



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü



KANSER KÖK HÜCRELERİN MAKROFAJLAR İLE ETKİLEŞİMİNİN ARAŞTIRILMASI

Yüksek Lisans Tezi

Asena Berşan ARICIOĞLU

Kök Hücre Anabilim Dalı

İzmir
2023

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

KANSER KÖK HÜCRELERİN MAKROFAJLAR İLE ETKİLEŞİMİNİN ARAŞTIRILMASI

Asena Berşan ARICIOĞLU

Danışman
Doç. Dr. Aylin ŞENDEMİR

Kök Hücre Anabilim Dalı
Kök Hücre Tezli Yüksek Lisans

İzmir
2023

Tez Değerlendirme Kurulu Üyeleri

(Adı Soyadı)

(İmza)

Başkan : Prof.Dr.

(Danışman)

Üye : Prof.Dr.

Üye : Prof.Dr.

Üye : Prof.Dr.

Üye : Prof.Dr.

Yüksek Lisans Tezinin kabul edildiği tarih:

ÖNSÖZ

Günümüzdeki kanser çalışmalarında kullanılan tedavi yöntemlerindeki direncin birincil nedeni olan, tümörü başlatan hücreler olarak da tanımlanmış kanser kök hücrelerini hedeflerken, tümör mikroçevresinde bulunan tümörle ilişkili makrofajlarla birlikte tedavi yöntemlerinin düşünülmesi gerekmektedir.

Yapmış olduğum yüksek lisans tez çalışmasında edindiğim tecrübelerime dayanarak, makrofajların tümör metastazında önemli bir faktör olduğu ve onlara yönelik tedavilerde başarılı olabileceğini düşünmekteyim. Bundan sonraki çalışmalar için literatüre bir katkı sağlamış olacak olmam beni mutlu hissettirmiştir.

İzmir, 20.02.2023

ASENA BERŞAN ARICIOĞLU

Özet

KANSER KÖK HÜCRELERİN MAKROFAJLAR İLE ETKİLEŞİMİNİN ARAŞTIRILMASI

Kanserin ilerlemesi, nüksü, metastazı ve tedavilere karşı direnç sağlamanın ana sorumlusu olan ve kanserin alt popülasyonu olarak tanımlanan kanser kök hücrelerin metastazında tümör mikroçevresinde (TME) bulunan tümörle ilişkili makrofajların (TAM) ilişkili olduğu bilinmektedir. Buna bağlı olarak yapılan tez çalışmasında, osteosarkom kök hücreleri (OKH) ile THP-1 monosit hücrelerinden indüklenen M0, M1 ve M2 makrofajlar kokültür yapılarak metastaz ilişkisi incelenmiştir. Çalışmada, kokültür gruplarının canlılık analizleri Alamar mavisi testi, CD133, Sox2, Nanog ve Vimentin ekspresyon seviyeleri immünofloresan boyama ile görüntülenmiş; hücre göçü analizi için migrasyon testi kullanılmıştır. Yapılan çalışma sonucuna göre, M2 makrofajların kanser kök hücrelerinin metastazında önemli rol oynadığı gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler; kanser kök hücreleri; osteosarkom kök hücresi; tümör mikro çevresi; tümörle ilişkili makrofajlar; metastaz

Abstract

INVESTIGATION OF THE INTERACTIONS OF CANCER STEM CELLS WITH MACROPHAGES

Tumor-associated macrophages (TAM) in the tumor microenvironment (TME) are known to be related to metastasis in cancer stem cells, which are defined as a subpopulation of cancer cells, and are the main group of cells that are responsible for cancer progression, relapse, metastasis, and resistance to treatments. In this thesis study, their relationship in metastasis was investigated by coculture of THP-1 monocyte derived M0, M1, and M2 macrophages and osteosarcoma stem cells (OSCs). In the study, viability of coculture groups were shown by the Alamar blue test, CD133, Sox2, Nanog, and Vimentin expression levels were demonstrated by immunofluorescence staining, and migration test was used for cell migration analysis. According to the results of the study, it has been shown that M2 macrophages play an important role in the metastasis of cancer stem cells.

Keywords; cancer stem cells; osteosarcoma stem cells; tumor microenvironment; tumor-associated macrophages; metastasis

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	II
ÖZET.....	III
ABSTRACT	IV
İÇİNDEKİLER	V
TABLolar DİZİNİ	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ	VIII
KISALTMA LİSTESİ	X
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Kanser Kök Hücreler (KKH).....	3
2.2. Tümör Mikroçevresi (TME).....	5
2.3. Tümörle İlişkili Makrofajlar (TAM).....	7
2.4. Metastaz.....	8
3. GEREÇ VE YÖNTEM	10
3.1. GEREÇLER.	12
3.1.1. Kullanılan Cihazlar.....	12
3.1.2. Sarf Malzemeler	12
3.1.3. Kimyasal Malzemeler	13
3.2. YÖNTEM.....	14
3.2.1. OKH Hücre Hattının Kültürü	14
3.2.1.1. OKH Hücre Hattının Pasajlanması.....	14
3.2.1.2. OKH Hücre Hattının Dondurulması.....	14
3.2.2. THP-1 Hücre Hattının Kültürü.....	15
3.2.2.1. Monositlerin Makrofajlara İndüklenmesi.....	15
3.2.2.2. Makrofajların Farklılaştırılması.....	16
3.2.3. OKH ve Makrofajların Kokültürü.....	16
3.2.4. Hücre Canlılık Analizleri.....	17
3.2.5. İmmünofloresan Boyama.....	18
3.2.6. Migrasyon Testi.....	19
3.2.7. İstatiksel Analiz.....	21
4. BULGULAR.....	22
4.1. OKH ve THP-1 Hücre Hatlarının Morfolojileri	22

4.2. THP-1 Monositlerinin Makrofajlara İndüklenmesi.....	24
4.3. Hücre Canlılık Analizleri.....	25
4.4. İmmünofloresan Boyama Analizleri.....	27
4.4.1. OKH Hücrelerinin İmmünofloresan Boyama Analizleri.....	27
4.4.2. Kokültür İmmünofloresan Boyama Analizleri.....	29
4.5. Migrasyon Testi Analizleri.....	33
5. TARTIŞMA.....	35
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	48
KAYNAKLAR.....	50
TEŞEKKÜR.....	63
ÖZGEÇMİŞ.....	64



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo

Sayfa

Tablo 1. Osteosarkom kök hücrelerinde eksprese edilen ana belirteçler (Schiavone ve ark., 2019).....6

Tablo 2. THP-1 monositlerinin makrofajlara farklılaşmasında kullanılan sitokinler.....16



ŞEKİLLER DİZİNİ

Sekil

Sayfa

Şekil 1. Skokastik/Klonal Evrim modelinin şematik gösterimi.....	4
Şekil 2. Hiyerarşik Kanser Kök Hücre modelinin şematik gösterimi.....	4
Şekil 3. Tez çalışma planının şematik gösterimi	11
Şekil 4. OKH'lerin kokültür için 24'lü plakalara ekilmesi	17
Şekil 5. Migrasyon testi için yapılan hazırlık aşaması.....	20
Şekil 6. OKH hücre morfolojilerinin ışık mikroskobunda görüntülenmesi (ölçek çizgisi:20µm)	22
Şekil 7. THP-1 monosit hücre morfolojilerinin ışık mikroskobunda görüntülenmesi (ölçek çizgisi:200µm).....	23
Şekil 8. THP-1 monosit hücrelerinin M0 makrofajlarına indüklenmesi.....	24
Şekil 9. OKH ve makrofaj kokültürünün 24. saatteki Alamar Mavisi testi analiz sonuçlarının grafikleri. (**** p <0.0001, ** p <0.01, * p <0.05).....	25
Şekil 10. OKH ve makrofaj kokültürünün 72. saatteki Alamar Mavisi testi analiz sonuçlarının grafikleri. (** p <0.01, * p <0.05).....	26
Şekil 11. OKH hücrelerinin CD133 ⁺ , Nanog ve Sox2 ifadelerinin immünofloresan boyama görüntüleri (ölçek çizgisi: 100 µm).....	27
Şekil 12. OKH+M0, OKH+M1 ve OKH+M2 kokültür gruplarında OKH'lerin Nanog ifadesinin immünofloresan boyama görüntüleri (ölçek çizgisi 100 µm).....	29
Şekil 13. OKH+M0, OKH+M1 ve OKH+M2 kokültür gruplarında OKH'lerin Sox2 ifadesinin immünofloresan boyama görüntüleri (ölçek çizgisi: 100µm).....	30
Şekil 14. OKH+M0, OKH+M1 ve OKH+M2 kokültür gruplarında OKH'lerin vimentin ifadesinin immünofloresan boyama görüntüleri (ölçek çizgisi:100 µm)....	31
Şekil 15. Kokültürün 3. günü sonrasında yapılan migrasyon testi görüntüleri. OKH+M0, OKH+M1 ve OKH+M2 kokültür gruplarında OKH'lerin 0, 3, 12 ve 24. Saatteki migasyon görüntüleri (ölçek çizgisi: 200µm).....	33

Şekil 16. Kokültürün 3. günü sonrasında yapılan migrasyon testinde OKH+M0, OKH+M1 ve OKH+M2 gruplarında OKH'lerin 0, 3, 12 ve 24. saatteki migrasyon oran grafiği (**** p <0.0001, ** p <0.01, * p <0.05).....	34
Şekil 17. Kök hücrelerin migrasyon yeteneği, bilinmeyen birincil bölge kanserinin varlığını açıklayabilir.....	35
Şekil 18. Tümör mikroçevresinin şematik olarak gösterimi.....	37
Şekil 19. Makrofaj farklılaşması ve polarizasyonu şematik gösterimi.....	38
Şekil 20. Makrofaj polarizasyonundaki sinyal yolları.....	46



KISALTMALAR LİSTESİ

AML	: Akut Miyeloid Lösemi
CAF	: Kanserle ilişkili fibroblast
CD133	: Cluster of differantiation 133
DC	: Dentritik hücreler
DMSO	: Dimetilsülfoksit
ECM	: Hücre dışı matris
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
EMT	: Epitelyal Mezenkimal Geçiş
EtOH	: Etanol
EV	: Hücre dışı vezikül
FBS	: Fetal Sığır Serum
IL-4	: Interlökin-4
IFN-γ	: Interferon-gama
KH	: Kök Hücre
KKH	: Kanser Kök Hücresi
LPS	: Lipopolisakkarit
MDSC	: Miyeloid türevli baskılayıcı hücreler
MET	: Mezenkimal Epitelyal Geçiş
Nanog	: Nanog homebox
NK	Doğal öldürücü hücreler
OKH	İnsan Osteosarkom Kök Hücreleri
PBS	: Fosfat tamponlu salin

Pen/Strep	: Penisilin/Streptomisin
PMA	: 12-O-Tetradecanoylphorbol 13-acetate, 4 β ,9 α ,12 β ,13 α ,20- Pentahydroxytiglic-1,6-dien-3-one 12- tetradecanoate 13-acetate
RPMI 1640	: Roswell Park Memorial Institute 1640
ROS	: Reaktif oksijen türleri
RN	: Reaktif azot türleri
Sox2	: SRY(sex determining region-Y)-box2
TAM	: Tümörle ilişkili Makrofajlar
TME	: Tümör Mikroçevresi
TIC	: Tümör başlatan hücreler
TNF-α	: Tümör nekroz faktör-alfa

1. GİRİŞ

Kanser kök hücreleri (KKH), tümörün başlaması ve ilerlemesinin temel itici güçleri olduğu öne sürülen, kök benzeri özelliklere sahip, tümörler içindeki bir hücre alt kümesidir. KKH'ler, sınırsız kendini yenileme ve *in vivo* olarak tümör oluşumunu başlatma yetenekleri ile işlevsel olarak tanımlanmaktadır (Aramini ve ark., 2021; Peiris-Pagès ve ark., 2016).

Normal kök hücreler gibi, KKH'ler, KKH fonksiyonlarını korumak ve teşvik etmek için benzersiz bir mikro ortam sağlayan tümörle ilişkili makrofajlar (TAM) dahil olmak üzere çok sayıda hücre tipinden oluşan hücresel bir niş içinde bulunur (Sainz ve ark., 2016).

Bağışıklık sistemi kanserin ilerlemesinde önemli bir faktördür. Solid tümörlerde tümör tipine bağlı olarak TAM'ların sayısı ile kötü prognoz arasında bir ilişki bulunduğu bilinmektedir. TAM'lar M2 makrofajlara benzemektedir ve immünosupresiftir; matrisin yeniden şekillenmesine katkıda bulunur ve dolayısıyla metastazı desteklemektedir (Sousa ve ark., 2015).

Günümüzdeki kanser tedavilerindeki direncin ana nedeni olarak kabul edilen, kanser başlatan hücreler olarak da tanımlanan kanser kök hücrelerin tümör mikro çevresinde bulunan tümörle ilişkili makrofajların tümör ilerlemesi, nüksü, ve metastazda önemli rolü olduğu bilinmektedir (Boutillier ve ark., 2021).

Kanser hücre hatları ile makrofajların kokültürünün yapıldığı çalışmalar literatürde bulunmaktadır (Chen ve ark., 2017; Qi L ve ark., 2016; Chen ve ark., 2022; Lv ve ark., 2021). Ancak farklı kanser kök hücreleri ile M0, M1 ve M2 makrofajların kokültürü ve metastazın araştırılması hakkında yeterli çalışma bulunmamaktadır.

Bu tez çalışmasında, makrofajlar ile kokültür sonrası metastaz ilişkisi incelenmemiş olan osteosarkom kök hücreler (OKH) kullanılmıştır.

Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü, Biyomalzemeler ve 3 Boyutlu Biyoarafazlar Laboratuvarı'nda yapılan tez çalışmasında, daha önceden satın alınmış ve laboratuvar stoğunda bulunan OKH'ler (Celprogen, CA, ABD) kullanılarak, THP-1 monosit hücre hattından (ATCC, ABD) türetilen M0, M1 ve M2 makrofajların kokültürü yapılarak makrofajların OKH'lerdeki metastatik rolü *in vitro* deneyler ile incelenmiştir.

Bu tez çalışmasında kanser kök hücresinin yolculuğunu incelerken yeni tedavi yöntemlerinin nasıl geliştirilebileceği hakkında literatüre katkı sağlanması beklenmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Kanser Kök Hücreler

Kanser Kök Hücreleri (KKH), sınırsız kendini yenileme kapasiteleri ve tümör oluşumunu indüklemeye yetenekleri nedeniyle tümörün başlaması ve ilerlemesinde temel etken olduğu bilinen, kök hücre benzeri özelliklere sahip, tümörler içerisindeki benzersiz bir hücre alt kümesidir (Aramini ve ark., 2021).

KKH'ler ilk olarak 1994 yılında, Lapidot ve ark. tarafından yapılan çalışmada, Akut Miyeloid Lösemi (AML) hücrelerinin yalnızca küçük bir yüzdesinin şiddetli kombine immün yetersiz farelerde (SCID) lösemiye başlatabileceği gösterilmiştir (Lapidot ve ark., 1994). Floresanla aktive edilmiş hücre ayırıcı (FACS) kullanılarak lösemik kök hücreler, normal hematopoietik kök hücrelere benzer hücre yüzey belirteçleri (CD34⁺, CD38⁻) olan AML hastalarında toplam lösemik hücrelerin % 0,2'sinden daha az bir alt popülasyonu olarak izole edilmiştir. Yalnızca CD34⁺ ve CD38⁻ lösemik kök hücre popülasyonu SCID farelerde AML oluşturabilmiştir (Bonnet & Dick, 1997; Siclari & Qin, 2010).

Solid tümörlerde KKH'lerin tanımlanması ilk olarak göğüs kanserinde Al Hajj ve ark. tarafından CD24 ve CD44 yüzey belirteçleri kullanılarak yapılmıştır (Al-Hajj ve ark., 2003). O zamandan beri, glioblastoma, akciğer kanseri, osteosarkom, kondrosarkom, melanom, prostat kanseri gibi çeşitli katı tümörlerde tanımlanmıştır (Tirino ve ark., 2012).

Kanser, morfolojik ve işlevsel olarak farklı olan malign hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalmasıyla karakterize edilir. Tümörün hücresel çeşitliliğini açıklamak için iki model önerilmiştir; stokastik ya da klonal evrim ve hiyerarşik kanser kök hücre modeli. Stokastik evrim modeline göre (Şekil 1), her kanser hücresi benzer bir tümör oluşturma kapasitesine sahiptir (Peiris-Pagès ve ark., 2016). Hiyerarşik KKH modeline göre (Şekil 2) ise KKH'ler normal bir dokuya benzeyen ve büyük bir proliferatif popülasyonun oluşumundan sorumlu kök özelliklerine sahip, aynı zamanda tümör başlatan hücreler (TIC) olarak adlandırılan, kendi kendini yenileyen alt

Osteosarkom Kök Hücreleri (OKH)

Osteosarkom, çocuk ve ergenlerde en sık görülen ve bu yaş grubunda yüksek ölüm oranına sebep olan, kemoterapi ve cerrahiye rağmen metastatik olma eğilimini devam ettiren kemik tümörlerinden biridir (Izadpanah ve ark., 2019).

Osteosarkom kök hücrelerinin (OKH) varlığı ilk olarak Gibbs ve ark. tarafından insan osteosarkom doku ve hücre hatlarını serumsuz koşulda büyütülerek sarkosferler ya da osteosferleri oluşturarak bir alt popülasyonu tanımlanmıştır (Gibbs ve ark., 2005; Yan, Lv & Guo, 2016). Daha sonra, MNNG/HOS osteosarkom hücrelerinin radyasyon ve kemoterapötik ajanlara dirençli kök hücre benzeri popülasyon içerdiği gösterilmiştir (Martins-Neves ve ark., 2012). CD133⁺, STRO1⁺, CD117⁺ ve CD271⁺ OKH'ler için yaygın olarak kullanılan yüzey belirteçleridir (Abarrategi ve ark., 2016). Buna ek olarak, köklük belirteçleri olan Sox2, Nanog ve Oct4'ü eksprese eden hücreler *in vitro* sferoidler oluşturarak ve preklinik fare modellerinde tümör başlatan hücre özelliklerini göstermişlerdir (Jubelin ve ark., 2022).

OKH'ler radyasyon ve kemoterapi gibi geleneksel tedavilerin çoğuna dirençlidir; bu nedenle tümör relapslarından ve metastazından sorumludur. Böylece, spesifik sinyalleşmeye ve/veya tümör nişlerine yönelik önerilen tedavilere ek olarak, Osteosarkom'da KKH alt popülasyonlarını hedefleyebilen tedavilerin geliştirilmesine yönelik çalışmalar gerekmektedir (Abarrategi ve ark., 2016).

2.2. Tümör Mikroçevresi (TME)

Tümör mikroçevresi (TME), bir tümörün geliştiği kompleks ve çok hücreli ortam olarak tanımlanmaktadır (Bejarano ve ark., 2021). Kanser hücrelerinin hızlı proliferasyonu, TME'de kanser hücrelerinin yeniden programlanmasıyla birlikte hipoksiyi indüklemektedir. Tümör ve onları çevreleyen TME hücreleri sürekli yeni koşullara uyum sağlayarak tümör büyümesini desteklemektedir. TME, kanser hücrelerinin kendilerini çevreleyen endotelial, bağışıklık hücreleri ve fibroblastlar ile etkileşim içinde yaşamaları için bir niş oluşturmaktadır (Deepak ve ark., 2020).

Tablo 1. Osteosarkom kök hücrelerinde eksprese edilen ana belirteçler (Schiavone ve ark., 2019).

