

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**M1-M2 İNDÜKLENMİŞ MAKROFAJLARIN VE MAKROFAJ TÜREVLİ
EKSOZOMLARIN MEME KANSERİ SFEROİDLERİ PRE/POST-
TÜMÖRİJENİK SÜREÇLERİNDEKİ ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Muhammed Mustafa SÜNGÜ

KİMYA ANABİLİM DALI

**ANKARA
2023**

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

M1-M2 İNDÜKLENMİŞ MAKROFAJLARIN VE MAKROFAJ TÜREVLİ EKSOZOMLARIN MEME KANSERİ SFEROİDLERİ PRE/POST-TÜMÖRİJENİK SÜREÇLERİNDEKİ ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Muhammed Mustafa SÜNGÜ

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Burak DERKUŞ

Bu çalışmada, çeşitli nanopartiküllerin ve farklı dozlarının makrofaj polarizasyonuna etkilerinin incelenmesi ve makrofaj-türevli eksozomların pre/post-tümörijenik etkilerinin değerlendirilmesi hedeflenmiştir. İlk olarak, makrofajlar hücreleri (Raw264.7) yedi farklı nanopartikül ile indüklenmiş ve indüklenmiş makrofajların gen ifadesi ve sitokin salımları incelenerek polarizasyon tipleri belirlenmiştir. Nanopartikül taraması sonucu elde edilen verilere dayanılarak seçilen paladyum nanopartiküllerinin (PdNP) meme kanseri (MCF-7) tümör mikro-dokularındaki metastatik, epital – mezenkimal geçiş (EMT), apoptotik ve invazif özellikleri kontrol grupları olan M0, M1 ve M2 makrofajlarla karşılaştırmalı olarak eş-kültür düzeneklerinde incelenmiştir. Ardından, farklı fenotipe sahip makrofajlardan (M0, M1, M2 ve PdNP – indüklenmiş) elde edilen eksozomların MCF-7'nin invazif özelliklerine etkisini incelemek amacı ile *in vitro* yara-kapama deneyi gerçekleştirilmiştir. Son olarak, tümör mikro-dokularında 5-Fluorourasil'e (5-FU) karşı eksozomların ilaç direncine etkileri de değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda, PdNP-indüklü makrofajların ve PdNP-indüklü makrofaj eksozomlarının (PdNP-Exo) meme kanseri tümör mikro-dokularında metastaz ve EMT-ilişkili genleri baskıladığını; apoptotik genlerde ise ifade artışını sağladığı gözlemlenmiştir. Bu sonuçlara dayanarak, PdNP-Exo'ların umut vadeden doğal immünomodulator veziküller olabileceği ve kanserle mücadele platformlarını destekleyebileceği düşünülmekte ve öngörülmektedir.

Nisan 2023, 96 sayfa

Anahtar Kelimeler: Meme kanseri, Tümör sferoidi, Makrofaj, Nanopartikül, Metastaz, İmmünomodulator, Eş-kültür, Eksozom

ABSTRACT

Master Thesis

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF M1-M2 INDUCED MACROPHAGES AND MACROPHAGE-DERIVED EXOSOMES ON PRE/POST-TUMORIGENIC PROCESSES OF BREAST CANCER SPHEROIDS

Muhammed Mustafa SUNGU

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry

Supervisor: Assoc. Prof. Burak DERKUS

In this thesis, it was aimed to examine the effects of various nanoparticles and their different doses on macrophage polarization and also to evaluate the pre/post-tumorigenic effects of macrophage-derived exosomes. First of all, the polarization types were determined by examining the gene expression and cytokine release by macrophage cells (Raw264.7) induced by seven different nanoparticles. Palladium nanoparticles (PdNP) which were selected based on the nanoparticle screening results affect the metastatic, epithelial-mesenchymal transition (EMT), apoptotic and invasive properties compared with the control groups M0, M1, and M2 macrophages in breast cancer (MCF-7) tumor micro-tissues by co-culture systems. Following, an in vitro wound-healing experiment was performed to analyze the effect of exosomes obtained from macrophages with different phenotypes (M0, M1, M2, and PdNP-induced) on the invasive properties of MCF-7. Eventually, the exosomes drug resistance effect to 5-Fluorouracil (5-FU) in tumor micro-tissues was also evaluated. In line with the results obtained, PdNP-induced macrophages and PdNP-induced macrophage exosomes (PdNP-Exo) suppress metastasis, and EMT-related genes in breast tumor micro-tissues were determined which provided an increase in apoptotic genes expression. To put it in a nutshell, this research predicted that PdNP-Exos can be promising natural immunomodulatory vesicles and also support cancer-fighting platforms.

April 2023, 96 pages

Key Words: Breast cancer, Tumor spheroid, Macrophage, Nanoparticle, Metastasis, Immunomodulator, Co-culture, Exosome

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca, bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşarak ilerlediğim akademik yolda bana ışık olan, desteğini ve motivasyonunu her daim yanımda hissettiğim, bilimsel duruşunu örnek aldığım değerli danışman hocam Doç. Dr. Burak DERKUŞ'a (Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya ABD),

Eğitimim boyunca manevi desteğini hep hissettiren saygı değer Prof. Dr. Emel EMREGÜL'e (Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya ABD), çalışmalarım sırasında bilgi ve birikimleri ile her zaman yardımlarını hissettiğim Doç. Dr. Sedat ODABAŞ ve Hakan ESKİZENGİN'e (Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya ABD), bu zorlu süreçte her zaman yanımda olan laboratuvar partnerlerimden de öte kardeşlerim gibi gördüğüm Melis IŞIK'a, Dilara KURT'a ve Buse SARI'ya ve laboratuvar partnerlerim olan değerli arkadaşlarım İpek ERTUĞRUL'a, Süveyda KOCACIK'a, Şevval YAZICIOĞLU'na ve Nazet GÜNGÖR'e, çalışmamda ne zaman ihtiyacım olsa yardıma koşan stajyerlerimiz Osman TÜRKÖZ'e, Elifnaz EKER'e ve Ilgım GÖZGÖZ'e beni yüksek lisansım boyunca maddi olarak destekleyen TÜBİTAK BİDEB'e,

Lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca, beni maddi ve manevi destekleyen amcam Arif SÜNGÜ'ye, lisans hayatımın bana kattığı en güzel şey olan, yanında gülüp yanında ağlayabildiğim, başım sıkışınca ilk yardıma koşan, yollarımızı birleştirme hayalleri kurduğum sevgili arkadaşım Elif KORGAN'a, hayatım boyunca her türlü düşüncemi paylaşabildiğim, bana insan olmanın inceliklerini ve sorumluluklarını aşıl原因, maddi ve manevi hiçbir desteğini esirgemeyen, her düştüğümde omzumu sıvazlayıp tekrar kalkmamı sağlayan, canımdan çok sevdiğim ailem olan annem Makbule SÜNGÜ'ye babam Kemal SÜNGÜ'ye ve kardeşlerim Nurefşan ve Mehmet Emin SÜNGÜ'ye

Tüm kalbimle teşekkürlerimi ve sevgilerimi sunarım.

Muhammed Mustafa SÜNGÜ
Ankara, Nisan 2023

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	
ETİK	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iii
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR	iv
SİMGELER DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER	5
2.1 Kanser Oluşumu	5
2.2 Meme Kanseri	6
2.3 Meme Tümör Mikroçevresi	7
2.4 Tümör-İmmün Mikroçevresi (TIME) ve Popülasyonunu Oluşturan Hücreler	8
2.4.1 Mast hücreleri (MCs)	9
2.4.2 Doğal öldürücü (NK) hücreler	9
2.4.3 Dentritik hücreler (DC)	9
2.4.4 T- lenfositleri	10
2.4.5 Miyeloid türevli baskılayıcı hücreler (MDSCs)	10
2.4.6 Makrofajlar	11
2.5 Makrofaj Fenotipleri ve Kanser Hücrelerine Etkileri	12
2.6 Meme Kanseri - Makrofaj Platformları	13
2.7 Eksozomlar ve Kanser Mikroçevresindeki Rolü	14
2.8 İmmünomodülatör Biyomalzemler	17
2.8.1 İmmünomodülatör nanopartiküller	17
3. KAYNAK ÖZETLERİ	20
4. MATERYAL ve YÖNTEM	23
4.1 Materyal	23
4.2 Yöntem	25
4.2.1 Hücre kültürü	25
4.2.2 Makrofaj polarizasyonu için nanopartiküllerin hazırlanması	25
4.2.3 Makrofaj polarizasyonu için nanopartikül uygulaması	26

4.2.4 XTT testi: Nanopartiküller ile polarizasyonu sağlanmış makrofajların hücre proliferasyonu.....	26
4.2.5 Canlı/ölü testi.....	27
4.2.6 Nanopartikül indüklü makrofajların gen ekspresyon analizleri.....	28
4.2.7 ELISA testi ile sitokin analizi.....	29
4.2.8 Makrofajların nanopartikül alımının TEM ile gözlemlenmesi	30
4.2.9 Tümör mikro-dokularının oluşturulması ve polarize makrofajlar ile eş-kültürü.....	31
4.2.10 MCF-7 tümör mikro-dokuların gen ekspresyon analizleri.....	33
4.2.11 Raw 264.7 hücrelerinden eksozom izolasyonu ve karakterizasyonu.....	33
4.2.12 Yara kapama deneyi	35
4.2.13 Çok hücreli heterojen tümör mikro-dokuların (heterosferoidlerin) hazırlaması, eksozom uygulaması ve gen ekspresyon analizleri.....	35
4.2.14 İlaç çalışmaları	37
5. BULGULAR.....	38
5.1 Nanopartikül Taraması: Farklı Nanopartiküllerin Hücre Çoğalmasına ve Makrofaj İndüksiyonuna Etkileri	38
5.1.1 Nanopartiküllerin makrofaj çoğalmasına etkilerinin XTT ile incelenmesi ...	40
5.1.2 Nanopartiküllerin makrofaj polarizasyonuna etkilerinin RT-qPCR ile incelenmesi	41
5.1.3 Nanopartikül alımının TEM ile incelenmesi	44
5.1.4 Sitokin salımının ELISA ile incelenmesi	45
5.2 Paladyum Nanopartikül (PdNP) -İndüklenmiş Makrofajların Canlılık Testi..	47
5.3 MCF-7 Tümör Mikro-dokuların Polarize Makrofajlar ile Eş-Kültür Çalışması	49
5.4 Makrofaj-Türevli Eksozomların Anti/Post-Tümörijenik Etkileri	54
5.4.1 PdNP-indüklenmiş makrofaj eksozomlarının morfolojik karakterizasyonu...	54
5.4.2 PdNP-indüklenmiş makrofaj eksozomlarının protein miktar tayini	55
5.5 Makrofaj-Türevli Eksozomların in vitro Yara Kapatma Potansiyelleri	56
5.6 Makrofaj-Türevli Eksozomların Tümör Mikro-Dokusuna ve Çok-Hücreli Mikro-Dokusuna Gen Ekspresyon Seviyesinde Anti/Post-Tümörijenik Etkileri.....	57
5.6.1 Eksozomların MCF-7 tümör mikro-dokulara etkileri.....	58
5.6.2 Eksozomların MCF-7 / HUVEC mikro-dokulara etkileri.....	62
5.6.3 Eksozomların MCF-7 / HUVEC / phDF mikro-dokulara etkileri.....	64
5.7 Eksozomların ve Sağlıklı Hücrelerin (HUVEC ve phDF) Anti-Kanser İlaç Cevabına Etkileri	68
5.7.1 Sağlıklı hücrelerin (HUVEC ve phDF) anti-kanser ilaç cevabına etkileri.....	68

5.7.2 Eksozomların anti-kanser ilaç cevabına etkileri.....	69
6. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	79
KAYNAKLAR.....	88
ÖZGEÇMİŞ.....	96



SİMGELER DİZİNİ

CO₂ Karbondioksit

Kısaltmalar

2D	İki Boyut
3B	Üç Boyut
5-FU	5-florourasil
AP-1	Aktivasyon Proteini - 1
Arg-1	Arginaz 1
CAF	Kanser İlişkili Fibroblast
CCL2	C-C Kemokin Ligand 2
cDNA	Tamamlayıcı DNA
CDNP-R848	R848, β – Siklodekstrin Nanoparçacıkları
CTL	Sitotoksik T Hücreleri
CXCL12	C-X-C Kemokin Ligand 12
DBP	Dibütil Ftalat
DC	Dentritik Hücreler
DDSA	Dodesil Sukkinik Anhidrat
DMEM-hg	Dulbecco's Modified Eagle's Medium-high glucose
DMP-30	2,4,6[tri(dimetilaminoetilfenol)]
DPBS	Dulbecco'nun Fosfat Tamponlu Salini
ECM	Hücre Dışı Matriks
EDTA	Etilen Diammin Tetraasetik Asit
EMT	Epitelyal-Mezenkimal Geçiş
ethd-1	Etidyum homodimer-1
FBS	Fetal Sığır Serumumu
GM-CSF	Granülosit Makrofaj Koloni Uyarıcı Faktörü
HIF-1α	Hipoksi ile İndüklenebilir Faktör 1 - Alfa
HUVEC	İnsan Göbek Kordonu Bağı Endotel Hücreleri
IARC	Uluslar Arası Kanser Araştırmaları Ajansı
IDO	İndoleamin 2,3-dioksijenaz
IFN-γ	İnterferon Gama
IL-6	İnterlökin - 6
LPS	Lipopolisakkarit

MAPK	Mitojenle Aktive Edilen Protein Kinaz
MC	Mast Hücreleri
MCF-7	Meme Kanseri Hücreleri
MCS	Çok Hücreli Sferoid
MDSCs	Miyoloid Türevli Baskılayıcı Hücreler
MMP's	Matris Metalopeptidazlar
mRNA	Mesajcı RNA
MVE	Multivesiküler Endozom
NF- κ β	NF- Sinyal Transdüseri ve Aktivatörü Kappa β
NO	Nitrik Oksit
NOS2	Nitrik Oksit Sentaz 2
P/S	Penisilin/Streptomisin
PDGF	Platelet Kökenli Büyüme Faktörü
PGE2	Prostaglandin E2
phDF	Birincil İnsan Dermal Fibroblast Hücreleri
PI3K	Fosfatidilinositol – 3 - Kinaz
ROS	Serbest Radikaller
RT-qPCR	Ters transkriptaz-kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu
STAT-1	Sinyal Dönüştürücü ve Transkripsiyon-1 Aktivatörü
TAM	Tümör ilişkili Makrofajlar
TEM	Geçirimli Elektron Mikroskobu
TGF-β	Tümör Büyüme Faktörü - Beta
Th	Yardımcı T Hücreleri
TIME	Tümör İmmün Mikroçecrei
TLR	Toll Bezeri Reseptör
TME	Tümör Mikroçevresi
TNBC	Triple Negatif Meme Kanseri
TNF-α	Tümör Nekroz Faktörü Alfa
Treg	Düzenleyici T Hücreleri
ULAP	Ultra Düşük Bağlantı Plakası
VEGF	Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü
XTT	[2,3-bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sülfofenil)-2H-tetrazolyum-5-karboksanilid]

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Normal hücreler ve kanser hücrelerin temsili görseli	5
Şekil 2.2 2020 Yılı içerisinde dünya çapında meme kanseri vakaları	6
Şekil 2.3 Tümör mikroçevresi bileşenleri	8
Şekil 2.4 Tümör-immün mikroçevresi bileşenleri ve TME'deki etkileri.....	11
Şekil 2.5 Polarize makrofajların görevleri ve hemeostasisin bozulduğu durumlarda meydana getirdikleri olumsuz etkiler	13
Şekil 2.6 Multivesiküler endozom (MVE) aracılı eksozom oluşumu	15
Şekil 2.7 Nanopatiküllerin MAPK yolağı aracılı makrofaj polarizasyonu	18
Şekil 4. 1 Eş-kültür deney sistemi kurulum şeması	32
Şekil 4.2 Oluşturulan mikro-dokuların temsili görseli	36
Şekil 5.1 İndüklenmeyen (A), düşük doz (10 µg/ml) nanopatiküller (Zn-Ni-FeO, Cu(II)O, Pd, Pt, GO ve CdSeS/ZnS kuantum noktacılar) ve 2.5 µg/ml (Au) ile indüklenen (B) ve yüksek doz (50 µg/ml) nanopatiküller (Zn-Ni-FeO, Cu(II)O, Pd, Pt, GO ve CdSeS/ZnS kuantum noktacılar) ve 5 µg/ml (Au) ile indüklenen (C) makrofajların 48. saat mikroskop görüntüleri.....	40
Şekil 5.2 Nanopatiküllerin makrofajlarda hücre proliferasyonuna etkileri: 48. Saat XTT sonuçları	41
Şekil 5.3 Nanopatiküller ile uyarılmış makrofajların M1 (CD64 ve STAT-1) ve M2 (CD163 ve STAT-6) belirteçler için gen ekspresyon grafikleri.....	42
Şekil 5.4 Nanopatiküller ile uyarılmış makrofajların gen ekspresyon ve gen ekspresyon oranlarının ısı haritası. Yüksek ekspresyonlar kırmızı renk ile gösterilmişken, düşük ekspresyonlar turkuaz rengi ile ifade edilmiştir	43
Şekil 5.5 Paladyum nanopatikülleri ile indüklenmiş makrofajların TEM görüntüleri ..	44
Şekil 5.6 Zn-Ni-FeO nanopatikülleri ile indüklenmiş makrofajların TEM görüntüleri	44
Şekil 5.7 ELISA testi için nanopatiküller ile indüklenen makrofajların mikroskop görüntüleri.....	46
Şekil 5.8 Nanopatiküller ile indüklenen makrofajların ürettikleri TNF- α konsantrasyonları	47
Şekil 5.9 Paladyum ile indüklenmiş ve indüklenmemiş makrofajların (A) 2. ve (B) 5. gün canlı/ölü testleri sonuçları	48
Şekil 5.10 Paladyum ile indüklenmiş ve indüklenmemiş makrofajların 2. ve 5. gün XTT testleri sonuçları	49
Şekil 5.11 Eş-kültür sistemindeki farklı fenotipteki makrofajların mikroskop görüntüleri.....	50

Şekil 5.12 Eş-kültür sistemindeki MCF-7 tümör mikro-dokuların mikroskop görüntüleri.....	50
Şekil 5.13 Farklı fenotiplere sahip makrofajlar ile eş-kültürlenmiş tümör mikro-dokularının zamana bağlı boyut dağılımı	51
Şekil 5.14 Farklı fenotiplerdeki Raw 264.7 makrofaj hücreleri ile 3 gün boyunca eş-kültürlenmiş MCF-7 tümör mikro-dokuların (A) % canlılık grafiği, (B) metastatik genlerin ekspresyon grafiği, (C) EMT ilişkili genlerinin ekspresyon grafiği, (D) p53 ekspresyonu grafiği	52
Şekil 5.15 Paladyum nanopartikülleriyle (50 µg/ml) indüklenmiş Raw 264.7 makrofaj hücrelerinden elde edilen eksozomların TEM görüntüsü	54
Şekil 5.16 BCA testine ait konsantrasyon – absorban standart grafiği	55
Şekil 5.17 MCF-7 hücrelerine uygulanan M0, M1, M2 eksozomları ve PdNP-Exo'larının oluşturulan suni yaraların zamana bağlı kapanmasına etkilerini gösteren mikroskop görüntüleri (ölçek: 500 µm).....	56
Şekil 5.18 M0, M1, M2 ve PdNP eksozomları ile tedavi edilen suni yaraların belirli saatler içerisindeki kapanma oranları grafiği.....	57
Şekil 5.19 İki farklı dozda eksozom uygulanmış MCF-7 tümör mikro-dokuların mikroskop görüntüleri.....	59
Şekil 5.20 İki konsantrasyonda (50 µg/ml ve 100 µg/ml) uygulanan M0, M1, M2 ve PdNP eksozomların MCF-7 tümör mikro-dokular üzerindeki (A) metastaz genlerine, (B) EMT belirteci olan N-cad/E-cad oranına ve (C) apoptotik p53 enine etkilerini gösteren gen ifade seviyesi grafikleri.....	61
Şekil 5.21 M0, M1, M2 ve PdNP eksozomları (100 µg/ml) ile kültürlenmiş MCF-7/HUVEC mikro-dokuların mikroskop görüntüleri (ölçek: 200 µm)	62
Şekil 5.22 M0, M1, M2 ve PdNP eksozomları ile kültürlenmiş MCF-7/HUVEC çok hücreli mikro-dokuların (A) metastatik belirteç genleri olan MMP2 ve MMP9, (B) EMT belirteç genlerinin oranı üzerindeki etkilerini belirten gen ekspresyon grafikleri ve (C) apoptotik p53 geni ekspresyon grafiği	64
Şekil 5.23 M0, M1, M2 ve PdNP eksozomları (100 µg/ml) ile kültürlenmiş MCF-7/HUVEC/phDF mikro-dokuların mikroskop görüntüleri	65
Şekil 5.24 M0, M1, M2 ve PdNP eksozomları ile kültürlenmiş MCF-7/HUVEC/phDF çok hücreli mikro-dokuların (A) metastatik belirteç genleri olan MMP2 ve MMP9 üzerindeki, (B) EMT belirteç genlerinin oranı üzerindeki ve (C) apoptotik p53 geni üzerindeki etkilerini belirten gen ekspresyon grafikleri .	67
Şekil 5.25 MCF-7, MCF-7/HUVEC ve MCF-7/HUVEC/phDF mikro-dokularının iki farklı doz (10 µM ve 100 µM) ve iki farklı zaman aralığında XTT ile alınan % canlılık grafiği	68
Şekil 5.26 Eksozomlu ilaç deneylerinin temsili görseli	70
Şekil 5.27 4 grup halinde uygulanan eksozomların (M0, M1, M2 ve PdNP-Exo) ve 5-FU anti-kanser ilacı (10 µM ve 100 µM) uygulanan MCF-7 tümör mikro-dokuların belirlenen zaman noktalarında alınan mikroskop görüntüleri (ölçek: 500 µm)	71

Şekil 5.28 4 grup halide uygulanan eksozomların (M0, M1,M2 ve PdNP-Exo) ve 5-FU anti-kanser ilacı (10 µM ve 100 µM) uygulanan MCF-7/HUVEC çok hücreli mikro-dokuların belirlenen zaman noktalarında alınan mikroskop görüntüleri (ölçek: 500 µm).....	72
Şekil 5.29 4 grup halide uygulanan eksozomların (M0, M1,M2 ve PdNP-Exo) ve 5-FU anti-kanser ilacı (10 µM ve 100 µM) uygulanan MCF-7/HUVEC/phDF çok hücreli mikro-dokuların belirlenen zaman noktalarında alınan mikroskop görüntüleri (ölçek: 500 µm).....	73
Şekil 5.30 100 µg/ml Eksozom (M0, M1, M2 ve PdNP-Exo) ve 5-FU anti-kanser ilacı (10 µM ve 100 µM) ile 24 saat boyunca tedavi edilen mikro-dokuların (MCF-7, MCF-7/HUVEC, MCF-7/HUVEC/phDF) % canlılık grafiği	75
Şekil 5.31 100 µg/ml Eksozom (M0, M1, M2 ve PdNP-Exo) ve 5-FU anti-kanser ilacı (10 µM ve 100 µM) ile 72 saat boyunca tedavi edilen mikro-dokuların (MCF-7, MCF-7/HUVEC, MCF-7/HUVEC/phDF) % canlılık grafiği	76
Şekil 5.32 100 µg/ml Eksozom (M0, M1, M2 ve PdNP-exo) ve 5-FU anti-kanser ilacı (10 µM ve 100 µM) ile tedavi edilen mikro-dokuların (MCF-7, MCF-7/HUVEC, MCF-7/HUVEC/phDF) genel % canlılık grafiği.....	77

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1 Kullanılan belirteç genlerin primer sekansları	24
Çizelge 5.1 Eksozom konsantrasyonları	55
Çizelge 5.2 5-FU anti-kanser ilacının iki farklı doz ve inkübasyon sürelerinde, farklı tip mikro-dokular üzerindeki etkinliği.....	69
Çizelge 5.3 Eksozomların (M0, M1, M2 ve PdNP-exo) farklı inkübasyon süresinde (24 saat ve 72 saat) ve ilaç dozlarında (10 μ M ve 100 μ M) tümör mikro- dokuları ve çok hücreli mikro-dokular üzerindeki ilaç aktivitesine etkileri	78

1. GİRİŞ

Günümüzde kanser, toplum sağlığını tehdit eden en kritik sorunlardan biri haline gelmiştir. Nitekim Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı'nın (IARC) sunduğu verilere göre, dünyada her beş kişiden birine yaşamı boyunca kanser teşhisi konulmaktadır. Sadece 2020 yılında, dünya çapında tahminen 19,3 milyon yeni kanser vakası ve kanser nedeniyle yaklaşık 10 milyon ölüm meydana gelmiştir (Ferlay ve Colombet 2021). Meme kanseri 2,26 milyon vaka ile en sık teşhis konulan kanser vakasıdır. Yine IARC'nin verilerine göre, dünya genelinde bu vakaların yaklaşık 685.000'i ölümle sonuçlanmıştır.

Kanser hücrelerinin bulunduğu mikroçevre, kanserle mücadelenin zorluğunda önemli bir etkiye sahiptir. Tümör mikro çevresi (TME) olarak adlandırılan bu çevre, bir tümörün geliştiği karmaşık ve zengin çok hücreli ortam olarak tanımlanır. TME, bağışıklık hücreleri, T ve B lenfositleri, dendritik hücreler, tümörle ilişkili makrofajlar ve doğal öldürücü hücreleri içerir. Ayrıca kanser kök hücreleri, kanserle ilişkili fibroblastlar ve anjiyogeneze katkıda bulunan vasküler endotel hücreleri içerir. TME'nin hücrel karmaşıklığı arasında, tümör büyümesini destekleyen hücre dışı matriks (ECM), büyüme faktörleri, sitokinler, kemokinler ve hücre dışı veziküller gibi çeşitli hücrel olmayan bileşenlere de sahiptir. Böylece TME'deki heterojenlik, hücrel ve hücrel olmayan bileşenlerin iletişim kurduğu karmaşık bir ortam oluşturur (Bejarano vd. 2021). Şu anda in vitro koşullarda kullanılan iki boyutlu (2D) kültür sistemi, hücre-matriks etkileşimleri, hücre-hücre etkileşimleri gibi hücre fonksiyonunda önemli olan özellikleri temsil edemediğinden in vivo ortamdaki TME koşullarını taklit etmek için yeterli değildir. Sferoidler gibi üç boyutlu kültür sistemleriyle üretilen hücre popülasyonları, in vivo komplekse daha yakın özellikleri gösterir. Ek olarak, mikrohücrel ortamı stimüle etmek ve hücre-hücre etkileşimlerini sağlamak için üç boyutlu çok hücreli sferoidler (MCS'ler) kullanılmaktadır (Lee ve Kim 2021).

Kanserle mücadelenin bu kadar zor olmasının bir diğer nedeni de TME'deki kanser hücrelerinin ve kanserle ilişkili fibroblastların (CAF) tümör-immün mikroçevresindeki (TIME) immün hücrelerinin aktivitelerini değiştirmesi veya baskılamasıdır. Dönüştürücü

büyüme faktörü-beta (TGF- β), interlökin-6 (IL-6), indoleamin 2,3-dioksijenaz (IDO), C-X-C kemokin ligand 12 (CXCL12), C-C kemokin ligand 2 (CCL2) gibi çoklu kemokinlerin ve sitokinlerin ortama salımı TIME etkinliğini bastırır. Aynı zamanda vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), prostaglandin E2 (PGE2) ile birlikte TME'de kanser hücrelerinin gelişimini de destekler (Mao vd. 2021). TIME'de çok sayıda bulunan makrofajlar, tümör antijenlerinin seyrek olduğu durumlarda tümör hücrelerini öldürmede etkilidir. Makrofajlar oldukça plastik hücrelerdir ve bu özellikleri onların patojenlere karşı savunma, doku homeostazını düzenleme ve yara iyileşmesine yardımcı olma gibi birçok rolde etkili olmalarını sağlar (Wynn vd. 2013). Makrofajların iki farklı fenotipi vardır, klasik olarak aktive edilmiş proinflamatuvar (M1) ve alternatif olarak aktive edilmiş anti-inflamatuvar (M2) ve bu fenotiplere olan yönelim mikroçevreden gelen ipuçlarına dayanır.

Ayrıca TME'de bulunan moleküller olan hücre dışı veziküller, hücre-hücre iletişimde oldukça kritiktir. Hücre dışı veziküllerin bir sınıfı olan eksozomlar 30-150 nm çapındadır ve kök hücreler, endotel hücreleri, makrofajlar ve kanser hücreleri gibi birçok farklı hücre türü tarafından salınır (Bondhopadhyay vd. 2021). Eksozomlar ayrıca proteinler, lipitler, DNA, mRNA, mikroRNA'lar dâhil olmak üzere birçok biyoaktif molekül taşırlar (Javeed ve Mukhopadhyay, 2017). Kanser hücreleri diğer hücrelere göre çok daha fazla eksozom salgılar ve bu eksozomlar kanserle ilgili çok sayıda biyoaktif molekül içerir. Bu biyoaktif moleküller makrofajlara taşınır ve çoklu sinyal yollarının aktivitesini düzenler, böylece makrofajların Fosfatidilinositol-3-kinaz (PI3K) ve AKT yolları yoluyla M2 fenotipine polarizasyonunu indükler (Han vd. 2021; Vergadi vd. 2017). Benzer şekilde, M2 polarize makrofajların eksozomlarının, kanser hücrelerinin istila, göç ve anjiyogenez özelliklerini arttırdığı bilinmektedir. Örneğin; Yang vd. (2011), M2 polarize makrofajlardan türetilen eksozomların meme kanseri üzerindeki etkilerini araştırmıştır. Eksozomların meme kanseri ile inkübasyonundan sonra, miR-223/Mef2c/ β -katenin yolağının artan aktivasyonu nedeniyle invazyonu teşvik ettiği gözlemlenmiştir (Yang vd. 2011). Wu vd., M2 makrofajlarından türetilen eksozomların, Hepatoselüler karsinom (HCC) hücrelerinde artan MMP9 ekspresyonu nedeniyle göçü desteklediğini bildirmişlerdir (Wu vd. 2021). Ek olarak, çalışmalar M2 makrofaj eksozomlarının

TME'de hücre büyümesini, anjiyogenezi ve kemodirenci desteklediğini kanıtlamıştır (El-Arabey vd. 2020; Yin vd. 2019; Yang vd. 2021).

Halihazırda geliştirilen bazı biyomalzemeler, tümör büyümesini destekleyen ve kanserli hücelere karşı savunma yapabilen proinflamatuvar fenotip (M1) makrofajlara yayılan anti-enflamatuvar fenotip (M2) makrofajlarını dönüştürmek için kanser mikro ortamında da kullanılabilir. Bu biyomalzemelere “immünomodülatör biyomalzemeler” denir. RH Movva vd, makrofaj yüzeyine güvenli bir şekilde yapışabilen, ‘sırt çantası’ adını verdikleri bir immünomodülatör biyomateryal rapor etmişlerdir. Bu biyomateryal, sürekli olarak makrofajları M1 fenotipe polarize eden IFN- γ salımı yapmaktadır (Movva vd. 2022). Nanopartiküller ayrıca makrofajların fenotipini düzenlemek için oldukça etkili malzemelerdir. Çünkü nanopartiküller vücuda veya hücre kültürüne girdikten sonra makrofajlar, yabancı cisim olarak tanımladıkları nanopartikülleri yüzey opsonizasyonu nedeniyle endositoz veya fagositoz yoluyla kendi bünyelerine alabilirler (Reichel vd. 2019). Nanopartiküllere makrofaj tepkileri, doz, boyut, nanopartikül bileşimi ve nanopartikül yüzey özellikleri gibi belirleyicilere bağlı olabilir. Örneğin; titanyum nanopartiküller (Ti-NP'ler), çinko oksit nanopartiküller (ZnO-NP'ler), süper paramanyetik demir oksit nanopartiküller (SPION'lar) ve paladyum nanopartiküller (Pd-NP'ler) gibi metalik nanopartiküller, mitojenle aktive olan protein kinazlara (MAPK) veya toll benzeri reseptörlere (TLR) bağlı olarak makrofajları M1 fenotipine polarize ederler (Scherbart vd. 2011; Wang vd. 2017; Kodali vd. 2013; Gurunathan vd. 2021; Ma vd. 2019). Öte yandan, lipozomal nanopartiküller, makrofajları M2 fenotipine indüklemektedir (Rajan vd. 2018).

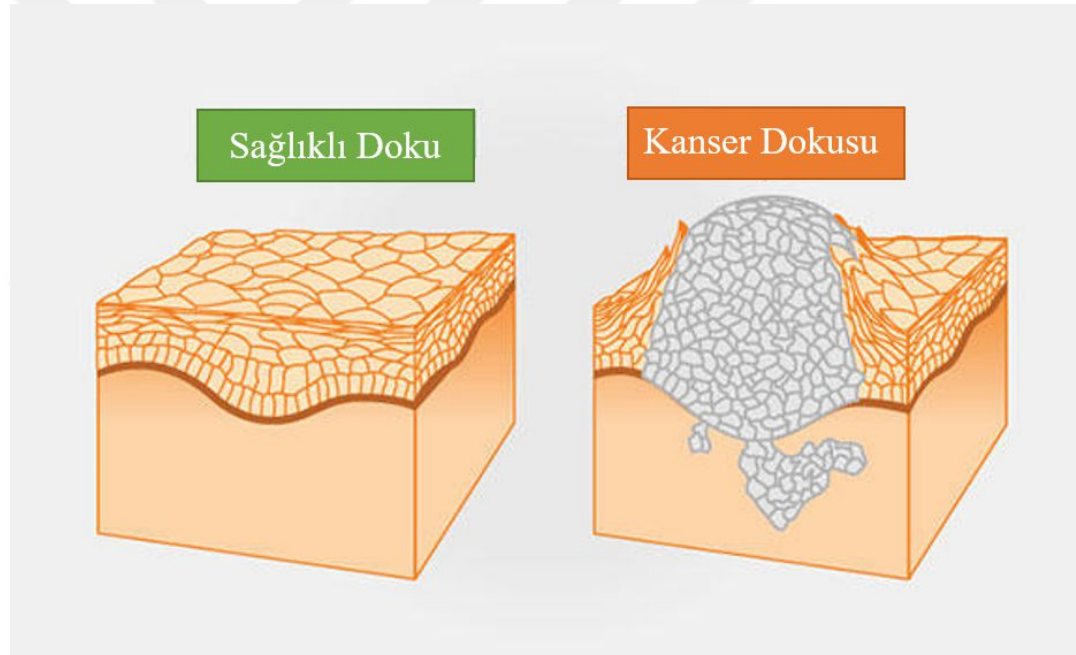
Bu çalışmanın amacı, çinko-nikel-demir (Zn-Ni-Fe) oksit, bakır (II) oksit (CuO), paladyum (Pd), platin (Pt), altın (Au), grafen oksit (GO) ve CdSeS/ZnS kuantum noktacıkları gibi çeşitli kimyasal ve fiziksel özelliklere sahip olan nanopartiküllerin makrofaj polarizasyonuna etkilerinin incelenmesidir ve nanopartikül-indüklü makrofaj eksozomlarının pre/post-tümörijenik etkilerinin değerlendirilmesidir. Paladyum nanopartiküllerinin (PdNP) M1 makrofaj polarizasyonu üzerindeki umut vadeden sonuçları sebebiyle, PdNP ile indüklenen makrofaj hücrelerinin meme kanseri (MCF-7 hücreleri) mikro-dokularındaki tümörijenik özellikleri üzerindeki etkileri bir eş-kültür

sistemi aracılığıyla ileri seviyede incelenmiştir. Öte yandan, M0, M1, M2 ve PdNP-indüklü makrofajlardan türetilen eksozomların (PdNP-Exo) MCF-7 tümör mikrodokuları ve çok hücreli MCF-7/ insan göbek kordonu bağı endotel hücreleri (HUVEC) ve MCF-7/HUVEC/Birincil İnsan Dermal Fibroblast Hücreleri (phDF) heteromikrodokuları üzerindeki etkileri incelenmiştir. Böylece makrofajların çeşitli varyantlarından türetilen eksozomların TME'ye benzer bir sistemdeki etkilerinin ve terapötik potansiyellerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Ek olarak, eksozomların 5-Fluorourasil'e (5-FU) karşı MCF-7 mikrodokuları ve çok hücreli mikrodokular üzerindeki ilaç duyarlılık/direnç potansiyelleri incelenmiştir.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1 Kanser Oluşumu

Vücudumuz, ölen ve yerine yenilerinin geldiği sayısız hücreden oluşur. Bu yeni hücreler, vücudumuzdaki mevcut hücrelerden türetilir ve önceki hücreler döngülerini tamamladığında yerlerini yeni hücreler alır. Ancak nadiren de olsa bu hücreler herhangi bir kısıtlama olmaksızın bölünerek vücudumuzda “kanser” dediğimiz bir anormalliğe neden olurlar (Mugarab-Samadi vd. 2021).



Şekil 2.1 Normal hücreler ve kanser hücrelerin temsili görseli (Mugarab-Samadi vd. 2021)

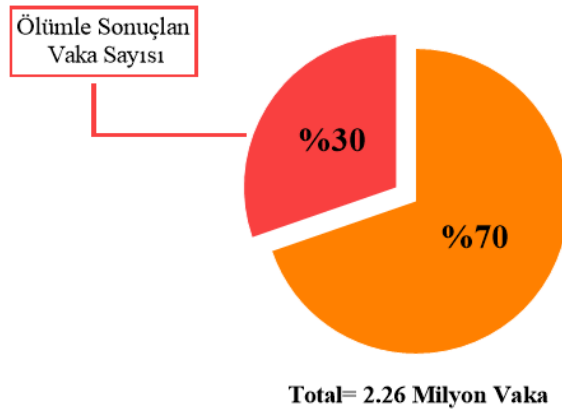
Kanser oluşumunun temel nedeni, DNA mutasyonlarına dayanır. Kanser oluşumuna neden olan genetik mutasyonlar; proto-onkogenler, tümör baskılayıcı genler ve DNA onarım genleri olmak üzere üç ana gen tipini etkileme eğilimindedir (Weinberg 1996). Epigenetik faktörler, sigara, UV ışınları, kanserojen kimyasallar, stres ve yeme alışkanlıkları, DNA mutasyonlarına sebebiyet verebilir (Ali vd. 2011). Kansere sebebiyet verebilecek DNA mutasyonların gerçekleşme riski, kişinin yaşının artmasına bağlı olarak

artabilir. IARC'nin sunduğu verilere göre, dünyada her beş kişiden birine yaşamı boyunca kanser teşhisi konulmaktadır. Sadece 2020'de, dünya çapında tahminen 19,3 milyon yeni kanser vakası ve kanserden yaklaşık 10 milyon ölüm meydana gelmiştir (Ferlay ve Colombet 2021).

