

**T.C
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**Meme Kanseri Modelinde Myeloid Kökenli Hücrelerin İmmün
Kompartmanlardaki Dağılımının Anti-Tümör Yanıtlara Yansıması**

Dr. Yusuf DÖLEN

**Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi Programı
DOKTORA TEZİ**

ANKARA

2013

T.C
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**Meme Kanseri Modelinde Myeloid Kökenli Hücrelerin İmmün
Kompartmanlardaki Dağılımının Anti-Tümör Yanıtlara Yansıması**

Dr. Yusuf DÖLEN

Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi Programı
DOKTORA TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Dicle GÜÇ

İKİNCİ DANIŞMAN
Doç. Dr. Güneş Esendağlı

ANKARA
2013

Anabilim Dalı: Temel Onkoloji
Program: Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi
Tez Başlığı: Meme Kanseri Modelinde Myeloid Kökenli Hücrelerin İmmün
Kompartmanlardaki Dağılımının Anti-Tümör Yanıtlara Yansıması
Öğrenci Adı-Soyadı: Yusuf Dölen
Savunma Sınavı Tarihi: 06.09.2013

Bu çalışma jürimiz tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı ve
Tez Danışmanı: Prof. Dr. Dicle Güç
Hacettepe Üniversitesi



Üye: Prof. Dr. Bilkay Baştürk
Başkent Üniversitesi



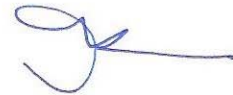
Üye: Doç. Dr. A. Lale Doğan
Hacettepe Üniversitesi



Üye: Doç. Dr. Güneş Esendağlı
Hacettepe Üniversitesi



Üye: Doç. Dr. Resul Karakuş
Gazi Üniversitesi



ONAY

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Ersin Fadilloğlu
Enstitü Müdürü 4

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde yol gösterici olan tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Dicle Güç'e ve yardımlarını ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Emin Kansu'ya sonsuz güven ve sabırlarından dolayı minnettarlığımı bildiririm.

Sayın Doç. Dr. Güneş Esendağlı, Sayın Doç. Dr. A. Lale Doğan ve Öğr. Gör. Dr. Hande Canpınar'a her koşuldaki özverili desteklerinden ötürü sonsuz teşekkür ederim.

Sayın Dr. Altuğ Kesikli ve Dr. Gürcan Günaydın'a bu çalışmaya verdikleri teorik, pratik ve motivasyon destekleri için teşekkürlerimi bildiririm.

Hacettepe Üniversitesi Temel Onkoloji Anabilim Dalı personel ve öğrencilerine yardımlarından ötürü teşekkür ederim.

Tüm eğitim öğrenim sürem boyunca ellerinden gelen tüm olanakları sunan anne ve babam ile lisansüstü öğrenimim boyunca hiç bir özveriden kaçınmayan sevgili eşime bana olan güvenleri için teşekkür eder, minnetlerimi sunarım.

ÖZET

DÖLEN, Y., Meme Kanseri Modelinde Myeloid Kökenli Hücrelerin İmmün Kompartmanlardaki Dağılımının Anti-Tümör Yanıtlara Yansıması, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi Programı Doktora Tezi, Ankara, 2013. Bu çalışmada, Nitroso Metil Üre (NMU) aracılı meme kanseri oluşturulmuş Sprague Dawley sıçanların periferik kan, kemik iliği ve dalak dokularında bulunan myeloid kökenli hücreler incelenmiştir. Rp-1 ekspresyonu ile sıçan myeloid hücrelerinin nötrofil ve monosit popülasyonları ilk defa birbirlerinden ayırt edilmiştir. Ayrıca HIS48 ekspresyonuna göre iki farklı sıçan monosit alt grubu olduğu tespit edilmiştir. Meme tümörü taşıyan sıçanların periferik kan ve dalaklarında anlamlı oranda Rp-1+ nötrofil birikimi gösterilmiştir. Tümörlü hayvanlarda sayıları artan bu Rp-1 + nötrofillerin, antijene özgü CD4+ T hücre proliferasyonunu baskıladığı gösterilerek myeloid kökenli baskılayıcı hücre (MDSC) karakterinde oldukları gösterilmiştir. Tümörlü sıçanlarda MDSC'ler, CD11b/c+, HIS48+ immünofenotipi ile tanımlanmaktadır. Bu tanım hem granülositik hem de monositik popülasyonları kapsamaktadır. Bu çalışmada, sıçan granülositik MDSC alt grubu Rp-1+ myeloid hücreler olarak ilk defa tanımlanmıştır. Yapılan işlevsel analizlerde; sıçan granülositik myeloid kökenli baskılayıcı hücrelerinin (MDSC'ler) reaktif oksijen türevleri (ROS), nitrik oksit (NO) ve TGF- β sentezleyerek baskılayıcılık fonksiyonu gösterdiği tespit edilmiştir. Tümörlü hayvanlarda klasik tipteki HIS48+ monosit popülasyonlarının MHC II ekspresyonlarında azalma görülmüştür. Tümörlü hayvan dalağında bulunan ve yüksek ROS ve NO üretimi ile TGF- β sentezine de sahip olan HIS48+ monositler, sıçan monositik MDSC'lerini teşkil ederler.

Anahtar Kelimeler: MDSC, Sıçan, Meme kanseri, Granülosit, NMU

ABSTRACT

DOLEN, Y., Distribution of Myeloid Derived Cells on Immune Compartments and it's Reflections to Anti-Tumor Immune Responses in a Breast Cancer Model, Hacettepe University Institute of Health Sciences PhD Thesis in Tumor Biology and Immunology, Ankara, 2013. Myeloid cells of peripheral blood, bone marrow and spleens from NMU induced mammary tumor bearing Sprague-Dawley rats were examined in this study. Myeloid derived suppressor cells (MDSCs) in tumor bearing rats are defined with CD11b/c⁺ HIS48⁺ immunophenotype. As this definition addresses both granulocytic and monocytic populations, we separated neutrophils from monocytic populations according to Rp-1 expression and classified monocytes into two sub groups regarding the HIS48 positivity. The RP-1⁺ neutrophil amounts increased prominently in peripheral blood and spleens of mammary tumor bearing Sprague Dawley rats. Rp-1⁺ neutrophils also suppressed the antigen specific CD4⁺ T cell proliferations. These neutrophils were the dominant suppressor populations and corresponded to the granulocytic-MDSCs. Reactive oxygen species (ROS), nitric oxide (NO) productions and TGF- β synthesis were found to be responsible for the suppressive effect of these neutrophils. Additionally, HIS48⁺ monocytes of tumor hosts had lower MHC class II expression, higher nitric oxide and TGF- β productions than HIS48⁻ monocytes resembling the monocytic-MDSCs of mice. Here we report Rp-1 antibody as a specific marker to distinguish rat PMN-MDSCs. Additionally, we identified two functionally different monocyte subsets based on HIS48 staining. Granulocytic subset of tumor bearing rat MDSCs were defined as Rp-1⁺ HIS48⁺ neutrophils. Two functionally and morphologically different subsets of RP-1⁻ rat monocytes were discriminated by HIS48 staining.

Keywords: MDSC, Rat, Breast cancer, Granulocyte, NMU

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiv
TABLolar DİZİNİ	xvi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Meme Kanseri	3
2.2. Kanser ve Mikroçevre	4
2.2.1. Hücre Dışı Matriks	5
2.2.2. Fibroblastlar	5
2.2.3. Vasküler Sistem	6
2.3. Kanser ve İmmün Sistem	7
2.3.1. Kanserde İmmün Gözetim	7
2.3.2. Kanserin İmmün Şekillendirilmesi	7
2.4. Kanser ve Myeloid Kökenli Hücreler	12
2.4.1. Makrofajlar	13
2.4.2. Nötrofiller	14
2.4.3. Dendritik Hücreler	15
2.5. Myeloid Kökenli Baskılayıcı Hücreler (MDSC'ler)	15
2.5.1. MDSC'lerin Gelişimleri ve Aktivasyonları	16
2.5.2. MDSC'lerin Fonksiyonel Özellikleri	18
2.5.3. MDSC'lerin Diğer Myeloid Kökenli Hücrelerle İlişkileri	23
2.5.4. MDSC'lerin Belirlenmesi	24
2.6. Sıçan Meme Kanseri Modelleri	25
2.6.1. Sıçan MDSC'leri ve Myeloid Hücreleri	26

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	28
3.1. Hayvanlar	28
3.2. Sıçan Kimyasal Meme Kanseri Modeli	28
3.3. Conalbumin İmmünizasyonları	30
3.4. Dokuların izolasyonu	30
3.4.1. Comet Analizleri İçin Periferik Kan İzolasyonu	30
3.4.2. ELISA Testleri İçin Periferik Kandan Serum İzolasyonu	30
3.4.3. Flow Sitometri ve FACS İçin Periferik Kan İzolasyonu	30
3.4.4. Dalak İzolasyonu	31
3.4.5. Kemik İliği İzolasyonu	31
3.4.6. Tümörlerin İzolasyonu	32
3.4.7. Lenf Nodlarının İzolasyonu	32
3.5. Hücrelerin İzolasyonu	32
3.5.1. Periferik Kandan Hücre İzolasyonları	32
3.5.2. Dalaktan Hücre İzolasyonları	33
3.5.3. Kemik İliğinden Hücre İzolasyonları	33
3.5.4. Tümörden Hücre İzolasyonları	33
3.5.5. Lenf Düğümlerinden Hücre İzolasyonları	34
3.6. Yoğunluk Gradienti İle Myeloid Hücrelerin Zenginleştirilmesi	34
3.7. Comet Analizleri	35
3.8. Akım Sitometri Analizleri ve Hücre Ayırılama	36
3.9. Giemsa Boyamaları	38
3.10. ROS Analizleri	38
3.11. Fagositoz Analizleri	39
3.12. Hücre Kültürleri ve Proliferasyon Deneyleri	39
3.13. Nitrik Oksit Analizleri	41
3.14. Enzyme-Linked İmmüno Sorbent Analizleri (ELISA)	41
3.14.1. TNF- α Analizleri	41
3.14.2. IL-6 Analizleri	42
3.14.3. IL-10 Analizleri	42
3.14.4. TGF- β 1 Analizleri	42

3.15. İstatistiksel Analizler	43
4. BULGULAR	44
4.1. Sıçanlarda NMU Aracılı Meme Kanseri Oluşumu	44
4.2. Periferik Kanda DNA Hasarı Tespiti	48
4.3. Fenotiplendirme Sonuçları ve Tespit Edilen Hücre Grupları	50
4.4. Tümörlü Hayvanların Myeloid Hücre Dağılımlarındaki Değişimler	53
4.4.1.Nötrofiller	54
4.4.2. HIS48+ Monositler	56
4.4.3.HIS48- Monositler	58
4.4.4. Farklı Dokulardaki Dağılımlar Arası İlişkiler	61
4.5. İşlevsel Analizler	63
4.5.1. Proliferasyon Analizleri ile Baskılamanın Tespiti	64
4.5.2.Baskılamada Rol Oynayan Mekanizmaların İncelenmesi	68
5. TARTIŞMA	89
5.1. NMU Aracılı Meme Kanseri Modeli ve Myeloid Hücreler	89
5.2. Kanserde Myeloid Hücrelerin Değişimleri	90
5.2.1. Sıçan Nötrofilleri	90
5.2.2. Sıçan Monositleri	91
5.3. Sıçan MDSC'leri	93
5.3.1.Sıçan MDSC'lerinin Baskılama Mekanizmaları	95
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	100
KAYNAKLAR	102
EKLER	120

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

2-ME	β -mercaptoethanol
aa.	Aminoasit
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
ACK	Amonyum-klorür-potasyum
AP-1	Aktivatör protein 1
APC	Allophyocyanine
ARG1	Arjinaz 1
ASC	Alanin-serin-sistein
ATRA	All-trans retinoic acid
Axl.	Aksiller
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
Bcl-xl	B-cell lymphoma-extra large
BSA	Sığır serum albumini
C/EBP β	CCAAT/enhansır-bağlanma protein- β
CAF	Karsinoma ilişkili fibroblastlar
CCL	C-C motif Kemokin ligandı
CCR	C-C motif Kemokin reseptörü
CDK	Siklin bağımlı kinaz
CFA	Complete Freund's Adjuvant,
CFSE	Carboxyfluorescein succinimidyl ester
CIR	Conalbumin immünize sıçan
COX2	Siklooksijenaz 2
CSF	Koloni stimüle edici faktör
CXCL	C-X-C motif kemokin ligandı
DC	Dendritik Hücre
diğ.	Diğerleri
dk.	Dakika
DLK	Dalak
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
EDTA	Etilendiamintetraasetik Asit

ELISA	Enzyme-Linked İmmüno Sorbent Analizi
eNOS	Endotelial nitrik oksit sentaz
ER	Östrojen reseptörü
Ets-1	E-twenty six-1
FACS	Fluoresan aktive hücre ayırlama
Fas	Fragment of Apoptosis Stimulation
FBS	Fötal sığır serumu
FITC	Fluorescein isothiocyanate
Foxp3	Forkhead box protein 3
FSC	Forward scatter
G-CSF	Granulosit koloni-stimüle edici faktör
GM-CSF	Granülosit Makrofaj-Koloni Uyarıcı Faktör
H.Ü.	Hacettepe Üniversitesi
H2-DCF-DA	2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate
H2O2	Hidrojen peroksit
HDM	Hücre dışı matris
HER2	Human Epidermal growth factor Receptor 2
HIF	Hipoksi indüklenebilir faktör
HLA	İnsan Lökosit Antijeni
HSP	Isı Şok Proteini
ICAM-1	Hücrelerarası Adezyon Molekülü-1
IFN- γ	İnterferon- γ
Ig	İmmüoglobülin
IL-	İnterlökin
ImC	İmmatür myeloid hücre
IP	İnterferon-inducible protein
I-TAC	İnterferon-inducible T cell kemoattractant;
İng.	İnguinal
iNOS	İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
JAK	Janus Kinaz
KI	Kemik iliği
LMP	Low molecular mass protein

LMPA	Düşük erime sıcaklığına sahip agar
LN	Lenf düğümü
mAb	Moleküler antikor
MCP-1	Makrofaj Kemotaktik Protein-1
M-CSF	Makrofaj koloni stimüle edici faktör
MDSC	Myeloid kökenli baskılayıcı hücre
MFI	Ortalama fluoresans intansitesi
MGMT	Metilguaninmetiltransferaz
MHC	Major Histokompatibilite Kompleksi
MIG	İnterferon gamma indüklenmiş monokin
MMP	Matriks metalloproteinaz
MPO	Mmyeloperoksidaz
mRNA	MessengerRNA
NF-κB	Nükleer Faktör- κB
NK	Doğal öldürücü hücre
NKG2D	Doğal öldürücü grup 2, üye D
NKT	Doğal öldürücü T hücreler
NMA	Normal erime sıcaklığına sahip agar
NMU	N-nitrözüre N-metil-üre
NO-	Nitrik oksit
NOX2	NADPH oksidaz 2
NS	Doğal baskılayıcı hücreler
ns.	Non-significant
PBS	Fosfat Tamponlanmış Tuz çözeltisi
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PDGF	Platellet kaynaklı büyüme faktörü
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein Complex
PGE2	Prostaglandin E2
PMN	Polimorfonükleer
PNT	Peroksinitrit
PTK	Protein tirozin kinaz

RNA	Ribonükleik Asit
ROS	Reaktif oksijen türevi
Rpm	Rotations per minute
SCF	Kök hücre faktörü
SCID	Severe Combined Immune Deficiency
SD	Standart sapma
SE	Standart hata
SIRP α	Sinyal düzenleyicisi protein alfa
SPL	Splenosit
SSC	Side Scatter
STAT	Sinyal iletici ve transkripsiyon aktive edici
TA	Tümör antijeni
TAM	Tümör ilişkili makrofaj
TAN	Tümör ilişkili nötrofil
TAP	Tapasin
TCR	T Hücre Reseptörü
TDLN	Tümör drene lenf düğümleri
TEM	Angiopoietin reseptörü Tie2 ekspres eden monosit
TGF- β	Transforming Growth Factor- β
Th	Yardımcı T lenfosit
Tm	Melting temperature
TNF	Tümör Nekroz Faktörü
TNF-R	Tümör Nekroz Faktörü Reseptör
TRAIL	TNF-ilişkili apoptoz başlatan ligand
Treg	Düzenleyici T lenfosit
VEGF	Vasküler endotelial büyüme faktörü

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
2.1. MDSC'lerin aktivasyon yolakları.	17
2.2. MDSC'lerin baskılama mekanizmaları.	23
3.1. Intraperitoneal Enjeksiyon	29
3.2. Sakrifikasyon sonrası doku izolasyonları.	31
3.3. İkili lökosit dansite gradientinin şematik gösterimi.	34
3.4. Comet assay yazılımı temsili ekran görüntüsü.	36
3.5. Myeloid hücrelerin işlevsel analizlerinin genel planı.	40
3.6. Proliferasyon analizleri için kullanılan deney planı.	40
4.1. Kontrol ve tümörlü hayvınların yaşları dağılımı.	46
4.2. Comet analizi temsili mikroskop görüntüleri.	48
4.3. Comet analizi sonuçlarının karşılaştırması.	49
4.4. Myeloid hücrelerin akım sitometrik olarak seçimi.	50
4.5. Nötrofil ve monositlerin akım sitometrik olarak ayrımı.	52
4.6. Monosit ve nötrofillerin giemsa boyaması mikroskop görüntüleri.	53
4.7. Nötrofillerin tüm myeloid hücreler içindeki oranları.	54
4.8. FACS izolasyonu ile elde edilen nötrofil sayıları.	55
4.9. Dalaktaki hücre birikimlerinin akım sitometrik gösterimi.	55
4.10. HIS48 ⁺ monositlerin tüm myeloid hücreler içindeki oranları.	56
4.11. FACS izolasyonu ile elde edilen HIS48 ⁺ monosit sayıları.	57
4.12. HIS48 ⁺ monositlerin tüm monositler içindeki oranları.	58
4.13. HIS48 ⁻ monositlerin tüm myeloid hücreler içindeki oranları.	59
4.14. FACS izolasyonu ile elde edilen HIS48 ⁻ monosit sayıları.	60
4.15. HIS48 ⁻ monositlerin tüm monositler içindeki oranları.	60
4.16. Myeloid alt grup hücre oranlarının farklı dokular arası korelasyonları.	62
4.17. İkili dansite gradienti uygulaması ile myeloid hücre kazanımı.	63
4.18. Farklı dansite fraksiyonlarına ait dalak hücrelerinin proliferasyona etkileri.	64
4.19. Kokültürlerde baskılayıcı hücre titrasyonları ve proliferasyona etkileri.	65

4.20.	Kontrol ve tümörlü hayvan nötrofillerin proliferatif etkileri.	66
4.22.	Kontrol ve tümörlü hayvan HIS48- monositlerin proliferatif etkileri.	67
4.23.	Kontrol ve tümörlü nötrofill kültürlerinin CFSE histogramları.	68
4.24.	HIS48 ⁺ monositlerin MHC sınıf II ekspresyonları.	69
4.25.	HIS48 ⁻ monositlerin MHC sınıf II ekspresyonları.	69
4.26.	HIS48 ⁺ monositlerin CD80 ekspresyonları.	70
4.27.	HIS48 ⁻ monositlerin CD80 ekspresyonları.	70
4.28.	Fagositoz analizlerinin dağılım ve histogramları.	71
4.29.	Nötrofil gruplarının fagositoza katılım oranları.	72
4.30.	HIS48 ⁺ monosit gruplarının fagositoza katılım oranları.	72
4.31.	HIS48 ⁻ monosit gruplarının fagositoza katılım oranları.	73
4.32.	Nötrofil gruplarının fagositoz kapasiteleri.	73
4.33.	HIS48 ⁺ monosit gruplarının fagositoz kapasiteleri.	74
4.34.	HIS48 ⁻ monosit gruplarının fagositoz kapasiteleri.	74
4.35.	Myeloid alt grupların H ₂ DCF-DA histogramları.	75
4.36.	Nötrofil gruplarının ROS düzeyleri.	76
4.37.	HIS48 ⁺ monositlerin ROS düzeyleri.	76
4.38.	HIS48 ⁻ monositlerin ROS düzeyleri.	77
4.39.	Nötrofil ko-kültürlerinin nitrik oksit seviyeleri.	78
4.40.	HIS48 ⁺ monosit ko-kültürlerinin nitrik oksit seviyeleri.	78
4.41.	HIS48 ⁻ monosit ko-kültürlerinin nitrik oksit seviyeleri.	79
4.42.	Tümörlü hayvan myeloid hücre ko-kültürlerinin TNF- α seviyeleri.	80
4.43.	Sağlıklı ve tümörlü hayvan serumlarının TNF- α seviyeleri.	81
4.44.	Tümörlü hayvan myeloid hücre ko-kültürlerinin IL-6 seviyeleri.	82
4.45.	Sağlıklı ve tümörlü hayvan serumlarının IL-6 seviyeleri.	83
4.46.	Tümörlü hayvan myeloid hücre ko-kültürlerinin IL-10 seviyeleri.	84
4.47.	Sağlıklı ve tümörlü hayvan serumlarının IL-10 seviyeleri.	85
4.48.	Tümörlü hayvan myeloid hücre ko-kültürlerinin TGF- β seviyeleri.	86
4.49.	Sağlıklı ve tümörlü hayvan serumlarının TGF- β seviyeleri.	87
4.50.	Serum IL-10 konsantrasyonu ile HIS48 ⁺ monosit ilişkisi.	88

TABLÖLAR DİZİNİ

	Sayfa	
3.1	Kullanılan hayvanların enjeksiyon tarihleri ve ağırlık bilgileri.	29
3.2.	ACK lizis tamponu bileşenleri.	32
3.3.	Akım sitometri analizlerinde kullanılan antikörler.	37
4.1.	Hayvanlarda gelişen tümörlerin boyutları ve lokasyonları.	44
4.2.	Hayvanların tümör gelişim hızları.	47
4.3.	Serum sitokin seviyesi korelasyonları.	87
5.1.	Fare, insan ve sıçan monosit ile MDSC alt-tipi fenotipleri.	94

1. GİRİŞ

Meme kanseri kadınlarda en sık görülen kanser türüdür. Son yıllarda meme kanserinin tanı ve tedavisinde önemli gelişmeler sağlandığı halde halen hastaların bir bölümü konvansiyonel kemoterapi ve cerrahi girişimlerinden fayda sağlayamamaktadır. Bu nedenle kemoterapiye dirençli tümörlerde etkinliği gösterilen veya immün sistemin aktivasyonunu sağlayan tümöre hedefli protokoller umut vaat etmektedirler.

Tümör hücreleri inflamatuvar dengeyi kendi lehine bozarak neoplazilere özgül kronik inflamasyona neden olabilir. Böylece, immün sistem hücreleri, tümör gelişiminin erken basamaklarından itibaren tümörün büyümesi, genomik kararsızlık, anjiyogenez ve metastaz için uygun ortam oluşturabilir. Bu işlemde, tümör ve mikroçevresindeki hücrelerden salınan çeşitli faktörlerin yerel veya distal miyeloid hücreler üzerinde etkileri başrol oynar.

Yapılan klinik araştırmalar ve hayvan deneyleri birçok kanser türünde kanda bulunan myeloid kökenli hücre gruplarının sayılarında artış olduğunu göstermiştir. Myeloid kökenli hücrelerdeki bu artış, metastaz kapasitesi ve sağkalım gibi prognostik değerler açısından önemlidir. Kanser ve diğer kronik inflamatuvar hastalıklarda sayıları artan myeloid hücrelerin asli fonksiyonlarının, anti tümör immün yanıtların baskılanması olduğu gösterilmiş ve bu hücreler myeloid kökenli baskılayıcı hücreler (Myeloid Derived Supressor Cells (MDSC) olarak adlandırılmıştır. MDSC'ler üzerinde yapılan çalışmalarda genellikle fare modellerinin tercih edilmesi, bu hücrelerin en çok dalaktan izole edilmeleri ve sinjenik farelerde antijen sunumunda sorun yaşanmamasından kaynaklanır. Meme kanseri hastalarında yapılan araştırmalar da, bu hücre grubunun kanda artışı gösterilmiştir. Ancak, hastalardan elde edilen doku örneklerinin kısıtlılığı ve etik nedenlerden ötürü, MDSC'lerin gelişim yolları veya diğer immün kompartmanlardaki etkilerini göstermek ancak hayvan deneyleri yaparak mümkün olabilir.

Bu çalışmada, insan meme kanseri ile pek çok yönden benzerlik gösterdiği bilinen nitroso-metil üre (NMU) aracılı sıçan meme kanseri modelinde myeloid kökenli hücrelerin alt-grupları ve fonksiyonları incelenmiştir. Bu amaçla myeloid hücrelerin immun-fenotiplemesi yapılarak başlıca alt-gruplar tanımlanmıştır.

Tümörlü hayvanların farklı dokularında; bu hücre alt-gruplarının sayısal artışları, reaktif oksijen türevi bileşiklerinin sentezi, nitrik oksit sentezi ve fagositoz kapasitesi gibi işlevsel özellikleri belirlenerek, tespit edilen hücrelerin MDSC karakterleri ile uyumu değerlendirilmiştir. Myeloid kökenli baskılayıcı hücre gruplarının baskılama tayini için dış-soy sıçanlar arasında antijen sunumunu olası kılacak bir model geliştirilerek NMU aracılı sıçan meme kanseri modelinde fonksiyonel olarak baskılayıcı myeloid hücrelerin varlığı gösterilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Meme Kanseri

Meme dokusu, epidermisten türeyen modifiye apokrin ter bezi gruplarından oluşmaktadır. Kadınlarda ergenlik döneminde hormonal sistemin uyarısıyla kanal sistemi proliferere olmaya başlar. Bu esnada alt segmental kanallardan lobüller tomurcuklanarak, işlevsel terminal dukto-lobüler üniteyi oluşturur. Lobüller, interlobüler bağ doku ile sarılı kesecikler ve aralarındaki intralobüler bağ dokudan oluşmaktadır. İnterlobüler ve segmental bağ doku daha fazla kollajenik karakterde olup hücresel içeriği düşüktür. Ergenlik sırasında memedeki genişlemeden sorumlu yağ dokusu bu bağdokuya göç eder. Kanal ve kanalcıklar çift tabakalı bir epitelyum ile örtülüdürler. Lümene bakan iç kısmı kübik ya da silindirik hücreler kaplarken dış kısımda aralıklı kontraktil mioepitelial hücreler bulunmaktadır. Epitelyum sürekli bir bazal membran ile sarılıdır. Aynı şekilde kanal sistemini de lenfatiklerce zengin bir bağ doku sarar (1).

Memede görülen en önemli hastalık olan meme kanseri; aynı zamanda kadınlarda en sık rastlanılan malinite türüdür. Son yıllarda meme kanserinin tanı ve tedavisinde gelişmeler görülse de önemli sayıda hasta tedaviye direnç geliştirmekte ve kaybedilmektedir (2). 2013 yılında Birleşik Devletlerde yaklaşık 230.000 kadında *in situ* haricinde meme kanseri gelişimi tahmin edilmektedir ve bunların 40 bininin kaybedileceği düşünülmektedir (3). Bu nedenle meme kanserinde yeni tedavi stratejileri geliştirilmesi önem arz etmektedir Meme kanseri vakalarının tamamına yakını terminal dukto-lobüler ünite kaynaklıdır. Meme kanserlerinde başlıca patolojik ayırım *in situ* ve invaziv olarak yapılmaktadır. *In situ* meme kanserinde ilk ortaya çıkan tümör hücreleri hastalar arasında değişen süreler boyunca kanal sistemine (*ductus*) hapsolmuş halde bulunurlar. Bu aşamada invazyon görülmez ve bazal membran bütünlüğünü korurken epitel hücrelerinde sitolojik malignite değişimleri görülmektedir. Duktal ve lobüler olarak iki tip *in situ* meme kanseri vardır bunların her ikisi de terminal dukto lobüler ünite kaynaklı olmalarına rağmen aralarında morfolojik ve prognostik farklılıklar bulunur. Var olan bir *in situ* karsinomadan memenin invaziv karsinoması gelişir. Bu aşamada, tümör hücreleri bazal membrana ulaşır ve stromayı tutarlar. Bununla birlikte histolojik olarak *in situ*

unsur ayırt edilemez durumdadır. Meme kanserinin ilk ortaya çıktığı bölgeden, yerel, lenfatik ve kan aracılığı ile yayılması (metastazı) söz konusudur. Meme kanseri yerel olarak deri örtüsünü, derin fasyayı ve göğüs duvarını tutarken aksiller ve meme içi lenf nodlarında da metastatik karsinoma tespit edilebilir. Kan yoluyla ise uzak metastazlar oluşmakta ve en sık akciğer, kemik ve karaciğeri tutmaktadırlar (1). Meme kanseri moleküler olarak, taşıdıkları östrojen (ER) ve epitel büyüme hormonu (HER2) reseptörlerine göre sınıflandırılmaktadır. İnsan meme kanserlerinin yaklaşık %75 lik kısmında östrojen reseptörü (ER) pozitifdir. Son yıllarda ER+ ve HER2+ meme kanserlerinde hedeflendirilmiş tedavi yaklaşımları da kullanılmaktadır (4). ER negatif meme kanserlerinin ise immün cevap ile olan etkileşimleri, klinik yanıt ile ilişkili bulunmuştur (5,6).

2.2. Kanser ve Mikroçevre

Kanser gelişimi çok basamaklı bir gelişim sergiler. Bu gelişimdeki inisiyasyon ve promosyon basamaklarında somatik hücrelerde genetik mutasyonlar oluşmakta ve birikmektedir (7). Ancak pek çok kanserin gelişimine kronik bir inflamasyonun eşlik ettiği de gösterilmiştir (8). Bu inflamatuvar koşullar proliferatif sinyal ağlarının oluşumu ile neoplastik gelişim için uygun ortam sağlamaktadırlar (9). Panet, 1889 tarihli "Seed and soil" (tohum ve toprak) hipotezi ile bu durumu meme kanserinde tanımlamıştır (10). Buna göre tümör gelişimi, verimli bir ortamın (toprak) olanak vermesi halinde uyumlu tümör hücrelerinin (tohumlar) proliferasyonu ile gerçekleşmektedir (11). Seed and soil hipotezinin primer tümörün ilk gelişim aşamasında mı yoksa sekonder metastazlar için mi daha uygun olduğu hakkında tartışmalar sürmekle birlikte her iki durumda da tümörün mikroçevresi ile olan ilişkisinin önemi yadsınamaz.

Meme kanserinin stromal elamanlarla olan etkileşiminde de meme yağ dokusunun adipositleri, fibroblastlar, miyofibroblastlar, lökositler, lenfositler ve miyoepitelial hücreler önemli rol oynarlar. Bu hücrelerin meme kanserlerinin büyümesi, farklılaşması, invazif karakter kazanması ve polariteleri üzerine etkileri gösterilmiştir (12,13). Dikkat çekici bir şekilde sıçan NMU modelinde yapılan bir çalışmada neoplazinin gelişiminde epitelden öncelikli olarak stromal bileşenlerin önem taşıdığı gösterilmiştir. Bu çalışmada 21 günlük hayvanların meme epitel

dokusu çıkarılmış ve in vitro olarak NMU ile muamele edilmiştir. Daha sonra meme yağ dokusuna nakledilen NMU'ya maruz kalmış epitel dokusu tümör gelişimi yerine sağlıklı dukto lobuler sistemler geliştirmiştir. Öte yandan epitel çıkarıldıktan sonra hayvanlara NMU uygulaması sonrasında aktarılan epitel hiç bir etkiye maruz kalmamış bile olsa karsinom gelişimi izlenmiştir (14). Bu örnek NMU aracılı meme kanserinin gelişimi esnasında da stromal elamanlardan destek aldığını göstermektedir.

Bir tümörü çevreleyen stroma örgüsü tümör dokusunun bağ doku iskeletini oluşturur. Bu iskelet, hücre dışı matriks (HDM), fibroblastlar, immün sistem hücreleri ve kan damarları gibi 4 eleman içermektedir ve normal dokudan farklılık gösterir (15).

2.2.1. Hücre Dışı Matriks

Hücrelerin arasındaki makromoleküler protein iplikleri ve fibröz dışı proteoglikanlardan oluşan ve tüm dokuların stromasında bulunan üç boyutlu ağ yapısıdır. HDM bileşenleri olan fibronektin, tip IV kollajen ve trombospondin-1 yapısal bütünlük ve birliklerine göre pro-ve anti anjiyojenik sinyaller oluştururlar (16). Daha da önemlisi, integrin aracılı HDM sinyalleri (17,18) karsinomalarında malign dönüşüme neden olur. Kanser hücreleri sentezledikleri proteolitik enzimler ile HDM'i yeniden düzenleyerek kendileri için invaziv bir ortam sağlarlar (19). Bunlardan en önemlisi matriks metalloproteinazlardır (MMP) ve hücre yüzeyi ve HDM'ye bağlı bulunan büyüme faktörlerini keserek aktive ederler (20). Çeşitli kanserlerde farklı MMP'ler öne çıksa da genellikle ekspresyon seviyeleri kanserin invazivliğinin önemli bir belirleyicisidir (21)

2.2.2. Fibroblastlar

Pek çok tümör hücresinden salınan tümör büyüme faktörü β (TGF- β) ve platellet kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) kanser hücrelerinin stromal fibroblastlarla etkileşiminde rol alırlar (21). İnsan meme tümörü xenograftlarının farelerde geliştirilebilmesi, insan tümör ilişkili stromal fibroblastların varlığına bağlıdır ve bu fibroblastların kanser gelişimindeki önemini göstermektedir (22). Fibroblastlarındaki TGF- β reseptörü nakavt olan farelerin epitel hücrelerinin malign dönüşüm geçirmesi,

bu sitokinin fibroblastlar üzerinden karsinogeneze olan etkisini gösteren bir örnektir (23). Öte yandan tümörler hücrelerinde aşırı eksprese olan TGF- β ise metastatik progresyona neden olarak tümörlerde çift yönlü etkisini göstermiştir (24). Her iki büyüme hormonu da fibroblastların, myofibroblast adı verilen aktive düz kas reaktif fibroblastlarına dönüşümünden sorumludur (25,26). Tümör stromasında bulunan myofibroblastlar karsinoma ilişkili fibroblastlar (CAF) olarak adlandırılmakta ve vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ve proteaz üreterek HDM modellenmesi ve anjiyogeneze katkı yaparlar (21). Ancak HDM modellenmesi ve anjiyogenez, fibroblastların bahsedilen karsinojenik etkilerini açıklamaya yeterli değildir.

Son bulgular, yara iyileşmesi gibi inflamatuvar durumlarda epitel hücrelerinin de makrofaj ve nötrofiller gibi hidrojen peroksit sentezleyebildiğini göstermiştir (27). Oksidatif stres ise normal fibroblastları aktive miyofibroblastlara dönüştürmek için yeterlidir ve aktive miyofibroblastlar daha sonra kendileri hidrojen peroksit üretmeye başlarlar (28,29). Ortamdaki hidrojen peroksitin ise daha çok inflamasyona, hücrel metabolizma değişikliklerine ve en önemlisi DNA hasarına yol açarak, tohum ve toprak hipotezinde eksik olan gübreyi oluşturduğu belirtilmiştir (30).

Adipositler de salgıladıkları kollajen VI ile tümör gelişimini arttırmaktadırlar (31). İnsan meme kanseri dokularında yapılan bir çalışmada da fibroblastların α -sma ekspresyonu ile kademeli bir myojenik farklılaşma içerisine girdikleri gösterilmiştir. Bu durum hücreler tümöre yaklaştıkça artış göstermektedir (32). Devam eden çalışmalarda kanser mikroçevresindeki myofibroblastların bir kısmının dolaşımdaki kemik iliği kaynaklı hücrelerden köken aldığı gösterilmiştir (33).

2.2.3. Vasküler Sistem

Yüzyıldan beri tümörlerin etrafında kan damarlarının geliştiği bilinmektedir (34). Anjiyogenez olarak bilinen bu durum tümör büyümesi ile paralel olarak seyreder ve gelişen tümörü beslemek için gerekli yeni kan ve lenf damarlarının oluşumunu içerir (35). Anjiyogenez, tümör ve mikroçevre içerisinde onunla ilişkili olan diğer hücrelerden salınan büyüme hormonları sayesinde oluşmaktadır. Bu hormonlardan anjiyogenez üzerinde en önemli etkiye sahip olanı vasküler endotelial büyüme hormonu (VEGF)'tir (36).

Anjiyogenezin malign tümörlerdeki kalıcılığı tümör stromasındaki endotel hücrelerinde düzenlenen VEGF reseptör 2 ekspresyonuna bağlıdır (37). Tümör invazyonu için bir gereklilik olan anjiyogenezin, VEGFR2 blokajı ile durdurulduğu, dahası, bu uygulama sonrasında düşen MMP seviyeleri sayesinde tümör-stroma sınırının belirginleşerek HDM yapısının tekrar organize olduğu gösterilmiştir (37).

2.3. Kanser ve İmmün Sistem

2.3.1. Kanserde İmmün Gözetim

Ehrlich, 1909'da transforme hücrelerin sürekli oluştuğu ve immün sistemin bu hücreleri sürekli tarayarak yok ettiğini öne sürdüğünden beri tümör immünolojisinin başlıca konularından biri kanserin immün gözetimi (cancer immunosurveillance) olmuştur (38). Bu yapılan işlemin tümörlerin büyümesine engel olduğunu gösteren birçok kanıt vardır (39). Örneğin tümörlerin içindeki lenfosit varlığı tümör hücreleri ile immün efektör hücreleri arasında bir ilişki olduğunu göstermektedir ve özellikle CD8+ T hücre yoğunluğu iyi prognoz ve uzun sağkalımla ilişkilidir (40). Özellikle tümörün çevresindekilerden ziyade tümörün içindeki T lenfositler tümör hücresinin ortadan kaldırılması için önemlidir (40). Benzer doğal öldürücü (NK) hücre infiltrasyonlarının da sağkalımla ilişkisi tespit edilmiştir (41). Yine deneysel olarak daha önce aynı tümörle karşılaşmış hayvanlara tekrar tümör nakli yapılırsa tümör reddedilir. Bu, kazanılmış bağışıklık tarafından tümörün özgül olarak tanınıp hatırlandığının bir göstergesidir. Klinik gözlemler, organ transplantasyonu yapılan kişilerde tümör meydana gelme olasılığının da arttığını göstermektedir (42,43). Bu durumun kullanılan immün baskılayıcı ilaçlardan kaynaklandığı düşünülmektedir (41). Bu da sağlam bir bağışıklık sisteminin tümör büyümesini engellediğinin kanıtıdır. Ancak tüm bu bulgulara rağmen oldukça sık tümör oluşması immün sisteminin tümörlere karşı zayıf ve yetersiz kaldığının bir göstergesidir.

2.3.2. Kanserın İmmün Şekillendirilmesi

Son yıllarda fareler üzerinde yapılan çalışmalar, immün sistemin kansere karşı konağı koruyucu etkisinin yanı sıra immünojenitesi düşük tümörlerin oluşumuna da yardım ettiğini göstermiştir (44). Bu nedenle, kanserin immün gözetimi terimiyle

kasdedilen işlevlerin immün sistemin kanserle ilişkili işlevlerini tam olarak tanımlamadığı ve yetersiz kaldığı düşünülmektedir. Bunun yerine kanserin immün şekillendirilmesi “cancer immunoediting” tanımının kullanılması önerilmektedir (45). Kanserın immün şekillendirilmesi tanımı; immün sistemin hem kanser oluşumunu engelleyici hem de neoplastik hastalığı şekillendiren ikili işlevini içermektedir. İmmün sistem, bazı tümörlerin oluşumunu tam olarak engellerken, bazı tümörlerde korumasız, bazılarında lakayt kalmakta, immünolojik anergi veya tolerans oluşumuna neden olmaktadır (45).

Kanserın immün şekillendirilmesi üç farklı sürecin sonucunda ortaya çıkmaktadır: Bunlara kanserin üç “E”s i adı verilmiştir (15,46).

- (a) *Eliminasyon*; klasik kanser immün gözetim konseptine karşılık gelmektedir.
- (b) *Equilibrium*; eliminasyon aşamasında tamamen yok edilmemiş tümör hücrelerinin düşük immünojenitedeki variantlarınının seçildiği ve arttırıldığı süreçtir
- (c) *Escape*; equilibrium aşamasındaki immünolojik denetimleri aşan tümörün kontrolsüz bir şekilde immün yeterli kişilerde hızla yayılmasıdır.

Eliminasyon (bertaraf etme)

Kanser immün gözetim kavramının öz niteliği olan gelişen tümörlerin ortadan kaldırılmasını tarif etmektedir. Bu işlemde immün sistemin doğal ve adaptif elemanları rol oynarlar ve tümörü ortadan kaldırmada başarılı oldukları takdirde immün şekillendirme bu aşamada sonlanır (41). Eliminasyon da 4 basamakta ele alınmaktadır. Bunlar;

1) Tümör hücrelerinin doğal immün sistem hücrelerince tanınması ve bir dereceye kadar öldürülmesi: Solid tümör belli bir büyüklüğe ulaştığı zaman invaziv olarak büyümeye başlayacak ve daha fazla kanlanmaya ihtiyacı olacaktır. Stromajenik ve anjiojenik proteinlerin yapımı başlayacaktır. İnvaziv büyüme çevre dokuda minör hasarlara ve dolayısıyla inflamatuvar bir cevabın oluşumuna neden olacaktır. Pro-inflamatuvar sinyaller, doğal öldürücü T hücreler (natural killer T; NKT), doğal öldürücü hücreler (natural killer; NK), $\gamma\delta$ T hücreleri, makrofajlar ve dendritik hücrelerin tümör alanında toplanmasını sağlayacaktır (47). Tümör, NK, NKT ve $\gamma\delta$ T hücreleri tarafından tanınarak Perforin, FasL ve TNF-ilişkili apoptoz

başlatan ligand (TRAIL) aracılı öldürülerek interferon gamma (IFN γ) üretimi başlar (48).

2) Dendritik hücrelerin (DC) matürasyonu ve göçü ile T hücelere çapraz sunum. IFN γ antiproliferatif ve apoptotik etkileriyle sınırlı oranda tümör hücrelerinin ölümüne neden olacaktır (49-51). IFN γ aynı zamanda hem tümör hücrelerinden hem de çevredeki normal dokudan CXCL10 (interferon-inducible protein-10, IP-10), CXCL9 (monokine induced by interferon gamma, MIG) ve CXCL11 (interferon-inducible T cell chemoattractant; I-TAC) gibi kemokinlerin salıverilmesini uyaracaktır (45). Bu kemokinlerden bazılarının anjiostatik etkileri vardır ve yeni damar oluşumlarını durdurarak daha fazla tümör hücrelerinin ölümüne neden olurlar (52). Birinci aşamadaki NK hücreleri aracılı öldürmeden ve bu aşamadaki IFN γ etkisine bağlı oluşan nekrotik hücreler ve tümör hücresi antijenleri çevrede bulunan immatür DC'ler tarafından alınarak tümör drene lenf düğümlerine (TDLN) götürülür (41). İnflamasyonun artışıyla beraber salıverilen kemokinler ortama daha fazla NK ve makrofaj gelmesine neden olur (45).