Belirteçler	Referanslar
Oct4 (octamer-binding transcription factor 4), Nanog (Nanog Homeobox), transkripsiyon faktörleri, köklük belirteçleri	Murase ve ark. (2009) ve Yang ve ark (2011)
Sox2 (SRY-related HMG-box-2) transkripsiyon faktörü, köklük belirteci	Basu-Roy ve ark. (2012, 2015)
ALDH1 (aldehyde desydrigenease-1)	Honoki ve ark. (2010), Greco ve ark. (2014) ve Wang ve ark. (2011)
CD24 (hücre adhezyon molekülü)	Guth ve ark. (2014)
CD44 (hiyalüronik asit reseptörü)	He ve ark. (2015)
CD117 (kök hücre büyüme faktör reseptörü)	Adhikari ve ark. (2010)
Stro-1 (mezenkimal kök hücre belirteci)	Adhikari ve ark. (2010)
CD133 (prominin-1)	Tirino ve ark. (2008, 2011), He ve ark (2012), Li ve ark (2013), Fujiwara ve ark (2014) ve Glumac ve LeBeau (2018)
CD271 (düşük-afiniteli sinir büyüme faktör reseptörü)	Tian ve ark. (2014) ve Zhang ve ark. (2016)
CBX3 (Chromobox protein homolog 3)	Fujiwara ve ark. (2014) ve Saini ve ark. (2012)
ABCA5 (ATP-bağlayıcı kaset, alt aile A, üye 5)	Saini ve ark. (2012)
KLF4 (Kruppel like factor 4)	Qi ve ark. (2018), Li ve ark. (2017) and Martins-Neves ve ark. (2016a)
SATB2 (özel AT bakımından zengin sekans bağlayıcı protein 2)	Xu ve ark. (2017)
RAB39A (Rab small GTPase)-RXRB (retinoid X receptor Beta)	Chano ve ark. (2018)
TB1XR1 (transducin (beta)-like 1 $\times$ -linked receptor 1)	Xi ve ark. (2019)
SENp1 (Sentrin spesifik proteaz-1)	Liu ve ark. (2018)
hTERT (insan telomeraz ters transkriptaz)	Yu ve ark. (2013)

TME'ler, T ve B lenfositleri, TAM'lar, dentritik hücreler (DC), doğal öldürücü (NK) hücreler, nötrofiller ve miyeloid türevli baskılayıcı hücreler (MDSC), kanserle ilişkili fibroblastlar (CAF), perisit ve mezenkimal stromal hücreler, hücre dışı matris (ECM) ve diğer salgılanan moleküller, büyüme faktörleri, sitokinler, kemokinler, hücre dışı

veziküller (EV), birbirleriyle ve heterojen kanser hücrelerinin kendileriyle iletişim halinde topluca iç içe geçmiş kan ve lenfatik damar ağları içermektedir (Bejarano ve ark., 2021).

2.3. Tümörle İlişkili Makrofajlar (TAM)

TME içinde en sık görülen immün hücrelerden biri olan tümörle ilişkili makrofajlar (TAM), tümör stromasının ana enflamatuvar bileşenleridir (Mortezaee, ve ark., 2022).

Makrofajlar polarize olmayan M0 makrofaj, klasik olarak aktive edilmiş M1 makrofajlar ve alternatif olarak aktive edilmiş M2 makrofajlar olarak sınıflandırılarak kategorilere ayrılmaktadır. Farklı sitokinler tarafından uyarılarak M2a, M2b, M2c ve M2d alt kategorilerine de polarize edilebilmektedirler (Ge ve ark., 2020).

Makrofajlar, olgunlaşmamış monositler olarak kemik iliğinden salınarak, kan dolaşımında dolaştıktan sonra, karaciğerdeki Kupffer hücreleri, akciğerdeki alveoler makrofajlar ve kemikteki osteoklastlar dahil olmak üzere daimi makrofajlara farklılaşmak için dokulara göç ederler (Bingle ve ark., 2002).

İnsanlarda makrofaj polarizasyonu, M1 makrofajlarından M2 makrofajlarına kadar bir süreklilik gösterir (Wu ve ark., 2017). M1 makrofajları, interferon γ (IFN- γ) veya lipopolisakarit (LPS) uyaranlarından türetilirler ve enflamatuvar sitokinler IL-6, IL-12, reaktif oksijen türleri (ROS), reaktif azot türleri (RN) ve TNF- α salgırlar. İnsan M1 makrofajlarının yüzey belirteçleri CD14 ve CD16, CD64, CD86 ve HLA-DR α 'dır (Sousa ve ark., 2015).

Katı tümörlerde, TAM'ların ana kaynağı, tümörlerin içinde çoğalan yerleşik makrofajların yerine dolaşımdaki monositlerdir. Kemik iliğindeki monositler, miyeloid progenitörlerden türer, kan dolaşımı yoluyla tümörlere girebilir ve ardından makrofajlara farklılaşabilir. M1/M2 paradigması tümörün ilerlemesinde önemli rol oynamaktadır (Boutillier ve ark., 2021).

Anjiyogenez, matrisin yeniden şekillenmesi ve tümör ilerlemesini destekleyen salgı faktörleri üreten makrofajların M2 benzeri polarizasyonu, Th2 sitokinleri; IL-13 ve IL-4 tarafından indüklenmektedir (Yao ve ark., 2018).

Kanser’de M1 makrofajlar, uzun süreli hasta sağkalımıyla ilişkili tümör baskılayıcılar olarak bilinirken, M2 makrofajlar, tümör adacıklarındaki yüksek yoğunluğun kötü bir prognozun göstergesi olduğu tümör promotörleri olarak görev almaktadır (Mortezaee, ve ark., 2022).

Kanser tedavisi sırasında kemoterapötik ajanlar, TAM'lar tarafından yönetilen yanlış yönlendirilmiş bir doku onarım yanıtını ortaya çıkarabilir. Bu da tümör büyümesinin desteklenmesine ve anti tümör etkisinin sınırlandırılmasına neden olabilir (Wu ve ark., 2017; Mantovani ve ark., 2013). *In vitro* ve *in vivo* kanıtlar, TAM'ların bazı kemoterapötik ajanlara (5-florourasil, doksorubisin, gemitabin, paklitaksel, platin bileşikleri) ve ayrıca anti-VEGF tedavisine karşı direnç aracılık ettiğini gösterilmiştir (Dijkgraaf ve ark., 2013; Wu ve ark., 2017; Shree T ve ark., 2011; Shojaei ve ark. 2007; Paulus ve ark., 2006; Mantovani ve ark., 2015; DeNardo ve ark., 2011).

2.4 Metastaz

Metastaz, "yer değiştirme" anlamına gelen Yunanca kökenli bir kelimedir. Bu terim, birincil tümörden vücudun farklı bölgelerine doğru hücre göçünü ve kanser nedenli ölümlerin ana nedeni olarak görülen yeni tümörlerin oluşumunu ifade etmektedir (Babaei ve ark., 2021).

Tümörlerin çoğu epitelyaldır, fakat mezenkimal özellikler sergileyebilmektedir. Tümör invazyonu sırasında, tümör hücreleri birincil tümör bölgesinden hareket eder ve normal embriyonik gelişim sırasında epiteldeki hücrelere benzer şekilde epitel özelliklerini ve hücreden hücreye temasları kaybeder ve mezenkimal özellik kazanırlar (Thiery, 2002; Kraljevic Pavelic ve ark., 2011). Buna epitelyal mezenkimal geçiş (EMT) adı verilir.

EMT, kanser hücresi metastazında önemli bir role sahip moleküler mekanizmalardan biridir (Montanarive ark., 2017). EMT, polarize epitel hücrelerin hücreden hücreye veya hücreden hücre dışı matrise (ECM) tutunmasının bozulmasıyla oluşur. E-cadherin, epitel tutunma bağlantısının ana bileşenidir ve EMT'nin ana bekçisi olarak görev yapmaktadır. EMT'yi başlatmak için anahtar adım olarak kabul edilen e-cadherin kaybı, hücreler arası mekanik iletişimin bozulmasına yol açmaktadır (Lo ve ark., 2017). Buna karşın, n-cadherin ve vimentin gibi mezenkimal belirteçlerin yanı sıra, e-cadherin transkripsiyonel baskılayıcılar (Snail/SNAI1 ve Slug/SNAI2, Twist 1 ve ZEB1 ve ZEB2) EMT sırasında yüksek oranda artar ve bu da gelişmiş hücre mobilitesinin mezenkimal fenotip kazanılmasına yol açmaktadır (Grant ve ark., 2013; Lo ve ark., 2017). Ayrıca, mezenkimal hücreler uzak organlara ulaştıktan sonra (Chaffer ve Weinberg'in evre 2), MET ile epitelyal fenotipe geri dönebilir ve böylece metastatik bölgelerde kanser hücresi proliferasyonu ve farklılaşma yeteneğini yeniden kazanabilmektedirler (Chaffer CL ve ark., 2007).

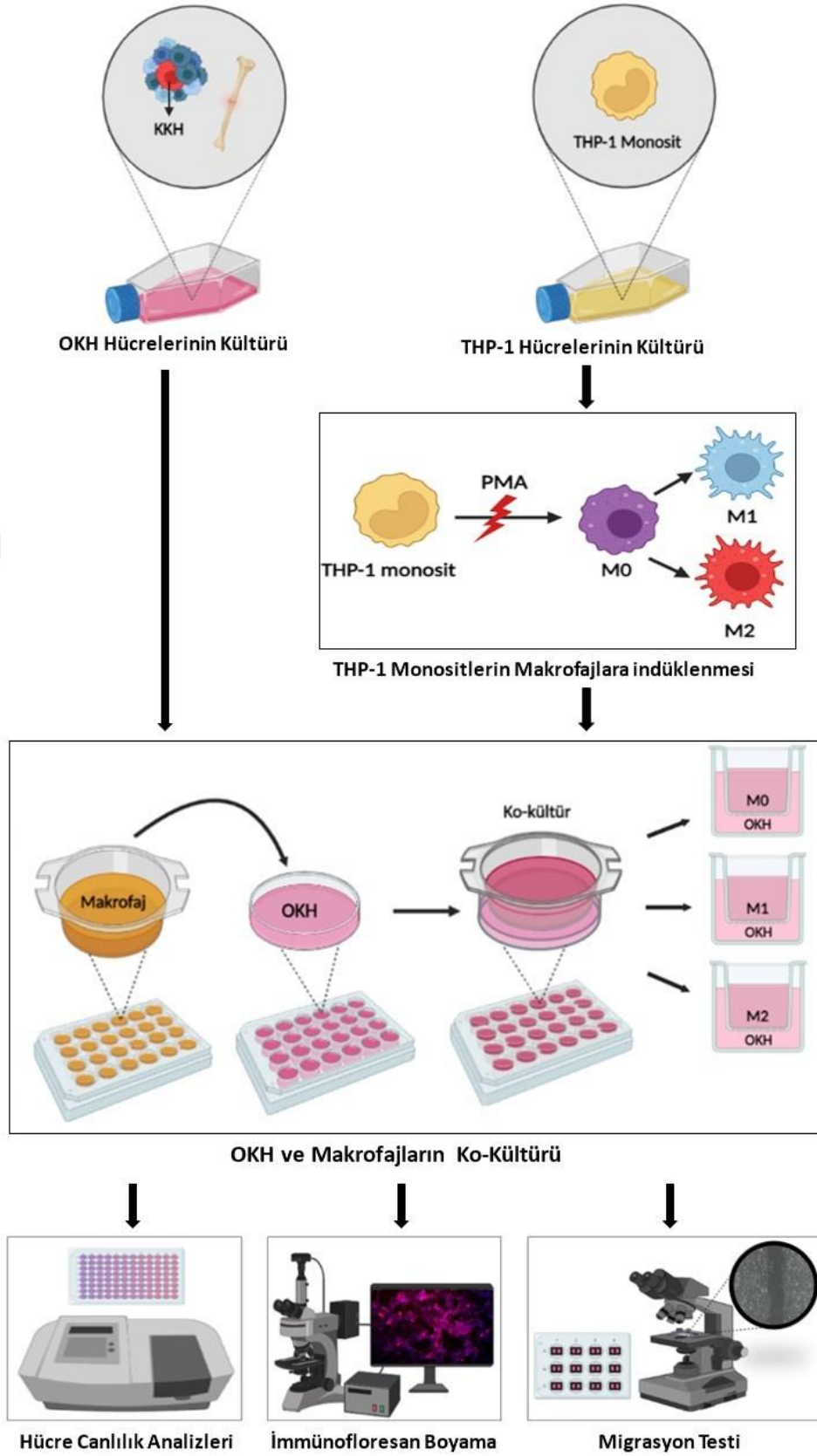
Olgun farklı kronik enflamatuvar hücre popülasyonları, yerel tümör mikro ortamını etkilemektedir. Bu enflamatuvar hücreler, tümör hücresi proliferasyonunu, matrisin yeniden şekillenmesini, anjiyogenezi, bastırılmış adaptif bağışıklığı ve EMT'yi teşvik ederek tümörün ilerlemesinde önemli bir rol oynamaktadır. Bunu interlökinler (IL), interferon (IFN) ve diğer tümör destekleyici faktörler gibi çeşitli sitokinler üreterek yaparlar. (Joyce J & Pollard J, 2009; Song ve ark., 2017).

Kanser hücrelerinin metastazının KKH'lerle başladığını gösteren önemli kanıtlar bulunmaktadır (Babaei ve ark., 2021). Birkaç çalışma, KKH'lerin tümör metastazında anjiyogenezi ve lenfanjiyogenezi destekleyebileceğini gösterilmiştir. Anjiyojenik ve lenfanjiyojenik faktörler, hipoksi koşullarında KKH'ler tarafından yüksek oranda eksprese edilir ve bu da KKH'lerin, tümör oluşumu ve ilerlemesi sırasında dolaylı olarak anjiyogenezi ve lenfanjiyogenezi destekleyebileceğini düşündürmektedir (Li ve ark., 2014; Lizárraga ve ark., 2020) Kendini yenileme yeteneği ve asimetric bölünme gösteren hücreler olarak bilinen ve tümör nüksü ile ilişkilendirilen KKH'leri hedeflemenin, kanser tedavisi için etkili bir tedavi stratejisi olabileceği gösterilmiştir (Babaei ve ark., 2021).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Tez çalışması Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü, Biyomalzemeler ve 3 Boyutlu Biyoarafazlar Laboratuvarları'nda, Doç. Dr. Aylin ŞENDEMİR danışmanlığında gerçekleştirilmiştir.

Bu tez çalışmasında satın alınmış insan osteosarkom kök hücreleri (OKH) ile THP-1 monosit hücrelerinden indüklenerek oluşturulan M0 makrofajları ve M0 makrofajlarından çeşitli sitokinler ile farklılaştırılarak oluşturulan M1 ve M2 makrofajlarının kokültür gerçekleştirilmiştir. Kokültürün 24. ve 72. saatteki hücre canlılık analizleri Alamar Mavisi testi ile, karakteristik belirteçleri ekspresyonları aynı pasaj sayısında kokültür tekrarlanarak 3. günlerinde immünofloresan boyama ile ve metastatic özellikleri migrasyon testi ile gösterilmiştir. Farklı polarizasyona sahip makrofajların, insan osteosarkom kök hücrelerine etkisi incelenmiştir.



Şekil 3. Tez çalışma planının şematik gösterimi (Biorender kullanılarak şematize edilmiştir.)

3.1 GEREÇLER

3.1.1 Kullanılan Cihazlar

1. Biyogüvenlik kabini (Class 2) (MSC II AC 120, Metisafe, Türkiye)
2. Inverted mikroskop (CK40-F200, Olympus, Japonya)
3. Floresan mikroskop (DFC 3000G, Leica, Almanya)
4. CO₂'li inkübatör (371, Thermo Scientific, ABD)
5. CO₂'siz inkübatör (Heraeus B12, Thermo Scientific, ABD)
6. Santrifüj cihazı (5810 R, Eppendorf, ABD)
7. Su banyosu (Lauda, LCB 0725, Almanya)
8. Pipet tabancası (YP4A010986, Isolab, Almanya)
9. Mikropipetler (Eppendorf, ABD)
10. UV Spektrofotometre (BioTek)
11. -80 °C (88400V, Thermo Scientific, ABD)
12. -20 °C (FZ 190, AEG)
13. +4 °C (KIKDN53AV, Bosch)
14. Hassas terazi (GD603, Sartorius, Almanya)
15. Isıtıcıli manyetik karıştırıcı (Big Squid, IKA, Almanya)
16. Vortex (2x3, Velp, İtalya)
17. Sıvı azot tankı (Locator Jr Plus, Thermo Scientific, ABD)

3.1.2 Sarf Malzemeleri

1. 6, 12, 24 ve 96 kuyulu kültür plakaları (703001, 712001, 702001, 748001, 701001, NEST, Çin)
2. Filtreli kültür kapları (25 cm², 75 cm², 175cm²) (Greiner, Cellstar, Almanya)
3. Steril serolojik pipet uçları (2, 5, 10, 25) (210513, 220104, 210305, 210907, NEST, Çin)
4. 15 ve 50 mL santrifüj tüpleri (601051, 602052, NEST, Çin)
5. 24 kuyulu plakaya uygun 0.4 µM transwell (353095, Falcon, ABD)

6. Hemositometre (Neubuer, Almanya)
7. 2'li insert kültür kalıpları (140113/3, Ibidi, Almanya)
8. Kriyotüpler (375353, Thermo Scientific, ABD)

3.1.3 Kimyasal Malzemeler

1. McCoy's 5A Medium (M8403, Sigma, ABD)
2. Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640) (Merck, ABD)
3. Lipopolisakkarit (PS) (Sigma, ABD)
4. İnterferon- gama (IFN- γ) Human (Sigma, ABD)
5. Interleukin-4 (IL-4) Human (Sigma, ABD)
6. PMA (12-O-Tetradecanoylphorbol 13-acetate, 4 β ,9 α ,12 β ,13 α ,20-Pentahydroxytiglia-1,6-dien-3-one 12-tetradecanoate 13-acetate) (Sigma, ABD)
7. Fetal sığır serumu (FBS) (Capricorne, Almanya)
8. Penisilin/Streptomisin (Pen/Strep) (Capricorne, Almanya)
9. Tripan mavisi solüsyonu (Sigma, ABD)
10. Dimetilsülfoksit (DMSO) (Sigma, ABD)
11. L-glutamin (Capricorne, Almanya)
12. Tripsin-etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) solüsyonu (2,5 g/L tripsin, 0,5 mM EDTA) (Capricorne, Almanya)
13. Triton X-100 (x100, Sigma, ABD)
14. Alamar Mavisi (2359067, Invitrogen, ABD)
15. Sığır Serum Albümini (BSA) (Yağ asidi içermeyen) (A-421-25, Gold Biotechnology, ABD)
16. Vimentin Antikoru (SC 8260, Santa Cruz, ABD)
17. N-cadherin Antikoru (SC 8424, Santa Cruz, ABD)
18. Nanog Antikoru (AB 106465, Abcam, İngiltere)
19. Sox2 Antikoru (AB 79351, Abcam, İngiltere)
20. APC Anti-Human CD133 Antikoru (372806, Biolegend, ABD)
21. Keçi Anti-Mouse Sekonder Antikor (Ab 150113, Abcam, İngiltere)
22. Eşek Anti-Rabbit Sekonder Antikor (Ab 150075, Abcam, İngiltere)

3.2 YÖNTEM

3.2.1. OKH Hücre Hattının Kültürü

İnsan osteosarkom kök hücre hattı (OKH) (Celprogen, CA, ABD), Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü, Biyomalzemeler ve 3 Boyutlu Biyoarafazlar Laboratuvarı stoğundan kullanılmıştır. OKH'ler, % 2,5 FBS, % 0,1 L-glutamin ve % 0,01 gentamisin içeren McCoy's 5A besi ortamı ile 37°C'de % 5 CO₂, % 95 nemli ortamda kültüre edilmiştir ve hücrelerin iki günde bir besi ortamı değiştirilmiştir. Bu çalışmada OKH hücre hattı P2-P6 pasaj aralığında kullanılmıştır.

