

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İNSAN MAKROFAJLARINDA NİTRİK OKSİT SENTAZ 2 (NOS2) İFADE VE
AKTİVİTESİNİN BAZAL BENZERİ MEME KANSERİ HÜCRELERİNDEN
ÜRETİLEN FAKTÖRLER VARLIĞINDA İNCELENMESİ**

Uzm. Biokim. Gözde BİLİR

**Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ANKARA
2022**

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İNSAN MAKROFAJLARINDA NİTRİK OKSİT SENTAZ 2 (NOS2) İFADE VE
AKTİVİTESİNİN BAZAL BENZERİ MEME KANSERİ HÜCRELERİNDEN
ÜRETİLEN FAKTÖRLER VARLIĞINDA İNCELENMESİ**

Uzm. Biokim. Gözde BİLİR

**Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Güneş ESENDAĞLI

İKİNCİ DANIŞMAN

Dr. Öğr. Üyesi Neşe ÜNVER

ANKARA

2022

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
İNSAN MAKROFAJLARINDA NİTRİK OKSİT SENTAZ 2 (NOS2) İFADE VE
AKTİVİTESİNİN BAZAL BENZERİ MEME KANSERİ HÜCRELERİNDEN ÜRETİLEN
FAKTÖRLER VARLIĞINDA İNCELENMESİ

Öğrenci: Gözde Bilir

Danışman: Prof. Dr. Güneş Esendağlı

İkinci Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Neşe Ünver

Bu tez çalışması 23.02.2022 tarihinde jürimiz tarafından "Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi Programı" nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:	<i>Prof. Dr. Banu Peynircioğlu</i> (<i>Hacettepe Üniversitesi</i>)	<i>(imza)</i>
Tez Danışmanı:	<i>Prof. Dr. Güneş Esendağlı</i> (<i>Hacettepe Üniversitesi</i>)	<i>(imza)</i>
Üye:	<i>Doç. Dr. Füsün Özmen</i> (<i>Hacettepe Üniversitesi</i>)	<i>(imza)</i>
Üye:	<i>Doç. Dr. Arzu Atalay</i> (<i>Ankara Üniversitesi</i>)	<i>(imza)</i>
Üye:	<i>Dr. Öğr. Üyesi Begüm Kocatürk</i> (<i>Hacettepe Üniversitesi</i>)	<i>(imza)</i>

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

15 Mart 2022

Prof. Dr. Müge YEMİŞÇİ ÖZKAN
Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan “**Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge**” kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- o Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. ⁽¹⁾
- o Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 6 ay ertelenmiştir.⁽²⁾
- o Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir.

...../...../.....

Gözde BİLİR

1“*Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge*”

- (1) *Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.*
- (2) *Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internette paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.*
- (3) *Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, tezin yapıldığı kurum tarafından verilir *. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, ilgili kurum ve kuruluşun önerisi ile enstitü veya fakültenin uygun görüşü üzerine üniversite yönetim kurulu tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir. Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir*

** Tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu tarafından karar verilir.*

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu Prof. Dr. Güneş ESENDAĞLI ve Dr. Öğr. Üyesi Neşe ÜNVER danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

Gözde BİLİR

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca değerli bilgisi ile her daim yol gösteren ve beni aydınlatan, bana bu yolda ışık olan değerli danışmanım Prof. Dr. Güneş Esendağlı'ya teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca bu yolda ilerlememde büyük katkısı olan, bilgisi ve sonsuz sabrı ile varlığını hissettiren eş danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Neşe Ünver'e de teşekkürlerimi sunarım.

Desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, değerli dostluklarını hep hissettiren, her koşulda yanımda olduğunu bildiğim Esendağlı Laboratuvar Üyeleri'nden Sakine Ulusoy, Hamdullah Yanık, Süleyman Can Öztürk, Ece Tavukçuoğlu ile Esendağlı Laboratuvarı'nın diğer üyeleri Utku Horzum, Sıla Ulutürk, Mubaida Parveen, Pınar Acar Özen, Kerim Bora Yılmaz, Alper Kurşunel, Feyza Gül Özbay, Ali Mert Sencer, Anıl Işık, Sibel Gökşen ve Sefa Özdemir' de teşekkürlerimi sunarım.

Temel Onkoloji Anabilim Dalı'ndaki tüm öğretim üyelerine, teknisyenlere ve personellere destekleri ve iyi niyetlerinden dolayı teşekkür ederim.

Manevi destekleri ile her şekilde yanımda olan, yürüdüğüm yolu huzurlu hale getiren değerli dostlarıma teşekkür ederim.

Hayatıma girdiği andan itibaren sonsuz sevgisi ve desteği ile yanımda olan, her şekilde bana güç veren, hayat arkadaşım Emre Aksoy'a en içten teşekkürlerimi ediyorum.

Bu yolda benimle beraber yürüyen, benimle beraber streslenip, o stresi mutluluğa çeviren, her türlü destekleri ile yanımda olan canım kardeşlerim Hande Bilir Bunsuz ve Abdulkerim Bunsuz'a teşekkür ederim.

Son olarak, koşulsuz sevgi ve destekleri ile her an yanımda olan, yaptıkları onca fedakarlık ile beni bu günlere getiren, iyiliğe ve güzelliğe dair ne varsa kaynağım olan biricik annem Melike Bilir ile biricik babam Abdurrahim Bilir'e yürekten teşekkür ederim.

ÖZET

Bilir G. İnsan makrofajlarında Nitrik Oksit Sentaz 2 (NOS2) ifade ve aktivitesinin bazal benzeri meme kanseri hücrelerinden üretilen faktörler varlığında incelenmesi. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi Programı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2022. Makrofajlar patojenlere karşı immün cevapta doğal immünitinin önde gelen hücreleridir ve kazanılmış bağışıklık cevaplarının düzenlenmesinde rol alırlar. Mikrobisidal özelliğe sahip makrofajlar LPS gibi bakteriyel ürünler, IFN- γ veya TNF- α gibi sitokinlerle uyarılarak proinflamatuvar cevabı iletirler. Nitrik oksit (NO) ve reaktif oksijen türleri (ROT) üretimi anti-mikrobiyal yanıtların biyokimyasal mekanizmasında elzemdir. NO üretimi nitrik oksit sentaz (NOS) enzimleri tarafından sağlanır. Uyarılabilir NOS izoformu (NOS2)'nin fare makrofajlarındaki varlığı pek çok çalışma ile kanıtlanmışken, insanlarda NOS2 ifadesine ve NO üretim düzeyine dair pek çok çelişkili yayın bulunmaktadır. Bu tez çalışması, monosit-makrofaj dönüşümü sırasında bazal-benzeri meme kanseri hücrelerinden üretilen faktörlerin miyeloid hücrelerin geçirdiği aktivasyon ve farklılaşma süreçleri sırasında NOS2 ifadesini ve NO değiştirebilmesi hipotezine dayanmaktadır. Bu amaçla, THP-1 monositik hücre hattı, bazal-benzeri meme kanseri hücre hattı süpernatantları varlığında makrofaj yönünde farklılaştırıldı ve lipopolisakarit (LPS) ve interferon (IFN)- γ ile uyarıldı. Hücrelerde fenotipik (CD14, TLR4, MD2, CD40, CD11c ve IFN γ R), fonksiyonel (ROT ve NO üretimi) ve morfolojik (May-Grünwald Giemsa, aktin hücre iskeleti boyaması) farklılaşma parametreleri incelendi. Ayrıca, THP-1 hücrelerinin bu koşullarda farklılaştırılması sırasında fibronektin ve Matrijel kaplı yüzeyler ile de deneyler gerçekleştirildi. Bu koşullar altında NOS2 ifade düzeyi mRNA ve protein düzeyinde araştırıldı. Fare kökenli makrofaj ve meme kanseri hücreleri varlığında ve ek olarak kullanılan insan hücre hatları süpernatantları varlığında doğrulama deneyleri gerçekleştirildi. İnsan bazal-benzeri meme kanseri hücre hattı prototipi olarak kullanılan MDA-MB-231 hücrelerinden salgılanan faktörler varlığında farklılaştırılan THP-1 hücrelerinde ROS ve NO üretiminin modüle olduğu belirlendi. Kanser süpernatantları varlığında LPS'nin etkisinin sınırlanabildiği ancak IFN- γ 'nın daha belirgin etkisi olduğu izlendi. İnsan NOS2 düzeylerinin meme kanseri süpernatantları varlığında olumsuz etkilendiği ve bunun NO üretimine de yansıdığı belirlendi. Elde edilen bulgular, özellikle kanser hücresinden salgılanan faktörler varlığında insan NOS2 ifadesinin ve dolayısı ile NO üretiminin monosit-makrofaj farklılaşma derecesine bağlı olarak transkripsiyon-translasyonel düzeylerde düzenlenebileceğine işaret etmektedir.

