  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de, %5  $\text{CO}_2$  içeren inkübatörde inkübe edilmiştir. Takip eden gün, deney gruplarına ait hücelere belirlenen tedavi koşulları (koşullu ortam [CM], ko-kültür ve Orlistat uygulamaları) uygun doz ve sürelerde uygulanmıştır. Tedavi sürecinin ardından, hücre kültürü ortamına  $20 \text{ }\mu\text{M}$  konsantrasyonunda Propidium Iodide (PI) içeren besiyeri eklenmiş ve hücreler 10 dakika boyunca  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de inkübe edilmiştir. PI boyası, yalnızca hücre membranı bütünlüğü bozulmuş, ölü hücreler tarafından alınabildiğinden dolayı nekrotik ve geç apoptotik hücreleri tanımlamak için kullanılmıştır. PI pozitif hücreler, 536 nm eksitasyon ve 617 nm emisyon dalga boylarında floresan mikroskop kullanılarak görüntülenmiştir.

### **3.2.8.3. 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) Boyama**

Nükleer morfolojik değişiklikleri değerlendirmek amacıyla hücreler,  $1 \times 10^5$  hücre/kuyu yoğunluğunda 6 oyuklu kültür kaplarına eklenmiş ve yüzeye yapışmalarını sağlamak amacıyla gece boyunca  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de, %5  $\text{CO}_2$  içeren inkübatörde inkübe edilmiştir. Ertesi gün, hücelere belirlenen tedavi protokolleri (koşullu ortam [CM], ko-kültür ve Orlistat) uygun doz ve sürelerde uygulanmıştır. Tedavi sonrası, hücre kültürü ortamına  $5 \text{ mg/mL}$  konsantrasyonunda DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) içeren boya çözeltisi eklenmiş ve hücreler 10 dakika süreyle inkübe edilmiştir. DAPI, çift sarmallı DNA'ya bağlanarak nükleusun morfolojik yapısını floresan özellikte görünür hale getirmektedir. Boyanmış hücreler, 350 nm eksitasyon ve 470 nm emisyon dalga boylarında floresan mikroskop ile gözlemlenmiştir. Böylece apoptozla ilişkili nükleer yoğunlaşma ve fragmentasyon gibi değişiklikler değerlendirilmiştir.

### **3.2.9. Yara Kapanması/ Migrasyon Deneyi**

Pankreas kanseri hücre hattı MIA PaCa-2, kültüre edilerek monolayer hücre tabakası oluşturulmuştur. Hücreler yeterli yoğunluğa ulaştığında, birleşik hücre tabakasının ortasına 200 µL'lik bir pipet ucu kullanılarak mekanik bir yara hattı oluşturulmuştur. İnkübasyon süresi boyunca hücre migrasyonu, her gün yara bölgesinin mikroskop altında görüntülenmesiyle takip edilmiştir. Deney sonunda hücreler sabitleme çözeltisi ile fikslenmiş, ardından DAPI ve DiOC<sub>6</sub> boyaları ile işaretlenerek mikroskopik analiz için hazırlanmıştır. Yara alanının kapatılma düzeyi, deney başlangıcında ölçülen yara genişliği ile karşılaştırılarak kantitatif olarak değerlendirilmiştir. Bu analiz, hücrelerin göç yeteneğini ve uygulanan tedavi koşullarının bu süreç üzerindeki etkilerini belirlemeye yönelik olarak gerçekleştirilmiştir.

### **3.2.10. İmmünoblotlama**

Tedavi uygulanmış hücre grupları, kültür plakalarındaki ekimlerinin ardından ortamdan uzaklaştırılmış ve hücreler soğuk 1× PBS ile yıkandıktan sonra mekanik kazıma yöntemi ile toplanmıştır. Elde edilen hücre süspansiyonları mikrofüj tüplerine aktarılmış ve 2 dakika boyunca 13.200 rpm'de santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırılmıştır. Elde edilen hücre pelletine, protein izolasyonu amacıyla Thermo Fisher Scientific firmasından temin edilen M-PER hücre lizis tamponu (%10 proteaz inhibitörü eklenmiş), pellet hacmine uygun olacak şekilde (~50 µL) eklenmiştir. Lizis işleminin verimli gerçekleşmesi için örnekler oda sıcaklığında 15 dakika çalkalayıcı üzerinde bekletilmiştir. Ardından, protein fraksiyonlarının ayrıştırılması amacıyla 15 dakika süreyle +4 °C'de 16.400 rpm'de santrifüj uygulanmıştır. Santrifüj sonrasında elde edilen süpernatant yeni bir mikrofüj tüpüne dikkatlice aktarılmış ve çözünen toplam protein fraksiyonu olarak -20 °C'de saklanmıştır. Protein konsantrasyonları, Bradford yöntemi kullanılarak spektrofotometrik olarak tayin edilmiştir.

### **3.2.10.1. Protein Konsantrasyonu Belirleme-Bradford Yöntemi**

Toplam protein miktarlarının belirlenmesi için Bradford yöntemi uygulanmıştır. 96 oyuklu mikrotitre plakalarına, 3 teknik tekrar halinde, her biri 1–5 µL arasında değişen hacimlerde 1.5 µg/µL protein standardı eklenmiş, diğer kuyucuklara ise 1 µL'lik deneysel protein örnekleri ilave edilmiştir. Tüm kuyucuklara 200 µL Bradford reaktifi eklenmiş ve plakalar 5 dakika karanlık ortamda bekletilmiştir. Absorbans değerleri 595 nm dalga boyunda Bio-Rad mikroparka okuyucu cihazı ile ölçülmüş, standart eğri üzerinden örneklerin protein konsantrasyonları hesaplanmıştır. Western blot analizi için, protein örnekleri 1:5 oranında 5× Laemmli örnek tamponu ile karıştırılarak 95 °C'de 5 dakika boyunca denatüre edilmiştir. Örnekler, %12 SDS içeren poliakrilamid jelde (SDS-PAGE) 90 V'de yaklaşık 3 saat süreyle yürütülmüştür. Proteinler, elektrotransfer yöntemi ile 0.45 µm PVDF membrana aktarılmıştır. Membran, non-spesifik bağlanmaların önlenmesi amacıyla %5 yağsız süt çözeltisi ile 1 saat süreyle oda sıcaklığında bloklanmıştır. Bloklama işleminin ardından membranlar, ilgili hedef proteinlere özgü primer antikolarla (Cell Signaling Technology) +4 °C'de gece boyunca inkübe edilmiştir. Primer inkübasyonu takiben, membranlar TBS-T ile üç kez 10 dakika, ardından 1 kez 10 dakika TBS ile yıkanmıştır. Daha sonra membranlar, 1:3000–1:5000 dilüsyonda hazırlanmış HRP-konjuge sekonder antikolar (anti-mouse/rabbit, Cell Signaling Technology) ile 2 saat oda sıcaklığında veya isteğe bağlı olarak gece boyunca inkübe edilmiştir. Sekonder antikor uygulaması sonrası aynı yıkama protokolü tekrarlanmıştır. Protein bantlarının tespiti için oda sıcaklığına getirilmiş kemilüminesans substratı uygulanmış ve bantlar Bio-Rad kemilüminesans görüntüleme cihazı ile tespit edilmiştir. Görüntülenen bantlar ImageLab yazılımı aracılığıyla densitometrik olarak analiz edilmiştir.

### **3.2.11. Akış Sitometresi ile FITC-Annexin V/PI Boyama ve Apoptoz Belirleme**

Hücreler  $3 \times 10^5$  hücre/kuyu yoğunluğunda 6 oyuklu kültür kaplarına ekilmiş ve ardından belirlenen Orlistat doz ve sürelerinde inkübe edilmiştir. Uygulama süresinin sonunda, hücreleri zedelemekten besiyerleri ortamdaki uzaklaştırılmış ve BD Pharmingen FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I (Cat No. 556547) protokolüne uygun şekilde işleme alınmıştır. Hücreler, 1× PBS ile yıkandıktan sonra 1× Bağlanma Tamponu ile resüspanse

edilmiştir. Elde edilen hücre süspansiyonlarının her biri, 5 µL Annexin V-FITC ve 5 µL PI içeren 100 µL'lik hacimlerde boyanmıştır. 15 dakika süreyle oda sıcaklığında karanlıkta inkübasyonun ardından, süspansiyonlar 1× Bağlanma Tamponu ile tamamlanmış ve numuneler en geç 1 saat içerisinde akış sitometrisi ile analiz edilmiştir. Böylece, apoptotik süreçteki hücrelerin evrelerine göre dağılımı kantitatif olarak değerlendirilmiştir.

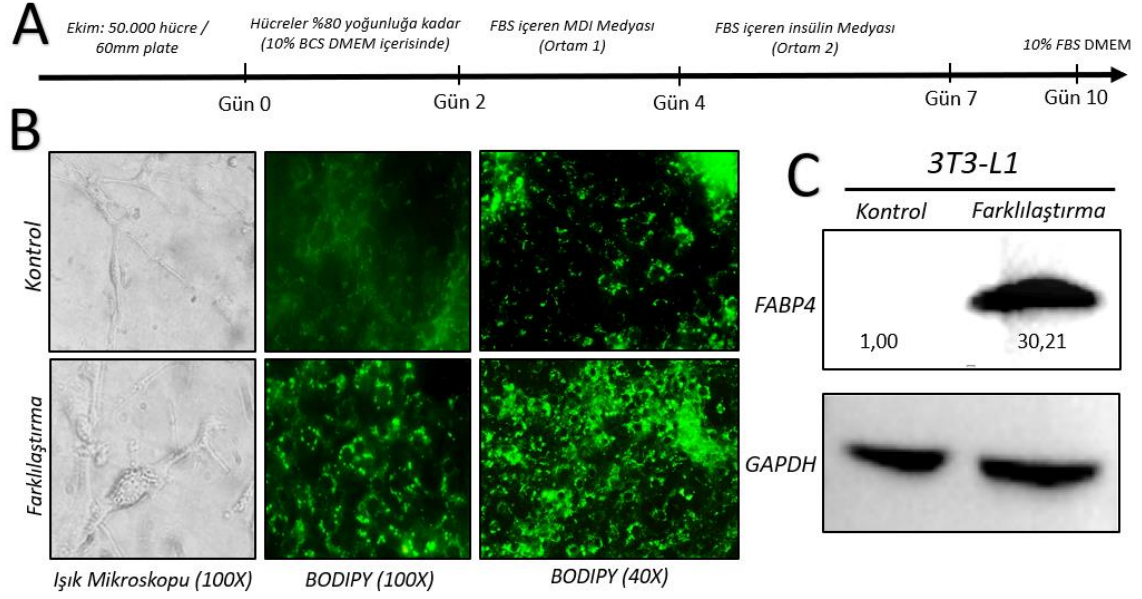
### **3.2.12. İstatiksel Analizler**

Tüm deneysel veriler, üç bağımsız biyolojik tekrarın ortalaması ± standart sapma (SD) şeklinde raporlanmıştır. Elde edilen verilerin istatistiksel analizi, GraphPad Prism yazılımı (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Gruplar arasındaki anlamlı farklılıkların belirlenmesi amacıyla iki yönlü varyans analizi (Two-way ANOVA) uygulanmış ve bunu takiben uygun çoklu karşılaştırma testler ile analizler detaylandırılmıştır. Tüm istatistiksel testlerde  $p < 0.05$  değeri anlamlılık eşiği olarak kabul edilmiştir.

## 4. SONUÇLAR

### 4.1. 3T3-L1 Preadiposit hücrelerinin olgun adiposit hücrelerine farklılaştırılması ve farklılaştırma analizleri

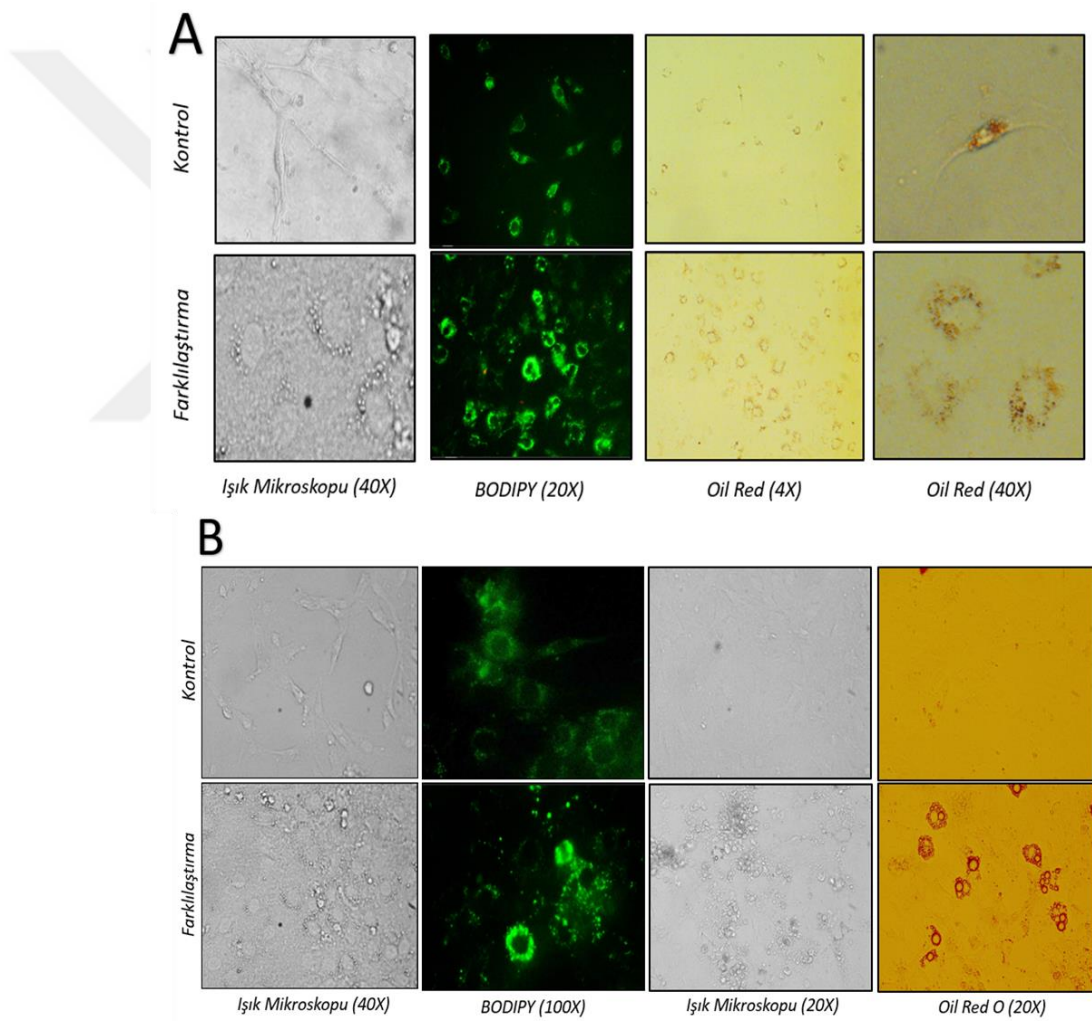
3T3-L1 preadiposit hücrelerinin olgun adiposit hücrelerine farklılaştırılması amacıyla metodumuzda belirttiğimiz protokol (Şekil 4. 1A) uygulanmış ve farklılaşma süreci boyunca hücrelerde lipit akümüasyonu belirgin şekilde artmıştır. BODIPY ile yapılan floresan boyama sonucunda, farklılaştırılmış grupta hücre içi lipit damlacıkları yoğun yeşil floresan sinyalle tespit edilmiştir (Şekil 4. 1B). Buna karşılık kontrol grubunda anlamlı bir lipit birikimi gözlenmemiştir. Farklılaştırma sürecinin ardından kontrol ve farklılaştırma gruplarından elde edilen total protein örnekleri Western blot analizi ile değerlendirilmiştir. Farklılaştırılmış hücrelerde, adiposit belirteci olan FABP4 proteininin ekspresyonu kontrol grubuna göre anlamlı şekilde artmıştır (Şekil 4. 1C). Normalizasyon amacıyla GAPDH referans proteini kullanılmıştır. Bant yoğunlukları densitometrik olarak analiz edilmiş ve göreceli ifade düzeyleri ilgili bantların altında belirtilmiştir.



Şekil 4. 1 3T3-L1 preadiposit hücrelerinin olgun adiposit hücrelerine farklılaştırılması.

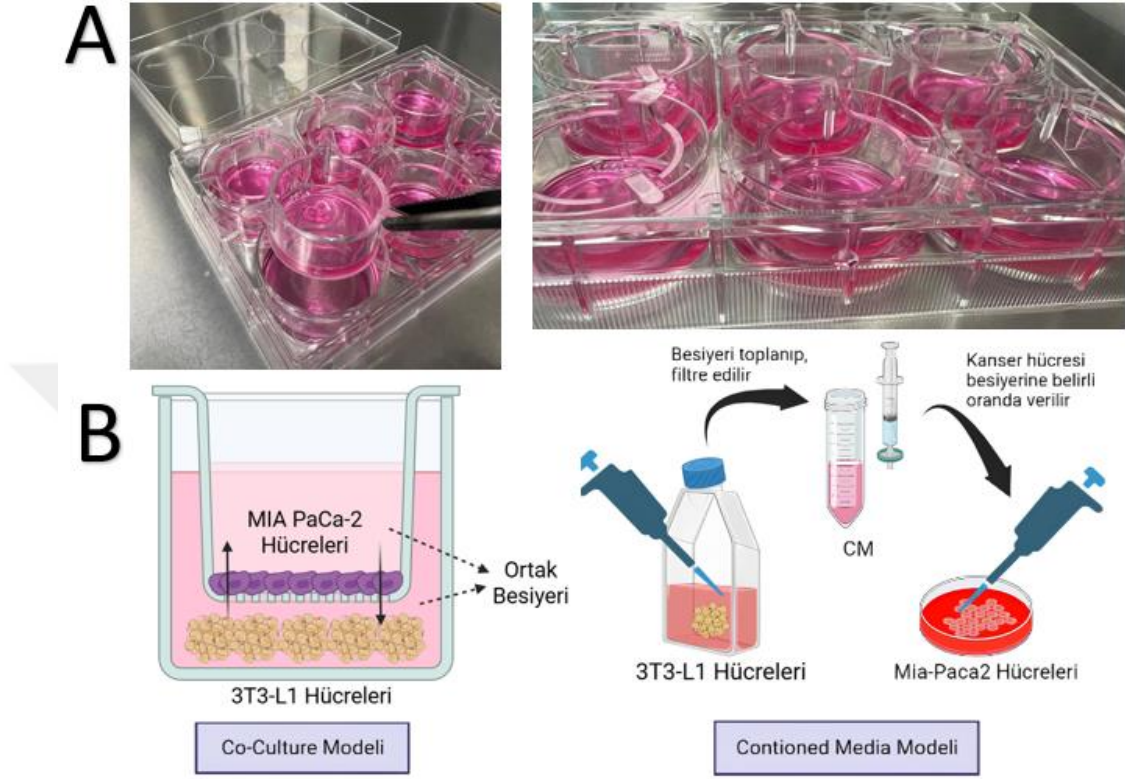
3T3-L1 preadiposit hücrelerinin farklılaşarak olgun adiposit fenotipine geçişi, morfolojik değişimler, floresan boyama ve histokimyasal analizler ile çok yönlü olarak değerlendirilmiştir. Işık mikroskobu ile yapılan gözlemlerde, farklılaştırılmış hücrelerde hücre şeklinin yuvarlaklaştığı ve sitoplazmada geniş vakuol benzeri yapıların oluştuğu görülmüştür. Bu morfolojik değişiklikler, hücrelerin lipid biriktirmeye başladığını ve farklılaşmanın gerçekleştiğini göstermektedir (Şekil 4. 2A-B). Buna karşılık kontrol grubunda hücreler daha ince, fibroblast benzeri yapıda kalmış ve herhangi bir vakuol oluşumu gözlenmemiştir. BODIPY boyası ile gerçekleştirilen floresan mikroskop görüntülemelerinde, farklılaştırılmış hücrelerin sitoplazmalarında yoğun yeşil floresan sinyaline sahip lipid damlacıkları belirgin şekilde izlenmiştir. BODIPY, nötral lipidleri yüksek özgüllükle boyadığından, bu floresan sinyal lipid birikiminin varlığını ve miktarını doğrudan göstermektedir. Kontrol grubunda ise BODIPY sinyali düşük seviyede kalmış, anlamlı bir lipid birikimi gözlenmemiştir. Oil Red O (ORO) boyaması ile yapılan histokimyasal analizde de farklılaştırılmış hücrelerde yoğun kırmızı renkte yağ damlacıkları birikimi tespit edilmiştir. Hem düşük (4X–20X) hem de yüksek (40X–100X) büyütmelemlerde alınan mikroskobik görüntülerde, bu lipid yapılar net olarak seçilebilmiştir. Buna karşın kontrol grubunda ORO ile tutulum farklılaştırma grubuna göre minimal

düzeyde kalmış ve yağ damlacıklarına rastlanmamıştır. Bu bulgular, BODIPY ile elde edilen sonuçları histolojik düzeyde desteklemektedir. Farklılaştırma sürecinde uygulanan medyaların, lipit metabolizması ve adipogenez üzerindeki etkileri bu çoklu görüntüleme teknikleriyle doğrulanmıştır. Tüm bu veriler birlikte değerlendirildiğinde, farklılaştırılmış 3T3-L1 hücrelerinin morfolojik, biyokimyasal ve yapısal olarak olgun adiposit fenotipi kazandığı açıkça gösterilmiştir.



