



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



ASPIRİNİN ANTİ-MİYELOMA ETKİNLİĞİNİN MAKROFAJ POLARİZASYONU ARACILI BELİRLENMESİ

Nurbanu Gönülkırılmaz

**TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Asuman SUNGUROĞLU**

**ANKARA
2023**

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ASPIRİNİN ANTİ-MİYELOMA ETKİNLİĞİNİN
MAKROFAJ POLARİZASYONU ARACILI BELİRLENMESİ

Nurbanu Gönülkırılmaz

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Asuman SUNGUROĞLU

ANKARA
2023

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Yüksek Lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Aspirinin Anti-Miyeloma Etkinliğinin Makrofaj Polarizasyonu Aracılı Belirlenmesi” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir. Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: NURBANU GÖNÜLKIRMAZ

Tarih: 13/01/2023

İmza:

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında Nurbanu GÖNÜLKIRMAZ tarafından hazırlanan “Aspirinin Anti-Miyeloma Etkinliğinin Makrofaj Polarizasyonu Aracılı Belirlenmesi” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak OY BİRLİĞİ / OY ÇOKLUĞU ile kabul / ret edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 13/01/2023

İmza

Doç. Dr. Oya Sena Aydos
Ankara Üniversitesi
Jüri Başkanı

İmza

Prof. Dr. Asuman Sunguroğlu
Ankara Üniversitesi

İmza

Dr. Öğr. Üyesi Pelin Telkoparan Akıllılar
Yüksek İhtisas Üniversitesi

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

İmza

Prof. Dr. Fügen AKTAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	vii
Şekiller	ix
Çizelgeler ve Tablolar	xi
1. GİRİŞ	1
1.1. Multipl Miyeloma	1
1.2. Miyeloma’da Hücre Trafığı	2
1.3. MM Tümör Mikroçevresi / MM Kemik İliği Nişi (KIN)	2
1.4. Makrofajlar	4
1.5. Fagositoz	5
1.6. TMC’de Makrofajlar	6
1.6.1. M0 Makrofajlar	7
1.6.2. M1 Makrofajlar	7
1.6.3. M2 Makrofajlar	7
1.6.4. Tümör İlişkili Makrofajlar (TAM)	9
1.7. MM’de TAM’ların İmmünoterapötik Hedeflenmesi	9
1.7.1. TAM’ların Azaltılması	10
1.7.2. TAM’ların Anti-Tümör Aktivasyonunun Yeniden Programlanması	11
1.8. Aspirin (Asetil Salisik Asit, ASA)	12
1.8.1. ASA ve Kanser	13
2. GEREÇ VE YÖNTEM	15
2.1. Hücre Kültürü	15
2.2. Aspirin hazırlanması	15
2.3. THP1 Hücrelerinin Makrofaj Alt-Tiplerine Farklılaştırılması	15
2.3.1. Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) hazırlanışı	15
2.3.2. IFN γ hazırlanışı	16
2.3.3. LPS hazırlanışı	16
2.3.4. Hücrelerin M0, M1 ve M2 fenotipine farklılaştırılması	16
2.4. MTT Hücre Canlılık Deneyi	17
2.4.1. ASA IC50 Konsantrasyonlarının Zamana Bağlı Belirlenmesi	17
2.5. Belirlenen Genlerin İfade Analizi	18
2.5.1. RNA izolasyonu	18
2.5.2. cDNA Sentezi	20
2.5.3. qRT-PCR	20
2.6. Akım Sitometri ile Makrofaj Polarizasyonunun Belirlenmesi	21
2.7. Akım Sitometri ile Fagositozun Tayini	21
2.8. Konfokal Mikroskop ile Fagositozun Görüntülenmesi ve Analizi	22

3. BULGULAR	23
3.1. M0, M1 ve M2 makrofajların ışık mikroskobu altındaki görüntüleri	23
3.2. MTT Analizi	24
3.2.3. ASA'nın M0 Hücreleri Üzerindeki Canlılığa Etkisi	24
3.2.4. ASA'nın M1 Hücreleri Üzerindeki Canlılığa Etkisi	26
3.2.5. ASA'nın M2 Hücreleri Üzerindeki Canlılığa Etkisi	28
3.2.6. ASA'nın MM1S Hücreleri Üzerindeki Canlılığa Etkisi	30
3.3. qRT- PCR	32
3.3.1. CD163	32
3.3.2. CD80 / CD86	33
3.3.3. IL10	34
3.3.4. IL6	35
3.4. Flow Sitometri ile Makrofaj Polarizasyonunun Belirlenmesi	36
3.4.1. THP1 Hücre Serisi	36
3.4.2. M0 Makrofaj	37
3.4.3. M1 Makrofaj	38
3.5. Flow Sitometri ile Fagositozun Tayini	40
3.5.1. M0 Hücrelerinde ASA öncesi ve Sonrası Fagositozun Tayini	40
3.5.2. M1 Hücrelerinde ASA öncesi ve Sonrası Fagositozun Tayini	42
3.5.3. M2 Hücrelerinde ASA öncesi ve Sonrası Fagositozun Tayini	44
3.6. Konfokal Mikroskop ile Fagositozun Görüntülenmesi ve Analizi	46
3.6.1. M0 Makrofaj	46
3.6.2. M1 Makrofaj	47
3.6.3. M2 Makrofaj	48
4. TARTIŞMA	50
4.1. MM ve Makrofajlar	50
4.2. MM ve ASA	51
4.3. MM'de ASA ve SİTOKİNLER	53
4.3.1. CD163	53
4.3.2. CD80 / CD86	54
4.3.3. IL-10	55
4.3.4. IL-6	56
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	58
ÖZET	61
SUMMARY	62
KAYNAKLAR	63
özgeçmiş	69

ÖNSÖZ

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde, değerli bilgilerini benimle paylaşan, kendisine ne zaman danışsam bana kıymetli zamanını ayırıp sabırla ve büyük bir ilgiyle bana faydalı olabilmek için elinden gelenden fazlasını sunan her sorun yaşadığımda yanına çekinmeden gidebildiğim, güler yüzünü ve samimiyetini benden esirgemeyen ve gelecekteki mesleki hayatımda da bana verdiği değerli bilgilerden faydalanacağımı düşündüğüm kıymetli hocam Prof. Dr. Asuman Sunguroğlu'na teşekkürü bir borç biliyor ve şükranlarımı sunuyorum.

Tez çalışmam sürecinde ve öncesinde, kaynak ve yöntem açısından bana sürekli yardımda bulunarak yol gösteren, bana her zaman destek olup yola devam etmem için yardımcı olan değerli hocalarım Dr. Tülin Özkan ve Öğr. Gör. Buket Altınok Güneş'e çok teşekkür ederim. Akademik yolculuğun benim için zor olduğu devam etmekte zorlandığım zamanlarda manevi olarak yanımda olan ve bana güç olan arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Hayatımın her alanında yanımda olan, tezimi yaparken beni cesaretlendiren, zorluklarla karşılaştığımda benimle birlikte göğüs geren ve hayatımı kolaylaştıran sevgili nişanlım Volkan Özgültekin'e teşekkür ederim.

Teşekkürün en özelini ise beni zorlu hayat koşullarında tek başında büyüten, maddi manevi her şeyimi eksiksiz hissettiren, hayallerini benimle şekillendiren, varlığına şükrettiğim canım annem Güler Şahinler'e ayırmak isterim.

Nurbanu Gönülkırılmaz

Ankara, 2023

SİMGELER VE KISALTMALAR

ASA	Asetil salisik asit
ARG	Arjinaz
COX	Siklooksijenaz
CSF	Koloni Stimüle Edici Faktör
IFN	İnterferon
IL	İnterlökin
IMiD	İmmün Modölatör İlaçlar
iNOS	İndüklenebilir nitrik oksit
iHDAC	Histon Deasetilaz İnhibitörleri
KiN	Kemik iliği nişi
LPS	Lipopolisakkarit
M0	Dinlenme durumundaki makrofaj
M1	Klasik olarak aktifleştirilmiş makrofaj
M2	Alternatif olarak aktifleştirilmiş makrofaj
mAb	Monoklonal Antikor
MDSC	Miyeloid kökenli süpresör hücreler
MFS	Mononükleer Fagositik Sistem
MGUS	Belirsiz monoklona gamopati
MM	Multipl Miyelom
MFS	Mononükleer Fagositik Sistem
NDMM	Yeni Tanı Konmuş Multipl Miyelom
NSAID	Steroid olmayan anti-inflamatuvar ilaç
PI	Proteazom İnhibitörleri
PMA	Phorbol myristat Asetat
SMM	Smoldering Multipl Miyelom
STAT	Sinyal Transdüktörü ve Transkripsiyon Faktörü
TAM	Tümör İlişkili Makrofajlar
TGF	Dönüştürücü Büyüme Faktörü
Th	T Yardımcı Hücre

TMÇ	Tümör Mikroçevresi
TNF	Tümör Nekroz Faktörü
Treg	Regülatör T hücreleri
VEGF	Vasküler Endotel Büyüme Faktörü



ŞEKİLLER

Şekil 1.1. MM progresyonu sürecinde KIN immün elemanlarının düzenlenmesi.	4
Şekil 1.2. Fagositoz Yolağı.	6
Şekil 1.3. Makrofaj polarizasyonu.	8
Şekil 1.4. MM’de TAM’ların immünoterapötik olarak hedeflenmesi.	11
Şekil 1.5. ASA’nın olası kemoprevensiyon mekanizmasının şeması.	14
Şekil 2.1. THP hücrelerinin M0, M1 ve M2 fenotipine farklılaşma deney şeması.	17
Şekil 2.2. İzole edilen RNA’ların saflık tayini.	19
Şekil 3.1. M0 Makrofaj, 40x	23
Şekil 3.2. M1 makrofaj, 40x	23
Şekil 3.3. M2 makrofaj, 40x	23
Şekil 3.4. ASA’nın M0 makrofajların canlılığına etkisi.	24
Şekil 3.5. ASA’nın M1 makrofajların canlılığına etkisi.	26
Şekil 3.6. ASA’nın M2 makrofajların canlılığına etkisi.	28
Şekil 3.7. ASA’nın MM1S tümör hücrelerinin canlılığına etkisi.	30
Şekil 3.8. ASA’nın makrofajlarda CD163 ifadesine etkisi.	32
Şekil 3.9. ASA’nın makrofajlarda CD80 ifadesine etkisi.	33
Şekil 3.10. ASA’nın makrofaj ve kanser hücrelerinde IL10 ifadesine etkisi.	34
Şekil 3.11. ASA’nın makrofaj ve kanser hücrelerinde IL6 ifadesine etkisi.	35
Şekil 3.12. THP1 hücrelerinde yüzey belirteçlerinin akım sitometri sonuçları.	36
Şekil 3.13. M0 hücrelerinde yüzey belirteçlerinin akım sitometri sonuçları.	37
Şekil 3.14. M1 hücrelerinde yüzey belirteçlerinin akım sitometri sonuçları.	38
Şekil 3.15. Makrofajlarda yüzey belirteç ifadelerinin ifadesinin grafik gösterimi.	39
Şekil 3.16. ASA Uygulanmayan M0 Hücrelerinin Fagositoz Oranı.	40
Şekil 3.17. ASA Uygulanan M0 Hücrelerinin Fagositoz Oranı.	41
Şekil 3.18. ASA Uygulanmayan M1 Hücrelerinin Fagositoz Oranı.	42
Şekil 3.19. ASA Uygulanan M1 Hücrelerinin Fagositoz Oranı.	43
Şekil 3.20. ASA Uygulanmayan M2 Hücrelerinin Fagositoz Oranı.	44
Şekil 3.21. ASA Uygulanan M2 Hücrelerinin Fagositoz Oranı.	45
Şekil 3.22. ASA Uygulanmayan M0 Makrofajların Fagositozunun Gösterimi	46

Şekil 3.23. ASA Uygulanan M0 Makrofaj Hücrelerinin Fagositozunun Gösterimi.	47
Şekil 3.24. ASA Uygulanmayan M1 Makrofajların Fagositozunun Gösterimi	47
Şekil 3.25. ASA Uygulanan M1 Makrofajların Fagositozunun Gösterimi.	48
Şekil 3.26. ASA Uygulanmayan M2 Makrofajların Fagositozunun Gösterimi	48
Şekil 3.27. ASA Uygulanan M2 Makrofajların Fagositozunun Gösterimi.	49



ÇİZELGELER

Çizelge 2.1. cDNA sentez için gerekli karışım.	20
Çizelge 2.2. cDNA sentez için reaksiyonun adımları.	20
Çizelge 3.1. ASA'nın M0 makrofajlarına 24 saatlik etkisinin istatistiksel analizi.	25
Çizelge 3.2. ASA'nın M0 makrofajlarına 48 saatlik etkisinin istatistiksel analizi.	25
Çizelge 3.3. ASA'nın M0 makrofajlarına 72 saatlik etkisinin istatistiksel analizi.	25
Çizelge 3.4. ASA'nın M1 makrofajlarına 24 saatlik etkisinin istatistiksel analizi.	26
Çizelge 3.5. ASA'nın M1 makrofajlarına 48 saatlik etkisinin istatistiksel analizi.	27
Çizelge 3.6. ASA'nın M1 makrofajlarına 72 saatlik etkisinin istatistiksel analizi.	27
Çizelge 3.7. ASA'nın M2 makrofajlarına 24 saatlik etkisinin istatistiksel analizi.	28
Çizelge 3.8. ASA'nın M2 makrofajlarına 48 saatlik etkisinin istatistiksel analizi.	29
Çizelge 3.9. ASA'nın M2 makrofajlarına 72 saatlik etkisinin istatistiksel analizi.	29
Çizelge 3.10. ASA'nın MM1S hücrelerine 24 saatlik etkisinin istatistiksel analizi.	30
Çizelge 3.11. ASA'nın MM1S hücrelerine 48 saatlik etkisinin istatistiksel analizi.	31
Çizelge 3.12. ASA'nın MM1S hücrelerine 72 saatlik etkisinin istatistiksel analizi.	31
Çizelge 3.13. ASA uygulanan tüm hücrelerin saatlere göre IC50 dozları.	31
Çizelge 3.14. Akım sitometri sonucu yüzey belirteç ifadelerinin tablosu.	38

1. GİRİŞ

1.1. Multipl Miyeloma

Multipl Miyeloma (MM), kemik iliğinde lokalize olan plazma hücrelerinin anormal büyümesi ile karakterize edilen hematolojik bir malignitedir. Bu anormal büyüme yıkıcı kemik lezyonlarına, böbrek hasarına, anemiye ve hiperkalsemiye neden olmaktadır (Cowan ve ark., 2022). MM hala tek bir kanser olarak kabul edilse de sitogenetik olarak farklı özelliklere sahip plazma hücre malignitelerini içerir. Bu farklılıklar hastalığın süreci ile ilişkili olarak birincil sitogenetik anomaliler ve ikincil sitogenetik anomaliler olarak sınıflandırılmaktadır. Trizomiler ve IgH translokasyonları hastalığın belirsiz monoklonal gamopati (MGUS) aşamasında ortaya çıkan birincil sitogenetik anomaliler olarak incelenirken, gain(1q), del(1p), del(17p), del(13), RAS mutasyonları ve MYC translokasyonları ise ikincil sitogenetik anomaliler olarak sınıflandırılmaktadır. Ek olarak, del(17p), gain(1q), t(4;14), t(14;16) anomaliler hastalığın riski ve kötü prognozu ile ilişkilendirilmiştir (Bryant ve ark., 2019; Rajkumar, 2019). Belirtilen anomalilerin gözlenmeye başlaması ve hastalığın sürecinin takibi ile MM süreci 4 döneme ayrılmaktadır: 1) belirsiz monoklonal gamopati (MGUS), 2) hafif zincir monoklonal gamopati, 3) smoldering multipl myelom (SMM) ve 4) Multipl Miyelom (MM) (Bryant ve ark., 2019).

MM tedavisi genellikle farklı etki mekanizmalarına sahip farklı ilaç kombinasyonlarını içerir: kortikosteroidler, alkilleyici ajanlar, antrasiklinler, proteazom inhibitörleri (PI'ler), immünomodülatör ilaçlar (IMiD'ler), histon deasetilaz inhibitörleri (iHDAC'ler), monoklonal antikorlar (mAb'ler) ve yüksek doz kemoterapi. Son zamanlarda yeni tanı konmuş MM (NDMM) hastaları, genellikle bortezomib, lenalidomid ve deksametazon gibi üçlü kombinasyonları içeren indüksiyon tedavisi ile tedavi edilmektedir. Adayların nakil için uygunluğuna bağlı olarak diğer tercih edilen tedavi yöntemleri uygulanabilmektedir. Tedavinin bu ilk aşaması, tümör yükünü azaltma ve hematopoietik kök hücre toplanmasını iyileştirme

amacına sahiptir (Pinto ve ark., 2020). Bu tedavi yöntemlerinin hastalarda sağ kalımı önemli ölçüde arttırdığı bildirilmiş olsa da MM için geliştirilmiş kesin ve etkin tedavi yöntemi bulunmamaktadır (Ghandili ve ark., 2021).

MM’de immün mikroçevrede salgılanan sitokinler tümörün immün sistemden kaçmasına, ilaç direncine ve hatta efektör hücrelerin baskılanmasına neden olmaktadır. Bu nedenle MM’de immünoterapi önemli bir terapötik hedef olarak düşünülmektedir. İmmünoterapi, MM’de düzensiz fonksiyon gösterdiği daha önceden bildirilmiş olan immün sistem hücrelerinin (B-T lenfositleri, makrofajlar, NK hücreleri vb.) hedeflenerek immün sistemdeki işlev bozukluğunun üstesinden gelmeye çalışmaktadır Jadoon ve ark., 2021).

1.2. Miyeloma’da Hücre Trafığı

MM hücrelerinin etrafında gözlenen etkileşimleri, MM hücrelerinin kemik iliğine yerleşmelerine, kolonize olmalarına ve ilerleyen evrelerde kemik iliğinden ayrılmalarına olanak sağlar. Bu etkileşimlerden en önemlisi kemik iliğinde yüksek oranda ifade edilen ve CXCL12 kemokini ile etkileşime giren kemokin reseptörü CXCR4’tür. CXCR4, normal ve malign hücrelerin kemik iliğine “homing”’inden sorumlu temel moleküldür. Ayrıca, kemik iliğine hücreleri çağırdıktan sonra orada tutulumundan sorumludur (Şekil 1.4.) (Garcia-Ortiz ve ark., 2021).

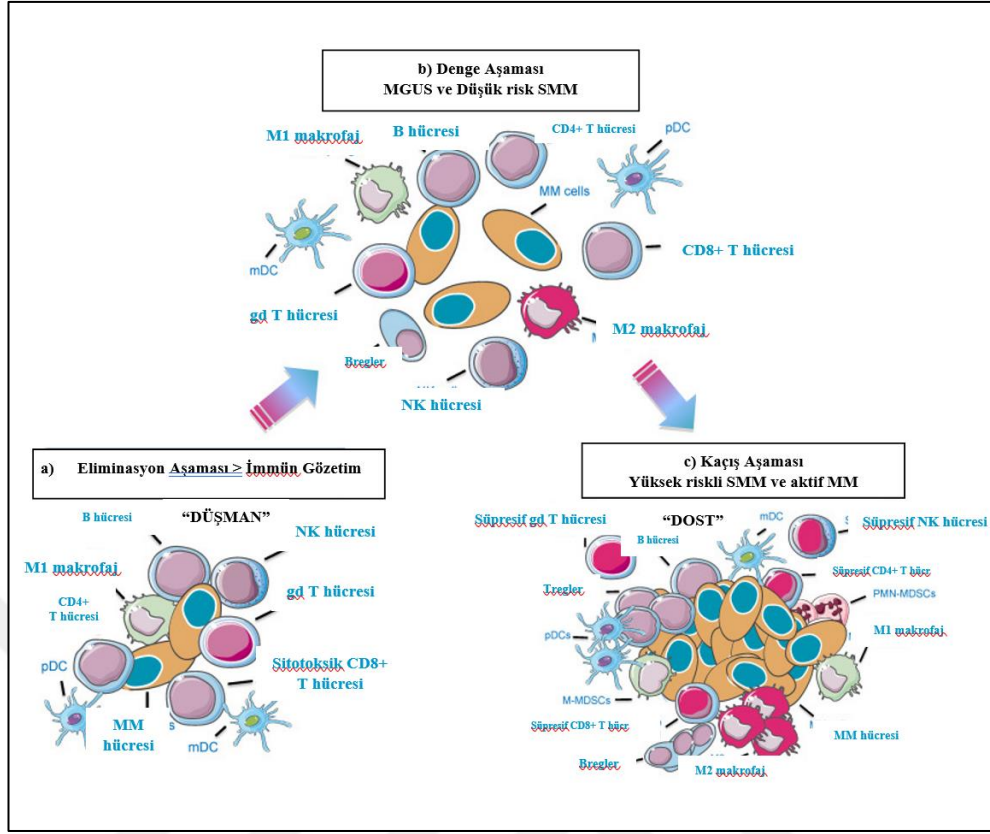
1.3. MM Tümör Mikroçevresi / MM Kemik İliği Nişi (KIN)

Tümör Mikroçevresi (TMÇ), yüzyılı aşkın süredir araştırılan bir konsept olmuştur. 1899 yılında Stephen Paget kanserin yayılması için kanser hücrelerine (*tohum*) ve bu hücrelerin büyümesi için destekleyici bir ortama (toprak) ihtiyaç duyduğunu belirterek **tohum ve toprak** (orijinali “seed and soil”) hipotezini öne sürmüştür (Ribatti ve ark., 2006). O zamandan beri kanser araştırmaları için TMÇ’yi anlamak için birçok çalışma yapılmış ve TMÇ tanımlanmaya çalışılmıştır. Genel

olarak TMC, fibroblastlar, immün sistem hücreleri, hücre dışı matriks ve damarlardan oluşan bir ağ olarak karakterize edilebilir. Fakat TMC, kanserin erken evresinde ve geç evresinde tamamen farklı işlev gösterebilmektedir (Şekil 1.1). Bu nedenle TMC'nin kanserdeki rolünü anti-karsinojenik veya pro-karsinojenik olarak nitelendirmek oldukça zor ve karmaşıktır (Wei ve ark., 2020).

TMC'nin rolü birçok kanserde olduğu gibi MM progresyonu için de oldukça önem taşımaktadır. MM kemik iliği nişi (KIN), neoplastik plazma hücreleri ile birlikte miyeloid ve lenfoid kökenden oluşan bağışıklık hücreleri tarafından kuşatılmış heterojen bir çevredir ve bu çevrenin miyelomagenez sürecinde kritik rol oynadığı belirtilmiştir. Bu nedenle son yıllarda MM tedavisi için özellikle KIN hedefli tedaviler aranmaktadır. MM, kanserde premalign-MGUS-kaçış aşamasındaki immün dengenin değişiminin gözlenebilmesi için mükemmel bir örnektir. MGUS ve SMM gibi hastalığın ilk aşamalarında IgH translokasyonları ve hiperdiploidi gözlenirken hastalığın ilerleyen aşamalarında çok daha karmaşık süreçler hastalığın tezahürüne etki etmektedir. Bu karmaşık süreçlerden en önemlisi de hastalığın progresyonu ve hatta agresifliği ile doğrudan ilişkili bulunan KIN'de gözlenen değişikliklerdir (Lopes ve ark., 2021).

MM KIN'de meydana gelen değişikliklerin; 1) reseptör sinyal yolağında ve sitokin ifadenmesinde disregülasyona neden olduğu, 2) T, NK ve dendritik hücrelerde değişimlere sebep olduğu, 3) regülatör T hücrelerinin (Treg), miyeloid kökenli süpresör hücrelerin (MDSC) ve tümör ilişkili makrofajların ekspansiyonuna destek olarak immün süpresif çevrenin gelişimine katkıda bulunduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Zavidij ve ark., 2020).



Şekil 1.1. MM progresyonu sürecinde KIN immün elemanlarının düzenlenmesi. a) MM sürecinin başlarında immün mikroçevresi tümör hücrelerine saldırmaya hazır bir düşman olarak davranmaktadırlar. Eliminasyon aşamasında tümör mikroçevresini tümörün “düşmanları” diyebileceğimiz sitotoksik T hücreleri, M1 makrofajlar ve NK hücreleri domine etmektedir. b) Hastalığın ilerlemesi ile tümör mikroçevresinde tümörün düşmanlarının yanı sıra tümörün progresyonunu ve agresifliğini destekleyecek M2 makrofajlar, regülatör B ve T hücreleri gibi tümörün “dostları” denilen hücrelerin sayısı da artmaya başlar. Bu evre de dostlar ve düşmanlar bir dengededirler. c) Yüksek riskli SMM ve aktif MM oluşumunun görüldüğü hastalığın en ileri aşamalarında tümör mikroçevresi artık tümörigenezi destekleyecek şekilde düzenlenmiştir. Bu evrede, antitümörijenik etki gösteren immün sistem elemanları süpresif hale uyarılırken tümörigenezi destekleyen “dost” hücrelerin sayısı artar (Lopes ve ark., 2021).

