

ONUR ETGÜ

İMMÜNOLOJİ ANABİLİM DALI YÜKSEK LİSANS TEZİ

2022



T.C.  
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIP FAKÜLTESİ İMMÜNOLOJİ  
ANABİLİM DALI



**MEME KANSERİ ALT-GRUPLARINDA  
MONOSİT/MAKROFAJ/ALVEOLAR MAKROFAJ ARASI  
ETKİLEŞİMLERİN METASTAZ VE  
İMMÜN MODÜLASYON ÜZERİNE ETKİLERİ**

**ONUR ETGÜ**

**(YÜKSEK LİSANS TEZİ)**

**BURSA-2022**



T.C.  
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIP FAKÜLTESİ İMMÜNOLOJİ  
ANABİLİM DALI



**MEME KANSERİ ALT-GRUPLARINDA  
MONOSİT/MAKROFAJ/ALVEOLAR MAKROFAJ ARASI  
ETKİLEŞİMLERİN METASTAZ VE  
İMMÜN MODÜLASYON ÜZERİNE ETKİLERİ**

**ONUR ETGÜ**

**(YÜKSEK LİSANS TEZİ)**

**DANIŞMAN:**

**Prof.Dr. Haluk Barbaros ORAL**

**BURSA-2022**

**T.C.  
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ETİK BEYANI**

Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum ‘‘MEME KANSERİ ALT-GRUPLARINDA MONOSİT/MAKROFAJ/ALVEOLAR MAKROFAJ ARASI ETKİLEŞİMLERİN METASTAZ VE İMMÜN MODÜLASYON ÜZERİNE ETKİLERİ’’ adlı çalışmanın, proje safhasından sonuçlanmasına kadar geçen bütün süreçlerde bilimsel etik kurallarına uygun bir şekilde hazırlandığını ve yararlandığım eserlerin kaynaklar bölümünde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir ve beyan ederim.

**ONUR ETGÜ**

**25.06.2022**

**TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU**

25/06/22

**Adı Soyadı:** Onur ETGÜ

**Anabilim Dalı:** Tıp-İmmünoloji

**Tez Konusu:** MEME KANSERİ ALT-GRUPLARINDA MONOSİT/MAKROFAJ/ALVEOLAR MAKROFAJ ARASI ETKİLEŞİMLERİN METASTAZ VE İMMÜN MODÜLASYON ÜZERİNE ETKİLERİ

<b><u>ÖZELLİKLER</u></b>	<b><u>UYGUNDUR</u></b>	<b><u>UYGUN DEĞİLDİR</u></b>	<b><u>ACIKLAMA</u></b>
Tezin Boyutları	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Dış Kapak Sayfası	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
İç Kapak Sayfası	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Kabul Onay Sayfası	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Sayfa Düzeni	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
İçindekiler Sayfası	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Yazı Karakteri	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Satır Aralıkları	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Başlıklar	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Sayfa Numaraları	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Eklerin Yerleştirilmesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Tabloların Yerleştirilmesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Kaynaklar	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

**DANIŞMAN ONAYI**

**Unvanı Adı Soyadı:** Prof Dr. H. Barbaros ORAL

**İmza:**

## İÇİNDEKİLER

<b>ETİK BEYANI</b> .....	<b>II</b>
<b>KABUL ONAY</b> .....	<b>III</b>
<b>TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU</b> .....	<b>IV</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>V</b>
<b>TÜRKÇE ÖZET</b> .....	<b>VII</b>
<b>İNGİLİZCE ÖZET</b> .....	<b>VIII</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	<b>2</b>
2.1 Karsiyogenez .....	2
2.2. Tümör İmmünolojisi .....	3
2.3 Meme Kanseri .....	6
2.4 Meme Kanseri Metastazı.....	9
2.5 Meme Kanseri Kök Hücreleri .....	10
2.6 Meme Kanseri ve Miyeloid Hücreler .....	12
2.7 Meme Kanseri ve Monosit/Makrofaj İlişkisi .....	16
2.8 Doku Yerleşik Makrofajlar .....	19
2.9 Akciğer ve Doku Yerleşik Makrofajlar .....	20
<b>3. GEREÇ ve YÖNTEM</b> .....	<b>22</b>
3.1 Çalışmada Kullanılan Maddeler .....	22
3.2 Hazırlanan Tamponlar ve Çözeltiler .....	22
3.3. Hücre Hatları İle İn-vitro Çalışmaların Planlanması .....	23
3.3.1 Hücre Hatlarının Kültürü.....	23
3.3.1.1 Meme Kanseri Hücre Hatlarının Kültürü .....	23
3.3.1.2 Monosit/Makrofaj/Alveolar Makrofajların Polarizasyonu ve Kültürü .....	24
3.3.2 Monosit/Makrofaj/Alveolar Makrofajların Karakterizasyonu .....	26
3.3.2.1 Flow Sitometri Yöntemi İle Monosit/Makrofaj/Alveolar Makrofajların Karakterizasyonu.....	26
3.3.2.2 Morfolojik Analizler İle Monosit/Makrofaj/Alveolar Makrofajların Karakterizasyonu .....	27
3.4 Ko-kültür Deneyleri.....	28
3.5 Floresan Aktive Hücre Saflaştırma (FACS) Yöntemi .....	29
3.6 EMG/MEG Değişimlerinin CD24/CD44 Düzeyi İle Belirlenmesi .....	30
3.7 İnvazyon Testi İle EMG/MEG Değişimlerinin İncelenmesi.....	30
3.8 İstatiksel Analiz .....	31
<b>4. BULGULAR</b> .....	<b>32</b>
4.1 Alveolar Makrofaj Benzeri Hücre Hattının (Al-Maq) Seçilimi ve Karakterizasyonu .....	32
4.2 Meme Kanseri Hücre Hatları Ve Monosit/Makrofaj/Alveolar Makrofaj-Benzeri Hücre Alt-Gruplarının Ko-Kültür Deneyleri.....	40
<b>5. TARTIŞMA ve SONUÇ</b> .....	<b>66</b>
<b>6. KAYNAKLAR</b> .....	<b>70</b>
<b>7. SİMGELER VE KISALTMALAR</b> .....	<b>84</b>
<b>8. EKLER</b> .....	<b>87</b>
<b>9. TEŞEKKÜR</b> .....	<b>88</b>
<b>10. ÖZGEÇMİŞ</b> .....	<b>89</b>

## TÜRKÇE ÖZET

Meme kanseri kadın kanserleri arasında birinci sırada yer almaktadır. İlk olarak akciğere olmakla beraber, kemik, karaciğer ve beyin metastazı görülür. Kanser kök hücresi/kanser başlatıcı hücrelerin metastazdan sorumlu olduğu ve primer meme tümöründe bulunan kanser kök hücresi popülasyon ve yüzdesinin bu yayılımda sorumlu olduğu ileri sürülmektedir. Kanser kök hücresi ve immün modülasyon/kaçış ile ilgili birçok çalışma literatürde bulunmakla beraber, monosit/makrofaj/doku yerleşik makrofajları ve kanser kök hücresi arasındaki ilişki henüz bilinmemektedir. Ayrıca, akciğer doku yerleşik makrofajları ile ilgili yapılacak çalışmalarda bu hücreler için bir hücre hattı mevcut değildir. İlgili tez kapsamında, monositik bir hücre hattı olan THP-1'den, spontan seçim ile alveolar makrofaj benzeri bir hücre hattı (Al-Maq/D6P30-DAİSY5) oluşturulmuştur. Bu hücre hattı CD206, CD163, CD169, CD11b, CD11c, CD14, HLA-DR, CD16 ve CD68 belirteçleri kapsamında karakterize edilmiştir. İlgili hücre hattı seçilirken farklı yüzey ve ekstrasellüler matris bileşenleri kullanılarak, farklılaşmayı en çok destekleyen koşul ile devam edilmiştir. Oluşturulan alveolar makrofaj benzeri hücre hattı meme kanseri hücre hatları ile ko-kültüre edilerek CD44/CD24 belirteç düzeylerindeki değişim araştırılmıştır.

Kullanılan meme kanseri hücre hatlarından MDA-MB-468 ve T47D hücrelerinin "karışık tip" kanser kök hücresi alt-klonlarını bulundurduğu ve en çok bu hücrelerin alveolar makrofaj karakterini desteklediği görülmüştür. BT474 hücrelerinin CD14+ monositik alt-grupları arttırırken, CD169 belirtecini en az uyaran hücre hattı olduğu belirlendi.

Tüm bu sonuçlar neticesinde, kanser kök hücresi alt-tiplerinin farklı monosit/makrofaj ve doku yerleşik makrofaj alt-grubunu destekleyebileceği belirlendi. Bu veriler ışığında ileri mekanistik çalışmalar planlanarak mekanizmanın aydınlanması hedeflenmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Meme kanseri, kanser kök hücresi, doku yerleşik makrofajlar, alveolar makrofaj, kanser ilişkili immün yanıtlar

## İNGİLİZCE ÖZET

### THE EFFECT OF MONOCYTE/MACROPHAGE/ALVEOLAR MACROPHAGE AXIS EFFECT ON METASTASIS AND İMMUNE MODULATION İN BREAST CANCER SUBTYPES

Breast cancer is one of the most common cancer type among women. Lung is still the most common site of metastasis for breast cancer, followed by bone, liver and brain metastasis. It has been suggested that cancer stem cell/cancer initiating cells are responsible for metastasis of cancer and the population and/or percentage of cancer stem cells found in the primary tumor are responsible for this metastasis. Although there are many studies about cancer stem cell and their immune modulation/evasion in the literature, the axis between monocyte/macrophage/tissue resident macrophages and cancer stem cells is unknown. In addition, a cell line is not available for future studies on lung tissue resident macrophages. Within the scope of the thesis, an alveolar macrophage-like cell line (Al-Maq/D6P30-DAISY5) was generated from a monocytic cell line, THP-1, by spontaneous selection. This cell line has been characterized by using the markers CD206, CD163, CD169, CD11b, CD11c, CD14, HLA-DR, CD16 and CD68. While performing the spontaneous selection of the alveolar macrophage-like cell line, the condition that most favors differentiation was selected by using different surface and extracellular matrix components. The alveolar macrophage-like cell line was co-cultured with breast cancer cell lines to investigate the change in CD44/CD24 surface expression levels. Among the breast cancer cell lines used, MDA-MB-468 and T47D cells contained "mixed type" cancer stem cell subclones and mostly supported the alveolar macrophage character of these cells. While BT474 cells increased CD14+ monocyte subsets, it was determined that they were the cell line that stimulates the CD169 expression at least.

As a results, it was determined that cancer stem cell subtypes could support different monocyte/macrophage and tissue resident macrophage subsets. With these data, it is aimed to elucidate the mechanism by planning mechanistic and functional studies.

**Keywords:** Breast cancer, breast cancer stem cell, tissue-resident macrophages, alveolar macrophage, cancer-associated immune responses

## 1. GİRİŞ

Kanser ilişkili ölümler dünyada hala ilk sıralarda yer almakta olup, meme kanseri kadın kanserleri arasında ilk sırada yer almaktadır. Kanser ile ilgili tedavi yaklaşımlarından kemoterapi, radyoterapi ve cerrahi konvansiyonel tedavi olarak halen uygulanmakta olup, metastatik odakların eliminasyonunda yetersiz kalmaktadır. Son yıllarda kanserin bireye özgü bir immün sistem hastalığı olarak tanımlanmaya başlamasından beri bakış açısı değiştirilerek bu alanda yapılan çalışmalar hızlandırılmıştır. Bu kapsamda immün sistemin birçok hücre veya molekülü denenmekte olup, elde edilen bazı sonuçlar umut vaad etmektedir.

Meme kanserinde metastaz genellikle akciğer, kemik, karaciğer ve beyne olmakla beraber, özellikle, üçlü negatif meme kanseri (triple negative breast cancer; TNBC) alt-gruplarında ilk metastatik organ olarak tümörün akciğeri tercih ettiği bildirilmiştir. Bu mekanizma ile ilgili çeşitli spekülasyonlar bulunsa da mekanizma tam olarak aydınlatılamamıştır.

Bu tez çalışmasında meme kanseri akciğer metastaz biyolojisi ile ilgili immün mekanizmayı aydınlatabilmek amacı ile, monosit/makrofaj/alveolar makrofaj ve meme kanseri etkileşimi sonucunda gelişen alt-klonların metastatik karakterleri ve immün modülasyon kapasiteleri incelenmiştir. Bu kapsamda kullanılan alveolar makrofaj benzeri hücreleri ise, monosit kaynaklı bir hücre hattından alt-klon seçilimi ile elde edilerek karakterize edilmiş ve kullanılmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1 Karsinogenez

Biyolojik sistemlerden hayvanlar alemine ait metazoalar hücrenel organizasyon ve gelişimsel farklılıkları açısından oldukça karmaşık ve çeşitlilik gösteren bir yapıya sahiptir. Evrimsel süreçte kazanmış oldukları bu *plastisite* yetenekleri sayesinde birçok özelleşmiş dokunun şekillenmesi sağlanmıştır. Ayrıca, organizmanın ve dokuların devamlılığı için birçok hücrenin farklı kapasitelerde proliferasyon ve kendini yenileme özelliği mevcuttur. Bu süreçlerin bir parçası olan mitoz bölünme esnasında hücrenin genetik materyalinin replikasyonu, korunumu, modifikasyonları vb., süreçlerin oldukça dikkatli kontrol edilmesi gerekmektedir. Hücrenin genetik veya epigenetik düzenlemeler sırasında geçirdiği mutasyonlar birçok kontrol mekanizması ile elimine edilebilmektedir. Fakat, hücrede ardarda meydana gelen birikimli, başlatıcı ve ilerletici mutasyonlar sonucunda hücre i) dış sinyallerden bağımsız proliferasyon kapasitesine sahip, ii) büyüme ve çoğalma sinyallerine aşırı duyarlı hale gelmiş, iii) kontak inhibisyon yeteneğini kaybetmiş, iv) bulunduğu organın genetik kimliğinden uzaklaşmaya başlamış, v) epitelyal-mezenkimal dönüşüm (*Epithelial-to-Mesenchymal Transition*, EMT) yeteneği kazanarak (Dongre, & Weinberg, 2019; Roche, 2018) başka organlara gidip orada yerleşen ve çoğalmaya devam eden, vi) neoanjyogenez uyarma kapasitesi sayesinde dolaşıma geçebilen ve zamanla bir çok organda baskın hale gelerek ilgili organların kendi fonksiyonlarını yapamaz hale gelmesini sağlayan bir ‘‘istilacı fenotipe’’ dönüşür. Bulunduğu organda başlamış olduğu anormal ökaryotik hücre davranış karakteri ile ilk olarak sadece bu organda sınırlı ve aşırı proliferasyon yeteneğine sahip bu kanser hücresi ‘‘benign tümör’’ olarak adlandırılır. Fakat, zaman içerisinde bu hücrede birikmeye başlayan ve çeşitli sebepler ile tamir edilemeyen mutasyonlar sebebi ile hücre hem bulunduğu organın fonksiyonlarına zarar vermeye başlar hem de geçirmiş olduğu başkalaşım neticesinde oluşturduğu alt-klonların bazıları anjyogenez ve metastaz yeteneği kazanmış hücrelere dönüşerek EMT kapasiteleri sayesinde başka organlara giderek

buralarda kolonize olurlar ve fonksiyon kaybına sebep verirler. Hem primer organda proliferasyona ek olarak diğer karakterleri kazanan hem de diğer organlara yayılım gösteren bu hücrelere ise ‘‘malign tümör’’ denilmektedir (Dongre, & Weinberg, 2019; Roche, 2018).

Kanser patolojisindeki en önemli ve ölümlere birebir korele özellik metastatik karakterdir. Primer tümörden kaynaklanan kanser hücreleri farklı organlara da giderek bu organların fonksiyonlarının işlevsiz hale gelmesine sebep olur. Günümüzde kanser vakaları Amerikan Kanser Derneği'nin (American Cancer Society, ACS) 2022 yılı verilerine göre, 1,918,030 yeni kanser vakası ve 609,360 adet kanser ilişkili ölüm raporlanmıştır. 2014-2018 yılları arasında gerçekleştirilmiş istatistiksel çalışmalar ve popülasyon temelli analizlere bakıldığında meme kanseri vakalarının görülme sıklığının yıllık %0,5'lik artış gösterdiği raporlanmıştır. Meme kanseri kaynaklı ölümlere bakıldığında ise, hafif bir azalma olduğu raporlanmış ve bunun sebebi olarak da tarama programları ile erken teşhislerin artışı, hedefli ve yenilikçi akıllı tedaviler ve immünoterapi başarısının artışı gösterilmiştir (Siegel, Miller, Fuchs, & Jemal, 2022).

Dünyada ölümlere sonuçlanan hastalıklar listesinde ilk olarak kalp ve damar hastalıkları ve daha sonra kanser yer almaktadır. Kanser zor bir tedavi prosedürüne sahiptir ve günümüzde çağın hastalığı olarak bildirilir. Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) 2020 verilerine göre yıl içerisinde 19,3 milyon yeni kanser vakası görülürken; 10 milyon ölüm kanserden dolayı meydana gelmiştir. Uluslararası Kanser Araştırma Derneği (IARC) verilerine göre, meme kanseri görülme sıklığı en yüksek olan akciğer kanserini geçmiştir (Sung ve ark., 2021).

## **2.2 Tümör İmmünolojisi**

Karsinogenez süreci, çoklu ve birikimli bir patoloji ile tanımlanmış olup, tüm karakteristik özelliklerini gösterebilmesi için, immün yanıtın kaçması gereklidir. İmmün sistem tüm organizmanın kontrolünü sağlayan bir ağ sistemidir. Karsinogenez süreci ile beraber hem tümör hücreleri hem de immün sistem hücreleri karşılıklı olarak seçilime uğrarlar. Bu seçim sırasında, immün sistem hücreleri tarafından tanınamayan kanser hücreleri, metastaz ve immün baskılama süreçlerinde yer alır ve

hayatta kalmaya devam eder (Dongre, & Weinberg, 2019; Blomberg, Spagnuolo, & Visser, 2018).

Tümör mikroçevresi; içerisinde farklı alt-klonları barındıran kanser hücrelerinin, ekstraselüler matris bileşenlerinin ve doğal/adaptif immün sistem hücrelerini bulunduran heterojen bir yapıdır. Primer tümörde kanser hücreleri büyüyüp, farklılaşırken hali hazırda var olan ve infltre olan immün sistem komponentleri tümörün metastatik karakter kazanmasında oldukça öneme sahiptir. Karsinogenez sürecindeki immün gözetimden kaçış tümör mikroçevresinde başlayıp, periferde (dalak, kemik iliği, kan ve metastatik organ) de oldukça etkili olduğu için kanser hücreleri uygun koşullarda metastaz sürecine katılabilmektedir (Dongre, & Weinberg, 2019).

Karsinogenez sürecinde immün sistemin hem tümör büyümesini ilerletici hem de engelleyici iki yönlü bir yanıt vermektedir. Tümör ve immün sistem arasındaki bu ilişki; tümörün algılanıp, ortadan kaldırılması yönünde olabileceği gibi karşılıklı eliminasyon sonucunda ortaya çıkan tümör hücresi alt-klonları immün sistemden kaçıp ve baskılama fonksiyonları da kazanabilir. Bu çift taraflı etki; immün sistem hücreleri, kanser hücreleri, stromal hücreler ve soluble faktörler arasındaki etkileşim sonucu oluşmaktadır (Dongre, & Weinberg, 2019; Ferguson, Diaz, & Reya, 2021; Keibel, Singh, & Sharma, 2009; Kumar, Patel, Tcyganov, & Gabrilovich, 2016) Dongre, & Weinberg, 2019). ‘‘3E Kuralı’’ olarak açıklanmaya çalışılan bu mekanizma eliminasyon (*elimination, E*), denge (*equilibrium, E*) ve kaçış (*escape, E*) aşamalarından oluşmaktadır (Dunn, Bruce, Ikeda, Old, & Schreiber, 2004). İmmün sistem tarafından tanınabilen kanser hücre klonları öldürülürken (eliminasyon), hayatta kalabilen klonlar ve immün sistem hücreleri bir süre dengede kalmaktadır (*equilibrium*). Bu kanser hücre klonları daha dirençli fenotipte olup, immün sistemi pro-tümör yönde farklılaştırarak veya baskılayarak immün kaçış mekanizmaları (*escape*) geliştirmektedirler (Dunn ve ark., 2004, Kim, Emi, & Tanabe, 2007). Genelde eliminasyon aşamasında anti-tümör immün yanıtlar için CD8+ sitotoksik T lenfositler (*cytotoxic T cells*), doğal öldürücü hücreler (*natural killer, NK*) ve M1 tip makrofajlar etkili rol oynamaktadırlar. Aynı zamanda eliminasyon aşamasında yüksek oranda salgılanan IFN- $\gamma$  sitokini ile makrofajların M1 yönünde polarize olduğu ve IL-12, IL-23, IL-6 ve TNF-a gibi sitokinleri salgıladıkları bilinmektedir (Dunn ve ark., 2004,

Kim ve ark., 2007). Fakat, makrofajlar ortamda gelişen immün yanıt sonucu M2 makrofajlara da polarize olabilmekte ve tümör ilişkili makrofajlar (TAM) (*Tumor associated macrophages*) olarak nitelendirilen bu hücreler tümörün büyümesini destekleyebilmektedirler (Allavena, Sica, Solinas, Porta, & Mantovani, 2008). Bu hücreler genel olarak IL-4 ve IL-13 gibi sitokinlerle polarize olmakta ve pro-tümörjenik özellik kazanıp, yüksek oranda IL10, TGF-beta salgılamaktadırlar (Allavena ve ark., 2008). Ayrıca, CD8+ sitotoksik T hücrelerin aktivasyonunu engelleyip, CD4+ hücrelerin düzenleyici T (Treg) (*Regulatory T*) hücrelerine dönüşümünü de desteklemektedirler (Awad, De Vlaeminck, Maebe, Goyvaerts, & Breckpot, 2018; Elliott, Doherty, Sheahan, & Ryan, 2017).

Eliminasyon aşamasında salgılanan en güçlü anti-tümör sitokinlerden olan IFN-gamma'ya karşı kanser hücreleri ve özellikle TAM'ların bazı alt grupları 'adaptif direnç' (Kursunel, & Esendagli, 2016) denilen bir mekanizma geliştirmekte ve üzerlerinde PD-L1 baskılayıcı ligandını yüksek düzeylerde ifade etmeye başlamaktadırlar. Tümörde bulunan CD8+ T hücreler de IFN-g sitokini ile belirli düzeylerde aktifleşirken, eş zamanlı olarak üzerlerinde PD-L1'in reseptörü olan PD-1'i taşımaya başlamaktadırlar. Bu reseptör ligand etkileşiminin tümör mikroçevresinde bulunması tümöre saldırmak üzere infiltre olmuş CD8+ T hücrelerini yanıtızsızlaştırmaktadır (Elliott ve ark., 2017; Kursunel, & Esendagli, 2016; Yoyen-Ermis ve ark., 2019).

Tümör dokusuna yerleşik; veya tümör ilişkili kronik inflamasyon sonucu dalak, kemik iliği ve metastatik organlarda biriken veya periferik kanda bulunan immün hücrelerden özellikle pro-tümör özellikte olan tip 2 monosit/makrofaj, miyeloid-kökenli baskılayıcı hücreler (MDSC) (myeloid-derived suppressor cells) ve baskılayıcı fonksiyona sahip nötrofiller; neo- anjiyogenez, T hücre ilişkili anti-tümör yanıtların baskılanması, tümör gelişimi ve metastazı için gerekli faktörlerin ve bağ dokunun yeniden şekillendirilmesi gibi karsinogenez için kritik fonksiyonlara sahiptirler (Awad ve ark., 2018; Kalluri, & Zeisberg, 2006; Marvel, & Gabrilovich, 2015; Mlecnik ve ark., 2011; Pietras, & Ostman, 2010).

## 2.3 Meme Kanseri

Meme kanseri tüm dünyada kadın cinsiyetin en sık görülen kanser tipidir. Klinikte erken evrelerde saptanan %70-80 hastada tamamen iyileşme sağlanabilirken, uzak organ metastazı varlığında elimizdeki mevcut tedaviler ile kür mümkün değildir. Meme kanseri moleküler düzeyde incelendiğinde biyolojik davranışların ve tedavi yaklaşımlarının farklı olduğu alt grupları olan oldukça heterojen bir hastalıktır. Tedavide cerrahi, radyasyon tedavisi ve sistemik tedavileri (kemoterapi, anti-HER2, endokrin tedaviler, PARP inhibitörleri, immunoterapiler) içeren multidisipliner yaklaşımlar kullanılmaktadır (Harbeck ve ark., 2019).

Erken evre meme kanseri, meme dokusu ve yalnızca komşu aksiller lenf nodlarına sınırlı hastalık olarak tanımlanır. Tedavide son 10-15 yılda kat edilen gelişmeler ile günümüzde erken evre hastalık büyük oranda tamamen iyileşme ile sonuçlanmaktadır, ancak ileri evre (metastatik) hastalıkta tamamen iyileşme mümkün değilken; daha az yan etkiler ile hastalığın semptomları kontrol altına almak ve sağkalımı uzatmak hedeflenmektedir. Günümüzde meme kanserinin sınıflaması ve tedavisi temel olarak moleküler düzeyde patogeneze sorumlu histolojik ve genetik değişiklikleri ölçü ve hedef olarak almaktadır. En sık kullanılan sınıflamada östrojen reseptör (ER), progesteron reseptör (PR) eksprese eden tümör hormon reseptör pozitif meme kanseri olarak adlandırılırken, ER, PR ve HER2 (human epidermal growth factor receptor 2) ekspresyonu göstermeyen tümör triple negatif meme kanseri olarak adlandırılır (Harbeck ve ark., 2019).

Meme kanserinin başlangıcı ve mekanizması tam olarak aydınlatılmamış olmakla beraber klonal evrim modeli ve kanser kök hücre modeli kabul görmüş; son çalışmalarda kanser kök hücrelerinin klonal seleksiyon ile seçilimi üzerinde durulmuştur (Harbeck ve ark., 2019; Petersen, & Polyak, 2010).

Normal meme dokusunda iki tip epitelyal hücre tipi bulunmaktadır. Kanal veya lobüllerdeki tek katlı epitel hücreler “luminal epitelyal” hücreler olarak isimlendirilirken; bu hücre katmanının etrafındaki ikinci katmandaki hücreler ise “bazal miyoepitelyal” hücreler olarak tanımlanır. Bazal miyoepitelyal hücreler bazal membran ile yakın temas halindedir. Bu nedenle meme kanseri alt-tipleri tanımlanırken kullanılan bazal ve luminal ifadesi bu hücre orijini sebebiyle kullanılmaktadır

(Petersen, & Polyak, 2010; Valentin da Silva, Privat, Alaoui-Jamali, & Bignon, 2012). Meme kanserinde de bu var olan ekstraselüler matriks ve farklı hücrelerin oluşturduğu kompleks mikroçevre daha da karışık bir yapı haline dönüşmektedir. Meme kanseri mikroçevresinde sıklıkla kanser ilişkili fibroblastlar ve lökosit serinin elemanları (lenfositler, makrofajlar, myeloid türevi stromal hücreler) bulunmaktadır. Farklı alt tipler arasında immunojenik kapasite değişkenlik gösterirken, triple negatif ve HER2 pozitif meme kanseri daha immunojenik özellik gösterirken, luminal A ve luminal B alt tipleri daha az immunojeniktir. Neoadjuvan tedavilere yanıt ve prognoz tümör infiltre eden lökositler ile pozitif olarak ilişkili olarak bulunmuştur (Harbeck ve ark., 2019; Petersen ve ark., 2010; Visvader, & Lindeman, 2006).

Meme kanserine oluşturulan immun yanıt, tümör hücrelerinde oluşan genetik değişiklikler sonucu ekspresyon gösterdiği neoantijenler ile başlatılır. Antijen sunucu hücreler tarafından sunulan neoantijenler CD8+ sitotoksik ve CD4+ yardımcı T hücre aktivasyonu ile sonuçlanır. Anti-tümör immun yanıt temel olarak T hücre reseptörü aktivasyonu ile CD8+ T hücreler tarafından sitolitik perforin ve granzim moleküllerinin salınımı ve tümör hücre lizisi ile oluşturulur. CD4+ T hücreler ise IFN $\gamma$ , IL-2 ve tümör nekrozis faktör gibi sitokinlerin salınımı ile CD8+ T hücre yanıtını güçlendirir. CD8+ T hücreler Fas ligand ekspresyonunu artırarak ve TNF ilişkili apoptoz ligandlarının (TRAIL) indüksiyonu ile tümör hücre apoptozunu gerçekleştirir. Ayrıca doğrudan tümör hücre ölümünde doğal immunitenin parçası olan NK ve NK T hücreleri de önemli rol oynar. Tümör hücreleri CTLA-4, PD-L1 gibi immun checkpoint düzenleyici molekül ekspresyonu anti-tümör immun yanıtı baskılamak için kullanırken sonuç olarak T hücreler kronik olarak tümör hücrelerine maruz kalır ve işlevsiz hale gelir (Harbeck ve ark., 2019).

Meme kanseri tedavisinde standart olarak kemoterapi, radyoterapi veya cerrahi kullanılmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalar ile tek hedefli tedaviler yerine kombine tedavi stratejilerinin kullanılmasının gerekliliği literatürde tartışılmaktadır. Kemoterapi ve cerrahi özellikle yüksek invaziv ve toksisite problemleri barındırdığı için, bu etkiyi minimize taşıyacak ve hedefli bir ek tedavi protokolü aranmaktadır. Ayrıca, aranan bu yeni tedavi yaklaşımlarında immün sistem hücrelerinin kanser tedavisinde önemini vurgulamakta ve immün sistem hücrelerinin seçici olarak hedeflenmesi gerekliliği bilim camiasında yüksek etkili dergiler ve bilim insanları

tarafından önerilmektedir (Charmsaz, Collins, Perry, & Prencipe 2019; Chun, Page, & McArthur 2019; Hiam-Galvez, Allen & Spitzer 2019; Murciano-Goroff, Warner & Wolchok, 2020; Pucci, Chiara & Gianni 2019; Zhao ve ark., 2019).

Meme kanserinin, Dünya Sağlık Örgütünün 2012 tümör sınıflamasında da bildirildiği gibi, konvansiyonel (geleneksel) tipine kıyasla daha az karşılaşılan çeşitli subtipleri (özel tipleri) bulunmaktadır. Yapılan morfolojik ve moleküler çalışmalarda, bu subtiplerin farklı hormonal profilleri ile tedavi modalitelerine farklı yanıtlar verdikleri ve prognozlarının da farklı olduğu gösterilmiştir (de Ronde, Bonder, Lips, Rodenhuis, & Wessels 2014). Hatta aynı kanser tipinin aynı tedaviye, farklı hastada farklı yanıt verdiği de saptanmıştır. Bu durum, günümüzde kişiye yönelik tedavi yöntemlerini gündeme getirmiş, tedavi protokollerinin kişiye göre düzenlenmesi gereksinimini doğurmuştur. Özellikle son 20 yılda moleküler çalışmaların artmasıyla meme kanserinin moleküler subtipleri tanımlanmıştır. Perou ve ark. tarafından yapılan çalışmada gen ekspresyon profiline (GEP) dayalı bir moleküler sınıflama yapılmıştır. Bu çalışmada toplam 42 hastaya ait 36 invaziv duktal karsinom, 2 invaziv lobüler karsinom, 1 DKİS, 1 fibroadenom ve 3 normal meme dokusu örneklerinin gen ekspresyon profiline bakarak birbirleri arasında ekspresyonları belirgin farklılık gösteren 496 adet gen ile intrinsek gen setini oluşturmuşlardır. Bu intrinsek gen seti ile hiyerarşik kümelenmelere bakıp bunları prognoz, tedaviye yanıtları ile korele ederek 'luminal' grup, 'bazal-benzeri' grup, 'HER-2 aşırı eksprese eden' grup ve 'normal meme benzeri' grup olarak 4 alt gruba ayırmışlardır (Perou ve ark., 2000). Hormon reseptörü eksprese eden luminal alt-grup ise, ER reseptör eksprese etme durumu ve sağ kalım göz önüne alınarak tekrar değerlendirilmiş ve luminal A ve luminal B olarak yeniden kategorize edilmiştir (Sørli ve ark., 2001). Bu çalışmalara ek olarak, birçok grup tarafından farklı çalışmalar yapılmış ve gen ekspresyon profili, tümör morfolojisi, biyolojik davranış, tedaviye yanıt, prognoz durumu beraber değerlendirilerek moleküler sınıflama üzerinde çalışılarak kişiye yönelik hedef tedavi geliştirme yöntemleri araştırılmaktadır (Guiu ve ark., 2012; Perou ve ark., 2000; Sørli ve ark., 2001).

Meme kanseri ile yapılan bilimsel çalışmalarda birçok patolojide olduğu gibi hücre kültürü çalışmaları büyük önem arz etmektedir. Meme kanserinde birçok farklı özellikte hücre hattı bulunmakta ve mekanistik çalışmalarda sıklıkla tercih

edilmektedir. Bu hücre hatlarından çalışmamızda BT474, T47D, MDA-MB-231 ve MDA-MB-468 hücre hatları kullanılarak immün yanıtlar araştırıldı. T47D ve BT 474 hücre hatları invaziv duktal karsinoma olup luminal alt-tipindedir. MDA-MB-231 ve MDA-MB-468 metastatik adenokarsinom alt-tipindeki bazal hücre hatlarıdır. Bazal alt-tiplere bakıldığında ise, MDA-MB-231 Bazal-B; MDA-MB-468 ise Bazal-A olarak kategorize edilmiştir (Driessens, Kline, & Gajewski, 2009).

## 2.4 Meme Kanseri Metastazi

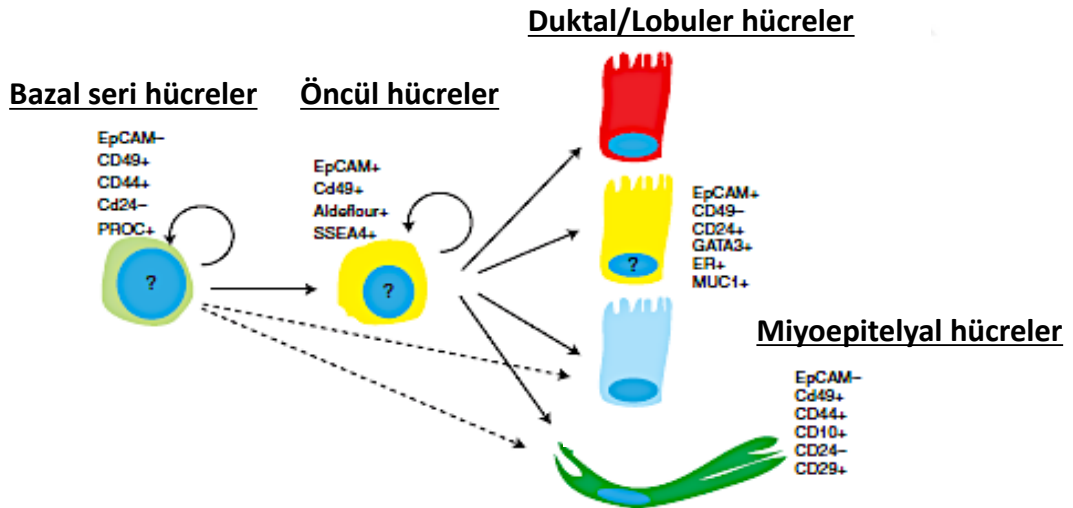
Meme kanserinde metastaz genellikle akciğer, kemik, karaciğer ve beyne olmaktadır. (Bailleux, Eberst, & Bachelot 2021; Pollock, Albares, Wendt, & Hubel, 2013). Özellikle, üçlü negatif meme kanseri (*triple negative breast cancer*; TNBC) alt-gruplarında ilk metastatik organ olarak tümörün akciğeri tercih ettiği bildirilmiştir (Smid ve ark., 2008). Bu metastatik tercih sırasında kanser hücrelerinin neden ilk olarak akciğeri seçtiğine dair farklı spekülasyonlar bulunsa da (Altorki ve ark., 2019; Jin ve ark., 2018; Medeiros, & Allan, 2019; Yousefi ve ark., 2018) mekanizma tam olarak aydınlatılamamıştır. Özellikle geçtiğimiz son bir kaç yıl içerisinde, akciğerde var olan doku yerleşik makrofajların inflamasyon ve akciğer dokusundaki önemleri vurgulanmaya başlanmıştır (Altorki, ve ark., 2019; Fares, Fares, Khachfe, Salhab, & Fares, 2020; Hu G, & Christman, 2019). Bu özeldde yayınlanan çalışmalar ise, genellikle deneysel hayvan modellerinde gösterilen sonuçları göstermekte veya akciğerin kendine has var olan yapısını kanser özelinde speküle etmektedir.

Akciğerin kendine has ekstraselüler komponent bileşimi ve oldukça karışık hücre alt-gruplarından oluşmaktadır. İmmün sistem hücrelerinden özellikle doku yerleşik makrofajlar, akciğerin devamlı immün hücre alt-grubunu oluşturmaktadır. Özellikle geçtiğimiz son bir yıl içerisinde, akciğerde var olan doku yerleşik makrofajların inflamasyon ve akciğer dokusundaki önemleri vurgulanmaya başlanmıştır (Hu G, & Christman, 2019). Farklı kanser tipleri karşılaştırıldığında ise, özellikle primer meme dokusunda en fazla infiltre olan lökosit alt-grubunun makrofajlar olduğu gösterilmiştir (Cassetta ve ark., 2008). Ancak, metastatik organlardaki doku yerleşik veya sekonder tümör mikroçevresinde bulunan makrofajlar ile ilgili bilgilerimiz oldukça sınırlıdır. Literatürde var olan bilgiler genellikle kanser

ilişkili makrofajlar veya deneysel hayvan modellerinde yapılmış sonuçları göstermekte olup (Cacho-Díaz ve ark., 2020; Cotechini, Atallah, & Grossman, 2021; Qian ve ark., 2009; Zhu ve ark., 2017) özellikle doku yerleşik makrofajlar özelinde meme kanseri hasta örnekleri ile yapılmış genel veya detaylı/mekanistik hiç bir çalışma bulunmamaktadır.