3) Tümör antijeni (TA) özgül T hücrelerin gelişimi. Eliminasyonun üçüncü fazında, tümörü infiltre eden NK ve makrofajlar birbirlerini uyararak daha fazla interlökin 12 (IL-12) ve IFN γ salıverilmesine neden olur ve tümör nekrotize edici faktör (TNF) ile ortaya çıkan apoptozu arttıran ligand, perforin, reaktif oksijen ve nitrojen araçları vasıtasıyla daha fazla tümör hücresi ölümüne neden olur (53). TDLN'a ulaşan dendritik hücreler tümöre özgül tip 1 yardımcı T hücrelerini (CD4+, Th1) uyarırlar ve tümöre özgül CD8+ T hücrelerinin gelişimine yardımcı olurlar (41).

4) TA-özgül T hücrelerinin tümör bölgesine göçü ve ve tümör hücrelerinin öldürülmesi. Dördüncü fazda tümör antijenlerine özgül CD8+ ve CD4+ T hücreleri tümörün bulunduğu alana giderler. Tümör bölgesinde sentezlenen IFN γ tarafından CD8+ sitotoksik T hücrelerin antijen taşıyan tümör hücrelerini öldürme kapasitesi arttırılır. Ancak bu basamakta immünojenitesi düşük tümör hücrelerin seçilimi de sağlanır (54).

Tümörün eliminasyon aşamasından kurtulmasında önem atfedilen immünojenite, tümör antijenlerinin ve yeterli pro-inflamatuar uyarımların varlığı olarak iki temel unsur barındırır (41). Yakın zamana kadar meme kanseri

hücrelerinin immün sistemin tanıyabileceği antijenler üretmediği varsayılmaktaydı, ancak zamanla tanımlanan birçok meme kanseri ilişkili antijen bunun aksini göstermiştir (55). Ayrıca meme kanseri hastalarından izole edilen T hücrelerin, immün sistemden yoksun hayvanlardaki insan meme kanseri hücrelerini tanıyıp öldürebildiği gösterilmiştir (56). Öte yandan hastaların immün sistemi tümörlerde ifade edilen bu antijenlere uzun süre maruz kaldığı için tümörlere karşı tolerans geliştirdiği düşünülmektedir (56). Toleransa neden olabilecek bir diğer husus da yeterli pro-inflamatuar ortamın sağlanamamasıdır. Tehlike hipotezi'ne konu olan bu durumda tümör antijenlerinin varlığında transformasyon sürecinin yeterli pro-inflamatuar sinyalleri sağlayamaması sonucunda antijene karşı immün yanıtlar gelişmez ya da tolerans gelişir (57). Ancak son çalışmalar pek çok tümörde yeterli tehlike sinyalini oluşturabilecek HDM değişimleri ve nekroz olduğunu göstermiştir (41,58).

Equilibrium (denge)

Eliminasyon süreci transforme hücrelerin büyük bir bölümünü ortadan kaldırır. Ancak bazı tümör hücreleri eliminasyonun etkilerinden kaçınabilirler (59). Bu süreçte, konağın immün sistemi ve eliminasyon işleminden kurtulan herhangi bir tümör variantı dinamik bir dengeye ulaşır (59). Bu süreç tümör immünolojisi için daha yeni tanımlanmış bir süreçtir ve tümör uykusu ile benzerdir (60). Lenfositler ve IFN γ genetik olarak kararlı olmayan ve hızla mutasyon gösteren tümör hücreleri üzerine potent bir seçilme baskısı oluşturur (59). Bu Darwin tipi seçilme periodu sırasında birçok orijinal tümör kaçış variant hücresi yok edilir ama bir yandan da immün saldırılara çok daha dirençli yeni mutasyonlar gösteren yeni variantlar oluşur (41). Equilibrium'un bu üç süreç arasında en uzun süren süreç olduğu ve equilibrium sürecinin yıllar aldığı düşünülmektedir (61). Denge süreci üç şekilde sonuçlanabilir. (i) immün sistem tümörü yok etme başarısını gösterebilir (ii) tümör ve immün sistem uzun yıllar moleküler ve hücrel bir denge içerisinde kalır (iii) tümör immün sistemden kaçarak ilerler (15,59).

Escape (kaçış)

Kaçış sürecinde, genetik veya epigenetik değişimler sonucu immünolojik tespiti ve ortadan kaldırılmaya duyarsız hale gelen tümör variantları kontrolsüz bir şekilde çoğalmaya başlarlar (46). Bu, klinik olarak gözlenebilen malign hastalığın ortaya çıkışına ve tedavi edilmezse konağın ölümüne neden olur. Tümör, antijenlerini kaybederek immün sistem tarafından tanınamaz hale gelir. Tümör, aynı zamanda antijen sunumunda görevli Tapasin, LMP2, LMP7, MHC molekülleri gibi bazı moleküllerini kaybederek antijenlerini sunamaz hale gelir (62). Ayrıca, IFN γ reseptörleri veya bu reseptörle ilişkili sinyal yolu moleküllerinde de kayıplar söz konusu olur bu nedenle tümör antiproliferatif ve apoptotik sinyalleri almaz (63).

İmmün sistemin kronik inflamatuvar durumlarda kendi cevaplarını kontrol altına alması da bir kaçış mekanizmasıdır ve bu otokontrol işlevine tümör de gelişimi esnasında kademeli olarak ürettiği anti inflamatuvar sitokinler sayesinde katkıda bulunmaktadır (64). Tümörün kendisi, transforming growth factor (TGF- β), vascular endothelial growth factor (VEGF), Prostaglandin E2 (PGE2), interlökin-10 (IL-10), siklooksijenaz 2 (COX2) gibi immün sistemi baskılayıcı bir grup mediyatörü salgılamaya başlar (41) (65). TGF- β , lenfosit proliferasyonunu durdurur. Tümör çevresinde bulunan dendritik hücrelerin maturasyonunu engellerler İmmatür dendritik hücreler etkili bir antijen sunumu gerçekleştiremedikleri gibi immatür dendritik hücrelerin T hücrelere antijen sunumu sonucunda aktivasyon yerine anergi gelişir ve efektör T hücreler regülatuar T hücrelere dönüşür (66). İmmün kaçışta rol oynayan bu araçların birçoğu STAT3 kaskatını kullanarak özellikle myeloid kökenli antijen sunan hücrelerin aktivasyonunu ve matürasyonunu engellerler (67-69). Ortama salınan IL-10 gibi sitokinler, IL-12 yapımını durdurduklarından, tümöre karşı immün cevapta etkili olan Th1 yanıtının Th2 yanıtına dönüşümüne neden olur ve bu da tümöre karşı etkili savaşı engeller(70).

Tümörün erken evrelerinde başlayan büyüme hormonu salgıları ve hipoksik ortamdan kaynaklanan uyarıcılar da kemik iliğinde hematopoezi artırarak immatür myeloid hücrelerin üretimini ve tümör mikroçevresine çekilmesini sağlarlar (71). Bu hücreler naiv öncüllerinden efektör T hücrelerin gelişmesini önleyerek, efektör T hücrelerin de düzenleyici (regülatuar) fenotipe dönüşmesi ya da apoptozuna yol açıp tümöre göçlerine engel olurlar. Regülatuar T hücreler de, salıverdikleri IL-10 ve

TGF β gibi sitokinlerle tümöre karşı oluşacak olan efektör T hücre cevabının bastırılmasına neden olurlar. Günümüzde, tümör çevresinde regülatuar fonksiyon gören bu hücrelerin arttığı iyi bilinmektedir (72,73).

Yukarıda bahsedilen hücrel ve moleküler faktörlerin etkisi sonucunda tümör hem kendini tanınmaz hale getirmekte hem de immün sistem cevabını etkili bir şekilde baskılayarak çoğalmasına ve yayılmasına devam etmektedir.

2.4. Kanser ve Myeloid Kökenli Hücreler

Tümör hücrelerinin metastaz, yayılma ve uzak bölgede yeni bir tümör oluşturabilmeleri için farklılaşmış bir mikroçevreye ihtiyaçları vardır. Son yayınlar, kanser hücrelerinin karmaşık-metastatik süreçlere geçmeleri için genetik mutasyonların tek başına yeterli olmadığını göstermektedir (74). Kanser hücrelerinin çevresindeki heterojen hücreler tümördeki büyümeyi, canlılığı, invazyonu ve metastazı uyararak hastalık progresyonunu artırır. Kanser gelişiminin kademeli olarak ilerleyişi sırasında immün infiltrasyon ve immün baskılanma arasında doğrudan bir ilişki olduğu ileri sürülmektedir. İmmün sistemin bu etkileri iki ucu keskin bir bıçağa benzetilebilir. Bir yandan tümörün tanınması ve eliminasyonu yönünde işlev görürken diğer yandan tümörün gelişimi için uygun kronik inflamatuvar bir çevre oluşturmaktadır (75). Erken safhalarda başlayan ve tümör lehine olan değişimlerde daha çok immün sistemin doğal bağışıklıktan sorumlu elamanları olan myeloid hücrelerin rol aldığı gösterilmiştir (76).

Tümör çevresinde inflamasyon nedeniyle pek çok doğal bağışıklık sistemi elemanı bulunmaktadır. Bunlar; makrofajlar, nötrofiller, mast hücreleri, MDSC'ler, dendritik hücreler ve doğal öldürücü (NK) hücreleridir. Tümörün gelişiminden sonra inflamatuvar denge genellikle tümörün lehine yön değiştirmektedir. Pek çok modelde ölçümler tümör belli bir büyüklüğün üstüne çıktıktan sonra yapıldığı için tümörün ilk gelişim dönemine ait veri azdır. Bilgimiz tümörün immün kontrol mekanizmalarından kaçışından sonraki döneme aittir (75). Öte yandan bir otokütanöz fare pankreatik tümör modelinde, Kras onkogenindeki transformasyonun başlaması ile birlikte myeloid hücrelerin ortama göçü görülmektedir. Bu myeloid hücreler IL-6 üreterek STAT3 üzerinden anti-apoptotik ve proliferatif genleri aktive ederek ve tümörün promosyonu ile progresyonuna neden olmaktadır (77). Bu modele benzer

bir dizi örnekte de görülen, kanserin oluşum aşamalarında myeloid hücrelerin tümör yatağına giderek ilk inflamatuvar yanıtları oluşturduğu, bu inflamatuvar çevrenin kanserin daha da ilerlemesine katkıda bulunduğu görüşünü desteklemektedir (78-80). Bu bölümde myeloid hücreler daha detaylı bir şekilde incelenecektir.

2.4.1. Makrofajlar

Neredeyse bütün tümörlerin mikroçevresinde makrofajlar bulunmaktadır. Özellikle meme kanserlerinde, makrofajlar tümör kitlesinin yarısından fazlasını oluşturabilirler (81). Fare ve insan meme kanserlerinde en az 3 ayrı makrofaj popülasyonu tanımlanmıştır. Bunlardan ilki tümörün invazif ucunda ve avasküler alanlarda yer alırlar. Diğer bir popülasyon ilerlemiş tümörlerin nekrotik alanlarında ölen hücrelerin sınırında bulunurlar. Üçüncü popülasyon ise damarların abluminal tarafında yer alarak nedeni belirsiz bir şekilde ve yukarı aşağı dolaşırlar (82). Klinik araştırmalarda meme kanserindeki makrofaj birikiminin kötü prognoza işaret ettiği gösterilmiştir (82). Ayrıca tümör mikroçevresindeki makrofajların tümör hücrelerinin invazyonunu ve metastazları arttırdığı gösterilmiştir. Makrofajları olmayan hayvanlarda tümörler oldukça büyümekte fakat benign karakterlerini kaybetmemektedirler ve bu durum tümörden salınan CSF-1'e bağımlıdır (83,84). Son olarak makrofajlar ürettikleri VEGF-A aracılığıyla tümörün invazif ucunda anjiyogeneze de yol açmaktadırlar (82).

Tip 1 makrofajlar (M1), TNF- α , IL-6 gibi pro-inflamatuvar sitokinler üretirken, Tip 2 makrofajlar (M2) IL-4, IL10, IL13 üretip, MHC sınıf II molekül ekspresyonlarını azaltırlar (75). Tümör gelişiminin erken safhalarında Tip1 makrofajlar tümöre infiltre olarak pro-inflamatuvar sitokin ve kemokin salınımı ile Th1, Th17 ve NK hücrelerini çağırıp tümör aleyhine aktivasyonlarını uyarabilir (85). Tümörün ilerleyen safhalarında ve hipoksik tümörlerde ise makrofajlar Th2 farklılaşması ve çağırılmasına neden olan 2. tipe dönüşürler. Tip2 makrofajlara (M2) benzeyen bu tümör ilişkili makrofajlar (TAM), düzenleyici tipteki Treg gruplarının gelişimine, doku onarımı ve anjiyogenez gibi tümörün lehine olan etkilere neden olmaktadır (86). Meme kanseri mikroçevresinde progresyona neden olan başkalaştırılmış makrofaj tiplerinin de bulunduğu bilinmektedir (87). TAM içeriği yüksek olan tümörlerin daha kötü prognoza sahip oldukları bildirilmiştir (88).

TAM'ların öncülleri olan monositler tümörden salınan CCL2 aracılığı ile kandan dokuya geçerler. Burada TAM'ların tümör mikroçevresindeki birikimlerinden sorumludurlar (88). Bu nedenle tümör mikroçevresinde tümör ilişkili makrofajlara (TAM) farklılaşan monositler CCL2 reseptörü olan CCR2 eksprese eden inflamatuar veya klasik monositlerdir. Ancak son zamanlarda kanda bulunan ve CCR2 eksprese etmeyen bir monosit alt grubunun da insan ve fare tümörlerine göç edebildiği saptanmıştır (89). Angiopoietin reseptörü Tie2 eksprese eden bu monositler (TEM) CCR2 eksprese etmeyen klasik dışı monositler içerisinde yer alırlar. TEM'lerin bir makrofaja başkalaşmadan hipoksik tümör hücrelerinden ve tümör damarlarından sentezlenen angiopoietin 2 sayesinde tümörde biriktikleri gösterilmiştir (90). TEM'lerin tümör damarlanmasına katkıda buldukları düşünülmektedir (88).

2.4.2. Nötrofiller

Tümör çevresinde tespit edilen bir başka myeloid hücre grubu olan nötrofiller de farklılaşma durumları ve TGF- β varlığına göre tümörün destekleyicisi veya tümöre karşı olabilirler. Tümöre karşı oynadıkları farklı roller nedeni ile nötrofiller de makrofajlara benzer şekilde N1 ve N2 fenotipleri ile sınıflandırılmışlardır. N2 ya da tümör ilişkili nötrofil (TAN) olarak adlandırılan fenotipe geçişte TGF- β 'nin rolü büyüktür (91). TGF- β 'nin ayrıca nötrofillerin tümöre infiltrasyonlarına ve tümör sitotoksitesine engel olduğu düşünülmektedir (91). N2 tipindeki nötrofillerin meme kanseri kaynaklı GM-CSF uyarımı ile IL-6 benzeri bir sitokin olan oncostatin M ürettikleri, bu sitokinin de meme kanseri hücrelerinden VEGF salınımını artırarak anjiyogenez ve invazifliği arttırdığı gösterilmiştir (92). Ek olarak tümör çevresindeki nötrofiller salgıladıkları matriks metalloproteinazlar (MMP) ile hücre dışı matriks bileşenlerini parçalayarak tümörün invazyonunu kolaylaştırırlar (93). Tümöre geçiş yapan granülositik MDSC'lerin matüre olarak TAN'lara dönüştüğüne dair veriler olmasına rağmen G-MDSC'ler ile TAN'ların gen ekspresyon profillerinin farklı olduğu da gösterilmiştir (94,95).

2.4.3. Dendritik Hücreler

Adaptif immün cevapların düzenleyicisi ve başlıca profesyonel antijen sunucu hücreler (ASH) olan dendritik hücreler de kanserde önemli değişimler göstermektedirler. Bu hücrelerin aktivasyonu ve matürasyonu, antijeni alıp lenfoid dokulara taşınmaları sırasında gerçekleşmektedir ve hücrel immün yanıtların temelini oluşturmaktadır. Tümörden salınan VEGF gibi faktörler kemik iliğinden çok sayıda immatür dendritik hücrenin çıkışına ve bu hücrelerin immatür durumda kalmalarına yol açmaktadır (96). Meme kanseri hastalarında yapılan kesitsel (bir zaman aralığını içeren) çalışmalarda bu hücrelerin antijen sunum ve aktivasyon fonksiyonunu yitirdiği ayrıca tümör mikroçevresinde immün baskılayıcı sitokin salınımının arttığı bildirilmiştir (97).

Özet olarak tümörden salınan çeşitli faktörler ve inflamasyon, myeloid kökenli hücre gruplarının tümör mikroçevresine toplanmasına ve burada doku yenilenmesi ve immün toleransı destekleyen fenotiplere dönüşmesine yol açmaktadır. Tümör mikroçevresindeki myeloid hücreler başlıca tümör anjiyogenezine ve metastazına katkıda bulunmaktadır. Ayrıca tümörden salınan VEGF ve çeşitli büyüme hormonları kemik iliğinde üretilen myeloid hücre miktarlarını arttırarak onları matürasyonlarını engellemektedir. Bu hücrelerin başında ise nötrofil, monosit ve dendritik hücrelerin öncülleri olan ve tam olgunluğa ulaşamamış MDSC'ler gelmektedir (98).

2.5. Myeloid Kökenli Baskılayıcı Hücreler (MDSC'ler)

Seksenli yılların sonlarında kronik graft versus host disease (GVHD) ve tümörlü farelerde kemik iliği ve dalakta artan sayılarda granüllü hücrelere rastlanmış ve farklı lenfoid cevapları baskıladıkları için bu hücreler doğal baskılayıcı hücreler (NS) olarak tanımlanmışlardır (99,100). Doksanlı yıllarda doğal baskılayıcı hücrelerin baskılama fonksiyonlarını nitrik oksit (NO-) ve TGF- β aracılığı ile yaptıkları ve gelişimlerinde tümörden salgılanan Granülosit-Makrofaj koloni stimüle edici hormonun (GM-CSF) rol oynadığı tespit edilmiştir (101-103). Fare meme kanseri modelleri ile yapılan çalışmalarda tümör gelişimine paralel olarak, uç farklılaşmasını tamamlamamış myeloid kökenli hücre gruplarında büyük bir artış tespit edilmiştir. Ayrıca, kanser hastalarındaki dendritik hücrelerin sayıları ve antijen

sunma yeteneklerindeki azalmanın kanlarındaki immatür myeloid hücre-(ImC) birikimi ile ilişkili olduğu gösterilmiş ve ATRA uygulaması ile matürasyonun sağlandığı ve baskılamanın sonlandığı gösterilmiştir (104,105). Doksanlı yılların sonlarına doğru tümörlü farelerin dalaklarındaki CD11b+ Gr-1+ monositlerin kontak bağımlı T hücre baskılamasından sorumlu olduğu tespit edilmiştir (106). ImC'ler çözünür proteinleri alıp işleyerek T hücrelere sunma kabiliyetindedirler ve kontak bağımlı antijen özgül anerjiye bu şekilde neden olmaktadır (95). İmmatür myeloid hücreler MHC sınıf II barındırmadıklarından bu yolla sunulan antijenlere karşı olan cevapları baskılamadıkları ama MHC sınıf I ile sunulan antijenlere karşı güçlü bir baskılamaya yol açtıkları gösterilmiştir (107). Ek olarak bu immatür hücreler tümör bölgelerine göç ederek çok daha fazla baskılayıcı tümör ilişkili makrofajlara (TAM) da dönüşmektedirler ve bu dönüşümden başlıca HIF-1 α sorumludur (108,109).

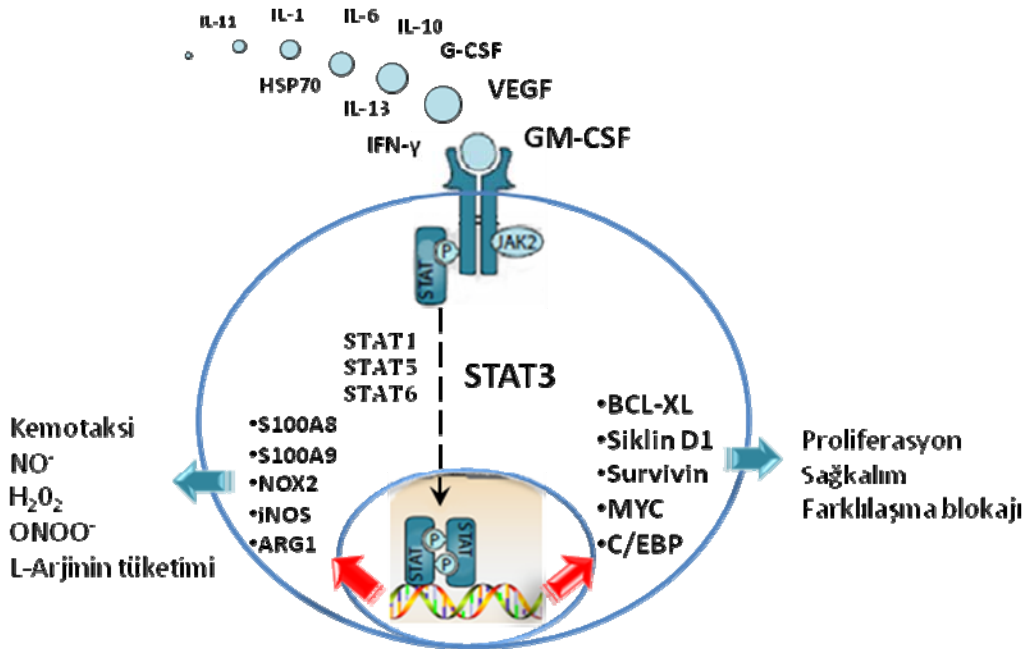
Bilim adamlarının ilgisi nedeniyle baskılayıcı myeloid hücrelerle ilgili yayın sayısı artınca 2007 yılında önde gelen araştırmacıların ortaklaşa aldığı bir kararla isim karmaşasına son verilerek bu hücreler myeloid kaynaklı baskılayıcı hücreler 'Myeloid-Derived Suppressor Cells' (MDSC) olarak adlandırılmışlardır (110). Bakteriyel ve parazitik enfeksiyonlar ile akut ve kronik inflamasyon ve travmatik strese de sayıları artan MDSC'ler kanserde başlıca periferik kan, lenf nodları ve dalakta bulunmaktadır (110-112). MDSC'ler myeloid hücrelerin tam olarak tanımlanmış bir alt grubu olmaktan ziyade matür hücrelere farklılaşmaları engellenmiş aktive immatür hücrelerin oluşturduğu heterojen bir topluluktur. Pek çok tümör modelinde ve insan kanserlerinde MDSC popülasyonunda artış gözlenirken MDSC'lerin ortadan kaldırılması hastalık ilerlemesinde dramatik bir iyileşme ve bazen direk anti-tümör etki ile sonuçlanmaktadır. MDSC'ler aynı zamanda anjiyogenez, tümör hücresi invazyonu ve metastazlardaki artışlara da katkıda bulunurlar (113).

2.5.1. MDSC'lerin Gelişimleri ve Aktivasyonları

Siklooksijenaz 2 (COX2), prostaglandinler, kök hücre faktörü (SCF), Makrofaj koloni stimüle edici faktör (M-CSF), interlökin-6 (IL-6), GM-CSF, ve vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) MDSC gelişimine neden olmaktadır. Bu faktörlerin pek çoğunun ortak noktası ise Janus Kinaz (JAK) protein ailesi ile

sinyal iletici ve transkripsiyon aktive edici 3-(STAT3) yolağını kullanırlardır. Böylelikle sağkalım ve proliferasyon artarken, farklılaşma ve apoptoz azalmaktadır (114). Hematopoietik progenitörler, tümör hücre kültürlerinden elde edilen süpernatantlarla kültüre edildiklerinde, JAK2 ve STAT3 aktivasyonu sonucunda MDSC gelişimi gözlenmiştir (115). Aynı zamanda STAT3 seçici inhibitörleri kullanılan ya da şartlı STAT3 knockout tümürlü farelerde MDSC gelişimi önemli ölçüde azalmış ve T hücre cevapları artmıştır (116).

MDSC'lerin baskılama yapabilmeleri için aktive olmaları gerekmektedir (114). Buna tümör hücre ölümü ve aktive olan T hücrelerden salınan IFN- γ , TLR ligandları, interlökin-4 (IL-4), interlökin-13 (IL-13) ve TGF- β gibi moleküller neden olmaktadır. Burada sinyal iletici ve transkripsiyon aktive edici-1 (STAT1) ve sinyal iletici ve transkripsiyon aktive edici-6 (STAT6) yolları başrol üstlenmektedirler (114). Tümör kaynaklı TGF- β da MDSC birikimi ve nötrofil polarizasyonunu düzenler (72). MDSC'lerde sitokin ve büyüme hormonları aracılığı ile aktive olan yollar şekil 2.1.'de özetlenmiştir.



Şekil 2.1. MDSC'lerin aktivasyon yolları.

STAT1 yolağı, IL-1 β ve IFN- γ uyarımı ile STAT3 yolağı, IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-11, G-CSF, GM-CSF, VEGF ve HSP70 uyarımı ile STAT5 yolağı, GM-CSF uyarımı

ile; STAT6 yolağı, IL-4 ve IL-13 uyarımı ile aktive olmaktadır. STAT1 aktivasyonu sonrasında ekspresyonları artan iNOS ve ARG1, nitrik oksit üretimi ve L-arjinin tüketimine; STAT3 yolağının aktivasyonu sonrasında ekspresyonları artan S100A8, S100A9, NOX2, BCL-XL, cyclin D1, survivin, MYC, C/EBP β , PKC β II, proliferasyon ve ROS üretimine; STAT5 yolağının aktivasyonu sonrasında ekspresyonları artan BCL-XL, cyclins, survivin, MYC proliferasyona; STAT6 yolağının aktivasyonu sonrasında ekspresyonları artan NOX2 ve ARG1, ROS üretimi ve L-arjinin tüketimine yol açar. ARG1, arjinaz 1; BCL-XL, B hücre lenfoma XL; C/EBP β , CCAAT/enhansır-bağlanma protein- β ; G-CSF, granulosit koloni-stimüle edici faktör; HSP70, ısı şoku proteini 70; iNOS, indüklenbilir nitrik oksit sentaz; NOX2, NADPH oksidaz 2;

2.5.2. MDSC'lerin Fonksiyonel Özellikleri

MDSC'lerin en karakteristik özellikleri kanserde T hücre toleransına neden olmalarıdır. Bu işlemde MDSC tarafından üretilen ROS ve NO ve peroksinitrit en önemli rolü oynamaktadır ve antijen özgül toleranstan sorumludur. Sitokin üretimi ve diğer metabolik özellikler ile MDSC'ler antijen bağımsız baskılamaya yol açmaktadırlar. MDSC'ler iki özel mekanizma ile baskılama yaparlar. Bunlar;

Antijene Özgün Baskılama

İmmatür myeloid hücrelerin çok miktarlarda hidrojen peroksit (H_2O_2) ürettikleri bildirilmiştir. Hidrojen peroksitin T hücre cevaplarını baskılamada rol aldığı bildirilmiştir. Dahası H_2O_2 Ca^{+} bağımlı bir mekanizma ile MDSC'lerin in vitro koşullarda daha uzun immatür halde kalmasına yol açmakta ve GM-CSF aracılı proliferasyonlarına katkı sağlamaktadır (117,118). MDSC'lerin reaktif oksijen türevi (ROS) üretimi STAT3 transkripsiyon faktörü ile kontrol edilen Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oksidaz (NOX2) aktivitesine bağımlıdır ve T hücrelerine antijen sunumu ile önemli artış göstermektedir (118,119). Öte yandan ROS üretimi CD11b, CD18 ve CD29 gibi integrinlerin bağlanması, TGF- β , IL-6, IL-10, Platellet kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) ve GM-CSF gibi tümör kaynaklı faktörler ile de artmaktadır (118,120).

MDSC'lerin yüksek miktarlarda nitrik oksit ürettikleri ilk tanımlandıkları zamanlardan bu yana bilinmektedir. MDSC'lerin nitrik oksit üretimindeki artış başlıca indüklenabilir nitrik oksit sentaz (iNOS) aktivitesine bağımlıdır ancak endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) ve diğer türevleri de bu üretime katkıda bulunurlar (121). Ancak bu bileşiklerin T hücre toleransına olan etki mekanizmaları çok daha sonradan tespit edilebilmiştir. Buna göre, H_2O_2 ile NO^- etkileşiminden vücutta sentezlenen oksidatif bir ajan olan peroksinitrit $ONOO^-$ (PNT) oluşmaktadır. NO^- üretimi bazal seviyelere çekilmiş olan iNOS knockout MDSC'ler PNT sentezi ve baskılama kapasitelerini korurken, H_2O_2 üretimleri olmayan NOX2 knockout MDSC'lerde PNT sentezi ve baskılama ortadan kalkmaktadır. Özgül bir peroksinitrit nötralizanı olan ürik asit ortama eklendiğinde ise bütün MDSC'ler baskılama yeteneklerini yitirmişlerdir. Buradan PNT üretiminde en kritik faktörün MDSC'lerde artan ROS üretimi olduğu ve baskılamada da peroksinitritin başrol oynadığı sonucuna varılmıştır (121).

MDSC'ler tarafından üretilen oksidatif ajanların temel etki mekanizması T hücre reseptör (TCR) kompleksinin bütünlüğünün bozulması üzerinedir. Bu bağlamda yapılan ilk çalışmalarda PNT'nin TCR zincirlerindeki tirozin bölgelerinin kararlı nitrosilasyonu sonucu MHC ile bağlantı kurmasına engel olarak T hücre toleransına yol açtığı düşünülmüştür (121). İlerleyen araştırmalarda ise bu etkinin nasıl olup da antijen özgül toleransa neden olduğu incelenmiştir. Genetik modifikasyonlar ile aynı hücre üzerinde iki farklı antijene karşı iki farklı TCR içeren CD8+ T hücreler geliştirilmiş ve MDSC'ler ile kültüre alınmışlardır. Sonuçta sadece MDSC'ler tarafından sunulan peptide karşı tolerans gelişmiş, diğer peptide karşı cevapta bir değişiklik olmamıştır. Ayrıca, MDSC tarafından sunulan peptide karşı özgül olan TCR'larda önemli düzeylerde nitrosilasyon görülürken özgül olmayan peptidlerdeki nitrosilasyon çok düşük seviyelerde saptanmıştır. Bu aynı zamanda MDSC'lerin baskılayıcılık için neden hücre temasına ihtiyaç duyduklarını da açıklamaktadır. Böylece MDSC'lerin T hücrelere antijen sunarken Majör histokompatibilite kompleksi (MHC)-TCR sinapsı bölgesinde TCR moleküllerinin nitrosilasyonu ile antijen özgül anerjiye neden oldukları gösterilmiştir. Bu durum yeni bir TCR molekülünün sentezlenerek eskisinin yerini almasına kadar yaklaşık 3 gün boyunca etkili bir T hücre cevapsızlığına neden olur ve ek olarak nitrosilasyona

uğrayan TCR molekülleri CD3 ve CD8 ile de fiziksel etkileşim kurma kabiliyetlerini yitirmişlerdir. (122).

MDSC'lerin genellikle MHC sınıf II moleküllerini eksprese etmedikleri ve bu nedenle sadece CD8⁺ T hücreleri baskıladıkları bildirilse de bazı fare çalışmaları buna istisna teşkil etmektedir (123,124). Bu çalışmalarda, MHC II⁺ MDSC'lerin CD4⁺ T hücrelerine antijen sunduktan sonra MHC II dimerizasyonu ile E-twenty six-1 (Ets-1) ekspresyonlarını arttırdıkları tespit edilmiştir. MDSC'lerde artan Ets-1, siklooksijenaz2 (Cox2) ekspresyonu üzerinden prostaglandin E2 (PGE2) üretimine yol açar. Bu da MDSC'lere antijene özgül olmayan baskılayıcılık özelliği kazandırır. Devam eden kültürlerde bu MDSC'lerin antijen yokluğunda dahi CD4 ve CD8 yanıtlarını baskılayabildikleri gösterilmiştir (123). Burada MHC II ekspresyonu olan MDSC'lerin ilk olarak CD4⁺ T hücreleri ile antijen bağımlı bir kontak kurdukları ve CD4⁺ T hücre cevaplarını baskıladıkları düşünülmektedir (123). Başka bir grubun 4T1 fare meme kanseri modeli çalışmasında da MDSC'lerin antijen bağımlı olarak CD4 T hücre proliferasyonunu baskılayabildikleri gösterilmiştir (124).

Antijene Özgün Olmayan Baskılama

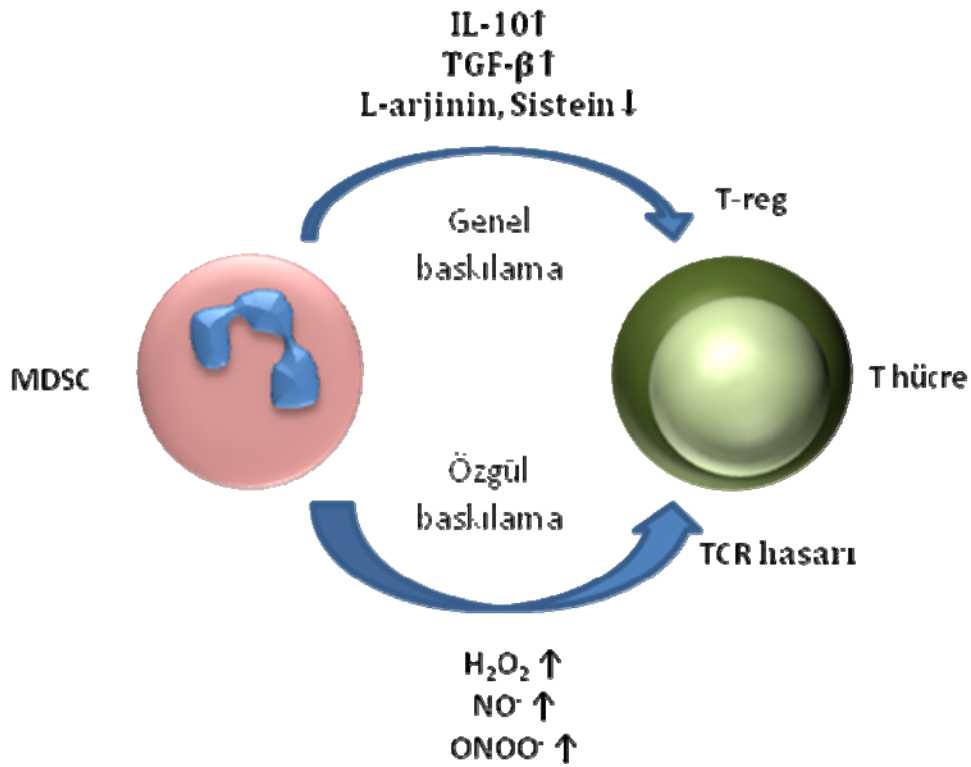
MDSC'ler antijenden bağımsız baskılama fonksiyonlarını öncelikle prostaglandin E2 (PGE₂) sentezleyerek gerçekleştirirler. PGE₂, T hücre proliferasyonunu doğrudan baskılar. T hücrelerin IL-2 sentezini ve cevabını engelleyerek diğer doğal immünite elamanlarını da IL-10 molekül sentezleyecek şekilde yönlendirirler (125). Ek olarak MDSC'ler membran bağlı TGF-β'ları ile NK hücrelerinin sitotoksitesini, NKG2D ekspresyonunu ve IFN-γ üretimlerini baskılamaktadırlar(126). MDSC'lerin antijene özgül olmayan baskılamalarında bir diğer özelliği de immün yanıtları kontrol altına alma özelliğindeki düzenleyici T hücrelerin (Treg) gelişimine neden olmalarıdır. MDSC'ler tarafından Treg hücrelerinin gelişiminin uyarılması halen tartışmalı bir konudur. Ancak, Treg gelişimlerinin tümöre özgül T hücrelerin aktivasyonuna gereksinim duyduğu ve IFN-γ, IL-10 ve TGF-β aracılığıyla olduğu düşünülmektedir (127). Diğer yandan bir grup araştırmacı Treg hücrelerinin tümör gelişimi boyunca MDSC'lerden bağımsız olarak fazla sayıda artmış olduğunu göstermiştir. Bir sıçan allograft tolerans modelinde de MDSC'lerin Treg gelişimine etkisinin oldukça sınırlı olduğu belirtilmiştir (73,128).

MDSC'lerin antijenden bağımsız baskılayıcılığı PGE₂ sentezi yanında genellikle ortamdaki besin maddelerinin tüketilmesi üzerinden işler. MDSC'ler yüksek Arjinaz 1 aktivitesine sahiptirler ve bu sayede aşırı L-arjinin katabolizmasına yol açarak ortamda bu amino asitin tüketilmesine neden olurlar. Ayrıca L-arjinin iNOS tarafından da katabolize edilmektedir (129). L-arjinin eksikliği, CD3 ζ zinciri ekspresyonunu düşürüp hücre döngüsü düzenleyicisi siklin D3 ve siklin bağımlı kinaz 4 (CDK4) seviyelerinin artışına engel olarak T hücre proliferasyonunu baskılamaktadır. Ayrıca iNOS ekspresyonları yüksek olan MDSC'ler bu enzimin ürünü olan nitrik oksit aracılığıyla JAK3 ve STAT5 tirozin fosforilasyonunu azaltarak fonksiyonlarının baskılanmasına yol açmaktadır (114,130,131). Bu işlemde nitrik oksitin JAK'ları defosforile eden SHP2'yi aktive etmesi ve STAT1 in DNA'ya bağlanması engellemesi gibi fonksiyonları rol alabilir. Ayrıca bir nitrik oksit duyarlı transkripsiyon faktörü olan AP-1'in sınıf II promotörü X2 kutusu dizisine bağlanmasını engelleyerek ya da NF- κ B heterotrimerinin sınıf II promotorundaki κ kutusuna bağlanmasını engelleyerek MHC II ekspresyonunu azaltmaktadır (131).

Ostrand-Rosenberg ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, sağlıklı fare Gr1⁺CD11b⁺ hücreleri, tümörlü hayvandan izole edilenler kadar baskılayıcı bulunmuştur. Ayrıca bu baskılama yalnız CD8⁺ T hücreleri değil, CD4⁺ T hücreleri de kapsamaktadır ve arjinaz blokajı ile ortadan kalkmaktadır (132). Devam eden çalışmalarında bu baskılamanın nedeni olarak MDSC'lerin ortamdaki sistin aminoasidini tüketmesi bir mekanizma olarak gösterilmiştir (133). Pek çok memeli hücresi sistatinyonaz enzimi aracılığı ile methionin aminoasitinden sistein üretebilir ya da ortamdaki sistini x_c⁻ taşıyıcıları ile alıp hücre içindeki indirgeyici ortamın etkisiyle sisteine çevirebilirler. Ancak naiv T hücreler ne bu enzimi ne de x_c⁻ taşıyıcılarını barındırmadıklarından sadece alanin-serin-sistein (ASC) taşıyıcıları ile ortamdaki sisteini alabilirler. Bu nedenle T hücrelerin proliferasyonları için ortamdaki sistini alıp, sisteine çevirip, kendi ASC taşıyıcıları ile tekrar dışarı veren antijen sunan hücrelere (ASH) ihtiyacı vardır. Bu durum ASH'lerin T hücre yanıtlarını kontrol altında tuttukları bir mekanizma olarak gösterilmiştir (134). MDSC'ler ise x_c⁻ taşıyıcıları ile ortamdaki sistini alabilirler fakat ASC taşıyıcısı barındırmadıkları için hücre içinde oluşan sisteini T hücrelerin kullanımı için dışarıya veremezler ve böylece ortamdaki sistini tüketerek T hücre proliferasyonunu engellerler (133).

Yetmişli yıllardan beridir lenfosit kültürlerinde kullanılan β -mercaptoethanol (2-ME) kültüre eklenen serumda bulunan sistini, T hücrelerin alımı için sistine çevirmektedir (133). Son yıllarda, insan T hücrelerinin aktivasyon sonrasında zamanla x_c^- taşıyıcılarını sentezledikleri ve proliferasyon esnasında kendilerine yetecek sistini alabildikleri gösterilmiştir (135). Ancak insan T hücreleri için bile sistin yoğunluğu hız sınırlayıcı faktördür ve CD3/CD28 uyarımı ile 72 saatlik proliferasyon düzeyleri, ortamdaki 2-ME yoğunluğuna son derece bağımlıdır (135). Sonuç olarak MDSC'lerin genellikle antijen özgül baskılama oluşturdukları söylenebilir. İleri evre kanser hastalarında yüksek doz kemoterapi sonrası veya terminal evre dışında sistemik bir immünyetmezlik görülmemesi bu görüşü desteklemektedir (114).

MDSC'lerin buldukları yer de baskılama şekillerine etki etmektedir. Örneğin dalaktaki MDSC'ler yüksek seviyelerde ROS içerirken makul düzeylerde NO ve ARG1 sentezlemektedirler ve böylece üretebildikleri PNT ile kontak bağımlı şekilde aktive T hücreleri baskırlarlar. Tümörde bulunan MDSC'ler ise daha yüksek NO ve ARG1 ekspresyonlarına sahiptirler ve ROS seviyeleri düşüktür böylece hem ortamdaki antijen özgül T hücreleri baskırlarlar hem de non-özgül baskılama yapabilirler (136). MDSC'lerin baskılamada kullandıkları mekanizmalar Şekil 2.2.'de özetlenmiştir.



Şekil 2.2. MDSC'lerin baskılama mekanizmaları.

MDSC'lerin T hücre proliferasyonu ve aktivasyonunu baskılamada kullandıkları iki farklı mekanizma gösterilmiştir. Antijen özgül baskılamada, hidrojen peroksit ve nitrik oksit ile her ikisinin varlığında ortaya çıkan peroksinitritin TCR yapısında oluşturduğu oksidatif hasar rol oynar. Antijen özgül olmayan baskılamada ise IL-10 ve TGF-β aracılı Treg fenotiplerine dönüşüm ve a.a tüketimi ile metabolik yetersizlik rol oynar.

2.5.3. MDSC'lerin Diğer Myeloid Kökenli Hücrelerle İlişkileri

Polimorfonükleer MDSC'leri nötrofillerden ayıran özelliklerin başında nötrofillerin baskılayıcı olmayışı gelmektedir. Ek olarak PMN-MDSC'ler yüksek düzeylerde CD115 ve CD244 eksprese ederlerken nötrofillerden daha düşük CXCR1 ve CXCR2 seviyelerine sahiptirler. Son olarak da PMN- MDSC'lerin nötrofillerden daha düşük fagositoz yeteneğine sahip oldukları, daha yüksek ARG1 ve MPO ile ROS aktivitesine sahip oldukları söylenebilir (72).