3.2.1.1. OKH Hücre Hattının Pasajlanması

Hücrelerin bulunduğu flastaki oran % 80'e ulaştığında pasaj yapılmıştır. Eski besi ortamı çekilip atılmıştır ve hücrelerin yüzeyi Ca⁺², Mg⁺² içermeyen PBS ile yıkanmıştır. % 0,25 tripsin/EDTA solüsyonu eklenerek, 2-3 dakika inkübatörde bekletilmiştir. Hücrelerin flask yüzeyinden ayrıldığından emin olmak için mikroskopta inceleme yapılmıştır. Tripsinin 3 katı kadar besi ortamı eklenerek ve 4°C, 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılarak, besi ortamı eklenmiştir ve hücreler süspanse edilerek yeni bir flaska koyulmuştur.

3.2.1.2. OKH Hücre Hattının Dondurulması

Çalışmanın devamında hücrelerin aynı pasaj aralığında kullanılabilmesi için dondurularak stok hazırlanmıştır. Hücreler 4°C, 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılarak, %90 FBS ve %10 DMSO ile süspanse edilerek kriyotüplere koyulmuştur. 24 saat boyunca -86°C'de bekletildikten sonra uzun süreli saklanılabilmesi için sıvı azota (-196°C) aktarılmıştır.

3.2.2. THP-1 Hücre Hattının Kültürü

THP-1 hücre hattı (ATCC, ABD), Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Biyomalzemeler ve 3 Boyutlu Biyoaraçlar Laboratuvarı stoğundan kullanılmıştır.

Hücreler % 10 FBS, % 1 L- glutamin ve % 0,1 penisilin-streptomisin içeren RPMI besi ortamında 37°C'de % 5 CO₂, % 95 nemli ortamda kültüre edilmiştir. Besi ortamı iki günde bir değiştirilerek hücre konsantrasyonu istenilene ulaştığında pasaj yapılarak kültürün devamı sağlanmıştır. Hücreler çalışmanın devamlılığı için %90 FBS ve %10 DMSO ile dondurulmuştur. İlk 24 saat -86°C'de bekletildikten sonra uzun süreli saklanabilmesi için sıvı azota (-196°C) aktarılmıştır.

3.2.2.1. Monositlerin Makrofajlara İndüklenmesi

Monositlerin indüklenmesi, farklılaştırılması ve kokültürü için 0.4 µm gözenek çapında, 24 kuyulu hücre kültürü plakalarına uygun transwell (Falcon, ABD) kullanılmıştır.

THP-1 hücreleri santrifüj tüpüne koyularak 4°C , 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. 24 kuyulu plakalara transweller yerleştirilmiştir. Hücreler hemositometre ile sayılarak her transwellde 500 µL'de 2x10⁵ hücre/ mL olacak şekilde ekim yapılmıştır. 1 mL ortam için 2 µL PMA stok solüsyonu (100 µg/mL) eklenmiştir ve 16 saat boyunca % 5 CO₂, 37°C'de inkübe edilmiştir. 16. saat sonunda PMA'lı ortam çekilmiştir ve yeni besi ortamı eklenerek 24 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Bu şekilde THP-1 monosit hücreleri makrofajlara (M0) indüklenmiştir.

3.2.2.2. Makrofajların Farklılaştırılması

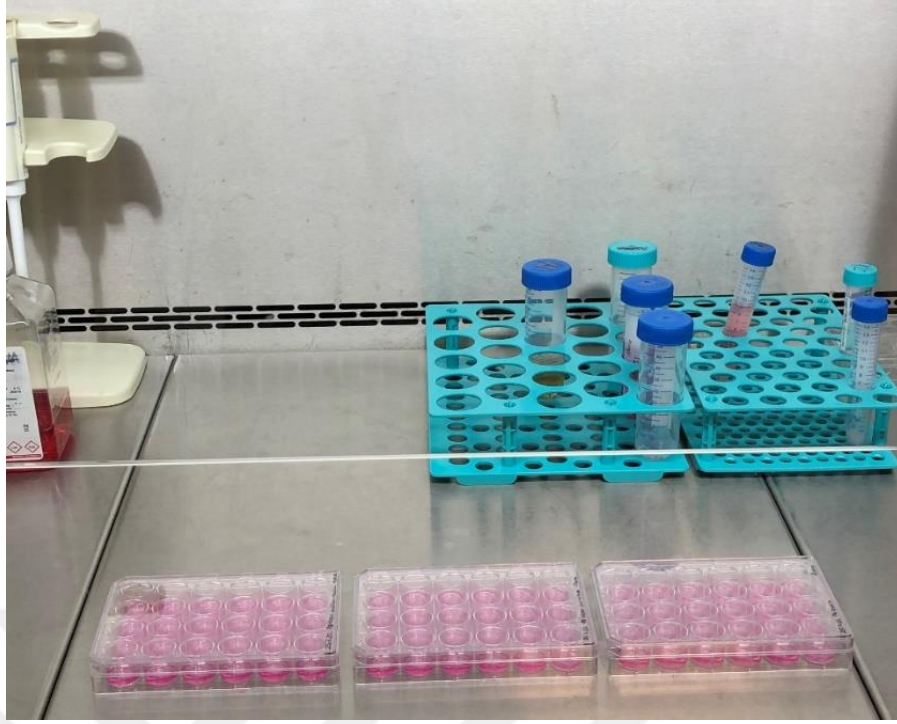
İnkübasyon sonrası elde edilen makrofajlar (M0), uygun sitokinler kullanılarak 3 günlük inkübasyon sonrasında M1 ve M2 makrofajlarına farklılaştırılmıştır.

Tablo 2. THP-1 monositlerinin makrofajlara farklılaşmasında kullanılan sitokinler.

M0 Makrofaj	RPMI besi ortamı
M1 Makrofaj	100 ng/mL IFN-γ ve 100 ng/mL LPS (Graney ve ark., 2020)
M2 Makrofaj	40 ng/mL IL-4 (Graney ve ark., 2020)

3.2.3. OKH ve Makrofajların Kokültürü

OKH'ler 24 kuyulu plakalarda her kuyuda 500 μ L'de 10^5 hücre/mL olacak şekilde ekilerek 24 saat inkübe edilmiştir. Transwell'de bulunan makrofajların eski ortamı çekilmiştir ve OKH'lerin bulunduğu 24 kuyulu plakaya aktarılmıştır. 500 μ L % 2,5 FBS içeren McCoy's 5A besi ortamı eklenerek kokültür başlatılmıştır.



Şekil 4. OKH'lerin kokültür için 24 kuyulu plakalara ekilmesi.

3.2.4. OKH'lerde Hücre Canlılık Analizleri

Alamar Mavisi testi kokültürün 1. ve 3. günlerinde uygulanmıştır.

İlk olarak transwellerin içindeki eski ortamı çekilmiştir ve başka bir plakaya aktarılmıştır. 24 kuyulu plakadaki OKH'lerin eski besi ortamı çekilmiştir. %10 Alamar mavisi ve % 90 McCoy's 5A besi ortamı olacak şekilde her kuyuya 300 μ L koyulmuştur. Plakalar aliminyum folyo ile kapatılmıştır ve 4 saat inkübasyona bırakılmıştır. 4 saat sonra, 96 kuyucuklu plakada her kuyuya 100 μ L eklenmiştir. 570-600 nm'de ölçüm yapılmıştır. Transweller tekrar 24 kuyucuklu plakalara koyulmuştur, yeni besi ortamı eklenerek 3. gün ölçümü için kokültüre devam edilmiştir.

3.2.5. İmmünofloresan Boyama

OKH'ler için köklük belirteçleri olan CD133, Sox2, Nanog antikorları kullanılarak ekspresyon seviyeleri İmmünofloresan Boyama yapılarak görüntülenmiştir.

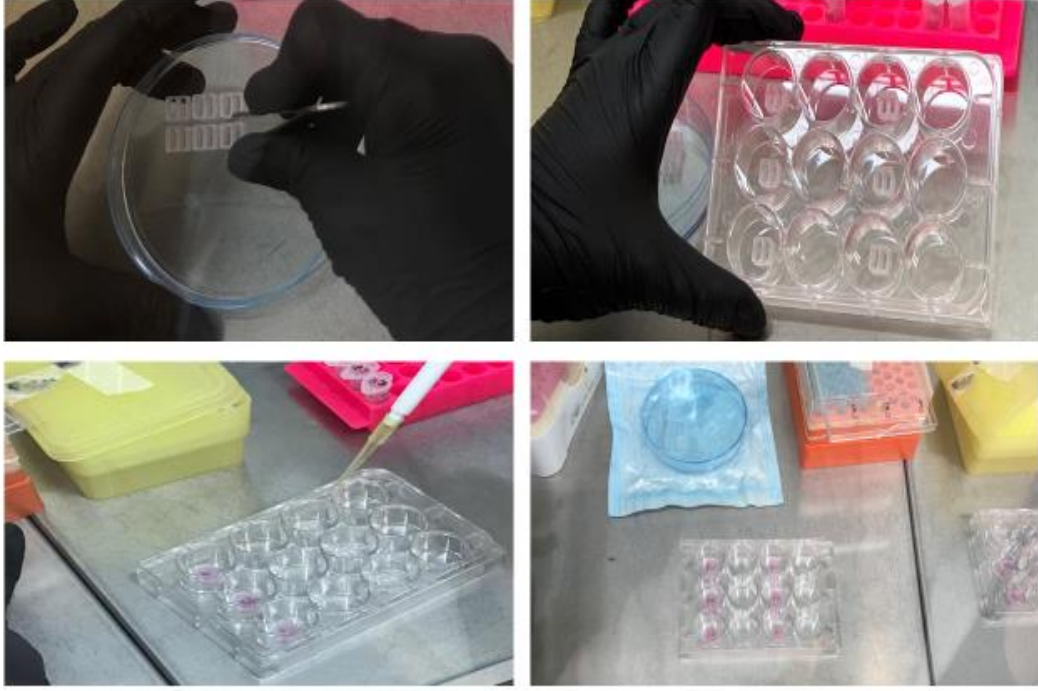
Tüm kokültür gruplarının 3. gününde metastatik gözlem için Sox2, Nanog ve Vimentin antikorları kullanılarak ekspresyon seviyeleri İmmünofloresan Boyama yapılarak görüntülenmiştir.

1. Plakada bulunan eski ortam çekilmiştir.
2. %100 Metanol ile 30 dakika -20°C 'de hücreler fikse edilmiştir.
3. % 0.2 Triton X-100'lü Ca^{+2} , Mg^{+2} içermeyen PBS ile 5 dakika bekletilmiştir.
4. Ca^{+2} , Mg^{+2} içermeyen PBS ile 1 kez yıkama yapılmıştır.
5. % 1 BSA'lı Ca^{+2} , Mg^{+2} içermeyen PBS ile 5 dakika bekletilmiştir.
6. Primer antikorlar %1 BSA'lı Ca^{+2} , Mg^{+2} içermeyen PBS içerisinde hazırlanmıştır (1:100, 1:200).
7. Nemli bir ortam yaratılarak 4°C 'de gece boyu bekletilmiştir.
8. Ca^{+2} , Mg^{+2} içermeyen PBS ile 3 kez yıkama yapılmıştır.
9. Sekonder antikorlar eklenip (1:500). 2 saat 37°C 'de aliminyum folyo ile kapatılarak bekletilmiştir.
10. Ca^{+2} , Mg^{+2} içermeyen PBS ile 3 kez yıkama yapılmıştır.
11. 1mg/ mL olan DAPI'den % 0,1 olacak şekilde her kuyuya 100 μL eklenilerek 10 dakika bekletilmiştir.
12. 1 mL %70 EtOH eklenerek oda sıcaklığında bekletilmiştir.
13. 1 mL %100 EtOH eklenerek oda sıcaklığında bekletilmiştir.
14. Floresan mikroskopta inceleme yapılmıştır.

3.2.6. Migrasyon Testi

Migrasyon testi için kokültürün 3. gününde hücrelere pasaj yapılarak uygun sayıda ekim yapılmıştır. Bu test için 2'li insert kültür kalıpları kullanılmıştır (İbidi, Almanya).

1. İlk olarak kalıplar 12'li plakaların tam ortasına yerleştirilmiştir.
2. Her kalıbın birinde 70 μL , toplamda 140 μL 'de 3×10^4 hücre/ mL olacak şekilde her iki bölüme hücre ekimi yapılmıştır.
3. Hücreler konflüent olduğunda kalıplar çıkarılmıştır ve PBS ile yıkama yapılmıştır.
4. Besi ortamı eklenmiştir ve ters faz ışık mikroskopunda belirli saat aralıklarında hücreler arası boşluğun dolması gözlemlenerek fotoğraf çekimi yapılmıştır.
5. 0, 3, 12 ve 24. saatlerde çekilmiş fotoğraflar ImageJ programı kullanılarak hücreler arasındaki boşluğun genişliği ölçülmüş ve $t=0$ anındaki boşluğun genişliğine oranlanarak migrasyon oranı hesaplanmıştır. Elde edilen ortalama değer ve standart sapmalar ile GraphPad programı kullanılarak istatistiksel analizler elde edilmiştir.



Şekil 5. Migrasyon testi için yapılan hazırlık aşaması. 2'li insert kalıplar plakaya koyulur ve hücrelerin ekimi yapılır.

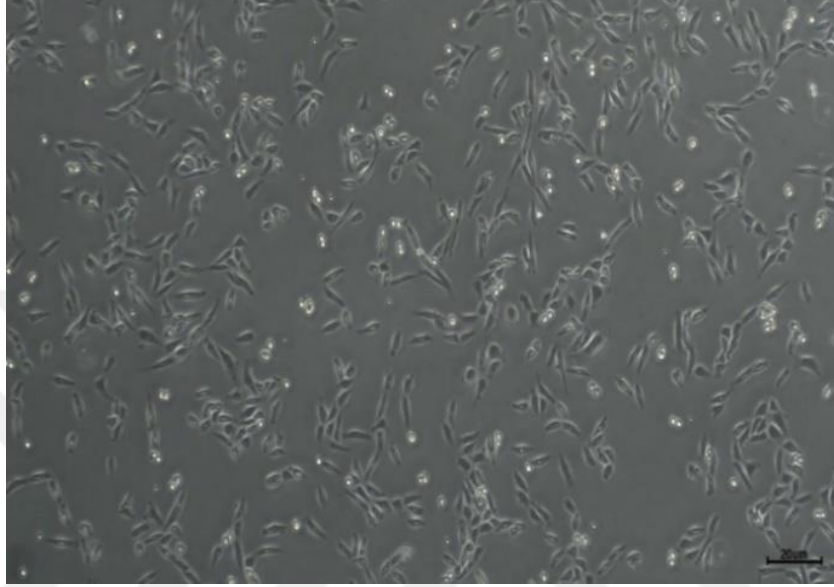
3.2.7 İstatiksel Analiz

Gerçekleştirilmiş olan tüm deneyler en az üç tekrarlı olacak şekilde ($n=3$) yapılmıştır. Sonuçların değerlendirilmesi için yapılan sayısal değerlendirmelerde ortalama değer ve standart sapmalar belirlenmiştir. Deney gruplarından elde edilen sonuçların normal dağılıma uyup uymadığı incelenerek bu analizin sonuçlarına göre parametrik veya parametrik olmayan istatistiksel analiz yöntemleri seçilerek %95 güven aralığında uygulanmıştır. Sonuçlar, Dunnett çoklu karşılaştırma testi ile her grupta tek yönlü ANOVA kullanılarak analiz edilmiştir.



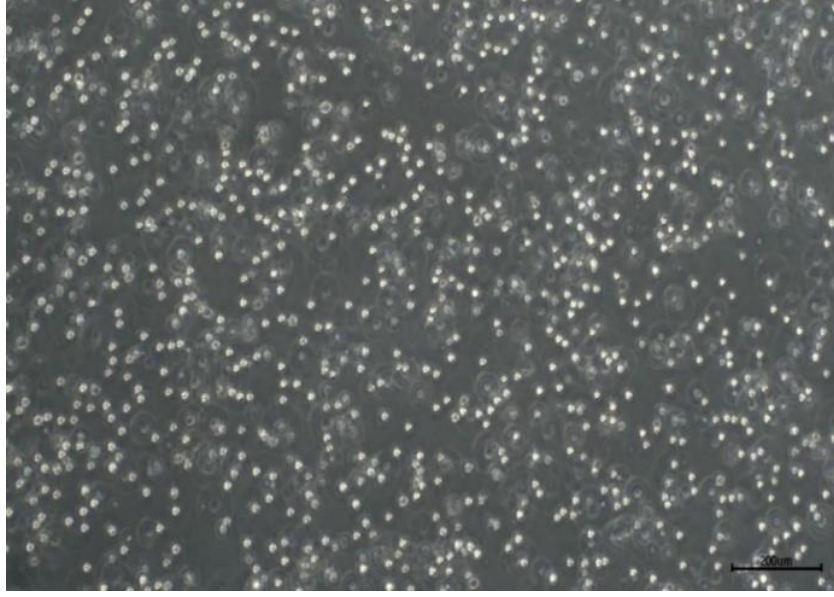
4. BULGULAR

4.1 OKH ve THP-1 Hücre Hatlarının Morfolojileri



Şekil 6. OKH hücre morfolojilerinin ışık mikroskopunda görüntülenmesi. (ölçek çizgisi: 20µm)

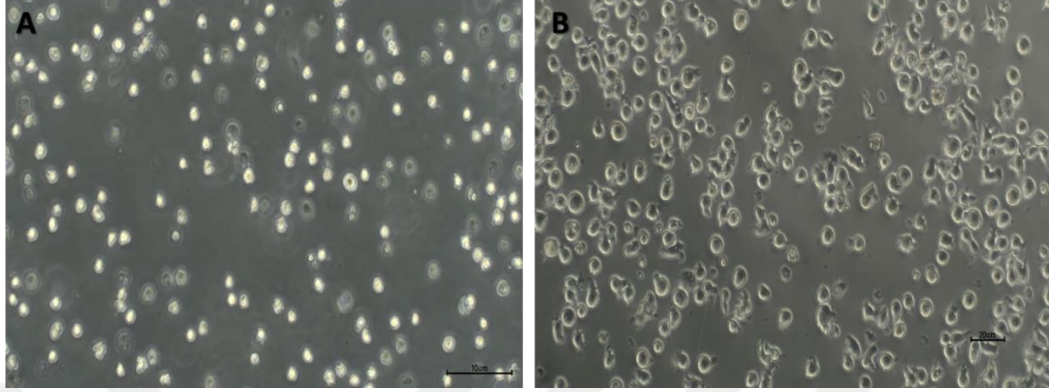
Şekil 6'da 2-6 pasaj aralığında çalışılan OKH hücrelerinin iğsi morfolojide, osteoblastik hücre yapısında olduğu gözlemlenmiştir (Abarrategi ve ark., 2016).



Şekil 7. THP-1 monosit hücre morfolojilerinin ışık mikroskopunda görüntülenmesi. (ölçek çizgisi: 200μm)

Şekil 7’de THP-1 monosit hücrelerinin süspanse monositik hücre yapısında olduğu gözlenlenmiştir (Chanput ve ark., 2014).