## 2.5 Meme Kanseri Kök Hücresi

Sağlıklı meme dokusu hormon ve büyüme faktörlerine açık ve dinamik bir yapıdadır. Bu dinamizmini sahip olduğu kök hücre havuzu ile devam ettirir. Bu kök hücre grubu genel olarak lin-CD44+ CD24- olarak bildirilmiştir. Ayrıca, EpCAM-, CD49+, CD44+, CD24-, PROC+ karaktere sahiptir. Bu hücreler dış sinyallere bağlı olarak EpCAM+, CD49+, ALDH1+, SSEA4+ öncül hücrelere farklılaşırlar. Bu hücreler ise, EpCAM+, CD49-, CD24+, GATA3+, ER+, MUC1+ duktal/lobüler hücrelere ve EpCAM-, CD49+, CD24-, CD44+, CD10+, CD29+ miyoepitelyal hücrelere farklılaşırlar (Petersen ve ark., 2010; Visvader & Lindeman, 2006).



**Şekil 2.1.** İnsan meme dokusundaki farklı epitelyal hücre serilerinin hiyerarşik gelişim ve farklılaşmasını gösteren şematik model (Petersen & Polyak, 2010'dan uyarlanmıştır).

Meme dokusunda bulunan CD44+/CD24- hücrelerin bazal karakterde olduğu ve gen ekspresyon profillerine bakıldığında hücre göç kapasitesi ile ilgili genleri

eksprese ettikleri gösterilmiştir. CD44-/CD24+ hücreler ise, daha diferansiye hücreler olan luminal epitelyal hücre fenotipini gösterir ve bu hücreler hormon reseptörleri ilişkili gen ekspresyonu profiline sahiptir (Fillmore, & Kuperwasser, 2008). CD24 yüzey belirteci, hücrelerin iletişiminde, adhezyonunda ve proliferasyonunda fonksiyona sahiptir (Kristiansen, Sammar, & Altevogt, 2004; Li, Zheng, & Liu, 2004; Lim, & Oh, 2005).

Kanser kök hücresi ise, normal kök hücrelerin de sahip olduğu gibi dokusu içerisinde kendini yenileme kapasitesine ve farklı klonlara farklılaşma yeteneğine sahip olan, tümörün oluşumu ve idamesini sağlayan, uzak metastazdan sorumlu ve tedavi direncine katkıda bulunan hücre alt grubudur. Bu özellikleri ile yeni geliştirilen tedavilerin hedefi haline gelmiştir. Sıklıkla kanser kök hücreleri epithelial-mezenkial farklılaşma ile ilişkili bulunmuştur. Meme kanser kök hücreleri yüzey belirteci olarak CD44high/CD24low eksprese ederken, aldehit dehidrogenaz (ALDH1) aktivitesi gösterirler. CD44 hücre adezyonu, proliferasyon, farklılaşma ile ilişkili hücre yüzey transmembran glikoproteinidir. CD24 sialoprotein ekspresyonu adezyon ve metastaz ile ilişkilidir. ALDH1 kök hücre proliferasyonu ve farklılaşmasına katkıda bulunmaktadır. (Li ve ark., 2021; Zhang, Powell, & Li, 2020).

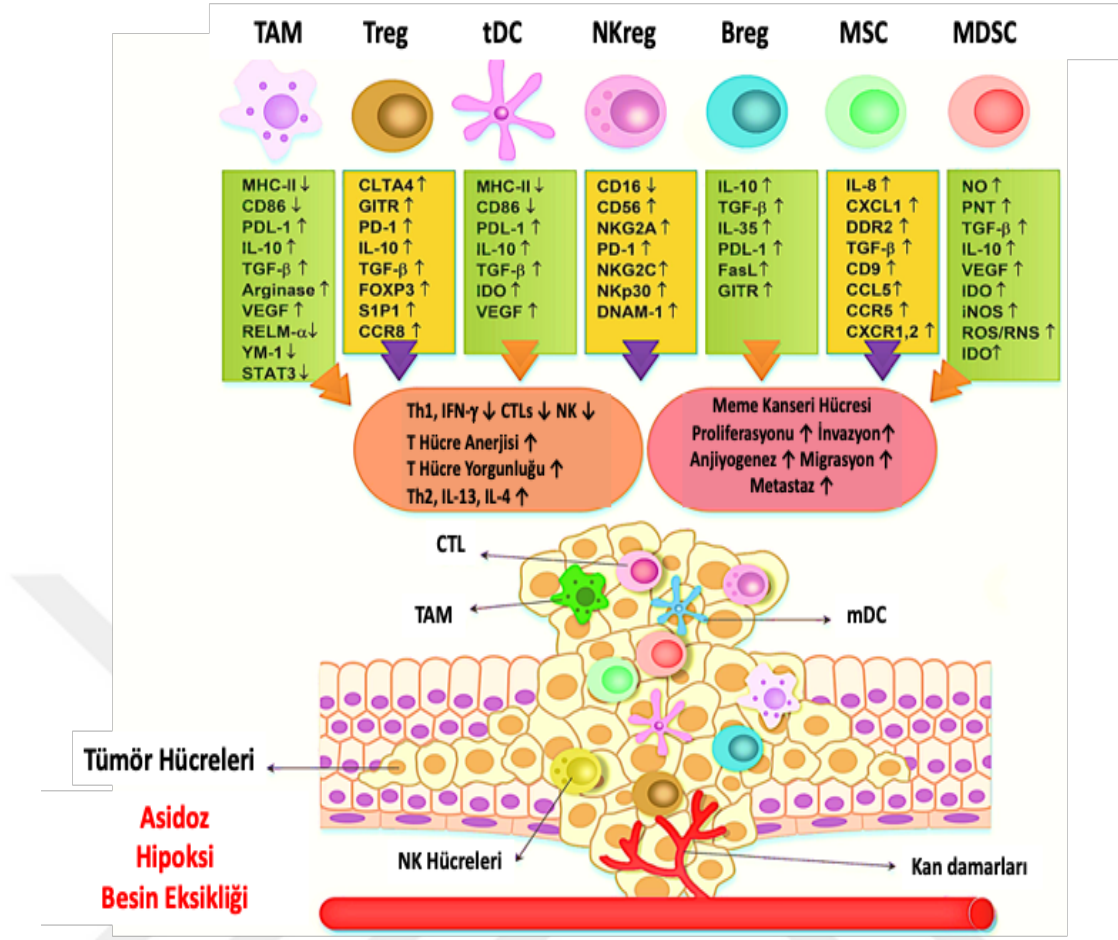
Meme kanseri kök hücresi ile yürütülen çalışmalarda birçok meme kanseri hücre hattı kullanılmakta ve metastatik mekanizma çözülmeye çalışılmaktadır. Bu çalışmalarda hücre hatlarında CD44+CD24- hücrelerin baskın olduğu hücre hatları bazal; CD44-CD24+ hücrelerin baskın olduğu hücre hatları luminal; hem CD44+ hem de CD24+ hücreleri barındıran gruplar ise “karışık tip” olarak raporlanmıştır. Bu hücre hatlarındaki parantel hücrelerden tanımlanmış bu alt-gruplar koşullara bağlı olarak farklılaşmaktadır (Fillmore, & Kuperwasser, 2008). Bunun yanı sıra, Vassilopoulos ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada, CD24+ hücre alt-gruplarının da metastatik karaktere sahip hücreler olabildiği gösterilmiştir (Nielsen ve ark., 2004; Potemski ve ark., 2005; Rakha ve ark., 2006; Rakha, & Ellis, 2009). Vassilopoulos, Chisholm, Lahusen, Zheng, & Deng, 2014). Meme kanseri kök hücreleri ile ilgili birçok çalışmada farklı yüzey belirteçleri de önerilse de, asıl bu hücre grubunu tanımlayan durum metastatik ve anjiyogenz karakteri ve EMT/MET dönüşüm kapasitesi olarak belirtilmiştir (Zhou ve ark., 2019). Litaratürde genel olarak luminal ve bazal benzeri hücre grubunun normal sağlıklı memede orijin aldığı

hücrelerden kaynaklandığı için bu ismi aldığı bildirilse de, yeni yapılan çalışmalarda bu hücre bazal kökenli hücrelerden luminal; luminal orjinli hücrelerden de bazal tipte meme kanseri hücreleri gelişebildiği bildirilmiştir (Zhou ve ark., 2019). Bu teori, kanser kök hücrelerinin sadece farklılaşmış hücrelerdeki mutasyonlardan kaynaklanmadığı ve farklı kanser kök hücresi hipotezlerine göre de yorumlanarak anlaşılmasına çalışılmaktadır. Kanser kök hücresi teorisine göre bir hücre i) kök hücre iken, ii) öncül hücre iken, iii) farklılaşmış bir hücre iken mutasyona uğrayabilir ve kanser kök hücresi oluşur. Özellikle, farklılaşmış bir hücrenin mutasyonlar sonucu dediferansiye (geri farklılaşması, kök hücre haline geri dönmesi) olarak kök hücre karakterine dönüşebilmesi luminal bir hücreden de bazal-benzeri kanser hücresi şekillenmesini açıklayabilmektedir (Polyak, 2007).

Meme kanseri kök hücreleri ile ilgili birçok teori ve literatür bilgisi bulunsa da, immün hücreler ile etkileşimi ile ilgili veriler oldukça sınırlıdır. Ayrıca, bu hücrelerin karakterizasyonu ve sınıflaması ile ilgili daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır (Dittmer, & Rody, 2013; Oliveira, Jeffrey, & Ribeiro-Silva, 2010; Owens, & Naylor, 2013; Ricardo ve ark., 2011).

## **2.6 Meme Kanseri ve Miyeloid Hücreler**

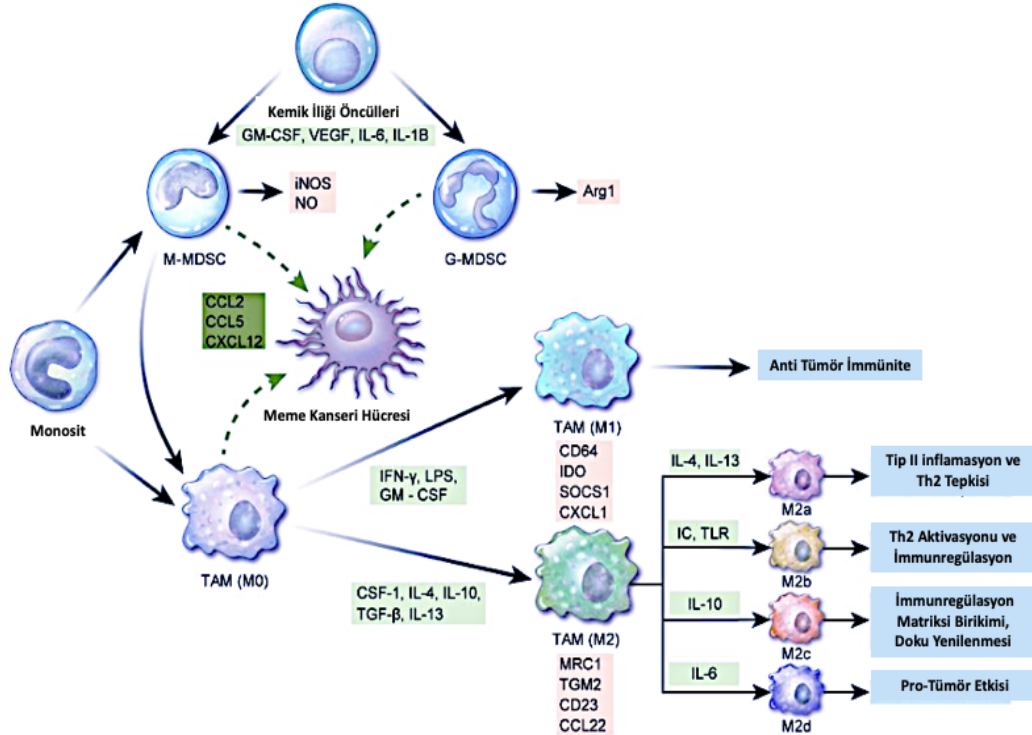
Tümörün gelişimi, mikroçevresinde bulunan immün hücrelere ve salgıladıkları mediyatörlere göre şekillenir (Stanton, Adams, & Disis 2016). Tümör mikroçevresinde tümör ilişkili makrofajlar (*tumor-associated macrophages*, TAM), tolerojenik dendritik hücreler (tolerogenic dendritic cell, tDC), düzenleyici doğal öldürücü hücreler (*regulatory natural killer cell*, NKreg), mezenkimal kök hücreler (*mesenchymal stem cell*, MSC), miyeloid kökenli baskılayıcı hücreler (*myeloid derived suppressor cell*, MDSC), düzenleyici T hücreler (regulatory T cell, Treg) ve düzenleyici B hücreler (*regulatory B cell*, Breg) bulunur. Bu hücreler tümör hücre büyümesini, metaztazını, göçünü, anjiyogenezini etkileyecek inhibitör sitokinleri salgılayarak tümör mikroçevresini değiştirebilirler (Şekil 2.2) (Lan ve ark., 2021).



**Şekil 2.2** Meme kanseri mikroçevresinde bulunan immün hücrelerin rolleri. TAM, *Tumor-associated macrophage*:Tümör ilişkili makrofaj; Treg, *regulatory T cell*: T regülâtör hücre; tDC, *tolerogenic dendritic cell*: tolerojenik dendritik hücre; NKreg, *regulatory natural killer cell* : regülâtör doğal öldürücü hücre; Breg, *regulatory B cell* : regülâtör B hücre; MSC, *mesenchymal stem cell* : mezenkimal kök hücre; MDSC, *myeloid derived suppressor cell* : Miyeloid kökenli baskılayıcı hücre; mDC, *myeloid dendritic cell*: miyeloid dendritik hücre; CTL, *cytotoxic T cell* : sitotoksik T hücre (Lan ve ark., 2021'den uyarlanmıştır).

Monositler interferon-gamma, lipopolisakkarit ve granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*, GM-CSF) varlığında M1 anti-tümör fenotipinde TAM polarizasyonu indüklenirken; makrofaj koloni uyarıcı faktör 1 (*macrophage colony-stimulating factor-1*, CSF-1), interlökin-4 (IL-4), interlökin-10 (IL-10), dönüştürücü büyüme faktörü-β (*Transforming growth factor-β*, TGF-β) ve interlökin-13 (IL-13) M2 fenotipindeki pro tümör TAM polarizasyonuna katkıda bulunur. M2 makrofajları ayrıca IL-4 ve IL-13 tarafından

M2'ya farklılaştırılır ve tip II inflamasyon ve T yardımcı hücre 2 (*T helper 2*, Th2) yanıtında rol oynar. M2 makrofajlarının M2b'ye farklılaşması, immün kompleks ve toll benzeri reseptör ligandı yoluyla Th2 aktivasyonuna ve immün regülasyona yol açar. IL-10 ve IL-6 ile M2c ve M2d farklılaşması, sırasıyla immünoregülasyon, matriks birikimi ve doku yeniden şekillenmesi ve tümör hücre kitlelerinin indüksiyonu ve büyümesi ile ilişkilidir. MDSC'ler, GM-CSF, vasküler endotelial büyüme faktörü (*vascular endothelial growth factor*, VEGF), IL-6 ve Interlökin-1B varlığında kemik iliği öncü hücrelerinden gelişir. CD11b<sup>+</sup> CD14<sup>+</sup> HLA-DR<sup>-</sup>/düşük CD15<sup>-</sup> monositik MDSC'ler arginaz 1 sağlarlar; CD11b<sup>+</sup> CD14<sup>-</sup> HLA-DR<sup>düşük</sup>/- CD15<sup>+</sup> granülositik MDSC'ler, indüklenebilir nitrik oksit sentaz (*inducible nitric oxide synthase*, iNOS), nitrik oksit (nitric oxide, NO) ve reaktif oksijen türleri (reactive oxygen species, ROS) salgılar. Bunlar arasında monositik MDSC'ler TAM'lere farklılaşabilir. Meme kanserinde, CCL2, CCL5 ve CXCL12, TAM ve/veya MDSC'lerin tümör mikroçevresine gelmesinde etkilidir (Şekil 2.3) (Cha, & Koo, 2020; Lu ve ark., 2013; Mantoyani ve ark., 2004; Martinez, & Gordon, 2014; Ohama ve ark., 2015).



**Şekil 2.3** Tümör ilişkili miyeloid hücrelerin farklılaşması ve özellikleri. GM-CSF, *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*: granülosit-makrofaj stimüle edici faktör; VEGF, *vascular endothelial growth factor*: vasküler endotelial büyüme

faktörü; IL-6, *interleukin-6*: interlökin-6; IL-1B, *interleukin 1B*: interlökin 1B; İNOS, *inducible nitric oxide synthase*:indüklenebilir nitrik oksit sentaz; NO, *nitric oxide*: nitrik oksit; M-MDSC, *monocytic-myeloid-derived suppressor cell*: monositik-miyeloid kökenli baskılayıcı hücre; G-MDSC, *granulocytic-myeloid-derived suppressor cell*: granülositik miyeloid kökenli baskılayıcı hücre; TAM, *tumor-associated macrophage*: tümör ilişkili makrofaj; Th2, *T helper 2*, Yardımcı T hücre 2. (Cha, & Koo, 2020'den uyarlanmıştır).

Tümör dokusuna yerleşik; veya tümör ilişkili kronik inflamasyon sonucu dalak, kemik iliği ve metastatik organlarda biriken veya periferik kanda bulunan immün hücrelerden özellikle pro-tümör özellikte olan tip 2 monosit/makrofaj, MDSC'ler ve baskılayıcı fonksiyona sahip nötrofiller; neo- anjiyogenez, T hücre ilişkili anti-tümör yanıtların baskılanması, tümör gelişimi ve metastazı için gerekli faktörlerin ve bağ dokunun yeniden şekillendirilmesi gibi karsinogenez için kritik olan önemli fonksiyonlara sahiptirler (Awad, Vlaeminck, Öaebe, Goyvaerts, & Breckpot, 2018; Gabrilovich, 2015; Kalluri, & Zeisberg, 2006; Marwel, & Gabrilovich 2015; Mlecnik ve ark., 2011; Pietras, & Ostman,2010).

Kanserin erken evrelerinde, TAM'ler, anti-tümör bağışıklığını aktive etmek ve tümör anjiyogenezini inhibe etmek için M1 fenotipini benimserken tümörün ileri evrelerinde, TAM'ler M2 fenotipine geçer ve anjiyogenezini kolaylaştırır. Meme kanserindeki TAM'lar M2 makrofajlar ya da alternatif yolla aktive edilmiş makrofajlar olarak bilinirler ve spesifik olarak CD68, CD163 ve CD206 yüzey belirteçlerini ve Arg1, EGF, IL-10, TGF- $\beta$ , IDO, CCL2 VE CCL22'yi ifade ederler. Bağ doku onarımı, anjiyogenez ve bağışıklık tepkilerini baskılama gibi pro-tümör özelliklere sahiptirler. Tümör mikroçevresinde bulunan tümör hücreleri arasındaki hücre-hücre ilişkileri ve tümör hücrelerinin metastazından sorumludurlar. İnsan meme kanserinde TAM'ların yoğunluğu kötü prognoz ile ilişkilidir ve anjiyogenez ile birlikte infiltrasyonları artar. Yapılan fare modeli çalışmalarında tümör mikroçevresinden TAM'ların çıkarılması tümör ilerlemesinin yavaşlamasını sağlamıştır (Lan ve ark., 2021; Leek ve ark., 1996; Munir ve ark., 2021; Najafi ve ark., 2019; Obeid, Nanda, Fu, & Olopade, 2013; Tan ve ark., 2018).

Meme kanseri de dahil olmak üzere birçok kanser türünde düşük lenfosit karşı yüksek nötrofil oranının kötü prognozla ilişkili olduğu görülmüştür. Tümör dokusuna infiltre CD66b<sup>+</sup> nötrofiller ile E-kadherin ekspresyonu arasında ters orantı gözlenmiştir. Bu nedenle bu hücrelerin artışı EMT sürecini ve tümör hücrelerinin migrasyonunu indükleyebilir (Azab ve ark., 2012; Hu ve ark., 2015; Shaul, & Fridlender, 2019). Tümör ilişkili nötrofiller (*Tumor associated neutrophils*, TAN) yüzeylerinde eksprese ettikleri nötrofil elastaz (*neutrophil elastase*, NE), matris metalloproteinaz 9 (*matrix metalloproteinase 9*, MMP9) ile tümör proliferasyonunu destekler. Ayrıca MMP9 tümör anjiyogenezi ile güçlü şekilde ilişkilidir (Wu, & Zhang, 2020).

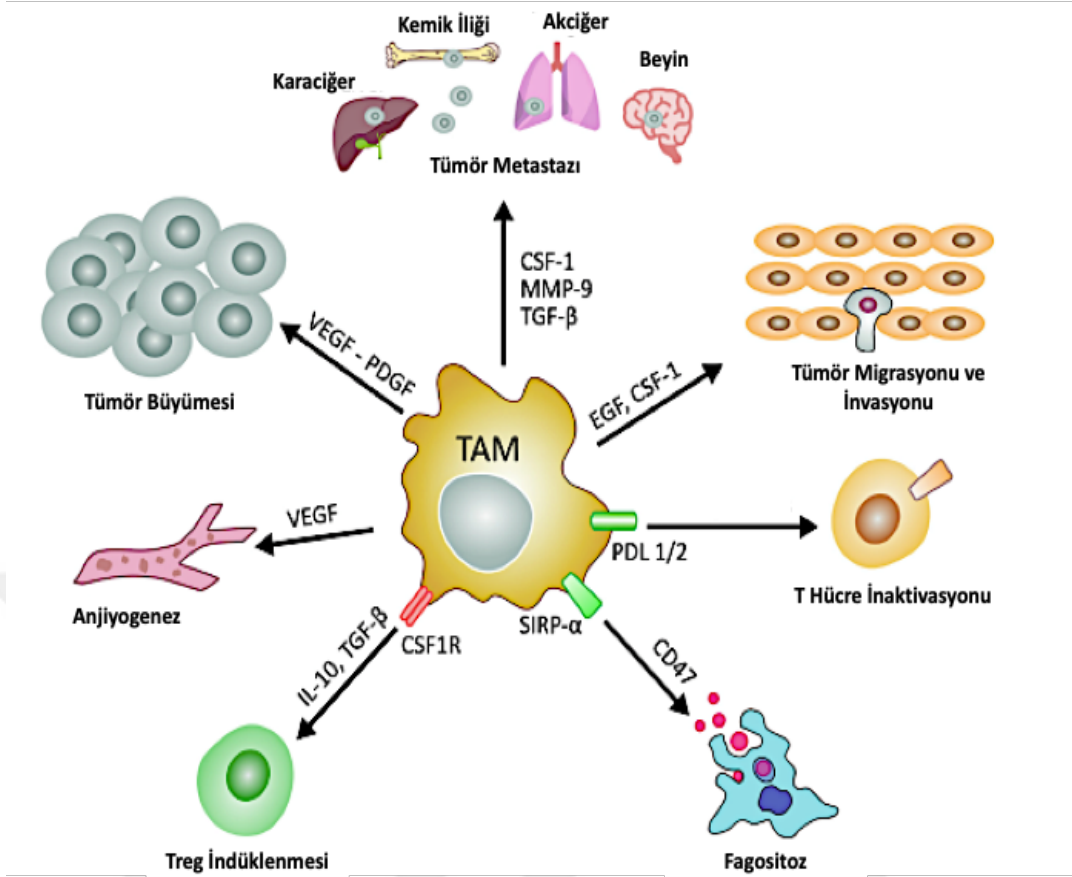
Meme kanserinde tümör tipine bağlı olarak MDSC'ler, CCL2, CXCL5 ve CXCL12 dahil olmak üzere çeşitli kemokinler tarafından tümör bölgelerine alınır. MDSC'ler meme kanseri olan hastalarda yüksek oranda bulunurlar ve klinik evre ve metastaz ile ilişkilidirler. Özellikle monositik-MDSC'ler meme kanserinin metastazı ile ilişkilidir. MDSC'ler tarafından salgılanan iNOS, NOS, ROS, Arg1, IL-10, TGF- $\beta$  ve programlanmış ölüm ligand 1 (*programmed death-ligand 1*, PD-L1) ile immünosupresyonun indüklenmesi tümör hücrelerinin bağışıklıktan kaçışını kolaylaştırır (Cha, & Koo, 2020; Kumar, Patel, Tcyganov, & Gabrilovich, 2016; Lan ve ark., 2021; Markowitz, Wesolowski, Papenfuss, Brooks, & Carson, 2013; Shou ve ark., 2016).

## **2.7 Meme Kanseri ve Monosit/Makrofaj İlişkisi**

Makrofajlar, doku homeostazını koruyan ve patojenlere karşı savunmada önemli rol oynayan doğal bağışıklık hücreleridir. Heterojen fenotipleri ve işlevleri buldukları doku ortamı tarafından sıkı bir şekilde düzenlenir (Kitamura ve ark., 2015). Makrofajlar, genellikle miyeloid progenitörlerden gelişirken patofizyolojik koşullarda monositlerden türevlenirler. Farklı monosit alt kümeleri (CD14/CD16 yüzey belirteçlerine göre) TAM'ların öncülleri olup pro-tümör aktiviteye sahiptirler. Dolaşımdaki monositlerin tümör içine alınması, sitokinler, kemokinler, kompleman bileşenleri vb. dahil olmak üzere tümör hücrelerinden veya malign olmayan stromal hücrelerden salınan kemotaktik sinyallere bağlıdır. Meme kanserinde monositten

türevlenen makrofajlar tümör büyümesi ve metastaz için önemli hücreler olup alternatif yolla aktive edilen M2 makrofajlara benzerdirler. Bu hücreler tümör hücrelerinin sağkalımını ve çoğalmasını destekler. Ayrıca kan damarlarına yakın bölgelere yerleşerek tümör hücrelerinin migrasyonunda etkili olurlar (Goswami ve ark., 2005; Ma ve ark., 2020; Olingy, Dinh, & Hedrick, 2019; Qian ve ark., 2011; Patysheva ve ark., 2022; Riabov ve ark., 2014 Ma ve ark., 2020; Qian ve ark., 2011; Wyckoff ve ark., 2007; Yang ve ark., 2013; Zhang ve ark., 2017; Zhang, Chen, Li, Zhu, & Li, 2021).

TAM'lar salgıladıkları CSF-1, MMP-9 ve TGF- $\beta$  ile tümör metastazını; epidermal büyüme faktörü (*epidermal growth factor*, EGF) ve CSF-1 ile tümör hücrelerinin migrasyon ve invazyonunu; tümör hücre yüzeyindeki PD-L1 ve PD-L2, T hücrelerin yüzeyindeki PD-1'e bağlanarak T hücrelerin apoptozunu ve inaktivasyonunu; tümör hücrelerinin yüzeyindeki sinyal düzenleyici protein alfa (*signal regulatory protein alpha*, SIRP- $\alpha$ ) makrofajların yüzeyindeki CD47 ile etkileşimi sonucu makrofajların fagositozlarının inhibisyonunu; salgıladıkları vasküler endotelial büyüme faktörü (*vascular endothelial growth factor*, VEGF) ile angiogenezi; VEGF ve platelet kökenli büyüme faktörü (*platelet-derived growth factor*, PDGF) ile tümör hücrelerinin büyümesinde etkilidirler (Şekil 2.4) (Aramimi ve ark., 2021; Keibel, Singh, & Sharma, 2009).

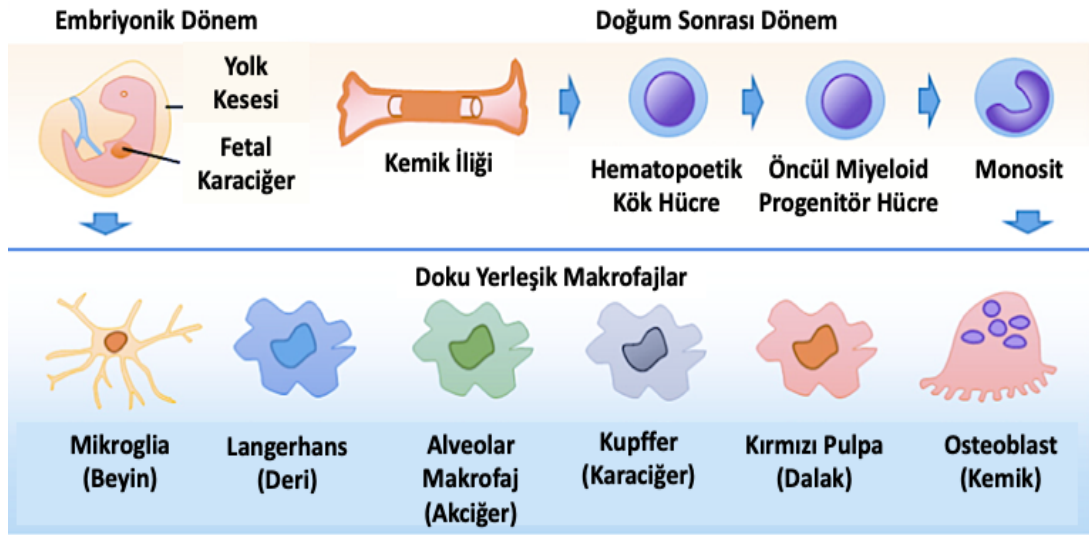


**Şekil 2.4** Tümör ilişkili makrofajların tümör gelişimindeki rolleri. VEGF, *vascular endothelial growth factor*: vasküler endotelial büyüme faktörü; PDGF, *platelet-derived growth factor*: platelet kökenli büyüme faktörü; CSF-1, *macrophage colony-stimulating factor-1*: makrofaj koloni stimüle edici faktör-1; CSF-1R, *macrophage colony-stimulating factor receptor-1*: makrofaj koloni stimüle edici faktör reseptörü 1; MMP-9, *matrix metalloproteinase 9*: matriks metolloproteinaz-9; TGF- $\beta$ , *Transforming growth factor- $\beta$* : dönüştürücü büyüme faktörü - $\beta$ ; EGF, *epidermal growth factor*: epidermal büyüme faktörü; IL-10, *interleukin-10*: interlökin-10; SIRP- $\alpha$ , *signal regulatory protein alpha*: sinyal düzenleyici protein- $\alpha$ ; PD-L1/2, *programmed death-ligand 1/2*: programlanmış ölüm ligandı 1/2. (Aramini ve ark., 2021'den uyarlanmıştır).

Tümör hücreleri tarafından salgılanan IL-4 ve IL-10 gibi sitokinler makrofajlardan proinflamatuvar sitokin ve kemokinlerin salgılanmasını engeller ve TAM'a benzeyen immünosupresif bir fenotipi destekler. İnsan THP-1 hücre dizisi, yaygın olarak kullanılan bir monosit/makrofaj modelidir ve bu hücrelerinin biyolojik davranışı, yapışma, fagositik kapasite ve yüzey belirteci ve sitokin ekspresyonu açısından monosit türevli makrofajlar olan TAM'lara benzerdir (Stewart, Yang, Makowski, & Troester, 2012; Yang, Ma, Shao, Clark, & Wells, 2016).

## 2.8 Doku Yerleşik Makrofajlar



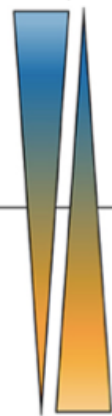


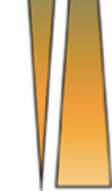
Doku yerleşik makrofajlar, embriyonik gelişim döneminde fetal karaciğer ve vitellüs kesesinden köken almaktadır. Doğum ile birlikte hematopoez kemik iliğine geçer. Kemik iliği progenitör hücrelerinden kökenlenen periferik kan monositleri dokulara infiltre olarak makrofajlara polarize olurlar. Doku makrofajları toplam hücre sayısının %10-15'ini oluşturmakla birlikte çok farklı dokularda bulunmakta ve farklı fenotip ile fonksiyon göstermektedirler. Akciğerde alveolar makrofaj, dalakta kırmızı pulpa, beyinde mikroglia hücresi, karaciğerde kupffer hücresi, deride langerhans hücresi, kemikte osteoklast ve bağ dokuda da histiyosit hücresi olarak adlandırılırlar (Şekil 2.5) (Geissmann ve ark., 2010; Hopkinson-Woolley, Hughes, Gordon, & Martin, 1994; İtaliani, & Boraschi, 2014; Pei, & Yeo, 2016).



Şekil 2.5 Makrofaj Gelişimi ve Doku Makrofajları (Pei, & Yeo, 2016'dan uyarlanmıştır).

Kemik iliğinden farklılaşan monosit türevli makrofajlar yüzeylerinde yüksek derecede CD11b, MHC-II ve CCR2 ifade eder. Yolk kesesi ya da fetal karaciğerden farklılaşan doku yerleşik makrofajlar ise yüksek düzeyde F4/80 ve CX3CR1 ifade eder. Monosit türevli makrofajlar enfeksiyon sırasında patojenleri fagosite ederler ve proinflamatuar durumlarda sitokin salgırlar. Doku yerleşik makrofajlar ise apoptotik hücreleri fagosite ederek doku homeostazını sürdürür ve doku yeniden şekillenmesi

için sitokinler salgılar (Şekil 2.6) (A-Gonzalez ve ark., 2017; Ham, Lima, Lek, & Möller, 2020; Mass ve ark., 2016; Zhu ve ark., 2017).

Yüzey Belirteçleri	Köken	Fonksiyon
 <p>F4/80<sub>orta</sub> CD11b<sub>yüksek</sub> MHC-II<sub>yüksek</sub> CCR2<sub>yüksek</sub></p> <p>Monosit-Kökenli Makrofaj</p>	 <p>Hematopoetik Kök Hücre</p>	<p>Enfeksiyon</p>  <p>-Patojenlerin Fagositozu -Pro-inflamatuvar Sitokinlerin Salgılaması</p>
 <p>F4/80<sub>yüksek</sub> CD11b<sub>orta</sub> MHC-II<sub>düşük/yüksek</sub> CCR2<sub>düşük</sub> CX3CR1<sub>yüksek</sub></p> <p>Doku Yerleşik Makrofaj</p>	 <p>Yolk Kesesi ve Fetal Karaciğer</p>	<p>Doku Yenilenme</p>  <p>-Apoptotik Hücrelerin Fagositozu ve Debrisin Temizlenmesi -Doku Yenilenmesi için Gerekli Sitokinlerin Salgılaması</p>

**Şekil 2.6** Monosit türevli makrofajlar ve doku yerleşik makrofajlar arasındaki farklar (Ham ve ark., 2020’den uyarlanmıştır).

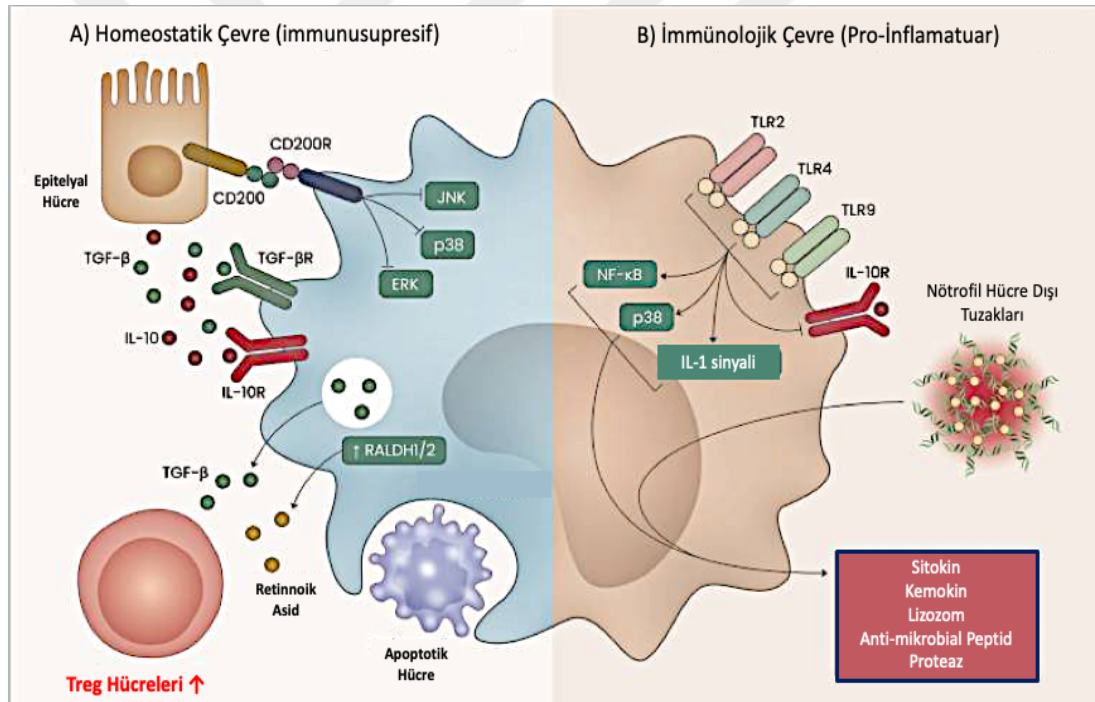
## 2.9 Akciğer ve Doku Yerleşik Makrofajlar

İntersitisyal ve alveolar makrofajlar olmak üzere akciğerde iki farklı fenotipte doku yerleşik makrofaj vardır. Bunlardan tip I ve II epitel hücreleri arasında bulunanlara alveolar makrofaj; mikrovasküler endotel ile alveolar epitel arasındaki parankimde bulunanlarada intersitisyal makrofajlar denilmiştir. Alveolar makrofajlar yüzeylerinde CD11b, CD11c, CD16, CD64, CD103, CD141, CD163, CD169, CD206 ve HLA-DR belirteçlerini ifade eder. CD163’ü orta ya da yüksek ifade etmelerine bağlı olarak alveolar makrofajlar farklı bölgelere lokalize olurlar (Bharom, Rankin, Blomberg, & Smed-Sörensen, 2017; Bharat ve ark., 2016; Liegeois, Legrand, Desmet, Marichal, & Bureau, 2018; Yu ve ark., 2016).

Alveolar makrofajların fonksiyonel fenotipi bulunduğu akciğer dokusunun mikro ortamı tarafınca şekillenir. Alveolar makrofajlar doku homeostazı, konak savunması, sürfaktan ve hücre kalıntılarının temizlenmesi, patojenleri tanıma, akciğerdeki inflamasyonun başlatılması ve hasarlı dokunun tamir edilmesi gibi önemli

işlevlere sahiptir (Xue ve ark., 2014). Fizyolojik koşullarda düşük seviyelerde sitokin üretirlerken yüksek fagositik aktiviteye sahiptirler (Hussell, & Bell, 2014).