Şekil 4. 2 3T3-L1 hücrelerinde adipojenik farklılaşmanın çeşitli boyama yöntemleriyle görselleştirilmesi

#### 4.2 MIA PaCa-2 / 3T3-L1 Ortak Kültürünmesi (Co-culture)



Şekil 4. 3 Ko-kültür sistemi ile koşullandırılmış medyanın (CM) hazırlanması ve uygulanmasının şematik gösterimi.

Adipositler ile pankreas kanseri hücreleri arasındaki parakrin etkileşimleri değerlendirmek üzere, iki farklı in vitro model sistemi geliştirilmiştir: transwell tabanlı ko-kültür modeli ve koşullu besiyeri (conditioned media, CM) modeli (Şekil 4. 3A ve B). Transwell sistemine dayalı ko-kültür modeli, gözenekli geçirgen zar yapısına sahip olacak şekilde tasarlanmıştır. Bu sistemde, alt bölmeye farklılaştırılmış 3T3-L1 olgun adiposit hücreleri eklenirken, üst bölmeye insan pankreas kanseri hücre hattı olan MIA PaCa-2 yerleştirilmiştir. Böylece, hücreler doğrudan temas etmeden aynı besiyeri ortamında bulunmuş ve parakrin sinyalleşme yoluyla karşılıklı etkilerini sürdürebilmiştir. Bu düzenleme, tümör mikroçevresini taklit eden bir ortamda hücreler arası dinamik ilişkiyi modelleme imkânı sunmuştur. Koşullu ortam (CM) modelinde ise farklılaştırılmış 3T3-

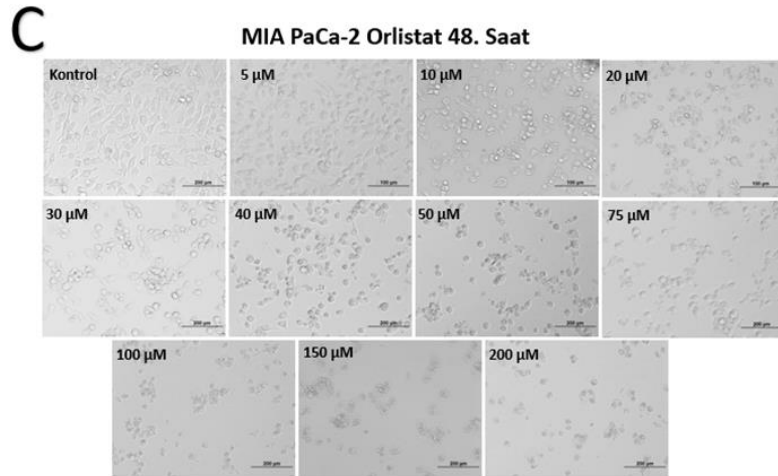
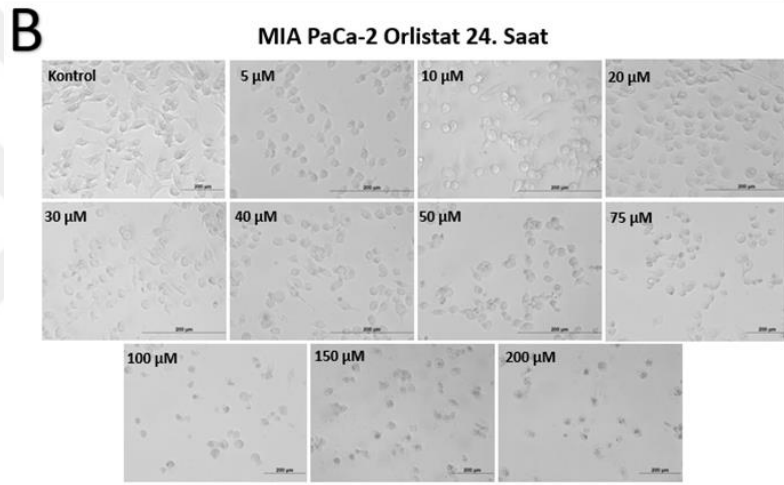
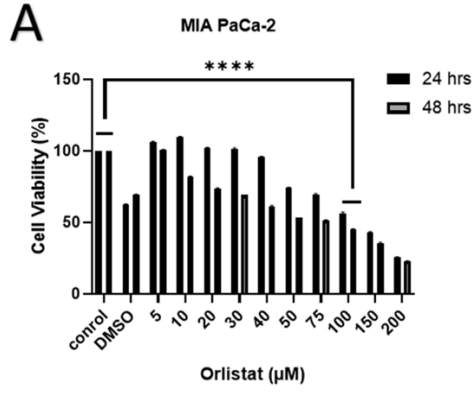
L1 hücreleri 60'lık petrilere kültürlenmiş, deneyden 24 saat önce medyaları değiştirilmiştir. Ardından, 24 saatlik inkübasyon sonrasında toplanan besiyeri santrifüj edilerek (500 xg'de 10 dk) ölü hücrelerden arındırılmış ve süpernatant filtre edilmiştir. Elde edilen koşullu besiyeri ("100 CM"), belirli oranlarda (%10, %25, %50 gibi) taze DMEM ile seyreltilmiş ve MIA PaCa-2 hücrelerine uygulanmıştır. Böylelikle, adipositlerin salgıladığı sitokin, adipokin ve lipit metaboliti gibi moleküllerin kanser hücreleri üzerindeki etkileri izole bir biçimde analiz edilebilecek şekilde hazırlanmıştır.

#### **4.3. MIA PaCa-2 pankreas kanseri hücrelerine ilgili doz/sürelerde Orlistat uygulanması, geçerli doz aralığının MTT testi ile belirlenmesi ve morfolojik incelemelerin yapılması**

MIA PaCa-2 pankreas kanseri hücrelerinde Orlistat tedavisinin sitotoksik etkisi, doz ve zamana bağlı olarak hücre canlılığı (MTT analizi) ile morfolojik değişiklikler üzerinden değerlendirilmiştir. Elde edilen bulgular, Orlistat'ın hem hücre canlılığını azalttığını hem de doza ve sürece bağlı şekilde hücre morfolojide bozulmalara yol açtığını göstermektedir. Orlistat'ın hücre canlılığı üzerindeki etkisi, 24 ve 48 saatlik uygulamalar sonrası MTT ile ölçülerek analiz edilmiştir. Düşük dozlar (5–20  $\mu$ M) ile 24 saatlik uygulamada hücre canlılığında anlamlı bir azalma gözlenmemiş, canlılık oranları %85–95 aralığında kalmıştır. Ancak bu gruplarda 48 saat sonunda canlılıkta azalma eğilimi başlamıştır. Orta dozlarda (30–50  $\mu$ M) ise her iki sürede de belirgin bir canlılık azalması kaydedilmiştir. Özellikle 48 saat sonunda 40  $\mu$ M ve 50  $\mu$ M Orlistat gruplarında canlılık oranı sırasıyla %55–60 ve %45–50 düzeylerine kadar düşmüştür. Yüksek doz grubunda (75–200  $\mu$ M) ise 24 saatlik uygulamada bile canlılık %40'ın altına gerilemiş; 48 saat sonunda ise 150  $\mu$ M ve 200  $\mu$ M uygulamalarında canlılık oranı %30'un altına düşmüştür (Şekil 4. 4A). Hücre canlılığını %50 seviyelerine kadar düşüren ve yalnızca 24 saat inkübasyon gerektiren doz olduğu için, sonraki tüm deneylerde MIA PaCa-2 hücrelerine "100  $\mu$ M Orlistat 24 saat inkübasyon" protokolü uygulanmıştır. Yapılan istatistiksel analiz sonucunda, doz ve zaman arasında anlamlı bir etkileşim tespit edilmiştir ( $p < 0.0001$ ) ve

bu bulgu Orlistat'ın sitotoksik etkisinin hem doza hem de uygulama süresine bağlı olduğunu ortaya koymaktadır.

Orlistat uygulamasına verilen hücresel yanıt, ışık mikroskobu ile yapılan morfolojik analizlerle görsel olarak desteklenmiştir (Şekil 4. 4B). 24 saat boyunca uygulanan düşük dozlarda (5–20  $\mu\text{M}$ ) hücrelerin yaygın, fibroblast benzeri yapıda ve sağlıklı morfolojide oldukları, hücre yoğunluğunda kayıp olmadığı gözlemlenmiştir. 30–50  $\mu\text{M}$  doz grubunda ise bazı hücrelerde sitoplazmik büzölmeler meydana gelmiştir. 50  $\mu\text{M}$  dozunda hücrelerin yer yer kümелendiği ve retrakt profiller sergilediği gözlenmiştir. 75  $\mu\text{M}$  ve üzerindeki dozlarda hücre yoğunluğunda bariz azalma meydana gelmiş, hücrelerin çoğunun yuvarlaklaştığı, zar bütünlüklerini kaybettiği ve bazı hücrelerde vakuol benzeri yapıların oluştuğu görülmüştür. 200  $\mu\text{M}$  grubunda ise neredeyse tüm hücreler morfolojik bozulma göstermiştir. 48 saatlik uygulamalarda (Şekil 4. 4C) 5–10  $\mu\text{M}$  doz grubunda hücre yapısının korunduğu ancak 24 saate kıyasla daha az yayılım ve daha fazla büzölme olduğu fark edilmiştir. 30–50  $\mu\text{M}$  dozlarında hücrelerin kompakt ve sferik yapıya dönüştüğü, yüzeydeki hücre sayısının azaldığı izlenmiştir. 75–200  $\mu\text{M}$  aralığında ise hücre ölümünün daha da arttığı, görüntülenen alanlarda canlı hücrelerin neredeyse kalmadığı ve hücre kalıntılarının belirginleştiği saptanmıştır. Bu morfolojik bulgular, MTT analiz verileri ile birebir örtüşmektedir.

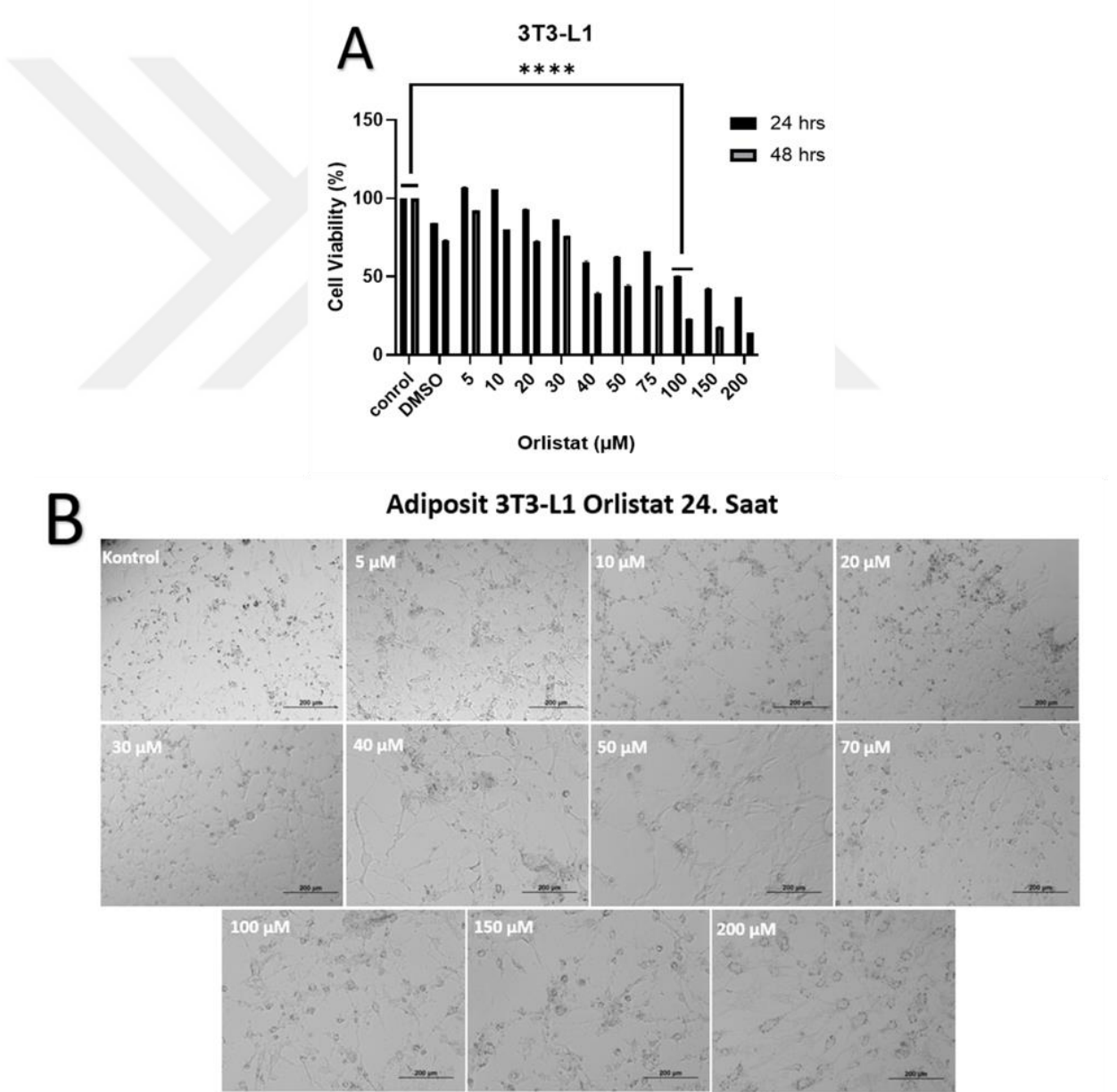


Şekil 4. 4 MIA PaCa-2 hücrelerinde farklı orlistat dozlarının hücre canlılığı ve morfoloji üzerindeki etkileri.

#### **4.4. Farklılaştırılmış 3T3-L1 olgun adiposit hücrelerine ilgili doz/sürelerde Orlistat uygulanması, geçerli doz aralığının MTT testi ile belirlenmesi ve morfolojik incelemelerin yapılması**

MIA PaCa-2 hücrelerinin ardından Orlistat'ın olgunlaşmış 3T3-L1 adiposit hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi, hem MTT hücre canlılığı analizi ile kantitatif olarak hem de ışık mikroskobu görüntüleri ile morfolojik düzeyde kapsamlı biçimde değerlendirilmiştir. Orlistat'ın 3T3-L1 hücre canlılığı üzerindeki etkisi, 24 saat ve 48 saat 5–200 µM aralığında uygulanarak MTT gerçekleştirilmiştir (Şekil 4. 5). Orlistat'ın 3T3-L1 hücre canlılığı üzerindeki etkisi, 24 saat ve 48 saat 5–200 µM aralığında uygulanarak MTT yöntemiyle değerlendirilmiştir. Sonuçlara bakıldığında kontrol ve DMSO gruplarında hücre canlılığı %100 düzeyinde korunmuş, DMSO'nun toksik etkisi gözlenmemiştir. 5–20 µM düşük dozlarda, 24-48 saatlik uygulamalarda canlılık ortalama %85–100 arasında seyretmiştir. 48 saat sonunda ise bu gruplarda hafif ama istatistiksel olarak anlamlı bir azalma eğilimi gözlenmiştir. 30–50 µM arası orta dozlarda, canlılık %60–80 aralığına düşmüş; bu dozlar hücre çoğalmasını baskılayıcı ve metabolik stres oluşturucu etki göstermeye başlamıştır. 75–100 µM dozlarında, canlılık oranı 24 saat sonunda %40–60 arasında değişmiş, 48 saatte ise bu oran %25–35'e kadar gerilemiştir. 150–200 µM yüksek dozlarda, canlılık her iki sürede de %20'nin altına düşmüş, bu durum orlistatın adiposit hücrelerinde doza bağlı toksik etki oluşturduğunu göstermiştir. MIA PaCa-2 hücrelerinde olduğu gibi hücre canlılığını %50 civarına kadar azaltabilen ve deney süreci bakımından en az inkübasyona sahip olan (24h) ve MIA PaCa-2 hücrelerinin aynı dozuna denk geldiği için 3T3-L1 hücreleri için de ileri deneylerde tüm orlistat uygulamaları “100 µM Orlistat 24 saat inkübasyon” olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. İstatistiksel analiz sonucunda doz ve zaman faktörleri arasında anlamlı etkileşim bulunduğu görülmüştür ( $p < 0.0001$ ). Orlistat uygulamasının ardından farklı dozlarda hücre morfolojisinde meydana gelen değişiklikler 24 saat sonunda ışık mikroskobu ile değerlendirilmiştir (Şekil 4. 5B). Kontrol grubunda hücrelerin düzgün yayılım gösterdiği, membran yapıları bütünlüğünün bozulmadığı, hücre yoğunluğunun yüksek, morfolojinin yuvarlak/ fibroblast benzeri yapıda olduğu görülmüştür. 30 µM dozundan sonra ise bazı hücrelerde sitoplazmik büzölmeler, kısmi yuvarlaklaşmalar başlamış; hücre arası bağlantılarda kopmalar gözlenmiştir. Hücre sayısında azalma görülmektedir. 40–50 µM dozlarında hücre zarında

düzensizlikler ve hücre şekillerinde deformasyonlar gözlenmektedir. 75  $\mu\text{M}$  ve üzeri doz gruplarında ise hücreler büyük oranda morfolojik bütünlüğünü kaybetmiş, hücre membranları bozulmuş ve hücreler dağınık hale gelmiştir. Özellikle 150–200  $\mu\text{M}$  gruplarında hücre kalıntıları artmış, canlı hücre oranı mikroskopik olarak da belirgin biçimde azalmıştır. Bu morfolojik bulgular, MTT analizinde elde edilen canlılık oranlarıyla tutarlılık göstermekte ve Orlistat'ın adiposit hücrelerinde doza bağlı olarak morfolojik dejenerasyon oluşturduğunu ortaya koymaktadır.