1.4. Makrofajlar

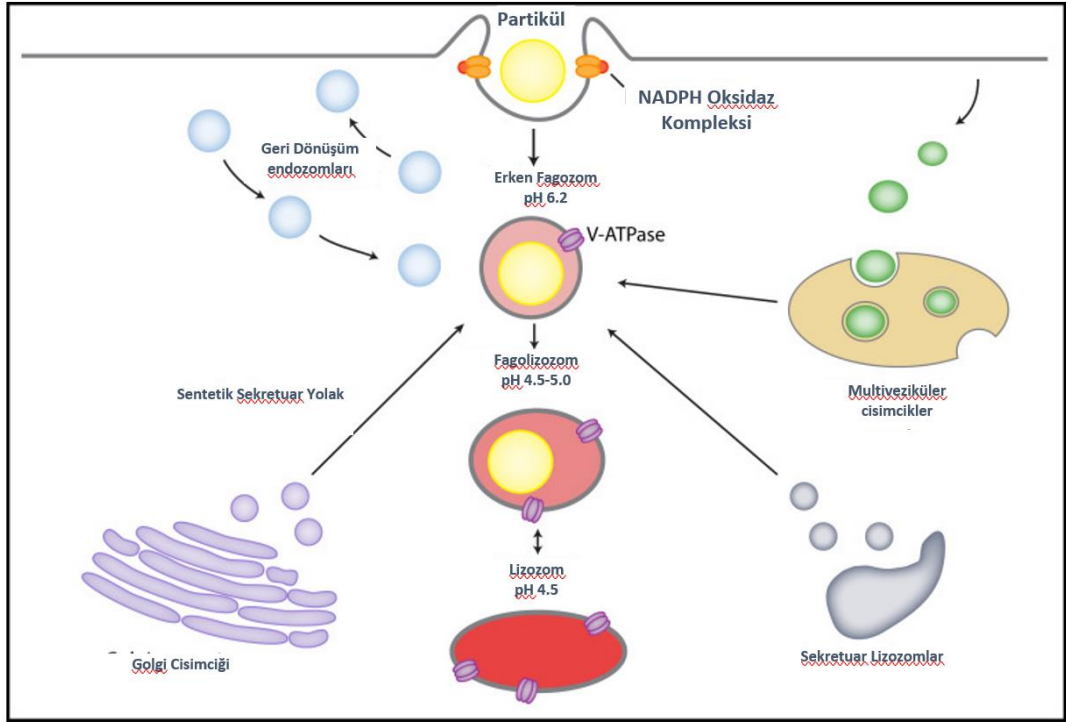
Makrofajlar, patojenlere karşı savunmada önemli rol oynayan doğal bağışıklık sisteminin temel elemanlarıdır. Makrofajların temel fonksiyonları arasında; fagositöz, bakterilerin yok edilmesi, sitokin üretimi ve adaptif bağışıklık yanıtının gelişebilmesi için T hücrelerine antijen sunumu bulunmaktadır (Bhattacharya ve ark., 2019). Makrofajlar, bulundukları yer ve işlevlerine göre çeşitli şekillerde

sınıflandırılmaktadırlar. Dokuda daimi bulunan makrofajlar “dokuda yerleşik makrofajlar olarak isimlendirilirken tümör çevresinde bulunan ve tümörün gelişimini destekleyerek metastaz, anjiogenez ve invazyonu teşvik eden makrofajlara “tümör ilişkili makrofajlar” olarak adlandırılmaktadırlar (Hirayama, 2017).

Makrofajların incelenmeye başlanmasıyla paralel olarak “**fagositoz**” süreci de araştırılmaya ve aydınlatılmaya çalışılmıştır (Gordon, 2016). İlk olarak Metchnikoff tarafından fagositik doğaları ile tanımlanan makrofajlar, Metazoan soyoluşundaki eski hücrelerdir. Erişkin memelilerde, anatomik ve fonksiyonel çeşitlilik göstermeleri nedeniyle tüm dokularda bulunurlar. Makrofajlar, bulundukları dokuda kendi bölgelerini oluşturan, adeta bir dokunun içine yerleşik başka bir doku gibi organize olurlar. Makrofajlar için birçok farklı sınıflandırma şekli bulunsa da, “Mononükleer Fagositik Sistem (MFS)” tanımı en genel ve açıklayıcı tanım olarak kabul edilebilir. (Wynn ve ark., 2013). Fagositoz konusundaki araştırmaları ile bilinen Rabinovitch ise 1995 yılında “profesyonel fagositler” terimini ortaya koymuştur. Rabinovitch’in bu tanımlamasında nötrofiller, monositler, makrofajlar, dendritik hücreler, osteoklastlar ve eozinofiller yer almaktadır (Rabinovitch, 1995).

1.5. Fagositoz

Fagositoz tek hücreli organizmalarda beslenme için gereken bir süreçtir. Çok hücreli organizmalarda ise yalnızca fagosit olarak adlandırılan hücrelerin gerçekleştirebildiği, 0.5 μm ’den büyük partiküllerin tanınmasını takiben “fagozom” adı verilen plazma zarından türetilmiş bir vezikül tarafından hücre içine alınarak sindirilmesi ile tamamlanan bir süreçtir. Fagositler, mikrobiyal patojenlerin yanı sıra apoptotik hücreleri de tanıyarak sindirebilir. Bu özellikleri sayesinde yalnızca mikrobiyal eliminasyon için değil aynı zamanda doku homeostazı için gerekli hale gelirler (Flannagan ve ark., 2012). Fagositoz süreci dört temel adımda incelenebilir: 1) hedef partikülün tanınması, 2) partikülün hücre içine alım (internalizasyon) mekanizmasının aktive olabilmesi için sinyal oluşumu, 3) fagozom oluşumu ve 4) fagolizozom maturasyonu (Şekil 2).



Şekil 1.2. Fagositoz Yolağı. Ekzojen partiküllerin hücre içine alınması (heterofaji) sürecinde ilk olarak dinamik plazma membran füzyonu gerçekleşir. Hücre içi veziküler zarla bölünmeyi takiben fagozomlar maturasyona uğrar. Son olarak düşük pH'nın meydana getirdiği asidik ortamda fagozom ve lizozomun füzyonunu ile fagolizozom formasyonu için füzyon ve sindirim ile sonuçlanır (Gordon, 2016).

1.6. TMÇ'de Makrofajlar

Makrofajların en temel özellikleri antijen sunmak ve fagositoz yapmak olarak bilinse de malignite ile ilişkilerini ortaya koyan birçok çalışma bulunmaktadır. Bulundukları dokulara ve ortamda salgılanan sitokinlere göre makrofajlar farklı alt tiplere farklılaşabilirler (Yunna ve ark., 2020). Aktivasyon ve fonksiyon durumuna göre, makrofajlar temel olarak iki alt gruba ayrılır: 1) klasik olarak aktive edilmiş makrofajlar (M1), 2) alternatif aktive edilmiş makrofajlar (M2). M1 makrofajlar pro-inflamatuvar sitokinler ve kemokinler salgılayarak pozitif immün yanıt oluşumuna katkı sağlar ve immün sürveyansta (gözetim) rol oynar. Diğer yandan M2 makrofajlar, IL-4, IL-10 ve TGF β gibi anti-inflamatuvar sitokinler salgılayarak doku rejenerasyonunu sağlayabilmek için bağışıklık yanıtlarını azaltırlar. Makrofajların farklı aktivite durumları arasındaki denge vücut homeostazı için etkilidir. Bu

dengedeki değişimler ise çeşitli hastalıkların ortaya çıkmasında rol oynamaktadır (Li ve ark., 2021).

1.6.1. M0 Makrofajlar

Kemik iliğinden türetilen dinlenme (resting) durumundaki makrofajlar (M0 makrofajlar), genellikle polarize makrofajların öncüleri olarak kabul edilir. M1 ve M2 makrofajlarının M0'dan türetilerek farklılaştığı ve M0 makrofajların M1 ve M2'ye farklılaşmadan önce belirli bir işlev göstermediği, böylelikle M0 durumunun makrofajların yalnızca dinlenme hali olduğu düşünölmektedir (Zhang ve ark., 2022)

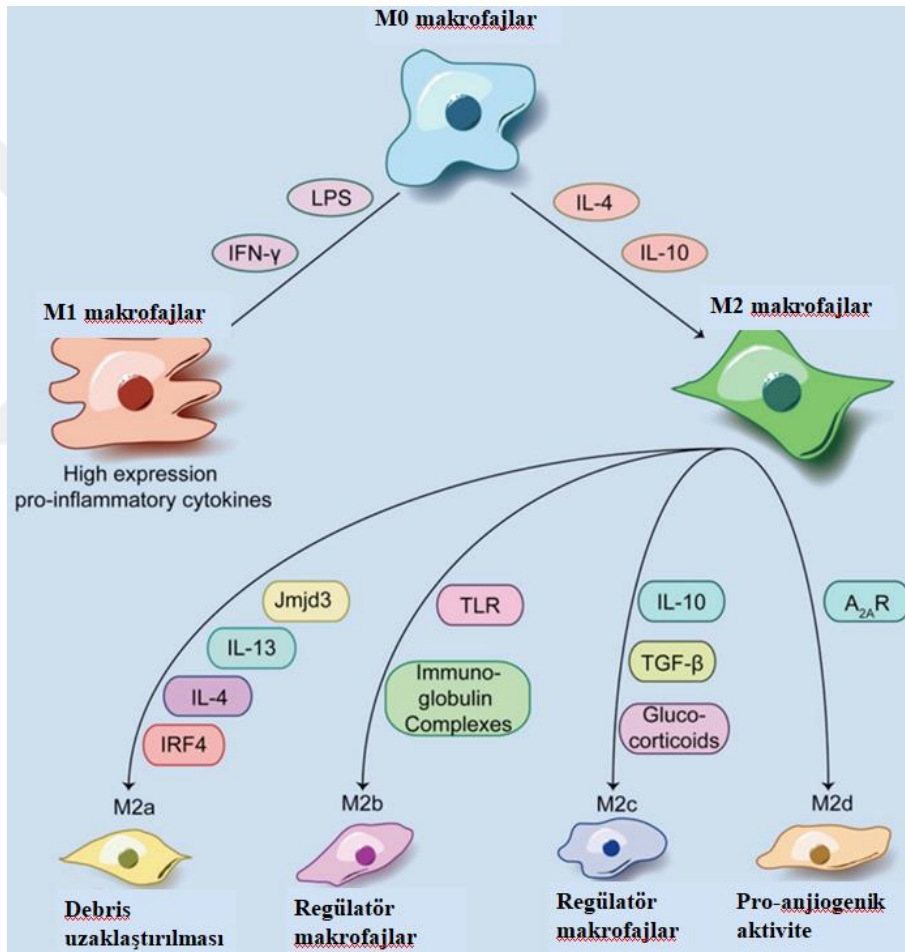
1.6.2. M1 Makrofajlar

M1 makrofajlar en klasik olarak bilinen makrofajlardır ve lipopolisakkarit (LPS) ve interferon gama ($IFN\gamma$) tarafından uyarılır ve tümör nekroz faktörü alfa ($TNF\alpha$), interlökin-1 ($IL1$), indöklenebilir nitrik oksit sentaz ($iNOS$) gibi pro-inflamatuvar sitokinler salgılamaktadırlar. Bu salgılar, bakteri, virüs ve kötü huylu tümör hücreleri gibi enfeksiyöz organizmaları öldürebilir. Makrofajlar tarafından tanınan yabancı bir madde lizozomlarla veziköller halinde birleşir ve lizozomlardaki hidrolitik/asidik enzimlerin etkisi ile parçalanır (Şekil 1.3). Bütün bu özellikleri sayesinde M1 makrofajların enfeksiyona karşı savunma ve anti-kanser etkilerinin oldukları düşünölmektedir. Artan bağışıklık yanıtları kronik enfeksiyona ve otoimmün hastalıklara yol açabileceğinden dolayı M1 makrofajlar doku homeostazı için dengede tutulması gereken önemli bir bileşendir (Kadomoto ve ark., 2021).

1.6.3. M2 Makrofajlar

M1 makrofajların tersine M2 makrofajlar, doku onarımı ve immün toleransta rol oynarlar. Sinyal transdöktörü ve transkripsiyon aktivatörü 6 ($STAT6$)'nın aktivasyonu aracılığıyla $IL-4$ ve $IL-13$ gibi sitokinler tarafından uyarılırlar. Ek olarak

inflamatuvar yanıtı baskılamak için IL-10, arjinaz (ARG) ve TGF β gibi sitokinler salgılar. Hücre kalıntılarını temizleyen, yara iyileşmesini ve anjiogenezi uyarak etki gösteren M2 makrofajlar, organların ve yumuşak dokuların korunmasında, bağışıklık dengesinin düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır (Bashir ve ark., 2016; Murray ve ark., 2014). Makrofajların M2 alt tipinde sınıflandırılması oldukça genel bir sınıflandırmadır. M2 makrofajlar fonksiyonlarındaki çeşitliliğe dayanarak 4 farklı gruba sınıflandırılabilir: 1) M2a, 2) M2b, 3) M2c, 4) M2d (Şekil 3) (Pan ve ark., 2020).



Şekil 1.3. Makrofaj polarizasyonu. Makrofajlar çevreden salgılanan sitokinlerin uyarımı sonucunda çeşitli alt tiplere karakterize edilebilirler. LPS ve IFN γ gibi pro-inflamatuvar sitokinlerin salgılanması sonucu M1 fenotipe dönüşürken, IL-4 ve IL-10 gibi anti-inflamatuvar sitokinlerin salgılanması sonucu ise M2 alt tipine farklılaşabilirler. M2 makrofajlar gösterdikleri fonksiyonlara göre 4 alt grupta incelenmektedirler. M2a olarak karakterize edilen makrofajlar IL-4, IL-13 gibi sitokinler tarafından uyarılır ve hücre kalıntılarının temizlenmesinden sorumludurlar. M2b ve M2c alt tipindeki makrofajlar ise regülatör makrofajlar olarak fonksiyon gösterirler. M2d alt tipinde karakterize olan makrofajların ise pro-anjiogenik aktivite gösterdiği ortaya konmuştur (Wang ve ark., 2019).

1.6.4. Tumor İlişkili Makrofajlar (TAM)

Tumor ilişkili makrofajlar (TAM) tumor mikroçevresinin oluşumuna katkı sağlayan makrofajlardır. TAM'lar çeşitli tümörlerde yaygın olarak bulunur ve tümörün progresyonu, invazyonu ve metastazının yanı sıra ilaç direnci ile de ilişkilendirilmişlerdir (DeNardo ve Ruffell, 2019). TAM'lar, fonksiyon ve fenotipindeki benzerlikler sebebiyle M2 makrofajlar grubuna dahil edilmektedir (Park ve ark., 2022). TAM'ların MM'deki rolünü ortaya koyan birçok çalışma bulunmaktadır. MM'de kemik iliğinin önemli bir bileşeni olarak fonksiyon gösteren TAM'lar, kemik iliğinin yaklaşık %10'unu oluşturmaktadır. Kemik iliğindeki geniş popülasyonları nedeniyle immünoterapötik olarak hedeflenmektedirler.

TAM'lar dolaşımdaki monositlerden köken alır. Koloni stimüle edici faktör-1 (CSF1), CC kemokinleri (CCL2, CCL3, CCL4, CCL5 ve CCL8) ve vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) tarafından tümörün bulunduğu dokuya çağrılır. CSF1'in yüksek ifadenmesi TAM'ların tümör dokusuna çağırılması ile ilişkilendirilmiştir (Sozzani ve ark., 2002).

Farelerde yapılan in vivo çalışmalar MM hastalığı oluşturulan farelerin kemik iliğinde makrofaj sayısının arttığını öne sürse de yapılan immünohistokimyasal çalışmalar MGUS'lu hastalara göre aktif MM oluşumu gözlenen hastalarda makrofaj sayısında bir değişim olduğunu göstermemiştir. Çarpıcı bir şekilde, hastalığın ilerleyen safhalarında makrofaj sayılarında bir değişim gözlenmemesine rağmen yapılan akım sitometri çalışmaları sonucu M2 polarizasyonunda önemli bir artış olduğu ortaya konmuştur (Calcinotto ve ark., 2015).

1.7. MM'de TAM'ların İmmünoterapötik Hedeflenmesi

TAM'lar kemik iliğindeki önemli fonksiyonlarından dolayı MM tedavisi için önemli bir terapötik hedef haline gelmiştir. Bu nedenle TMÇ'de TAM'ların

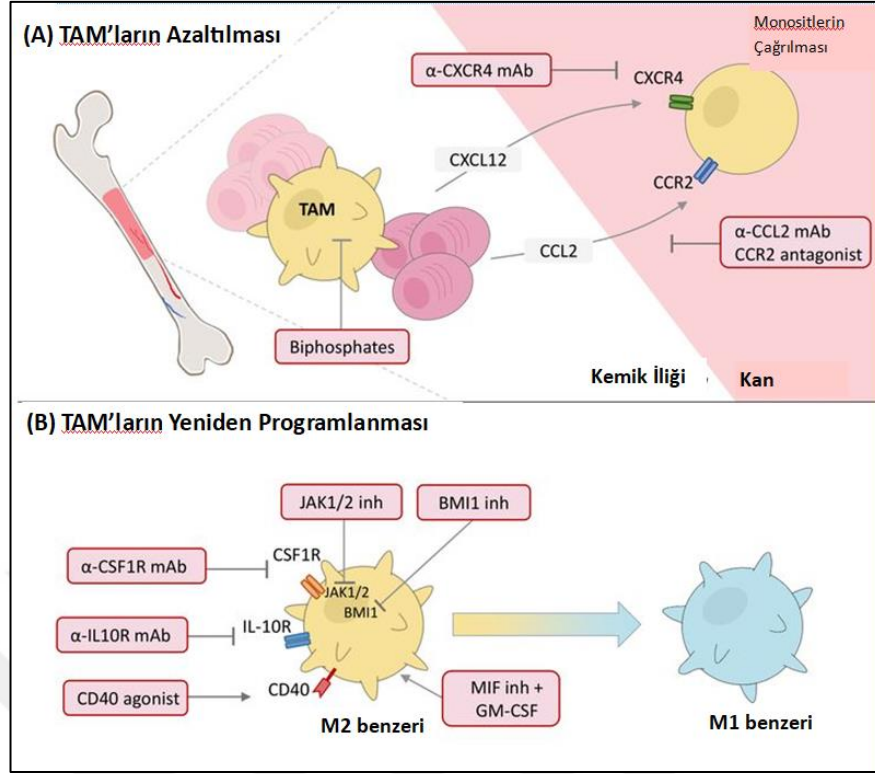
hedeflenmesi için kullanılan stratejiler şunlardır. 1) TAM'ların Azaltılması, 2) TAM'ların Anti-Tümör Aktivasyonunun Yeniden Programlanması.

1.7.1. TAM'ların Azaltılması

TMÇ'de TAM sayısının azaltılması makrofaj-tümör desteğinin kesilmesi için planlanan bir stratejidir. Bu iki şekilde gerçekleştirilebilir; 1) TMÇ'de TAM'ların öldürülmesini hedeflemek, 2) Monositlerin TMÇ'ye çağrılmasını engellemek.

TAM'ların hedeflenerek öldürülmesi Opperman ve arkadaşlarının (2019) yaptığı araştırmada, klodronat lipozom uygulamasının TAM'ların deplesyonuna neden olarak TMÇ'deki tümör yükünü azalttığını göstermiştir (Opperman ve ark., 2019). TAM'ların doğrudan öldürülmesinin aksine, TMÇ'ye monosit çağrılmasının kontrol edilmesi ve TAM migrasyonunun engellenmesi üzerine daha kapsamlı çalışmalar bulunmaktadır. CXCL12-CXCR4 sinyal yolağı MM kemik iliği için önemli bir makrofaj çağrı mekanizmasıdır. Araştırmalar sonucunda MM hücrelerinin yüksek miktarda CXCL12 ligandı taşıdığı gösterilmiştir (Teixido ve ark., 2018). Bu sinyal yolağı yalnızca makrofajların tümör dokusuna migrasyonuna katkı sağlamaz. Ayrıca yüksek CD206 ifadenmesi ve IL10 salgısının artışı ile birlikte çağrılan makrofajları M2 benzeri fenotipe farklılaştırır (Azab, ve ark., 2009; Beider ve ark., 2014).

TAM'ın TMÇ'ye göçünü terapötik hedeflemek amacıyla, monoklonal antikor aracılığı ile CCR2/CCL2 yolağının hedeflenmesi pankreas, karaciğer kanserlerinde prelinik ve klinik olarak umut vadetmektedir. Bu nedenle bu yolağın hedeflenmesi TAM deplesyonunu sağlayarak MM tedavisinde umut vaad edici olabileceği bildirilmiştir (Nywening, ve ark., 2016, Li ve ark., 2017; Tu ve ark., 2020).



Şekil 1.4. MM'de TAM'ların immünoterapötik olarak hedeflenmesi. Preklinik stratejiler (A) TAM'ların azaltılması ve (B) TAM'ların yeniden programlanmasını içermektedir. CCR2-CXCL12 yolu aracılığıyla monositlerin kandan kemik iliğine çağırıldığı gösterilmektedir. Bu etkileşim ile çağırılan monositlerin TMÇ'nin de etkisiyle M2 benzeri fenotipe uyarıldığı bildirilmektedir (Sun ve ark., 2022).

1.7.2. TAM'ların Anti-Tümör Aktivasyonunun Yeniden Programlanması

TAM'ların depleksyonu yanı sıra TMÇ'de pro-tümörjenik etki gösteren M2 benzeri fenotipe sahip TAM'ların fenotipini anti-tümörjenik M1 fenotipine farklılaştırmak üzere yeniden programlamak MM tedavisinde yeni ve popüler bir araştırma alanıdır.

Wang ve arkadaşları (2018) yaptıkları çalışmada, CSF1 reseptörünü (CSF1R) bloke eden monoklonal antikörleri kullanarak M2→M1 farklılaşmasını takip ettiler. CSF1R blokajının MM ilişkili makrofajların kısmi depleksyonunu sağlarken TMÇ'deki M2 makrofajların M1 fenotipine polarize olmasını desteklediğini gösterdiler. (Wang ve ark., 2018).

1.8. Aspirin (Asetil Salisik Asit, ASA)

Tarihte yer alan en eski ve en kapsamlı tıbbi papirüs olarak Ebers papirüsüne göre (~M.Ö. 1534) salisilatların kullanımı eski Mısırlılara kadar dayanmaktadır. Ebers papirüsünde yer alan 700'ü aşkın bitkisel ilaçtan en önemlisi günümüzde söğüt olarak bilinen ve ağrı kesici, iltihap önleyici olarak kullanılan “tjeret” veya “salixtir (Jeffreys 2008). M.Ö. 400 civarında Hipokrat’ın ateş düşürücü olarak salisilik çayını kullanması, 1758 yılında Rahip Edward Stone’un sıtma hastalarına söğüt ağacının özütünden kurutularak elde edilen kabuğu “agues” (sıtma) hastalarına uygulaması ve hastalarda iyileşmeyi gözlemlemesi salisilatların tarihteki yerini ve önemini ortaya koymaktadır (Fuster ve Sweeny 2011). 1863’te kurulan Bayer şirketine 1894 yılında katılan genç kimyager Felix Hoffman’ın babasının romatizma hastalığına tedavi geliştirmek için sodyum salisilattan daha az yan etki gösterecek bir madde arayışı Aspirin’in keşfine öncülük etmiştir. Hoffman’ın laboratuvar defter kayıtlarına göre salisik asidi asetik anhidrit ile geri tepkimeye sokarak (reflux) fenol grubunu asetillemeyi başarmış böylece asetilsalisik asidi (ASA) en saf haliyle elde etmiştir.