Homoestatik koşullar altında epitelyal hücrelerin yüzeyinde bulunan CD200 ve epitelyal hücrelerden salgılanan IL-10 ve TGF- $\beta$ 'nin alveolar makrofaj yüzeyinde bulunan CD200R, IL-10R ve TGF- $\beta$ R tarafından tanınması alveolar makrofajların immüno-supresif özellik kazanmasını sağlar. Sonrasında alveolar makrofajlar TGF- $\beta$  salgılayarak ve retinal dehidrojenazları 1/2 (*retinal dehydrogenases 1/2*, RALDH1/2) salgılayarak Treg oluşumuna katkıda bulunur. Ölmekte olan hücreleri fagosit ederek de doku homoestazını korurlar (Şekil 2.7A). İnflamatuar koşullarda ise Toll benzeri reseptör (*Toll-like receptor*, TLR) sinyalleri ya da nötrofil hücre dışı tuzakları (*neutrophil extracellular traps*, NET) alveolar makrofajların pro-inflamatuar tepkilerini tetikler (Şekil 2.7B) (Woo, Jeong, & Chung, 2021).



**Şekil 2.7** Alveolar makrofajların İmmünolojik İşlevleri. TGF- $\beta$ , *Transforming growth factor- $\beta$* : dönüştürücü büyüme faktörü - $\beta$ ; TGF- $\beta$ R, *Transforming growth factor- $\beta$  receptor*: dönüştürücü büyüme faktörü - $\beta$  reseptörü; IL-10, *interleukin-10*: interlökin-10; IL-10R, *interleukin 10 receptor*: interlökin 10 reseptörü; RALDH1/2, *retinal dehydrogenases 1/2*: retinal dehidrojenazlar 1/2; TLR, *toll like receptor*: toll benzeri reseptör. (Woo ve ark., 2021'den uyarlanmıştır).

### 3. GEREÇ ve YÖNTEM

#### 3.1 Çalışmada Kullanılan Maddeler

Bu tez kapsamında kullanılan kimyasal ve biyolojik malzemeler firmalarına göre sıralanmıştır. Fosfat tamponlanmış tuz çözeltisi (PBS) (EUROIMMUN, Almanya) ; Fötal Buzağı Serum (FBS) (Biowest, Fransa); Penisilin-Streptomisin (Biowest, Fransa); RPMI 1640 (Biowest, Fransa); Ficoll 1.077g/mL (Capricorn Scientific, Almanya); FACS Flow Cell Wash (BD, ABD); RBC Liziz Tamponu (Sony Biotechnology, ABD) Tripsin EDTA (Biowest, Fransa); Propidyum İodür Çözeltisi (Biolegend, ABD); Forbol 12-Miristat 13- Asetat (PMA) (Sigma, ABD); L-glutamin (Lonza, Belçika); Anti insan CD45 (klon:J33) mAb (Beckman Coulter, ABD); Anti insan CD16 (klon:3G8) mAb (Beckman Coulter, ABD); Anti insan CD14 (klon:RMO52) mAb (Beckman Coulter, ABD); Anti insan CD11b (klon: D12) mAb (Becton Dickinson, ABD);Anti insan CD80 (klon: L307.4) mAb (Becton Dickinson, ABD); Anti insan CD86 (klon: IT2.2) mAb (Becton Dickinson, ABD); Anti insan CD206 (klon:19.2) mAb (Becton Dickinson, ABD); Anti insan CD163 (klon:GHI/61) mAb (Biolegend, ABD); Anti insan CD69 (klon:7-239) mAb (Biolegend, ABD); Anti insan PD-L1 (klon:MIH2) mAb (Biolegend, ABD); Anti insan PD-L2 (klon:MIH18) mAb (Becton Dickinson, ABD); Anti insan CD68 (klon:Y1/82A) mAb (Biolegend, ABD); Anti insan HLA-DR(klon:L243) mAb (Becton Dickinson, ABD); Anti insan CD44 (klon: 515) mAb (Becton Dickinson, ABD); Anti insan CD24 (klon: ML5) mAb (Becton Dickinson, ABD).

#### 3.2 Hazırlanan Tamponlar ve Çözeltiler

**PBS Çözeltisi:** Steril PBS tablet 1000mL başına bir adet olacak şekilde dH<sub>2</sub>O'ya eklenerek (1X) çözüldü ve otoklavlanarak sterilize edildi. Oda sıcaklığında (25°C) muhafaza edildi.

**Tam RPMI 1640 Hücre Kültürü Ortamı:** L-glutamin içeren RPMI 1640 üzerine son konsantrasyonu %10 v/v olacak şekilde FBS (ısı-inaktive), %1 v/v olacak şekilde penisilin/streptomisin eklendi ve +4°C’de saklandı.

**Tam DMEM Hücre Kültürü Ortamı:** L-glutamin içeren DMEM üzerine son konsantrasyonu %10 v/v olacak şekilde FBS (ısı-inaktive), %1 v/v olacak şekilde penisilin/streptomisin eklendi ve +4°C’de saklandı.

**Tam DMEM Hücre Kültürü Ortamı:** L-glutamin içeren DMEM üzerine son konsantrasyonu %5 v/v olacak şekilde FBS (ısı-inaktive), %1 v/v olacak şekilde penisilin/streptomisin eklendi ve +4°C’de saklandı.

**Karboksifloresan Süksinimidil Ester (CFSE) çözeltisi:** CFSE tuzu (50µg) üzerine 18µl DMSO eklenerek çözüldü ve -86°C’de saklandı.

**Tripan Mavisi Çözeltisi:** Steril ortamda tartım sonrasında 1X PBS ile 0.4’lük çözelti hazırlandı ve 0.22µm’lik filtreden geçirildi. Oda sıcaklığında (25°C) muhafaza edildi.

### **3.3 Hücre Hatları İle İn-vitro Çalışmaların Planlanması**

#### **3.3.1 Hücre Hatlarının Kültürü**

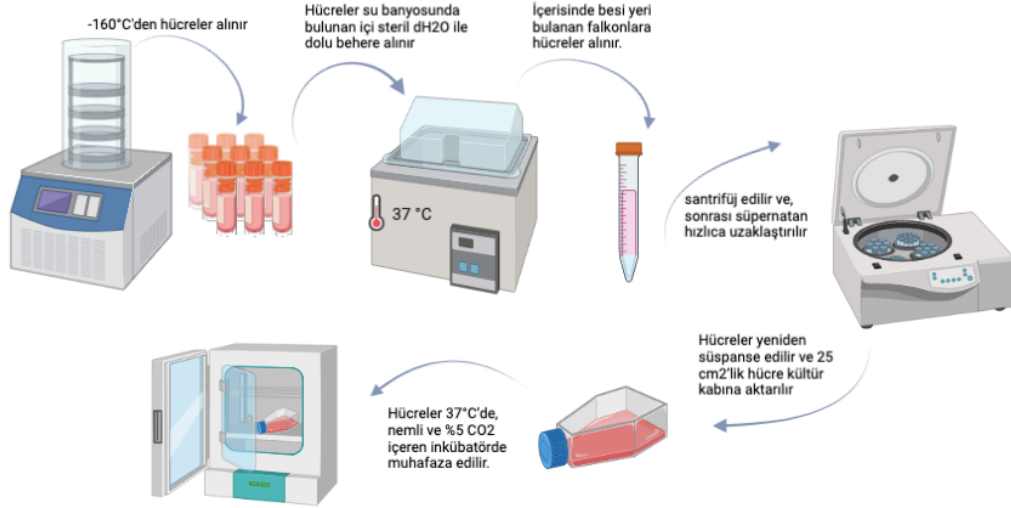
Çalışmamızda meme kanseri hücre hattı olarak MDA-MB-231, MDA-MB-468, BT-474, T-47D, monosit/makrofaj hücre hattı olarak THP-1 hücre hatları kullanıldı.

##### **3.3.1.1 Meme Kanseri Hücre Hatlarının Kültürü;**

MDA-MB-231, MDA-MB-468, BT-474 ve T-47D -160°C’den alınarak, 37°C’ye önceden ısıtılmış su banyosunda bulunan içi steril dH<sub>2</sub>O ile dolu behere alındı. Tam çözümleri beklemeden hücrelerin bulunduğu tüpler alkollenerek

laminer akım kabinine alındı, üzerlerine önceden 37°C'ye ısıtılmış tam media kültür ortamı pastör pipeti ile eklendi.

Hücreler hızlı bir şekilde donduruldukları tüplerden yeni tüplere alındı, santrifüj edildi ve sonrası süpernatant hızlıca uzaklaştırıldı, taze tam hücre kültür ortamında hücreler yeniden süspansiyon edildi. Hücreler öncelikle 25 cm<sup>2</sup>'lik hücre kültür kabına aktarıldı, kültür kabını doldurdukları zaman besiyeri ile beraber 75 cm<sup>2</sup>'lik kültür kaplarına alındı ve tam hücre kültür ortamında büyütüldü. Hücreler istenilen yoğunluğa ulaştığında (~1x10<sup>6</sup> hücre/ml) pasajlanarak ilgili deneylerde kullanıldı. Pasajlama haftada iki kez gerçekleştirildi ve hücre kültürünün devamlılığı sağlandı. Hücrelerin pasaj sayısı 7-10 defadan fazla devam ettirilmedi ve bu pasaj sayısına ulaşan hücreler atılarak her defasında yeni hücreler açıldı. Hücreler 37°C'de, nemli ve %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde muhafaza edildi. (Şekil 3.1)



Şekil 3.1 Hücre hatlarının açılımı (biorender.com kullanılarak hazırlanmıştır.)

### 3.3.1.2 Monosit/Makrofaj/Alveolar Makrofajların Polarizasyonu ve Kültürü

THP-1 hücre hattı monositik hücre hattı modeli olarak kullanıldı. Ayrıca, bu hücre hattının phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) ile uyarılması ile makrofaja farklılaştırıldığı, popülasyon içinde spontan olarak yapışarak büyüyen alt-grubun da alveolar makrofaj karakterinde olduğu bildirilmiştir. Bu nedenle çalışmamızda bu hücre hattı tercih edildi.

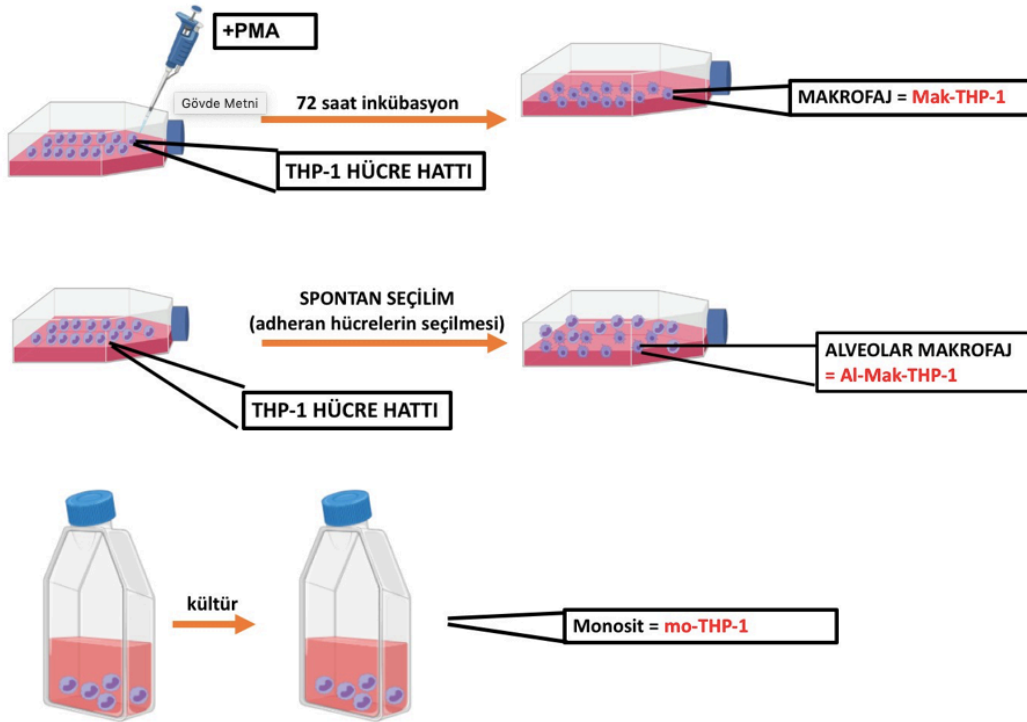
THP-1 hücre hattı yukarıda belirtildiği gibi açılarak hücreler devam ettirildi.

\*Monositik hücreler için (**mo-THP-1**); THP-1 hücre hattı dikey pozisyonda devam ettirilecek ve dört günde bir yarı yarıya pasajlandı.

\*Makrofajları mimik etmek için (**p-THP-1**); THP-1 hücre hattı yatay pozisyonda, 72 saat boyunca PMA (final konsantrasyon; 40nM) ile uyarıldı.

\*Alveolar makrofaj polarizasyonu için (Al-Mak-THP-1); THP-1 hücre hatları ( $\sim 2,5 \times 10^5$  hücre/ml) 6-kuyucuklu plakalara ekildi spontan olarak hücrelerin yapışması beklendi. Yaklaşık dört günde bir süspansiyon atıldı, yapışanların proliferasyonu desteklendi.

Yukarıda belirtilen hücrelerin eldesi için kullanılacak kültür koşulları şematik olarak aşağıda gösterilmiştir.



**Şekil 3.2** Monosit/Makrofaj/Alveolar Makrofaj hücrelerinin THP-1 monositik hücre hattından farklılaştırılması (biorender.com kullanılarak hazırlanmıştır.)

Tüm hücre kültürü deneylerinde ana hücre stoğu açıldıktan sonraki ilk pasaj dondurularak, hücreler stoklandı. Ayrıca, hücre kültürünün sağlığı için hücrelerden ayda bir supernatan toplanarak mikoplazma testi yapıldı.

### **3.3.2 Monosit/Makrofaj/Alveolar Makrofajların Karakterizasyonu**

Yukarıda anlatıldığı üzere kullanılacak olan miyeloid hücre hatlarının karakterize edilebilmesi için üçlü doğrulama stratejisi kullanıldı. Bu kapsamda;

#### **3.3.2.1 Flow Sitometri Yöntemi İle Monosit/Makrofaj/Alveolar Makrofajların Karakterizasyonu**

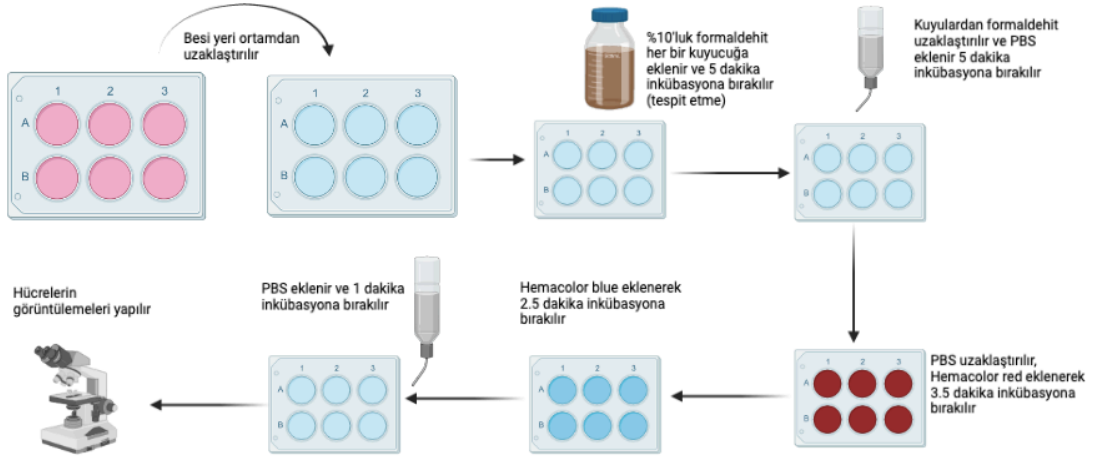
Anti-insan CD14, CD16, CD11b, CD80, CD86, CD206, CD163, CD169, CD63, CD45, PD-L1, PD-L2, CD68 ve HLA-DR belirteçleri analiz edildi. Genel çalışma prensibi olarak hücreler akım sitometri tüplerine toplandı ve yukarıda belirtilen antikorlar ile işaretlendi. Yüzey belirteçlerine karşı monoklonal antikorlar ve izotipik kontrol antikorları (IgG1/G1) uygun konsantrasyonlarda (10ug/mL) eklendi tüpler vortekslendi ve inkübasyona (45 dk, 4°C, karanlık) alındı. İnkübasyon süresinin sonunda 1.5 mL Cell Wash (BD Biosciences, ABD) çözeltisi eklendi, santrifüj (1800 rpm, 5 dk, 4°C) edildi ve supernatan atıldı. Tüplere 150 µL Cell Wash eklendi ve vortekslendi. Hücreler Flow sitometri cihazında değerlendirildi. İlgili belirteç için pozitif olan hücrelerin yüzdesi belirlenirken ilk olarak tek tek düşen hücreler kaplandı. Bunun için forward scatter (FSC)-A ve FSC-H grafiğinden diagonal alanda saçılım gösteren hücreler analiz edildi (doublet discrimination). Bu hücrelerden granülarite (side scatter-area, SSC-A) ve boyutları (FSC-A) göz önünde bulundurularak yeni bir grafik daha çizildi ve ilgilenilen hücreler yeniden kapıldı. Bu genel kapılama stratejisinin ardından antikorların konjuge edildiği renkleri gösteren histogram veya nokta saçılım grafikleri çizildi ilgili hücrelerin yüzdesi ve gerektiğinde ortalama/ortanca floresan yoğunlukları (mean/median fluorescence intensity, MFI) hesaplandı.

**Tablo 3.1** Akım sitometride kullanılan antikorlar ve özellikleri

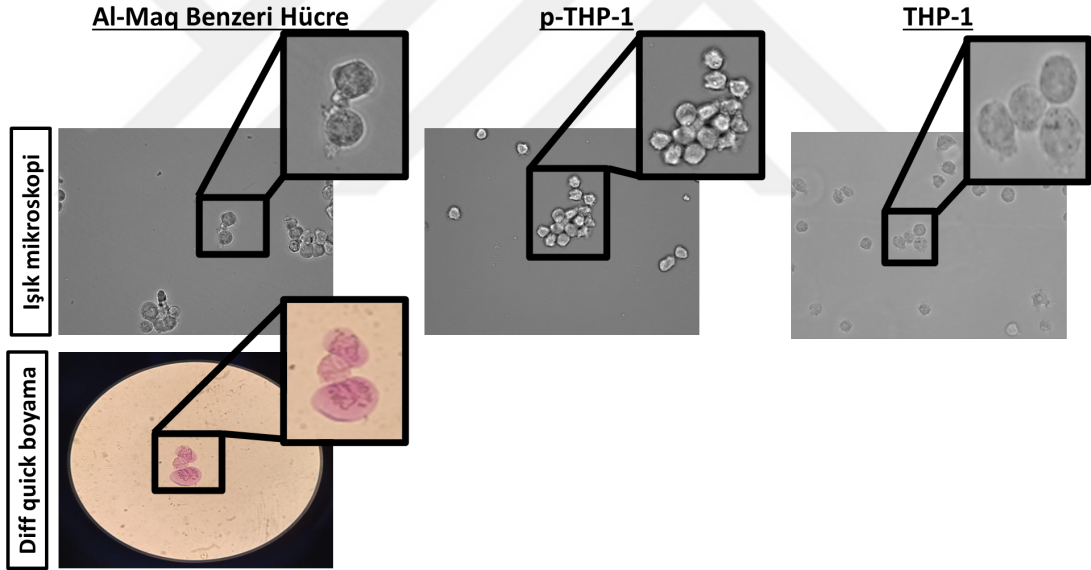
Antikor (anti-insan)	Florokrom	Eklenen miktar	Tedarikçi
CD14	APC Alexa Flour 700	1 µl	Beckman Coulter, ABD
CD16	PE	2.5 µl	Beckman Coulter, ABD
CD11b	APC Alexa Flour 750	1 µl	Beckman Coulter, ABD
CD80	APC	1 µl	Beckman Coulter, ABD
CD86	PC5	2 µl	Beckman Coulter, ABD
CD206	FITC	9 µl	Becton Dickinson, ABD
CD163	PE	9 µl	Becton Dickinson, ABD
CD169	APC	9 µl	Becton Dickinson, ABD
CD45	Krom Orange	1 µl	Beckman Coulter, ABD
PD-L1	PE	9 µl	Becton Dickinson, ABD
PD-L2	PE	9 µl	Becton Dickinson, ABD
HLA-DR	APC Pasific Blue	1 µl 3 µl	Beckman Coulter, ABD

### 3.3.2.2 Morfolojik Analizler İle Monosit/Makrofaj/Alveolar Makrofajların Karakterizasyonu

6 kuyulu hücre kabında bulunan hücrelere diff quick boyaması yapılarak monosit/makrofaj karakterleri değerlendirildi. Hücreler ilk olarak 6 kuyulu hücre kabına ekildi ve 24 saat inkübasyona bırakıldı daha sonra PBS ile yıkanarak besiyeri ortamdan uzaklaştırıldı ardından %10'luk formaldehit her bir kuyucuğa eklendi ve 5 dakika inkübasyona bırakıldı daha sonra PBS yardımı ile formaldehid ortamdan uzaklaştırıldı ardından PBS de ortamdan uzaklaştırıldı ve boyama işlemleri başladı. İlk olarak hemacolor red eklenerek 3.5 dakika inkübasyona bırakıldı yıkama yapılmadan hemen arkasından hemacolor blue eklenerek 2.5 dk inkübasyona bırakıldı ve son olarak PBS ile yıkanarak mikroskopta değerlendirildi (Şekil 3.4).



**Şekil 3.4** Morfolojik analizler ile Monosit/Makrofaj/Alveolar Makrofajların Karakterizasyonu (biorender.com kullanılarak hazırlanmıştır.)



**Şekil 3.5** Morfolojik analizler ile Monosit/Makrofaj/Alveolar Makrofajların Karakterizasyonun Işık Mikroskopisi ve Diff Quick Boyama İle Karşılaştırılması

### 3.4. Ko-Kültür Deneyleri

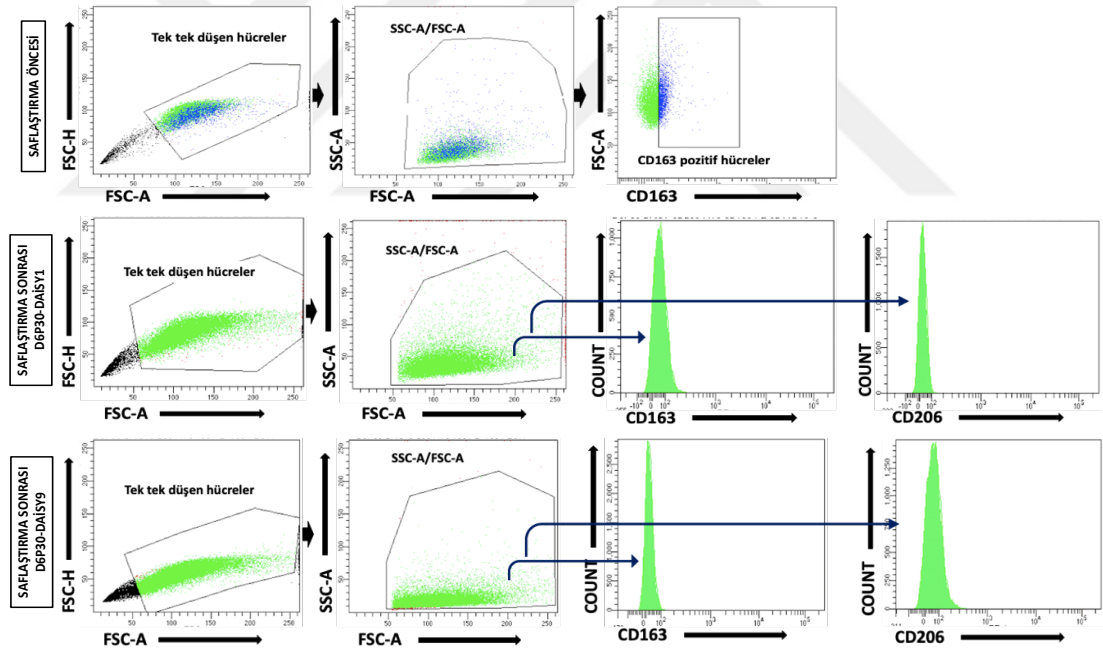
Meme kanseri hücre hatları ve THP-1'den farklılaştırılmış hücre hatları (Mo-THP-1, TAM-THP-1, AM-THP-1) hem hücre/hücre etkileşimini anlamak, hem de salgılanan faktörlerin etkisini değerlendirmek için ikili olarak kültüre edildi.

Bu kapsamda,

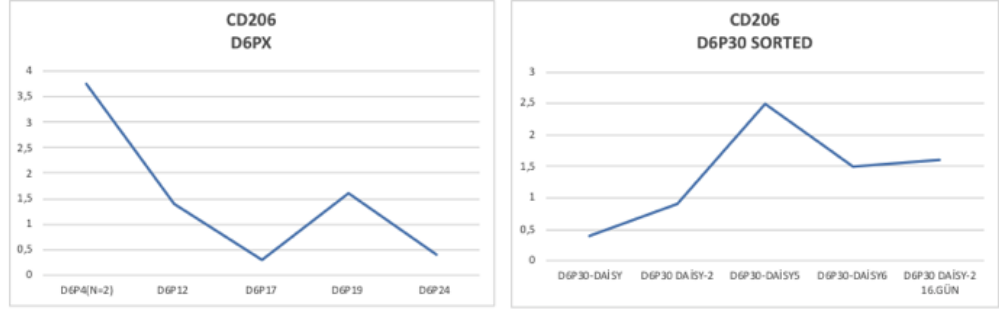
-Meme kanseri hücre hatları+miyeloid hücre hatları ko-kültüre edildi.

### 3.5. Floresan Aktive Hücre Saflaştırma (Facs) Yöntemi

İlgili belirteçlere karşı geliştirilmiş floresan konjuge antikor ile işaretlenmiş pozitif hücrelerin içinden tek tek düşen hücreler kaplandı. Bunun için forward scatter (FS)-INT ve side scatter (SS)-TOF veya forward scatter (FSC)-A ve FSC-H grafiğinden tek tek düşen hücreler analiz edildi (doublet discrimination). Sonrasında tek tek düşen hücrelerin içinden granülarite (SSINT) ve boyutuna (FS-INT) göre yeni bir kapılama yapıldı. Bu genel kapılama stratejilerinin ardından antikorların CD163'ya göre bir nokta saçılım grafiği çizildi. CD163'ı yüksek düzeyde taşıyan hücreler kaplandı ve bu kapılamalara göre hücreler saflaştırıldı (Şekil 3.6)Daha sonrasında CD206 ekspresyonuna bakıldı. Analizler Flow.jo programı kullanılarak değerlendirilmiştir (Şekil 3.7).



Şekil 3.6 FACS yöntemi öncesi ve sonrası D6P30 (Al-Maq) hücrelerin akım sitometri yöntemi ile gösterimi.



**Şekil 3.7** CD206 ekspresyonunu ilerleyen pasajlarda kaybeden alveolar makrofaj benzeri THP-1 kökenli hücrelerin FACS ile saflaştırılması (CD163'e göre saflaştırma yapıldı) sonrasında CD206 ekspresyonuna sahip hücrelerin ilerleyen pasajlardaki durumu.

İlgili hücreler FACS yöntemi ile saflaştırıldıktan sonra CD206 ekspresyonunu zaman içerisinde tekrar kaybetmelerini önlemek adına bu hücreler gelatin, Poly-L-lysin ve ekstracellular matrix (ECM) ile kaplanan hücre kültürü kaplarında büyütüldü. Bu koşullarda büyüyen hücreler kıyaslandığı zaman üç boyutlu hücre kültürüne bir nebze daha yakın olan bu kaplama koşullarında CD206 ekspresyonunun daha iyi korunduğu ön verisi elde edildi. Ayrıca, elde edilecek hücreler ilerleyen deneylerde meme kanseri ko-kültürlerinde kullanılacağı için ve bu meme kanseri hücreleri DMEM besiyerinde büyüdüğü için, DMEM ve RPMI koşulları da birbiri ile kıyaslandı.

### 3.6 EMG/MEG Değişimlerinin CD24/CD44 Düzeyi İle Belirlenmesi

Ko-kültürler sonucunda meme kanseri hücre hatlarında var olan KHH'lerin (kanseri kök hücresi) yüzdesinde meydana gelen farklılıklar araştırıldı. Bu kapsamda CD45-, CD44+, CD24-/düşük hücreler kanser kök hücresi olarak beklenmekte olup, akım sitometri yöntemi ile değerlendirildi.

### 3.7. İnvazyon Testi İle EMG/MEG Değişimlerinin İncelenmesi

Ko-kültür ön sonuçlarına göre seçilen inkübasyon süresi sonrasında miyeloid hücre hatları ile karşılaşmış meme kanseri hücre hatları plakalardan toplandı. CD45 negatif hücreler (kanseri) kapılarak flow sitometri yöntemi ile saflaştırıldı. Elde

edilen hücreler 6-kuyulu plakalara ekildi, (çoğalma hızları göz önüne alınarak hücre sayısı ön deneyler ile belirlenecektir) 16 saat boyunca adheren faza geçmelerine izin verildi. İnkübasyon sonunda kuyu tam ortadan çizilerek fotoğraflandı. Yaralanan alanın ne kadar kapandığını ölçmek için 3 gün boyunca aynı alan fotoğraflandı. İlgili fotoğraflar Image J programında analiz edilerek yara kapanma hızı ölçüldü.

### **3.8 İstatiksel Analiz**

Tez çalışmasının verileri IBM SPSS 21.0 ve GraphPad Prism 7 programları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Normal dağılım gösteren değişkenler için student's t (ikili karşılaştırma) ya da ANOVA (ikiden fazla karşılaştırma), normal dağılım göstermeyenler için Mann-Whitney U (ikili karşılaştırma) ya da Kruskal Wallis (ikiden fazla karşılaştırma), testlerinin kullanılması tercih edilmiştir. Gruplar arasındaki farklar ve anlamlılıkları two-way ANOVA testi (Bonferroni's post hoc testi ile beraber) ile çoklu test metodu kullanılmıştır.  $p < 0.05$  değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiş olup,  $p < 0,05$  \*;  $p < 0,01$  \*\*;  $p < 0,001$  \*\*\* olarak grafiklerde kullanılmıştır.

## 4. BULGULAR

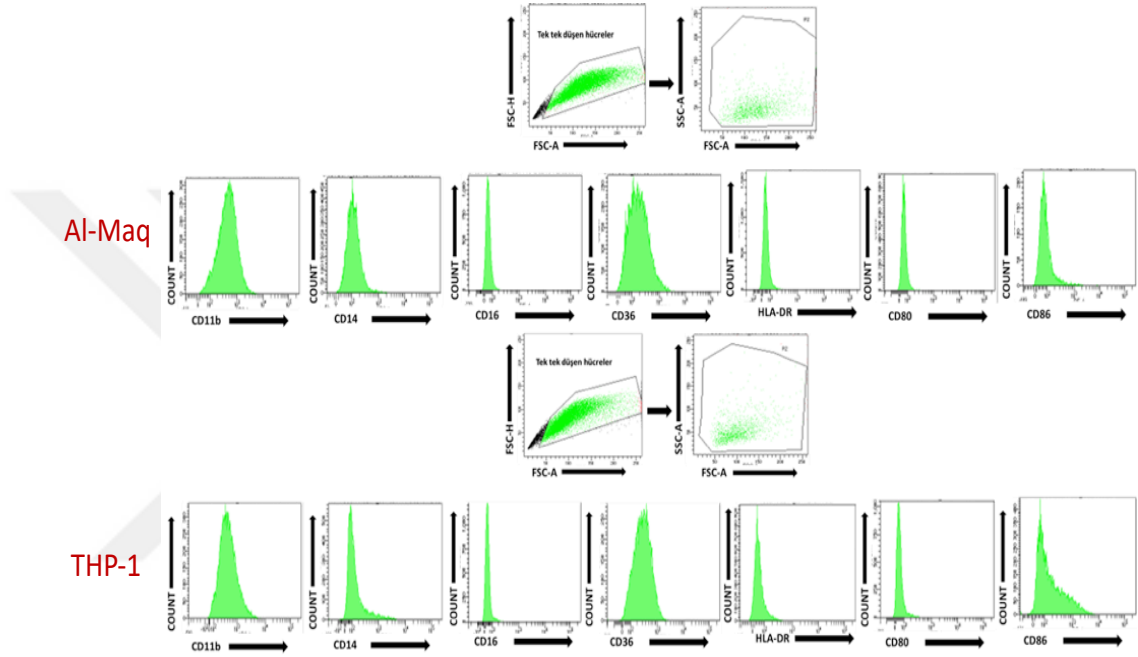
### 4.1 Alveolar Makrofaj Benzeri Hücre Hattı'nın (Al-Maq) Seçilimi ve Karakterizasyonu

Çalışmamızda monositik hücre hattı olan THP-1 hücreleri yatay pozisyonunda bekletilerek 4 günde bir besiyeri 1:1 oranında değiştirilmiştir. Zamanla yapışan hücreler seçilmeye başlanmış ve bu işlem 11 ay boyunca devam ettirilmiştir. Elde edilen spontan makrofaj alt-grubu CD206, CD80, CD86, CD16, CD11c, CD11b, CD14 ve HLA-DR ekspresyon kapasitesine göre değerlendirilerek, alveolar makrofaj benzeri karaktere ne kadar yakın olduğu saptamaya çalışılmıştır. Bu kapsamda iki farklı klonal seçim ile meydana getirilen hücre alt-grubu oluşturulmuştur. (Şekil 4.4-Şekil 4.15). D6P30-DAİSY5 olarak tanımlanan hücre grubunun ilk seçilimi 6 kuyucuklu plakalardan başladığı için "D6" kodu buradan gelmektedir. İlerleyen pasajlar sonucunda, farklılaşmaya ilk başladığı pasaj 30. Pasaj olduğu için "P30" tanımlaması yapılmıştır. 30. pasajdan sonra devam eden ardışık pasajların 5. Pasajında dondurulduğu için de DAİSY5 takısı eklenmiştir (Şekil 4.4 ve Şekil 4.10). Alt-klon seçilimi T25lik flaklardan başlayıp, 12. Pasajda ilk karakteri sergileyen ve takiben 4. Pasajda dondurulan hücreler ise, "DAİSY12-DAİSY4" olarak isimlendirilmiştir (Şekil 4.5 ve 4.8).

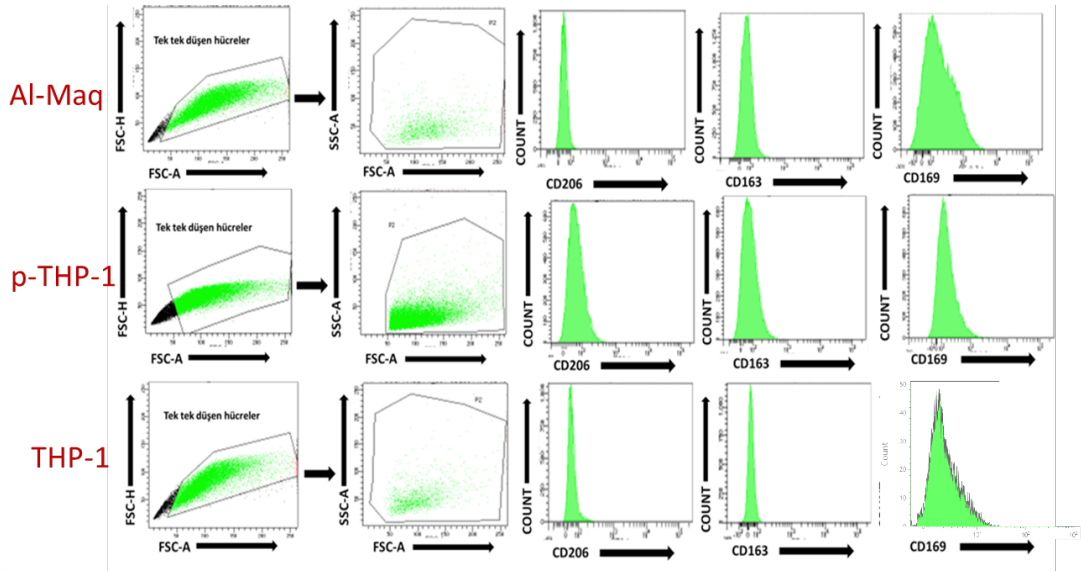
İlgili hücrelerin karakterizasyonu yapılırken, genel hücre hatları prensibi de gereği popülasyonun tüm hücreleri adherent fazda ve seçilmiş popülasyonun %100 karakterini göstermemiştir. Bu nedenle karakterizasyon yapılırken seçim sırasındaki hem süspanse faz hem de adherent faz değerlendirilmiştir (Şekil 4.4, Şekil 4.15).

Alveolar makrofaj benzeri hücreler tutunarak büyüyen hücre alt-grupları (adherent) oldukları için, bu hücrelerin tutunmasını ve farklılaşmasını sağlayan ekstraselüler matriks bileşenleri de kullanılmıştır. Bu kapsamda, Poly-L-Lysin, Gelatin ve ekstraselüler matriks bileşen karışımı (ECM) kullanılmıştır. Besiyeri içeriğine göre bir farklılaşma potansiyel farkı da göz önüne alınarak DMEM ve RPMI besiyerlerinin ikisi de bu koşullar ile ayrı ayrı denenmiştir (Şekil 4.4-Şekil 4.45).