2.2 Meme Kanseri

2020 yılı içerisinde kanser vakaları arasında en sık rastlanana 2,26 milyon vaka ile meme kanseridir. Yine Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı'nın verilerine göre, dünya genelinde bu vakaların yaklaşık 685.000'i ölümlle sonuçlanmıştır. Meme kanseri, üç moleküler belirtecin varlığına veya yokluğuna bağlı olarak üç farklı ana tipe ayrılır. Bunlardan biri, kadınlık hormonu olan östrojenin reseptörüdür, bir diğeri yine kadınlık hormonu olan progesteronun reseptörüdür, son olarak ise insan epidermal büyüme faktörü 2 (ERBB2; eski adıyla HER2) proteindir. Meme kanseri hastalarının yaklaşık %70'i hormon reseptörü pozitif/ERBB2 negatif sınıfındadır; yaklaşık %15'i ERBB2 pozitif ve %15'i ise üçlü negatif (3 standart moleküler belirtecin hiçbirini içermeyen tümörler) sınıfındadırlar (Waks ve Winer 2019).

2020 Yılı İçerisinde Dünya Çapında Meme Kanseri Vakaları

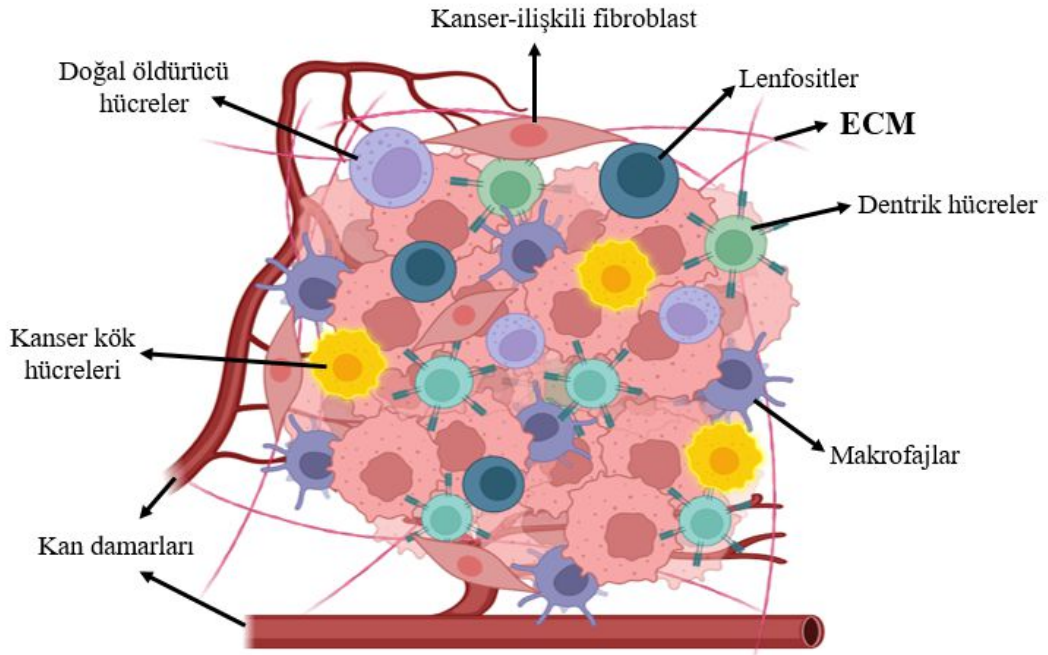


Şekil 2.2 2020 Yılı içerisinde dünya çapında meme kanseri vakaları

Teknolojinin gelişmesi ile beraber meme kanseri ile mücadelede çeşitli yaklaşımlar ele alınmıştır. Ameliyat, kemoterapi, radyoterapi, endokrin tedavisi ve kombine tedaviler gibi yöntemlerin yanı sıra, güvenli ve kanser hücrelerini hedefleyerek öldürebilen aynı zamanda bağışıklık sistemini uyaran onkolitik virüsler meme kanseri ile mücadelede umut vadeden yaklaşımlardandır (Eissa vd. 2018; O'brayn vd. 2018; Tai vd. 2019). Bu umut verici yaklaşımlar sayesinde, meme kanseri hastalarının ölüm oranı günümüzde %30 civarlarına düşürülmüştür. Lakin kadın sağlığını tehdit eden en önemli hastalıklardan biri olmayı sürdürmektedir (Garcia-Aranda ve Rendondo 2019). Tümör mikroçevresinin oldukça kompleks yapısı, kanser hücrelerinin agresif ve metastatik yapıları, kullanılan kemoterapötik ilaçların yüksek ölçüde sağlıklı hücrelere de zarar vermesi veya kanser hücrelerinin ilaç dirençleri kansere karşı mücadeleyi zorlaştıran faktörler olmaya devam etmektedir (Vasan vd. 2019; Burguin vd. 2021).

2.3 Meme Tümör Mikroçevresi

Meme kanser hücrelerinin geliştiği tümör mikroçevresi, zengin ve karmaşık çok hücreli bir ortam olarak tanımlanır. TME, T ve B lenfositleri, dendritik hücreler, tümörle ilişkili makrofajlar (TAM) ve doğal öldürücü hücreler gibi tümör immün mikroçevresi (TIME) elamanlarını içermektedir. Ayrıca kanser kök hücreleri, kanserle ilişkili fibroblastlar (CAF) ve anjiyogeneze katkıda bulunan vasküler endotel hücreleri içermektedir. TME'nin hücrel karmaşıklığı arasında, tümör büyümesini destekleyen hücre dışı matriks (ECM), büyüme faktörleri, sitokinler, kemokinler ve hücre dışı veziküller gibi çeşitli hücrel olmayan bileşenleri de bulundurmaktadır. Böylece TME'deki heterojen hücrel ve hücrel olmayan bileşenlerin iletişim kurduğu karmaşık bir ortam oluşur (Bejarano vd. 2021). Tümör mikroçevresinde bulunan bu hücreler ve hücrel olmayan birleşenler, kansere karşı mücadelede zorluklar çıkarmaktadır. Örneğin; kanser ilişkili fibroblastlar (CAF), TIME elemanlarının aktivitelerini değiştirir veya baskırlar. Ayrıca kanser ilişkili makrofajlar (TAM), vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) salımı ile kanser hücrelerinin çoğalmasını ve anjiyogenezi destekler (Mao vd. 2021). Böylelikle kanser hücreleri, vücudun yara iyileştirmesi için kullandığı mekanizmayı manipüle ederek kendi gelişimi ve metastazı için kullanmaktadır.



Şekil 2.3 Tümör mikroçevresi bileşenleri (Işık, 2022)

2.4 Tümör-İmmün Mikroçevresi (TIME) ve Popülasyonunu Oluşturan Hücreler

Tümör-immün mikroçevresi, kanser hastalarının klinik prognozu ile yakından ilişkili olduğu bildirilen yeni bir kavramdır. TME içerisindeki miyeloid hücreler, lenfositler gibi doğal ve adaptif bağışıklık hücrelerinin oluşturduğu hücre popülasyonu TIME'nin çoğunluğunu oluşturur (Mao vd. 2021). TME'deki kanser hücreleri ve kanser ilişkili fibroblastlar; anti-inflamatuar makrofajlar, düzenleyici T (Treg) hücreleri ve miyeloid türevli baskılayıcı hücreler (MDSCs) gibi immün baskılayıcı hücrelerin TIME içerisindeki oranlarını arttırmaktadır. Böylece hastalarda kanser bağışıklığı bastırılır ve kanser prognozu ilerlemeye devam etmektedir. TIME'yi etkileyen en önemli faktörlerden biri olan CAF'lar, endotel, mezenkimal, epitel, fibroblast ve monosit gibi birçok farklı tür hücrelerden farklılaşarak oluşabilirler (Mao vd. 2021).

2.4.1 Mast hücreleri (MCs)

TIME'nin bir bileşeni olan mast hücreleri ilginç bir şekilde lokasyonlarına, kanser tipine ve kanserin ilerleme durumlarına bağlı olarak tümörün büyümesini hem teşvik edebilir hem de baskılayabilmektedir. MC'ler kanser promotörleri olarak VEGF-A, VEGF-B ve heparin gibi pro-anjiyojenik moleküllerin üretimi ile ECM degradasyonunu ve anjiyogenezi uyarmaktadır (Beer, Ng ve Murray 2008). Diğer bir taraftan TNF, IL-1 ve IL-6 gibi sitokinlerin üretimine bağlı olarak anti-tümör inflamasyonunu ve tümör apoptozunu uyarırken kanser hücrelerinin invazif özelliklerini azaltmaktadır (Maltby vd. 2009).

2.4.2 Doğal öldürücü (NK) hücreler

Doğal bağışıklık sistemi üyelerinden olan doğal öldürücü (NK) hücreler, kanser hücresine doğrudan yanıt vermektedir. NK hücrelerinin aktivasyonu, hücre yüzeyinde aktive edici veya inhibe edici reseptörlerin ekspresyonlarına ve uyarılmasına bağlıdır. TME doğrudan veya dolaylı bir şekilde NK reseptör aktivasyonunu, sitotoksik aktivite ve sitokin üretimi dâhil olmak üzere birçok işlem yoluyla NK hücreleri üzerinde inhibe edici etki göstermektedir. TME hücrelerinden olan CAF, TGF- β , prostaglandin E2 (PGE2) ve indoleamin 2,3-dioksijenaz (IDO) enzimi yolu ile NK hücrelerinin inaktif edilmiş bir fenotipe geçiş yapmalarına neden olmaktadır. Böylelikle NK hücrelerinin anti-tümör bağışıklığına tepkisiz bir ortam oluşturulmasına yol açmaktadır (Turley vd. 2015; Li vd. 2012).

2.4.3 Dendritik hücreler (DC)

Çeşitli alt popülasyonlarla heterojen bir grup olan dendritik hücreler (DC'ler), sınıf I ve sınıf II büyük doku uygunluk (MHC) komplekslerinin ve adezyon moleküllerinin yüksek ekspresyonu yoluyla TIME'de doğal ve adaptif immün yanıtların aktivasyonunda ve düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır (Wculek vd. 2020). TME' de bulunan kanser hücreleri ve CAF'lar, DC olgunlaşmasını, antijen sunumunu ve bunlarla ilişkili

adaptif bağışıklık tepkilerini bloke ederek tümör hücrelerinin bağışıklıktan kaçmasına sebep olabilmektedir (Cheng vd. 2016). TME ortamında DC'ler, düzenleyici DC'lere (rDC) dönüştükten sonraIDO enzim salımı yapar. IDO enzimine bağlı olarak DC'ler, T hücrelerinin aktivitelerini baskılayan düzenleyici T (Treg) hücrelerinin proliferasyonunu teşvik ederek T hücrelerine bağlı immün yanıtı da kısıtlamaktadırlar (Suciu vd. 2009).

2.4.4 T- lenfositleri

Treg hücreleri, yardımcı T (Th) hücreleri ve sitotoksik T lenfositleri (CTL) gibi alt popülasyonlardan oluşan T lenfositleri, adaptif bağışıklık sisteminin modüle edilmesinde kilit rol oynar (Bourhis vd. 2021). Yüksek Foxp3 ekspresyonuna sahip Treg hücreleri, anti-tümör bağışıklığını kısıtladığı bilinmektedir (Kumar, Connors ve Farber 2018). Tümör mikroçevresinden salınan CCL5 kemokini aracılığı ile Treg hücrelerinin TIME'deki yoğunluklarının artmasına sebep olmaktadır. Bununla birlikte TME'de üretilen VEGF-A ve büyüme faktörleri, Treg hücrelerini indüklemektedir (Tanaka ve Sakaguchi 2017). Th hücre alt kümeleri, çoğunlukla saf CD4 + T hücrelerinden farklılaşan Th1, Th2 ve Th17 hücrelerini içerir. Th1 ve Th2 hücreleri, çeşitli spesifik sitokinleri salgılayarak sırasıyla hücrel ve humoral bağışıklığa katılmaktadırlar (Zhang vd. 2014). CTL'ler olarak da adlandırılan CD8 + T hücreleri ise esas olarak anti-tümör bağışıklığının en kritik bileşeni olarak kabul edilir ve tümör hücrelerinin apoptozunu indükleyerek sitotoksik aktivitelere aracılık eder (Uzhachenko ve Shanker 2019). TME, CD8 + T hücre infiltrasyonu, büyümesi ve antitümör bağışıklığını TGF- β , IL-6 ve VEGF gibi sitokin salımı aracılığıyla inhibe ettiği bilinmektedir (Freeman ve Mielgo 2020).

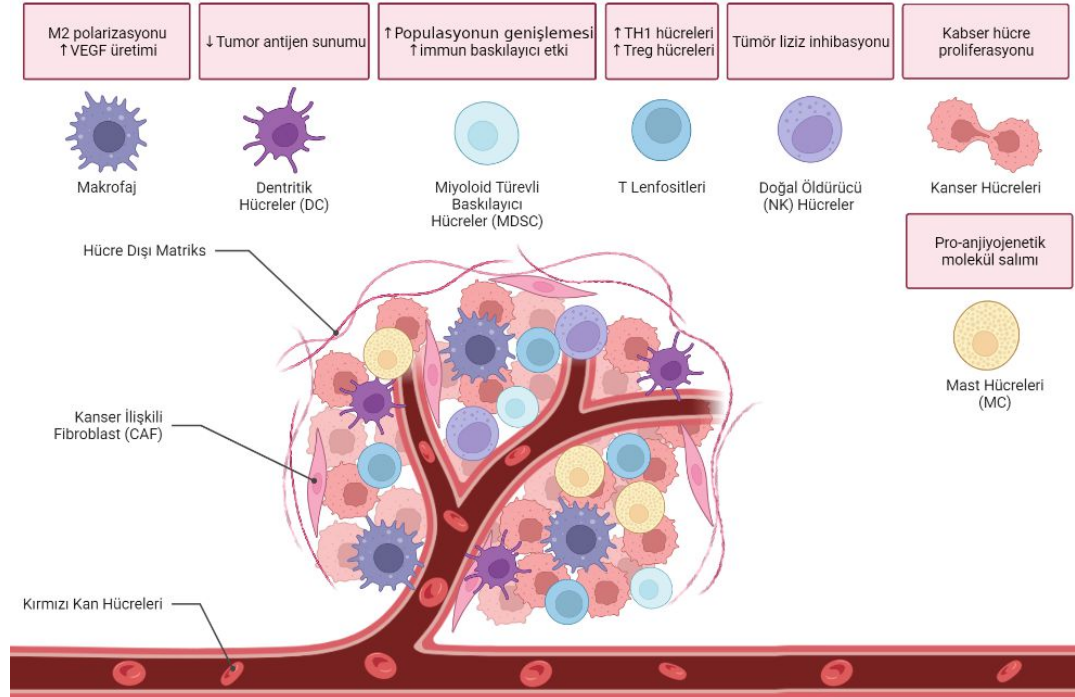
2.4.5 Miyeloid türevli baskılayıcı hücreler (MDSCs)

Kemik iliğinden köken alan MDSC'ler, TIME içindeki güçlü immüno-supresif aktiviteleri ile ünlüdür. TME'deki MDSC'ler sürekli olarak anti-enflamatuvar sitokinler, ROS ve nitrik oksit (NO) salarak kanser anjiyogenezi, invazyonu, metastazı ve bağışıklık toleransının desteklenmesine katkıda bulunur (Youn vd. 2012). IL-6, PGE2 ve TGF- β 1 ve CCL2 gibi sitokin ve kemokinleri serbest bırakan TME, MDSC'lerin ortama getirilmesini ve

oluşumunu kolaylaştırabilir ve sonuç olarak aktif T hücrelerinin anti-tümör aktivitesini baskılamaktadır (Ohshio vd. 2014).

2.4.6 Makrofajlar

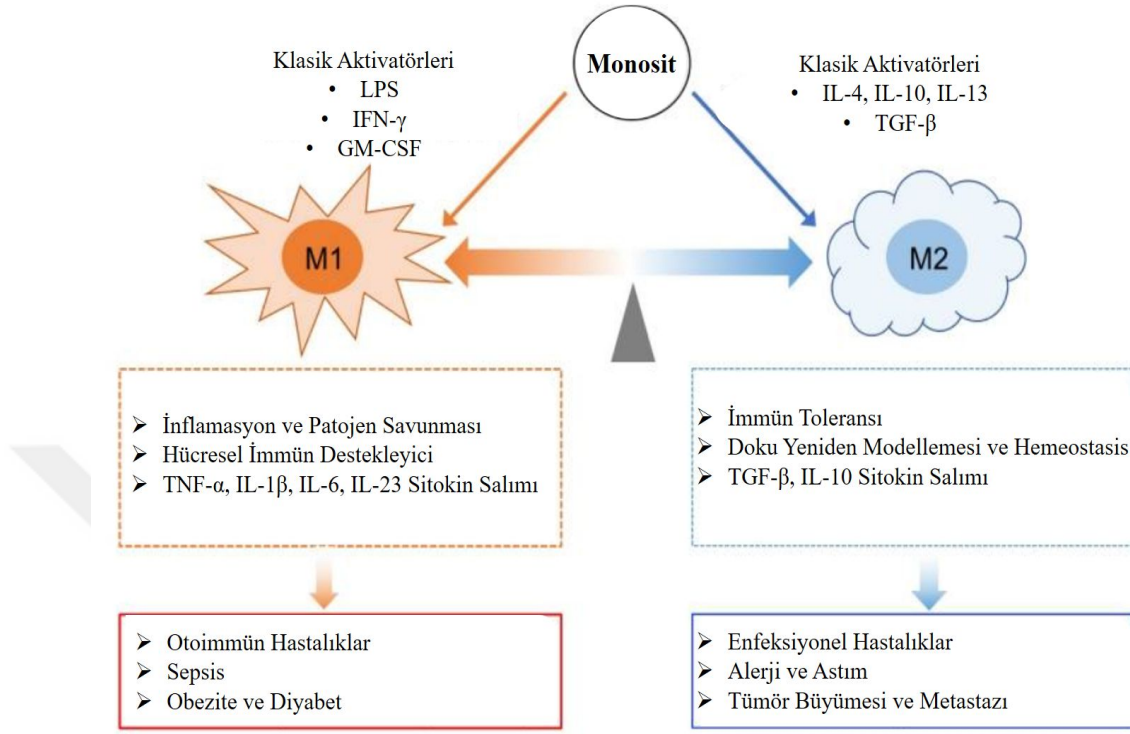
Makrofajlar oldukça plastik hücrelerdir ve bu özellikleri onların patojenlere karşı savunma, doku homeostazını düzenleme ve yara iyileşmesine yardımcı olma gibi birçok rolde etkili olmalarını sağlar (Wynn vd. 2013). TIME'nin son derece önemli olan bileşenlerinden biri olan makrofajların iki farklı fenotipi vardır, klasik olarak aktive edilmiş proinflamatuvar (M1) ve alternatif olarak aktive edilmiş anti-inflamatuvar (M2) ve bu fenotiplere olan yönelim mikroçevreden gelen ipuçlarına dayanır. TME' de bulunan anti-inflamatuvar sitokinler nedeniyle polarize olmamış makrofajlar (M0) ve M1 fenotipe sahip makrofajlar M2 fenotipe geçiş yapmaktadırlar. Böylelikle TME' de anjiyogenezi, immünite baskılanmasını, invazyonu ve metastazı desteklemektedir (Allavena vd. 2008).



2.5 Makrofaj Fenotipleri ve Kanser Hücrelerine Etkileri

Daha önce de belirtildiği gibi makrofajlar iki farklı fenotipe sahiptirler ve ortamdaki aldıkları sinyaller ile polarize olarak fenotiplerini değiştirebilirler. Proinflamatuvar makrofajlar (M1), sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon-1 aktivatörü (STAT-1), STAT3, hipoksi ile indüklenebilir faktör 1-alfa (HIF-1 α), aktivasyon proteini-1 (AP-1) ve NF- κ B sinyal transdüseri ve aktivatörü kapp B (NF- κ B) salını yapmaktadır. Ayrıca interlökin-1beta (IL-1 β), IL-6, nitrik oksit sentaz 2 (NOS2) ve tümör nekroz faktörü α (TNF- α) M1 makrofaj fenotipi için prediktif sitokinlerdir. Anti-inflamatuvar makrofajlar (M2), yüksek düzeyde yüzey adezyon proteinleri (CD163, CD206, MMP'ler, Arg-1, IL-10) ekspres ederler. Ayrıca hücre çoğalmasını destekleyen büyüme faktörlerini (TGF- β 1, PDGF, VEGF) sentezlerler. Buna ek olarak, anjiyogenez promotörü kemokinler (CXCL1, CXCL2, CXCL5) salgırlar (Stentz vd. 2004; Liu ve Segura 2020; Vishwakarma vd. 2016).

Lipopolisakkarit (LPS), interferon gama (IFN- γ) ve Granülosit Makrofaj Koloni Uyarıcı Faktörü (GM-CSF) klasik M1 polarizasyon aktivatörleri olarak bilinirken, IL-4, IL-13, IL-10 ve TGF- β ise klasik olarak M2 polarizasyon aktivatörleri olduğu bilinmektedir. M1 makrofajlar patojenlere karşı immün yanıtı güçlendirerek vücudun savunma mekanizmasını etkin kılmak için önemlidir. Diğer bir yandan, M2 polarize makrofajlar ise doku yenilenmesinde ve inflamasyon baskılanmasında büyük önem taşır. Bu iki makrofaj tipinin dengesinin bozulduğu durumlarda vücut için bazı sorunlar oluşabilmektedir. M1 makrofajların fazla yoğun bulunduğu durumlarda otoimmün hastalıklar, obezite, diyabet ve sepsise sebep olurken; M2 makrofajların yoğun olduğu durumlarda enfeksiyonel hastalıklar, alerji, astım, tümör büyümesi ve metastazına sebep olabilmektedirler (Thapa ve Lee 2019).



Şekil 2.5 Polarize makrofajların görevleri ve hemeostasisin bozulduğu durumlarda meydana getirdikleri olumsuz etkiler

2.6 Meme Kanseri - Makrofaj Platformları

Tümör-makrofaj etkileşimlerini incelemek amacı ile farklı platformlar kullanılmaktadır. Hücre kültürü platformuna örnek olarak çip üzerinde tümör teknolojisi, çok hücreli TME etkileşimlerini in vitro olarak incelemek için bir alternatif sunmaktadır. Çip üzerinde tümör sistemleri, tümör-stroma etkileşimlerini ve tümör ilişkili anjiyogeneji incelemek için yaygın olarak kullanılmaktadır (Aung vd. 2020). Aynı platformda kullanılan diğer bir teknik olan eş-kültür sistemleri, iç içe geçebilen ve birbirleri arasında biyolojik sentezlerin geçebilmesini sağlayan kuyucuklardan oluşur. Bu sayede, kanser hücrelerinin ve makrofajların biyolojik sentezlerinin birbirleri üzerindeki etkilerini incelemek amacı ile kullanılan sistemlerden biri haline gelmiştir (Wang vd. 2020). Tümör-makrofaj etkileşimleri, hücre dışı veziküller aracı etkileşimler üzerinden de incelenebilmektedir. Boyutları 50 ile 200 nm arası değişen ve çeşitli hücre tiplerinden salgılanan hücre dışı veziküller olan eksozomlar tümör-makrofaj etkileşimlerini incelemek amacı ile

kullanılmakta olan bir başka platformdur. Eksozomlar, bir nevi üretildikleri hücrelerin mRNA, miRNA, DNA parçaları ve proteinleri gibi biyoaktif moleküllerinin fosfolipid ile çevrili kargolarıdır. Bu nedenle eksozomlar, TME’deki tümör-makrofaj etkileşimlerinin incelenmesinde özellikle son zamanlarda önemli bir platform haline gelmiştir (Baig vd. 2020; Chen vd. 2021). Bunun yanı sıra, hücre-hücre etkileşimlerini güçlendirmek ve TME ortamını daha iyi taklit edebilmesi sayesinde üç boyutlu (3D) hücre kültür sistemleri de tümör-makrofaj etkileşimlerini incelemek amacı ile kullanılmaktadır (Nii, Makino ve Tabata 2020). 3D hücre kültür sistemlerine organoidler de kullanılmaktadır. Organoidler, ilgili dokunun *in-vivo* özelliklerini taklit edebilen 3D çpk hücreli *in-vitro* doku yapısıdır (de Souza ve Natalie 2018). Organoid çalışmalarına bir örnek olarak, Lim vd. (2022) hepatoselüler tümör organoidlerini matrijel içerisinde kültürlenme stratejisi sayesinde, 3D kültür sistemini biyomalzeme sistemi ile birleştirerek oluşturdukları platformda tümör-makrofaj etkileşimlerini incelemiştir. Böylelikle, tümör-makrofaj etkileşimlerini *in-vivo* şartlarına daha yakın bir ortamda incelenmesine olanak sağlamışlardır.

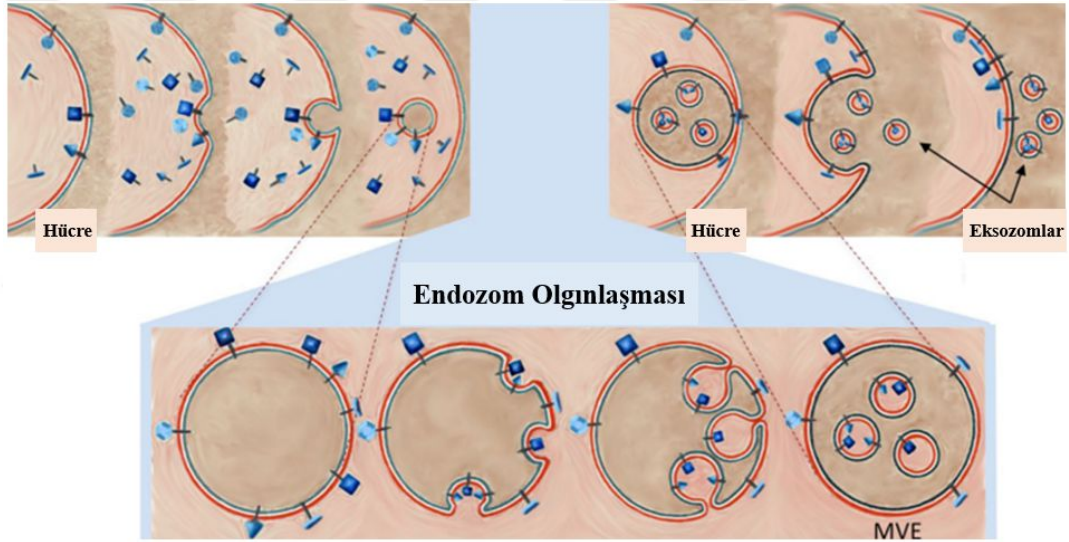
2.7 Eksozomlar ve Kanser Mikroçevresindeki Rolü

Tümör ilerlemesi, tümör ve mikro çevre arasındaki aktif ortaklıktan kaynaklanmaktadır. Bu ortaklık, etkili iletişim yolları olmadan imkânsız olurdu. Doğrudan hücreden hücreye temas, sinyal moleküllerinin salgılanması ve veziküllerin hücre dışı boşluğa salınması aracılığı ile bu iletişim sağlanmaktadır (Kucharzewska ve Belting 2013). Eksozomlar 30-200 nm çapındadır ve kök hücreler, endotel hücreleri, makrofajlar ve kanser hücreleri gibi birçok farklı hücre türü tarafından salgınır (Bondhopadhyay vd. 2021). Eksozomlar ayrıca proteinler, lipitler, DNA, mRNA, mikroRNA’lar dâhil olmak üzere birçok biyoaktif molekül taşıyıcıdır (Javeed ve Mukhopadhyay, 2017).

2.7.1 Eksozom oluşumu

Hücreler, hücre zarını içe doğru tomurcuklandırarak zara bağlı bir endozom oluşturur. Bu endozom, erken bir endozomdan geç bir endozoma olgunlaştıkça çeşitli değişikliklerden geçer. En önemlisi, endozomal membran içe doğru tomurcuklanır ve endozom içinde zara

bağlı veziküller yapmak amacı ile sıkışır ve endozom artık multivesiküler endozom (MVE) olarak adlandırılır. MVE, lizozoma gidebilir ve içeriği bozabilir veya hücre zarına gidip hücre zarıyla birleşerek, hücre dışına salındıklarında eksozomlar olarak adlandırılan içeriklerini serbest bırakabilir (Thery vd. 2002). Eksozomal zar, endozomla ilişkili zar taşıma ve füzyon proteinleri (flotilin, Anneksinler, GTPazlar), spesifik lipidler (sfingomyelin, kolesterol, seramid) ve antijen sunan hücrelerden geliyorsa MHC-II açısından zengindir. Eksozomlar ayrıca membran yüzeylerinde endozoma özgü tetraspaninler (CD9, CD63, CD81, CD82) ve MVE biyogenez ile ilgili proteinler (Alix, TSG101) içerir (Micheal vd. 2010).



Şekil 2.6 Multivesiküler endozom (MVE) aracılı eksozom oluşumu (Brinton vd. 2015)

2.7.2 Eksozomların TME' deki etkileri

Kanser hücreleri, diğer hücelere göre çok daha fazla eksozom salgılar ve bu eksozomlar kanserle ilgili çok sayıda biyoaktif molekül içerir. Bu biyoaktif moleküller, makrofajlara taşınır ve çoklu sinyal yollarının aktivitesini düzenler, böylece makrofajların fosfatidilinositol-3-kinaz (PI3K) ve AKT yolları (Han vd. 2021; Vergadi vd. 2017) yoluyla M2 fenotipine polarizasyonunu indükler. Benzer şekilde, M2 polarize makrofajların eksozomlarının, kanser hücrelerinin istila, göç ve anjiyogenez özelliklerini

arttırdığı bilinmektedir (Yang vd. 2011; Wu vd. 2021). Kanser hücrelerinden oluşan eksozomlar, fibroblastların CAF'lara farklılaşmasında da etkilidir. Tümör epitel hücrelerinin moleküler durumuna bağlı olarak tümör büyümesini, ilerlemesini ve tümör hücre invazyonunu teşvik edebilmektedirler (Brinton vd. 2015). Tümörlerin birkaç milimetre küpün ötesine büyüebilmesi için daha çok besine, oksijene ve atık uzaklaştırmaya erişimi olmalıdır. Bu ihtiyaçlarını giderebilmek amacı ile tümör hücrelerinin konak damar sistemine erişmesi ve kanı tümöre yönlendirmesi gerekir (Bergers ve Benjamin 2003). Tümör hücreleri, kan kaynağının oluşturulması için VEGF gibi pro-anjiyojenik faktörlerin artırılması gerekir. Tümör ortamında hipoksi algılandığından, karsinom hücreleri, yeterli oksijenasyonu sağlamak için sinyalleşmeyi başlatmak ve anjiyojenik faktörleri iletmek için mikro ortama eksozomlar salgılamaktadır. Tümör eksozomlarında salgılanan hipoksi kaynaklı proteinler, normal konakçı endotel hücreleri tarafından alınır. Alınan eksozomal yük, yeni tübül oluşumunu uyarır ve sonuç olarak bu alanı beslemek için bir kan damarı ağı oluşturur (Skog vd. 2008).

2.7.3 Eksozomların kanser hücrelerinin metastatik özelliklerine ve kemodirence etkileri

Birçok kanser için metastaz süreci, epitelyal-mezenkimal geçişi (EMT) gerçekleştiren tümör hücreleri tarafından başlatılır. Bu tümör hücreleri, metastaz yapabilmek için vasküler ve lenfatik kanallara göçme yeteneğine sahip olurlar. EMT geçirmiş kanser hücrelerinden salınan eksozomlar, EMT faktörlerince zengindirler ve bu eksomları bünyesine alan mikroçevredeki diğer kanser hücrelerini de EMT'ye teşvik edebilmektedirler (Jeppesen vd. 2014). Bunun yanı sıra, eksozomların kanser hücrelerinin ilaç direncine de etkileri bulunmaktadır. Tümör hücreleri heterojen bir popülasyon olduğundan, kemodirenç seviyesi tümör hücresinden tümör hücresine değişmektedir. İlaç direncinin bir mekanizması olarak, hayatta kalan tümör hücreleri, direnç özelliklerini eksozomlar yoluyla hassas hücelere ileterek kanser tedavilerinden etkilenmeyen daha büyük bir hücre popülasyonu oluşturmaktadır (Chen vd. 2014).

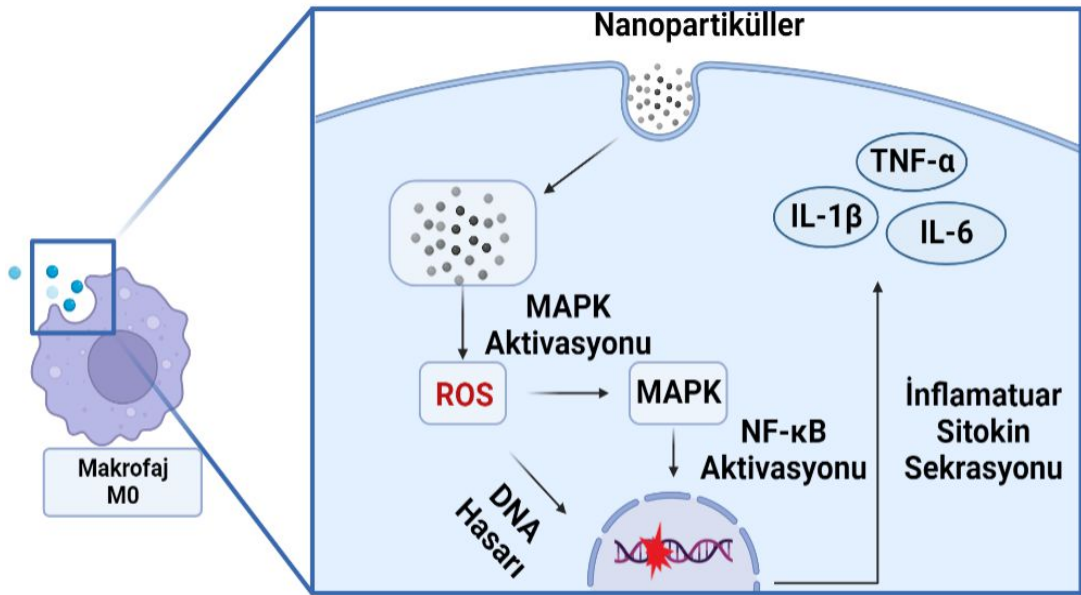
2.8 İmmünomodulatör Biyomalzemler

Daha önce de belirtildiği gibi TME yüksek oranda immünsupresif bir durumdadır ve bu da kanser hücrelerinin immünden kaçışını kolaylaştırır. Bunun aksine, bağışıklık hücrelerinin anormal bir şekilde yüksek aktivasyonu ise iltihaplanmaya, iltihaplı hastalıklara, obeziteye, otoimmün hastalıklara veya alerjik hastalıklara neden olabilir. Ayrıca, anormal inflamasyon, organ nakil reddine ve doku rejenerasyonunun engellenmesine vesile olmaktadır (Feng vd. 2019). Özetle, her sistemde olduğu gibi bağışıklık sisteminin de hemeostazı büyük önem taşır. Biyomalzeme alanındaki gelişmeler sayesinde, bağışıklık sisteminin hemeostazının bozulduğu durumlarda bağışıklık hücrelerini düzenleyen biyomalzemelere ‘immünomodulatör biyomalzemeler’ denir (Feng vd. 2019). Bu malzemeler immün baskılayıcı olarak, implantasyonlarda yabancı cisim tepkisini (FBR) ve aşırı inflamasyonu azaltmak için kullanılabilir. Örneğin, ECM tabanlı biyomalzemeler, doku uyumluluğu sayesinde doğal ve adaptif bağışıklık sistemini kontrol ederek FBR’yi azalttığı ve bununla beraber doku rejenerasyonuna katkıda bulunduğu bilinmektedir (Dziki ve Badylak, 2018). Polimerik veya protein bazlı nanopartiküller ve deselülize ECM iskeleleri gibi immün baskılayıcı biyomalzemeler aynı zamanda otoimmün hastalıkların tedavisinde ve rejeneratif tıpta da kullanılabilir (Zhang vd. 2018; de Bittencourt Jr vd. 2007). Bağışıklık uyarıcı biyomalzemeler ise kanser tedavisinde, virüs ve bakteri enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılmaktadır (Movva vd. 2022). Shield vd. 2020 yılında yayınladıkları bir çalışmada iki poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) arasına IFN- γ bulunduran polivinil alkol ile makrofajların hücre zarına yapışan bir sandviç modeli oluşturduklarına değinmiştir. Bu sandviç modeli içerisindeki bağışıklık uyarıcı IFN- γ sitokini sayesinde makrofajların pro-inflamatuar fenotipe polarizasyonunu modüle etmektedir.

2.8.1 İmmünomodulatör nanopartiküller

İmmünomodulatör nanopartiküller, makrofajların fenotipini düzenlemek için oldukça etkili olan düzenleyici biyomalzemelerdendir. Çünkü nanopartiküller vücuda veya hücre kültürüne girdikten sonra, makrofajlar yabancı cisim olarak tanımladıkları

nanopartikülleri yüzey opsonizasyonu nedeniyle endositoz veya fagositoz yoluyla kendi bünyelerine alabilirler (Reichel vd. 2019). Nanopartiküllere makrofaj tepkileri, doz, boyut, nanopartikül bileşimi ve nanopartikül yüzey özellikleri gibi belirleyicilere bağlı olabilir. Örneğin; Titanyum Nanopartiküller (Ti-NP'ler), Çinko Oksit Nanopartiküller (ZnO-NP'ler), Süper Paramanyetik Demir Oksit Nanopartiküller (SPION'lar) ve Paladyum Nanopartiküller (Pd-NP'ler) gibi metalik nanopartiküller, mitojenle aktive olan protein kinazlara (MAPK) veya toll benzeri reseptörlere (TLR) bağlı olarak makrofajları M1 fenotipine polarize ederler (Scherbart vd. 2011; Wang vd. 2017; Kodali vd. 2013; Gurunathan vd. 2021; Ma vd. 2019). MAPK yolağına bağlı makrofaj polarizasyonunda, hücre içerisine alınan nanopartiküller hücrede oksijen stresine (ROS) sebep olur. Oluşan ROS, MAPK yolağını aktif eder ve NF- κ B aktivasyonunu sağlar. Devamında IL-6, TNF- α ve IL-1 β gibi pro-inflamatuar sitokinlerin salımına sebep olmaktadır. Bununla beraber hücre içerisinde oluşan ROS seviyesine bağlı olarak hücre DNA hasarı artmasıyla beraber hücreyi ölüme götürebilmektedir (Lenders vd. 2020). TLR' ye bağlı polarizasyonda ise, hücre içerisine alınan nanopartiküller endozomdaki TLR2, TLR7, TLR8 ve TLR9 gibi reseptörleri aktive eder. TLR aktivasyonu hücre ile içerisinde NF- κ B üretilmesi ve bununla beraber inflammatuar sitokinlerin ortama bırakılması sağlanır (Lenders vd. 2020).



Şekil 2.7 Nanopatiküllerin MAPK yolağı aracılı makrofaj polarizasyonu

Bunun yanı sıra, immünomodulator nanopartiküller çeşitli reseptörler ile modifiye edilebilmektedir ve içlerine kanser ilaçları, inhibitörler, uyarıcılar gibi çeşitli biyoaktif moleküller ilave edilebilmektedir. Bu sayede bu nanopartiküller, ilaç dağıtım sistemlerinde spesifik hücre hedefli ilaç iletimi sağlarken aynı zamanda TME' deki immünespresif ortamı da sağlayabilir (de Bittencourt Jr vd. 2007; Noh vd. 2017; Zhang vd. 2018; Rodell vd. 2018). İmmün baskılayıcı olarak kullanılan nanopartiküller ise makrofajları genellikle M2 fenotipine indükleyebilen lipozomal, polimerik, dentrimer ve protein bazlı nanopartiküllerdir (Rajan vd. 2018).