Anahtar Kelimeler: Makrofaj, Nitrik Oksit Senaz 2 (NOS2), Nitrik Oksit (NO), Bazal benzeri meme kanseri, insan/fare monositik hücre hattı.

ABSTRACT

Bilir G. Investigation of nitric oxide synthase 2 (NOS2) expression and activity in human macrophages in the presence of factors produced from basal-like breast cancer cells. Hacettepe University Graduate School of Health Sciences, Tumor Biology and Immunology Program Master Thesis, Ankara, 2022. Macrophages are the leading cells of innate immunity in the immune response against pathogens and are involved in the regulation of adaptive immune responses. Macrophages with microbicidal properties promote the proinflammatory response by stimulating bacterial products such as LPS, cytokines such as IFN- γ or TNF- α . Production of nitric oxide (NO) and reactive oxygen species (ROS) is essential in the biochemical mechanism of antimicrobial responses. NO production is provided by nitric oxide synthase (NOS) enzymes. While the existence of the inducible NOS isoform (NOS2) in mouse macrophages has been proven by many studies, there are many conflicting publications on NOS2 expression and NO production level in humans. This thesis is based on the hypothesis that factors produced from basal-like breast cancer cells during monocyte-macrophage transformation can change NOS2 expression and NO during the activation and differentiation processes of myeloid cells. To this end, the THP-1 monocytic cell line was differentiated into macrophage in the presence of basal-like breast cancer cell line supernatants and stimulated with lipopolysaccharide (LPS) and interferon (IFN)- γ . The phenotypic (CD14, TLR4, MD2, CD40, CD11c and IFN γ R), functional (ROT and NO production) and morphological (May-Grünwald Giemsa, actin cytoskeleton staining) differentiation parameters in cells were examined. In addition, experiments were performed with fibronectin and Matrigel coated surfaces during differentiation of THP-1 cells under these conditions. Under these conditions, NOS2 expression level was investigated at the mRNA and protein levels. Confirmation experiments were performed in the presence of mouse macrophage and breast cancer cells and in the presence of supplemental human cell lines supernatants. It was determined that ROS and NO production were modulated in THP-1 cells differentiated in the presence of factors secreted from MDA-MB-231 cells used as a human basal-like breast cancer cell line prototype. It was observed that the effect of LPS could be limited in the presence of cancer supernatants, but IFN- γ had a more pronounced effect. It was determined that human NOS2 levels were negatively affected in the presence of breast cancer supernatants and this was also reflected in NO production. The findings indicate that human NOS2 expression and thus NO production can be regulated at transcriptional-translational levels depending on the degree of monocyte-macrophage differentiation, especially in the presence of factors secreted from cancer cells.

Keywords: Macrophage, Nitric Oxide Synthase 2 (NOS2), Nitric Oxide (NO), Basal-like breast cancer, human/mouse monocytic cell line.

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR	xii
ŞEKİLLER	xiv
TABLolar	xviii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Nitrik Oksit Yapısı, Ara ürünleri ve Görevleri:	4
2.2. Nitrik Oksit Üretimi ve Nitrik Oksit Sentazlar	6
2.3. İnflamasyonda Nitrik Oksit'in Rolü	10
2.3.1. İnflamasyon	10
2.3.2. İnflamasyonda NOS2 ekspresyonu	11
2.3.3. Fare ve İnsanda NOS2 ekspresyonu	13
2.4. Myeloid Hücreler ve NOS2 ilişkisi	17
2.4.1. Myeloid Hücreler	17
2.4.2. Monosit-Makrofaj Farklılaşması ve Makrofaj Polarizasyonu	19
2.4.3. Makrofajlarda NOS2 ekspresyonu:	24
2.4.4. Meme Kanseri ile ilişkili TAM hücreleri ve NOS2 ekspresyonu	26
3. GEREÇ ve YÖNTEM	29
3.1. Çalışmada Kullanılan Malzemeler	29
3.2. Çalışmada Kullanılan Çözeltiler	30
3.3. Hücre Kültürü	33
3.3.1. Hücre Hatlarının Dondurulması ve Çözülmesi	33
3.3.2. Hücrelerin Pasajlanması	33

3.3.3. Hücre Sayımı	34
3.3.4. Meme Kanseri Hücre Hatları ve Fibroblast Hücre Hattından Süpernatant Eldesi	35
3.3.5. THP-1 İnsan Monositik Hücre Hattının Elde Edilen Süpernatantlar ile Uyarılması	36
3.3.6. J774A.1 Fare Makrofaj Hücre Hatlarının Elde Edilen Süpernatantlar ile Uyarılması	37
3.3.7. Miyeloid Hücrelerin Pro-inflamatuvar Sitokinler ile Uyarılması	38
3.4. Akım Sitometri	39
3.4.1. ROS/NO Analizi	40
3.5. Western Blot Analizleri	40
3.5.1. Protein Lizatı Hazırlama	40
3.5.2. Protein Konsantrasyonu Ölçümü	41
3.5.3. Protein Örneklerinin Denatürasyonu	42
3.5.4. Poliakrilamid Jel Elektroforezi	42
3.5.5. Transfer, Blotlama ve Primer Antikor ile İnkübasyon	43
3.5.6. Sekonder Antikor ile İnkübasyon	44
3.5.7. Kemoluminesans Görüntüleme ve Bant Dansitesinin Ölçümü	45
3.6. Gen İfadesi Analizleri	45
3.6.1. RNA İzolasyonu	45
3.6.2. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi	46
3.6.3. Polimer Zincir Reaksiyonu (PZR)	47
3.6.4. Gerçek Zamanlı PZR	48
3.6.5. Agaroz Jel Elektroforezi	49
3.7. İmmünofloresan Boyama	50
3.7.1. Hücre-içi İmmünofloresan Boyama	50
3.7.2. Uyarılmış THP-1 Hücre Polarizasyonunun İmmünofloresan Boyama ile Gösterilmesi	51
3.8. Sitokimyasal Boyama	52
3.8.1. May-Grünwald-Giemsa Boyama	52

3.9. İstatistiksel Analiz	53
4. BULGULAR	54
4.1. Bazal-benzeri Meme Kanseri Hücrelerinden Salgılanan Faktörlerin Makrofaj Farklılaşmasına Etkisi	54
4.1.1. Makrofaj Yönünde Farklılaşmanın İmmünofenotip Analizi İle Değerlendirilmesi	55
4.1.2. Farklı Yüzeylerin THP-1 Hücrelerinde Makrofaj Farklılaşması Üzerine Etkisi	58
4.2. MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücrelerinden Salgılanan Faktörler Varlığında Farklılaştırılan THP-1 Hücrelerinde ROS ve NO Üretimi	62
4.3. Bazal-benzeri Meme Kanseri Hücrelerinden Salgılanan Faktörler Varlığında Farklılaştırılan Makrofajların NOS2 Düzeyleri	66
4.4. Farklı Mezenkimal Karaktere Sahip Hücre Hatlarından Salgılanan Faktörler Varlığında Farklılaştırılan Makrofajların ROS ve NO Düzeyleri	71
4.5. Fare Kökenli Bazal-Benzeri Meme Kanseri Hücrelerinden Salgılanan Faktörlerin Fare Kökenli Makrofaj Hücre Hattında ROS ve NO Üretimine Etkisi	74
5. TARTIŞMA	78
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	88
7. KAYNAKLAR	92
8. EKLER	
EK 1. Tez Çalışması Orijinallik Raporu	
EK 2. Dijital Makbuz	
9. ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER ve KISALTMALAR

231THPMq	MDA-MB-231 süpernatanı varlığında makrofaja farklılaşması sağlanan THP-1 hücreleri
38THPMq	HCC38 süpernatanı varlığında makrofaja farklılaşması sağlanan THP-1 hücreleri
982THPMq	SW982 süpernatanı varlığında makrofaja farklılaşması sağlanan THP-1 hücreleri
ATP	Adenozin Trifosfat
BH₄	Tetrahidrobiopterin
cGC	siklik Guanilat Siklaz
cGMP	siklik Guanozin Monofosfat
COX	Siklooksijenaz
CSF	Koloni Uyarıcı Faktör
FAD	Flavin Adenin Dinükleotit
FMN	Flavin Mononükleotit
HIV	İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü
IFN	İnterferon
IL	İnterlökin
IRF	İnterferon Düzenleyici Faktör
JAK-STAT	Janus Kinaz-Sinyal Dönüştürücü ve Transkripsiyon Aktivatörü
LBP	LPS-bağlayıcı Protein
LPS	Lipopolisakkarit
MAO	Mono Amin Oksidaz
MAPK	Mitojen Aktive Protein Kinaz
MD2	Miyeloid Farklılaşma Faktörü 2
MPS	Mononükleer Fagosit Sistem
MyD88	Miyeloid Farklılaşma Primer Yanıt Proteini 88
N₂O₃	Dinitrojenioksit
NADPH	Nikotinamin Adenin Dinükleotit
NO	Nitrik Oksit