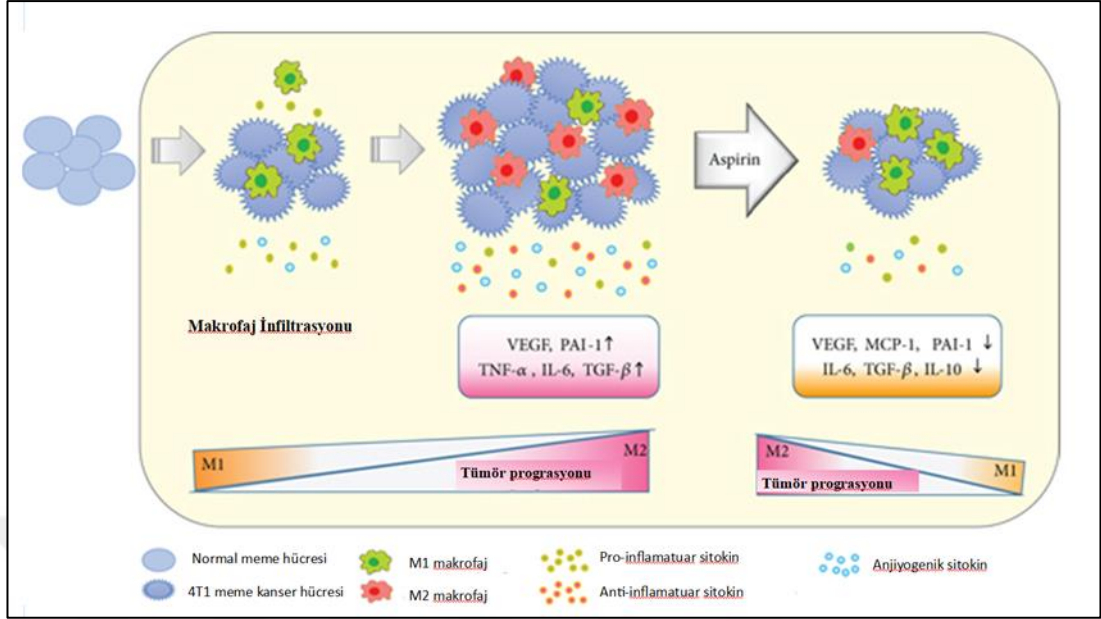
Prostanoidler, prostaglandinler (ör. PGD₂, PGE₂, PGF_{2a}), tromboksan A₂ (TXA₂) ve prostasiklin (PGI₂) içeren bir biyoaktif lipid ailesidir. Prostanoid biyosentezinin hız sınırlayıcı adımı, COX-1 ve COX-2 olmak üzere 2 izoforma sahip bir enzim olan siklooksijenaz (COX) tarafından kataliz edilir. Hem COX-1 hem de COX-2, araşidonik asidin PGG₂'ye ve ardından tüm prostanoidlerin ortak öncüsü olan PGH₂'ye dönüşümüne aracılık eden neredeyse aynı enzimatik aktiviteye sahiptir (Vane ve Botting 1997). Bununla birlikte, her bir izoform tarafından sentezlenen prostanoidlerin spektrumu, farklı hücre tiplerinde prostanoid sentezlere fonksiyonel bağlanma ve farklı ekspresyon modellerinin bir sonucu olarak in vivo olarak farklılık gösterir. Örneğin, COX-2, enflamasyon ve yara iyileşmesi sırasında endotel hücrelerinde ve makrofajlarda indüklenir ve bu hücrelerde PGE₂ sentaz ile etkileşime girerek proinflatuar PGE₂ üretir (Kihara ve ark., 2014; Kirkby ve ark., 2016). COX2'nin tersine, COX-1 yapısal olarak ifade edilir. Trombositlerde COX-1, prokoagülan uyarılar (örn. kollajen, trombin ve adenosin difosfat [ADP]) üzerine protrombotik TXA₂ oluşturmak için TXA₂ sentaz (TXAS) ile birleşir (FitzGerald

1991, Armstrong, Truss et al. 2008). Steroid olmayan anti-inflamatuvar ilaç (NSAID) olan ASA, COX1 ve COX2 olarak bilinen prostaglandin H sentaz 1 ve prostaglandin H sentaz 2'nin COX aktivitesini geri dönüşümsüz olarak baskılar. Düşük doz ASA seçici olarak COX-1 aktivitesini inhibe ederken, daha yüksek dozlar hem COX-1 hem de COX-2'yi inhibe eder. Bu baskılama mekanizması araşidonik asidin enzime ulaşmasını engelleyen COX cebinde lokalize olan serin amino asidinin (COX1'de serin529; COX2'de serin516) asetillenmesi aracılığıyla gerçekleşmektedir. Böylece prostanoid biyosentezinin yukarı akışının inhibisyonuna ve sonuç olarak tromboksan A2 (TXA2) ve prostasiklin (PGI2) oluşumunun inhibisyonuna neden olur (Patrono ve ark., 2005; Patrono ve Baigent 2019).

1.8.1. ASA ve Kanser

Prostaglandinler, kısmen makrofajların aktivasyonunu ve polarizasyonunu indükleyerek bağışıklık fonksiyonunu da modüle edebilir. TAM'lar, enflamatuvar sinyallemeye yanıt olarak sıklıkla M2 fenotipini aktive eder ve polarize olur. Aktive olduklarında, enflamatuvar yanıtı değiştirirler, Tip I T-yardımcı (Th1) hücre adaptif bağışıklığını inhibe ederler, matrisin yeniden şekillenmesine katkıda bulunurlar ve hücre proliferasyonunu ve anjiyogenezi desteklemektedirler (Barnard ve ark., 2018).

COX2 ve enzimatik ürünü PGE2, immün negatif düzenleyici moleküller olarak, immün baskılayıcı tümör mikroçevresini oluşturmak için immün hücrelerin immün süpresör hücrelere farklılaşmasını kolaylaştırır, böylece tümör ilerlemesini ve immün toleransı kolaylaştırabilir. Bu nedenle, COX2/PGE2 ekspresyonunun ASA aracılığı ile aşağı regülasyonu, tümör tedavilerinde anahtar bir yaklaşım olarak düşünülmektedir (Şekil 1.5) (Sun ve ark., 2022).



Şekil 1.5. ASA'nın olası kemoprevensiyon mekanizmasının şeması. 4T1 meme kanseri hücre ortamında, RAW264.7 makrofaj infiltrasyonu, VEGF, PAI-1, TNF- α , IL-6 ve TGF- β seviyelerini ve M2 makrofaj ekspresyonunu artırarak tümörün ilerlemesine fayda sağladığı gösterilmiştir. ASA tedavisi, anjiyojenik ve inflamasyonla ilişkili sitokin VEGF, PAI-1, MCP-1, IL-6, IL-10 ve TGF- β üretimini azaltmıştır. Bunların yanı sıra, aspirin tedavisi makrofajlarda M1 ekspresyonunu artırıp M2 ekspresyonunu azaltarak tümör mikroçevresindeki iletişimin bozulmasına ve tümör progresyonunun körelmesine neden olmuştur (Hsieh ve Wang 2018).

Gerçekleştirilen tez çalışmasında; TMÇ'de MM hücrelerine makrofaj desteğinin kesilmesi önemli bir strateji olarak planlanmıştır. Bu tez projesinin amacı, ASA'nın anti-miyelom etkinliğini belirlemektir. Bu amaç doğrultusunda öncelikle ASA'nın MM hücrelerine ve Makrofaj hücrelerine olan sitotoksik etkisi araştırılmıştır. Bunun yanı sıra ASA'nın MM mikroçevresine etkisinin anlaşılması amacıyla M2→M1 polarizasyonuna olan etkisi analiz edilmiştir. Son olarak, ASA'nın tümör hücrelerinin makrofajların fagositozuna olan etkinliği araştırılmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Hücre Kültürü

Deneylerde tümör hücresi olarak MM hücre modeli olan MM1S (GFP+, luc+) hücre serisi kullanılmıştır. Makrofaj farklılaşması amacıyla İnsan Histiyoitik Lenfoma hücre serisi olan THP1 monosit hücreleri kullanılmıştır. Hücreler, %10 Fetal Bovin Serum (FBS) ve %1 penisilin/streptomisin içeren RPMI1640 besiyeri içerisinde, %5 CO₂ içeren nemli kültür ortamında büyütülmüşlerdir. Hücreler %80 yoğunluğa ulaştıklarında pasajlanarak besiyeri/hücre dengesi korunmuştur. Deneylerin tekrarında yeniden kullanılmak üzere hücreler erken pasajlarda %10 DMSO içeren besiyeri içerisinde kademeli bir şekilde dondurularak daha sonra kullanılmak üzere -80 derin dondurucuya kaldırılarak saklanmıştır.

2.2. Aspirin hazırlanması

Asetil salisik asit (C₉H₈O₄), toz halde temin edilmiştir. 1 gram tartılarak 5 ml etil alkol içerisinde çözülmüştür. Moleküler ağırlığı 180,158 g/mol olarak belirtilen asetil salisik asitin son konsantrasyonu 1,11 Molar olarak hesaplanmıştır. Hazırlanan asetil salisik asit 100 µl olacak şekilde bölünerek -20°C’de saklanmıştır.

2.3. THP1 Hücrelerinin Makrofaj Alt-Tiplerine Farklılaştırılması

2.3.1. Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) hazırlanışı

PMA (Sigma, ABD), 1 mg toz halinde temin edilmiştir. 10 mg PMA’nın 1 ml DMSO içerisinde çözüldüğü bildirilmiştir. Çözünürlüğü dikkate alınarak hazırlandığında moleküler ağırlığı 616,82 g/mol olan PMA’nın son konsantrasyonu

16,21 mM olarak hesaplanmıştır. 2 µl olacak şekilde tüplere dağıtılarak -20°C’de saklanmıştır.

2.3.2. IFN γ hazırlanışı

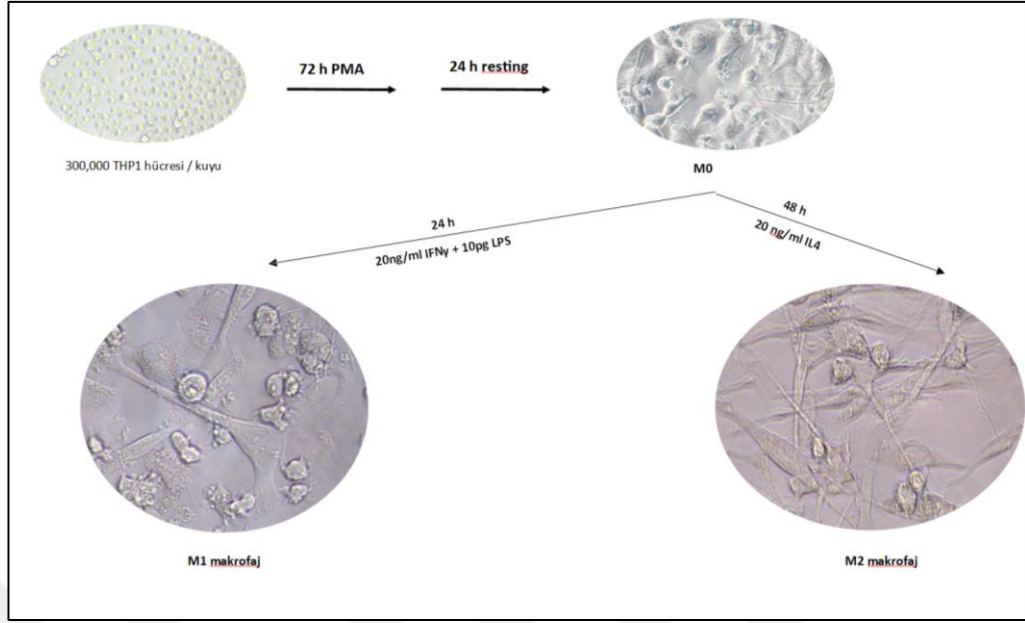
100ng/µl ana stok halindeki 200ng/ml olacak şekilde ara stok hazırlanarak 500 µl olacak şekilde tüplere dağıtılıp -20°C’de saklanmıştır.

2.3.3. LPS hazırlanışı

Ana stok 1mg/ml olarak -80°C’de saklanmaktadır. Kuyulara 100pg/ml olarak uygulanacağından 1. ara stok 100ng/ml olacak şekilde -80°C’de saklanmaktadır. 2. Ara stok ise 100pg/ml olacak şekilde hazırlanarak -20°C’de saklanmıştır.

2.3.4. Hücrelerin M0, M1 ve M2 fenotipine farklılaştırılması

THP1 hücreleri 300,000 hücre/kuyu olacak şekilde 24 kuyulu plakalara ekilir. Hücrelere 100nM/1ml olacak şekilde PMA uygulanır. Hücrelerin M0 fenotipine farklılaşabilmeleri için 3 gün beklenir. 3. Günün sonunda hücrelerin üzerinden PMA içeren besiyeri uzaklaştırılarak 1ml taze besiyeri eklenir ve bir gece boyunca hücreler inkübatöre kaldırılır (resting). 4. Günün sonunda hücreler M0 fenotipine farklılaşmıştır. Hücreler M1 ve M2 fenotipine M0’dan farklılaştırılmıştır. Bu nedenle 2 saat boyunca PMA uygulanan ve ardından taze besiyeri içerisinde dinlenmeye alınan M0 hücrelerini M1 fenotipine farklılaştırmak için 24 saat boyunca 20ng/ml IFN γ ile 10pg/ml LPS birlikte uygulanmıştır. M2 fenotipine farklılaştırmak için ise, M0 makrofaj hücrelerine 48 saat boyunca 20 ng/ml IL4 uygulanmıştır (Şekil 4).



Şekil 2.1. THP hücrelerinin M0, M1 ve M2 fenotipine farklılaşma deney şeması.

2.4. MTT Hücre Canlılık Deneyi

2.4.1. ASA IC50 Konsantrasyonlarının Zamana Bağlı Belirlenmesi

Aspirin'in MM1S ve makrofaj hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi MTT deneyi ile analiz edilmiştir. Hücreler 96 kuyulu plakalara 40,000 hücre/kuyu olacak şekilde ekilmiştir. Hücrelere 0.5mM, 1mM, 2.5mM ve 5mM ASA dozları uygulanmıştır. Canlılık analizinin gerçekleştirilebilmesi için ASA uygulanmayan kontrol grubuna ise EtOH uygulanmıştır. Hücreler 24h, 48h ve 72h boyunca ASA ile muamele edilmiştir. İlgili saatlerin sonunda hücrelere 5mg/ml MTT {3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium-bromide} (Serva, Almanya) ajanından 10 µl uygulanmıştır. Hücreler 2h boyunca kültür şartlarında inkübe edilmiştir. 2 h sonunda formazanın açığa çıkarak hücrelerdeki canlılığın analiz edilebilmesi için tetrazolyum iyonunun çözölebileceği SDS içeren bir çözücü (100 µl) her bir kuyuya uygulanmıştır. Her kuyunun optik densitesi referans dalga boyu olan 690nm'ye karşı 570nm'de ölçülmüştür. Her bir doz için 6 tekrarın ortalaması alınarak IC50 değerleri hesaplanmıştır.

2.5. Belirlenen Genlerin İfade Analizi

2.5.1. RNA izolasyonu

Aspirin uygulanan ve uygulanmayan M0, M1, M2 makrofajlardan ve MM1S hücrelerinden Trizol ile total RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Deney protokolü şu adımları içermektedir:

1. Makrofaj hücreleri (M0, M1 ve M2) PMA uygulaması sonrası adherent hücre özelliği gösterdikleri için RNA izolasyonu ile toplanırken üzerlerindeki besiyeri uzaklaştırılarak 1 ml Trizol içerisinde 1.5ml eppendorflara toplanmıştır. MM1S hücreleri ise süspanse hücreler olmaları sebebiyle önce pipetaj ile kuyulardan toplanıp, 5000 rpm’de 6 dakika santrifüj edildikten sonra supernatant kısmı uzaklaştırılıp pellet kısmına 1ml Trizol uygulanmıştır.
2. Trizol ile toplanan hücreler daha sonra toplu izole edilmek üzere -80 derin dondurucuya kaldırılmıştır.
3. RNA izole edileceği zaman hücrelerin bulunduğu eppendorflar oda ısısına çıkarılarak eriyene kadar beklenmiştir.
4. Eriyen eppendorflarda 1ml Trizol içerisine 200 µl kloroform eklenerek tüpler çalkalanmış olup oda ısısında 10 dakika beklenmiştir.
5. Kloroform inkübasyon süresinin bitmesinin ardından tüpler daha önceden +4°C’ye getirilmiş olan soğutmalı santrifüj içerisinde 12,000g’de 15 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası 3 faza ayrılan hücre debrisinin en üst fazı (berrak faz, RNA) pipetle dikkatle çekilerek daha önceden işaretlenmiş yeni RNA tüplerine aktarılmıştır.

6. RNA fazının bulunduğu yeni tüplerin üzerine ~500 µl izopropanol eklenerek hafifçe çalkalanmıştır ve oda ısısında 10 dakika inkübasyona bırakılmıştır.
7. İnkübasyonun ardından izopropanol içeren tüpler soğutmalı santrifüj içerisinde 12,000'de 10 dakika boyunca santrifüj edilmiştir.
8. Santrifüj sonrası tüplerin dibinde RNA peleti gözle görülmüştür.
9. Ardından Trizol ile gerçekleştirilen manuel RNA izolasyonu esnasında kullanılan tuz ve diğer moleküllerin ortamdan uzaklaştırılması için RNA peletleri %75 etanol ile yıkanarak son kez 8000g'de 5 dakika santrifüj edilir.
10. Etanolün dikkatlice tüplerden uzaklaştırılması ile tüpler ters çevrilerek içerisindeki etanol buharlaşana kadar tüpler oda ısısında bekletilmiştir.
11. En son aşamada etanol buharlaştıktan sonra RNA pelletleri ~100µl DNAaz ve RNAaz içermeyen su ile sulandırılarak miktar tayini gerçekleştirilmiştir (Şekil 2.2.)

	ng/µL	260/280
MM1S kontrol	720,037	1,9095
MM1S 48 h aspirin	394,464	1,7965
M0 kontrol	251,288	1,6515
M0 48 h aspirin	223,055	1,7055
M1 kontrol	243,982	1,5765
M1 48 h aspirin	177,354	1,4815
M2 kontrol	318,736	1,8745
M2 48 h aspirin	205,207	1,7995

Şekil 2.2. İzole edilen RNA'ların saflık tayini.

2.5.2. cDNA Sentezi

1 ug RNA örneği Bio-Rad şirketinin "iScript cDNA Synthesis Kit" isimli cDNA sentez kiti kullanılarak kite ait protokol takip edilerek cDNA'ya dönüştürülmüştür. Oluşan cDNA 5 kat seyreltilerek RT-qPCR (Reverse Transcription-quantitative Polymerase Chain Reaction) deneylerinde kullanılmıştır. Kullanılacak RNA çözeltisinin hacmi buna göre $(1.0\text{ug} \div c_RNA\text{ug/uL}) = x \text{ uL}$ olmak üzere hesaplanmıştır. cDNA sentezi için hazırlanacak karışım ve reaksiyon adımları aşağıdaki çizelgelerde belirtilmiştir (Çizelge 2.1, Çizelge 2.2)

Çizelge 2.1. cDNA sentez için gerekli karışım.

Nükleaz içermeyen su	16-x µl
5x iScript Reaction Mix	4 µl
RNA Kalıbı	1ug total RNA olacak şekilde hesaplanmıştır.
Toplam Hacim	20 µl

Çizelge 2.2. cDNA sentez için reaksiyonun adımları.

Protokol Adımı	Sıcaklık	Süre
Primerlerin Bağlanması	25°C	5 dk
Ters transkripsiyon	48°C	20 dk.
Ters Transkriptazın Etkisizleştirilmesi	95°C	1 dk.
Tepkimenin 4°C Saklanması	95°C	Süresiz

2.5.3. qRT-PCR

M0, M1, M2 ve MM1S hücrelerinde ASA'nın IC50 dozunun uygulanmasından sonra CD163, CD80, CD86, IL-10 ve IL-6 genlerinin mRNA ifadelerini belirlemek ve kantite etmek amacıyla qPCR yapılmıştır. Bütün genlerin ifade seviyeleri gliseraldehid -3-fosfat dehidrojenaz (GAPDH) göre normalize edilmiştir. Kullanılan genler BioRad'ın perimer panellerinden temin edilmiştir. CD163, CD80 ve CD86 primerleri "Cell Surface Markers" panelinden, IL-10 ve IL-6 primerleri ise "Human Cytokine Primer Library" panelinden kullanılmıştır. Erime derecesi olarak 60°C belirlenmiştir. Her bir gen 3 biyolojik tekrar olmak üzere 2 replika olarak çalışılmıştır.

2.6. Akım Sitometri ile Makrofaj Polarizasyonunun Belirlenmesi

M0, M1 ve M2 alt tipine farklılaştırılan makrofaj hücrelerinin tayini için belirli yüzey belirteçlerinin tespit edilmesi için akım sitometrisi kullanılmıştır. Literatürde makrofaj alt tipleri için belirlenen yüzey belirteçleri hücrelerde tayin edilmiştir. Akım sitometride analizi gerçekleştirilen yüzey belirteçleri şunlardır; CD36, CD38, CD71, CD80, CD11b, CD11c, CD200 ve CD206. Farklılaşma süreci tamamlanan M0, M1 ve M2 makrofajları kuyulardan toplanarak 6000 rpm'de 3 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Ardından süpernatant uzaklaştırılarak 50µl %5 FBS içeren besiyeri hücrelerin üzerine eklenmiştir. Ardından ilgili belirtecin antikorundan 5 µl eklenerek 20 dakika karanlıkta inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası hücreler santrifüj edilerek PBS ile iki kez yıkandıktan sonra Accuri CD Akım sitometri cihazında yüzey belirteçlerinin ifadesi belirlenmiştir.

2.7. Akım Sitometri ile Fagositozun Tayini

24 kuyulu plakalara ekilerek farklılaştırılan makrofaj hücreleri Vybrant™ DiD (Cat: V22887, Thermo Scientific, ABD) boyası ile boyanmıştır. ASA uygulanan ve uygulanmayan ve kırmızı DiD boyası ile boyanan makrofajların bulunduğu kuyuların üzerine GFP+ işaretli 1,000,000 MM1S hücresi taze besiyeri içerisinde ekilmiştir. Adherent hücre olarak plakaların dibine yerleşik bulunan makrofaj hücreleri üzerine süspanse kanser hücresi eklenerek 3 saat boyunca kokültür gerçekleştirilmiştir. 3 saatin sonunda fagositozun gerçekleştirildiği kuyular taze besiyeri ile 3 kere yıkanarak süspanse kanser hücreleri makrofaj hücrelerinden uzaklaştırılır. Kuyunun dibinde yerleşik bulunan makrofajlar toplanarak akım sitometride kırmızı hücre (FL4A) ve yeşil hücre (FL1A) oranı tayin edilmiştir. Kırmızı makrofaj hücrelerinin içerisindeki GFP+ miktar oranı fagositoz oranı olarak tayin edilmiştir.

2.8. Konfokal Mikroskop ile Fagositozun Görüntülenmesi ve Analizi

6 kuyulu plakalara ince lameller alkol ile yıkanıp kurutularak yerleştirilmiştir. Ardından kuyu üzerinde yerleşik bulunan lamelin yerinden oynatılmamasına dikkat edilerek 600,000 hücre/kuyu olacak şekilde THP1 hücreleri ekilmiştir ve farklılaştırma basamakları uygulanmıştır (bkz. Şekil 4). Ardından M0, M1 ve M2 makrofajlar Vybrant™ DiD (Cat: V22887, Thermo Scientific, ABD) boyası ile boyanmıştır. Farklılaştırılan makrofaj hücrelerinin kontrol grubuna ASA uygulanmamıştır. ASA uygulanan makrofaj hücreleri 48 saat boyunca 2.5 mM ASA uygulanan ve uygulanmayan GFP işaretli 1,000,000 MM1S hücreleri ile 3 saat boyunca kokültür edilmiştir. 3 saat sonunda süspanse tümör hücreleri 3 kere taze besiyeri ile yıkanarak ortamdan uzaklaştırılmıştır. Kırmızı makrofaj hücrelerinin içerisindeki yeşil tümör hücrelerinin görüntülenmesi konfokal mikroskop ile analiz edilerek 100 hücre sayılmıştır. Kırmızı ve içerisinde yeşil bulunan hücreler fagositozu gerçekleştirmiş hücre olarak kabul edilmiş olup yüzde yeşil hücre oranına göre fagositoz oranı tayin edilmiştir.

3. BULGULAR

3.1. M0, M1 ve M2 makrofajların ışık mikroskobu altındaki görüntüleri



Şekil 3.1. M0 Makrofaj, 40x



Şekil 3.2. M1 makrofaj, 40x

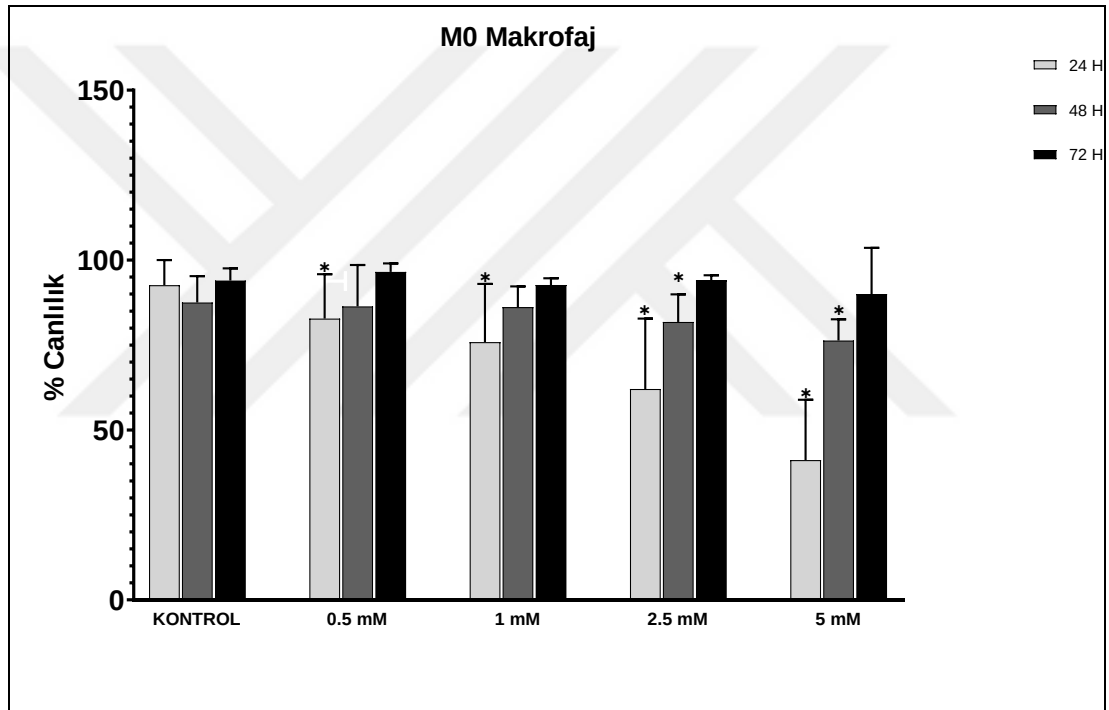


Şekil 3.3. M2 makrofaj, 40x

THP1 hücrelerine farklı sitokinlerin uygulanması sonucu elde edilen M0, M1 ve M2 makrofajlarda morfolojik değişim gözlenmiştir. Bu değişimin makrofajların polarizasyonu ve fagositoz yetenekleri ile ilgili olabileceği düşünülmüştür.