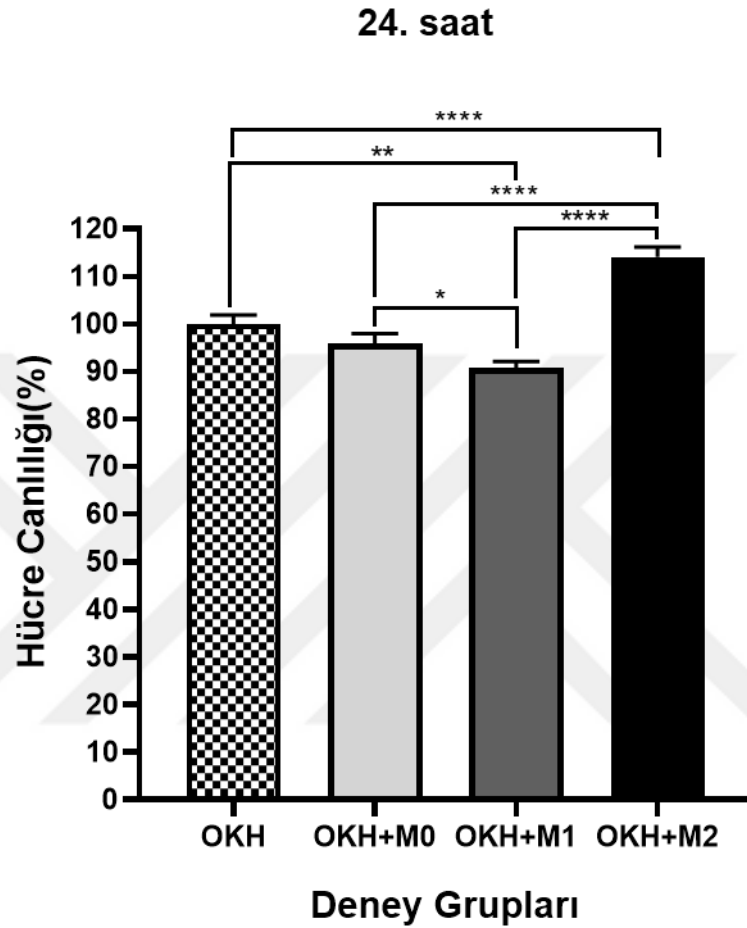
4.2 THP-1 Monositlerin Makrofajlara İndüklenmesi



Şekil 8. THP-1 monosit hücrelerinin M0 makrofajlarına indüklenmesi. A) THP-1 monositlerinin ışık mikroskopunda görüntülenmesi (ölçek çizgisi:10 μ m) B) THP-1 hücrelerinin 16 saat PMA inkübasyonu sonrası M0 makrofajlara indüklenmesinin ışık mikroskopunda görüntülenmesi (ölçek çizgisi: 20 μ m)

THP-1 monosit hücrelerinin morfolojisi süspanse halde gözlemlenirken (Şekil 8a), 16 saat PMA ile inkübasyonundan sonra M0 makrofajlara indüklendiğinde monolayer faza geçerek kültür yüzeyine tutundukları gözlemlenmiştir (Şekil 8b).

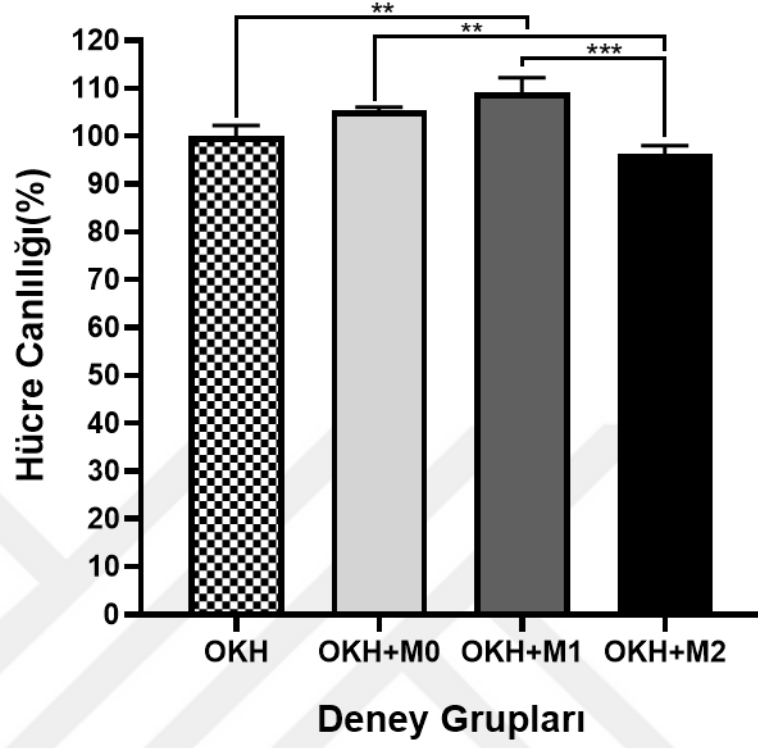
4.3 OKH'lerde Hücre Canlılık Analizleri



Şekil 9. OKH ve makrofaj kokültürünün 24. saatteki Alamar Mavisi testi analiz sonuçlarının grafikleri. (**** p <0.0001, ** p <0.01, * p <0.05)

OKH'ler ile kokültür grupları (OKH+M0, OKH+M1 ve OKH+M2) ve kokültür gruplarına kendi aralarında karşılaştırıldığında OKH+M2 grubundaki OKH'lerin OKH grubuna göre daha yüksek canlılık gösterdikleri; OKH+M0 grubu ile OKH grubu arasında anlamlı fark olmadığı; OKH+M1 grubunun ise OKH grubuna göre hücre canlılığında düşüş gösterdiği görülmektedir (Şekil 9).

72. saat



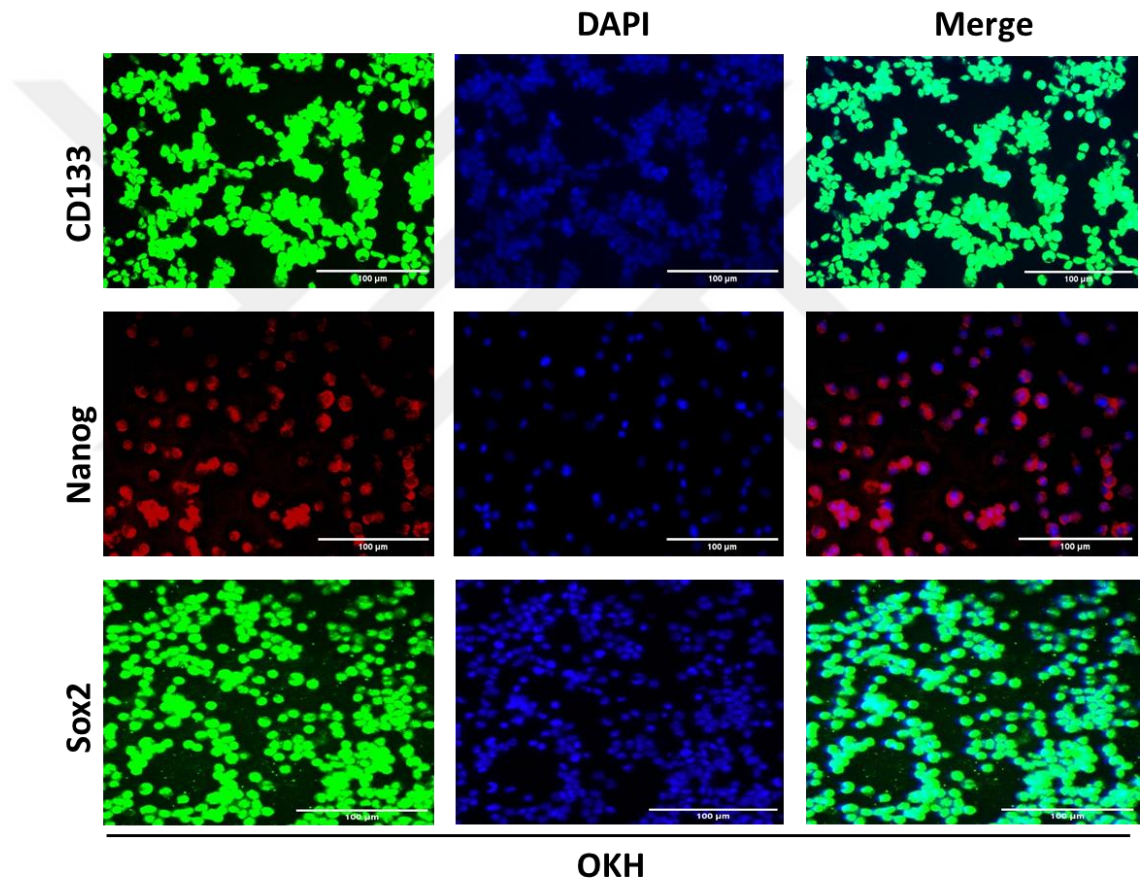
Şekil 10. OKH ve makrofaj kokültürünün 72. saatteki Alamar Mavisi testi analiz sonuçlarının grafikleri. (***) $p < 0.001$, (**) $p < 0.01$)

72. saat hücre canlılık oranlarına bakıldığında OKH+M1 kokültür grubunun OKH grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artış gösterdiği gözlemlenmiştir (Şekil 10).

4.4 İmmünofloresan Boyama Analizleri

4.4.1 OKH Hücrelerinin İmmünofloresan Boyama Analizleri

OKH hücrelerinde CD133⁺, Nanog ve Sox2 ekspresyon düzeyleri immünofloresan boyama yöntemi ile floresan mikroskopta (DFC 3000G, Leica, Almanya) görüntülenmiştir.



Şekil 11. OKH hücrelerinin CD133⁺, Nanog ve Sox2 ifadelerinin immünofloresan boyama görüntüleri (ölçek çizgisi: 100 µm).

OKH'lerin kanser kök hücre özelliğini kanıtlayan CD133+, Nanog ve Sox2 antikorları kullanılarak elde edilen immüno floresan boyama görüntüleri Şekil 11'de gösterilmiştir.

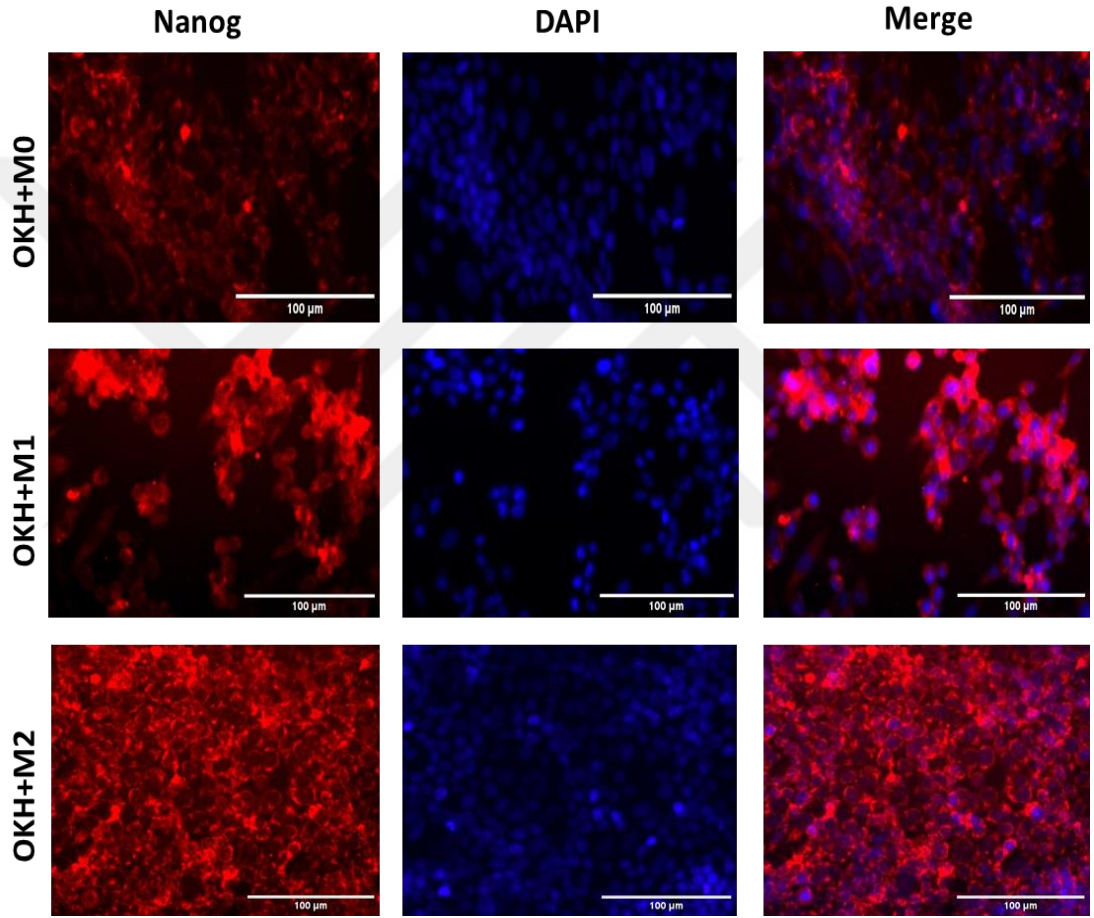
Kanser kök hücrelerinin belirlenmesinde en yaygın olarak kullanılan CD133⁺ belirteci osteosarkom hücre hattında kullanılarak kanser kök hücrelerinin varlığı ispatlanmıştır (Tirino ve ark., 2008; Brown ve ark., 2017).

Nanog, kanser kök hücre benzeri hücrelerde malignitenin indüklenmesinde yer alan bir transkripsiyon faktördür (Yuan Ye ve ark., 2021).

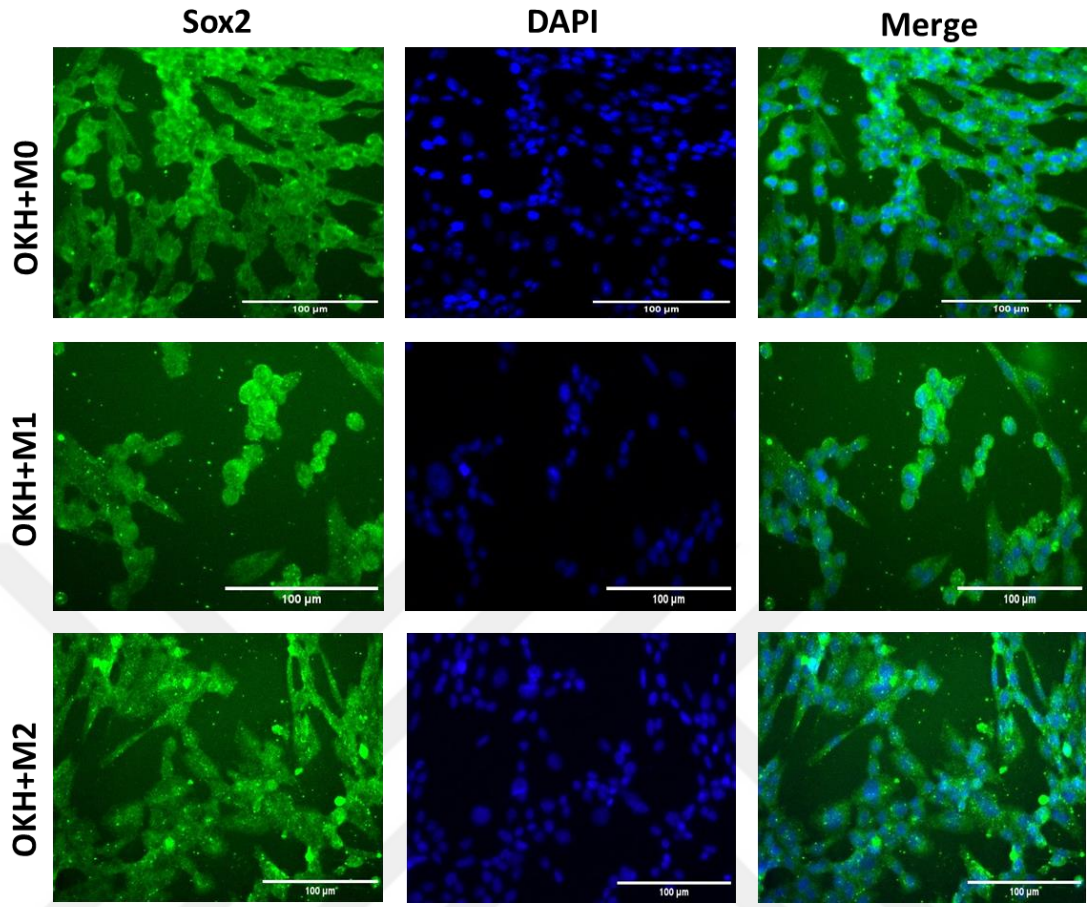
Sox2'nin kök hücre özelliklerine sahip olan tümör başlatan osteosarkom hücre popülasyonunu işaretlediği yapılan bir çalışmada kanıtlanmıştır (Basu-Roy ve ark., 2012).

4.4.2 Kokültür İmmüno Floresan Boyama Analizleri

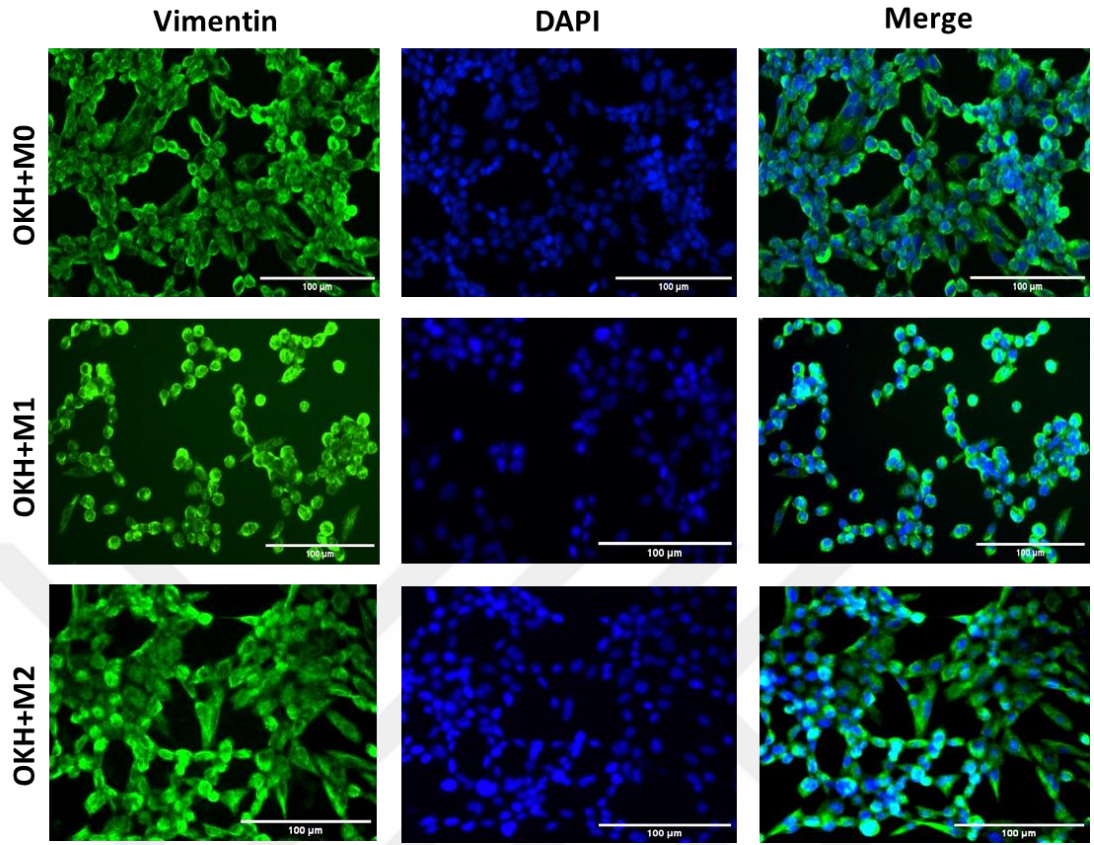
Kokültür sonrasında her OKH grubunda Nanog, Sox2 ve Vimentin ekspresyon düzeyleri immüno floresan boyama yöntemi ile floresan mikroskopta (DFC 3000G, Leica, Almanya) görüntülenmiştir.



Şekil 12. OKH+M0, OKH+M1 ve OKH+M2 kokültür gruplarında OKH'lerin Nanog ifadesinin immüno floresan boyama görüntüleri (ölçek çizgisi 100 µm).