3. KAYNAK ÖZETLERİ

İmmünomodulator biyomalzemeler, kanser mikroçevresinde oluşan baskılanmış bağışıklık sistemi aktivitesini canlandırmak için oldukça önemlidir. Bu amaç için kullanılan çeşitli immünomodulator biyomalzemeler, immünomodulator nanopartiküller ve pro-inflamatuar makrofajlardan elde edilen eksozomları içeren çalışmalar aşağıda özetlenmiştir.

Shields vd. (2020) yaptıkları bir çalışmada makrofaj yüzeylerine sağlam bir şekilde yapışabilen ve hücrel fenotipleri düzenleyebilen ‘sırt çantası’ olarak adlandırılan bir immünomodulator rapor etmişlerdir. İki poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) arasına IFN- γ bulunduran polivinil alkol ile sandviç modeli oluşturulmuştur ve bu sandviçin bir yüzeyi aldehit ile modifiye edilen hyalüronik asit ve poli(alilamin) hidroklorid (HA-Ald/PAH) ile kaplanmıştır. Bu kaplama sayesinde oluşturulan sırt çantası, makrofaj hücrelerinin yüzeyine yapışarak sürekli sitokin salımı sayesinde makrofajları M1 polarizasyonuna yönlendirdiğini rapor etmişlerdir. Ek olarak, in vivo çalışmalarda sırt çantası bulunduran makrofaj hücreleri tümör mikroçevresinden daha az etkilenecek M2 makrofaj polarizasyonunu baskıladığı görülmüştür. Genel olarak bu çalışma kanser ve bulaşıcı hastalıklarda makrofajların fenotipini düzenleyebilmek için bir strateji sunar.

Rodell vd. (2018), makrofaj fenotipini düzenlemek amacı ile toll benzeri reseptör (TLR7 ve TLR8) agonisti olan R848, β – siklodekstrin nanoparçacıkları (CDNP-R848) arasında konak – konuk reaksiyonları yardımı ile modifiye edilmiştir. M2 tümör ilişkili makrofajların TLR aktivasyonunu indükleyen CDNP-R848 makrofajları M1 polarizasyonlarını sağladığı rapor edilmiştir. Ek olarak, in vivo çalışmalarda da tümör mikroçevresinden etkilenecek immünsupresif makrofajların anti-tümörjenik aktivitelerini arttırdığı ve bununla beraber kanser büyümesini ve metastazını baskıladığı anlatılmaktadır. Kısaca, rasyonel olarak tasarlanmış ilaç-nanopartikül kombinasyonlarının, kanser immünoterapisi için tümörle ilişkili makrofajları verimli bir şekilde modüle etme yeteneğine sahip olduğu gösterilmiştir.

Daha önceden de belirtildiği gibi metastaz, meme kanseri de dahil olmak üzere birçok tümör tipinde kansere bağlı ölümlerin büyük bir kısmından sorumludur. EMT, metastazın ortaya çıkması ve ilerlemesi için itici güçtür. Wang vd. (2021), immünomodülatör bir nanomalzeme olan paladyum nanoplakaların (PdPL) hem birincil tümörlere hem de metastatik tümörlere etkilerini incelemiştir. Mekanistik araştırmalar, TGF- β sinyalinin kısmen de olsa inhibisyonundan dolayı PdPL tedavisi meme kanseri hücrelerinde EMT'nin baskılandığını ortaya çıkardı. Epitelyal ve endotelyal hücreler arasındaki sıkı bağlantıların bütünlüğü için gerekli olan oklüzyon kaybı, hücreden hücreye adezyonun kaybolmasına ve böylece güçlendirilmiş EMT'ye yol açabilir (Zihni vd. 2016). PdPL tedavisi 4T1 hücrelerindeki EMT ilişkili genleri baskılayarak mezenkimal-epital geçişi (MET) yeniden programlanmasını sağlar. Özet olarak, PdPL'nin EMT sinyalini inhibe ederek metastazı önemli ölçüde engellediği ortaya koyuldu ve böylece PdPL'nin meme kanseri metastazını tedavi etmek için terapötik bir ajan olarak umut verici potansiyelini gösterdi. Ek olarak, Gurunathan vd. (2021) bir çalışmada ise paladyum nanopartiküllerin insan lösemi monositik hücrelerinde (Thp-1) eksozom biyogenezi üzerindeki etkisini ve Thp-1 hücrelerinde salınımını ele almayı amaçladı. PdNP tedavisinin Thp-1 hücreleri üzerinde oksidatif stres, endoplazmik retikulum stresi, apoptoz ve immünomodülasyonu indükleyerek eksozomların biyogenezi ve salınımını arttırdığını ortaya koymuşlardır. TSG101, CD9, CD63 ve CD81'in ekspresyon seviyeleri, PdNP ile tedavi edilen hücrelerde kontrol hücrelerine göre önemli ölçüde daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Bunun yanı sıra, sitokin ve kemokin seviyeleri, PdNP ile muamele edilmiş Thp-1 hücrelerinden izole edilen eksozomlarda, kontrol hücrelerinden izole edilenlere göre önemli ölçüde daha yüksek çıktığı rapor edilmiştir. Bu sonuçlar, çeşitli terapötik uygulamalar ve eksozom üretimini iyileştirmek için makul bir yaklaşım önermektedir.

Eksozomların ilaç dağıtım sistemlerini güçlendirmek ve ilaç etkinliğini arttırmak amacı ile kullanıldığı çalışmalar da literatürde mevcuttur. Örnek olarak, Sha vd. (2020) üçlü-negatif meme kanseri (TNBC) kemoterapisi için makrofaj türevli eksozom kaplı bir poli (laktik-ko-glikolik asit) nanopartikülü geliştirmişlerdir. Tümör spesifik bir nanopartikül oluşturmak amacı ile eksozom yüzeyi TNBC hücreleri tarafından yüksek oranda eksprese edilen mezenkimal-epitelyal geçiş faktörünü (c-Met) hedefleyen bir peptid ile modifiye

edilmiştir. Nanopartikülün iç çekirdeğini oluşturan poli (laktik-ko-glikolik asit) anti kanser ilacı olan doksorubisin ile kombine edilmiştir. Böylece, tümör hücreleri tarafından alınacak olan eksozomlar, lizozomdaki asitlik sebebi ile eksozom kolayca ayrılacak ve kanser hücrelerinin çekirdeklerinde birikerek hücre apoptozunu indükleyecek olan kapsüllenmiş doksorubisini serbest bırakacaktır. Elde edilen sonuçlar, eksozom kaplı nanoparçacıkların, doksorubisinin hücre alım verimliliğini ve antitümör etkinliğini önemli ölçüde geliştirdiğini gösterdi. In vivo aşamasında ise, nanotaşıyıcıların yüksek tümör hedefleme etkinliği sergilediğini, tümör büyümesinin inhibisyonunun artmasına ve yoğun tümör apoptozu indüklemesine yol açtığını gösterdi. Bu sonuçlar, tasarlanmış makrofaj eksozom kaplı nanopartiküllerin, TNBC tedavisi için umut verici bir ilaç dağıtım stratejisi olduğunu gösterdi.

Yapılan bu çalışmalarda, tümör immün mikroçevresi elemanlarından biri olan makrofajların tümör mikroçevresinden etkilenerek pro-inflamatuar fenotipini kaybetmesini engellemek, dolayısıyla TME'deki bağışıklık tepkisini canlı tutmak amacı ile immünomodülatör nanopartiküller ve makrofaj türevli eksozomların kullanımından bahsedilmiştir. Bunun yanı sıra, eksozomların nanopartiküller ile kombinasyonu sayesinde bir nevi ilaç kargosu olarak kullanılarak terapötik etkileri incelenmiştir. Ancak, immünomodülatör nanopartiküller ile indüklenmiş ve çeşitli fenotipe sahip makrofajlardan elde edilen eksozomların meme kanseri mikro-dokuları üzerindeki etkileri literatürde karşılaştırmalı olarak ele alınmamıştır. Bunun yanı sıra, paladyum ile indüklenmiş makrofaj eksozomlarının ve HUVEC, phDF gibi tümör mikroçevresinde bulunan farklı tip hücrelerin, tümör mikro-dokuları üzerindeki metastatik, apoptotik, EMT ve kemoresistans özelliklerine etkileri, çok-hücreli mikro-dokuları oluşturarak incelenmesi bu tez çalışmasına özgün değer katmaktadır.

4. MATERYAL ve YÖNTEM

4.1 Materyal

Hücre kültürü çalışmalarında hücrelerin çoğaltıldığı ve deneylerin yapıldığı steril doku kültür kapları Sarstedt, Almanya'dan ve besiyeri olarak kullanılan DMEM-HG (Dulbecco's Modified Eagle's Medium-high glucose), DMEM-F12 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium-F12) besiyeri katkısı olarak kullanılan L-glutamin, penisilin/streptomisin (P/S), fetal sığır serumu (FBS) ve hücrelerin pasajlanması işleminde kullanılan DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) ve tripsin/EDTA çözeltisi Thermo Fisher firmasından temin edildi. Hücre çalışmaları, laminer akışlı steril kabinde (Heal Force, Türkiye) yapıldı ve hücre kültürleri 37°C, %5 CO₂, %95 nem ortamını sağlayan bir karbondioksitli inkübatörde (Panasonic, Japonya) gerçekleştirildi.

Makrofajların polarizasyonunu indüklemek amacı ile kullanılan nanopartiküller (Zn-Ni-FeO, Cu(II)O, Pd, Pt, Au, GO, CdSeS/ZnS kuantum noktacıkları) Sigma-Aldrich (Amerika) firmasından temin edildi. Ek olarak, yine makrofaj polarizasyonu sağlamak için LPS (Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Biyoteknoloji ve Biyogüvenlik AD.), interferon gama (IFN- γ) (Sigma-Aldrich, Amerika) ve interlökin-10 (IL-10) (Peprotech) kullanıldı.

Nanopartiküller ile indüklenen makrofajların yaşayabilirliğini gözlemek için kalsein-AM (Molecular Probes, Thermo Fisher, UK) boyaması yapıldı. Ölü hücreleri gözlemek için ise etidyum homodimer-1 (ethd-1, Molecular Probes, Thermo Fisher) boyaması yapıldı. Hücreler, Leica DMIL (Almanya) floresan mikroskobu ile gözlemlendi. Hücre proliferasyonunu incelemek amacıyla XTT [2,3-bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sülfenil)-2H-tetrazolyum-5-karboksanilid] hücre proliferasyon kiti (Biological Industries, USA) kullanıldı ve ölçümler UV-spektrofotometre (Multiskan Sky Microplate Spectrophotometer, Thermo Fisher) cihazında alındı.

Gen ekspresyon çalışmasında RNA izolasyonu için toplam RNA izolasyon kiti (GeneDireX, ABD) ve tamamlayıcı DNA (cDNA) sentezi için iScript™ cDNA sentez kiti (Bio-Rad, ABD) kullanıldı. Ters transkriptaz-kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (RT-qPCR) için kullanılan primerler (Çizelge 4.1) Oligomer Biyoteknoloji (Türkiye) firmasından temin edildi ve RT-qPCR reaksiyonu termal döngüleyici (Bio-Rad CFX96 cihazı, ABD) ile yapıldı.

Çizelge 4.1 Kullanılan belirteç genlerin primer sekansları

Genler	Primerler (F: 5'-3')	Primerler (R: 5'-3')
CD64	ACCTGAGTCACAGCGGCATCTA	TGACACGGATGCTCTCAGCACT
CD163	GGCTAGACGAAGTCATCTGCAC	CTTCGTTGGTCAGCCTCAGAGA
STAT-1	GCCTCTCATTGTCACCGAAGAAC	TGGCTGACGTTGGAGATCACCA
STAT-6	ACGACAACAGCCTCAGTGTGGA	CAGGACACCATCAAACCACTGC
MMP2	AGCGAGTGGATGCCGCCTTAA	CATTCCAGGCATCTGCGATGAG
MMP9	GCCACTACTGTGCCTTTGAGTC	CCCTCAGAGAATCGCCAGTACT
E-kadherin	GCCTCCTGAAAAGAGAGTGGAAAG	TGGCAGTGTCTCTCCAAATCCG
N-kadherin	CCTCCAGAGTTTACTGCCATGAC	GTAGGATCTCCGCCACTGATTC
p53	GAGGTTGGCTCTGACTGTACC	TCCGTCCCAGTAGATTACCAC
GAPDH (Fare)	CATCACTGCCACCCAGAAGACTG	ATGCCAGTGAGCTTCCCCTTCAG
GAPDH (İnsan)	GAACGGGAAGCTTGTCATCAA	ATCGCCCCACTTGATTTGG

Nanopartiküller ile indüklenmiş makrofajların sitokin seviyelerini ölçmek için TNF- α ELISA kiti (Bioassay Technology Laboratory, Çin) kullanıldı.

Nanopartiküllerin makrofajlar tarafından hücre içerisine alındığını doğrulamak için makrofaj hücrelerinden Reichert OM-U3 (Austria) kullanılarak kesitler alındı ve geçirimli elektron mikroskobu (TEM, JEOL JEM 100CX II Tokyo, Japan) aracılığı ile incelendi.

Farklı fenotipe sahip makrofajlardan toplanan atık besiyerleri, eksozom izolasyonu için ultrasantrifüj cihazına (Himac CP100WX, Hitachi, Amerika) alındı. Ardından elde edilen eksozomların karakterizasyonu için bisinkoninik asit (BCA) tahlil kiti (Thermo Fisher Scientific, Amerika) ve geçirimli elektron mikroskobu kullanıldı.

İlaç çalışmalarında mikro-dokuları oluşturmak için hücre ekimlerinde ultra az yapışır plakalar (ULAP) (Corning, ABD) ve 5-Fuluorourasil antikanser ilacı kullanıldı.

4.2 Yöntem

Bu bölümde fare makrofaj (Raw 264.7), insan meme kanseri (MCF-7), insan göbek kordonu bağı endotel hücreleri (HUVEC) ve insan primer dermal fibroblast (phDF) hücrelerinin çoğaltılması, pasajlanması, nanopartikül indüksiyonu, mikro-doku oluşumları, sitokin seviyesi ölçümü, ilaç uygulaması, sitotoksosite ve gen ekspresyon çalışmaları hakkında metodolojik bilgi sunulmuştur.

4.2.1 Hücre kültürü

Raw 264.7 ve HUVEC hücreleri hacimce %1 P/S ve %10 FBS içeren DMEM-HG içerisinde; MCF-7 hücreleri hacimce %1 P/S ve %20 FBS içeren DMEM-HG içerisinde; phDF hücreleri hacimce %1 P/S ve %10 FBS içeren DMEM-F12 içerisinde 37 °C ve %5 CO₂ içeren ortam şartlarında inkübe edildi. Hücreler bağıl bolluğa gelinceye kadar 2-3 günde bir taze besiyeri değişimi yapılarak kültüre devam edilmiştir.

4.2.2 Makrofaj polarizasyonu için nanopartiküllerin hazırlanması

Katı halde stoklanan nanopartiküllerden (Zn-Ni-FeO, Cu(II)O, Pd, Pt) hassas terazide 1 mg tartılıp sterilizasyon için bir saat boyunca UV altında bekletilmiştir ve 1 ml ultra saf su içerisinde resüspanse edilerek 1 mg/ml çalışma stoğu hazırlanmıştır. Sıvı nanopartiküller (Au, GO, CdSeS/ZnS kuantum noktacıları) ise istenen dozlarda (10 µg/ml ve 100 µg/ml) besiyeri içerisinde kullanılmaya hazır hale getirilmiştir.

4.2.3 Makrofaj polarizasyonu için nanopartikül uygulaması

Yaklaşık %80-85 bağıl bolluğa ulaştığı gözlemlenen 24 kuyucuklu plakalara ekilmek amacı ile hücreler tripsinize edilmiştir. Bu amaçla, doku kültür kaplarında kültür olan hücrelerin atık vasatı alındı ve tripsini inhibe eden serumu ortamdan uzaklaştırmak için hücreler, 2-3 kez 10 mL DPBS ile yıkanmıştır. Ardından kültür kabına 1 ml % 0,25 Tripsin-EDTA çözeltisi eklendi ve hücrelerin kültür kabı yüzeyinden ayrılması için 37°C'de 4-5 dakika inkübe edilmiştir. Mikroskop ile hücrelerin yüzeyden kalktığı gözlemlendikten sonra hücreler üzerine 4 mL serum içeren besiyeri eklenerek tripsin aktivitesi inhibe edilmiştir. Süspansiyon halindeki hücreler pipetleme yapıldıktan sonra santrifüj tüpüne alınarak 1200 devir/dakika hızda 5 dakika süreyle santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra süpernatant atılmıştır. Oluşan hücre pelleti üzerine 1 mL tam besiyeri eklenmiş ve hemositometre ile hücre sayımı yapıldıktan sonra içerisine besiyeri ilave edilmiş 24 kuyucuklu plakalara istenilen hücre yoğunluğunda hücre ekimi yapılmıştır. Ardından ekilen hücreler, 37°C ve %5 CO₂ içeren ortam şartlarında bir gece inkübe edilmiş ve devamında 7 farklı nanopartikül (Zn-Ni-FeO (<100 nm), Cu(II)O (<50 nm), Pd (<25 nm), Pt (<50 nm), GO, Au (5 nm), CdSeS/ZnS kuantum noktacık (QD) (3 nm)) iki dozda (10 µg/ml ve 50 µg/ml) makrofaj hücrelerine eklenmiştir. Ayrıca, kontrol gruplarına makrofajları M1 polarizasyonuna yönlendirdiği bilinen LPS (200 ng/ml) ve IFN-γ (20 ng/ml) eklenmiştir. M2 polarizasyon kontrolü olarak da makrofajları M2 polarizasyonuna yönlendirdiği bilinen IL-10 (20 ng/ml) eklenmiş ve hücreler iki gün boyunca 37°C ve %5 CO₂ içeren ortam şartlarında bir gece inkübe edilmiştir. 2 gün sonrasında hücrelerin mikroskop görüntüleri alınmıştır.

4.2.4 XTT testi: Nanopartiküller ile polarizasyonu sağlanmış makrofajların hücre proliferasyonu

Zn-Ni-FeO, Cu(II)O, Pd, Pt, GO, Au, CdSeS/ZnS kuantum noktacık (QD) nanopartiküllerinin iki farklı dozu ile 2 gün boyunca indüklenmiş makrofaj hücrelerinin çoğalma kapasiteleri yapılan XTT testi ile gözlemlenmiştir. Bu veriler ışığında sonraki aşamalarda analizler için seçilen paladyum nanopartikülleri için iki zaman noktasında (2. gün ve 5. gün) proliferasyon farkını görmek için bir XTT testi tekrarlanmıştır.

Bu amaçla, 2. ve 5. gün olarak belirlenen zaman noktalarına ulaşıldığında sadece metabolik olarak aktif bulunan hücrelerde Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat'a (NADPH) bağlı dehidrogenaz enzimleri aracılığı ile XTT tetrazolyum bileşiğinin hücre kültür ortamında çözünür turuncu renkli formazan kristallerine indirgenmesi prensibine dayanan kolorimetrik hücre canlılığı ve proliferasyonu tespit yöntemi kullanılmıştır.

96-kuyucuklu plaka içerisine kuyucuk başına 10.000 olacak şekilde Raw 264.7 hücreleri ekilmiştir. Nanopartiküller 37°C ve %5 CO₂ içeren ortam şartlarında bir gece inkübe edilmiştir. Nanopartikül uygulaması 4.2.1.3 bölümünde belirtildiği gibi yapıldı. Belirlenen zaman noktalarında, örneklerin bulunduğu kuyucuklardaki besiyeri uzaklaştırılmış ve DPBS ile yıkama yapıldıktan sonra örnekler 100 µl taze besiyeri ilavesi yapılmıştır. Reaksiyon çözeltisi 5 mL XTT reaktifine 0,1 mL aktivasyon çözeltisi olacak şekilde hazırlandı ve her bir örneğin bulunduğu kuyucuklara hazırlanan çözeltilerden 50 µl ilave edilerek 37°C'da %5'lik CO₂ içeren inkübatörde 2 saat inkübasyon sağlanmıştır. Ardından, renk değişiminin tamamlandığı gözlemlenen örnekler üzerinden besiyeri-XTT reaksiyon çözeltisini içeren süpernatant toplanmış ve yeni bir 96-kuyucuklu plakaya aktararak spektrofotometre cihazı ile 490 nm dalga boyunda ölçümler kaydedilmiştir.

4.2.5 Canlı/ölu testi

Önceden belirlenen zaman aralıklarında (2. gün ve 5. gün) makrofaj polarizasyonu için kullanılan PdNP'lerinin Raw 264.7 hücreleri üzerinde oluşturabileceği sitotoksik etki ve morfolojik değişiklikleri yapılan Canlı/Ölü testi ile incelenmiştir.

Bu amaçla, 2. ve 5. gün olarak belirlenen zaman noktalarına ulaşıldığında canlı/ölu kit protokolü uygulanarak canlı hücreler için Kalsein-AM ve ölu hücreler ethd-1 boyaması yapılmıştır. Canlı hücreler, Kalsein-AM üzerindeki asetoksimetil ester grubu yağda çözünür karakterde olduğundan dolayı floresan olmayan kalseinin, canlı hücrelerde bulunan esterazlar tarafından asetoksimetil ester grubunun hidroliz olması ile yağda

çözünemeyen bir karakter kazanması ve yeşil floresan kalseine dönüştürülmesi prensibine dayanan yöntem ile gözlemlenmiştir. Ölü hücreler ise, canlı hücreler tarafından geçirgen olmayan nükleik asit boyası ethd-1'in, ölü hücrelerin membranlarından geçerek DNA'larına bağlanması ile çekirdeklerinde lokalize olarak kırmızı floresan renk yayması prensibine dayanan mekanizma ile gözlemlenmiştir.

96-kuyucuklu plaka içerisine kuyucuk başına 10.000 hücre olacak şekilde Raw 264.7 hücreleri ekilmiştir. Örnekler 37°C ve %5 CO₂ içeren ortam şartlarında bir gece inkübe edilmiştir. PdNP uygulaması 4.2.1.3 bölümünde belirtildiği gibi yapıldı. Belirlenen zaman noktalarında, örneklerin bulunduğu kuyucuklardaki besiyeri uzaklaştırılmış ve DPBS ile yıkama yapılmıştır. Canlı hücreleri boyamak için 4 µM Kalsein-AM ve ölü hücreleri boyamak için 10 µM Ethd-1 reaktifleri DPBS içerisinde hazırlanarak örneklerin olduğu kuyucuklara eklenmiştir. Örnekler, 37°C'de %5'lik CO₂ içeren inkübatörde 5 dakika inkübe edildikten sonra floresan mikroskobu kullanılarak canlı hücreler 488 nm dalga boyunda (yeşil floresan) ve ölü hücreler 527 nm dalga boyunda (kırmızı floresan) gözlemlenmiştir.

4.2.6 Nanopartikül indüklü makrofajların gen ekspresyon analizleri

RT-qPCR, farklı nanopartikül ve dozlarının makrofajlar üzerinde polarizasyon etkilerini görebilmek için M1 ve M2 makrofaj belirteç genleri üzerindeki etkilerini incelemek amacı ile uygulanmıştır.

Bu amaçla, 24-kuyucuklu plakalara Raw 264.7 hücreleri 350.000 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekilmiş ve bir gece boyunca 37°C ve %5 CO₂ içeren ortam koşullarında inkübe edilmiştir. Nanopartikül uygulamaları 4.2.1.3 bölümünde belirtildiği gibi yapılmış ve 2 gün boyunca 37°C ve %5 CO₂ içeren ortam koşullarında inkübe edilmiştir. İnkübasyon periyodunun ardından RNA izolasyon kitindeki talimatlar takip edilerek iki tekrarlı olacak şekilde hazırlanan örneklerden toplam RNA izole edilmiştir. Bu amaçla, hücre lizisi sağlamak için örnek başına 1 mL RiboEx reaktifi eklenerek homojenizasyon sağlanıncaya kadar pipetleme yapılmış ve oda sıcaklığında 5 dakika inkübasyon

sağlanarak nükleoprotein komplekslerinin tamamen ayrışmasına izin verilmiştir. Ardından homojenize edilen örnekler ependorflara aktararak istenmeyen hücre dışı materyallerin ve yüksek moleküler ağırlıklı DNA'ların çökmesini sağlamak amacı ile 12.000 x g'de 10 dakika santrifüj işlemi yapılmıştır. RNA'ları içeren süpernatantlar yeni ependorflara aktararak hacimce 1 mL RiboEx başına 0,2 mL olacak şekilde kloroform ilavesi yapılmış ve pipetleme işleminin ardından örnekler 12.000 x g'de 15 dakika santrifüjlenmiştir. Şeffaf süpernatant yeni bir ependorfa aktararak hacimce 1:1 olacak şekilde RBE reaktif eklenmiş ve pipetlemenin ardından örnekler mini spin kolonlara aktarılmıştır. 10.000 x g'de 30 saniye santrifüjleme yapılarak RNA'ların silika membranlara bağlanması sağlanmıştır. Daha sonra sırasıyla SVI ve RNW tamponu ile yıkama yapılarak membrandaki RNA'larda bulunabilecek kontaminantlar uzaklaştırılmıştır. Son aşamada, nükleaz içermeyen su ilavesi ile RNA'ların silika membranlardan elüsyonu gerçekleştirilmiştir. İzole edilen RNA'ların konsantrasyonları NanoDrop spektrofotometre cihazı kullanılarak ölçülmüştür.

Elde edilen RNA konsantrasyonlarından cDNA sentezi için baz alınacak konsantrasyon miktarı hesaplanmıştır ve cDNA sentez kitinin talimatları uygulanarak izole edilen RNA'lardan cDNA sentezlenmiştir. Kısaca, her örnek için total hacim 10 µL olacak şekilde 5 µL 5x iScript Reaction Mix eklenmiştir. Ardından izole edilen RNA'lar en fazla 1 µg konsantrasyonda olacak şekilde ilave edilerek nükleaz içermeyen su ile gerekli olan seyreltmeler yapılmış ve termal ısıl döngüleyici kullanılarak cDNA'ların sentezi tamamlanmıştır.

cDNA sentezinin ardından RT-qPCR tekniğine dayanan gen ekspresyonu analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, M1 fenotip belirteçleri olarak CD64 ve STAT-1, M2 fenotip belirteçleri olarak CD163 ve STAT-6 genleri analiz edilmiştir.

4.2.7 ELISA testi ile sitokin analizi

Makrofajlara uygulanan çeşitli nanopartiküller ve dozlarının taranması sonucu elde edilen XTT testi ve RT-qPCR sonuçlarına dayanarak Zi-Ni-FeO nanopartikülleri ve Pd

nanopartikülleri dışındaki nanopartiküller ile devam edilmemiştir. Tarama sonucu seçilen bu iki nanopartikül ile indüklenen makrofajların ürettikleri TNF- α sitokin salımının incelenmesi amacı ile ELISA testi uygulanmıştır.

Bu amaçla, 96-kuyucuklu plakalar içerisine kuyucuk başına 10.000 hücre olacak şekilde Raw 264.7 hücreleri ekilmiştir. Örnekler, 37°C ve %5 CO₂ içeren ortam şartlarında bir gece inkübe edilmiştir. PdNP ve Zi-Ni-FeO nanopartiküllerin uygulaması 4.2.1.3 bölümünde belirtildiği gibi yapılmış ve 2 gün boyunca 37°C ve %5 CO₂ içeren ortam koşullarında inkübe edilmiştir. Devamında ELISA kitindeki protokol talimatları takip edilmiştir. Bu amaçla, kullanılacak standartlar seri seyreltme yapılarak hazır hale getirilmiştir. İnkübasyon süresi tamamlanan Raw 264.7 hücrelerinin besiyerleri toplanarak 3000 rpm'de 3 dakika boyunca santrifüje bırakılmıştır. ELISA plakasının içerisine standart kuyucuklarına 50 μ l standartlar, örnek kuyucuklarına ise 40 μ l hücre besiyerleri ve üzerine 10 μ l TNF- α antikoru eklenmiştir. Devamında bütün kuyucuklara 50 μ l streptavidin-HRP solüsyonu eklenmiş ve plakanın üzeri kapatılıp 1 saat boyunca 37°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında kuyucuklardan solüsyonlar uzaklaştırılmış ve üç kez 350 μ l yıkama tamponu ile kuyucuklar yıkanmıştır. Kuyucuklara 50 μ l substrat A ve 50 μ l substrat B solüsyonları eklenmiştir. Plaka 10 dakika boyunca karanlıkta ve oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Reaksiyonu durdurmak için kuyucuklara durdurucu solüsyondan 50 μ l eklenmiş ve sarı renkten mor renge geçiş gözlemlenince spektrofotometrede 450 nm'de absorbans değerleri alınmıştır.

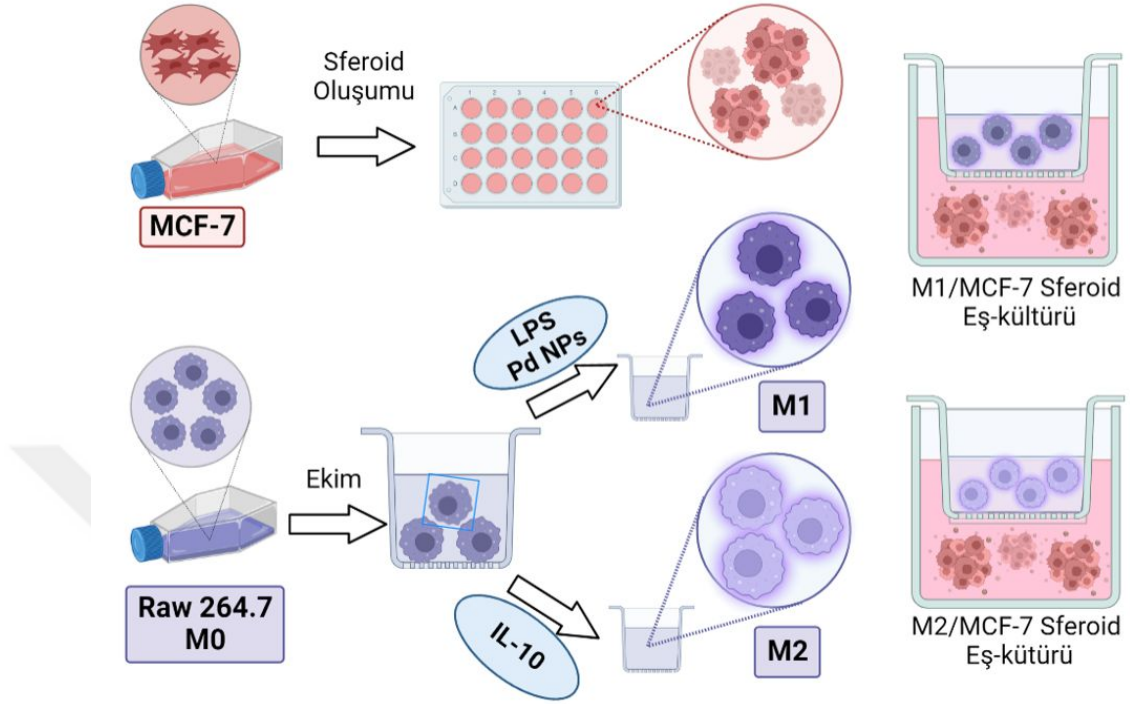
4.2.8 Makrofajların nanopartikül alımının TEM ile gözlemlenmesi

Nanopartiküllerin makrofajlar tarafından hücre içerisine alındığını doğrulamak için makrofaj hücrelerinden kesitler alındı ve TEM aracılığı ile incelenmiştir. Bu amaç doğrultusunda daha önce belirtildiği gibi nanopartiküllerle indüklenen Raw 264.7 hücreleri, bağıl bolluğa ulaşana kadar T75 steril doku kültür kaplarında kültürlenmiştir. Daha sonra hücreler tripsin/EDTA ile kültür yüzeyinden kaldırılarak santrifüj tüpüne aktarılmış ve 1200 rpm'de 5 dakika santrifüjlenmiştir. Santrifüjlemeden sonra süpernatant uzaklaştırılmıştır. Hücre peleti, bir gün boyunca glutaraldehit içinde sabitlenmiştir. Pelet,

sodyum fosfat tamponu ile yıkandı ve sodyum fosfat tamponunda 30 dakikalık üç yıkama yapılmıştır. %70 alkolde hazırlanan uranil asetat ile 1 saat boyanmıştır. Numuneler %80 alkol ile 10 dakika, %90 alkol ile 10 dakika, %96 alkol ile 10 dakika, %100 alkol ile 10 dakika, %100 alkol ile 10 dakika ve propilen oksit ile 30 dakika süreyle yıkanmıştır. Ardından araldit solüsyonu hazırlamak için 10 ml araldit, sertleştirici olarak 10 ml dodesil sukkinik anhidrat (DDSA), hızlandırıcı olarak 0.5 ml 2,4,6[tri(dimetilaminoetilfenol)] (DMP-30) ve plastikleştirici olarak ise 1 ml dibütil fitalat (DBP) kimyasalları kullanılmıştır. Numuneler %25 araldit + %75 propilen oksit içinde 3 saat, %50 araldit + %50 propilen oksit içinde 3 saat, %75 araldit + %25 propilen oksit içinde gece boyunca ve son olarak 6 saat saf araldit içinde tutulmuştur. Numuneler 45°C'de 24 saat ve ardından 60°C'de 24 saat süreyle etüvde bekletilmiştir. Ultra ince kesitler (30-60 nm) ultramikrotom (Reichert OM-U3, Avusturya) ile kesilmiş ve kesitler %1 uranil asetat ile 5 dakika boyanmıştır. Numuneler, geçirimli elektron mikroskobu (JEOL JEM 100CX II Tokyo, Japonya) altında incelenmiştir.

4.2.9 Tümör mikro-dokularının oluşturulması ve polarize makrofajlar ile eş-kültürü

Farklı fenotipteki (M0, M1, M2 ve PdNP indüklenmiş) makrofajların meme kanseri mikro-dokuları üzerinde metastatik, apoptotik ve EMT etkilerini değerlendirmek amacı ile meme kanseri mikro-dokuları üretilmiş ve 0.4 µm porlara sahip bir membran ile birbirinden ayrılmış iki-bölmeli kültür düzeneği olan transwell sistemleri ile eş-kültürler kurulmuştur (Şekil 4.1).



Şekil 4.1 Eş-kültür deney sistemi kurulum şeması

MCF-7 tümör mikro-dokularını oluşturmak için öncelikle, MCF-7 hücrelerinin plaka yüzeyine yapışmasını engelleyerek birbirlerine yapışması ve mikro-doku oluşturabilmek amacıyla 6-kuyucuklu plakanın kuyucukları ağırlıkça %1 agar solüsyonu ile kaplanmıştır. Agar solüsyonu soğuyup jelleştikten sonra hacimce %1 penisilin-streptomisin içeren PBS ile yıkandı ve ardından kuyucuklara 1'er ml besiyeri ilave edilerek hücre ekimine kadar inkübatöre kaldırılmıştır. %1 agar kaplı 6-kuyucuklu plakara 300.000 hücre/kuyucuk olacak şekilde MCF-7 hücreleri ekildi ve makrofaj polarizasyonu için gereken süre bitene kadar (48 saat) mikro-dokuların oluşumu 37°C'de ve %5 CO₂ kültür şartlarında sağlanmıştır. Kuyucuk başına yaklaşık 200 mikro-doku oluşumu gözlenmiş ve mikro-dokular önceden %1 agar ile kaplanmış 24-kuyucuklu plakalara kuyucuk başı 100 mikro-doku olacak şekilde aktarılmıştır. Aynı bir 24-kuyucuklu plakada Raw 264.7 hücreleri eş-kültür sisteminin üst kompartımanı olarak kullanılacak olan porlu kuyucuklara (insert) kuyucuk başına 30.000 hücre olacak şekilde ekildi ve hücrelerin kuyucuklara yapışabilmeleri için bir gece boyunca 37° C'de ve %5 CO₂ şartları altında inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra, polarizasyonlarını teşvik etmek için makrofaj hücrelerine M1-indüksiyonu için LPS (200 ng/ml)/IFN- γ (20 ng/ml), M2-indüksiyonu

için IL-10 (20 ng/ml) ve M1-indüksiyonu için PdNP'leri (50 µg/ml) uygulandı ve 48 saat boyunca 37°C'de ve %5 CO₂ altında inkübasyona bırakılmıştır. Son olarak, polarizasyonu sağlanmış makrofajların bulunduğu eş-kültür sistemin üst kompartımanı mikro-dokuların aktarıldığı 24-kuyucuklu plakanın kuyucuklarına yerleştirilmiştir. Oluşturulan eş-kültür sistemi 3 gün boyunca 37°C'de ve %5 CO₂ şartları altında inkübe edildi ve günlük olarak makrofajların ve mikro-dokuların mikroskop görüntüleri alınmıştır. Periyodik olarak alınan mikro-doku görüntülerinden boyutları Image J programı kullanılarak ölçülmüştür.

4.2.10 MCF-7 tümör mikro-dokuların gen ekspresyon analizleri

RT-qPCR, farklı fenotipteki makrofajların MCF-7 tümör mikro-dokuları üzerindeki metastatik, apoptotik ve EMT ilişkili gen ekspresyon seviyelerindeki farklılıkları incelemek amacıyla kullanılmıştır. Bu amaçla, 24-kuyucuklu plakalardan toplanan mikro-dokular 1 dakika boyunca 10.000 x g'de santrifüj işlemi ile ayrılmış ve supernatant uzaklaştırılmıştır. Ardından, RNA izolasyonu ve cDNA sentezi bölüm 4.2.6'da açıklandığı şekilde yapılmıştır. cDNA sentezinin ardından RT-qPCR tekniğine dayanan gen ekspresyonu analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, metastaz belirteçleri olarak MMP2 ve MMP9, EMT belirteçleri olarak E-cad ve N-cad genleri ve apoptoz belirteci olarak ise p53 geni analiz edilmiştir.

4.2.11 Raw 264.7 hücrelerinden eksozom izolasyonu ve karakterizasyonu

Farklı fenotipe sahip makrofajlardan elde edilen eksozomların MCF-7 mikro-dokuları üzerindeki pre/post-tümörijenik özelliklerinin araştırılması amacı ile eksozom izolasyonu ve karakterizasyonu yapılmıştır.