Şekil 4. 5 3T3-L1 hücrelerinde farklı orlistat dozlarının hücre canlılığı ve morfoloji üzerindeki etkileri.

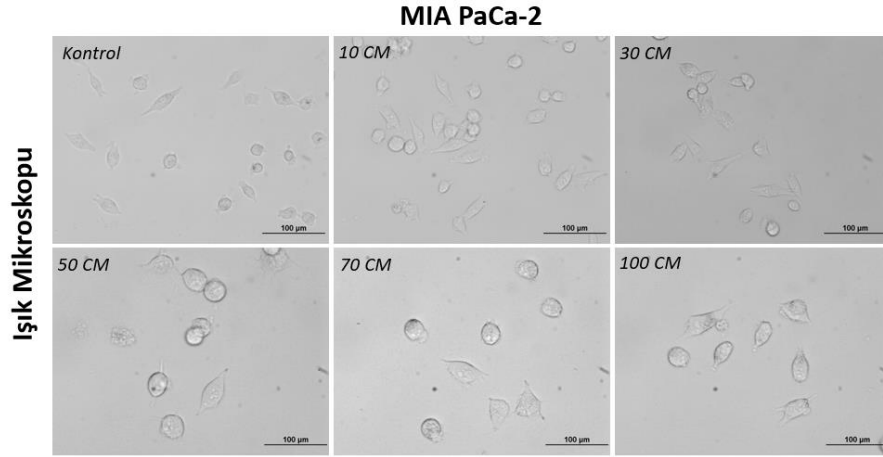
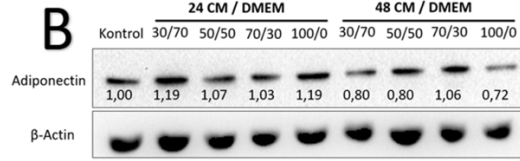
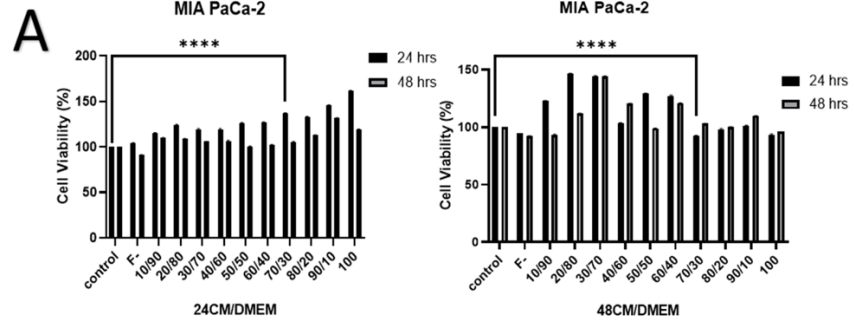
#### **4.5. MIA PaCa-2 pankreas kanseri hücrelerine ilgili doz ve sürelerde CM uygulaması yapılması, MTT analizi ve Oil Red O Tayini ile moleküler analizler**

Adiposit hücrelerinden elde edilen koşullu medyanın (CM) MIA PaCa-2 hücreleri üzerindeki etkisi, farklı oranlarda ve sürelerde uygulanarak hücre canlılığı (MTT) ve morfoloji düzeyinde değerlendirilmiştir. 24CM ve 48CM olarak adlandırılan grupta 3T3-L1 farklılaştırma sürecinden sonra hücreler üzerinde 24 saat ve 48 saat bekletilen medyalardan CM eldesi yapılarak bu sürenin de MIA PaCa-2 hücreleri üzerindeki etkisi incelenmek istenmiştir (Şekil 4. 6A).

MIA PaCa-2 hücrelerine, 3T3-L1 adipositlerinden elde edilen koşullu ortam (CM) farklı oranlarda (CM/DMEM, %10–100) uygulanmış ve hücre canlılığı 24 saat ve 48 saat sürelerle MTT yöntemiyle değerlendirilmiştir. MTT analizi sonuçları, CM'nin tümör hücreleri üzerindeki biyolojik etkilerinin hem doz oranına hem de inkübasyon süresine bağlı olduğunu ortaya koymuştur. 24 saatlik uygulama süresi sonunda, özellikle %30/70, %50/50 ve %70/30 CM/DMEM oranlarında, MIA PaCa-2 hücre canlılığı kontrol grubuna kıyasla anlamlı şekilde artış göstermiştir ( $p < 0.0001$ ) (Şekil 4. 6A). Bu durum, adipositlerin salgıladığı adipokinler, yağ asitleri ve büyüme faktörlerinin tümör hücrelerinde proliferasyonu teşvik edici rol oynadığını düşündürmektedir. %100 CM uygulamasında, 24 saatlik sürede canlılık hâlâ yüksek olmakla birlikte plato düzeyine ulaşmıştır (Şekil 4. 6A); bu, belirli bir yoğunluğun ötesinde hücrelerin ek uyarana yanıt vermemesi veya adaptif mekanizmaların devreye girmesiyle açıklanabilir. 48 saatlik uygulama süresinde, benzer bir proliferatif etki gözlenmiş olsa da yüksek CM oranlarında (özellikle %100), canlılıkta düşüş başlamıştır. Bu durum, aşırı sekretom etkisinin hücreleri metabolik strese sokabileceğini düşündürmektedir. Yapılan morfolojik incelemelerde ise uygulanan CM dozlarının hücreler olan etkisinin MTT verileriyle örtüştüğü, hücre canlılık düzeylerinin 10-100 CM dozu aralığında negatif yönde etkilenmediği gözlemlenmiştir (Şekil 4. 6).

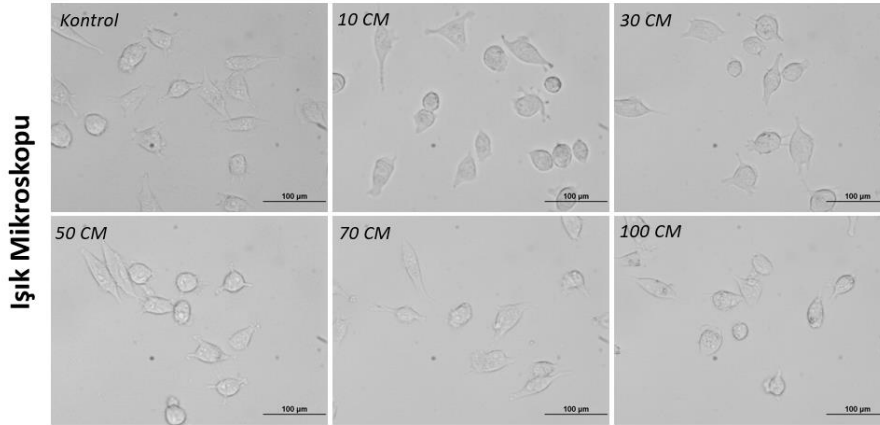
Western blot analizi ise koşullu ortam uygulamasının adiponektin ekspresyonunu nasıl etkilediğini ortaya koymuştur (Şekil 4. 6B). 24 saatlik gruplarda, %30–70 CM oranlarında

adiponektin düzeyi kontrol grubuna kıyasla hafif artış göstermiştir (örneğin %50 CM grubunda 1.19 kat artış). Bu artış, CM içeriğindeki adiposit kaynaklı faktörlerin tümör hücrelerinde adiponektin ekspresyonunu indükleyebileceğini düşündürmektedir. Ancak 48 saatlik inkübasyonda, özellikle yüksek CM gruplarında (70/30 ve 100/0), adiponektin düzeyi kontrol seviyesinin altına düşmüştür (örneğin 100/0 grubunda 0,72). Bu sonuç, yüksek dozda ve uzun süreli adiposit etkisinin tümör hücresinde negatif geri bildirim yolaklarını aktive ederek adiponektin ekspresyonunu baskılamış olabileceğine işaret etmektedir. Bu sonuçlar doğrultusunda CM içeriği yüksek olduğu halde hücre canlılığına etkisinin negatif yönde görülmediği doz olan “70/30 CM/DMEM oranlı 24 saat inkübasyon” prosedürü ileri deneyler için uygun görülmüştür.



**24 CM 24.Saat**

**MIA PaCa-2**



**48 CM 24.Saat**

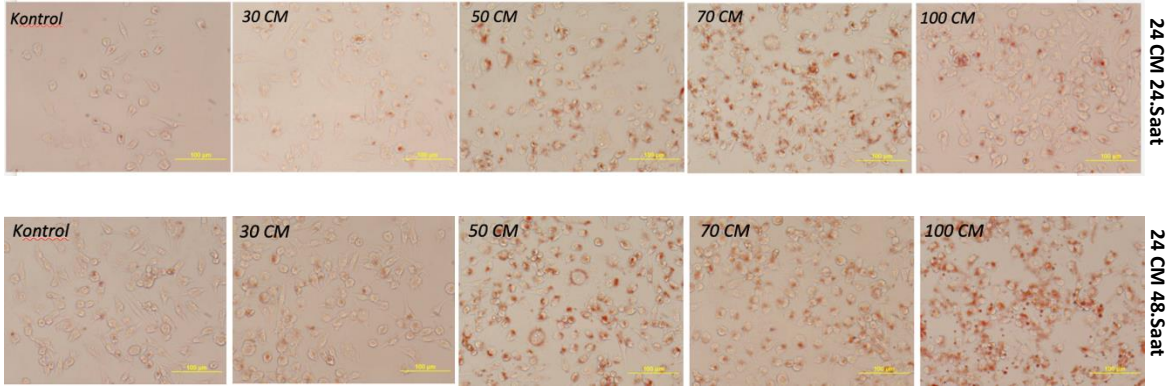
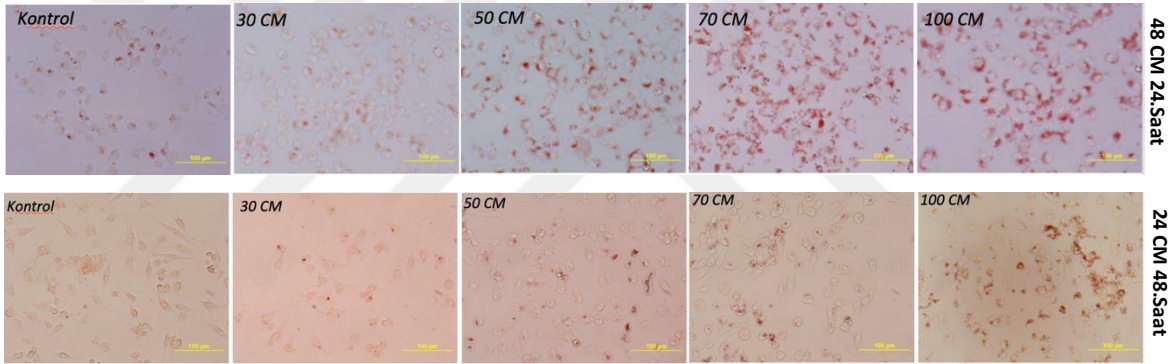
Şekil 4. 6 3T3-L1'den elde edilen koşullandırılmış medyumun (CM) MIA PaCa-2 hücreleri üzerindeki etkileri.

Adiposit kaynaklı koşullu ortamın (CM), MIA PaCa-2 pankreas kanseri hücrelerinde lipit birikimi üzerine etkisi, Oil Red O boyama yöntemiyle değerlendirilmiştir (

Şekil 4. 7A ve 16B). Boyama yöntemi, nötral lipitlerin ve trigliserit içeren damlacıkların görselleştirilmesine olanak sağlayarak, CM'nin kanser hücresi metabolizması üzerindeki etkisini morfolojik düzeyde ortaya koymuştur. 24CM ve 48CM gruplarında, 24 saatlik inkübasyonun ardından artan CM oranı ile lipit birikiminde belirgin artış gözlenmiştir. Kontrol gruplarında, hücreler yayılmış morfolojide ve zayıf düzeyde Oil Red O boyaması göstermektedir; bu durum düşük bazal lipit seviyelerine işaret etmektedir. %30 ve %50 CM uygulamalarında, hücre içi lipit damlacıkları orta düzeyde artış göstermiştir. %70 ve %100 CM oranlarında, hücrelerin sitoplazmasında belirgin şekilde koyu kırmızı boyanmış lipit yapılar gözlenmiştir. Lipit birikimi, hücre popülasyonunun büyük bir kısmında yaygın olarak izlenmiş, CM oranıyla doğru orantılı şekilde artmıştır (

Şekil 4. 7A). Bu bulgular, kısa süreli (24 saatlik) CM maruziyetinin bile tümör hücrelerinde lipit metabolizmasını aktive ettiğini ve lipogenez/yağ asidi alımı ile ilişkili süreçleri uyardığını düşündürmektedir. Bunun yanı sıra 48 saatlik inkübasyon, lipit birikimi düzeylerinde daha belirgin bir artışa yol açmıştır (

Şekil 4. 7). Hem 24CM hem de 48CM gruplarında, kontrol gruplarına kıyasla lipit birikimi yüksek düzeyde artmış; boyanmış alanlar daha geniş ve yoğun hale gelmiştir. Özellikle 24 saat 48 CM %70 ve %100 CM gruplarında, lipit damlacıkları hem boyutsal olarak büyümüş hem de sayıca artış göstermiştir.

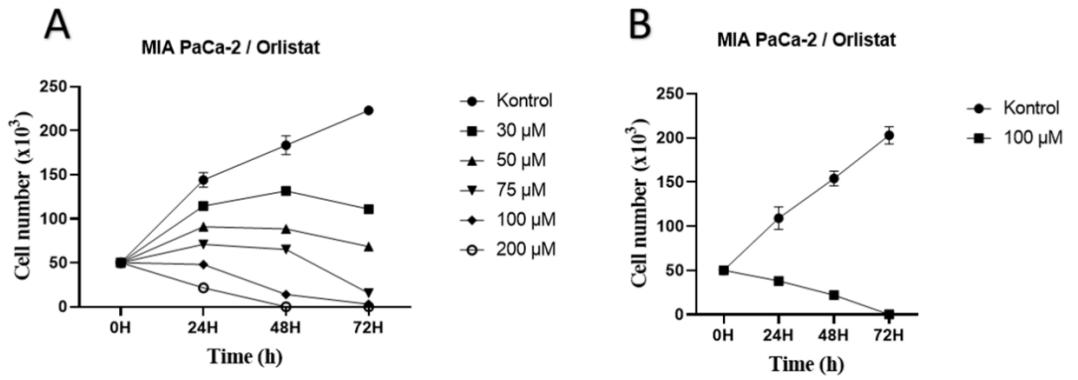
**A****B**

Şekil 4. 7 3T3-L1 koşullandırılmış medyum (CM) uygulaması sonrası MIA PaCa-2 hücrelerinde lipid birikiminin Oil Red O boyası ile gösterimi.

#### **4.6. MIA PaCa-2 pankreas kanseri hücrelerine ilgili doz ve sürelerde Orlistat-CM uygulaması ve Tripan mavisi hücre sağ kalım/ büyüme testi**

Orlistat'ın pankreas kanseri hücre hattı MIA PaCa-2 üzerindeki hücre çoğalmasını baskılayıcı etkisi, doz ve zamana bağlı olarak detaylı biçimde incelenmiştir. Hücrelerin proliferatif kapasitesi hem manuel sayımlarla nicel olarak hem de mikroskopik görüntülerle morfolojik açıdan değerlendirilmiştir. Farklı Orlistat konsantrasyonları (30–200 µM) ile muamele edilen MIA PaCa-2 hücrelerinde zaman içerisindeki çoğalma eğilimleri analiz edilmiştir (Şekil 4. 8A).

Kontrol grubunda, hücre sayısı 72 saat boyunca düzenli olarak artarak sağlıklı bir proliferasyon sergilemiştir. 30 ve 50  $\mu\text{M}$  Orlistat uygulamaları hücre büyümesini kısmen baskılamış, ancak tamamen durdurmamıştır; hücre sayısında zamanla hafif bir artış gözlenmeye devam etmiştir. 75  $\mu\text{M}$  dozda ise çoğalma daha belirgin biçimde engellenmiş, özellikle 48. saatten sonra hücre sayısında ciddi bir artış görülmemiştir. 100 ve 200  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarında ise hücre sayısı zamanla artmamış, aksine 48 ve 72 saat sonunda azalmıştır. Bu durum, yüksek doz Orlistat'ın sadece proliferasyonu baskılamakla kalmayıp, aynı zamanda hücre ölümünü tetikleyici sitotoksik bir etki gösterdiğini düşündürmektedir. Özellikle 100  $\mu\text{M}$  doz, hücre çoğalmasını tamamen durdurarak MIA PaCa-2 hücrelerinin büyümesini etkili bir şekilde engellemiştir (Şekil 4. 8B).



Şekil 4. 8 MIA PaCa-2 hücrelerinde farklı orlistat dozlarının büyüme üzerine etkisinin değerlendirilmesi.

#### 4.7. MIA PaCa-2 pankreas kanseri hücrelerine ilgili doz ve sürelerde Orlistat-CM-Co-Culture uygulaması ve Floresan Boyama Tayinleri

Orlistat'ın MIA PaCa-2 pankreas kanseri hücrelerinde hücre ölümüne bağlı biyolojik mekanizmaları nasıl etkilediği, DiOC<sub>6</sub>, DAPI ve PI boyamaları ile floresan mikroskopi kullanılarak araştırılmıştır (Şekil 4. 9A). Kontrol grubunda, DiOC<sub>6</sub> boyasıyla tüm hücrelerde yoğun yeşil floresan sinyali gözlemlenmiş; bu da hücrelerin büyük kısmında mitokondri zar potansiyelinin korunduğunu, yani hücrelerin sağlıklı olduğunu

göstermektedir. 50  $\mu$ M Orlistat uygulanan hücrelerde, hücre sayısında hafif bir azalma ve DiOC<sub>6</sub> floresanında kısmi bir zayıflama görülmüş; bu da mitokondriyal hasarın başladığını fakat tüm hücreleri etkilemediğini düşündürmektedir. 75 ve 100  $\mu$ M dozlarında ise DiOC<sub>6</sub> floresan şiddeti bariz şekilde düşmüş, bu durum mitokondri zar bütünlüğünün bozulduğunu ve enerji üretiminin engellenerek hücre ölümünün tetiklendiğini göstermektedir.