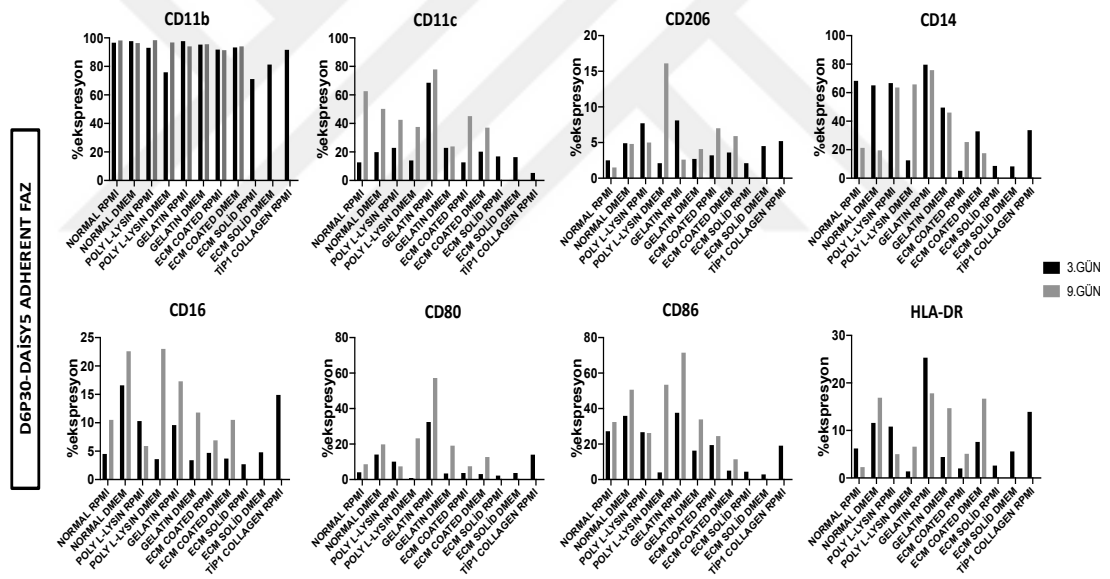
Hem D6P30-DAİSY5 hem de DAİSY12-DAİSY4 alt-klonları değerlendirildiğinde adherent fazdaki hücrelerin süspanselere göre daha fazla makrofaj karakterinde olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.3-Şekil 4.14). Farklı yüzey tutunma maddeleri kendi arasında kıyaslandığında D6P30-DAİSY5 en fazla Poly-L-Lysin DMEM koşulunda ve 9.günde CD206 ekspresyonunu arttırmıştır. Bu koşulda ayrıca, HLA-DR ekspresyonunun ve CD11c'nin orta düzeyde olması, alveolar makrofaj benzeri karakter ile uyumludur (Şekil 4.4).



Şekil 4.2 THP-1 hücre hattından spontan seçilim ile oluşturulan alveolar makrofaj benzeri (Al-Maq) hücre hattının akım sitometri analizleri ile karakterizasyonun temsili görüntüleri

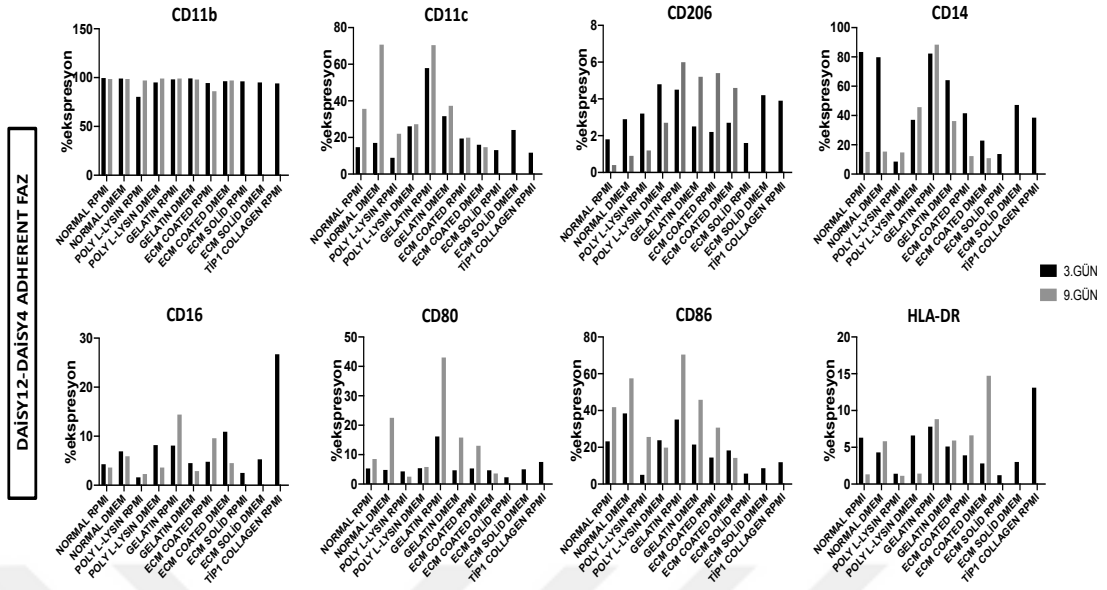


Şekil 4.3 THP-1, p-THP-1 ve Al-Maq hücre hatlarının CD206, CD163 ve CD169 belirteçlerini ifade etme düzeylerini gösteren temsili akım sitometri görüntüleri



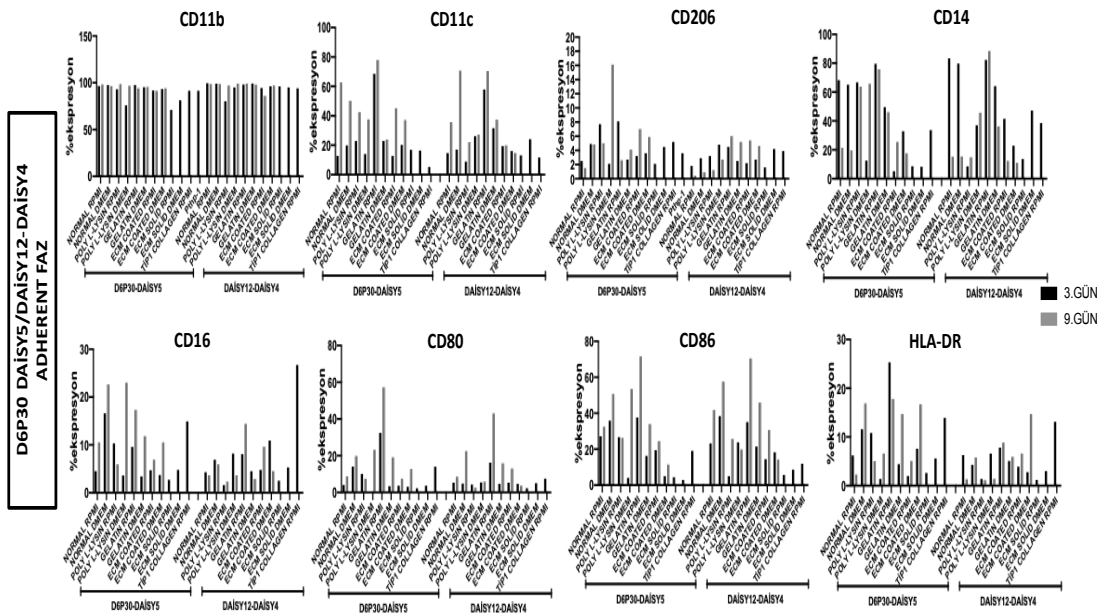
Şekil 4.4 Alveolar Makrofaj Benzeri Hücre Hattı Alt-Klonu D6P30-DAİSY5 hücre hattının ‘adherent fazında’ bulunan hücrelerdeki CD206, CD80, CD86, CD16, CD11c, CD11b, CD14 ve HLA-DR yüzey belirteçlerinin %ekspresyon grafikleri

DAİSY12-DAİSY4 ise en fazla gelatin RPMI koşulunda ve 9.günde CD206 ekspresyonunu arttırmıştır. Fakat, bu koşulda CD11c’de yüksek düzeyde olduğu için, dendritik hücre alt-gruplarının da farklılaştığı düşünülmektedir.

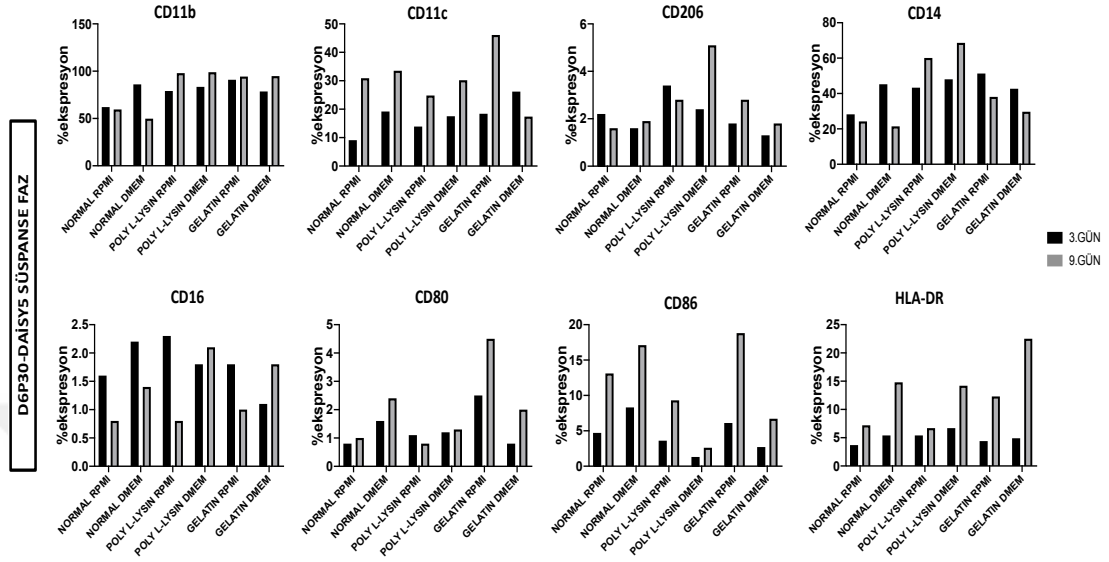


**Şekil 4.5** Alveolar Makrofaj Benzeri Hücre Hattı Alt-Klonu DAİSY12-DAİSY4 hücre hattının ‘adherent fazında’ bulunan hücrelerdeki CD206, CD80, CD86, CD16, CD11c, CD11b, CD14 ve HLA-DR yüzey belirteçlerinin % ekspresyon grafikleri

Tüm alt-klonlar ve koşullar beraber değerlendirildiğinde, alveolar makrofajlar için oldukça kritik olan CD206 belirtecinin D6P30-DAİSY5 hücre alt-klonu ve Poly-L-Lysin DMEM koşulunda olduğu belirlenmiştir. Meme kanseri hücreleri ile gerçekleştirilecek kültürler de DMEM ortamında olacağı için D6P30-DAİSY5’in alveolar makrofaj karakterini koruyacağı da desteklenmiştir.

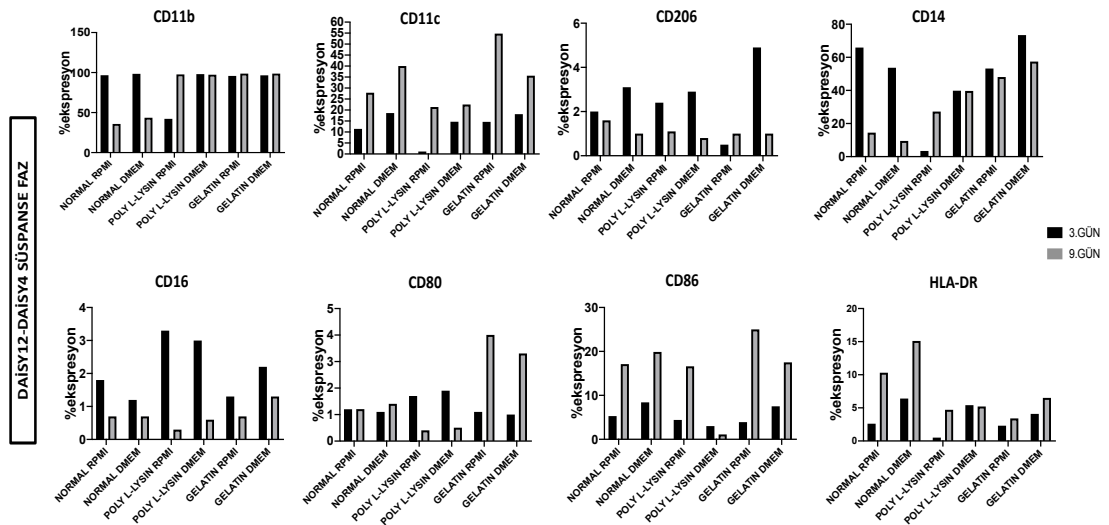


**Şekil 4.6** Alveolar Makrofaj Benzeri Hücre Hattı Alt-Klonu D6P30-DAİSY5/DAİSY12-DAİSY4 hücre hattının ‘adherent fazında’ bulunan hücrelerdeki CD206, CD80, CD86, CD16, CD11c, CD11b, CD14 ve HLA-DR yüzey belirteçlerinin % ekspresyon grafikleri

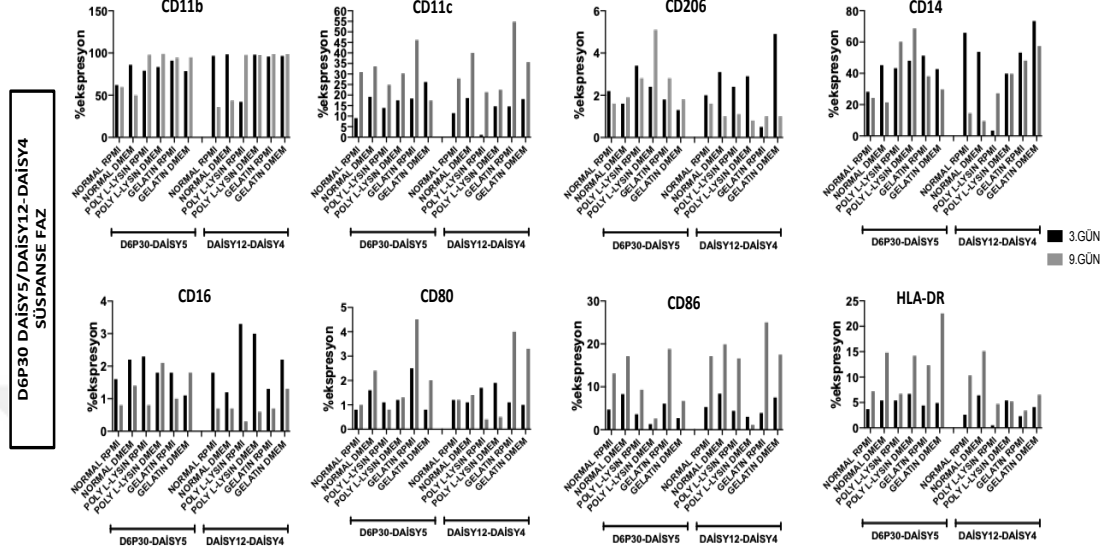


**Şekil 4.7** Alveolar Makrofaj Benzeri Hücre Hattı Alt-Klonu D6P30-DAİSY5 hücre hattının ‘süspans fazında’ bulunan hücrelerdeki CD206, CD80, CD86, CD16, CD11c, CD11b, CD14 ve HLA-DR yüzey belirteçlerinin % ekspresyon grafikleri.

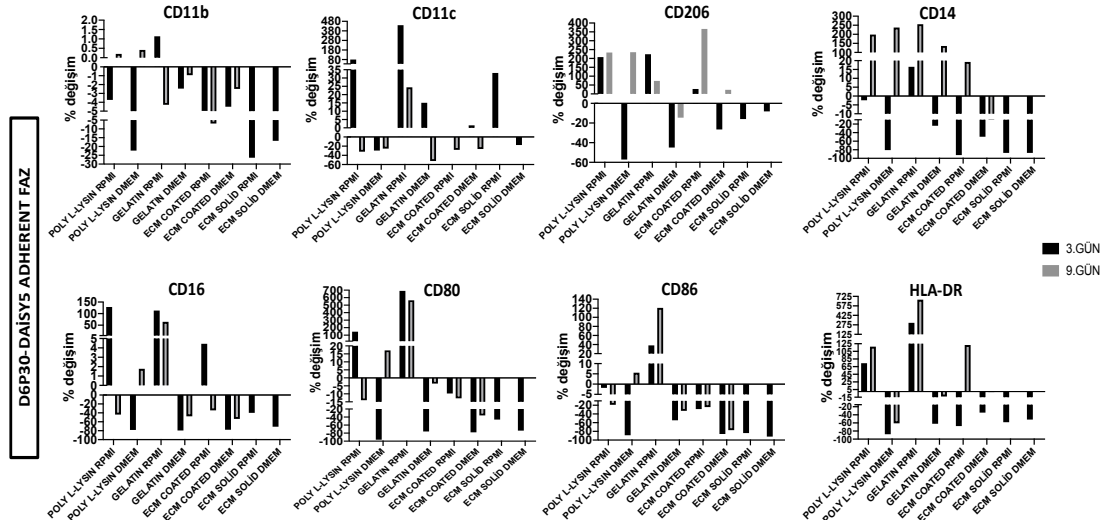
Süspans fazlar değerlendirildiği zaman ise, D6P30-DAİSY5 hücre alt-klonunun bu koşulda da hala var olduğu saptanmıştır. Bu durum alveolar makrofaj benzeri hücre hattı seçim için destekleyici diğer bir veriyi oluşturmuştur (Şekil 4.5 ve Şekil 4.6).



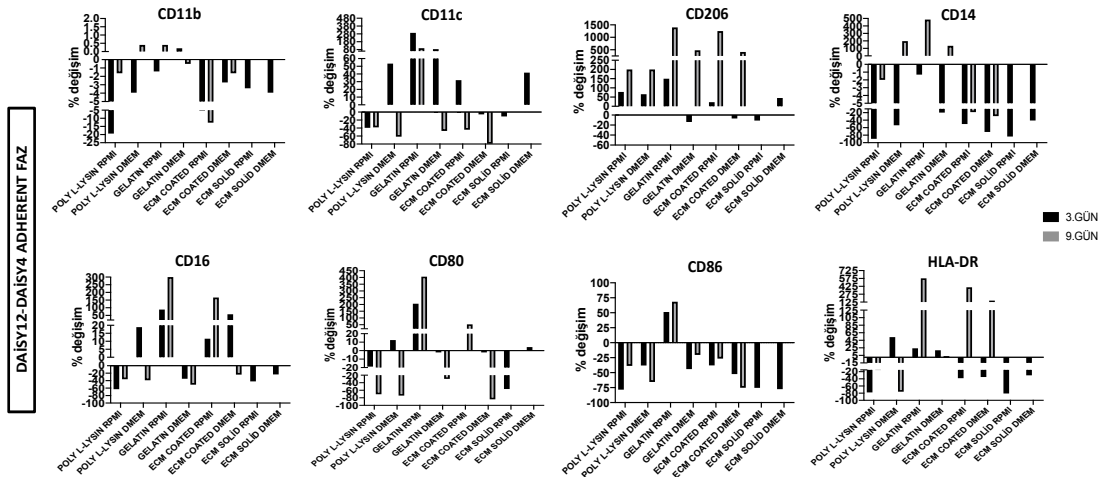
**Şekil 4.8** Alveolar Makrofaj Benzeri Hücre Hattı Alt-Klonu DAİSY12-DAİSY4 hücre hattının ‘süspansöz fazında’ bulunan hücrelerdeki CD206, CD80, CD86, CD16, CD11c, CD11b, CD14 ve HLA-DR yüzey belirteçlerinin % ekspresyon grafikleri



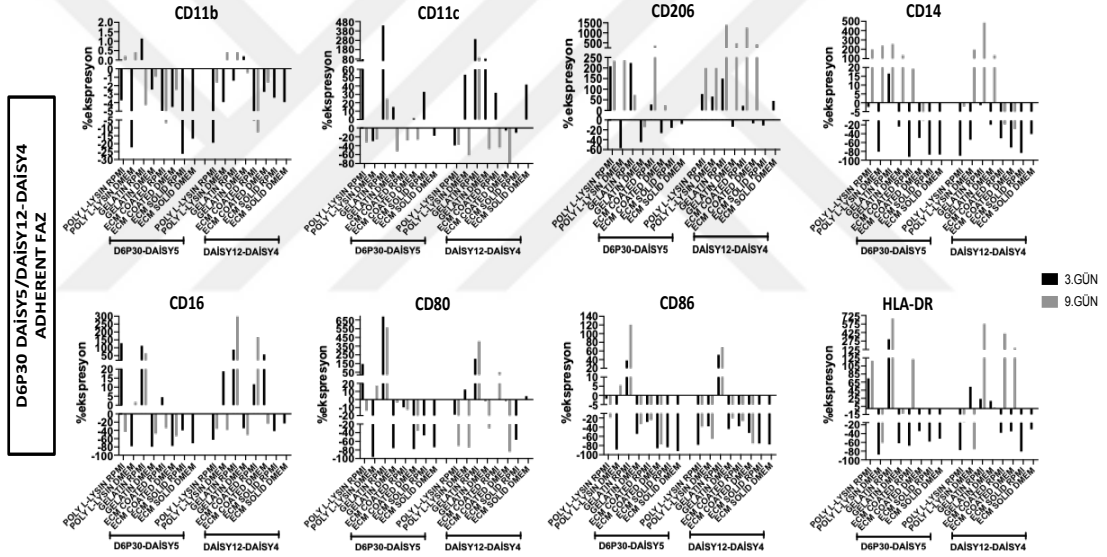
**Şekil 4.9** Alveolar Makrofaj Benzeri Hücre Hattı Alt-Klonu D6P30-DAİSY5/DAİSY12-DAİSY4 hücre hattının ‘süspansöz fazında’ bulunan hücrelerdeki CD206, CD80, CD86, CD16, CD11c, CD11b, CD14 ve HLA-DR yüzey belirteçlerinin % ekspresyon grafikleri



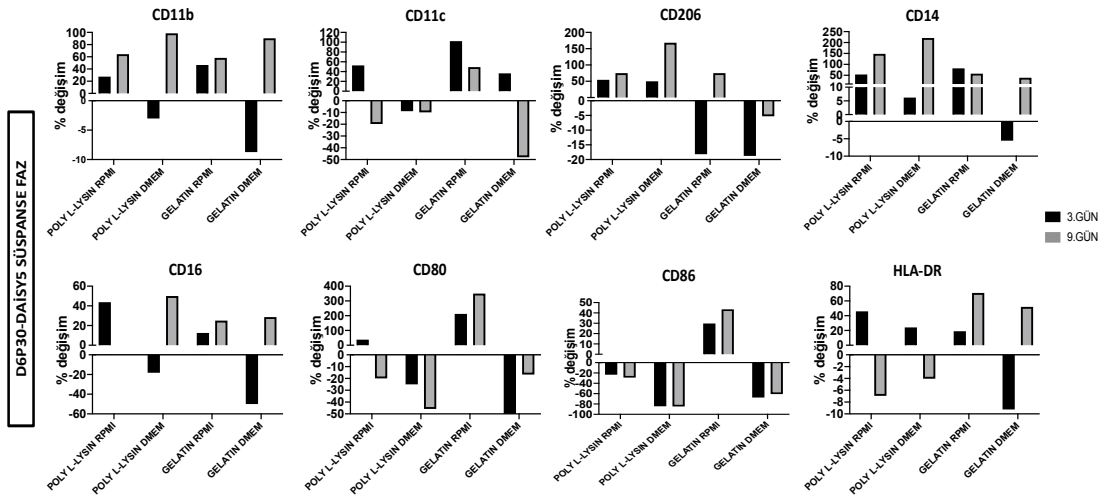
**Şekil 4.10** Alveolar Makrofaj Benzeri Hücre Hattı Alt-Klonu D6P30-DAİSY5 hücre hattının ‘adherent fazında’ bulunan hücrelerdeki CD206, CD80, CD86, CD16, CD11c, CD11b, CD14 ve HLA-DR yüzey belirteçlerinin %değişim grafikleri



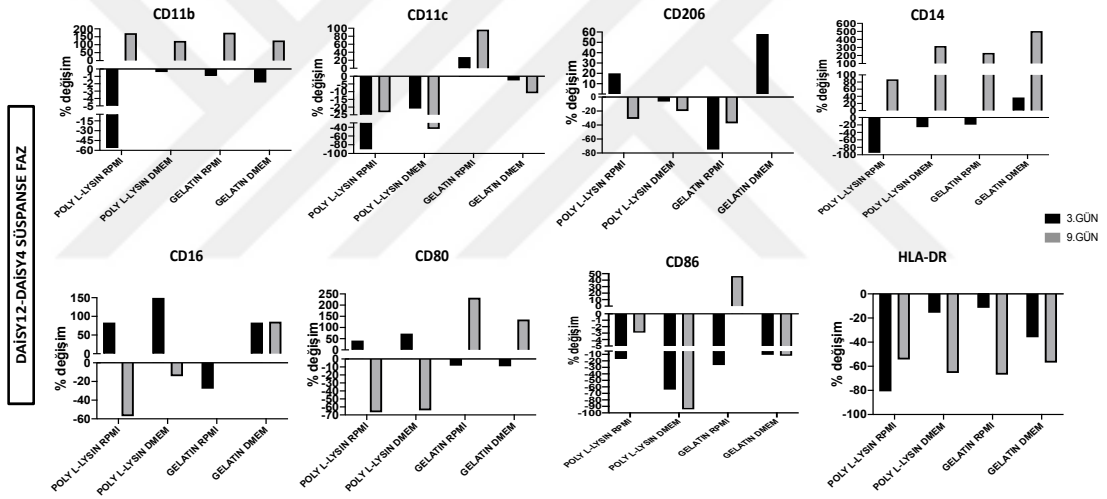
**Şekil 4.11** Alveolar Makrofaj Benzeri Hücre Hattı Alt-Klonu DAİSY12-DAİSY4 hücre hattının ‘‘adherent fazında’’ bulunan hücrelerdeki CD206, CD80, CD86, CD16, CD11c, CD11b, CD14 ve HLA-DR yüzey belirteçlerinin %değişim grafikleri



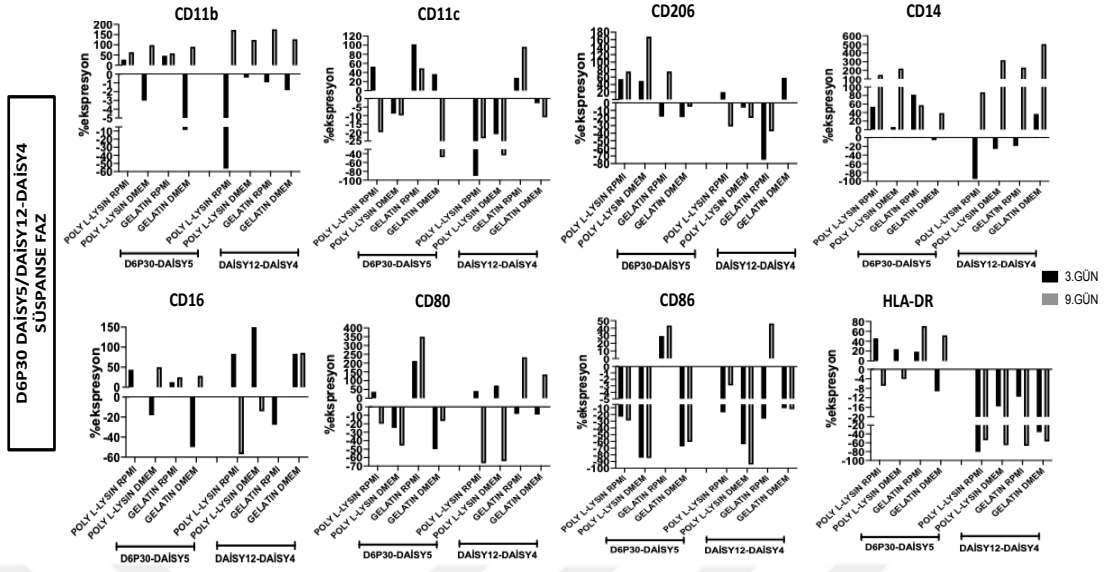
**Şekil 4.12** Alveolar Makrofaj Benzeri Hücre Hattı Alt-Klonu D6P30-DAİSY5/DAİSY12-DAİSY4 hücre hattının ‘‘adherent fazında’’ bulunan hücrelerdeki CD206, CD80, CD86, CD16, CD11c, CD11b, CD14 ve HLA-DR yüzey belirteçlerinin %değişim grafikleri



**Şekil 4.13** Alveolar Makrofaj Benzeri Hücre Hattı Alt-Klonu D6P30-DAİSY5 hücre hattının ‘süspans fazında’ bulunan hücrelerdeki CD206, CD80, CD86, CD16, CD11c, CD11b, CD14 ve HLA-DR yüzey belirteçlerinin %değişim grafikleri

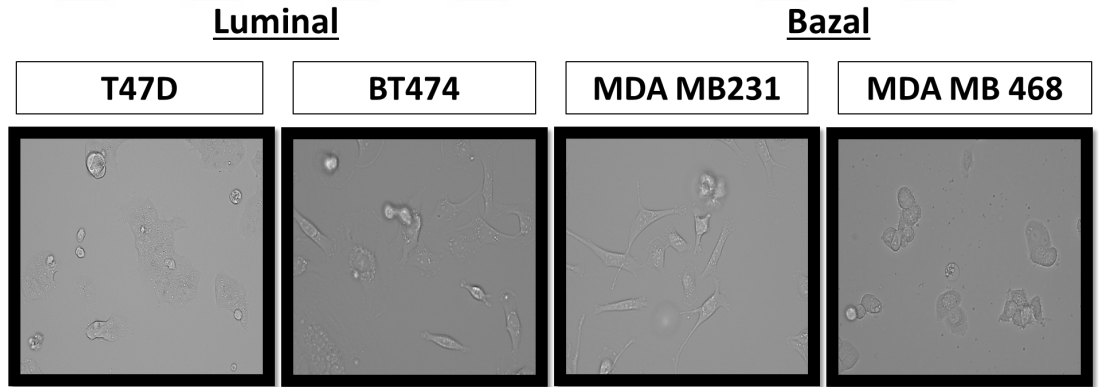


**Şekil 4.14** Alveolar Makrofaj Benzeri Hücre Hattı Alt-Klonu DAİSY12-DAİSY4 hücre hattının ‘süspans fazında’ bulunan hücrelerdeki CD206, CD80, CD86, CD16, CD11c, CD11b, CD14 ve HLA-DR yüzey belirteçlerinin %değişim grafikleri



**Şekil 4.15** Alveolar Makrofaj Benzeri Hücre Hattı Alt-Klonu D6P30-DAİSY5/DAİSY12-DAİSY4 hücre hattının ‘süspanse fazında’ bulunan hücrelerdeki CD206, CD80, CD86, CD16, CD11c, CD11b, CD14 ve HLA-DR yüzey belirteçlerinin %değişim grafikleri

#### 4.2 Meme Kanseri Hücre Hatları Ve Monosit/Makrofaj/Alveolar Makrofaj-Benzeri Hücre Alt-Gruplarının Ko-Kültür Deneyleri



**Şekil 4.16** Kanser Hücre Hatlarının Işık Mikroskopi İle Görüntüleri.

Meme kanseri hücre hatları T47D, BT474, MDA-MB-231, MDA-MB-468 ve monosit/makrofaj hücre hatları THP-1, pTHP-1, Al-Maq ile gerçekleştirilen ko-kültürler sonrasında CD24+CD44-, CD24-CD44+, CD24+CD44+, CD24-CD44- hücre alt gruplarının ekspresyon düzeylerine bakılmıştır (Şekil 4.17, Şekil 4.18, Şekil 4.19, Şekil 4.20). İlk olarak CD24+CD44- yüzey ekspresyon seviyelerine bakıldığında, bu ekspresyonun en çok luminal hücre hattı olan T47D’de over eksprese

edildiği görülmektedir. BT474, MDA-MB-231, MDA-MB-468’de ise ya hiç eksprese edilmediği ya da çok az edildiği görülmektedir. T47D’nin THP-1, pTHP-1, Al-Maq ile ko-kültürü sonrası pTHP-1’in THP-1’e göre CD24+CD44- ekspresyon düzeyinin arttığı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Şekil 4.21, Şekil 4.22, Şekil 4.23, Şekil 4.24).

BT474 hücre hattı tek başına CD24+CD44- eksprese etmezken, Al-Maq ve THP-1 ile ko-kültürü sonrası CD24+CD44- ekspresyonunu arttığı görülürken, pTHP-1 ko-kültürü ile birlikte bu yüzey belirtecinin ekspresyonunda bir değişiklik görülmemiştir (Şekil 4.21, Şekil 4.22, Şekil 4.23, Şekil 4.24).

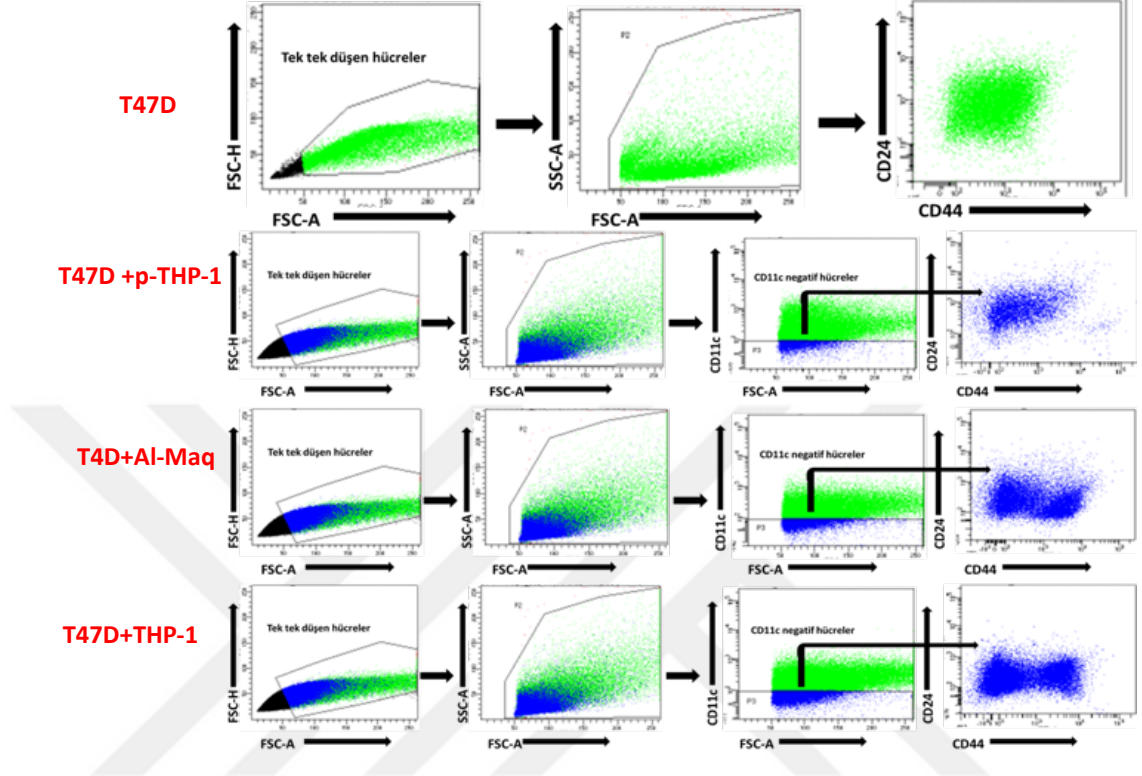
Bazal hücre hatları MDA-MB-231, MDA-MB-468 tek başına CD24+CD44- ya hiç ya da çok az eksprese ederken, MDA-MB-231’de CD24+CD44- ekspresyonu özellikle Al-Maq ile önemli bir seviyede artarken, MDA-MB-468’te ise hem Al-Maq ko-kültürü hemde THP-1, pTHP-1 ko-kültürü sonrasında CD24+CD44- ekspresyonunun arttığı görülmektedir (Şekil 4.19, Şekil 4.20, Şekil 4.21, Şekil 4.22).

Özellikle kanser kök hücresi yüzey belirteci olan CD24-CD44+ ekspresyonu BT474 ve MDA-MB-231 hücre hatlarında tek başına artmışken, T47D ve MDA-MB-468 hücre hatlarında ekspresyonu görülmemektedir. Fakat bu iki hücre hattının özellikle THP-1 ve Al-Maq ile ko-kültürleri sonrası CD24-CD44+ ekspresyonlarının önemli bir düzeyde arttığı görülmektedir. BT474 ve MDA-MB-231 hücre hatlarının ise THP-1, pTHP-1, Al-Maq ile ko-kültürleri sonrası yine CD24-CD44+ ekspresyonlarının arttığı görülmektedir, fakat yüzde değişimi olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (Şekil 4.21, Şekil 4.22, Şekil 4.23, Şekil 4.24).

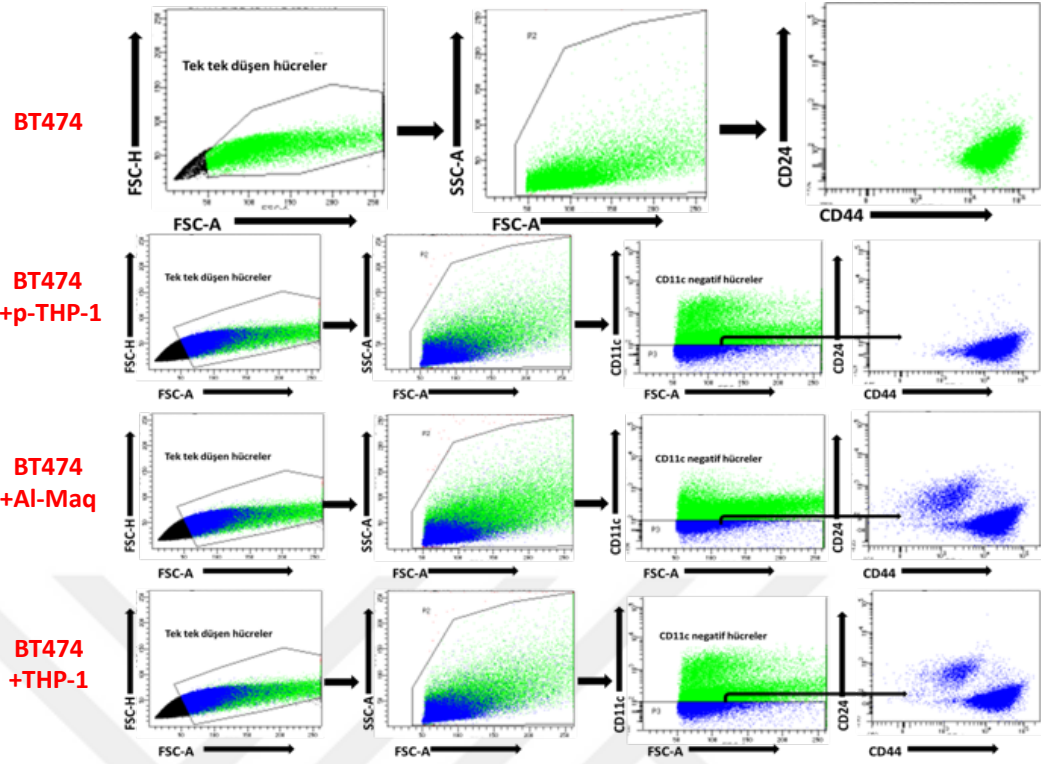
CD24+CD44+ ekspresyonunun ise bu sefer T47D ve MDA-MB-468 hücre hatlarında arttığı görülürken, T47D ve MDA-MB-231 hücre hatları ise CD24+CD44+ yüzey belirtecini çok az eksprese ettiği görülmektedir. Yine bu iki hücre hattının özellikle THP-1 ve Al-Maq ile birlikte ko-kültürü sonrasında, CD24+CD44+ ekspresyonunun istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı görülmektedir (Şekil 4.19, Şekil 4.22, Şekil 4.24, Şekil 4.26).