NO₂	Nitrojen Dioksit
NOS	Nitrik Oksit Sentaz
Nox	NADPH Oksidaz
O₂⁻	Süperoksit Anyonu
ONOO⁻	Peroksinitrit
PAMP	Patojen İlişkili Moleküler Desen
PMA	Forbol miristat asetat
PRR	Kalıp Tanıma Reseptörü
RNOS	Reaktif nitrojen oksit türleri
ROS	Reaktif oksijen türleri
TAM	Tümör ilişkili makrofajlar
THPMq	PMA uyarımı ile makrofaja farklılaşması sağlanan THP-1 hücreleri
TLR	Toll-benzeri reseptör

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Nitrik oksit metabolizmasının şematik gösterimi	6
2.2. Nitrik oksit sentez mekanizması ve NOS'un alt birimleri	7
2.3. Kemik iliği kaynaklı Miyeloid projenitor hücrelerden köken alan Miyeloid hücre alt grupları	19
2.4. İnflamatuvar yanıtlarda makrofaj polarizasyonu	21
2.5. Makrofaj polarizasyonu ile ilişkili belirteçler	23
3.1. Fuchs-Rosenthal hemositometrisinin (Hausser Scientific, ABD) mikroskop altında şematik görünümü. Bir kenarı 1 mm olan bir kare, kenarları 0,25 mm olan 16 küçük kare içerir.	35
3.2. MDA-MB-231 hücrelerinden elde edilen süpernatantlar varlığında uyarılan THP-1 hücrelerinin deney tasarımı	37
3.3. 4T1 hücrelerinden elde edilen süpernatantlar varlığında uyarılan J774A.1 hücrelerinin deney tasarımı	38
3.4. BCA analizine ilişkin spektrofotometrik ölçümlerde, protein konsantrasyonlarının hesaplanması için "log-log" algoritmasına göre oluşturulan standart eğri grafiği.	42
3.5. 50 bç DNA belirteci (Thermo Scientific, ABD), bç: baz çifti	50
4.1. THP-1 monositik hücre hattının, insan bazal-benzeri meme kanseri hücre hattı olan MDA-MB-231 hücrelerinden elde edilen süpernatantlar varlığında 5×10^5 hücre/mL olacak şekilde eş zamanlı gerçekleştirilen kültüründe PMA ile 72 saat inkübasyonun ardından 48 saat boyunca LPS veya IFN- γ ile muamelesi sonucunda M1 makrofaja farklılaşan hücrelerin May-Grünwald Giemsa boyaması ile elde edilen morfolojik görüntü analizleri. Ölçek çubuğu 12 μm 'dir.	55
4.2.A. THP-1 hücreleri ile elde edilen sonuçları gösteren temsili akım sitometri histogramları. Boş histogramlar THP-1 hücrelerinin tam RPMI besiyeri ile muamele edilmiş gruplardaki OFY değerlerini, dolu histogramlar ise MDA-MB-231 süpernatantları varlığında muamele edilmiş gruplardaki OFY değerlerini, dolu histogramlar ise MDA-MB-231 süpernatantları varlığında muamele edilen THP-1 hücrelerinin OFY değerlerini yapılan göstermektedir.	57
4.2.B. THP-1 hücreleri ile elde edilen sonuçları gösteren temsili akım sitometri histogramları. Boş histogramlar THP-1 hücrelerinin tam RPMI besiyeri ile muamele edilmiş gruplardaki OFY değerlerini, dolu histogramlar ise MDA-MB-231 süpernatantları varlığında muamele edilmiş gruplardaki OFY değerlerini, dolu histogramlar ise MDA-MB-231 süpernatantları varlığında	

- muamele edilen THP-1 hücrelerinin OFY değerlerini yapılan göstermektedir. 58
- 4.3.** A-C. Protein kinaz C agonisti ile 72 saat muamelenin ardından 48 saat boyunca LPS veya IFN- γ etkisi altında hücrelerin Matrigel ile kaplı yüzeylerde izlenen (A) hücre alanı, (B) hücre çevresi ve (C) kutupsallık indeksleri, aktin iskeleti boyaması ile belirlendi. 59
- 4.3.D.** Protein kinaz C agonisti ile 72 saat muamelenin ardından 48 saat boyunca LPS veya IFN- γ etkisi altında hücrelerin Matrigel ile kaplı yüzeylerde izlen aktin iskeleti boyama sonuçlarını gösteren temsili floresan mikroskop görüntü analizleri (yeşil, phalloidin; mavi, DAPI) Ölçek çubuğu 10 μ m'dir. 60
- 4.4.** A-C. Protein kinaz C agonisti ile 72 saat muamelenin ardından 48 saat boyunca LPS veya IFN- γ etkisi altında hücrelerin fibronektin ile kaplı yüzeylerde izlenen (A) hücre alanı, (B) hücre çevresi ve (C) kutupsallık indeksleri aktin iskeleti boyaması ile belirlendi. 61
- 4.4.D.** Protein kinaz C agonisti ile 72 saat muamelenin ardından 48 saat boyunca LPS veya IFN- γ etkisi altında hücrelerin Fibronektin ile kaplı yüzeylerde izlen aktin iskeleti boyama sonuçlarını gösteren temsili floresan mikroskop görüntü analizleri (yeşil, phalloidin; mavi, DAPI) Ölçek çubuğu 10 μ m'dir. 62
- 4.5.** Protein kinaz C agonisti ile 72 saat muamelenin ardından 48 saat boyunca LPS veya IFN- γ varlığında THPMq ve 231THPMq hücrelerinin ROS üretimi (A) Otofloresan yoğunluğuna göre normalize edilmiş H2DFCDA OFY ve (B) temsili akım sitometri histogramları. Boş histogramlar THPMq hücrelerini, dolu histogramlar ise 231THPMq hücrelerini göstermektedir (Gri renk, kontrol grubu; mavi renk, LPS ile uyarım; kırmızı renk, IFN- γ ile uyarım) 63
- 4.6.** Protein kinaz C agonisti ile 72 saat muamelenin ardından 48 saat boyunca LPS veya IFN- γ etkisi altında THPMq ve 231THPMq hücrelerinde meydana gelen NO üretimlerine ait akım sitometri analiz sonuçlarının (A) bar grafiği, (B) histogramları. Boş histogramlar THPMq hücrelerini, dolu histogramlar ise 231THPMq hücrelerini göstermektedir. Gri renk kontrol grubunu, mavi renk LPS ile uyarımı, kırmızı renk IFN- γ ile uyarımı ifade etmektedir. 64
- 4.7.** Protein kinaz C agonisti ile 72 saat muamelenin ardından LPS veya IFN- γ ile artan inkübasyon sürelerinde uyarılmış THPMq ve 231THPMq hücrelerinin ROS üretim düzeylerinin yüzde değişimi uyarılmamış hücrelere göre hesaplanmıştır. Yeşil renk IFN- γ ile uyarılan THPMq hücrelerini, sarı renk LPS ile muamele edilen THPMq hücrelerini, kırmızı renk IFN- γ ile uyarılan 231THPMq hücrelerini, mavi renk ise LPS ile muamele edilen 231THPMq hücrelerini ifade etmektedir. 65