3.2. MTT Analizi

3.2.1. ASA'nın M0 Hücreleri Üzerindeki Canlılığa Etkisi



Şekil 3.4. ASA'nın M0 makrofajların canlılığına etkisi. 24 saatin sonunda ASA'nın M0 hücre canlılığını doza bağımlı olarak düşürdüğü tespit edilmiştir ve bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Çizelge 3.1). En yüksek ASA dozunda 24. Saatteki canlılık %92'den %41'e düşmüştür. Buna karşılık 48 ve 72 saat sonuçlarında canlılık %76 ve %90'a yükselirken 24. saate kıyasla canlılıkta artış gözlenmiştir. ASA'nın M0 hücrelerine uygulanması kısa süreli toksik bir etki yaratsa da zamana bağlı olarak toksik etki göstermediği belirlenmiştir. İstatistiksel analiz Wilcoxon test ile gerçekleştirilmiş olup analiz sonuçları çizelgeler halinde gösterilmiştir (Çizelge 3.2, Çizelge 3.3).

Çizelge 3.1. ASA'nın M0 makrofajlarına 24 saatlik etkisinin istatistiksel analizi.

İstatistik Wilcoxon Test	M0 Kontrol 24H	M0 0,5 mM 24H	M0 1 mM 24H	M0 2,5 mM 24H	M0 5 mM 24H
N	6	6	6	6	6
Ortalama	92,59	82,77	75,85	62,05	41,16
Standart Sapma	7,44	13,05	17,10	20,74	17,75
Medyan	94,05	82,21	69,31	54,71	33,23
Minimum	81,01	64,15	57,42	44,15	27,62
Maksimum	100,00	98,43	102,15	95,87	72,50
p değeri		,028	,046	,028	,028

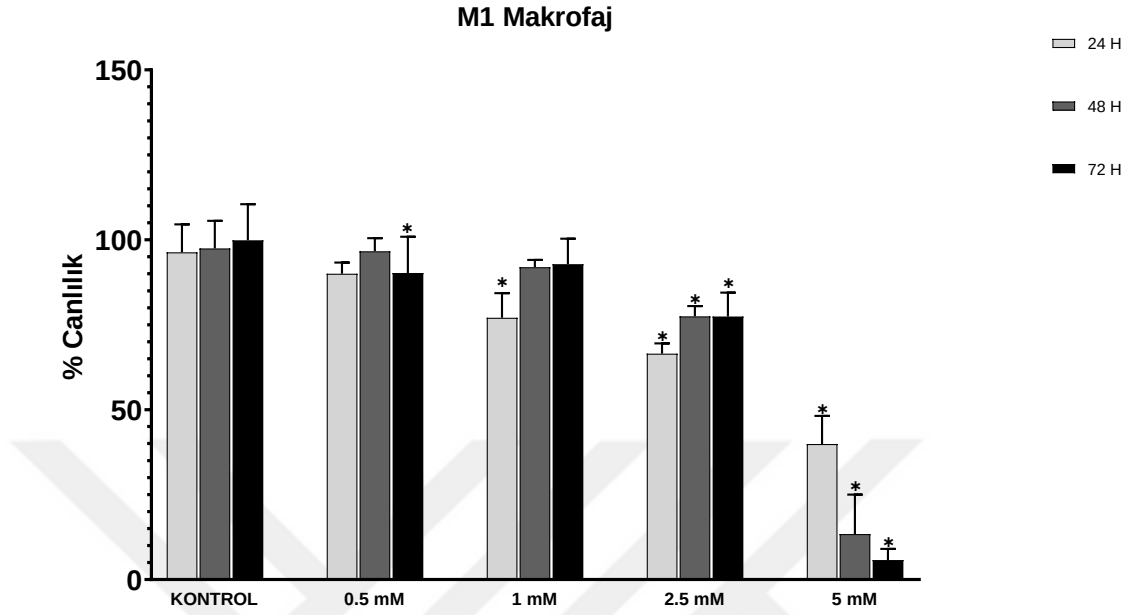
Çizelge 3.2. ASA'nın M0 makrofajlarına 48 saatlik etkisinin istatistiksel analizi.

İstatistik Wilcoxon Test	M0 Kontrol 48H	M0 0,5 mM 48H	M0 1 mM 48H	M0 2,5 mM 48H	M0 5 mM 48H
N	6	6	6	6	6
Ortalama	87,52	86,36	86,18	81,78	76,30
Standart Sapma	7,73	12,17	6,09	8,12	6,26
Medyan	87,08	81,50	86,05	79,56	74,45
Minimum	76,78	79,32	79,40	73,61	71,08
Maksimum	100,00	110,73	96,70	95,45	87,46
p değeri		0,753	0,249	0,028	0,028

Çizelge 3.3. ASA'nın M0 makrofajlarına 72 saatlik etkisinin istatistiksel analizi.

İstatistik Wilcoxon Test	M0 Kontrol 72H	M0 0,5 mM 72H	M0 1 mM 72H	M0 2,5 mM 72H	M0 5 mM 72H
N	6	6	6	6	6
Ortalama	93,97	96,53	92,69	94,07	90,03
Standart Sapma	3,61	2,51	1,95	1,46	13,56
Medyan	93,89	95,30	92,58	93,84	96,06
Minimum	88,89	94,55	90,10	92,02	64,55
Maksimum	100,00	100,40	95,45	96,06	101,41
p değeri		,028	,463	1,000	,917

3.2.2. ASA'nın M1 Hücreleri Üzerindeki Canlılığa Etkisi



Şekil 3.5. ASA'nın M1 makrofajların canlılığına etkisi. M1 makrofaj hücrelerine ASA uygulaması sonucu canlılığın zamana ve doza bağlı olarak azaldığı tespit edilmiştir. 24. Saat sonunda 5 mM ASA uygulanan hücrelerin %61'i ölmüşken 48. Ve 72. saatte hücrelerin ~%90'ı ölmüştür. Sonuç olarak, 5mM ASA M1 makrofaj hücrelerinde sitotoksik etki göstermiştir. M1 hücrelerine uygulanan 2.5 mM ASA dozunun hücrelerin canlılığını azaltması istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Fakat zamana bağlı olarak 2.5 mM ASA dozunda hücre canlılığı ~%70 olarak belirlenmiştir. Böylece 2.5 mM ASA dozunun sitotoksik olmadığı gösterilmiştir. İstatistiksel analiz Wilcoxon test ile gerçekleştirilmiş olup analiz sonuçları çizelgeler halinde gösterilmiştir (Çizelge 3.4, Çizelge 3.5 ve Çizelge 3.6).

Çizelge 3.4. ASA'nın M1 makrofajlarına 24 saatlik etkisinin istatistiksel analizi.

İstatistik Wilcoxon Test	M0 Kontrol 72H	M0 0,5 mM 72H	M0 1 mM 72H	M0 2,5 mM 72H	M0 5 mM 72H
N	6	6	6	6	6
Ortalama	96,31	90,02	77,06	66,51	39,90
Standart Sapma	8,24	3,29	7,25	3,00	8,25
Medyan	100,00	90,10	77,04	66,79	40,26
Minimum	84,39	85,92	68,57	61,43	28,06
Maksimum	104,49	94,69	87,55	70,00	50,61
p değeri		,116	,028	,028	,028

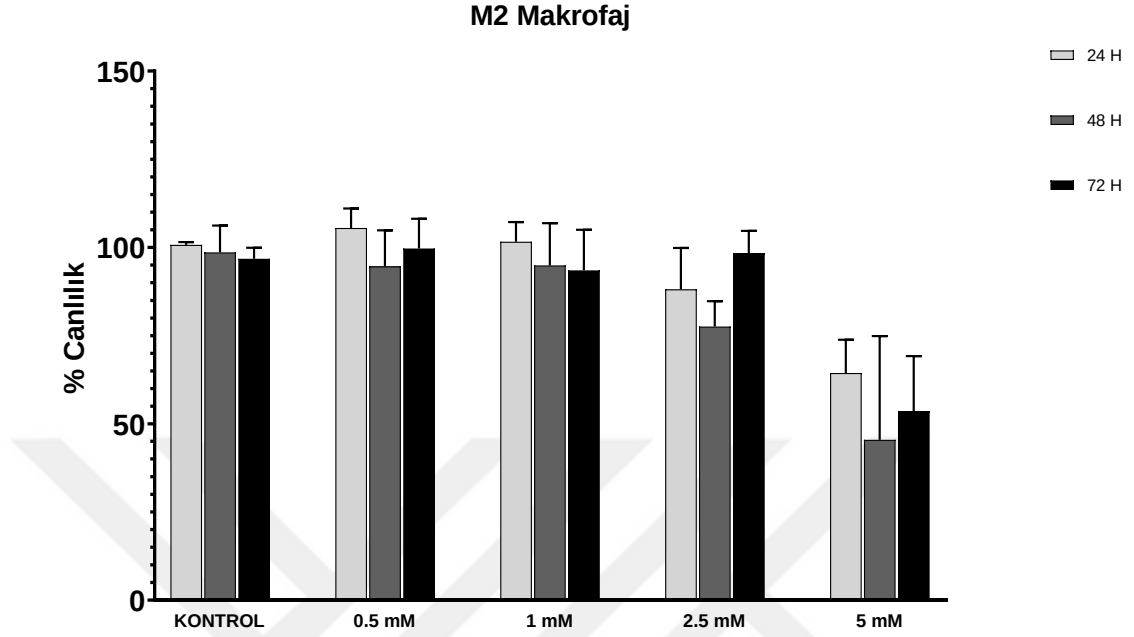
Çizelge 3.5. ASA'nın M1 makrofajlarına 48 saatlik etkisinin istatistiksel analizi.

İstatistik <i>Wilcoxon Test</i>	M1 Kontrol 48H	M1 0,5 mM 48H	M1 1 mM 48H	M1 2,5 mM 48H	M1 5 mM 48H
N	6	6	6	6	6
Ortalama	97,47	96,64	91,94	77,49	13,40
Standart Sapma	8,14	3,86	2,16	2,97	11,62
Medyan	98,49	96,35	92,17	76,80	9,63
Minimum	83,76	91,76	88,28	73,90	5,68
Maksimum	107,19	101,28	94,66	81,90	36,77
p değeri		,753	,173	,028	,028

Çizelge 3.6. ASA'nın M1 makrofajlarına 72 saatlik etkisinin istatistiksel analizi.

İstatistik <i>Wilcoxon Test</i>	M1 Kontrol 72H	M1 0,5 mM 72H	M1 1 mM 72H	M1 2,5 mM 72H	M1 5 mM 72H
N	6	6	6	6	6
Ortalama	99,84	90,24	92,85	77,41	5,76
Standart Sapma	10,62	10,64	7,47	7,02	3,28
Medyan	98,53	93,87	93,26	80,15	4,53
Minimum	87,25	74,75	79,41	64,22	2,70
Maksimum	118,14	101,47	101,23	83,09	11,27
p değeri		,046	,116	,028	,028

3.2.3. ASA'nın M2 Hücreleri Üzerindeki Canlılığa Etkisi



Şekil 3.6. ASA'nın M2 makrofajların canlılığına etkisi. ASA'nın en yüksek dozda M2 canlılığı düşürdüğü gösterilmiş olsa da etkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. 24, 48 ve 72. saatte uygulanan 5mM ASA dozunun M2 makrofaj hücrelerinin ~%50'sini öldürdüğü tespit edilmiştir. 2.5 mM doz ASA'nın ise hücrelerin yalnızca ~%19 unu öldürdüğü gösterilmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda zamana bağlı artan dozlarda uygulanan ASA'nın M2 fenotipine farklılaşmış makrofaj hücrelerinde sitotoksik etki göstermediği belirlenmiştir. İstatistiksel analiz Wilcoxon test ile gerçekleştirilmiş olup analiz sonuçları çizelgeler halinde gösterilmiştir (Çizelge 3.7, Çizelge 3.8 ve Çizelge 3.9).

Çizelge 3.7. ASA'nın M2 makrofajlarına 24 saatlik etkisinin istatistiksel analizi.

İstatistik Wilcoxon Test	M2 Kontrol 24H	M2 0,5 mM 24H	M2 1 mM 24H	M2 2,5 mM 24H	M2 5 mM 24H
N	3	3	3	3	3
Ortalama	100,72	105,55	101,62	88,12	64,40
Standart Sapma	,79	5,47	5,58	11,73	9,44
Medyan	100,60	105,97	103,82	92,55	59,67
Minimum	100,00	99,88	95,27	74,82	58,27
Maksimum	101,56	110,80	105,76	97,00	75,27
p değeri		,285	1,000	,109	,109

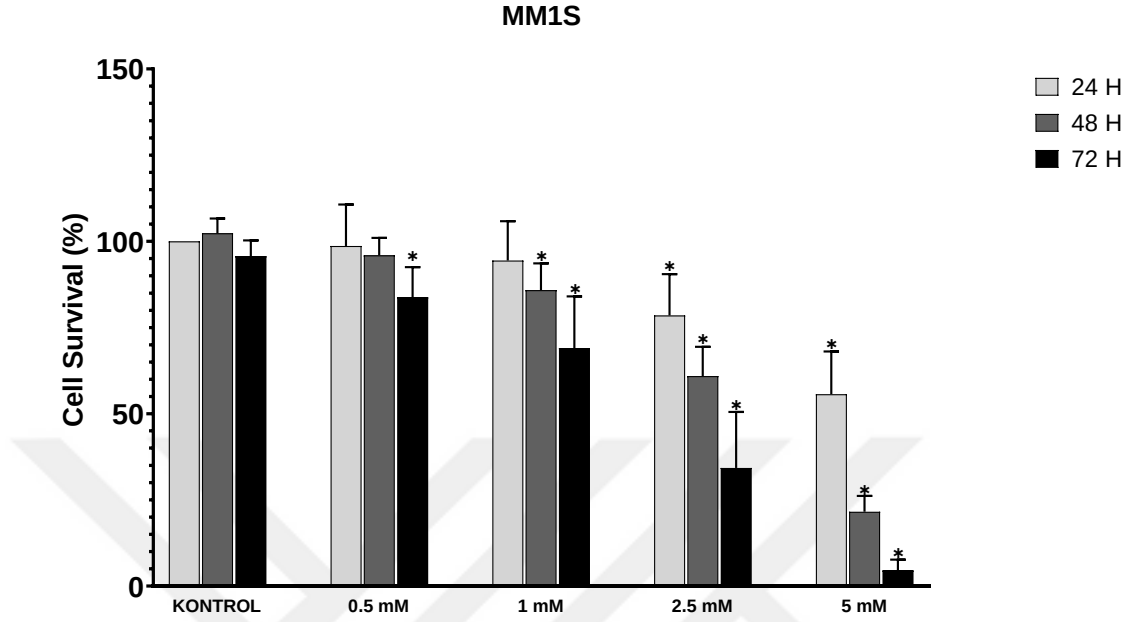
Çizelge 3.8. ASA'nın M2 makrofajlarına 48 saatlik etkisinin istatistiksel analizi.

İstatistik <i>Wilcoxon Test</i>	M2 Kontrol 48H	M2 0,5 mM 48H	M2 1 mM 48H	M2 2,5 mM 48H	M2 5 mM 48H
N	3	3	3	3	3
Ortalama	98,6169	94,6358	94,9239	77,5748	45,4624
Standart Sapma	7,56	10,23	11,97	7,19	29,41
Medyan	100,0000	96,8880	101,4908	79,9792	61,6973
Minimum	90,46	83,46	81,10	69,49	11,52
Maksimum	105,39	103,56	102,18	83,26	63,17
p değeri		,593	1,000	,109	,109

Çizelge 3.9. ASA'nın M2 makrofajlarına 72 saatlik etkisinin istatistiksel analizi.

İstatistik <i>Wilcoxon Test</i>	M2 Kontrol 72H	M2 0,5 mM 72H	M2 1 mM 72H	M2 2,5 mM 72H	M2 5 mM 72H
N	3	3	3	3	3
Ortalama	96,78	99,72	93,49	98,35	53,56
Standart Sapma	3,13	8,43	11,50	6,37	15,65
Medyan	96,59	104,27	92,61	96,11	58,42
Minimum	93,76	89,99	82,45	93,40	36,06
Maksimum	100,00	104,89	105,40	105,54	66,21
p değeri		,593	,593	,593	,109

3.2.4. ASA'nın MM1S Hücreleri Üzerindeki Canlılığa Etkisi



Şekil 3.7. ASA'nın MM1S tümör hücrelerinin canlılığına etkisi. ASA'nın artan dozda ve zamana bağlı olarak MM1S hücrelerinde sitotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir. 24 saat boyunca uygulanan 2.5 mM ASA dozu hücrelerin %22'sini, 48 saat sonunda hücrelerin %40'ını ve 72 saat sonunda ise hücrelerin %66'sını öldürdüğü gösterilmiştir. Canlılığa olan sitotoksik etkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. İstatistiksel analiz Wilcoxon test ile gerçekleştirilmiş olup analiz sonuçları çizelgeler halinde gösterilmiştir (Çizelge 3.10, Çizelge 3.11 ve Çizelge 3.12).

Çizelge 3.10. ASA'nın MM1S hücrelerine 24 saatlik etkisinin istatistiksel analizi.

İstatistik Wilcoxon Test	MM1S Kontrol 24H	MM1S 0,5 mM 24H	MM1S 1 mM 24H	MM1S 2,5 mM 24H	MM1S 5 mM 24H
N	6	6	6	6	6
Ortalama	100,00	98,6693	94,43	78,52	55,69
Standart Sapma	,00000	12,02	11,40	11,98	12,37
Medyan	100,00	95,4045	91,1616	76,4174	55,2609
Minimum	100,00	87,80	84,35	65,45	37,80
Maksimum	100,00	121,88	115,10	98,96	76,04
p değeri		,345	,249	,028	,028

Çizelge 3.11. ASA'nın MM1S hücrelerine 48 saatlik etkisinin istatistiksel analizi.

İstatistik <i>Wilcoxon Test</i>	MM1S Kontrol 48H	MM1S 0,5 mM 48H	MM1S 1 mM 48H	MM1S 2,5 mM 48H	MM1S 5 mM 48H
N	5	5	5	5	5
Ortalama	102,3697	95,9306	85,8279	60,9422	21,5985
Standart Sapma	4,26	5,062	7,80	8,49	4,56
Medyan	103,56	93,33	81,92	56,67	19,45
Minimum	96,21	92,36	80,44	52,13	18,65
Maksimum	106,64	104,50	98,82	70,62	29,62
p değeri		,225	,043	,043	,043

Çizelge 3.12. ASA'nın MM1S hücrelerine 72 saatlik etkisinin istatistiksel analizi.

İstatistik <i>Wilcoxon Test</i>	MM1S Kontrol 72H	MM1S 0,5 mM 72H	MM1S 1 mM 72H	MM1S 2,5 mM 72H	MM1S 5 mM 72H
N	5	5	5	5	5
Ortalama	95,68	83,74	69,06	34,27	4,54
Standart Sapma	4,60	8,77	14,99	16,23	3,13
Medyan	98,28	82,20	73,02	36,63	5,63
Minimum	90,36	72,79	45,01	8,27	,00
Maksimum	100,00	96,33	84,33	53,11	7,67
p değeri		,043	,043	,043	,043

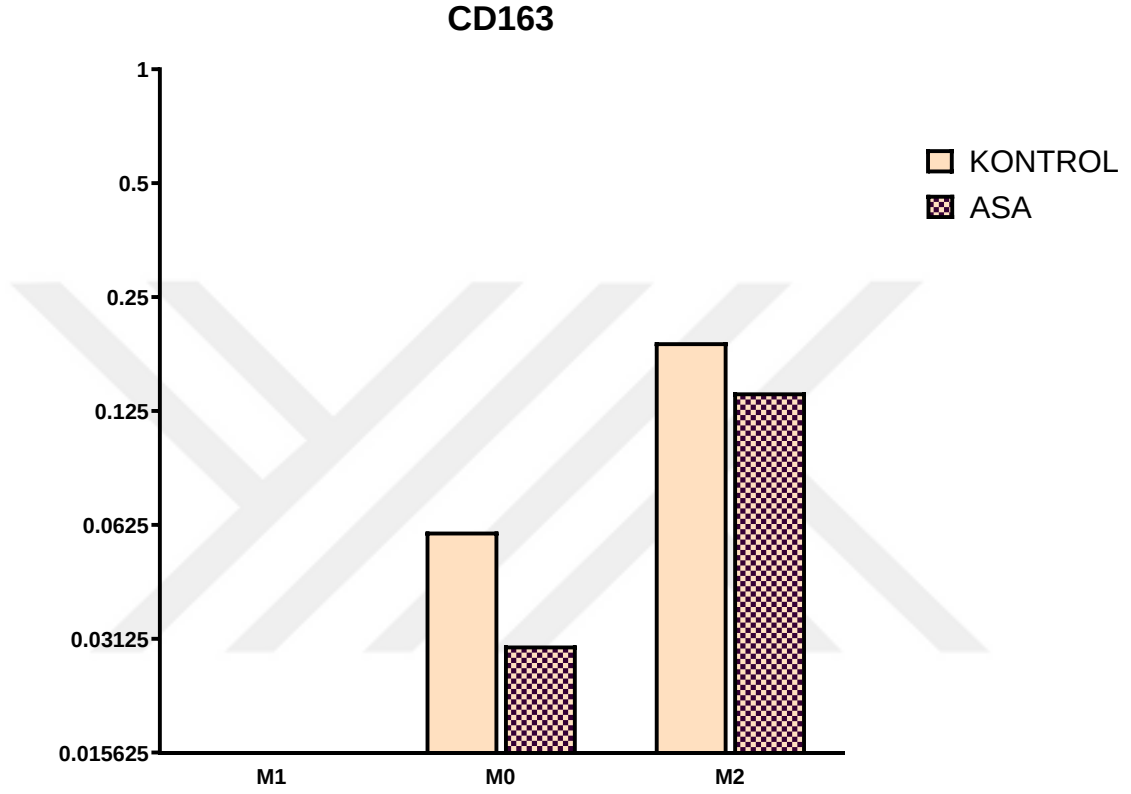
Çizelge 3.13. ASA uygulanan tüm hücrelerin saatlere göre IC50 dozları.

Hücre	MM1S	M0	M1	M2
24.Saat IC50 (mM)	5.7	3.7	3.8	6.4
48.Saat IC50 (mM)	2.8	22.19	3.2	4.6
72.Saat IC50 (mM)	1.5	25.99	3.1	5.1

MTT deneyi sonucunda makrofaj ve tümör hücrelerine uygulanacak olan doz ve saat 2.5 mM / 48 saat olarak belirlenmiştir. Makrofaj hücreleri için toksik olmayan bu dozun makrofaj polarizasyonuna olanak sağlayabileceği öngörülmüştür. Bunun yanı sıra 2.5 mM / 48 saat ASA uygulanmasının MM1S kanser hücrelerindeki sitotoksik etkisi de deney kurgusu açısından önemli bulunmuş olup anti-miyeloma etkinliğini gösterebilmek amacıyla sitokin salınımını değiştirebileceği düşünülmüştür.