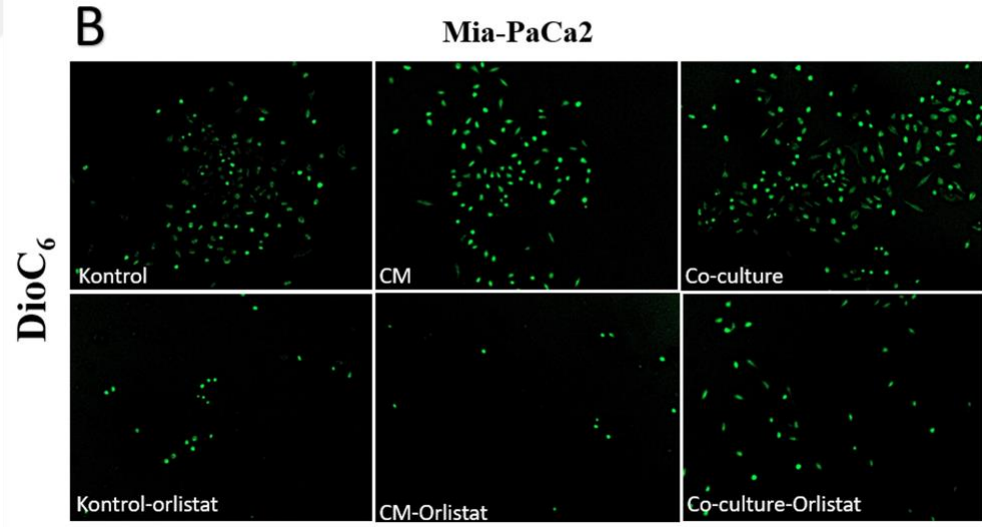
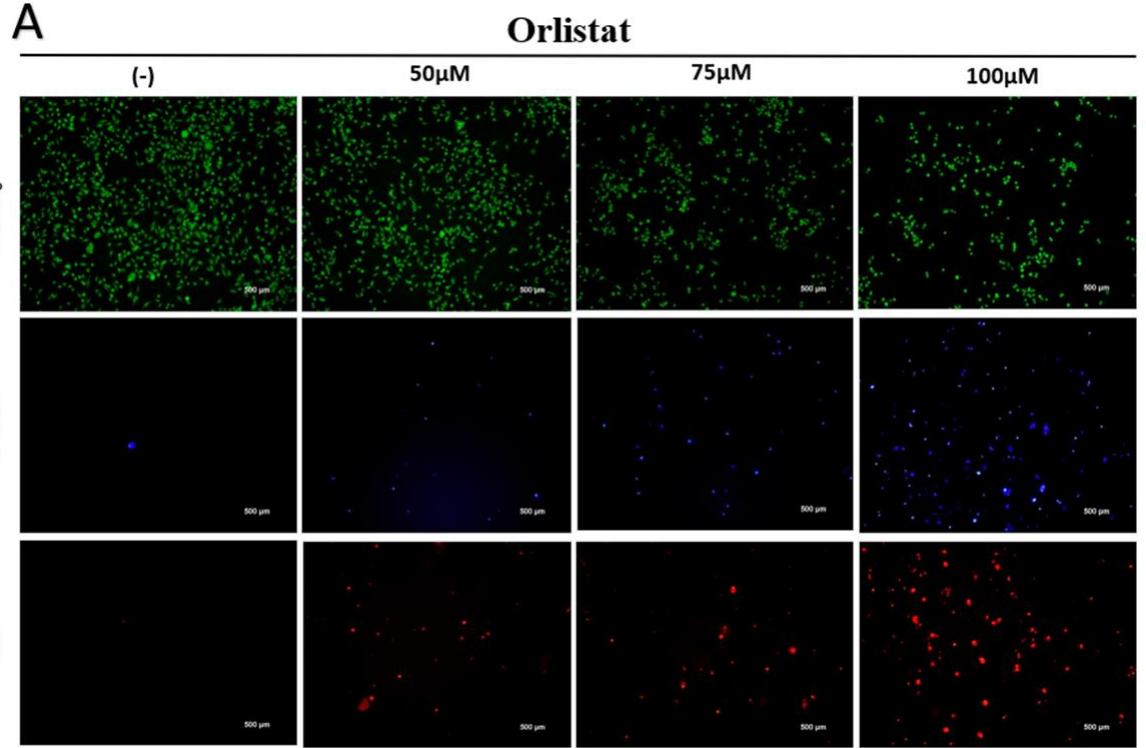
Kontrol grubunda DAPI boyasıyla sadece birkaç çekirdeğin işaretlendiği görülmüş; bu da hücrelerin normal çekirdek yapısını koruduğuna işaret etmektedir. Ancak Orlistat uygulanan gruplarda, özellikle 75 ve 100  $\mu$ M dozlarında, DAPI floresan sinyali artmış ve çekirdeklerde yoğunlaşma ile parçalanma (DNA kondensasyonu ve nükleer fragmentasyon) belirginleşmiştir. Bu değişiklikler, apoptozun erken ve orta evreleri ile uyumludur. PI boyaması ise kontrol grubunda oldukça sınırlı kalmış ve canlı hücre zar bütünlüğünün korunduğunu yansıtmıştır. 50  $\mu$ M Orlistat ile muamele edilen hücrelerde PI pozitif hücre sayısı hafifçe artarken, 75 ve özellikle 100  $\mu$ M dozlarında PI sinyali belirgin şekilde yükselmiş; bu da hücre ölümünün ileri evrelerine (geç apoptoz veya nekroz) işaret etmektedir (Şekil 4. 9A).

Pankreas tümör mikroçevresine özgü koşulların, Orlistat'a karşı gelişen mitokondriyal yanıt üzerindeki etkisi ise DiOC<sub>6</sub> boyası ile değerlendirilmiştir (Şekil 4. 9B). Bu analiz; doğrudan Orlistat etkisi ile birlikte, koşullu ortam (CM) ve ko-kültür gibi mikroçevresel etkenlerin bu etkiyi nasıl değiştirdiğini ortaya koymak amacıyla yapılmıştır. Kontrol grubundaki hücreler yoğun ve yaygın yeşil floresan vererek yüksek mitokondriyal aktivite göstermiştir. CM ve Ko-kültür grupları da benzer şekilde veya daha yüksek DiOC<sub>6</sub> sinyali sergilemiş; bu da adipositlerden salınan faktörlerin mitokondri fonksiyonlarını destekleyebileceğini düşündürmektedir. Özellikle ko-kültür grubunda, hücreler geniş bir alana yayılmış homojen yeşil sinyalle görüntülenmiş ve bu durum ko-kültür ortamının hücre metabolizmasını canlı tuttuğunu göstermiştir.

Kontrol + Orlistat grubunda ise DiOC<sub>6</sub> sinyali anlamlı derecede azalmıştır; bu durum Orlistat'ın mitokondri zar potansiyelini bozarak apoptoz sürecini başlattığını göstermektedir. CM + Orlistat grubunda yeşil floresan azalmış olsa da bu azalma kontrol + Orlistat grubuna göre daha sınırlı kalmıştır. Bu da koşullu ortamda yer alan bazı

adipokinlerin, hücreleri mitokondriyal stres kaynaklı ölüme karşı kısmen koruyabileceğini düşündürmektedir. Ko-kültür + Orlistat grubunda ise DiOC<sub>6</sub> pozitif hücre sayısı gözle görülür şekilde azalmıştır; bu da Orlistat'ın, mikroçevresel hücre-hücre etkileşimleri varlığında bile mitokondri zar bütünlüğünü bozarak hücre ölümünü etkin biçimde başlattığını göstermektedir (Şekil 4. 9B).

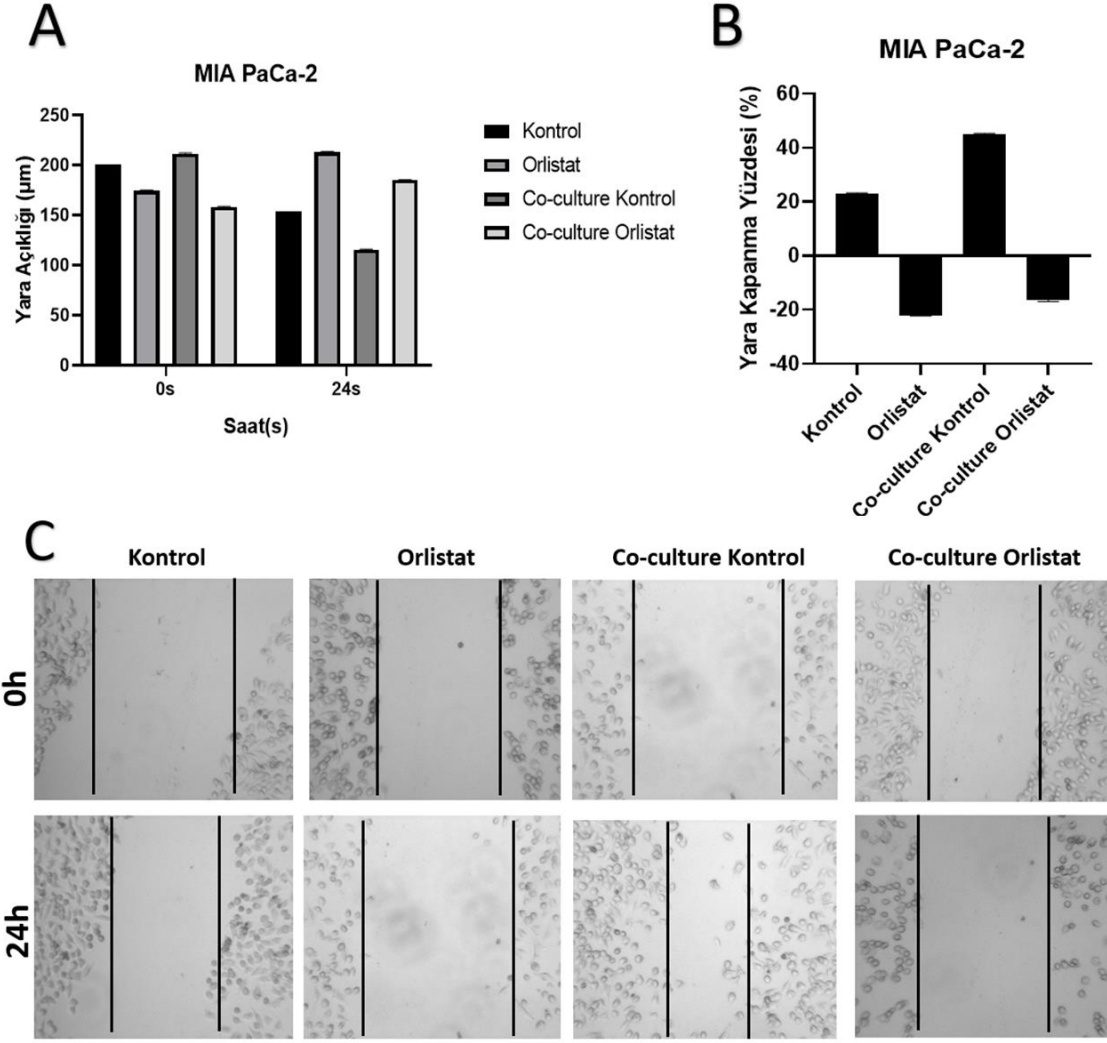




Şekil 4. 9 MIA PaCa-2 hücrelerinde orlistat ve 3T3-L1 koşullandırılmış medyum (CM) uygulamaları sonrası floresan boyamalarla yapılan hücresel analiz.

#### **4.8. MIA PaCa-2 pankreas kanseri hücrelerine ilgili doz ve sürelerde Orlistat-Co-Culture uygulaması ve Testi Yara Kapanması/ Migrasyon**

Wound healing (yara iyileşme) analizi, MIA PaCa-2 pankreas kanseri hücrelerinin göç potansiyelini değerlendirmek amacıyla uygulanmıştır (Şekil 4. 10A-B-C). 0 saat ve 24. saatte yara açıklığının mikrometre ( $\mu\text{m}$ ) cinsinden ölçümü (Şekil 4. 10A)'da gösterilmiş. Aynı zaman noktalarında yara kapanma yüzdesinin hesaplanarak gruplar arası karşılaştırılması (Şekil 4. 10B)'de gösterilmiştir. Her gruba ait 0 saat ve 24 saat sonrası mikroskop görüntüleri (Şekil 4. 10)'de gösterilmektedir. Kontrol grubunda 24 saat sonunda yara alanı önemli ölçüde kapanmış, hücre migrasyonu gerçekleşmiştir. Buna karşılık, orlistat uygulanan grupta yara alanında anlamlı bir kapanma izlenmemiş, hatta bazı bölgelerde hücrelerin geri çekildiği gözlenmiştir; bu da orlistatın hücre göçünü baskıladığını göstermektedir. Ko-kültür kontrol grubunda, yara kapanması en yüksek düzeyde gerçekleşmiş, bu da adiposit kaynaklı parakrin faktörlerin tümör hücresi migrasyonunu desteklediğini düşündürmektedir. Ancak Ko-kültür + Orlistat grubunda, orlistat bu artmış motiliteyi baskılayarak yara alanının büyük ölçüde açık kalmasına neden olmuştur. Bu bulgular, orlistatın hem doğrudan hem de adiposit-ilişkili göçü inhibe edebildiğini göstermektedir.

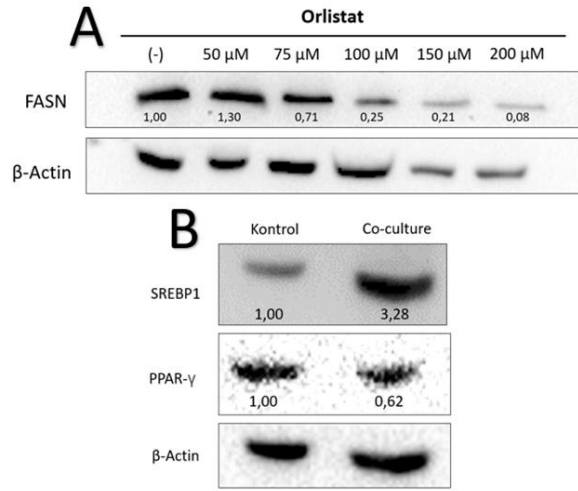


Şekil 4. 10 MIA PaCa-2 hücrelerinde kontrol, orlistat, ko-kültür ve ko-kültür + orlistat uygulamaları sonrası yara iyileşme (wound healing) analizinin değerlendirilmesi.

#### 4.9. MIA PaCa-2 pankreas kanseri hücrelerine ilgili doz ve sürelerde Orlistat-Co-Culture uygulaması ve protein ekspresyonlarına etkisi

Orlistat'ın MIA PaCa-2 hücrelerinde FASN proteini üzerindeki etkisi, doz bağımlı olarak Western blot analiziyle değerlendirilmiştir. MIA PaCa-2 hücrelerine artan dozlarda orlistat (50–200  $\mu$ M) uygulanmasının ardından Western blot yöntemiyle FASN (Fatty

Acid Synthase) proteininin ekspresyon düzeyi analiz edilmiştir (A).  $\beta$ -Actin iç kontrol olarak kullanılmıştır. Bant yoğunluklarının normalize edilmiş göreceli ifadeleri her bir örnek altında verilmiştir. 100  $\mu$ M ve üzerindeki dozlarda FASN protein seviyesinin belirgin şekilde azaldığı görülmüştür. Düşük doz (50  $\mu$ M) orlistat uygulaması sonrasında FASN ekspresyonu hafifçe artmıştır (1,30 kat), bu durum geri besleme kompanzasyonunu düşündürülebilir. 75  $\mu$ M dozda bu etki baskılanmış, FASN ekspresyonu kontrol seviyesinin altına inmiştir (0,71 kat). 100  $\mu$ M ve üzerindeki dozlarda, FASN protein düzeyi oldukça azalmış ve özellikle 200  $\mu$ M'de neredeyse saptanamaz seviyeye inmiştir (0,08 kat). Bu sonuçlar, orlistat'ın yüksek dozlarda FASN enzimini etkili biçimde inhibe ettiğini doğrulamaktadır.



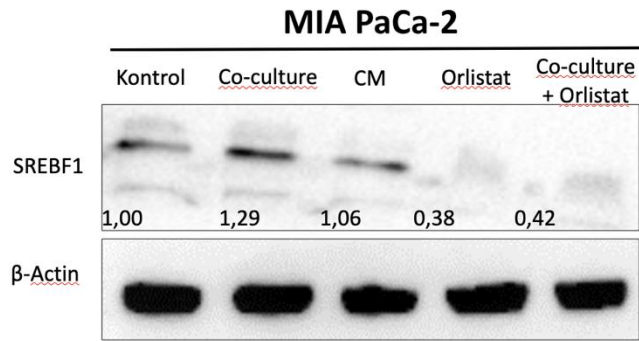
Şekil 4. 11 MIA PaCa-2 hücrelerinde lipogenezle ilişkili proteinlerin western blot analizi

MIA PaCa-2 hücreleri, 3T3-L1 adipositleri ile ko-kültür ortamında yetiştirildikten sonra Western blot yöntemi ile lipogenez ve farklılaşma belirteçlerinden SREBP1 ve PPAR- $\gamma$  proteinlerinin ekspresyon düzeyleri analiz edilmiştir (Şekil 4. 10B).  $\beta$ -Actin iç kontrol olarak kullanılmıştır. SREBP1 protein ekspresyonu ko-kültür grubunda artarak kontrol grubuna kıyasla 3,28 kat yükselmiştir. Bu durum, adipositlerle kurulan hücresel iletişimin kanser hücrelerinde lipit biyosentezinin aktivasyonunu uyardığını göstermektedir. Hem adipogenez hem de lipit homeostazında görev alan, çoğu zaman anti-proliferatif etkileriyle bilinen bir çekirdek reseptörü olan PPAR- $\gamma$  seviyesi ko-kültür ortamında

kontrol grubuna göre %38 azalmıştır. Bu azalma, kanser hücrelerinin diferansiyasyondan uzaklaştığını, daha agresif bir fenotipe geçiş yaptığını ve lipid metabolizmasının pro-onkojenik yönde yeniden programlandığını göstermektedir.

#### 4.10. MIA PaCa-2 Pankreas Kanseri Hücrelerinde Farklı Mikroçevre Koşullarında (Ko-kültür, CM, Orlistat) SREBF1 ve FASN Gen Ekspresyonunun Değerlendirilmesi

Orlistat ve farklı kültür koşullarının MIA PaCa-2 hücrelerinde SREBP1 proteini üzerindeki etkisi Western blot analizi ile değerlendirilmiştir (Şekil 4. 12). SREBP1 protein düzeyleri kontrol, ko-kültür, koşullandırılmış ortam (CM), orlistat ve ko-kültür + orlistat gruplarında karşılaştırılmıştır. Bant yoğunluklarının normalize edilmiş göreceli ifadeleri sırasıyla 1 (kontrol), 1,29 (ko-kültür), 1,06 (CM), 0,38 (orlistat) ve 0,42 (ko-kültür + orlistat) olarak bulunmuştur. Ko-kültür uygulaması SREBP1 ekspresyonunda artışa neden olurken, orlistat tedavisi belirgin bir azalma göstermiştir. Ayrıca orlistatın ko-kültür ortamında da SREBP1 protein düzeylerini baskıladığı gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar, orlistatın SREBP1 protein ekspresyonunu etkili şekilde inhibe ettiğini göstermektedir.