Benzer bir şekilde monositik MDSC'ler de inflamatuvar monositler ile benzer fenotip ve morfolojide olmalarına karşın yüksek derecede baskılayıcıdır ve artmış iNOS ve ARG1 ekspresyonları mevcuttur(72). MDSC'ler dendritik hücre, makrofaj

ve granüositlerin doğrudan öncüllerini barındırmaktadır. Öyle ki 24 saatlik *in vitro* kültür sonrasında PMN-MDSC'ler fenotipik ve fonksiyonel olarak nötrofil karakteri kazanırlar ve tümör kaynaklı faktörler olmadan yapılan kültürlerde ya da tümörsüz hayvanlara aktarıldıklarında matür DC ve makrofajlara dönüşürler (72,137). MDSC'ler makrofajları IL-10 ve hücre teması bağımlı bir şekilde M2 fenotipine dönüştürürler (138). Benzer bir şekilde IL-10 aracılığıyla dendritik hücrelerin de TLR uyarısına karşı IL-12 üretimlerini azaltarak DC aracılı T hücre aktivasyonunu engellerler.(139).

2.5.4. MDSC'lerin Belirlenmesi

MDSC'ler myeloid hücrelerin tam olarak tanımlanmış bir alt grubu olmaktan ziyade matür hücrelere farklılaşmaları engellenmiş aktive immatür hücrelerin oluşturduğu heterojen bir topluluktur. MDSC'ler, monositler makrofajlar ve dendritik hücreler tarafından özgül olarak ifade edilen belirteçleri taşımazlar ve granüosit ya da monosit morfolojisindeki hücrelerden oluşurlar (114). Farelerde ilk olarak myeloid seri farklılaşma antijenleri Gr-1 ve CD11b taşıyan hücreler olarak tanımlanmışlardır. (106) Normal fare kemik iliğinin %20-%30'u bu hücrelerden oluşurken sağlıklı fare dalağında %2-4 oranında bulunurlar ve lenf nodlarında tespit edilmemişlerdir tümörlü farelerde ise dalakta ve kanda %50'lerin üzerine çıkan birikimleri bildirilmiştir (114). İnsanlarda ise genel olarak CD14⁻CD11b⁺ veya CD33⁺ Lin⁻ HLA-DR⁻ hücreler olarak tanımlanırlar (114).

Son yıllarda farelerde yapılan çalışmalarda CD11b pozitif myeloid hücre serisinde, Gr-1 antijeninin iki farklı epitopunu tanıyan antikorlar olan Ly6G ve Ly6C bağlanmalarına göre MDSC'lerin morfolojik heterojenitesi daha detaylı belirlenmiştir (140). Buna göre MDSC'ler CD11b⁺LY6G⁺LY6C^{low} granüositik ve CD11b⁺LY6G⁻LY6C^{hi} monositik olmak üzere iki tipe ayrılmışlardır (140). Fareler üzerinde yapılan MDSC çalışmalarında son olarak CD49d⁺ bir alt grup tanımlanmış ve başlıca monositik karakterdeki bu hücrelerin antijen özgül T hücre proliferasyonunu NO bağımlı bir mekanizma ile baskıladığı gösterilmiştir (141). On farklı fare tümör modelinde yapılan çalışmada her iki alt-tipte de sayısal artış gözlenmiş olup granüositik hücreler monositik olanlardan çok daha fazla birikim göstermektedirler (140). Granüositik tipte olanların ana baskılayıcı mekanizmasının ROS sentezi,

monositik tipte olanların ise iNOS ve çeşitli sitokin salınımları olduğu gösterilmiştir (128). ROS aracılı baskılamamanın hücre-hücre kontağına gereksinim duyduğundan bahsedilmiştir. Bu nedenle, granülositik tipteki MDSC'lerin baskınlığı pek çok tümör modelinde görülen antijene özgül toleransın nedeni olabilir (142). Ancak ilginç bir şekilde her iki alt-tipin de eşit seviyelerde antijene özgül baskılamaya neden olduğu gösterilmiştir (128,140). *In vitro* koşullarda dendritik hücre ve makrofajlara matürasyon yeteneği ise yalnızca monositik grupla sınırlıdır (140).

Neredeyse tüm fare tümörlerinde başlıca birikim gösteren granülositik MDSC'ler olmasına rağmen bu hücrelerin proliferasyon yetenekleri yoktur. Öte yandan daha az birikim görülen monositik MDSC'lerin yüksek proliferasyon yetenekleri vardır. Bu durum insan ve farelerde yapılan bir çalışmayla açıklığa kavuşturulmuştur (143). Buna göre MHC II negatif monositik MDSC'ler retinoblastoma geni bağımlı bir şekilde *in vitro* ve *in vivo* koşullarda granülositik MDSC'lere dönüşmektedirler. Bu durum her iki alt-tipin baskılayıcılığının karşılaştırıldığı çalışmalarda tespit edilen benzerliği ve monositik hücrelerin aynı zamanda granülositik hücreleri de oluşturduklarından dolayı neden hücre başına daha çok baskılayıcı olduğunu açıklamaktadır.

MDSC'lerin heterojenitesi fazla bir hücre grubu oluşu, önümüzdeki yıllarda farklı baskılayıcı fenotiplere sahip alt-grupların belirleneceğinin göstergesidir.

2.6. Sıçan Meme Kanseri Modelleri

Kimyasal olarak tetiklenen deneysel karsinogenez modelleri *in vivo* kanser çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır. Güçlü kanser oluşturma özelliğine sahip olduğu bildirilen N-nitroz-N-metilüre (NMU)'nin periyodik olarak periton içerisine injeksiyonu, dişi Sprague-Dawley sıçanlarda yüksek insidansla meme adenokarsinomu oluşumuna neden olur (144). Bu yöntemle geliştirilmiş tümör kitlelerinin gelişimi ve yayılımı zamana bağlı olarak izlenebilmektedir. NMU ile oluşturulmuş sıçan meme adenokarsinoma modelinin, insan meme kanseri ile duktal köken, heterojenite, histopatoloji, agresiflik ve metastaz kapasitesi, östrojen bağımlılığı, total gen ekspresyon profili ve intra tümöral lenfoid hücre infiltrasyonu profilleri açısından benzerliği, farede oluşturulan diğer meme kanseri modellerine göre daha fazladır (144-147). NMU uygulaması oldukça esnek olmasına karşın en

hızlı ve yüksek karsinoma insidansına, 21 günlük pubertedeki dişi Sprague Dawley sıçanlara haftalık NMU enjeksiyonları ile ulaşılmıştır (148,149). Öte yandan, dışsoy hayvanların heterojenitesi ve mevsimsel etkiler nedeniyle tümör insidansında gelişen yüksek varyasyon ve meme karsinomalarına eşlik eden fibroadenoma, hiperkeratotik papillomalar gibi diğer malinitelerin varlığı bu modelin dezavantajlarını oluşturmaktadır (149,150).

Aynı modeli kullanarak tamamladığımız bir önceki çalışmada tümöre infiltre olmuş T hücre popülasyonunun büyük çoğunluğunun düzenleyici fenotipte ($CD4^+ CD25^{hi}$ veya $CD4^+ Foxp3^+$, $CD8^+ Foxp3^+$) olduğu, aynı şekilde lenf nodları ve dalaktaki T hücre popülasyonlarının da artmış düzenleyici ($CD4^+ CD25^{hi}$ Treg) fenotipte T hücre alt tiplerini içerdiği gösterilmiştir (151).

Sıçanlarda N-nitroz-N-metilüre ile tetiklenen meme kanseri modelinde daha önce çalışılmamış olmasına rağmen MDSC'lerin varolabileceğine dair bazı ipuçları vardır. Örneğin meme tümörü taşıyıcısı sıçanların periferik kanlarında anlamlı bir nötrofil akümüasyonu tespit edilmiştir (150). Ancak bu birikimin bir tolerans mekanizması değil de büyük tümörlere karşı oluşturulan bir inflamatuvar immün cevaptan ileri geldiği yönünde görüş bildirilmiştir. Bölümümüzde yapılan önceki çalışmada da, meme kanseri olan sıçanların splenositlerinin proliferasyon kapasitelerinin düştüğü ve bu hayvanların dalak ve neoplastik dokularında TGF- β ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (151). Son olarak NMU ile oluşturulmuş tümör hücrelerinin yüksek miktarlarda IL-10 sentezlediği bildirilmiştir (145). Glioma dışındaki sıçan kanser modellerinde MDSC'lerin varlığı, fonksiyonel kapasiteleri, immün kompartmanlarda dağılımları ve olası alt grupları daha önce çalışılmamıştır.

2.6.1. Sıçan MDSC'leri ve Myeloid Hücreleri

Sıçan MDSC'leri üzerine yapılan çalışmalar son derece sınırlıdır. İlk olarak Fischer 344 sıçanları ile yapılan bir T9 glioma modelinde MDSC'leri $CD11b/c^+$ ve $HIS48^+$ hücreler olarak tanımlanmışlardır (152). 2002 yılında yapılan bu çalışmadan bu yana sıçan MDSC belirteçlerinde $CD172a$ (SIRP α) ekspresyonu dışında hiçbir değişiklik kaydedilememiştir. Benzer çalışmalarda sıçan MDSC'lerinin TGF- β ve iNOS ifade ettikleri gösterilmiş olup glioma infiltre MDSC'lerin baskılayıcı niteliklerinden nitrik oksitin sorumlu olduğu gösterilmiştir (66,73,153). Bu

çalışmalarda kullanılan CD11b/c antikoru integrin α 'nın hem M hemde X tipinde ortak bulunan bir epitopa özgül olup HIS48 antikoru bir granülosit belirteci olarak kabul edilmiştir. HIS48 antikorunun tanıdığı epitop henüz tanımlanmamış olup ticari olarak 'sıçan granülosit antikoru' olarak adlandırılmasına karşın monosit ve makrofajlara da bağlandığı bilinmektedir (154). Bu nedenle, önceki sıçan çalışmalarında tanımlanan MDSC'lerin granülositik tipte olup olmadığı belirsizliğini korumaktadır.

İlk olarak 1995'de sıçan monositleri CD43 ekspresyonlarına göre iki alt grupta incelenmiştir. CD43^{high} popülasyonlar küçük boyutta olup düşük FSC ve SSC değerlerine sahipken CD43^{low} popülasyonlar daha granüllü görünümde ve büyük hücrelerdir (155). Aynı çalışmada CD43^{low} hücrelerin bir diğer granülosit antikoru olan RP-3 için de pozitif oldukları gösterilmiştir. CD43 ve CD16 aynı zamanda sırasıyla fare ve insan monosit alt-tiplerini ayırt etmekte kullanılmışlardır (156). Faredeki CD43^{high} ve insandaki CD16^{high} monositler, sıçan CD43^{high} monositleri ile benzer morfoloji gösterirler ve klasik dışı monositler olarak isimlendirilirler. Sıçan ve farelerin CD43^{low} monositleri ise CCR2 ve CCR7 pozitifliği göstererek inflame dokuya göç etme kapasitesine sahiptirler. Bu nedenle klasik ya da inflamatuvar monositler olarak adlandırılmışlardır (156,157). Bugüne kadar ne CD43'ün ne de CD16'nın monositik MDSC'lerde ifadeleri incelenmemiş olmasına karşın CCR2 ekspresyonu pek çok tümör modeli ve melanoma hastalarının kanlarındaki baskılayıcı monositik hücrelerde bulunmaktadır bu da monositik MDSC'lerin inflamatuvar monositlere benzediğini düşündürmektedir (158).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışmada bahsi geçen tüm deneyler ve analizler aksi belirtilmediği hallerde Hacettepe Üniversitesi Temel Onkoloji Anabilim Dalı bünyesindeki ana araştırma laboratuvarı ile hücre kültürü, akım sitometri ve girişimsel hayvan laboratuvarlarında yapılmıştır.

3.1. Hayvanlar

Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları Yetiştirme ve Bakım Ünitesi'nden ve KOBAY AŞ'den 21 günlük 66 adet Sprague Dawley cinsi dişi sıçan temin edilmiştir. Tüm hayvanların bakımları Deney Hayvanları Yetiştirme ve Bakım Ünitesindeki konvansiyonel laboratuvar koşullarında yapılmış olup sınırsız su ve yiyecek sağlanmıştır. 38 hayvana deney grubunu oluşturmaları için NMU enjeksiyonu yapılmış ve 4 hayvana antijen özgül proliferasyon analizleri için Conalbumin enjeksiyonu yapılmıştır. Ayrıca 24 adet sağlıklı Sprague Dawley cinsi dişi sıçan temin edilmiştir. Bu hayvanlar da kontrol grubunu oluşturmak üzere eş zamanlı olarak aynı bakım hizmetinden faydalanmışlardır. Kontrol grubunu oluşturan hayvanlara enjeksiyon yapılmamıştır. Bu proje Hacettepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 2007 / 68-5 numaralı kararı ile deneylere başlanmadan önce onaylanmıştır. Uygulanan tüm prosedürlerde Helsinki deklarasyonunda belirlenen etik standartlara uygun hareket edilmiştir.

3.2. Sıçan Kimyasal Meme Kanseri Modeli

N-nitroso-N-metil üre (NMU) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ABD) çözeltisi pH=5 steril serum içerisinde %0.9, w/v olacak şekilde enjeksiyon günü taze olarak hazırlanmıştır. Deney grubundaki 38 hayvana 4 hafta boyunca haftada bir kez olmak üzere 50mg/kg dozunda NMU enjeksiyonları intra-peritoneal yol ile gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.1.). Hayvanların enjeksiyon esnasındaki ağırlıkları kaydedilmiştir (Tablo-3.1.). İlk enjeksiyondan sakrifikasyon anına dek tüm hayvanların fiziksel durumları rutin olarak kontrol edilmiştir. Hareketlilik ve tepkilerinde anomali gösteren hayvanlar acilen sakrifiye edilerek deneye dahil edilmişlerdir. Tüm sakrifikasyonlar eter anestezisi altında gerçekleştirilmiş olup kardiyak delme işlemleri esnasındaki anestezisi derinliği ayrı bir araştırmacı tarafından

izlenerek sabit tutulmuştur. Tümörlü hayvanların sakrifikasyonu sonrasında tümör sayıları ile tümör çapları ve lokasyonları kayıt altına alınmıştır.



Şekil 3.1. Intraperitoneal Enjeksiyon

21 günlük dişi sıçanlara 50mg/kg dozunda %0.9 NMU çözeltisi haftalık olarak enjekte edilmiştir. Ardışık haftalarda enjeksiyonlar sağ ve sol bölgelerden uygulanmıştır.

Tablo 3.1. Kullanılan hayvanların enjeksiyon tarihleri ve ağırlık bilgileri.

Grup	1.enjeksiyon ort.ağırlık	2.enjeksiyon ort.ağırlık	3.enjeksiyon ort.ağırlık	4.enjeksiyon ort.ağırlık
1.Tümör grubu	25.08.2010 36.9g 5 adet	01.09.2010 43.1g 5ad	08.09.2010 53.2g 5 ad	15.09.2010 110.8g 5 ad
2.Tümör grubu	10.11.2010 41.5g 4 adet	17.11.2010 41.6g 4 ad	24.11.2010 52.8g 4ad.	01.12.2010 84.2g 4 ad
3.Tümör grubu	06.05.2011 33.4g 3 adet	13.05.2011 53.4g 3ad.	20.05.2011 76.3g 3ad.	30.05.2011 78.4g 3ad.
4.Tümör grubu	07.06.2011 31.2g 4 adet	14.06.2011 31.4g 4ad.	22.06.2011 54.6g 4ad.	29.06.2011 72.7g 4ad.
5.Tümör grubu	06.09.2011 32.9g 5 adet	13.09.2011 40.7g 5ad.	20.09.2011 61.1g 5ad.	27.09.2011 86.8g 5ad.
6.Tümör grubu	03.01.2012 40.5g 6 adet	11.01.12 36,8g 6adet	18.01.12 57,6g 6adet	25.01.2012 86,2g 6adet
7.Tümör grubu	18.04.2012 33,2g 2 adet	25.04.2012 49,5g 2 adet	02.05.12 69,7g 2 adet	09.05.12 92,5g 2 adet
8.Tümör grubu	17.10.2012 37,45g 4 adet	23.10.2012 40,5g 4 adet	31.10.2012 60,85g 4adet	07.11.2012 79,56g 4 adet
9.Tümör grubu	30.11.2012 39g 5 adet	07.12.2012 45,56g 5adet	14.12.2012 59,58g 5adet	21.12.2012 66,48g 5 adet
				Toplam 38

3.3. Conalbumin İmmünizasyonları

Conalbumin özgül T hücrelerin gelişimi için 4 adet sağlıklı Sprague Dawley dişi sıçana 1/1 oranında CFA (Complete Freund's Adjuvant) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ABD) ile süspansiyon yapılmış 100µg Conalbumin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ABD) ayak tabanlarından sub-kütenöz yolla enjekte edilmiştir. Enjeksiyonlar 14 gün sonra tekrar edilmiştir. Hayvanlar ilk conalbumin enjeksiyonundan 30 gün sonra sakrifiye edilerek dokuları izole edilmiştir.

3.4. Dokuların izolasyonu

3.4.1. Comet Analizleri İçin Periferik Kan İzolasyonu

DNA hasarı tespiti için NMU enjeksiyonlarından sonra deney grubundaki ve enjeksiyon yapılmamış sağlıklı hayvanlardan 100'er µl kan alınmıştır. Bu işlem esnasında hayvanlar bir strainer içerisinde sabitlenmiş ve kuyruklarına ılık su uygulanarak kuyruk venlerinin dilatasyonu sağlanmıştır. Heparin içeren insülin enjektörü yardımı ile kaudal venlerden kan izolasyonları gerçekleştirilmiştir. İşlem sonrasında kuyruk bölgesi alkol ile temizlenerek hayvanların bakımlarına devam edilmiştir.

3.4.2. ELISA Testleri İçin Periferik Kandan Serum İzolasyonu

Sakrifikasyonlar öncesinde ve eter anestezisi altında anti-koagulan içermeyen 1,5 ml'lik tüplere kuyruktan yaklaşık 1ml kan alınmıştır. 15-30 dakika koagülasyon için oda sıcaklığında bekletilen kan örneği 13.000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Sonrasında serum ayrı 1,5 ml'lik tüplere alınarak eliza testleri için -80 C°'de saklanmıştır.

3.4.3. Flow Sitometri ve FACS İçin Periferik Kan İzolasyonu

Sakrifikasyonlar öncesinde ve eter anestezisi altında heparin ile yıkanmış enjektör aracılığı ile kardiak delme uygulanmıştır. İzole edilen 5-6 ml kandan eritrosit lizis ile hücreler izole edilerek flow sitometri ve FACS işlemlerinde kullanılmıştır.

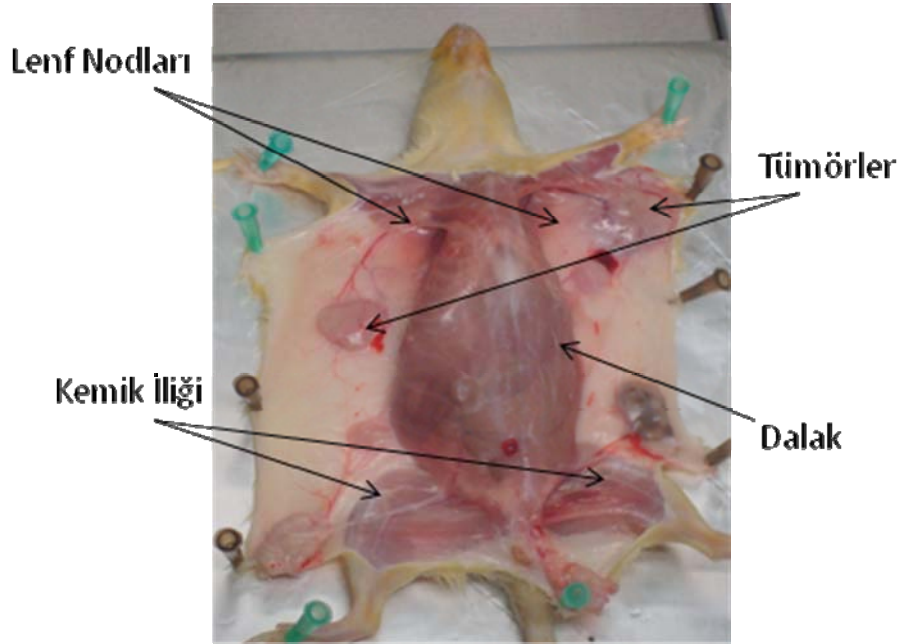
3.4.4. Dalak İzolasyonu

Periton makas yardımıyla açılarak iç organlara ulaşılmıştır (Şekil 3.2.). Dalak çıkarılarak 6 kuyulu plaklar içerisindeki PBS + %10 FBS solüsyonuna alınmıştır. Hücre izolasyonlarına kadar dokuların su kaybını önlemek amacıyla yaklaşık 30 dakika bu solüsyonda bekletilmişlerdir.

3.4.5. Kemik İliği İzolasyonu

Her iki femur da bistüri yardımıyla kaslardan ayrılarak eklem yerlerinden çıkarılmış, uç kısımları makas ile kesilerek açılmıştır (Şekil 3.2.). 10ml'lik bir enjektör ile kemiklerin uçlarından içeren PBS + %10 FBS enjekte edilerek kemik iliğinin 6 kuyulu plaklarda toplanması sağlanmıştır.

Ayrıca tüm iç organlar incelenerek metastaza sahip dokular ve abdominal tümörler kayıt altına alınmıştır.



Şekil 3.2. Sakrifikasyon sonrası doku izolasyonları.

Tümörler kesildikten sonra sırasıyla; tümör drene lenf nodları, dalak ve her iki femur çıkarılır. Tüm iç organlar metastazlar için incelenmiştir.

3.4.5. Tümörlerin İzolasyonu

Nekropside abdominalden başlayarak tüm ventral bölgenin derisi makas ve bistüri yardımı ile açılarak iğneler ile sabitlenmiştir (Şekil 3.2.). Bu şekilde tümörlere erişim sağlanmıştır. Tümörler bistüri yardımıyla etrafındaki bağ dokusundan ayrılmış ve içerisinde PBS + %10 FBS bulunan 6 kuyulu plaklara alınmıştır.

3.4.6. Lenf Nodlarının İzolasyonu

Ulaşılabilir durumda olan tümör drene lenf nodları ve conalbumin immünize hayvanların popliteal lenf nodları da çıkarılarak içerisinde PBS + %10 FBS bulunan 6 kuyulu plaklara alınmıştır.

3.5. Hücrelerin İzolasyonu

3.5.1. Periferik Kandan Hücre İzolasyonları

Kan örneği enjektörlerden 15ml'lik falkon tüplere alınarak 5ml örneğin üzerine 10ml Amonyum-klorür-potasyum (ACK) tamponu eklenip karıştırılarak 10-15 dakika karanlık bir ortamda oda sıcaklığında bekletilmiştir. ACK tamponunun içeriği tablo 3.2. de belirtilmiştir. Süre sonunda 5 dk 200 g gücünde santrifüj edilmiş ve süpernatant uzaklaştırılarak 10ml PBS ile süspansiyon edilmiştir. Beklenilmeden 400 g gücünde 5 dk santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırılmış ve hücre pelleti tam besiyeri ya da PBS + %10 FBS ile süspansiyon edilmiştir. Özellikle bazı tümörlü hayvanların periferik kanlarındaki tüm eritrositlerin lizisi için bu işlemin iki kere tekrar edilmesi gerekmiştir.

Tablo 3.2. ACK lizis tamponu bileşenleri.

Bileşenler	1 litre H ₂ O içerisinde son konsantrasyon	1 litre için gerekli miktar
NH ₄ Cl	0.15M	8,29g
KHCO ₃	0.01M	1g
Na ₂ EDTA	0.1mM	37.2mg
pH: 7.2/7.4		

3.5.2. Dalaktan Hücre İzolasyonları

Plaklara alınan dalak 20ml PBS + %10 FBS içerisinde steril bir enjektörün pistonu yardımı ile 70um'lik filtrede ezilerek homojenize edilmiş ve diğer bir 70um'lik filtreden geçirilerek süzülmüştür. Dalak hücre süspansiyonu 50 ml'lik tüplere alınıp ACK lizis tamponu ile 1/1 oranlarında karıştırılmıştır. 10-15 dk karanlıkta ve oda sıcaklığında bekletilen hücreler 5 dk 200 g gücünde santrifüj edilmiş ve süpernatant uzaklaştırılarak 10ml PBS ile süspanse edilmiştir. Beklenilmeden 400 g gücünde 5 dk santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırılmış ve hücre peleti tam besiyeri ya da PBS + %10 FBS ile süspanse edilmiştir. Dalakta bulunan eritrositlerin lizisi için bu işlemin bir kez uygulanması yeterlidir.

3.5.3. Kemik İliğinden Hücre İzolasyonları

Plaklara alınan kemik iliği hücre süspansiyonu PBS + %10 FBS içerisinde steril bir enjektörün pistonu yardımı 70um'lik filtrede ezilerek ile homojenize edilmiş ve yeni bir 70um'lik filtreden geçirilerek süzülmüştür. Kemik iliği hücre süspansiyonundaki eritrositlerin lizisi için de dalakta uygulanan protokol tekrar edilmiştir.

3.5.4. Tümörden Hücre İzolasyonları

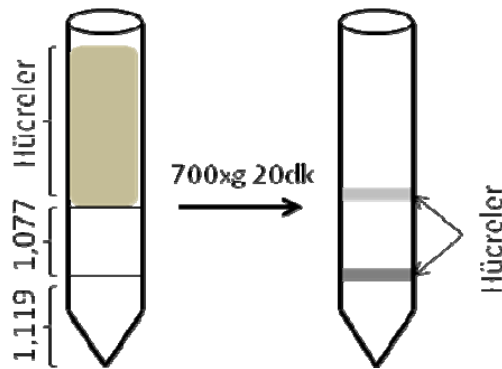
Tümörden myeloid hücrelerin izolasyonu için ilk önce havan ve metal elek yardımı ile fiziksel parçalama ve oluşan homojenatın percoll veya ficoll gradienti ile ayrılması sınanmıştır. Ancak bu yol ile myeloid hücrelerin zenginleştirilmesi gerçekleştirilememiştir. Tümörün bir enjektör pistonu aracılığıyla 70um'lik filtreden geçirilmesi ile elde edilen homojenatlar da myeloid hücre açısından fakir kalmışlardır. Enzimatik yöntemler aracılığı ile uygulanan parçalama da başarısız olmuştur. İzolasyon sonrasında epitel hücrelerinin baskın oranlarda bulunması ile myeloid hücrelerden morfolojik olarak ayrıl原因amıyor olmaları analizleri zorlaştırmakta, çok yüksek arka plan ışımalarına sahip olmaları da antikor işaretlemeleri ile ayırmayı olanaksız kılmaktadır. Bu nedenle tümör dokusundaki myeloid hücrelerin akım sitometrik olarak incelenmesi iptal edilmiştir. Bu doku için immünohistokimya daha uygun bir yöntem olabilir.

3.5.5. Lenf Düğümlerinden Hücre İzolasyonları

Plaklara alınan lenf nodları steril bir enjektörün pistonu ile 70 μ m'lik filtreden ezilerek geçirilmiştir. Kontrol hayvan lenf nodu hücreleri ile yapılan akım sitometri analizlerinde yüksek miktarlarda lenfosit popülasyonu gözlemlenmesine rağmen bu dokularda yeterli sayıda myeloid hücre elde edilememiştir. Tümörlü hayvanlarda ise tümörler genellikle lenf nodlarının bulunduğu bölgelerde geliştiğinden ve geniş tümörlerin yerleşmesi beklendiğinden lenf nodlarının tümör dokusundan ayırt edilmesinde güçlükler yaşanmıştır. Yetersiz lenf nodu izolasyonu nedeni ile bu dokudaki analizler terk edilmiştir. Daha küçük çaplardaki tümörler kullanılarak lenf nodu izolasyon başarıları artırılabilir

3.6. Yoğunluk Gradienti İle Myeloid Hücrelerin Zenginleştirilmesi

FACS saflaştırmalarında kullanılmak üzere myeloid hücrelerin zenginleştirilmesi amacı ile 1,077g/ml ve 1,119g/ml'lik Histopaque (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ABD) gradienti kullanılmıştır. Bu işlem için 15ml'lik tüplere 2,5ml 1,119 Histopaque onun üzerine de 2,5ml 1,077 Histopaque eklenmiş bu işlem yavaşça uygulanarak sıvıların birbirine karışmamasına özen gösterilmiştir. İki fazın üzerine ise 10ml eritrosit lizis işlemi geçirmiş hücre süspansiyonu karıştırılmadan yavaşça eklenmiştir. 700 g ve düşük fren gücü ile 20dk santrifügasyon sonrasında iki hücre gradienti elde edilmiştir (Şekil 3.3.).



Şekil 3.3. İkili lökosit dansite gradientinin şematik gösterimi.

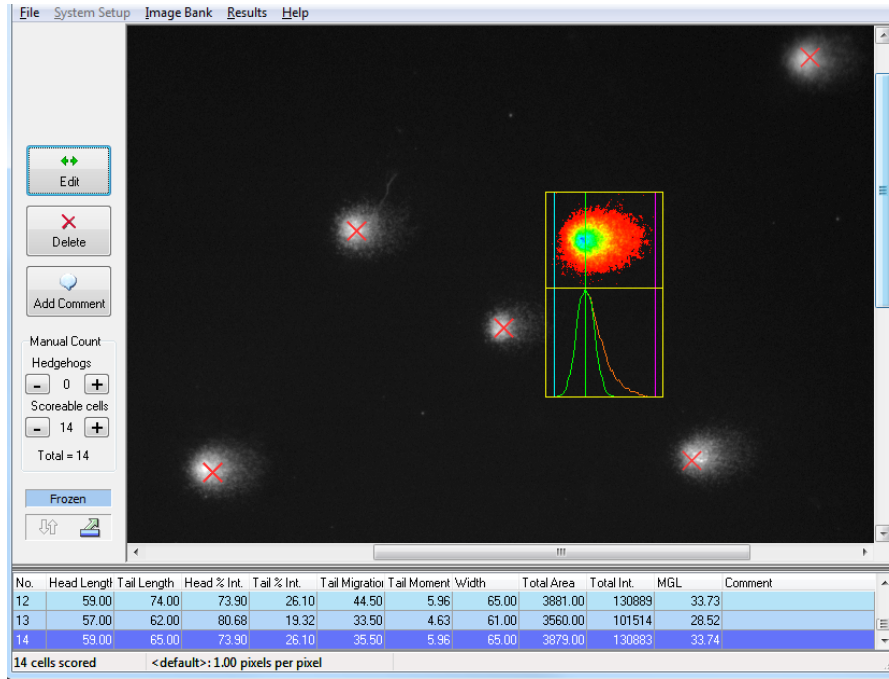
Santrifüj öncesi sol şekilde gösterildiği gibi 1,119g/ml histopque üzerine 1,077g/ml histopaque en son da hücre süspansiyonu eklenmektedir. Santrifüj sonrası sağ

şekildeki gibi hücreler yoğunluklarına göre iki farklı faz oluştururlar. Alt faz myeloid hücrelerce zengin iken üst fazda sıklıkla lenfositler bulunmaktadır.

3.7. Comet Analizleri

4 haftalık NMU enjeksiyonunun son enjeksiyonundan 24 saat, 1 ve 2 ay sonra alınan kanlar ile kontrol hayvanlardan alınan kanlar kullanılmıştır. İlgili protokoller daha önce belirtildiği şekilde uygulanmıştır (159,160).

Özetle; Normal erime sıcaklığına sahip agar (%1 'lik NMA) ile kaplanmış olan mikroskop slaytlarına 75µl düşük erime sıcaklığına sahip agar (%0,75'lik LMPA) ile karıştırılmış 10 µl tam kan eklenmiştir. Lamel ile üzeri kapatılan cam slaytlar buz üzerinde 5-10dk bekletilmiştir. Agarın donmasının ardından lameller nazikçe kaldırılmış ve slaytların üzerine 90 µl LMPA eklenmiştir. Tekrar lameller yerleştirilerek bu tabakanın da buz üzerinde donması sağlandıktan sonra lameller uzaklaştırılmış ve cam slaytlar taze hazırlanmış soğuk lizis solüsyonuna alınmıştır. Karanlıkta ve +4C°'de 2 saat süren inkübasyon sonrasında lizis solüsyonundan çıkarılan slaytlar yatay bir jel kutusuna yerleştirilerek rezervuar taze hazırlanmış pH>13 elektroliz tamponu ile slaytları tamamen örtünceye kadar doldurulmuştur. Alkali solüsyon içinde 20 dakika bekletildikten sonra güç kaynağı çalıştırılarak 24 volt ve 300 miliamper akımda 30 dakika elektroforez gerçekleştirilmiştir. Süre sonunda güç kaynağı kapatılıp slaytların üzerine nötralizasyon tamponu eklenerek 5 dk bekletilmiş ve bu işlem 3 kez tekrarlanmıştır. Daha sonra slaytlar %100'lük soğuk etanole alınarak dehidrate olmaları sağlanmış ve kurutularak saklanmışlardır. Analiz öncesinde slaytlar 80µl 1x ethidium bromür ile muamele edilmişler ve mikroskop ile görüntü alınmıştır. Comet Analysis Software, version 3.0 (Kinetic Imaging Ltd, Liverpool, BK) kullanılarak fragmente olmuş DNA migrasyonu değerlendirilmiştir (Şekil 3.4.). Görüntü analizleri, Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmakotoksikoloji Anabilim Dalı araştırmacılarının rehberliğinde ve laboratuvarlarının olanakları kullanılarak gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.4. Comet assay yazılımı temsili ekran görüntüsü.

Her bir nükleus otomatik olarak tanınarak ışık yoğunluğuna göre baş ve kuyruk kısımları belirlenmektedir. Baş kısmının çapı ile kuyruk uzunluğu oranları migrasyon verilerini verir.

3.8. Akım Sitometri Analizleri ve Hücre Ayrılama

Her bir hayvanın periferik kan, dalak ve kemik iliğinden izole edilen hücreler 100µl de 1×10^6 hücre olacak şekilde PBS + %1 FBS içerisinde süspansiyon edilerek ayrı flow tüplerine dağıtıldı. Antikor kokteylleri de PBS + %1 FBS içerisinde hazırlanarak 100'er µl olarak hücre süspansiyonlarının üzerlerine eklendi ve vortekslendi. 20-30dk karanlık ve oda sıcaklığında yapılan inkübasyonlar sonrasında 2'şer ml PBS eklenerek 400 g de 5 dk santrifüj edilmişler ve ikinci işaretlemeler için 100'er µl PBS ile süspansiyon edildi. Bu aşamada hücrelerin bulunduğu ortamda RPMI ya da FBS olmaması streptavidin uygulaması için kritik öneme sahiptir. İşaretlemelerde kullanılan antikorlar tablo 3.3.'de gösterilmiştir. Tüm analizlerde özgül olmayan izotip eşlenik antikorlar ile işaretlemeler kontrol olarak kullanılmıştır. Çoklu boyamalar içeren deneylerde otomatik kompensasyon matrislerinin oluşturulması için her bir antikor ile tekli işaretlemeler yapılmıştır.

Tablo 3.3. Akım sitometri analizlerinde kullanılan antikorlar.

Antikor isimleri, klonları ve fluoresan ekleri	Antikorların bağlanma epitopları	Antikorların bağlandığı hücre grupları
anti-rat CD11b/c (OX-42) FITC işaretli (BD Biosciences, San Jose, CA, ABD)	İntegrin alpha M (MAC-1) ya da kompleman reseptör 3.	Monositler, granüositler, makrofaj, dendritik hücreler ve NK hücreleri.
anti-rat Granulocytes (HIS48) + APC/Cy7 işaretli streptavidin (E-bioscience, San Diego, CA, ABD)	Bilinmiyor	Tüm granüositler (nötrofil eosinofil, basofil) ve kemik iliğinde olgunlaşma sürecindeki eritroit serinin hücreleri.
anti-rat neutrophils (RP-1) PE işaretli (BD Biosciences, San Jose, CA, ABD)	Bilinmiyor	Sıçan peritoneal ve periferel kan nötrofilleri.
anti-rat CD172a (OX-41) PE işaretli (E-bioscience, San Diego, CA, ABD)	Sinyal düzenleyici protein α (SIRP α) İg ailesi üyesidir CD47'ye bağlanır.	Monosit, makrofaj, dendritik hücreler, granüositler ve nöronlar
anti-rat CD80 (3H5) APC işaretli antikor (Invitrogen, Camarillo, CA, ABD)	B7 ailesi üyesidir. T hücre proliferasyonunda ko-stimülatör aktivite gösteren reseptörlerdendir..	Antijen sunucu hücreler ve en yüksek seviyelerde de dendritik hücrelerde.
anti-rat MHC sınıf II (OX-6) PerCP işaretli (BD Biosciences, San Jose, CA, ABD)	MHC sınıf II. Antijen sunumu.	Antijen sunan hücreler, B hücreler, makrofajlar Dendritik hücreler.
mouse anti-rat CD3 (G4.18) APC işaretli (E-bioscience, San Diego, CA, ABD)	T hücre serisinin bir belirteci ve TCR kompleksinin bir bileşeni olan CD3 proteinine bağlanır.	Tüm T hücreler.
anti-rat CD4 (OX-35) PE işaretli (Biolegend, San Diego, CA, ABD)	T hücrelerde TCR kompleksinin bir bileşeni olan ve MHC II'ye bağlanmayı sağlayan ko-reseptördür	Periferdeki yardımcı T hücreleri ile monosit ve makrofajlar ile bazı dendritik hücreler.
anti-rat CD161 (3.2.3) APC işaretli (Biolegend, San Diego, CA, ABD)	NKR-P1A NK aktivatör reseptörüne bağlanır.	Tüm NK hücreleri ile T hücrelerin bir alt grubu.

Akım sitometri analizleri için işaretleme yapılan antikorlar, bağlandıkları epitoplar ve görevleri ile genellikle tespit edildikleri hücre grupları tablo 3.3'de gösterilmiştir. Analizler 488nm ve 635nm lazerler ile donatılmış FACS ARIA II (BD Biosciences, San Jose, CA, ABD) akım sitometri cihazı ile analiz edilmiştir. Akım

sitometri verileri Kaluza (Beckman Coulter, Brea, CA, ABD) yazılımı aracılığıyla işlenmiştir. Akım sitometri aracılı hücre ayırılama (FACS) işlemlerinde tüm dalak dokusu, 5ml periferik kan ve iki femurdan elde edilen toplam hücre süspansiyonları kullanılmıştır. Tüm dokulardan yapılan FACS saflaştırmalarında CD11b/c+ CD172a+ hücreler bu iki antikorun bağlanma intansitelerine göre monosit ve nötrofiller olarak iki grupta ele alınmış ve monositler HIS48 bağlanma intansitelerine göre pozitif ve negatif olarak ikiye ayrılmışlardır. Rp-1 nötrofil belirteci kullanılarak yapılan ayırılama işlemlerinde aynı fluoresan eke sahip olan CD172a antikorunu kullanılmadığından NK hücreleri dışlamak için CD161 antikorunu kullanılmıştır. Burada CD11b/c+ CD161- hücreler Rp-1+ HIS48+ nötrofiller, Rp-1- HIS48+ monositler ve Rp-1-HIS48- monositler olarak 3 grupta ele alınmışlardır. Her iki ayırılama stratejisinde de aynı 3 hücre grubu elde edilmiş ve farklı tüplerde toplanmıştır.

3.9. Giemsa Boyamaları

FACS ile saflaştırılan hücre grupları 1×10^6 hücre/ml olacak şekilde tam besiyeri içerisinde süspanse edildi. 1/1 oranında PBS ile seyreltilen hücre süspansiyonundan 200µl'si küvetlere alınarak 800rpm 3dk Cytospin4 (Thermo Fisher, MA, ABD) santrifüj yardımı ile mikroskop slaytlarına tespit edildi. 1ml dH₂O içerisine 1 damla stok Giemsa boyası damlatılarak hazırlanan boyama solüsyonu havada kurutulan slaytlar üzerine 1'er ml eklendi. 15 dk oda sıcaklığında inkübasyon sonrası boya dökülüp distile su ile slaytlar yıkandı. Mikroskop incelemeleri 100x büyütmede yapılmış olup hücrelerin görüntüleri kaydedilmiştir. Giemsa boyamalarında Hacettepe Üniversitesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarından faydalanılmıştır.

3.10. ROS Analizleri

FACS ile saflaştırılan hücre grupları 3ml'lik flow tüplerine alınarak çöktürülmüş ve yaklaşık $1-2 \times 10^5$ hücre 250 µl serumsuz RPMI-1640 (Lonza, Walkersville, MD, ABD) içerisinde süspanse edilmiştir. Bu süspansiyona 2 µl 1mM Karboksi-H₂-DCF-DA (85703, Anaspec, CA, ABD) eklenmiş ve 37C° ve %5 CO₂'li etüvde 1 saat inkübe edilmiştir. Tüpler inkübasyonun bitiminde buz üzerine alınmış

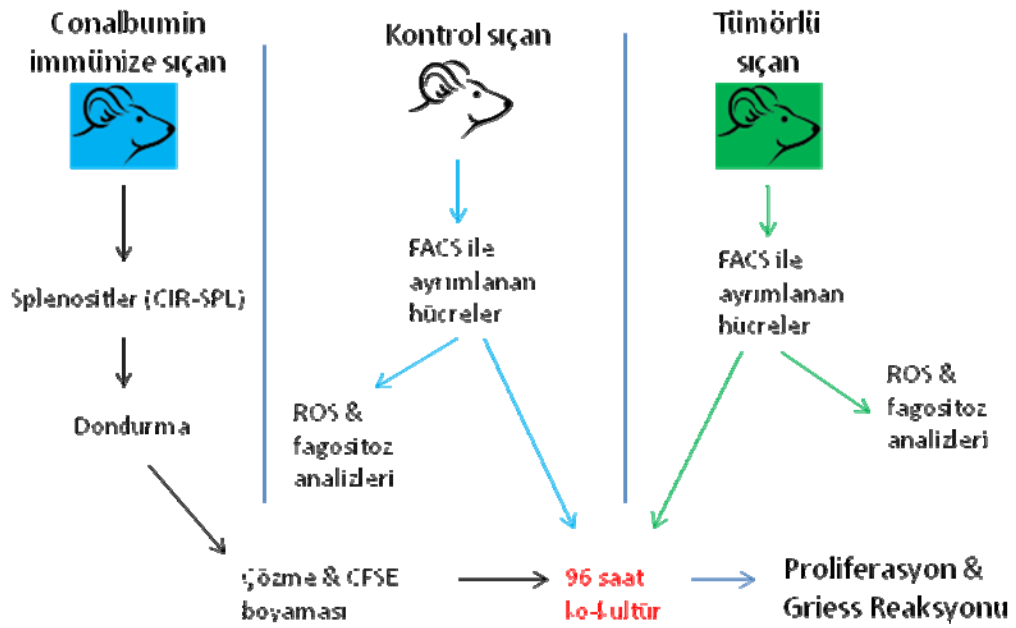
ve akım sitometri cihazında okumalar gerçekleştirilmiştir. Analizlerde FITC kanalının sinyal alan intansitesi yerine yükseklik intansitesi ortalamaları karşılaştırılmıştır.