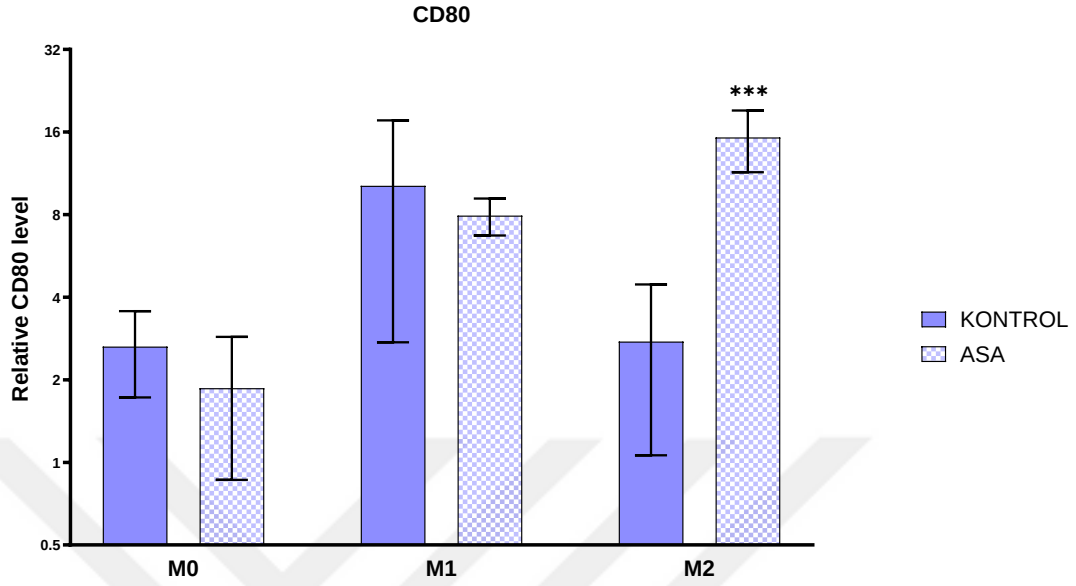
3.3. qRT- PCR

3.3.1. CD163



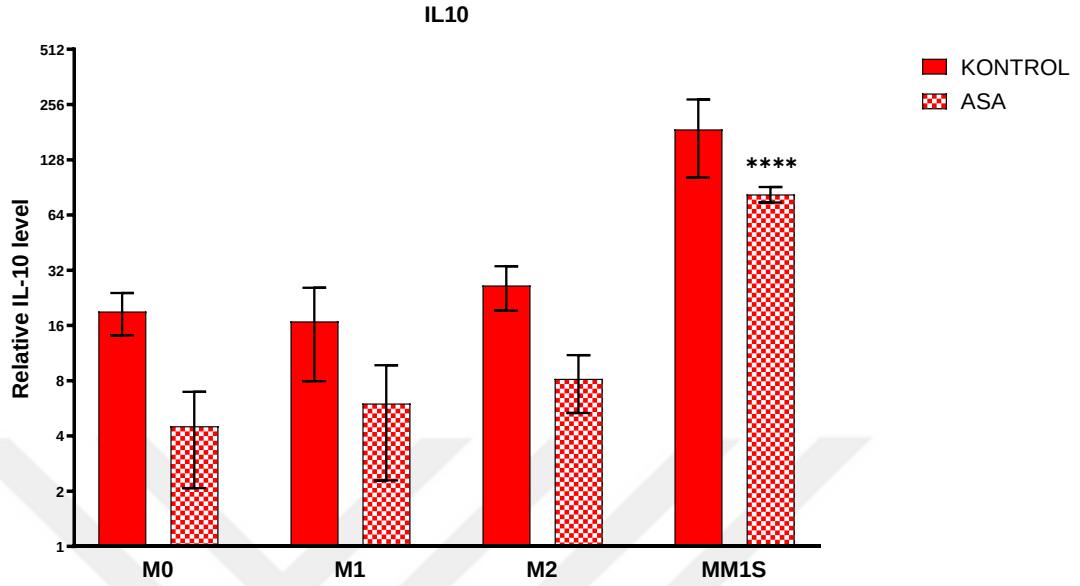
Şekil 3.8. SA'nın makrofajlarda CD163 ifadesine etkisi. ASA uygulanmayan kontrol gruplarında M1 makrofajlarda CD163 ifadesi gözlenmemiştir. M2 makrofajlarda ise CD163 ifadesi en yüksek olarak belirlenmiştir. Böylece IL4 aracılı M2 makrofaj polarizasyonunun başarı ile gerçekleştiği tespit edilmiştir. 48 saat boyunca 2.5 mM ASA uygulanması sonucu M1 makrofajlardaki CD163 ifadesi değişmezken, M0 makrofajlarda ~2 kat azalmıştır. M2 makrofajlarda ise ASA uygulamasının CD163 ifadesini azalttığı gösterilmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda ASA uygulamasının CD163 ifadesi üzerinden M2→M1 makrofaj polarizasyonunu uyurabileceği sonucuna ulaşılmıştır.

3.3.2. CD80 / CD86



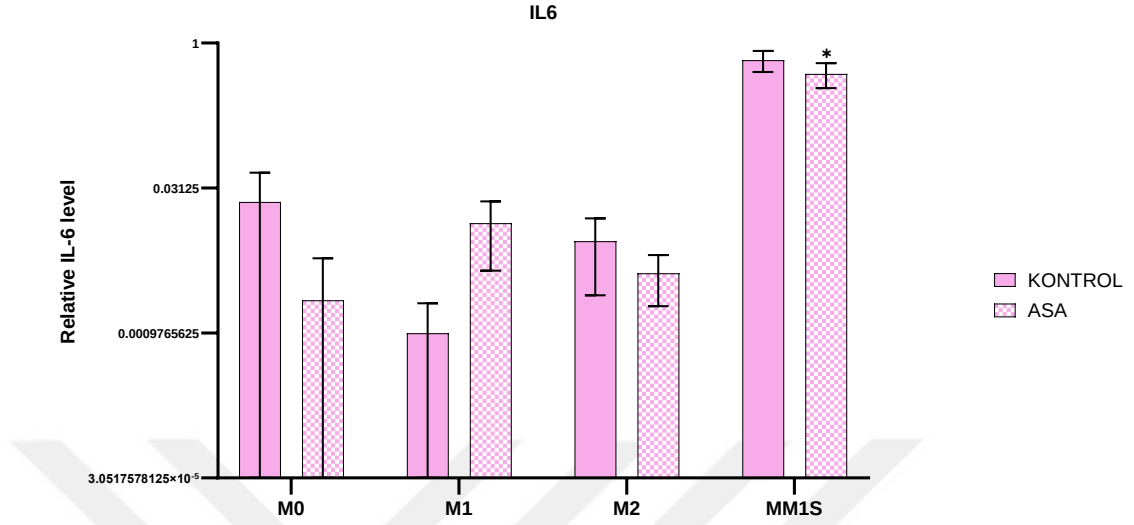
Şekil 3.9. ASA'nın makrofajlarda CD80 ifadesine etkisi. ASA uygulanmayan kontrol gruplarında en yüksek CD80 ifadesi M1 makrofajlarda gösterilmiştir. ASA uygulaması sonrası M0 ve M1 makrofajlarda CD80 ifadesi azalsa da bu değişim istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. M2 makrofajlarda diğer makrofaj gruplarına göre nispeten daha az ifade edilen CD80'in ASA uygulaması sonrası ~4 kat yüksek ifade edildiği gösterilmiştir. Bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.005$). M2 makrofajlarda ASA uygulaması sonrası gözlenen CD80 ifadesinin artışı ASA'nın M2→M1 polarizasyonunu uyardığı sonucunu desteklemektedir. İstatistiksel analiz 2Way Anova testi ile gerçekleştirilmiştir.

3.3.3. IL10



Şekil 3.10. ASA'nın makrofaj ve kanser hücrelerinde IL10 ifadesine etkisi. ASA uygulanmayan kontrol gruplarında en yüksek IL10 ifadesi MM1S kanser hücrelerinde gösterilmiştir. ASA uygulaması sonrası M0 makrofajlarda IL10 ifadesi ~4kat, M1 ve M2 makrofajlarda ~2 kat azaldığı tespit edilmiştir. Makrofaj hücrelerinin yanı sıra MM1S kanser hücrelerine ASA uygulamasının IL10 ifadesini ~2 kat azalttığı gösterilmiştir. Kanser hücrelerindeki bu azalış istatistiksel olarak yüksek anlamlı bulunmuştur ($p < 0.0001$). IL10 ifadesinin ASA uygulaması ile azalması sonucu ASA'nın anti-miyolam etki gösterdiği desteklenmiştir. Bunun yanı sıra, ASA uygulamasının makrofaj hücrelerindeki IL10 ifadesini azaltması ve böylece tümör mikroçevresinin anti-tümörijenik olarak şekillenmesine yardımcı olabileceği sonucuna ulaşılmıştır. İstatistiksel analiz 2Way Anova testi ile gerçekleştirilmiştir.

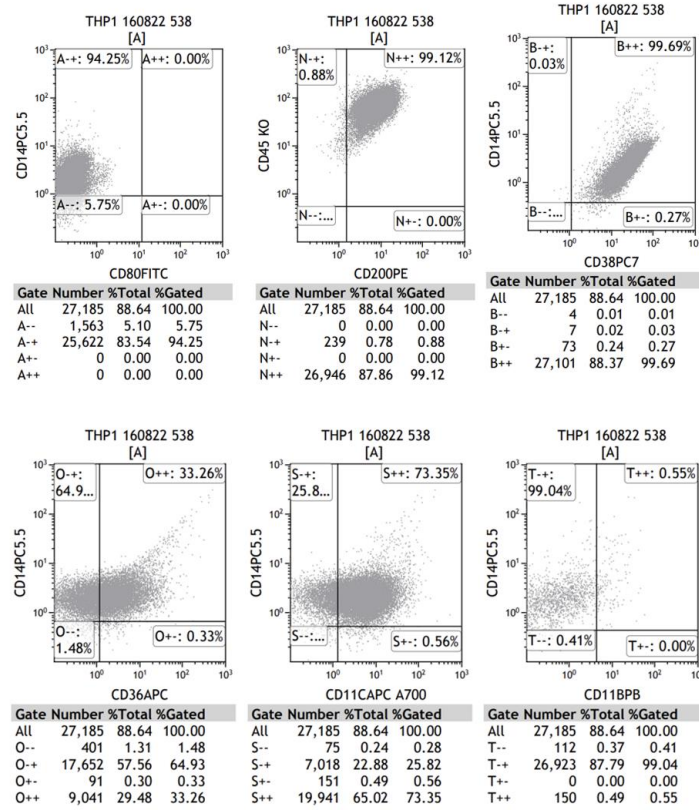
3.3.4. IL6



Şekil 3.11. ASA'nın makrofaj ve kanser hücrelerinde IL6 ifadesine etkisi. ASA uygulanmayan kontrol gruplarında en yüksek IL6 ifadesi MM1S kanser hücrelerinde gösterilmiştir. ASA uygulaması sonrası IL6 ifadesi M0 ve M2 makrofajlarda azalırken, M1 makrofajlarda artmıştır. ASA'nın makrofaj hücrelerindeki IL6 ifadesini azaltması istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. MM hücrelerinin büyüme faktörü olan IL6'nın MM1S hücrelerinde ASA uygulaması sonrası azaldığı tespit edilmiş bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$). IL6 ifadesinin ASA uygulaması sonucu MM1S hücrelerinde azalmasının azalması sonucu ASA'nın anti-miyelom etki gösterdiği desteklenmiştir.

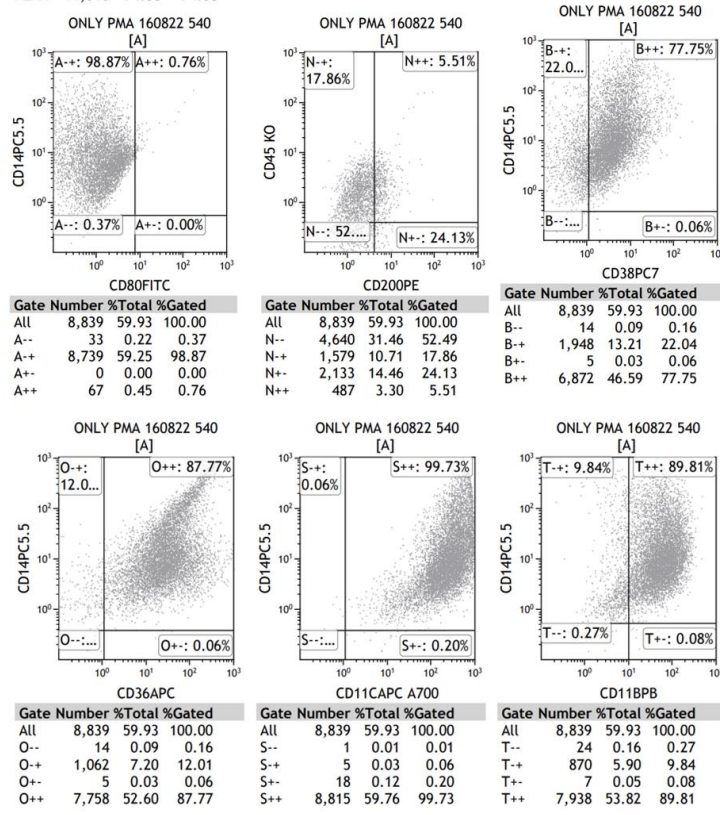
3.4. Flow Sitometri ile Makrofaj Polarizasyonunun Belirlenmesi

3.4.1. THP1 Hücre Serisi



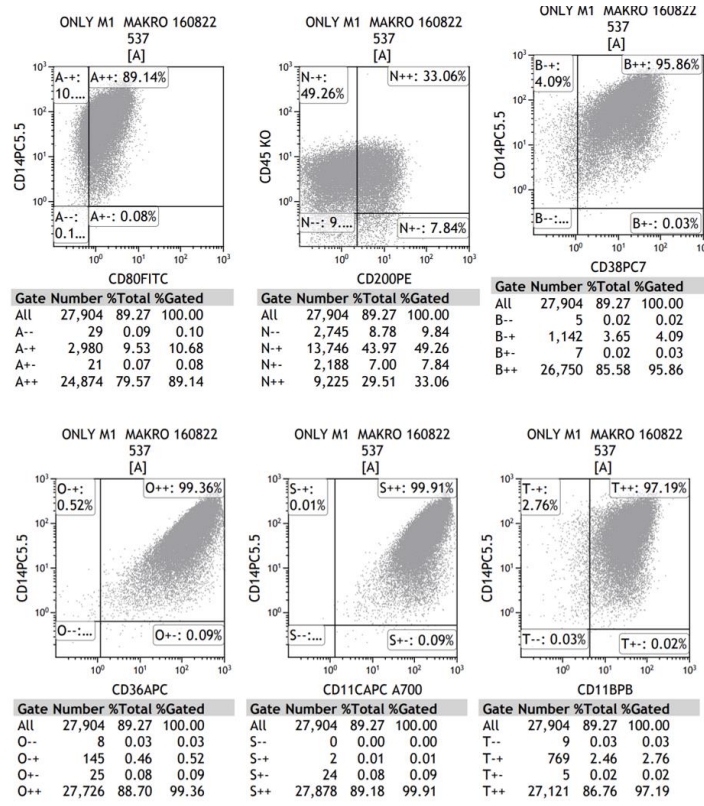
Şekil 3.12. THP1 hücrelerinde yüzey belirteçlerinin akım sitometri sonuçları. Makrofaj öncülü olarak kullanılan THP1 monosit hücrelerindeki CD36 ifadesinin %33 oranda ifade edildiği gösterilirken CD80 ve CD11B ifadesine rastlanmamıştır.

3.4.2. M0 Makrofaj



Şekil 3.13. M0 hücrelerinde yüzey belirteçlerinin akım sitometri sonuçları. THP1 hücrelerine kıyasla CD200 ifadesi %94 azalırken CD36 ifadesinin %54 arttığı gösterilmiştir. Bunun yanı sıra M0 makrofaj hücrelerinde CD80 ifadesine rastlanmamıştır. THP1 monositlerine göre yüksek oranda artan CD11B ifadesinin monositten makrofaja farklılaşma sürecinde bir belirteç olarak takip edileceği sonucuna varılmıştır.

3.4.3. M1 Makrofaj

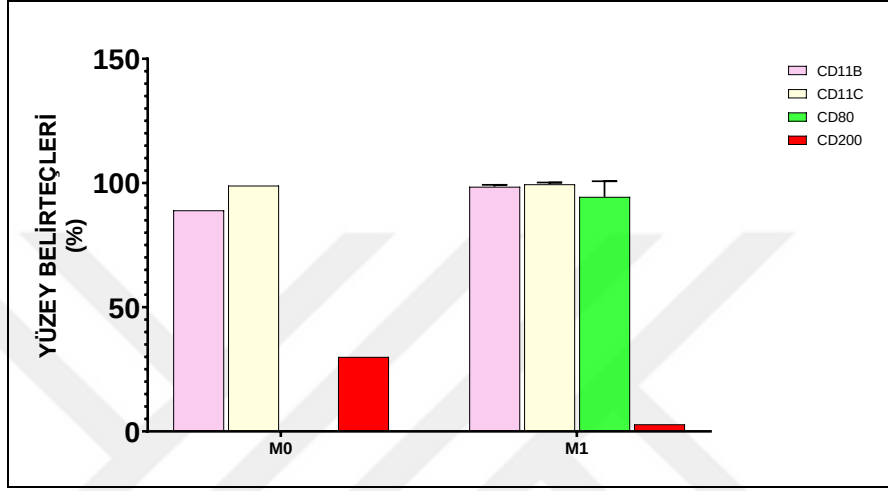


Şekil 3.14. M1 hücrelerinde yüzey belirteçlerinin akım sitometri sonuçları. THP1 ve M0 makrofajlarda gözlenmeyen CD80 ifadesi LPS+IFN γ sonrası %89 oranda ifade edilmektedir. Bu sonuç M1 makrofaj polarizasyonunun uygulanan yöntem sonucunda başarı ile gerçekleştirildiğini desteklemektedir. Bunun yanı sıra CD200 ifadesi THP1 monositlerine göre daha az ifade edilirken M0 makrofajlara göre %28 daha fazla ifade edilmektedir.

Çizelge 3.14. Akım sitometri sonucu yüzey belirteç ifadelerinin tablosu.

Yüzey Belirteçleri	THP1	M0	M1
CD36	33%	87%	99%
CD38	99%	77%	95%
CD71	98%	99%	98%
CD80	0%	0.5%	90%
CD11B	0.55%	89%	98%
CD11C	73.35%	99%	99%
CD200	90%	30%	39%

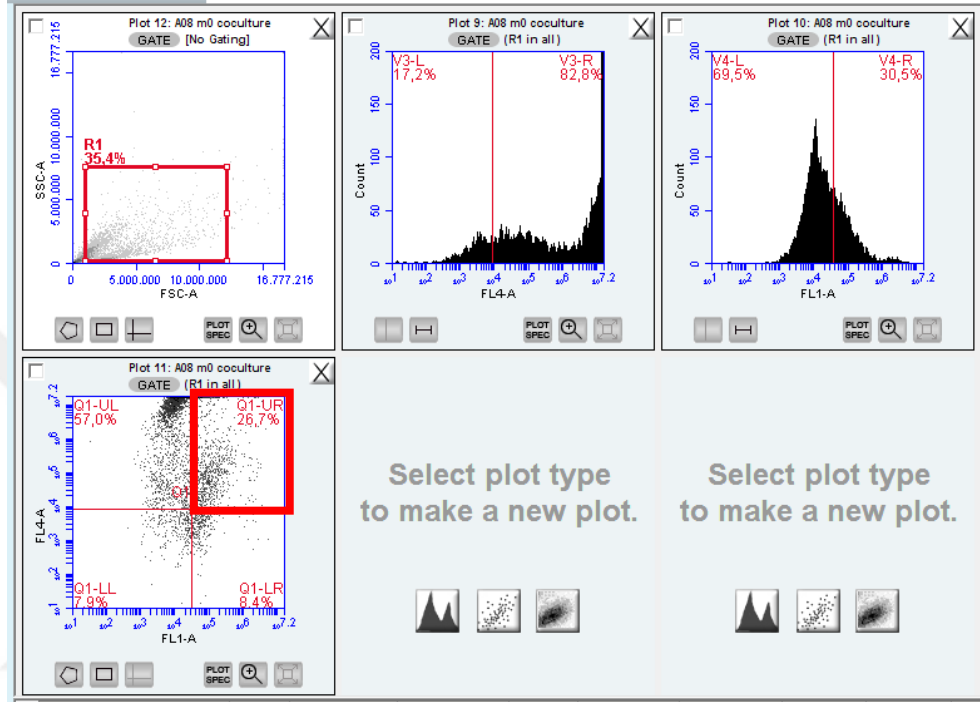
Karakterizasyonu belirlemek için gerçekleştirilen deney sonrasında CD11B monosit makrofaj dönüşümünde takip edilecek bir belirteç olarak belirlenmiştir. Ek olarak, CD80 ifadesinin yalnızca M1 makrofajlarda artması sonucunda makrofajlarda gerçekleştirilen M0 ve M1 polarizasyonunun başarı ile gerçekleştirildiği sonucuna varılmaktadır.



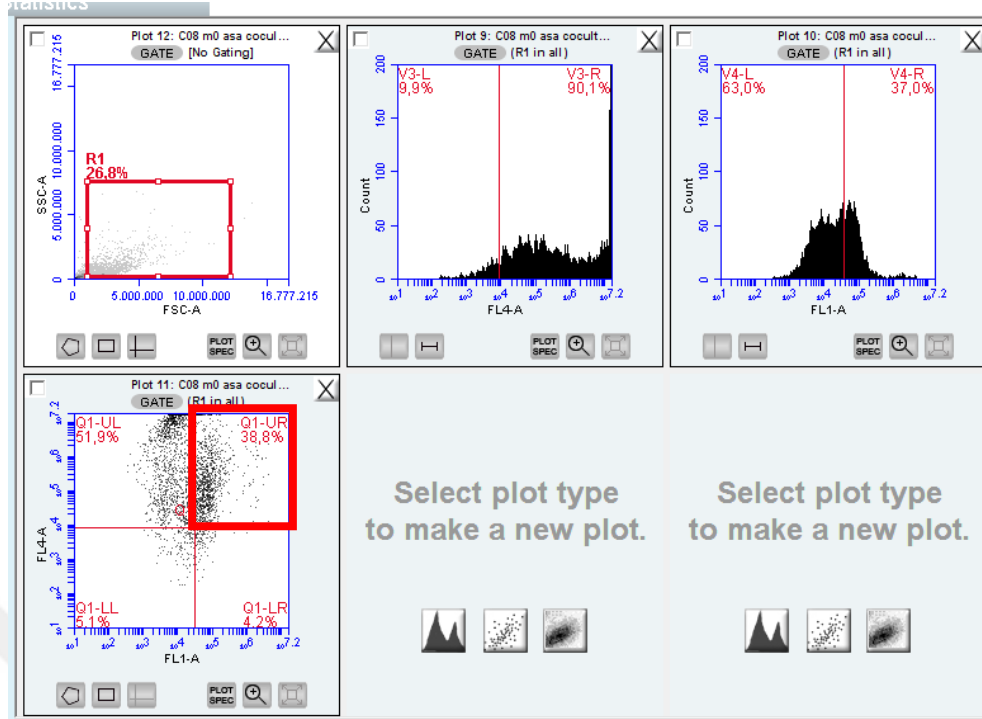
Şekil 3.15. Makrofajlarda yüzey belirteç ifadelerinin ifadesinin grafik gösterimi. Grafikte belirtildiği üzere M0 ve M1 makrofajlarda ortak olarak CD11B ve CD11C ifadesine rastlanmaktadır. CD80 ifadesi ise yalnızca M1 makrofajlar ile karakterize edilmektedir.

3.5. Flow Sitometri ile Fagositozun Tayini

3.5.1. M0 Hücrelerinde ASA öncesi ve Sonrası Fagositozun Tayini

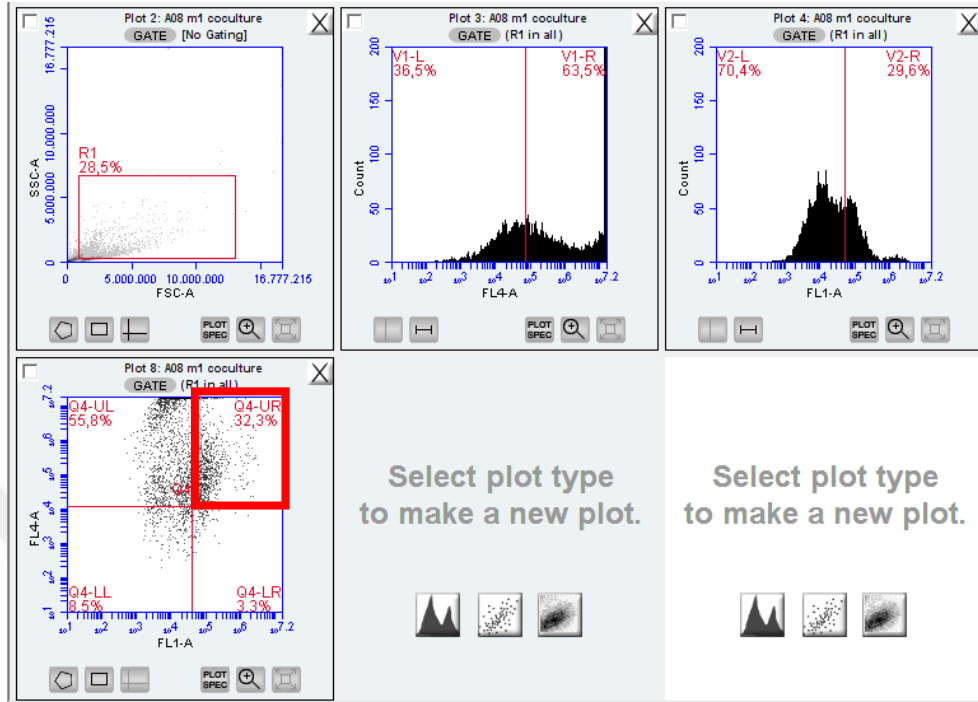


Şekil 3.16. ASA Uygulanmayan M0 Hücrelerinin Fagositoz Oranı. DiD ile boyanan M0 hücreleri ile 1,000,000 GFP+MM1S hücresi birlikte 3 saat kokültür edilmiştir. Kokültür sonucunda kuyular 3 kere yıkanarak süspansе tümör hücreleri ortamdan uzaklaştırılmıştır. Kuyudan toplanan makrofaj hücreleri ile gerçekleştirilen akım sitometri deneyinde kırmızı makrofaj hücrelerinin içindeki yeşil tümör hücrelerinin oranına bakılmıştır. Bu deney doğrultusunda ASA uygulanmayan M0 makrofaj hücrelerinin tümör hücrelerine fagosite etme oranı %26.7 olarak belirlenmiştir.