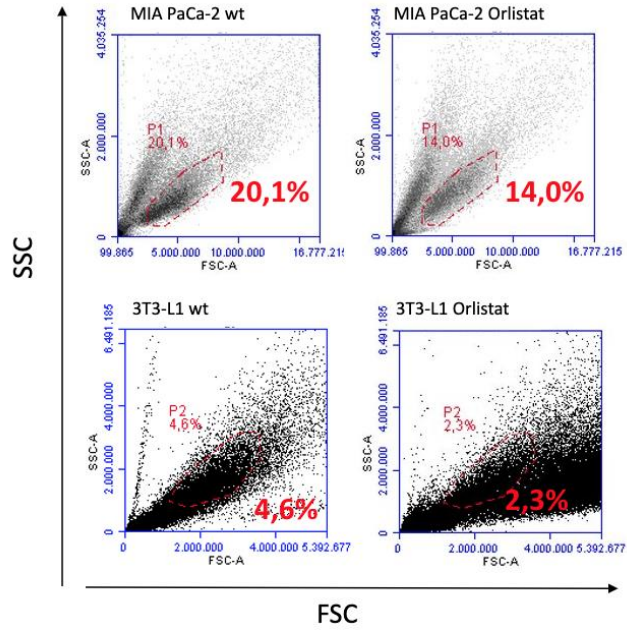
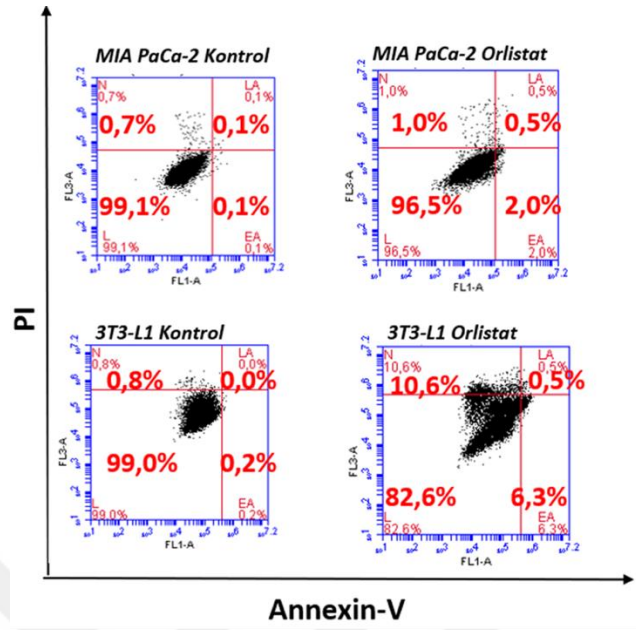


Şekil 4. 12 MIA PaCa-2 hücrelerinde farklı koşullarda SREBP1 protein ekspresyonunun western blot analizi.

#### **4.11. MIA PaCa-2 pankreas kanseri hücrelerine ve farklılaştırılmış 3T3-L1 olgun adiposit hücrelerine ilgili doz ve sürelerde Orlistat uygulaması ve Akış Sitometresi FITC-Annexin V/ PI boyaması ile apoptoz tayini**

Apoptoz ve nekroz gibi programlı hücre ölüm süreçlerinin orlistat tarafından nasıl etkilendiğini değerlendirmek amacıyla, MIA PaCa-2 pankreas kanseri hücreleri ve 3T3-L1 olgun adiposit hücreleri Annexin V/PI boyaması ile analiz edilmiştir. Annexin V-FITC ve Propidyum İyodür (PI) ile çift boyama yapılarak, MIA PaCa-2 (üst panel) ve 3T3-L1 (alt panel) hücrelerinin kontrol ve orlistat (100 µM) uygulama sonrası apoptoz ve nekroz profilleri değerlendirilmiştir (Şekil 4. 4A). Grafikte sağ alt kadran (Annexin-V<sup>+</sup> / PI<sup>-</sup>) erken apoptoz, sağ üst kadran (Annexin-V<sup>+</sup> / PI<sup>+</sup>) geç apoptoz/sekonder nekroz, sol üst kadran (Annexin-V<sup>-</sup> / PI<sup>+</sup>) primer nekroz ve sol alt kadran (çift negatif) canlı hücre popülasyonunu temsil etmektedir. MIA PaCa-2 hücrelerinde kontrol grubunda, hücrelerin %99,1'i canlı (Annexin V<sup>-</sup> / PI<sup>-</sup>) olarak tespit edilmiş, erken veya geç apoptotik hücre oranı oldukça düşük olarak gözlemlenmiştir (%0,7 + %0,1). Orlistat uygulamasından sonra, canlı hücre oranı %96,5'e düşerken, erken apoptoz oranı %2,0 ve geç apoptoz oranı %0,5'e yükselmiştir. Nekrotik hücre oranı (%1,0), kontrol grubuna göre artış gösterse de düşük düzeyde kalmıştır, bu da orlistatın MIA PaCa-2 hücrelerinde öncelikli olarak apoptozu aktive ettiğini desteklemektedir.

3T3-L1 hücrelerinde ise kontrol grubunda, hücrelerin %99,0'ı canlı ve sadece %0,8'i erken apoptotik popülasyona aitken orlistat uygulanan grupta, canlı hücre oranı %82,6'ya düşmüştür. Bu grupta erken apoptoz oranı %6,3, geç apoptoz/sekonder nekroz oranı %0,5 ve özellikle nekrotik hücre oranı %10,6 olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar, orlistatın 3T3-L1 adipositleri üzerinde MIA PaCa-2 hücrelerine göre daha yüksek toksisite oluşturduğunu ve özellikle nekrotik hücre ölümünü belirgin şekilde indüklediğini ortaya koymaktadır.



Şekil 4. 13 100  $\mu$ M orlistat uygulaması sonrası MIA PaCa-2 ve 3T3-L1 hücrelerinde Annexin V/PI boyası ile apoptoz ve nekroz analizi.

## 5. TARTIŞMA

Bu çalışmanın ilk aşamasında, 3T3-L1 preadipositlerinin olgun adipositlere farklılaştırılması yoluyla in vitro adipogenez modeli oluşturulması hedeflenmiştir. 3T3-L1 hücre hattı, yüksek farklılaşma kapasitesi ve in vivo adiposit gelişiminin birçok yönünü taklit edebilme yeteneği sayesinde adipogenez çalışmaları için literatürde en yaygın kullanılan modellerden biridir. Farklılaşma, insülin, deksametazon ve IBMX (3-izobütill-1-metilsantin) içeren klasik hormonal karışım solüsyonu ile indüklenmiştir. Bu kombinasyonun, adipogenez sürecini başlatan genetik yolları etkin şekilde aktive ettiği literatürde birçok çalışmayla gösterilmiştir (Zebisch et al, 2012).

Farklılaşma süreci boyunca yapılan morfolojik incelemeler, olgun adipositlere özgü karakteristik değişimleri ortaya koymuştur. Işık mikroskobu altında hücrelerin fibroblast benzeri uzun yapılarından daha yuvarlak ve hacimli bir morfolojiye geçtikleri ve sitoplazmalarında vakuol benzeri yapılar olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4). Lipid birikimini doğrulamak amacıyla iki tamamlayıcı boyama yöntemi kullanılmıştır. BODIPY, nötral lipidlere özgü floresan bağlanma yeteneği sayesinde farklılaşmış hücrelerde yoğun lipid damlacıkları varlığını göstermiştir. Ayrıca, geleneksel bir histolojik boyama yöntemi olan Oil Red O, trigliserit ve nötral lipid birikimini doğrulamış ve farklılaşmış hücrelerde yaygın lipid akümülyasyonunu ortaya koymuştur (Şekil 4). Bu iki yöntemle elde edilen sonuçlar, adipogenez sürecinin başarıyla gerçekleştiğini fenotipik düzeyde açıkça göstermektedir.

Farklılaşmayı moleküler düzeyde doğrulamak amacıyla, adipositlerin geç evre belirteçlerinden biri olan Fatty Acid Binding Protein 4 (FABP4)'ün protein düzeydeki ekspresyonu Western blot yöntemi ile analiz edilmiştir. FABP4, yağ asidi taşınması ve depolanmasında görev alan sitoplazmik bir proteindir ve olgunlaşmış adipositlerin karakteristik bir göstergesi olarak kabul edilmektedir (Guru, Ajay, et al., 2020). Western blot analizinde elde edilen bant yoğunluklarının densitometrik değerlendirilmesi sonucunda, FABP4 protein ekspresyonunun farklılaşmış hücrelerde kontrol grubuna göre

yaklaşık 30 kat arttığı belirlenmiştir. Bu güçlü artış, adipogenez sırasında spesifik gen yollarının etkili bir şekilde aktive olduğunu ve terminal farklılaşmanın başarıyla gerçekleştiğini göstermektedir. Literatürde de benzer şekilde, farklılaşmış 3T3-L1 hücrelerinde FABP4 ekspresyonunun anlamlı düzeyde arttığı ve bu proteinin güvenilir bir moleküler belirteç olarak kullanıldığı birçok çalışmada bildirilmiştir (M.Kang et al ,2013)

Sonuç olarak; morfolojik değerlendirmeler, boyama analizleri ve protein ekspresyon verileri bir arada ele alındığında, 3T3-L1 preadipositlerinin başarılı bir şekilde olgun adipositlere farklılaştığı açıkça ortaya konmuştur. Bu doğrulanmış in vitro adiposit modeli, çalışmanın sonraki aşamalarında elde edilen adiposit koşullandırılmış medyumunun pankreas kanseri hücreleri üzerindeki etkilerinin incelenmesi açısından güçlü bir temel oluşturmuştur.

Adipositlerin tümör mikroçevresindeki (TMÇ) rolünü değerlendirebilmek amacıyla, çalışmamızın ikinci aşamasında farklılaşmış 3T3-L1 adipositleri ile MIA PaCa-2 pankreas kanseri hücreleri arasında kurulan iki farklı dolaylı etkileşim modeli kullanılmıştır. Tümör mikroçevresi, kanser hücreleri ile çevresindeki stromal hücreler (adipositler, fibroblastlar, bağışıklık hücreleri vb.) arasındaki karmaşık ve dinamik etkileşimlerle şekillenir ve bu hücre dışı sinyalleşme, tümör progresyonunda kritik bir rol oynar (de Visser et al, 2023).

Bu bağlamda, ilk modelleme yaklaşımında, farklılaşmış 3T3-L1 hücrelerinden elde edilen koşullandırılmış medyum (CM) kullanılarak, bu hücrelerin salgıladığı çözünen faktörlerin MIA PaCa-2 hücreleri üzerindeki etkisi araştırılmıştır. CM, adipositlerin salgıladığı sitokinler, adipokinler, büyüme faktörleri ve metabolitleri içerdiği için, hücre dışı iletişimi taklit etmek adına sıkça kullanılan bir yöntemdir (Jeong-Hyeon Ko, 2019). Bu model, literatürde özellikle 3T3-L1 ve meme kanseri hücreleri arasındaki etkileşimlerin incelenmesinde yaygın olarak tercih edilmiş ve adipositlerin salgıladığı faktörlerin tümör hücre proliferasyonu, migrasyonu ve ilaca direnç gelişimi gibi süreçleri etkileyebileceği gösterilmiştir (A. Geneste et al, 2020). Tez çalışmasında da literatür bulgularına paralel olarak belirtilen yöntem kullanılmıştır (Şekil 4.2).

Farklılaşmış 3T3-L1 adipositlerinden elde edilen koşullandırılmış medyumun (CM), MIA PaCa-2 pankreas kanseri hücreleri üzerindeki biyolojik etkilerini değerlendirmek amacıyla gerçekleştirilen MTT testleri, adiposit kaynaklı çözünen faktörlerin hücre

proliferasyonuna olan etkisini ortaya koymuştur. CM, artan konsantrasyonlarda MIA PaCa-2 hücrelerine uygulanmış ve hücre canlılığı üzerindeki etkisi nicel olarak değerlendirilmiştir. Bulgulara göre, özellikle %70 konsantrasyonda uygulanan CM, hücre canlılığında en belirgin artışı sağlamış; bu oran, diğer konsantrasyonlara kıyasla en yüksek proliferatif yanıtın elde edildiği seviye olmuştur (Şekil 4.6A). Bu durum, adiposit kaynaklı salgıların belli bir yoğunlukta optimal etki gösterdiğini düşündürmektedir. CM içerisinde yer alan sitokinler (örneğin IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) ve adipokinler (örneğin leptin, resistin) gibi biyolojik aktif moleküller, kanser hücreleri ile parakrin iletişim kurarak çeşitli yollarla hücre proliferasyonunu teşvik edebilir, apoptozu baskılayabilir ve hücrelerin tümör mikroçevresine adaptasyonunu kolaylaştırabilir (Chun Lin et al, 2023). Özellikle IL-6 JAK/STAT ve PI3K/AKT gibi proliferasyonu destekleyen , Adipokin de AMPK anti-apoptotik sinyal yollarını aktive ettiği bilinmektedir (Clemente-Suárez et al, 2023). Bu nedenle, %70 CM ile gözlenen canlılık artışı, muhtemelen bu tür mitojenik ve anti-apoptotik faktörlerin etkisiyle ilişkilidir.

Literatürde benzer çalışmalar, adipositlerden elde edilen CM'nin meme ve kolon kanseri hücrelerinde hücre büyümesini ve migrasyonunu artırdığını göstermiştir (A. Geneste et al, 2020). Çalışmamızda pankreas kanseri hücreleriyle elde edilen benzer sonuçlar, adipositlerin yalnızca enerji depolayan hücreler değil, aynı zamanda tümör mikroçevresinde aktif sinyal kaynakları olarak görev yaptığı görüşünü desteklemektedir. Ayrıca, bu etkilerin konsantrasyon bağımlı olması, adiposit kaynaklı faktörlerin biyolojik etkilerinin belli bir eşiğin üzerinde daha belirgin hale geldiğini göstermektedir.

Koşullandırılmış medyumun (CM) MIA PaCa-2 hücreleri üzerindeki moleküler etkilerini incelemek amacıyla, farklı CM konsantrasyonlarının adiponektin reseptör ekspresyonuna etkisi Western blot yöntemiyle değerlendirildi. Sonuçlar, 24 saat inkübe edilen CM (24 CM) uygulamasında adiponektin reseptörünün ekspresyonunda belirgin bir artış olduğunu gösterirken, 48 saat inkübe edilen CM (48 CM) uygulamasında ise ekspresyonda hafif bir azalma gözlenmiştir (Şekil 4.6 B). Bu farklılık, CM'nin hazırlanma süresine bağlı olarak içerdiği biyolojik aktif moleküllerin kalitesi ve miktarındaki değişikliklere işaret etmektedir. 24 saatlik koşullandırılmış ortam (24 CM), adiponektin reseptörlerinin ifadesini artırmaktadır. Buna karşın 48 CM'de biyolojik aktivitenin azalması, adiponektin

sinyal yollarının uyarılmasının zayıflamasına yol açmış olduğu önerilmektedir. Ayrıca, bu sonuçlar çalışmadaki MTT analizleriyle paralellik göstermekte; 24 CM'nin canlılığı artırması ile adiponektin reseptörünün artan ekspresyonu arasında pozitif bir ilişki olduğu düşünülebilir. Öte yandan 48 CM'de reseptör ifadesindeki azalma, hücre canlılığında gözlenen değişimlerle uyumlu olabilir.

MIA PaCa-2 hücrelerine koşullandırılmış medyumun (CM) uygulanmasının ardından hücre morfolojisi ışık mikroskobu altında incelenmiştir. Genel olarak belirgin büyük morfolojik değişiklikler gözlenmemekle birlikte, CM uygulanan gruplarda hücrelerde hafif bir şişkinlik ve hacim artışı fark edilmiştir (Şekil 4.6). Bu gözlem, hücrelerde olası bir lipid birikimi sürecinin işareti olarak değerlendirilmiştir. Bu hipotezi doğrulamak amacıyla, hücrelerde lipid birikimini spesifik olarak gösteren Oil Red O boyaması uygulanmıştır. Şekil 4.7'de de görüldüğü üzere, CM konsantrasyonu arttıkça hücrelerde kırmızı renkle işaretlenen lipid birikimi de artış göstermiştir. Bu sonuç, CM'nin MIA PaCa-2 hücrelerinde lipid sentezi ve alımını artırdığını desteklemektedir.

Literatürde, adiposit kaynaklı salgıların tümör mikroçevresinde kanser hücrelerinde lipid metabolizmasını uyararak, hücrelerin enerji ihtiyacını karşılamada ve tümör progresyonunda önemli rol oynadığı bildirilmiştir (Ran Jin et al , 2023). CM'nin lipid birikimini artırması, pankreas kanseri hücrelerinin lipid metabolizmasında adaptif değişiklikler yaşadığını ve tümör gelişimine katkıda bulunabilecek metabolik esnekliğe sahip olduğunu göstermektedir.

Çalışmamızda, adiposit kaynaklı koşullandırılmış medyum (CM) ve 3T3-L1 adipositleri ile MIA PaCa-2 hücrelerinin ko-kültür sistemlerinde SREBP1 (Sterol Regulatory Element Binding Protein 1) protein ekspresyonu Western blot ile incelenmiştir. Sonuçlar, her iki deneysel koşulda da SREBP1 ekspresyonunun belirgin şekilde arttığını göstermiştir (Şekil 4.11 B ). Literatürde, SREBP1'in kanser hücrelerinde lipid biyosentezini düzenleyen anahtar bir transkripsiyon faktörü olduğu ve ekspresyonundaki artışın tümör hücrelerinde lipid üretiminin yükselmesine yol açtığı belirtilmektedir (Geng.et al, 2024). Artan lipid biyosentezi, kanser hücrelerinin hızlı büyüme ve enerji ihtiyacını karşılaması için kritik bir adaptasyon mekanizmasıdır (Ran Jin et al , 2023).

Ayrıca, adipositlerin salgıladığı önemli proinflamatuvar sitokinler olan TNF- $\alpha$  ve IL-6'nın, SREBP1 ekspresyonunu artırdığı literatürde bildirilmiştir (Gierens et al, 2019). Bu sitokinler, CM'de bol miktarda bulunmakta ve adipositlerin pankreas kanseri hücreleri üzerindeki etkilerini şekillendirmektedir. Dolayısıyla, çalışmamızda gözlenen SREBP1 ekspresyonundaki artışın, adiposit kaynaklı TNF- $\alpha$  ve IL-6 gibi sitokinlerin etkisiyle tetiklenmiş olması kuvvetle muhtemeldir. Bu bulgular, adipositlerle pankreas kanseri hücreleri arasındaki parakrin etkileşimin, kanser hücrelerinde lipid metabolizmasını uyararak tümör progresyonunu destekleyen önemli bir mekanizma olduğunu ortaya koymaktadır.