- 4.8. Protein kinaz C agonisti ile 72 saat muamelenin ardından LPS veya IFN- γ ile artan inkübasyon sürelerinde uyarılmış THPMq ve 231THPMq hücrelerinin NO üretim düzeylerinin yüzde değişimi, uyarılmamış hücrelere göre hesaplanmıştır. Yeşil renk IFN- γ ile uyarılan THPMq hücrelerini, sarı renk LPS ile muamele edilen THPMq hücrelerini, kırmızı renk IFN- γ ile uyarılan 231THPMq hücrelerini, mavi renk ise LPS ile muamele edilen 231THPMq hücrelerini ifade etmektedir. 66
- 4.9. Protein kinaz C agonisti ile 72 saat muamelenin ardından 48 saat boyunca LPS veya IFN- γ ile muamele edilen THPMq ve 231THPMq hücrelerinde NOS2 gen ifadesine ait qPCR sonuçları. MDA-MB-231 süpernatanı varlığında makrofaj yönünde farklılaştırılan THP-1 hücrelerinde NOS1, NOS2 ve NOS3 gen ifadesi RT-PCR ile değerlendirildi. β -aktin referans gen olarak kullanılarak kontrol hücrelerinden elde edilen verilere göre normalizasyon yapıldı. 67
- 4.10. Protein kinaz C agonisti ile 72 saat muamelenin ardından 48 saat boyunca LPS veya IFN- γ ile muamele edilen THPMq ve 23THPMq hücrelerinin NOS2 proteinine ait Western blot sonuçları. (A) NOS2 proteinine ait Western Blot bandlarının agaroz jel elektroforezi sonrasında görüntüsü. (B) THP-1 hücrelerinin MDA-MB-231 süpernatanı varlığında makrofaja farklılaştırılması sonrasında Western Blot analizi gerçekleştirildi. β -aktin referans protein olarak kullanılarak kontrol hücrelerinden elde edilen verilere göre normalizasyon yapıldı. 68
- 4.11. Protein kinaz C agonisti ile 72 saat muamelenin ardından 48 saat boyunca LPS veya IFN- γ ile muamele edilen hücrelerin NOS2 protein boyamalarının temsili resimleri (nükleus (DAPI), mavi; NOS2, yeşil) ($n \geq 15$) Ölçek çubuğu 10 μm 'dir. 69
- 4.12. A. Protein kinaz C agonisti ile 72 saat muamelenin ardından 48 saat boyunca LPS veya IFN- γ etkisi altındaki THPMq ve 231THPMq hücrelerinin Matrigel kaplı yüzeylerde immünfloresan boyama ile gösterilmesi (nükleus (DAPI), mavi; NOS2, kırmızı) ($n \geq 15$). Ölçek çubuğu 10 μm 'dir. 70
- 4.12.B. Protein kinaz C agonisti ile 72 saat muamelenin ardından 48 saat boyunca LPS veya IFN- γ etkisi altındaki THPMq ve 231THPMq hücrelerinin fibronektin kaplı yüzeylerde immünfloresan boyama ile gösterilmesi (nükleus (DAPI), mavi; NOS2, kırmızı) ($n \geq 15$) Ölçek çubuğu 10 μm 'dir. 71
- 4.13. Protein kinaz C agonisti ile 72 saat muamelenin ardından 48 saat boyunca LPS veya IFN- γ etkisi altında, 231THPMq, 38THPMq ve 982THPMq hücrelerinin ROS üretimlerinde meydana gelen (A) yüzde değişim grafikleri (B) temsili akım sitometri histogramları. Elde edilen sonuçlar kontrol THPMq hücrelerine göre % değişimi hesaplanarak sunulmuştur 73

- 4.14.** Protein kinaz C agonisti ile 72 saat muamelenin ardından 48 saat boyunca LPS veya IFN- γ etkisi altında, 231THPMq, 38THPMq ve 982THPMq hücrelerinin NO üretimlerinde meydana gelen (A) yüzde değişim grafikleri (B) temsili akım sitometri histogramları. Elde edilen sonuçlar kontrol THPMq hücrelerine göre % değişimi hesaplanarak sunulmuştur. 74
- 4.15.** 4T1 ve EMT6/AR1 meme kanseri hücrelerinin süpernatanı ile kültürü yapılan J774A.1 makrofaj hücrelerinin 48 saat boyunca LPS uyarımı ile hücre hattında F4/80 belirtecinin akım sitometri ile analizi. A) F4/80 belirteci ait ortanca floresan yoğunluğu (OFY) % değişimi. Kontrol hücreleri otofloresan verisine göre normalize edilmiştir. B) F4/80 ifadesine ait akım sitometri histogramları 75
- 4.16.** 4T1 ve EMT6/AR1 meme kanseri hücrelerinin süpernatanı ile kültürü yapılan J774A.1 makrofaj hücrelerinin 48 saat boyunca LPS uyarımı ile hücre hattında H2DFCDA belirtecinin akım sitometri ile analizi. A) H2DFCDA belirteci ait ortanca floresan yoğunluğu (OFY) % değişimi. Kontrol hücreleri otofloresan verisine göre normalize edilmiştir. B) H2DFCDA ifadesine ait akım sitometri histogramları 76
- 4.17.** 4T1 ve EMT6/AR1 meme kanseri hücrelerinin süpernatanı ile kültürü yapılan J774A.1 makrofaj hücrelerinin 48 saat boyunca LPS uyarımı ile hücre hattında DAF2DA belirtecinin akım sitometri ile analizi. A) DAF2DA belirteci ait ortanca floresan yoğunluğu (OFY) % değişimi. Kontrol hücreleri otofloresan verisine göre normalize edilmiştir. B) DAF2DA ifadesine ait akım sitometri histogramları 77

TABLULAR

Tablo		Sayfa
3.1.	Akım sitometride kullanılan antikorlara ilişkin bilgiler	40
3.2.	Western Blot analizlerinde kullanılan primer antikorlar	44
3.3.	Western Blot analizlerinde kullanılan sekonder antikor	44
3.4.	PZR analizlerinde kullanılan primerlere ilişkin bilgiler	47
3.5.	Standart PZR bileşenleri	47
3.6.	Gradyan PZR protokolü	48
3.7.	Gerçek zamanlı PZR bileşenleri	48
3.8.	Gerçek zamanlı PZR protokolü	49

1. GİRİŞ

Makrofajlar, patojenlere karşı immün cevapta efektör hücreler olup, doğal ve kazanılmış bağışıklık cevaplarının düzenlenmesinde rol alırlar. Yüksek plastisite özellikleri sayesinde klasik (M1) ve alternatif (M2) olarak 2 ana gruba polarize olurlar. Klasik makrofaj aktivasyonu, *in vitro* koşullarda bakteriyel hücre duvarı bileşenleri (LPS gibi) ve IFN- γ veya TNF- α uyarımıyla kullanılarak elde edilir. Bu aktivasyon TNF- α , IL-1, IL-6 ve IL-12 gibi proinflamatuvar sitokinlerin üretimi ile karakterize edilmektedir (1).

Nitrik oksit (NO), bilinen en küçük biyoaktif molekül olup, çeşitli hücreler tarafından üretilir. Nitrik oksit sentaz enzimi tarafından üretilen, üç farklı NOS izoformu tanımlanmıştır: nöronal nitrik oksit sentaz (nNOS, NOS1), uyarılabilir nitrik oksit sentaz (iNOS, NOS2) ve endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS, NOS3) (2). Bu enzimlerden, NOS2 kalsiyumdan bağımsız aktivite gösterip; T hücreleri, makrofajlar ve olgun dendritik hücreler tarafından eksprese edilir ve transkripsiyonel veya sinyal yollarında yer alan çeşitli moleküllerin nitrasyonu yoluyla bağışıklık hücrelerinin farklılaşmasında ve işlevinin düzenlenmesinde görevlidir (3). Yapılan çalışmalarda, fare makrofajlarında NOS2 ifadesinin olduğu desteklenirken, insanda NOS2 ifadesinin varlığı tartışmalıdır. İnsan makrofajlarında NOS2 ifadesini gösteren çalışmalarda; kanser hücre hatları *in vitro* ortamda çeşitli sitokinler ve bakteriyel ürünler kullanarak makrofajların M1 fenotipine polarize olduğu desteklenmiş ve NOS2 mRNA düzeyi ile protein ekspresyon düzeyleri değerlendirilmiştir (4). Aynı zamanda enzimatik aktivite ölçümü ile de nitrit ve nitrat miktarlarının varlığı gösterilmiştir (5). Bu durumun aksine, diğer çalışmalarda ise herhangi bir protein ekspresyonu ve enzimatik aktivitenin olmadığına ilişkin çalışmalar da söz konusudur (6). Bu tez çalışması, monosit-makrofaj dönüşümü sırasında miyeloid hücrelerin geçirdiği eş zamanlı aktivasyon ve farklılaşma süreçlerinin NOS2 ifadesini düzenlediğini ve insan miyeloid hücrelerinin de NO üretimini sağladığı hipotezine dayanmaktadır.

Gerçekleştirilen bu tez çalışmasında, THP-1 monositik hücre hattı ve MDA-MB-231 bazal benzeri meme kanseri hücrelerinden elde edilen süpernatantlar

kullanıldı. MDA-MB-231 hücrelerinden elde edilen süpernatantlar varlığında protein kinaz C (PKC) agonisti kullanılarak THP-1 monositik hücrelerinin makrofaja farklılaşmaları (231THPMq) sağlandı. Ardından LPS veya IFN- γ ile uyarımları sonucunda M1 fenotipine polarize oldukları gösterildi. Bazal benzeri meme kanseri hücrelerinden salgılanan faktörlerin de bu farklılaşmayı uyardığı belirlendi. Farklı yüzeylerin makrofaj farklılaşmasına etkisini gözlemlemek için, THPMq ve 231THPMq hücrelerinin IFN- γ veya LPS uyarımı koşulunda ekstraselüler matriks proteini olan fibronektin ve Matrigel kaplanan yüzeylerdeki davranışları incelendi ve MDA-MB-231 süpernatantı varlığında her iki yüzeyde de farklılaşmanın en yüksek düzeyde olduğu tespit edildi. Ayrıca, IFN- γ uyarımının farklılaşmaya etkisinin LPS'e göre daha fazla olduğu bulundu. 231THPMq hücrelerinde ROS ve NO üretiminin olduğu; LPS veya IFN- γ uyarımının ise üretilen ROS ve NO düzeylerinde artışa sebep olduğu gösterildi. Bununla beraber, 231THPMq hücrelerinde LPS veya IFN- γ uyarımlarının artan inkübasyon süreleri ile korele bir şekilde NO üretiminde artışa sebep olduğu belirlenerek 48. saatte en yüksek düzeye ulaştığı belirlendi.