Şekil 13. OKH+M0, OKH+M1 ve OKH+M2 kokültür gruplarında OKH'lerin Sox2 ifadesinin immüno Floresan boyama görüntüleri. (ölçek çizgisi: 100 µm)



Şekil 14. OKH+M0, OKH+M1 ve OKH+M2 kokültür gruplarında OKH'lerin vimentin ifadesinin immüno Floresan boyama görüntüleri (ölçek çizgisi: 100 µm)

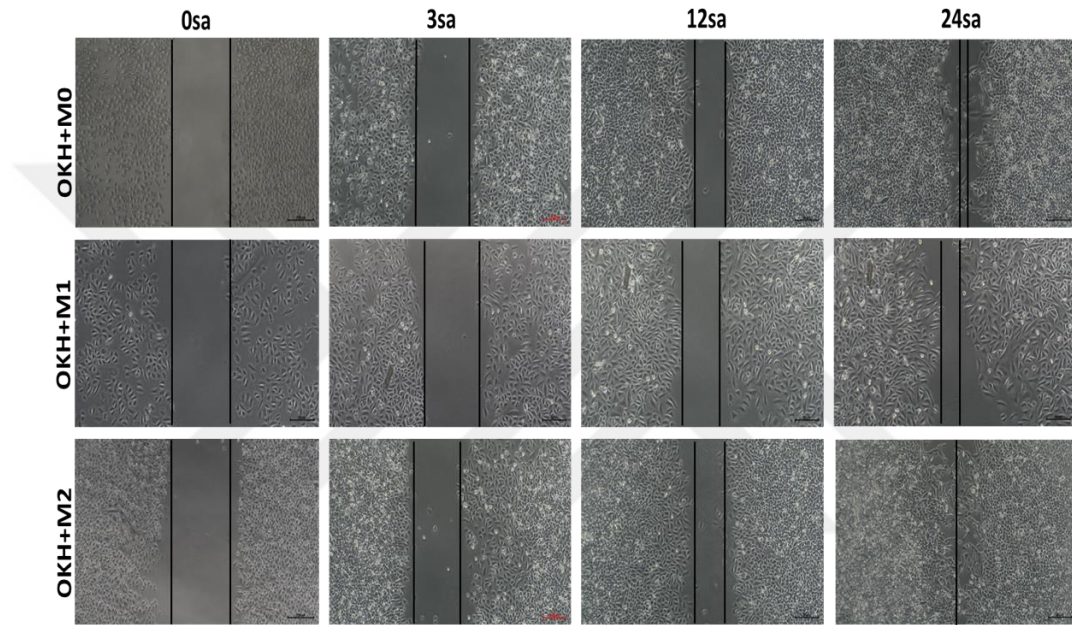
Kokültür gruplarının Şekil 12’de Nanog, Şekil 13’te Sox2 ve Şekil 14’te vimentin ekspresyon düzeyleri floresan mikroskopta görüntülenmiştir.

Nanog’ta en fazla ekspresyon görülen grup OKH+M2 iken, Sox2’de OKH+M0 ve OKH+M2 ve Vimentin ekspresyonunun en fazla olduğu grup ise OKH+M0 ve OKH+M2 olarak görüntülenmiştir.

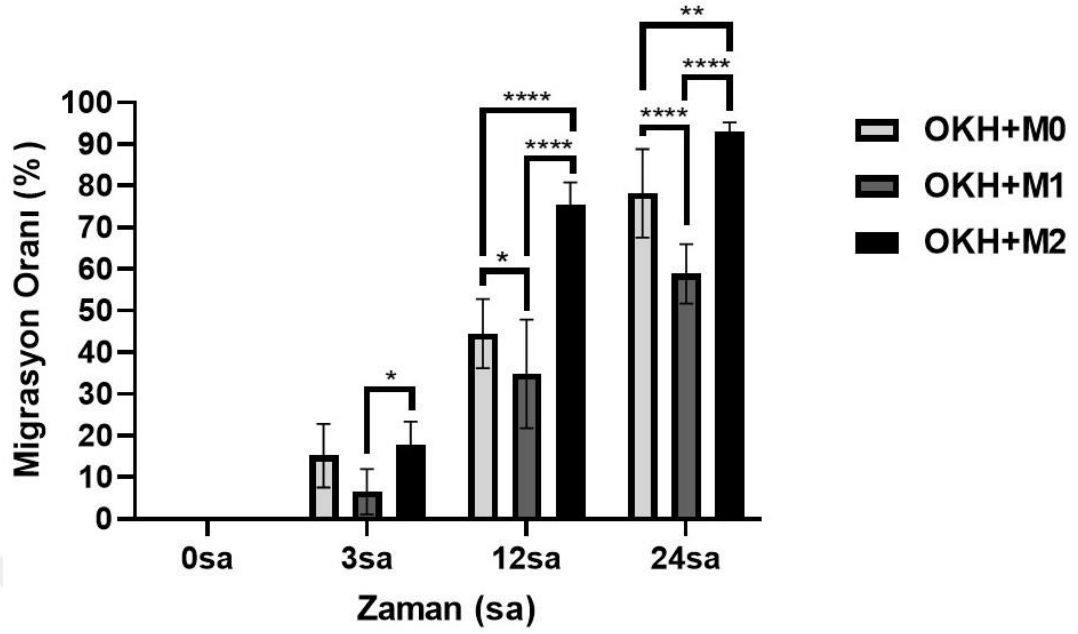
Vimentin, mezenkimal hücrelerde eksprese edilen bir ara filament proteinidir (Zhang ve ark., 2022). Vimentin malign tümörlerin migrasyonunda önemli rol oynamaktadır (Chernoivanenko ve ark., 2013). Şekil 14’te mezenkimal hücre belirteci olan vimentinin ekspresyonuna bakıldığında, mezenkimal hücre görüntüsü en fazla OKH+M0 ve OKH+M2 grubunda izlenmiştir.

4.5 Migrasyon Testi Analizleri

Her kokültür grubunda 0, 3, 12, ve 24. saatlerde hücreler arasındaki boşluğun fotoğrafları ters faz ışık mikroskobuyla (CK40-F200, Olympus, Japonya) çekilerek hücrelerin migrasyon görüntüleri Şekil 15'te gösterilmiştir.



Şekil 15. Kokültürün 3. günü sonrasında yapılan migrasyon testi görüntüleri. OKH+M0, OKH+M1 ve OKH+M2 kokültür gruplarında OKH'lerin 0, 3, 12 ve 24. saatteki migrasyon görüntüleri. (ölçek çizgisi: 200 µm)

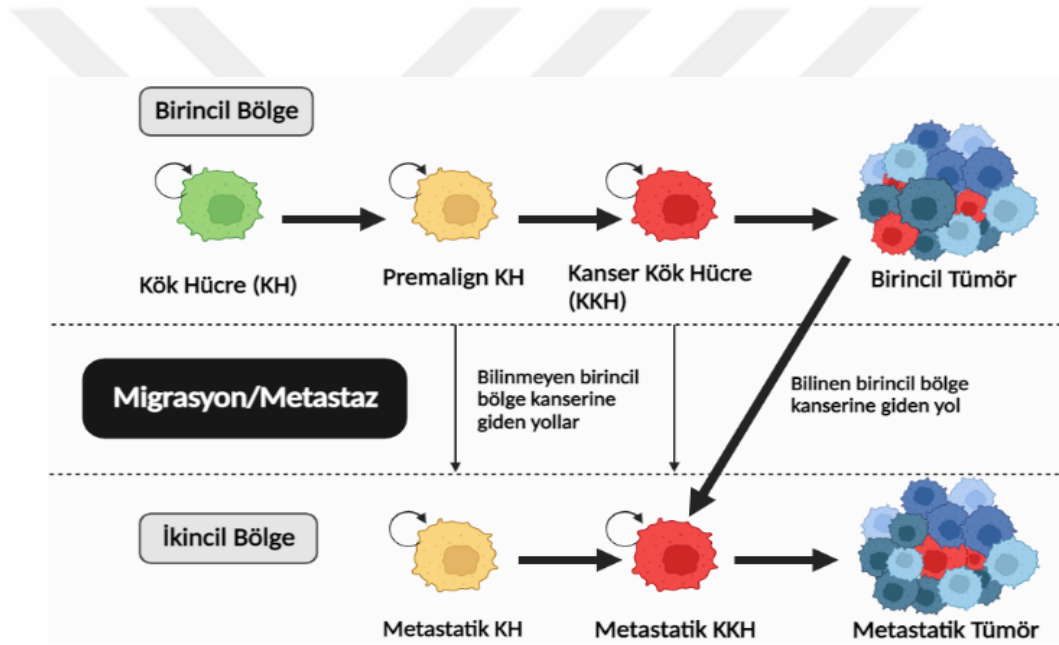


Şekil 16. Kokültürün 3. günü sonrasında yapılan migrasyon testinde OKH+M0, OKH+M1 ve OKH+M2 gruplarında OKH'lerin 0, 3, 12 ve 24. saatteki migrasyon oran grafiği (**** p <0.0001, ** p <0.01, * p <0.05)

Şekil 16'da kokültür gruplarının 0, 3, 12 ve 24. saatteki migrasyon oran grafiği gösterilmektedir. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar bulunmaktadır. 24. saatteki migrasyon oranları OKH+M0'da %78, OKH+M1'de %59 ve OKH+M2 grubunda % 93'tür. OKH+M2 grubunun migrasyon oranına bakıldığında en hızlı göç eden kokültür grubu olarak analiz edilmiştir.

5. TARTIŞMA

KKH'ler, kendi kendini yenileyen, tümörün başlaması, nüksü ve metastazında kritik role sahip kanser nişleri içerisinde lokalize olan popülasyondur. Genel olarak, çok sayıda KKH, artan tümör proliferasyonu ve olumsuz klinik sonuçlarla ilişkilidir (Najafi ve ark., 2019). Günümüzdeki kapsamlı araştırmalara rağmen, KKH'lerin kimliği ve kanser tedavisindeki mücadele konusundaki zorluklar hala sabittir (Lim ve ark., 2021).



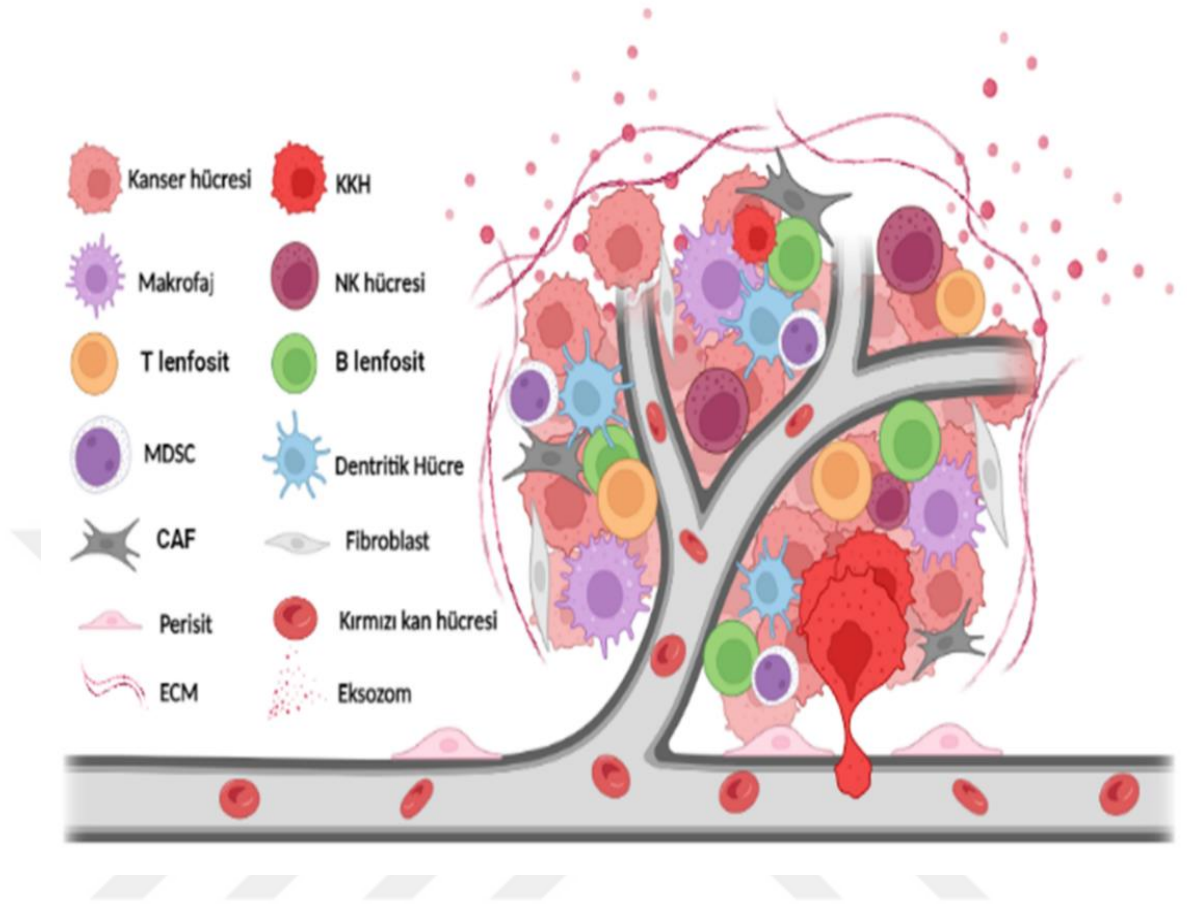
Şekil 17. Kök hücrelerin migrasyon yeteneği, bilinmeyen birincil bölge kanserinin varlığını açıklayabilir. Birincil yeri bilinmeyen bir kanser, premalign kök hücreler veya kanser kök hücreleri doğal dokularından (birincil bölge) göç ettiğinde ve birincil bölgelerinde bir tümör oluşturmadan önce veya oluşturmadan başka bir dokuda (ikincil bölge) bir tümör oluşturduğunda oluşur (López-Lázaro ve ark., 2015). (López-Lázaro ve ark.'dan esinlenilerek Biorender kullanılarak şematize edilmiştir.)

Kanserin ilerlemesinde KKH'lerin temel mekanizması belirsizdir. Böylece somatik hücrelerden türetilen KKH'lerin kanser hücresindeki değişiklikleri ve edinilmiş genetik/epigenetik mutasyonlar nedeniyle köklüğünü geri kazanması gibi bir takım önerilerde bulunulmuştur. Bunun için hiyerarşik ve stokastik modeller olmak üzere iki model önerilmiştir.

Şekil 2’de gösterilen hiyerarşik modele göre, tümör başlangıcı, normal büyüme kontrolünden ve düzenlemesinden kaçan kök hücrelerle başlar. Bu nedenle, tümörlerin biyolojik temelini oluşturan farklı bir hücre popülasyonuna yol açan KKH'lere dönüşebilirler. Hiyerarşik model klinik olarak doğrulanmıştır ve neden yalnızca KKH'lerin tamamen ortadan kaldırılmasının kanserlerin nüksetmesini önleyebileceğini açıklamaktadır. Bununla birlikte, bu model KKH'ler ve diğer farklılaşmış kanser hücreleri arasındaki etkileşimi açıklayamamaktadır.

Şekil 1’de gösterilen stokastik model ise uygun koşullar altında tüm tümör hücrelerinin (farklılaşmış veya farklılaşmamış) başka lezyonlar başlatabileceğini önermektedir. Bu model, tümör heterojenliği ile tümörleri başlatma kapasitesi arasındaki ilişkiyi açıklamada sınırlamalara sahiptir. Bu bulgular, her iki modelin de birleştirildiği hücresel plastisite kavramına yol açmıştır (Bradshaw ve ark., 2016; Ju ve ark., 2022).

Hücresel plastisite, TME’nin önemli bir özelliğidir ve tümörün agresif davranışını büyük ölçüde etkilemektedir. Plastisite ve KKH, tümörü teşvik etme kapasitelerine sahip çok sayıda hücreyi besleyerek bir kanseri şekillendirmek için gerekli olan birbirine bağlı süreçlerdir. TME’nin hücresel plastisite doğası, özellikle yüksek dereceli kanserler için terapi açısından sadece KKH'leri yok etmenin yeterli olmadığı anlamına gelmektedir (Najafi ve ark., 2019).



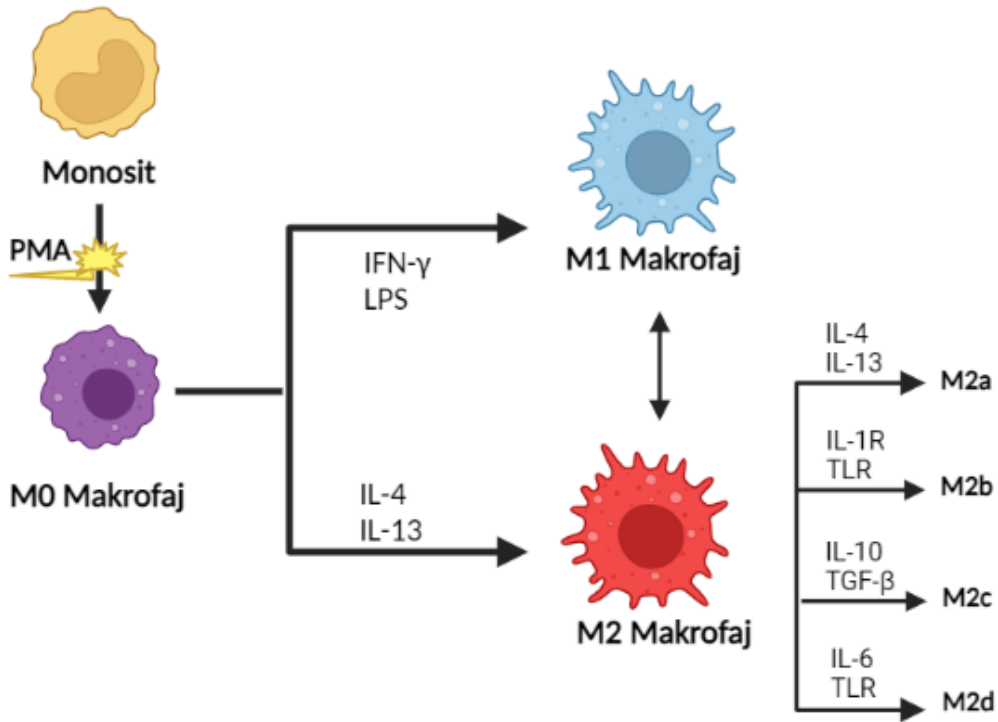
Şekil 18. Tümör mikroçevresinin şematik olarak gösterimi. (KKH: kanser kök hücre, NK: doğal öldürücü, MDSC: miyeloid türevli baskılayıcı hücreler, CAF: kanserle ilişkili fibroblastlar, ECM: hücre dışı matris) (Ju ve ark., 2022) (Ju ve ark.'dan esinlenilerek Biorender kullanılarak şematize edilmiştir.)

TAM'lar, TME'de çeşitli faktörleri yöneterek öne çıkan bağışıklık hücreleridir. TAM'lar, kanserin başlatılması ve ilerlemesi, immün baskılama, metastaz, premalign bir niş oluşturma ve anjiyogenez dahil olmak üzere tümörün ilerlemesinde önemli rol oynamaktadır (Yang ve ark., 2017).

TME'nin tümör gelişimi ve terapötik dirençteki kritik rollerinin artan anlayışı göz önüne alındığında, kanser hastalarında terapötik faydalar elde edilmesinde TME'nin bileşenlerini hedeflemeye yönelik birçok çalışmalar yapılmıştır.

Doğrudan kanser hücrelerini hedeflemeye kıyasla TME'yi hedeflemede önemli bir terapötik avantaj sağlar, çünkü kanser hücreleri, genomik kararsızlıklarından dolayı ilaç direncine yatkınken, TME'deki tümör olmayan hücreler genetik olarak daha kararlı bir yapıya sahiptir ve daha savunmasızdır (Xiao & Yu, 2021).