Çalışmamızın bir sonraki aşamasında, yağ asidi sentezi inhibitörü olan Orlistat'ın pankreas kanseri hücreleri üzerindeki etkilerini değerlendirdik. MIA PaCa-2 hücrelerine farklı dozlarda Orlistat uygulanarak hem MTT testi hem de hücre büyüme (growth) analizleri gerçekleştirildi (Şekil 4.4, 4.8). Elde edilen sonuçlara göre, artan Orlistat dozlarıyla birlikte hücre canlılığında belirgin bir azalma gözlenmiştir. Bu durum, Orlistat'ın MIA PaCa-2 hücrelerinde sitotoksik ve antiproliferatif bir etki gösterdiğini ortaya koymaktadır (Jovana V Jovankić et al 2023). Orlistat, başta FASN (Fatty Acid Synthase) olmak üzere yağ asidi sentezinde görev alan enzimleri inhibe ederek, kanser hücrelerinin lipogeneze olan bağımlılığını hedef alır. Literatürde, özellikle agresif fenotipe sahip tümör hücrelerinin enerji ihtiyacını karşılamak ve membran sentezini sürdürebilmek için lipogeneze bağımlı olduğu ve bu yolun baskılanmasının hücre ölümünü tetiklediği belirtilmektedir (Ja Mandez et al. 2005) Orlistat'ın MIA PaCa-2 hücrelerindeki hücre ölüm mekanizmasını daha kapsamlı olarak değerlendirebilmek amacıyla, çeşitli hücre boyama yöntemleriyle birlikte Annexin V/PI çift boyama analizi gerçekleştirilmiştir. Önceki boyama sonuçlarında, DIOC6 ile mitokondriyel membran potansiyelinde belirgin azalma saptanmış, bu durum mitokondri kökenli apoptotik sürecin aktive olduğunu göstermiştir. Bu bulgulara ek olarak yapılan Annexin V / PI analizleri, hücrelerin ölüm evresini daha ayrıntılı şekilde ortaya koymuştur. Orlistat uygulanan gruplarda, Annexin V (+) / PI (-) hücre oranının artmış olması, hücrelerin büyük bir kısmının erken apoptoz sürecine girdiğini göstermektedir. Bununla birlikte, Annexin V (+) / PI (+) çift pozitif hücrelerin de artmış olması, bazı hücrelerin geç apoptoz ya da ikincil nekroz sürecinde olduğunu düşündürmektedir. Bu bulgular, Orlistat'ın MIA PaCa-

2 hücrelerinde programlanmış hücre ölümünü aktif bir şekilde tetiklediğini çoklu kanıtlarla ortaya koymaktadır.

Orlistat uygulamasının MIA PaCa-2 hücrelerinde lipid metabolizması üzerine olan etkisini moleküler düzeyde değerlendirmek amacıyla FASN (Fatty Acid Synthase) protein ekspresyonu Western blot yöntemi ile analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, Orlistat'ın artan dozlarıyla birlikte FASN ekspresyonunun giderek doz-bağımlı şekilde azaldığı gözlenmiştir (Şekil 4.11). Bu durum, Orlistat'ın FASN enzimine karşı spesifik bir inhibitör etki gösterdiğini ve pankreas kanseri hücrelerinde lipid biyosentezini baskıladığını açıkça ortaya koymaktadır. Literatürde, FASN inhibisyonunun kanser hücrelerinde lipid biyosentezini bozarak metabolik stres oluşturduğu ve bu stresin hücreleri apoptoza sürüklediği birçok çalışmada gösterilmiştir (Shiva Kant et al ,2012). Lipid sentezinin baskılanması, özellikle hızla bölünen tümör hücrelerinin membran üretimi, enerji dengesi ve sinyal iletimi gibi temel süreçlerini sekteye uğratarak hücre ölümünü tetikler. Çalışmamızda da FASN düzeyindeki bu azalma, Orlistat uygulanan gruplarda gözlenen canlılık azalması (MTT testi), mitokondriyel potansiyel kaybı (DIOC6) ve apoptoz bulguları (Annexin/PI, DAPI) ile uyum içindedir. Bu veriler, FASN'ın pankreas kanseri hücrelerinde hayatta kalım için kritik bir hedef olduğunu ve Orlistat'ın bu yolağı baskılayarak programlanmış hücre ölümünü (apoptoz) indüklediğini güçlü bir şekilde desteklemektedir.

Pankreas tümör mikroçevresinin adipositler ile etkileşiminin MIA PaCa-2 hücrelerinin mitokondriyel aktivitesi üzerindeki etkisini değerlendirmek amacıyla, farklı gruplarda DIOC6 boyaması uygulanmıştır. Bu analizle mitokondriyel membran potansiyeli ( $\Delta\Psi_m$ ) ölçülerek hücrel enerji aktivitesi dolaylı olarak değerlendirilmiştir. Bulgular, hem adipositlerden elde edilen CM uygulanan gruplarda hem de ko-kültür sistemlerinde, kontrol grubuna kıyasla DIOC6 sinyalinde artış olduğunu ortaya koymuştur. Bu durum, adipositlerin salgıladığı parakrin faktörlerin kanser hücrelerinde mitokondriyel aktiviteyi ve metabolik canlılığı artırdığını göstermektedir (Şekil 4.9). Ancak, bu gruplara Orlistat uygulandığında DIOC6 sinyali tüm gruplarda belirgin şekilde azalmış, yani mitokondriyel membran potansiyeli düşmüştür. Bu sonuç, Orlistat'ın adiposit kaynaklı mitojenik

sinyalleri baskıladığı ve mitokondriyel yıkım (depolarizasyon) başlattığını göstermektedir.

MIA PaCa-2 hücrelerinin migrasyon kapasitesini değerlendirmek amacıyla gerçekleştirilen wound healing (yara iyileşme) testi, hem normal koşullarda hem de 3T3-L1 adipositleri ile kurulan ko-kültür ortamında uygulanmıştır. Bulgulara göre, kontrol grubuna kıyasla ko-kültür ortamında yara alanının çok daha hızlı kapandığı gözlemlenmiştir. Bu durum, adiposit kaynaklı parakrin faktörlerin MIA PaCa-2 hücrelerinin migrasyon yeteneğini artırdığını, dolayısıyla tümör hücrelerinin invaziv kapasitesini desteklediğini göstermektedir (şekil 4.9). Ancak dikkat çekici şekilde, her iki koşulda (normal ve ko-kültür) Orlistat uygulandığında hücre göçü tamamen durmuş, hatta bazı örneklerde yara alanı kapanmak yerine genişlemiştir. Bu bulgu, Orlistat'ın yalnızca proliferasyonu değeril, aynı zamanda kanser hücrelerinin hareket kabiliyetini ve doku invazyon potansiyelini de baskıladığını göstermektedir.

Literatürde SREBP1 (Sterol Regulatory Element Binding Protein 1), yalnızca lipid biyosentezinden sorumlu bir transkripsiyon faktörü olarak değeril, aynı zamanda kanser hücrelerinde proliferasyonun, migrasyonun ve tümör oluşumunun düzenlenmesinde kilit rol oynayan bir molekül olarak tanımlanmıştır (Ying He et al, 2023) SREBP1'in aktivasyonu, özellikle agresif kanser fenotiplerinde hücre büyümesini ve invazyon potansiyelini artırmakta, böylece tümör progresyonuna katkı sağlamaktadır. Bu bilgiler doğerultusunda, alışmamızda Orlistat'ın yalnızca FASN üzerinden değeril, aynı zamanda upstream düzenleyicilerden biri olan SREBP1 üzerinden de etkili olabileceği hipotezinden yola çıkılmıştır. Bu nedenle, Orlistat uygulanan MIA PaCa-2 hücrelerinde SREBP1 protein düzeyleri Western blot yöntemiyle analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlar, artan Orlistat dozlarıyla birlikte SREBP1 ekspresyonunun belirgin şekilde azaldığını göstermiştir (şekil 4.12). Bu bulgu, Orlistat'ın FASN inhibisyonuna ek olarak, transkripsiyonel düzeyde de lipid biyosentezini baskıladığını ve bunun tümör hücrelerinin büyüme ve hareketliliğini azaltmada önemli bir mekanizma olabileceğini ortaya koymaktadır.

Çalışmamızın genel bulguları, adipositlerin pankreas kanseri mikroçevresinde tümör hücreleri üzerinde önemli pro-tümöral etkiler oluşturduğunu açıkça göstermektedir. Hem

CM hem de ko-kültür modellerinde artan hücre canlılığı, mitokondriyal aktivite, lipid birikimi ve hücre migrasyonu, adiposit kaynaklı faktörlerin MIA PaCa-2 hücrelerinin tümör agresifliğini artırdığını ortaya koymuştur. Bu etkilerin moleküler düzeydeki temel düzenleyicilerinden birinin ise SREBP ailesi, özellikle de SREBP1 ve SREBP2 olduğu anlaşılmaktadır. Literatürde, SREBP2'nin kolesterol biyosentezi ve membran bütünlüğü üzerinde kritik rol oynadığı; aktivasyonunun ise proliferasyon, migrasyon ve tümör progresyonu gibi kanser davranışlarını desteklediği birçok çalışmada bildirilmiştir [Buraya kaynak ekleyiniz]. Adipositlerin salgıladığı TNF- $\alpha$ , IL-6 ve diğer adipokinlerin, bu transkripsiyon faktörlerini aktive ederek tümör hücrelerinin metabolik programını değiştirdiği düşünülmektedir. Bu noktada, çalışmamızda kullanılan Orlistat'ın yalnızca FASN enzimini değil, aynı zamanda SREBP1/SREBP2 sinyal yollarını da baskılayarak tümör hücrelerinin metabolik avantajını ortadan kaldıracıcağı gösterilmiştir. Orlistat uygulanan gruplarda gözlenen azalmış canlılık, artmış apoptoz, azalmış migrasyon ve SREBP1 inhibisyonu, bu ajanı tümör mikroçevresine yönelik potansiyel bir terapötik aday olarak ön plana çıkarmaktadır.

Sonuç olarak, adipositlerin tümör mikroçevresindeki varlığı, pankreas kanseri hücrelerinde SREBP aracılı lipid metabolizmasını ve tümör progresyonunu önemli ölçüde artırmaktadır. Orlistat gibi metabolik inhibitörler, bu etkileşimi hedef alarak gelecekte kanser tedavisinde tamamlayıcı bir strateji olarak değerlendirilebilir.

## KAYNAKLAR

3T3-L1 - CL-173 / ATCC. (n.d.). Retrieved June 18, 2025, from <https://www.atcc.org/products/cl-173>

Alzhrani, R., Alsaab, H. O., Vanamala, K., Bhise, K., Tatiparti, K., Barari, A., Sau, S., & Iyer, A. K. (2021). Overcoming the Tumor Microenvironmental Barriers of Pancreatic Ductal Adenocarcinomas for Achieving Better Treatment Outcomes. *Advanced Therapeutics*, 4(6), 2000262. <https://doi.org/10.1002/ADTP.202000262>

Baghban, R., Roshangar, L., Jahanban-Esfahlan, R., Seidi, K., Ebrahimi-Kalan, A., Jaymand, M., Kolahian, S., Javaheri, T., & Zare, P. (2020). Tumor microenvironment complexity and therapeutic implications at a glance. *Cell Communication and Signaling* 2020 18:1, 18(1), 1–19. <https://doi.org/10.1186/S12964-020-0530-4>

Bailey, P., Chang, D. K., Nones, K., Johns, A. L., Patch, A. M., Gingras, M. C., Miller, D. K., Christ, A. N., Bruxner, T. J. C., Quinn, M. C., Nourse, C., Murtaugh, L. C., Harliwong, I., Idrisoglu, S., Manning, S., Nourbakhsh, E., Wani, S., Fink, L., Holmes, O., ... Grimmond, S. M. (2016). Genomic analyses identify molecular subtypes of pancreatic cancer. *Nature*, 531(7592), 47–52. <https://doi.org/10.1038/NATURE16965>,

Basak, U., Sarkar, T., Mukherjee, S., Chakraborty, S., Dutta, A., Dutta, S., Nayak, D., Kaushik, S., Das, T., & Sa, G. (2023). Tumor-associated macrophages: an effective player of the tumor microenvironment. *Frontiers in Immunology*, 14, 1295257. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2023.1295257>

Basturk, O., Hong, S. M., Wood, L. D., Adsay, N. V., Albores-Saavedra, J., Biankin, A. V., Brosens, L. A. A., Fukushima, N., Goggins, M., Hruban, R. H., Kato, Y., Klimstra, D. S., Klöppel, G., Krasinskas, A., Longnecker, D. S., Matthaei, H.,

- Offerhaus, G. J. A., Shimizu, M., Takaori, K., ... Furukawa, T. (2015). A revised classification system and recommendations from the Baltimore consensus meeting for neoplastic precursor lesions in the pancreas. *American Journal of Surgical Pathology*, 39(12), 1730–1741. <https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000000533>,
- Basu, A. K. (2018). DNA damage, mutagenesis and cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(4). <https://doi.org/10.3390/IJMS19040970>,
- Bouche, C., & Quail, D. F. (2023). Fueling the Tumor Microenvironment with Cancer-Associated Adipocytes. *Cancer Research*, 83(8), 1170–1172. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-23-0505>
- Brown, J. S., Amend, S. R., Austin, R. H., Gatenby, R. A., Hammarlund, E. U., & Pienta, K. J. (2023). Updating the Definition of Cancer. *Molecular Cancer Research*, 21(11), 1142. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-23-0411>
- Capurso, G., Traini, M., Piciocchi, M., Signoretti, M., & Arcidiacono, P. G. (2019). Exocrine pancreatic insufficiency: Prevalence, diagnosis, and management. *Clinical and Experimental Gastroenterology*, 12, 129–139. <https://doi.org/10.2147/CEG.S168266>,
- Chen, F., Chen, J., Yang, L., Liu, J., Zhang, X., Zhang, Y., Tu, Q., Yin, D., Lin, D., Wong, P. P., Huang, D., Xing, Y., Zhao, J., Li, M., Liu, Q., Su, F., Su, S., & Song, E. (2019). Extracellular vesicle-packaged HIF-1 $\alpha$ -stabilizing lncRNA from tumour-associated macrophages regulates aerobic glycolysis of breast cancer cells. *Nature Cell Biology*, 21(4), 498–510. <https://doi.org/10.1038/S41556-019-0299-0>,
- Cheng, C., Geng, F., Cheng, X., & Guo, D. (2018). Lipid metabolism reprogramming and its potential targets in cancer. *Cancer Communications*, 38(1). <https://doi.org/10.1186/S40880-018-0301-4>,
- Cheng, H., Wang, M., Su, J., Li, Y., Long, J., Chu, J., Wan, X., Cao, Y., & Li, Q. (2022). Lipid Metabolism and Cancer. *Life*, 12(6), 784. <https://doi.org/10.3390/LIFE12060784>

- Choi, H., & Moon, A. (2018). Crosstalk between cancer cells and endothelial cells: implications for tumor progression and intervention. *Archives of Pharmacal Research*, *41*(7), 711–724. <https://doi.org/10.1007/S12272-018-1051-1>,
- Clarke, S. L., Betts, G. J., Plant, A., Wright, K. L., El-Shanawany, T. M., Harrop, R., Torkington, J., Rees, B. I., Williams, G. T., Gallimore, A. M., & Godkin, A. J. (2006). CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells suppress anti-tumor immune responses in patients with colorectal cancer. *PLoS ONE*, *1*(1). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0000129>,
- Collisson, E. A., Sadanandam, A., Olson, P., Gibb, W. J., Truitt, M., Gu, S., Cooc, J., Weinkle, J., Kim, G. E., Jakkula, L., Feiler, H. S., Ko, A. H., Olshen, A. B., Danenberg, K. L., Tempero, M. A., Spellman, P. T., Hanahan, D., & Gray, J. W. (2011). Subtypes of pancreatic ductal adenocarcinoma and their differing responses to therapy. *Nature Medicine*, *17*(4), 500–503. <https://doi.org/10.1038/NM.2344>,
- de la Fuente, J., Chatterjee, A., Lui, J., Nehra, A. K., Bell, M. G., Lennon, R. J., Kassmeyer, B. A., Graham, R. P., Nagayama, H., Schulte, P. J., Doering, K. A., Delgado, A. M., Vege, S. S., Chari, S. T., Takahashi, N., & Majumder, S. (2023). Long-Term Outcomes and Risk of Pancreatic Cancer in Intraductal Papillary Mucinous Neoplasms. *JAMA Network Open*, *6*(10), E2337799. <https://doi.org/10.1001/JAMANETWORKOPEN.2023.37799>,
- de Visser, K. E., & Joyce, J. A. (2023). The evolving tumor microenvironment: From cancer initiation to metastatic outgrowth. *Cancer Cell*, *41*(3), 374–403. <https://doi.org/10.1016/J.CCELL.2023.02.016>
- Decker, K., Goldman, D. C., L. Grash, C., & Sussel, L. (2006). Gata6 is an important regulator of mouse pancreas development. *Developmental Biology*, *298*(2), 415–429. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.06.046>
- Dirat, B., Bochet, L., Dabek, M., Daviaud, D., Dauvillier, S., Majed, B., Wang, Y. Y., Meulle, A., Salles, B., Le Gonidec, S., Garrido, I., Escourrou, G., Valet, P., & Muller, C. (2011). Cancer-associated adipocytes exhibit an activated phenotype and

- contribute to breast cancer invasion. *Cancer Research*, 71(7), 2455–2465. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-3323>,
- Drosten, M., & Barbacid, M. (2020). Targeting the MAPK Pathway in KRAS-Driven Tumors. *Cancer Cell*, 37(4), 543–550. <https://doi.org/10.1016/J.CCELL.2020.03.013>
- Duncan, Z. N., Summerlin, D., West, J. T., Packard, A. T., Morgan, D. E., & Galgano, S. J. (2023). PET/MRI for evaluation of patients with pancreatic cancer. *Abdominal Radiology*, 48(12), 3601–3609. <https://doi.org/10.1007/S00261-023-03943-9>,
- Ellrichmann, M., Ritter, P. R., Otte, J. M., Schrader, H., Banasch, M., Brunke, G., Herzig, K. H., Seebeck, J., Schmidt, W. E., & Schmitz, F. (2007). Orlistat reduces gallbladder emptying by inhibition of CCK release in response to a test meal. *Regulatory Peptides*, 139(1–3), 136–140. <https://doi.org/10.1016/j.regpep.2006.11.016>
- Erez, N., Truitt, M., Olson, P., & Hanahan, D. (2010). Cancer-Associated Fibroblasts Are Activated in Incipient Neoplasia to Orchestrate Tumor-Promoting Inflammation in an NF- $\kappa$ B-Dependent Manner. *Cancer Cell*, 17(2), 135–147. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.12.041>
- Feijóo-Bandín, S., Portolés, M., Roselló-Lletí, E., Rivera, M., González-Juanatey, J. R., & Lago, F. (2015). 20 years of leptin: Role of leptin in cardiomyocyte physiology and physiopathology. *Life Sciences*, 140, 10–18. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2015.02.016>
- Ferrara, N. (2002). VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. *Nature Reviews Cancer*, 2(10), 795–803. <https://doi.org/10.1038/NRC909>,
- Flavin, R., Peluso, S., Nguyen, P. L., & Loda, M. (2010). Fatty acid synthase as a potential therapeutic target in cancer. *Future Oncology (London, England)*, 6(4), 551. <https://doi.org/10.2217/FON.10.11>
- Fujisaki, K., Fujimoto, H., Sangai, T., Nagashima, T., Sakakibara, M., Shiina, N., Kuroda, M., Aoyagi, Y., & Miyazaki, M. (2015). Cancer-mediated adipose reversion