THP-1 hücrelerinin MDA-MB-231 süpernatantları varlığında makrofaj hücrelerine farklılaştırılması sonucunda NOS enzimlerinin gen ekspresyonları incelendi. THPMq hücrelerinde NOS3 gen ekspresyonu en yüksek, NOS1 gen ekspresyonu en düşük düzeyde saptandı. 231THPMq hücrelerinde ise NOS izoformlarının mRNA düzeyinde THPMq'ya göre azaldığı saptandı. NOS2 ifade düzeylerinin LPS veya IFN- γ ile muamele edilen 231THPMq hücrelerinde aynı koşullarda uyarılmış THPMq hücrelerine göre arttığı saptandı. Gen ekspresyon analizlerinin yanı sıra; LPS veya IFN- γ ile muamele edilen THPMq ve 231THPMq hücrelerinin NOS2 protein ekspresyonlarının da anlamlı düzeyde azaldığı belirlendi. NOS2 düzeyleri fibronektin ve Matrigel kaplanan yüzeylerde büyütülen hücrelerde yapılan immünfloresan analizleri ile de incelendi ve NOS2 varlığının Matrigel kaplı yüzeylerde bulunan 231THPMq hücrelerinde arttığı gösterildi.

MDA-MB-231 hücreleri ile gerçekleştirilen makrofaj farklılaştırılması deneylerine ek olarak, THP-1 monositik hücre hattının, bazal-benzeri meme kanseri hücre hattından (HCC38) ve fibroblastik hücre hattından (SW982) elde edilen

süpernatantlar varlığında protein kinaz C (protein kinase C, PKC) agonisti ile uyarımı sonrası LPS veya IFN- γ ile muamelesi gerçekleştirildi. Bunun sonucunda HCC38 süpernatantı varlığında uyarılan hücrelerde üretilen ROS ve NO düzeyinin diğer hücrelere göre daha fazla olduğu belirlendi.

Fare kökenli makrofaj hücrelerinde de ROS ve NO üretimine ilişkin doğrulama deneyleri yapıldı. Bu amaçla, J774A.1 fare makrofajlarının fare bazal-benzeri meme kanseri hücre hattı olan 4T1 ve EMT6/AR1 hücrelerinden elde edilen süpernatantlar varlığında kültürü gerçekleştirildi. LPS uyarımı varlığında EMT6/AR1 süpernatantı ile uyarılan J774A.1 hücrelerinde ROS ve NO üretiminin anlamlı düzeyde arttığı saptandı.

Sonuç olarak, insan bazal benzeri meme kanserinden salgılanan faktörler varlığında makrofaja farklılaşan hücrelerde NOS2 gen ekspresyonunun olduğu ve NO üretiminin gerçekleştiği gösterildi.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Nitrik Oksit Yapısı, Ara ürünleri ve Görevleri:

Nitrik oksit (NO), lipit-geçirgen ve serbest radikallere sahip çeşitli biyolojik süreçlerde rol alan biyoaktif bir moleküldür (2,3). Bu molekül, siklik Guanilat siklaz (*cyclic guanylate cyclase*, cGC)'in çözümlü izoformunun aktivasyonu ile siklik GMP (*cyclic GMP*, cGMP) oluşturması ve ardından iyon kanalları ve kinazların aktivasyonu ile endotel hücrelerinden NO üretmesi sonucunda arteriyel vazodilatasyona aracılık etmesi sırasında keşfedilmiştir (2). NO'nun görevleri arasında vasküler ve bronşiyal genişlemeyi teşvik etmesi, trombosit agregasyonunu inhibe etmesi, mukus salgılanmasını desteklemesi, kan basıncını düzenlemesi (4), öğrenme ve hafıza gibi bilişsel fonksiyonları sağlaması yer alır (5). Ayrıca immün sistemde meydana gelen inflamatuvar solunum yolu hastalıkları, romatoid artrit, ankilozan spondilit, ülseratif kolit, Chron hastalığı gibi immünolojik hastalıklarda da NO'nun artmış üretimi söz konusudur (6, 7).

NO serbest radikallere sahip bir gaz molekülü olup, oksijen varlığında kararsız bir forma sahiptir. Kararsız formu sebebiyle tioller (R-SH), metaller (Fe^{2+}) ve süperoksit anyonu (O_2^-) olmak üzere çeşitli biyomoleküllerle tepkimeler oluşturarak (8); peroksinitrit ($ONOO^-$), S-nitrosotiyoller (RSNO), nitrojen dioksit (NO_2), dinitrojen trioksit (N_2O_3) ve dinitrosil-demir ara ürünlerini meydana getirmektedir (Şekil 1) (9). Bu ara ürünler, NO konsantrasyonu $1 \mu M$ 'den büyük olduğunda biyolojik olarak önemli hale gelir (9). Bu konsantrasyonlarda, reaktif nitrojen oksit türleri (*reactive nitrogen oxide species*, RNOS), DNA'nın yapısını değiştirerek, enzim fonksiyonunu inhibe ederek ve NO'nun antimikrobiyal özelliğini oluşturan lipit peroksidasyonunu indükleyerek oksidatif ve nitrozatif hasarlara neden olur (10) (11).

Peroksinitrit ($ONOO^-$), NO'nun O_2^- ile reaksiyona girmesi sonucu oluşup, hücre zarından kolayca geçebilmektedir. NO veya O_2^- 'den daha fazla sitotoksik aktiviteye sahiptir (11). Bununla birlikte oksidatif hasara, DNA'da tek sarmal kırıklarına yol açarak (12); lipitler ve proteinler ile daha hızlı aktivite göstererek

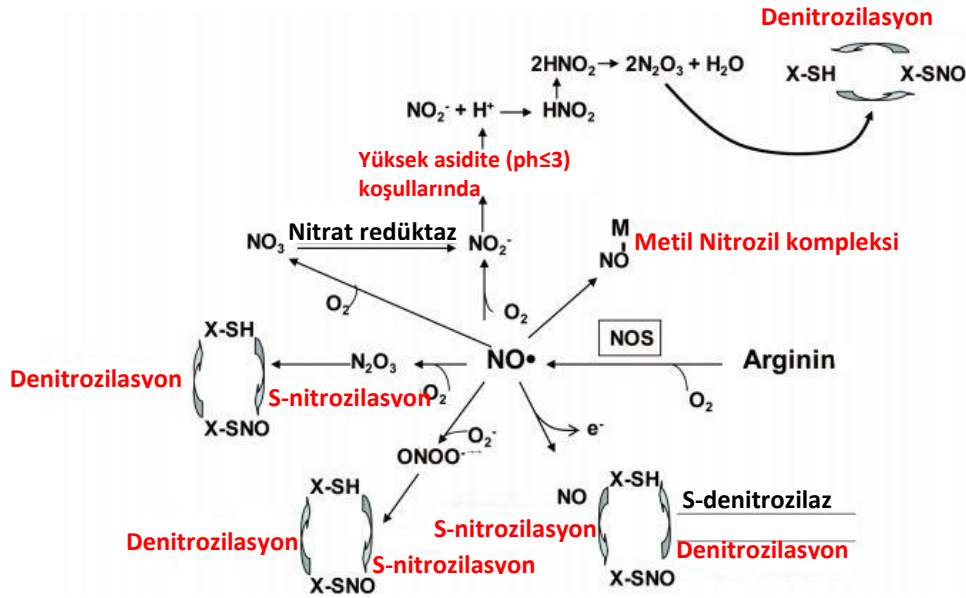
biyomoleküllerin S-nitrosilasyonuna neden olur (13). S-nitrosilasyon aynı zamanda, N_2O_3 gibi reaktif nitrojen oksitlerin metabolizması sırasında tiyollere kovalent olarak bağlanmak için nitrosonyum iyonunun (NO^+) serbest bırakılmasıyla da gerçekleşir (8). Proteinlerin S-nitrosilasyonu, hedef proteine bağlı olarak uyarıcı veya inhibe edici sinyal iletimini sağlamaktadır (14). S-nitrosilasyon, fagositotik hücrelerin (makrofajlar, nötrofiller) patojenleri temizlemek için O_2^- üretimi açısından fizyolojik önem taşır. Hem O_2^- hem de NO üreten makrofajlarda, bu moleküller reaksiyona girerek peroksinitrit oluşumu gerçekleşebilir (8).

Hücrede peroksinitrit (H_2O_2) seviyeleri, peroksinitritin nitrite indirgenmesini katalize eden glutatyon peroksidazlar tarafından kontrol edilir. Ancak NO ve peroksinitrit, selenosistein ile reaksiyona girerek glutatyon peroksidazın aktivitesini inhibe edebilir. H_2O_2 ayrıca, peroksinitritin 3-nitrotirozin oluşturmak için proteinlerdeki tirozin kalıntıları ile reaksiyona girdiği protein nitrasyonu adı verilen bir süreç yoluyla ikincil haberci molekül olarak hücrelerde sinyal iletimine katılabilmektedir (15).