3.11. Fagositoz Analizleri

Kırmızı fluoresan işaretli 2µm çaplı karboksile modifiye polistren lateks boncukların (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ABD), hücreler tarafından fagositozları tespit edilmiştir. Stok konsantrasyonlarındaki boncuklar 1/1 oranında sıçan serumu ile 1 saat 37C°'de inkübe edilmişlerdir. FACS ile saflaştırılan hücre grupları 3ml'lik flow tüplerine alınarak çöktürülmüş ve yaklaşık 1-2 x 10⁵ hücre 250 µl %10 FBS içeren RPMI-1640 içerisinde süspanse edilmiştir. Hücre süspanسیونlarının üzerine 3 µl boncuk/serum karışımı ilave edilip 2 saat süreyle 37C° ve %5 CO₂'li etüvde inkübe edilmiştir. PBS'ile yapılan yıkamanın ardından fagositoza katılan hücre oranları ve bu hücrelerin PE kanalındaki ortalama fluoresan intansiteleri (MFI) karşılaştırılmıştır.

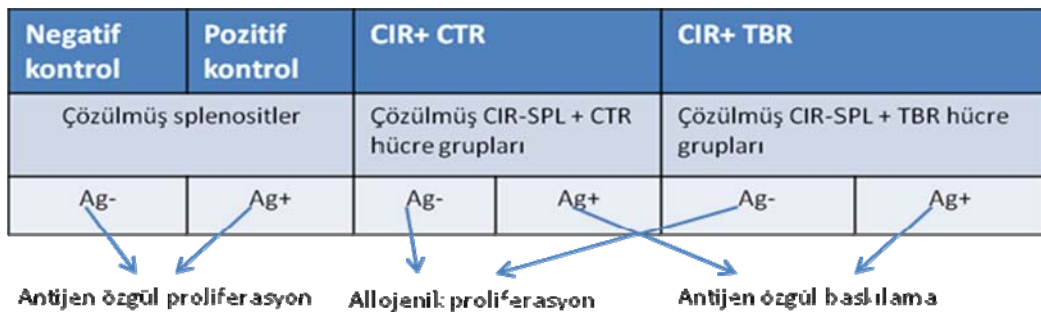
3.12. Hücre Kültürleri ve Proliferasyon Deneyleri

Conalbumin immünize hayvanlardan izole edilen splenositler (CIR-SPL) %90 FBS ve %10 DMSO içerisinde -80 C° de dondurularak saklanmışlardır. Proliferasyon deneyinin yapılacağı gün farklı hayvanlardan elde edilen CIR-SPL'ler %10 FBS içeren tam besiyeri içerisinde çözülmüş ve bir yıkamanın ardından tam besiyeri içerisine alınarak 1 saat 37C° ve %5 CO₂'li etüvde inkübe edilmiştir. Bir kez PBS ile yıkanan hücreler %0,1 BSA içeren PBS içerisinde süspanse edilerek 10µM CFSE ile karanlık oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edilmiştir. CFSE işaretlenmesinin durdurulması için 10ml %10 FBS içeren PBS eklenen hücreler 2 defa bu solüsyon ile yıkanmış ve tam besiyeri içerisine alınmıştır. CFSE işaretlenmesinin ardından deneyler düşük ışıklı ortamlarda sürdürülmüştür. (Şekil 3.5.)



Şekil 3.5. Myeloid hücrelerin işlevsel analizlerinin genel planı.

Kontrol ve tümörlü hayvan dokularından aseptik koşullar altında ayrımlanması gerçekleşen hücre grupları 10% FBS, 2.1mM ultra-glutamin, 100 ünite/ml Penisilin, 100µg/ml Streptomisin ve 50µM 2-Merkaptoetanol içeren RPMI-1640 tam besiyeri içerisinde 37°C, %5 karbondioksitli etüvde CIR-SPL ile birlikte kültüre alınmıştır. Kültür ortamına 25µg/ml conalbumin eklenmesi ile antijen özgün proliferasyon ve baskılama tayini yapılmıştır. Hiç bir deneyde allojenik reaksiyon gözlenmemiştir (Şekil 3.6.).



Şekil 3.6. Proliferasyon analizleri için kullanılan deney planı.

96 kuyulu plaklarda yapılan ko-kültürlerin özetidir.

3.13. Nitrik Oksit Analizleri

Proliferasyon deneyleri için gerçekleştirilen 96 saatlik kültürlerin süpernatantları izole edilmiş ve nitrat düzeyleri Griess reaksiyonu ile değerlendirilmiştir. Bu amaçla 100µl süpernatant, 100µl Griess ajanı (5% phosphoric acid ve 0.1% *N*-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride dH₂O içerisinde 1% sulfanilamide) ile 96 kuyulu plaklarda karıştırılmıştır. 30 dakika oda sıcaklığında ve karanlıkta yapılan inkübasyon sonrasında plaklar çalkalayıcı vasıtası ile karıştırılmış ve 535nm ışık absorbans değerleri mikroplate okuyucusunda (SpectraMax Plus, Molecular Devices, CA, ABD) kaydedilmiştir. Nitrit konsantrasyonları hesaplanırken 100mM sodyum nitritin seri dilüsyonları sonucu oluşturulmuş "kuadratik model'e" uygun bir standart eğri temel alınmıştır. Analizler Softmaxpro 2.6.1 yazılımı (Molecular Devices, CA, ABD) ile gerçekleştirilmiş olup 1/2 oranında seyreltilen örneklerin sonuçlarının gerçek konsantrasyonları yansıtması amacıyla analiz sonrası elde edilen değerler iki ile çarpılmıştır.

3.14. Enzyme-Linked İmmüno Sorbent Analizleri (ELISA)

3.14.1. TNF- α Analizleri

Analizlerde sıçan TNF- α kullanıma hazır sandviç ELISA kiti (Platinum ELISA, E-bioscience, San Diego, CA, ABD) kullanılmıştır. Analiz öncesinde -80C°'de dondurulmuş olan serum ve ko-kültür süpernatantları buz üzerinde çözülmüşlerdir. 3 farklı proliferasyon deneyinden izole edilen ko-kültür süpernatantları eşit oranlarda karıştırılarak bir havuz oluşturulmuştur. Tümörlü ve kontrol hayvanlardan izole edilen serum örnekleri ve karıştırılan kültür süpernatantları 1/2 oranında seyreltilerek ELISA analizlerine katılmışlardır. Bir standart eğri referans alınarak hesaplanan tüm sitokin konsantrasyonlarında "kuadratik model" tercih edilmiştir (161). Analizler Softmaxpro 2.6.1 yazılımı (Molecular Devices, CA, ABD) ile gerçekleştirilmiş olup 1/2 oranında seyreltilen örnek sonuçlarının gerçek konsantrasyonları yansıtması amacıyla analiz sonrası elde edilen değerler iki ile çarpılmıştır.

3.14.2. IL-6 Analizleri

Analizlerde sıçan IL-6 kullanıma hazır sandviç ELISA kiti (Platinum ELISA, E-bioscience, San Diego, CA, ABD) kullanılmıştır. Analiz öncesinde -80C°de dondurulmuş olan serum ve ko-kültür süpernatantları buz üzerinde çözülmüşlerdir. 3 farklı proliferasyon deneyinden izole edilen ko-kültür süpernatantları eşit oranlarda karıştırılarak bir havuz oluşturulmuştur. Tümörlü ve kontrol hayvanlardan izole edilen serum örnekleri ve karıştırılan kültür süpernatantları 1/2 oranında seyreltilerek ELISA analizlerine katılmışlardır. 1/2 oranında seyreltilen örnek sonuçlarının gerçek konsantrasyonları yansıtılmaları amacıyla analiz sonrası elde edilen değerler iki ile çarpılmıştır.

3.14.3. IL-10 Analizleri

Analizlerde sıçan IL-10 kullanıma hazır sandviç ELISA kiti (Platinum ELISA, E-bioscience, San Diego, CA, ABD) kullanılmıştır. Analiz öncesinde -80C°de dondurulmuş olan serum ve ko-kültür süpernatantları buz üzerinde çözülmüşlerdir. 3 farklı proliferasyon deneyinden izole edilen ko-kültür süpernatantları eşit oranlarda karıştırılarak bir havuz oluşturulmuştur. Tümörlü ve kontrol hayvanlardan izole edilen serum örnekleri 1/500, karıştırılan kültür süpernatantları ise 1/30 oranında seyreltilerek ELISA analizlerine katılmışlardır. Seyreltilen örnek sonuçlarının gerçek konsantrasyonları yansıtılmaları amacıyla analiz sonrası elde edilen serum konsantrasyonları 500, süpernatant konsantrasyonları ise 30 ile çarpılmıştır.

3.14.4. TGF-β1 Analizleri

Analizlerde sıçan TGF-β1 kullanıma hazır sandviç ELISA kiti (Platinum ELISA, E-bioscience, San Diego, CA, ABD) kullanılmıştır. Analiz öncesinde -80C°de dondurulmuş olan serum ve ko-kültür süpernatantları buz üzerinde çözülmüşlerdir. 3 farklı proliferasyon deneyinden izole edilen ko-kültür süpernatantları eşit oranlarda karıştırılarak bir havuz oluşturulmuştur. Tümörlü ve kontrol hayvanlardan izole edilen serum örnekleri ile karıştırılan kültür süpernatantları 1/2 oranında seyreltilerek ELISA analizlerine katılmışlardır. 1/2

oranında seyreltilen örnek sonuçlarının gerçek konsantrasyonları yansıtılmaları amacıyla analiz sonrası elde edilen değerler iki ile çarpılmıştır.

3.15. İstatistiksel Analizler

İstatistik analizlerinde SPSS18 (IBM, Armonk, NY, ABD) ve Graph Pad Prism 6 (GraphPad Software, La Jolla, CA, ABD) kullanılmıştır. Karşılaştırmalarda kontrol ve tümörlü gruplarının ortalamaları kullanılmıştır. İlk olarak tüm veri gruplarında D'Agostino & Pearson omnibus normalite sınaması yapılmış olup testi geçen popülasyonların Gaussian dağılımı taşıdıkları kabul edilip ilgili parametrik T testlerine tabi tutulmuşlardır. Normal dağılan iki grup arasında anlamlı varyans farkı var ise Welch düzeltmesi uygulanmıştır. Normalite testlerini geçemeyen ya da küçük örneklem boyutlarına sahip gruplar non-parametrik Mann-Whitney U analizlerine tabi tutulmuşlardır. Tüm veriler aritmetik ortalama ile gösterilmiş olup karşılaştırmalarda ortalamaların standart hataları (\pm SEM), tekli gösterimlerde ise standart sapmalar (\pm SD) belirtilmiştir. Veriler arasındaki ilişkilere Pearson korelasyon testleri ile bakılmıştır. Anlamlı korelasyon bulunan çiftler arasındaki ilişkiyi ifade eden en uygun regresyon modeli seçilerek grafiklerde belirtilmiştir. Tüm analizlerde $p < 0.05$ istatistiksel anlamlılığa işaret etmektedir.

4. BULGULAR

4.1. Sıçanlarda NMU Aracılı Meme Kanseri Oluşumu

Enjeksiyon yapılan tüm hayvanlarda tümör gelişimi gözlenmiştir. Sakrifikasyon esnasında hayvanlarda mevcut olan tümörlerin büyüklükleri ile analizlerde kullanılmak üzere myeloid hücre izolasyonlarının gerçekleştirildiği dokular tablo 4.1. 'de belirtilmiştir. İç organlarda ve peritonda bulunan tümörlerin çapı hesaplanamamıştır.

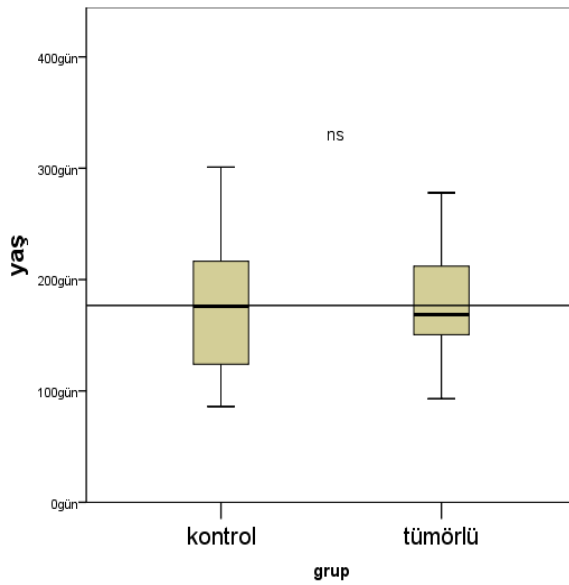
Tablo 4.1. Hayvanlarda gelişen tümörlerin boyutları ve lokasyonları.

Sıra No	İzole Edilen Dokular	Tümör Büyüklükleri cm ²	Toplam Çap (cm)
Tümör-1	Tümör/ Lenf Nodu/ Dalak/ Kemik İliği	Sağ Aksiller 2.2 Sağ İnguinal 0.77 Sol Aksiller 7.5	3,23
Tümör-2	Dalak/ Kemik İliği/ Tümör/ Lenf Nodu	Sağ İnguinal 6.25	2.5
Tümör-3	Dalak/ Kemik İliği/ Periferik Kan/ Tümör	Sağ Aksiller 1.5 Sağ İnguinal 10.5 Sol Aksiller 3 Sol Abdominal 10.5 Sol İnguinal 18	6,59
Tümör-4	Dalak/ Kemik İliği/ Periferik Kan/ Tümör	Sol Aksiller 3.4 Sağ Abdominal 3 Sağ Abdominal 13	4,40
Tümör-5	Dalak/ Kemik İliği/ Periferik Kan/ Tümör	Sol İnguinal 30 Sağ Abdominal 13.75	6,61
Tümör-6	Periferik Kan	Sol İnguinal 16	4
Tümör-7	Dalak/ Kemik İliği/ Periferik Kan/ Tümör	Sol İnguinal 3.75 Sağ Aksiller 11.25 Sağ İnguinal 15.91 2 Böbreğe Metastaz	5,55
Tümör-8	Dalak/ Kemik İliği/ Tümör/ Periferik Kan	Tüm Abdomen Metastaz	
Tümör-9	Dalak Sort	Sol İnguinal 5	2.23
Tümör-10	Dalak Sort	Sağ Aksiller 7.2 Sol Abdominal 20.14	5,22
Tümör-11	Dalak/ Periferik Kan	İnguinal 14 Sağ Aksiller 0.8 Sağ Abdominal 0.8 x2 Sol Abdominal 1.6	4,24
Tümör-12	Dalak Sort	Sol İnguinal 11	3,31
Tümör-13	Tüm Dokular	Sol İng 15,9 Sağ Axillar 2,7	4,31

Tümör-14	Tüm Dokular	Sol Axl 5,4 Sağ Axl 3,3 Sağ İng 10	4,32
Tümör-15	Tüm Dokular	Sağ Axl 3 İng 18,9	4,67
Tümör-16	Tüm Dokular	Tüm Abdominal	
Tümör-17	Tüm Dokular	Sağ İng 2,24 Sol İng 0,88 Sağ Axl 4,14	2,69
Tümör-18	Tüm Dokular	Sağ Axl 5 Sağ İng 1,44 Sol İng 12,5	4,35
Tümör-19	Tüm Dokular	Sol İng 1,8 Sol İng 0,64 Sağ İng 0,8	1,8
Tümör-20	Tüm Dokular	Sağ İng 1,3 Sol İng 0,3 Sol Axl 1,21 Sol Axl 3,08	2,42
Tümör-21	Tüm Dokular	Sol İng 13,02	3,6
Tümör-22	Tüm Dokular	Sol Axl 7,5	2,73
Tümör-23	Tüm Dokular	Sol İng 9,6 Sağ İng 1,1 Sol Axl 2,1	3,57
Tümör-24	Dalak	Sağ İng 6,21 Sol İng 3,22 Sol Axl 4,8 Sağ Axl 3,24	4,17
Tümör-25	Tüm Dokular	Sağ Axl 2,34 Sağ İng 2,38 Sol İng 8,4	3,62
Tümör-26	Tüm Dokular	İnguinal 19,2 Sol Axl 0,96	4,48
Tümör-27	Dalak Ve Tümör	Abdominal	
Tümör-28	Dalak	Abdominal	
Tümör-29	Dalak	Abdominal	
Tümör-30	Tüm Dokular	Sağ Axl. 1 Sağ İng. 5 Sağ İng. 1,5 Sağ İng. 1	2,91
Tümör-31	Tüm Dokular	Sol İng. 5,1 Sağ İng. 0,36 Sağ Axl. 0,6	2,46
Tümör-32	Tüm Dokular	Sol İng. 7,5	2,73
Tümör-33	Dalak Ve Kemik İliği	Sağ İng. 10,5	3,24
Tümör-34	Dalak Ve Kan	Sol İng. 6,75 Sol İng. 3,4 Sağ İng. 3 Sol Axl. 1 Sağ Axl. 0,81	3,86
Tümör-35	Dalak Ve Kemik İliği	Sağ Axl. 6,25	3,04

		Sağ İng. 2 Sol İng. 1	
Tümör-36	Tüm Dokular	Sağ İng. 3,6 Sağ Axl. 4,4 Sol İng. 0,56 Sol Axl. 1,5	3,17
Tümör-37	Tüm Dokular	Abdominal	
Tümör-38	Tüm Dokular	Abdominal	

Hayvanların sakrifikasyon günündeki yaşları ve son NMU enjeksiyonundan sakrifikasyon gününe kadar geçen süreler tablo 4.2. 'de belirtilmiştir. Bu veriler yardımıyla hayvanların sahip oldukları tümörlerin gelişim hızları toplam tümör çapları geçen süreye bölünerek hesaplanmıştır (Tablo4.2.). Hayvanlardaki tümör çapları, tümör gelişim hızları veya yaşları ile deney sonuçlarında elde edilen hiç bir veri arasında ilişki yoktur. Kontrol hayvanlar ile tümörlü hayvanların sakrifikasyon günlerindeki ortalama yaşları da benzer bulunmuştur (Şekil 4.1.)



Şekil 4.1. Kontrol ve tümörlü hayvanların yaşları dağılımı.

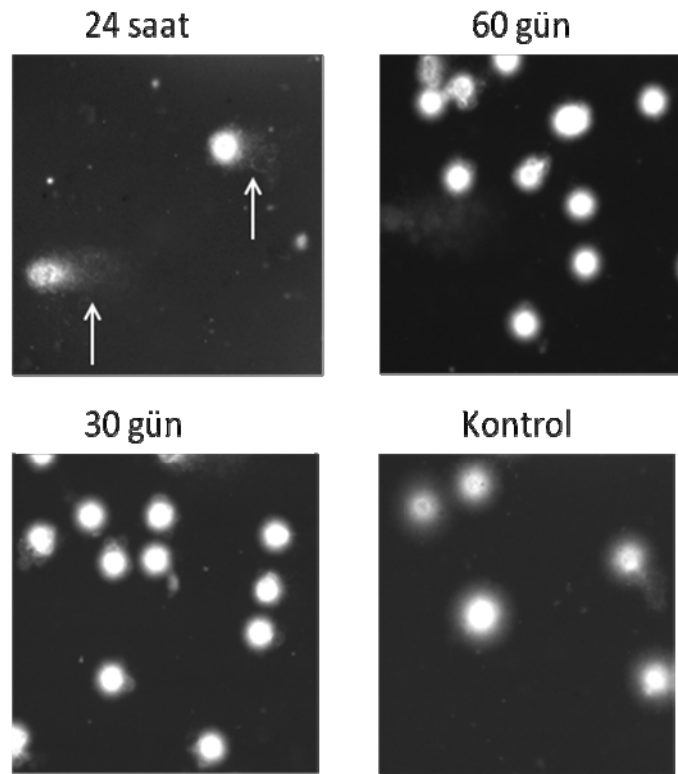
Deneylerde kullanılan kontrol ve tümörlü hayvanların sakrifikasyon günlerindeki yaşları karşılaştırılmıştır. Yatay çizgiler aritmetik ortalamaları, kutular ortalamaların standart sapmasını, çubuklar ise yaş aralığını göstermektedir. ns: istatistiksel anlamlılık olmadığını belirtir.

Tablo 4.2. Hayvanların tümör gelişim hızları.

Sıra no	Yaş (gün)	Süre (gün)	Toplam Çap(cm)	Hız (cm/gün)
Tümör-3	114	63	6,59	0,104603
Tümör-10	116	65	5,22	0,080308
Tümör-21	93	42	3,6	0,085714
Tümör-34	108	57	3,86	0,067719
Tümör-33	101	50	3,24	0,0648
Tümör-11	126	75	4,24	0,056533
Tümör-13	155	104	4,31	0,041442
Tümör-5	233	182	6,61	0,036319
Tümör-18	161	110	4,35	0,039545
Tümör-1	127	76	3,23	0,0425
Tümör-7	204	153	5,55	0,036275
Tümör-35	122	71	3,04	0,042817
Tümör-14	168	117	4,32	0,036923
Tümör-23	143	92	3,57	0,038804
Tumor-24	164	113	4,17	0,036903
Tümör-15	184	133	4,67	0,035113
Tümör 26	178	127	4,48	0,035276
Tümör-4	196	145	4,40	0,030345
Tümör-25	170	119	3,62	0,03042
Tümör-30	148	97	2,91	0,03
Tümör-12	182	131	3,31	0,025267
Tümör-17	157	106	2,69	0,025377
Tümör-32	166	115	2,73	0,023739
Tümör-2	154	103	2,50	0,024272
Tümör 31	153	102	2,46	0,024118
Tümör-36	222	171	3,17	0,018538
Tümör-6	278	227	4,00	0,017621
Tümör-22	220	169	2,73	0,016154
Tümör-20	212	161	2,42	0,015031
Tümör-19	169	118	1,8	0,015254

4.2. Periferik Kanda DNA Hasarı Tespiti

Alkilleyici bir ajan olan NMU, DNA'da sıklıkla çift zincir kırıkları oluşturarak karsinojenik etki göstermektedir (162). NMU'nun DNA hasarları alkali Comet analizi ile belirgin bir şekilde tespit edilmiştir (163). Tümörlü hayvanların myeloid hücrelerinde sakrifikasyon anında DNA hasarı kalıntısı tespiti için Comet analizine başvurulmuştur. Farklı zamanlarda NMU enjeksiyonu yapılmış hayvanların kuyruk venlerinden alınan kan örnekleri analiz prosedürüne göre incelenmiştir (Şekil 4.2.). Her bir zaman aralığındaki iki farklı hayvanın 50'şer hücresinden elde edilen sonuçların ortalamaları karşılaştırılmıştır

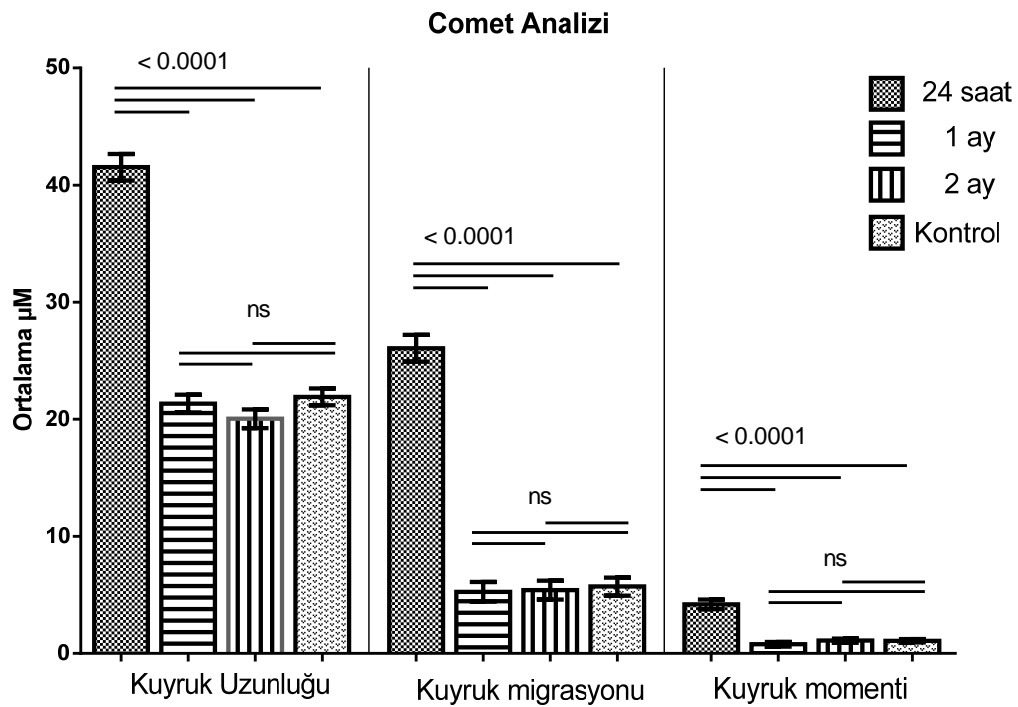


Şekil 4.2. Comet analizi temsili mikroskop görüntüleri.

24 saat sonrasındaki DNA hasarı kuyruklu yıldız görüntüsü oluşturmaktadır.

Son NMU enjeksiyonundan 24 saat sonra alınan periferik kan hücreleri ile enjeksiyondan 30 ve 60 gün sonra alınan kandaki hücrelerin kontrol hayvandan alınan kan ile karşılaştırmaları. Görüntüler elektroforez sonrası ethidium bromür ile işaretlenmiş nükleuslara aittir.

Comet analizinin temel değişkenleri olan kuyruk uzunluğu, kuyruk migrasyonu ve kuyruk momenti sonuçlarına göre son enjeksiyondan 24 saat sonra görülen yüksek DNA hasarı, son enjeksiyondan 1 ay sonra kontrol seviyelerine düşmüştür (Şekil 4.3.). En erken gerçekleştirilen sakrifikasyon son enjeksiyondan 42 gün sonra olduğu için bu sonuç incelediğimiz hücrelerin DNA hasarına uğramamış olduğunu göstermektedir.

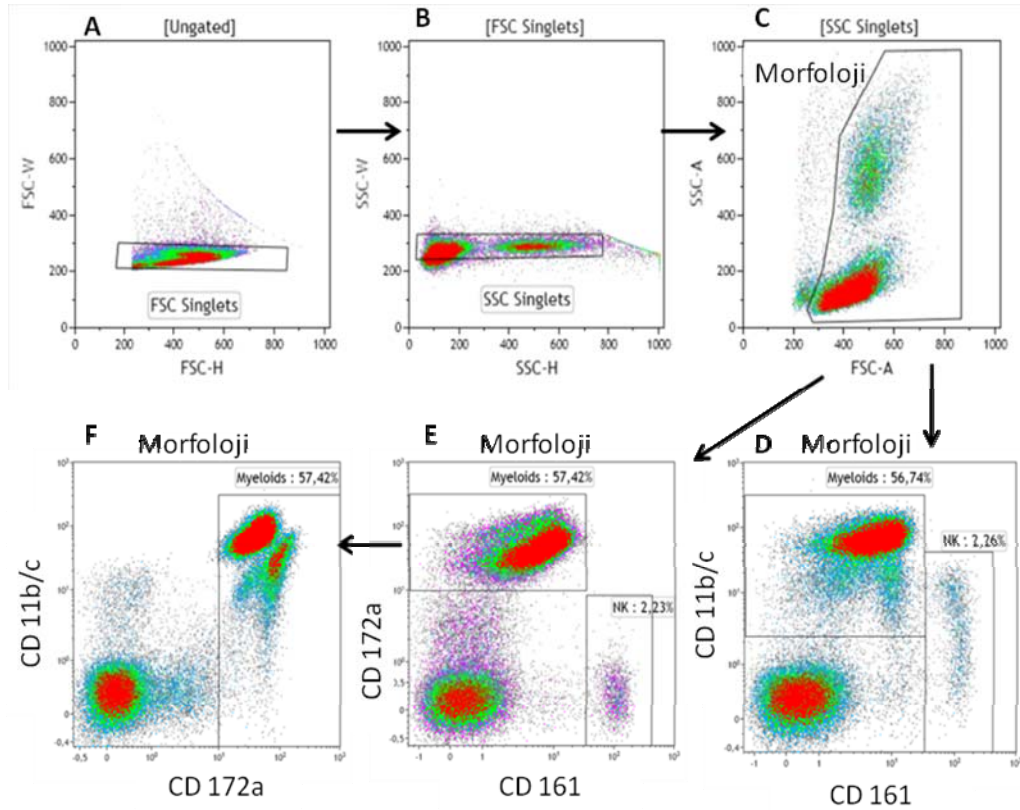


Şekil 4.3. Comet analizi sonuçlarının karşılaştırması.

Son NMU enjeksiyonlarından 24 saat, 1 ay ve 2 ay sonra alınan kan örnekleri ile NMU enjekte edilmemiş kontrol hayvanların kan örneklerindeki DNA kırıklarını belirten değişkenler gösterilmiştir. Her üç değişken için de 1 ay ve 2 ay sonraki değerler kontrol değerden anlamlı farklılık göstermemektedir (ns). 24 saat değerleri ise yüksek derecede anlamlı farklılık göstermiştir ($p < 0.0001$).

4.3. Fenotiplendirme Sonuçları ve Tespit Edilen Hücre Grupları

Kemik iliği, periferik kan ve dalak örneklerinden izole edilen hücreler myeloid hücre belirteci antikorlar ile işaretlenip akım sitometrik olarak incelenmişlerdir. Akım sitometri veri analizinde uygulanan prensipler şekil 4.4. ve şekil 4.5.'de gösterildiği gibidir.



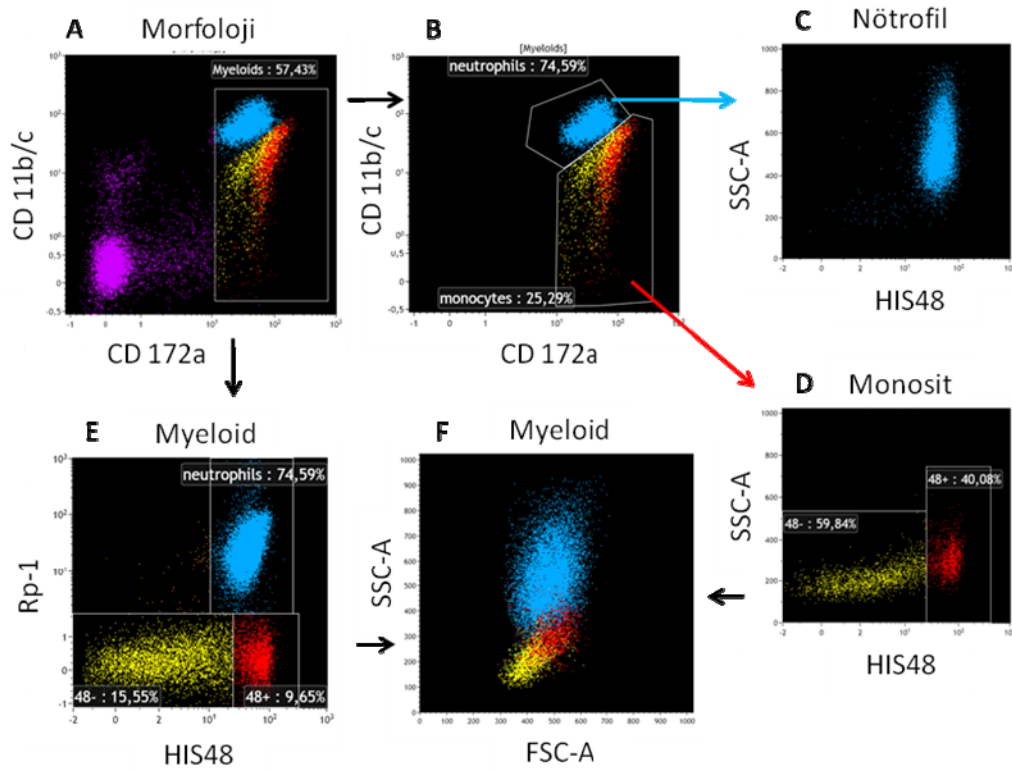
Şekil 4.4. Myeloid hücrelerin akım sitometrik olarak seçimi.

A) Tekli hücrelerin FSC değerlerine göre seçimi. B) Tekli hücrelerin SSC değerlerine göre seçimi. C) Morfolojik dağılımlarına göre canlı hücrelerin seçimi. D) NK hücrelerinin CD11b/c pozitifliğinin gösterimi. E) NK hücrelerinin CD172a negatifliğinin gösterimi. F) CD11b/c ve CD172a pozitifliğine göre myeloid hücrelerin seçimi. Grafiklerde dansite renklendirilmesi uygulanmış olup kırmızı renk en yoğun hücre topluluğunu göstermektedir

Öncelikle ön yayılım sinyalinin genişliği ve yüksekliğine göre (FSC-W/FSC-H) uygulanan dağılım ile boyutlarına göre tekli hücreler kapılanmıştır (Şekil 4.4.).

Seçilen hücreler bu kez yan saçılım sinyalinin genişliği ve yüksekliğine göre (SSC-W/SSC-H) uygulanan dağılım ile granül içerikleri temel alınarak tekli hücreler kapılanmıştır (Şekil 4.4.). Seçilen hücreler morfolojik özelliklerine göre ve ölü hücreler ile debris dışarıda kalacak şekilde kapılanmışlardır (Şekil 4.4.). Burada morfoloji kapısı ile belirtilen hücreler ilgili dokudan izole edilen tüm hücreleri kapsamaktadır. Ancak konumuz kapsamı dışında kalan hücre sayılarındaki değişimlerden etkilenmemek için analizler sadece myeloid hücreleri kapsamalıdır. Bu durumda CD11b/c⁺ hücreler tüm myeloid hücreler olarak tanımlanırlarsa CD161⁺ NK hücrelerinin karışımı görülecektir (Şekil 4.4.). NK hücrelerini dışarıda bırakmak amacıyla bir genel myeloid belirteci olan CD172a kullanılmıştır ve CD172a⁺ olan tüm hücreler myeloid hücre olarak kabul edilmiştir (Şekil 4.4.). CD172a⁺ hücreler aynı zamanda CD11b/c için de pozitiflik göstermektedirler (Şekil 4.4.).

Analizin devamında başlıca myeloid hücre alt-gruplarının ayırılmasına odaklanılmıştır. Bu aşamada iki farklı kapılama yöntemiyle de nötrofil ve monositlerin fenotipik olarak ayrıştırılması başarılmıştır. Bunlardan ilkinde, CD11b/c ile CD172a dağılımı üzerinde ayrılan iki grup tespit edilmiştir (Şekil-3B). Bunlardan CD11b/c^{hi} CD172a⁺ olanlar aynı zamanda HIS48 antikoru için de pozitiflik göstermekte olup yüksek SSC değerleri ile nötrofillere karşılık gelmektedirler (Şekil 4.5.). CD11b/c^{int} CD172a^{hi} olanların ise SSC değerleri düşüktür ve monosit olabilecekleri düşünülmüştür (Şekil 4.5.). Ancak bu hücreler HIS48 antikoru pozitifliğine göre iki alt gruba ayrılmaktadırlar (Şekil 4.5.). HIS48⁺ monositik hücreler daha yüksek SSC ve FSC değerleri verir iken, HIS48⁻ hücreler daha düşük SSC ve FSC değerleri göstermişlerdir (Şekil 4.5.). Diğer kapılama stratejisi ise nötrofil ve monositlerin ayırılmasını daha net yapabilmektedir. Buna göre sıçanlar için nötrofil özgül bir belirteç olan Rp-1 kullanılmıştır. Rp-1 ile HIS48 dağılımında Rp-1⁺ HIS48⁺ nötrofiller, Rp-1⁻ HIS48⁺ monositler ve Rp-1⁻ HIS48⁻ monositler net olarak ayırt edilebilir (Şekil 4.5.). Öte yandan Rp-1 antikoru ticari olarak sadece PE fluoresan işaretli formda mevcut olduğu için CD172a ile birlikte kullanılması mümkün olmamıştır. Bu nedenle Rp-1 ile hazırlanan antikor kokteyllerine NK hücrelerin dışlanması amacıyla APC işaretli CD161 antikoru da eklenmiş, myeloid hücrelerin seçimi şekil 4.5. de gösterildiği gibi yapılmıştır.



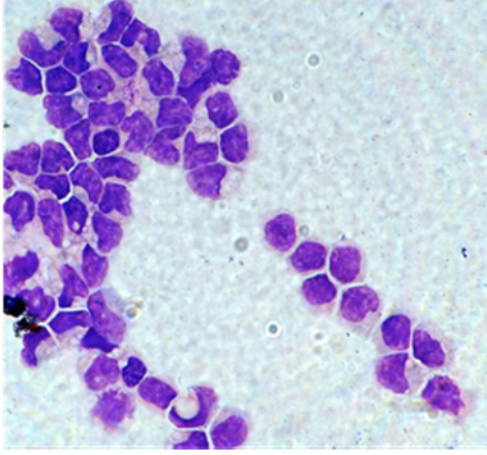
Şekil 4.5. Nötrofil ve monositlerin akım sitometrik olarak ayrımı.

A) CD172a pozitifliğine göre tüm myeloid hücrelerin seçimi. B) CD11b/c ve CD172a dağılımı ile nötrofil ve monositlerin ayrımı. C) Nötrofillerin SSC ve HIS48 değerlerinin gösterimi. D) Monositlerin HIS48 pozitifliğine göre ayrılınması. E) RP-1 ve HIS48 dağılımına göre nötrofil ve monosit alt gruplarının ayrımı. F) Sınıflandırılan myeloid hücrelerin morfolojik özellikleri. Grafiklerde kapılama renklendirilmesi uygulanmıştır. Nötrofiller, mavi; HIS48⁺ monositler, kırmızı; HIS48⁻ monositler ise sarı renk ile temsil edilmektedirler. Her iki kapılama stratejisi ile de aynı F grafiği elde edilmektedir.

Akım sitometri aracılı hücre ayrılması (FACS) ile periferik kan örneklerinden bahsi geçen üç popülasyon saflaştırılmışlardır. Farklı hücre gruplarının nükleer ve sitoplazmik morfolojilerinin incelemesi amacıyla saflaştırılan hücreler mikroskop slaytlarına yayılıp giemsa ile boyanmışlardır. Elde edilen görüntülerde düşük SSC değerlerine sahip ve Rp-1 negatif olan hücrelerin monosit, Rp-1⁺ hücrelerin ise nötrofil morfolojisi gösterdikleri doğrulanmıştır (Şekil 4.6.). HIS48⁺ monositlerin daha büyük sitoplazmaya olup nükleer yapılarının fasülye şeklinde

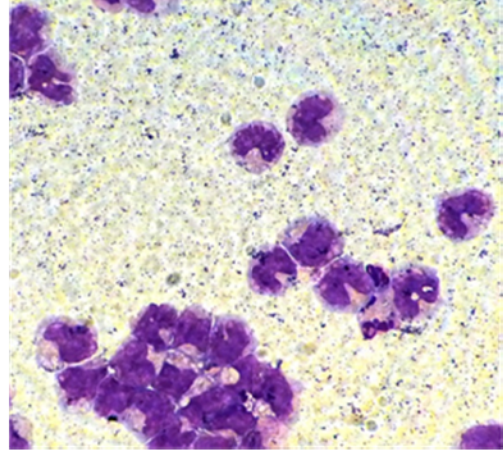
oluşu HIS48- monositlerden daha yüksek FSC ve SSC değerleri göstermelerini açıklamaktadır (Şekil 4.6.).

A)HIS48- Monositler



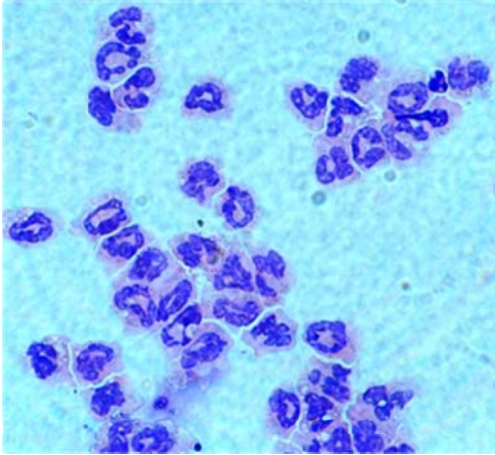
100x

B)HIS48+ Monositler



100x

C)Nötrofiller



100x

Şekil 4.6. Monosit ve nötrofillerin giemsa boyaması mikroskop görüntüleri.

FACS ile saflaştırılmış, **A)** HIS48⁻ monositlerin, **B)** HIS48⁺ monositlerin ve **C)** Nötrofillerin Giemsa boyamaları. 100x büyütme görüntüleri.

4.4. Tümörlü Hayvanların Myeloid Hücre Dağılımlarındaki Değişimler

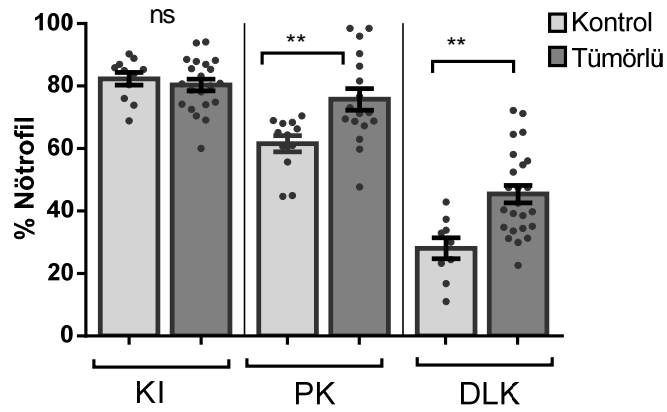
Sıçanların incelenen tüm immün kompartmanlarında bahsi geçen üç hücre popülasyonu tespit edilmiştir. Ancak bu alt grupların farklı dokularda ve tümörlü ve sağlıklı hayvanlardaki dağılımları değişim göstermektedir. Bu bölümde, incelenen

hücre gruplarının farklı dokulardaki dağılımları tümörlü ve sağlıklı hayvanlar arasında karşılaştırılarak sunulacaktır.

4.4.1.Nötrofiller

Kemik iliğinde tüm myeloid hücrelerin yaklaşık %80'ini nötrofiller oluşturmaktadır ve bu durum tümörlü hayvanların kemik iliklerinde de değişmeden korunmuştur (Şekil 4.7.). Kemik iliğinden izole edilen nötrofil sayıları da benzerdir.

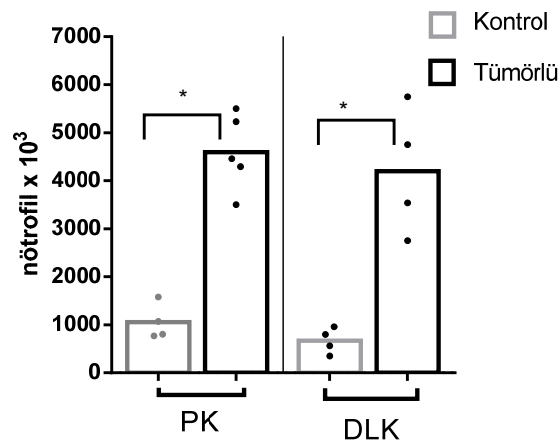
Sağlıklı sıçan periferik kanındaki myeloid hücrelerin yaklaşık %60'lık kısmını oluşturan nötrofiller tümörlü hayvan periferik kanında %90'lara ulaşan artışlar göstermektedir (Şekil 4.7.). İstatistiksel olarak da anlamlı bulunan bu artış yüzdesi periferik kandan izole edilen nötrofil sayılarıyla da örtüşmektedir. Öyle ki, sağlıklı hayvanlarda 5-6ml kandan yaklaşık 1×10^6 civarında nötrofil izole edilebilirken aynı hacimdeki tümörlü hayvan kanından 5 kat daha fazla nötrofil elde edilmiştir (Şekil 4.8.).