Eksozomlar, polarizasyonu sağlanmış (M1, M2, PdNP-indüklü makrofajlar) ve polarize edilmemiş (M0) makrofajlardan izole edilmiştir. Bu amaçla, ilk adım olarak Raw 264.7 makrofaj hücreleri, 37°C'de ve %5 CO₂ koşullarında dört ayrı T75 steril kültür kaplarında kültürlenmiştir. Hücre bolluğu yaklaşık %50'ye ulaştığında, makrofajları farklı

polarizasyonlara yönlendirmek için steril kültür kaplarından üçü indüklenmiştir. M1 polarizasyonuna teşvik etmek için standart protokol olan LPS (200 ng/ml) ve IFN- γ (20 ng/ml) uygulaması yapılmıştır. Ayrıca tarafımızca önerilen PdNP'ler (50 μ g/ml) ile indüksiyon sağlanmıştır. M2-indüksiyon amacıyla IL-10 (20 ng/ml) uygulanmıştır. Hücre bolluğu yaklaşık %80'e ulaştığında, kültür kaplarından atık besiyeri toplanarak -20°C'de stoklanmış ve kültür kaplarına taze besiyeri konularak tekrar kültür edilmek üzere inkübatöre bırakılmıştır. Toplanan koşullandırılmış besiyeri (conditioned medium) kademeli santrifüjleme işlemine tabi tutulmuştur. İlk olarak 3.000 g'de 4°C'de 15 dakika santrifüjleme işlemi ile besiyerinde kalan hücreler ve kalıntılar uzaklaştırılmıştır. Daha sonra 0,22 μ m filtreden geçirildikten sonra 10.000 g'de 4°C'de 15 dakika santrifüjlenerek apoptotik veziküller uzaklaştırılmıştır. Son olarak, eksozom peletini elde etmek için 120.000 g'de 4°C'de 70 dakika ultrasantrifüjleme işlemi yapılmıştır (Himac CP100WX, Hitachi, ABD). İzole edilen eksozom peletleri PBS ile resüspanse edilerek kullanılabilecek kadar -80 °C'de saklanmıştır.

İzolasyonu yapılan eksozomların protein konsantrasyonlarını belirlemek amacıyla bisinkoninik asit (BCA) testi kit protokolü uyarınca yapılmıştır (Thermo Fisher Scientific, ABD). Ardından, eksozomların konvansiyonel morfolojisini görselleştirmek amacıyla TEM çalışması yapılmıştır. Bu amaç doğrultusunda, petri üzerine yerleştirilen gridlerin (Agar Scientific, İngiltere) karbon kaplı yüzeyine 3 kat seyreltilmiş eksozom örneklerinden 10 μ l hassas bir şekilde aktarılmıştır. Grid üzerindeki eksozomları sabitlemek için hacimce %5 gluteraldehit solüsyonundan 10 μ l eklenmiş ve 5 dakika inkübasyon sağlanmıştır. Gluteraldehitin fazlası grid üzerinden peçete yardımıyla hassas bir şekilde uzaklaştırılmış ve kuruması için petrinin üstü kapalı bir şekilde bekletilmiştir. Geçirimli elektron mikroskopunda (JEOL JEM 100CX II Tokyo, Japonya) görüntüler alınmıştır.

4.2.12 Yara kapama deneyi

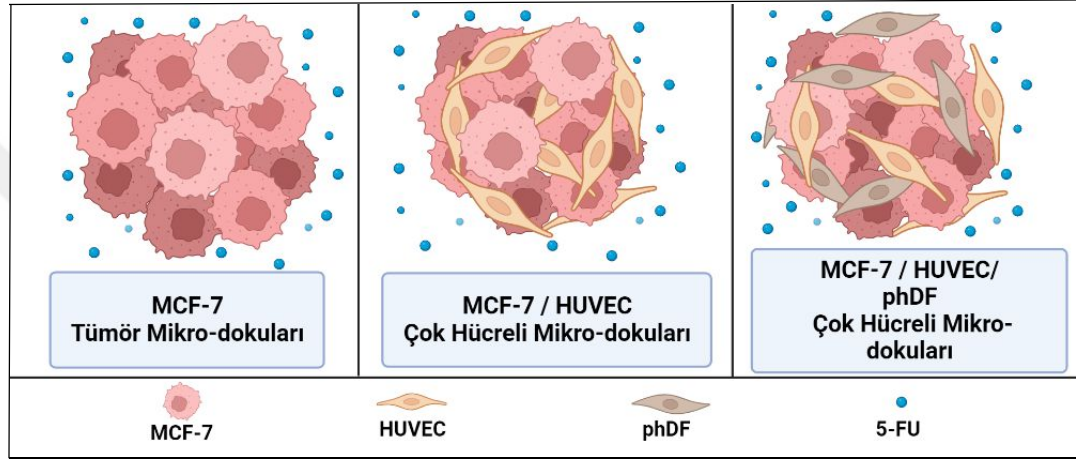
Farklı fenotipte makrofaj hücrelerinden izole edilen eksozomların (M0, M1, M2 ve PdNP-Exo) MCF-7 hücrelerinin invazif davranışları üzerindeki etkilerini incelemek için yara kapama deneyi kurulmuştur. Bu amaçla, MCF-7 hücreleri 24-kuyucuklu plakalara kuyucuk başına 300.000 hücre olacak şekilde ekilmiş ve 37°C'de ve %5 CO₂ koşullarında inkübe edilmiştir. Hücreler tamamen bolluğa geldiğinde besiyeri uzaklaştırılmış ve kuyucukların ortası pipet ucu ile dikkatli bir şekilde çizilerek bir suni yara oluşturulmuştur. Ardından eksozomlu besiyeri (100 µg/ml) eklenmiş ve kültür devam ettirilerek belirli saat aralıklarıyla mikroskop görüntüleri alınmıştır. Yara boyutlarındaki zamana bağlı değişiklikler, elde edilen görüntülerden Image J programı kullanılarak hesaplanmıştır.

4.2.13 Çok hücreli heterojen tümör mikro-dokuların (heterosferoidlerin) hazırlaması, eksozom uygulaması ve gen ekspresyon analizleri

In vivo ortamı daha iyi taklit edebilmek amacıyla ve hücre heterojenitenin tümör hücrelerinde eksozomal yanıtlara etkilerinin değerlendirilmesi amacıyla insan meme kanseri hücreleri (MCF-7), insan damar endotel hücreleri (HUVEC) ve primer insan dermal fibroblast (phDF) hücrelerinin kullanılmasıyla heterojen tümör mikro-dokuları (heterosferoidler) üretilmiş ve pre/post-tümörijenik gen ekspresyon çalışmaları tekrarlanmıştır. Dört farklı tip eksozom (M0, M1, M2, PdNP-Exo) uygulaması yoluyla mikro-dokuların gen ekspresyonu seviyelerindeki değişiklikler metastaz (MMP2, MMP9), EMT (E-Cad, N-Cad) ve apoptoz (p53) belirteçleri için incelenmiştir.

Bu amaçla, öncelikle, %1 agar kaplı 6-kuyucuklu plakalar bölüm 4.2.9'da açıklandığı gibi hazırlanmış ve her bir kuyucuğa 2 ml besiyeri ilave edilmiştir. Tümör mikro-dokuları oluşturmak için MCF-7 hücreleri 300.000 hücre/kuyucuk olacak şekilde, çok hücreli mikro-dokuları (MCF-7/HUVEC) oluşturmak için MCF-7 ve HUVEC hücreleri sırasıyla 150.000/150.000 hücre/kuyucuk olacak şekilde, son olarak MCF-7/HUVEC/phDF mikro-dokuların üretilmesi için MCF-7, HUVEC ve phDF hücreleri 150.000/100.000/50.000 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekilmiştir. Tümör mikro-

dokuların ve heterojen tümör mikro-dokularının oluşumları tamamlandıktan sonra mikro-dokular, eksozom (100 µg/ml) içeren besiyerleri ile birlikte %1 agar kaplı 24-kuyucuklu plakalara kuyucuk başına 100 mikro-doku olacak şekilde aktarılmış ve 37°C'de %5 CO₂ şartları altında 72 saat boyunca inkübe edilmiştir. Mikro-dokuların mikroskop görüntüleri her gün kaydedilmiştir. Oluşturulan mikro-dokuların temsili Şekil 4.2' de sunulmuştur.



Şekil 4.2 Oluşturulan mikro-dokuların temsili görseli

İnkübasyon süresi tamamlanan tümör mikro-dokuları 24-kuyucuklu plakalardan toplanarak 1 dakika boyunca 10.000 x g' de santrifüjleme işlemi ile ayrılmıştır. Ardından, RNA izolasyonu ve cDNA sentezi bölüm 4.2.6' da tarif edildiği şekilde yapılmıştır. cDNA sentezinin ardından RT-qPCR tekniğine dayanan gen ekspresyonu analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, metastaz belirteçleri olarak MMP2 ve MMP9, EMT belirteçleri olarak E-cad ve N-cad genleri ve apoptoz belirteci olarak ise p53 genleri analiz edilmiştir.

4.2.14 İlaç çalışmaları

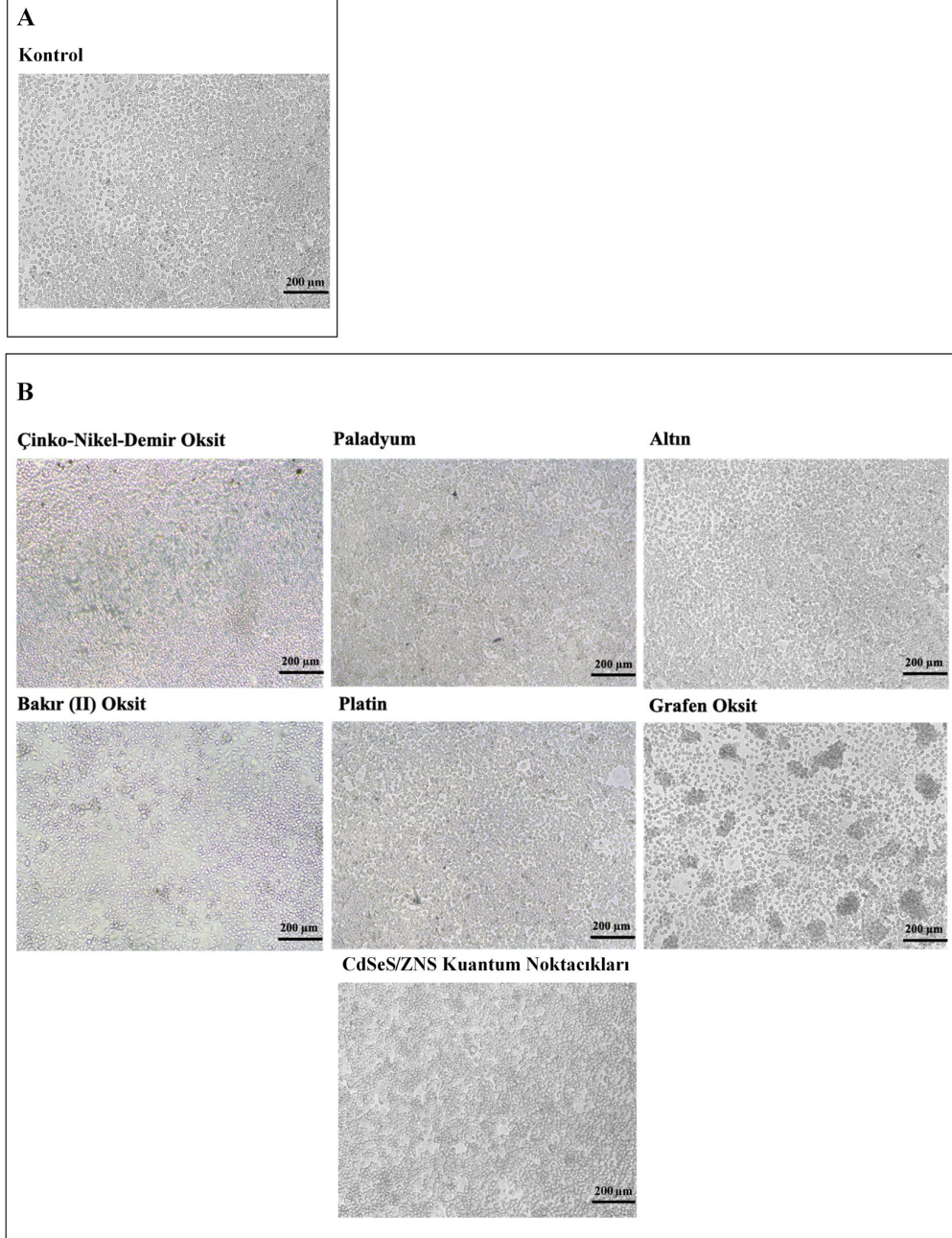
Farklı fenotipe sahip makrofajlardan elde edilen eksozomların 5-Fluorourasil (5-FU) anti-kanser ilacının etkinliğine etkisi MCF-7, MCF-7/HUVEC ve MCF-7/HUVEC/phDF mikro-doku sistemleri ile incelenmiştir.

Bu doğrultuda, tümör mikro-dokularını ilaç test çalışmalarının yapılacağı 96-kuyucuklu plakalarda oluşturmak için MCF-7 hücreleri 10.000 hücre/kuyucuk olacak şekilde; MCF-7/HUVEC mikro-dokularını oluşturmak amacı ile MCF-7 ve HUVEC 5.000/5.000 hücre/kuyucuk olacak şekilde; MCF-7/HUVEC/phDF mikro-dokularını oluşturmak için ise MCF-7, HUVEC ve phDF hücreleri 5.000/3.300/1.700 hücre/kuyucuk olacak şekilde ULAP'lara ekilmiştir. Ekimi tamamlanan ULAP, gece boyunca 37°C'de ve %5 CO₂ koşullarında inkübe edilmiştir. 24 saatlik kültürden sonra her bir kuyucuğa M0, M1, M2 eksozomlar ve PdNP-Exo (100 µg/ml) uygulanmıştır. Devamında, oluşan mikro-dokular 5-FU'nun iki farklı dozu (10 µg/ml ve 100 µg/ml) ile etkileştirilmiştir. 24 saat ve 72 saat 5-FU etkileşiminden sonra mikro-dokular için XTT hücre proliferasyon testi bölüm 4.2.4'de belirtildiği gibi uygulanmıştır. İnkübasyon süresi boyunca tüm mikro-dokuların mikroskop görüntüleri günden güne kaydedilmiştir. Böylece, eksozomların ilaç direncine etkisi, farklı dozlarda ve maruz kalma sürelerinde tespit edilmiştir.

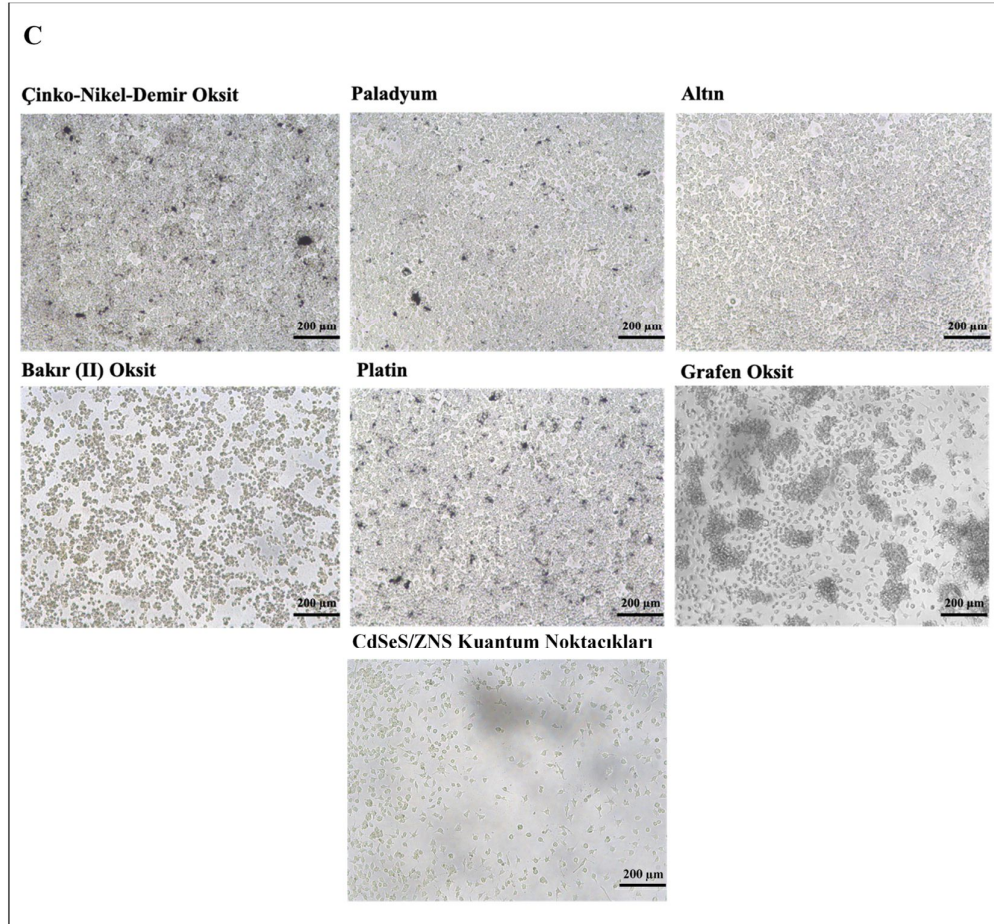
5. BULGULAR

5.1 Nanopartikül Taraması: Farklı Nanopartiküllerin Hücre Çoğalmasına ve Makrofaj İndüksiyonuna Etkileri

7 farklı nanopartikülün (Zn-Ni-FeO, Cu(II)O, Pd, Pt, Au, GO ve CdSeS/ZnS kuantum noktacıkları) iki farklı dozda (10 ve 50 µg/ml) makrofajlara uygulandıktan 48 saat sonra nanopartiküllerin makrofajlar üzerindeki polarizasyon ve proliferasyon etkileri incelenmiştir. İnvirt faz-kontrast mikroskop görüntüleri Şekil 5.1’de sunulmuştur. Nanopartiküller ile indüklenen makrofajların mikroskop görüntüleri incelendiğinde Cu(II)O, GO ve CdSeS/ZnS kuantum noktacıkları makrofajların proliferasyonları üzerinde olumsuz etkiler oluşturduğu gözlemlenmiştir.



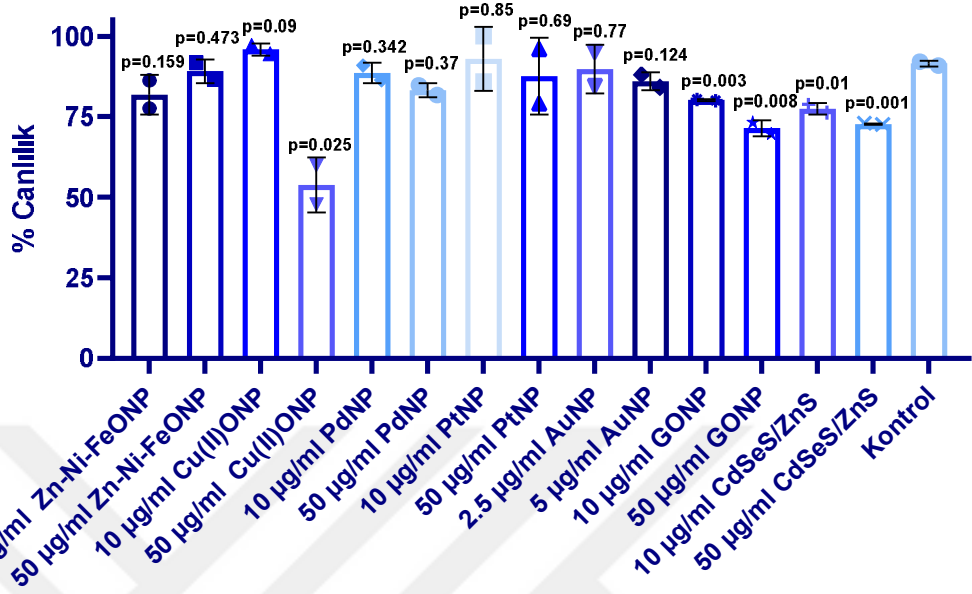
Şekil 5.1 indüklenmeyen (A), düşük doz (10 µg/ml) nanopartiküller (Zn-Ni-FeO, Cu(II)O, Pd, Pt, GO ve CdSeS/ZnS kuantum noktacılar) ve 2.5 µg/ml (Au) ile indüklenen (B) ve yüksek doz (50 µg/ml) nanopartiküller (Zn-Ni-FeO, Cu(II)O, Pd, Pt, GO ve CdSeS/ZnS kuantum noktacılar) ve 5 µg/ml (Au) ile indüklenen (C) makrofajların 48. saat mikroskop görüntüleri



Şekil 5.1 indüklenmeyen (A), düşük doz (10 µg/ml) nanopartiküller (Zn-Ni-FeO, Cu(II)O, Pd, Pt, GO ve CdSeS/ZnS kuantum noktacılar) ve 2.5 µg/ml (Au) ile indüklenen (B) ve yüksek doz (50 µg/ml) nanopartiküller (Zn-Ni-FeO, Cu(II)O, Pd, Pt, GO ve CdSeS/ZnS kuantum noktacılar) ve 5 µg/ml (Au) ile indüklenen (C) makrofajların 48. saat mikroskop görüntüleri (devam)

5.1.1 Nanopartiküllerin makrofaj çoğalmasına etkilerinin XTT ile incelenmesi

Makrofajların indüksiyonu için test edilen nanopartiküllerin ve farklı dozlarının makrofajların proliferasyonu üzerindeki etkilerini incelemek amacı ile XTT testi uygulanmıştır.



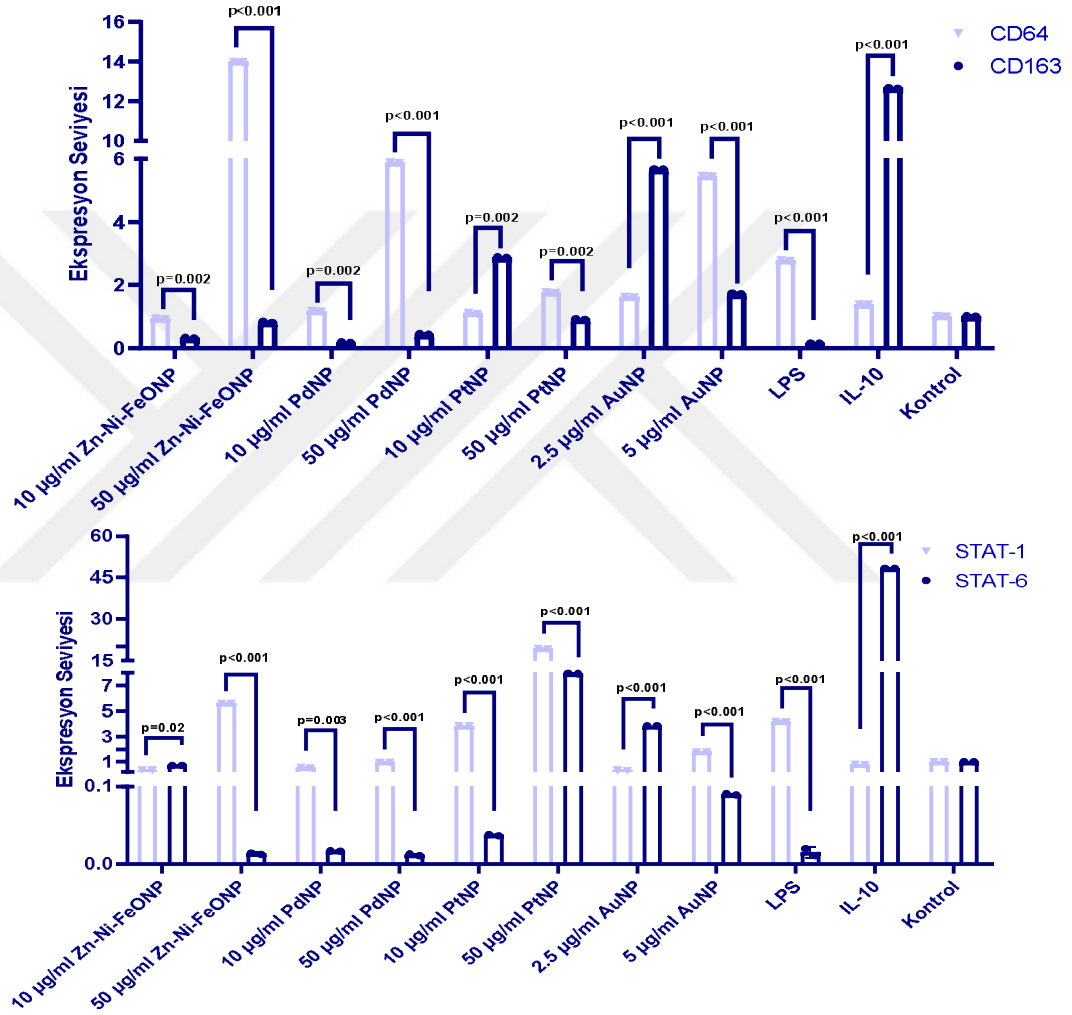
Şekil 5.1 Nanopartiküllerin makrofajlarda hücre proliferasyonuna etkileri: 48. saat XTT sonuçları

XTT sonuçları göz önünde bulundurulduğunda, Cu(II)O'nun, GO'nun ve CdSeS/ZnS kuantum noktacıklarının yüksek dozları dışında bütün nanopartikül ve dozlarının makrofaj canlılığına negatif etkisinin olmadığı gözlemlenmiştir (Şekil 5.2). Bu sebeple Cu(II)O, GO ve CdSeS/ZnS kuantum noktacıklarının ileri analizlerde kullanılmamasına karar verilmiştir.

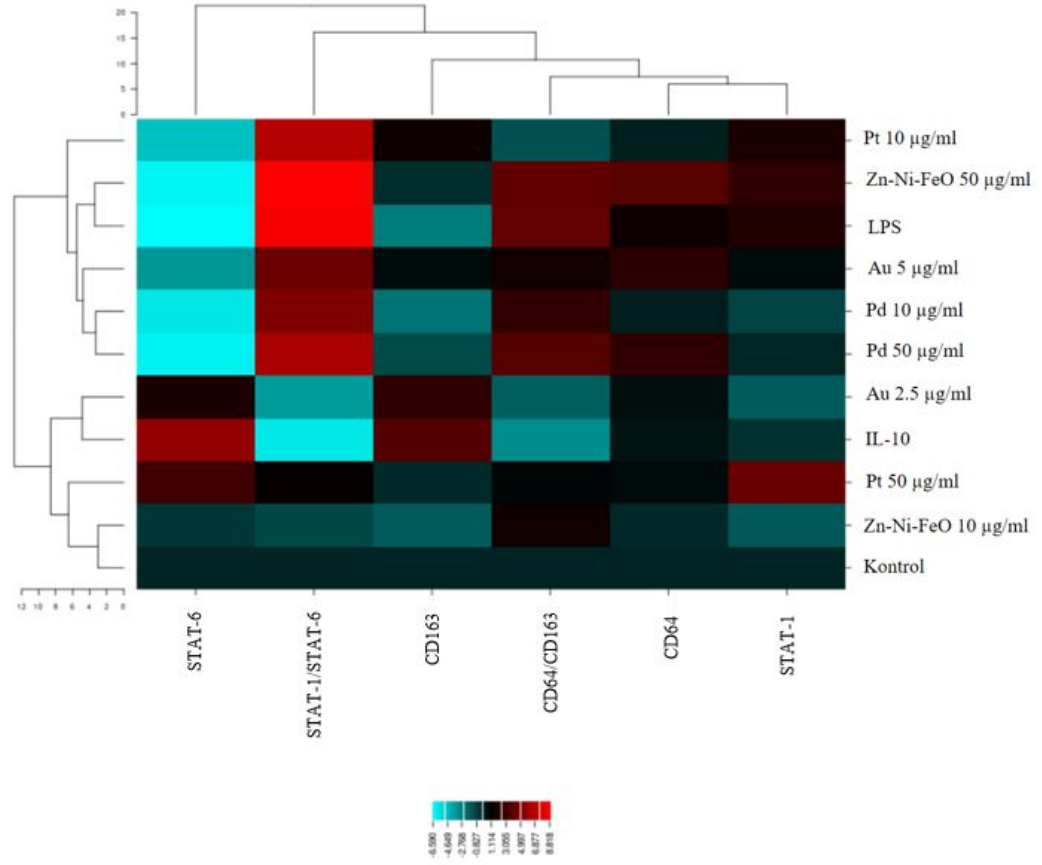
5.1.2 Nanopartiküllerin makrofaj polarizasyonuna etkilerinin RT-qPCR ile incelenmesi

Uygulanan nanopartiküllerin makrofaj polarizasyonuna etkileri M1 makrofaj belirteçleri olan CD64 ve STAT-1 ile M2 makrofaj belirteçleri olan CD163 ve STAT-6 için RT-qPCR yöntemi ile incelenmiştir. Ek olarak, M1 polarizasyonu için standart yöntem olan LPS/IFN γ indüksiyonu ve M2 polarizasyonu için standart yöntem olan IL-10 indüksiyonları da pozitif kontrol grupları olarak kullanılmıştır. Gen ekspresyon sonuçları incelendiğinde Zn-Ni-FeO, Pd, Pt nanopartiküllerin her iki dozu ve AuNP'lerin yüksek dozu (5µg/ml) M1 makrofaj belirteçleri olan CD64 ve STAT-1 genlerinin ekspresyon değerleri M2 makrofaj belirteçleri olan CD163 ve STAT-6 gen ekspresyon seviyelerine

oranla daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar ışığında, Zn-Ni-FeO, Pd, Pt nanopartiküllerin ve AuNP'lerinin yüksek dozunun (5µg/ml) M1 makrofaj polarizasyonu için etkili nanopartiküller olabileceğini göstermektedir (Şekil 5.3).



Şekil 5.2 Nanopartiküller ile uyarılmış makrofajların M1 (CD64 ve STAT-1) ve M2 (CD163 ve STAT-6) belirteçler için gen ekspresyon grafikleri

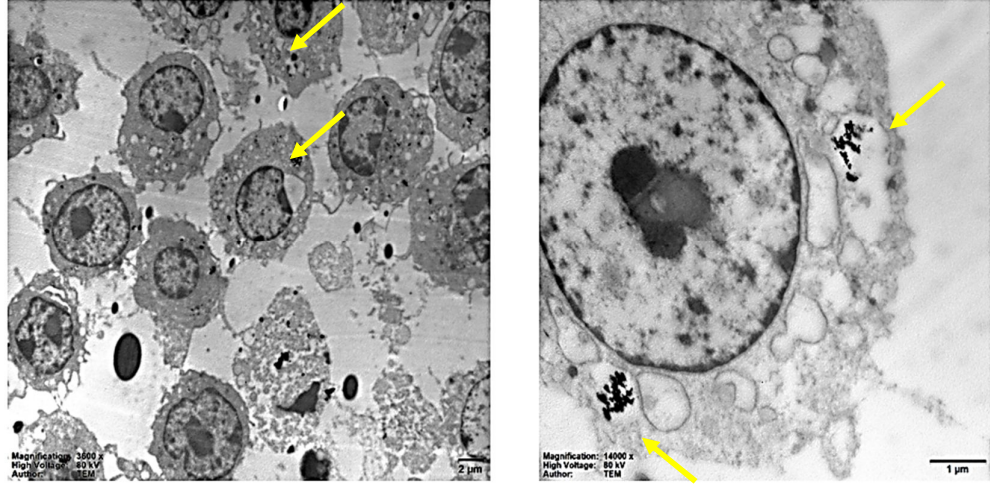


Şekil 5.3 Nanopartiküller ile uyarılmış makrofajların gen ekspresyon ve gen ekspresyon oranlarının ısı haritası. Yüksek ekspresyonlar kırmızı renk ile gösterilmişken, düşük ekspresyonlar turkuaz rengi ile ifade edilmiştir

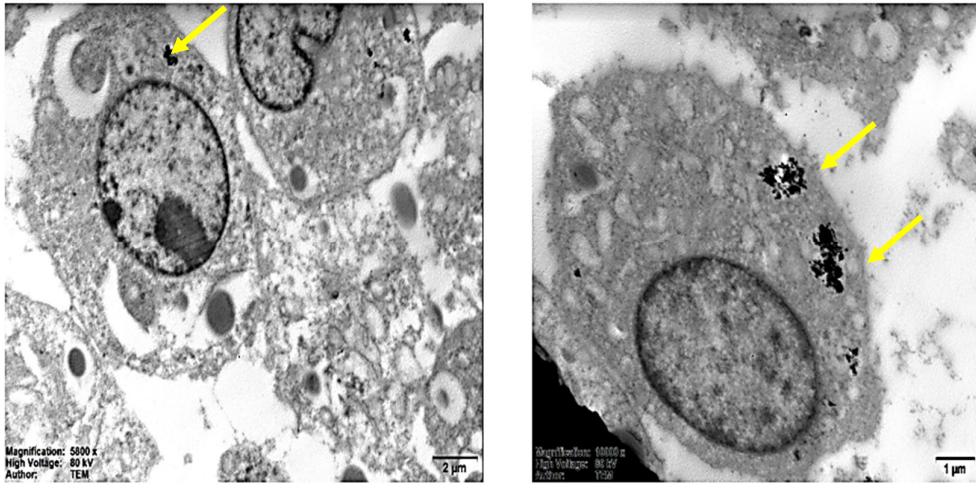
Nanopartikül taraması sonucu umut vadeden nanopartiküllerin gen ekspresyon değerleri ve M1/M2 belirteç genlerin ekspresyon oranları ısı haritası üzerinde gösterilmiştir. Isı haritasında, kırmızı renkler yüksek ekspresyon seviyelerini göstermekteyken turkuaz renkler ile ifade edilen bölümler düşük ekspresyon seviyelerini işaret etmektedir (Şekil 5.4). Elde edilen gen ekspresyon sonuçları ve bu sonuçlardan oluşturulan ısı haritası göz önüne alınarak, taranan nanopartiküller arasında 50 µg/ml Zn-Ni-FeO ve 50 µg/ml Pd nanopartiküllerin makrofajların M1 fenotipine indüksiyonunda en etkili nanopartiküller olduğu değerlendirilmiştir. Sonraki çalışmalara bu iki nanopartikül ile devam edilmiştir.

5.1.3 Nanopartikül alımının TEM ile incelenmesi

Zn-Ni-FeO (50 µg/ml) ve Pd (50 µg/ml) nanopartiküllerin makrofajlara uygulanmasından sonra makrofajların, nanopartikülleri hücre içine alımlarını görselleştirmek amacı ile indüklenmiş makrofajların TEM görüntüleri alınmıştır.



Şekil 5.4 Paladyum nanopartikülleri ile indüklenmiş makrofajların TEM görüntüleri (Sol taraftaki görüntü 2 µm ölçeğine sahiptir. Sağ taraftaki görüntü 1 µm ölçeğine sahiptir. Hücre içerisine alınan nanopartiküller sarı oklar ile gösterilmiştir.)

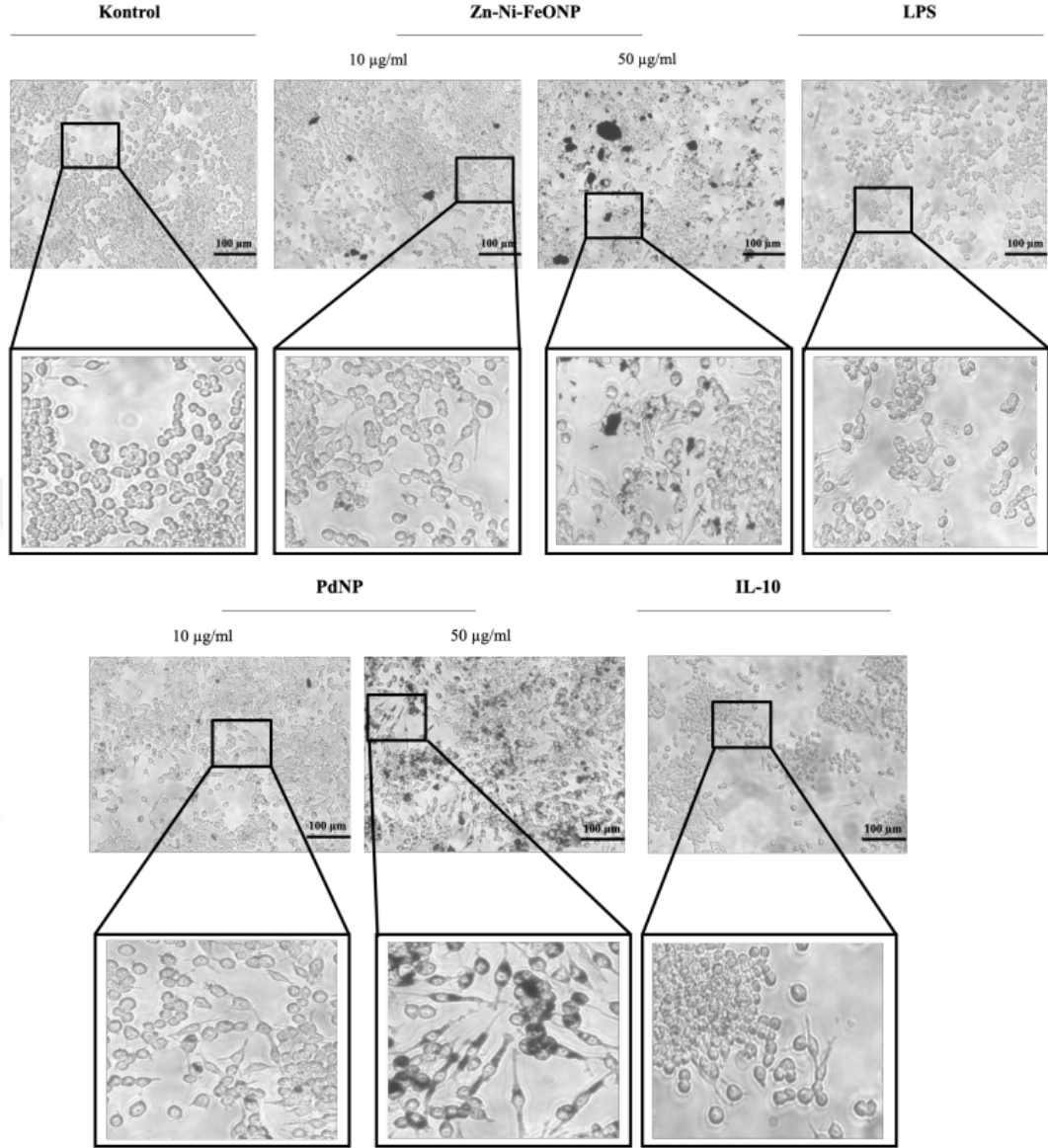


Şekil 5.5 Zn-Ni-FeO nanopartikülleri ile indüklenmiş makrofajların TEM görüntüleri (Sol taraftaki görüntü 2 µm ölçeğine sahiptir. Sağ taraftaki görüntü 1 µm ölçeğine sahiptir. Hücre içerisine alınan nanopartiküller sarı oklar ile gösterilmiştir.)

Nanopartikül uygulaması sonrasında toplanan makrofaj peletlerinden alınan mikro kesitlerin TEM görüntüleri Şekil 5.5 ve 5.6'da sunulmuştur. TEM görüntüleri incelendiğinde, makrofajların PdNP'lerin ve üçlü alaşım olan Zn-Ni-FeO nanopartiküllerin hücre içerisine alımı karşılaştırılması sonucu PdNP'lerin hücre içerisine alınımının daha fazla sayıda hücrede başarılı olduğu gözlemlenmiştir.