Literatürdeki bilgilere dayanarak yapılan bu tez çalışmasında, insan osteosarkom kök hücreleri ve tümör mikroçevresinde bulunan makrofajların etkileşimine bakılarak üç farklı makrofaj fenotipinin (M0, M1 ve M2) tümör metastazındaki rolleri incelenmiştir.



Şekil 19. Makrofaj farklılaşması ve polarizasyonu şematik gösterimi. (Biorender kullanılarak şematize edilmiştir.)

OKH hücreleri Mc Coy's 5A besi ortamı ile, THP-1 monosit hücreleri RPMI besi ortamı kullanılarak kültüre edilmiştir. Monosit hücrelerinin 16 saat PMA ile inkübasyonu ile M0 makrofajları elde edilmiştir. Daha sonra, literatüre dayanılarak Şekil 22'de gösterildiği gibi M0 makrofajları ile çeşitli sitokinler M1 makrofajlar için 100 ng/mL IFN-γ ve 100 ng/mL LPS ve M2 makrofajlar için 40 ng/mL IL-4

kullanılarak 3 gün inkübe edilerek istenilen makrofaj fenotiplerine indüklenmiştir (Graney ve ark., 2020).

Elde edilen M0, M1 ve M2 makrofajların OKH'ler ile kokültürü başlatılarak Şekil 9'da gösterilen 24. saat sonunda hücre canlılık analizleri Alamar mavisi testi ile ölçülmüştür.

OKH'ye göre OKH+M2 kokültür grubunun canlılık oranının en yüksek olduğu gösterilmiştir. TAM'lar, tümör mikroçevresindeki önemli bir rol oynayan ve en çok bulunan bağışıklık popülasyonunu temsil eder. TAM'lar, tümör hücrelerinin varlığıyla derinden ilişkilendirilmiştir ve en yaygın olarak M2 benzeri bir fenotip kazanmışlardır. TAM'ların, aktif olarak kanser hücresi proliferasyonunu artırdığı ve anti tümör bağışıklık yanıtlarını güçlü bir şekilde baskıladıkları için tümörün ilerlemesini desteklediği kabul edilmektedir (Sainz ve ark, 2016; Mantovani ve ark. 2017; Allavena ve ark., 2021).

Şekil 10'da gösterilen 72. saatteki hücre canlılık analizleri Alamar Mavisi testi ile ölçülmüştür. OKH'lere göre OKH+M1 grubunda anlamlı bir artış gözlemlenmiştir. Literatüre bakıldığında bir çalışmada, osteosarkomda tanımlanan TAM'lar hem M1 hem de M2 özelliklerine sahip olduğu gösterilmiştir (Buddingh EP ve ark., 2011).

Glioblastom kök hücreleri ile M2 makrofajların kokültürü yapılan bir çalışmada, M2 makrofaja özgü salgılanan bir sitokin olan TGF-21 seviyelerinin, KKH'lerin varlığında yükseldiğini bildirilerek ve kokültürün daha önce M1 fenotipine polarize olan makrofajlarda M2 belirteçlerinin ekspresyonunun artmasıyla sonuçlandığı bulunmuştur. siRNA aracılı STAT3 susturulmasının, KKH'lerin kemo-yanıtı ve göç etme yeteneklerini azalttığı bildirmiştir. STAT3 siRNA ve DNA alkileyici ajanların kombinasyon tedavisinin, KKH fonksiyonlarını ortadan kaldırdığını bildirilmiştir (Nusblat LM ve ark., 2017). Böylece OKH+M1 grubunun M2'ye polarize olabileceği düşünülebilir.

Bu tez çalışmasında, daha önceden satın alınmış Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü, Biyomalzemeler ve 3 Boyutlu Biyoaraçlar Laboratuvarı stoğunda bulunan insan osteosarkom kök hücreleri (OKH), Tablo 1’de (Schiavone ve ark., 2019) gösterildiği gibi kanser kök hücre belirteçleri olarak kullanılan CD133⁺, Sox2 ve Nanog’un ekspresyon düzeylerinin immünofloresan boyama yapılarak floresan mikroskopta çekilen fotoğrafları Şekil 14’te gösterilerek OKH’lerin köklük özellikleri ispatlanmıştır.

Kökültür gruplarında Nanog (Şekil 12), Sox2 (Şekil 13) ve vimentin (Şekil 14) ekspresyon seviyeleri görüntülenmiştir.

Şekil 12’e bakıldığında Nanog ekspresyonunun OKH+M2 kökültür grubunda en fazla floresan yoğunlukta olduğu görülmektedir. Son çalışmalar, Nanog upregülasyonunun malignitelerin ileri evreleri ve kötü prognozu ile önemli bir ilişkisi olduğunu ve lösemi, karaciğer, kolorektal, prostat, yumurtalık, akciğer, baş ve boyun, beyin, pankreas, mide ve meme kanserlerinin tümör oluşumunda çok önemli bir rol oynadığını ortaya koymuştur (Vasefifar ve ark., 2022).

Nanog'un aşırı ekspresyonu, çeşitli kanser türlerinde tümör metastazı ile ilişkilendirilmiştir (Lin T ve ark., 2021). Ayrıca Nanog, kanser hücresi motilitesini de aktif olarak düzenlemektedir (Wang ve ark., 2013).

Siu ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada Nanog’un yumurtalık kanseri hücrelerinde yüksek oranda eksprese edildiği görülmüştür ve Nanog'un susturulması, hücre çoğalmasını, göçünü ve metastazını engellemiştir (Siu ve ark., 2013).

Park ve ark. tarafından yapılan başka bir çalışmada, Nanog'un ekspresyonunun, lenfatik invazyon, akciğer adenokarsinomunda EMT ile ilişkili olduğu ve akciğer

adenokarsinomunda kötü prognoz için bağımsız bir risk faktörü olduğu bildirilmiştir (Park ve ark., 2016).

Böylece Nanog'un da OKH+M2 grubunda aşırı ekspresyonu göz önünde bulundurulduğunda bu grubun metastatik özelliğinin yüksek olduğu sonucuna varılabilir.

Şekil 13'e bakıldığında Sox2'nin OKH+M0 ve OKH+M2 grubunda en fazla eksprese edildiği gözükmemektedir. Zhang ve ark. tarafından yapılan çalışmada, hepataselüler karsinomda (HCC) M0 makrofajlarla ilgili genlerinden biyoinformatik yöntemler kullanılarak bir risk modeli oluşturulmuştur. Yapılan bu çalışmaya göre, M0 makrofajların da tümöre katkısından bahsedilebilir (Zhang ve ark., 2022).

Mou ve ark. meme kanserinde yapmış oldukları çalışmada Sox2'nin tümör metastazında rol oynayabileceğini göstermişlerdir. Böylece OKH+M2 kök kültür grubunun Sox2 ekspresyonunda metastatik özelliği gösterebilirken, hem de bir kanser kök hücre belirteci olan Sox2'nin artması OKH+M2 kök kültür grubundaki kanser kök hücrelerin varlığının da arttığını göstermektedir. (Mou ve ark., 2015; Basu-Roy ve ark., 2012).

Şekil 14'te vimentin ekspresyonlarının OKH+M0 ve OKH+M2 gruplarındaki ekspresyon oranlarının daha fazla olduğu gösterilmiştir. Mezenkimal hücre belirteci olan vimentinin hücre göçünü ve adezyonu düzenlediği ve kanserin ilerlemesinde bir faktör olduğu bilinmektedir (Wu ve ark., 2018).

Şekil 14'e bakıldığında, OKH+M0 ve OKH+M2 grubundaki epitel hücre yoksunluğundan mezenkimal hücre tipine geçişi dikkat çekmektedir. Literatüre bakıldığında, pankreatik duktal adenokarsinom (PDAC) ve THP-1 hücrelerinden indüklenmiş CD68 ve CD163'ü ifade eden ancak CD206'yı ifade etmeyen M0 makrofajlar ile yapılan çalışmada PAR1 ekspresyonunun, birincil PDAC'lerde

makrofaj infiltrasyonu ile ilişkili olduğu ve makrofajların, mezenkimal geçişi indüklemek için PDAC hücresi PAR1 üzerinde hareket eden MMP9'u salgılar. Bu makrofaj kaynaklı mezenkimal geçiş, makrofaj akışının tümör destekleyici rolünü desteklemiştir ve makrofajların tümör büyümesindeki katkısını açıklamıştır (Tekin ve ark., 2020).

Aşırı vimentin ekspresyonu prostat, gastrointestinal sistem, meme gibi birçok kanserde bildirilmiştir (Kidd ME ve ark., 2014; Satelli A ve ark., 2011; Sun BO ve ark., 2015). Vimentinin katı tümörlerde EMT sırasında meydana gelen hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesine katılarak, EMT sinyal yollarını düzenleyerek metastatik ilerlemeyi desteklediği de gösterilmiştir (Wu ve ark., 2018).

Şekil 15'e bakıldığında kokültür gruplarında yapılan migrasyon testinin 0, 3, 12 ve 24. saatteki hücre göçleri görülmektedir. Şekil 16'daki grafikte 24. saatte OKH+M0 grubunda %78, OKH+M1 grubunda %59 iken OKH+M2 grubunda %93 oranında hücre göçünün tamamlandığı görülmektedir. Bu sonuçlara bakılarak OKH+M2 kokültür grubunun hücre migrasyonunda en hızlı grup olduğu görülmektedir. Literatürle karşılaştırıldığında, M2 makrofajlarının mide kanseri hücrelerinin ve meme kanseri hücrelerinin göçünü desteklediği gösterilmiştir (Chen ve ark., 2017).

Diğer bir çalışmada, osteosarkom dokularında M2 makrofajları tarafından salgılanan yaygın bir kemokin olan CCL18'in aşırı ekspresyonu bildirilerek osteosarkom hücrelerinin proliferasyonu ve hücre invazyonu ile ilişkilendirilmiştir. Buna ek olarak, tanımlanmış CCL18 TAM sayısının, birincil osteosarkom ile karşılaştırıldığında metastatik osteosarkom dokularında daha yüksek olduğu görülmüştür (Su Y ve ark., 2019).

Başka bir çalışmada, THP-1 monosit hücrelerinden türetilmiş M2 makrofajlar ile kokültür yapılan A549 akciğer kanser kök hücrelerinde kök hücre özelliğinin arttığı bildirilmiştir (Zhang ve ark., 2021).

THP-1 monositlerinden indüklenmiş M2 makrofajlar ve glioma hücreleriyle kokültür yapılan başka bir çalışmada ise, M2 makrofajların JAK2/STAT3 sinyal yolağı üzerinden IL-10'un JAK2 ile etkileşimi ile gliomayı arttırdığı bildirilmiştir (Qi L ve ark., 2016).

Li ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, pro-tümör M2 benzeri makrofajların polarizasyonunun ve oluşumunun, yüksek IL-6/IL-8 salgılanmasıyla JAK2/STAT3 sinyal yolağının aktivasyonu ile mide kanserinde, mide kanseri kaynaklı mezenkimal kök hücreler (GC-MSC) tarafından çarpıcı bir şekilde tetiklendiği bildirilmiştir. Ayrıca, GC-MSC ile prime edilmiş makrofajlar, mide kanseri hücrelerinde EMT sürecini artırarak mide kanseri metastazını önemli ölçüde desteklediği bildirilmiştir (Li ve ark., 2019).

Wei ve ark. tarafından yapılan başka bir çalışmada, TAM'lar ve kanser hücreleri arasında pozitif bir geri beslenme döngüsü içeren önemli bir mekanizmayı ortaya koymuştur. Bu mekanizma kolorektal kanserin (CRC) başlatılması, ilerlemesi ve metastazı için önemlidir. IL6/STAT3/miR-506-3p/FoxQ1 sinyal kaskadının CRC ile mücadele için potansiyel bir terapötik hedef olabileceği vurgulamaktadır (Wei ve ark., 2019).

THP-1 monositlerinden türetilen M2 makrofajlar ile anoplastik tiroid karsinomundaki (ATC) kokültür çalışmasında, M2 benzeri TAM salgılayan IGF-1 ve IGF-2'nin, IR-A/IGF-1R aracılığıyla PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağıyla ATC'nin kanser invazyonunu, Oct4, Sox2 ve CD133 ekspresyon seviyelerinde köklüğün arttığı ve e-caderinin azalması, n-kaderin ve vimentin ekspresyon seviyelerinin artmasıyla EMT'yi desteklediği ortaya koyulmuştur (Lv ve ark., 2021).

Üçlü negatif meme kanseri (TNBC) ile kokültürü yapılan M2 makrofajların TAM'ların TNBC'de KKH özelliklerini arttırdığı, EMT'yi teşvik ettiği ve TNBC'nin teşhisi ve tedavisi için yeni stratejiler sunulabilecek CCL2/AKT/ β -katenin sinyalinin

aktivasyonu ile TNBC'de KKH özelliklerini geliştirdiği yeni bir mekanizma bildirilmiştir (Chen ve ark., 2022).

Literatürdeki karşılaştırmalara bakılarak yapılan migrasyon testindeki sonuçların M2 makrofajların OKH'lerin metastatik özelliklerinde artışa neden olduğu söylenebilir.

Tümörle ilişkili makrofajların hedeflenmesi, immünoşüpresif tümör mikro ortamını iyileştirmek ve antitümör tedavisinin etkinliğini arttırmak için büyük bir potansiyele sahiptir (Ye ve ark., 2019).

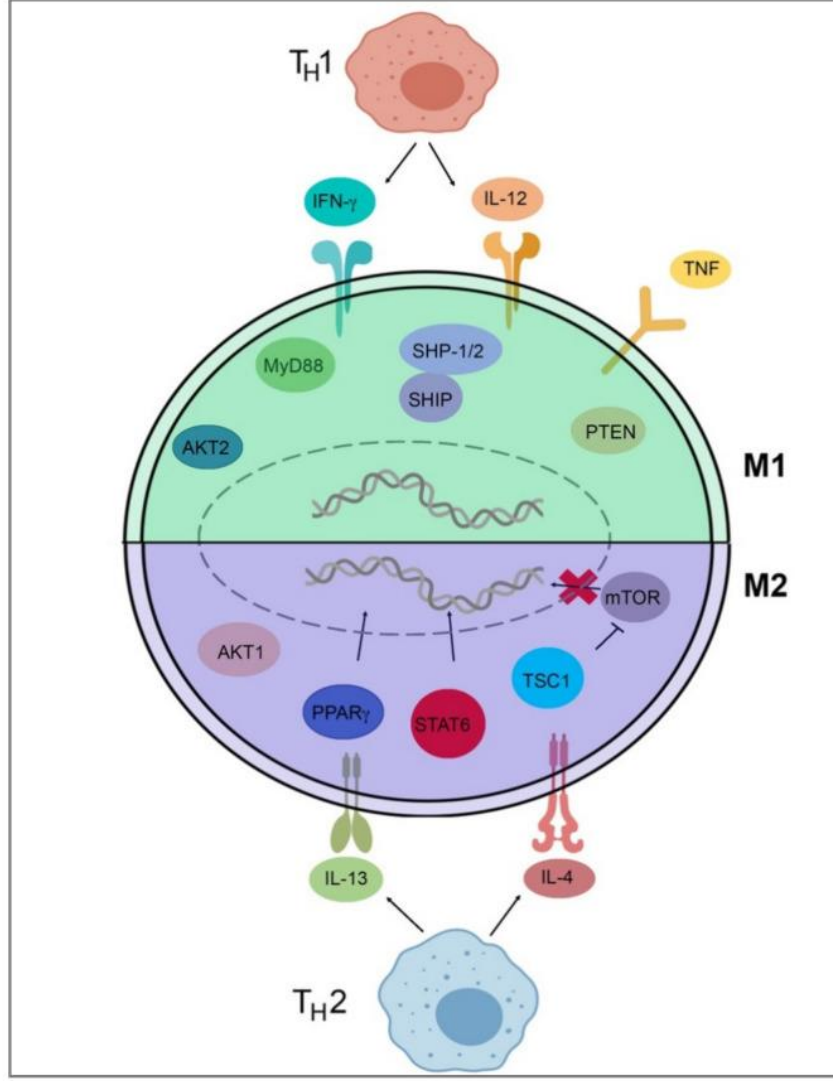
CAR-makrofaj (CAR-M) teknolojisi kanser hastaları için yeni bir immünoterapi stratejisi sunmaktadır (Gao ve ark., 2022). Santoni ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, TME'ye sızan çok sayıda makrofajlarla, CAR-M teknolojisi makrofajların fagositozunu düzenler, antijen-sunucu aktivitelerini artırır ve onları M1 fenotipinde bloke ederek immünoşüpresif mikro ortamı iyileştirmiştir (Santoni ve ark., 2021).

Eksozomlar, 30-150 nm çapındaki en küçük hücre dışı veziküllerdir (EV) ve hücreler arasındaki etkileşimlerde önemli bir role sahiptir (Guo ve ark., 2020). Genel olarak, hem makrofaj hem de kanser hücresi kaynaklı eksozomlar, çeşitli sinyal yollarıyla tümör immün kaçışı, metastaz ve ilaç direnci ile ilişkilidir Nagarsheth ve ark., 2017).

Xun ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, meme kanseri hücrelerinin ortak kültürü, makrofajlarda KDM6B ekspresyonunun aşağı regülasyonuna yol açmıştır. Kanser hücresinden türetilmiş eksozomal miR-138-5p, makrofajlarda KDM6B ekspresyonunun inhibisyonuyla M1 polarizasyonunu inhibe etmiştir ve M2 polarizasyonunu desteklemiştir. Eksozomal miR-138-5p ile tedavi edilen makrofajlar, akciğer metastazını desteklemiştir ve dolaşımdaki eksozomal miR-138-5p seviyesi, meme kanserinin ilerlemesi ile pozitif korelasyon göstermiştir. Bu nedenle eksozomal miR-138-5p, meme kanseri tedavisi için umut verici bir prognostik belirteç ve hedefi temsil etmektedir (Xun ve ark., 2021).

Ye ve ark., tarafından yapılan başka bir çalışmada, TAM'ları azaltmak veya yeniden-eğitmek için hücreye özgü yüzey reseptörleri aracılığıyla TAM'ları hedeflemek için çeşitli lipozomlar geliştirilmiştir. Bu çalışmada, geleneksel lipozomlar, PEG'lenmiş lipozomlar ve mannosile edilmiş lipozomlar dahil olmak üzere lipozomların TAM'lar üzerindeki yüzey işlevselleştirmesinin hücresel internalizasyonu ve immün sistemi uyarıcı aktivitesi araştırılmıştır. Veriler, M2 fenotipinden M1 fenotipine geçişe dayalı olarak immünomodülatörlerin anti-tümör immün etkinliğini artıracak bir dağıtım sistemindeki mannosillenmiş lipozomların potansiyelinin olduğunu göstermektedir (Ye ve ark., 2019).





Şekil 20. Makrofaj polarizasyonundaki sinyal yolları. TH1 T hücreleri tarafından IFN- γ ve IL-12 salgılanmasını, mTOR/Akt veya TLR4 aracılığıyla LPS sinyalini, Akt2/NF- κ B aktivasyonunu, Cd11b'nin SHP-1/2 inhibisyonunu, M2 genlerinin SHIP ve MyD88 inhibisyonunu içermektedir. M1 gen ekspresyonunu indüklemek için PTEN aktivasyonu ve TNF/TNFR/NF- κ B aktivasyonu. M2 genlerinin uyarılması, IL-4 ve IL-13'ün TH2 T hücrelerinden salgılanması ve IL-4Ra reseptörü aktivasyonunun yanı sıra aşağı akış Stat6'ya bağlı arginaz-1 inhibisyonu, PPAR γ aktivasyonu ve mTOR'un TSC1 inhibisyonu tarafından yönetilir (Boutillier ve ark., 2021).