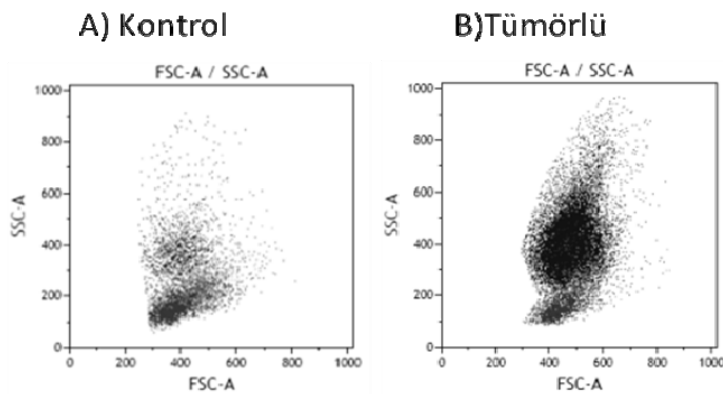
Şekil 4.7. Nötrofillerin tüm myeloid hücreler içindeki oranları.

Nötrofillerin farklı dokulardaki dağılımlarının karşılaştırılması. Noktalar, bağımsız deney sonuçlarını temsil etmektedir, grupların ortalama değerleri standart hata ile gösterilmiştir. KI: Kemik iliği, PK: Periferik kan, DLK: Dalak. İstatistiksel anlamlılıklar için, * $P < .05$, ** $P < .01$, *** $P < .001$, n.s: istatistiksel anlamlılık olmadığını gösterir.

Sağlıklı sıçan dalağındaki myeloid hücrelerin yaklaşık %10-40 kısmını nötrofiller oluştururken tümörlü hayvanlarda bu oran %30-70 seviyesine yükselmiştir (Şekil 4.7.). Sağlıklı bir hayvan dalağının tümünden izole edilebilen maksimum nötrofil sayıları 5×10^5 - 1×10^6 arasında değişim gösterirken tümörlü hayvanlarda, gözlemlenen splenomegali ile uyumlu bir şekilde 10 kata varan artışlar tespit edilmiştir (Şekil 4.8). Akım sitometri morfoloji dağılımları da tümörlü hayvan dalaklarındaki nötrofil birikimi net bir şekilde görülebilir (Şekil 4.9.).



Şekil 4.8. FACS izolasyonu ile elde edilen nötrofil sayıları. Noktalar, bağımsız deney sonuçlarını temsil etmektedir, grupların ortalama değerleri gösterilmiştir. PK: Periferik kan, DLK: Dalak. İstatistiksel anlamlılıklar için, * P < .05, ** P < .01, *** P < .001, n.s: istatistiksel anlamlılık olmadığını gösterir.

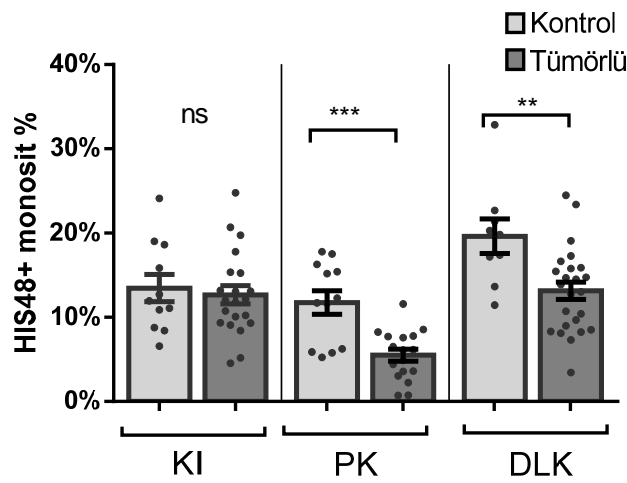


Şekil 4.9. Dalaktaki hücre birikimlerinin akım sitometrik gösterimi.

Tümörlü hayvan dalaklarında granülosit birikimini morfolojik olarak gösterilmiştir.

4.4.2. HIS48⁺ Monositler

Kemik iliğindeki HIS48⁺ monositler tüm myeloid hücrelerin %10-20'sini oluşturmaktadır ve tümörlü hayvanlarda değişim tespit edilmemiştir (Şekil 4.10.). Sayısal olarak ise en fazla kemik iliğinden izole edilebilmişlerdir. Ayrıca tümörlü hayvanlardaki sayıları da değişim göstermemektedir (Şekil 4.11.). Ancak, kontrol hayvan kemik iliğindeki tüm monositlerin yaklaşık %80'nini oluşturan HIS48⁺ monositler tümörlü hayvan kemik iliğinde daha geniş bir dağılım göstermekle birlikte ortalama %70 değerlerine düşmüştür (Şekil 4.12.).



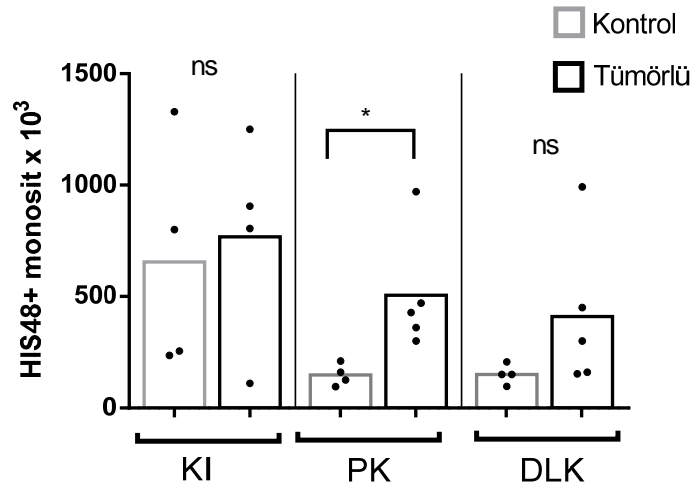
Şekil 4.10. HIS48⁺ monositlerin tüm myeloid hücreler içindeki oranları.

HIS48⁺ monositlerin farklı dokulardaki dağılımlarının karşılaştırılması. Noktalar, bağımsız deney sonuçlarını temsil etmektedir, grupların ortalama değerleri standart hata ile gösterilmiştir. KI: Kemik iliği, PK: Periferik kan, DLK: Dalak. İstatistiksel anlamlılıklar için, * P < .05, ** P < .01, *** P < .001, n.s: istatistiksel anlamlılık olmadığını gösterir.

Sağlıklı hayvanların kanlarındaki myeloid hücreler içinde %5-15 arası HIS48⁺ monosit bulunmaktadır. Ancak tümörlü hayvanlarda bu oran %10'un altına düşmüştür (Şekil 4.10.). İzole edilen hücre sayıları karşılaştırıldığında ise tümörlü hayvanların kanında, HIS48⁺ monositlerin anlamlı olarak arttığı görülmektedir (Şekil 4.11.). Bu durumu sınamak için başvuru tüm monositler içerisindeki yüzdelerde ise değişiklik yoktur (Şekil 4.12.). Tüm myeloid hücreler içindeki yüzdelerin düşüşü

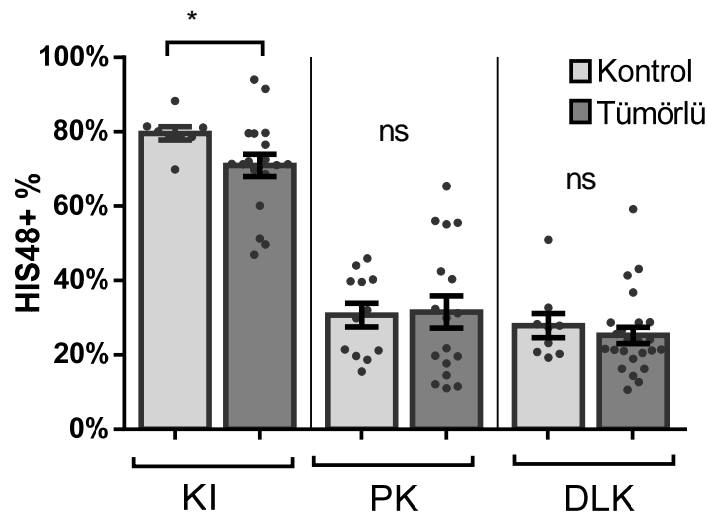
nötrofillerdeki yüksek artışla ilişkili olabilir. Öte yandan artan sayılarına rağmen monositler içerisindeki dengenin bozulmamış olması sadece HIS48- monositlerde de benzer bir artış varsa doğru olarak yorumlanmalıdır.

Kontrol hayvan dalaklarındaki tüm myeloid hücrelerin yaklaşık %20'lik kısmını oluşturan HIS48⁺ monositler tümörlü hayvanlarda çok daha geniş bir varyasyona sahiptir. Ortalama yüzdeleri ise sağlıklı hayvanlara göre bir düşüş olduğu yönünde istatistiksel anlamlılık taşımaktadır (Şekil 4.10.). Tümörlü hayvanların dalaklarından izole edilebilen toplam HIS48⁺ monosit sayıları bazı hayvanlarda artmış görünse de istatistiksel anlamlılığı yoktur (Şekil 4.11.). Monosit alt-popülasyonlarının dengesi ise değişmeden kalmıştır (Şekil 4.12.).



Şekil 4.11. FACS izolasyonu ile elde edilen HIS48⁺ monosit sayıları.

Noktalar, bağımsız deney sonuçlarını temsil etmektedir, grupların ortalama değerleri gösterilmiştir. KI: Kemik iliği, PK: Periferik kan, DLK: Dalak. İstatistiksel anlamlılıklar için, * P < .05, ** P < .01, *** P < .001, n.s: istatistiksel anlamlılık olmadığını gösterir.



Şekil 4.12. HIS48⁺ monositlerin tüm monositler içindeki oranları.

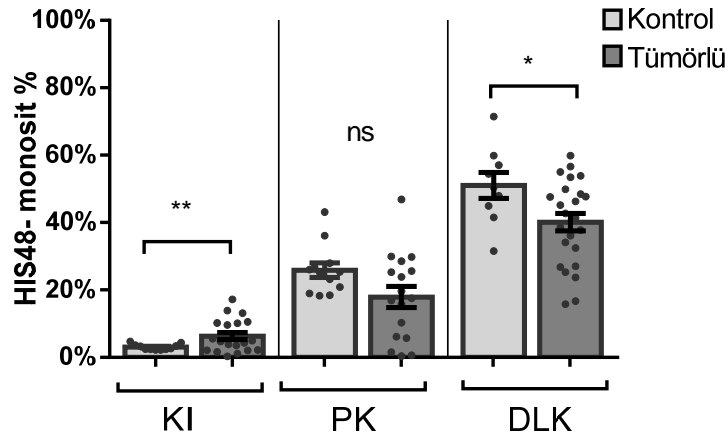
Tüm monositler içinde HIS48⁺ alt-grubun oranı. Noktalar, bağımsız deney sonuçlarını temsil etmektedir, grupların ortalama değerleri standart hata ile gösterilmiştir. KI: Kemik iliği, PK: Periferik kan, DLK: Dalak. İstatistiksel anlamlılıklar için, * P < .05, ** P < .01, *** P < .001, n.s: istatistiksel anlamlılık olmadığını gösterir.

4.4.3.HIS48⁻ Monositler

Sağlıklı hayvan kemik iliğindeki HIS48⁻ monositler tüm myeloid hücrelerin %10'dan az bir kısmını kapsamaktadır ancak tümörlü hayvanlarda %20'lere ulaşan anlamlı bir artış söz konusudur (Şekil 4.13). Bu artış sayısal olarak doğrulanıyor görülsede örnek yetersizliğinden istatistiksel anlamlılığa ulaşamamıştır (Şekil 4.14.). Aynı şekilde kemik iliğindeki monosit dengesi de HIS48⁻ monositler lehine kaymıştır (Şekil 4.15.). Bu nedenle sadece monositler içinde incelendiğinde HIS48⁺ monositlerde görülen azalma diğer monosit grubunun birikiminden kaynaklanmalıdır.

Tümörlü hayvanların periferik kanındaki HIS48⁻ monositler sağlıklı hayvanlarla benzer, %20-30 seviyelerindedir (Şekil 4.13). Nötrofil artışından kaynaklanabilecek bir miktar düşüş HIS48⁻ monositler için de geçerli olabilse de istatistiksel değişim yoktur. Kandan izole edilebilen total HIS48⁻ monosit sayısı ise iki kattan fazla artış göstermiştir (Şekil 4.14.). Ancak monositlerin dengesinde bir

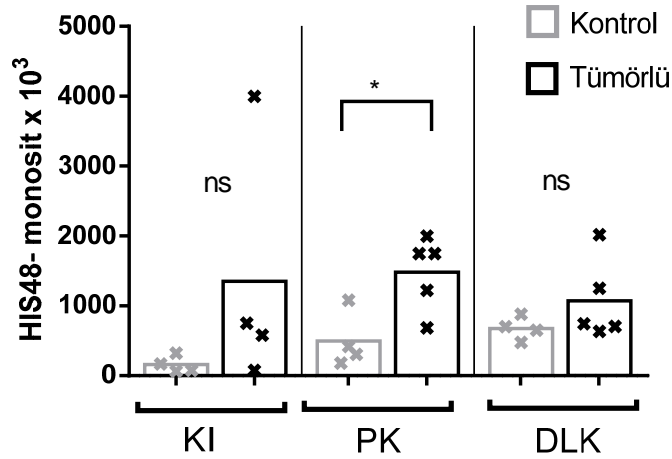
değişim görünmemektedir (Şekil 4.15.). Beklenildiği gibi kandaki monosit dengesinin değişmeden kalması her iki alt grubunda sayılarında benzer artışlar olması ile mümkün olmuştur. Nötrofil sayılarındaki görece daha yüksek olan artış ise tüm myeloid hücreler içerisinde monositlerin oranlarında düşüş etkisi yaratmaktadır. Sonuç olarak tümörlü hayvanların periferik kanında tüm myeloid hücrelerde artış olmuştur.



Şekil 4.13. HIS48⁻ monositlerin tüm myeloid hücreler içindeki oranları.

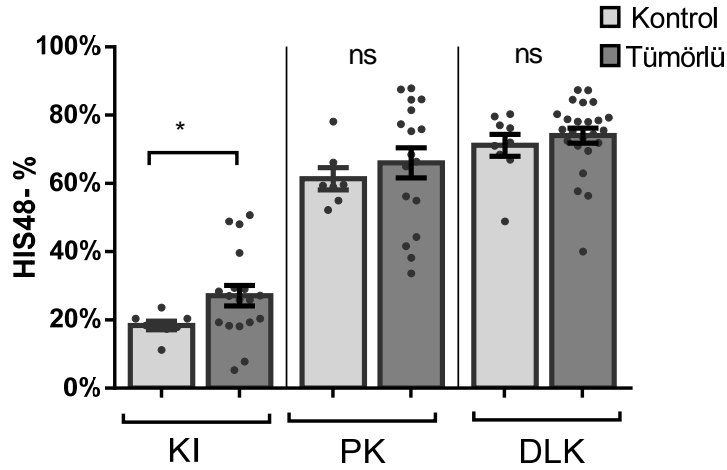
HIS48⁻ monositlerin farklı dokulardaki dağılımlarının karşılaştırılması. Noktalar, bağımsız deney sonuçlarını temsil etmektedir, grupların ortalama değerleri standart hata ile gösterilmiştir. KI: Kemik iliği, PK: Periferik kan, DLK: Dalak. İstatistiksel anlamlılıklar için, * P < .05, ** P < .01, *** P < .001, n.s: istatistiksel anlamlılık olmadığını gösterir.

Kontrol sıçan dalağındaki myeloid hücrelerin yarısını HIS48⁻ monositler teşkil etmekte iken tümörlü hayvanlarda nötrofil birikimi sonucu diğer monosit grubuna benzer bir düşüş tespit edilmiştir (Şekil 4.13). Ancak dalaktaki HIS48⁻ monositler de HIS48⁺ eşlenikleri gibi anlamlı bir değişim göstermemiştir (Şekil 4.14., Şekil 4.15.)



Şekil 4.14. FACS izolasyonu ile elde edilen HIS48⁻ monosit sayıları.

Noktalar, bağımsız deney sonuçlarını temsil etmektedir, grupların ortalama değerleri gösterilmiştir. KI: Kemik iliği, PK: Periferik kan, DLK: Dalak. İstatistiksel anlamlılıklar için, * P < .05, ** P < .01, *** P < .001, n.s: istatistiksel anlamlılık olmadığını gösterir.

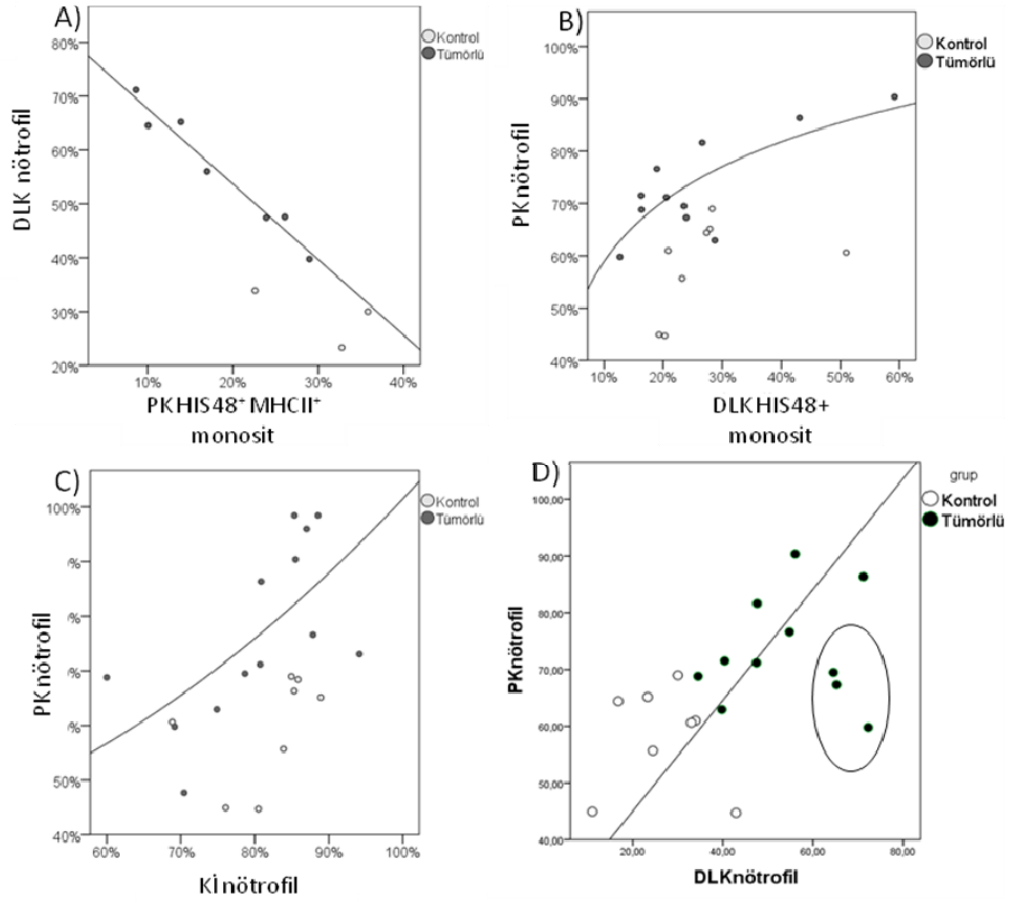


Şekil 4.15. HIS48⁻ monositlerin tüm monositler içindeki oranları.

Tüm monositler içinde HIS48⁻ alt-grubun oranları. Noktalar, bağımsız deney sonuçlarını temsil etmektedir, grupların ortalama değerleri standart hata ile gösterilmiştir. KI: Kemik iliği, PK: Periferik kan, DLK: Dalak. İstatistiksel anlamlılıklar için, * P < .05, ** P < .01, *** P < .001, n.s: istatistiksel anlamlılık olmadığını gösterir.

4.4.4. Farklı Dokulardaki Dağılımlar Arası İlişkiler

Aynı dokularda bulunan hücre yüzdeleri birbirini tamamlayıcı olarak etkilediğinden farklı dokulardaki hücresel birikimlerin birbirleri ile olan ilişkilerine pearson korelasyon testleri ile bakılmıştır. En anlamlı ve güçlü ilişki dalaktaki nötrofil akümülyasyonu ile kandaki HIS48+ monositlerin arasında ve ters yönlüdür (Şekil 4.16). Bir diğer deyişle dalakta nötrofil birikimi ile birlikte kandaki HIS48+ monositlerin MHC sınıf II ekspresyonları düşmektedir. En güçlü ikinci ilişki yine dalak ile kan arasındadır ve dalak HIS48+ monositlerini ve kan nötrofillerini kapsamaktadır. Buna göre kandaki nötrofil birikimi dalaktaki HIS48+ monosit birikimi ile ilişkili görünmektedir (Şekil 4.16). Orta güçteki son ilişki de kemik iliği ve kan nötrofilleri arasında tespit edilmiştir (Şekil 4.16). Ayrıca periferik kan ve dalak nötrofil oranları bazı tümörlü hayvanlarda yüksek derecede ilişkili görünürken bir grup tümörlü hayvanda dalak nötrofillerindeki yüksek birikimin periferik kandan bağımsız olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.16). Dolaşımda ve dalaktaki nötrofil artışlarının tümörlü hayvanlardaki güçlü ilişkisi görülmektedir. Daire ile işaretli hayvanlarda dalaktaki nötrofil artışı periferik kandan bağımsızdır (Şekil 4.16).

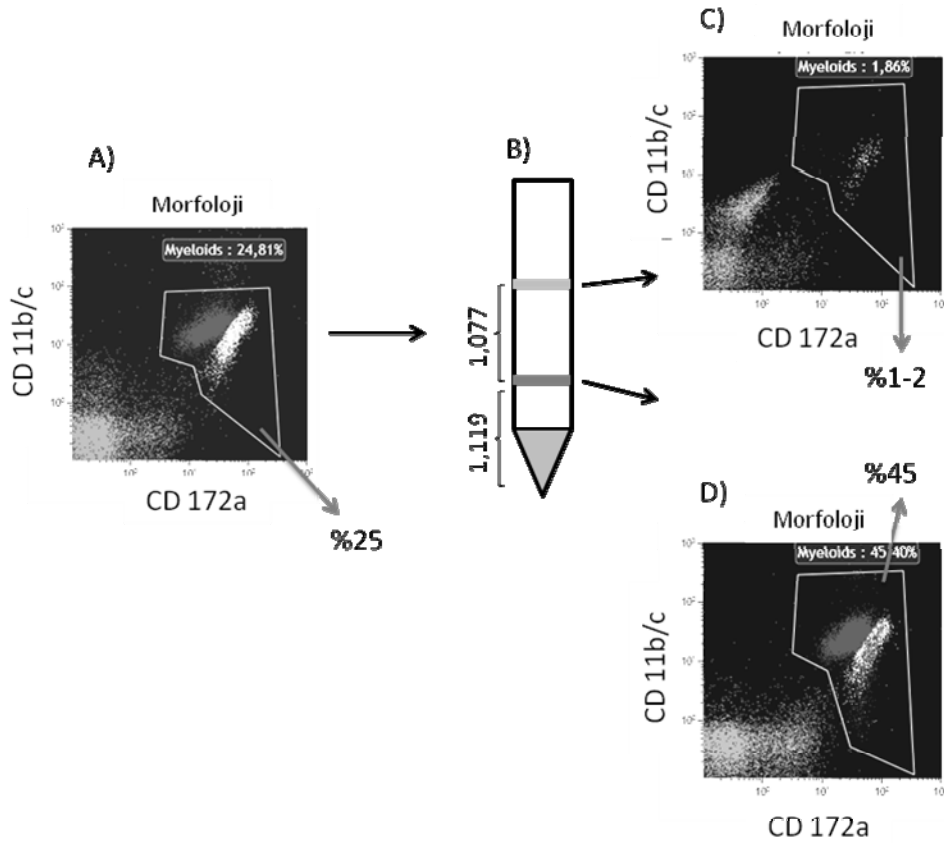


Şekil 4.16. Myeloid alt grup hücre oranlarının farklı dokular arası korelasyonları.

A) Hayvanların dalak nötrofil ve HIS48⁺ MHC sınıf II⁺ monosit oranlarına göre dağılımları ($r=-0.979$; $p<0,000$ $n=7$). **B)** Hayvanların kan nötrofil ve dalak HIS48⁺ monosit oranlarına göre dağılımları ($r=0.783$; $p=0,004$ $n=11$). **C)** Hayvanların kan ve kemik iliği nötrofil oranlarına göre dağılımları ($r=0.638$; $p=0,019$ $n=13$). **D)** Hayvanların periferik kan ve dalak nötrofil dağılımları. Korelasyonlar sadece tümörlü hayvanlar için hesaplanmıştır. Transformasyon uygulanmamıştır ve çizgiler sırasıyla doğrusal, logaritmik ve bi-exponansiyel regresyon denklemlerini gösterir.

4.5. İşlevsel Analizler

Farklı dokulardaki myeloid hücre gruplarının fonksiyonel özelliklerinin karşılaştırılması için saflaştırılmaları gerekmektedir. Bu amaçla kullanılan akım sitometrik hücre ayırılma tekniği tümörlü hayvanlarda sayıları artmış olan myeloid hücreleri izole etmek için kısmen yeterli olsa da sağlıklı hayvanların total hücre popülasyonları içerisindeki seyreklikleri uygulanabilirlikten uzak ayırım sürelerine yol açmaktadır. Bu nedenle akım sitometrik ayırılma öncesinde ikili dansite gradienti uygulanarak myeloid hücre yoğunlukları artırılmıştır (Şekil 4.17.). Buna göre, kontrol hayvan periferik kanında tüm hücreler içerisinde %25 civarında olan myeloid hücre oranı %45 seviyelerine, dalakta ise %10 civarında olan myeloid hücre oranları %50 oranlarına çıkarılmıştır.

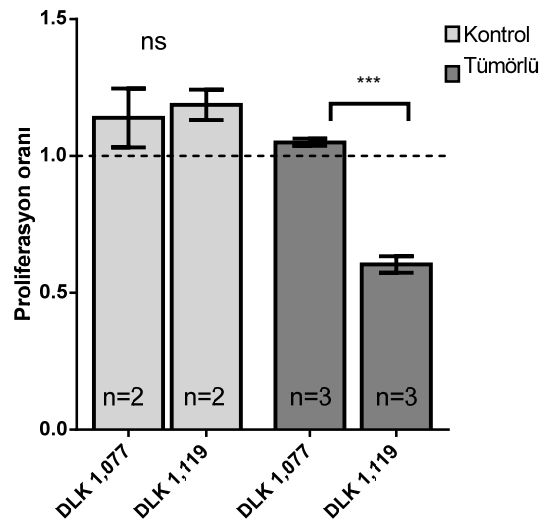


Şekil 4.17. İkili dansite gradienti uygulaması ile myeloid hücre kazanımı.

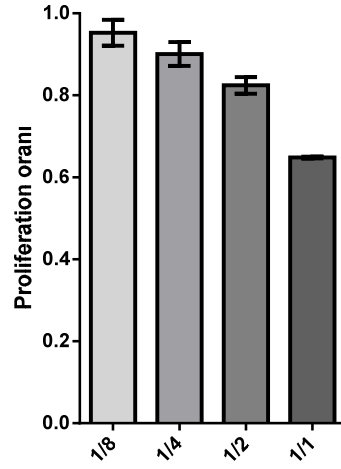
Kontrol sıçan periferik kanındaki A) toplam myeloid hücre oranı, B) Dansite gradientinin şematik gösterimi, C) 1,077 gradientindeki myeloid hücre oranı, D) 1,119 gradientindeki myeloid hücre oranları.

4.5.1. Proliferasyon Analizleri ile Baskılamanın Tespiti

Dansite gradienti sonrasında elde edilen iki farklı fraksiyonun baskılayıcı özellikleri proliferasyon testi ile değerlendirilmiştir. Sağlıklı kontroller ve tümörlü hayvanların dalaklarından izole edilen myeloid hücrelerin farklı dansite gradienti fraksiyonları conalbumin immünize hayvanların splenositleri (CIR-SPL) ile antijen varlığında kültüre alınmıştır. Elde edilen sonuçlar kontrol hayvanların her iki gradientinin de proliferasyonda düşüşten ziyade artışa neden olduklarını gösterirken, tümörlü hayvan splenositlerinin yalnızca 1,119 fazı baskılayıcıdır (Şekil 4.18.). Bu sonuca istinaden devam eden tüm fonksiyonel deneylerde myeloid hücrelerin yoğun olarak bulunduğu 1,119 gradienti hücreleri kullanılmışlardır. Ayrıca, 1,119 gradienti hücrelerinin ko-kültürlerdeki oranları arttıkça proliferasyon düşüş göstermektedir (Şekil 4.19.).



Şekil 4.18. Farklı dansite fraksiyonlarına ait dalak hücrelerinin proliferasyona etkileri. Conalbumin immünize hayvan splenositleri (CIR-SPL) ile kontrol ve tümörlü hayvan splenositlerinin antijen varlığında ko-kültürlerinin proliferasyona etkileri. Ko-kültür proliferasyonlarının yalnızca CIR-SPL hücrelerinin proliferasyonlarına oranları gösterilmiştir. DLK: Dalak. İstatistiksel anlamlılıklar için, * $P < .05$, ** $P < .01$, *** $P < .001$, n.s: istatistiksel anlamlılık olmadığını gösterir.



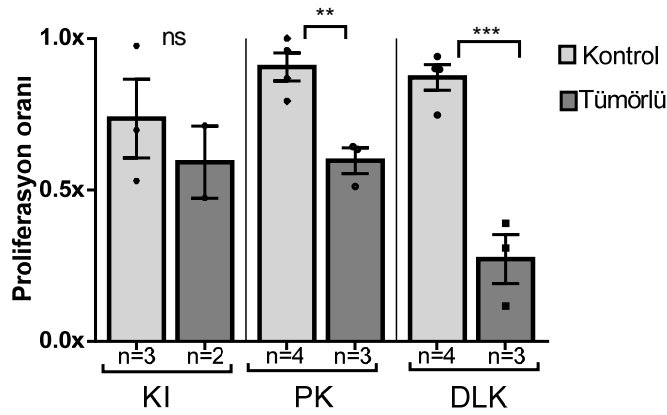
Şekil 4.19. Kokültürlerde baskılayıcı hücre titrasyonları ve proliferasyona etkileri.

Dalaktan izole edilmiş hücrelerin 1,119 gradientine ait fraksiyonları artan oranlarda CIR-SPL ile birlikte kültüre alınmışlardır. 1/1 oranında her iki hücre grubundan 5×10^4 hücre bulunmaktadır.

Myeloid alt-popülasyonlarının baskılayıcı potansiyellerini değerlendirmek için FACS ile saflaştırılmış 1,119 gradienti hücreleri CIR-SPL ile antijen varlığında 96 saat ko-kültürlere alınmışlardır. CFSE analizi (Şekil 4.23.) ile elde edilen $CD4^+$ T hücre proliferasyonu sonuçlara göre;

1. Kültür ortamına eklenen hiçbir myeloid hücre grubu proliferasyonu bazal seviyenin üzerine çıkaramamıştır (Şekil 4.20-22).
2. En yüksek proliferasyon kontrol hayvan nötrofilleri ve HIS48- monositleri ile yapılan kültürlerde elde edilmiştir (Şekil 4.22.) En düşük proliferasyon HIS48+ monosit kültürleri ile ortaya çıkmıştır (Şekil 4.21).
3. İstatistiksel olarak anlamlı baskılama sadece tümörlü periferik kan ve dalak nötrofillerinde tespit edilmiştir. En yüksek baskılama tümörlü hayvan dalak nötrofillerinde görülmektedir (Şekil 4.20.).

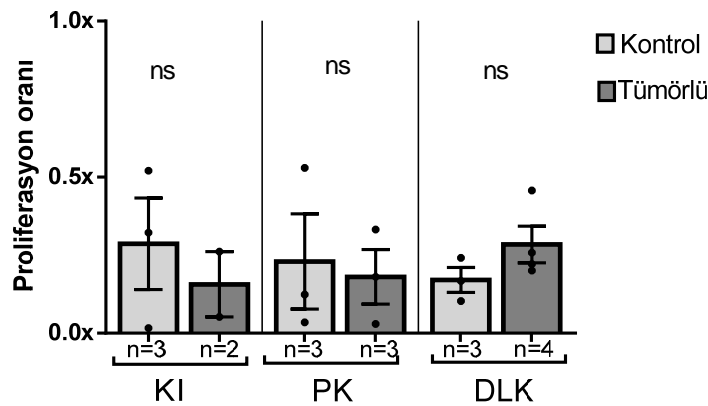
Nötrofiller



Şekil 4.20. Kontrol ve tümörlü hayvan nötrofillerin proliferatif etkileri.

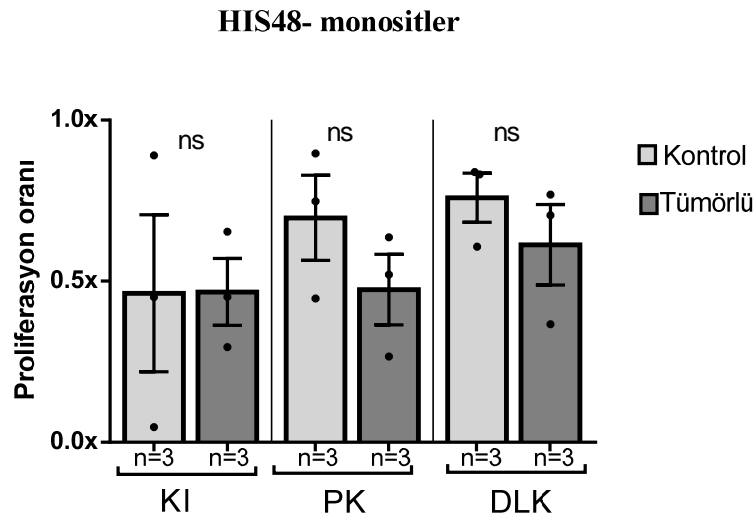
Nötrofiller ile yapılan ko-kültürlerin $CD4^+$ T hücre proliferasyon oranları gösterilmiştir. Kontrol ve tümörlü hayvanlardan saflaştırılan 25×10^3 efektör myeloid hücre 1×10^5 CIR-SPL hücresi ile kültüre edilmiştir. Ko-kültür proliferasyonlarının pozitif kontrol proliferasyonlarına oranları gösterilmiştir. Noktalar, bağımsız deney sonuçlarını temsil etmektedir, grupların ortalama değerleri standart hata ile gösterilmiştir. KI: Kemik iliği, PK: Periferik kan, DLK: Dalak. İstatistiksel anlamlılıklar için, * $P < .05$, ** $P < .01$, *** $P < .001$, n.s: istatistiksel anlamlılık olmadığını gösterir.

HIS48+ monositler



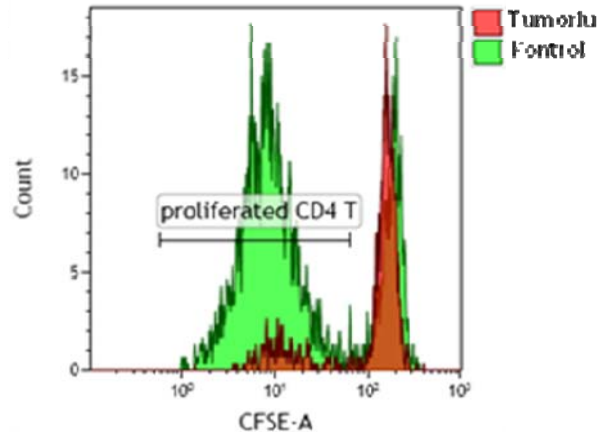
Şekil 4.21. HIS48+ monositlerin proliferatif etkileri.

HIS48+ monositler ile yapılan ko-kültürlerin CD4⁺ T hücre proliferasyon oranları gösterilmiştir. Kontrol ve tümörlü hayvanlardan saflaştırılan 25×10^3 efektör myeloid hücre 1×10^5 CIR-SPL hücresi ile kültüre edilmiştir. Ko-kültür proliferasyonlarının pozitif kontrol proliferasyonlarına oranları gösterilmiştir. KI: Kemik iliği, PK: Periferik kan, DLK: Dalak. İstatistiksel anlamlılıklar için, * P < .05, ** P < .01, *** P < .001, n.s: istatistiksel anlamlılık olmadığını gösterir.



Şekil 4.22. Kontrol ve tümörlü hayvan HIS48- monositlerin proliferatif etkileri.

HIS48- monositler ile yapılan ko-kültürlerin CD4⁺ T hücre proliferasyon oranları gösterilmiştir. Kontrol ve tümörlü hayvanlardan saflaştırılan 25×10^3 efektör myeloid hücre 1×10^5 CIR-SPL hücresi ile kültüre edilmiştir. Ko-kültür proliferasyonlarının pozitif kontrol proliferasyonlarına oranları gösterilmiştir. Noktalar, bağımsız deney sonuçlarını temsil etmektedir, grupların ortalama değerleri standart hata ile gösterilmiştir. KI: Kemik iliği, PK: Periferik kan, DLK: Dalak. İstatistiksel anlamlılıklar için, * P < .05, ** P < .01, *** P < .001, n.s: istatistiksel anlamlılık olmadığını gösterir.



Şekil 4.23. Kontrol ve tümörlü nötrofill kültürlerinin CFSE histogramları.

Temsili CFSE analizi ile kontrol ve tümörlü hayvan dalak nötrofil ko-kültürlerinin CD4⁺ T hücre proliferasyonu karşılaştırması.

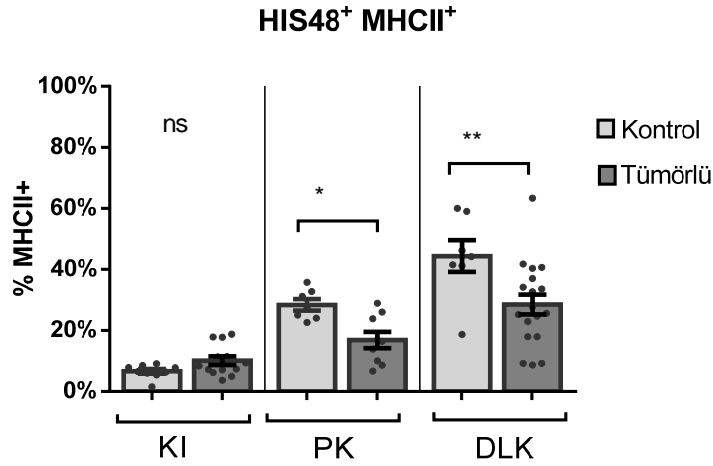
4.5.2. Baskılamada Rol Oynayan Mekanizmaların İncelenmesi

Myeloid hücre alt-gruplarının baskılayıcılıkla ilişkili olabilecek diğer özellikleri incelenmiştir. Bunlar sırasıyla kültür öncesi ko-stimulatör molekül ekspresyonu düzeyleri, fagositoz kapasiteleri ve reaktif oksijen türevi sentezleri ile kültür sonrasında süpernatandaki nitrik oksit üretiminin bir belirteci olan nitrit seviyelerinin incelenmesidir.

Kostimulatör Molekül Ekspresyonu ve Antijen Sunumu Kapasitesi

Myeloid hücre alt-gruplarının MHC sınıf II veya CD80 pozitif hücre yüzdeleri karşılaştırılmıştır. Nötrofillerin MHC sınıf II ve CD80 ekspresyonları çok düşük seviyelerdedir ve farklılık görülmemiştir. Sağlıklı sıçan HIS48⁺ monosit popülasyonu, kemik iliği ve dalak arasında kademeli bir MHC sınıf II pozitifliği sergilemektedir (Şekil 4.24.) ve MHC sınıf II pozitif HIS48⁺ monositler tümörlü hayvanların periferik kanları ve dalaklarında anlamlı olarak azalmıştır (Şekil 4.24.).

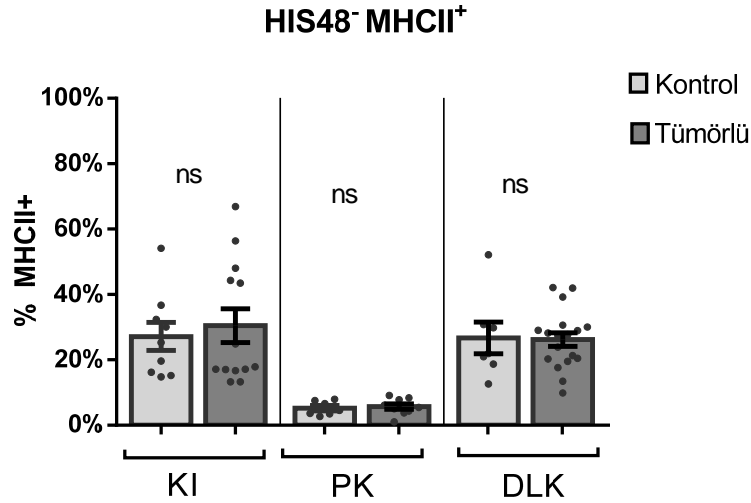
Kemik iliğindeki HIS48⁻ monositler dalaktaki eşlenikleri ile benzer oranlarda MHC sınıf II pozitifliği ve tüm diğer dokulardan yüksek CD80 pozitifliği barındırmaktadırlar (Şekil 4.25.-27.). Tümörlü ve sağlıklı hayvanlar arasında CD80 eksprese eden monosit yüzdeleri açısından bir farklılık görülmemiştir (Şekil 4.26.-27.).



Şekil 4.24. HIS48⁺ monositlerin MHC sınıf II ekspresyonları.

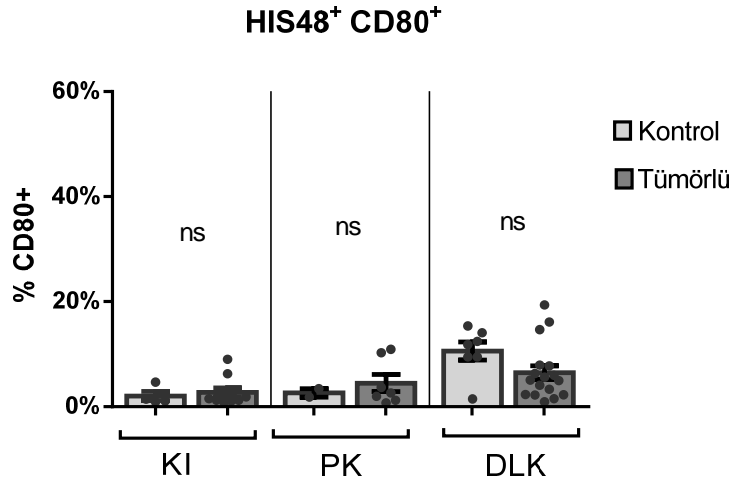
HIS48⁺ monositlerin MHC sınıf II pozitif hücre oranları karşılaştırılmıştır.