Son olarak hem bazal hem de luminal bu dört hücre hattında da CD24-CD44- ekspresyonu çok fazla görülmemektedir. Luminal hücre hatları T47D ve BT474’ün THP-1 ve Al-Maq ile birlikte ko-kültürü sonrasında CD24-CD44- ekspresyonunun önemli bir düzeyde arttığı görülmektedir. Bazal hücre hatlarından MDA-MB-231’in

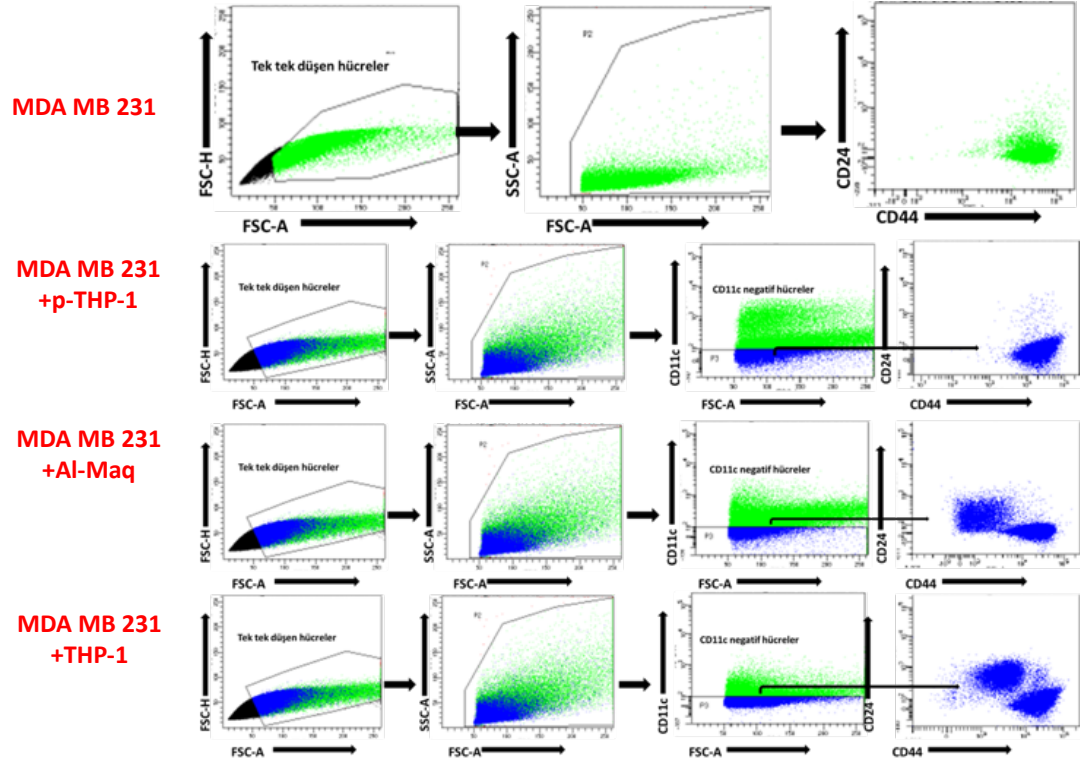
Al-Maq ile ko-kültürü sonrası, MDA-MB-468 hücre hattının ise hem Al-Maq, hem de THP-1 ve pTHP-1 ile ko-kültürü sonrası CD24-CD44- ekspresyonunun anlamlı bir şekilde arttığı görülmektedir (Şekil 4.21, Şekil 4.22, Şekil 4.23, Şekil 4.24).



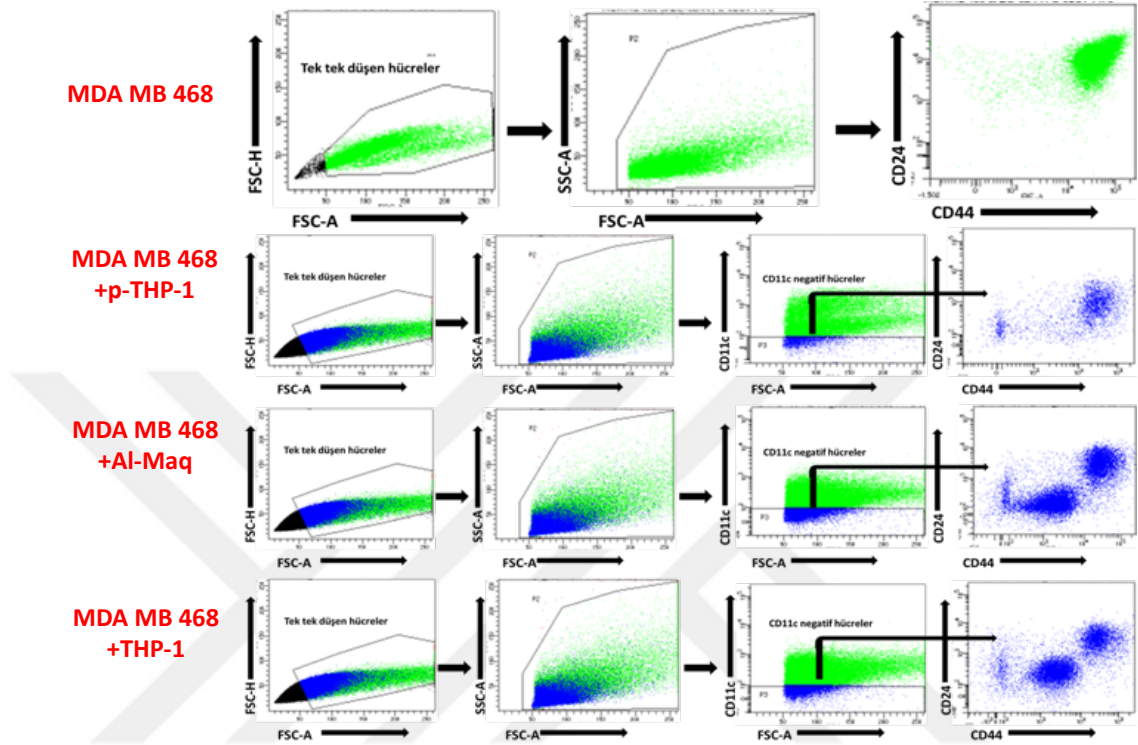
Şekil 4.17 Meme kanseri hücre hattı T47D ve monosit/makrofaj hücre hatları THP-1, pTHP-1, Al-Maq ile gerçekleştirilen ko-kültürler sonrasında CD24+CD44-, CD24-CD44+, CD24+CD44+, CD24-CD44- hücre alt gruplarının ekspresyon düzeylerinin temsili akım sitometri grafikleri.



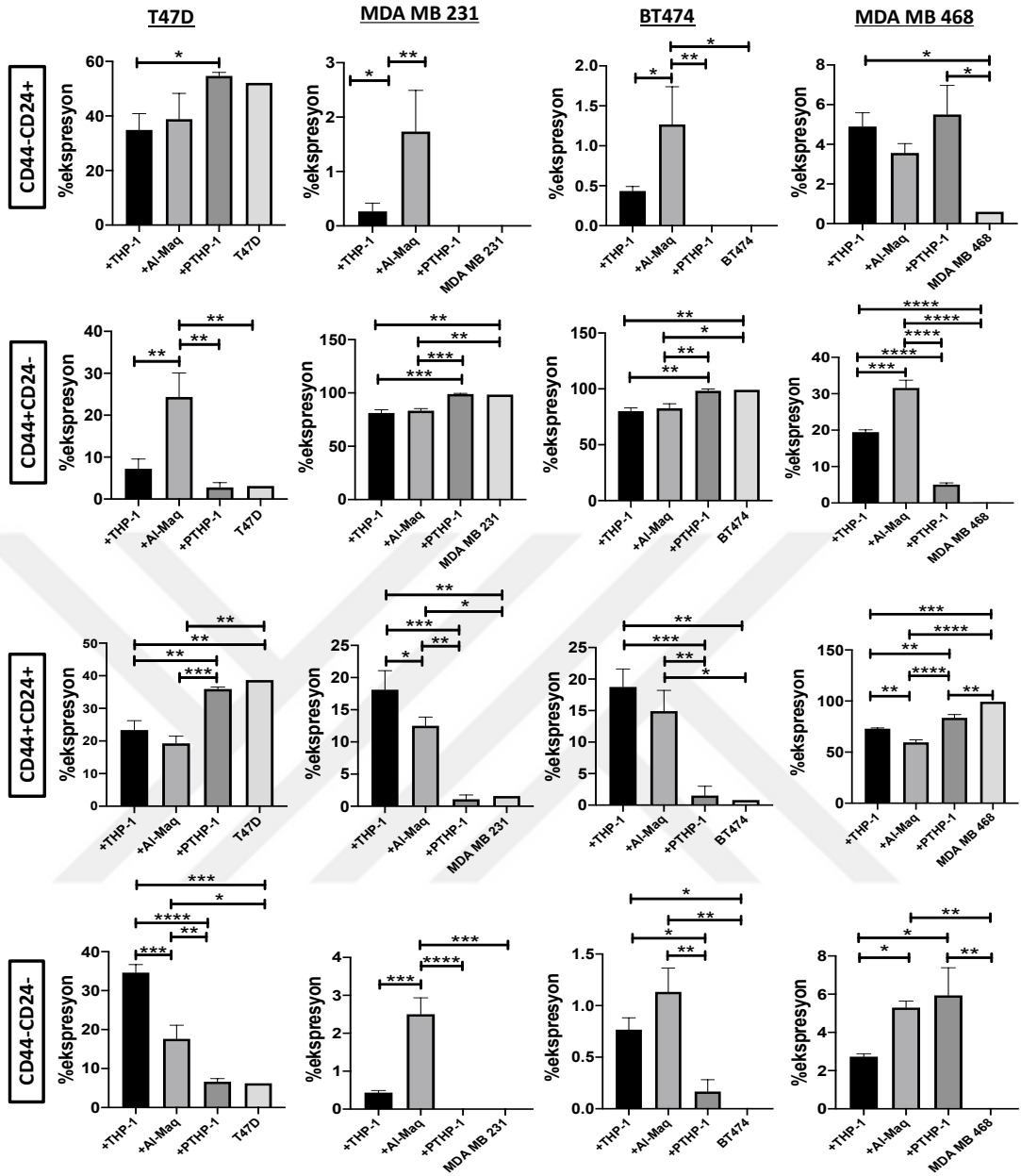
**Şekil 4.18** Meme kanseri hücre hattı BT474 ve monosit/makrofaj hücre hatları THP-1, pTHP-1, Al-Maq ile gerçekleştirilen ko-kültürler sonrasında CD24+CD44-, CD24-CD44+, CD24+CD44+, CD24-CD44- hücre alt gruplarının ekspresyon düzeylerinin temsili akım sitometri grafikleri.



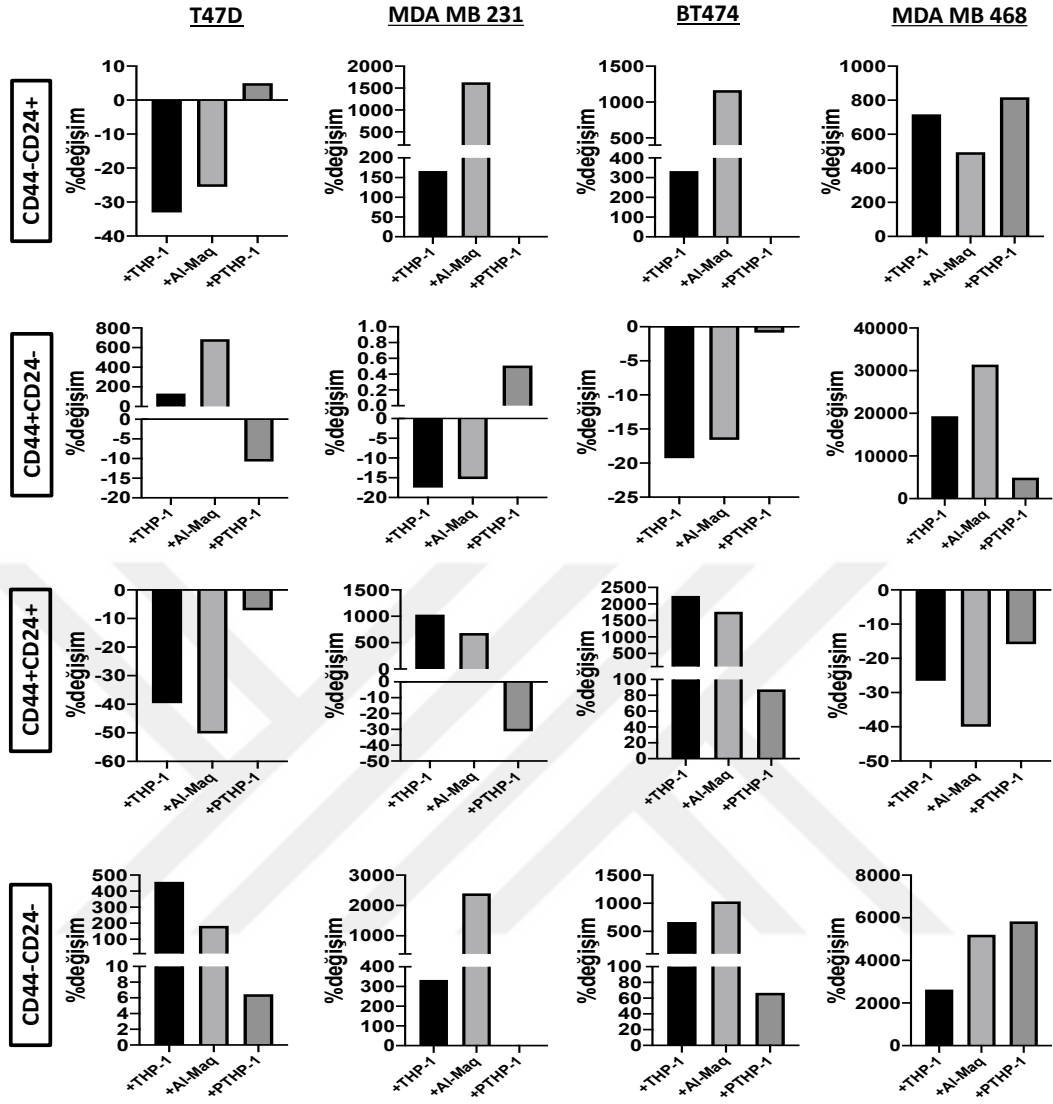
**Şekil 4.19** Meme kanseri hücre hattı MDA MB 231 ve monosit/makrofaj hücre hatları THP-1, pTHP-1, Al-Maq ile gerçekleştirilen ko-kültürler sonrasında CD24+CD44-, CD24-CD44+, CD24+CD44+, CD24-CD44- hücre alt gruplarının ekspresyon düzeylerinin temsili akım sitometri grafikleri.



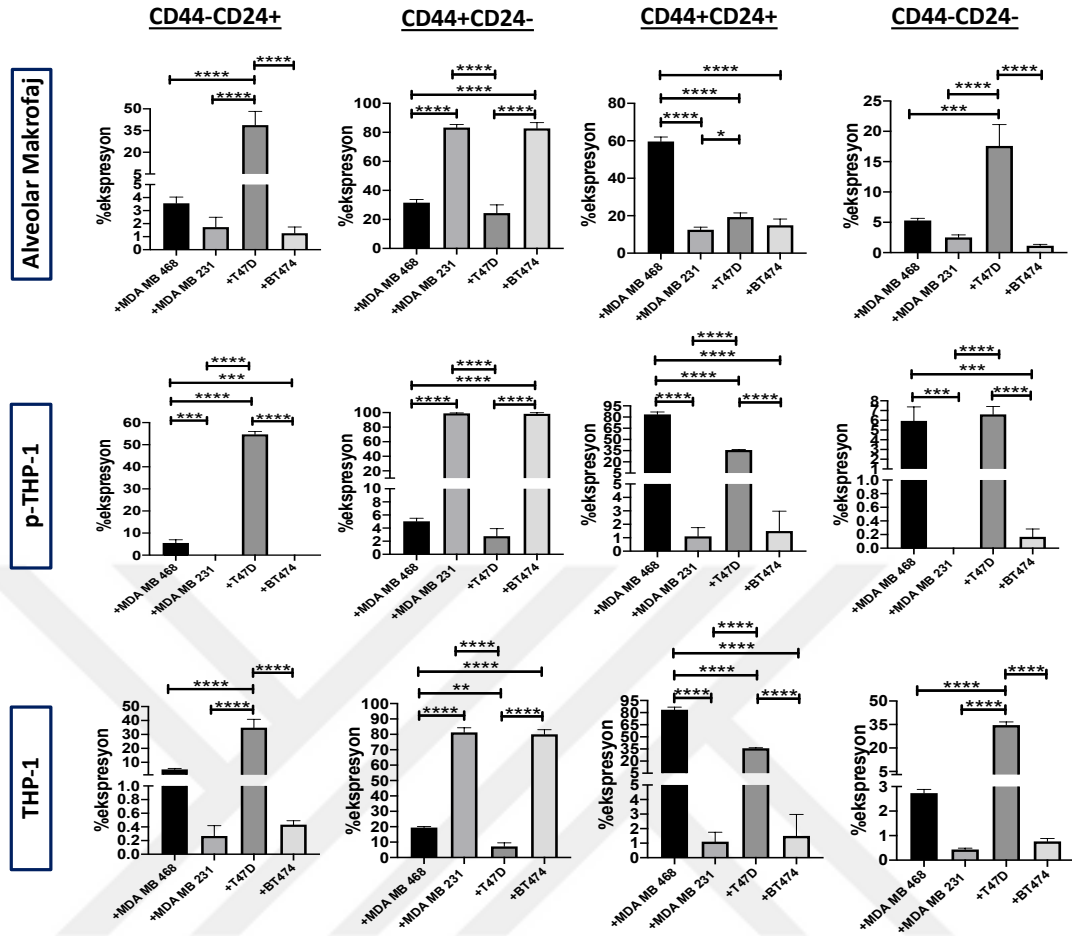
**Şekil 4.20** Meme kanseri hücre hattı MDA MB 468 ve monosit/makrofaj hücre hatları THP-1, pTHP-1, Al-Maq ile gerçekleştirilen ko-kültürler sonrasında CD24+CD44-, CD24-CD44+, CD24+CD44+, CD24-CD44- hücre alt gruplarının ekspresyon düzeylerinin temsili akım sitometri grafikleri.



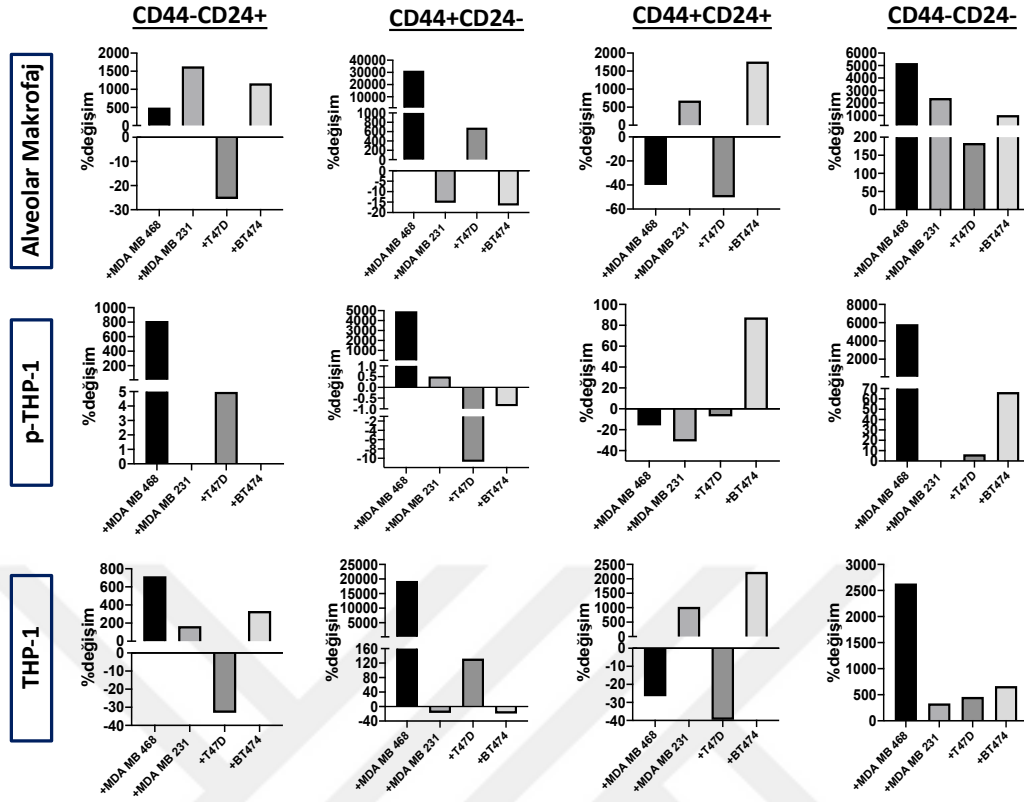
**Şekil 4.21** Meme kanseri hücre hatları (T47D, BT474, MDA-MB-231, MDA-MB-468) ve monosit/makrofaj hücre hatları (THP-1, pTHP-1, Al-Maq) ile gerçekleştirilen ko-kültürler sonrasında CD24+CD44, CD24-CD44+, CD24+CD44+, CD24-CD44- hücre alt gruplarının %ekspresyon değişimleri.  $p < 0,05$ \*;  $p < 0,01$ \*\*;  $p < 0,001$ \*\*\*;  $p < 0,0001$ \*\*\*\*



**Şekil 4.22** Meme kanseri hücre hatları (T47D, BT474, MDA-MB-231, MDA-MB-468) ve monosit/makrofaj hücre hatları (THP-1, pTHP-1, Al-Maq) ile gerçekleştirilen ko-kültürler sonrasında CD24+CD44, CD24-CD44+, CD24+CD44+, CD24-CD44- hücre alt gruplarının %değişim grafikleri.



Şekil 4.23 Al-Maq, pTHP-1 ve THP-1 hücrelerinin, meme kanseri MDA-MB-468, MDA-MB-231, T47D ve BT474 hücre alt gruplarına etkisi. Yüzde ekspresyon grafikleri verilmiştir.  $p < 0,05^*$ ;  $p < 0,01^{**}$ ;  $p < 0,001^{***}$ ;  $p < 0,0001^{****}$



**Şekil 4.24** Al-Maq, pTHP-1 ve THP-1 hücrelerinin, meme kanseri MDA-MB-468, MDA-MB-231, T47D ve BT474 hücre alt gruplarına etkisi. Yüzde değişim grafikleri verilmiştir.  $p < 0,05^*$ ;  $p < 0,01^{**}$ ;  $p < 0,001^{***}$ ;  $p < 0,0001^{****}$

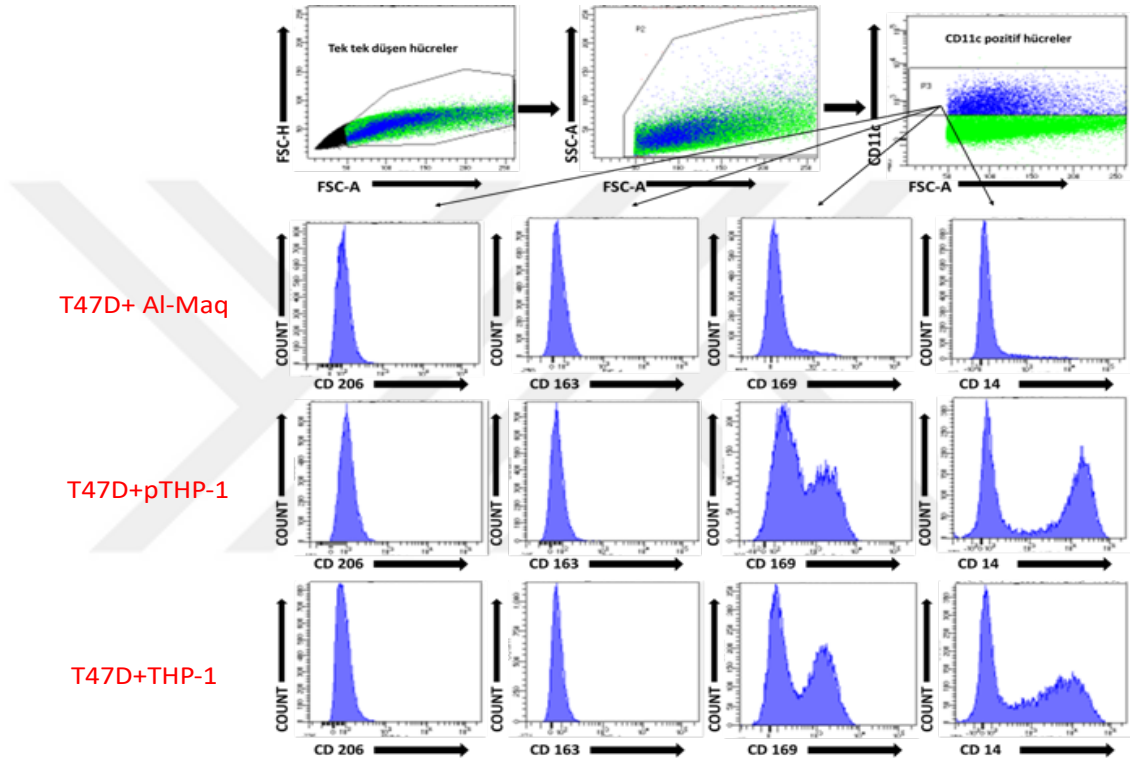
Meme kanseri hücre hatları T47D, BT474, MDA-MB-231 ve MDA-MB-468'in monosit/makrofaj hücre hatları THP-1, Al-Maq ve pTHP-1 ile ko-kültürü sonrası CD206, CD163, CD169 ve CD14 yüzey belirteçleri üzerine etkileri incelenmiştir (Şekil 4.25, Şekil 4.26, Şekil 4.27, Şekil 4.28).

Alveolar makrofaj belirteçlerinden CD206 düzeyi BT474 hücre hattı ile gerçekleşen ko-kültürler sonrasında en çok Al-Maq hücrelerinde, sonrasında da THP-1 hücre hatlarında gözlemlendi. CD163 genellikle makrofaj lokalizasyonu ile ilgili fikir veren bir molekül olup, BT474 ko-kültürü ile en az p-THP hücrelerinde artış gösterdi (Şekil 4.27, Şekil 4.28 ve Şekil 4.9). Bazal benzeri hücre hatları olan ve metastatik potansiyeli yüksek olduğu daha önceki çalışmalarda gösterilmiş MDA-MB-468 ve MDA-MB-231 hücre hatlarının ise, CD163 belirtecini en yüksek düzeylerde p-THP hücrelerinde arttırdığı görüldü (Şekil 4.29, Şekil 4.30 ve Şekil 4.31).

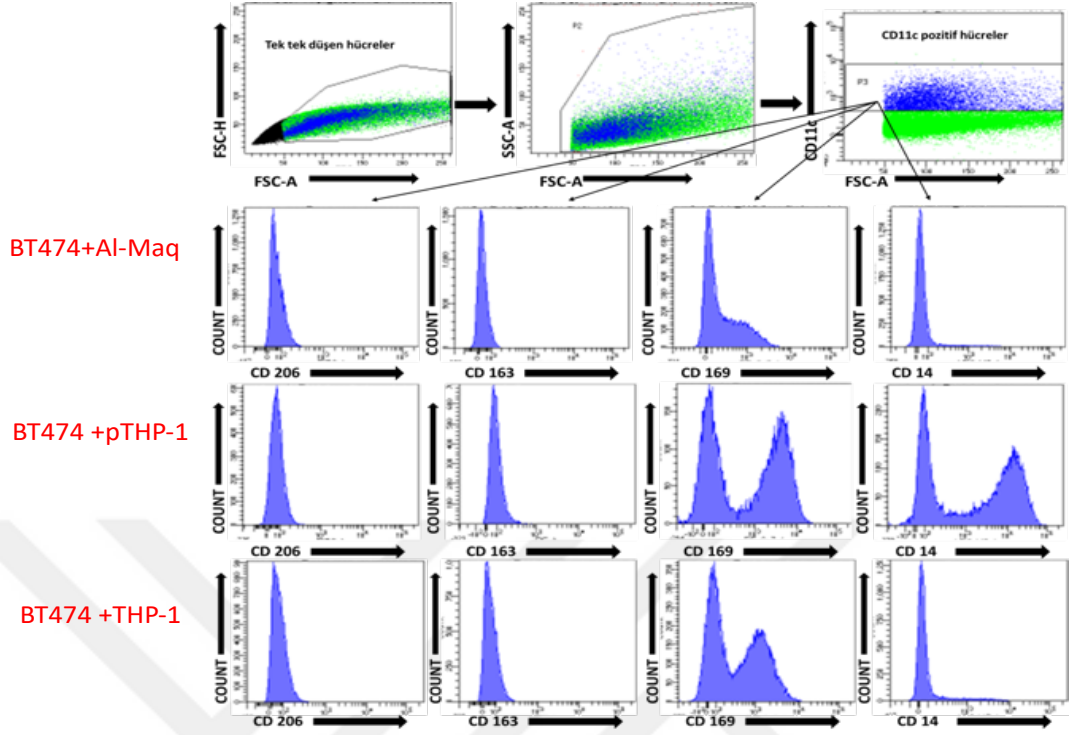
CD169, alveolar makrofajlar üzerinde CD206 ile beraber görülen bir yüzey belirteci olup, MDA-MB-468 hücre hattı ile gerçekleşen ko-kültürlerin tümünde bu

belirtecin artış gösterdiği saptanmıştır. Bunun yanı sıra, MDA-MB-231 hücre hattının da Al-Maq alt-grubunda bu belirteci arttırdığı gösterilmiştir. En az uyarıcı hücre hattı ise, BT474 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.29, Şekil 4.30).

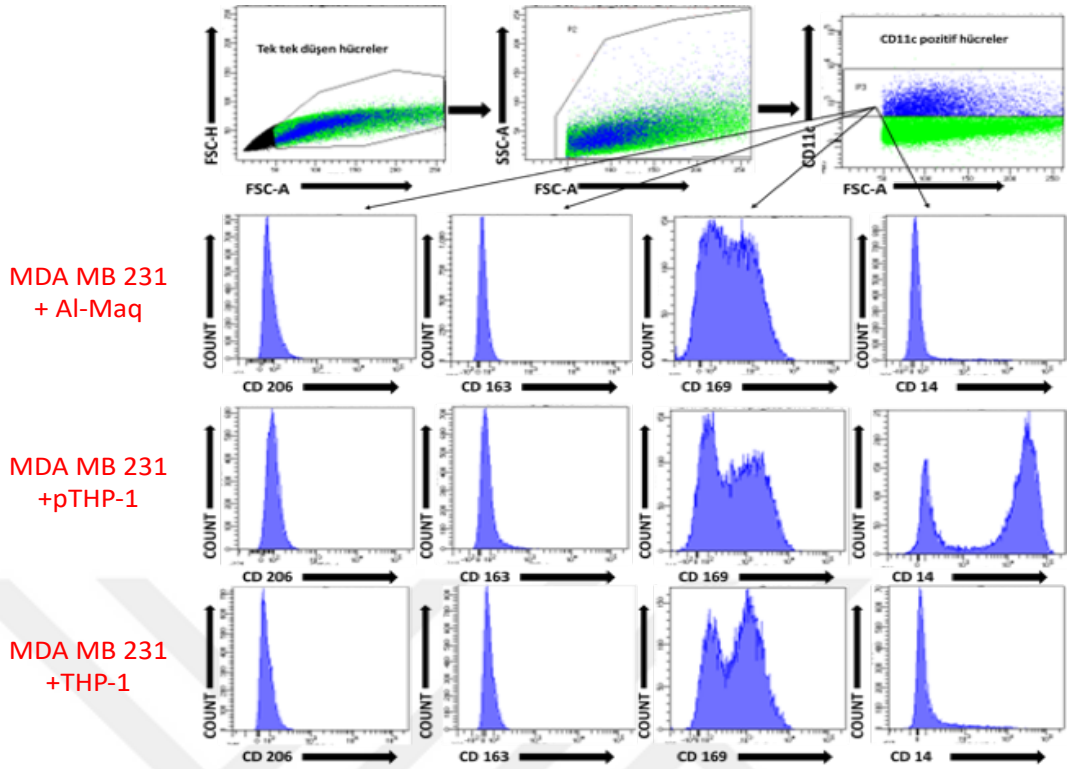
CD14 hem monosit hem de makrofajlar için kullanılan bir yüzey belirteci olup, özellikle monositler için kabul görmektedir. BT474, THP-1 hücre hattında tüm alt-gruplara göre CD14 belirtecini en yüksek düzeyde arttırmıştır. MDA-MB-468 ise, Al-Maq ve p-THP-1 hücrelerinde belirtecin artışı desteklemiştir (Şekil 4.29, Şekil 4.30).