5.1.4 Sitokin salımının ELISA ile incelenmesi

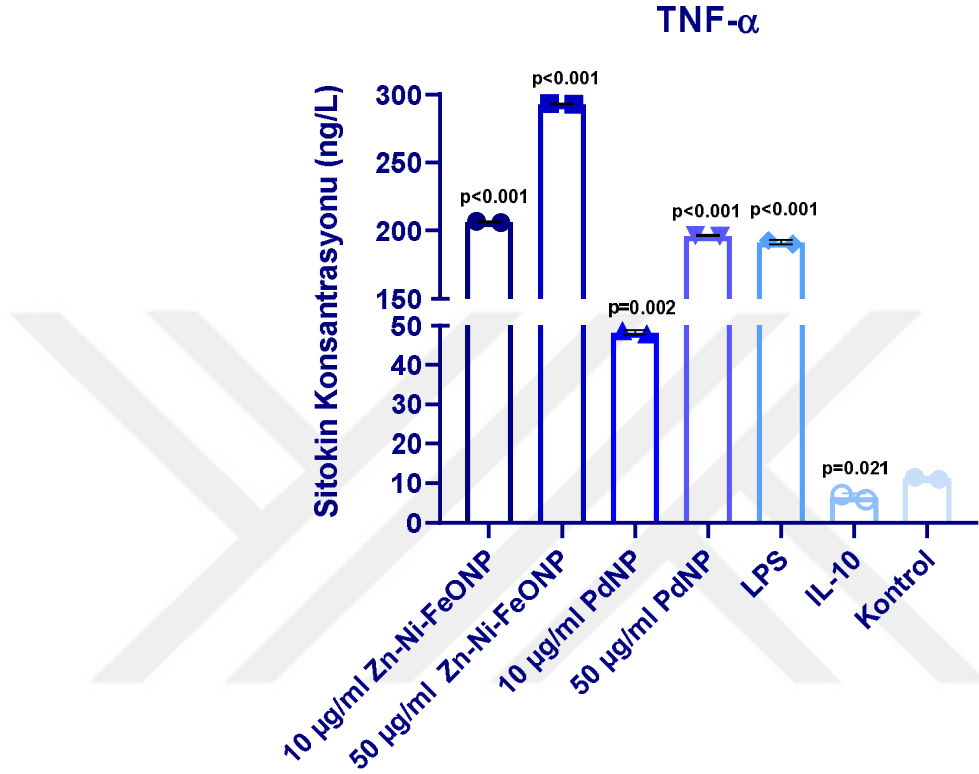
Zn-Ni-FeO ve Pd nanopartiküller ile indüklenen makrofajların pro-inflamatuar bir sitokin olan TNF- α sekresyonunu belirlemek amacı ile ELISA testi uygulanmıştır. Nanopartiküller ile makrofaj indüksiyonlarına dair mikroskop görüntüleri Şekil 5.7'de sunulmuştur.



Şekil 5.6 ELISA testi için nanopartiküller ile indüklenen makrofajların mikroskop görüntüleri (ölçek: 100 µm)

Her iki nanopartikül ile indüklenmiş makrofajların ürettikleri TNF- α sitokin seviyeleri kontrole göre oldukça yüksek çıktığı görülmüştür (Şekil 5.8). Bütün bu sonuçlar her iki nanopartikülün de makrofaj hücrelerini M1 fenotipine polarizasyonunda başarılı olduğunu destekler niteliktedir. Ancak, TEM görüntülerinden makrofajların Zn-Ni-FeO nanopartiküllerini paladyum nanopartikülleri kadar rahat şekilde bünyesine alamadığının gözlemlenmesi ve hücre kültürü esnasında Zn-Ni-FeO nanopartiküllerinin çökelti

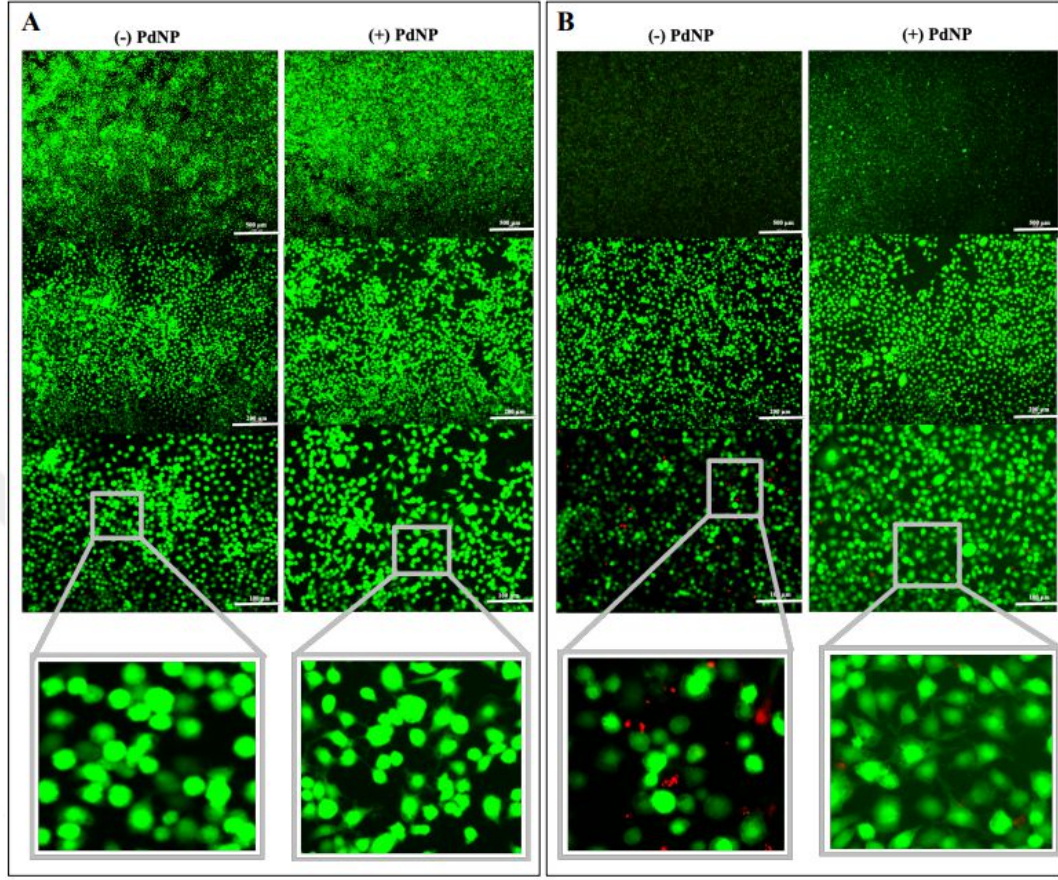
oluşturması sebebi ile paladyum nanopartikülleri kullanılarak daha sonraki deneylere devam edilmiştir.



Şekil 5.7 Nanopartiküller ile indüklenen makrofajların ürettikleri TNF- α konsantrasyonları

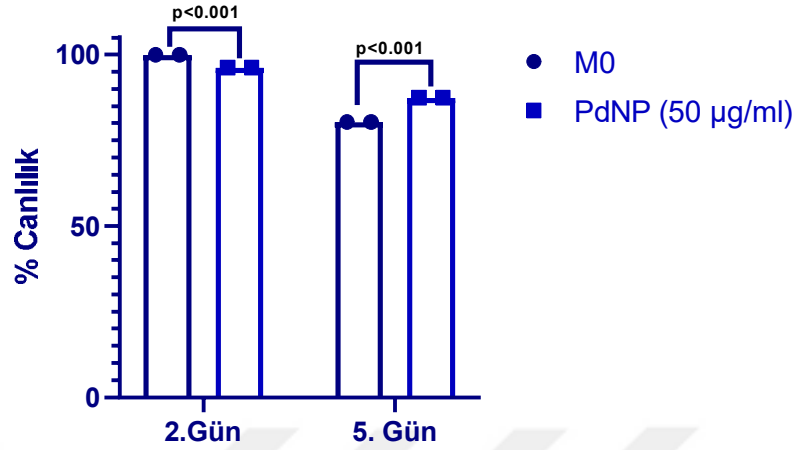
5.2 Paladyum Nanopartikül (PdNP) -İndüklenmiş Makrofajların Canlılık Testi

Raw 264.7 makrofaj hücrelerinin M1 polarizasyonuna teşviki için yapılan geniş spektrumlu nanopartikül taraması sonucu seçilen PdNP'lerinin (50 µg/ml) makrofajlar üzerinde zamana bağlı oluşturabileceği sitotoksik etki, morfolojik değişiklikler ve proliferasyon etkileri incelenmiştir. Bu amaç doğrultusunda, 2. gün ve 5. gün olmak üzere iki farklı zaman noktasında XTT testi ve canlı/ölü testleri uygulanmıştır.



Şekil 5.8 Paladyum ile indüklenmiş ve indüklenmemiş makrofajların (A) 2. ve (B) 5. gün canlı/ölü testleri sonuçları (ölçek: 500 μm , 200 μm , 100 μm)

Canlı/ölü testinde kullanılan Kalsein-AM boyaması sonucu canlı hücrelerin yeşil ışımaya yapması sonucunda canlı hücreler görselleştirilebilir. Bununla beraber, kırmızı renk veren noktalar ölü hücreleri göstermektedir. Elde edilen floresan görüntülerinde PdNP'lerin makrofaj canlılıklarına olumsuz bir etkisi bulunmadığı ve hatta 5. gün sonunda alınan sonuçlarda kontrol grubuna göre daha az ölü hücre bulunduğunu gözlemlenmiştir. Ek olarak, canlı/ölü testi görselleri incelendiğinde makrofaj hücrelerinin M1 polarizasyonuna bağlı olarak morfolojik değişikliklere uğradığı Şekil 5.9' da sunulmuştur.



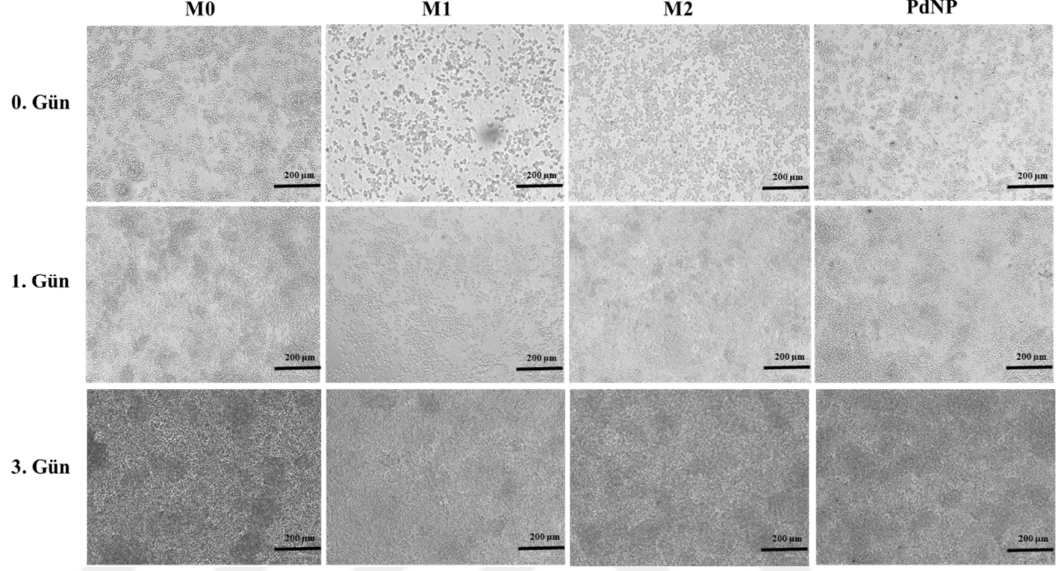
Şekil 5.9 Paladyum ile indüklenmiş ve indüklenmemiş makrofajların 2. ve 5. gün XTT testleri sonuçları

PdNP'lerin (50 µg/ml) makrofaj hücrelerinin proliferasyonuna etkileri XTT testi ile incelenmiştir. XTT sonuçları göz önüne alındığında, 2 gün boyunca uygulanan PdNP'lerin makrofaj proliferasyonu üzerinde ciddi bir olumsuz etkisi gözlemlenmezken 5 gün boyunca inkübe edilen PdNP'lerin makrofaj proliferasyonunu arttırdığı gözlemlenmiştir (Şekil 5.10).

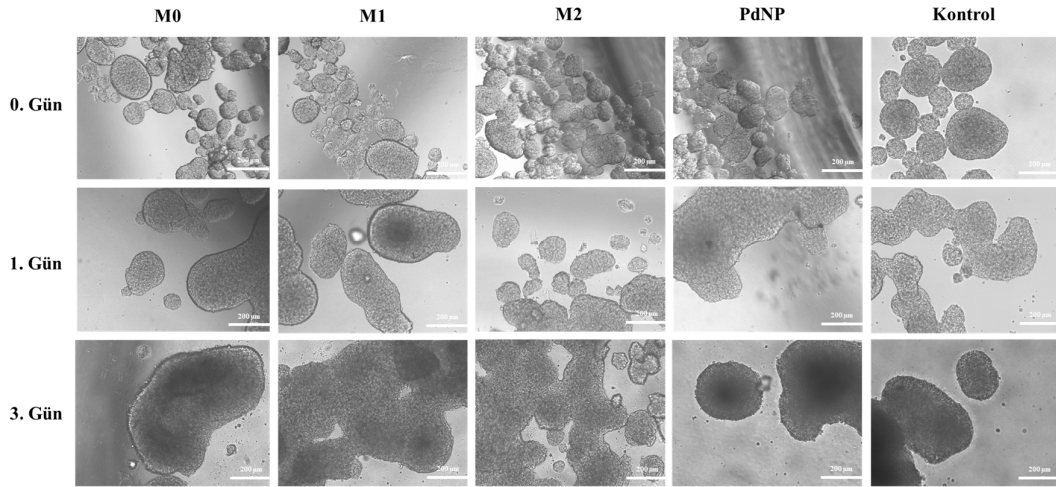
5.3 MCF-7 Tümör Mikro-dokuların Polarize Makrofajlar ile Eş-Kültür Çalışması

Farklı fenotiplere (M0, M1, M2 ve PdNP-indüklenmiş) polarizasyonu sağlanan makrofajlar ile tümör mikroçevresini daha yakından taklit edebilmek için oluşturulan MCF-7 tümör mikro-doku eş kültürleri, makrofajların tümör mikro-dokuları üzerindeki canlılıklarını, metastatik, apoptotik ve EMT özelliklerine etkilerini incelemek amacı ile kurulmuştur. Farklı fenotiplere (M0, M1, M2 ve PdNP-indüklenmiş) polarizasyonu sağlanan makrofajlar ile eş-kültürlenmiş makrofajların ve tümör mikro-dokuların invert faz-kontrast mikroskop görüntüleri Şekil 5.11 ve Şekil 5.12'de sunulmuştur. Bunun yanı sıra, farklı fenotiplere sahip makrofajlar ile eş-kültür edilen tümör mikro-doku sayıları ve boyutları inkübasyon süresine bağlı olarak incelenmiştir. İnkübasyon süresine bağlı olarak farklı fenotipteki makrofajlar ile eş-kültürlenmiş tümör mikro-dokularının

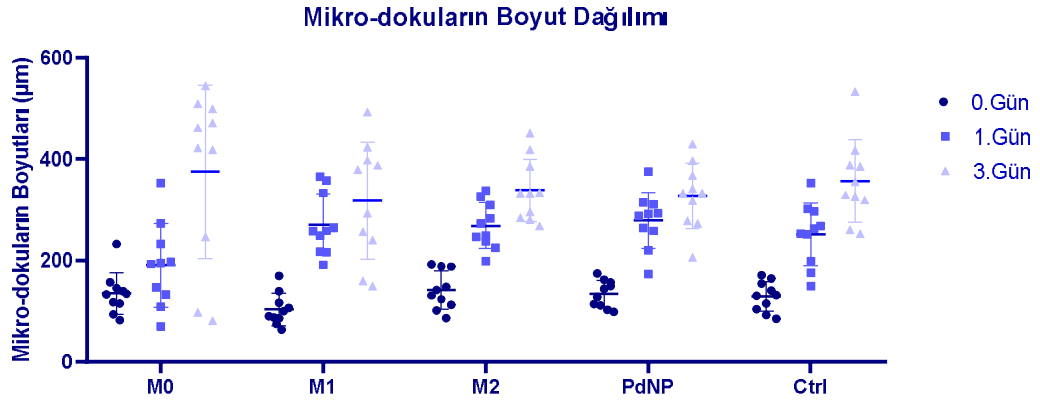
boyutlarının arttığı gözlemlenmiştir. Mikroskop görüntüleri yardımı ile oluşturulan tümör mikro-doku boyutlarının dağılımı Şekil 5.13’de sunulmuştur.



Şekil 5.10 Eş-kültür sistemindeki farklı fenotipteki makrofajların mikroskop görüntüleri (ölçek: 200 µm)

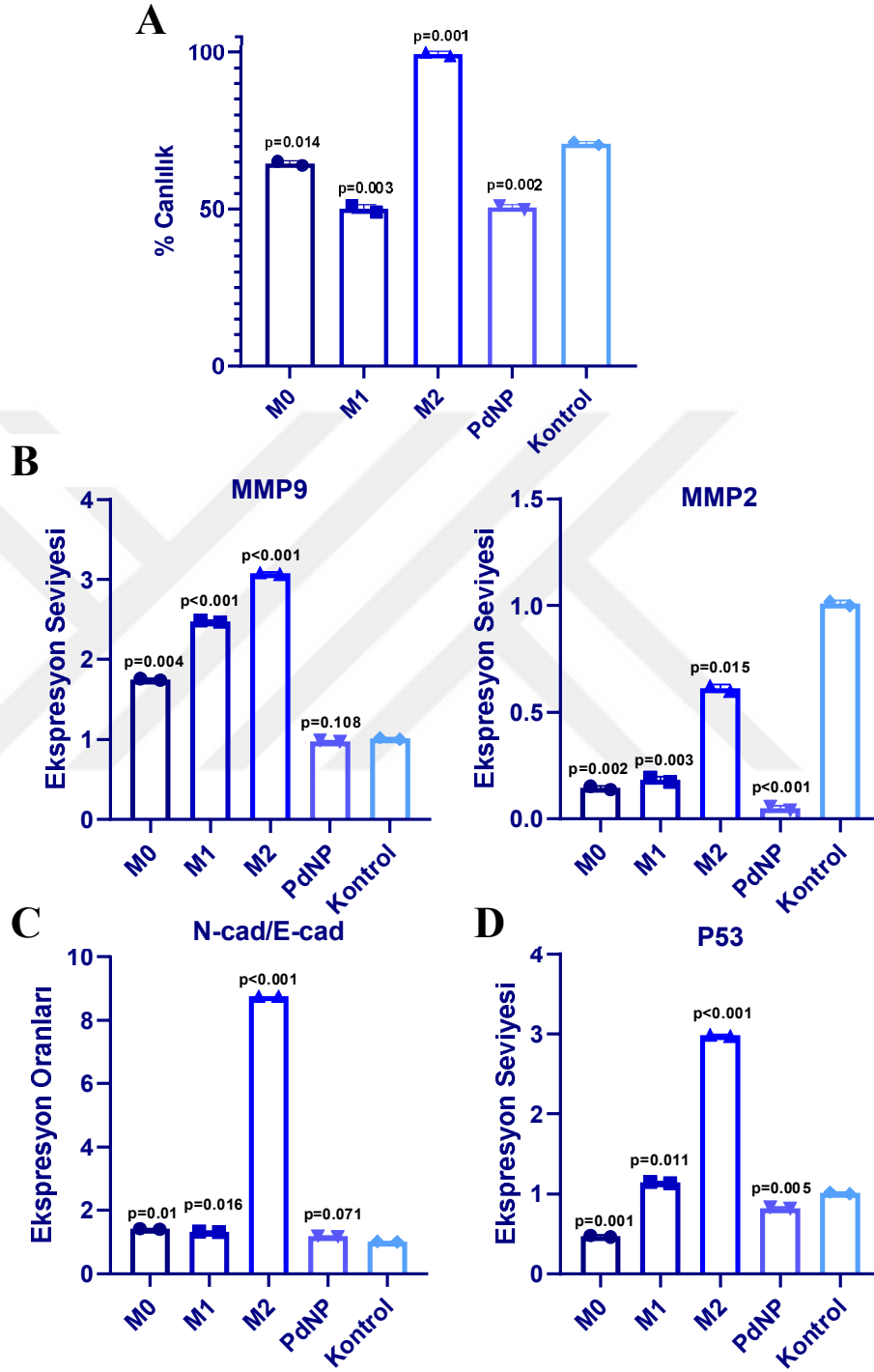


Şekil 5.11 Eş-kültür sistemindeki MCF-7 tümör mikro-dokularının mikroskop görüntüleri (ölçek: 200 µm)



Şekil 5.12 Farklı fenotiplere sahip makrofajlar ile eş-kültürlenmiş tümör mikro-dokularının zamana bağlı boyut dağılımı

Eş-kültür sonrası uygulanan XTT testi sonuçlarında M0, M1 makrofajlar ve PdNP ile indüklenmiş makrofajlar MCF-7 tümör mikro-dokularının canlılıklarını azalttığı gözlemlenmişken, M2 polarizasyonundaki makrofajların ise tümör mikro-dokularının canlılıklarını ciddi derecede arttırdığı gözlemlenmiştir. (Şekil 5.14.A).

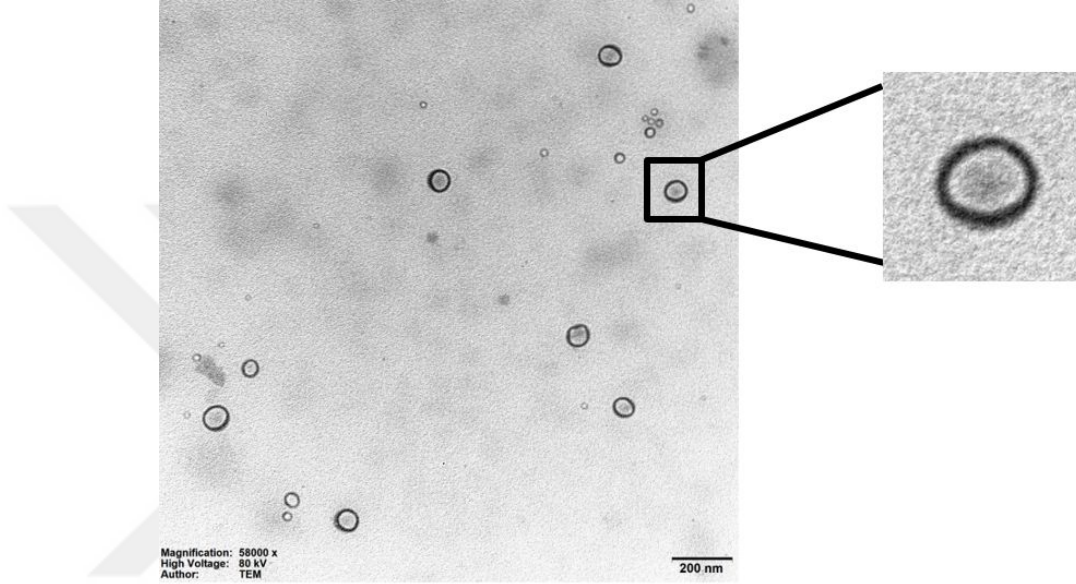


Şekil 5.13 Farklı fenotiplerdeki Raw 264.7 makrofaj hücreleri ile 3 gün boyunca eş-kültürlenmiş MCF-7 tümör mikro-dokularının (A) % canlılık grafiği, (B) metastatik genlerin ekspresyon grafiği, (C) EMT ilişkili genlerinin ekspresyon grafiği, (D) p53 ekspresyonu grafiği

Farklı fenotipteki makrofajlar ile 3 gün boyunca eş-kültürlenmiş MCF-7 tümör mikro-dokuların gen ifade analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu analizler ışığında, MCF-7 tümör mikro-dokuların metastatik genlerinden olan MMP2 aktivasyonu özellikle PdNP ile indüklenmiş makrofajlar olmak üzere bütün makrofaj fenotipleri tarafından gen ifadesini baskıladığı gözlemlenmiştir (M0: 0,14 kat, M1: 0,18 kat, M2: 0,6 kat ve PdNP-indüklenmiş: 0.04 kat). Diğer bir metastatik gen olan MMP9 gen ifadesinin aktivasyonu ise M0, M1 ve M2 makrofajlarının kontrol grubuna göre etkileri ile artarken (sırasıyla; 1,75, 2,48 ve 3,08 kat) PdNP ile indüklenmiş makrofajların MMP9 gen ifadesinin aktivasyonuna bir etkisi olmamıştır (0.98 kat) (Şekil 5.14.B). Makrofajların tümör mikro-dokuları üzerindeki EMT etkisi E-cad ve N-cad belirteç genleri üzerinden de incelenmiştir ve N-cad/E-cad oranı göz önünde bulundurularak M0, M1 ve PdNP-indüklenmiş makrofaj fenotiplerinin tümör mikro-dokuları üzerinde EMT etkisi oluşturmadığı gözlemlenmiştir (sırasıyla; 1,41, 1,32 ve 1,17 kat), M2 makrofajları ile eş-kültürlenmiş MCF-7 tümör mikro-dokularının EMT'ye yönlendirdiği gözlemlenmiştir (8,76 kat) (Şekil 5.14.C). M2 makrofajlar, tümör mikro-dokulardaki apoptotik gen olan p53 gen ifadesinin aktivasyonunu kontrol grubuna oranla arttırırken (2,98 kat), M0 fenotipe sahip makrofajlar ise p53 gen ifadesinin aktivasyonunu kontrol grubuna oranla azaltmıştır (0,47 kat). Bununla beraber, M1 ve PdNP-indüklenmiş makrofajlar tümör mikro-dokuların p53 gen ifadesi üzerinde ciddi bir değişime sebep olmamıştır (sırasıyla; 1,14 ve 0.82 kat) (Şekil 5.14.D).

5.4 Makrofaj-Türevli Eksozomların Anti/Post-Tümörijenik Etkileri

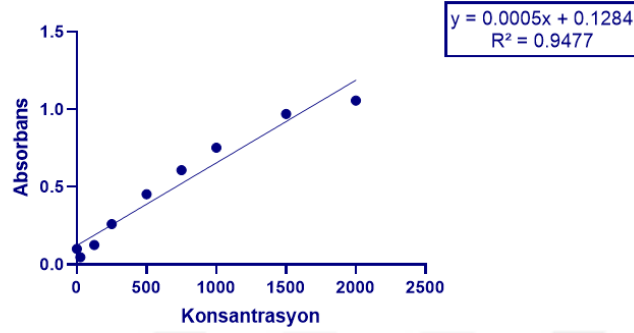
5.4.1 PdNP-indüklenmiş makrofaj eksozomlarının morfolojik karakterizasyonu



Şekil 5.14 Paladyum nanopartikülleriyle (50 $\mu\text{g/ml}$) indüklenmiş Raw 264.7 makrofaj hücrelerinden elde edilen eksozomların TEM görüntüsü (ölçek: 200 nm)

Paladyum nanopartikülleri (50 $\mu\text{g/ml}$) ile indüklenen Raw 264.7 makrofaj hücrelerinin atık besiyerleri toplanarak ultrasentrifüj yardımıyla eksozomları elde edilmiştir. Elde edilen eksozomların TEM görüntüleri alınmıştır. Olağan TEM görüntüleme prosesinde uygulanan eksozomların görünümünü kolaylaştırmak amacı ile yapılan boyama adımı PdNP indüklenmiş makrofajlardan elde edilen eksozomları görüntülemek için uygulanmamıştır. Buna rağmen, TEM ile alınan görüntülerde boyutları yaklaşık 80-100 nm arasında olan küresel yapılar gözlemlenmiştir. Elde edilen görüntüler şekil ve boyut itibariyle literatürdeki eksozom tanımına uymaktadır (Bondhopadhyay vd. 2021).

5.4.2 PdNP-indüklenmiş makrofaj eksozomlarının protein miktar tayini



Şekil 5.15 BCA testine ait konsantrasyon – absorbans standart grafiği

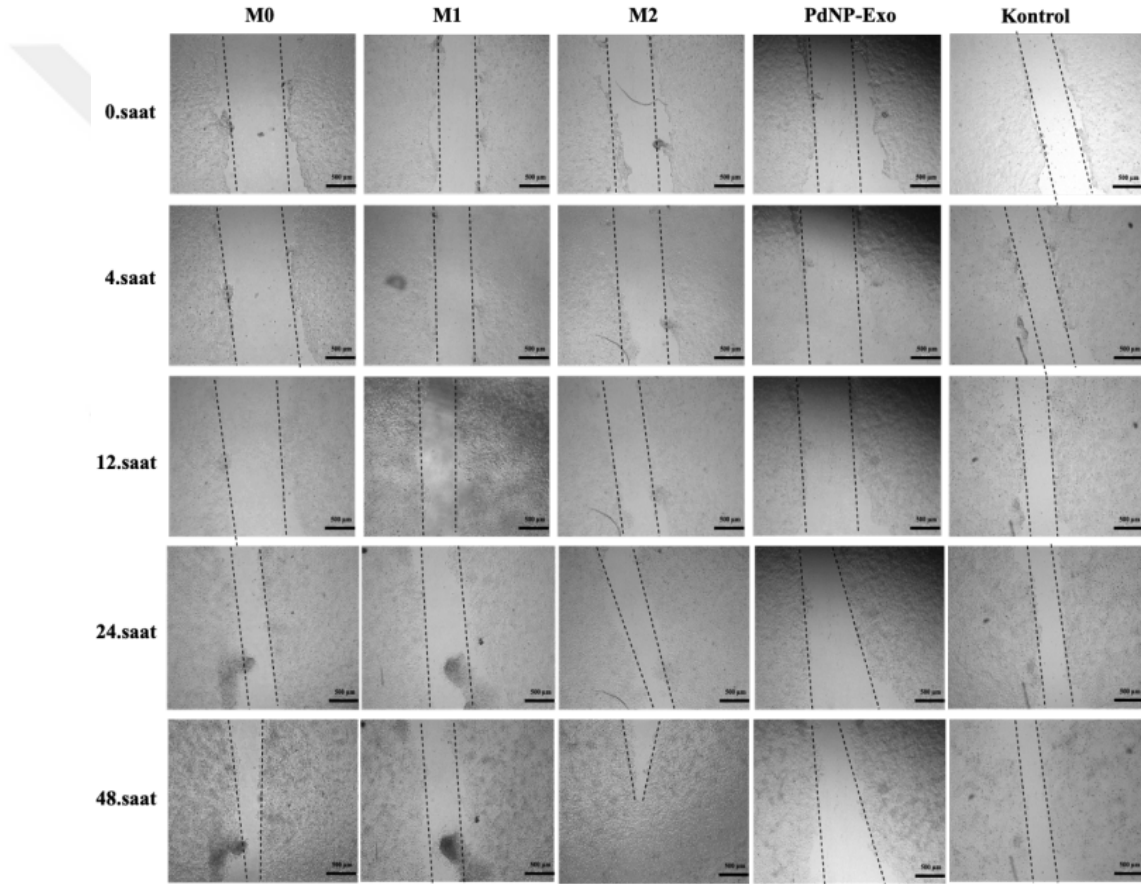
4 farklı makrofaj fenotipinden (M0, M1, M2 ve PdNP-indüklenmiş) elde edilen eksozomların karakterizasyonu için toplam protein konsantrasyonları BCA testi ile ölçülmüştür. Eksozomların protein miktarlarını gösteren standart eğrisi ölçülen absorbans ve standartlarının oluşturduğu konsantrasyon - absorbans değerleri kullanılarak çizilmiştir. Elde edilen denklem ile her bir eksozom örneğinin konsantrasyon değeri M0 eksozomları için 4.85 mg/ml, M1 eksozomları için 6.12 mg/ml, M2 eksozomlar için 5.83 mg/ml ve PdNP eksozomları (PdNP-Exo) için 3.16 mg/ml olarak hesaplanmıştır (Çizelge 5.1).

Çizelge 5.1 Eksozom konsantrasyonları

Eksozom Tipi	Konsantrasyonu
M0	4.85 mg/ml
M1	6.12 mg/ml
M2	5.83 mg/ml
PdNP-Exo	3.16 mg/ml

5.5 Makrofaj-Türevli Eksozomların *in vitro* Yara Kapatma Potansiyelleri

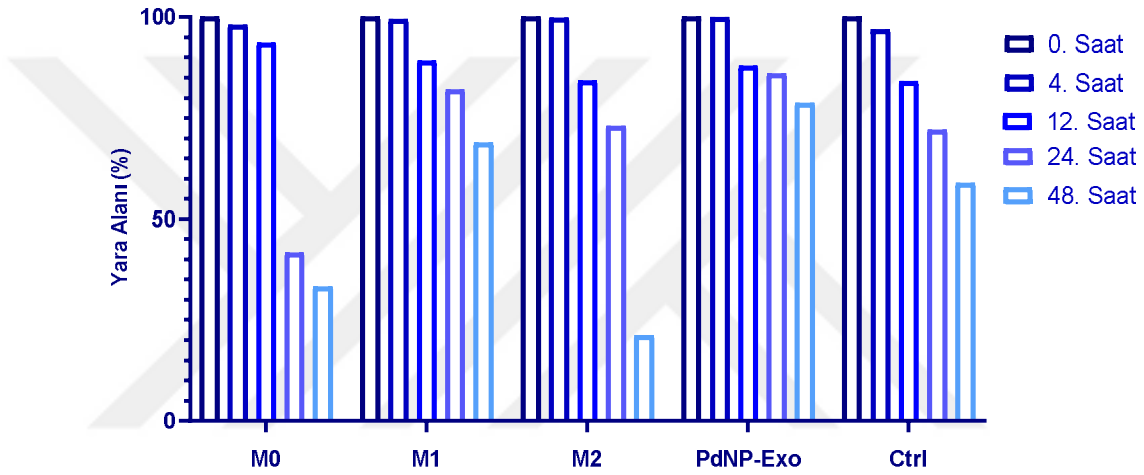
Farklı makrofaj tiplerinden elde edilen eksozomların MCF-7 meme kanseri hücreleri üzerindeki invazif özelliklerinin ve migrasyonuna etkilerinin incelenmesi amacı ile *in vitro* yara kapama deneyi uygulanmıştır. Eksozomların, oluşturulan suni yaralar üzerindeki etkileri belirli saat aralıkları ile alınan mikroskop görüntüleri (Şekil 5.17) ile incelenmiştir ve yara alanları Image J programı kullanılarak hesaplanmıştır.



Şekil 5.16 MCF-7 hücrelerine uygulanan M0, M1, M2 eksozomları ve PdNP-Exo'larının oluşturulan suni yaraların zamana bağlı kapanmasına etkilerini gösteren mikroskop görüntüleri (ölçek: 500 µm)

Oluşturulan yaralara M0, M1, M2 ve PdNP eksozomlarının uygulanmasından 48 saat sonra en ciddi yara kapanması M2 eksozomların uygulandığı grupta gözlemlenmiştir. 48 saat sonrasında kontrol grubundaki suni yaranın alanı %60'a düşerken M2 eksozomların

uygulandığı grupta yaranın alanı % 21 seviyesine düşmüştür. Bunun yanı sıra, M0 türevli eksozom uygulanan grupta da yara alanı % 33 seviyesine düştüğü ve kontrol grubuna göre yara alanında ciddi bir kapanma gerçekleştirdiği gözlemlenmiştir. Aksine, M1 türevli eksozomlar %68 yara alanı ile yara kapanmasını baskımlarken, PdNP eksozomların uygulandığı grupta ise yara alanı %79 seviyelerinde kalmıştır. Sonuç olarak, PdNP eksozomlarının MCF-7 hücrelerinin invazif özelliklerini ve migrasyonunu ciddi anlamda baskıladığı gözlemlenmiştir (Şekil 5.18).



Şekil 5.17 M0, M1, M2 ve PdNP eksozomları ile tedavi edilen suni yaraların belirli saatler içerisindeki kapanma oranları grafiği

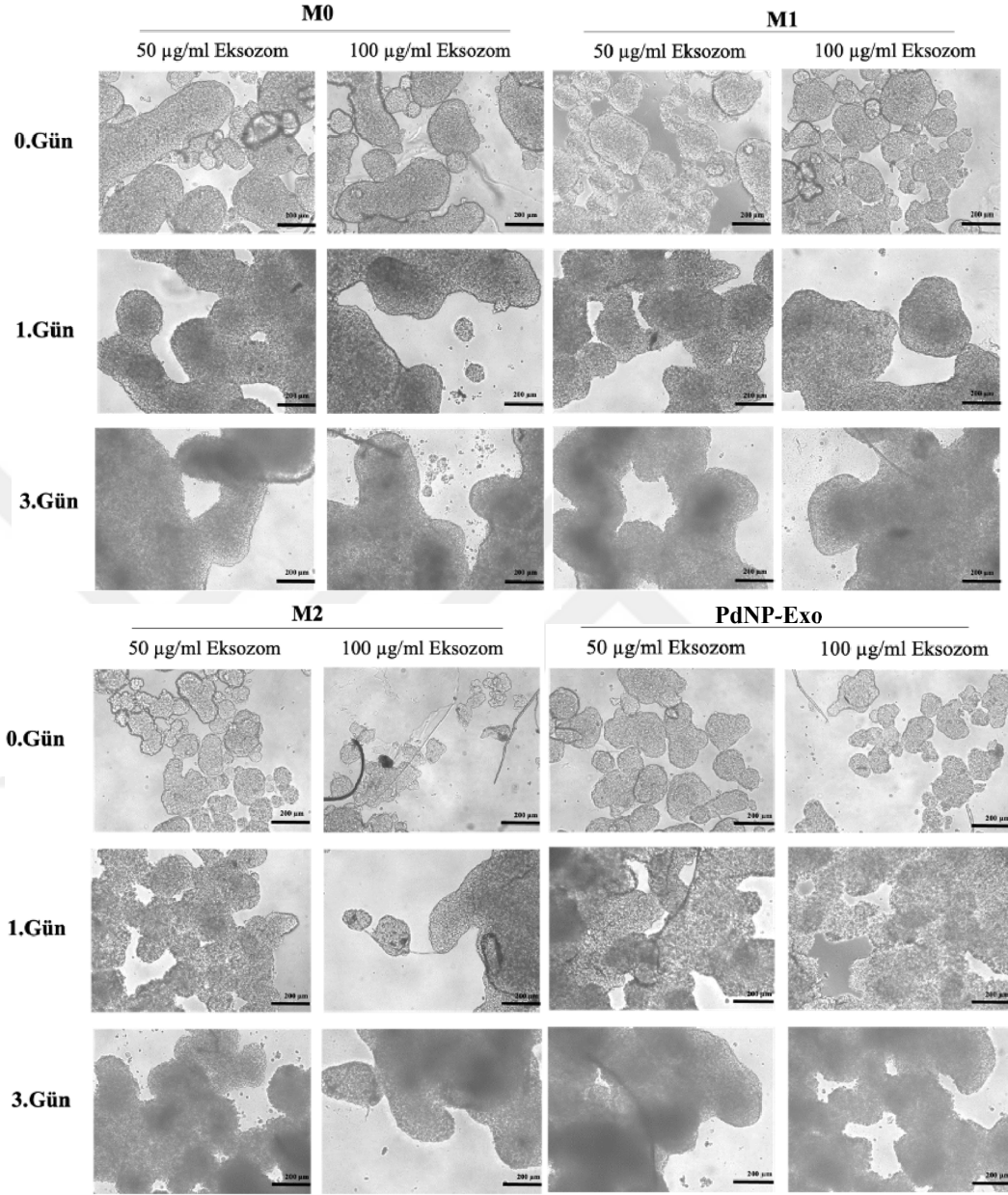
5.6 Makrofaj-Türevli Eksozomların Tümör Mikro-Dokusuna ve Çok-Hücreli Mikro-Dokusuna Gen Ekspresyon Seviyesinde Anti/Post-Tümörjenik Etkileri

Bu deney ile tümör mikro-dokulara ve çok hücreli mikro-dokulara dört farklı tip eksozom (M0, M1, M2 ve PdNP-Exo) uygulanması sonucu mikro-dokulardaki gen ekspresyon seviyelerindeki değişimler, metastatik (MMP2, MMP9), EMT ile ilişkili (E-Cad, N-Cad) ve apoptotik (p53) belirteç genler aracılığıyla incelenmesi amaçlanmıştır.