- promotes cancer cell migration via IL-6 and MCP-1. *Breast Cancer Research and Treatment*, 150(2), 255–263. <https://doi.org/10.1007/S10549-015-3318-2>,
- Gao, J., Long, B., & Wang, Z. (2017). Role of Notch signaling pathway in pancreatic cancer. *American Journal of Cancer Research*, 7(2), 173. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5336494/>
- Global Cancer Observatory*. (n.d.). Retrieved June 18, 2025, from <https://gco.iarc.fr/en>
- Goosenberg, E., & Lappin, S. L. (2025). Chronic Pancreatitis. *StatPearls*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482325/>
- Gopalakrishnan, V., Helmink, B. A., Spencer, C. N., Reuben, A., & Wargo, J. A. (2018). The Influence of the Gut Microbiome on Cancer, Immunity, and Cancer Immunotherapy. *Cancer Cell*, 33(4), 570–580. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.03.015>
- Greenberg, R. A., Chin, L., Femino, A., Kee-Ho, L., Gottlieb, G. J., Singer, R. H., Greider, C. W., & DePinho, R. A. (1999). Short dysfunctional telomeres impair tumorigenesis in the INK4a( $\Delta$ 2/3) cancer-prone mouse. *Cell*, 97(4), 515–525. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80761-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80761-8)
- Gupta, A., Das, D., & Taneja, R. (2024a). Targeting Dysregulated Lipid Metabolism in Cancer with Pharmacological Inhibitors. *Cancers 2024*, Vol. 16, Page 1313, 16(7), 1313. <https://doi.org/10.3390/CANCERS16071313>
- Gupta, A., Das, D., & Taneja, R. (2024b). Targeting Dysregulated Lipid Metabolism in Cancer with Pharmacological Inhibitors. *Cancers 2024*, Vol. 16, Page 1313, 16(7), 1313. <https://doi.org/10.3390/CANCERS16071313>
- Hall, M. E., Cohen, J. B., Ard, J. D., Egan, B. M., Hall, J. E., Lavie, C. J., Ma, J., Ndumele, C. E., Schauer, P. R., & Shimbo, D. (2021). Weight-Loss Strategies for Prevention and Treatment of Hypertension: A Scientific Statement from the American Heart Association. *Hypertension*, 78(5), E38–E50. <https://doi.org/10.1161/HYP.0000000000000202>,

- Hanahan, D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery*, *12*(1), 31–46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, *144*(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2011.02.013>
- He, S., & Sharpless, N. E. (2017). Senescence in Health and Disease. *Cell*, *169*(6), 1000–1011. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.05.015>
- Heinemann, V. (2001). Gemcitabine: Progress in the treatment of pancreatic cancer. *Oncology*, *60*(1), 8–18. <https://doi.org/10.1159/000055290>,
- Helfen, A., Roth, J., Ng, T., & Eisenblatter, M. (2018). In vivo imaging of pro- and antitumoral cellular components of the tumor microenvironment. *Journal of Nuclear Medicine*, *59*(2), 183–188. <https://doi.org/10.2967/JNUMED.117.198952>,
- Hinshaw, D. C., & Shevde, L. A. (2019). The tumor microenvironment innately modulates cancer progression. *Cancer Research*, *79*(18), 4557–4567. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-3962>,
- Hsu, P. P., & Sabatini, D. M. (2008). Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. *Cell*, *134*(5), 703–707. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.08.021>
- Ihara, Y., Toyokuni, S., Uchida, K., Odaka, H., Tanaka, T., Ikeda, H., Hiai, H., Seino, Y., & Yamada, Y. (1999). Hyperglycemia causes oxidative stress in pancreatic  $\beta$ -cells of GK rats, a model of type 2 diabetes. *Diabetes*, *48*(4), 927–932. <https://doi.org/10.2337/DIABETES.48.4.927>,
- Jin, H. R., Wang, J., Wang, Z. J., Xi, M. J., Xia, B. H., Deng, K., & Yang, J. L. (2023a). Lipid metabolic reprogramming in tumor microenvironment: from mechanisms to therapeutics. *Journal of Hematology and Oncology*, *16*(1), 1–33. <https://doi.org/10.1186/S13045-023-01498-2/TABLES/3>
- Jin, H. R., Wang, J., Wang, Z. J., Xi, M. J., Xia, B. H., Deng, K., & Yang, J. L. (2023b). Lipid metabolic reprogramming in tumor microenvironment: from mechanisms to therapeutics. *Journal of Hematology and Oncology*, *16*(1), 1–33. <https://doi.org/10.1186/S13045-023-01498-2/TABLES/3>

- Jin, M. Z., & Jin, W. L. (2020). The updated landscape of tumor microenvironment and drug repurposing. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5(1), 166. <https://doi.org/10.1038/S41392-020-00280-X>
- Jones, S., Zhang, X., Parsons, D. W., Lin, J. C. H., Leary, R. J., Angenendt, P., Mankoo, P., Carter, H., Kamiyama, H., Jimeno, A., Hong, S. M., Fu, B., Lin, M. T., Calhoun, E. S., Kamiyama, M., Walter, K., Nikolskaya, T., Nikolsky, Y., Hartigan, J., ... Kinzler, K. W. (2008). Core Signaling Pathways in Human Pancreatic Cancers Revealed by Global Genomic Analyses. *Science (New York, N.Y.)*, 321(5897), 1801. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1164368>
- Kant, S., Kumar, A., & Singh, S. M. (2014). Tumor growth retardation and chemosensitizing action of fatty acid synthase inhibitor orlistat on T cell lymphoma: Implication of reconstituted tumor microenvironment and multidrug resistance phenotype. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1840(1), 294–302. <https://doi.org/10.1016/J.BBAGEN.2013.09.020>
- Kardon, D. E., Thompson, L. D. R., Przygodzki, R. M., & Heffess, C. S. (2001). Adenosquamous carcinoma of the pancreas: A clinicopathologic series of 25 cases. *Modern Pathology*, 14(5), 443–451. <https://doi.org/10.1038/modpathol.3880332>
- Kirkegård, J., Mortensen, F. V., & Cronin-Fenton, D. (2017). Chronic Pancreatitis and Pancreatic Cancer Risk: A Systematic Review and Meta-analysis. *American Journal of Gastroenterology*, 112(9), 1366–1372. <https://doi.org/10.1038/AJG.2017.218>,
- Koltai, T. (2023). Earlier Diagnosis of Pancreatic Cancer: Is It Possible? *Cancers* 2023, Vol. 15, Page 4430, 15(18), 4430. <https://doi.org/10.3390/CANCERS15184430>
- Kondo, A., Yamamoto, S., Nakaki, R., Shimamura, T., Hamakubo, T., Sakai, J., Kodama, T., Yoshida, T., Aburatani, H., & Osawa, T. (2017). Extracellular Acidic pH Activates the Sterol Regulatory Element-Binding Protein 2 to Promote Tumor Progression. *Cell Reports*, 18(9), 2228–2242. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.02.006>

- Kridel, S. J., Axelrod, F., Rozenkrantz, N., & Smith, J. W. (2004). Orlistat Is a Novel Inhibitor of Fatty Acid Synthase with Antitumor Activity. *Cancer Research*, *64*(6), 2070–2075. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-03-3645>
- Lau, E. Y. T., Lo, J., Cheng, B. Y. L., Ma, M. K. F., Lee, J. M. F., Ng, J. K. Y., Chai, S., Lin, C. H., Tsang, S. Y., Ma, S., Ng, I. O. L., & Lee, T. K. W. (2016). Cancer-Associated Fibroblasts Regulate Tumor-Initiating Cell Plasticity in Hepatocellular Carcinoma through c-Met/FRA1/HEY1 Signaling. *Cell Reports*, *15*(6), 1175–1189. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.04.019>
- Lee, M. G., Lee, S. H., Lee, S. J., Lee, Y. S., Hwang, J. H., Ryu, J. K., Kim, Y. T., Kim, D. U., & Woo, S. M. (2014). 5-fluorouracil/leucovorin combined with irinotecan and oxaliplatin (FOLFIRINOX) as second-line chemotherapy in patients with advanced pancreatic cancer who have progressed on gemcitabine-based therapy. *Chemotherapy*, *59*(4), 273–279. <https://doi.org/10.1159/000356158>,
- Leiphrakpam, P. D., Chowdhury, S., Zhang, M., Bajaj, V., Dhir, M., & Are, C. (2025). Trends in the Global Incidence of Pancreatic Cancer and a Brief Review of its Histologic and Molecular Subtypes. *Journal of Gastrointestinal Cancer*, *56*(1). <https://doi.org/10.1007/S12029-025-01183-2>,
- Lengauer, C., Kinzler, K. W., & Vogelstein, B. (1998). Genetic instabilities in human cancers. *Nature*, *396*(6712), 643–649. <https://doi.org/10.1038/25292>,
- Li, Q., Feng, Z., Miao, R., Liu, X., Liu, C., & Liu, Z. (2022). Prognosis and survival analysis of patients with pancreatic cancer: retrospective experience of a single institution. *World Journal of Surgical Oncology*, *20*(1). <https://doi.org/10.1186/S12957-021-02478-X>,
- Li, S., & Li, X. (2021). Analysis of EGFR, KRAS, and PIK3CA gene mutation rates and clinical distribution in patients with different types of lung cancer. *World Journal of Surgical Oncology*, *19*(1). <https://doi.org/10.1186/S12957-021-02315-1>,
- Liew, S. Z. H., Ng, K. W., Ishak, N. D. B., Lee, S. Y., Zhang, Z., Chiang, J., & Ngeow, J. Y. Y. (2023). Geographical, ethnic, and genetic differences in pancreatic cancer

- predisposition. *Chinese Clinical Oncology*, 12(3), 27–27.  
<https://doi.org/10.21037/CCO-23-8/COIF>
- Lin, Y. C., Hou, Y. C., Wang, H. C., & Shan, Y. S. (2023). New insights into the role of adipocytes in pancreatic cancer progression: paving the way towards novel therapeutic targets. *Theranostics*, 13(12), 3925.  
<https://doi.org/10.7150/THNO.82911>
- Ling, S., Brown, K., Miksza, J. K., Howells, L., Morrison, A., Issa, E., Yates, T., Khunti, K., Davies, M. J., & Zaccardi, F. (2020). Association of type 2 diabetes with cancer: A meta-analysis with bias analysis for unmeasured confounding in 151 cohorts comprising 32 million people. *Diabetes Care*, 43(9), 2313–2322.  
<https://doi.org/10.2337/DC20-0204>,
- Lüttges, J., Hahn, S., & Klöppel, G. (2004). Where and When Does Pancreatic Carcinoma Start? *Medizinische Klinik*, 99(4), 191–195. <https://doi.org/10.1007/s00063-004-1028-3>
- Maishi, N., & Hida, K. (2017). Tumor endothelial cells accelerate tumor metastasis. *Cancer Science*, 108(10), 1921. <https://doi.org/10.1111/CAS.13336>
- Matsushita, H., Hosoi, A., Ueha, S., Abe, J., Fujieda, N., Tomura, M., Maekawa, R., Matsushima, K., Ohara, O., & Kakimi, K. (2015). Cytotoxic T lymphocytes block tumor growth both by lytic activity and IFN $\gamma$ -Dependent Cell-cycle arrest. *Cancer Immunology Research*, 3(1), 26–36. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-14-0098>,
- Menendez, J. A., & Lupu, R. (2007). Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis. *Nature Reviews Cancer*, 7(10), 763–777.  
<https://doi.org/10.1038/NRC2222>,
- MIA PaCa-2 - CRL-1420 | ATCC*. (n.d.). Retrieved June 18, 2025, from <https://www.atcc.org/products/crl-1420>
- Moore, J. V., Tom, S., Scoggins, C. R., Philips, P., Egger, M. E., & Martin, R. C. G. (2021). Exocrine Pancreatic Insufficiency After Pancreatectomy for Malignancy:

Systematic Review and Optimal Management Recommendations. *Journal of Gastrointestinal Surgery*, 25(9), 2317–2327. <https://doi.org/10.1007/S11605-020-04883-1>

Muller, C. (2013). Tumour-surrounding adipocytes are active players in breast cancer progression. *Annales d'Endocrinologie*, 74(2), 108–110. <https://doi.org/10.1016/j.ando.2013.02.007>

Nazarenko, I., Rana, S., Baumann, A., McAlear, J., Hellwig, A., Trendelenburg, M., Lochnit, G., Preissner, K. T., & Zöller, M. (2010). Cell surface tetraspanin Tspan8 contributes to molecular pathways of exosome-induced endothelial cell activation. *Cancer Research*, 70(4), 1668–1678. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-2470>,

Nieman, K. M., Romero, I. L., Van Houten, B., & Lengyel, E. (2013). Adipose tissue and adipocytes supports tumorigenesis and metastasis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1831(10), 1533. <https://doi.org/10.1016/J.BBALIP.2013.02.010>

Oberstein, P. E., & Olive, K. P. (2013). Pancreatic cancer: Why is it so hard to treat? *Therapeutic Advances in Gastroenterology*, 6(4), 321–337. <https://doi.org/10.1177/1756283X13478680>,

Orimo, A., Gupta, P. B., SgROI, D. C., Arenzana-Seisdedos, F., Delaunay, T., Naeem, R., Carey, V. J., Richardson, A. L., & Weinberg, R. A. (2005). Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell*, 121(3), 335–348. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.02.034>

Orimo, A., & Weinberg, R. A. (2006). Stromal fibroblasts in cancer: A novel tumor-promoting cell type. *Cell Cycle*, 5(15), 1597–1601. <https://doi.org/10.4161/CC.5.15.3112>,

*Pancreatic Cancer Overview - Signaling Pathway. Diagnostics Marker. Targeted Therapy and Clinical Trials. - Creative Biolabs.* (n.d.). Retrieved June 18, 2025, from <https://www.antibody-creativebiolabs.com/pancreatic-cancer-overview-signaling-pathway.htm>

- Pérez-Escuredo, J., Van Hée, V. F., Sboarina, M., Falces, J., Payen, V. L., Pellerin, L., & Sonveaux, P. (2016). Monocarboxylate transporters in the brain and in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1863(10), 2481. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMCR.2016.03.013>
- Piperigkou, Z., Kyriakopoulou, K., Koutsakis, C., Mastronikolis, S., & Karamanos, N. K. (2021). Key Matrix Remodeling Enzymes: Functions and Targeting in Cancer. *Cancers*, 13(6), 1441. <https://doi.org/10.3390/CANCERS13061441>
- Piperigkou, Z., Manou, D., Karamanou, K., & Theocharis, A. D. (2018). Strategies to target matrix metalloproteinases as therapeutic approach in cancer. *Methods in Molecular Biology*, 1731, 325–348. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7595-2\\_27](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7595-2_27),
- Popova, N. V., & Jücker, M. (2022). The Functional Role of Extracellular Matrix Proteins in Cancer. *Cancers*, 14(1), 238. <https://doi.org/10.3390/CANCERS14010238>
- Pradip, D., Jennifer, A., & Nandini, D. (2021). Cancer-associated fibroblasts in conversation with tumor cells in endometrial cancers: A partner in crime. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(17). <https://doi.org/10.3390/IJMS22179121>,
- Puckett, Y., Sharma, B., & Kasi, A. (2023). Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm of the Pancreas. *StatPearls*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507779/>
- Rawla, P., Sunkara, T., & Gaduputi, V. (2019a). Epidemiology of Pancreatic Cancer: Global Trends, Etiology and Risk Factors. *World Journal of Oncology*, 10(1), 10. <https://doi.org/10.14740/WJON1166>
- Rawla, P., Sunkara, T., & Gaduputi, V. (2019b). Epidemiology of Pancreatic Cancer: Global Trends, Etiology and Risk Factors. *World Journal of Oncology*, 10(1), 10. <https://doi.org/10.14740/WJON1166>
- Ridge, S. M., Sullivan, F. J., & Glynn, S. A. (2017). Mesenchymal stem cells: key players in cancer progression. *Molecular Cancer*, 16(1), 31. <https://doi.org/10.1186/S12943-017-0597-8>

- Rossi, S., Ou, W., Tang, D., Bhattacharya, N., Dei Tos, A. P., Fletcher, J. A., & Loda, M. (2006). Gastrointestinal stromal tumours overexpress fatty acid synthase. *Journal of Pathology*, 209(3), 369–375. <https://doi.org/10.1002/PATH.1983>,
- Scheja, L., & Heeren, J. (2019). The endocrine function of adipose tissues in health and cardiometabolic disease. *Nature Reviews Endocrinology*, 15(9), 507–524. <https://doi.org/10.1038/S41574-019-0230-6>,
- Scherübl, H. (2021). Typ-2-Diabetes-mellitus und Krebsrisiko. *Deutsche Medizinische Wochenschrift (1946)*, 146(18), 1218–1225. <https://doi.org/10.1055/A-1529-4521>,
- Sejda, A., Sigorski, D., Gulczyński, J., Wesołowski, W., Kitlińska, J., & Iżycka-Świeszewska, E. (2020). Complexity of Neural Component of Tumor Microenvironment in Prostate Cancer. *Pathobiology*, 87(2), 87–99. <https://doi.org/10.1159/000505437>,
- Shen, M., & Kang, Y. (2018). Complex interplay between tumor microenvironment and cancer therapy. *Frontiers of Medicine*, 12(4), 426–439. <https://doi.org/10.1007/S11684-018-0663-7>,
- Shintani, Y., Maeda, M., Chaika, N., Johnson, K. R., & Wheelock, M. J. (2008). Collagen I promotes epithelial-to-mesenchymal transition in lung cancer cells via transforming growth factor- $\beta$  signaling. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 38(1), 95–104. <https://doi.org/10.1165/RCMB.2007-0071OC>,
- Sivapalan, L., Kocher, H. M., Ross-Adams, H., & Chelala, C. (2022). The molecular landscape of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Pancreatology*, 22(7), 925–936. <https://doi.org/10.1016/j.pan.2022.07.010>
- Slack, J. M. W. (1995). Developmental biology of the pancreas. *Development*, 121(6), 1569–1580. <https://doi.org/10.1242/DEV.121.6.1569>,
- Su, S., Chen, J., Yao, H., Liu, J., Yu, S., Lao, L., Wang, M., Luo, M., Xing, Y., Chen, F., Huang, D., Zhao, J., Yang, L., Liao, D., Su, F., Li, M., Liu, Q., & Song, E. (2018). CD10+GPR77+ Cancer-Associated Fibroblasts Promote Cancer Formation and