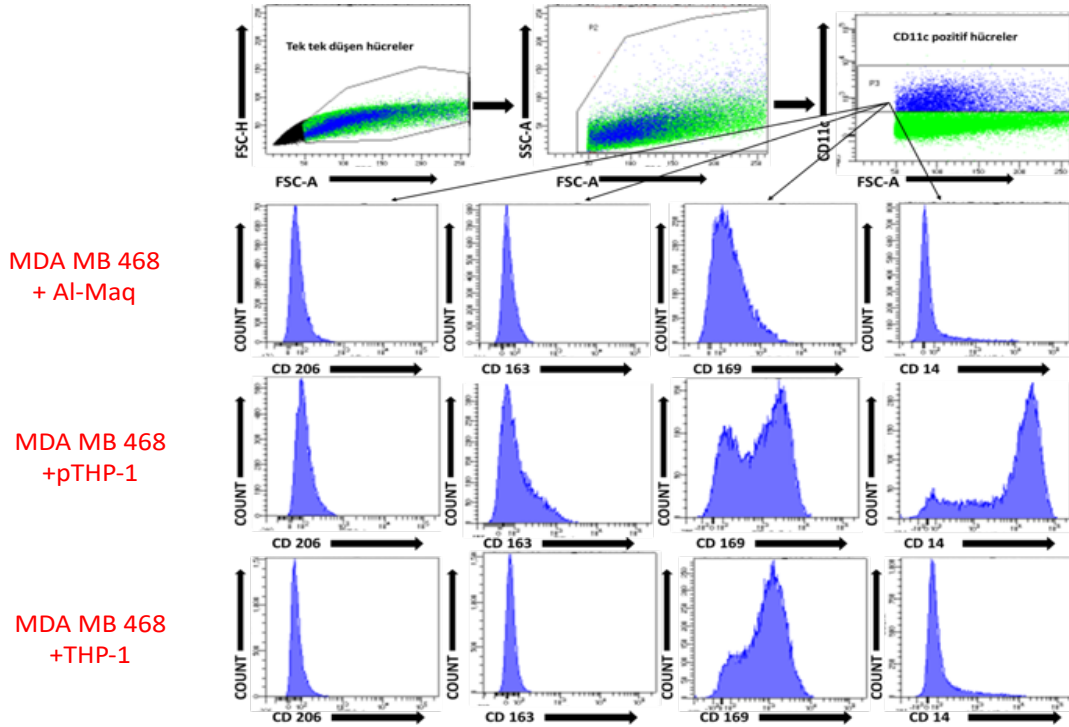
**Şekil 4.25** Meme kanseri hücre hattı T47D'nin monosit/makrofaj hücre hatları THP-1, Al-Maq ve pTHP-1 ile ko-kültürü sonrası CD11c+ hücre kapısından CD206, CD163, CD169 ve CD14 yüzey belirteçleri üzerine etkilerinin temsili akım sitometri görüntüleri



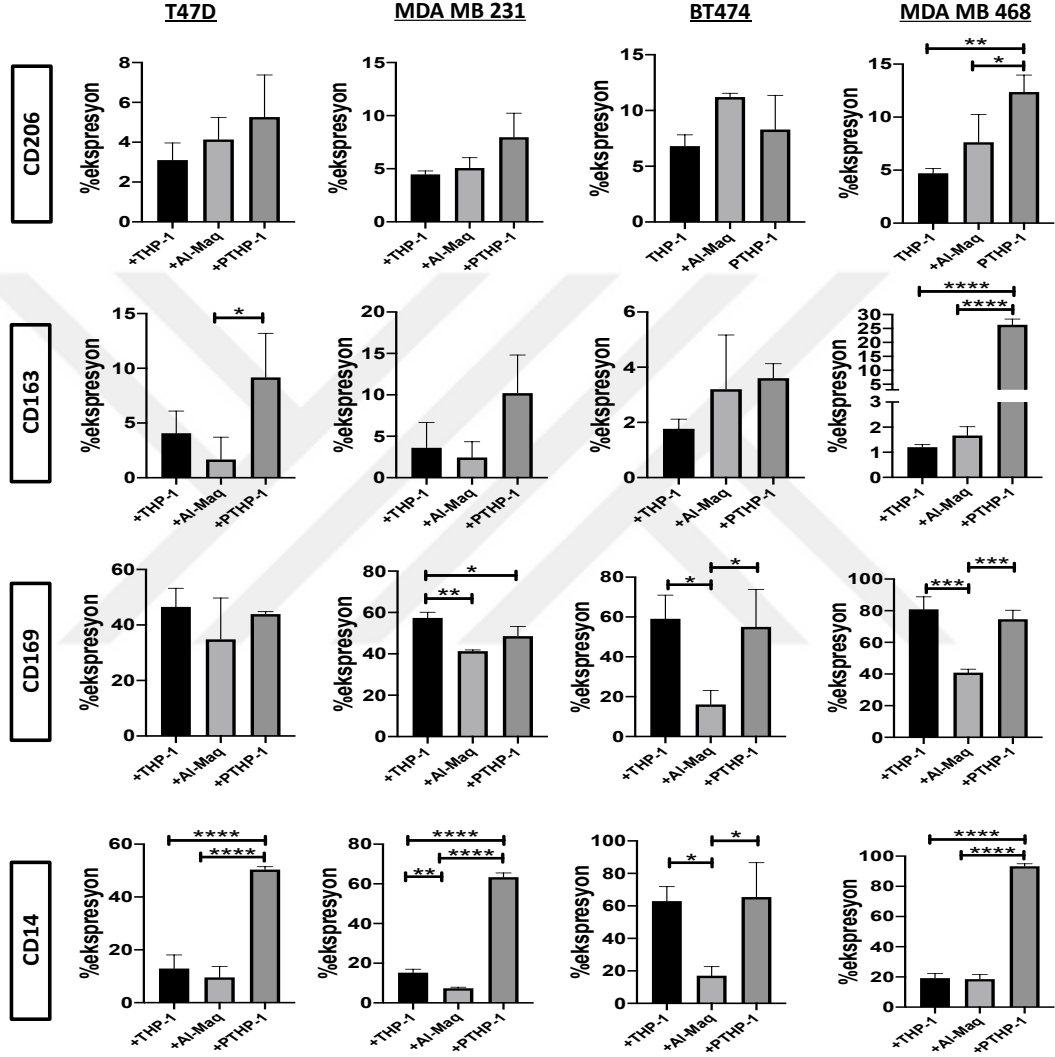
**Şekil 4.26** Meme kanseri hücre hattı BT474'ün monosit/makrofaj hücre hatları THP-1, Al-Maq ve pTHP-1 ile ko-kültürü sonrası CD11c+ hücre kapısından CD206, CD163, CD169 ve CD14 yüzey belirteçleri üzerine etkilerinin temsili akım sitometri görüntüleri



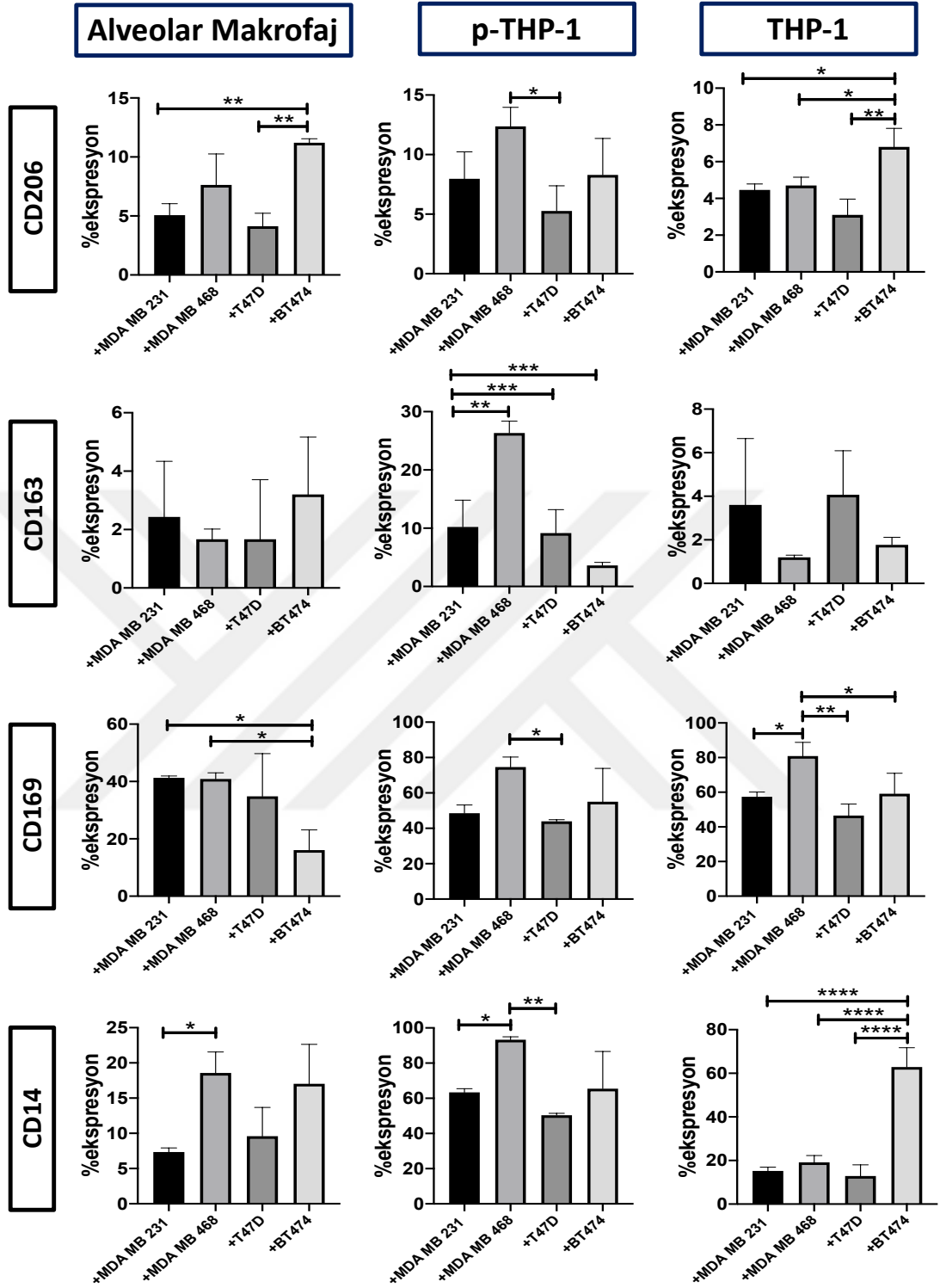
Şekil 4.27 Meme kanseri hücre hattı MDA MB 231'in monosit/makrofaj hücre hatları THP-1, Al-Maq ve pTHP-1 ile ko-kültürü sonrası CD11c+ hücre kapısından CD206, CD163, CD169 ve CD14 yüzey belirteçleri üzerine etkilerinin temsili akım sitometri görüntüleri



**Şekil 4.28** Meme kanseri hücre hattı MDA MB 468'in monosit/makrofaj hücre hatları THP-1, Al-Maq ve pTHP-1 ile ko-kültürü sonrası CD11c+ hücre kapısından CD206, CD163, CD169 ve CD14 yüzey belirteçleri üzerine etkilerinin temsili akım sitometri görüntüleri

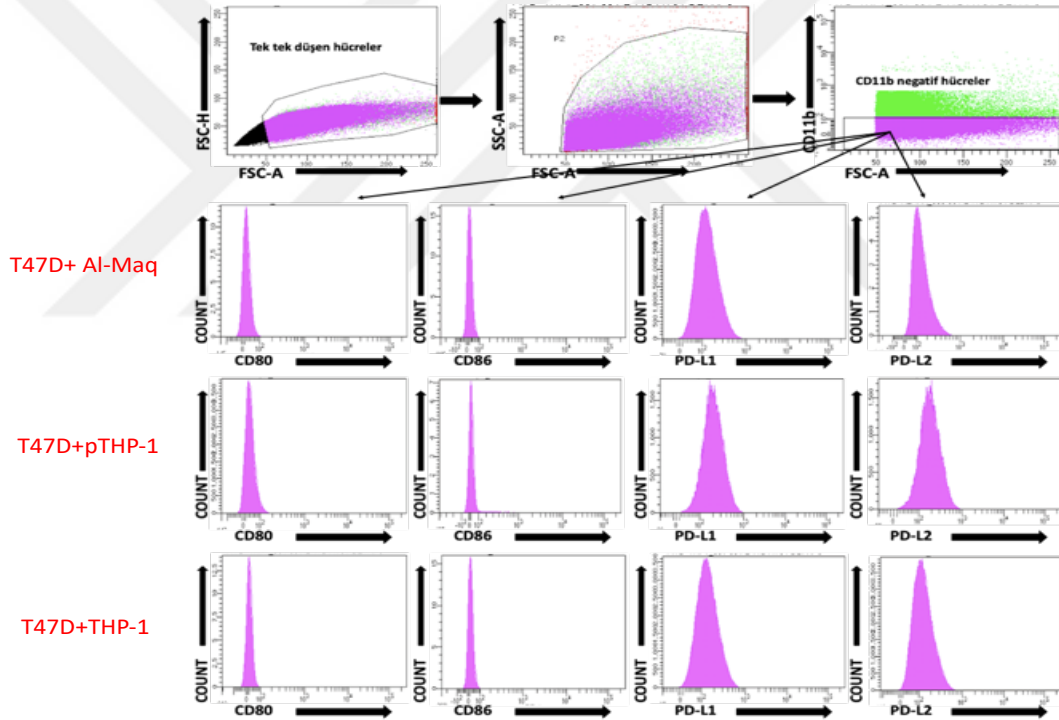


**Şekil 4.29** T47D, BT474, MDA-MB-231 ve MDA-MB-468 hücrelerinin THP-1, Al-Maq ve pTHP-1 hücreleriyle ko-kültürü sonrası CD11c+ hücre kapısından CD206, CD163, CD169 ve CD14 yüzey belirteçleri üzerine etkileri. p<0,05\*; p<0,01\*\*; p<0,001\*\*\*; p<0,0001\*\*\*\*

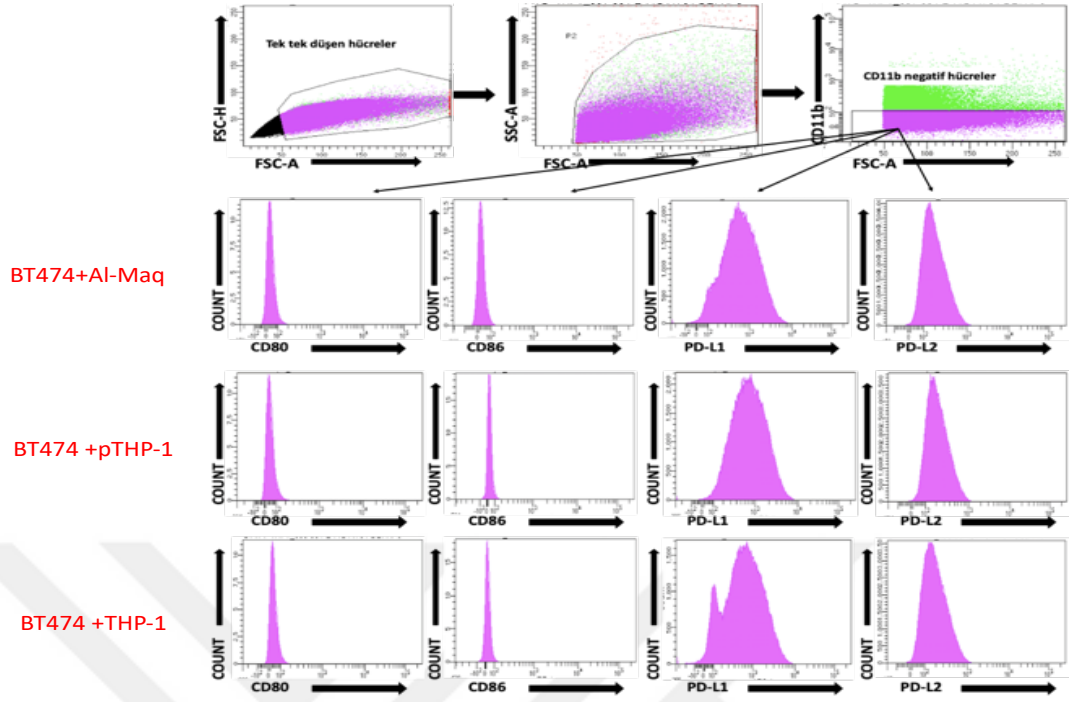


Şekil 4.30 Al-Maq, pTHP-1 ve THP-1 hücrelerinin MDA-MB-231, MDA-MB-468, T47D ve BT474 hücreleriyle ko-kültürü sonrası CD11c+ hücre kapısından CD206, CD163, CD169 ve CD14 yüzey belirteçleri üzerine etkileri.  $p < 0,05^*$ ;  $p < 0,01^{**}$ ;  $p < 0,001^{***}$ ;  $p < 0,0001^{****}$

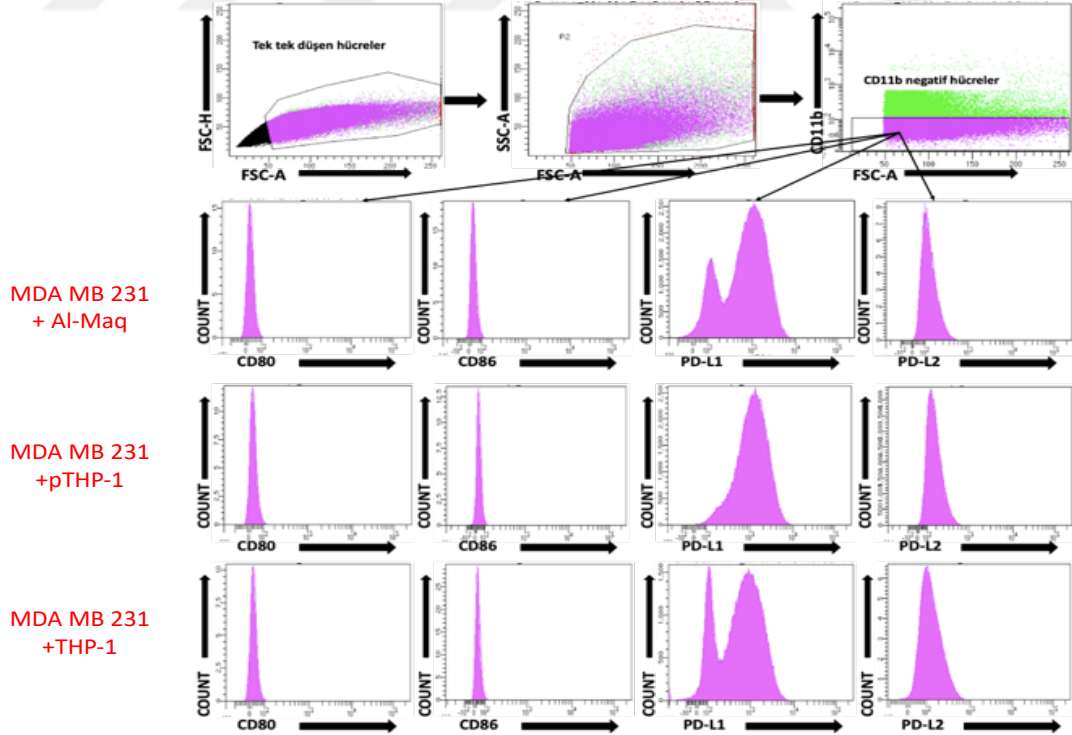
Kanser hücre hatları ile gerçekleşen monosit/makrofaj ko-kültürlerinde, BT474 hücreleri CD80 ekspresyonu yönünden diğer kanserlere oranla daha fazla uyarılmıştır. En düşük ekspresyon THP-1 ile ko-kültüre edilen T47D hücrelerinde görülmüştür. En yüksek CD86 ekspresyonu p-THP-1 ile ko-kültür yapılan T47D hücrelerinde görüldü. Yine aynı zamanda en düşük CD86 ekspresyonu da THP-1 hücresi ile ko-kültür yapılan T47D hücrelerinde belirlendi. Al-Maq, p-THP-1 ve THP-1 hücreleri ile ko-kültür yapılan MDA-MB 231 ve BT474 hücre hatlarında PD-L1 diğer kanserlere oranla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı tespit edildi. PD-L2 ekspresyonuna baktığımız zaman ise, BT474 hücre hattı diğer kanserlere göre istatistiksel olarak anlamlı bulundu. CD80, CD86, PD-L1 ve PD-L2 ekspresyonları tüm kanserlerde p-THP-1 koşulunda en yüksek ekspresyon düzeyine sahipti (Şekil 4.35, Şekil 4.36).



**Şekil 4.31** Meme kanseri hücre hattı T47D'nin monosit/makrofaj hücre hatları THP-1, Al-Maq ve pTHP-1 ile ko-kültürü sonrası CD11b- hücre kapısından CD80, CD86, PD-L1, PD-L2 yüzey belirteçleri üzerine etkilerinin temsili akım sitometri görüntüleri

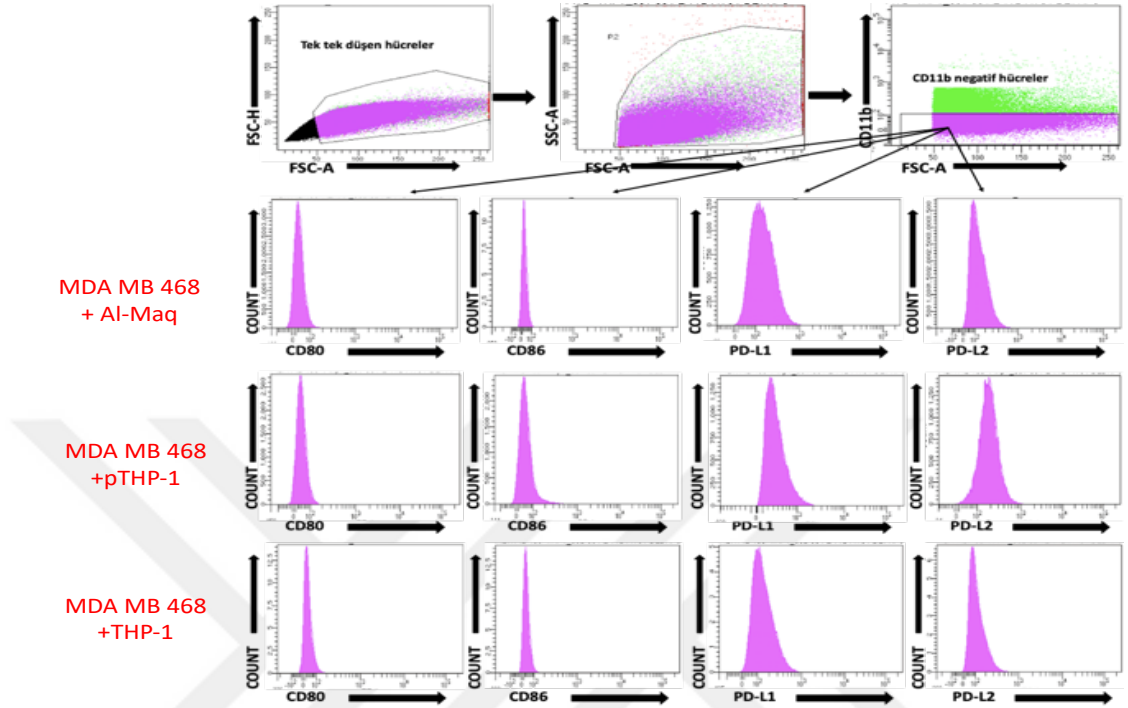


**Şekil 4.32** Meme kanseri hücre hattı BT474'ün monosit/makrofaj hücre hatları THP-1, Al-Maq ve pTHP-1 ile ko-kültürü sonrası CD11b- hücre kapısından CD80, CD86, PD-L1, PD-L2 yüzey belirteçleri üzerine etkilerinin temsili akım sitometri görüntüleri

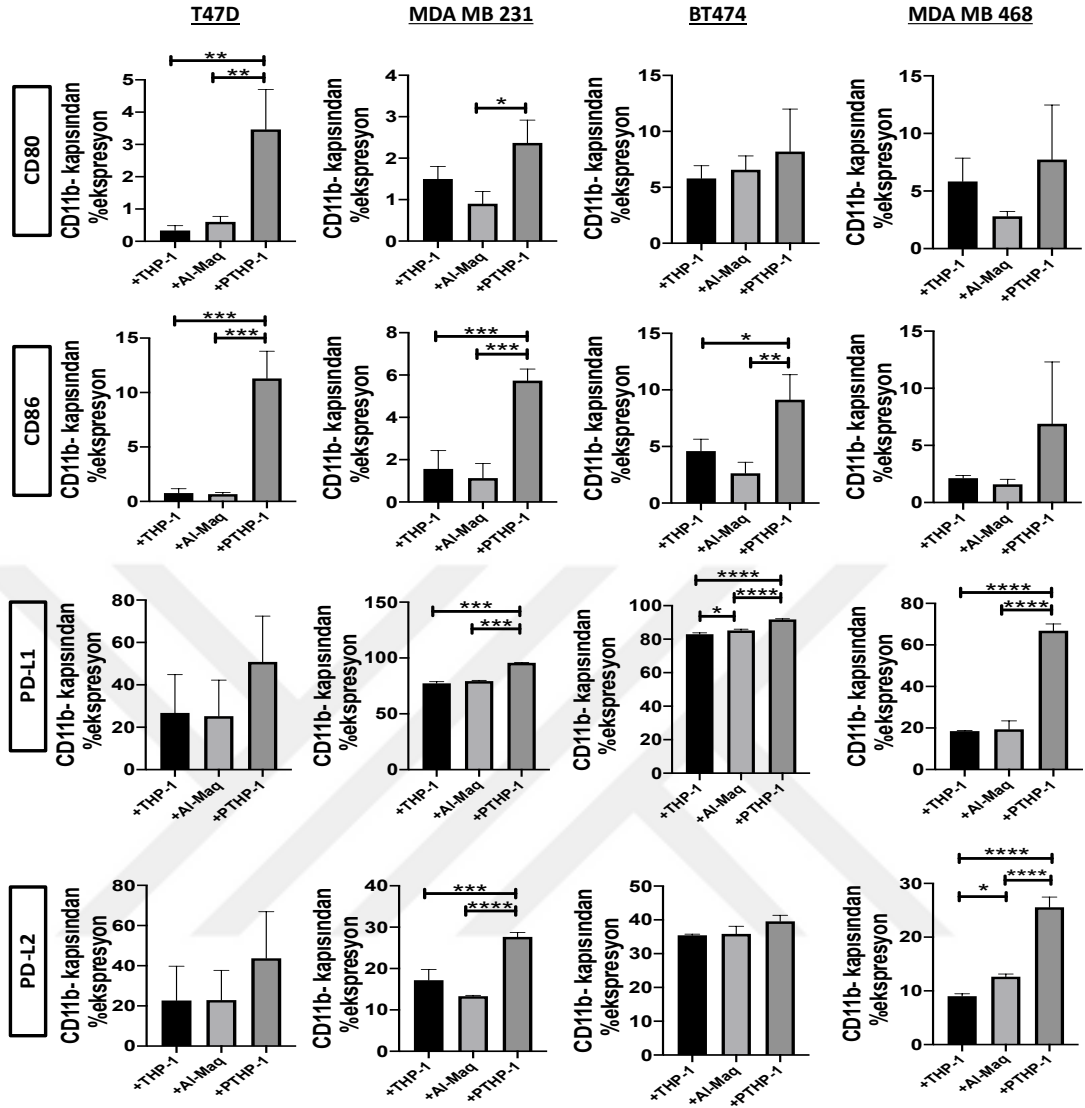


**Şekil 4.33** Meme kanseri hücre hattı MDA MB 231'in monosit/makrofaj hücre hatları THP-1, Al-Maq ve pTHP-1 ile ko-kültürü sonrası CD11b- hücre kapısından CD80,

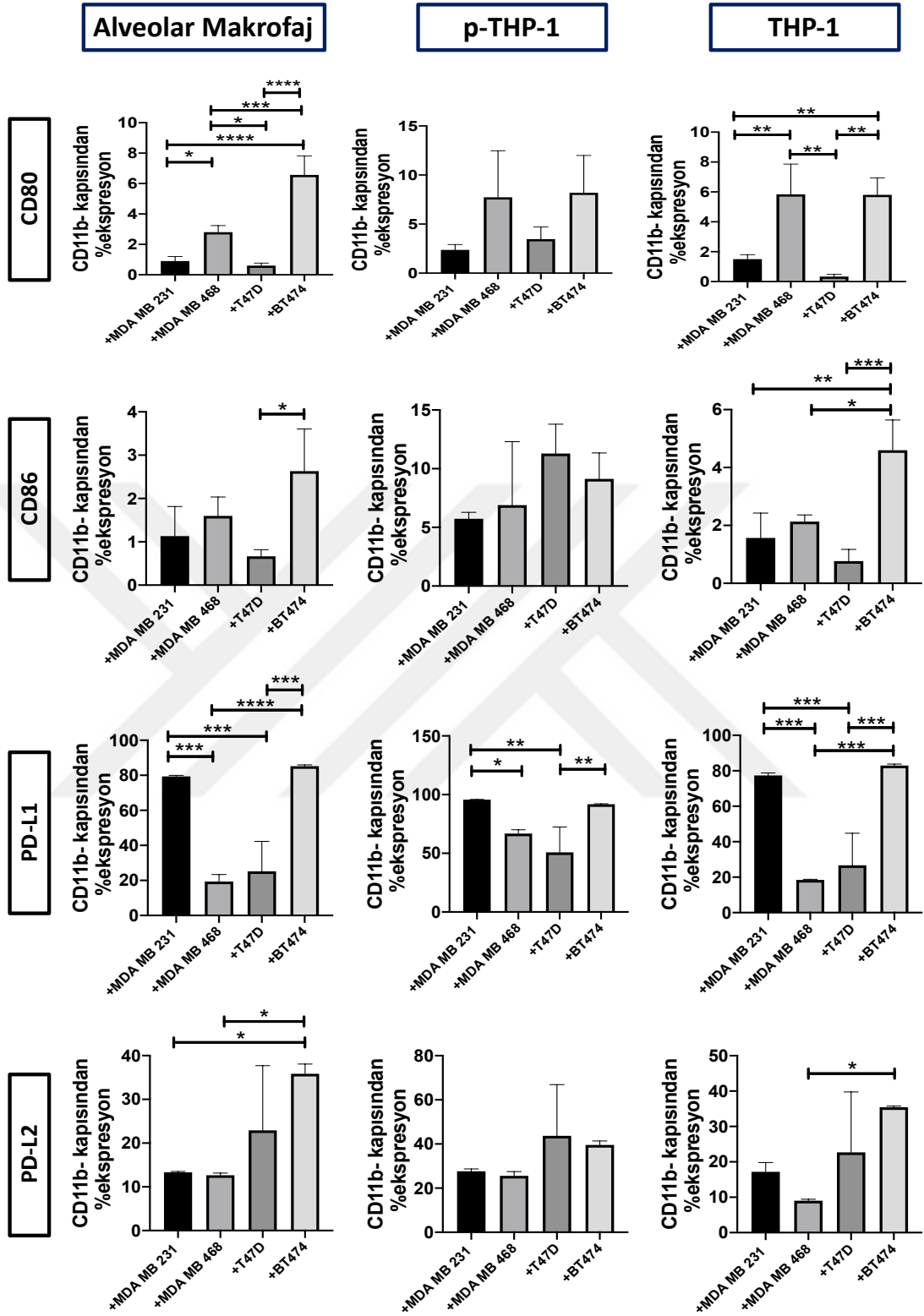
CD86, PD-L1, PD-L2 yüzey belirteçleri üzerine etkilerinin temsili akım sitometri görüntüleri



Şekil 4.34 Meme kanseri hücre hattı MDA MB 468'in monosit/makrofaj hücre hatları THP-1, Al-Maq ve pTHP-1 ile ko-kültürü sonrası CD11b- hücre kapısından CD80, CD86, PD-L1, PD-L2 yüzey belirteçleri üzerine etkilerinin temsili akım sitometri görüntüleri



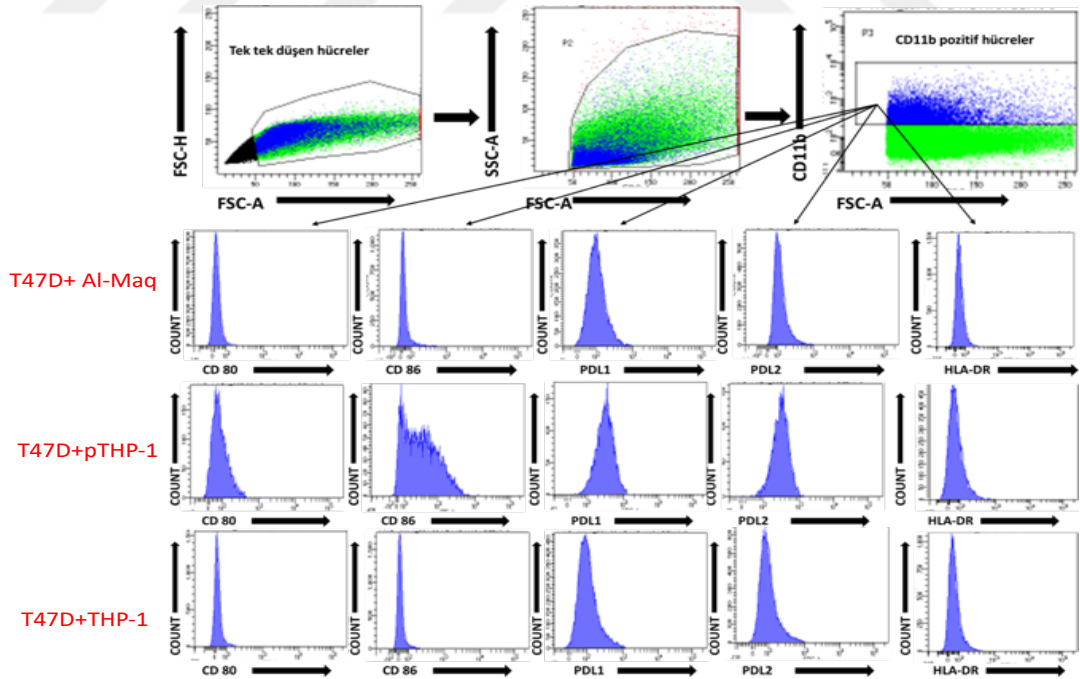
Şekil 4.35 T47D, BT474, MDA-MB-231 ve MDA-MB-468 hücrelerinin THP-1, Al-Maq ve pTHP-1 hücreleriyle ko-kültürü CD11b- hücre kapısından sonrası ko-stimülatör belirteçler CD80, CD86, PD-L1 ve PD-L2 üzerine etkileri.  $p < 0,05^*$ ;  $p < 0,01^{**}$ ;  $p < 0,001^{***}$ ;  $p < 0,0001^{****}$



**Şekil 4.36** Al-Maq, pTHP-1 ve THP-1 hücrelerinin MDA-MB-231, MDA-MB-468, T47D ve BT474 hücreleriyle ko-kültürü sonrası CD11b- hücre kapısından ko-stimülasyon belirteçler CD80, CD86, PD-L1 ve PD-L2 üzerine etkileri.  $p < 0,05^*$ ;  $p < 0,01^{**}$ ;  $p < 0,001^{***}$ ;  $p < 0,0001^{****}$

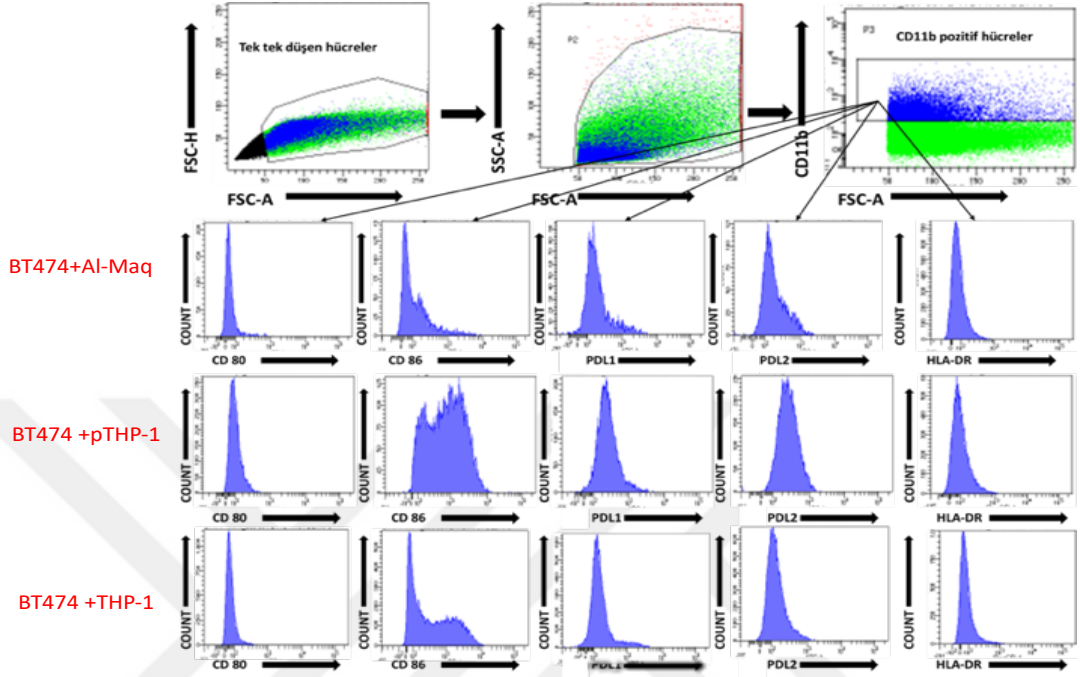
T47D hücre hattı ile gerçekleşen monosit/makrofaj ko-kültürlerinde, bu kanser alt-tipinin miyeloid hücrelerdeki HLA-DR ve CD80 ekspresyonunu en az düzeyde uyaran hücre hattı olduğu görüldü. BT474 hücre hattının ise en çok THP-1 hücre hattında daha sonrasında da Al-Maq (D6P30-DAİSY5) hücrelerinde HLA-DR ekspresyonunu desteklediği görüldü (Şekil 4.41, Şekil 4.42).

MDA MB 468 hücre hattı ile gerçekleşen p-THP-1 ko-kültüründe, bu kanser alt-tipinin miyeloid hücrelerdeki CD80 ekspresyonunu en yüksek düzeyde uyaran hücre hattı olduğu görüldü. Miyeloid hücreler arasındaki en çok CD86 ekspresyonu p-THP-1'a MDA MB 231 ve BT474 hücre hatları eklendiğinde görülmüştür. Yine en düşük CD86 ekspresyonu T47D hücre hattı ile ko-kültür yapılan miyeloid hücrelerde görüldü. PD-L1 ve PD-L2 ekspresyonu en çok T47D hücreleri ile ko-kültür yapılan p-THP-1 hücrelerinde görüldü. MDA MB 468 hücre hattı ile ko-kültür yapılan miyeloid hücre hatlarında en düşük PD-L1 ve PD-L2 ekspresyon seviyeleri belirlendi. CD80, CD86, PD-L1, PD-L2 ve HLA-DR ekspresyonları tüm kanser hücre hatlarında, p-THP-1 koşulunda diğer miyeloidlere göre en yüksek seviyelerde belirlendi (Şekil 4.41, Şekil 4.42).