5.6.1 Eksozomların MCF-7 tümör mikro-dokulara etkileri

Uygulanacak eksozom konsantrasyonunun belirlenmesi için ilk önce oluşturulan MCF-7 tümör mikro-dokularına 50 µg/ml ve 100 µg/ml olmak üzere iki farklı konsantrasyonda eksozomlar uygulanıp 3 gün boyunca kültür edilmiştir. Kültür süresi boyunca tümör mikro-dokuların mikroskop görüntüleri Şekil 5.19'da sunulmuştur. Mikroskop görüntülerinde iki farklı konsantrasyonda uygulanan M0, M1, M2 ve PdNP eksozomlarının varlığında kültürlenmiş tümör mikro-dokuların zamanla büyümesi ve birleştikleri gözlemlenmiştir.



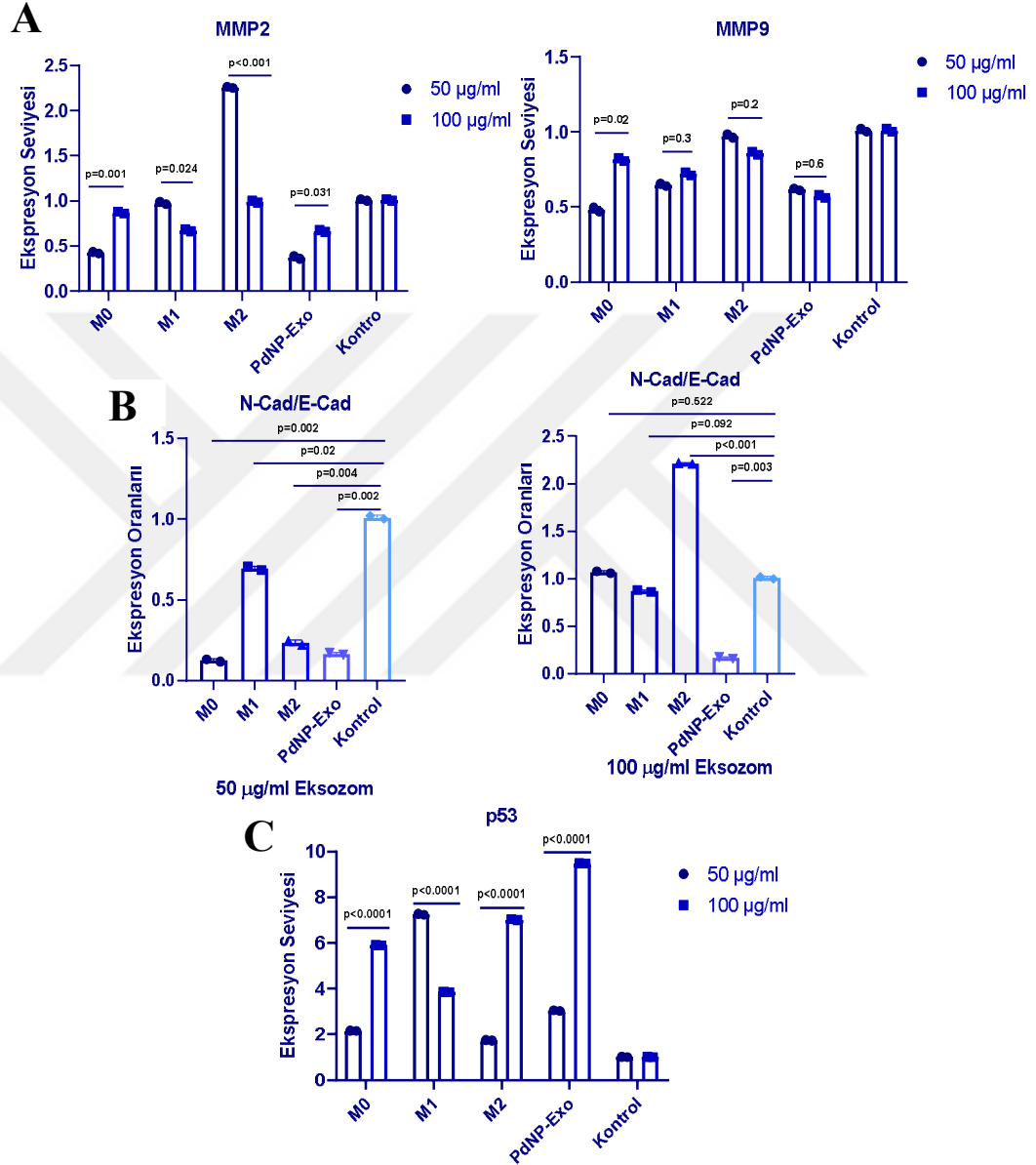


Şekil 5.18 İki farklı dozda eksozom uygulanmış MCF-7 tümör mikro-dokuların mikroskop görüntüleri (ölçek: 200 µm)

PCR ile elde edilen gen ekspresyon sonuçlarına göre M0, M1 ve PdNP-Exo eksozomlarının uygulanan iki konsantrasyonda da (50 µg/ml ve 100 µg/ml) kontrol grubuna oranla tümör mikro-dokuların metastatik MMP2 geni üzerinde ekspresyonda azalmaya sebep olmuşlardır (M0 sırasıyla; 0,42 kat ve 0,87 kat, M1 sırasıyla; 0,95 kat ve 0,67 kat; PdNP-Exo sırasıyla; 0,37 ve 0,61 kat). M2 eksozomları düşük konsantrasyonu

mikro-dokularda MMP2 gen ekspresyon seviyesini arttırırken (2,26 kat) yüksek konsantrasyonu M2 eksozomları ise MMP2 gen ekspresyonu üzerinde kontrol grubuna oldukça yakın ekspresyon sonuçları (0,99 kat) vermiştir. Diğer bir metastatik gen olan MMP9 ekspresyonları değerlendirildiğinde, bütün eksozom çeşitleri farklı düzeylerde MMP9 gen ifadelerini baskıladığı gözlemlenmiştir (M0 sırasıyla; 0,48 kat ve 0,81 kat, M1 sırasıyla; 0,64 kat ve 0,72 kat, M2 sırasıyla; 0,95 kat ve 0,85 kat, PdNP-Exo sırasıyla; 0,61 kat ve 0,57 kat) (Şekil 5.20.A). MCF-7 tümör mikro-dokularında EMT ile ilişkili genler olan N-cad ve E-cad oranları incelendiğinde ise uygulanan M0, M1, M2 ve PdNP-Exo olmak üzere tüm eksozom türleri 50 µg/ml konsantrasyonu EMT'yi kontrol grubuna oranla baskıladığı gözlemlenmiştir (sırasıyla; 0,13 kat, 0,69 kat, 0,23 kat ve 0,16 kat). 100 µg/ml konsantrasyonda uygulanan eksozomlarda ise başta PdNP-Exo olmak üzere M1 eksozomlar ile birlikte EMT'yi baskıladığı gözlemlenmiştir (sırasıyla; 0,16 kat ve 0,85 kat). Bununla birlikte, M0 eksozomlarının EMT üzerinde kontrol grubuna yakın çıkmasından dolayı etkisiz olduğu gözlemlenirken (1,06 kat), M2 eksozomlarının EMT'yi teşvik ettiği belirlenmiştir (2,21 kat) (Şekil 5.20.B). Eksozomların tümör mikro-dokuların apoptotik p53 geni üzerinde etkileri incelendiğinde, 50 µg/ml konsantrasyonda kullanılan M0, M1, M2 ve PdNP-Exo eksozom grupları p53 gen aktivitesini kontrol grubuna göre ifadesini arttırdığı gözlemlenmiştir (sırasıyla; 2,15 kat, 7,25 kat, 1,73 kat ve 3,04 kat). Ek olarak, yüksek konsantrasyonda (100 µg/ml) eksozom uygulaması sonucu, tümör mikro-dokulardaki p53 geninin ekspresyonunda kontrol grubuna göre ciddi artışlar gözlemlenmiştir (sırasıyla; 5,9 kat, 3,85 kat, 7,02 kat ve 9,48 kat) (Şekil 5.20.C). Sonuç olarak, bütün grafikler değerlendirildiğinde özellikle PdNP-Exo grubunun mikro-dokular

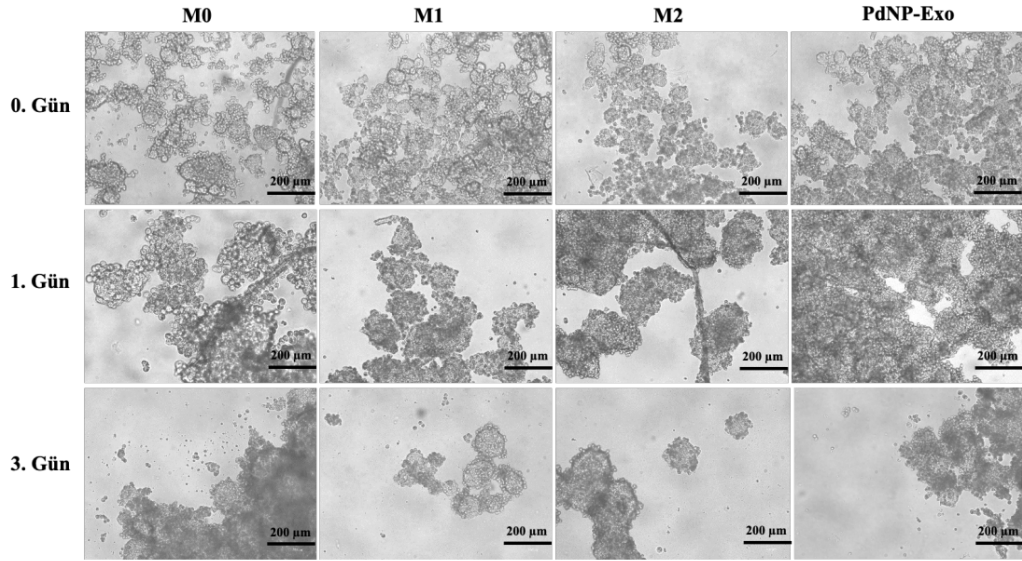
üzzerindeki p53 aktivasyonu ve EMT'ye etkileri göz önünde bulundurularak 100 µg/ml eksozom konsantrasyonu ile bundan sonraki deneylere devam edilmiştir.



Şekil 5.19 İki konsantrasyonda (50 µg/ml ve 100 µg/ml) uygulanan M0, M1, M2 ve PdNP eksozomların MCF-7 tümör mikro-dokular üzerindeki (A) metastaz genlerine, (B) EMT belirteci olan N-cad/E-cad oranına ve (C) apoptotik p53 genine etkilerini gösteren gen ifade seviyesi grafikleri

5.6.2 Eksozomların MCF-7 / HUVEC mikro-dokulara etkileri

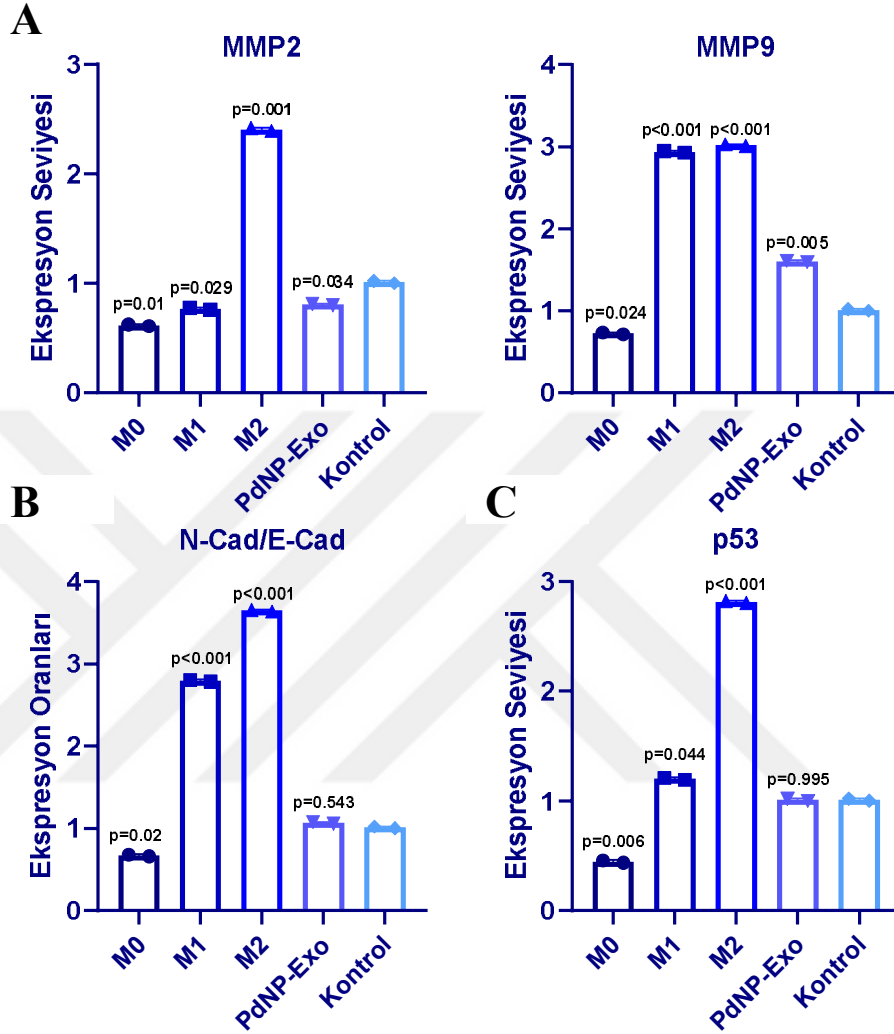
Tümör mikroçevresine daha yakın bir ortamda eksozomların etkilerini incelemek amacıyla MCF-7 meme kanseri hücrelerinin ve HUVEC hücrelerinin bir arada bulunduğu mikro-dokular oluşturulmuştur. Heterosferoid veya çok hücreli mikro-doku diye adlandırdığımız bu mikro-dokular, ayrı gruplar halinde dört tip eksozomun (100 µg/ml) varlığında 3 gün boyunca kültürlenmiştir. Kültür süresi boyunca alınan mikroskop görüntüleri incelendiğinde, çok hücreli mikro-dokuların ekiminin yapıldığı gün (0. Gün) mikro-dokuların boyutları daha küçük ve sayıları daha fazla olduğu gözlemlenmiştir. İnkübasyon süresi devam ettikçe mikro-dokuların birbirleri ile birleşmesi ve hücre proliferasyonu vesilesiyle daha büyük mikro-dokuların oluştuğu gözlemlenmiştir (Şekil 5.21).



Şekil 5.20 M0, M1, M2 ve PdNP eksozomları (100 µg/ml) ile kültürlenmiş MCF-7/HUVEC mikro-dokularının mikroskop görüntüleri (ölçek: 200 µm)

Dört farklı grup eksozom (M0, M1, M2 ve PdNP-exo) ile üç gün boyunca kültürlenmiş çok hücreli mikro-dokuların metastatik MMP2 ve MMP9 genlerinin ifade seviyeleri incelendiğinde, M2 eksozomlarının çok hücreli mikro-dokulardaki metastatik genlerin ifade seviyesini kontrol grubuna oranla arttırdığı gözlemlenmiştir (sırasıyla; 2,40 kat ve 3,03 kat). M1 eksozomlarının ve PdNP eksozomlarının MMP2 aktivitesi kontrole kıyasla

baskılanmışken (M1 eksozom 0,77 kat ve PdNP-Exo 0,81 kat), MMP9 aktivitesini ise arttırdığı gözlemlenmiştir (M1 eksozom 2,95 kat ve PdNP-Exo 1,61 kat). M0 türevli eksozomlar incelendiğinde ise çok hücreli mikro-dokuların metastatik genleri baskıladığı sonucuna varılmıştır (MMP2'yi 0,62 kat ve MMP9'u 0,73 kat) (Şekil 5.22.A). Buna ek olarak, eksozomların çok hücreli mikro-dokular üzerindeki EMT etkileri N-cad/E-cad oranı üzerinden incelendiğinde, M1 ve M2 eksozomları N-cad/E-cad ekspresyon oranı kontrol grubuna oranla yüksek çıkması (sırasıyla; 2,80 kat ve 3,65 kat) bu eksozomların çok hücreli mikro-dokuları EMT'ye teşvik ettiğini göstermiştir. Bununla beraber, M0 eksozomlarının uygulandığı grup kontrol grubuna göre N-cad/E-cad ekspresyon oranında düşüş gözlemlenirken (0,67 kat), PdNP eksozomları ise p53 gen ekspresyon sonuçlarına benzer bir şekilde kontrol grubu ile anlamlı bir fark oluşturmadığı gözlemlenmiştir (1,06 kat) (Şekil 5.22.B). Eksozomların çok hücreli mikro-dokulardaki p53 apoptotik gen ifade seviyesindeki değişimler incelendiğinde ise, M1 ve M2 eksozomlar ile kültürlenen çok hücreli mikro-dokularda p53 ekspresyon seviyesinde kontrol grubuna oranla artış olduğu gözlemlenmiştir (sırasıyla; 1,20 kat ve 2,82 kat). Bununla beraber M0 eksozomlar, p53 gen aktivasyonunu kontrol grubuna oranla baskıarken (0,44 kat), PdNP eksozomlar ise p53 gen aktivasyonunda anlamlı bir etkisi olmadığı (1,01 kat) gözlemlenmiştir (Şekil 5.22.C).

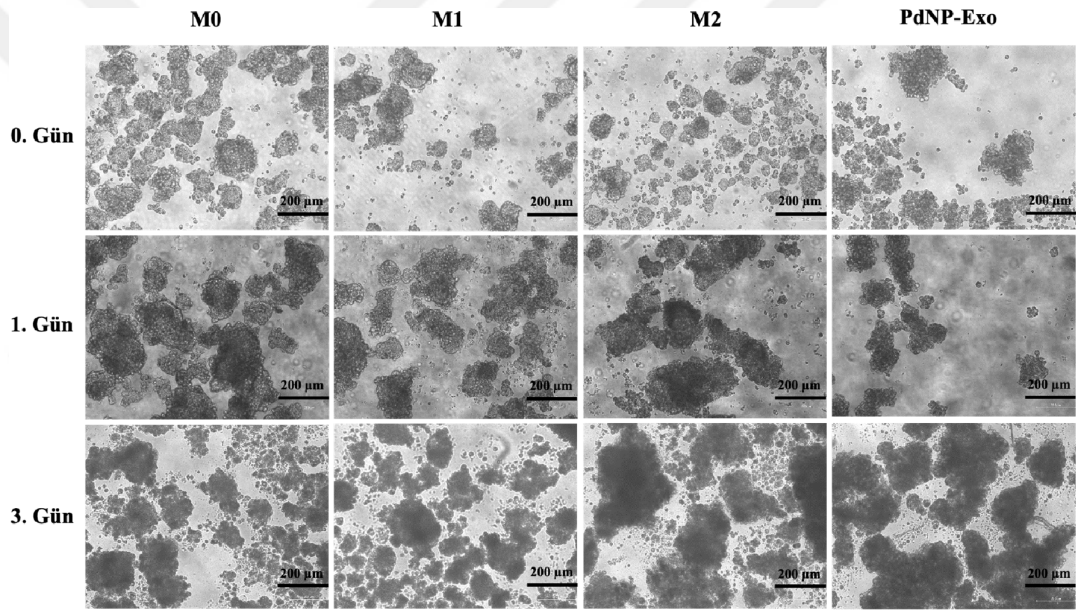


Şekil 5.21 M0, M1, M2 ve PdNP eksozomları ile kültürlenmiş MCF-7/HUVEC çok hücreli mikro-dokuların (A) metastatik belirteç genleri olan MMP2 ve MMP9, (B) EMT belirteç genlerinin oranı üzerindeki etkilerini belirten gen ekspresyon grafikleri ve (C) apoptotik p53 geni ekspresyon grafiği

5.6.3 Eksozomların MCF-7 / HUVEC / phDF mikro-dokulara etkileri

Tümör mikroçevresine daha yakın bir ortamda eksozomların etkilerini incelemek amacıyla MCF-7 meme kanseri hücrelerinin ve HUVEC hücrelerinin yanı sıra bir de birincil insan dermal fibroblast (phDF) hücrelerinin de bir arada bulunduğu çok hücreli mikro-dokular oluşturulmuştur. Çok hücreli mikro-dokular diye adlandırdığımız bu

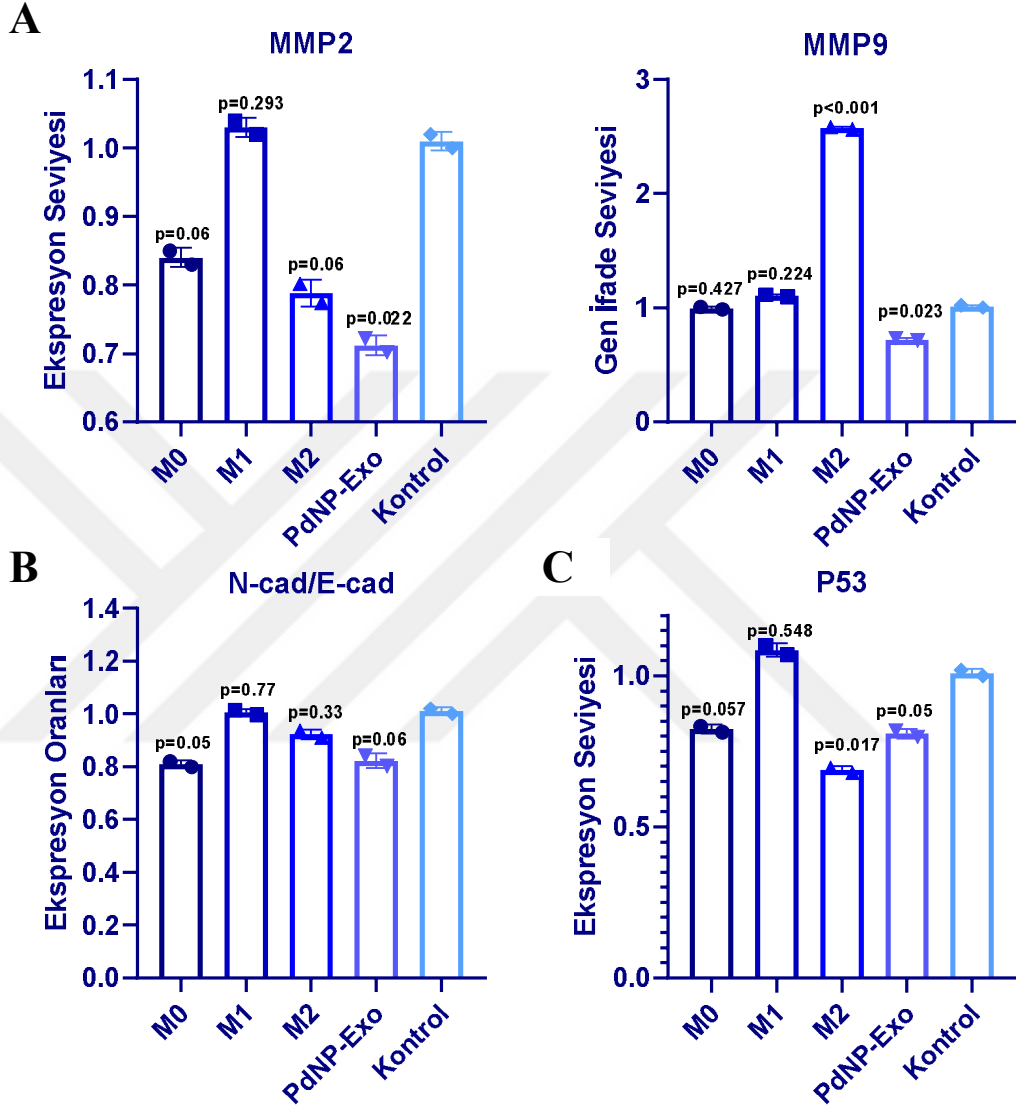
mikro-dokular, ayrı gruplar halinde dört tip eksozomun (100 µg/ml) varlığında 3 gün boyunca kültürlenmiştir. Kültür süresi boyunca mikroskop görüntüleri alınmıştır ve inkübasyon süresi sonrası gen ifadeleri incelenmiştir. Kültür süreci boyunca alınan mikroskop görüntüleri incelendiğinde, MCF-7/HUVEC mikro-dokulara benzer bir şekilde MCF-7/HUVEC/phDF çok hücreli mikro-dokularda da ekiminin yapıldığı gün (0. Gün) mikro-dokuların boyutları daha küçük ve sayıları daha fazla olduğu gözlemlenmiştir. Yine benzer bir şekilde, inkübasyon süresi devam ettikçe mikro-dokuların birbirleri ile birleşmesi ve hücre proliferasyonu vesilesiyle daha büyük mikro-dokuların oluştuğu gözlemlenmiştir (Şekil 5.23).



Şekil 5.22 M0, M1, M2 ve PdNP eksozomları (100 µg/ml) ile kültürlenmiş MCF-7/HUVEC/phDF mikro-dokularının mikroskop görüntüleri (ölçek: 200 µm)

Dört farklı eksozom grubu (M0, M1, M2 ve PdNP-exo) ile üç gün boyunca kültürlenmiş çok hücreli mikro-dokuların metastatik MMP2 ve MMP9 genlerinin ekspresyon seviyeleri incelendiğinde, PdNP-Exo grubu mikro-dokulardaki hem MMP2 (0,71 kat) hem de MMP9 (0,72 kat) gen ekspresyonunu kontrol grubuna göre azalttığı gözlemlenmiştir. Bununla beraber, M0, M1 ve M2 eksozomları MMP2 ve MMP9 üzerinde değişken sonuçlara neden olduğu gözlemlenmiştir. M0 eksozomları, MMP2 ekspresyonunu kontrol grubuna oranla az baskılayarak (0,84 kat), MMP9 aktivasyonuna

anamlı bir etkisi olmadığı gözlemlenmiştir (0,99 kat). M1 eksozomları ise MMP2 aktivasyonu üzerinde anlamlı bir etki göstermezken (1,03 kat), MMP9 gen ekspresyon seviyesinde kontrol grubuna oranla ufak bir artışa sebep olduğu gözlemlenmiştir (1,11 kat). M2 eksozom grubu, mikro-dokulardaki MMP2 aktivasyonunu kontrol grubuna kıyasla (0,78 kat) baskılarken, MMP9 ekspresyonunda net bir artışa (2,57 kat) sebep olduğu gözlemlenmiştir (şekil 5.24.A). Eksozomların çok hücreli mikro-dokularda EMT üzerine etkisi N-cad ve E-cad genlerinin oranları üzerinden incelenmiştir. M0, M2 ve PdNP-Exo grupları çok hücreli mikro-dokularda EMT'yi kontrol grubuna oranla yüksek seviyelerde olmasa da baskıladığı gözlemlenmiştir (sırasıyla; 0,81 kat, 0,90 kat ve 0,85 kat). M1 ve kontrol gruplarının N-cad/E-cad oranları birbirlerine eşit çıkması sebebi ile M1 eksozomlarının çok hücreli mikro-dokuların EMT'si üzerinde etkisiz olduğu gözlemlenmiştir (şekil 5.24.B). Eksozomların mikro-dokular üzerindeki apoptotik etkileri p53 geni ekspresyonu üzerinden incelendiğinde, EMT sonuçlarına benzer sonuçlara rastlanmıştır. M0, M2 ve PdNP-Exo grupları çok hücreli mikro-dokuların p53 gen ekspresyon seviyelerini azaltırken (sırasıyla; 0,82 kat, 0,69 kat ve 0,80 kat), M1 eksozomları p53 gen aktivasyonu üzerinde anlamlı bir etkisi olmadığı (1,08 kat) gözlemlenmiştir (şekil 5.24.C).

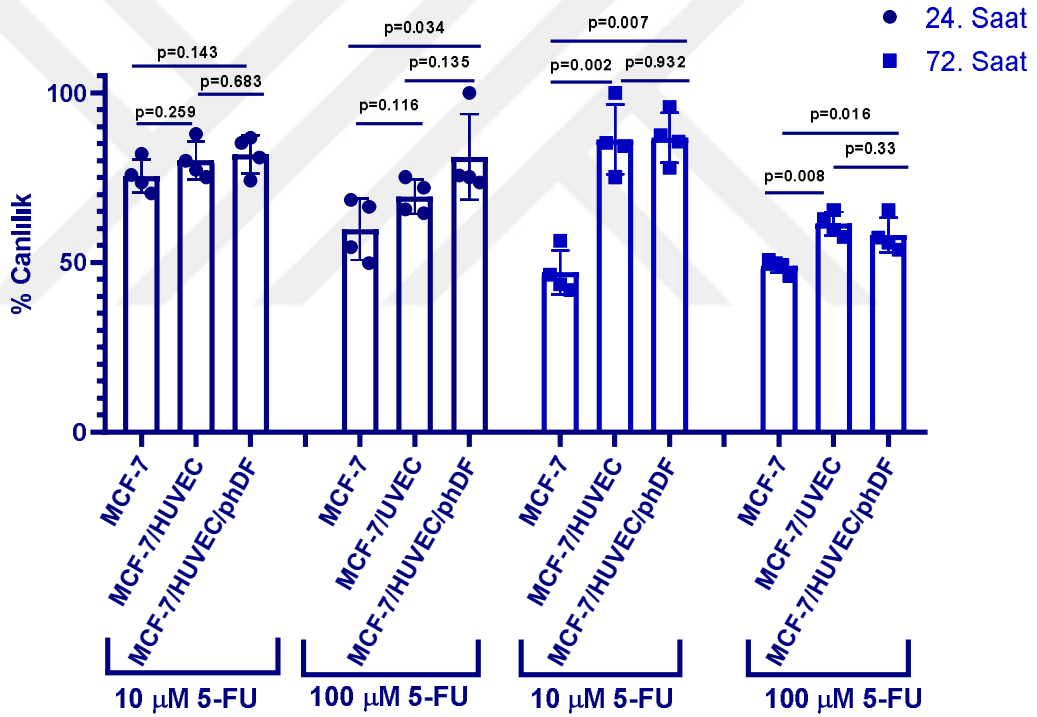


Şekil 5.23 M0, M1, M2 ve PdNP eksozomları ile kültürlenmiş MCF-7/HUVEC/phDF çok hücreli mikro-dokuların (A) metastatik belirteç genleri olan MMP2 ve MMP9 üzerindeki, (B) EMT belirteç genlerinin oranı üzerindeki ve (C) apoptotik p53 geni üzerindeki etkilerini belirten gen ekspresyon grafikleri

5.7 Eksozomların ve Sağlıklı Hücrelerin (HUVEC ve phDF) Anti-Kanser İlaç Cevabına Etkileri

5.7.1 Sağlıklı hücrelerin (HUVEC ve phDF) anti-kanser ilaç cevabına etkileri

In-vivo tümör mikroçevre koşullarını *in-vitro* ortamda taklit edebilmek amacı ile oluşturulan çok hücreli mikro-dokuların (MCF-7/HUVEC ve MCF-7/HUVEC/phDF) anti-kanser ilacı olan 5-FU'nun anti kanser aktivitesi üzerindeki etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır. 24 saat ve 72 saat boyunca 5-FU ile etkileştirilen mikro-dokuların XTT testi ile canlılıkları incelenmiştir.



Şekil 5.24 MCF-7, MCF-7/HUVEC ve MCF-7/HUVEC/phDF mikro-dokularının iki farklı doz (10 µM ve 100 µM) ve iki farklı zaman oktasında XTT ile alınan % canlılık grafiği

XTT testi sonucu, 10 µM 5-FU dozunun 24 saat uygulanması, 5-FU etkinliğinin MCF-7 (%76), MCF-7/HUVEC (%80) ve MCF-7/HUVEC/phDF (%82) mikro-dokuları üzerinde düşük olduğu gözlemlenmiştir. Aynı inkübasyon süresinde ilaç dozu 100 µM' a çıkarıldığında ise 5-FU, MCF-7 mikro-dokuların canlılıklarını %58'e düşürmüştür. 24

saat boyunca 100 μ M 5-FU ile tedavi edilen MCF-7/HUVEC mikro-dokularında (% 69), tümör mikro-dokulara oranla daha az olsa da canlılıkta düşüş görülmüştür. Aynı şartlar altında tedavi edilen MCF-7/HUVEC/phDF çok hücreli mikro-dokularda ise canlılık %81 seviyesinde kaldığı dolayısıyla ilaç dozunun artmasının MCF-7/HUVEC/phDF üzerinde 5-FU aktivitesini etkilemediği gözlemlenmiştir. İlaç uygulama süresi 72 saate çıkarıldığında, düşük doz 5-FU'nun (10 μ M) MCF-7 (% 47) tümör mikro-dokuları üzerinde etkili olduğu gözlemlenmiştir. Ancak, MCF-7/HUVEC (% 86) ve MCF-7/HUVEC/phDF (% 87) çok hücreli mikro-dokularda 5-FU ilaç etkinliğinin azaldığı gözlemlenmiştir. Ek olarak, 72 saat 100 μ M 5-FU ilaç tedavisinde MCF-7 (%49), MCF-7/HUVEC (%61) ve MCF-7/HUVEC/phDF (%58) mikro-dokuları olmak üzere bütün mikro-doku türevleri üzerinde 5-FU etkinliğinin arttığı gözlemlenmiştir (Şekil 5.25). 5-FU anti-kanser ilacının iki farklı doz ve inkübasyon süresinde, farklı tip mikro-dokular üzerindeki etkinliği Çizelge 5.2'de sunulmuştur.