Noktalar, bağımsız deney sonuçlarını temsil etmektedir, grupların ortalama değerleri standart hata ile gösterilmiştir. KI: Kemik iliği, PK: Periferik kan, DLK: Dalak. İstatistiksel anlamlılıklar; * $P < .05$, ** $P < .01$, *** $P < .001$, n.s: istatistiksel anlamlılık olmadığını gösterir.



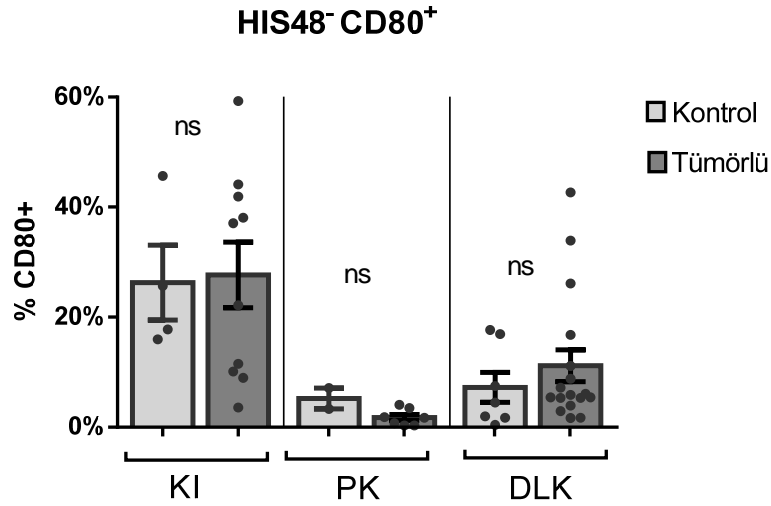
Şekil 4.25. HIS48⁻ monositlerin MHC sınıf II ekspresyonları.

HIS48⁻ monositlerin MHC sınıf II pozitif hücre oranları karşılaştırılmıştır. KI: Kemik iliği, PK: Periferik kan, DLK: Dalak. İstatistiksel anlamlılıklar; * $P < .05$, ** $P < .01$, *** $P < .001$, n.s: istatistiksel anlamlılık olmadığını gösterir.



Şekil 4.26. HIS48⁺ monositlerin CD80 ekspresyonları.

HIS48⁺ monosit gruplarının CD80 pozitif hücre oranları gösterilmiştir HIS48⁻ monosit gruplarının MHC sınıf II pozitif hücre oranları karşılaştırılmıştır. KI: Kemik iliği, PK: Periferik kan, DLK: Dalak. İstatistiksel anlamlılıklar; * P < .05, ** P < .01, *** P < .001, n.s: istatistiksel anlamlılık olmadığını gösterir.

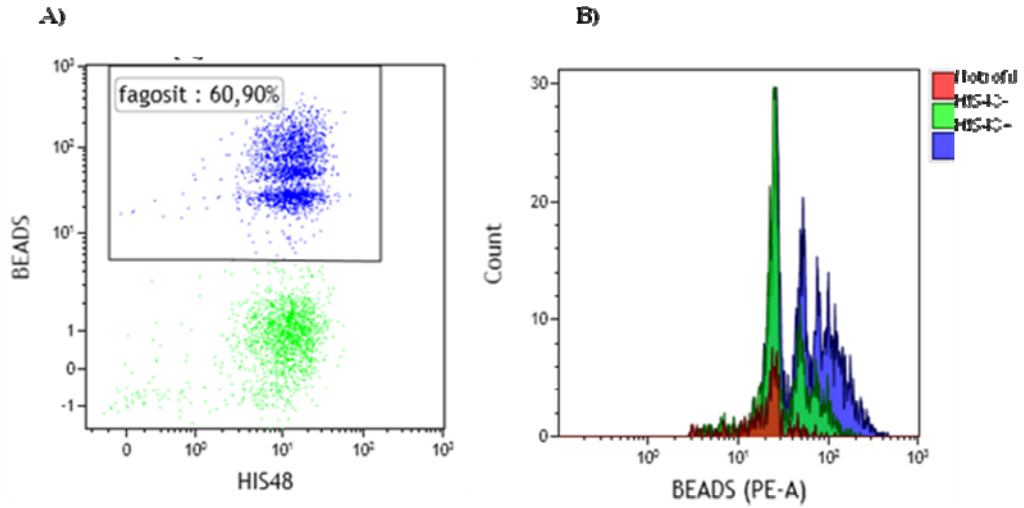


Şekil 4.27. HIS48⁻ monositlerin CD80 ekspresyonları.

HIS48⁻ monosit gruplarının CD80 pozitif hücre oranları gösterilmiştir HIS48⁺ monosit gruplarının MHC sınıf II pozitif hücre oranları karşılaştırılmıştır. KI: Kemik iliği, PK: Periferik kan, DLK: Dalak. İstatistiksel anlamlılıklar; * P < .05, ** P < .01, *** P < .001, n.s: istatistiksel anlamlılık olmadığını gösterir.

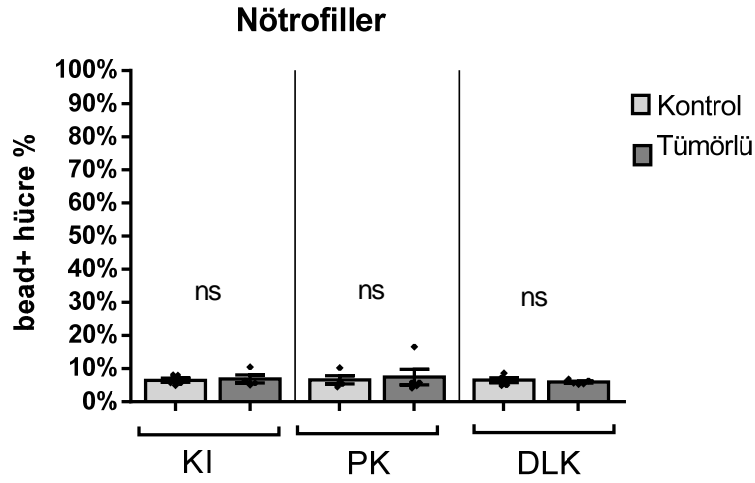
Fagositoz Kapasitelerinin Değerlendirilmesi

Hücrelerin fagositoz yeteneklerini değerlendirmek için 2µm'lik lateks fluoressan parçacıklar kullanılmıştır. Parçacıkların ışımalarına göre fagositoza katılan hücre oranları ve ışımaya gücüne göre alınan parçacık miktarları karşılaştırılmıştır (Şekil 4.28.). Nötrofiller en az fagositoza katılan gruptur (Şekil 4.29., 32.). HIS48+ monositlerin tüm dokularda %30'dan fazlası fagositoza katılır ve en fazla miktarda parçacık alırlar (Şekil 4.30., 33.). En yüksek fagositoza katılım oranı ve kapasitesine sahip hücre grubunu periferik kan HIS48+ monositleri oluşturmaktadır (Şekil 4.30., 33.). HIS48- monositlerin yaklaşık onda biri fagositoza katılır ve kapasiteleri HIS48+ monositlerden daha düşüktür (Şekil 4.31., 34.). Tümörlü ve sağlıklı hayvanlar arasında fagositoz açısından tek istatistiksel farklılık dalak HIS48- monositlerinde görülmektedir (Şekil 4.31.).



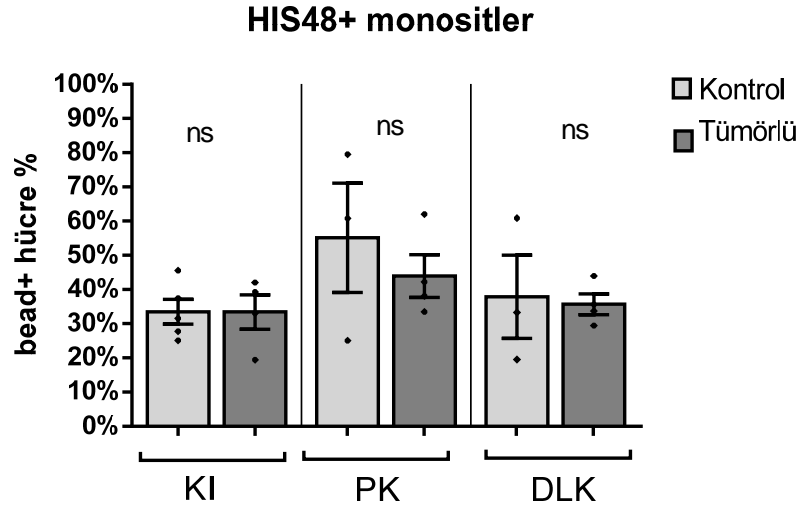
Şekil 4.28. Fagositoz analizlerinin dağılım ve histogramları.

A) Fagositoza katılan hücre oranları tespitinin gösterimi. B) Fagositoza katılmış hücrelerin fagositoz kapasitelerinin bead fluoressan yoğunluğuna göre gösterimi.



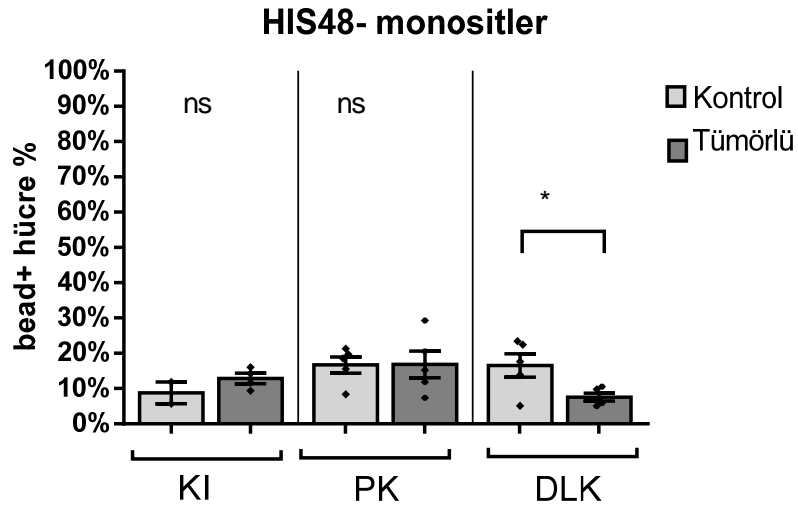
Şekil 4.29. Nötrofil gruplarının fagositoza katılım oranları.

Farklı dokulardaki nötrofil gruplarının fagositoza katılan hücre oranları. KI: Kemik iliği, PK: Periferik kan, DLK: Dalak. n.s: istatistiksel anlamlılık olmadığını gösterir.



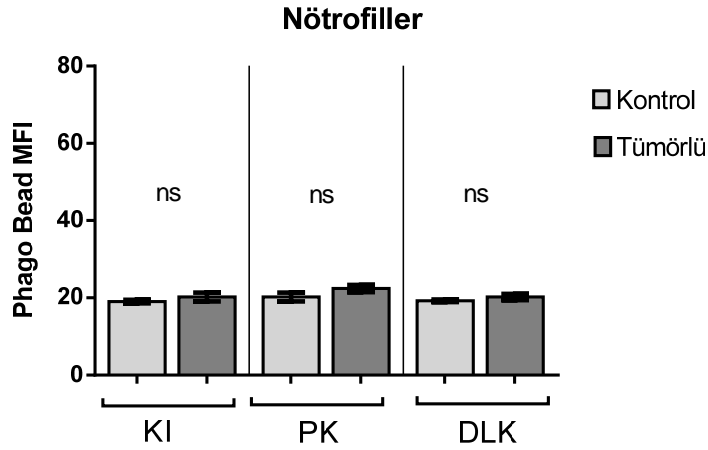
Şekil 4.30. HIS48+ monosit gruplarının fagositoza katılım oranları.

Farklı dokulardaki HIS48+ monosit gruplarının fagositoza katılan hücre oranları. KI: Kemik iliği, PK: Periferik kan, DLK: Dalak. n.s: istatistiksel anlamlılık olmadığını gösterir.



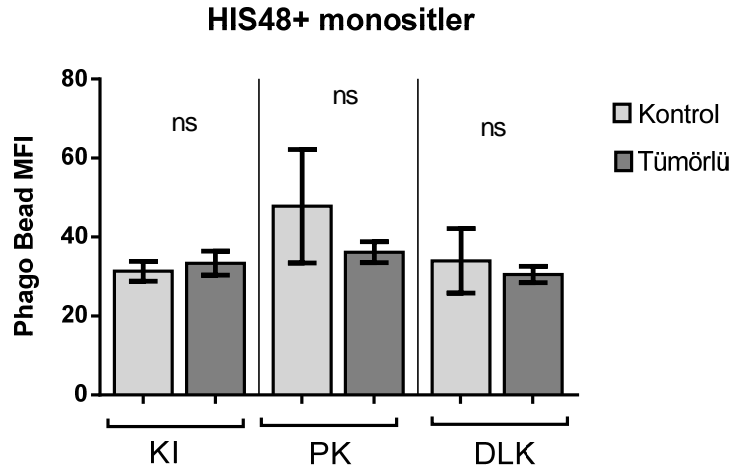
Şekil 4.31. HIS48- monosit gruplarının fagositoza katılım oranları.

Farklı dokulardaki HIS48- monosit gruplarının fagositoza katılan hücre oranları. KI: Kemik iliği, PK: Periferik kan, DLK: Dalak. İstatistiksel anlamlılıklar; * $P < .05$, ** $P < .01$, *** $P < .001$, n.s: istatistiksel anlamlılık olmadığını gösterir.



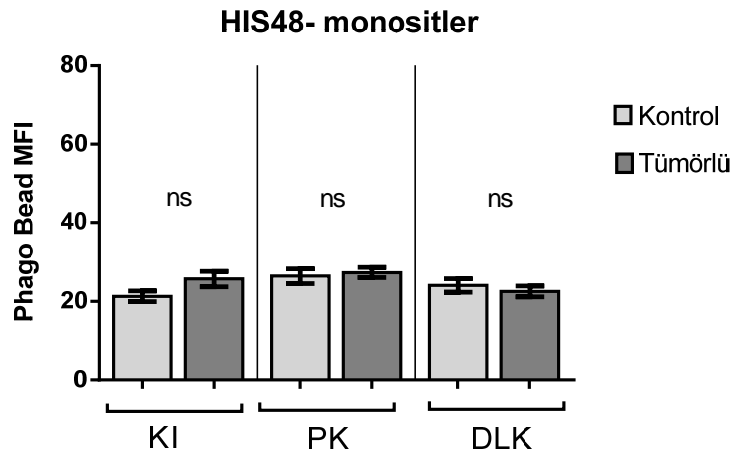
Şekil 4.32. Nötrofil gruplarının fagositoz kapasiteleri.

Fagositoza katılmış HIS48- monosit gruplarının fagositoz kapasitelerini belirten hücre başına ortalama parçacık ışınmaları. KI: Kemik iliği, PK: Periferik kan, DLK: Dalak. n.s: istatistiksel anlamlılık olmadığını gösterir.



Şekil 4.33. HIS48+ monosit gruplarının fagositoz kapasiteleri.

Fagositoza katılmış HIS48+ monosit gruplarının fagositoz kapasitelerini belirten hücre başına ortalama parçacık ışımları. KI: Kemik iliği, PK: Periferik kan, DLK: Dalak. n.s: istatistiksel anlamlılık olmadığını gösterir.

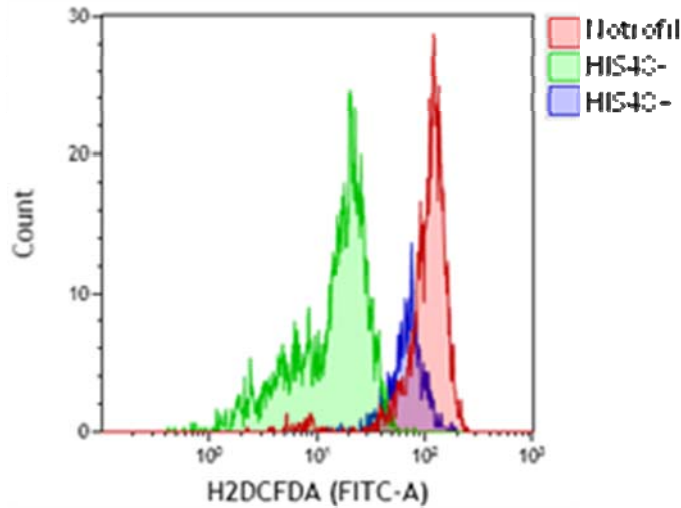


Şekil 4.34. HIS48- monosit gruplarının fagositoz kapasiteleri.

Fagositoza katılmış HIS48- monosit gruplarının fagositoz kapasitelerini belirten hücre başına ortalama parçacık ışımları. KI: Kemik iliği, PK: Periferik kan, DLK: Dalak. n.s: istatistiksel anlamlılık olmadığını gösterir.

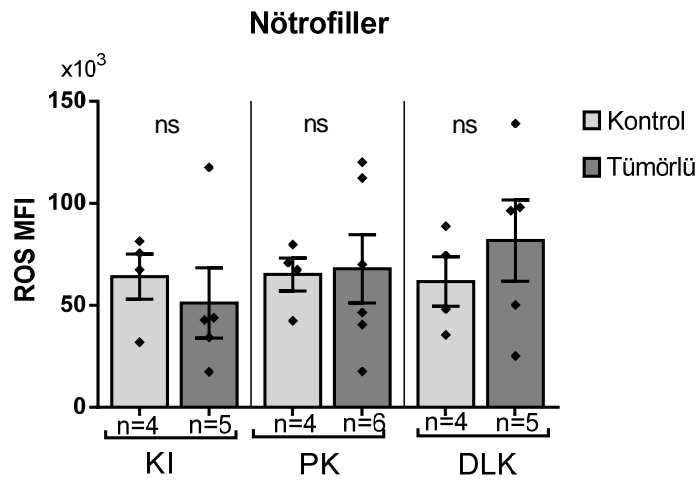
ROS analizleri

FACS saflaştırmalarından hemen sonra myeloid hücreler, H₂DCF-DA ile inkübe edilmişlerdir. ROS seviyeleri fluorometrik olarak belirlenmiştir (Şekil 4.35.). Hiçbir myeloid hücre grubunun ROS düzeyleri tümörlü hayvanlarda anlamlı bir değişim göstermemiştir (Şekil 4.36.-38.). Ancak tümörlü hayvan nötrofillerinde yüksek varyasyon görülmektedir ve bazı örneklerde 3 katı geçen artışlar tespit edilmiştir (Şekil 4.36.). Nötrofillerin ROS sentezleri HIS48+ monositlerin seviyeleri ile benzer düzeydedir (Şekil 4.37.). Reaktif oksijen bileşeni üretimleri konusunda en net yargıya varılabilen grup HIS48- monositlerdir ve çok düşük seviyelerde ROS üretimi yapmaktadırlar (Şekil 4.38.).



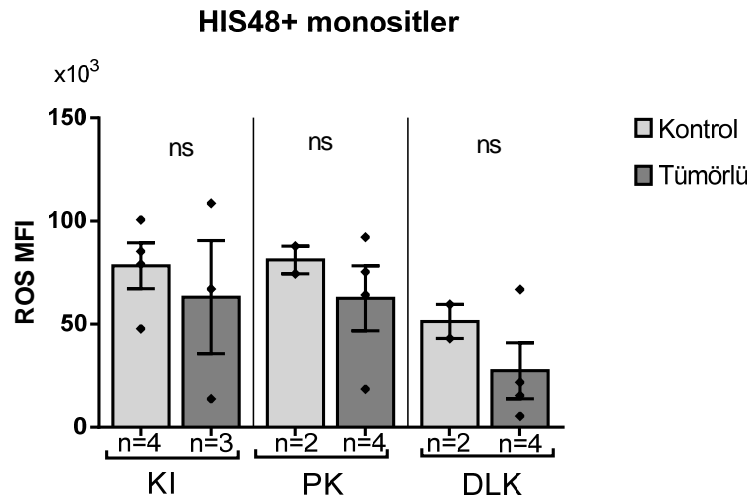
Şekil 4.35. Myeloid alt grupların H₂DCF-DA histogramları.

Tümörlü hayvan periferik kanındaki 3 farklı hücre grubunun FACS saflaştırmalarından hemen sonraki ROS seviyelerinin karşılaştırılması. ROS düzeyi, H₂DCF-DA ile inkübasyonları sonrası fluorometrik olarak belirlenmiştir.



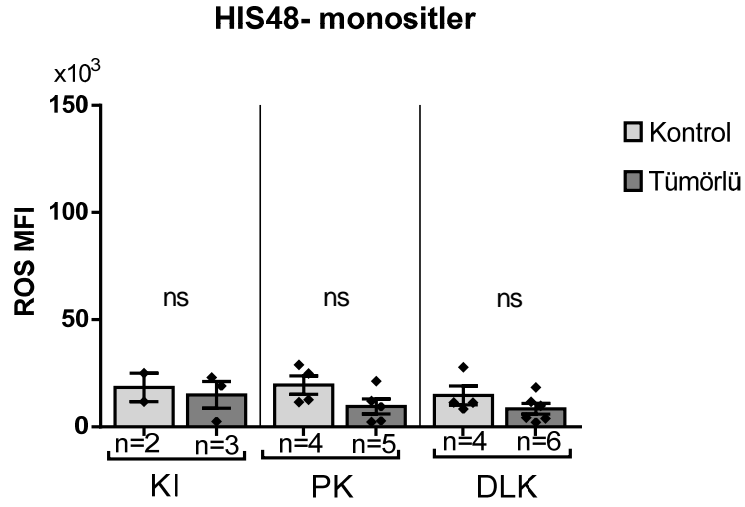
Şekil 4.36. Nötrofil gruplarının ROS düzeyleri.

Farklı dokulardan izole edilen nötrofillerin H₂DCF-DA ışınması ortalamalarıdır. KI: Kemik iliği, PK: Periferik kan, DLK: Dalak. n.s: istatistiksel anlamlılık olmadığını gösterir.



Şekil 4.37. HIS48+ monositlerin ROS düzeyleri.

Farklı dokulardan izole edilen HIS48+ monositlerin H₂DCF-DA ışınması ortalamalarıdır. KI: Kemik iliği, PK: Periferik kan, DLK: Dalak. n.s: istatistiksel anlamlılık olmadığını gösterir.

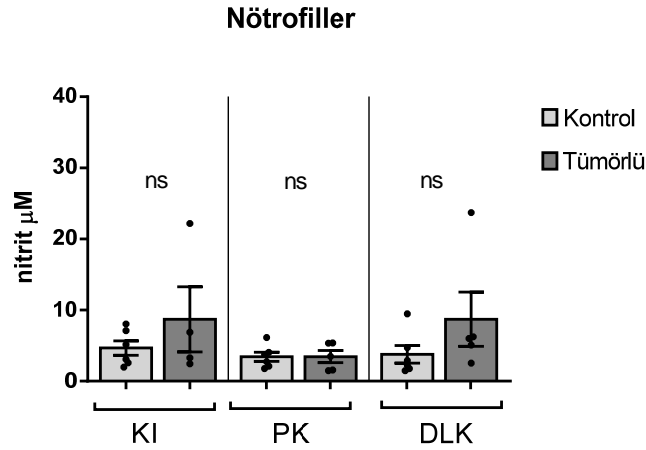


Şekil 4.38. HIS48- monositlerin ROS düzeyleri.

Farklı dokulardan izole edilen HIS48- monositlerin H₂DCF-DA ışınması ortalamalarıdır. KI: Kemik iliği, PK: Periferik kan, DLK: Dalak. n.s: istatistiksel anlamlılık olmadığını gösterir.

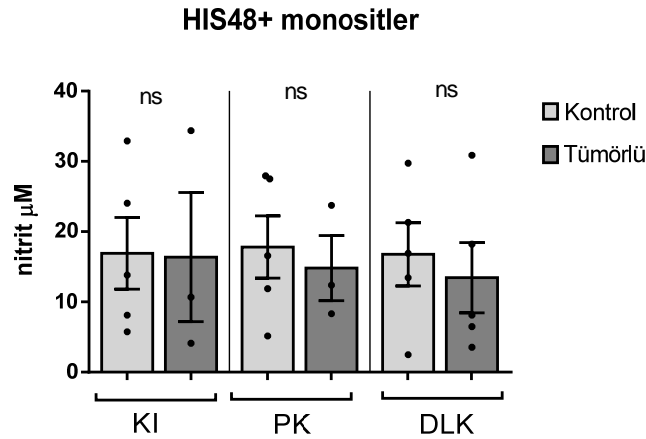
Nitrik Oksit Analizleri

96 saat ko-kültür sonrasında hücre gruplarının nitrik oksit üretimi, kültür süpernatantındaki nitrit seviyeleri Griess reaksiyonu ile ölçülerek değerlendirilmiştir. Tümörlü ve sağlıklı hayvanlar arasında hiçbir hücre grubunda anlamlı NO- üretimi farkı tespit edilmemiştir (Şekil 4.39.-41). En yüksek nitrik oksit üretiminden HIS48⁺ monositler sorumludur ve örneklerdeki varyasyon yüksektir (Şekil 4.40.). Tümörlü hayvanların kemik iliği ve dalak nötrofilleri anlamlılığa ulaşmayan artış eğilimi sergilemektedir (Şekil 4.39.) ancak genel olarak HIS48- monositlere benzer bazal seviyelerde NO- üretmektedirler (Şekil 4.41.).



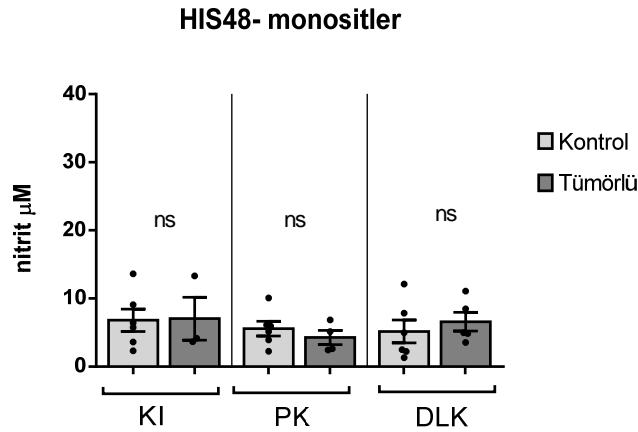
Şekil 4.39. Nötrofil ko-kültürlerinin nitrik oksit seviyeleri.

Farklı dokulardan izole edilen nötrofillerin 96 saat ko-kültür sonrasında süpernatandaki nitrit düzeyleri Griess reaksiyonu ile kolorimetrik olarak ölçülmüştür. Kemik iliği, PK: Periferik kan, DLK: Dalak. ns: istatistiksel anlamlılık olmadığını gösterir.



Şekil 4.40. HIS48+ monosit ko-kültürlerinin nitrik oksit seviyeleri.

Farklı dokulardan izole edilen HIS48+ monositlerin 96 saat ko-kültür sonrasında süpernatandaki nitrit düzeyleri Griess reaksiyonu ile kolorimetrik olarak ölçülmüştür. Kemik iliği, PK: Periferik kan, DLK: Dalak. ns: istatistiksel anlamlılık olmadığını gösterir.



Şekil 4.41. HIS48- monosit ko-kültürlerinin nitrik oksit seviyeleri.

Farklı dokulardan izole edilen HIS48- monositlerin 96 saat ko-kültür sonrasında süpernatandaki nitrit düzeyleri Griess reaksiyonu ile kolorimetrik olarak ölçülmüştür. Kemik iliği, PK: Periferik kan, DLK: Dalak. ns: istatistiksel anlamlılık olmadığını gösterir.

ELISA

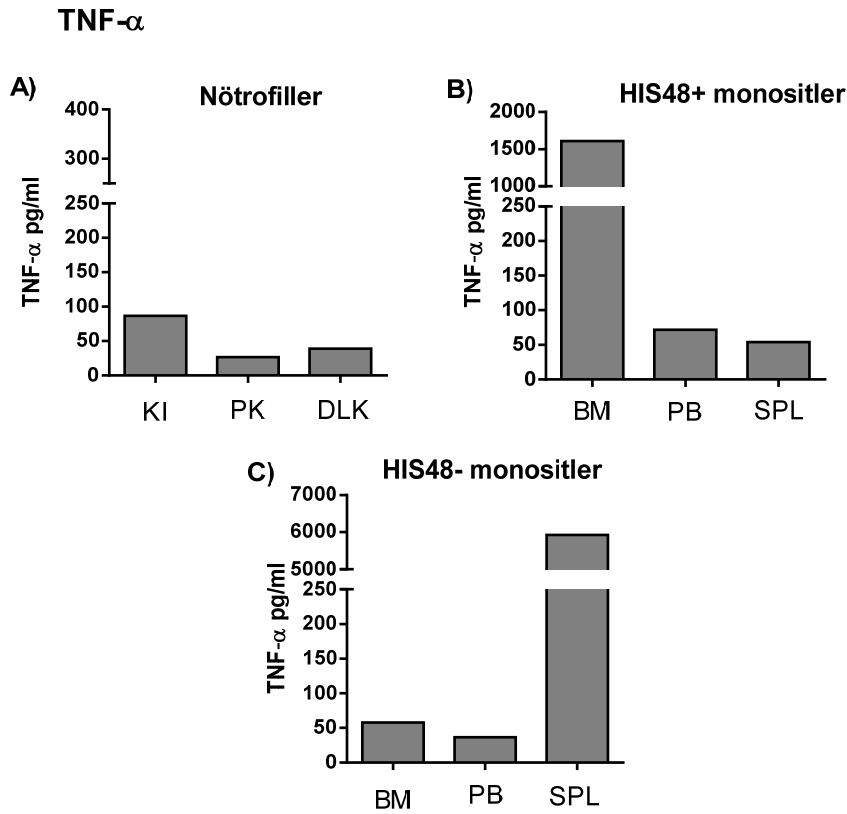
Tümörlü hayvanlardan izole edilen myeloid hücre grupları ile yapılan üç bağımsız ko-kültür deneyinden elde edilen süpernatantlar eşit miktarlarda bir havuzda toplanmıştır. ELISA yöntemi ile baskılama ile ilişkili olabilecek pro-inflamatuar TNF- α ve IL-6 ile anti-inflamatuar IL-10 ve TGF- β sitokin seviyeleri incelenmiştir. Ek olarak, sakrifikasyondan hemen önce hayvanların kanlarından izole edilip -80 C°'de saklanan serum örneklerinin de TNF- α , IL-6, IL-10 ve TGF- β konsantrasyonları tespit edilmiştir. Bu bölümde sitokine göre elde edilen sonuçlar belirtilecektir.

TNF- α

TNF- α üretimi en çok tümörlü hayvanların dalak HIS48- monositleri ile kemik iliği HIS48+ monositlerini içeren kültürlerde olmaktadır. Dalaktaki HIS48- monositler, yaklaşık 6 μ g/ml TNF- α üreterek 1,5 μ g/ml düzeyindeki kemik iliği HIS48+ monositlerinden 3 kat daha fazla TNF- α sentezine neden olmuşlardır. Dalak, kemik iliği ve periferik kandan izole edilmiş olan nötrofiller ile kan ve dalaktan izole edilmiş HIS48+ monositler ile kemik iliği ve kandan izole edilmiş HIS48-

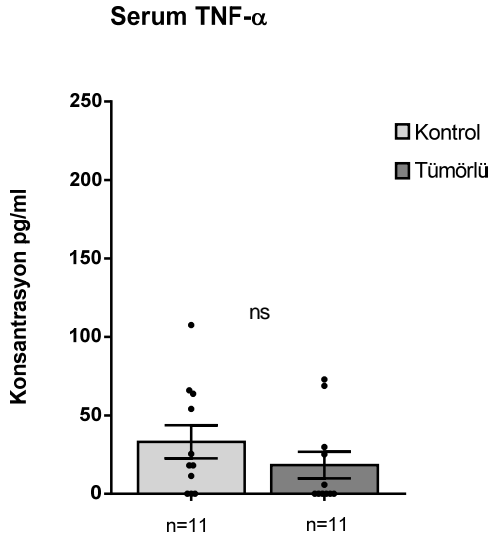
monositlerin TNF- α üretimleri bazal olarak 50-100 pg/ml seviyelerinde tespit edilmiştir (Şekil 4.42.).

Buna ek olarak hem 11 kontrol hem de 11 tümörlü hayvan serumunda yapılan incelemelerde de üst sınırı 100 pg/ml olan TNF- α konsantrasyonları tespit edilmiş, iki grup ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olmadığı gösterilmiştir (Şekil 4.43.).



Şekil 4.42. Tümörlü hayvan myeloid hücre ko-kültürlerinin TNF- α seviyeleri.

96 saat CIR-SPL ile kültüre edilen myeloid hücrelerin kültür süpernatanlarındaki TNF- α konsantrasyonları gösterilmektedir. **A)** Nötrofiller, **B)** HIS48+ monositler, **C)** HIS48- monositlerin farklı dokulardan izole edilmiş gruplarını göstermektedir. Süpernatanlar 3 bağımsız deneyden elde edilmiş ve eşit miktarlarda bir havuzda toplanmışlardır. Barlar duplike kuyuların ortalama sonuçlarını göstermektedir.



Şekil 4.43. Sağlıklı ve tümörlü hayvan serumlarının TNF- α seviyeleri.

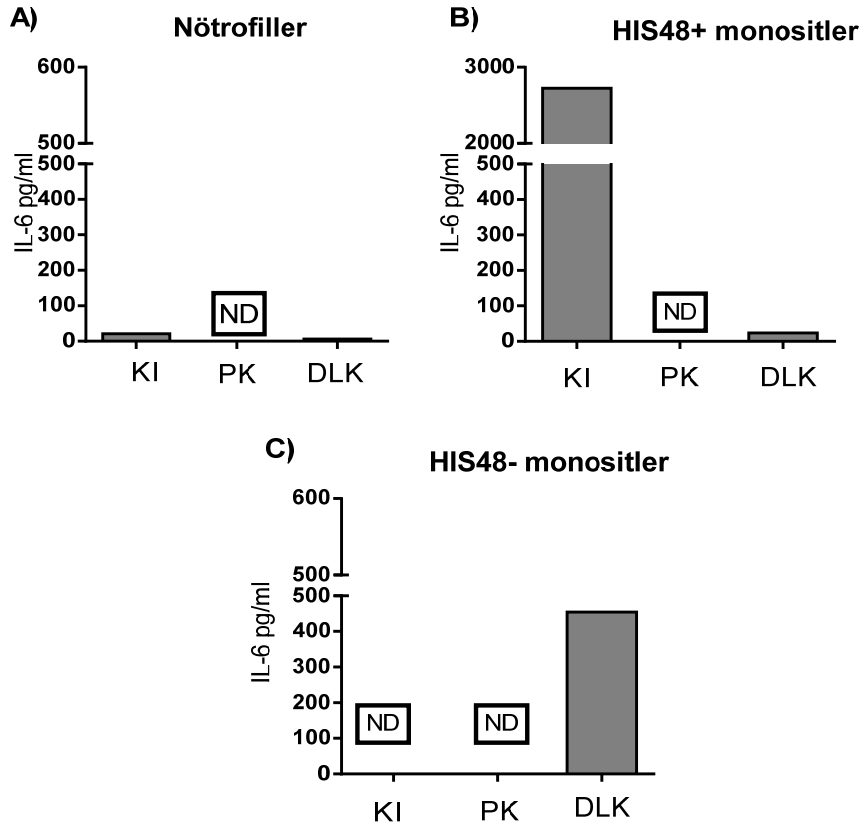
Tümörlü ve kontrol hayvanların serumlarındaki TNF- α konsantrasyonları gösterilmiştir. n.s: istatistiksel anlamlılık olmadığını gösterir.

IL-6

IL-6 üretimi de yine en çok tümörlü hayvanların dalak HIS48- monositleri ile kemik iliği HIS48+ monositlerini içeren kültürlerde olmaktadır. KI HIS48+ monositleri, 3 μ g/ml seviyelerine yaklaşan IL-6 üretimleri ile 0,5 μ g/ml seviyelerindeki dalak HIS48- monositlerinden yaklaşık 4 kat fazla IL-6 sentezine neden olmuşlardır (Şekil 4.44.). Dalak, kemik iliği ve periferik kandan izole edilmiş olan nötrofiller; kan ve dalaktan izole edilmiş HIS48+ monositler ile kemik iliği ve kandan izole edilmiş HIS48- monositlerin IL-6 üretimleri 50 pg/ml seviyelerinin altında ölçülmüştür (Şekil 4.44.).

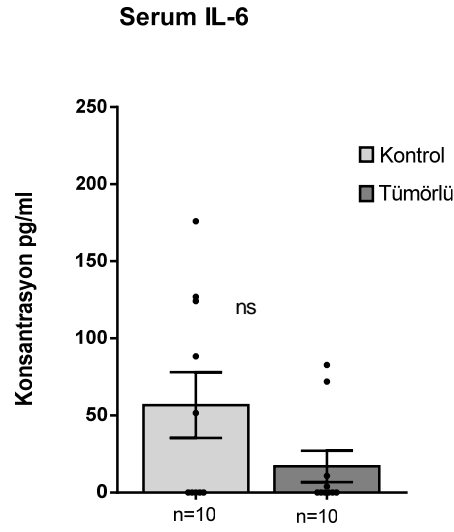
Serum IL-6 düzeyleri karşılaştırılan 10'ar adet kontrol ve tümörlü hayvanda da ortalama IL-6 konsantrasyonları bazal 50-100pg/ml düzeylerindedir. Kontrol grubundaki 3 hayvanda 200pg/ml'ye yaklaşan artışlar görülse de bu durum iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yaratmamıştır (Şekil 4.45.).

IL-6



Şekil 4.44. Tümörlü hayvan myeloid hücre ko-kültürlerinin IL-6 seviyeleri.

96 saat CIR-SPL ile kültüre edilen myeloid hücrelerin kültür süpernatanlarındaki IL-6 konsantrasyonları gösterilmektedir. **A)** Nötrofiller, **B)** HIS48+ monositler, **C)** HIS48- monositlerin farklı dokulardan izole edilmiş gruplarını göstermektedir. Süpernatanlar 3 bağımsız deneyden elde edilmiş ve eşit miktarlarda bir havuzda toplanmışlardır. Barlar duplike kuyuların ortalama sonuçlarını göstermektedir.



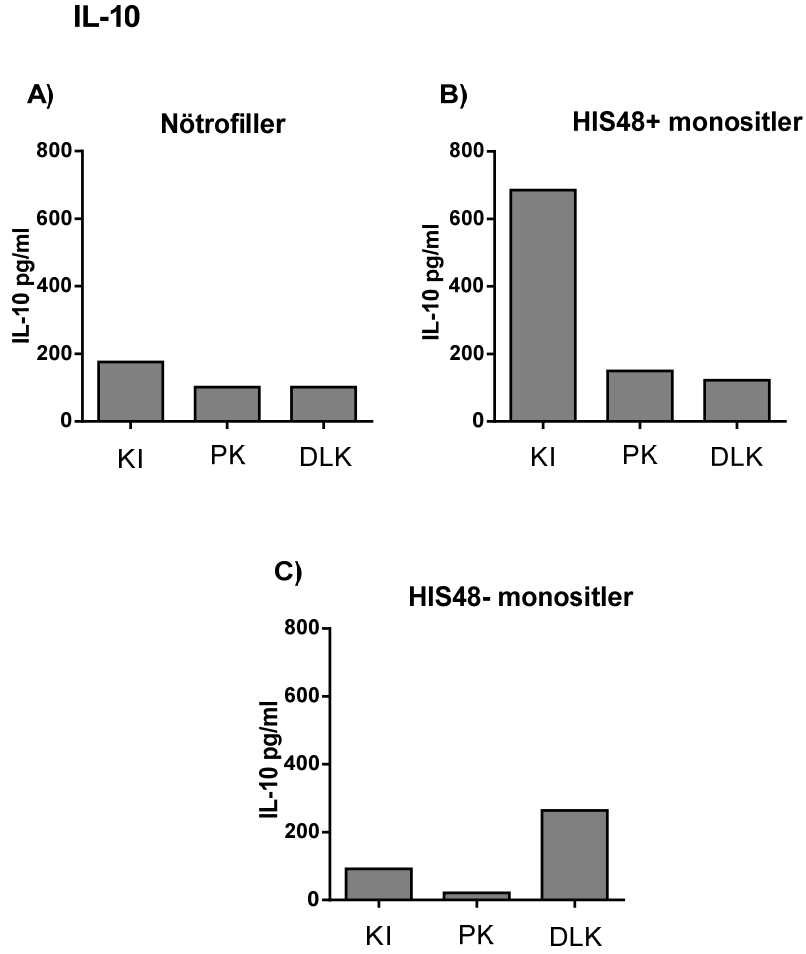
Şekil 4.45. Sağlıklı ve tümörlü hayvan serumlarının IL-6 seviyeleri.

Tümörlü ve kontrol hayvanların serumlarındaki IL-6 konsantrasyonları gösterilmiştir. n.s: istatistiksel anlamlılık olmadığını gösterir.

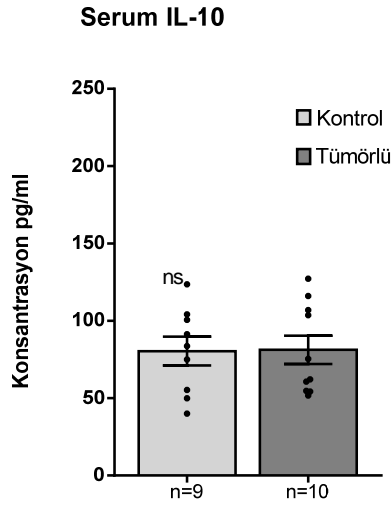
IL-10

IL-10 seviyeleri içinde IL-6 üretimine benzer sonuçlardan bahsedilebilir. HIS48+ kemik iliği monositleri 0,75µg/ml ile 0,3µg/ml IL-10 konsantrasyonlarındaki HIS48- dalak monosit kültürlerinden 2 kat fazla IL-10 sentezine neden olmuş görünmektedirler (Şekil 4.46.). IL-6 ve IL-10 için tüm diğer doku ve gruplarda bazal seviyelerde üretim gözlenmiştir. Dalak, kemik iliği ve periferik kandan izole edilmiş olan nötrofiller ile kan ve dalaktan izole edilmiş HIS48+ monositler ile kemik iliği ve kandan izole edilmiş HIS48- monositlerin IL-10 üretimleri bazal olarak 50-100 pg/ml seviyelerinde tespit edilmiştir (Şekil 4.46.).

Ayrıca, 9 kontrol ve 10 tümörlü hayvan serum örneklerinde de 100 pg/ml civarında IL-10 tespit edilmiş olup iki grup arası ortalamalar ve dağılım hemen hemen aynıdır (Şekil 4.47.).



Şekil 4.46. Tümörlü hayvan myeloid hücre ko-kültürlerinin IL-10 seviyeleri. 96 saat CIR-SPL ile kültüre edilen myeloid hücrelerin kültür süpernatanlarındaki IL-10 konsantrasyonları gösterilmektedir. **A)** Nötrofiller, **B)** HIS48+ monositler, **C)** HIS48- monositlerin farklı dokulardan izole edilmiş gruplarını göstermektedir. Süpernatanlar 3 bağımsız deneyden elde edilmiş ve eşit miktarlarda bir havuzda toplanmışlardır. Barlar duplike kuyuların ortalama sonuçlarını göstermektedir.