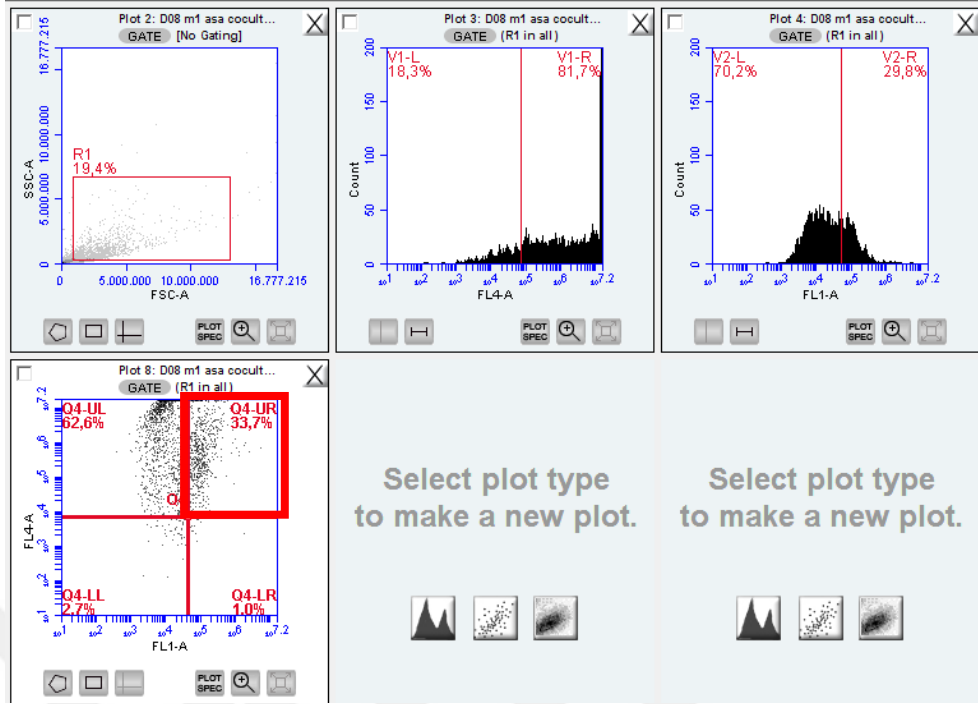


Şekil 3.17. ASA Uygulanan M0 Hücrelerinin Fagositoz Oranı. DiD ile boyanan M0 makrofaj hücrelerine 48 boyunca 2.5mM ASA uygulanmıştır. ASA uygulanması sonrası M0 makrofaj hücreleri ile 1,000,000 GFP+ MM1S hücresi birlikte 3 saat kokültür edilmiştir. Kokültür sonucunda kuyular 3 kere yıkanarak süspanse tümör hücreleri ortamdan uzaklaştırılmıştır. Kuyudan toplanan makrofaj hücreleri ile gerçekleştirilen akım sitometri deneyinde kırmızı makrofaj hücrelerinin içindeki yeşil tümör hücrelerinin oranına bakılmıştır. Bu deney doğrultusunda ASA uygulanan M0 makrofaj hücrelerinin tümör hücrelerini fagosite etme oranı %38.8 olarak belirlenerek ASA uygulamasının M0 makrofajların fagositoz kapasitesini artırdığı sonucuna varılmıştır.

3.5.2. M1 Hücrelerinde ASA öncesi ve Sonrası Fagositozun Tayini

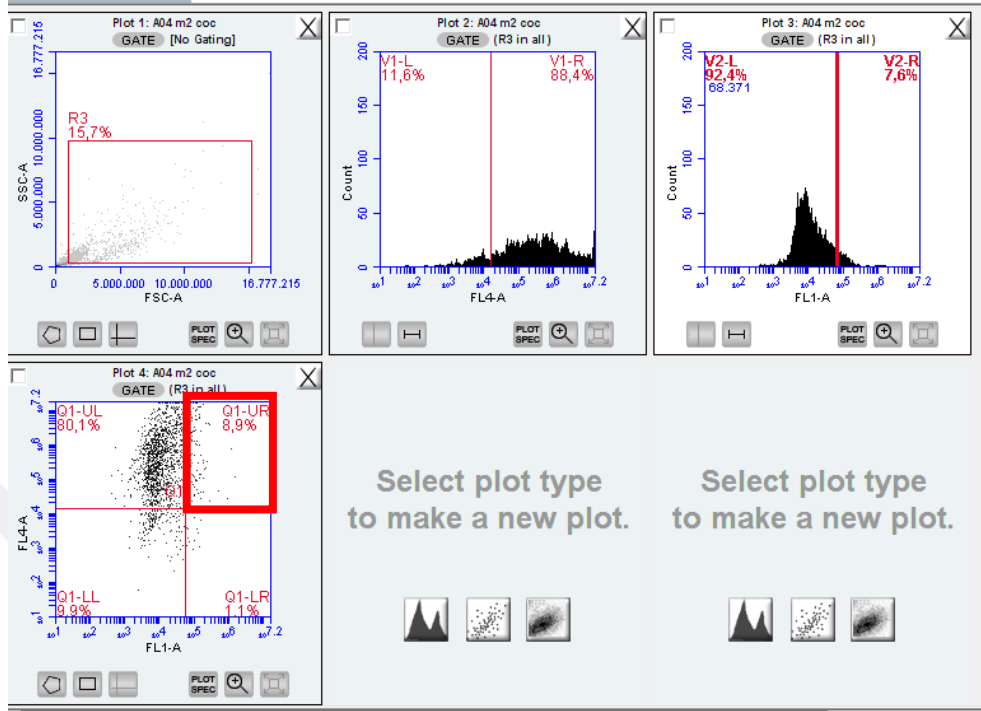


Şekil 3.18. ASA Uygulanmayan M1 Hücrelerinin Fagositoz Oranı. DiD ile boyanan M1 polarizasyonu gerçekleştirilmiş makrofaj hücreleri ile 1,000,000 GFP+MM1S hücresi birlikte 3 saat kokültür edilmiştir. Kokültür sonucunda kuyular 3 kere yıkanarak süspanse tümör hücreleri ortamdaki uzaklaştırılmıştır. Kuyudan toplanan makrofaj hücreleri ile gerçekleştirilen akım sitometri deneyinde kırmızı makrofaj hücrelerinin içindeki yeşil tümör hücrelerinin oranına bakılmıştır. Bu deney doğrultusunda ASA uygulanmayan M1 makrofaj hücrelerinin tümör hücrelerini fagosit etme oranı %32.3 olarak belirlenmiştir.

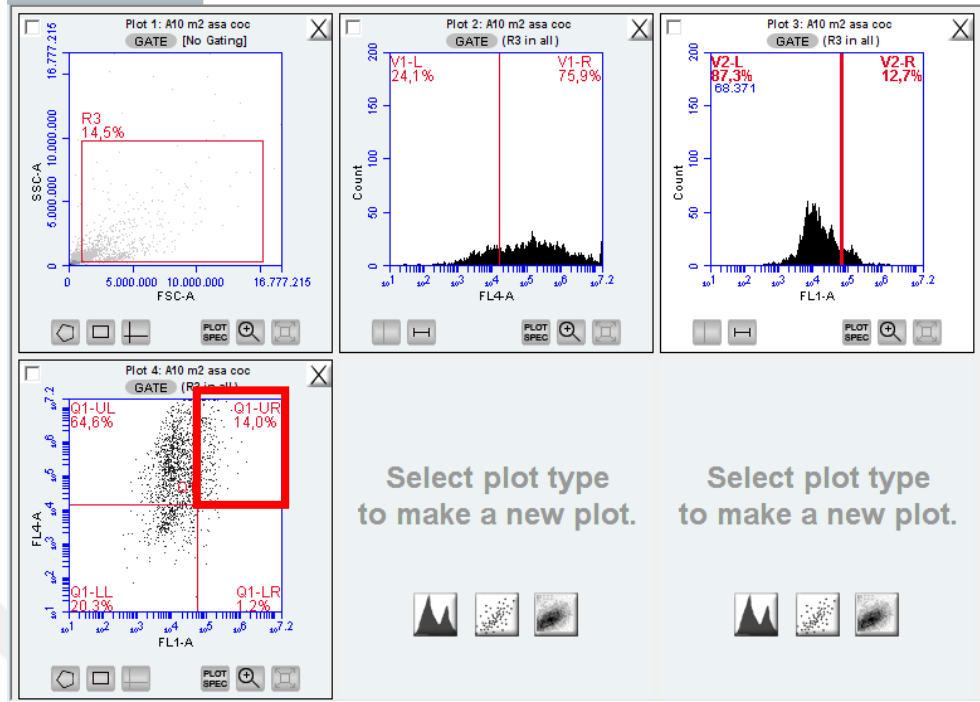


Şekil 3.19. ASA Uygulanan M1 Hücrelerinin Fagositoz Oranı. DiD ile boyanan M1 makrofaj hücrelerine 48 boyunca 2.5mM ASA uygulanmıştır. ASA uygulanması sonrası M1 makrofaj hücreleri ile 1,000,000 GFP+ MM1S hücresi birlikte 3 saat kokültür edilmiştir. Kokültür sonucunda kuyular 3 kere yıkanarak süspanse tümör hücreleri ortamdan uzaklaştırılmıştır. Kuyudan toplanan makrofaj hücreleri ile gerçekleştirilen akım sitometri deneyinde kırmızı makrofaj hücrelerinin içindeki yeşil tümör hücrelerinin oranına bakılmıştır. Bu deney doğrultusunda ASA uygulanan M1 makrofaj hücrelerinin tümör hücrelerini fagosit etme oranı %33.7 olarak belirlenerek ASA uygulamasının M1 makrofajların fagositoz kapasitesini etkilemediği gösterilmiştir.

3.5.3. M2 Hücrelerinde ASA öncesi ve Sonrası Fagositozun Tayini



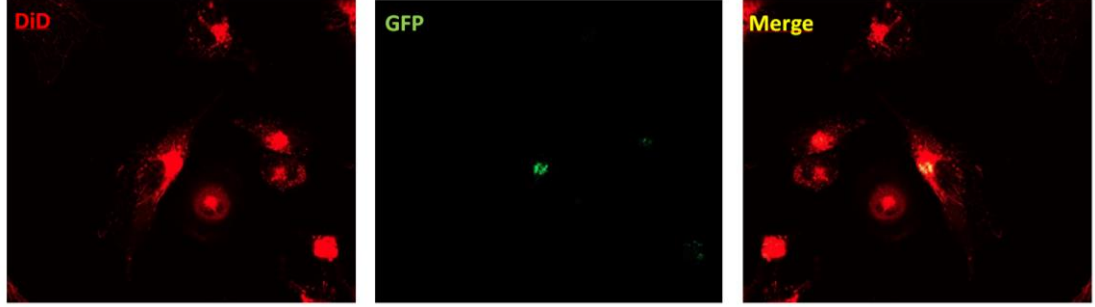
Şekil 3.20. ASA Uygulanmayan M2 Hücrelerinin Fagositoz Oranı. DiD ile boyanan M2 polarizasyonu gerçekleştirilmiş makrofaj hücreleri ile 1,000,000 GFP+ MM1S hücresi birlikte 3 saat kokültür edilmiştir. Kokültür sonucunda kuyular 3 kere yıkanarak süspansiyon tümör hücreleri ortamdan uzaklaştırılmıştır. Kuyudan toplanan makrofaj hücreleri ile gerçekleştirilen akım sitometri deneyinde kırmızı makrofaj hücrelerinin içindeki yeşil tümör hücrelerinin oranına bakılmıştır. Bu deney doğrultusunda ASA uygulanmayan M2 makrofaj hücrelerinin tümör hücrelerine fagosite etme oranı %8.9 olarak belirlenmiştir.



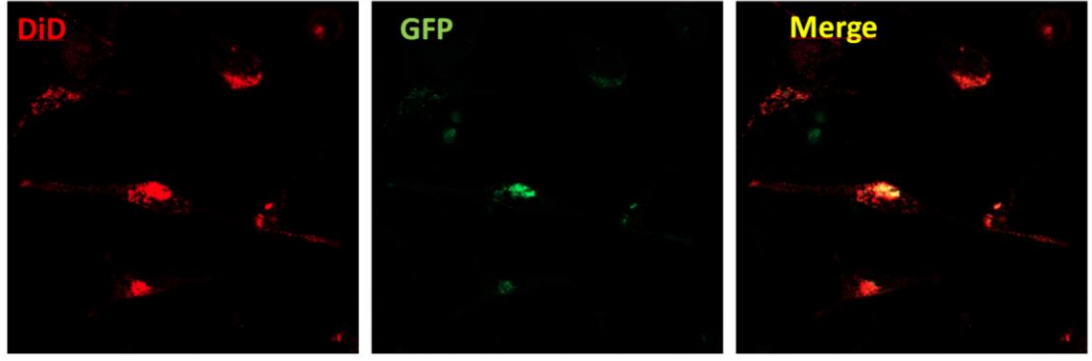
Şekil 3.21. ASA Uygulanan M2 Hücrelerinin Fagositoz Oranı. DiD ile boyanan M2 makrofaj hücrelerine 48 boyunca 2.5mM ASA uygulanmıştır. ASA uygulanması sonrası M2 makrofaj hücreleri ile 1,000,000 GFP+ MM1S hücresi birlikte 3 saat kokültür edilmiştir. Kokültür sonucunda kuyular 3 kere yıkanarak süspanse tümör hücreleri ortamdan uzaklaştırılmıştır. Kuyudan toplanan makrofaj hücreleri ile gerçekleştirilen akım sitometri deneyinde kırmızı makrofaj hücrelerinin içindeki yeşil tümör hücrelerinin oranına bakılmıştır. Bu deney doğrultusunda ASA uygulanan M2 makrofaj hücrelerinin tümör hücrelerini fagosite etme oranı %14 olarak belirlenerek ASA uygulamasının M2 makrofajların fagositoz kapasitesini ~2 kat artırdığı sonucuna varılmıştır.

3.6. Konfokal Mikroskop ile Fagositozun Görüntülenmesi ve Analizi

3.6.1. M0 Makrofaj

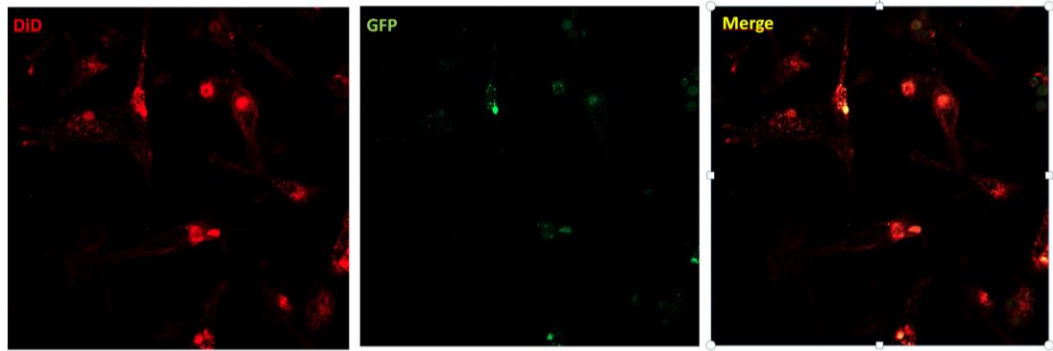


Şekil 3.22. ASA Uygulanmayan M0 Makrofajların Fagositozunun Gösterimi. DiD ile boyanan M0 hücreleri ile 1,000 000 GFP+ MM1S hücresi birlikte 3 saat kokültür edilmiştir. Kokültür sonucunda kuyular 3 kere yıkanarak süspanse tümör hücreleri ortamdan uzaklaştırılmıştır. Kuyuda kalan makrofaj hücreleri konfokal mikroskop ile görüntülerek kırmızı makrofaj hücrelerinin içinde bulunan yeşil tümör hücreleri sayılmıştır. Alanda 100 hücre sayılarak elde edilen bulgular doğrultusunda ASA uygulanmayan M0 makrofajların tümör hücrelerini fagosit etme oranı %40 olarak belirlenmiştir.

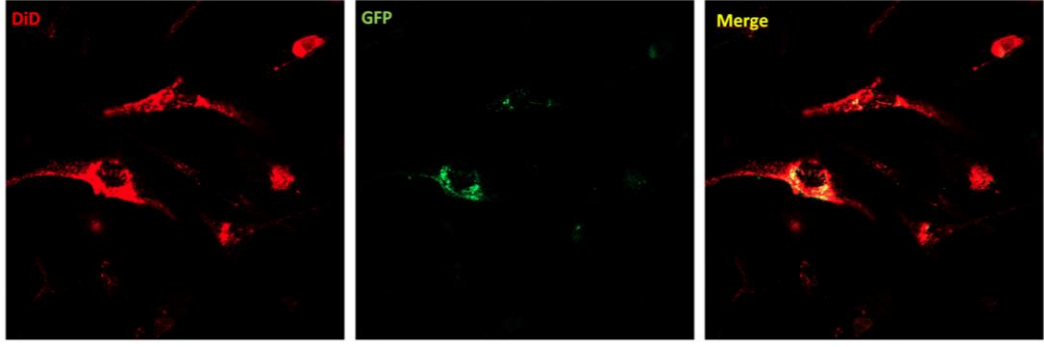


Şekil 3.23. ASA Uygulanan M0 Makrofaj Hücrelerinin Fagositozunun Gösterimi. DiD ile boyanan M0 hücreleri 2.5 mM ASA ile 48 saat boyunca muamele edilmiştir. Ardından M0 makrofaj hücreleri 1,000,000 GFP+ MM1S hücresi birlikte 3 saat kokültür edilmiştir. Kokültür sonucunda kuyular 3 kere yıkanarak süspanse tümör hücreleri ortamdan uzaklaştırılmıştır. Kuyuda kalan makrofaj hücreleri konfokal mikroskop ile görüntülerek kırmızı makrofaj hücrelerinin içinde bulunan yeşil tümör hücreleri sayılmıştır. Alanda 100 hücre sayılarak elde edilen bulgular doğrultusunda ASA uygulanan M0 makrofajların tümör hücrelerini fagosite etme oranı %72 olarak belirlenmiştir. Konfokal mikroskop ile belirlenen fagositoz deneyinde ASA uygulamasının M0 makrofaj hücrelerinin tümör hücrelerini fagosite etme özelliklerini % 32 oranında arttırdığı gösterilmiştir. Elde edilen bulgular akım sitometri deneyini desteklemektedir.

3.6.2. M1 Makrofaj



Şekil 3.24. ASA Uygulanmayan M1 Makrofajların Fagositozunun Gösterimi. DiD ile boyanan M1 makrofaj hücreleri ile 1,000,000 GFP+ MM1S hücresi birlikte 3 saat kokültür edilmiştir. Kokültür sonucunda kuyular 3 kere yıkanarak süspanse tümör hücreleri ortamdan uzaklaştırılmıştır. Kuyuda kalan makrofaj hücreleri konfokal mikroskop ile görüntülerek kırmızı makrofaj hücrelerinin içinde bulunan yeşil tümör hücreleri sayılmıştır. Alanda 100 hücre sayılarak elde edilen bulgular doğrultusunda ASA uygulanmayan M1 makrofajların tümör hücrelerini fagosite etme oranı %63 olarak belirlenmiştir.

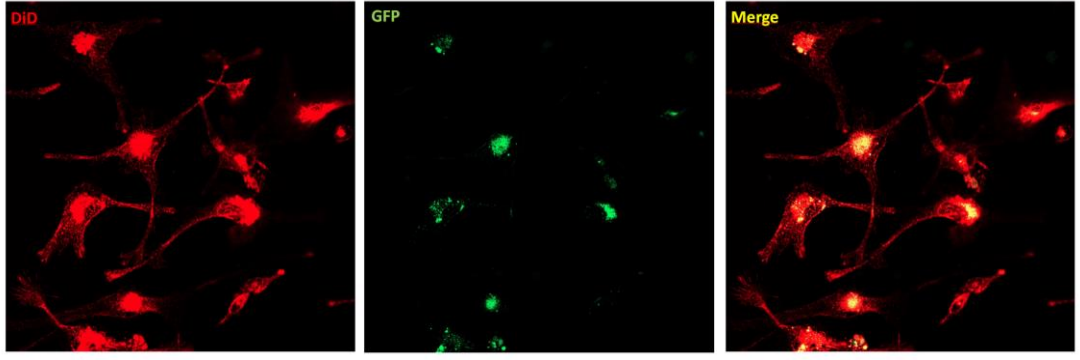


Şekil 3.25. ASA Uygulanan M1 Makrofajların Fagositozunun Gösterimi. DiD ile boyanan M1 makrofaj hücreleri 2.5 mM ASA ile 48 saat boyunca muamele edilmiştir. Ardından M1 makrofaj hücreleri 1,000,000 GFP+ MM1S hücresi birlikte 3 saat kokültür edilmiştir. Kokültür sonucunda kuyular 3 kere yıkanarak süspanse tümör hücreleri ortamdan uzaklaştırılmıştır. Kuyuda kalan makrofaj hücreleri konfokal mikroskop ile görüntülerek kırmızı makrofaj hücrelerinin içinde bulunan yeşil tümör hücreleri sayılmıştır. Alanda 100 hücre sayılarak elde edilen bulgular doğrultusunda ASA uygulanan M1 makrofajların tümör hücrelerini fagosite etme oranı %69 olarak belirlenmiştir. Konfokal mikroskop ile belirlenen fagositoz deneyinde ASA uygulamasının M1 makrofaj hücrelerinin tümör hücrelerini fagosite etme özelliklerini değiştirmedığı gösterilmiştir. Elde edilen bulgular akım sitometri deneyini desteklemektedir.

3.6.3. M2 Makrofaj



Şekil 3.26. ASA Uygulanmayan M2 Makrofajların Fagositozunun Gösterimi. DiD ile boyanan M2 makrofaj hücreleri ile 1,000,000 GFP+ MM1S hücresi birlikte 3 saat kokültür edilmiştir. Kokültür sonucunda kuyular 3 kere yıkanarak süspanse tümör hücreleri ortamdan uzaklaştırılmıştır. Kuyuda kalan makrofaj hücreleri konfokal mikroskop ile görüntülerek kırmızı makrofaj hücrelerinin içinde bulunan yeşil tümör hücreleri sayılmıştır. Alanda 100 hücre sayılarak elde edilen bulgular doğrultusunda ASA uygulanmayan M2 makrofajların tümör hücrelerini fagosite etme oranı %26 olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.27. ASA Uygulanan M2 Makrofajların Fagositozunun Gösterimi. DiD ile boyanan M2 makrofaj hücreleri 2.5 mM ASA ile 48 saat boyunca muamele edilmiştir. Ardından M2 makrofaj hücreleri 1,000,000 GFP+ MM1S hücresi birlikte 3 saat kokültür edilmiştir. Kokültür sonucunda kuyular 3 kere yıkanarak süspanse tümör hücreleri ortamdan uzaklaştırılmıştır. Kuyuda kalan makrofaj hücreleri konfokal mikroskop ile görüntülere kırmızı makrofaj hücrelerinin içinde bulunan yeşil tümör hücreleri sayılmıştır. Alanda 100 hücre sayılarak elde edilen bulgular doğrultusunda ASA uygulanan M2 makrofajların tümör hücrelerini fagosit etme oranı %70'e yükseldiği belirlenmiştir. Konfokal mikroskop ile belirlenen fagositoz deneyinde ASA uygulamasının M2 makrofaj hücrelerinin tümör hücrelerini fagosit etme özelliklerini önemli oranda arttırdığını göstermektedir. Bunun yanı sıra DiD ile boyanan M2 makrofaj hücrelerinde ASA uygulaması sonrası morfolojik olarak önemli bir değişim görülmektedir.