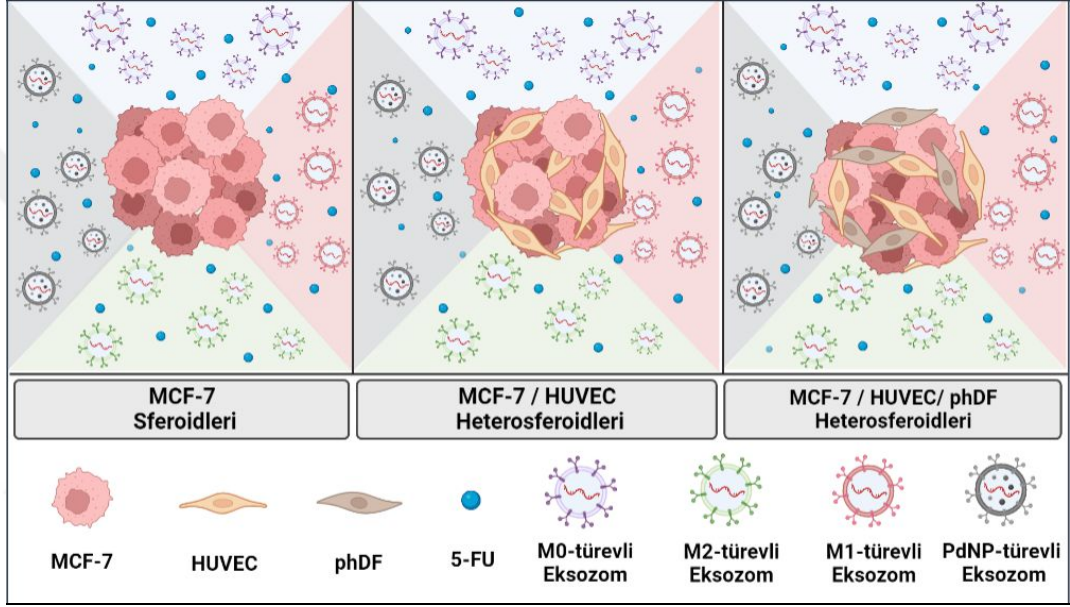
Çizelge 5.2 5-FU anti-kanser ilacının iki farklı doz ve inkübasyon sürelerinde, farklı tip mikro-dokular üzerindeki etkinliği

İnkübasyon Süresi	Doz	MCF-7 Tümör Mikro-dokuları	MCF-7/HUVEC Çok Hücreli Mikro-dokular	MCF-7/HUVEC/phDF Çok Hücreli Mikro-dokular
24 saat	10 μ M	—	—	—
	100 μ M	↑	—	↓
72 saat	10 μ M	↑	↓	↓
	100 μ M	↑	↓	↓

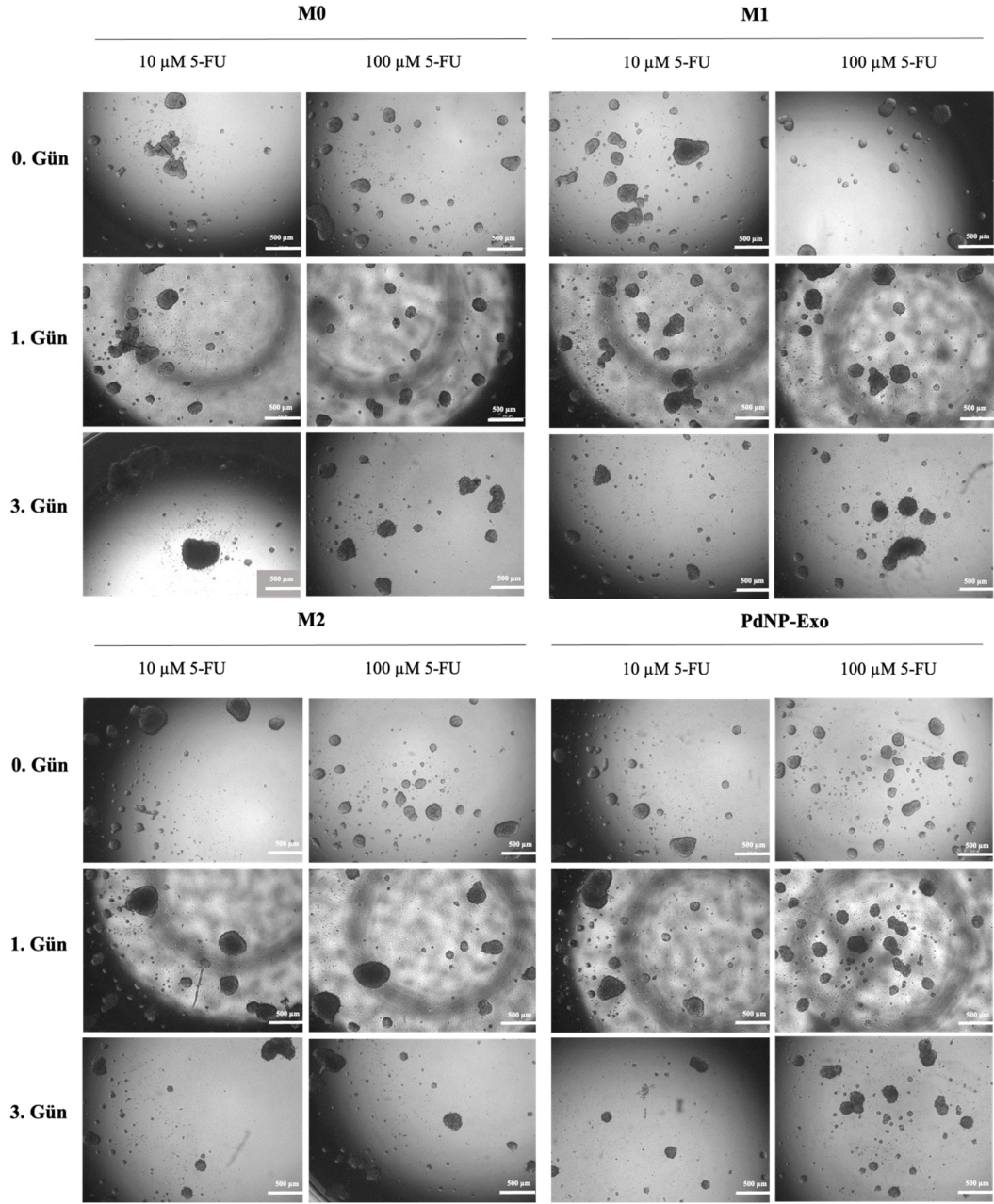
5.7.2 Eksozomların anti-kanser ilaç cevabına etkileri

In-vivo tümör mikroçevre koşullarını *in-vitro* ortamda taklit edebilmek amacı ile oluşturulan çok hücreli mikro-dokularına (MCF-7/HUVEC ve MCF-7/HUVEC/phDF) dört farklı grup halinde uygulanan eksozomların (M0, M1, M2 ve PdNP-exo) anti-kanser ilacı olan 5-FU'nun aktivitesi üzerindeki etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bir kez uygulanan eksozomlar (100 μ g/ml) ve 5-FU anti-kanser ilacının iki konsantrasyonu (10 μ M ve 100 μ M) ile oluşturulan deney planında 24 saat ve 72 saat tedavi sonrası mikro-dokulardaki canlılık sonuçları XTT testi ile elde edilmiştir. Oluşturulan deney planının

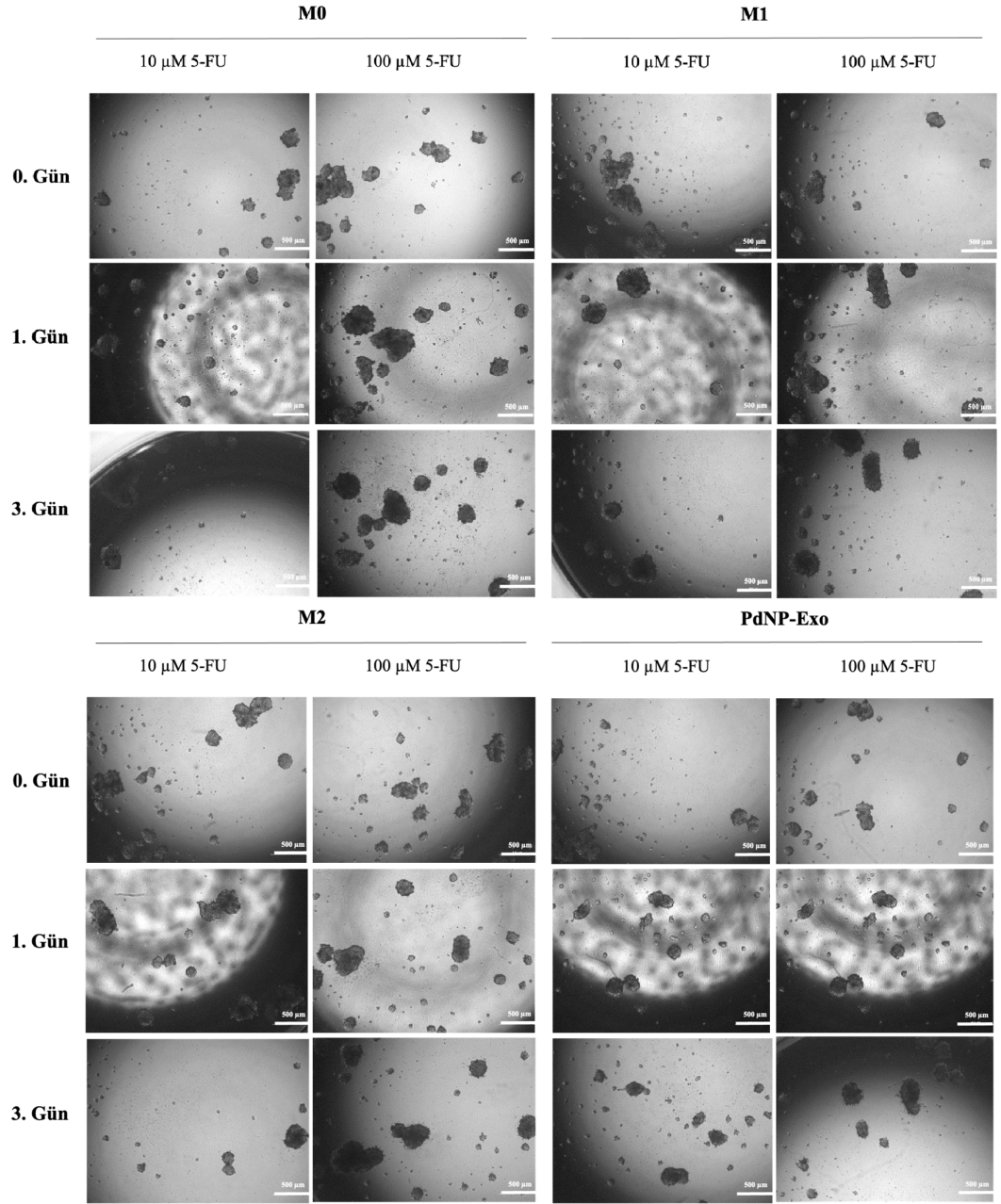
temsili görseli Şekil 5.26'da sunulmuştur. Dörk farklı eksozom ve iki farklı dozda ilaç uygulanan MCF-7 tümör mikro-dokulardan belirli zaman noktalarında alınan mikroskop görüntüleri Şekil 5.27'de, MCF-7/HUVEC çok hücreli mikro-dokulardan alınan mikroskop görüntüleri Şekil 5.28'de ve MCF-7/HUVEC/phDF çok hücreli mikro-dokulardan alınan mikroskop görüntüleri ise Şekil 5.29'da sunulmuştur.



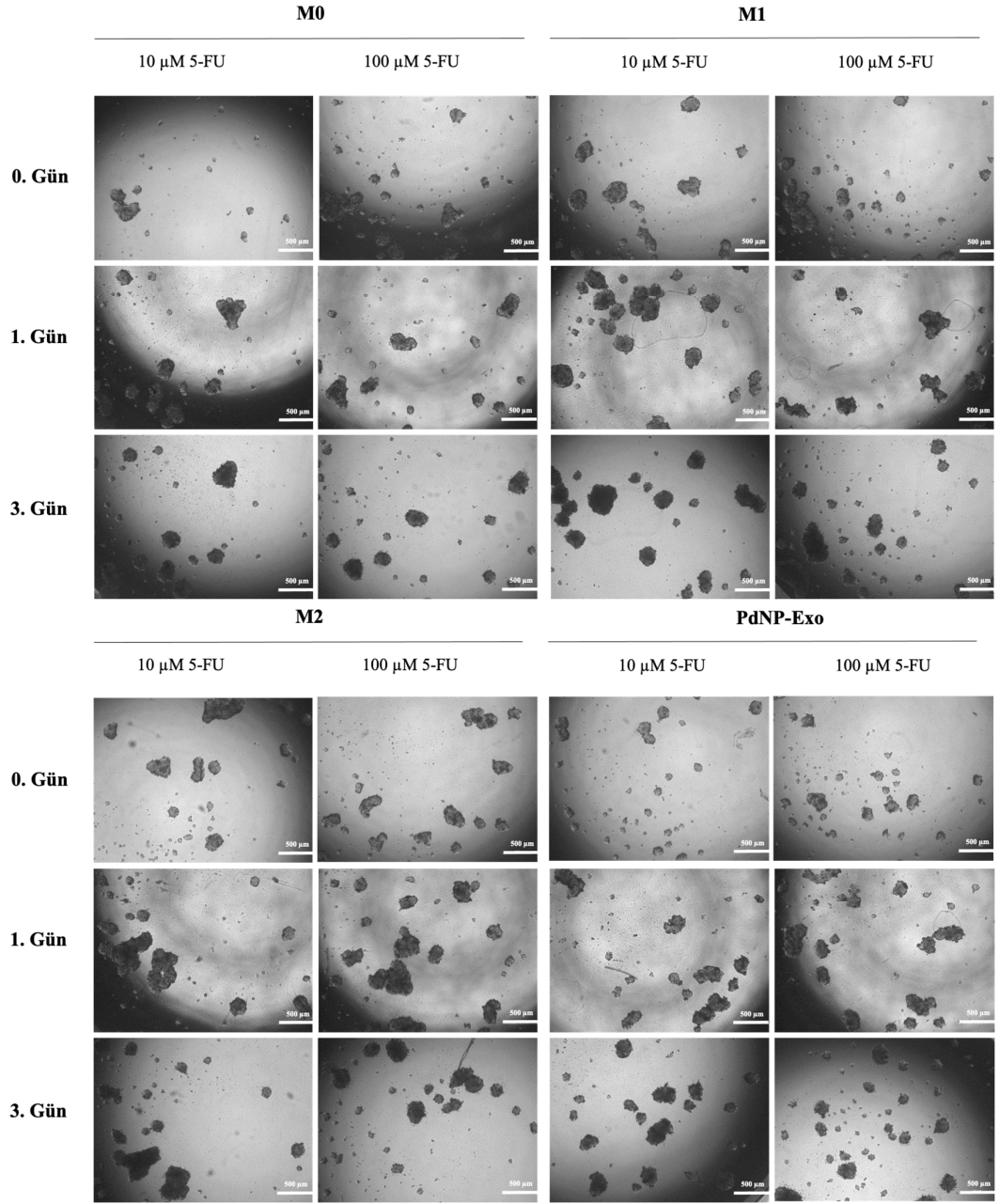
Şekil 5.25 Eksozomlu ilaç deneylerinin temsili görseli



Şekil 5.26 4 grup halide uygulanan eksozomların (M0, M1, M2 ve PdNP-Exo) ve 5-FU anti-kanser ilacı (10 μ M ve 100 μ M) uygulanan MCF-7 tümör mikrodokuların belirlenen zaman noktalarında alınan mikroskop görüntüleri (ölçek: 500 μ m)



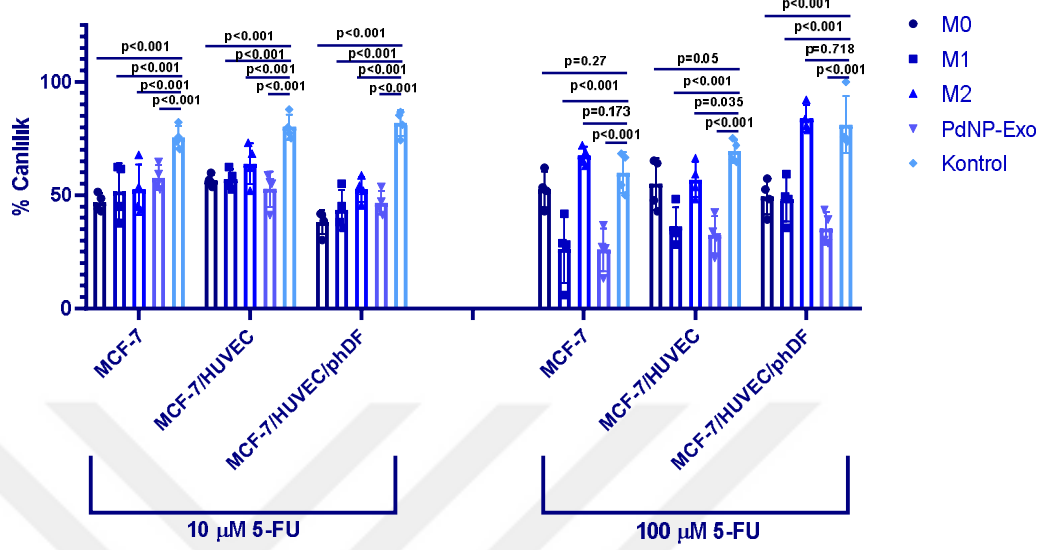
Şekil 5.27 4 grup halide uygulanan eksozomların (M0, M1, M2 ve PdNP-Exo) ve 5-FU anti-kanser ilacı (10 μ M ve 100 μ M) uygulanan MCF-7/HUVEC çok hücreli mikro-dokuların belirlenen zaman noktalarında alınan mikroskop görüntüleri (ölçek: 500 μ m)



Şekil 5.28 4 grup halide uygulanan eksozomların (M0, M1,M2 ve PdNP-Exo) ve 5-FU anti-kanser ilacı (10 μ M ve 100 μ M) uygulanan MCF-7/HUVEC/phDF çok hücreli mikro-dokuların belirlenen zaman noktalarında alınan mikroskop görüntüleri (ölçek: 500 μ m)

XTT sonuçları incelendiğinde, bütün eksozom türlerinin 24 saat boyunca düşük doz 5-FU tedavisi ilaç etkinliğini üç mikro-doku türü üzerinde de arttırdığı gözlemlenmiştir. Öyle ki, M0 eksozomlar ve 5-FU (10 µM) MCF-7 tümör mikro-dokuların canlılığını % 46'ya, MCF-7/HUVEC çok hücreli mikro-dokuların canlılığını % 53'e ve MCF-7/HUVEC/phDF çok hücreli mikro-dokuların canlılığını ise % 30'a düşürdüğü gözlemlenmiştir. Aynı şekilde, M1 eksozom ve 5-FU tedavisinde mikro-dokuların canlılıkları sırasıyla %51, %57 ve % 43 seviyesine düşürdüğü belirlenmiştir. Bununla beraber, M2 eksozom ve ilaç tedavisinde mikro dokulardaki canlılık sırasıyla %43, %63 ve %52 seviyelerine düşerken PdNP eksozomları ve 5-FU ile tedavi edilen mikro-dokularda canlılık sırasıyla %57, %52 ve %46 seviyelerine düşmüştür. Eksozomların yüksek doz (100 µM) ilaç aktivitesine etkileri incelendiğinde ise, M0, M1 ve PdNP eksozomlarının bütün mikro-doku türlerinde ilaç etkinliğini arttırdığı gözlemlenmiştir. M0 eksozomlar ve yüksek dozda 5-FU ile tedavi, mikro-dokularda canlılığı sırasıyla %52, %54 ve % 50 seviyelerine düşürmüştür. M1 eksozomlar ve yüksek dozda 5-FU ile tedavi, mikro-dokularda canlılığı sırasıyla %26, %36 ve %48 seviyelerine indirirken PdNP eksozomları ise mikro-dokulardaki canlılığı %25, %22 ve %35 seviyelerine çekmiştir. Ancak, M2 eksozomları mikro-dokulardaki canlılığı kontrol grubuna oranla düşürmediği veya çok az derecede düşürdüğü gözlemlenmiştir. Öyle ki, MCF-7 tümör mikro-dokularında kontrol grubunda canlılık %60 iken, M2 eksozom grubunda canlılık %68 seviyesine çıkmıştır. MCF-7/HUVEC çok hücreli mikro-dokuların kontrol grubunda canlılık %69 seviyesindeyken, M2 eksozom grubu bu canlılığı sadece %56 seviyelerine çekebilmiştir. MCF-7/HUVEC/phDF çok hücreli mikro-dokuların kontrol grubundaki canlılık %81 iken M2 eksozom grubu canlılığı %83 seviyesine çektiği gözlemlenmiştir (Şekil 5.30).

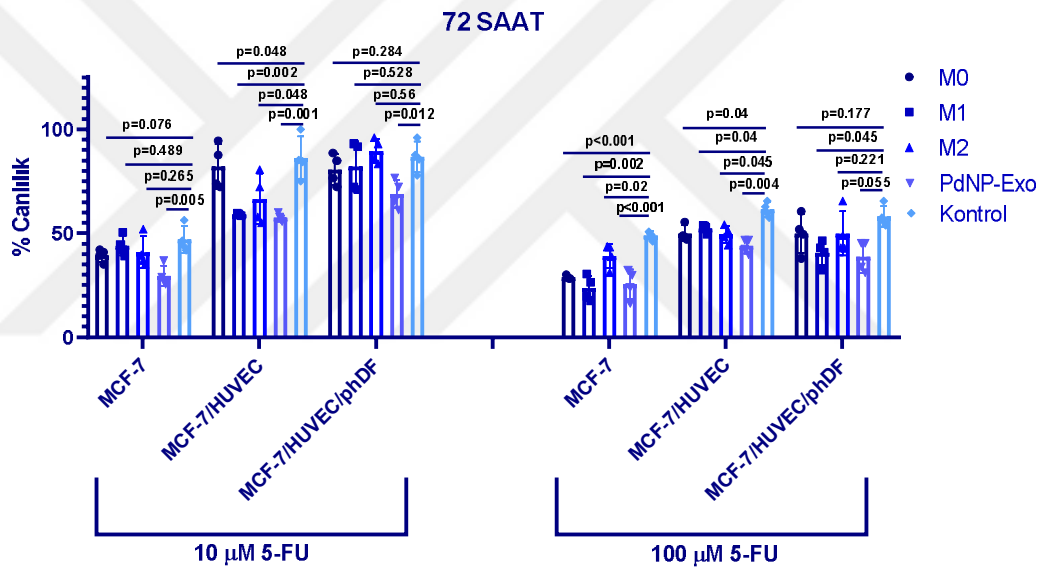
24. SAAT



Şekil 5.29 100 µg/ml Eksozom (M0, M1, M2 ve PdNP-Exo) ve 5-FU anti-kanser ilacı (10 µM ve 100 µM) ile 24 saat boyunca tedavi edilen mikro-dokuların (MCF-7, MCF-7/HUVEC, MCF-7/HUVEC/phDF) % canlılık grafiği

4 farklı eksozom grubu ve iki 5-FU konsantrasyonunda 72 saat tedavi edilen mikro-dokulardaki canlılıklar incelenerek eksozom gruplarının 5-FU anti-kanser ilacının aktivitesine etkileri araştırılmıştır. İlk olarak, eksozom gruplarının düşük doz (10 µM) 5-FU ilacının aktivitesine etkileri incelendiğinde, M0 eksozomları MCF-7, MCF-7/HUVEC ve MCF-7/HUVEC/phDF olmak üzere üç mikro-doku üzerinde ilaç etkinliğine ciddi bir etkisi olmadığı gözlemlenmiştir. Öyle ki, MCF-7 tümör mikro-dokularında kontrol grubunda canlılık %47 iken, M0 eksozomlarının uygulandığı grupta canlılık %40 seviyesinde kalmıştır. MCF-7/HUVEC çok hücreli mikro-dokuların kontrol grubunda canlılık %86 seviyesindeyken, M0 eksozomlarının uygulandığı grupta canlılık %82 seviyesinde kalmıştır. MCF-7/HUVEC/phDF çok hücreli mikro-dokuların kontrol grubundaki canlılık ise %87 iken, M0 eksozomlarının uygulandığı grupta canlılık %81 seviyesinde kalmıştır. M1 eksozomlarının düşük dozda ilaç aktivitesine etkileri incelendiğinde ise mikro-doku türleri arasında değişkenlikler gözlemlenmiştir. MCF-7 tümör mikro-dokularında, M1 eksozomları canlılığı kontrol grubuna yakın bir canlılık seviyesi olan %44 seviyesinde tutmuştur. Benzer bir şekilde, MCF-7/HUVEC/phDF çok hücreli mikro-dokularında da canlılığı kontrol grubuna yakın bir seviye olan %81 seviyesinde tutarak ilaç aktivitesine etkisi olmadığı gözlemlenmiştir. Ancak, M1

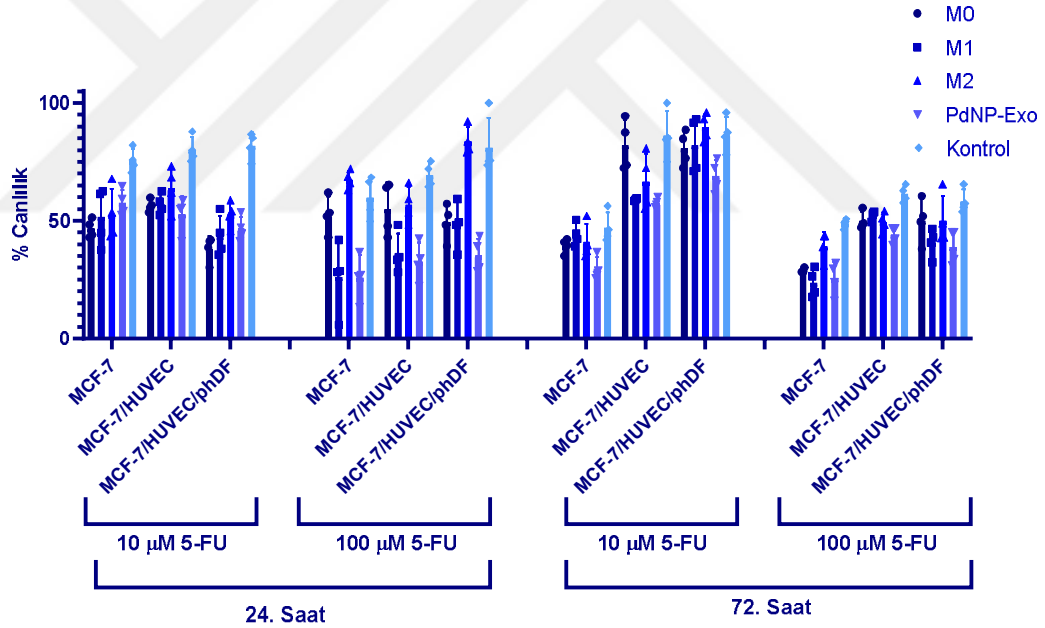
eksozomları MCF-7/HUVEC çok hücreli mikro-dokuların canlılık seviyesini %59'a düşürerek ilaç aktivitesine katkıda bulunduğu gözlemlenmiştir. M2 eksozomları ise, MCF-7 ve MCF-7/HUVEC/phDF mikro-dokuların canlılıklarını sırasıyla %41 ve %89 düzeyinde tutarak kontrol grubuna yakın değerler verdiği gözlemlenmiştir. Ancak, MCF-7/HUVEC üzerinde ise canlılığı %66'ya düşürerek ilaç etkinliğini desteklediği gözlemlenmiştir. PdNP eksozomları ve düşük doz 5-FU ile 72 saat boyunca tedavi edilen bütün mikro-doku türlerinde canlılıkları kontrol grubuna oranla daha düşük seviyelere indirerek ilaç aktivitesine katkısını göstermiştir (MCF-7 %29, MCF-7/HUVEC %57 ve MCF-7/HUVEC/phDF %69) (Şekil 5.31).



Şekil 5.30 100 µg/ml Eksozom (M0, M1, M2 ve PdNP-Exo) ve 5-FU anti-kanser ilacı (10 µM ve 100 µM) ile 72 saat boyunca tedavi edilen mikro-dokuların (MCF-7, MCF-7/HUVEC, MCF-7/HUVEC/phDF) % canlılık grafiği

Eksozom gruplarının yüksek doz (100 µM) 5-FU ilacının aktivitesine etkileri incelendiğinde, M0 eksozomlarının ilaç aktivitesine etkileri farklı mikro-dokular üzerinde değişiklikler gösterdiği saptanmıştır. MCF-7 tümör mikro-dokularında kontrol grubunda canlılık %49 iken, M0 eksozomlarının uygulandığı grupta canlılık %29 seviyesine düşmüştür. MCF-7/HUVEC çok hücreli mikro-dokuların kontrol grubunda canlılık %61 seviyesindeyken, M0 eksozomlarının uygulandığı grupta canlılık %57 seviyesinde kalmıştır. MCF-7/HUVEC/phDF çok hücreli mikro-dokuların kontrol

grubundaki canlılık ise %58 iken, M0 eksozomlarının uygulandığı grupta canlılık %50 seviyesinde kalmıştır. M1 eksozomları ve yüksek doz 5-FU ile tedavi edilen eksozomlarda canlılıklar sırasıyla %23, %52 ve %40 seviyelerinde olması M1 eksozomlarında ilaç aktivitesi üzerindeki etkileri mikro-dokulara bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. M2 eksozomlar ise kontrol grubu ile karşılaştırıldığında MCF-7 (%40) ve MCF-7/HUVEC/phDF (%50) mikro-dokuları üzerinde yüksek dozda ilaç etkinliğine net bir etkisi olmadığı gözlemlenmiştir. Son olarak, PdNP eksozomları ve yüksek doz 5-FU ile 72 saat boyunca tedavi edilen bütün mikro-doku türlerinde canlılıkları kontrol grubuna oranla daha düşük seviyelere indirerek ilaç aktivitesine katkısının olduğu gözlemlenmiştir (MCF-7 %23, MCF-7/HUVEC %44 ve MCF-7/HUVEC/phDF %39) (Şekil 5.31).



Şekil 5.31 100 µg/ml Eksozom (M0, M1, M2 ve PdNP-exo) ve 5-FU anti-kanser ilacı (10 µM ve 100 µM) ile tedavi edilen mikro-dokuların (MCF-7, MCF-7/HUVEC, MCF-7/HUVEC/phDF) genel % canlılık grafiği

Eksozomların (M0, M1, M2 ve PdNP-Exo) farklı inkübasyon süresinde (24 saat ve 72 saat) ve ilaç dozlarında (10 µM ve 100 µM) tümör mikro-dokuları ve çok hücreli mikro-dokular üzerindeki canlılıklarına etkileri Şekil 5.32'deki genel % canlılık grafiğinde sunulmuştur. Özetle, PdNP eksozomlar haricindeki diğer bütün eksozom çeşitleri farklı

ilaç dozları, farklı tedavi süreleri ve farklı mikro-dokular üzerinde değişken sonuçlar gösterirken M1 ve PdNP türevli eksozomlar her durum ve koşulda ilaç etkinliğini arttırdığı gözlemlenmiştir (Çizelge 5.3).

Çizelge 5.3 Eksozomların (M0, M1, M2 ve PdNP-exo) farklı inkübasyon süresinde (24 saat ve 72 saat) ve ilaç dozlarında (10 μ M ve 100 μ M) tümör mikro-dokuları ve çok hücreli mikro-dokular üzerindeki ilaç aktivitesine etkileri

İnkübasyon Süresi	Doz	Eksozom Türü	MCF-7 Tümör Mikro-dokuları	MCF-7/HUVEC Çok Hücreli Mikro-dokular	MCF-7/HUVEC/phDF Çok Hücreli Mikro-dokular
24 saat	10 μ M	M0	↑	↑	↑
		M1	↑	↑	↑
		M2	↑	↑	↑
		PdNP	↑	↑	↑
	100 μ M	M0	—	—	↑
		M1	↑	↑	↑
		M2	↓	—	↓
		PdNP	↑	↑	↑
72 saat	10 μ M	M0	—	—	—
		M1	—	↑	—
		M2	—	↑	—
		PdNP	↑	↑	↑
	100 μ M	M0	↑	—	—
		M1	↑	—	↑
		M2	—	↑	—
		PdNP	↑	↑	↑

6. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada, tümör immün mikroçevresinin en önemli hücrelerinden biri olan makrofajlar çeşitli nanopartiküller ve bu nanopartiküllerin farklı dozları ile indüklenmiştir. Uygulanan yedi farklı nanopartikül ve her bir nanopartikülün iki farklı dozunun makrofajlar üzerindeki sitotoksitesi XTT testi ile incelenmiştir. Bunun yanı sıra, uygulanan nanopartiküllerin makrofaj polarizasyonuna etkileri gen ekspresyon düzeyinde M1 makrofaj belirteçleri olan CD64 ve STAT-1; M2 makrofaj belirteçleri olarak ise CD163 ve STAT-6 genleri hedeflenerek RT-qPCR ile incelenmiştir. Elde edilen sonuçlarla beraber nanopartikül tarama skalası yedi nanopartikülden iki farklı nanopartiküle (Zn-Ni-FeO NP ve PdNP) indirgenmiştir. Zn-Ni-FeO NP ve PdNP'lerin farklı dozlarının (10 µg/ml ve 50 µg/ml) makrofajlar üzerindeki pro-inflamatuar TNF-α sitokin salımına etkileri ve makrofajların hücre içerisine alımını teyit etmek için yapılan TEM çalışmaları sonrasında yedi farklı nanopartikül arasından paladyum nanopartiküllerinin yüksek dozunun (PdNP, 50 µg/ml) M1-makrofaj polarizasyonu için en olumlu sonuçlar verdiği gözlemlenmiştir. Ardından farklı tür makrofaj fenotipleri (M0, M1, M2 ve PdNP indüklenmiş) ve MCF-7 tümör mikro-dokuları ile eş-kültür sistemi kurulmuştur. Böylelikle, farklı fenotipe sahip makrofajların MCF-7 tümör mikro-dokusu üzerinde apoptoz, metastaz ve EMT ilişkili gen ekspresyon seviyeleri düzeyinde incelenmiştir. Devamında, farklı fenotipe sahip makrofajlardan elde edilen eksozomların tümör mikro-dokuları ve çok hücreli (multi-selüler) mikro-dokular üzerindeki apoptotik, metastatik ve EMT ilişkili genlerin ekspresyon seviyelerine etkileri incelenmiştir. Aynı zamanda farklı tip eksozomların (M0, M1, M2 ve PdNP-Exo), MCF-7 meme kanseri hücrelerinin invazif özelliklerine etkileri *in vitro* yara kapama (scratch assay) deneyi kurularak gözlemlenmiştir. Son olarak, izole edilen eksozomların ve tümör mikroçevre elemanlarından olan endotel hücreler ve fibroblast hücrelerinin, MCF-7 mikro-dokuları üzerindeki kemodirence etkileri XTT testi yardımıyla incelenmiştir.

Çalışmanın ilk aşamasında 7 farklı nanopartikülün (Zn-Ni-FeO, Cu(II)O, Pd, Pt, Au, GO ve CdSeS/ZnS kuantum noktacılar) ikişer dozu makrofajlar üzerine polarizasyonu indüklemek amacıyla uygulanmıştır. 48 saat süren nanopartikül indüklemesi sonucu nanopartiküllerin makrofajlar üzerindeki polarizasyon ve sitotoksik etkileri incelenmiştir.

Uygulanacak nanopartikül konsantrasyonlarına ve ikübasyon sürelerine literatürde bulunan çalışmalar ışığında karar verilmiştir (Gatto vd. 2017; Feito vd. 2019; Chen vd. 2022; Bastus vd. 2009). 48 saat sonrasında alınan mikroskop görüntüleri (Şekil 5.1) ve XTT sonuçlarına (Şekil 5.2) dayanılarak makrofajlar üzerinde sitotoksik etki oluşturmayan nanopartiküller ve dozları belirlenmiştir. XTT sonuçları göz önünde bulundurulduğunda, Cu(II)O' nun, GO' nun ve CdSeS/ZnS kuantum noktalarının yüksek dozları haricinde bütün nanopartikül ve dozlarının makrofaj canlılığına üzerinde ciddi bir düşüşe sebep olmadığı gözlemlenmiştir. Nanopartikül taramasının bir sonraki aşamasında makrofaj hücreleri üzerinde sitotoksik etki oluşturmayan nanopartiküllerin (Zn-Ni-FeO NP, PdNP, PtNP, AuNP) makrofaj polarizasyon karakterizasyonu için M1 makrofaj belirteç genleri olan CD64 ve STAT-1; M2 makrofaj belirteç genleri olan CD163 ve STAT-6 genlerinin ekspresyon seviyeleri RT-qPCR yöntemi ile incelenmiştir (Şekil 5.3). Ek olarak, nanopartiküllerin yanı sıra M1 makrofaj polarizasyonuna indüklediği bilinen LPS/IFN γ ve M2 makrofaj polarizasyonunu teşvik ettiği bilinen IL-10 sitokini pozitif kontrol grupları olarak kullanılmıştır (Chen vd. 2022). Genel nanopartikül taramasının RT-qPCR sonuçları, CD64 / CD163 ve STAT-1 / STAT-6 gen ifade oranlarına dayanarak M1 makrofaj polarizasyonuna indüklemek için Zn-Ni-FeO ve Pd nanopartiküllerinin ısı haritasında kırmızı renkte ifade edilmesine dayanarak da etkili olabileceğini göstermiştir (Şekil 5.4). Bu sonuçlar ve XTT sonuçlarına dayanarak tarama skalası, bu 2 nanopartikülün ikişer dozuna düşürülmüştür. Nanopartikül taraması Zn-Ni-FeO NP ve PdNP üzerinden devam edilmiştir. Makrofajların nanopartikülleri hücre içerisine alabilme kapasitelerini incelemek amacıyla nanopartiküller ile indüklenen makrofajlardan TEM görüntüleri alınmıştır (Şekil 5.5 ve 5.6). Aynı zamanda nanopartikül ile indüklenen makrofajların pro-inflamatuar bir sitokin olan TNF- α sekresyonuna etkilerini belirlemek doğrultusunda ELISA uygulanmıştır (Şekil 5.8). TEM görüntüleri (Şekil 5.7) ve invert mikroskop görüntülerien dayanarak Zn-Ni-FeO nanopartiküllerinin boyutlarının büyük olması ve ağır olmalarına bağlı olarak kültür içerisinde çökeltiler oluşturduğu gözlemlenmiştir. Bu sebeple, makrofajlarda TNF- α sitokin üretimine daha fazla katkıda bulunmasına rağmen genel nanopartikül taraması sonucunda Pd nanopartiküller ile deneylere devam edilmesine karar verilmiştir. Ek olarak, PdNP ile indüklenmiş makrofajların morfolojileri literatürdeki çalışmalara benzer bir şekilde M1

makrofaj fenotip morfolojisine sahip olduğu PdNP'lerin makrofajları M1 polarizasyonuna teşvik ettiğini kanıtlamaktadır (Rodell vd. 2018; Schmitz vd. 2020).

50 µg/ml dozunda uygulanan Pd nanopartiküllerinin immünotoksisitesini incelemek amacı ile canlı/ölü testi (Şekil 5.9) ve XTT proliferasyon testi (Şekil 5.10) yapılmıştır. Sonuçlar göz önüne alındığında, Pd nanopartiküllerinin makrofajlar üzerinde kısa süreli inkübasyonda sitotoksik etki yaratmadığı gözlemlenmiştir ve literatürde de örnekleri bulunmaktadır (Gurunathan vd. 2021). Bununla beraber, uzun süreli inkübasyonda makrofajların pro-inflamatuar sitokinler salımı aracılığı ile makrofaj proliferasyonunu arttırdığı düşünülmektedir. Ek olarak, Kalsein-AM boyaması canlı hücrelerin sitoplazmasını boyar ve hücre canlılık durumunu görselleştirir, fakat hücrelerden gelen ışığa hücre uzantıları üzerine vurarak yansımaları sayesinde yakın objektif görüntülerinde makrofajlardaki morfolojik farklılıkları da görselleştirmiştir.

Farklı fenotipe sahip makrofajların (M0, M1, M2 ve PdNP indüklenmiş) MCF-7 meme kanseri mikro-dokuları üzerindeki etkilerini incelemek amacıyla eş-kültür deney sistemi kurulmuştur. Fenotip türü değişmeksizin eş-kültürlenmiş makrofajların, mikro-doku sayılarında düşüşe sebep olduğu gözlemlenmiştir. Bunun sebebinin makrofaj aktivasyonundan ziyade kuyucuklar içerisindeki mikro-dokuların zaman içinde birbirleri ile birleşmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Ayrıca, mikro-doku boyutlarının dağılım grafiği incelendiğinde mikro-doku boyutlarında inkübasyon süresine bağlı olarak bir artış görülmektedir. Ancak, farklı makrofaj fenotipleri ile eş-kültürlenmiş tümör mikro-dokuları kontrol ile karşılaştırılarak detaylı bir şekilde ele alındığında anti-inflamatuar M2 makrofajların tümör mikro-dokularında boyutsal artışlara yol açtığı gözlemlenmiştir. Böyle bir durumda, M2 makrofajların tümör gelişimine katkıda bulunduğu söylenebilir. M0 makrofajlarda ise 24. ve 48. saatlerde tümör mikro-dokularının boyutu kontrol grubuna kıyasla küçük iken 72. saatte ciddi bir artış mevcuttur. Bunun, eş-kültür sisteminde tümör mikro-dokuların ile makrofajların iletişimi (crosstalk) ile zaman içerisinde M2 polarizasyonuna teşvik etmesinden kaynaklandığını düşündürmektedir (Jing vd. 2020; Nie vd. 2019; Valeta-Magara vd. 2019). M1 makrofajların etkinliğinin kontrol grubuna yakın olduğu gözlemlenirken PdNP indüklenmiş makrofajlar ile eş-kültürlenmiş tümör mikro-dokularında ise kontrol grubuna kıyasla mikro-doku boyutunda

azalma gözlemlenmiştir. Böyle bir durumda PdNP ile indüklenmiş makrofajların anti-tümöral etkinliğinden söz edilebilir (Şekil 5.13).

Eş-kültür sistemi sonrasında yapılan XTT testi ve gen ifade analizi çalışmaları incelendiğinde, M2 makrofajların tümör proliferasyonuna ciddi derecede katkı sağladığı gözlemlenmiştir. Aksine M1 ve PdNP indüklenmiş makrofajların ise anti-tümöral etki gösterdiğini, tümör mikro-dokularının proliferasyonunu baskılamasını kanıtlar niteliktedir (Şekil 5.14.A) (Yunna vd. 2020; Gurunathan vd. 2021). Bunun yanı sıra, PdNP indüklenmiş makrofajları başta olmak üzere 4 tip makrofajda da tümör mikro-dokularının metastatik genlerinden MMP2 gen ekspresyonunu baskıladığı görülmüştür. Ayrıca, MMP9 ekspresyonunda PdNP indüklenmiş makrofajlar haricinde diğer tür makrofajlar ile kültürlenmiş tümör mikro-dokularında MMP9 gen ifade artışı saptanmıştır. Bu sonuçlar ışığında, PdNP indüklenmiş makrofajların tümör mikro-dokularındaki metastatik aktiviteyi baskıladığı söylenebilir (Şekil 5.14.B) (Wang vd 2021). Ek olarak, makrofajların tümör mikro-dokuları üzerindeki EMT etkisi N-cad/E-cad oranı ile ele alındığında M2 polarize makrofajların tümör mikro-dokularında EMT'yi teşvik ettiği gözlemlenirken diğer makrofajların ciddi bir etkisi olmadığı tespit edilmiştir (Şekil 5.14.C). Tümör mikro-dokularının M1 ve M2 makrofajlar ile eş-kültürü sonrasında, tümör mikro-dokularının apoptotik p53 geninin ekspresyon seviyesinde artış gözlemlenmiştir. M1 makrofajların sebep olduğu p53 genindeki ifade artışı, pro-inflamatuar özelliği nedeniyle beklenen bir sonuçken (Lim vd. 2020) M2 makrofajların sebep olduğu ifade artışı ise beklenmedik bir durum oluşturmuştur. Lakin, kurulan deney sisteminde eşit koşullarda makrofajlar ve tümör mikro-dokuları eş-kültürlenmiştir ve bu sebeple her deney için eşit hacimlerde besiyeri ilave edilmiştir. XTT sonuçlarında da görüldüğü üzere, bu eşit koşullarda M2 makrofajlar ile eş-kültürlenmiş tümör mikro-dokularının proliferasyonu ciddi derecede artmasına bağlı olarak ortamda bulunan besinin yetersiz gelerek hücreleri strese soktuğu düşünülmektedir (Şekil 5.14.D). Literatürde de besin yetersizliğinin hücrelerde p53 aktivitesini arttırdığına dair bulgular mevcuttur (Jones vd. 2005).