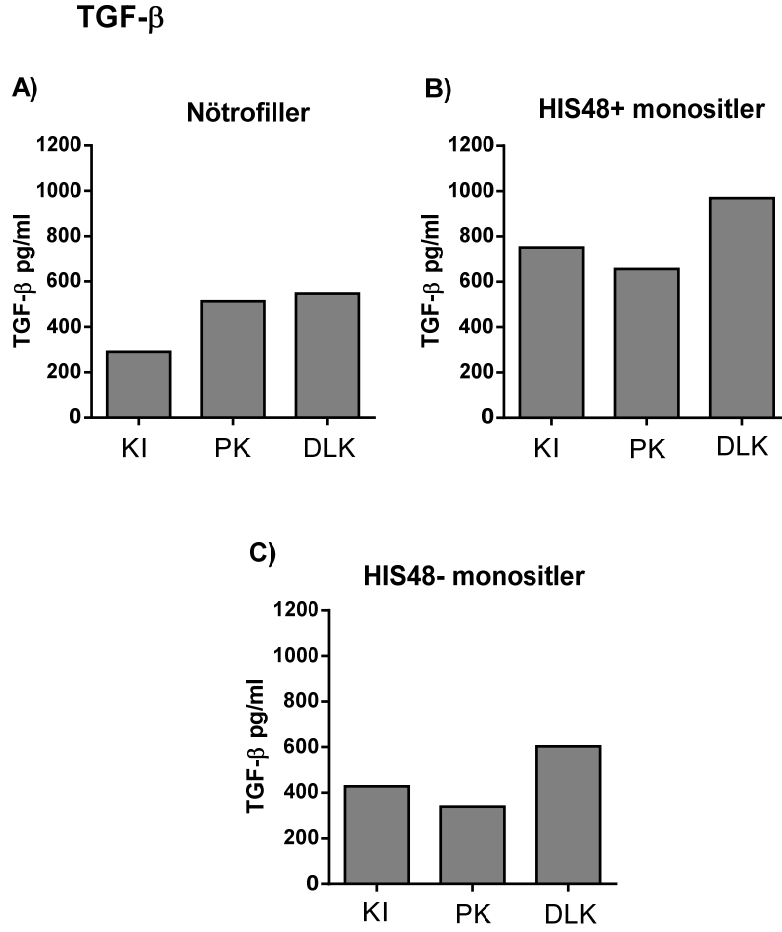
Şekil 4.47. Sağlıklı ve tümörlü hayvan serumlarının IL-10 seviyeleri.

Tümörlü ve kontrol hayvanların serumlarındaki IL-10 konsantrasyonları gösterilmiştir. n.s: istatistiksel anlamlılık olmadığını gösterir.

TGF- β

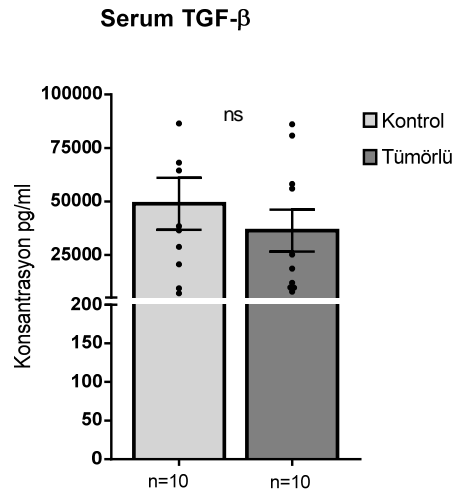
TGF- β üretiminde ise farklı bir dağılım söz konusudur. Tüm HIS48+ monosit kültürleri 0,6 μ g/ml üstündeki konsantrasyonlar ile diğer hücre gruplarından daha çok TGF- β üretimine katkı yapmaktadırlar (Şekil 4.48.). En yüksek TGF- β seviyesi ise 1 μ g/ml civarındaki dalak HIS48+ monosit kültürlerinden elde edilmiştir. Bu duruma paralel olarak dalaktan izole edilen nötrofil ve HIS48- monositler de kan ve kemik iliğindeki eşleniklerinden daha yüksek TGF- β üretimlerine yol açmışlardır (Şekil 4.48.).

Serum örneklerinde en yüksek konsantrasyonlarda bulunan sitokini yaklaşık 50 μ g/ml düzeyleri ile TGF- β oluşturmaktadır. Ancak beklenildiğinin aksine tümörlü hayvan serumlarındaki TGF- β düzeyleri kontrol hayvanlardan istatistiksel olarak anlamlı farklılık içermemektedir. (Şekil 4.49.).



Şekil 4.48. Tümörlü hayvan myeloid hücre ko-kültürlerinin TGF- β seviyeleri.

96 saat CIR-SPL ile kültüre edilen myeloid hücrelerin kültür TGF- β konsantrasyonları gösterilmektedir. **A)** Nötrofiller, **B)** HIS48+ monositler, **C)** HIS48- monositlerin farklı dokulardan izole edilmiş gruplarını göstermektedir. Süpernatantlar 3 bağımsız deneyden elde edilmiş ve eşit miktarlarda bir havuzda toplanmışlardır. Barlar duplike kuyuların ortalama sonuçlarını göstermektedir.



Şekil 4.49. Sağlıklı ve tümörlü hayvan serumlarının TGF- β seviyeleri.

Tümörlü ve kontrol hayvanların serumlarındaki TGF- β konsantrasyonları gösterilmiştir. n.s: istatistiksel anlamlılık olmadığını gösterir.

Serum Sitokin Düzeyi Korelasyonları

Serum sitokin düzeylerinin birbirleri ile korelasyon içerisinde olduğu tespit edilmiştir. Özellikle TNF- α , IL-6 ve TGF- β arasında güçlü ilişkiler bulunurken, IL-10 ile TNF- α ve TGF- β arasında orta güçte bir ilişki söz konusudur (Tablo 4.3.).

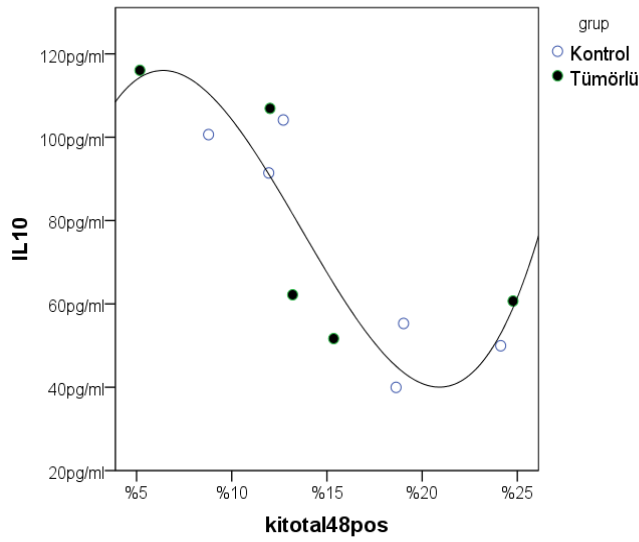
Tablo 4.3. Serum sitokin seviyesi korelasyonları.

¹ Sağlıklı kontrolleri de içeren hesaplamalar, ² Sadece tümörlü hayvanlarda yapılan hesaplamalar.

	IL-6	IL-10	TGF- β
KI HIS48+ monosit		¹ r= -0,795 p=0,003 n=11	
TNF-α	¹ r= 0,793 p=0,000 n=15 ² r= 0,981 p=0,000 n=10	¹ r= 0,581 p=0,029 n=14	¹ r= 0,839 p=0,000 n=14 ² r= 0,794 p=0,006 n=10
IL-6			¹ r= 0,762 p=0,001 n=16 ² r= 0,837 p=0,003 n=10
IL10			¹ r= 0,554 p=0,026 n=16

Ayrıca serum sitokin seviyelerinin dokulardaki hücre grupları ile ilişkisi istatistiksel olarak incelenmiştir. Elde edilen korelasyon sonuçlarına göre yalnızca kemik iliği HIS48⁺ hücre oranları ile IL-10 arasında anlamlı ve güçlü bir ilişki bulunmuştur. İlginç olarak ters yönde bulunan bu güçlü ilişkide yer alan kemik iliği HIS48⁺ hücre grubu ko-kültürlerde en yüksek IL-10 düzeylerini sergilemektedir (Tablo 4.3.).

Çelişkili görülen bu durum daha detaylı regresyon analizleri ile açıklığa kavuşturulmuştur. Buna göre sigmoid bir eğri denklemi uygun bulunan ilişkide monosit oranları %20 üzerine çıktığında IL-10 seviyeleri de artışa geçmektedir.



Şekil 4.50. Serum IL-10 konsantrasyonu ile HIS48⁺ monosit ilişkisi.

Tümörlü ve kontrol hayvanların kemik iliği HIS48⁺ monositleri ile serum IL-10 konsantrasyonları dağılımı gösterilmiştir. Eğri, iki değer arasındaki kübik regresyon denklemi belirtmektedir.

5. TARTIŞMA

5.1. NMU Aracılı Meme Kanseri Modeli ve Myeloid Hücreler

N-nitroso bileşikleri metabolik olarak çeşitli alkilleyici ajanlara dönüştürüldükten sonra DNA üzerinde etkili olmaktadır (164). Intraperitoneal yol ile NMU uygulanmasından sonra çeşitli dokulardaki alkilleyici ajanların oluşumu ve ortadan kalkışı 50 saate kadar sürebilir ve bu süre sonunda DNA'daki metillenmiş pürin oranları en yüksek seviyelerine çıkar (165). DNA'daki metillenme hasarı metilguaninmetiltransferaz (MGMT) enzimi aracılığıyla tamir edilebilmektedir. Bu nedenle MGMT aktivitesinin düşük olduğu puberte öncesi immatür meme epitel ve böbrek hücreleri yüksek MGMT aktivitesi taşıyan matür eşleniklerinden daha fazla kanser gelişimi gösterirler (166). Ek olarak, peritoneal yol ile NMU enjeksiyonunun kemik iliğindeki hücrelere de etkisi olduğu gösterilmiştir ve fare ve sıçanlarda lökopeni, immün cevaplarda azalma ve graft toleransına yol açmaktadır (167-169). Bu nedenle periferik kan, uyguladığımız NMU enjeksiyonlarının myeloid hücrelerde farklı zamanlarda oluşturabileceği DNA hasarlarını incelemek için uygun bir dokudur (163). Comet analizi sonuçları da son NMU enjeksiyonlardan 24 saat sonra işaret ettiği yüksek DNA fragmantasyonu ile periferik kandaki NMU etkisini göstermiştir. Sonuçlara göre 1 ay sonra lökositlerin DNA hasarı düzeyleri hiç enjeksiyon yapılmamış kontrol hayvanların seviyelerine gerilemiştir. NMU'nun vücuttaki etkinliği en fazla 50 saat olduğundan ve sıçan myeloid hücreleri normal şartlarda dolaşımında maksimum 6 gün kaldıklarından bu sonucun nedeni kemik iliğindeki DNA hasarının zaman içerisinde onarılması ya da lökopeni bulgularının da gösterdiği gibi hasarlı hücrelerin ortadan kaldırılması olabilir (167,170). Ancak sonradan bahsedileceği gibi, yapılan hücresel dağılım analizlerimizde bir lökopeniden ziyade myeloid seride artış göze çarpmaktadır. Bu da uygulamanın hemen ardından lökopeni olmuş olsa bile NMU enjeksiyonundan en az 42 gün sonra bu durumun ortadan kalktığını göstermektedir. NMU aracılı sıçan meme kanserleri, duktal köken, histopatoloji, agresiflik ve metastaz kapasitesi ile östrojen bağımlılığı ve total gen ekspresyon profilleri ile östrojen reseptörü pozitif insan meme kanserlerine çok büyük benzerlik göstermektedir (144-147). Bu nedenle

çalışmamızda tespit edilmiş olan hücre grupları arasındaki değişimlerin insan meme kanserlerinde de benzer profiller sergilemesi beklenmektedir.

Daha önce meme kanseri hastalarında yapılan MDSC analizleri oldukça sınırlı sayıdadır. Bu çalışmalarda granülosit ya da monositik alt-tipleri belirtilmemiş olsa da immatür myeloid hücrelerin sayılarında artış olduğu ve bu hücrelerin T hücre yanıtlarını baskılama kapasitesinde oldukları gösterilmiştir (104,171). Ek olarak, evre I/II meme kanserlerinde periferik kanda %1,96 olan MDSC oranları evre III ve IV'de sırasıyla %2,46 ve %3,77'ye çıkmış, birçok organ sisteminin dahil olduğu evre IV hastalarda ise 4,37 olarak bulunmuştur. İlginç bir şekilde bazı evre IV hastalarda %25 üzerinde MDSC oranları tespit edilmiştir (171). Meme kanserlerinde MDSC oranlarının prognostik değer taşıdığı ve doxorubicin + siklofosfamid terapisi ile MDSC seviyelerinin artışı da bulgular arasındadır (172). İnsandaki meme kanserine benzerliği bahsedilmiş olan NMU- aracılı sıçan meme kanseri modelinde de myeloid hücrelerin birikimleri beklenmektedir.

5.2. Kanserde Myeloid Hücrelerin Değişimleri

5.2.1. Sıçan Nötrofilleri

Çalışmamızda meme tümörü taşıyan hayvanların periferik dolaşım ve dalaklarında 10 kata kadar varan nötrofil artışları tespit edilmiştir. Bu, 4T1 fare modelinde de görülen granülositik MDSC birikimleri ile NMU aracılı sıçan meme tümörü modelinde daha önce tespit edilen nötrofil birikimleri ile uyumlu bir veridir (150,173). Ancak tümörlü sıçanlardaki nötrofil oranları yüksek varyasyon göstermektedir. Bu durum, tümör boyutları ile korele olmasa da meme kanseri hastalarındaki gibi farklı organ tutulumları veya evreler ile bağıntılı olabilir (171).

Periferik kan ve dalakta artan nötrofil oranları ise tümörlü sıçanlarda da farelerdeki gibi artan hematopoez kaynaklı olmalıdır (71). Ancak, tümörlü hayvan kemik iliği nötrofil oranlarında kontrol hayvanlardan farklı bir durum gözlenmemiştir. Bunun nedeni yeni gelişen immatür nötrofillerin tümör kaynaklı kemotaktik gradiente uygun şekilde hızla dolaşıma geçişleri olabilir. Bu teoriyi destekler şekilde, kemik iliği nötrofil oranlarındaki küçük değişiklikler periferik kan nötrofillerinde daha büyük ölçekteki değişimlere neden olmaktadır. Benzer olarak

tümörlü hayvanların periferik kan ve dalak nötrofil oranları da birbirleri ile korele görünmektedirler. Bu durum da dalaktaki nötrofillerin periferik kandan göçtükleri sonucuna varmamıza neden olmuştur. Ancak bir grup tümörlü hayvanın dalak nötrofil seviyeleri periferik kan nötrofilleri ile uyumsuzdur ve bu hayvanlardaki dalak nötrofillerinin bir kısmının kandan göç etmediği şeklinde yorumlanabilir.

Özetle, farklı tümörlü hayvanların nötrofil oranlarında gösterdikleri yüksek varyasyona rağmen aynı hayvanlardaki nötrofil dağılımlarının farklı dokular arasında bağıntılı oluşu 4T1 fare çalışmasının da işaret ettiği tümörün karakterine göre salınan faktörlere bağlı olabilir (173).

5.2.2. Sıçan Monositleri

CD43⁺ fare ve sıçan monositleri ile CD16⁺ insan monositleri klasik dışı monositler olarak tanımlanmışlardır. Öte yandan, CD43^{low} monositler daha büyük morfolojide ve CCR2/7⁺ olup inflame dokulara göç etme kabiliyetindedir. İnflamatuar ya da klasik monositler olarak adlandırılan sıçan CD43^{low} monositleri ayrıca bir diğer granülosit belirteci olan Rp-3 pozitifliği de taşımaktadırlar (155-157). HIS48, Rp-1 ve Rp3 antikörlerinin tanıdıkları epitoplara hakkında henüz bilgi bulunmamasına karşın Rp-3 antikoru ile HIS48 antikörünün %99,4 oranında aynı hücrelere bağlandıkları gösterilmiştir (153). Bu nedenle, çalışmamızda HIS48 pozitifliğine göre tanımlanan iki farklı monosit grubu daha önce CD43 ve Rp-3 ile tanımlanan gruplara karşılık geliyor olabilir. Dahası, burada HIS48'e göre gruplandırılan monositlerin FSC ve SSC özellikleri de CD43'e göre ayrılmış olan grupların özellikleri ile örtüşmektedir. Özetlemek gerekirse, bu çalışmada HIS48⁺ ve HIS48⁻ olarak tanımlanan monosit grupları literatürdeki sırasıyla klasik veya inflamatuar monositler ile klasik dışı monositleri tanımlamaktadır (155) (Tablo 5.1.).

Yapılan 3 farklı analiz de kemik iliğindeki HIS48⁻ monositlerin arttığı yönünde sonuç verdiği için kemik iliğindeki yegane değişimin HIS48⁻ monosit artışı olduğu söylenebilir. Periferik kan ve dalakta ise tüm myeloid hücreler içinde hesaplama yapıldığında, nötrofillerin birikimine bağlı olarak iki monosit alt-tipinde de azalma gözlenmektedir. Bu nedenle kan ve dalak monositleri analizlerinde tüm myeloid hücreler içinden yapılan hesaplamalar dikkate alınmamıştır. Bunun yerine monositlerin alt-grupları arasındaki yüzde hesapları incelendiğinde iki monosit grubu

arasındaki dengenin değişmediği, kan ve dalaktan izole edilebilen toplam monosit sayıları dikkate alındığında ise iki monosit grubunda da artışa işaret eden sonuçlar olduğu gözlenmiştir.

Tüm monositler kemik iliğindeki makrofaj/dendritik hücre progenitörlerinden köken alırlar ancak dalakta her iki monosit grubunun oluşturduğu bir depo söz konusudur. Bu depodaki hücreler bir yaralanma anında hızla dalaktan çıkarak dolaşım ile inflamasyon bölgesine göç etmektedirler (174,175). Uyumlu bir şekilde, çalışmamızdaki tümörlü hayvan serum sitokin seviyelerinde ve dalak monositlerinde kontrol hayvanlardan farklılık olmayışı bu hayvanlarda sistemik bir inflamatuvar yanıt eksikliğine işaret etmektedir. Kanserde monositik MDSC'lerin birikimleri ise PMN-MDSC'lerde görülenden çok daha düşük oranlardadır ve 4T1 modelinde de gösterilen hematopoezdeki bir artıştan köken alıyor olabilirler (71,176). Çalışmamızda kemik iliğinde HIS48⁺ monositlerde bir artış tespit edilmemiştir bunun nedeni nötrofiller gibi monositlerin de tümörün etkisiyle hızla dolaşıma katılması olabilir. Ancak dolaşımdaki HIS48⁺ ve HIS48⁻ monositlerde görülen düşük seviyeli birikim hematopoezdeki artış nedeni olabilir. Şaşırtıcı olarak, inflamatuvar bir durumun yokluğunda dolaşımdaki inflamatuvar monositlerin kemik iliğine döndükleri, burada klasik dışı gruba farklılaşp 3 gün içerisinde tekrar dolaşıma katıldıkları bildirilmiştir (157,177,178). Buna göre tümörlü sıçanlarda da artmış HIS48⁺ monositlerin kemik iliğine döneceği, HIS48⁻ monositlere farklılaşp günler sonra dolaşıma katılacağı düşünülebilir. Bu teori, bizim tespit ettiğimiz HIS48⁻ monositlerin neden diğer hücrelerden farklı olarak kemik iliğinde de kısmi artış gösterdiğini açıklamaktadır. Ayrıca HIS48⁻ monositler MDSC'lerin tümöre kemotaksisinde önemli rol oynayan CCR2 barındırmadıklarından kemik iliğinden çıkışları daha da geç gerçekleşiyor olabilir (89).

Tümörlü hayvanlarda monositlerin MHCII ekspresyon durumları değişim sergilemiştir. Kan ve splenik HIS48⁺ monositlerin MHC II pozitiflik oranları ciddi bir şekilde düşüş göstermektedir. Bu durum monositik MDSC'lerin karakteristik bir özelliğidir ve MDSC'lerin bir diğer karakteristik özelliği olan ve immatür myeloid hücreler olarak adlandırılmalarında nedeni olan immatürlüğe işaret etmektedir (123). Immatür hücreler tümör bölgelerine göç ederek baskılayıcı özellikteki tümör ilişkili makrofajlara (TAM) dönüşmektedirler (108).

Tümörlü hayvanların farklı dokularındaki farklı myeloid hücre alt-grupları arasındaki ilişkiler incelendiğinde ise nötrofil birikimleri ile ilişkili olarak sadece HIS48⁺ monosit oranlarının değişimi görülmüştür. Güçlü olarak tanımlanabilecek bu korelasyonlardan biri dalaktaki HIS48⁺ monosit birikimi ile periferik kandaki nötrofil birikimi arasında, biri de periferik kandaki MHC II negatif HIS48⁺ monosit oranları ile dalaktaki nötrofil birikimi arasındadır. HIS48⁺ monosit artışına bu hücrelerin MHC sınıf II pozitifliğindeki düşüş eklenince biriken hücrelerin MHC II negatif immatür monositler ya da monositik MDSC'ler olması muhtemeldir. HIS48⁺ monositler ile nötrofiller birikimi arasında korelasyonlar tespit edilmesi, ayrıca bir grup tümörlü hayvanda dalaktaki nötrofil birikimlerinin periferik kandaki nötrofil birikiminden yoksun olarak bulunması, artan nötrofillerin yalnızca hematopezdeki artıştan kaynaklanmayacağını düşündürmektedir. Bu durumu açıklayabilecek mekanizmalar literatürde mevcuttur ve yüksek proliferasyon kapasitesine sahip olan MHC II negatif monositik MDSC'lerin kanda ve dalakta PMN-MDSC'lere farklılaşarak granülositik birikimden kısmen sorumlu olduğunu göstermektedir (143).

Tümörlü hayvanlardaki myeloid hücre dağılımlarının kontrol hayvanlardan farklarını kısaca özetlemek gerekirse; nötrofiller kan ve dalakta ciddi birikimler oluşturmakta, yine kan ve dalakta HIS48⁺ monositler düşük seviyelerde artış gösterirken benzer seviyelerdeki birikimler HIS48⁻ monositler tarafından kemik iliği ve kanda gösterilmektedir.

5.3. Sıçan MDSC'leri

Bu modelde MDSC'lerin varlığı daha önce gösterilmemiş olmasına rağmen bir kaç araştırma çalışmamıza ipucu sağlamaktadır. Bunlardan ilki meme tümörlü sıçan dolaşımında raporlanan nötrofil birikimidir ancak anti-tümör inflamatuvar yanıtlardan kaynaklandığı düşünülmüştür (150). Yine bölümümüzde daha önce yapılan bir çalışmada tümörlü hayvanların dalak ve neoplastik hücrelerinde yüksek TGF- β sentezine eşlik eden regülatuar T hücre birikimi ve immün kompartmanlarda özgül olmayan uyarımlara karşı T hücre proliferasyonundaki düşüş örnek gösterilebilir (151). Bu durum MDSC'lerin antijene özgül olmayan baskılama mekanizmalarını akla getirmekte ve bu hayvanlardaki immün cevapsızlıktan olası

MDSC birikimi ile MDSC'ler tarafından sentezlenen TGF- β ve IL-10'un sorumlu olabileceğini düşündürmektedir (127)

Sıçan MDSC'leri daha önce CD11b/c⁺ ve HIS48⁺ hücreler olarak tanımlanmışlardır (152). Ancak, bir sıçan granülosit belirteci olarak bilinen HIS48 antikorunun aynı zamanda monosit ve makrofajlara da bağlandığı gösterilmiştir (154). Bu çalışmada, sıçan nötrofillerini özgün olarak tanıyan RP-1 antikorunu kullanarak nötrofillerin ve dolayısıyla polimorfonükleer (PMN)-MDSC'lerin ayırd edilmesinde kullanılan bir immün fenotiplendirme stratejisi geliştirilmiştir (157,179) (Tablo 5.1.).

Çalışmamızda tümörlü hayvanlarda birikimleri gösterilen nötrofillerin aynı zamanda T hücre proliferasyonunu baskılama kapasitesine de sahip oldukları doğrulanmıştır. Böylece ilk defa Rp-1 antikorunu ile sıçan PMN-MDSC alt grubu tanımlanmıştır.

Tablo 5.1. Fare, insan ve sıçan monosit ve MDSC alt-tipleri fenotipleri.

Kalın yazılar bu çalışmadan elde edilen sonuçları göstermektedir. Sıçanların klasik ve klasik dışı monositleri sırasıyla HIS48⁺ ve HIS48⁻ olarak tanımlanmıştır. Her iki sıçan monosit grubu da Rp-1 negatiftir. Sıçan nötrofilleri ile PMN-MDSC'leri hem Rp-1 hem de HIS48 pozitiflerdir. (155-157)

Özellik	Klasik monositler	Klasik dışı monositler	PMN MDSC'ler	Monositik MDSC'ler	Taşıyıcı Organizma
FSC/SSC	Hi	Low	Hi	?	Fare/İnsan/Sıçan
CD43	Low	Hi	Low	?	Fare/Sıçan
Ly6C	Hi	Low	Low	Hi	Fare
CD16	Low	Hi	Low	?	İnsan
CCR2	Hi	Low	Low (Sıçan?)	Hi (Sıçan?)	Fare/İnsan/Sıçan
RP-3	Hi	Low	?	?	Sıçan
HIS48	+	-	+	+?	Sıçan
RP-1	-	-	+	-	Sıçan

5.3.1.Sıçan MDSC'lerinin Baskılama Mekanizmaları

Antijen Alımı ve Sunumu

Hem tümörlü hem de kontrol sıçan monosit alt-grupları arasında önemli işlevsel farklılıklar mevcuttur. Örneğin, dalaktaki HIS48⁺ monositler en yüksek MHC sınıf II pozitifliği taşıyan gruptur kandaki eşlenikleri ise en yüksek fagositoz kabiliyetindeki hücreleri oluştururlar bu nedenle antijeni işleyip sunma beklentisi en yüksek olan monositlerdir. Ancak her iki dokuda bulunan HIS48⁺ monositler de HIS48⁻ monositler kadar proliferasyonu indükleyememişlerdir. Kemik iliğinde bulunan ve çok daha düşük MHC II ekspresyonu olan eşlenikleri ise proliferasyondan ziyade yüksek pro-inflamatuar sitokin salınımına neden olmuşlardır. Öte yandan özellikle kemik iliğindeki HIS48⁻ monositler düşük oranlarda fagositoza katılsalar bile hem yüksek MHC II pozitifliği hem de en yüksek CD80 taşıyıcısıdır. Ancak buna rağmen çok düşük MHC II ve CD80 ekspresyonu gösteren periferik kan ve dalaktaki eşleniklerinden daha az proliferasyona ve inflammatuar sitokin salınımına yol açmışlardır. Polimorfonükleer MDSC'lerin daha düşük fagositoz kabiliyeti taşıdıkları bilinmesine rağmen tümörlü ve kontrol sıçan nötrofilleri ve monositlerinin fagositoz işlevleri arasında anlamlı farklılık yoktur (72). Genel olarak tüm hücre gruplarına bakıldığında tümörden ve dokudan bağımsız olarak tüm HIS48⁺ monositlerin proliferasyonu önemli ölçüde engellediği buna karşın HIS48⁻ hücrelerin proliferasyonu çok fazla etkilemediği görülmüştür. Buradan, farklı dokularda ve tümörlü hayvanlarda farklılık sergileyen MHC II veya CD80 ekspresyonu ile fagositoz etkinliğinin proliferasyonun baskılanması açısından büyük role sahip olmadığı sonucu çıkarılabilir.

ROS ve NO Üretimi

Genel olarak tüm hücre gruplarının ROS ve nitrik oksit üretimleri ile proliferasyon etkinlikleri karşılaştırıldığında bir örtüşme görülmektedir. Buradan ROS ve NO üretimlerinin proliferasyon için belirleyici olduğu yargısına varılmıştır. Böylece ROS üretimleri en az nötrofiller kadar yüksek olan ve en yüksek nitrik oksit üreticisi alt-grubu oluşturan HIS48⁺ monositlerin, köken aldıkları doku, MHC II ekspresyonu ve fagositoz kapasiteleri ile tümörden bağımsız yüksek baskılayıcılığı

anlaşılmaktadır. Kontrol grubundaki monositlerinin daha çok proliferasyonu uyarması beklenirken bu grupta tespit edilen baskılayıcılık şaşırtıcı olmuştur. Benzer bir durum sağlıklı bireylerden izole edilen CD14+ monositler ile yapılan T hücre ko-kültürlerinde rapor edilmiştir. Treg hücrelerin bu kültürlerden çıkarıldığı durumlarda dahi önemli seviyelerde proliferatif baskılamının olduğu bildirilmiştir (180). Sağlıklı bireylerin monosit kültürlerinde görülen bu baskılamının makrofaj polarizasyonu dahilinde tolerojenik bir yanıt olduğu kabul edilmiştir (181). Bu nedenle monositler arasında MDSC karakterini tespit etmek güçleşmiştir.

Bu çalışmada bir nötrofil belirteci eksprese eden granülositler ise kontrol ve tümörlü hayvanlarda proliferasyon oranlarını yarıya yakın düşürmüşler ve granülositik MDSC oldukları kesinleşmiştir. Granülositlerin yüksek ROS üretimi potansiyeline sahip olup NO- üretiminde aktif rol almadıkları bilinen bir husustur (128). Bu çalışmada da nötrofillerin yüksek ROS üretimine sahip oldukları gösterilmiştir. Ek olarak nötrofillerin nitrik oksit üretimleri de bazal seviyelerde olmuştur. Özellikle tümörlü hayvan dalak nötrofilleri çok yüksek nitrik oksit üreticisi olmamalarına rağmen HIS48+ monositlere denk bir baskılama sergileyebilmektedir. Bunun nedeni en oksitleyici ajan olan ve MDSC aracılı baskılamada başrol üstlendiği bilinen peroksi nitrit (PNT) oluşumunda sınırlayıcı bileşenin H₂O₂ olmasıdır (121). Bazal seviyelerdeki nitrik oksit baskılama için yeterli PNT oluşumuna izin vermektedir. Ancak periferik kan nötrofillerinin benzer ROS üretimlerine karşın dalaktaki eşleniklerinden daha fazla proliferasyona izin vermiş olmaları nitrik oksit düzeylerinin de etkisinin olduğunu göstermektedir. Bu nedenle ikincil de olsa ROS ile birlikte yüksek NO seviyeleri de PNT üretimine katkıda bulunarak ve böylece baskılayıcılığı arttırmaktadır. Kontrol hayvanların kan ve dalak nötrofilleri ile karşılaştırıldıklarında ise tümörlü hayvan nötrofillerinin ROS ve NO sentezleri arasında büyük farklar bulunmaması bu bileşiklerin tek başlarına baskılayıcılıktaki rollerinin yeterli olup olmadığının sorgulanmasına neden olmaktadır.

Sitokin Sentezleri

İnsan CD16^{low} ve fare CD43^{low} klasik monositleri dolaşımdan tümör bölgesine geçerek makrofajlara farklılaşırlar ve tümör mikroçevresinin en önemli bileşenleri olan tümör ilişkili makrofajları (TAM)'ları oluştururlar (182). Tümör

ortamında bulunan TGF- β , IL-10 ve IL-6 da klasik monositlerin TAM'lara dönüşümünün M2 tipinde olmasını sağlarlar. Öte yandan tümör mikroçevresine göç eden klasik dışı monositler makrofajlara dönüşmeden kalarak anjiyogenezde rol alırlar (182). Bölümümüzde daha önce yapılan çalışmalarda tümör dokusunda tüm bu sitokinlerin eksprese olduğu gösterilmiştir (151,183). Aktive makrofajlardaki IL-10 ekspresyonu TNF- α ile birlikte artmakta, TGF- β üretimi ise aktivasyonun ilerleyen aşamalarında başlamaktadır. Bu durum TGF- β 'nin inflamasyonun sonlandırılmasındaki rolünü vurgular (184). Bu nedenle kemik iliği HIS48⁺ ve dalak HIS48⁻ monositleri ile yapılan 96 saatlik ko-kültürlerde gördüğümüz TNF- α , IL-6, IL-10 ve TGF- β nın birlikte üretiminin baskılayıcı bir fenotipi işaret etme olasılığı düşüktür. Genel olarak ko-kültürlerdeki pro-inflamatuvar sitokin üretimleri değerlendirildiğinde sadece bu iki monosit grubunun inflamatuvar bir yanıt oluşturduğu görülmektedir. Kemik iliği HIS48⁺ ve dalak HIS48⁻ monositlerini diğer eşleniklerinden ayıran tek özellikleri, tümörlü hayvanlarda ya çok az ya da hiç birikim göstermemiş olmalarıdır. Bir diğer deyişle hücre oranlarında değişim görünmeyen bu monosit popülasyonlarının MDSC barındırma olasılıkları azdır ve durum ko-kültürlerde görülen pro-inflamatuvar yanıtları açıklayabilir.

Öte yandan dalaktaki HIS48⁺ monositler herhangi bir pro-inflamatuvar sitokin üretimi olmadan en yüksek seviyelerde TGF- β üretimine neden olmuşlardır. Proliferyasyonda değişim oluşturamadıkları için MDSC olarak adlandırılmasında zorluk çekilen bu hücre grubu, TGF- β aracılığıyla T hücrelerin reglaturar yönde bir farklılaşmasına yol açıyor olabilirler. Ayrıca MHC sınıf II ekspresyonlarının azlığı ve nötrofil birikimleri ile olan ilişkileri de eklendiğinde tümörlü hayvan dalağındaki HIS48⁺ monosit grubunun immatür baskılayıcı hücre içeriklerinin yüksek olduğu düşünülebilir. Ek olarak tümörlü hayvanların periferik kan ve dalak nötrofilleri de düşük seviyelerde TNF- α , IL-6 üretimi gösterirken ko-kültürlerinde kayda değer konsantrasyonlarda TGF- β üretimi ile karşılaşmıştır. Nötrofillerin sitokin sentezindeki bu durum ROS ve NO üretimlerine tamamlayıcı bir rol oynuyor olabilir. Bu bulgular, aynı zamanda bölümümüzde gerçekleştirilen bir önceki çalışmada belirtilen T-reg artışından immatür myeloid hücreler tarafından sentezlenen TGF- β ' nın sorumlu olabileceğini göstermektedir (151).

Daha önce de belirtildiği gibi bu araştırmada tümörlü hayvanların serumlarında incelenen hiç bir sitokin sağlıklı hayvan serum seviyelerinden farklılık arz etmemektedir. Ancak, hayvanların serum sitokin seviyeleri ile hücrel dağılımlar arasındaki korelasyonlar incelendiğinde IL-10 seviyeleri ile ilgili şaşırtıcı bir durum ile karşılaşmıştır. Ko-kültürlerde inflamatuvar cevapla birlikte en yüksek IL-10 seviyelerini gösteren kemik iliği HIS48⁺ monositlerinin kemik iliğindeki yüzdeleri ile serum IL-10 seviyeleri arasında güçlü bir korelasyon vardır. Öyle ki, IL10 düzeyleri, monosit oranları arttıkça düşüş sergilerken monosit oranı %20'nin üzerine çıktığında tekrar artış yönüne dönmektedir. Serum IL-10 konsantrasyonunun TNF- α ve TGF- β ile de ilişkisinin olması da kemik iliğindeki HIS48⁺ monosit oranlarının inflamatuvar durumdan etkilendiğini göstermektedir. Klasik monositlerin inflamasyon yokluğundaki kemik iliğine geri dönüşleri inflamatuvar belirteçlerin varlığında sekteye uğruyor olabilir ve bu %20'ye kadar olan azalmayı açıklarken hematopoez sonucunda kemik iliğinde %20 den fazla oranlarda çıkan HIS48⁺ hücrelerin IL-10 oranlarını arttırması MDSC karakteri taşımaya başladıklarına işaret ediyor olabilir (127). Her ne kadar monositlerin döngüsü çalışmamızın kapsamı dışında kalıyor olsa da bu etkinlikteki IL-10 katkısı daha ileri araştırmalara konu olabilir.

Daha önce farelerde 4 farklı meme kanseri hücre hattı ile yapılan çalışmalarda sadece 4T1 hücrelerinin anlamlı MDSC birikimine neden olduğu gösterilmiştir (173). Aynı zamanda tümör boyu ile MDSC birikimi arasında korelasyon görülen tek hücre hattı da 4T1 olmuştur (173). Aynı çalışmada MDSC akümüülasyonunun kanser hücrelerinden salınan GM-CSF, G-CSF ile VEGF-A aracılığıyla olduğu belirlenmiş ve böylece bu faktörleri yüksek biçimde üreten 4T1 hücre hattının neden MDSC birikimlerine daha çok etki ettiği açıklanmıştır (173). Bizim çalışmamız da modelin heterojen özelliği nedeniyle farklı immün yanıtların oluşabildiğinin iyi bir örneğini oluşturmaktadır (149,150). Zira kullandığımız heterojen modelde tanık olunan hayvanlar arası yüksek varyasyon hem MDSC birikiminde hem de MDSC karakterinde görülen değişimleri açıklayabilir. Öte yandan meme kanseri hastalarında evreler ve organ tutulumları ile MDSC oranlarının korele olmaları çalışmamızdaki nötrofil birikiminin tümör yükünden ziyade evreleri veya metastazları ile ilişkili olabileceği sonucunu doğrular (171). Bu bilgiler ışığında

dış-soy veya karsinojen uygulaması ile elde edilen modeller ile özgün olarak NMU aracılı meme tümörlerinin MDSC araştırmaları için zorlu modeller olduğu sonucuna varılabilir (149,150,185). Öte yandan benzer güçlüklerin kanser hastaları içinde geçerli olduğu varsayımı yadsınamaz. Bu açıdan, hayvanlar ile elde edilen yüksek varyasyonlar ve bu verilerin analizi klinik araştırmaların daha etkin yürütülebilmesi açısından bir temel arz edebilir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada özetle,

- 1- İlk defa Rp-1 belirteci ile sıçan MDSC'lerinin PMN alt-tipi tanımlanmıştır.
- 2- Sıçan MDSC'lerinin ROS ve NO üretiminin baskılamada ortaklaşa rol aldıkları gösterilmiştir.
- 3- Ayrıca ilk olarak HIS48 antikorunun sıçanların iki farklı monosit grubunu ayırt etmede kullanımı gösterilmiş olup bu iki monosit grubu, farklı işlevsel özelliklerine göre karşılaştırılmıştır. HIS48+ monositler; sıçan, fare ve insanlardaki inflamatuvar ya da klasik monositlere benzerlik gösterirken HIS48- monositler klasik dışı angiotensin reseptörü ifade eden monositlere karşılık geldiği düşünülmektedir.
- 4- Tümörlü hayvan HIS48+ monositlerinin MHC sınıf II pozitiflikleri dolaşım ve dalakta anlamlı düşüşler gösterirler.
- 5- HIS48- monositlerin yüksek MHCII pozitifliği gösteren kemik iliği ve dalak popülasyonlarında değişim olmamıştır.
- 6- HIS48+ monositler ayrıca yüksek ROS ve NO üretimlerine sahiptir.
- 7- HIS48- monositler her iki oksidatif radikal üretiminde geride kalmaktadır.
- 8- Son olarak HIS48+ monositlerin fagositoza katılma ve fagositoz kapasiteleri de HIS48- monositlerin iki misline yakındır.
- 9- Bu sonuçlar çerçevesinde sıçan HIS48+ monositleri ve özellikle de dalakta bulunanlar monositik MDSC olarak tanımlanmaya aday hücre grubunu oluşturmuştur.
- 10- Tümörlü hayvan dalak nötrofillerinin kan ve kemik iliğindeki eşleniklerinden daha yüksek baskılama potansiyeline sahip olmalarının nedeni daha yüksek ROS, NO ve TGF- β üretimleri ile daha az TNF- α sentezleri ile ilişkili olabilir.

Öneriler:

- 1- Tümörlerin erken gelişim aşamalarındaki myeloid hücre değişimleri uygun bir araştırma konusu teşkil edebilir. Küçük boyutlardaki tümörlere drene lenf nodlarındaki MDSC popülasyonları ve fonksiyonları incelenebilir.
- 2- Sıçan MDSC'lerinin baskılama potansiyelleri ve T hücreler üzerine etkileri ko-kültürlerdeki IFN- γ üretiminin belirlenebileceği ELISPOT benzeri analizler yardımı ile daha detaylı olarak incelenebilir.
- 3- 3- Sıçan meme kanseri eşliğinde gelişen MDSC'lerin aktivasyon yolları (JAK-STAT, NF κ B vb.) microarray, hücre içi antikor işaretlemeleri ya da Western blot yöntemleri ile tespit edilebilir.
- 4- Bu yolların bloklanmasını hedefleyen ilaç uygulamaları sınanabilir.
- 5- İnsan meme tümörlerinin de %75'lik kısmını oluşturan ER+ meme kanserlerini çok iyi örnekleyen NMU aracılı sıçan tümörlerinin MDSC'lerin gelişiminde etkili olan büyüme faktörü sentezleri incelenerek meme kanseri hastalarındaki durum ile karşılaştırılabilir.
- 6- Bu faktörleri hedefleyen tedavi stratejileri geliştirilebilir.
- 7- NMU aracılı meme kanseri modelinde meme dokusundaki stromanın epitel dokunun transformasyonunda belirleyici rolü vardır. NMU uygulanmış hayvanlardan erken dönemde izole edilecek yağ doku ve fibroblastların myeloid kökenli hücrelerin kemotaksisi ve aktivasyonlarına etkisi incelenebilir. Bu stromal hücrelerin sağlıklı hayvan kemik iliğinden izole edilmiş hücrelerde MDSC gelişimine olan etkileri araştırılabilir.

KAYNAKLAR

1. Levinson, D.A., Reid, R., Burt, A.D. (2008). *Muir's Textbook of Pathology: Hodder Arnold*.
2. Cheng, F., Gabrilovich, D., Sotomayor, E.M. (2004) Immune tolerance in breast cancer. *Breast Dis*, 20, 93-103.
3. Siegel, R., Naishadham, D., Jemal, A. (2012) Cancer statistics, 2012. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 62 (1), 10-29.
4. Romond, E.H., Perez, E.A., Bryant, J., Suman, V.J., Geyer, C.E., Davidson, N.E. ve diğerleri. (2005) Trastuzumab plus Adjuvant Chemotherapy for Operable HER2-Positive Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*, 353 (16), 1673-1684.
5. Desmedt, C., Haibe-Kains, B., Wirapati, P., Buyse, M., Larsimont, D., Bontempi, G. ve diğerleri. (2008) Biological processes associated with breast cancer clinical outcome depend on the molecular subtypes. *Clin Cancer Res*, 14 (16), 5158-5165.
6. Teschendorff, A.E., Miremadi, A., Pinder, S.E., Ellis, I.O., Caldas, C. (2007) An immune response gene expression module identifies a good prognosis subtype in estrogen receptor negative breast cancer. *Genome Biol*, 8 (8), R157.
7. Hanahan, D., Weinberg, R.A. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell*, 100 (1), 57-70.
8. Balkwill, F., Mantovani, A. (2001) Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet*, 357 (9255), 539-545.
9. Coussens, L.M., Werb, Z. (2002) Inflammation and cancer. *Nature*, 420 (6917), 860-867.
10. Paget, S. (1889) The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *The Lancet*, 133 (3421), 571-573.
11. Hart, I. (1982) 'Seed and soil' revisited: mechanisms of site-specific metastasis. *Cancer and Metastasis Reviews*, 1 (1), 5-16.
12. DeCosse, J.J., Gossens, C., Kuzma, J.F., Unsworth, B.R. (1975) Embryonic inductive tissues that cause histologic differentiation of murine mammary carcinoma in vitro. *J Natl Cancer Inst*, 54 (4), 913-922.
13. Tlsty, T.D. (2001) Stromal cells can contribute oncogenic signals. *Semin Cancer Biol*, 11 (2), 97-104.