TAM'ların tümör evrimindeki odak noktası olan STAT ailesi (STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B ve STAT6), PI3K γ /AKT ve NF- κ B sinyal yolları ve CD47/SIRPa sinyal yolağı gibi bunlarla sınırlı olmamak üzere çeşitli sinyal yollarıyla ilişkilidir (Gao ve ark., 2022; Anderson ve ark., 2021; Shu ve ark., 2020).

M2 polarize makrofajları ve hepataselüler karsinom (HCC) üzerinde yapılan bir çalışmada, M2 polarize makrofajların Toll benzeri reseptör 4 (TLR4) /STAT3 sinyal yoluyla metastazı ve EMT'yi desteklediği gösterilmiştir. TLR4'ü nötralize edici bir inhibitör kullanılarak migrasyon ve EMT indüklenmiştir (Yao ve ark., 2018).

Yapılan başka bir çalışmada, proliferasyonu ve anti-apoptotik özelliğini olan M1 benzeri TAM'ların karaciğer kanseri hücrelerindeki infiltrasyonu ve ameliyat sonrası transkateter arteriyel kemoembolizasyonun (TACE) etkinliği arasındaki ilişki araştırılmıştır. Araştırmanın sonucunda M1 makrofajların, karaciğer kanser hücrelerinin anti apoptotik yeteneğini arttırmıştır. Ayrıca M1 benzeri TAM'ın karaciğer kanseri hücrelerinde NF- κ B sinyal yolunu aktive edebildiği gözlemlenmiştir. Böylece M1 benzeri TAM'ın karaciğer kanseri dokularına sızmasının, karaciğer kanseri hücrelerinde NF- κ B sinyal yolunu aktive edebileceği sonucuna varılmıştır (Sharen ve ark., 2022).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

- Bu tez çalışmasında, insan osteosarkom kök hücreleri ile THP-1 monosit hücrelerinden türetilmiş M0, M1 ve M2 makrofajların *in vitro* koşullarda kokültürü yapılmıştır. Literatürdeki mevcut çalışmalarda bu makrofaj gruplarının osteosarkom kök hücrelerinin metastazındaki rolleri incelenmemiştir. Böylece bu çalışma ile osteosarkom kök hücrelerin tümör mikroçevresinde bulunan tümörle ilişkili makrofajlar tarafından nasıl etkilendiği ortaya konmuştur.
- Tez kapsamında yapılan çalışmada M2 makrofajları ile kokültür yapılan osteosarkom kök hücrelerinde metastatik özelliklerin arttığı ortaya konulmuştur.
- Fakat M0'ların Sox2 ve Vimentin ekspresyon seviyelerindeki artışı göz önünde bulundurulduğunda M0'ların M2'ye polarize olabileceği ve/veya M0'ın da osteosarkom kök hücrelerde metastatik özelliği arttırdığı düşünülmektedir.
- Tümörle ilişkili makrofajların, tümör mikroçevresindeki davranışlarını daha iyi anlayabilmemiz için kokültür sonrasında makrofaj belirteçlerinin ekspresyon seviyelerinin ölçülmesi gerekmektedir. Makrofajların birbirlerine polarizasyonu bilinmektedir. Böylece kokültür sonrasında makrofajların hangi makrofajlara dönüştüğü hakkında kesin bilgi edinilebilir.
- Tümör mikroçevresi oldukça karmaşıktır. Günümüzde tek tek kanser kök hücrelerini ya da makrofajları hedefleyen tedavileri düşünmek yeterli olmayacaktır. Kanser kök hücreleri ve makrofajları birlikte hedefleyecek tedaviler geliştirmek tümör nüksünü azaltabilir.

- M2 makrofaj benzeri TAM'lar, M1 makrofaj fenotipe yeniden programlanarak osteosarkom kök hücreler için bir tedavi stratejisi olarak kullanılabilir.
- OKH'lerin M0, M1 ve M2 makrofajlar ile kokültür süreleri 24 ve 72. Saatler olarak incelenmiştir. Sonraki çalışmalar için daha uzun deney sürelerinde OKH'lerin canlılığı incelenebilir.
- Yapılan çalışmada yarı kantitatif olarak bilinen immünofloresan boyama yapılmıştır. Bu çalışmanın devamında kantitatif ölçümler için PCR kullanılabilir.
- Bu çalışmada epitelyal mezenkimal geçiş için sadece mezenkimal belirteç olan vimentin ekspresyon seviyelerine bakılmıştır. Sonraki çalışmalarda epitel belirteç olan e-cadherin ve mezenkimal belirteç olan n-cadherin seviyelerine bakılarak osteosarkom kök hücrelerinde epitelyal mezenkimal geçiş daha kapsamlı olarak araştırılabilir.
- Çalışmanın devamında, çeşitli sinyal yolları hedeflenerek kanser metastazını engellemeye yönelik çalışmalar düşünülebilir.
- İleriki çalışmalar için CAR-makrofaj teknolojisi ile kanser nüksünün azaltılması için tümöre hedeflenecek bir immünoterapi stratejisi kullanılmalıdır.

KAYNAKLAR

- Abarrategi, A., Tornin, J., Martinez-Cruzado, L., Hamilton, A., Martinez-Campos, E., & Rodrigo, J. et al. (2016). Osteosarcoma: Cells-of-Origin, Cancer Stem Cells, and Targeted Therapies. *Stem Cells International*, 2016, 1-13. doi: 10.1155/2016/3631764
- Adams, J., & Strasser, A. (2008). Is Tumor Growth Sustained by Rare Cancer Stem Cells or Dominant Clones?. *Cancer Research*, 68(11), 4018-4021. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-07-6334>
- Adhikari AS, Agarwal N, Wood BM, Porretta C, Ruiz B, Pochampally RR, Iwakuma T. CD117 and Stro-1 identify osteosarcoma tumor-initiating cells associated with metastasis and drug resistance. *Cancer Res.* 2010 Jun 1;70(11):4602-12. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-3463>.
- Aguilar-Gallardo, C., & Simón, C. (2013). Cells, Stem Cells, and Cancer Stem Cells. *Seminars In Reproductive Medicine*, 31(01), 005-013. <https://doi.org/10.1055/s-0032-1331792>
- Allavena, P., Digifico, E. & Belgiovine, C. Macrophages and cancer stem cells: a malevolent alliance. *Mol Med* 27, 121 (2021). <https://doi.org/10.1186/s10020-021-00383-3>
- Al-Hajj, M., Wicha, M., Benito-Hernandez, A., Morrison, S., & Clarke, M. (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 100(7), 3983-3988. doi: 10.1073/pnas.0530291100
- Anderson, N. R., Minutolo, N. G., Gill, S., & Klichinsky, M. (2021). Macrophage-Based Approaches for Cancer Immunotherapy. *Cancer research*, 81(5), 1201-1208. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-20-2990>
- Aramini, B., Masciale, V., Grisendi, G., Banchelli, F., D'Amico, R., & Maiorana, A. et al. (2021). Cancer stem cells and macrophages: molecular connections and future perspectives against cancer. *Oncotarget*, 12(3), 230-250. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.27870>
- Babaei, G., Aziz, S. G. G., & Jaghi, N. Z. Z. (2021). EMT, cancer stem cells and autophagy; The three main axes of metastasis. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 133, 110909. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110909>

- Basu-Roy, U., Seo, E., Ramanathapuram, L. *et al.* Sox2 maintains self renewal of tumor-initiating cells in osteosarcomas. *Oncogene* 31, 2270–2282 (2012). <https://doi.org/10.1038/onc.2011.405>
- Basu-Roy U, Bayin NS, Rattanakorn K, Han E, Placantonakis DG, Mansukhani A, Basilico C. Sox2 antagonizes the Hippo pathway to maintain stemness in cancer cells. *Nat Commun.* 2015 Apr 2;6:6411. <https://doi.org/10.1038/ncomms7411>.
- Bejarano, L., Jordão, M. J., & Joyce, J. A. (2021). Therapeutic targeting of the tumor microenvironment. *Cancer discovery*, 11(4), 933-959. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-20-1808>
- Bingle L, Brown NJ, Lewis CE. The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. *J Pathol.* 2002 Mar;196(3):254-65. <https://doi.org/10.1002/path.1027>.
- Bonnet, D., & Dick, J. (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nature Medicine*, 3(7), 730-737. <https://doi.org/10.1038/nm0797-730>
- Boutillier, A. J., & Elsawa, S. F. (2021). Macrophage Polarization States in the Tumor Microenvironment. *International journal of molecular sciences*, 22(13), 6995. <https://doi.org/10.3390/ijms22136995>
- Bradshaw, A., Wickremsekera, A., Tan, S., Peng, L., Davis, P., & Itinteang, T. (2016). Cancer Stem Cell Hierarchy in Glioblastoma Multiforme. *Frontiers In Surgery*, 3. <https://doi.org/10.3389/fsurg.2016.00021>
- Brown, H. K., Tellez-Gabriel, M., & Heymann, D. (2017). Cancer stem cells in osteosarcoma. *Cancer letters*, 386, 189-195. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.11.019>
- Buddingh EP, Kuijjer ML, Duim RA, Bürger H, Agelopoulos K, Myklebost O, Serra M, Mertens F, Hogendoorn PC, Lankester AC, Cleton-Jansen AM. Tumor-infiltrating macrophages are associated with metastasis suppression in high-grade osteosarcoma: a rationale for treatment with macrophage activating agents. *Clin Cancer Res.* 2011 Apr 15;17(8):2110-9. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-2047>
- Chaffer CL, Thompson EW, Williams ED. Mesenchymal to epithelial transition in development and disease. *Cells Tissues Organs.* 2007;185(1-3):7-19. <https://doi.org/10.1159/000101298>.

- Chano, T., Kita, H., Avnet, S., Lemma, S., & Baldini, N. (2018). Prominent role of RAB39A-RXR β axis in cancer development and stemness. *Oncotarget*, 9(11), 9852–9866. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23955>
- Chanput, W., Mes, J. J., & Wichers, H. J. (2014). THP-1 cell line: An in vitro cell model for immune modulation approach. *International Immunopharmacology*, 23(1), 37–45. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2014.08.002>
- Chen, X., Yang, M., Yin, J., Li, P., Zeng, S., Zheng, G., He, Z., Liu, H., Wang, Q., Zhang, F., & Chen, D. (2022). Tumor-associated macrophages promote epithelial-mesenchymal transition and the cancer stem cell properties in triple-negative breast cancer through CCL2/AKT/ β -catenin signaling. *Cell communication and signaling : CCS*, 20(1), 92. <https://doi.org/10.1186/s12964-022-00888-2>
- Chen, Y., Zhang, S., Wang, Q., & Zhang, X. (2017). Tumor-recruited M2 macrophages promote gastric and breast cancer metastasis via M2 macrophage-secreted CHI3L1 protein. *Journal of hematology & oncology*, 10(1), 36. <https://doi.org/10.1186/s13045-017-0408-0>
- Chernoivanenko, I.S., Minin, A.A. & Minin, A.A. Role of vimentin in cell migration. *Russ J Dev Biol* 44, 144–157 (2013). <https://doi.org/10.1134/S1062360413030016>
- Deepak, K. G. K., Vempati, R., Nagaraju, G. P., Dasari, V. R., Nagini, S., Rao, D. N., & Malla, R. R. (2020). Tumor microenvironment: Challenges and opportunities in targeting metastasis of triple negative breast cancer. *Pharmacological research*, 153, 104683. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.104683>
- DeNardo, D. G., Brennan, D. J., Rexhepaj, E., Ruffell, B., Shiao, S. L., Madden, S. F., Gallagher, W. M., Wadhwani, N., Keil, S. D., Junaid, S. A., Rugo, H. S., Hwang, E. S., Jirstrom, K., West, B. L., & Coussens, L. M. (2011). Leukocyte complexity predicts breast cancer survival and functionally regulates response to chemotherapy. *Cancer discovery*, 1(1), 54–67. <https://doi.org/10.1158/2159-8274.CD-10-0028>
- Dijkgraaf, E. M., Heusinkveld, M., Tummers, B., Vogelpoel, L. T., Goedemans, R., Jha, V., ... & van der Burg, S. H. (2013). Chemotherapy Alters Monocyte Differentiation to Favor Generation of Cancer-Supporting M2 Macrophages in the Tumor Microenvironment Effect of Chemotherapy on Tumor Microenvironment. *Cancer research*, 73(8), 2480–2492. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-3542>

- Fujiwara T, Katsuda T, Hagiwara K, Kosaka N, Yoshioka Y, Takahashi RU, Takeshita F, Kubota D, Kondo T, Ichikawa H, Yoshida A, Kobayashi E, Kawai A, Ozaki T, Ochiya T. Clinical relevance and therapeutic significance of microRNA-133a expression profiles and functions in malignant osteosarcoma-initiating cells. *Stem Cells*. 2014 Apr;32(4):959-73. <https://doi.org/10.1002/stem.1618>.
- Gao, J., Liang, Y., & Wang, L. (2022). Shaping polarization of tumor-associated macrophages in cancer immunotherapy. *Frontiers in immunology*, 13, 888713. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.888713>
- Ge Z, Ding S. The Crosstalk Between Tumor-Associated Macrophages (TAMs) and Tumor Cells and the Corresponding Targeted Therapy. *Front Oncol*. 2020 Nov 3;10:590941. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.590941>.
- Gibbs, C., Kukekov, V., Reith, J., Tchigrinova, O., Suslov, O., & Scott, E. et al. (2005). Stem-Like Cells in Bone Sarcomas: Implications for Tumorigenesis. *Neoplasia*, 7(11), 967-976. <https://doi.org/10.1593/neo.05394>
- Glumac PM, LeBeau AM. The role of CD133 in cancer: a concise review. *Clin Transl Med*. 2018 Jul 9;7(1):18. <https://doi.org/10.1186/s40169-018-0198-1>.
- Graney, P. L., Ben-Shaul, S., Landau, S., Bajpai, A., Singh, B., Eager, J., ... & Spiller, K. L. (2020). Macrophages of diverse phenotypes drive vascularization of engineered tissues. *Science advances*, 6(18), eaay6391. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aay6391>
- Grant, C. M., & Kyprianou, N. (2013). Epithelial mesenchymal transition (EMT) in prostate growth and tumor progression. *Translational andrology and urology*, 2(3), 202–211. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2223-4683.2013.09.04>
- Greco N, Schott T, Mu X, Rothenberg A, Voigt C, McGough RL 3rd, Goodman M, Huard J, Weiss KR. ALDH Activity Correlates with Metastatic Potential in Primary Sarcomas of Bone. *J Cancer Ther*. 2014 Mar 31;5(4):331-338. <https://doi.org/10.4236/jct.2014.54040>.
- Guo, W., Li, Y., Pang, W., & Shen, H. (2020). Exosomes: A Potential Therapeutic Tool Targeting Communications between Tumor Cells and Macrophages. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 28(9), 1953–1964. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2020.06.003>

- He A, Qi W, Huang Y, Feng T, Chen J, Sun Y, Shen Z, Yao Y. CD133 expression predicts lung metastasis and poor prognosis in osteosarcoma patients: A clinical and experimental study. *Exp Ther Med*. 2012 Sep;4(3):435-441. <https://doi.org/10.3892/etm.2012.603>.
- He A, Yang X, Huang Y, Feng T, Wang Y, Sun Y, Shen Z, Yao Y. CD133(+) CD44(+) Cells Mediate in the Lung Metastasis of Osteosarcoma. *J Cell Biochem*. 2015 Aug;116(8):1719-29. <https://doi.org/10.1002/jcb.25131>.
- Honoki K, Fujii H, Kubo A, Kido A, Mori T, Tanaka Y, Tsujiuchi T. Possible involvement of stem-like populations with elevated ALDH1 in sarcomas for chemotherapeutic drug resistance. *Oncol Rep*. 2010 Aug;24(2):501-5. https://doi.org/10.3892/or_00000885.
- Izadpanah, S., Shabani, P., Aghebati-Maleki, A., Baghbanzadeh, A., Fotouhi, A., & Bisadi, A. et al. (2019). Prospects for the involvement of cancer stem cells in the pathogenesis of osteosarcoma. *Journal Of Cellular Physiology*, 235(5), 4167-4182. <https://doi.org/10.1002/jcp.29344>
- Joyce, J., Pollard, J. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer* 9, 239–252 (2009). <https://doi.org/10.1038/nrc2618>
- Ju, F., Atyah, MM, Horstmann, N. ve ark. Kanser kök hücre nişinin özellikleri ve terapötik stratejiler. *Kök Hücre Res Ther* 13 , 233 (2022). <https://doi.org/10.1186/s13287-022-02904-1>
- Jubelin, C., Muñoz-Garcia, J., Cochonneau, D., Moranton, E., Heymann, M., & Heymann, D. (2022). Biological evidence of cancer stem-like cells and recurrent disease in osteosarcoma. *Cancer Drug Resistance*. <https://doi.org/10.20517/cdr.2021.130>
- Kidd ME, Shumaker DK, Ridge KM. The role of vimentin intermediate filaments in the progression of lung cancer. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2014 Jan;50(1):1-6. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2013-0314TR>
- Kraljevic Pavelic, S., Sedic, M., Bosnjak, H., Spaventi, S., & Pavelic, K. (2011). Metastasis: new perspectives on an old problem. *Molecular cancer*, 10, 22. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-10-22>
- Lapidot, T., Sirard, C., Vormoor, J., Murdoch, B., Hoang, T., & Caceres-Cortes, J. et al. (1994). A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*, 367(6464), 645-648. <https://doi.org/10.1038/367645a0>
- Li J, Zhong XY, Li ZY, Cai JF, Zou L, Li JM, Yang T, Liu W. CD133 expression in osteosarcoma and derivation of CD133⁺ cells. *Mol Med Rep*. 2013 Feb;7(2):577-84. <https://doi.org/10.3892/mmr.2012.1231>.