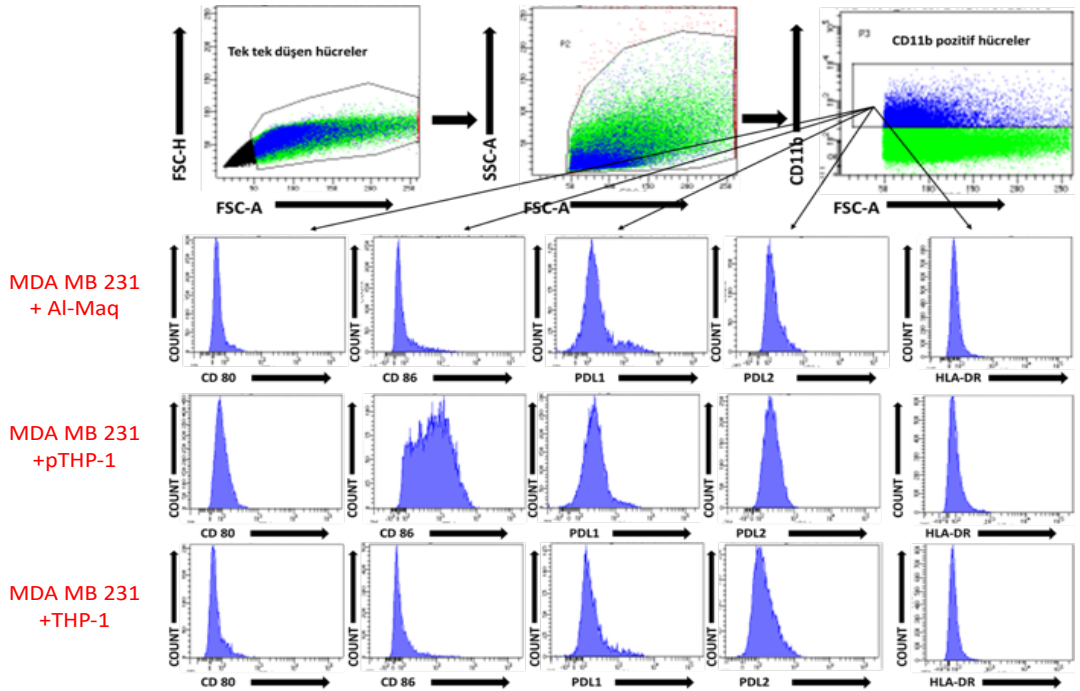


Şekil 4.37 Meme kanseri hücre hattı T47D'nin monosit/makrofaj hücre hatları THP-1, Al-Maq ve pTHP-1 ile ko-kültürü sonrası CD11b+ hücre kapısından HLA-DR,

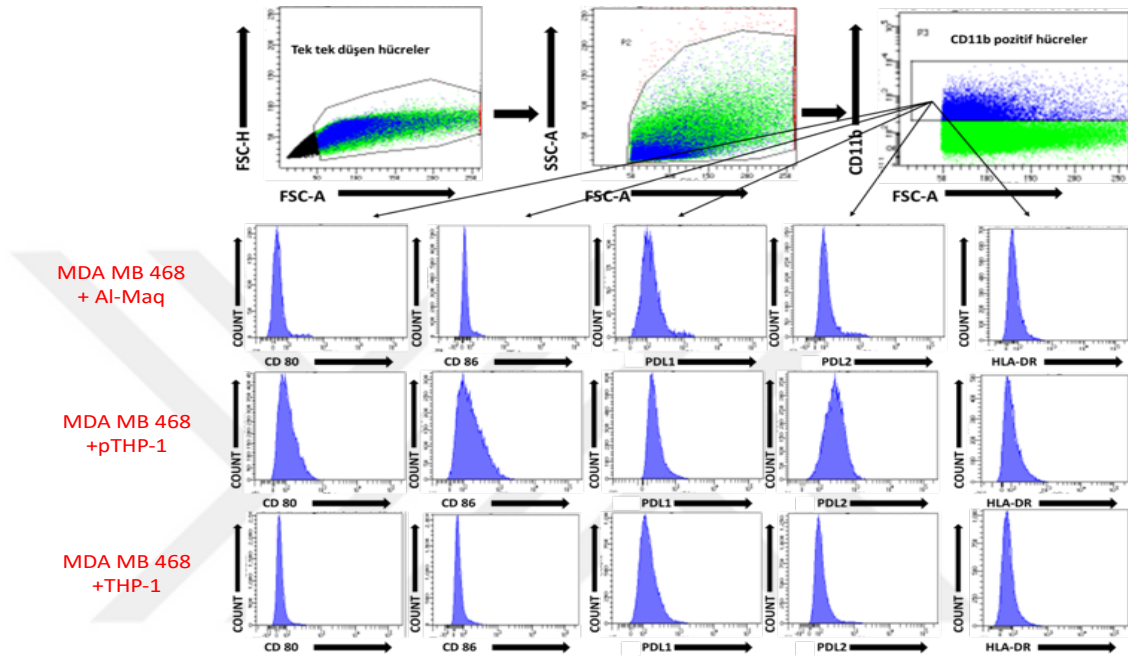
CD80, CD86, PD-L1 ve PD-L2 yüzey belirteçleri üzerine etkilerinin temsili akım sitometri görüntüleri



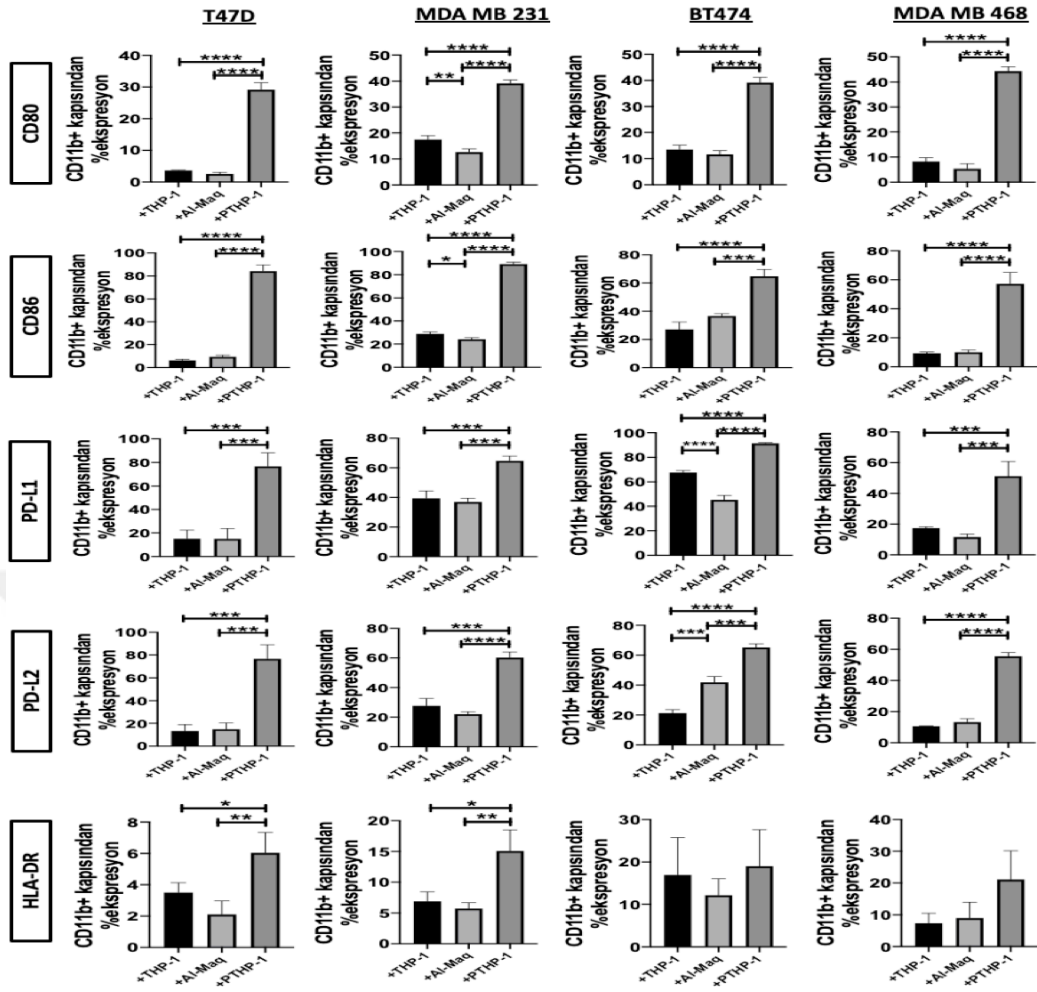
Şekil 4.38 Meme kanseri hücre hattı BT474'ün monosit/makrofaj hücre hatları THP-1, Al-Maq ve pTHP-1 ile ko-kültürü sonrası CD11b+ hücre kapısından HLA-DR, CD80, CD86, PD-L1 ve PD-L2 yüzey belirteçleri üzerine etkilerinin temsili akım sitometri görüntüleri



**Şekil 4.39** Meme kanseri hücre hattı MDA MB 231'in monosit/makrofaj hücre hatları THP-1, Al-Maq ve pTHP-1 ile ko-kültürü sonrası CD11b+ hücre kapısından HLA-DR, CD80, CD86, PD-L1 ve PD-L2 yüzey belirteçleri üzerine etkilerinin temsili akım sitometri görüntüleri



**Şekil 4.40** Meme kanseri hücre hattı MDA MB 468'in monosit/makrofaj hücre hatları THP-1, Al-Maq ve pTHP-1 ile ko-kültürü sonrası CD11b+ hücre kapısından HLA-DR, CD80, CD86, PD-L1 ve PD-L2 yüzey belirteçleri üzerine etkilerinin temsili akım sitometri görüntüleri

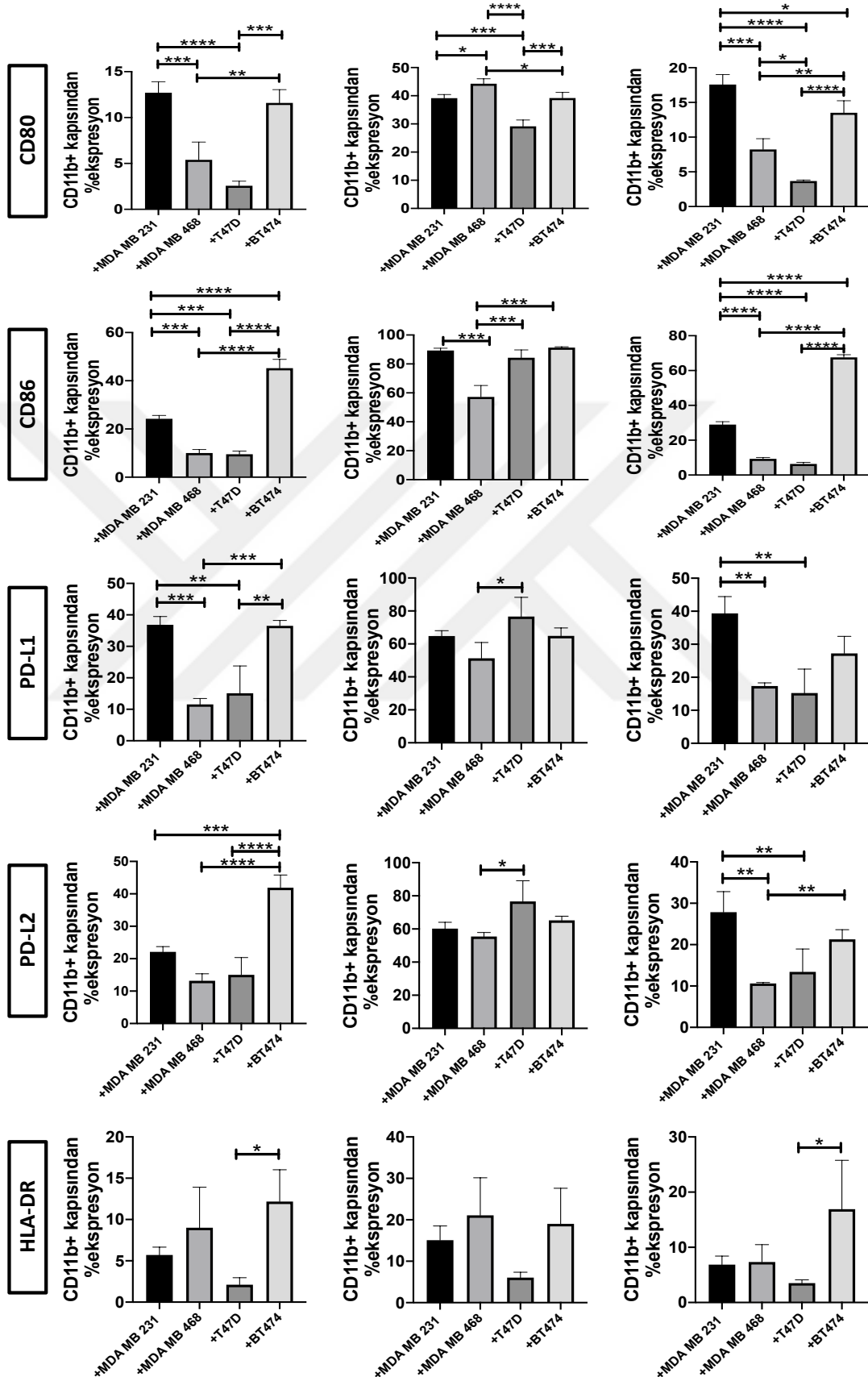


**Şekil 4.41** T47D, BT474, MDA-MB-231 ve MDA-MB-468 hücrelerinin THP-1, Al-Maq ve pTHP-1 hücreleriyle ko-kültürü CD11b+ hücre kapısından sonrası ko-stimülör belirteçler HLA-DR, CD80, CD86, PD-L1 ve PD-L2 üzerine etkileri.  $p < 0,05^*$ ;  $p < 0,01^{**}$ ;  $p < 0,001^{***}$ ;  $p < 0,0001^{****}$

### Alveolar Makrofaj

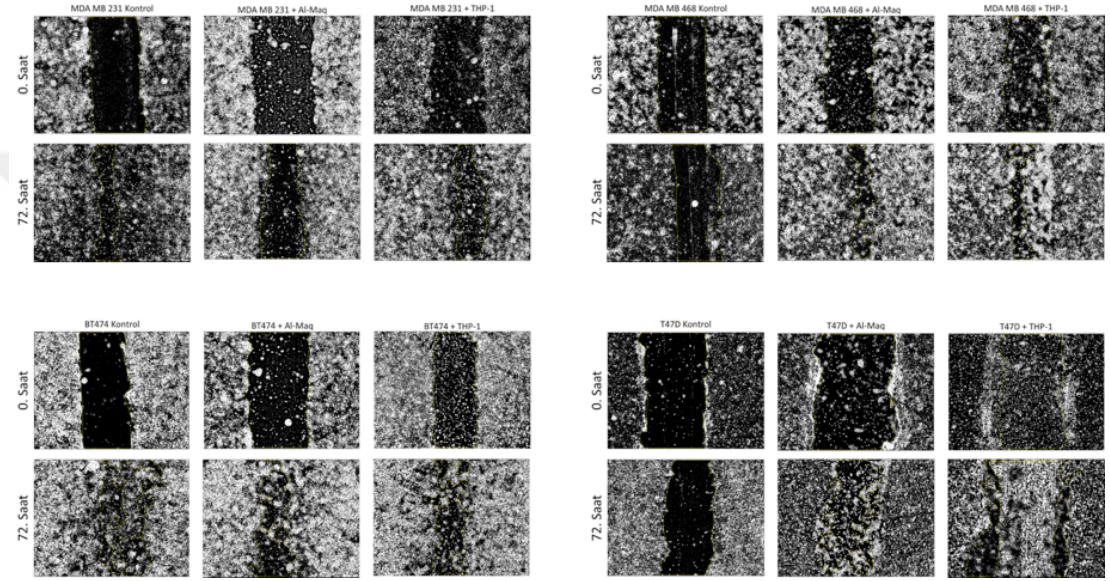
### p-THP-1

### THP-1

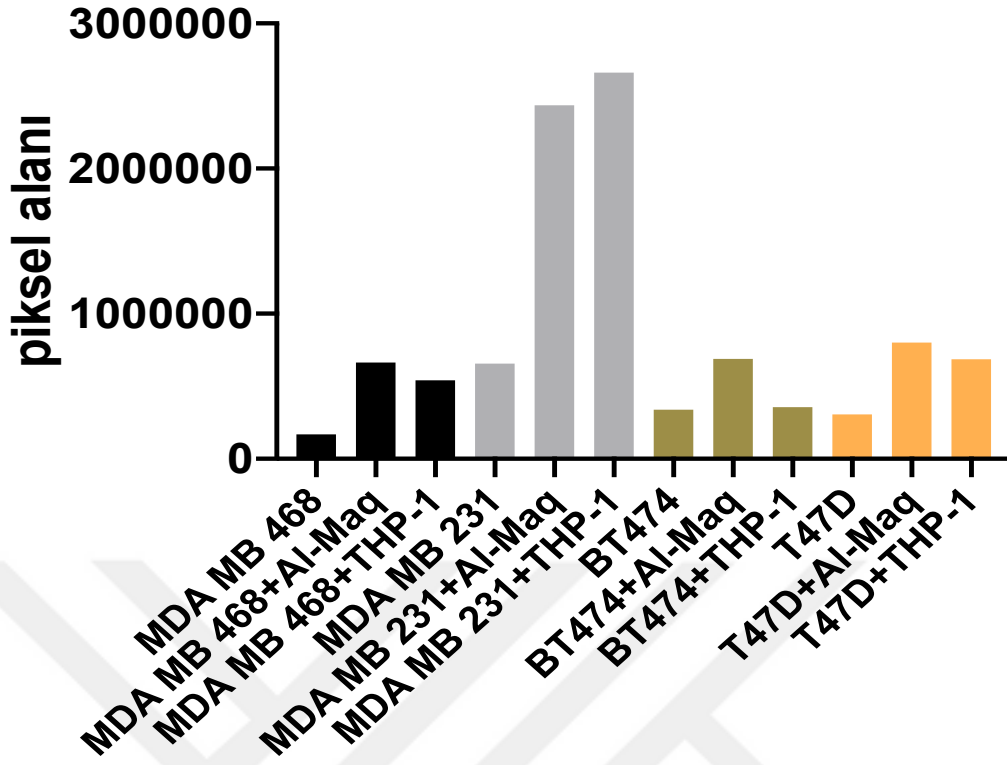


**Şekil 4.42** Al-Maq, pTHP-1 ve THP-1 hücrelerinin MDA-MB-231, MDA-MB-468, T47D ve BT474 hücreleriyle ko-kültürü sonrası CD11b+ hücre kapısından ko-stimülatör belirteçler HLA-DR, CD80, CD86, PD-L1 ve PD-L2 üzerine etkileri.  $p < 0,05^*$ ;  $p < 0,01^{**}$ ;  $p < 0,001^{***}$ ;  $p < 0,0001^{****}$

MDA MB 231, MDA MB 468, T47D, BT474 hücre hatları ile ko-kültür edilen miyeloid hücreler, bu kanser hücrelerinde invazyonu desteklemiştir. En yüksek düzeyde invazyon MDA MB 231 hücre hattı ile THP-1 hücre hatının ko-kültür gurubunda belirlendi (Şekil 4.43, Şekil 4.44)



**Şekil 4.43** Al-Maq, pTHP-1 ve THP-1 hücrelerinin MDA-MB-231, MDA-MB-468, T47D ve BT474 hücreleriyle ko-kültürü sonrası metastatik karaktere olan etkisinin Scratch Assay yöntemi ile belirlenmesi.



Şekil 4.44 Al-Maq, pTHP-1 ve THP-1 hücrelerinin MDA-MB-231, MDA-MB-468, T47D ve BT474 hücreleriyle ko-kültürü sonrası metastatik karaktere olan etkisinin Scratch Assay yöntemi ile belirlenmesi. Piksel alanı hesaplanırken, (0.saatte ölçülen alan) - (72.saate ölçülen alan) formülasyonu uygulanmıştır.

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Meme kanseri, kadın kanserleri arasında ilk sırada yer almaktadır ve özellikle üçlü negatif alt-tipi kanser ilişkili ölümlerde ilk sırada yer almaktadır (Siegel, Miller, Fuchs, & Jemal, 2022). Bunun sebebi olarak, kanser başlatıcı/kanser kök hücre alt-klonlarının bu kanser tipinde sayı ve yüzdece fazla olması olarak gösterilmektedir (Batlle, & Clevers, 2017; Dittmer, & Rody, 2013; Galassi, Musella, Manduca, Maccafeo, & Sistigu, 2021). Bu hücre alt-gruplarının EMT/MET dönüşüm kapasitelerinin yüksek (Zhou ve ark., 2019) ve immün modülasyon/kaçışta etkin olduğu tartışılmaktadır (Lei, & Lee, 2021). Kanser kök hücresi ve diğer adı ile kanser başlatıcı hücre veya sirküle tümör hücresinin literatürde CD44, CD24 ve ALDH1 ekspresyonuna göre testip edilebileceği belirtilmektedir. Genel olarak, CD44+/CD24 negatif olarak belirtilse de, CD24+ hücrelerin de metastazda rol oynayabileceğini gösteren yayınlar mevcuttur (Li ve ark., 2021; Nielsen ve ark., 2004; Potemski ve ark., 2005; Rakha ve ark., 2006; Rakha ve ark., 2009; Ricardo ve ark., 2011; Vassilopoulos ve ark., 2014; Walcher ve ark., 2020; Zhang ve ark., 2020; Zhang ve ark., 2021).

CD44- CD24- hücrelerin, uzak organ metastazlarında etkin olduğu literatürde bildirilmiştir (Qiao ve ark., 2021). Literatürde kanser kök hücre popülasyonları araştırılan hücre hatlarında CD44/CD24 belirtecinin ekspresyonuna göre Bazal, Luminal ve karışık alt-gruplardan bahsedilmektedir. CD44+ CD24+ hücrelerin tüm alt-grupları verebileceği raporlanmıştır (Yeung ve ark., 2010; Jaggupilli ve ark., 2012). Buna göre, tanımlanan ‘‘karışık alt-grup’’ta CD44+/CD24-, CD44düşük/CD24- ve CD44-CD24+ kök hücre alt-grupları bulunabilmektedir (Fillmore & Kuperwasser, 2008). Tez çalışmamız kapsamında gerçekleştirdiğimiz deneylerde, literatür ile uyumlu olarak MDA-MB-231 hücrelerinde CD44+/CD24- kanser kök hücresi popülasyonununun %90 civarlarında olduğu saptanmıştır (Şekil 4.17). Ayrıca, BT474 hücre hattının da luminal alt-tipte olmasına rağmen bu alt-popülasyonu MDA-MB-231 hücre hattı kadar bulundurduğu görülmüştür (Şekil 4.17). MDA-MB-468 hücrelerinde CD44+/CD24- hücre alt-grubu bulunmaz iken, CD44+/CD24+ hücre

altgrubu %90 civarlarında belirlenmiştir. Bu da bu hücre hattının karışık alt-grup'ta yer alması gerektiğini düşündürmüştür (Fillmore & Kuperwasser, 2008) (Şekil 4.6). Bu hücre alt-tipi T47D hücrelerinde de %30 civarında tespit edilmiştir (Şekil 4.17). CD44-/CD24+ hücre hattının metastaz ile ilişkili olabileceği bildirilmiş olup, (Nielsen ve ark., 2004; Li ve ark., 2021; Potemski ve ark., 2005; Rakha ve ark., 2006; Rakha ve ark., 2009; Ricardo ve ark., 2011; Vassilopoulos ve ark., 2014; Walcher ve ark., 2020; Zhang ve ark., 2020; Zhang ve ark., 2021) T47D hücrelerinde %50 civarında CD44-/CD24+ hücre alt-grubu saptanmıştır (Şekil 4.17). Bu hücre hattında mix popülasyon varlığı da olduğu için (Şekil 4.17), luminal/karışık alt-grupta değerlendirilebileceği düşünülmektedir. Halihazırda CD44-CD24+ ekspresyonu olan T47D hücre hattı ile p-THP-1 ko-kültürü sonucunda p-THP-1'in T47D hücre hattındaki ekspresyonu desteklediği görüldü. Bu sonuç T47D'nin metastatik karakterinin desteklendiğini düşündürmektedir (Şekil 4.21, Şekil 4.23). Aynı zamanda CD44+CD24- ekspresyonu çok az iken Al-Maq hücresi ile ko-kültürü sonucunda meme kanseri kök hücresi karakteri kazandığı da yorumlanabilir (Şekil 4.21, Şekil 4.23). BT474'un bazal seviyede hiç CD44-CD24+ ekspresyonu yok iken Al-Maq hücresi ile ko-kültürü sonucu az da olsa CD44-CD24+ ekspresyonu kazandığı görülmektedir. Bu sonuç, BT474'ün metastatik karakterinin desteklenebildiğini düşündürmüştür (Şekil 4.21, Şekil 4.23). MDA MB 231 hücre hattının Al-Maq hücresiyle ko-kültüründe CD44-CD24+ ve CD44-CD24- belirteçlerinde ekspresyon düzeyinin artması, hücre karakterinin metastatik yönde desteklendiğini düşündürmüştür (Şekil 4.21, Şekil 4.23). MDA MB 468 hücre hattı ile Al-Maq hücre hattı ko-kültürü sonrasında CD44+CD24+ ekspresyonu düşerken CD44-CD24-, CD44+CD24-, CD44-CD24+ ekspresyonlarının artması, CD44+CD24+ alt-grubun tüm hücre alt-gruplarını verebileceği literatür verisini desteklemektedir (Şekil 4.21, Şekil 4.23). Tüm kanser hücre hatları ve p-THP-1'in ko-kültürü sonucunda kanser hücrelerindeki PD-L1, PD-L2'nin artışı ve miyeloid grupta p-THP-1'de CD80, CD86 artışı bu iki hücre grubunun PD-L1/PD-L2/PD-1 etkileşimi ile immün kaçış yapabileceğini işaret etmektedir (Şekil 4.35, Şekil 4.36, Şekil 4.41, Şekil 4.42). Tüm kanser hücre hatları ve miyeloid hücre hatları ile yapılan ko-kültürün ardından invazyon testi ile miyeloid hücre hatlarının kanserde invazyonu desteklediği düşünülmektedir (Şekil 4.43, Şekil 4.44)

Meme kanseri kök hücreleri ile ilgili birçok çalışmada farklı yüzey belirteçleri de önerilse de asıl bu hücre grubunu tanımlayan durum metastatik ve anjiyogenz karakteri ve EMT/MET dönüşüm kapasitesi olarak belirtilmiştir. (Zhou ve ark., 2019). M0 makrofajlardan, temelde M1 ve M2 makrofaj olmak üzere iki farklı makrofaj alt-tipi şekillenmektedir. M1 makrofajlar genellikle HLA-DR+, CD86+, CD14+, CD36+, CD163- immünofenotipe sahiptir (Lolmede ve ark., 2009). M2 makrofajlar ise, M2a, M2b, M2c ve M2d olmak üzere farklı alt-gruplar içermektedir (Kim ve ark., 2021; Lolmede ve ark., 2009; Yongli, Xiang-Hong & Liping 2019). M2 makrofajların da genel olarak CD206+, CD163+ ve CD86+ olduğu bildirilmiştir (Kim ve ark., 2021). M2a alt-grubu, CD206+, CD163+, HLA-DR+ olup, CD14 belirtecini düşük düzeyde eksprese etmektedir. Bu makrofajların doku tamiri ile alakalı fonksiyonlarda görev aldığı bildirilmiştir (Kim ve ark., 2021; Lolmede ve ark., 2009; Yao ve ark., 2019). M2b alt-grubu, CD86+ ve Th2 yanıtlarını modüle etmektedir (Kim ve ark., 2021; Yao ve ark., 2019). M2c alt-grubu, CD206+, CD163+ ve HLA-DR belirtecini düşük düzeylerde eksprese etmektedir. Bu hücreler apoptotik hücrelerin fagositozunda görev alır (Kim ve ark., 2021; Lolmede ve ark., 2009; Yao ve ark., 2019). M2d hücreler genellikle toll-benzeri reseptör (toll-like receptor, TLR) ekspresyonu ile karakterize olup, pro-tümör özellikleri vardır (Kim ve ark., 2021).

Meme kanseri metastazında özellikle M2 makrofajların ve baskılayıcı monositlerin rolü olduğu bilinse de (Ham ve ark., 2020; Keibel ve ark., 2009; Kumar ve ark., 2016; Marvel & Gabrielovich, 2015; Cotechini ve ark., 2021) doku yerleşik makrofajlar ve kanser kök hücreleri arasındaki etkileşim konusunda bilgiler oldukça sınırlıdır. Bu tez çalışması ile amacımız, farklı kanser kök hücresi alt-gruplarının akciğerdeki doku yerleşik alveolar makrofaj benzeri hücre dönüşümüne etkisinin olup olmadığı konusunda ilk bilgileri elde etmek idi. Meme kanserinin metastatik odağı ilk olarak akciğer olduğu için, çalışmamızda akciğer doku yerleşik makrofajları olan alveolar makrofajlar araştırmıştır. Alveolar makrofajlar yüzeylerinde CD11b, CD11c, CD16, CD64, CD103, CD141, CD163, CD169, CD206 ve HLA-DR belirteçlerini ifade eder. CD163 ekspresyonu bu hücrelerin hangi bölgelere lokalize olduğunu göstermektedir. (Bharom ve ark., 2017; Bharat ve ark., 2016; Liegeois ve ark., 2018; Yu ve ark., 2016). Alveolar makrofajlar ile yapılan insan kaynaklı hücre kültürü çalışmalarında büyük bir limitasyon bulunmaktadır. Literatürde kabul görmüş

bir alveolar makrofaj hücre hattı bulunmamaktadır. Sadece bir çalışmada THP-1'den köken alan bir hücre alt-klonu oluşturulmuş ve bu hücrenin karakteristik hücrelerinin alveolar makrofaja yakın olduğu gösterilmiştir (Sadofsky ve ark., 2019). Fakat, bu çalışmada alveolar makrofaj CD206 ekspresyonunun zamanla kaybolduğu belirtilmiş ve bu sebeple fonksiyonel deneylerde kullanılacak devamlılık sağlanamamıştır. Laboratuvar çalışmalarımız kapsamında THP-1 hücre hattından 11 aylık yapay seçim süreci ile belirtilen bu hücre hattı elde edilmiştir. Özellikle, Poly-L-Lysin ve DMEM koşulu varlığında bu alt-klonların ko-kültürü ile CD206 belirteci modüle edilebilmiştir. Zaman içerisinde bizim hücre alt-klonlarımız da bu ekspresyonu kaybedebilme potansiyeline sahip olsa da hücre saflaştırma yöntemi ile CD206 eksprese eden alt-klonlar saflaştırılarak bol miktarda dondurulmuştur. Bu deneyler sonucunda, literatürde alveolar makrofaja en yakın olduğu düşünülen bir hücre hattı tarafımızca önerilmiştir. Aynı zaman da tüm bu literatür bilgisinin ışığında laboratuvarımızda alt-popülasyon olarak karakterize ettiğimiz D6P30-Daisy5, CD163+, CD206+ ve HLA-DR ekspresyonu düşük immünofenotipik karakteri ile M2c alt-grubuna benzer özellikler de göstermektedir. CD169+ makrofajların mide kanseri hastalarının lenf nodlarında yüksek düzeyde bulunmasının iyi prognoz ile ilişkilendirildiği bildirilmiştir (Kumamoto ve ark., 2021). Bu belirteçlere ek olarak, CD169 pozitifliğini yüksek düzeylerde gösteriyor olması da, tümör immün yanıtlarında potansiyel etkilerinin olabileceğini düşündürmektedir. Böylelikle, planladığımız meme kanseri ko-kültürleri ile gerçekleştirilecek fonksiyonel deneyler gerçekleştirilmiştir. Hem T47D hem de MDA-MB-468 hücre hatları kokültürlerde en çok alveolar makrofaj benzeri karakteri destekleyen hücre hattı olarak belirlenmiştir. Bu hücreler CD169, CD206 ve CD14 belirteçlerinin modülasyonunu uyarırken, özellikle T47D tüm monosit/makrofaj alt-gruplarında HLA-DR ekspresyonunu azalttığı için immün kaçıışı destekleyebilecektir.

Elde edilen tüm veriler ışığında, literatürde alveolar makrofaj olarak önerilebilecek bir hücre hattı tanımlanmıştır. Bunun yanı sıra, meme kanseri kök hücrelerinden özellikle ‘‘karışık tip’’ alt-grubunun alveolar makrofaj benzeri hücreleri uyurabildiği gösterilmiştir. Bu bilgi ile, bu tip kanserlerin metastatik odak doku yerleşik makrofajları metastazı destekleyici yönde şekillendirebileceği düşünülmektedir.

## 6. KAYNAKLAR

- A-Gonzalez, N., Quintana, J. A., García-Silva, S., Mazariegos, M., González de la Aleja, A., ...Hidalgo, A. (2017). Phagocytosis imprints heterogeneity in tissue-resident macrophages. *The Journal Of Experimental Medicine*, 214(5), 1281–1296. <https://doi.org/10.1084/jem.20161375>
- Allavena, P., Sica, A., Solinas, G., Porta, C., & Mantovani, A. (2008). The inflammatory micro-environment in tumor progression: the role of tumor-associated macrophages. *Critical Reviews In Oncology/Hematology*, 66(1), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2007.07.004>
- Altorki, N. K., Markowitz, G. J., Gao, D., Port, J. L., Saxena, A., Stiles, B., ... & Mittal, V. (2019). The lung microenvironment: an important regulator of tumour growth and metastasis. *Nature Reviews. Cancer*, 19(1), 9–31. <https://doi.org/10.1038/s41568-018-0081-9>
- Aramini, B., Masciale, V., Grisendi, G., Banchelli, F., D'Amico, R., Maiorana, A., ... Haider, K. H. (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>
- Awad, R. M., De Vlaeminck, Y., Maebe, J., Goyvaerts, C., & Breckpot, K. (2018). Turn Back the TIME: Targeting Tumor Infiltrating Myeloid Cells to Revert Cancer Progression. *Frontiers In Immunology*, 9, 1977. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01977>
- Azab, B., Bhatt, V. R., Phookan, J., Murukutla, S., Kohn, N., Terjanian, T., & Widmann, W. D. (2012). Usefulness of the neutrophil-to-lymphocyte ratio in predicting short- and long-term mortality in breast cancer patients. *Annals Of Surgical Oncology*, 19(1), 217–224. <https://doi.org/10.1245/s10434-011-1814-0>
- Baharom, F., Rankin, G., Blomberg, A., & Smed-Sörensen, A. (2017). Human Lung Mononuclear Phagocytes in Health and Disease. *Frontiers In Immunology*, 8, 499. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00499>
- Bailleux, C., Eberst, L., & Bachelot, T. (2021). Treatment strategies for breast cancer brain metastases. *British Journal Of Cancer*, 124(1), 142–155. <https://doi.org/10.1038/s41416-020-01175-y>
- Balkwill F. (2004). Cancer and the chemokine network. *Nature Reviews. Cancer*, 4(7), 540–550. <https://doi.org/10.1038/nrc1388>

- Battle, E., Clevers, H. (2017). Cancer stem cells revisited. *Nat Med* 23, 1124–1134. <https://doi.org/10.1038/nm.4409>
- Bharat, A., Bhorade, S. M., Morales-Nebreda, L., McQuattie-Pimentel, A. C., Soberanes, S., Ridge, K., ... Misharin, A. V. (2016). Flow Cytometry Reveals Similarities Between Lung Macrophages in Humans and Mice. *American Journal Of Respiratory Cell And Molecular Biology*, 54(1), 147–149. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2015-0147LE>
- Blomberg, O. S., Spagnuolo, L., & de Visser, K. E. (2018). Immune regulation of metastasis: mechanistic insights and therapeutic opportunities. *Disease Models & Mechanisms*, 11(10), dmm036236. <https://doi.org/10.1242/dmm.036236>
- Bottazzi, B., Polentarutti, N., Acero, R., Balsari, A., Boraschi, D., Ghezzi, P., Salmona, M., & Mantovani, A. (1983). Regulation of the macrophage content of neoplasms by chemoattractants. *Science (New York, N.Y.)*, 220(4593), 210–212. <https://doi.org/10.1126/science.6828888>
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal For Clinicians*, 68(6), 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
- Cacho-Díaz, B., García-Botello, D. R., Wegman-Ostrosky, T., Reyes-Soto, G., Ortiz-Sánchez, E., & Herrera-Montalvo, L. A. (2020). Tumor microenvironment differences between primary tumor and brain metastases. *Journal Of Translational Medicine*, 18(1), 1. <https://doi.org/10.1186/s12967-019-02189-8>
- Cassetta, L., Noy, R., Swierczak, A., Sugano, G., Smith, H., Wiechmann, L., & Pollard, J. W. (2016). Isolation of Mouse and Human Tumor-Associated Macrophages. *Advances In Experimental Medicine And Biology*, 899, 211–229. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-26666-4\\_12](https://doi.org/10.1007/978-3-319-26666-4_12)
- Cha, Y. J., & Koo, J. S. (2020). Role of Tumor-Associated Myeloid Cells in Breast Cancer. *Cells*, 9(8), 1785. <https://doi.org/10.3390/cells9081785>
- Charmsaz, S., Collins, D. M., Perry, A. S., & Prencipe, M. (2019). Novel Strategies for Cancer Treatment: Highlights from the 55th IACR Annual Conference. *Cancers*, 11(8), 1125. <https://doi.org/10.3390/cancers11081125>
- Chun, B.M., Page, D.B. & McArthur, H.L. (2019). Combination Immunotherapy Strategies in Breast Cancer. *Curr Breast Cancer Rep* 11, 228–240 <https://doi.org/10.1007/s12609-019-00333-3>
- Cotechini, T., Atallah, A., & Grossman, A. (2021). Tissue-Resident and Recruited Macrophages in Primary Tumor and Metastatic Microenvironments: Potential Targets in Cancer Therapy. *Cells*, 10(4), 960. <https://doi.org/10.3390/cells10040960>

- de Ronde JJ, Bonder MJ, Lips EH, Rodenhuis S, Wessels LF. (2014). Breast cancer subtype specific classifiers of response to neoadjuvant chemotherapy do not outperform classifiers trained on all subtypes. *PLoS One* 2014; 9 (2): e88551.
- Dittmer, J., & Rody, A. (2013). Cancer stem cells in breast cancer. *Histology and histopathology*, 28(7), 827–838. <https://doi.org/10.14670/HH-28.827>
- Dongre, A., Weinberg, R.A. (2019). New insights into the mechanisms of epithelial–mesenchymal transition and implications for cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 20, 69–84. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0080-4>
- Dunn, G. P., Bruce, A. T., Ikeda, H., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2002). Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nature Immunology*, 3(11), 991–998. <https://doi.org/10.1038/ni1102-991>
- Driessens, G., Kline, J., & Gajewski, T. F. (2009). Costimulatory and coinhibitory receptors in anti-tumor immunity. *Immunological Reviews*, 229(1), 126–144. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2009.00771.x>
- Eliyatkın, N., Yalçın, E., Zengel, B., Aktaş, S., & Vardar, E. (2015). Molecular Classification of Breast Carcinoma: From Traditional, Old-Fashioned Way to A New Age, and A New Way. *The Journal Of Breast Health*, 11(2), 59–66. <https://doi.org/10.5152/tjbh.2015.1669>
- Elliott, L. A., Doherty, G. A., Sheahan, K., & Ryan, E. J. (2017). Human Tumor-Infiltrating Myeloid Cells: Phenotypic and Functional Diversity. *Frontiers In Immunology*, 8, 86. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00086>
- Ferguson, L. P., Diaz, E., & Reya, T. (2021). The Role of the Microenvironment and Immune System in Regulating Stem Cell Fate in Cancer. *Trends In Cancer*, 7(7), 624–634. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2020.12.014>
- Fillmore, C. M., & Kuperwasser, C. (2008). Human breast cancer cell lines contain stem-like cells that self-renew, give rise to phenotypically diverse progeny and survive chemotherapy. *Breast Cancer Research: BCR*, 10(2), R25. <https://doi.org/10.1186/bcr1982>
- Gabrilovich D. (2015). Fatal attraction: How macrophages participate in tumor metastases. *The Journal Of Experimental Medicine*, 212(7), 976. <https://doi.org/10.1084/jem.2127insight1>
- Galassi, C., Musella, M., Manduca, N., Maccafeò, E., & Sistigu, A. (2021). The Immune Privilege of Cancer Stem Cells: A Key to Understanding Tumor Immune Escape and Therapy Failure. *Cells*, 10(9), 2361. <https://doi.org/10.3390/cells10092361>

- Geissmann, F., Manz, M. G., Jung, S., Sieweke, M. H., Merad, M., & Ley, K. (2010). Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* (New York, N.Y.), 327(5966), 656–661. <https://doi.org/10.1126/science.1178331>
- Goff, S. L., & Danforth, D. N. (2021). The Role of Immune Cells in Breast Tissue and Immunotherapy for the Treatment of Breast Cancer. *Clinical Breast Cancer*, 21(1), e63–e73. <https://doi.org/10.1016/j.clbc.2020.06.011>
- Goswami, S., Sahai, E., Wyckoff, J. B., Cammer, M., Cox, D., Pixley, F. J., ... Condeelis, J. S. (2005). Macrophages promote the invasion of breast carcinoma cells via a colony-stimulating factor-1/epidermal growth factor paracrine loop. *Cancer Research*, 65(12), 5278–5283. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-1853>
- Guiu, S., Michiels, S., André, F., Cortes, J., Denkert, C., Di Leo, A., ... & Reis-Filho, J. S. (2012). Molecular subclasses of breast cancer: how do we define them? The IMPAKT 2012 Working Group Statement. *Annals Of Oncology : Official Journal Of The European Society For Medical Oncology*, 23(12), 2997–3006. <https://doi.org/10.1093/annonc/mds586>
- Ham, S., Lima, L. G., Lek, E., & Möller, A. (2020). The Impact of the Cancer Microenvironment on Macrophage Phenotypes. *Frontiers In Immunology*, 11, 1308. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01308>
- Hanahan D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery*, 12(1), 31–46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>
- Harbeck, N., Penault-Llorca, F., Cortes, J., Gnant, M., Houssami, N., Poortmans, P., ... Cardoso, F. (2019). Breast cancer. *Nature Reviews. Disease Primers*, 5(1), 66. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0111-2>
- Hiam-Galvez, K. J., Allen, B. M., & Spitzer, M. H. (2021). Systemic immunity in cancer. *Nature Reviews. Cancer*, 21(6), 345–359. <https://doi.org/10.1038/s41568-021-00347-z>
- Hiam-Galvez, K.J., Allen, B.M. & Spitzer, M.H. (2021). Systemic immunity in cancer. *Nat Rev Cancer* 21, 345–359 <https://doi.org/10.1038/s41568-021-00347-z>
- Hopkinson-Woolley, J., Hughes, D., Gordon, S., & Martin, P. (1994). Macrophage recruitment during limb development and wound healing in the embryonic and foetal mouse. *Journal Of Cell Science*, 107 (Pt 5), 1159–1167. <https://doi.org/10.1242/jcs.107.5.1159>
- Hu, G., & Christman, J. W. (2019). Editorial: Alveolar Macrophages in Lung Inflammation and Resolution. *Frontiers In Immunology*, 10, 2275. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02275>