Paladyum nanopartiküller ile indüklenmiş makrofajlardan elde edilen eksozomların TEM görüntüleri alınması amacı ile eksozomlar gridlerde hazırlanmış ve eksozomların

görüntülerini netleştirmek için urasil asetat boyası kullanılmamıştır. Buna rağmen, TEM ile elde edilen görüntülerde küresel şekilleri ve boyutlarının yaklaşık 80–100 nm olması ile literatürdeki eksozom tanımına uyan görseller elde edilmiştir (Pegdel ve Gould, 2019). Çapları yaklaşık 15-20 nm olan PdNP'lerin eksozomların bünyesinde bulunması sebebi ile oluşturdukları kontrast farkına bağlı olarak TEM görüntülerinin elde edilebildiği düşünülmektedir (Şekil 5.15).

Eksozomların MCF-7 meme kanseri hücrelerinin invazif özelliklerine ve migrasyonlarına etkilerinin incelenmesi amacı ile yara kapama deneyi dizayn edilmiştir. Suni olarak oluşturulan yaralarda belirli zaman noktalarında mikroskop görüntüleri alınarak değişen yara alanı incelenmiştir. 48 saat sonunda M0 ve M2 türevli eksozomların, oluşturulan yarayı büyük ölçüde kapattığı gözlemlenmiştir. Buna karşı, M1 ve özellikle PdNP türevli eksozomlar yaranın kapanmasını büyük oranda engelledikleri anlaşılmıştır (Şekil 5.17 ve 5.18). M2 makrofaj eksozomları, makrofajları meme kanseri hücrelerinin invazyona ve migrasyona teşvik ettiği gözlemlenmiştir ve literatürde bulunan çalışmalarda bu bulguyu kanıtlar niteliktedir (Lan vd. 2019). Ek olarak M1 makrofajlardan elde edilen eksozomların da kanser migrasyonunu ve invazyonunu baskıladığı gözlemlenmesi de aynı şekilde literatürdeki çalışmaların bulguları ile uyumaktadır (Chaleshtori vd. 2021). PdNP indüklenmiş makrofajlardan elde edilen eksozomların, meme kanserinin saldırgan yapısının baskılanmasında etkili olması, kombine ilaç tedavilerinde kanser davranışlarını sınırlama amacı ile kullanılması için umut verici bir gelişme olabilir.

Farklı makrofaj fenotiplerinden elde edilen eksozomların tümör mikro-dokuları ve çok hücreli mikro-dokular üzerindeki apoptotik, metastatik ve EMT ile ilişkili genlere etkileri gen ekspresyon düzeyinde RT-qPCR ile incelenmiştir. Öncelikle kullanılacak eksozom konsantrasyonunun optimizasyonu amacı ile MCF-7 tümör mikro-dokuları 50 µg/ml ve 100 µg/ml olmak üzere iki farklı dozda eksozom ile tedavi edilmiştir. Çeşitli fenotiplere sahip makrofaj eksozomlarında konsantrasyona bağlı gen ekspresyon değerleri farklılık gösterse de PdNP indüklenmiş makrofaj türevli eksozomların yüksek konsantrasyonda apoptotik p53 geninin ekspresyon seviyesinde dikkat çekici artış görülmesinden dolayı daha sonraki deneylere 100 µg/ml eksozom konsantrasyonu ile devam edilmiştir (Şekil

5.20.D). Genel olarak PdNP türevli eksozomların, metastatik genler olan MMP2 ve MM9'larda baskılayıcı özellik göstermektedir (Şekil 5.20.A). Aynı zamanda EMT ilişkili genler olan E-cad ve N-cad oranı incelendiğinde, M2 türevli eksozomların kanser hücrelerini EMT'ye teşvik ettiğini ve PdNP türevli eksozomların ise tam aksine baskıladığı gözlemlenmiştir (Şekil 5.20.C). Ek olarak, M2 türevli eksozomlarda p53 gen aktivasyonunun yüksek çıkması daha öncede eş-kültür deneyinde bahsedilen sebepten dolayı kaynaklandığını düşündürmektedir. Bununla beraber, kanser hücrelerinden etkilenerek M2 fenotipine polarize olan makrofajların da eksozom aracılığı ile kanser hücreleri üzerinde EMT'ye sebep olmasına ve premetastatik nişler oluşturmaya teşvik ettiği literatürde bulunan çalışmalarda gözlemlenmiştir (Liu vd. 2021).

Benzer bir şekilde farklı makrofaj fenotiplerinden elde edilen eksozomlar, bu aşamada kanser mikroçevresinin daha yakın bir taklidinde incelenmesi amacı ile 1:1 oranında MCF-7/HUVEC hücrelerinden oluşan çok hücreli mikro-dokular üzerinde uygulanmıştır. Eksozomların bu sistemdeki metastatik, apoptotik ve EMT ilişkili genleri üzerindeki etkileri RT-qPCR ile incelenmiştir. M2 makrofaj türevli eksozomların bu sistem içerisinde de metastatik genler olan MMP2 ve MMP9 genlerinin ekspresyonlarına artışa sebep olduğu gözlemlenmiştir. Aynı şekilde apoptotik p53 geninin ekspresyonundaki artış daha önce eş-kültür sisteminde açıklanan durum ile bağlantılı olduğunu düşündürmektedir. Ek olarak, M2 türevli eksozomların N-cad/E-cad oranında sebep olduğu artış hücrelerin EMT'ye yönlendirdiğine yönelik düşünceleri ortaya çıkarmıştır. M1 ve PdNP eksozomların, çok hücreli mikro-dokuların p53 gen aktivasyonundaki tümör mikro-dokulara oranla gözlemlenen düşüş sistemdeki HUVEC hücrelerinin p53 gen ekspresyon seviyesini aşağıya çekmiş olmasına bağlı olabileceğini düşündürmektedir. Bunun yanı sıra, çok hücreli mikro-doku sistemindeki metastatik ve EMT ilişkili genlerin ifadelerinin tümör mikro-dokularına oranla nisbeten daha yüksek çıkması, endotel hücreler ile kanser hücreleri arasındaki miRNA aracılı iletişimden kaynaklandığını düşündürmektedir (Orso vd. 2020). Buna rağmen, PdNP indüklenmiş makrofajlardan elde edilen eksozomların bu durum karşısında dahi kısmende olsa metastazı ve EMT'yi baskıladığı söylenebilir (Şekil 5.22).

Bir sonraki aşama olarak, farklı makrofaj fenotiplerinden elde edilen eksozomlar, kanser mikroçevresine daha yakın bir taklidinde incelenmesi amacı ile 2:1:1 oranında MCF-7/HUVEC/phDF hücrelerinden oluşan çok hücreli mikro-dokular üzerinde uygulanmıştır. Bu sistemde de M2 türevli eksozom haricindeki eksozomların, MMP9 genlerine bağlı olarak metastazı baskıladığı gözlemlenmiştir. MCF-7/HUVEC sisteminde metastatik ve EMT ilişkili genlerin ekspresyonunda artış gözlemlenirken, sisteme primer fibroblast hücreleri eklendiğinde metastaz ve EMT ilişkili genlerin ekspresyonunda tekrar düşüş gözlemlenmiştir. Ortama fibroblastların girmesi ile endotel-kanser hücreleri arasındaki hücrelerel iletişimin zayıflamasından dolayı bu düşüşe sebep olduğu düşünülmektedir. MCF-7/HUVEC/phDF çok hücreli mikro-doku sisteminde de iki hücreli mikro-doku sistemine benzer bir şekilde p53 gen aktivasyonunun düştüğü gözlemlenmiştir. Gözlemlenen düşüş, çok hücreli mikro-doku sistemindeki HUVEC ve fibroblast hücrelerinin p53 ekspresyonları sistemdeki toplam p53 gen ekspresyon seviyesini aşağıya çekmiş olmasına bağlı olabileceğini düşündürmektedir (Şekil 5.24).

İlaç çalışmalarında ilk olarak oluşturulan mikro-dokuların (MCF-7/HUVEC ve MCF-7/HUVEC/phDF), anti-kanser ilacı olan 5-FU'nun anti kanser aktivitesi üzerindeki etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır. 24 saat ve 72 saat boyunca 5-FU ile tedavi edilen mikro-dokuların XTT testi ile canlılıkları incelenmiştir. Çok hücreli mikro-dokular ile MCF-7 tümör mikro-dokuları arasındaki yüzde canlılık karşılaştırıldığında, 24 saat boyunca 10 µM 5-FU ilacının etkinliğine olumlu veya olumsuz herhangi bir etkisi gözlemlenmemiştir. Lakin 24 saat boyunca 100 µM 5-FU anti kanser ilacının etkinliği tümör mikro-dokularında artarken çok hücreli mikro-dokularda kademeli olarak etkinliğin azaldığı gözlemlenmiştir. Yüksek dozda dahi ilacın tümör mikro-dokularında %50 canlılığın üzerinde kalması, 24 saat tedavi süresinin yetersiz olabileceğini düşündürmektedir. Bununla beraber, çok hücreli mikro-dokularda ilaç uygulaması sonucu canlılığın tümör mikro-dokularına oranla daha yüksek olması, piyasada bulunan bütün anti kanser ilaçları gibi 5-FU anti kanser ilacının da en önemli özelliği olan seçiciliğine yani kanser hücrelerini hedefleyerek öldürme özelliğine dayandığı düşünülmektedir (Longley vd. 2003). 72 saat uygulamaları incelendiğinde, 10 µM 5-FU dozunun tümör mikro-dokuları üzerindeki etkinliği çok hücreli mikro-dokular üzerindeki etkinliğine kıyasla çok daha fazladır. Bu farkın sadece az önce bahsedilen ilaç

seçiciliği ile açıklamak mümkün olmadığı ve başka bir etkenin de çok hücreli mikro-dokuları oluşturan sağlıklı hücrelerin MCF-7 kanser hücrelerine direnç sağlamış olabileceği düşünülmektedir. Bununla beraber, yine 72 saat boyunca 100 μM 5-FU tedavisinde çok hücreli mikro-dokuların canlılığındaki düşüş ilacın toksik etkisinin uzun süreli tedaviye dayanarak sağlıklı hücreleri de etkilediği gözlemlenmektedir (Şekil 5.25).

İlaç çalışmalarının diğer bir basamağında 24 saat ve 72 saat boyunca iki farklı dozdaki (10 μM ve 100 μM) 5-FU anti-kanser ilacının etkinliğine çeşitli eksozom türlerinin katkılarının incelenmesi amacı ile bir deney düzeneği tasarlanmıştır (Şekil 5.26). 10 μM anti kanser ilacının 24 saat tedavi sonrasında bütün eksozom çeşitlerinin üç mikro-doku çeşidinde de ilaç etkinliğini arttırdığı gözlemlenmiştir. Yüksek dozda 24 saat tedavi sonrasında MCF-7 tümör mikro-dokularında M1 ve PdNP türevli eksozomların ilaç etkinliğini desteklemesine bağlı olarak tümör mikro-dokularının canlılığını ciddi bir oranda düşürdüğü gözlemlenmiştir. Çok hücreli mikro-dokularda canlılıkların tümör mikro-dokularına oranla artmasına karşın, M1 ve PdNP türevli eksozomlar aynı şekilde ilaç etkinliğinin arttırdığını ve oluşan kemoresistansı azalttığı düşünülmektedir. Bunun aksine, M0 eksozomlarının ilaç etkinliğine ciddi bir katkısı olmazken M2 eksozomların ise üç mikro-doku çeşidinde de canlılığın kontrol grubuna oranla yüksek çıkması, mikro-dokuların ilaç direncine katkıda bulunduğunun ve buna bağlı olarak ilaç etkinliğinin azalmasına sebep olduğu düşünülmektedir. Özellikle PdNP grubu ele alındığında, doz farkılmaksızın 24 saat boyunca tedavide 5-FU anti kanser ilacının aktivitesini desteklediği gözlemlenmiştir (Şekil 5.30). Tedavi süresinin uzaması ile birlikte 10 μM ilaç dozunda dahi MCF-7 tümör mikro-dokularında canlılıklar %50 seviyesi ve altına düşerken yine PdNP eksozomlarının 5-FU ilacının etkinliğine en çok katkıda bulunan eksozom grubu olduğu gözlemlenmiştir. Buna karşın, çok hücreli mikro-doku canlılıklarındaki genel artış daha önceden de belirtildiği gibi ilaç seçiciliğinden meydana gelebileceği gibi mikro-dokuları oluşturan sağlıklı hücrelerin kanser hücrelerine kemoresistans sağlamasına da bağlı olabileceğini düşündürmektedir. Ancak, ortamda oluşabilecek ilaç direnci ihtimaline karşı özellikle PdNP eksozomları olmak üzere M1 eksozomlarının ilaç etkinliğini arttırdığı gözlemlenmiştir. 72 saat 10 μM 5-FU ve eksozom tedavisi sonucunda tümör mikro-dokularının canlılığında ciddi azalmalar söz konusudur. M0, M1 ve PdNP eksozomları kontrol ile karşılaştırıldığında ilaç etkinliğini

arttırdıkları gözlenirken, M2 eksozomlarının ilaç etkinliğine ciddi bir katkısı bulunmadığı düşünülmektedir. Çok hücreli mikro-dokular incelendiğinde ise düşük doz ilaç uygulanan çok hücreli mikro-dokulara oranla canlılıklarının düştüğü gözlemlenmiştir ve bunun sebebi olarak 5-FU anti kanser ilacının yüksek doz ve uzun tedavi sürelerinde sağlıklı hücrelere de toksik etki yaratmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Ancak bu durumlarda dahi PdNP eksozomları ile birlikte tedavi edilen çok hücreli mikro-doku gruplarında canlılığın azalması PdNP eksozomlarının ilaç etkinliğini arttırmaya devam ettiğini göstermektedir (Şekil 5.31). Özetle, farklı fenotipe sahip makrofajlardan elde edilen eksozomların 5-FU anti kanser ilacı etkinliğine etkileri; mikro-doku çeşidine, ilaç dozuna ve tedavi süresine göre değişiklikler göstermesine rağmen, PdNP indüklenmiş makrofajlardan izole edilen eksozomları her koşul dâhilinde anti-kanser ilacının etkinliğine katkıda bulunduğu yapılan çalışmalar sonucu gözlemlenmiştir (Çizelge 5.3).

Sonuç olarak, yedi farklı nanopartikülün ikişer dozu ile oluşturulan makrofaj polarizasyon taramasında elde edilen veriler ışığında paladyum nanopartiküllerinin (PdNP) 50 µg/ml konsantasyonunun makrofaj polarizasyonu için taranan diğer nanopartiküllere kıyasla en uygun immünomodülatör nanopartikül olduğuna karar verilmiştir. PdNP'ler aracılığıyla pro-inflamatuar fenotipine polarizasyonu sağlanmış makrofajların, kanser mikroçevresini daha iyi yansıtmaları amacıyla oluşturulan MCF-7 tümör mikro-dokularına etkileri eş-kültür sistemi ile incelenmiştir. Eş-kültür sonucunda, tümör mikro-dokularının proliferasyonunu, metastatik genleri baskılamasına dayanarak kanser prognozunu sınırladığı sonucuna varılmıştır. Ek olarak, PdNP indüklenmiş makrofajlardan elde edilen eksozomlarda da MCF-7 tümör mikro-dokularının ve hatta daha karmaşık ve in-vivoya yakın mikro-doku sistemlerinde (MCF-7/HUVEC, MCF-7/HUVEC/phDF) dahi tümörjenik etkilerinin baskılanmasında etkili olabileceği kanısına varılmıştır. Bu sonuçların yanı sıra, ilaç çalışmalarında PdNP türevli eksozomların seçilen dozlar ve tedavi süreleri farketmeksizin ilaç etkinliğine katkıları bulunduğu gözlemlenmiştir. Bütün bu sonuçlara dayanarak, PdNP indüklenmiş makrofaj eksozomlarının meme kanseri ile mücadelede umut vadeden doğal immünomodülatörler olabileceği ve kanserle mücadele platformunu destekleyebileceği bir potansiyele sahip olduğunu göstermektedir.

KAYNAKLAR

- Ali, Imran, et al. "Social Aspects of Cancer Genesis." *Cancer therapy* 8 (2011).
- Allavena, P., Sica, A., Garlanda, C., & Mantovani, A. (2008). The Yin-Yang of tumor-associated macrophages in neoplastic progression and immune surveillance. *Immunological reviews*, 222(1), 155-161.
- Aung, A., Kumar, V., Theprungsirikul, J., Davey, S. K., & Varghese, S. (2020). An engineered tumor-on-a-chip device with breast cancer-immune cell interactions for assessing T-cell recruitment. *Cancer research*, 80(2), 263-275.
- Baig, M.S., Roy, A., Rajpoot, S. *et al.* Tumor-derived exosomes in the regulation of macrophage polarization. *Inflamm. Res.* **69**, 435–451 (2020).
- Bastús, N. G., Sánchez-Tilló, E., Pujals, S., Farrera, C., López, C., Giralt, E., ... & Puntès, V. (2009). Homogeneous conjugation of peptides onto gold nanoparticles enhances macrophage response. *ACS nano*, 3(6), 1335-1344.
- Beer, T. W., Ng, L. B., & Murray, K. (2008). Mast cells have prognostic value in Merkel cell carcinoma. *The American journal of dermatopathology*, 30(1), 27-30.
- Bejarano, L., Jordão, M. J., & Joyce, J. A. (2021). Therapeutic targeting of the tumor microenvironment. *Cancer discovery*, 11(4), 933-959.
- Bergers, G., & Benjamin, L. E. (2003). Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nature reviews cancer*, 3(6), 401-410.
- Bondhopadhyay, B., Sisodiya, S., Alzahrani, F. A., Bakhrebah, M. A., Chikara, A., Kasherwal, V., ... & Hussain, S. (2021). Exosomes: a forthcoming era of breast cancer therapeutics. *Cancers*, 13(18), 4672.
- Bourhis, M., Palle, J., Galy-Fauroux, I., & Terme, M. (2021). Direct and indirect modulation of T cells by VEGF-A counteracted by anti-angiogenic treatment. *Frontiers in immunology*, 12, 616837.
- Brinton, L. T., Sloane, H. S., Kester, M., & Kelly, K. A. (2015). Formation and role of exosomes in cancer. *Cellular and molecular life sciences*, 72(4), 659-671.
- Burguin, A., Diorio, C., & Durocher, F. (2021). Breast cancer treatments: updates and new challenges. *Journal of Personalized Medicine*, 11(8), 808.
- Chen, W. X., Liu, X. M., Lv, M. M., Chen, L., Zhao, J. H., Zhong, S. L., ... & Tang, J. H. (2014). Exosomes from drug-resistant breast cancer cells transmit chemoresistance by a horizontal transfer of microRNAs. *PloS one*, 9(4), e95240.

- Chen, W. X., Wang, D. D., Zhu, B., Zhu, Y. Z., Zheng, L., Feng, Z. Q., & Qin, X. H. (2021). Exosomal miR-222 from adriamycin-resistant MCF-7 breast cancer cells promote macrophages M2 polarization via PTEN/Akt to induce tumor progression. *Aging (Albany NY)*, 13(7), 10415.
- Chen, X., Jia, Z., Wen, Y., Huang, Y., Yuan, X., Chen, Y., ... & Liu, J. (2022). Bidirectional anisotropic palladium nanozymes reprogram macrophages to enhance collaborative chemodynamic therapy of colorectal cancer. *Acta Biomaterialia*, 151, 537-548.
- Cheng, J. T., Deng, Y. N., Yi, H. M., Wang, G. Y., Fu, B. S., Chen, W. J., ... & Zhang, Q. (2016). Hepatic carcinoma-associated fibroblasts induce IDO-producing regulatory dendritic cells through IL-6-mediated STAT3 activation. *Oncogenesis*, 5(2), e198-e198.
- de Souza, N. (2018). Organoids. *Nature Methods*, 15(1), 23-23.
- de Bittencourt Jr, P. I. H., Lagranha, D. J., Maslinkiewicz, A., Senna, S. M., Tavares, A. M., Baldissera, L. P., ... & Curi, R. (2007). LipoCardium: endothelium-directed cyclopentenone prostaglandin-based liposome formulation that completely reverses atherosclerotic lesions. *Atherosclerosis*, 193(2), 245-258.
- Dziki, J. L., & Badylak, S. F. (2018). Immunomodulatory biomaterials. *Current Opinion in Biomedical Engineering*, 6, 51-57.
- Eissa, I. R., Bustos-Villalobos, I., Ichinose, T., Matsumura, S., Naoe, Y., Miyajima, N., ... & Kasuya, H. (2018). The current status and future prospects of oncolytic viruses in clinical trials against melanoma, glioma, pancreatic, and breast cancers. *Cancers*, 10(10), 356.
- El-Arabey, A. A., Denizli, M., Kanlikilicer, P., Bayraktar, R., Ivan, C., Rashed, M., ... & Lopez-Berestein, G. (2020). GATA3 as a master regulator for interactions of tumor-associated macrophages with high-grade serous ovarian carcinoma. *Cellular signalling*, 68, 109539.
- Feito, M. J., Diez-Orejas, R., Cicuéndez, M., Casarrubios, L., Rojo, J. M., & Portolés, M. T. (2019). Characterization of M1 and M2 polarization phenotypes in peritoneal macrophages after treatment with graphene oxide nanosheets. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 176, 96-105.
- Feng, X., Xu, W., Li, Z., Song, W., Ding, J., & Chen, X. (2019). Immunomodulatory nanosystems. *Advanced science*, 6(17), 1900101.
- Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Parkin, D. M., Piñeros, M., Znaor, A., & Bray, F. (2021). Cancer statistics for the year 2020: An overview. *International journal of cancer*, 149(4), 778-789.

- Freeman, P., & Mielgo, A. (2020). Cancer-associated fibroblast mediated inhibition of CD8+ cytotoxic T cell accumulation in tumours: mechanisms and therapeutic opportunities. *Cancers*, *12*(9), 2687.
- Fuad Mugarab-Samedi., et al. "Mathematical Models and their Application in Cancer Growth". *Acta Scientific Cancer Biology* 5.7 (2021): 35-41.
- García-Aranda, M., & Redondo, M. (2019). Immunotherapy: a challenge of breast cancer treatment. *Cancers*, *11*(12), 1822.
- Gatto, F., Cagliani, R., Catelani, T., Guarnieri, D., Moglianetti, M., Pompa, P. P., & Bardi, G. (2017). PMA-induced THP-1 macrophage differentiation is not impaired by citrate-coated platinum nanoparticles. *Nanomaterials*, *7*(10), 332.
- Gurunathan, S., Kang, M. H., Jeyaraj, M., & Kim, J. H. (2021). Palladium Nanoparticle-Induced Oxidative Stress, Endoplasmic Reticulum Stress, Apoptosis, and Immunomodulation Enhance the Biogenesis and Release of Exosome in Human Leukemia Monocytic Cells (THP-1). *International Journal of Nanomedicine*, *16*, 2849.,
- Han, C., Zhang, C., Wang, H., & Zhao, L. (2021). Exosome-mediated communication between tumor cells and tumor-associated macrophages: implications for tumor microenvironment. *Oncoimmunology*, *10*(1), 1887552.
- Işık, M. 2022. Yüksek Lisans Tezi. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Javeed, N., & Mukhopadhyay, D. (2017). Exosomes and their role in the micro-/macro-environment: a comprehensive review. *Journal of biomedical research*, *31*(5), 386.
- Jeppesen DK, Nawrocki A, Jensen SG, Thorsen K, Whitehead B, Howard KA, Dyrskjøt L, Ørntoft TF, Larsen MR, Ostenfeld MS (2014) Quantitative proteomics of fractionated membrane and lumen exosome proteins from isogenic metastatic and nonmetastatic bladder cancer cells reveal differential expression of EMT factors. *Proteomics* 14:699–712.
- Jing, W., Guo, X., Wang, G., Bi, Y., Han, L., Zhu, Q., ... & Zhao, Y. (2020). Breast cancer cells promote CD169+ macrophage-associated immunosuppression through JAK2-mediated PD-L1 upregulation on macrophages. *International Immunopharmacology*, *78*, 106012.
- Jones, R. G., Plas, D. R., Kubek, S., Buzzai, M., Mu, J., Xu, Y., ... & Thompson, C. B. (2005). AMP-activated protein kinase induces a p53-dependent metabolic checkpoint. *Molecular cell*, *18*(3), 283-293.
- Kodali, V., Littke, M. H., Tilton, S. C., Teegarden, J. G., Shi, L., Frevert, C. W., ... & Thrall, B. D. (2013). Dysregulation of macrophage activation profiles by engineered nanoparticles. *ACS nano*, *7*(8), 6997-7010.

- Kucharzewska P, Belting M (2013) Emerging roles of extracellular vesicles in the adaptive response of tumour cells to microenvironmental stress. *J Extracell Vesicles*.
- Kumar, B. V., Connors, T. J., & Farber, D. L. (2018). Human T cell development, localization, and function throughout life. *Immunity*, *48*(2), 202-213.
- Lan, J., Sun, L., Xu, F., Liu, L., Hu, F., Song, D., ... & Wang, G. (2019). M2 macrophage-derived exosomes promote cell migration and invasion in colon cancer. *Cancer research*, *79*(1), 146-158.
- Larionova, I., Cherdyntseva, N., Liu, T., Patysheva, M., Rakina, M., & Kzhyshkowska, J. (2019). Interaction of tumor-associated macrophages and cancer chemotherapy. *Oncoimmunology*, *8*(7), e1596004.
- Lee, K. H., & Kim, T. H. (2021). Recent advances in multicellular tumor spheroid generation for drug screening. *Biosensors*, *11*(11), 445.
- Lenders, V., Koutsoumpou, X., Sargsian, A., & Manshian, B. B. (2020). Biomedical nanomaterials for immunological applications: ongoing research and clinical trials. *Nanoscale Advances*, *2*(11), 5046-5089.
- Li, S., Wu, Y., Ding, F., Yang, J., Li, J., Gao, X., ... & Feng, J. (2020). Engineering macrophage-derived exosomes for targeted chemotherapy of triple-negative breast cancer. *Nanoscale*, *12*(19), 10854-10862.
- Li, T., Yang, Y., Hua, X., Wang, G., Liu, W., Jia, C., ... & Chen, G. (2012). Hepatocellular carcinoma-associated fibroblasts trigger NK cell dysfunction via PGE2 and IDO. *Cancer letters*, *318*(2), 154-161.
- Lim, Y. J., Lee, J., Choi, J. A., Cho, S. N., Son, S. H., Kwon, S. J., ... & Song, C. H. (2020). M1 macrophage dependent-p53 regulates the intracellular survival of mycobacteria. *Apoptosis*, *25*, 42-55.
- Liu, T., Hooda, J., Atkinson, J. M., Whiteside, T. L., Oesterreich, S., & Lee, A. V. (2021). Exosomes in Breast Cancer—Mechanisms of Action and Clinical Potential Role of Exosomes in Breast Cancer. *Molecular Cancer Research*, *19*(6), 935-945.
- Liu, Y., & Segura, T. (2020). Biomaterials-mediated regulation of macrophage cell fate. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 1428.
- Longley, D. B., Harkin, D. P., & Johnston, P. G. (2003). 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nature reviews cancer*, *3*(5), 330-338.
- Ma, X., Wang, Y., Liu, X. L., Ma, H., Li, G., Li, Y., ... & Liang, X. J. (2019). Fe₃O₄-Pd Janus nanoparticles with amplified dual-mode hyperthermia and enhanced ROS generation for breast cancer treatment. *Nanoscale Horizons*, *4*(6), 1450-1459.

- Maltby, S., Khazaie, K., & McNagny, K. M. (2009). Mast cells in tumor growth: angiogenesis, tissue remodelling and immune-modulation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1796(1), 19-26.
- Mao, X., Xu, J., Wang, W., Liang, C., Hua, J., Liu, J., ... & Shi, S. (2021). Crosstalk between cancer-associated fibroblasts and immune cells in the tumor microenvironment: New findings and future perspectives. *Molecular cancer*, 20(1), 1-30.
- Michael A, Bajracharya SD, Yuen PS, Zhou H, Star RA, Illei GG, Alevizos I (2010) Exosomes from human saliva as a source of microRNA biomarkers. *Oral Dis* 16:34–38.
- Moradi-Chaleshtori, M., Shojaei, S., Mohammadi-Yeganeh, S., & Hashemi, S. M. (2021). Transfer of miRNA in tumor-derived exosomes suppresses breast tumor cell invasion and migration by inducing M1 polarization in macrophages. *Life Sciences*, 282, 119800.
- Movva, R. H., Yarraguntla, S. R., & Paravastu, V. K. K. (2022). Cellular backpacks for macrophage immunotherapy-A Review. *GSC Biological and Pharmaceutical Sciences*, 20(1), 126-133.
- Nie, Y., Huang, H., Guo, M., Chen, J., Wu, W., Li, W., ... & Hu, H. (2019). Breast Phyllodes Tumors Recruit and Repolarize Tumor-Associated Macrophages via Secreting CCL5 to Promote Malignant Progression, Which Can Be Inhibited by CCR5 Inhibition Therapy Phyllodes Tumors Recruit and Repolarize TAMs via CCL5. *Clinical Cancer Research*, 25(13), 3873-3886.
- Nii, T., Makino, K., & Tabata, Y. (2020). Three-dimensional culture system of cancer cells combined with biomaterials for drug screening. *Cancers*, 12(10), 2754.
- Noh, Y. W., Kim, S. Y., Kim, J. E., Kim, S., Ryu, J., Kim, I., ... & Lim, Y. T. (2017). Multifaceted immunomodulatory nanoliposomes: reshaping tumors into vaccines for enhanced cancer immunotherapy. *Advanced Functional Materials*, 27(8), 1605398.
- O'bryan, S. M., & Mathis, J. M. (2018). Oncolytic virotherapy for breast cancer treatment. *Current Gene Therapy*, 18(4), 192.
- Ohshio, Y., Hanaoka, J., Kontani, K., & Teramoto, K. (2014). Tranilast inhibits the function of cancer-associated fibroblasts responsible for the induction of immune suppressor cell types. *Scandinavian Journal of Immunology*, 80(6), 408-416.
- Orso, F., Quirico, L., Dettori, D., Coppo, R., Virga, F., Ferreira, L. C., ... & Taverna, D. (2020, February). Role of miRNAs in tumor and endothelial cell interactions during tumor progression. In *Seminars in Cancer Biology* (Vol. 60, pp. 214-224). Academic Press.,

- Pegtel, D. M., & Gould, S. J. (2019). Exosomes. *Annual review of biochemistry*, 88, 487-514.
- Rajan, R., Sabnani, M. K., Mavinkurve, V., Shmeeda, H., Mansouri, H., Bonkougou, S., ... & La-Beck, N. M. (2018). Liposome-induced immunosuppression and tumor growth is mediated by macrophages and mitigated by liposome-encapsulated alendronate. *Journal of Controlled Release*, 271, 139-148.
- Reichel, D., Tripathi, M., & Perez, J. M. (2019). Biological effects of nanoparticles on macrophage polarization in the tumor microenvironment. *Nanotheranostics*, 3(1), 66.
- Rodell, C. B., Arlauckas, S. P., Cuccarese, M. F., Garris, C. S., Li, R., Ahmed, M. S., ... & Weissleder, R. (2018). TLR7/8-agonist-loaded nanoparticles promote the polarization of tumour-associated macrophages to enhance cancer immunotherapy. *Nature biomedical engineering*, 2(8), 578-588.
- Scherbart, A. M., Langer, J., Bushmelev, A., van Berlo, D., Haberzettl, P., van Schooten, F. J., ... & Albrecht, C. (2011). Contrasting macrophage activation by fine and ultrafine titanium dioxide particles is associated with different uptake mechanisms. *Particle and fibre toxicology*, 8(1), 1-19.
- Schmitz, T., Jannasch, M., Weigel, T., Moseke, C., Gbureck, U., Groll, J., ... & Hansmann, J. (2020). Nanotopographical coatings induce an early phenotype-specific response of primary material-resident M1 and M2 macrophages. *Materials*, 13(5), 1142.
- Skog J, Wu¨rdinger T, van Rijn S, Meijer DH, Gainche L, Curry WT Jr, Carter BS, Krichevsky AM, Breakefield XO (2008) Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol* 10:1470–1476.
- Stentz, F. B., Umpierrez, G. E., Cuervo, R., & Kitabchi, A. E. (2004). Proinflammatory cytokines, markers of cardiovascular risks, oxidative stress, and lipid peroxidation in patients with hyperglycemic crises. *Diabetes*, 53(8), 2079-2086.
- Suciu-Foca, N., Berloco, P., & Cortesini, R. (2009). Tolerogenic dendritic cells in cancer, transplantation, and autoimmune diseases. *Human immunology*, 70(5), 277-280.
- Tai, C. J., Liu, C. H., Pan, Y. C., Wong, S. H., Tai, C. J., Richardson, C. D., & Lin, L. T. (2019). Chemovirotherapeutic treatment using camptothecin enhances oncolytic measles virus-mediated killing of breast cancer cells. *Scientific reports*, 9(1), 1-13.
- Tanaka, A., & Sakaguchi, S. (2017). Regulatory T cells in cancer immunotherapy. *Cell research*, 27(1), 109-118.

- Thapa, B., & Lee, K. (2019). Metabolic influence on macrophage polarization and pathogenesis. *BMB reports*, 52(6), 360.
- The'ry C, Zitvogel L, Amigorena S (2002) Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol* 2:569–579.
- Turley, S. J., Cremasco, V., & Astarita, J. L. (2015). Immunological hallmarks of stromal cells in the tumour microenvironment. *Nature reviews immunology*, 15(11), 669-682.
- Uzhachenko, R. V., & Shanker, A. (2019). CD8+ T lymphocyte and NK cell network: circuitry in the cytotoxic domain of immunity. *Frontiers in immunology*, 10, 1906.
- Valeta-Magara, A., Gadi, A., Volta, V., Walters, B., Arju, R., Giashuddin, S., ... & Schneider, R. J. (2019). Inflammatory Breast Cancer Promotes Development of M2 Tumor-Associated Macrophages and Cancer Mesenchymal Cells through a Complex Chemokine Network. *Chemokines and Macrophages in Inflammatory Breast Cancer*. *Cancer research*, 79(13), 3360-3371.
- Vasan, N., Baselga, J., & Hyman, D. M. (2019). A view on drug resistance in cancer. *Nature*, 575(7782), 299-309.
- Vergadi, E., Ieronymaki, E., Lyroni, K., Vaporidi, K., & Tsatsanis, C. (2017). Akt signaling pathway in macrophage activation and M1/M2 polarization. *The Journal of Immunology*, 198(3), 1006-1014.
- Vishwakarma, A., Bhise, N. S., Evangelista, M. B., Rouwkema, J., Dokmeci, M. R., Ghaemmaghami, A. M., ... & Khademhosseini, A. (2016). Engineering immunomodulatory biomaterials to tune the inflammatory response. *Trends in biotechnology*, 34(6), 470-482.
- Waks, A. G., & Winer, E. P. (2019). Breast cancer treatment: a review. *Jama*, 321(3), 288-300.
- Wang, J., Lee, J. S., Kim, D., & Zhu, L. (2017). Exploration of zinc oxide nanoparticles as a multitarget and multifunctional anticancer nanomedicine. *ACS applied materials & interfaces*, 9(46), 39971-39984.
- Wang, R., Zhao, S., Wang, Z., & Koffas, M. A. (2020). Recent advances in modular co-culture engineering for synthesis of natural products. *Current Opinion in Biotechnology*, 62, 65-71.
- Wang, S., Li, J., Chen, M., Ren, L., Feng, W., Xu, L., ... & Liu, S. (2021). Palladium nanoplates scotch breast cancer lung metastasis by constraining epithelial-mesenchymal transition. *National Science Review*, 8(7), nwaa226.

- Wculek, S. K., Cueto, F. J., Mujal, A. M., Melero, I., Krummel, M. F., & Sancho, D. (2020). Dendritic cells in cancer immunology and immunotherapy. *Nature Reviews Immunology*, 20(1), 7-24.
- Weinberg, R. A. (1996). How cancer arises. *Scientific American*, 275(3), 62-70.
- Wu, J., Gao, W., Tang, Q., Yu, Y., You, W., Wu, Z., ... & Wang, X. (2021). Retracted: M2 macrophage-derived exosomes facilitate HCC metastasis by transferring α M β 2 integrin to tumor cells. *Hepatology*, 73(4), 1365-1380.
- Wynn, T. A., Chawla, A., & Pollard, J. W. (2013). Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature*, 496(7446), 445-455.
- Yang, M., Chen, J., Su, F., Yu, B., Su, F., Lin, L., ... & Song, E. (2011). Microvesicles secreted by macrophages shuttle invasion-potentiating microRNAs into breast cancer cells. *Molecular cancer*, 10(1), 1-13.
- Yang, Y., Guo, Z., Chen, W., Wang, X., Cao, M., Han, X., ... & Qiu, Z. (2021). M2 macrophage-derived exosomes promote angiogenesis and growth of pancreatic ductal adenocarcinoma by targeting E2F2. *Molecular Therapy*, 29(3), 1226-1238.
- Yin, Z., Ma, T., Huang, B., Lin, L., Zhou, Y., Yan, J., ... & Chen, S. (2019). Macrophage-derived exosomal microRNA-501-3p promotes progression of pancreatic ductal adenocarcinoma through the TGFBR3-mediated TGF- β signaling pathway. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 38(1), 1-20.
- Youn, J. I., Collazo, M., Shalova, I. N., Biswas, S. K., & Gabrilovich, D. I. (2012). Characterization of the nature of granulocytic myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *Journal of leukocyte biology*, 91(1), 167-181.
- Yunna, C., Mengru, H., Lei, W., & Weidong, C. (2020). Macrophage M1/M2 polarization. *European journal of pharmacology*, 877, 173090.
- Zhang, Q., Dehaini, D., Zhang, Y., Zhou, J., Chen, X., Zhang, L., ... & Zhang, L. (2018). Neutrophil membrane-coated nanoparticles inhibit synovial inflammation and alleviate joint damage in inflammatory arthritis. *Nature nanotechnology*, 13(12), 1182-1190.
- Zhang, X., Wang, C., Wang, J., Hu, Q., Langworthy, B., Ye, Y., ... & Gu, Z. (2018). PD-1 blockade cellular vesicles for cancer immunotherapy. *Advanced Materials*, 30(22), 1707112.
- Zhang, Y., Zhang, Y., Gu, W., He, L., & Sun, B. (2014). Th1/Th2 cell's function in immune system. *T helper cell differentiation and their function*, 45-65.
- Zihni, C., Mills, C., Matter, K., & Balda, M. S. (2016). Tight junctions: from simple barriers to multifunctional molecular gates. *Nature reviews Molecular cell biology*, 17(9), 564-580.