Reaktif nitrojen ara ürünleri proteinlerin *hem* grupları, demir sülfür kümeleri, fenol veya aromatik amino asit kalıntıları yoluyla da reaksiyona girebilir (11). Nitrik oksitin protein fonksiyonlarını düzenlemesi, bir demir-nitrosil kompleksi oluşturmak için demirin *hem* gruplarına ve metaloproteinlerin metal kofaktörlerine bağlanması ile gerçekleşmektedir. Bu mekanizma içerisinde yer alan moleküller çözünebilir guanilil siklaz (*soluble guanylyl cyclase, sGC*), hemoglobin, sitokrom P450 ve nitrik oksit sentazlardır. sGC'ye NO bağlanması, bu enzimi aktive ederek hücre içi ikincil haberci olan cGMP'nin downregülasyonuna yol açar. NO'nun, sitokrom P450'de bulunan *hem* grubuna bağlanması bu enzimin aktivitesini inhibe eder (16).

NO, *hem* içeren başka bir enzim olan siklooksigenazın (*cyclooxygenase, COX*) aktivasyonu yoluyla prostaglandin üretimini arttırır (17). Enzim ve proteinlerin çoğu, sülfid kümelerini düzenlemek için demiri kullanır. Bu proteinler ayrıca NO tarafından düzenlenir ve mitokondriyal solunum zinciri, cis-akonitaz, NADH süksinat oksidoredüktaz ve NADH ubikuinon oksidoredüktazları içerir. NO, akonitaz aktivitesini azaltırken demire duyarlı element bağlayıcı proteinin (*iron responsive*

binding protein, IRBP) RNA bağlama fonksiyonunu uyarır. Çinko parmak transkripsiyon faktörleri Sp1, EGR-1, vitamin D3 reseptörü gibi geçiş metalleri ve çinko içeren proteinler, NO modifikasyonuna ve inhibisyonuna duyarlıdır (11).



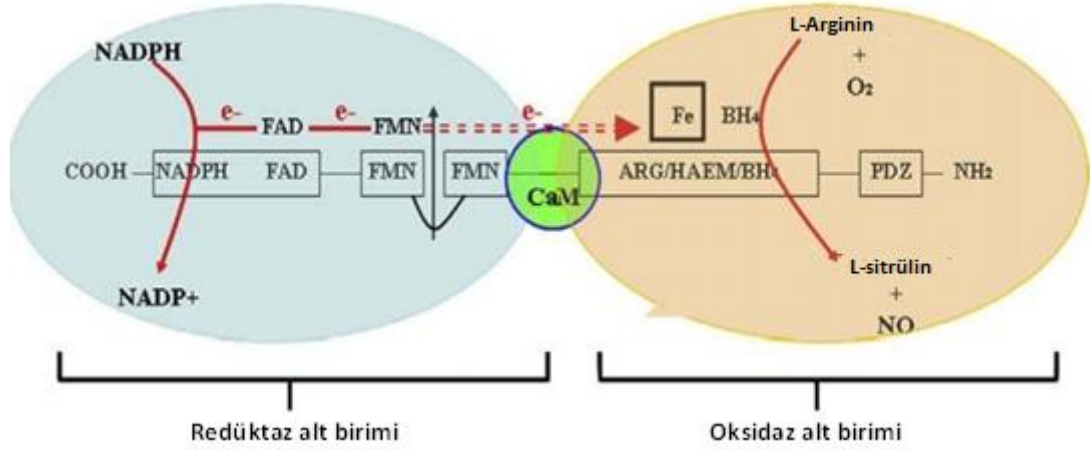
Şekil 2.1. Nitrik oksit metabolizmasının şematik gösterimi (17)

2.2. Nitrik Oksit Üretimi ve Nitrik Oksit Sentazlar

Nitrik oksit üretimi, nitrik oksit sentazlar (EC 1.14.13.39) tarafından gerçekleştirilmektedir. Nitrik oksit sentaz (*nitric oxide synthase*, NOS) 'lar L-argininden L-sitrülin ve NO oluşumunu kataliz ederler. Kataliz sırasında moleküler oksijen ve nikotinamid adenin dinükleotit fosfatı (*dihyronicotinamide adenine dinucleotide phosphate*, NADPH) substrat olarak; flavin adenin dinükleotit (*flavin adenine dinucleotide*, FAD), flavin mononükleotit (*flavin mononucleotide*, FMN), tetrahidrobiopterin (*tetrahydrobiopterin*, BH₄), heme ve Ca²⁺/kalmomodulini ise kofaktör olarak kullanılırlar (6, 18).

NOS'un homodimer yapıya sahip üç farklı izoformu bulunmaktadır. İzoformların homodimer yapısı, üç farklı alanı içermektedir (Şekil 2). Molekülün karboksi ucunda bulunan redüktaz alanı elektron transferinin gerçekleştiği kısımdır. Bu alan, Ca²⁺/kalmomodulin, FAD, FMN ve NADPH moleküllerini içermektedir. Burada

NOS, elektronları NADPH'tan alarak FAD ve FMN aracılığıyla oksidaz alanına doğru transferini sağlamaktadır (6). Redüktaz alanından terminal uçta bulunan oksijenaz alanına geçişte bulunan kalmodulin bağlama bölgesi, tüm NOS izoformlarının aktivitesi için gerekli olup, redüktaz alanından oksijenaz alanına elektron akışını kolaylaştırır. Terminal uçta bulunan oksijenaz alanı ise; L-arginin'in L-sitrülin ve NO'ya dönüştüğü alandır. Bu alan, BH₄, heme ve arginin için bağlanma bölgelerini içermektedir (2). Üç izoform da aynı reaksiyonu katalize etmektedir. İlk aşamada, enzim L-arginin oksidasyonunu katalize ederek bir ara bileşik olan N-hidroksi-L-arginini oluşturur, bu ara ürün daha sonra L-sitrüline oksitlenir ve NO sentezi gerçekleşir (Şekil 2) (19).



Şekil 2.2. Nitrik oksit sentez mekanizması ve NOS'un alt birimleri (21)

NOS1, NOS2 ve NOS3 olmak üzere üç farklı izoforma sahip olan NOS'tan NOS1 ve NOS3 yapısal, NOS2 ise sitokinler ve endotoksinler tarafından indüklenebilir yapıdadır (2). Yapısal olan NOS enzimleri iki alt gruba ayrılmaktadır. Bunlardan birincisi temel olarak merkezi ve periferel sinir sisteminde bulunan nöronal NOS (nNOS, NOS1); ikincisi ise daha çok vasküler endotelde bulunan endotelial NOS (eNOS, NOS3)'tur. Sitokin ve endotoksinler tarafından indüklenen NOS ise indüklenebilir NOS (iNOS, NOS2) olarak tanımlanmaktadır (7). Bu enzimlerden NOS1 ve NOS3'ün aktivitesi Ca²⁺ bağımlı iken, NOS2'nin aktivitesi ise Ca²⁺ bağımsızdır. Ayrıca NOS1 ve NOS3 ekspresyonu protein fosforilasyonu ve diğer

proteinler ile olan etkileşimler aracılığıyla düzenlenir. NOS2 ise bu iki formdan farklı olarak transkripsiyonel ve posttranskripsiyonel olarak düzenlenmektedir (18).

NOS1, NO'nun bir nörotransmitter olarak işlev gördüğü beyin ve periferik sinir sistemi için önemli olup, felç ve nörodejeneratif hastalıklarla ilişkili nörotoksisitede, peristalsis dahil düz kasın regülasyonunda ve penil ereksiyonda rol oynar (7). Omurilikte, sempatik ganglionlarda, adrenal bezlerde, periferik sinirlerde, çeşitli organların epitel hücrelerinde, böbrek makula densa hücrelerinde, pankreas adacık hücrelerinde ve vasküler düz kas hücrelerinde bulunmaktadır. Memelilerde NOS1'in temel kaynağı iskelet kasıdır (2). Nöronal hücrelere yoğun Ca^{2+} akışı ile uyarılan NOS1, serebrovasküler felçte N-metil-D-aspartat reseptör aracılı nöronal ölümden rol oynar. Aynı zamanda NOS1 aracılı NO üretiminin artışı, multipl skleroz, Alzheimer ve Parkinson hastalıkları gibi çeşitli nörodejeneratif patolojilere de sebep olmaktadır (20). Bununla birlikte, gastrointestinal sistemdeki gastroözofageal reflü gibi düz kas tonusu bozukluklarının da periferik nitroerjik sinirlerde NOS1 tarafından aşırı NO üretimi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (21).