- Chemoresistance by Sustaining Cancer Stemness. *Cell*, 172(4), 841-856.e16.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.01.009>
- Swierczynski, J., Hebanowska, A., & Sledzinski, T. (2014). Role of abnormal lipid metabolism in development, progression, diagnosis and therapy of pancreatic cancer. *World J Gastroenterol*, 20(9), 2279–2303. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i9.2279>
- Swinnen, J. V., Brusselmans, K., & Verhoeven, G. (2006). Increased lipogenesis in cancer cells: New players, novel targets. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 9(4), 358–365.  
<https://doi.org/10.1097/01.MCO.0000232894.28674.30>,
- Symonds, H., Krall, L., Remington, L., Saenz-Robles, M., Lowe, S., Jacks, T., & Van Dyke, T. (1994). p53-Dependent apoptosis suppresses tumor growth and progression in vivo. *Cell*, 78(4), 703–711. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90534-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90534-7),
- Talathi, S. S., Zimmerman, R., & Young, M. (2023). Anatomy, Abdomen and Pelvis, Pancreas. *StatPearls*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK532912/>
- Tam, S. Y., Wu, V. W. C., & Law, H. K. W. (2020). Hypoxia-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancers: HIF-1 $\alpha$  and Beyond. *Frontiers in Oncology*, 10, 486. <https://doi.org/10.3389/FONC.2020.00486>
- Terry, A. R., & Hay, N. (2024). Emerging targets in lipid metabolism for cancer therapy. *Trends in Pharmacological Sciences*, 45(6), 537–551.  
<https://doi.org/10.1016/J.TIPS.2024.04.007/ASSET/9660A32F-E5BE-4ACE-8BDC-B541C96F88E4/MAIN.ASSETS/GR5.JPG>
- Thienpont, B., Van Dyck, L., & Lambrechts, D. (2016). Tumors smother their epigenome. *Molecular and Cellular Oncology*, 3(6).  
<https://doi.org/10.1080/23723556.2016.1240549>,
- Tommelein, J., Verset, L., Boterberg, T., Demetter, P., Bracke, M., & De Wever, O. (2015). Cancer-Associated Fibroblasts Connect Metastasis-Promoting Communication in Colorectal Cancer. *Frontiers in Oncology*, 5, 63.  
<https://doi.org/10.3389/FONC.2015.00063>

- Ullman, N. A., Burchard, P. R., Dunne, R. F., & Linehan, D. C. (2022). Immunologic Strategies in Pancreatic Cancer: Making Cold Tumors Hot. *Journal of Clinical Oncology*, *40*(24), 2789–2805. <https://doi.org/10.1200/JCO.21.02616>,
- Usuki, J., Matsuda, K., Azuma, A., Kudoh, S., & Gemma, A. (2012). Sequential Analysis of myofibroblast differentiation and transforming growth factor- $\beta$ 1/Smad pathway activation in Murine Pulmonary Fibrosis. *Journal of Nippon Medical School*, *79*(1), 46–59. <https://doi.org/10.1272/JNMS.79.46>,
- Werb, Z. (1997). ECM and cell surface proteolysis: Regulating cellular ecology. *Cell*, *91*(4), 439–442. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80429-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80429-8)
- What is the Pancreas? - Pancreatic Cancer Action Network*. (n.d.). Retrieved June 18, 2025, from <https://pancan.org/facing-pancreatic-cancer/about-pancreatic-cancer/what-is-the-pancreas/>
- Whiteside, T. L. (2008). The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. *Oncogene*, *27*(45), 5904–5912. <https://doi.org/10.1038/ONC.2008.271>,
- Wu, Q., Li, B., Li, Z., Li, J., Sun, S., & Sun, S. (2019). Cancer-associated adipocytes: Key players in breast cancer progression. *Journal of Hematology and Oncology*, *12*(1). <https://doi.org/10.1186/S13045-019-0778-6>,
- Xu, J. H., Fu, J. J., Wang, X. L., Zhu, J. Y., Ye, X. H., & Chen, S. D. (2013). Hepatitis B or C viral infection and risk of pancreatic cancer: A meta-analysis of observational studies. *World Journal of Gastroenterology*, *19*(26), 4234–4241. <https://doi.org/10.3748/WJG.V19.I26.4234>,
- Xu, J., Lamouille, S., & Derynck, R. (2009). TGF- $\beta$ -induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Research*, *19*(2), 156–172. <https://doi.org/10.1038/CR.2009.5>,
- Yadav, A., Kumar, B., Datta, J., Teknos, T. N., & Kumar, P. (2011). IL-6 promotes head and neck tumor metastasis by inducing epithelial-mesenchymal transition via the JAK-STAT3-SNAIL signaling pathway. *Molecular Cancer Research*, *9*(12), 1658–1667. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-11-0271>,

- Yang, E., Wang, X., Gong, Z., Yu, M., Wu, H., & Zhang, D. (2020). Exosome-mediated metabolic reprogramming: the emerging role in tumor microenvironment remodeling and its influence on cancer progression. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5(1), 242. <https://doi.org/10.1038/S41392-020-00359-5>
- Yao, H., & He, S. (2021a). Multi-faceted role of cancer-associated adipocytes in the tumor microenvironment. *Molecular Medicine Reports*, 24(6), 866. <https://doi.org/10.3892/MMR.2021.12506>
- Yao, H., & He, S. (2021b). Multi-faceted role of cancer-associated adipocytes in the tumor microenvironment. *Molecular Medicine Reports*, 24(6), 866. <https://doi.org/10.3892/MMR.2021.12506>
- Ye, M., Song, Y., Pan, S., Chu, M., Wang, Z. W., & Zhu, X. (2020). Evolving roles of lysyl oxidase family in tumorigenesis and cancer therapy. *Pharmacology & Therapeutics*, 215, 107633. <https://doi.org/10.1016/J.PHARMTHERA.2020.107633>
- Yuan, S., Norgard, R. J., & Stanger, B. Z. (2019). Cellular plasticity in cancer. *Cancer Discovery*, 9(7), 837–851. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-19-0015>,
- Zhao, C., Wu, M., Zeng, N., Xiong, M., Hu, W., Lv, W., Yi, Y., Zhang, Q., & Wu, Y. (2020). Cancer-associated adipocytes: emerging supporters in breast cancer. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research: CR*, 39(1), 156. <https://doi.org/10.1186/S13046-020-01666-Z>
- Zhou, J., Enewold, L., Stojadinovic, A., Clifton, G. T., Potter, J. F., Peoples, G. E., & Zhu, K. (2010). Incidence rates of exocrine and endocrine pancreatic cancers in the United States. *Cancer Causes and Control*, 21(6), 853–861. <https://doi.org/10.1007/S10552-010-9512-Y>,
- Zhou, W., Zhang, J., Yan, M., Wu, J., Lian, S., Sun, K., Li, B., Ma, J., Xia, J., & Lian, C. (2021). Orlistat induces ferroptosis-like cell death of lung cancer cells. *Frontiers of Medicine*, 15(6), 922–932. <https://doi.org/10.1007/S11684-020-0804-7/METRICS>

## EKLER

### Ek A: Çalışma Süresince Kullanılan Cihazlar

Tablo A. 1 Kullanılan Cihazların Listesi

ÜRÜN ADI	ÜRÜN KODU	FİRMANIN ADI
Buz Makinası	AF80	Scotsman
CO2 inkübatörü	50116047	Thermo Fisher Scientific
Çalkalayıcı	GyroTwister	Labnet
Derin Dondurucu	Ultra Low Temperature Freezer (ULTF)	ARCTIKO
Dikey Jel Elektroforezi Sistemi	Mini-PROTEAN Tetra Cell	BioRad
Distile Su Cihazı	Tank 30 Liter PE/Milipore	Labor Teknik
Dondurucu (-80°C)	Ultra Low Temperature Freezer Innova U725	New Brunswick Scientific
Elektroforez Donanımları		BioRad
Floresan Mikroskop	IX71	Olympus
Hassas Tartı	LE6202S	Sartorius
Hemositometre	Neubauer Improved	Assistent Germany
İnvert Mikroskop	XDS-1B	SOIF
Laminar Flow	HERASAFE KS	Thermo Scientific
Manyetik Karıştırıcı	SB162	Stuart
Saf Su Cihazı	Direct-Q 5UV	Labor Teknik
Santrifüj	NF 200	Nüve

Kemilüminesans Görüntüleme Cihazı	ChemiDoc MP System 1708280	BioRad
Optik Mikroskop	TH4-200	Olympus
Termal Döngüleyici	MyCycler Thermal Cycler	BioRad
Mikropipetler 10 µl, 100 µl, 1000 µl		CAPP
Mini Santrifüj Cihazı	CR-1512	CAPP
Mikroplaka Okuyucu	iMark	BioRad
Mini Spin Cihazı	Fisherbrand 15358266	ThermoFisher Scientific
Spektrofotometre	IMPLEN NanoPhotometer	BO-GA
Mikrodalga Fırın	MD 595	Arçelik

## Ek B: Çalışma Süresince Hücre Kültüründe Kullanılan Materyaller

Tablo B. 1 Hücre Kültüründe Kullanılan Materyaller

ÜRÜN ADI	ÜRÜN KODU	FİRMANIN ADI
3T3-L1	CL-173	ATCC
MIA PACA-2	CRL-1420	
DMEM	P04-03590	PAN Biotech
Fetal Sığır Serumu Gelişmiş(FBS)	FBS-11A	Capricorn Scientific
Bovine Calf Serum (BCS)	12133C	Sigma-Aldrich
Penisilin/Streptomisin	P06-07100	PAN Biotech
Tripsin-EDTA (0.25%) (1X)	SH40003.01	HyClone
Orlistat		
50 ml Santrifüj Tüpleri	430828	CORNING
15 ml Santrifüj Tüpleri	5100015	CAPP
Kriyojenik Tüpleri	607001	NEST

1.5 ml mikröfüş tüpleri		TPP
75 cm2 Hücre Büyütme Kapları	90076	TPP
25 cm2 Hücre Büyütme Kapları	90026	TPP
60 mm Hücre Büyütme Kapları	93060	TPP
96 Kuyucuklu Hücre Kabı	92096	TPP
Thincert Hücre Kültür inserti	654641	greiner

### Ek C: Çalışma Süresince Kullanılan Kimyasallar

Tablo C. 1 Kullanılan Kimyasalların Listesi.

ÜRÜN ADI	ÜRÜN KODU	FİRMANIN ADI
MTT Reaktifi	BD18787	BLDpharm
Trypan blue		
DMSO	D1370	Duchefa Biochemie
Agaroz (Tip 1)	121853	MERCK
M-PER Memeli Protein Ekstraksiyon Reaktifi	78505	ThermoFisher Scientific
Proteaz İnhibitör Kokteyli	87786	ThermoFisher Scientific
Proteaz İnhibitör Tablet (EDTA içermez)	A32955	ThermoFisher Scientific
Protein Marker	PageRuler Plus Prestained Protein Ladder 26619	Thermo Scientific
Akrilamid/Bis- Akrilamid (%30 çözelti, 37.5:1)	A0011	BIOBASIC
SDS	1177GR100	BIOFROXX
TEMED	8027ML100	BIOFROXX

Etanol	TK.200650	Teksoll
Metanol	34860	Honeywell
Tris Hidroklorür	648317	CALBIOCHEM
Yağsız Süt Tozu	1172KG001	BIOFROXX
p-Kumarik Asit	C9008-1G	Sigma-Aldrich
luminol	A2185	AppliChem
APS	A2941	AppliChem
Hidrojen Peroksit %35	1086001000	MERCK
Kristal Viyole	FN1048735	MERCK
Coomassie Brilliant Blue R- 250 Staining Solution	1610436	BioRad
Oil Red O		
Dexamthasone		
IBMX		
Insulin		
Annexin PI kit		
Ponceau S Solüsyonu	A2935	AppliChem
Tween-20	A600560-0500	Sangon Biotech
PureZOL RNA İzolasyon Ajanı	7326890	BioRad
Kloroform	1024452500	MERCK
DEPC	A0881	AppliChem
2-Propanol (İzopropanol)	1096342500	MERCK
1 kb DNA Ladder	GeneRuler SM0311	Thermo Scientific
DNA Jel Yükleme Boyası (6X)	DNA Jel Yükleme Boyası (6X)	Thermo Scientific
miScript II RT Kit	218161	QIAGEN
iScript cDNA Sentez Kit	1708891	BioRad
miScript SYBR Green PCR Kit	218073	QIAGEN

## Ek D: Western sürecince %12'lik Poliakrilamid Jel Hazırlanması

Tablo D. 1 12'lik Alt Jel (Seperating Gel) hazırlama prosedürü (2Jel)

ÜRÜN ADI	2 JEL
Su	4.1 ml
1.5M Tris-HCL, pH 8.8	2.5 ml
% 10 SDS	0.1 ml
Acrylamid/bisacry (%30, %0.8 w/v)	4 ml
% 10 (w/v) Ammonium Persulphate (aps)	0.05 ml
TEMED	0.01 ml

Tablo D. 2 4'lük Üst Jel (Stacking Gel) hazırlama prosedürü

ÜRÜN ADI	2 JEL
Su	3.075 ml
0.5M Tris-HCL, pH 6.8	1.25 ml
% 10 SDS	0.05 ml
Acrylamid/bisacry (%30, %0.8 w/v)	0.67 ml
% 10 (w/v) Ammonium Persulphate (aps)	0.025 ml
TEMED	0.005 ml

## 6.5 Ek E: Çalışma Süresince Kullanılan Çözeltiler

DMEM besiyeri: 500 ml DMEM'e %10 fetal bovin serumu (FBS) ya da Bovine Calf Serumu (BCS) ve %1 Penisilin/Streptomisin eklenerek hazırlanır. 0,22 µm gözenek

çapına sahip filtreden süzülür. 50 ml'lik santrifüj tüplerine alikotlanarak +4 °C'de saklanır.

Hücre Dondurma Medyası (Freezing Media): 1 ml dimetil sülfoksit (DMSO), 9 ml fetal sığır serumu (FBS) içerisine eklenir. Karışım 0,22 µm gözenek çapına sahip filtreden süzülür. 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine alikotlanarak karanlık ortamda -20 °C'de saklanır.

MTT Reaktifi: 0.05 gram %98 saflıkta 2-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-3,5-diphenyl-2H-tetrazol-3-ium bromide (Thiazolyl Blue, MTT tozu, BLDpharm) 10 ml 1X PBS içinde çözülür. 0,22 µm gözenek çapına sahip filtreden süzülür. 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine alikotlanarak karanlık ortamda -20 °C'de saklanır.

Bradford Reaktifi: 1L'lik Ana stock hazırlamak için, 100 mg Coomassie Brilliant Blue (G-250) boyası tartılarak 50 ml %95'lik etanol içerisinde çözündürülür. Ardından 100 ml %85'lik fosforik asit eklenir. Son olarak çözelti, distile su ile 1 litreye tamamlanır ve karanlık ortamda +4 °C'de saklanır.

Floresan boyamalar: 4nM DiOC6(3) (3,3'-Diheksiloksakarboşyanin İyodür) boya hazırlamak için, 0,0006 gram DiOC6 tozu tartılarak 1 ml DMEM içinde çözündürülür ve +4 °C'de saklanır. 2µg/ul Propidium iyodür (PI) boya hazırlamak için, 0,023 gram PI tozu tartılarak 1 ml DMEM içinde çözündürülür ve +4 °C'de saklanır.

Kristal Viyole: 50ml Kristal viyole hazırlamak için, 0.25 gram kristal viyole tartılır, 12.5 ml %25'lik metanol ve 37.5 ml distile su içerisinde çözündürülür. 0,22 µm gözenek çapına sahip filtreden süzülür ve oda sıcaklığında karanlık ortamda saklanır.

Laemmli (5X) Tamponu: 10 ml Laemmli yükleme tamponu hazırlamak için 2 ml Tris-Cl çözeltisi (1,5 M, pH=6,8), 0,5 ml Bromofenol mavisi (%1), 5 ml Gliserol, 2,5 ml β-merkaptöetanol, 2,0 g SDS içerir. Hazırlandıktan sonra +4°C'de karanlık ortamda saklanır.

Yürütme Tambonu (10X): Yürütme tambonununun 1L 10X ana stokunu hazırlamak için 30,3 g Tris Baz, 144 g Glisin ve 10 g Sodyum Dodeasil Sülfat (SDS) tartılır ve 800 ml distile su ile çözündürülür. pH 8-9 arasında ayarlandıktan sonra distile su ile 1000 ml'ye tamamlanır. Oda sıcaklığında saklanır. Hazırlanan ana stok distile su ile 1X'e dönüştürülür ve kullanılır.

Transfer Tamponu (10X): Transfer tamponununun 1L 10X ana stokunu hazırlamak için 30,2 g Tris Baz ve 144 g Glisin tartılır ve 700 ml distile su ile çözündürülür. pH 8-9 arasında ayarlandıktan sonra distile su ile 1000 ml'ye tamamlanır. Oda sıcaklığında saklanır. Hazırlanan ana stok 1X'e dönüştürmek için 100 ml transfer tamponuna 700 ml distilat su eklenir ve ardından 1000 ml'ye tamamlamak için 200 ml metanol eklenir.

Bloklama sütü (%5 yağsız süt): 50 ml olarak hazırlanan bloklama sütünü hazırlamak için 2,5 gr yağsız süt tozu tartılıp TBS-T (TBS Tween20) içerisinde bir karıştırıcı yardımıyla çözündürülür.

Memeli Hücre Lizis Tamponu (CLB): Hücre lizis tamponu, 10 ml M-PER memeli protein ekstraksiyonuna 1X dilüe edilen proteaz inhibitör kokteyli eklenerek hazırlanır. +4°C'de saklanır.

Mild Strip Tamponu: 15 g Glisin, 1 g SDS ve 10 ml Tween 20 tartılır ve manyetik karıştırıcı kullanılarak 800 ml distile su içerisinde çözündürülür. PH 2,2'ye ayarlandıktan sonra distile su ile 1000 ml'ye tamamlanır.

10X TBS: 5,6 g Tris-baz, 88 g NaCl ve 24 g tartılır ve manyetik karıştırıcı kullanılarak 900 ml Tris-HCl içerisinde çözündürülür. 5M HCl ve 5M NaOH kullanılarak pH 7,6 olarak ayarlanır ve Tris-HCl ile 1000 ml'ye tamamlanır. Hazırlanan ana stok distile su ile 1X'e dönüştürülür ve kullanılır.

Luminol: 0,44 g Luminol tozu tartılır ve 10 ml dimetilsülfoksit (DMSO) içerisinde çözündürülür. karanlık ortamda 20°C'de saklanır.

Kumarik Asit: 0,15 g Kumarik asit tartılarak 10 ml etanol ile çözündürülür. +4°C'de saklanır.

Amonyum Persülfat (%10): 1 g APS tartılır ve 10 ml distile su ile çözündürülür. -20°C'de saklanır.

Membran görüntüleme için çözelti A ve B hazırlanır. Çözelti A, 9 ml distile su, 1M Tris-HCl, 50 µl Kumarik asit ve 200 µl Luminol eklenerek hazırlandı. Çözelti B, 9 ml distile su, 1M Tris-HCl pH=8,5 ve 10 µl Hidrojen Peroksit eklenerek hazırlandı.

Ek F: Çalışma Süresince Kullanılan Antikor ve primerlerchnology (CST)' den alınmıştır.  
Her primer ve sekonder 1:1000-1:3000 aralığında çalışılmıştır.