4. TARTIŞMA

4.1. MM ve Makrofajlar

MM tedavisinde son terapötik ilerlemeler sağkalım süresini 3 yıldan 5 yıla kadar ilerletmiş olsa da 5 yıllık sağkalım oranı %50'nin altında kalmaktadır (Cowan, Allen et al. 2018). Neredeyse tüm hastalarda nüks gözlenmekte ve dünya çapında her yıl yaklaşık 98.000 hasta MM'e yenik düşmektedir (Fonseca, Abouzaid et al. 2017, Global Burden of Disease Cancer, Fitzmaurice et al. 2018). MM tedavisi, IMiD'ler, PI'lar, tümörü ve immün sistemi hedefleyen mAb'lar dahil olmak üzere immün terapilerin kullanıma girmesiyle önemli ölçüde iyileşmiştir. Buna rağmen, tedavi her zaman kötü huylu plazma hücrelerini tamamen ortadan kaldırmakta başarısız olur ve çoğu kişi, terapiye olumlu yanıt verenlerde bile hastalık nüksetmeye başlar. MM bu nedenle tedavi edilemez bir hastalık olmaya devam etmektedir.

Tümör destekleyici kemik iliği mikro ortamı ile kombinasyon halinde MM hücrelerini hedeflemek, terapi etkinliğini artırma potansiyeline sahiptir. Fakat TMC alanında yapılan çalışmaların az olması nedeniyle daha çok araştırmaya ihtiyaç vardır (de Jong ve ark., 2021). Birçok kanserde makrofajlar TMC'de yaygın olarak bulunmaktadır. Doğal bağışıklık hücreleri ve antijen sunan hücreler olarak görev yapan makrofajların kandaki yarılanma ömürleri uzundur ve tümör dokusuna özgül olarak bağlanabilme ve fagositoz yetenekleri vardır. Bu özellikleri sebebiyle tümör hedefli tedavilerde makrofajlar önemli bir terapötik hedef planlanmaktadır. Bunun yanı sıra diğer bağışıklık hücreleri ile karşılaştırıldığında tümör dokularına kolaylıkla ulaşabilmektedirler (Liu ve ark., 2022). TAM'lar üzerine yapılan çalışmalar tümörlü dokuya makrofaj infiltrasyonunun ve TMC'de bulunan makrofajların M2 fenotipine farklılaşmasının kötü prognoz ile ilişkili olduklarını ortaya koymuştur (Fotis ve ark., 2013). MGUS hastaları sağlıklı kontroller ile karşılaştırıldığında hem yeni tanı hem de nüks sırasında MM hastaların kemik iliğinde CD206 makrofaj (M2 makrofaj) sayısında bir artış olduğu ortaya konmuştur. Fakat bu hastaların CD86 ve iNOS (M1 makrofaj) ifadenmelerinde bir değişiklik gözlenmemiştir. Ek olarak hem yeni tanı

konan hem de tekrarlayan MM hastalarının kemik iliğinde yüksek ifadelenen CD163 (M2 makrofaj) ifadesi kötü sağkalım ile ilişkilendirilmiştir (Suyani ve ark., 2013; Panchabhai ve ark., 2016).

Tümör progresyonunu geriletebilmek amacıyla makrofajların tedavi için hedeflenmesi yaklaşımları bulunmaktadır. İlk olarak immün süpresif yolakların baskılanması makrofajların yeniden programlanmasını uyarak TMÇ'deki makrofajların M1 fenotipine karakterizasyonunu hedeflemektedir. IL-10'a bağlı immün süpresif yolların inhibisyonunun hedeflenmesi de makrofaj polarizasyonunun programlanmasına katkı sağlamaktadır. Bir diğer yaklaşım ise tümör yüzeyinde bulunan "beni yeme sinyalleri"nin hedeflenerek tümörün öldürülmesinin hedeflenmesidir. Makrofajlar üzerinde bulunan ve immün kaçış noktalarından biri olan SIRPα'nın tümör yüzeyinde ifade edilen CD47 ile etkileşiminin tümör hücrelerinin fagositozunu engellediği yapılan çalışmalar ile ortaya konmuştur. Bu nedenle CD47'nin monoklonal antikör hedefli tedaviler aracılığıyla hedeflenmesinin tümör fagositozunu arttırdığı ortaya konmuştur (Russ ve ark., 2018).

4.2. MM ve ASA

İnflamasyonun MM patogenezindeki rolü bilinmektedir. Nükleer faktör κB (NFκB) ve IL-6 dahil olmak üzere inflamatuvar yolağın yukarı regülasyonunun MM sürecini kötüye götürmektedir. ASA, NFκB, COX, prostaglandinler gibi inflamasyona aracılık eden moleküllerin aşağı regülasyonunu kontrol eden bir anti-inflamatuvar ilaçtır. ASA, COX1 ve COX2'ye geri dönüşümsüz olarak kovalent bağ ile bağlanarak etkisiz hale getirmektedir (Marinac ve ark., 2022). Belhassa ve arkadaşları (2020) yaptıkları çalışmada ASA uygulamasının miyokardiyal enfarktüs patogenezindeki etkisini araştırmışlardır. Elde ettikleri bulgular doğrultusunda ASA fagositozda ve hücre içi patojen öldürme aktivitelerinde artışa neden olmuştur (Belhassa ve ark., 2020). Bu nedenlerden dolayı ASA'nın MM tedavisinde etkili

olabileceği düşünülmüş olup tedavi için terapötik bir hedef olarak düşünülmektedir. Konu ile ilgili daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Literatür araştırmaları sonucunda ASA'nın fagositozu arttırdığı ve anti-tümörijenik etki gösterdiği ortaya konmuştur. Fakat ASA'nın MM'de TMC'yi nasıl düzenlediği ve MM hücrelerinin fagositozunu nasıl yönlendirdiği ile ilgili çalışmaya rastlanmamıştır. Bu tez çalışmasının amacı ASA uygulamasının TMC'deki rolünü anlamak ve MM'de mikroçevrenin yeniden programlanmasına, makrofaj aracılı düzenlenmesine ve aynı zamanda TMC'deki tümör kütlelerinin azalmasına etkilerinin belirlenmesidir.

Bu tez çalışması kapsamında ASA ile muamele edilen MM kanser hücrelerinin canlılığında azalma gösterilmiştir ve bu sitotoksik etkinin zamana bağlı azalışı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Bunun yanı sıra TMC'de farklı fonksiyon gösteren makrofaj alttiplerinde ise (M0-aktif olmayan; M1; anti-tümörijenik; M2; pro-tümörijenik) ASA'nın miyelom hücrelerinde canlılığı düşürdüğü gösterilse de en yüksek doz hariç toksik olmadığı belirlenmiştir. Bu doğrultuda ASA'nın Myeloma hücrelerinde apoptozis ile ölümü uyarmış, makrofaj tiplerinde ise monosit hariç canlılığı düşürse de ciddi bir sitotoksik etki göstermediği sonucuna varılmıştır.

Canlılık analizi sonrasında makrofajlar için sitotoksik olmadığı gösterilen ASA dozunun (2.5mM) TMC'de makrofajların polarizasyonunu nasıl değiştirdiği analiz edilmiştir. TMC'de tümör progresyonu ile azaldığı belirtilen M1 makrofajların yanı sıra tümör salgıları ile kanserin ilerlemesini, metastazı ve ilaç direncini teşvik ettiği bildirilen M2 makrofajların arttığı gösterilmiştir. Bu nedenle ASA'nın TMC'de makrofajların M2 fenotipinden M1 fenotipe farklılaşması teşvik edilmektedir.

Planlanan tez çalışması doğrultusunda makrofajlar M0, M1 ve M2 fenotipine başarı ile farklılaştırılmıştır. ASA uygulamasının makrofaj alttiplerinin fagositozu üzerinden myeloma tümör klirensine etkisi başarılı bir şekilde ortaya konmuştur. M0, M1 ve M2 makrofajların tümör fagositozuna olan etkilerini gösterebilmek amacıyla akım sitometri ve konfokal mikroskop kullanılmıştır. Sonuçlarımız doğrultusunda,

akım sitometri ile ulaşılan verilerde M0 ve M1 makrofajlarının tümör hücrelerinin fagositozunu gerçekleştirdiği gösterilmiş, ayrıca 48 saat ASA uygulamasının M0 ve M1 makrofajların tümör fagositozunu önemli ölçüde arttırdığı ortaya konmuştur. Bunun yanı sıra M2 makrofajların tümör hücrelerini fagositozunu gerçekleştiremediği belirlenmiş, 48 saat boyunca uygulanan ASA'nın M2 makrofajları yeniden programlayarak tümör hücrelerinin fagositozunu 2 kat arttırdığı akım sitometri sonuçları ile desteklenmiştir.

Akım sitometri sonuçlarını desteklemek ve tümör hücrelerinin fagositozunu görüntüleyebilmek amacıyla planlanan **konfokal mikroskop ile fagositozun takibinin gerçekleştirildiği deneylerde ise** M0 ve M1 makrofajların tümör hücrelerinin fagositozunu gerçekleştirebildiği gösterilmiş ve en yüksek fagositik aktiviteyi M1 makrofajların gösterdiği sonucuna ulaşılmıştır. Fagositoz oranını tayin edebilmek için ikili tekrar çalışılan preparatlarda minimum 100 hücre sayılarak deney gerçekleştirilmiştir. M0 ve M1 hücrelerine ASA uygulamasının fagositoz oranını arttırdığı gösterilmiştir.

4.3. MM'de ASA ve S TOK NLER

4.3.1. CD163

TM 'nin ana bileşeni olan TAM'lar birçok kanser türünde analiz edilmiştir. TAM'lar, M2 benzeri fenotip sergilemeleri nedeniyle adaptif immün yanıtı aktif olarak baskılayarak tümör progresyonunu ve anjiogenezi desteklemektedirler. TAM'ların hematolojik kanserlerdeki rolü Hodgkin Lenfoma (CHL), Hodgkin olmayan Lenfoma (NHL) ve MM'de kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. Chen ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği bir kohort çalışmasında (2017), 240 MM vakasında CD163+ TAM'ların kötü prognostik faktör olduğu belirlenmiştir (Chen ve ark., 2017).

Aynı zamanda Wang ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği bir diğer çalışmada (2019), IL-4 ile uyarılan M2 makrofajların IL-6 ve IL-10 sekresyonunu arttırdığı tespit edilmiştir. Aynı zamanda bu çalışma ile CD163, M2 makrofajların spesifik bir belirteci olarak tespit edilmiştir. Literatürdeki çalışmalar M2 makrofajların IL-10 ve IL-6'nın parakrin salgılanması yoluyla kanser kök hücre benzeri özellikleri uyardığını göstermiştir. Bu çalışmalar doğrultusunda MM'de ilaç direncini, kötü prognozu ve hatta yeni novel terapötiklerin etkisini belirleyebilmek için TAM'lar ile ilgili daha çok araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır (Wang ve ark., 2016; Wang ve ark., 2019).

Steroid olmayan anti-inflamatuvar ilaç grubunun bir üyesi olan Aspirin (ASA), siklooksijenaz enzimleri COX1 ve COX2'nin baskılanması yoluyla prostaglandin seviyesini düşürmeyi hedeflemektedir. Prostaglandinlerin ise makrofaj aktivasyonunu ve polarizasyonunu uyararak immün yanıtı modüle edebildiği gösterilmiştir (Eruslanov ve ark., 2010). Barnard ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği bir çalışmada (2018), NSAID kullanımının COX1 ve COX2 baskılaması üzerinden yumurtalık kanseri riskini farklılaştırmadığını göstermişlerdir. Fakat NSAID kullanımının TMÇ'de M2 makrofaj yoğunluğunu ciddi derecede değiştirdiğini ortaya koymuşlardır (Barnard ve ark., 2019).

Tamamlanan bu tez çalışmasında, ASA uygulamasının M1 makrofaj hücrelerinde CD163 ifadesine rastlanmazken, M0, ve M2 makrofaj hücrelerinde CD163 ifadesini azalttığı gözlemlenmiştir. M2 fenotipinin belirteci olarak takip edilen CD163 ifadesinin ASA uyarımı ile azalması, TMÇ'nin anti-tümörijenik olarak yeniden programlanabileceğini ve ASA'nın tümör mikroçevresinde M2→M1 makrofaj polarizasyonunu yeniden programlayabileceğini desteklemektedir.

4.3.2. CD80 / CD86

MM tedavisi önündeki en önemli engellerden biri de kemoterapötik dirençtir. TMÇ ile stromal hücreler arasındaki etkileşimler pro-tümörijenik etki gösterdiğinden

TMÇ'nin ilaç direncine aracılık ettiği yapılan çalışmalar ile desteklenmektedir. Klasik olarak aktive edilmiş makrofajlar (M1 makrofajlar), majot doku uyumluluk kompleksi sınıf II (MHC II), CD80, CD86'nın yüksek ifadesiyle karakterize edilmiştir (Cutolo ve ark., 2022). M2 benzeri fenotip gösteren TAM'lar ise CD163 ve CD206 yüzey belirteçlerinin yüksek ifadenmesiyle karakterize edilmektedir (Roszer, 2015). Yi ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği bir çalışmada (1997) kemik iliğinden elde edilen plazma hücrelerinde yok denecek kadar az CD80/CD86 ifadesi gözlemlendiğini raporlamıştır (Yi ve ark., 1997).

Tez çalışması kapsamında elde edilen sonuçlar ASA uygulamasının ardından bütün makrofaj alt tiplerinde artan CD80 CD86 ifadesinin makrofaj polarizasyonunu M2→M1 şeklinde yönlendirebildiğini göstermektedir. **M1 makrofaj polarizasyonunun belirteci olan CD80 ve CD86 ifadesinin ASA ile uyarımı takiben artması ile TMÇ'nin ASA uygulaması sonrasında yeniden programlanabileceği in vitro MM modelinde ilk kez gösterilmiştir.** ASA uygulaması sonrası M1 ve M2 makrofajların tümör hücrelerinin fagositozunu arttırması da qPCR sonuçlarını desteklemektedir.

4.3.3. IL-10

IL10 monositler/makrofajlar, B ve T lenfositleri, NK hücreleri ve mast hücreleri tarafından salgılanan bir sitokindir. B hücrelerinin plazma hücrelerine farklılaşmasında yer alır ve B hücre proliferasyonunu destekler. Bu nedenle malign B hücre lenfomalarında kötü prognoz ile ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır. MM hücreleri için bir büyüme faktörü gibi davranarak hastalığı kötü prognoza yönlendirildiği bildirilmiştir (Alexandrakis ve ark., 2015; Yue ve ark., 2022). MM'nin yanı sıra makrofajlarda IL10 sekresyonunun kanserde metastazı arttırdığı ile ilgili çalışmalar bulunmaktadır. Zhang ve arkadaşlarının mide kanserinde IL10 salgılayan TAM'lar üzerine gerçekleştirdikleri çalışmada (2022), IL10+ TAM'ların TMÇ'yi immün sistemden kaçmak üzere programladığını, kemoterapötiklere direnç geliştirdiğini ortaya koymuşlardır. Bu nedenle kanserde

IL10 hedeflenmesi hem kanser hücrelerin progresyonu açısından hem de TMC’de yer alan makrofajların pro-tümörjenik aktivitelerinin kontrol edilebilmesi açısından kritiktir (Zhang ve ark., 2022).

Sonuçlarımız doğrultusunda ASA uygulamasının makrofajların bütün alt tipleri üzerinde IL10 sekresyonunu önemli ölçüde azalttığını ortaya koymuştur. Bu sonuç doğrultusunda ASA uygulamasının makrofajlar üzerinde IL10 sekresyonunu düzenleyerek TMC’nin yeniden programlanmasına katkı sağlayabileceği düşünülmektedir. Bununla birlikte MM1S hücrelerinde de ASA uygulamasının IL10 seviyesini azalttığı gösterilmiştir. Böylece ASA uygulamasının TMC’nin yanı sıra kanser hücrelerini de direkt hedefleyerek IL10 üzerinden proliferasyonlarını yavaşlatacağı düşünülmüştür. Ayrıca, immünsupresif bir sitokin olan IL10’un tümör mikroçevresinde azalması diğer immün sistem hücreleri üzerindeki baskılamayı da azaltması beklendiğinden, ASA uygulamasının MM mikroçevresinde genel bir immünreaktivasyona neden olması söz konusu olabilir. Bu konuda daha fazla araştırmaya ihtiyaç bulunmaktadır.

4.3.4. IL-6

IL6 MM için temel bir büyüme faktörü olarak gösterilmektedir ve hem otokrin hem de parakrin olarak salgılanabilmektedir. Aynı zamanda kemik iliği stromal hücreler ile MM hücreleri arasındaki iletişim de IL6 tarafından takip edilmekte olup IL6 sekresyonu anjiogenez ve ilaç direnci ile ilişkilendirilmektedir (Jasrotia ve ark., 2020). Tümör hücrelerinin yanı sıra IL6’nın makrofajlar üzerindeki etkilerine dair de araştırmalar bulunmaktadır. Yin ve arkadaşlarının hepatoselüler karsinomda gerçekleştirdikleri çalışmada (2018), M1 makrofaj polarizasyonunda IL6/STAT3 yolağının inhibe edildiği, buna karşılık M2 makrofaj polarizasyonunda IL6 sekresyonunun doğru orantıda arttığı gösterilmiştir. Bunun yanı sıra tümör hücreleri ile makrofaj kokültürü gerçekleştirilerek fagositoz gerçekleştirilmiş olup IL6 inhibisyonunun fagositozu arttırdığı ortaya konmuştur. Bu çalışmanın en değerli sonuçlarından biri IL6/STAT2 yolağını M2 makrofaj polarizasyonunda etkin rol

oynayan bir yolak olarak göstermesidir (Yin ve ark., 2020). Tian ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği çalışma ise (2010) ASA uygulamasının IL6/STAT3 yolağını baskılayarak IL6 sekresyonunu azalttığını göstermektedir (Tian ve ark., 2010). Bir diğer çalışma ise ASA uygulamasının IL6'yı baskılaması üzerinden p53'ün aşağı düzenlenmesini durdurarak protümörjenik etkileri azalttığını göstermiştir (Brighenti ve ark., 2016).

Gerçekleştirilen tez çalışma sonucu ASA uygulanmasına bağlı olarak IL6 gen ifadesindeki değişim hem MM hücrelerinde hem de makrofaj hücrelerinde gösterilmiştir. M1 hücrelerinde IL6 ifadesinin düşük seviyede ifade edildiği gösterilirken, M2 makrofajlarda nispeten daha yüksek bir ifade gözlenmiştir. ASA uygulaması sonrası ise M0 makrofajlarda IL6 ifadesi kontrol grubuna göre azalırken M2 makrofajlarda ASA uygulaması sonrası IL6 ifadesine rastlanmamıştır. Klinik olarak anlamlı olarak değerlendirilen bu bulgular ASA'nın hem MM hücrelerinde hem de makrofaj üzerindeki anti-tümörjenik etkinliğini doğrulamaktadır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Son yıllarda birçok kanserde olduğu gibi MM tedavisinde de TMC'nin hedeflenmesi yeni terapötik yaklaşımların temelini oluşturmaktadır. Bu doğrultuda kullanılan yeni ilaçların, tümör hücrelerini öldürmesinin yanı sıra TMC'yi yeniden planlayarak tümör için yaşanamaz hale getirmesi ciddi önem taşımaktadır. Yeni ilaçların oluşturulması ve klinikte uygulanmaya başlanması uzun yıllar gerektirdiğinden klinikte farklı hastalıklar için hedeflenen ilaçların kanser üzerindeki etkisini araştıran terapilerin geliştirilmesi oldukça hızlı ve etkili bir yöntem görülmektedir. Gerçekleştirilen bu tez çalışması doğrultusunda immün sistemi düzenleyen bir anti-inflamatuvar ilaç olan ASA'nın anti-myeloma etkinliğinin yanısıra tümör hücrelerinin fagositozuna etkisi ve bununla birlikte mikroçevrede yaygın bulunan makrofajların polarizasyonuna etkisinin belirlenmesi hedeflenmiştir.

Tezde elde edilen bulgular doğrultusunda:

- Canlılık analizi sonrasında makrofajlar için sitotoksik olmadığı gösterilen ASA'nın MM TMC'de makrofajların polarizasyonu üzerindeki etkinliği **ilk kez** analiz edilmiştir.
- ASA uygulamasının makrofaj polarizasyonuna etkisi araştırılmış, M0 ve M2 makrofaj hücrelerinde CD163 ifadesini azalttığı ilk kez gösterilmiştir. M2 fenotipinin belirteci olarak takip edilen CD163 ifadesinin azalması TMC'nin anti-tümörijenik olarak yeniden programlanabileceğini ve tümör infiltrasyonu sırasında makrofaj polarizasyonunu anti-tümörijenik olarak programlayabileceğini desteklemektedir.
- ASA uygulamasının aktif makrofaj M1 belirteci olan CD80/CD86 ifadesini arttırdığı ilk kez gösterilmiştir. ASA uygulaması sonunda artan CD80/CD86 ifadesinin M2→M1 polarizasyonunun uyarılması ile ilişkilendirilmiştir. CD80 ve CD86 ifadesinin artması M1 makrofaj polarizasyonunu

uyardığından MM’de TMC’nin ASA uygulaması sonrası yeniden programlanabileceği ilk kez gösterilmiştir.

- ASA uygulaması ile hem tümör hem makrofaj hücrelerinde IL6 ve IL10 sekresyonunun azaldığı belirlenmiş, ve ASA’nın immünmodülatör etkinliği ortaya konmuştur.
- M0, M1 ve M2 makrofaj hücrelerinin MM hücrelerini fagositozu iki farklı yöntemle analiz edilmiş ve ASA uygulanmasının makrofaj aktivasyonuna neden olduğu ve farklı polarizasyon gösteren makrofaj hücrelerinde fagositozu olumlu şekilde yönlendirdiği ortaya konmuştur. **Bu tez çalışması, literatürde, ASA’nın MM hücrelerinin fagositozuna dair etkisinin gösterildiği ilk çalışmadır.**

Klinikte kullanılan ve tümör klirensini hedefleyen terapötiklere gelişen direnç ve ilaçların yan etkilerinin yıkıcı etkinliği kanserde terapi araştırmalarına yön vermiştir. Bu nedenlerden dolayı kanserde uygulanan tedavi yöntemleri son zamanlarda immün mikroçevrenin hedeflenmesini içermektedir. Kanser direkt eliminasyonunun yanı sıra kanserin progresyonunu ve anjiogenezi destekleyen tümör mikroçevresinin yeniden anti-tümörijenik olarak programlanması etkili bir tedavi yöntemi olarak öngörülmektedir ve destekleyici birçok çalışma gerçekleştirilmiştir. Bunun yanı sıra yeni bir terapötüğün etkilerinin belirlenmesi ve kullanıma geçmesi oldukça uzun süre aldığından hali hazırda immün mikroçevreyi modüle edebilen ilaçların anti-karsinojenik etkinliğinin belirlenmesi popüler bir araştırma alanı olmuştur.

Bu tez çalışmasında elde edilen sonuçlar doğrultusunda, ASA’nın miyelom hücrelerine ve TMC’deki önemli bileşenlerden olan makrofajlara ve alt tiplerine etkisi açıkça gösterilmiştir. Bu doğrultuda ASA’nın MM tedavisinde kullanılabilmesi için makrofaj polarizasyonu ve fagositoz altında yatan yolların daha çok aydınlatılması gerekmektedir. Aynı zamanda klinikte uygulanan terapötikler ile birlikte ASA uygulanmasının TMC’yi nasıl hedeflediğinin araştırılması önem taşımaktadır. Böylelikle klinikte aktif kullanılan onay almış ilaçların terapötik

etkisinin güçlendirilmesi ve kanserde tedavi yöntemlerinin aydınlatılması ve güçlendirilmesi açısından umut verici olacaktır. Bununla birlikte ASA'nın MM ve çevresindeki rolünün belirlenebilmesi için ASA'nın MM çevresinde yer alan ve immün süpresif karakterizasyon gösteren diğer immün sistem bileşenleri üzerine etkisinin de araştırılması gereklidir. ASA'nın etkisinin ve hedeflediği mekanizmaların aydınlatılması yeni terapötik yaklaşımlarında önünü açarak kanser tedavisine yeni bir bakış kazandırılmasına yardımcı olabileceği düşünülmektedir.



ÖZET

ASPIRİN'in Anti-Miyeloma Etkinliğinin Makrofaj Polarizasyonu Aracılı Belirlenmesi

Tümör mikroçevresi (TMÇ), tümör progresyonunu etkileyen çeşitli hücre tipleri açısından zengin bir ortamdır. Makrofajlar, TMÇ'de en bol miktarda bulunan hücre popülasyonu olmaları nedeniyle ve salgıladıkları sitokinler aracılığıyla tümör progresyonuna destek olabilmektedir. Steroid olmayan anti-inflamatuvar ilaç (NSAID) olan Aspirin (ASA), birçok kanserde kemopreventif bir ajan olarak işlev gösterdiği bilinmesine rağmen MM'de in vitro herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu tez çalışmasında, ASA'nın en yaygın hematolojik kanserlerden biri olan Multipl Miyelom (MM) hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi, TMÇ'yi anti-tümörijenik olarak yeniden programlaması ve miyeloma hücrelerinin makrofaj aracılı fagositozu üzerindeki etkilerinin araştırılması hedeflenmiştir.