- Li, S., & Li, S. (2014). Cancer stem cells and tumor metastasis (Review). *International Journal of Oncology*, 44, 1806-1812. <https://doi.org/10.3892/ijo.2014.2362>
- Li, Y., Xian, M., Yang, B., Ying, M., & He, Q. (2017). Inhibition of KLF4 by Statins Reverses Adriamycin-Induced Metastasis and Cancer Stemness in Osteosarcoma Cells. *Stem cell reports*, 8(6), 1617–1629. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.04.025>
- Lin T, Ding YQ, Li JM. Overexpression of Nanog protein is associated with poor prognosis in gastric adenocarcinoma. *Med Oncol*. 2012 Jun;29(2):878-85. <https://doi.org/10.1007/s12032-011-9860-9>
- Lim, J.R., Mouawad, J., Gorton, O.K. *et al*. Cancer stem cell characteristics and their potential as therapeutic targets. *Med Oncol* 38, 76 (2021). <https://doi.org/10.1007/s12032-021-01524-8>
- Liu F, Li L, Li Y, Ma X, Bian X, Liu X, Wang G, Zhang D. Overexpression of SENP1 reduces the stemness capacity of osteosarcoma stem cells and increases their sensitivity to HSVtk/GCV. *Int J Oncol*. 2018 Nov;53(5):2010-2020. <https://doi.org/10.3892/ijo.2018.4537>.
- Lizárraga-Verdugo, E., Avendaño-Félix, M., Bermúdez, M., Ramos-Payán, R., Pérez-Plasencia, C., & Aguilar-Medina, M. (2020). Cancer Stem Cells and Its Role in Angiogenesis and Vasculogenic Mimicry in Gastrointestinal Cancers. *Frontiers in oncology*, 10, 413. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00413>
- Lo, U.-G., Lee, C.-F., Lee, M.-S., & Hsieh, J.-T. (2017). The Role and Mechanism of Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Prostate Cancer Progression. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(10), 2079. MDPI AG. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.3390/ijms18102079>
- López-Lázaro M. (2015). The migration ability of stem cells can explain the existence of cancer of unknown primary site. Rethinking metastasis. *Oncoscience*, 2(5), 467–475. <https://doi.org/10.18632/oncoscience.159>
- Lv, J., Liu, C., Chen, F. K., Feng, Z. P., Jia, L., Liu, P. J., Yang, Z. X., Hou, F., & Deng, Z. Y. (2021). M2-like tumour-associated macrophage-secreted IGF promotes thyroid cancer stemness and metastasis by activating the PI3K/AKT/mTOR pathway. *Molecular medicine reports*, 24(2), 604. <https://doi.org/10.3892/mmr.2021.12249>
- Mantovani, A., Biswas, S. K., Galdiero, M. R., Sica, A., & Locati, M. (2013). Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. *The Journal of pathology*, 229(2), 176-185. <https://doi.org/10.1002/path.4133>

- Mantovani, A., & Allavena, P. (2015). The interaction of anticancer therapies with tumor-associated macrophages. *Journal of Experimental Medicine*, 212(4), 435-445. <https://doi.org/10.1084/jem.20150295>
- Mantovani A, Marchesi F, Malesci A, Laghi L, Allavena P. Tumour-associated macrophages as treatment targets in oncology. *Nat Rev Clin Oncol*. 2017;14(7):399–416. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2016.217>
- Martins-Neves, S., Lopes, Á., do Carmo, A., Paiva, A., Simões, P., Abrunhosa, A., & Gomes, C. (2012). Therapeutic implications of an enriched cancer stem-like cell population in a human osteosarcoma cell line. *BMC Cancer*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2407-12-139>
- Martins-Neves SR, Corver WE, Paiva-Oliveira DI, van den Akker BE, Briaire-de-Bruijn IH, Bovée JV, Gomes CM, Cleton-Jansen AM. Osteosarcoma Stem Cells Have Active Wnt/ β -catenin and Overexpress SOX2 and KLF4. *J Cell Physiol*. 2016 Apr;231(4):876-86. <https://doi.org/10.1002/jcp.25179>.
- Montanari, M., Rossetti, S., Cavaliere, C., D'Aniello, C., Malzone, M. G., Vanacore, D., Di Franco, R., La Mantia, E., Iovane, G., Piscitelli, R., Muscariello, R., Berretta, M., Perdonà, S., Muto, P., Botti, G., Bianchi, A. A. M., Veneziani, B. M., & Facchini, G. (2017). Epithelial-mesenchymal transition in prostate cancer: an overview. *Oncotarget*, 8(21), 35376–35389. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15686>
- Mortezaee K, Majidpoor J. Roles for macrophage-polarizing interleukins in cancer immunity and immunotherapy. *Cell Oncol (Dordr)*. 2022 Jun;45(3):333-353. <https://doi.org/10.1007/s13402-022-00667-8>.
- Mou, W., Xu, Y., Ye, Y., Chen, S., Li, X., Gong, K., ... & Li, N. (2015). Expression of Sox2 in breast cancer cells promotes the recruitment of M2 macrophages to tumor microenvironment. *Cancer letters*, 358(2), 115-123. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.11.004>
- Murase, M., Kano, M., Tsukahara, T. *et al*. Side population cells have the characteristics of cancer stem-like cells/cancer-initiating cells in bone sarcomas. *Br J Cancer* 101, 1425–1432 (2009). <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605330>

- Nagarsheth, N., Wicha, M. S., & Zou, W. (2017). Chemokines in the cancer microenvironment and their relevance in cancer immunotherapy. *Nature reviews. Immunology*, 17(9), 559–572. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.49>
- Najafi, M., Mortezaee, K., & Ahadi, R. (2019). Cancer stem cell (a) symmetry & plasticity: tumorigenesis and therapy relevance. *Life sciences*, 231, 116520. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.05.076>
- Nusblat LM, Carroll MJ, Roth CM. Crosstalk between M2 macrophages and glioma stem cells. *Cell Oncol (Dordr)*. 2017 Oct;40(5):471-482. <https://doi.org/10.1007/s13402-017-0337-5>
- Park E, Park SY, Sun PL, Jin Y, Kim JE, Jheon S, Kim K, Lee CT, Kim H, Chung JH. Prognostic significance of stem cell-related marker expression and its correlation with histologic subtypes in lung adenocarcinoma. *Oncotarget*. 2016 Jul 5;7(27):42502-42512. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9894>.
- Paulus, P., Stanley, E. R., Schäfer, R., Abraham, D., & Aharinejad, S. (2006). Colony-stimulating factor-1 antibody reverses chemoresistance in human MCF-7 breast cancer xenografts. *Cancer research*, 66(8), 4349-4356. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-3523>
- Peiris-Pagès, M., Martinez-Outschoorn, U., Pestell, R., Sotgia, F., & Lisanti, M. (2016). Cancer stem cell metabolism. *Breast Cancer Research*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/s13058-016-0712-6>
- Santoni M, Massari F, Montironi R, Battelli N. Manipulating macrophage polarization in cancer patients: From nanoparticles to human chimeric antigen receptor macrophages. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*. 2021 Aug;1876(1):188547. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2021.188547>
- Satelli A, Li S. Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy. *Cell Mol Life Sci*. 2011 Sep;68(18):3033-46. <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0735-1>
- Sharen, G., Cheng, H., Hu, X., Miao, J., & Zhao, D. (2022). M1-like tumor-associated macrophages enhance proliferation and anti-apoptotic ability of liver cancer cells via activating the NF- κ B signaling pathway. *Molecular Medicine Reports*, 26(5), 1-10. <https://doi.org/10.3892/mmr.2022.12847>

- Shu, Y., & Cheng, P. (2020). Targeting tumor-associated macrophages for cancer immunotherapy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1874(2), 188434. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2020.188434>
- Sun BO, Fang Y, Li Z, Chen Z, Xiang J. Role of cellular cytoskeleton in epithelial-mesenchymal transition process during cancer progression. *Biomed Rep*. 2015 Sep;3(5):603-610. <https://doi.org/10.3892/br.2015.494>
- Qi L, Yu H, Zhang Y, Zhao D, Lv P, Zhong Y, Xu Y. IL-10 secreted by M2 macrophage promoted tumorigenesis through interaction with JAK2 in glioma. *Oncotarget*. 2016 Nov 1;7(44):71673-71685. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12317>
- Qi XT, Li YL, Zhang YQ, Xu T, Lu B, Fang L, Gao JQ, Yu LS, Zhu DF, Yang B, He QJ, Ying MD (2018) KLF4 functions as an oncogene in promoting cancer stem cell-like characteristics in osteosarcoma cells. *Acta Pharmacol Sin*. <https://doi.org/10.1038/s41401-018-0050-6>
- Saini, V., Hose, C. D., Monks, A., Nagashima, K., Han, B., Newton, D. L., Millione, A., Shah, J., Hollingshead, M. G., Hite, K. M., Burkett, M. W., Delosh, R. M., Silvers, T. E., Scudiero, D. A., & Shoemaker, R. H. (2012). Identification of CBX3 and ABCA5 as putative biomarkers for tumor stem cells in osteosarcoma. *PloS one*, 7(8), e41401. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041401>
- Sainz, B., Carron, E., Vallespinós, M., & Machado, H. (2016). Cancer Stem Cells and Macrophages: Implications in Tumor Biology and Therapeutic Strategies. *Mediators Of Inflammation*, 2016, 1-15. <https://doi.org/10.1155/2016/9012369>
- Schiavone, K., Garnier, D., Heymann, M. F., & Heymann, D. (2019). The heterogeneity of osteosarcoma: the role played by cancer stem cells. *Stem Cells Heterogeneity in Cancer*, 187-200. https://doi.org/10.1007/978-3-030-14366-4_11
- Shojaei, F., Wu, X., Malik, A. *et al*. Tumor refractoriness to anti-VEGF treatment is mediated by CD11b⁺Gr1⁺ myeloid cells. *Nat Biotechnol* 25, 911–920 (2007). <https://doi.org/10.1038/nbt1323>
- Shree T, Olson OC, Elie BT, Kester JC, Garfall AL, Simpson K, Bell-McGuinn KM, Zabor EC, Brogi E, Joyce JA. Macrophages and cathepsin proteases blunt chemotherapeutic response in breast cancer. *Genes Dev*. 2011 Dec 1;25(23):2465-79. <https://doi.org/10.1101/gad.180331.111>
- Siclari, V., & Qin, L. (2010). Targeting the osteosarcoma cancer stem cell. *Journal Of Orthopaedic Surgery And Research*, 5(1), 78. <https://doi.org/10.1186/1749-799x-5-78>

- Siu, M., Wong, E., Kong, D. *et al.* Stem cell transcription factor NANOG controls cell migration and invasion via dysregulation of E-cadherin and FoxJ1 and contributes to adverse clinical outcome in ovarian cancers. *Oncogene* 32, 3500–3509 (2013). <https://doi.org/10.1038/onc.2012.363>
- Song, W., Mazzei, R., Yang, T., & Gobe, G. C. (2017). Translational Significance for Tumor Metastasis of Tumor-Associated Macrophages and Epithelial-Mesenchymal Transition. *Frontiers in immunology*, 8, 1106. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01106>
- Sousa, S., Brion, R., Lintunen, M. *et al.* Human breast cancer cells educate macrophages toward the M2 activation status. *Breast Cancer Res* 17, 101 (2015). <https://doi.org/10.1186/s13058-015-0621-0>
- Su Y, Zhou Y, Sun YJ, Wang YL, Yin JY, Huang YJ, Zhang JJ, He AN, Han K, Zhang HZ, Yao Y, Lv XB, Hu HY. Macrophage-derived CCL18 promotes osteosarcoma proliferation and migration by upregulating the expression of UCA1. *J Mol Med (Berl)*. 2019 Jan;97(1):49-61. <https://doi.org/10.1007/s00109-018-1711-0>.
- Tekin, C., Aberson, H.L., Waasdorp, C. *et al.* Macrophage-secreted MMP9 induces mesenchymal transition in pancreatic cancer cells via PAR1 activation. *Cell Oncol*. 43, 1161–1174 (2020). <https://doi.org/10.1007/s13402-020-00549-x>
- Thiery, J. Epithelial–mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2, 442–454 (2002). <https://doi.org/10.1038/nrc822>
- Tian, J., Li, X., Si, M., Liu, T., & Li, J. (2014). CD271+ osteosarcoma cells display stem-like properties. *PloS one*, 9(6), e98549. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098549>
- Tirino V, Desiderio V, d'Aquino R, De Francesco F, Pirozzi G, Galderisi U, et al. (2008) Detection and Characterization of CD133⁺ Cancer Stem Cells in Human Solid Tumours. *PLoS ONE* 3(10): e3469. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003469>
- Tirino V, Desiderio V, Paino F, De Rosa A, Papaccio F, Fazioli F, Pirozzi G, Papaccio G. Human primary bone sarcomas contain CD133⁺ cancer stem cells displaying high tumorigenicity in vivo. *FASEB J*. 2011 Jun;25(6):2022-30. <https://doi.org/10.1096/fj.10-179036>.
- Tirino, V., Desiderio, V., Paino, F., De Rosa, A., Papaccio, F., & La Noce, M. et al. (2012). Cancer stem cells in solid tumors: an overview and new approaches for their isolation and characterization. *The FASEB Journal*, 27(1), 13-24. <https://doi.org/10.1096/fj.12-218222>

- Vasefifar, P., Motafakkerazad, R., Maleki, L. A., Najafi, S., Ghrobaninezhad, F., Najafzadeh, B., ... & Baradaran, B. (2022). Nanog, as a key cancer stem cell marker in tumor progression. *Gene*, 827, 146448. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2022.146448>
- Wang, M. L., Chiou, S. H., & Wu, C. W. (2013). Targeting cancer stem cells: emerging role of Nanog transcription factor. *OncoTargets and therapy*, 6, 1207–1220. <https://doi.org/10.2147/OTT.S38114>
- Wang L, Park P, Zhang H, La Marca F, Lin CY. Prospective identification of tumorigenic osteosarcoma cancer stem cells in OS99-1 cells based on high aldehyde dehydrogenase activity. *Int J Cancer*. 2011 Jan 15;128(2):294-303. <https://doi.org/10.1002/ijc.25331>.
- Wei, C., Yang, C., Wang, S., Shi, D., Zhang, C., Lin, X., Liu, Q., Dou, R., & Xiong, B. (2019). Crosstalk between cancer cells and tumor associated macrophages is required for mesenchymal circulating tumor cell-mediated colorectal cancer metastasis. *Molecular cancer*, 18(1), 64. <https://doi.org/10.1186/s12943-019-0976-4>
- Wu, T., & Dai, Y. (2017). Tumor microenvironment and therapeutic response. *Cancer letters*, 387, 61-68. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.01.043>
- Wu, S., Du, Y., Beckford, J., & Alachkar, H. (2018). Upregulation of the EMT marker vimentin is associated with poor clinical outcome in acute myeloid leukemia. *Journal of translational medicine*, 16(1), 170. <https://doi.org/10.1186/s12967-018-1539-y>
- Xi X, Wu Q, Bao Y, Lin M, Zhong X, Dai X, Lin H. Overexpression of TBL1XR1 confers tumorigenic capability and promotes recurrence of osteosarcoma. *Eur J Pharmacol*. 2019 Feb 5;844:259-267. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2018.12.013>
- Xiao, Y., & Yu, D. (2021). Tumor microenvironment as a therapeutic target in cancer. *Pharmacology & therapeutics*, 221, 107753. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2020.107753>
- Xu HY, Fang W, Huang ZW, Lu JC, Wang YQ, Tang QL, Song GH, Kang Y, Zhu XJ, Zou CY, Yang HL, Shen JN, Wang J. Metformin reduces SATB2-mediated osteosarcoma stem cell-like phenotype and tumor growth via inhibition of N-cadherin/NF-kB signaling. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2017 Oct;21(20):4516-4528. PMID: 29131265.
- Xun, J., Du, L., Gao, R., Shen, L., Wang, D., Kang, L., Chen, C., Zhang, Z., Zhang, Y., Yue, S., Feng, S., Xiang, R., Mi, X., & Tan, X. (2021). Cancer-derived exosomal miR-138-

- 5p modulates polarization of tumor-associated macrophages through inhibition of KDM6B. *Theranostics*, 11(14), 6847–6859. <https://doi.org/10.7150/thno.51864>
- Ye, J., Yang, Y., Dong, W., Gao, Y., Meng, Y., Wang, H., Li, L., Jin, J., Ji, M., Xia, X., Chen, X., Jin, Y., & Liu, Y. (2019). Drug-free mannosylated liposomes inhibit tumor growth by promoting the polarization of tumor-associated macrophages. *International journal of nanomedicine*, 14, 3203–3220. <https://doi.org/10.2147/IJN.S207589>
- Yan, G., Lv, Y., & Guo, Q. (2016). Advances in osteosarcoma stem cell research and opportunities for novel therapeutic targets. *Cancer Letters*, 370(2), 268-274. doi: 10.1016/j.canlet.2015.11.003
- Yang, L., Zhang, Y. Tumor-associated macrophages: from basic research to clinical application. *J Hematol Oncol* 10, 58 (2017). <https://doi.org/10.1186/s13045-017-0430-2>
- Yang M, Yan M, Zhang R, Li J, Luo Z. Side population cells isolated from human osteosarcoma are enriched with tumor-initiating cells. *Cancer Sci*. 2011 Oct;102(10):1774-81. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2011.02028.x>.
- Yao, Z., Zhang, J., Zhang, B., Liang, G., Chen, X., Yao, F., ... & Yang, B. (2018). Imatinib prevents lung cancer metastasis by inhibiting M2-like polarization of macrophages. *Pharmacological research*, 133, 121-131.
- Yao, R. R., Li, J. H., Zhang, R., Chen, R. X., & Wang, Y. H. (2018). M2-polarized tumor-associated macrophages facilitated migration and epithelial-mesenchymal transition of HCC cells via the TLR4/STAT3 signaling pathway. *World journal of surgical oncology*, 16(1), 9. <https://doi.org/10.1186/s12957-018-1312-y>
- Yu, L., Liu, S., Zhang, C., Zhang, B., Simões, B. M., Eyre, R., Liang, Y., Yan, H., Wu, Z., Guo, W., & Clarke, R. B. (2013). Enrichment of human osteosarcoma stem cells based on hTERT transcriptional activity. *Oncotarget*, 4(12), 2326–2338. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.1554>
- Yuan Ye, Mengsi Zhang, Guangning Yan, Qinghua Ma, Zexuan Yan, Lihong Wang, Kaidi Yang, Deyu Guo. Nanog promotes stem-like traits of glioblastoma cells. *Front. Biosci. (Landmark Ed)* 2021, 26(3), 552–565. <https://doi.org/10.2741/4907>

- Zhang D, Zhao Q, Sun H, Yin L, Wu J, Xu J, He T, Yang C, Liang C. Defective autophagy leads to the suppression of stem-like features of CD271⁺ osteosarcoma cells. *J Biomed Sci.* 2016 Nov 18;23(1):82. doi: 10.1186/s12929-016-0297-5.
- Zhang X, Zhu M, Hong Z, Chen C. Co-culturing polarized M2 Thp-1-derived macrophages enhance stemness of lung adenocarcinoma A549 cells. *Ann Transl Med.* 2021 Apr;9(8):709. <https://doi.org/10.21037/atm-21-1256>
- Zhang, X., Cao, G., Diao, X., Bai, W., Zhang, Y., & Wang, S. (2022). Vimentin Protein In Situ Expression Predicts Less Tumor Metastasis and Overall Better Survival of Endometrial Carcinoma. *Disease Markers*, 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/5240046>
- Zhang, Y., Zou, J. & Chen, R. An M0 macrophage-related prognostic model for hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer* 22, 791 (2022). <https://doi.org/10.1186/s12885-022-09872-y>

TEŞEKKÜR

Her daim bilimin ışığında gitmemde en önemli itici gücüm olan ve bu yolda örnek aldığım, sonsuz saygı ve sevgi duyduğum Gazi Mustafa Kemal ATATÜRK'e

Tez çalışmamda, verdiği fikirler, yol göstericiliği, öğreticiliği, sabrı, her türlü sorumda ve sorunumda bana destek oluşu ile yanımda olan, laboratuvarında çalışma fırsatı sağlayan tez danışmanım, değerli hocam Doç Dr. Aylin ŞENDEMİR'e,

Yüksek lisans eğitimim boyunca kattığı bilgiler ve her türlü akademik sorunumda destek olup en hızlı şekilde çözen değerli hocam Prof. Dr. Yiğit UYANIKGİL'e,

Makrofajlar konusundaki deneyimini benimle paylaşan ve desteğini esirgemeyen değerli çalışma arkadaşım Zehra Gül MORÇİMEN'e,

Laboratuvardaki çalışmalarım boyunca desteğini esirgemeyen değerli çalışma arkadaşım Ecenaz Merve NAMLI'ya,

Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü, Biyomalzemeler ve 3 Boyutlu Biyoarafazlar Laboratuvarı'nda bulunan tüm arkadaşlarıma,

Varlığını her an hissettiğim, bilimsel araştırmalarıma büyük bir tutkuyla bağlanmamın en büyük nedeni olan akciğer kanserinden kaybettiğim canım babama, bu hayattaki en kıymetlim olan ve bilime olan desteği ve merakı ile hep yanımda olan anneme, desteğini her an hissettiğim canım ağabeyime,

Uzarlarda olup varlığını en yakında hissettiğim herkese çok teşekkür ederim.

İzmir, 20.02.2023

ASENA BERŞAN ARICIOĞLU

ÖZGEÇMİŞ

ASENA BERŞAN ARICIOĞLU

EĞİTİM

2020 - 2023 Yüksek Lisans Ege Üniversitesi, Kök Hücre Bölümü, İzmir, Türkiye

2014 - 2020 Lisans Üsküdar Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik (İngilizce) Bölümü, İstanbul, Türkiye

2009 - 2013 Lise Derici Mustafa Gürbüz Anadolu Lisesi, Kuşadası, Aydın, Türkiye