- Hu, P., Shen, M., Zhang, P., Zheng, C., Pang, Z., Zhu, L., & Du, J. (2015). Intratumoral neutrophil granulocytes contribute to epithelial-mesenchymal transition in lung adenocarcinoma cells. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 36(10), 7789–7796. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-3484-1>
- Hussell, T., & Bell, T. J. (2014). Alveolar macrophages: plasticity in a tissue-specific context. *Nature Reviews. Immunology*, 14(2), 81–93. <https://doi.org/10.1038/nri3600>
- Italiani, P., & Boraschi, D. (2014). From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation. *Frontiers In Immunology*, 5, 514. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00514>
- Jin, L., Han, B., Siegel, E., Cui, Y., Giuliano, A., & Cui, X. (2018). Breast cancer lung metastasis: Molecular biology and therapeutic implications. *Cancer Biology & Therapy*, 19(10), 858–868. <https://doi.org/10.1080/15384047.2018.1456599>
- Kalluri, R., & Zeisberg, M. (2006). Fibroblasts in cancer. *Nature Reviews. Cancer*, 6(5), 392–401. <https://doi.org/10.1038/nrc1877>
- Keibel, A., Singh, V., & Sharma, M. C. (2009). Inflammation, microenvironment, and the immune system in cancer progression. *Current Pharmaceutical Design*, 15(17), 1949–1955. <https://doi.org/10.2174/138161209788453167>
- Kim, R., Emi, M., & Tanabe, K. (2007). Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology*, 121(1), 1–14. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2007.02587.x>
- Kitamura, T., Qian, B. Z., Soong, D., Cassetta, L., Noy, R., Sugano, G., ... Pollard, J. W. (2015). CCL2-induced chemokine cascade promotes breast cancer metastasis by enhancing retention of metastasis-associated macrophages. *The Journal Of Experimental Medicine*, 212(7), 1043–1059. <https://doi.org/10.1084/jem.20141836>
- Kristiansen, G., Sammar, M., & Altevogt, P. (2004). Tumour biological aspects of CD24, a mucin-like adhesion molecule. *Journal Of Molecular Histology*, 35(3), 255–262. <https://doi.org/10.1023/b:hijo.0000032357.16261.c5>
- Kumar, V., Patel, S., Tcyganov, E., & Gabrilovich, D. I. (2016). The Nature of Myeloid-Derived Suppressor Cells in the Tumor Microenvironment. *Trends in Immunology*, 37(3), 208–220. <https://doi.org/10.1016/j.it.2016.01.004>
- Kursunel, M. A., & Esendagli, G. (2016). The untold story of IFN- $\gamma$  in cancer biology. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 31, 73–81. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2016.07.005>

- Kumamoto, K., Tasaki, T., Ohnishi, K., Shibata, M., Shimajiri, S., Harada, M., Komohara, Y., & Nakayama, T. (2021). CD169 Expression on Lymph Node Macrophages Predicts in patients with gastric cancer. *Frontiers in oncology*, 11, 636751. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.636751>
- Lambert, A.W., Weinberg, R.A. (2021). Linking EMT programmes to normal and neoplastic epithelial stem cells. *Nat Rev Cancer* 21, 325–338. <https://doi.org/10.1038/s41568-021-00332-6>
- Lan, H. R., Du, W. L., Liu, Y., Mao, C. S., Jin, K. T., & Yang, X. (2021). Role of immune regulatory cells in breast cancer: Foe or friend?. *International Immunopharmacology*, 96, 107627. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2021.107627>
- Leek, R. D., Lewis, C. E., Whitehouse, R., Greenall, M., Clarke, J., & Harris, A. L. (1996). Association of macrophage infiltration with angiogenesis and prognosis in invasive breast carcinoma. *Cancer Research*, 56(20), 4625–4629.
- Lei, M., & Lee, T. (2021). Cancer Stem Cells: Emerging Key Players in Immune Evasion of Cancers. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 692940. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.692940>
- Li, J., Qi, D., Hsieh, T. C., Huang, J. H., Wu, J. M., & Wu, E. (2021). Trailblazing perspectives on targeting breast cancer stem cells. *Pharmacology & Therapeutics*, 223, 107800. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2021.107800>
- Li, O., Zheng, P., & Liu, Y. (2004). CD24 expression on T cells is required for optimal T cell proliferation in lymphopenic host. *The Journal of Experimental Medicine*, 200(8), 10831089. <https://doi.org/10.1084/jem.20040779>
- Liegeois, M., Legrand, C., Desmet, C. J., Marichal, T., & Bureau, F. (2018). The interstitial macrophage: A long-neglected piece in the puzzle of lung immunity. *Cellular Immunology*, 330, 91–96. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2018.02.001>
- Lim, S. C., & Oh, S. H. (2005). The role of CD24 in various human epithelial neoplasias. *Pathology, Research and Practice*, 201(7), 479–486. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2005.05.004>
- Lin, E. Y., & Pollard, J. W. (2007). Tumor-associated macrophages press the angiogenic switch in breast cancer. *Cancer Research*, 67(11), 5064–5066. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-0912>
- Lin, E. Y., Li, J. F., Bricard, G., Wang, W., Deng, Y., Sellers, R., Porcelli, S. A., & Pollard, J. W. (2007). Vascular endothelial growth factor restores delayed tumor progression in tumors depleted of macrophages. *Molecular Oncology*, 1(3), 288–302. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2007.10.003>

- Lu, J., Cao, Q., Zheng, D., Sun, Y., Wang, C., Yu, X., ... Wang, Y. (2013). Discrete functions of M2a and M2c macrophage subsets determine their relative efficacy in treating chronic kidney disease. *Kidney International*, 84(4), 745–755. <https://doi.org/10.1038/ki.2013.135>
- Ma, RY, Zhang, H., Li, XF, Zhang, CB, Selli, C., Tagliavini, G., ... Qian, BZ (2020). Monocyte-derived macrophages promote breast cancer bone metastasis outgrowth. *The Journal of Experimental Medicine*, 217(11), e20191820. <https://doi.org/10.1084/jem.20191820>
- Mantovani, A., Allavena, P., Sozzani, S., Vecchi, A., Locati, M., & Sica, A. (2004). Chemokines in the recruitment and shaping of the leukocyte infiltrate of tumors. *Seminars in Cancer Biology*, 14(3), 155–160. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2003.10.001>
- Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., & Locati, M. (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in Immunology*, 25(12), 677–686. <https://doi.org/10.1016/j.it.2004.09.015>
- Markowitz, J., Wesolowski, R., Papenfuss, T., Brooks, T. R., & Carson, W. E. (2013). Myeloid-derived suppressor cells in breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 140(1), 13–21. <https://doi.org/10.1007/s10549-013-2618-7>
- Martinez, F. O., & Gordon, S. (2014). The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000prime Reports*, 6, 13. <https://doi.org/10.12703/P6-13>
- Marvel, D., & Gabrilovich, D. I. (2015). Myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment: expect the unexpected. *The Journal of Clinical Investigation*, 125(9), 3356–3364. <https://doi.org/10.1172/JCI80005>
- Mass, E., Ballesteros, I., Farlik, M., Halbritter, F., Günther, P., Crozet, L., ... Geissmann, F. (2016). Specification of tissue-resident macrophages during organogenesis. *Science (New York, N.Y.)*, 353(6304), aaf4238. <https://doi.org/10.1126/science.aaf4238>
- Matsushima, K., Larsen, C. G., DuBois, G. C., & Oppenheim, J. J. (1989). Purification and characterization of a novel monocyte chemotactic and activating factor produced by a human myelomonocytic cell line. *The Journal of Experimental Medicine*, 169(4), 1485–1490. <https://doi.org/10.1084/jem.169.4.1485>
- Medeiros, B., & Allan, A. L. (2019). Molecular Mechanisms of Breast Cancer Metastasis to the Lung: Clinical and Experimental Perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(9), 2272. <https://doi.org/10.3390/ijms20092272>

- Minkyu Kim, Jisoo Park, Mehdi Bouhaddou, Kyumin Kim, Ajda Rojc, Maya Modak, Margaret Soucheray, Michael J. Mcgregor, Patrick O'leary, Denise Wolferica Stevensontzeh Keong Foo, Dominique Mitchell, Karı A. Herrington, Denise P. Muñoz, Beril Tutuncuoglu, Kuei-Ho Chen, Fan Zheng, Jason F. Kreisberg, Morgan E. Diolaiti, John D. Gordan, Jean-Philippe Coppé, Danielle L. Swaney, Bing Xia, Laura Van 'T Veeralan Ashworth, Trey Ideker And Nevan J. Krogan (2021). A protein interaction landscape of breast cancer. *Sciens*, Vol 374, Issue 6563. <https://doi.org/10.1126/science.abf3066>
- Mlecnik, B., Tosolini, M., Kirilovsky, A., Berger, A., Bindea, G., Meatchi, T., Bruneval, P., Trajanoski, Z., Fridman, W. H., Pagès, F., & Galon, J. (2011). Histopathologic-based prognostic factors of colorectal cancers are associated with the state of the local immune reaction. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 29(6), 610–618. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.30.5425>
- Munir, M. T., Kay, M. K., Kang, M. H., Rahman, M. M., Al-Harrasi, A., Choudhury, M., Moustaid-Moussa, N., Hussain, F., & Rahman, S. M. (2021). Tumor-Associated Macrophages as Multifaceted Regulators of Breast Tumor Growth. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(12), 6526. <https://doi.org/10.3390/ijms22126526>
- Murciano-Goroff, Y. R., Warner, A. B., & Wolchok, J. D. (2020). The future of cancer immunotherapy: microenvironment-targeting combinations. *Cell Research*, 30(6), 507–519. <https://doi.org/10.1038/s41422-020-0337-2>
- Najafi, M., Hashemi Goradel, N., Farhood, B., Salehi, E., Nashtaei, M. S., Khanlarkhani, N., ... Mortezaee, K. (2019). Macrophage polarity in cancer: A review. *Journal of Cellular Biochemistry*, 120(3), 2756–2765. <https://doi.org/10.1002/jcb.27646>
- Nielsen, T. O., Hsu, F. D., Jensen, K., Cheang, M., Karaca, G., Hu, Z., ... Perou, C. M. (2004). Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clinical Cancer Research: an Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 10(16), 5367–5374. <https://doi.org/10.1158/1078>
- Obeid, E., Nanda, R., Fu, Y. X., & Olopade, O. I. (2013). The role of tumor-associated macrophages in breast cancer progression (review). *International Journal of Oncology*, 43(1), 5–12. <https://doi.org/10.3892/ijo.2013.1938>
- Ohama, H., Asai, A., Ito, I., Suzuki, S., Kobayashi, M., Higuchi, K., & Suzuki, F. (2015). M2b macrophage elimination and improved resistance of mice with chronic alcohol consumption to opportunistic infections. *The American Journal of Pathology*, 185(2), 420–431. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2014.09.022>

- Ohshika, S., Saruga, T., Ogawa, T., Ono, H., & Ishibashi, Y. (2021). Distinction between benign and malignant soft tissue tumors based on an ultrasonographic evaluation of vascularity and elasticity. *Oncology Letters*, 21(4), 281. <https://doi.org/10.3892/ol.2021.12542>
- Olingy, C. E., Dinh, H. Q., & Hedrick, C. C. (2019). Monocyte heterogeneity and functions in cancer. *Journal of Leukocyte Biology*, 106(2), 309–322. <https://doi.org/10.1002/JLB.4RI0818-311R>
- Oliveira, L. R., Jeffrey, S. S., & Ribeiro-Silva, A. (2010). Stem cells in human breast cancer. *Histology and Histopathology*, 25(3), 371–385. <https://doi.org/10.14670/HH-25.371>
- Qian, B., Deng, Y., Im, J. H., Muschel, R. J., Zou, Y., Li, J., ... & Pollard, J. W. (2009). A distinct macrophage population mediates metastatic breast cancer cell extravasation, establishment and growth. *PloS One*, 4(8), e6562. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006562>
- Patysheva, M., Larionova, I., Stakheyeva, M., Grigoryeva, E., Iamshchikov, P., Tarabanovskaya, N., ... Kzhyshkowska, J. (2022). Effect of Early-Stage Human Breast Carcinoma on Monocyte Programming. *Frontiers in Oncology*, 11, 800235. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.800235>
- Peranzoni, E., Lemoine, J., Vimeux, L., Feuillet, V., Barrin, S., Kantari-Mimoun, Damotte, C., ... Donnadieu, E. (2018). Macrophages impede CD8 T cells from reaching tumor cells and limit the efficacy of anti-PD-1 treatment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(17), E4041–E4050. <https://doi.org/10.1073/pnas.1720948115>
- Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*;406 (6797):747-52.
- Petersen, O. W., & Polyak, K. (2010). Stem cells in the human breast. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(5), a003160. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003160>
- Pietras, K., & Ostman, A. (2010). Hallmarks of cancer: interactions with the tumor stroma. *Experimental Cell Research*, 316(8), 1324–1331. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2010.02.045>
- Pollock, K., Albares, L., Wendt, C., & Hubel, A. (2013). Isolation of fibroblasts and epithelial cells in bronchoalveolar lavage (BAL). *Experimental Lung Research*, 39(3), 146–154. <https://doi.org/10.3109/01902148.2013.781720>
- Polyak K. (2007). Breast cancer: origins and evolution. *The Journal of Clinical Investigation*, 117(11), 3155–3163. <https://doi.org/10.1172/JCI33295>

- Potemski, P., Kusinska, R., Watala, C., Pluciennik, E., Bednarek, A. K., & Kordek, R. (2005). Prognostic relevance of basal cytokeratin expression in operable breast cancer. *Oncology*, 69(6), 478–485. <https://doi.org/10.1159/000090986>
- Pucci, C., Martinelli, C., & Ciofani, G. (2019). Innovative approaches for cancer treatment: current perspectives and new challenges. *Ecancermedicalscience*, 13, 961. <https://doi.org/10.3332/ecancer.2019.961>
- Qian, B. Z., Li, J., Zhang, H., Kitamura, T., Zhang, J., Campion, L. R., Kaiser, E. A., Snyder, L. A., & Pollard, J. W. (2011). CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. *Nature*, 475(7355), 222–225. <https://doi.org/10.1038/nature10138>
- Rakha EA, Putti TC, Abd El-Rehim DM, Paish C, Green AR, Powe DG, (2006). Morphological and immunophenotypic analysis of breast carcinomas with basal and myoepithelial differentiation. *The Journal of Pathology*.;208 (4):495-506.
- Rakha, E. A., & Ellis, I. O. (2009). Triple-negative/basal-like breast cancer: review. *Pathology*, 41(1), 40–47. <https://doi.org/10.1080/00313020802563510>
- Riabov, V., Gudima, A., Wang, N., Mickley, A., Orekhov, A., & Kzhyshkowska, J. (2014). Role of tumor associated macrophages in tumor angiogenesis and lymphangiogenesis. *Frontiers in Physiology*, 5, 75. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00075>
- Ricardo, S., Vieira, A. F., Gerhard, R., Leitão, D., Pinto, R., Cameselle-Teijeiro, J. F. ... Paredes, J. (2011). Breast cancer stem cell markers CD44, CD24 and ALDH1: expression distribution within intrinsic molecular subtype. *Journal of Clinical Pathology*, 64(11),937–946. <https://doi.org/10.1136/jcp.2011.090456>
- Roche J. (2018). The Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Cancer. *Cancers*, 10(2), 52. <https://doi.org/10.3390/cancers10020052>
- S. Caspar-Bauguil, B. Cousin, S. Bour, L. Castiella, L. Penicaud and C. Carpéné. (2009). Adipose tissue lymphocytes: types and roles. *J Physiol Biochem*, 65 (4), 423-436. <https://doi.org/10.1007/BF03185938>
- Shaul, M. E., & Fridlender, Z. G. (2019). Tumour-associated neutrophils in patients with cancer. Nature reviews. *Clinical Oncology*, 16(10), 601–620. <https://doi.org/10.1038/s41571-019-0222-4>
- Shou, D., Wen, L., Song, Z., Yin, J., Sun, Q., & Gong, W. (2016). Suppressive role of myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) in the microenvironment of breast cancer and targeted immunotherapies. *Oncotarget*, 7(39), 64505–64511. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11352>

- Siegel, R. L., Miller, K. D., Fuchs, H. E., & Jemal, A. (2022). Cancer statistics, 2022. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 72(1), 7–33. <https://doi.org/10.3322/caac.21708>
- Smid, M., Wang, Y., Zhang, Y., Sieuwerts, A. M., Yu, J., Klijn, J. G., ...Martens, J. W. (2008). Subtypes of breast cancer show preferential site of relapse. *Cancer Research*, 68(9), 3108–3114. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-5644>
- Sørli, T., Perou, C. M., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, H., ...& Børresen-Dale, A. L. (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(19), 10869–10874. <https://doi.org/10.1073/pnas.191367098>
- Stanton, S. E., Adams, S., & Disis, M. L. (2016). Variation in the Incidence and Magnitude of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Breast Cancer Subtypes: A Systematic Review. *JAMA Oncology*, 2(10), 1354–1360. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2016.1061>
- Stewart, D. A., Yang, Y., Makowski, L., & Troester, M. A. (2012). Basal-like breast cancer cells induce phenotypic and genomic changes in macrophages. *Molecular Cancer Research: MCR*, 10(6), 727–738. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-11-0604>
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Tan, B., Shi, X., Zhang, J., Qin, J., Zhang, N., Ren, H., ... Liu, M. (2018). Inhibition of Rspo-Lgr4 Facilitates Checkpoint Blockade Therapy by Switching Macrophage Polarization. *Cancer Research*, 78(17), 4929–4942. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-0152>
- Valentin, M. D., da Silva, S. D., Privat, M., Alaoui-Jamali, M., & Bignon, Y. J. (2012). Molecular insights on basal-like breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 134(1), 21–30. <https://doi.org/10.1007/s10549-011-1934-z>
- Vassilopoulos, A., Chisholm, C., Lahusen, T., Zheng, H., & Deng, C. X. (2014). A critical role of CD29 and CD49f in mediating metastasis for cancer-initiating cells isolated from a Brcal-associated mouse model of breast cancer. *Oncogene*, 33(47), 5477–5482. <https://doi.org/10.1038/onc.2013.516>

- Visvader, J. E., & Lindeman, G. J. (2006). Mammary stem cells and mammapoiesis. *Cancer Research*, 66(20), 9798–9801. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-2254>
- Walcher, L., Kistenmacher, A. K., Suo, H., Kitte, R., Dluczek, S., Strauß, A., ... Kossatz-Boehlert, U. (2020). Cancer Stem Cells-Origins and Biomarkers: Perspectives for Targeted Personalized Therapies. *Frontiers in Immunology*, 11, 1280. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01280>
- Woo, Y. D., Jeong, D., & Chung, D. H. (2021). Development and Functions of Alveolar Macrophages. *Molecules and Cells*, 44(5), 292–300. <https://doi.org/10.14348/molcells.2021.0058>
- Wu, L., & Zhang, X. H. (2020). Tumor-Associated Neutrophils and Macrophages-Heterogenous but Not Chaotic. *Frontiers in Immunology*, 11, 553967. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.553967>
- Wyckoff, J. B., Wang, Y., Lin, E. Y., Li, J. F., Goswami, S., Stanley, E. R., ... Condeelis, J. (2007). Direct visualization of macrophage-assisted tumor cell intravasation in mammary tumors. *Cancer Research*, 67(6), 2649–2656. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-1823>
- Xue, J., Schmidt, S. V., Sander, J., Draffehn, A., Krebs, W., Quester, I., ... Schultze, J. L. (2014). Transcriptome-based network analysis reveals a spectrum model of human macrophage activation. *Immunity*, 40(2), 274–288. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.01.006>
- Yang, J., Liao, D., Chen, C., Liu, Y., Chuang, T. H., Xiang, R., ... Luo, Y. (2013). Tumor-associated macrophages regulate murine breast cancer stem cells through a novel paracrine EGFR/Stat3/Sox-2 signaling pathway. *Stem Cells* (Dayton, Ohio), 31(2), 248–258. <https://doi.org/10.1002/stem.1281>
- Yang, M., Ma, B., Shao, H., Clark, A. M., & Wells, A. (2016). Macrophage phenotypic subtypes diametrically regulate epithelial-mesenchymal plasticity in breast cancer cells. *BMC Cancer*, 16, 419. <https://doi.org/10.1186/s12885-016-2411-1>
- Ye, Y., Xu, C., Chen, F., Liu, Q., & Cheng, N. (2021). Targeting Innate Immunity in Breast Cancer Therapy: A Narrative Review. *Frontiers in Immunology*, 12, 771201. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.771201>
- Yoyen-Ermis, D., Tunali, G., Tavukcuoglu, E., Horzum, U., Ozkazanc, D., Sutlu, T., ...& Esendagli, G. (2019). Myeloid maturation potentiates STAT3-mediated atypical IFN- $\gamma$  signaling and upregulation of PD-1 ligands in AML and MDS. *Scientific Reports*, 9(1), 11697. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48256-4>

- Yongli Yao, Xiang-Hong Xu and Liping Jin (2019). Macrophage polarization in physiological and pathological pregnancy. *Frontiers in immunology*. 10:792. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00792>
- Yousefi, M., Nosrati, R., Salmaninejad, A., Dehghani, S., Shahryari, A., & Saberi, A. (2018). Organ-specific metastasis of breast cancer: molecular and cellular mechanisms underlying lung metastasis. *Cellular Oncology (Dordrecht)*, 41(2), 123–140. <https://doi.org/10.1007/s13402-018-0376-6>
- Yu, Y. R., Hotten, D. F., Malakhau, Y., Volker, E., Ghio, A. J., Noble, P. W., ... Tighe, R. M. (2016). Flow Cytometric Analysis of Myeloid Cells in Human Blood, Bronchoalveolar Lavage, and Lung Tissues. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 54(1), 13–24. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2015-0146OC>
- Zhang, B., Cao, M., He, Y., Liu, Y., Zhang, G., Yang, C., ... Gao, F. (2017). Increased circulating M2-like monocytes in patients with breast cancer. *Tumour Biology: The Journal of The International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 39(6), 1010428317711571. <https://doi.org/10.1177/1010428317711571>
- Zhang, Q., Le, K., Xu, M., Zhou, J., Xiao, Y., Yang, W., Jiang, Y., Xi, Z., & Huang, T. (2019). Combined MEK inhibition and tumor-associated macrophages depletion suppresses tumor growth in a triple-negative breast cancer mouse model. *International Immunopharmacology*, 76, 105864. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.105864>
- Zhang, X. M., Chen, D. G., Li, S. C., Zhu, B., & Li, Z. J. (2021). Embryonic Origin and Subclonal Evolution of Tumor-Associated Macrophages Imply Preventive Care for Cancer. *Cells*, 10(4), 903. <https://doi.org/10.3390/cells10040903>
- Zhang, X., Powell, K., & Li, L. (2020). Breast Cancer Stem Cells: Biomarkers, Identification and Isolation Methods, Regulating Mechanisms, Cellular Origin, and Beyond. *Cancers*, 12(12), 3765. <https://doi.org/10.3390/cancers12123765>
- Zhao, Z., Zheng, L., Chen, W., Weng, W., Song, J., & Ji, J. (2019). Delivery strategies of cancer immunotherapy: recent advances and future perspectives. *Journal of Hematology & Oncology*, 12(1), 126. <https://doi.org/10.1186/s13045-019-0817-3>
- Zheng, Q., Zhang, M., Zhou, F., Zhang, L., & Meng, X. (2021). The Breast Cancer Stem Cells Traits and Drug Resistance. *Frontiers in Pharmacology*, 11, 599965. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.599965>
- Zhou, J., Chen, Q., Zou, Y., Chen, H., Qi, L., & Chen, Y. (2019). Stem Cells and Cellular Origins of Breast Cancer: Updates in the Rationale,

Controversies, and Therapeutic Implications. *Frontiers in Oncology*, 9, 820. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00820>

Zhu, Y., Herndon, J. M., Sojka, D. K., Kim, K. W., Knolhoff, B. L., Zuo, C., ... DeNardo, D. G. (2017). Tissue-Resident Macrophages in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Originate from Embryonic Hematopoiesis and Promote Tumor Progression. *Immunity*, 47(2), 323–338.e6. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.07.014>



## 7. SİMGELER VE KISALTMALAR

ACS	Amerikan kanser topluluğu
ALDH1	Aldehit dehidrojenaz 1
Al-Maq	Alveolar Makrofaj
Breg	Düzenleyici B hücre
CTLA-4	Bağışıklık kontrol noktası inhibitör-4
CSF-1	Makrofaj koloni uyarıcı faktör-1
CFSE	Karboksifloresan Süksinimidil Ester
CD8+	Sitotoksik T lenfositler
DKİS	Duktal karsinoma in situ
EMT	Epitelden mezenkima geçiş
ER	Östrojen reseptör
EGF	Epidermal büyüme faktörü
GEP	Gen ekspresyon profilin
GM-CSF	Granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör
HER2	İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2
IL-2	İnterlökin-2
IL-4	İnterlökin-4
IL-10	İnterlökin-10
IL-13	İnterlökin-13
IFN $\gamma$	İnterferon gamma
İARC	Uluslararası kanser araştırma derneği

İNOS	İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
MDSC	Miyeloid-kökenli baskılayıcı hücreler
mDC	Miyeloid dendritik hücre
MSC	Mezenkimal kök hücre
MET	Mezenkimal epitelyal geçiş
MMP9	Matris metalloproteinaz 9
NET	Nötrofil hücre dışı tuzakları
NK	Doğal öldürücü hücreler
NK T	Doğal öldürücü T hücreler
NKreg	Düzenleyici doğal öldürücü hücre
NO	Nitrik oksit
PBS	Fosfat tamponlanmış tuz çözeltisi
PMA	Forbol 12-Miristat 13- Asetat
PD-L1	Programlanmış ölüm ligandı 1
PD-L2	Programlanmış ölüm ligandı 2
PARP	Poli-ADP-riboz polimeraz <i>inhibitörleri</i>
PDGF	Trombosit kaynaklı büyüme faktörü
PR	Progesteron reseptör
SIRP- $\alpha$	Sinyal düzenleyici protein alfa
TAN	Tümör ilişkili nötrofiller
TAM	Tümör ilişkili makrofajlar
tDC	Tolerojenik dendritik hücre
TNBC	Üçlü negatif meme kanseri
TNF	Tümör nekroz faktör

TGF- $\beta$	Dönüştürücü büyüme faktörü- $\beta$
Treg	Düzenleyici T hücreler
TRAIL	Tümör nekroz faktörü ile ilişkili apoptozu indükleyen ligand
TLR	Toll benzeri reseptör
VEGF	Vasküler endotelyal büyüme faktörü
WHO	Dünya sağlık örgütü
3E	Eleminasyon, Denge, Kaçış



## 8. EKLER

Bu çalışma hücre hatları ile gerçekleştirildiği ve ilgili tüm tablo, Şekil vb. dökümanlar metin içinde kullanıldığı için bu bölüme bir belge konulmamıŐtır.



## 9. TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana hep destek olan, bilgi birikimi ile bana yol gösteren ve kendimi geliştirmem için beni hep cesaretlendiren ve içtenlikle destekleyen, bunun yanı sıra tedavi sürecimde de yanımda olan ve benim için bir hocadan çok öte danışmanım Sayın Prof. Dr. Haluk Barbaros Oral hocama en içten duygularla teşekkürü bir borç bilirim.

Hem hoca olarak bilgilerinden yararlandığım hem de yeri geldiğinde bir arkadaş gibi dertlerimizi paylaşabildiğimiz, kariyerimde ufkumu açan ve beni hayatım boyunca çalışacağım alana yönlendiren ve o alanı sevdiğini, yakın zamanda öğrendiğim ve hayatımda aklımın ucundan dahi geçmeyecek olan bir hastalığının olduğunu öğrendikten sonra bu hastalıkla nasıl başa çıkacağımı bilmiyor iken beni yönlendiren belki de daha uzun süre bu dünyada yaşamaya devam etmemi sağlayan teşhis tanı ve tedavi süreçlerinde hep yanımda olan Sayın Dr. Öğr. Üyesi Diğdem Yöyen Ermiş hocama en içten teşekkürlerimi sunarım.

Bana her zaman destek olan, zor zamanlarımda yanımdan ayrılmayan çalışma arkadaşlarım ve dostlarım Fatma Dombaz, Mehmet Karaçay ve Gözde Arslan'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ameliyatım sırasında bana hep destek ve moral kaynağı olan Diğdem Yöyen Ermiş, Haluk Barbaros Oral, Arzu Yılmaz Oral, Salih Haldun Bal, Esra Gülderen, Bahar Dakiki, Ekin Başpınar, Fatma Dombaz, Mehmet Karaçay, Gözde Arslan, Erkan Ermiş ve İmmünoloji Ailesine sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Her zaman beni seven, hep destekleyen, yaşamım boyunca en büyük moral kaynağım olan değerli canım anneme, babama ve kardeşlerime yürekten teşekkür ederim.

Onur ETGÜ  
25/06/2022

## 10. ÖZGEÇMİŞ

**Adı Soyadı** : Onur ETGÜ  
**Doğum Yeri ve Tarihi** :  
**Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)**  
**Lisans** : Bursa Uludağ Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi  
Biyoloji Bölümü (2015-2019)  
**Yüksek Lisans** : Bursa Uludağ Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü,  
Tıp-İmmünoloji Anabilim Dalı (2019-Halen)  
**İletişim (e-posta)** : e  
**Adres** :

### Projeler

Diğdem Yöyen-Ermiş, Haluk Barbaros Oral, Ferah Budak, Emin Halis Akalın, Salih Haldun Bal, Ali Asan, Eren Çağan. “COVID-19 Pozitif Hastalarda Miyeloid Hücre Alt-Gruplarındaki Değişimlerin Efektif Anti-Viral İmmün Yanıt Üzerine Etkileri Ve Biyobelirteç Olarak Kullanımı” TUBİTAK 1001 (01.09.2020-01.06.2021 Tarihleri arasında proje **bursiyeri** olarak görev aldım)

### Ödüller

**En iyi sözel sunum bildiri 3.lük ödülü.** Arslan G., Karacay M., Çelik E., Yumuşak E., Etgü O., Dombaz F., Dündar F., Yoyen-Ermis D., Ersoy F., Oral-Yilmaztepe A., Akkoç A., Sütlü T., Yalçın M., Oral H.B., Çoklu Gen Modifikasyonu İle Tolerans İndükleyici Hale Getirilmiş Dendritik Hücreleri İle Deneysel Allerjik Ensefalomyelit Tedavisi: Ms Tedavisi İçin Yeni Bir Yaklaşım.12.Klinik Nöroimmünoloji Sempozyumu 12-15 Mayıs 2022 (Sözlü Sunum)

### Ulusal Kongre-Sözlü Sunum

Yoyen-Ermis D., Dombaz F., Karacay M., Etgü O., Cagan E., Asan A., Kızmaz M.A., Simsek A., Karaca M., Arslan G., Pınar İ.E., Bal S.H., Özkocaman V., Özkalemkaş F., Akalın E.H., Budak F., Oral H.B., Çocuk ve Erişkin COVID-19 Pozitif Hastalarda Miyeloid Kökenli Baskılayıcı Hücre (MDSC) Kompozisyonunun Fenotipik ve Fonksiyonel Farklılıklarının Hastalık Seyri ile İlişkisi. XII. Aziz Sancar DETAE Günleri 10-11 Aralık 2020, Türkiye.

Arslan G., Karacay M., Çelik E., Yumuşak E., Etgü O., Dombaz F., Dündar F., Yoyen-Ermis D., Ersoy F., Oral-Yilmaztepe A., Akkoç A., Sütlü T., Yalçın M., Oral H.B., Çoklu Gen Modifikasyonu İle Tolerans İndükleyici Hale Getirilmiş Dendritik Hücreleri İle Deneysel Allerjik Ensefalomyelit Tedavisi: Ms Tedavisi İçin Yeni Bir Yaklaşım.12.Klinik Nöroimmünoloji Sempozyumu 12-15 Mayıs 2022 (Sözlü Sunum) (En iyi 3. Sözel sunum bildiri ödülü)

Arslan G., Karacay M., Çelik E., Yumuşak E., Etgü O., Dombaz F., Dündar F., Yoyen-Ermis D., Ersoy F., Oral-Yilmaztepe A., Akkoç A., Sütlü T., Yalçın M., Oral H.B., Deneysel Otoimmün Ensefalomyelit (Eae) Fare Modelinde Farklı Yaklaşımlarla Oluşturulan Tolerojenik Dendritik Hücre Bazlı Tedavilerin Monositik/Granülositik ve T Hücre Yanıtları Üzerine Etkileri 12. Klinik Nöroimmünoloji Sempozyumu 12-15 Mayıs 2022 (Sözlü Sunum)

Yoyen-Ermis D., Dombaz F., Kızmaz M.A., Simsek A., Cagan E., Asan A., Karacay M., Etgü O., Karaca M., Arslan G., Pınar İ.E., Bal S.H., Özkocaman V., Özkalemkaş F., Akalın E.H., Budak F., Oral H.B., Covid-19 Pozitif Hastalarda Matür Monosit ve/veya Nötrofil Alt-Tipleri Ve İmmatür PMN-MDSC, M-MDSC ve/veya E-MDSC-Benzeri Alt-Gruplarının İncelenmesi ve Hastalık Düzeyi İle Değişimlerin Değerlendirilmesi. XXV. Ulusal İmmünoloji Kongresi, 20-22 Kasım 2020, Türkiye.

### **Uluslararası Kongre-Sözlü Sunum**

Yoyen-Ermis D., Dombaz F., Karacay M., Etgü O., Kızmaz M.A., Simsek A., Cagan E., Asan A., Yılmaz E., Kazak E., Pınar İ.E., Bal S.H., Arslan G., Karaca M., Özkocaman V., Özkalemkaş F., Akalın E.H., Budak F., Oral H.B., The distribution of mature and/or immature myeloid cells and their role in effective anti-viral immune responses in COVID-19 positive patients. 6<sup>th</sup> European Congress of Immunology, 1-4 September 2021 Virtual Congress.

### **Ulusal Kongre-Poster Sunum**

Karaca M., Simsek A., Etgü O., Dombaz F., Macuncuoğlu A.C., Dirican M., Budak F., Oral H.B., Ortalama Floresan Yoğunluğu Yüksek Olan Negatif PRA Testi Sonuçlarının Karaciğer İle İlişkinin Değerlendirilmesi XXV. Ulusal İmmünoloji Kongresi, 20-22 Kasım, Türkiye.

Yoyen-Ermis D., Karacay M., Etgü O., Karaca M., Arslan G., Dombaz F., Kızmaz M.A., Simsek A., Cagan E., Asan A., Pınar İ.E., Bal S.H., Özkocaman V., Özkalemkaş F., Akalın E.H., Budak F., Oral H.B., COVID-19 Pozitif Hastalardaki Granülositik-Benzeri Miyeloid Kökenli Baskılayıcı Hücrelerin (PMN-MKBH) Baskılama Kapasite Farklılıklarının Araştırılması XXV. Ulusal İmmünoloji Kongresi, 20-22 Kasım, Türkiye.

Yoyen-Ermis D., Arslan G., Karacay M., Karaca M., Dombaz F., Etgü O., Kızmaz M.A., Simsek A., Cagan E., Asan A., Pınar İ.E., Bal S.H., Özkocaman V., Özkalemkaş F., Akalın E.H., Budak F., Oral H.B., COVID-19 Pozitif Hastaların Farklı Yaş Grubu Dağılımındaki Hücre Proliferasyonlarının Değerlendirilmesi. XXV. Ulusal İmmünoloji Kongresi, 20-22 Kasım, Türkiye.

Yoyen-Ermis D., Etgü O., Dombaz F., Karacay M., Pınar İ.E., Kızmaz M.A., Simsek A., Cagan E., Asan A., Karaca M., Arslan G., Bal S.H., Özkocaman V., Özkalemkaş F., Akalın E.H., Budak F., Oral H.B., SARS-COV2 İlişkili İmmün Yanıtta Periferik Kan Miyeloid Seri Hücrelerinin Olgunlaşma Düzeyleri, Reaktif Oksijen Türleri (ROS)

ve Nitrik Oksit (NO) Üretme Kapasitesi. XXV. Ulusal İmmünoloji Kongresi, 20-22 Kasım, Türkiye.

### **Uluslararası Kongre-Poster Sunum**

Dombaz F., Karacay M., Etgü O., Kızmaz M.A., Simsek A., Cagan E., Pınar İ.E., Bal S.H., Özkocaman V., Özkalemkaş F., Budak F., Oral H.B., Yoyen-Ermis D., Phenotypes and Functions of Low(er)-Density Neutrophils (LDNs) in Early Childhood and Children. 6<sup>th</sup> European Congress of Immunology, 1-4 September 2021 Virtual Congress.

Etgü O., Karacay M., Dombaz F., Kızmaz M.A., Simsek A., Asan A., Yılmaz E., Kazak E., Pınar İ.E., Bal S.H., V., Özkalemkaş F., Akalın E.H., Budak F., Oral H.B., Yoyen-Ermis D., Macrophage Polarization Capacity of Peripheral Blood Monocytes and Monocytic Cell Line THP-1 in Response to Secreted Factors From COVID-19 Patients. 6<sup>th</sup> European Congress of Immunology, 1-4 September 2021 Virtual Congress.

Arslan G., Karacay M., Guvenc-Bayram G., Ozoglu E., Dombaz F., Etgu O., Yumusak E., Yoyen-Ermis D., Akkoc A., Yalcın M., Oral H.B., Evaluation of Some Blood Parameters and Percentage of CD4+ or CD8+ T Cells from Spleen and Liver from The Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Mouse Model. 6<sup>th</sup> European Congress of Immunology, 1-4 September 2021 Virtual Congress.

Karacay M., Arslan G., Guvenc-Bayram G., Dombaz F., Etgu O., Yumusak E., Yoyen-Ermis D., Akkoc A., Yalcın M., Oral H.B., Evaluation of Monocytic/Granulocytic Cells from Spleen and Liver in The Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Mouse Model. 6<sup>th</sup> European Congress of Immunology, 1-4 September 2021 Virtual Congress.