- 14.Maffini, M.V., Soto, A.M., Calabro, J.M., Ucci, A.A.,Sonnenschein, C. (2004) The stroma as a crucial target in rat mammary gland carcinogenesis. *J Cell Sci*, 117 (Pt 8), 1495-1502.
- 15.Guc, D. (2005) *Tümör İmmünolojisi. XVIII. Ulusal İmmünoloji Kongresi Program ve Özet Kitabı*, 166-171.
- 16.Kalluri, R. (2003) Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer*, 3 (6), 422-433.
- 17.Andriani, F., Garfield, J., Fusenig, N.E.,Garlick, J.A. (2004) Basement membrane proteins promote progression of intraepithelial neoplasia in 3-dimensional models of human stratified epithelium. *Int J Cancer*, 108 (3), 348-357.
- 18.Roskelley, C.D.,Bissell, M.J. (2002) The dominance of the microenvironment in breast and ovarian cancer. *Semin Cancer Biol*, 12 (2), 97-104.
- 19.Stetler-Stevenson, W.G.,Yu, A.E. (2001) Proteases in invasion: matrix metalloproteinases. *Semin Cancer Biol*, 11 (2), 143-152.
- 20.Egeblad, M.,Werb, Z. (2002) New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer*, 2 (3), 161-174.
- 21.Mueller, M.M.,Fusenig, N.E. (2004) Friends or foes - bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nat Rev Cancer*, 4 (11), 839-849.
- 22.Kuperwasser, C., Chavarria, T., Wu, M., Magrane, G., Gray, J.W., Carey, L. ve diğerleri. (2004) Reconstruction of functionally normal and malignant human breast tissues in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101 (14), 4966-4971.
- 23.Bhowmick, N.A., Chytil, A., Plieth, D., Gorska, A.E., Dumont, N., Shappell, S. ve diğerleri. (2004) TGF-beta signaling in fibroblasts modulates the oncogenic potential of adjacent epithelia. *Science*, 303 (5659), 848-851.
- 24.Weeks, B.H., He, W., Olson, K.L.,Wang, X.J. (2001) Inducible expression of transforming growth factor beta1 in papillomas causes rapid metastasis. *Cancer Res*, 61 (20), 7435-7443.
- 25.Shao, Z.M., Nguyen, M.,Barsky, S.H. (2000) Human breast carcinoma desmoplasia is PDGF initiated. *Oncogene*, 19 (38), 4337-4345.
- 26.Lewis, M.P., Lygoe, K.A., Nystrom, M.L., Anderson, W.P., Speight, P.M., Marshall, J.F. ve diğerleri. (2004) Tumour-derived TGF-beta1 modulates

myofibroblast differentiation and promotes HGF/SF-dependent invasion of squamous carcinoma cells. *Br J Cancer*, 90 (4), 822-832.

27. Niethammer, P., Grabher, C., Look, A.T., Mitchison, T.J. (2009) A tissue-scale gradient of hydrogen peroxide mediates rapid wound detection in zebrafish. *Nature*, 459 (7249), 996-999.

28. Toullec, A., Gerald, D., Despouy, G., Bourachot, B., Cardon, M., Lefort, S. ve diğerleri. (2010) Oxidative stress promotes myofibroblast differentiation and tumour spreading. *EMBO Mol Med*, 2 (6), 211-230.

29. Waghray, M., Cui, Z., Horowitz, J.C., Subramanian, I.M., Martinez, F.J., Toews, G.B. ve diğerleri. (2005) Hydrogen peroxide is a diffusible paracrine signal for the induction of epithelial cell death by activated myofibroblasts. *FASEB J*, 19 (7), 854-856.

30. Lisanti, M.P., Martinez-Outschoorn, U.E., Lin, Z., Pavlides, S., Whitaker-Menezes, D., Pestell, R.G. ve diğerleri. (2011) Hydrogen peroxide fuels aging, inflammation, cancer metabolism and metastasis: the seed and soil also needs "fertilizer". *Cell Cycle*, 10 (15), 2440-2449.

31. Iyengar, P., Combs, T.P., Shah, S.J., Gouon-Evans, V., Pollard, J.W., Albanese, C. ve diğerleri. (2003) Adipocyte-secreted factors synergistically promote mammary tumorigenesis through induction of anti-apoptotic transcriptional programs and proto-oncogene stabilization. *Oncogene*, 22 (41), 6408-6423.

32. Ronnov-Jessen, L., Petersen, O.W., Kotliansky, V.E., Bissell, M.J. (1995) The origin of the myofibroblasts in breast cancer. Recapitulation of tumor environment in culture unravels diversity and implicates converted fibroblasts and recruited smooth muscle cells. *J Clin Invest*, 95 (2), 859-873.

33. Ishii, G., Sangai, T., Oda, T., Aoyagi, Y., Hasebe, T., Kanomata, N. ve diğerleri. (2003) Bone-marrow-derived myofibroblasts contribute to the cancer-induced stromal reaction. *Biochem Biophys Res Commun*, 309 (1), 232-240.

34. Goldmann, E. (1908) The Growth of Malignant Disease in Man and the Lower Animals, with special reference to the Vascular System. *Proc R Soc Med*, 1 (Surg Sect), 1-13.

35. Folkman, J. (2003) Fundamental concepts of the angiogenic process. *Curr Mol Med*, 3 (7), 643-651.

36. Bergers, G., Benjamin, L.E. (2003) Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer*, 3 (6), 401-410.
37. Skobe, M., Rockwell, P., Goldstein, N., Vosseler, S., Fusenig, N.E. (1997) Halting angiogenesis suppresses carcinoma cell invasion. *Nat Med*, 3 (11), 1222-1227.
38. Ehrlich, P. (1908). Über den jetzigen Stand der Karzinomforschung.
39. Dunn, G.P., Bruce, A.T., Ikeda, H., Old, L.J., Schreiber, R.D. (2002) Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol*, 3 (11), 991-998.
40. Naito, Y., Saito, K., Shiiba, K., Ohuchi, A., Saigenji, K., Nagura, H. ve diğerleri. (1998) CD8+ T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer. *Cancer Res*, 58 (16), 3491-3494.
41. Kim, R., Emi, M., Tanabe, K. (2007) Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology*, 121 (1), 1-14.
42. Birkeland, S.A., Storm, H.H., Lamm, L.U., Barlow, L., Blohme, I., Forsberg, B. ve diğerleri. (1995) Cancer risk after renal transplantation in the Nordic countries, 1964-1986. *Int J Cancer*, 60 (2), 183-189.
43. Pham, S.M., Kormos, R.L., Landreneau, R.J., Kawai, A., Gonzalez-Cancel, I., Hardesty, R.L. ve diğerleri. (1995) Solid tumors after heart transplantation: lethality of lung cancer. *Ann Thorac Surg*, 60 (6), 1623-1626.
44. Shankaran, V., Ikeda, H., Bruce, A.T., White, J.M., Swanson, P.E., Old, L.J. ve diğerleri. (2001) IFN[gamma] and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature*, 410 (6832), 1107-1111.
45. Dunn, G.P., Bruce, A.T., Ikeda, H., Old, L.J., Schreiber, R.D. (2002) Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol*, 3 (11), 991-998.
46. Dunn, G.P., Old, L.J., Schreiber, R.D. (2004) The Three Es of Cancer Immunoediting. *Annual Review of Immunology*, 22 (1), 329-360.
47. Matzinger, P. (1994) Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol*, 12, 991-1045.
48. Cerwenka, A., Lanier, L.L. (2001) Natural killer cells, viruses and cancer. *Nat Rev Immunol*, 1 (1), 41-49.

49. Gollob, J.A., Sciambi, C.J., Huang, Z., Dressman, H.K. (2005) Gene expression changes and signaling events associated with the direct antimelanoma effect of IFN-gamma. *Cancer Res*, 65 (19), 8869-8877.
50. Qin, Z., Schwartzkopff, J., Pradera, F., Kammertoens, T., Seliger, B., Pircher, H. ve diğerleri. (2003) A critical requirement of interferon gamma-mediated angiostasis for tumor rejection by CD8+ T cells. *Cancer Res*, 63 (14), 4095-4100.
51. Wall, L., Burke, F., Barton, C., Smyth, J., Balkwill, F. (2003) IFN-gamma induces apoptosis in ovarian cancer cells in vivo and in vitro. *Clin Cancer Res*, 9 (7), 2487-2496.
52. Angiolillo, A.L., Sgadari, C., Taub, D.D., Liao, F., Farber, J.M., Maheshwari, S. ve diğerleri. (1995) Human interferon-inducible protein 10 is a potent inhibitor of angiogenesis in vivo. *J Exp Med*, 182 (1), 155-162.
53. Sinha, P., Clements, V.K., Miller, S., Ostrand-Rosenberg, S. (2005) Tumor immunity: a balancing act between T cell activation, macrophage activation and tumor-induced immune suppression. *Cancer Immunol Immunother*, 54 (11), 1137-1142.
54. Shankaran, V., Ikeda, H., Bruce, A.T., White, J.M., Swanson, P.E., Old, L.J. ve diğerleri. (2001) IFN-gamma and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature*, 410 (6832), 1107-1111.
55. Luna Coronell, J.A., Syed, P., Sergelen, K., Gyurjan, I., Weinhausel, A. (2012) The current status of cancer biomarker research using tumour-associated antigens for minimal invasive and early cancer diagnostics. *J Proteomics*, 76 Spec No., 102-115.
56. Feuerer, M., Beckhove, P., Bai, L., Solomayer, E.F., Bastert, G., Diel, I.J. ve diğerleri. (2001) Therapy of human tumors in NOD/SCID mice with patient-derived reactivated memory T cells from bone marrow. *Nat Med*, 7 (4), 452-458.
57. Smyth, M.J., Godfrey, D.I., Trapani, J.A. (2001) A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. *Nat Immunol*, 2 (4), 293-299.
58. Powell, J.D., Horton, M.R. (2005) Threat matrix: low-molecular-weight hyaluronan (HA) as a danger signal. *Immunol Res*, 31 (3), 207-218.
59. Dunn, G.P., Old, L.J., Schreiber, R.D. (2004) The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity*, 21 (2), 137-148.

60. Wheelock, E.F., Weinhold, K.J., Levich, J. (1981) The tumor dormant state. *Adv Cancer Res*, 34, 107-140.
61. MacKie, R.M., Reid, R., Junor, B. (2003) Fatal melanoma transferred in a donated kidney 16 years after melanoma surgery. *N Engl J Med*, 348 (6), 567-568.
62. Seliger, B., Maeurer, M.J., Ferrone, S. (2000) Antigen-processing machinery breakdown and tumor growth. *Immunol Today*, 21 (9), 455-464.
63. Wong, L.H., Krauer, K.G., Hatzinisiriou, I., Estcourt, M.J., Hersey, P., Tam, N.D. ve diğerleri. (1997) Interferon-resistant human melanoma cells are deficient in ISGF3 components, STAT1, STAT2, and p48-ISGF3gamma. *J Biol Chem*, 272 (45), 28779-28785.
64. Taylor, M.A., Lee, Y.H., Schiemann, W.P. (2011) Role of TGF-beta and the tumor microenvironment during mammary tumorigenesis. *Gene Expr*, 15 (3), 117-132.
65. Khong, H.T., Restifo, N.P. (2002) Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes. *Nat Immunol*, 3 (11), 999-1005.
66. Ghiringhelli, F., Puig, P.E., Roux, S., Parcellier, A., Schmitt, E., Solary, E. ve diğerleri. (2005) Tumor cells convert immature myeloid dendritic cells into TGF-beta-secreting cells inducing CD4+CD25+ regulatory T cell proliferation. *J Exp Med*, 202 (7), 919-929.
67. Oyama, T., Ran, S., Ishida, T., Nadaf, S., Kerr, L., Carbone, D.P. ve diğerleri. (1998) Vascular endothelial growth factor affects dendritic cell maturation through the inhibition of nuclear factor-kappa B activation in hemopoietic progenitor cells. *J Immunol*, 160 (3), 1224-1232.
68. Wang, T., Niu, G., Kortylewski, M., Burdelya, L., Shain, K., Zhang, S. ve diğerleri. (2004) Regulation of the innate and adaptive immune responses by Stat-3 signaling in tumor cells. *Nat Med*, 10 (1), 48-54.
69. Xu, Q., Briggs, J., Park, S., Niu, G., Kortylewski, M., Zhang, S. ve diğerleri. (2005) Targeting Stat3 blocks both HIF-1 and VEGF expression induced by multiple oncogenic growth signaling pathways. *Oncogene*, 24 (36), 5552-5560.
70. Urosevic, M., Dummer, R. (2003) HLA-G and IL-10 expression in human cancer-different stories with the same message. *Semin Cancer Biol*, 13 (5), 337-342.

71. Isenberg, J.S., Vinod-Kumar, S., White, G., Ojefo, J.O. (2004) Hematopoietic stem cells mobilization and immune response in tumor-bearing mice. *Ann Plast Surg*, 52 (5), 523-530; discussion 531.
72. Gabrilovich, D.I., Ostrand-Rosenberg, S., Bronte, V. (2012) Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nat Rev Immunol*, 12 (4), 253-268.
73. Dugast, A.S., Haudebourg, T., Coulon, F., Heslan, M., Haspot, F., Poirier, N. ve diğeri. (2008) Myeloid-derived suppressor cells accumulate in kidney allograft tolerance and specifically suppress effector T cell expansion. *J Immunol*, 180 (12), 7898-7906.
74. Vasievich, E.A., Huang, L. (2011) The suppressive tumor microenvironment: a challenge in cancer immunotherapy. *Mol Pharm*, 8 (3), 635-641.
75. Grivennikov, S.I., Greten, F.R., Karin, M. (2010) Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*, 140 (6), 883-899.
76. Zamarron, B.F., Chen, W. (2011) Dual roles of immune cells and their factors in cancer development and progression. *Int J Biol Sci*, 7 (5), 651-658.
77. Lesina, M., Kurkowski, M.U., Ludes, K., Rose-John, S., Treiber, M., Kloppel, G. ve diğeri. (2011) Stat3/Socs3 activation by IL-6 transsignaling promotes progression of pancreatic intraepithelial neoplasia and development of pancreatic cancer. *Cancer Cell*, 19 (4), 456-469.
78. Qian, B.-Z., Li, J., Zhang, H., Kitamura, T., Zhang, J., Campion, L.R. ve diğeri. (2011) CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. *Nature*, 475 (7355), 222-225.
79. O'Connell, P.A., Surette, A.P., Liwski, R.S., Svenningsson, P., Waisman, D.M. (2010) S100A10 regulates plasminogen-dependent macrophage invasion. *Blood*, 116 (7), 1136-1146.
80. Phipps, K.D., Surette, A.P., O'Connell, P.A., Waisman, D.M. (2011) Plasminogen receptor S100A10 is essential for the migration of tumor-promoting macrophages into tumor sites. *Cancer Research*, 71 (21), 6676-6683.
81. Lewis, C.E., Pollard, J.W. (2006) Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer Res*, 66 (2), 605-612.
82. Pollard, J.W. (2008) Macrophages define the invasive microenvironment in breast cancer. *J Leukoc Biol*, 84 (3), 623-630.

83. Lin, E.Y., Nguyen, A.V., Russell, R.G., Pollard, J.W. (2001) Colony-stimulating factor 1 promotes progression of mammary tumors to malignancy. *J Exp Med*, 193 (6), 727-740.
84. Lin, E.Y., Gouon-Evans, V., Nguyen, A.V., Pollard, J.W. (2002) The macrophage growth factor CSF-1 in mammary gland development and tumor progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 7 (2), 147-162.
85. Krausgruber, T., Blazek, K., Smallie, T., Alzabin, S., Lockstone, H., Sahgal, N. ve diğeri. (2011) IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and TH1-TH17 responses. *Nat Immunol*, 12 (3), 231-238.
86. Biswas, S.K., Mantovani, A. (2010) Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat Immunol*, 11 (10), 889-896.
87. Leek, R.D., Harris, A.L. (2002) Tumor-associated macrophages in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 7 (2), 177-189.
88. Murdoch, C., Muthana, M., Coffelt, S.B., Lewis, C.E. (2008) The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer*, 8 (8), 618-631.
89. De Palma, M., Venneri, M.A., Galli, R., Sergi, L., Politi, L.S., Sampaoli, M. ve diğeri. (2005) Tie2 identifies a hematopoietic lineage of proangiogenic monocytes required for tumor vessel formation and a mesenchymal population of pericyte progenitors. *Cancer Cell*, 8 (3), 211-226.
90. Murdoch, C., Tazzyman, S., Webster, S., Lewis, C.E. (2007) Expression of Tie-2 by human monocytes and their responses to angiopoietin-2. *J Immunol*, 178 (11), 7405-7411.
91. Fridlender, Z.G., Sun, J., Kim, S., Kapoor, V., Cheng, G., Ling, L. ve diğeri. (2009) Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: "N1" versus "N2" TAN. *Cancer Cell*, 16 (3), 183-194.
92. Queen, M.M., Ryan, R.E., Holzer, R.G., Keller-Peck, C.R., Jorcyk, C.L. (2005) Breast cancer cells stimulate neutrophils to produce oncostatin M: potential implications for tumor progression. *Cancer Res*, 65 (19), 8896-8904.
93. Gregory, A.D., Houghton, A.M. (2011) Tumor-associated neutrophils: new targets for cancer therapy. *Cancer Res*, 71 (7), 2411-2416.
94. Fridlender, Z.G., Sun, J., Mishalian, I., Singhal, S., Cheng, G., Kapoor, V. ve diğeri. (2012) Transcriptomic analysis comparing tumor-associated neutrophils

with granulocytic myeloid-derived suppressor cells and normal neutrophils. *PLoS one*, 7 (2), e31524.

95.Kusmartsev, S., Nagaraj, S.,Gabrilovich, D.I. (2005) Tumor-associated CD8+ T cell tolerance induced by bone marrow-derived immature myeloid cells. *J Immunol*, 175 (7), 4583-4592.

96.Conejo-Garcia, J.R., Benencia, F., Courreges, M.C., Kang, E., Mohamed-Hadley, A., Buckanovich, R.J. ve diğerleri. (2004) Tumor-infiltrating dendritic cell precursors recruited by a beta-defensin contribute to vasculogenesis under the influence of Vegf-A. *Nat Med*, 10 (9), 950-958.

97.Gabrilovich, D.I., Corak, J., Ciernik, I.F., Kavanaugh, D.,Carbone, D.P. (1997) Decreased antigen presentation by dendritic cells in patients with breast cancer. *Clin Cancer Res*, 3 (3), 483-490.

98.Yang, L., DeBusk, L.M., Fukuda, K., Fingleton, B., Green-Jarvis, B., Shyr, Y. ve diğerleri. (2004) Expansion of myeloid immune suppressor Gr+CD11b+ cells in tumor-bearing host directly promotes tumor angiogenesis. *Cancer Cell*, 6 (4), 409-421.

99.Holda, J.H., Maier, T.,Claman, H.N. (1985) Murine graft-versus-host disease across minor barriers: immunosuppressive aspects of natural suppressor cells. *Immunol Rev*, 88, 87-105.

100.Young, M.R., Newby, M.,Wepsic, H.T. (1987) Hematopoiesis and suppressor bone marrow cells in mice bearing large metastatic Lewis lung carcinoma tumors. *Cancer Res*, 47 (1), 100-105.

101.Angulo, I., Rodriguez, R., Garcia, B., Medina, M., Navarro, J.,Subiza, J.L. (1995) Involvement of nitric oxide in bone marrow-derived natural suppressor activity. Its dependence on IFN-gamma. *J Immunol*, 155 (1), 15-26.

102.Young, M.R., Wright, M.A., Matthews, J.P., Malik, I.,Prechel, M. (1996) Suppression of T cell proliferation by tumor-induced granulocyte-macrophage progenitor cells producing transforming growth factor-beta and nitric oxide. *J Immunol*, 156 (5), 1916-1922.

103.Young, M.R., Wright, M.A.,Pandit, R. (1997) Myeloid differentiation treatment to diminish the presence of immune-suppressive CD34+ cells within human head and neck squamous cell carcinomas. *J Immunol*, 159 (2), 990-996.

104. Almand, B., Resser, J.R., Lindman, B., Nadaf, S., Clark, J.I., Kwon, E.D. ve diğ erleri. (2000) Clinical significance of defective dendritic cell differentiation in cancer. *Clin Cancer Res*, 6 (5), 1755-1766.
105. Almand, B., Clark, J.I., Nikitina, E., van Beynen, J., English, N.R., Knight, S.C. ve diğ erleri. (2001) Increased production of immature myeloid cells in cancer patients: a mechanism of immunosuppression in cancer. *J Immunol*, 166 (1), 678-689.
106. Jaffe, M.L., Arai, H., Nabel, G.J. (1996) Mechanisms of tumor-induced immunosuppression: evidence for contact-dependent T cell suppression by monocytes. *Mol Med*, 2 (6), 692-701.
107. Gabrilovich, D.I., Velders, M.P., Sotomayor, E.M., Kast, W.M. (2001) Mechanism of immune dysfunction in cancer mediated by immature Gr-1+ myeloid cells. *J Immunol*, 166 (9), 5398-5406.
108. Kusmartsev, S., Gabrilovich, D.I. (2006) Role of immature myeloid cells in mechanisms of immune evasion in cancer. *Cancer Immunol Immunother*, 55 (3), 237-245.
109. Corzo, C.A., Condamine, T., Lu, L., Cotter, M.J., Youn, J.I., Cheng, P. ve diğ erleri. (2010) HIF-1alpha regulates function and differentiation of myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment. *J Exp Med*, 207 (11), 2439-2453.
110. Gabrilovich, D.I., Bronte, V., Chen, S.H., Colombo, M.P., Ochoa, A., Ostrand-Rosenberg, S. ve diğ erleri. (2007) The terminology issue for myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res*, 67 (1), 425; author reply 426.
111. Dolcetti, L., Marigo, I., Mantelli, B., Peranzoni, E., Zanovello, P., Bronte, V. (2008) Myeloid-derived suppressor cell role in tumor-related inflammation. *Cancer Lett*, 267 (2), 216-225.
112. Kao, J., Ko, E.C., Eisenstein, S., Sikora, A.G., Fu, S., Chen, S.H. (2011) Targeting immune suppressing myeloid-derived suppressor cells in oncology. *Crit Rev Oncol Hematol*, 77 (1), 12-19.
113. Youn, J.I., Gabrilovich, D.I. (2010) The biology of myeloid-derived suppressor cells: the blessing and the curse of morphological and functional heterogeneity. *Eur J Immunol*, 40 (11), 2969-2975.

114. Gabilovich, D.I., Nagaraj, S. (2009) Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol*, 9 (3), 162-174.
115. Nefedova, Y., Huang, M., Kusmartsev, S., Bhattacharya, R., Cheng, P., Salup, R. ve diğeri. (2004) Hyperactivation of STAT3 is involved in abnormal differentiation of dendritic cells in cancer. *J Immunol*, 172 (1), 464-474.
116. Nefedova, Y., Nagaraj, S., Rosenbauer, A., Muro-Cacho, C., Sebt, S.M., Gabilovich, D.I. (2005) Regulation of dendritic cell differentiation and antitumor immune response in cancer by pharmacologic-selective inhibition of the janus-activated kinase 2/signal transducers and activators of transcription 3 pathway. *Cancer Res*, 65 (20), 9525-9535.
117. Kusmartsev, S., Gabilovich, D.I. (2003) Inhibition of myeloid cell differentiation in cancer: the role of reactive oxygen species. *J Leukoc Biol*, 74 (2), 186-196.
118. Kusmartsev, S., Nefedova, Y., Yoder, D., Gabilovich, D.I. (2004) Antigen-specific inhibition of CD8+ T cell response by immature myeloid cells in cancer is mediated by reactive oxygen species. *J Immunol*, 172 (2), 989-999.
119. Corzo, C.A., Cotter, M.J., Cheng, P., Cheng, F., Kusmartsev, S., Sotomayor, E. ve diğeri. (2009) Mechanism regulating reactive oxygen species in tumor-induced myeloid-derived suppressor cells. *J Immunol*, 182 (9), 5693-5701.
120. Sauer, H., Wartenberg, M., Hescheler, J. (2001) Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation. *Cell Physiol Biochem*, 11 (4), 173-186.
121. Nagaraj, S., Gupta, K., Pisarev, V., Kinarsky, L., Sherman, S., Kang, L. ve diğeri. (2007) Altered recognition of antigen is a mechanism of CD8+ T cell tolerance in cancer. *Nat Med*, 13 (7), 828-835.
122. Nagaraj, S., Schrum, A.G., Cho, H.I., Celis, E., Gabilovich, D.I. (2010) Mechanism of T cell tolerance induced by myeloid-derived suppressor cells. *J Immunol*, 184 (6), 3106-3116.
123. Nagaraj, S., Nelson, A., Youn, J.I., Cheng, P., Quiceno, D., Gabilovich, D.I. (2012) Antigen-specific CD4(+) T cells regulate function of myeloid-derived suppressor cells in cancer via retrograde MHC class II signaling. *Cancer Res*, 72 (4), 928-938.

- 124.Kodumudi, K.N., Woan, K., Gilvary, D.L., Sahakian, E., Wei, S.,Djeu, J.Y. (2010) A novel chemoimmunomodulating property of docetaxel: suppression of myeloid-derived suppressor cells in tumor bearers. *Clin Cancer Res*, 16 (18), 4583-4594.
- 125.Kalinski, P. (2012) Regulation of immune responses by prostaglandin E2. *J Immunol*, 188 (1), 21-28.
- 126.Li, H., Han, Y., Guo, Q., Zhang, M.,Cao, X. (2009) Cancer-expanded myeloid-derived suppressor cells induce anergy of NK cells through membrane-bound TGF-beta 1. *J Immunol*, 182 (1), 240-249.
- 127.Huang, B., Pan, P.Y., Li, Q., Sato, A.I., Levy, D.E., Bromberg, J. ve diğerleri. (2006) Gr-1+CD115+ immature myeloid suppressor cells mediate the development of tumor-induced T regulatory cells and T-cell anergy in tumor-bearing host. *Cancer Res*, 66 (2), 1123-1131.
- 128.Movahedi, K., Guilliams, M., Van den Bossche, J., Van den Bergh, R., Gysemans, C., Beschin, A. ve diğerleri. (2008) Identification of discrete tumor-induced myeloid-derived suppressor cell subpopulations with distinct T cell-suppressive activity. *Blood*, 111 (8), 4233-4244.
- 129.Bronte, V.,Zanovello, P. (2005) Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. *Nat Rev Immunol*, 5 (8), 641-654.
- 130.Bingisser, R.M., Tilbrook, P.A., Holt, P.G.,Kees, U.R. (1998) Macrophage-derived nitric oxide regulates T cell activation via reversible disruption of the Jak3/STAT5 signaling pathway. *J Immunol*, 160 (12), 5729-5734.
- 131.Harari, O.,Liao, J.K. (2004) Inhibition of MHC II gene transcription by nitric oxide and antioxidants. *Curr Pharm Des*, 10 (8), 893-898.
- 132.Sinha, P., Clements, V.K.,Ostrand-Rosenberg, S. (2005) Reduction of myeloid-derived suppressor cells and induction of M1 macrophages facilitate the rejection of established metastatic disease. *J Immunol*, 174 (2), 636-645.
- 133.Srivastava, M.K., Sinha, P., Clements, V.K., Rodriguez, P.,Ostrand-Rosenberg, S. (2010) Myeloid-derived suppressor cells inhibit T-cell activation by depleting cystine and cysteine. *Cancer Res*, 70 (1), 68-77.

134. Edinger, A.L., Thompson, C.B. (2002) Antigen-presenting cells control T cell proliferation by regulating amino acid availability. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99 (3), 1107-1109.
135. Levring, T.B., Hansen, A.K., Nielsen, B.L., Kongsbak, M., von Essen, M.R., Woetmann, A. ve diğerleri. (2012) Activated human CD4⁺ T cells express transporters for both cysteine and cystine. *Sci Rep*, 2, 266.
136. Solito, S., Bronte, V., Mandruzzato, S. (2011) Antigen specificity of immune suppression by myeloid-derived suppressor cells. *J Leukoc Biol*, 90 (1), 31-36.
137. 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. *J Leukoc Biol*, 91 (1), 167-181.
138. Sinha, P., Clements, V.K., Bunt, S.K., Albelda, S.M., Ostrand-Rosenberg, S. (2007) Cross-talk between myeloid-derived suppressor cells and macrophages subverts tumor immunity toward a type 2 response. *J Immunol*, 179 (2), 977-983.
139. Hu, C.E., Gan, J., Zhang, R.D., Cheng, Y.R., Huang, G.J. (2011) Up-regulated myeloid-derived suppressor cell contributes to hepatocellular carcinoma development by impairing dendritic cell function. *Scand J Gastroenterol*, 46 (2), 156-164.
140. Youn, J.I., Nagaraj, S., Collazo, M., Gabrilovich, D.I. (2008) Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *J Immunol*, 181 (8), 5791-5802.
141. Haile, L.A., Gamrekelashvili, J., Manns, M.P., Korangy, F., Greten, T.F. (2010) CD49d is a new marker for distinct myeloid-derived suppressor cell subpopulations in mice. *J Immunol*, 185 (1), 203-210.
142. Monu, N., Frey, A.B. (2007) Suppression of proximal T cell receptor signaling and lytic function in CD8⁺ tumor-infiltrating T cells. *Cancer Res*, 67 (23), 11447-11454.
143. Youn, J.I., Kumar, V., Collazo, M., Nefedova, Y., Condamine, T., Cheng, P. ve diğerleri. (2013) Epigenetic silencing of retinoblastoma gene regulates pathologic differentiation of myeloid cells in cancer. *Nat Immunol*, 14 (3), 211-220.
144. Thompson, H.J., Singh, M. (2000) Rat models of premalignant breast disease. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 5 (4), 409-420.

- 145.Hill, M., Bausero, M., Mazal, D., Menoret, S., Khalife, J., Anegon, I. ve diğeri. (2004) Immunobiological characterization of N -nitrosomethylurea-induced rat breast carcinomas: tumoral IL-10 expression as a possible immune escape mechanism. *Breast Cancer Res Treat*, 84 (2), 107-116.
- 146.Singh, M., McGinley, J.N.,Thompson, H.J. (2000) A comparison of the histopathology of premalignant and malignant mammary gland lesions induced in sexually immature rats with those occurring in the human. *Lab Invest*, 80 (2), 221-231.
- 147.Chan, M.M., Lu, X., Merchant, F.M., Iglehart, J.D.,Miron, P.L. (2005) Gene expression profiling of NMU-induced rat mammary tumors: cross species comparison with human breast cancer. *Carcinogenesis*, 26 (8), 1343-1353.
- 148.Thompson, H.J., McGinley, J.N., Rothhammer, K.,Singh, M. (1995) Rapid induction of mammary intraductal proliferations, ductal carcinoma in situ and carcinomas by the injection of sexually immature female rats with 1-methyl-1-nitrosourea. *Carcinogenesis*, 16 (10), 2407-2411.
- 149.Esendagli, G., Yilmaz, G., Canpinar, H., Gunel-Ozcan, A., Guc, M.O.,Guc, D. (2009) Coexistence of different tissue tumorigenesis in an N-methyl-N-nitrosourea-induced mammary carcinoma model: a histopathological report in Sprague-Dawley rats. *Lab Anim*, 43 (1), 60-64.
- 150.Perse, M., Cerar, A., Injac, R.,Strukelj, B. (2009) N-methylnitrosourea induced breast cancer in rat, the histopathology of the resulting tumours and its drawbacks as a model. *Pathol Oncol Res*, 15 (1), 115-121.
- 151.Fahmi, T., Esendagli, G., Yilmaz, G., Kansu, E.,Guc, D. (2010) Immune compartmentalization of T cell subsets in chemically-induced breast cancer. *Scand J Immunol*, 72 (4), 339-348.
- 152.Prins, R.M., Scott, G.P., Merchant, R.E.,Graf, M.R. (2002) Irradiated tumor cell vaccine for treatment of an established glioma. II. Expansion of myeloid suppressor cells that promote tumor progression. *Cancer Immunol Immunother*, 51 (4), 190-199.
- 153.Jia, W., Jackson-Cook, C.,Graf, M.R. (2010) Tumor-infiltrating, myeloid-derived suppressor cells inhibit T cell activity by nitric oxide production in an intracranial rat glioma + vaccination model. *J Neuroimmunol*, 223 (1-2), 20-30.

154. Ysebaert, D.K., De Greef, K.E., Vercauteren, S.R., Ghielli, M., Verpooten, G.A., Eyskens, E.J. ve diğerleri. (2000) Identification and kinetics of leukocytes after severe ischaemia/reperfusion renal injury. *Nephrol Dial Transplant*, 15 (10), 1562-1574.
155. Ahuja, V., Miller, S.E., Howell, D.N. (1995) Identification of two subpopulations of rat monocytes expressing disparate molecular forms and quantities of CD43. *Cell Immunol*, 163 (1), 59-69.
156. Ziegler-Heitbrock, L., Ancuta, P., Crowe, S., Dalod, M., Grau, V., Hart, D.N. ve diğerleri. (2010) Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood*, 116 (16), e74-80.
157. Yrliğ, U., Jenkins, C.D., MacPherson, G.G. (2006) Relationships between distinct blood monocyte subsets and migrating intestinal lymph dendritic cells in vivo under steady-state conditions. *J Immunol*, 176 (7), 4155-4162.
158. Lesokhin, A.M., Hohl, T.M., Kitano, S., Cortez, C., Hirschhorn-Cymerman, D., Avogadri, F. ve diğerleri. (2012) Monocytic CCR2(+) myeloid-derived suppressor cells promote immune escape by limiting activated CD8 T-cell infiltration into the tumor microenvironment. *Cancer Res*, 72 (4), 876-886.
159. Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L. (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*, 175 (1), 184-191.
160. Aydın, S., Canpınar, H., Undeger, U., Güc, D., Colakoglu, M., Kars, A. ve diğerleri. (2013) Assessment of immunotoxicity and genotoxicity in workers exposed to low concentrations of formaldehyde. *Arch Toxicol*, 87 (1), 145-153.
161. Herman, R.A., Scherer, P.N., Shan, G. (2008) Evaluation of logistic and polynomial models for fitting sandwich-ELISA calibration curves. *J Immunol Methods*, 339 (2), 245-258.
162. Swann, P.F., Magee, P.N. (1968) Nitrosamine-induced carcinogenesis. The alkylation of nucleic acids of the rat by N-methyl-N-nitrosourea, dimethylnitrosamine, dimethyl sulphate and methyl methanesulphonate. *Biochem J*, 110 (1), 39-47.

163. Uhl, M., Helma, C., Knasmüller, S. (1999) Single-cell gel electrophoresis assays with human-derived hepatoma (Hep G2) cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 441 (2), 215-224.
164. Abbott, P.J., Saffhill, R. (1979) DNA synthesis with methylated poly (dC-dG) templates. Evidence for a competitive nature to miscoding by O6-methylguanine. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Nucleic Acids and Protein Synthesis*, 562 (1), 51-61.
165. Likhachev, A.J., Ivanov, M.N., Bresil, H., Planche-Martel, G., Montesano, R., Margison, G.P. (1983) Carcinogenicity of single doses of N-nitroso-N-methylurea and N-nitroso-N-ethylurea in Syrian golden hamsters and the persistence of alkylated purines in the DNA of various tissues. *Cancer Res*, 43 (2), 829-833.
166. Ariazi, J.L., Haag, J.D., Gould, M.N. (2005) Methylguanine methyltransferase activity deficiency in immature rat mammary epithelial cells parallels increased carcinogenic susceptibility. *Mol Carcinog*, 44 (3), 193-201.
167. Waynforth, H.B., Magee, P.N. (1974) The effect of N-nitroso-N-methylurea and N-dimethylnitrosamine on cell mediated and humoral immune responses in rats and mice. *Br J Cancer*, 30 (6), 512-523.
168. Stahl, K.W., Bayer, U. (1983) Bone marrow genotoxicity of N-methyl, N-nitrosourea (NMU): n-alkanols as sister chromatid exchange (SCE) anti-inducers. *Experientia*, 39 (7), 757-759.
169. Frei, J.V., Swenson, D.H., Warren, W., Lawley, P.D. (1978) Alkylation of deoxyribonucleic acid in vivo in various organs of C57BL mice by the carcinogens N-methyl-N-nitrosourea, N-ethyl-N-nitrosourea and ethyl methanesulphonate in relation to induction of thymic lymphoma. Some applications of high-pressure liquid chromatography. *Biochem J*, 174 (3), 1031-1044.
170. Goto, Y., Hogg, J.C., Suwa, T., Quinlan, K.B., Eeden, S.F.v. (2003) A novel method to quantify the turnover and release of monocytes from the bone marrow using the thymidine analog 5'-bromo-2'-deoxyuridine. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 285 (2), C253-C259.
171. Diaz-Montero, C.M., Salem, M.L., Nishimura, M.I., Garrett-Mayer, E., Cole, D.J., Montero, A.J. (2009) Increased circulating myeloid-derived suppressor cells

- correlate with clinical cancer stage, metastatic tumor burden, and doxorubicin-cyclophosphamide chemotherapy. *Cancer Immunol Immunother*, 58 (1), 49-59.
172. Markowitz, J., Wesolowski, R., Papenfuss, T., Brooks, T.R., Carson, W.E., 3rd. (2013) Myeloid-derived suppressor cells in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 140 (1), 13-21.
173. Donkor, M.K., Lahue, E., Hoke, T.A., Shafer, L.R., Coskun, U., Solheim, J.C. ve diğerleri. (2009) Mammary tumor heterogeneity in the expansion of myeloid-derived suppressor cells. *Int Immunopharmacol*, 9 (7-8), 937-948.
174. Varol, C., Landsman, L., Fogg, D.K., Greenshtein, L., Gildor, B., Margalit, R. ve diğerleri. (2007) Monocytes give rise to mucosal, but not splenic, conventional dendritic cells. *J Exp Med*, 204 (1), 171-180.
175. Swirski, F.K., Nahrendorf, M., Etzrodt, M., Wildgruber, M., Cortez-Retamozo, V., Panizzi, P. ve diğerleri. (2009) Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. *Science*, 325 (5940), 612-616.
176. Youn, J.I., Gabilovich, D.I. (2013) New roles of Rb1 in expansion of MDSCs in cancer. *Cell Cycle*, 12 (9), 1329-1330.
177. Tacke, F., Randolph, G.J. (2006) Migratory fate and differentiation of blood monocyte subsets. *Immunobiology*, 211 (6-8), 609-618.
178. Yona, S., Jung, S. (2010) Monocytes: subsets, origins, fates and functions. *Curr Opin Hematol*, 17 (1), 53-59.
179. Gotoh, S., Itoh, M., Fujii, Y., Arai, S., Sendo, F. (1986) Enhancement of the expression of a rat neutrophil-specific cell surface antigen by activation with phorbol myristate acetate and concanavalin A. *J Immunol*, 137 (2), 643-650.
180. Mirza, N., Gabilovich, D. (2007) Comment on "Cutting edge: induction of B7-H4 on APCs through IL-10: novel suppressive mode for regulatory T cells". *J Immunol*, 178 (8), 4705-4706; author reply 4706.
181. Attwood, J.T., Munn, D.H. (1999) Macrophage suppression of T cell activation: a potential mechanism of peripheral tolerance. *Int Rev Immunol*, 18 (5-6), 515-525.
182. Doseff, A., Parihar, A. (2012). Monocyte Subsets and Their Role in Tumor Progression: InTech.
183. Esendagli, G., Canpinar, G., Yilmaz, G., Gunel-Ozcan, A., Guc, M.O., Kansu, E. ve diğerleri. (2009) Primary tumor cells obtained from MNU-induced mammary

carcinomas show immune heterogeneity which can be modulated by low-efficiency transfection of CD40L gene. *Cancer Biol Ther*, 8 (2), 136-142.

184.Tomioka, H., Shimizu, T., Maw, W.W.,Ogasawara, K. (2000) Roles of tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha), transforming growth factor-beta (TGF-beta), and IL-10 in the modulation of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression by macrophages during mycobacterial infection. *Clin Exp Immunol*, 122 (3), 335-342.

185.Gupta, P.B.,Kuperwasser, C. (2004) Disease models of breast cancer. *Drug Discovery Today: Disease Models*, 1 (1), 9-16.

EKLER

EK 1. Hacettepe Üniversitesi Yerel Etik Kurulu 2007 / 68-5 no'lu izni.



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

06100 Sıhhiye-Ankara
Telefon: 0 (312) 305 1090-1082 - Faks: 0 (312) 310 0580
www.etikkurul.hacettepe.edu.tr/index_hdk.php

Sayı: B.30.2.HAC.0.05.06.00/84

12 Ekim 2010

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL KARARI

TOPLANTI TARİHİ : 23.07.2010 (PERŞEMBE)
TOPLANTI SAYISI : 2010/7
DOSYA KAYIT NUMARASI : 2007/68
KARAR NUMARASI : 2007/68 -5
ARAŞTIRMA YÜRÜTÜCÜSÜ : Prof. Dr. Dicle Güç
HAYVAN DENEYLERİNDEN SORUMLU ARAŞTIRMACI : Dr. Güneş Esendağlı
YARDIMCI ARAŞTIRMACILAR : Dr. Tariq Zeki, Uzm. Bio. Yusuf Dölen
ONAYLANAN HAYVAN TÜRÜ ve SAYISI : 50 adet Sprague-Dawley sıçan
ONAY GEÇERLİLİK SÜRESİ : 24 ay

Üniversitemiz Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Dicle Güç'ün yürütücüsü olduğu "*N-Metil-N-Nitrozüre (MNU) ile Oluşturulmuş Deneysel Meme Tümör Modelinde Malign ve Malign Olmayan Meme Dokusunda Seçici İmmün İnfiltrasyon Düzeyinin Değerlendirilmesi*" isimli 2007/68 sayılı Kurul Kararı ile onaylı projenin süresi 01.08.2012 tarihine kadar uzatılmış ve devamı olarak proje başlığının "*Meme Kanseri Modelinde Myeloid Kökenli Hücrelerin İmmün Kompartmanlardaki Dağılımının Anti-Tümör Yanıtlara Yansıması*" olarak değiştirilmesi 23.07.2010 tarihli toplantımızda görüşülmüş olup uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Hakan S. ORER
Etik Kurul Başkanı