NOS2, makrofajlar ve nötrofiller başta olmak üzere pek çok hücrede sentezlenir (2). Hücrelerde fizyolojik koşullarda NOS2 olmamasına rağmen; lipopolisakarit (LPS) gibi bakteriyel ürünler, interferon gama ($IFN-\gamma$), $TNF-\alpha$ veya interlekin-1 ($IL-1$) gibi proinflamatuvar sitokinlerle uyarıma bağlı olarak ekspresyonu aktive olmaktadır. NOS2 ekspresyonunun, hücre içi kalsiyum (Ca^{+2}) bağımsız, transkripsiyonel veya posttranskripsiyonel seviyede düzenlendiği rapor edilmiştir (22). $IFN-\gamma$ ve LPS, NOS2 ekspresyonu üzerinde sinerjik etki gösterirler ve üretilen NO miktarını artırırlar (23). NOS2 tarafından üretilen NO daha çok inflamatuvar cevaplarda ve kanser gibi hastalıklarda önemlidir (24). NOS2 kanser hücrelerinde konsantrasyona bağlı olarak tümör gelişimini hem destekleyici hem de baskılayıcı role sahiptir. Tümör mikroçevresinde ise anjiyogenez ve metastaza neden olarak tümör gelişimini destekleyici etki gösterirken, sitotoksik etkisi aracılığı ile de kanser hücrelerini yok etmektedir (25). NOS2 inflamatuvar hastalıklarda immün yanıt mekanizmalarında da oldukça önemlidir. NOS2 tarafından yüksek konsantrasyonlarda üretilen NO, hızlı bir şekilde reaktif nitrojen ürünlerine (reactive

nitrogen speies, RNS) oksitlenir ve NO'nun bağışıklık sistemi üzerindeki etkilerinin çoğuna aracılık etmektedir. RNS, kinazlar ve transkripsiyon faktörleri gibi birçok sinyal molekülünü aktive eder (26). Ayrıca mitokondriyal solunumda, ATP'nin ve hücrel enerjinin tükenmesine yol açan nikotinamid adenin dinükleotid fosfat oksidaz (*dihyronicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase*, NADPH oksidaz) veya monoamin oksidazlar (*mono amine oxidase*, MAO) gibi enzimleri de inhibe eder (26, 27).

NOS2 inflamatuvar nörodejeneratif hastalıklarda NOS1 ile beraber etkilidir. Aktive edilmiş mikroglia ve astrositlerin nöronları öldürdüğü mekanizmalar hücre kültüründe tanımlanmıştır. Bu mekanistik çalışmalar, mikroglia fagosit NADPH oksidazın aktivasyonunu ve gliada NOS2'nin ekspresyonunu içermektedir. NOS2'den türetilmiş NO ayrıca, nöronal ölümü indüklemek için sitokrom oksidazı inhibe eder ve hipoksi ile sinerji oluşturur. Bu durum, glutamat salınımına ve eksitotoksisiteye neden olabilir. NOS2'nin aşırı ekspresyonu, septik şok ile ilişkilendirilmiştir (22, 28).

NOS3, kan damarlarının iç yüzeyini kaplayan düz kas hücrelerin tek tabakası olan vasküler endotelyumda NO üretiminden sorumludur (29). Vasküler endotelyum dışında kardiyak miyositlerde, trombositlerde, nöronlarda, insan plasentasında trofoblastlarda ve böbrek tübüler hücrelerinde de bulunmaktadır (2). NOS3 tarafından üretilen NO, vasküler tonu, hücre proliferasyonu, lökosit yapışması ve trombosit agregasyonunun düzenlenmesinde görevlidir (30). NOS3'ün düzenlenmesinde, NOS1'de de olduğu gibi Ca^{2+} /kalmodulin kompleksi oldukça önemlidir. Bunun dışında, ısı şok proteini 90 (*heat shock protein 90*, hsp90)'ın da NOS3 aktivitesini arttırmada allosterik bir modülatör olduğu bulunmuştur (31). NOS3, cGC'yi uyarıp düz kas hücrelerinde cGMP'yi arttırarak kan damarlarında vazodilatasyona sebep olmaktadır (2). Ayrıca, kemoatraktan bir molekül olan monosit kemoatraktan molekül 1'in (*monocyte chemoattractant protein 1*, MCP-1) ekspresyonunu azaltarak (32) veya lökosit adezyon molekülü olan CD11/CD18'in ekspresyonunu baskılayarak endotel hücre üzerindeki lökosit adezyonunu inhibe etmektedir (33). Bu mekanizma sonucunda da ateroskleroz gelişimine neden olan aterojenezi önlemektedir. Aterosklerozun önlenmesinde etkili olan bir diğer

mekanizma da, NOS3'ün reaktif oksijen ürünleri (*reactive oxygen species*, ROS), anjiyotensin 2 gibi moleküllerin neden olduğu endotel hücre apoptozunu baskılamasıdır (2).

2.3. İnflamasyonda Nitrik Oksit'in Rolü

2.3.1. İnflamasyon

İnflamasyon, patojenler, hasarlı hücreler ve toksik bileşiklerce uyarılan, bağışıklık sisteminin oluşturduğu biyolojik bir yanıttır. Bu yanıtta, doğal bağışıklık sistemi hücrelerinden olan nötrofil ve makrofajlar aktive olup; NF-κB (*nuclear factor kappa b*), MAPK (*mitogen-activated protein kinases*) ve JAK-STAT (*Janus kinase, JAK, signal transducer and activator of transcription protein, STAT*) sinyal yolları üzerinden inflamasyona neden olan ajanı fagosite etmektedirler. Bu hücreler aynı zamanda çeşitli sitokin ve kemokin üretiminde rol alıp, edinsel bağışıklık sistemi yanıtlarını da oluşturmaktadırlar (34).

NF-κB transkripsiyon faktörü, inflamatuvar immün yanıt ve apoptoz süreçlerinde önemli rol oynayıp, patojen türevi maddeler ve inflamatuvar sitokinler olmak üzere birçok uyarıcı tarafından indüklenmektedir (35). NF-κB aktivasyonu, immün ve inflamatuvar yanıtları düzenlemede rol alan kanonik ve kanonik olmayan 2 alt mekanizmayı içermektedir (36). Kanonik NF-κB sinyal yolağı, çeşitli sitokin reseptörlerinin ligandları, model tanıma reseptörleri (*pattern recognition receptor, PRR*), TNF reseptörü (TNFR) süper ailesi üyelerinin yanı sıra T hücresi reseptörü (*T cell receptor, TCR*) ve B hücresi reseptörü olmak üzere çeşitli uyarıcılara yanıt verir (37). Kanonik olmayan NF-κB sinyal yolağı ise RANK, CD40 gibi spesifik uyarıcılara yanıt verir (36). Makrofajlar, dendritik hücreler gibi doğal bağışıklık sistem hücreleri patojenle ilişkili moleküler araçlar (*pathogen associated molecular pattern, PAMP*) olarak adlandırılan PRR'leri tanır ve NF-κB sinyal yolağını aktive ederek IL-1, IL-6, IL-12, TNFα gibi sitokinleri üreterek inflamatuvar cevap oluşturur (35).

İnflamatuvar cevapta, MAPK'lar, Serin/Treonin protein kinaz ailesinden olup; hücre proliferasyonunu, farklılaşmasını, ve apoptozisini düzenler Osmotik stres, mitojenler, ısı şoku proteinleri ve inflamatuvar sitokinler (IL-1, TNF-α ve IL-6) gibi

çeşitli uyarılara yanıt oluşturur (38). IL-1 β ve TNF- α sitokinlerinin PRR'ler tarafından uyarılması, NF- κ B ve MAPK transkripsiyon faktörlerini birlikte uyararak inflamatuvar yanıtı güçlendirmektedir. IL-1 β 'nin IL1R (IL-1 reseptör)'ye bağlanması MyD88'e bağlı sinyal yolağını aktive ederken; TNF α , TNF reseptörü I'e (TNF-RI) bağlanarak proinflamatuvar yanıtı oluşturur (39).

Tirozin kinaz ailesi içinde yer alan JAK-STAT sinyal yolağı (40), çeşitli sitokinler, büyüme faktörleri, interferonlar ve leptin gibi uyarılar ile aktive olarak hücre dışı faktörlerin gen ekspresyonunu kontrol etmektedir (41). IL-6, IL-27 gibi sitokinler, IFN- γ ve tip-1 IFN'lar tarafından aktive olan JAK-STAT'lar (40) inflamasyonda önemli role sahiptir. Romatoid artrit, sedef hastalığı ve inflamatuvar bağırsak hastalıklarının patogeneğinde bu sinyal yolağı rol almaktadır (42).