MM'nin mikroçevresindeki etkileşimleri analiz edebilmek için THP1 hücre serileri köken alınarak farklı makrofaj alt tiplerine (M0, M1 ve M2) farklılaştırılan makrofaj hücreleri ile MM hücre serisi olan MM1S hücreleri kullanılmıştır. Gerçekleştirilen tez çalışması kapsamında, ASA uygulanan ve uygulanmayan makrofaj tiplerinin MM hücrelerinin fagositozuna olan etkisi, makrofaj polarizasyonuna etkisi ve ASA'nın MM1S hücreleri üzerindeki öldürücü etkisi araştırılmıştır.

ASA uygulanan makrofaj hücrelerinde IL6, IL10 gibi pro-tümörijenik sitokinlerin ifadelerini azalttığı ilk kez gözlenmiştir. Bunun yanı sıra ASA uygulamasının M2 makrofajların polarizasyonunu M1 fenotipine yönlendirdiği ve tümör hücrelerinin fagositozunu önemli ölçüde arttırdığı belirlenmiştir. Bu tez çalışması, ASA uygulamasının MM mikroçevresinde makrofaj polarizasyonunu anti-tümörijenik olarak yeniden programlayabildiğini göstermiş ve ASA'nın MM1S hücrelerindeki canlılığı önemli ölçüde azalttığının ortaya konması nedeniyle ASA'nın MM tedavisinde alternatif ve umut verici bir ajan olabileceği şeklinde yorumlanmıştır.

Anahtar Sözcükler: Aspirin, Fagositoz, Makrofaj Polarizasyonu, Multipl Miyelom, Tümör İlişkili Makrofajlar (TAM).

SUMMARY

Determination of Anti-Myeloma Effect of ASPIRIN by Macrophage Polarization

Tumor microenvironment (TME) is an environment rich in various cell types that influence tumor progression. Macrophages can support tumor progression through the cytokines they secrete, because they are the most abundant cell population in TME. Although Aspirin (ASA), a non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID), is known to function as a chemo-preventive agent in many cancers, In vitro studies have not been found in MM. In this thesis study, it is aimed to investigate the cytotoxic effect of ASA on Multiple Myeloma (MM) cells, one of the most common hematological cancers, its reprogramming of TMC as anti-tumorigenic, and its effects on macrophage-mediated phagocytosis of myeloma cells.

In order to analyze the interactions in the microenvironment of MM, macrophage cells differentiated into different macrophage subtypes (M0, M1 and M2) by originating from THP1 cell series and MM1S cells, which are MM cell series were used, Within the scope of the thesis study, the effect of ASA on phagocytosis of MM cells via macrophages, their effect on macrophage polarization and the cytotoxic effect of ASA on MM1S cells were investigated.

It has been observed for the first time that it reduces the expression of pro-tumorigenic cytokines such as IL6, IL10 in macrophage cells treated with ASA. In addition, it was determined that ASA treatment directed the polarization of M2 macrophages to the M1 phenotype and significantly increased the phagocytosis of tumor cells. This thesis study showed that ASA administration can reprogram macrophage polarization in the MM microenvironment as anti-tumorigenic and has been interpreted as ASA may be an alternative and promising agent in the treatment of MM since it has been shown that ASA significantly reduces the viability in MM1S cells.

Keywords: Aspirin, Macrophage Polarization, Multiple Myeloma, Phagocytosis, Tumor-Associated Macrophages (TAM).

KAYNAKLAR

- ALEXANDRAKIS MG, GOULIDAKI N, PAPPA CA, BOULA A, PSARAKIS F, NEONAKIS I, TSIRAKIS G (2015). Interleukin-10 Induces Both Plasma Cell Proliferation and Angiogenesis in Multiple Myeloma. *Pathol Oncol Res.* **21**(4):929-34.
- ARMSTRONG PCJ, TRUSS, NJ, ALI FY, DHANJI AA, VOJNOVIC I, ZAIN ZNM, BISHOP-BAILEY D, PAUL-CLARK MJ, TUCKER, AT, MITCHELL JA (2008). Aspirin and the in vitro linear relationship between thromboxane A2-mediated platelet aggregation and platelet production of thromboxane A2. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* **6**(11): 1933-1943.
- AZAB AK, RUNNELS JM, PITSILLIDES C, MOREAU AS, AZAB F, LELEU X, JIA X, WRIGHT R, OSPINA B, CARLSON AL, ALT C, BURWICK N, ROCCARO AM, NGO HT, FARAG M, MELHEM MR, SACCO A, MUNSHI NC, HIDEHIMA T, ROLLINS BJ, ANDERSON KC, KUNG AL, LIN CP, GHOBRIAL I. (2009). CXCR4 inhibitor AMD3100 disrupts the interaction of multiple myeloma cells with the bone marrow microenvironment and enhances their sensitivity to therapy. *Blood* **113**(18): 4341-4351.
- BARNARD ME, HECHT JL, RICE MS, GUPTA M, HARRIS HR, ELIASSEN AH, ROSNER BA, TERRY KL, TWOROGGER SS (2018). Anti-Inflammatory Drug Use and Ovarian Cancer Risk by COX1/COX2 Expression and Infiltration of Tumor-Associated Macrophages. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **27**(12): 1509-1517.
- BASHIR S, SHARMA Y, ELAHI A, KHAN F (2016). Macrophage polarization: the link between inflammation and related diseases. *Inflamm Res* **65**(1): 1-11.
- BELHASSENA I, NOUARI W, MESSAOUD A, NOUAR M, BRAHIMI M, LAMARA SC, ARIBI M (2020). Aspirin enhances regulatory functional activities of monocytes and downregulates CD16 and CD40 expression in myocardial infarction autoinflammatory disease. *Int Immunopharmacol* **83**:106349.
- BHATTACHARYA S, AGGARWAL A. (2019) M2 macrophages and their role in rheumatic diseases. *Rheumatol Int.* **39**(5):769-780.
- BEIDER K, BITNER H, LEIBA M, GUTWEIN O, KOREN-MICHOWITZ M, OSTROVSKY O, ABRAHAM M, WALD H, GALUN E, PELED A, NAGLER A (2014). Multiple myeloma cells recruit tumor-supportive macrophages through the CXCR4/CXCL12 axis and promote their polarization toward the M2 phenotype. *Oncotarget* **5**(22): 11283-11296.
- BRIGHENTI E, GIANNONE FA, FORNARI F, ONOFRILLO C, GOVONI M, MONTANARO L, TRERÉ D, DERENZINI M (2016). Therapeutic dosages of aspirin counteract the IL-6 induced pro-tumorigenic effects by slowing down the ribosome biogenesis rate. *Oncotarget.* **7**(39):63226-63241.
- CALCINOTTO A, PONZONI M, RIA R, GRIONI M, CATTANEO E, VILLA I, SABRINA BERTILACCIO MT, CHESI M, RUBINACCI A, TONON G, BERGSAGEL PL, VACCA A, BELLONE M (2015). Modifications of the mouse bone marrow microenvironment favor angiogenesis and correlate with disease progression from asymptomatic to symptomatic multiple myeloma. *Oncoimmunology* **4**(6): e1008850.
- CHEN X, CHEN J, ZHANG W, SUN R, LIU T, ZHENG Y, WU Y (2017). Prognostic value of diametrically polarized tumor-associated macrophages in multiple myeloma. *Oncotarget.* **8**(68):112685-112696.

- COWAN AJ, ALLEN C, BARAC A, BASALEEM H, BENSENOR I, CURADO MP, FOREMAN K, GUPTA R, HARVEY J, HOSGOOD HD, JAKOVljeVIC M, KHADER Y, LINN S, LAD D, MANTOVANI L, NONG VM, MOKDAD A, NAGHAVI M, POSTMA M, ROSHANDEL G, SHACKELFORD K, SISAY M, NGUYEN CT, TRAN TT, XUAN BT, UKWAJA KN, VOLLSET SE, WEIDERPASS E, LIBBY EN, FITZMAURICE C (2018). Global Burden of Multiple Myeloma: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *JAMA Oncol* 4(9): 1221-1227.
- COWAN AJ, GREEN DJ, KWOK M, LEE S, COFFEY DG, HOLMBERG LA, TUAZON S, GOPAL AK, LIBBY EN (2022). Diagnosis and Management of Multiple Myeloma: A Review *JAMA*
- CUTOLO M, CAMPITIELLO R, GOTELLI E, SOLDANO S (2022). The Role of M1/M2 Macrophage Polarization in Rheumatoid Arthritis Synovitis. *Front Immunol*. 13:867260.
- DE JONG MME, KELLERMAYER Z, PAPAIZIAN N, TAHRI S, HOFSTE OP BRUININK D, HOOGENBOEZEM R, SANDERS MA, VAN DE WOESTIJNE PC, BOS PK, KHANDANPOUR C, VERMEULEN J, MOREAU P, VAN DUIN M, BROIJL A, SONNEVELD P, CUPEDO T (2021). The multiple myeloma microenvironment is defined by an inflammatory stromal cell landscape. *Nat Immunol* 6(6):769-780.
- DENARDO DG VE RUFFELL B (2019). Macrophages as regulators of tumour immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 19(6): 369-382.
- ERUSLANOV E, DAURKIN I, ORTÍZ J, VIEWEG J, KUSMARTSEV S (2010). Pivotal Advance: Tumor-mediated induction of myeloid-derived suppressor cells and M2-polarized macrophages by altering intracellular PGE₂ catabolism in myeloid cells. *J Leukoc Biol*. 88(5):839-48.
- FITZGERALD GA (1991). Mechanisms of platelet activation: thromboxane A2 as an amplifying signal for other agonists. *The American journal of cardiology* 68(7): B11-B15.
- FLANNAGAN RS, JAUMOUILLE V, GRINSTEIN S (2012). The cell biology of phagocytosis. *Annu Rev Pathol* 7: 61-98.
- FONSECA R, ABOUZAIID S, BONAFEDE M, CAI Q, PARIKH K, COSLER L, RICHARDSON P (2017). Trends in overall survival and costs of multiple myeloma, 2000-2014. *Leukemia* 31(9): 1915-1921.
- ASIMAKOPOULOS F, KIM J, DENU RA, HOPE C, JENSEN JL, OLLAR SJ, HEBRON E, FLANAGAN C, CALLANDER N, HEMATTI P Macrophages in multiple myeloma: emerging concepts and therapeutic implications (2013). *Leuk Lymphoma* 54(10):2112-21.
- FUSTER V ve SWEENEY JM (2011). Aspirin: a historical and contemporary therapeutic overview. *Circulation* 123(7): 768-778.
- GARCIA-ORTIZ A, RODRIGUEZ-GARCIA Y, ENCINAS J, MAROTO-MARTIN E, CASTELLANO E, TEIXIDO J, MARTINEZ-LOPEZ J (2021). The Role of Tumor Microenvironment in Multiple Myeloma Development and Progression. *Cancers (Basel)* 13(2).
- GHANDILI S, WEISEL KC, BOKEMEYER C, LEYPOLDT LB (2021). Current Treatment Approaches to Newly Diagnosed Multiple Myeloma. *Oncol Res Treat* 44(12): 690-699.
- GLOBAL BURDEN OF DISEASE CANCER COLLABORATION (2018). Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-Years for 29 Cancer Groups, 1990 to 2016: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study. *JAMA Oncol* 4(11): 1553-1568.

- GORDON S (2016). Phagocytosis: An Immunobiologic Process. *Immunity* **44**(3): 463-475.
- HSIEH CC VE WANG CH (2018). Aspirin Disrupts the Crosstalk of Angiogenic and Inflammatory Cytokines between 4T1 Breast Cancer Cells and Macrophages. *Mediators_Inflamm* **2018**: 6380643.
- HIRAYAMA D, IIDA T, NAKASE H (2017). The Phagocytic Function of Macrophage-Enforcing Innate Immunity and Tissue Homeostasis. *Int J Mol Sci* **19**(1):92.
- JADOON Y, SIDDIQUI MA (2021). Immunotherapy in multiple myeloma. *Cancer Treat Res Commun.* **29**:100468.
- JASROTIA S, GUPTA R, SHARMA A, HALDER A, KUMAR L (2020). Cytokine profile in multiple myeloma. *Cytokine.* **136**:155271.
- JEFFREYS D (2008). Aspirin: the remarkable story of a wonder drug. *Bloomsbury Publishing USA*.
- JADOON Y, SIDDIQUI MA (2021). Immunotherapy in multiple myeloma. *Cancer Treat Res Commun.* **29**:100468.
- JOSHUA DE, BRYANT C, DIX C, GIBSON J, HO J (2019). Biology and therapy of multiple myeloma. *Med J Aust* **210**(8): 375-380.
- KADOMOTO S, IZUMI K, MIZOKAMI A (2021). Macrophage Polarity and Disease Control. *Int J Mol Sci* **23**(1).
- KAWANO Y, MOSCHETTA M, MANIER S, GLAVEY S, GORGUN GT, ROCCARO AM, ANDERSON KC, GHOBRIAL IM (2015). Targeting the bone marrow microenvironment in multiple myeloma. *Immunol Rev* **263**(1): 160-172.
- KIHARA Y, GUPTA S, MAURYA MR, ARMANDO A, SHAH I, QUEHENBERGER O, GLASS CK, DENNIS EA, SUBRAMANIAM S (2014). Modeling of eicosanoid fluxes reveals functional coupling between cyclooxygenases and terminal synthases. *Biophysical journal* **106**(4): 966-975.
- KIRKBY NS, CHAN MV, ZAISS AK, GARCIA-VAZ E, JIAO J, BERGLUND LM, VERDU EF, AHMETAJ-SHALA B, WALLACE JL, HERSCHMAN HR, GOMEZ MF, MITCHELL JA (2016). Systematic study of constitutive cyclooxygenase-2 expression: Role of NF-kappaB and NFAT transcriptional pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**(2): 434-439.
- LI P, HAO Z, WU J, MA C, XU Y, LI J, LAN R, ZHU B, REN P, FAN D, SUN S (2021). Comparative Proteomic Analysis of Polarized Human THP-1 and Mouse RAW264.7 Macrophages. *Front Immunol* **12**: 700009.
- LI X, YAO W, YUAN Y, CHEN P, LI B, LI J, CHU R, SONG H, XIE D, JIANG X, WANG H (2017). Targeting of tumour-infiltrating macrophages via CCL2/CCR2 signalling as a therapeutic strategy against hepatocellular carcinoma. *Gut* **66**(1): 157-167.
- LIU K, CUI JJ, ZHAN Y, OUYANG QY, LU QS, YANG DH, LI XP, YIN JY (2022). Reprogramming the tumor microenvironment by genome editing for precision cancer therapy. *Mol Cancer* **21**(1):98.
- LOPES R, CAETANO J, FERREIRA B, BARAHONA F, CARNEIRO EA, JOAO C (2021). The Immune Microenvironment in Multiple Myeloma: Friend or Foe? *Cancers (Basel)* **13**(4).

- MAJETI R, CHAO MP, ALIZADEH AA, PANG WW, JAISWAL S, GIBBS KD, JR., VAN ROOIJEN N, WEISSMAN IL (2009). CD47 is an adverse prognostic factor and therapeutic antibody target on human acute myeloid leukemia stem cells. *Cell* **138**:286–99.
- MANTOVANI, A, SOZZANI S.,LOCATI M, ALLAVENA P, SICA A (2002). Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol* **23**(11): 549-555.
- MARINAC CR, LEE DH, COLDITZ GA, REBBECK TR, ROSNER B, BUSTOROS M, GHOBRIAL IM, BIRMANN BM (2022). Regular Aspirin Use and Mortality in Patients with Multiple Myeloma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **31**(2):479-485.
- MURRAY PJ, ALLEN JE, BISWAS SK, FISHER EA, GILROY DW, GOERDT S, GORDON S, HAMILTON JA, IVASHKIV LB, LAWRENCE T, LOCATI M, MANTOVANI A, MARTINEZ FO, MEGE JL, MOSSER DM, NATOLI G, SAEIJ JP, SCHULTZE JL, SHIREY KA, SICA A, SUTTLES J, UDALOVA I, VAN GINDERACHTER, JA, VOGEL SN, WYNN TA (2014). Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity* **41**(1): 14-20.
- NYWENING TM, WANG-GILLAM A, SANFORD DE, BELT BA, PANNI RZ, CUSWORTH BM, TORIOLA AT, NIEMAN RK, WORLEY LA, YANO M, FOWLER KJ, LOCKHART AC, SURESH R, TAN BR, LIM KH, FIELDS RC, STRASBERG SM, HAWKINS WG, DENARDO DG, GOEDEGEBUURE SP, LINEHAN DC (2016). Targeting tumour-associated macrophages with CCR2 inhibition in combination with FOLFIRINOX in patients with borderline resectable and locally advanced pancreatic cancer: a single-centre, open-label, dose-finding, non-randomised, phase 1b trial. *Lancet Oncol* **17**(5): 651-662.
- OPPERMAN, KS, VANDYKE K, CLARK KC, COULTER EA, HEWETT DR, MROZIK KM, SCHWARZ N, EVDOKIOU A, CROUCHER PJ, PSALTIS PJ, NOLL JE, ZANNETTINO AC (2019). Clodronate-Liposome Mediated Macrophage Depletion Abrogates Multiple Myeloma Tumor Establishment In Vivo. *Neoplasia* **21**(8): 777-787.
- PANCHABHAI S, KELEMEN K, AHMANN G, SEBASTIAN S, MANTEI J, FONSECA R (2016). Tumor-associated macrophages and extracellular matrix metalloproteinase inducer in prognosis of multiple myeloma. *Leukemia* **30**(4): 951-954.
- PAN Y, YU Y, WANG X, ZHANG T (2020). Tumor-Associated Macrophages in Tumor Immunity. *Front Immunol* **11**: 583084.
- PATRONO C, GARCÍA RODRÍGUEZ LA, LANDOLFI R, BAIGENT C (2005). Low-dose aspirin for the prevention of atherothrombosis. *New England Journal of Medicine* **353**(22): 2373-2383.
- PATRONO C VE BAIGENT C (2019). Role of aspirin in primary prevention of cardiovascular disease. *Nature Reviews Cardiology* **16**(11): 675-686
- PINTO V, BERGANTIM R, CAIRES HR, SECA H, GUIMARÃES JE, VASCONCELOS MH (2020). Multiple Myeloma: Available Therapies and Causes of Drug Resistance. *Cancers (Basel)*. **12**(2):407.
- RABINOVITCH M (1995). Professional and non-professional phagocytes: an introduction. *Trends Cell Biol* **5**(3): 85-87.
- RAJKUMAR SV (2019). Multiple myeloma: Every year a new standard? *Hematol Oncol* **37**: 62-65.
- RIBATTI D, MANGIALARDI G, VACCA A. (2006). Stephen Paget and the 'seed and soil' theory of metastatic dissemination. *Clin Exp Med* **6**(4): 145-149.

- ROSZER T (2015). Understanding the mysterious M2 macrophage through activation markers and effector mechanisms. *Mediators Inflamm.* **2015**:816460.
- RUSS A, HUA AB, MONTFORT WR, RAHMAN B, RIAZ IB, KHALID MU, CAREW JS, NAWROCKI ST, PERSKY D, ANWER F (2018). Blocking "don't eat me" signal of CD47-SIRP α In hematological malignancies, an In-depth review *Blood Rev* **32**(6):480-489.
- SUN J, PARK C, GUENTHNER N, GURLEY S, ZHANG L, LUBBEN B, ADEBAYO O, BASH H, CHEN Y, MAKSIMOS M, MUZ B, AZAB AK (2022). Tumor-associated macrophages In multiple myeloma: advances In biology and therapy. *J Immunother Cancer* **10**(4).
- SUN K, YU J, HU J, CHEN J, SONG J, CHEN Z, CAI Z, LU Z, ZHANG L, WANG Z (2022). Salicylic acid-based hypoxia-responsive chemodynamic nanomedicines boost antitumor Immunotherapy by modulating Immunosuppressive tumor microenvironment. *Acta Biomater* **148**: 230-243.
- SUYANI E, SUCAK GT, AKYUREK N, SAHIN S, BAYSAL NA, YAGCI M, HAZNEDAR R (2013). Tumor-associated macrophages as a prognostic parameter In multiple myeloma. *Ann Hematol* **92**(5): 669-677.
- TEIXIDO J, MARTINEZ-MORENO M, DIAZ-MARTINEZ M, SEVILLA-MOVILLA S (2018). The good and bad faces of the CXCR4 chemokine receptor. *Int J Biochem Cell Biol* **95**: 121-131.
- TIAN Y, YE Y, GAO W, CHEN H, SONG T, WANG D, MAO X, REN C (2011). Aspirin promotes apoptosis In a murine model of colorectal cancer by mechanisms involving downregulation of IL-6-STAT3 signaling pathway. *Int J Colorectal Dis* **26**(1):13-22.
- TU MM, ABDEL-HAFIZ HA, JONES RT, JEAN A, HOFF KJ, DUEX JE, CHAUCA-DIAZ A, COSTELLO JC, DANCIK GM, TAMBURINI BAJ, CZERNIAK B, KAYE J, THEODORESCU D (2020). Inhibition of the CCL2 receptor, CCR2, enhances tumor response to Immune checkpoint therapy. *Commun Biol* **3**(1): 720.
- VANE JR ve BOTTING RM (1997). Mechanism of action of aspirin-like drugs. Seminars In arthritis and rheumatism, *Elsevier*.
- WANG H, WANG L, CHI PD, WANG WD, CHEN XQ, GENG QR, XIA ZJ, LU Y (2016). High level of Interleukin-10 in serum predicts poor prognosis in multiple myeloma. *Br J Cancer.* **114**(4):463-8.
- WANG H, HU WM, XIA ZJ, LIANG Y, LU Y, LIN SX, TANG H (2019). High numbers of CD163+ tumor-associated macrophages correlate with poor prognosis in multiple myeloma patients receiving bortezomib-based regimens. *J Cancer.* **10**(14):3239-3245.
- WANG Q, LU Y, LI R, JIANG Y, ZHENG Y, QIAN J, BI E, ZHENG C, HOU J, WANG S, YI Q (2018). Therapeutic effects of CSF1R-blocking antibodies in multiple myeloma. *Leukemia* **32**(1): 176-183.
- WEI R, LIU S, ZHANG S, MIN L, ZHU S (2020). Cellular and Extracellular Components in Tumor Microenvironment and Their Application in Early Diagnosis of Cancers. *Anal Cell Pathol (Amst)* **2020**: 6283796.
- WYNN TA, CHAWLA A, POLLARD JW (2013). Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature* **496**(7446): 445-455.
- YI Q, DABADGHAO S, OSTERBORG A, BERGENBRANT S, HOLM G (1997). Myeloma bone marrow plasma cells: evidence for their capacity as antigen-presenting cells. *Blood.* **90**(5):1960-7.

- YIN Z, MA T, LIN Y, LU X, ZHANG C, CHEN S, JIAN Z (2018). IL-6/STAT3 pathway intermediates M1/M2 macrophage polarization during the development of hepatocellular carcinoma. *J Cell Biochem.* **119**(11):9419-9432.
- YUNNA C, MENGROU H, LEI W, WEIDONG C (2020). Macrophage M1/M2 polarization. *Eur J Pharmacol* **877**: 173090.
- ZHANG J, GAO J, CUI J, WANG Y, JIN Y, ZHANG D, LIN D, LIN J (2022) Tumor-associated macrophages in tumor progression and the role of traditional Chinese medicine in regulating TAMs to enhance antitumor effects. *Frontiers in Immunology* **13**.
- ZAVIDIJ O, HARADHVALA NJ, MOUHIEDDINE TH, SKLAVENITIS-PISTOFIDIS R, CAI S, REIDY M, RAHMAT M, FLAIFEL A, FERLAND B, SU NK, AGIUS MP, PARK J, MANIER S, BUSTOROS M, HUYNH D, CAPELLETTI M, BERRIOS B, LIU CJ, HE MX, BRAGGIO E, FONSECA R, MARUVKA YE, GUERRIERO JL, GOLDMAN, M, VAN ALLEN EM, MCCARROLL SA, AZZI J, GETZ G, GHOBRIAL IM (2020). Single-cell RNA sequencing reveals compromised immune microenvironment in precursor stages of multiple myeloma. *Nat Cancer* **1**(5): 493-506.
- ZHANG H, LI R, CAO Y, GU Y, LIN C, LIU X, LV K, HE X, FANG H, JIN K, FEI Y, CHEN Y, WANG J, LIU H, LI H, ZHANG H, HE H, ZHANG W (2022). Poor Clinical Outcomes and Immuno-evasive Contexture in Intratumoral IL-10-Producing Macrophages Enriched Gastric Cancer Patients. *Ann Surg.* **275**(4):e626-e635.