İnflamasyonda immün yanıtların şekillenmesinde sinyal yolak aktivasyonlarının yanı sıra çeşitli sitokinler ve mediyatör moleküller de görev alır. Bu moleküllerden C-reaktif protein (CRP), serum amiloid A, fibrinojen ve α 1-glikoprotein gibi antikordan bağımsız moleküller travma veya enfeksiyonlar sırasında homeostazisi düzenlemeye yardımcı olmaktadır. Sitokinler ise monositler, makrofajlar ve lenfositlerden salınarak proinflamatuvar ve anti-inflamatuvar özellik göstermektedir (34).

2.3.2. İnflamasyonda NOS2 ekspresyonu

Makrofajlar inflamasyonda önemli rolü olan doğal bağışıklık hücreleridir. Makrofaj hücrelerinin polarize alt gruplarından biri olan M1 makrofajlar, LPS gibi bakteriyel ürünler ve IFN- γ gibi inflamatuvar sitokinler tarafından indüklenmektedir. M1 makrofajlar hücre içi patojenlere karşı konakçı savunması ile inflamasyonda önemli bir role sahiptir (43). M1 makrofajları hücre içi konakçı savunmasını ürettikleri TNF α , IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinler ve NOS2 ekspresyonu ile gerçekleştirirler (44). NOS2 ekspresyonunun düzenlenmesinde rol alan mekanizmalar temel olarak iki şekilde olmaktadır. Bunlardan biri LPS gibi PAMPlar, TNF ve reaktif oksijen türleri ile indüklenen NF- κ B; diğeri ise IFN- γ ile indüklenen IRF-

1 ve STAT-1 sinyal yollarıdır. NOS2'nin optimum ekspresyonu, IFN- γ ve LPS'in beraber olduklarında gerçekleşmektedir (45).

IFN- γ genel olarak T helper -1 (Th-1) hücreleri ve aktive edilmiş doğal öldürücü (natural killer, NK) hücrelerden üretilip, makrofaj aktivasyonunu sağlayan ve majör histokompatibilite kompleksi (*majör histocompatibility complex*, MHC) ekspresyonunu düzenleyen proinflamatuvar bir sitokindir. IFN- γ uyarımının NOS2 mRNA ekspresyonunda başlıca NF-kB, MAPK ve STAT1 transkripsiyon faktörlerini aktive ederek düzenlediği gösterilmiştir (45). IFN- γ 'nın ayrıca TNF- α , MCP1 gibi moleküller ve T hücre aktivasyonunu sağlamada da etkili olduğu bilinmektedir. Bunun yanı sıra, anti-inflamatuvar özellikte olan IL-10 aktivitesini ve ekspresyonunu azaltmaktadır (46). IFN- γ ile aktive olan bir diğer transkripsiyon faktörü interferon düzenleyici faktör 1 (*interferon regulating factor 1*, IRF-1)'dir. IRF-1, IFN- γ veya LPS ile uyarım sonucunda aktive olur ve NOS2 ekspresyonunun düzenlenmesinde önemli rol oynar. (47). IFN- γ ile beraber IL-17 uyarımının NF-kB sinyal yolu aktivasyonunu arttırarak NO üretimini güçlendirdiği ve inflamatuvar yanıtları arttırdığı görülmüştür (48). IFN- γ tarafından indüklenen p38 MAPK aktivasyonu ise NOS2'nin aşırı ekspresyonunu önleyerek apoptozu önleyen bir mekanizmadır (49).

LPS, toll benzeri reseptör 4 (*toll like receptor*, TLR4)'ün agonistidir. Bakteriye enfeksiyona karşı inflamatuvar cevap oluşturulması bağışıklık sisteminin temel bileşenleri olan makrofajlar tarafından başlatılır ve yönlendirilir (50). LPS ile uyarılan makrofajlarda; NOS2 ekspresyonunda ve NO biyosentezinde artış görülür (45). Makrofajlar, enfeksiyonlara karşı oluşturdukları savunmayı, aktif radikaller, peroksitler, katyonik peptitler, interferonlar, lizozimler ve hidrolitik enzimler üreterek gerçekleştirirler (51). TLR4'ün LPS ile dimerizasyonu NF-kB aktivasyonunu indüklemektedir (52). NOS2 tarafından yüksek konsantrasyonlarda üretilen NO hızla RNS'ye oksitlenir, bu da NO'nun bağışıklık sistemi üzerindeki etkilerinin çoğuna aracılık eder. RNS, kinazlar ve PI3K gibi transkripsiyon faktörleri olmak üzere çeşitli sinyal moleküllerini aktive eder (7, 53). RNS ayrıca, mitokondriyal solunumda, NADPH oksidaz veya MAO enzimleri de inhibe eder (54).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda NO'nun inflamasyon ve inflamatuvar hastalıklardaki etkisi üzerine odaklanılmıştır (7). Memeli hücrelerinin çoğunluğunda, romatoid artirit, osteoartirit ve ankilozan spondilit gibi iltihaplı eklem hastalıklarında artan sitokinler tarafından uyarım sonucunda NOS2 ekspresyonu görülür (55,56). Bu hastaların serumlarında artmış NO konsantrasyonu görülmekle beraber, nitrotirozin konsantrasyonlarında da artış görülmektedir. Nitrotirozin, NO'nun sebep olduğu oksidatif hasarda peroksinitratın tirozin amino asidi ile reaksiyona girmesi sonucu oluşmaktadır (6).

Astım, akut solunum sıkıntısı sendromu (acute respiratory distress syndrome, ARDS) ve bronşektazi gibi solunum yolunun inflamatuvar hastalıkları solunum yolu epitel hücreleri ile inflamatuvar immün hücrelerinde artmış NOS2 ekspresyonu ve yüksek miktarda NO üretimi ile karakterize edilmektedir. Aşırı inflamasyon ile gelişen akciğer hasarı, pulmoner fibrozise neden olmaktadır. NO'nun bu şekilde aşırı miktarda üretiminin dezavantajı, özellikle fagositler tarafından üretilen oksidanların varlığında RNS ve peroksinitrit gibi molekülleri sentezleyerek, akciğer hasarına sebep olmasıdır (57).

NOS2 ekspresyonu ile ilişkilendirilen bir diğer hastalık grubu inflamatuvar bağırsak hastalıklarıdır. Bu hastalıklardan ülseratif kolit veya Chron hastalığı olanların iltihaplı mukozalarında artmış NOS2 aktivitesi bulunmuştur. Romatoid artritli hastaların serumlarında olduğu gibi, ülseratif kolitli hastaların serumlarında da artmış nitrat düzeyleri gösterilmiştir (57). Bağırsak hücrelerinin epitel hücrelerinde üretilen mukus salgısı, mikroplar, toksinler ve safra tuzu gibi iritanlara karşı koruyucu özellik göstermektedir. Bu salgı NO'nun sGC (siklik Guanilat siklaz)'yi aktive ederek kolinerjik salgıları indüklemesi ile sağlanmaktadır (58). Bununla birlikte, NOS2'nin aşırı ekspresyonu bağırsak epitel hücrelerinde elektrolit dengesinin bozulmasına neden olmaktadır (59).

2.3.3. Fare ve İnsanda NOS2 ekspresyonu

NO₂, NO'nun kendini oksitlemesi veya NO₂'nin myeloperoksidaz (*myeloperoxidase*, MPO) ve H₂O₂ tarafından oksidasyonu sonucu oluşmaktadır (60).

Biyolojik sistemlerde, canlı organizmanın türüne veya deneysel koşullara bağlı olarak NO üretiminde farklılıklar vardır (61). NOS2 hücrelerde fizyolojik koşullarda mevcut olmayan ancak sitokinler ve LPS gibi immünolojik veya mikrobiyal uyarılar tarafından güçlü şekilde indüklenen bir enzimdir (62).

NOS2, makrofajlar ve nötrofiller gibi bağışıklık tepkilerini oluşturan hücrelerin yanı sıra fibroblastlar, keratinositler, endotelial ve vasküler düz kas hücrelerinde de eksprese edilir (63). Fare makrofajlarında NO üretiminin olup olmadığı açık bir şekilde aydınlatılmıştır. Bunun yanında, insanlarda NOS2 tarafından indüklenen NO üretimi ise tartışmalıdır (63-66) .

İnsanda NOS2 ekspresyonunun olmadığını ifade eden araştırmalara göre, insan makrofajları çeşitli bakteriyel ürünler ve lenfositlerle uyarım sonucunda NO üretimini gerçekleştirmemektedir. İnsan makrofajlarının fungal ve mikrobiyal enfeksiyonlarla uyarımı ile yapılan bir çalışma sonucunda makrofajlarda ölçülebilir düzeyde nitrit/nitrat üretimi gözlenmemiştir (67). Schneeman ve arkadaşlarının yaptığı bir diğer çalışmada, insan makrofajları LPS, IFN- γ , GM-CSF ve TNF- α gibi sitokinlerle uyarılmış; ancak ortama BH₄ gibi kofaktörlerin eklenmesi halinde *in vitro* ortamda NOS2 ekspresyonu gözlenmemiştir (68). Nathan ve Bogdan, *in vitro* ortamda LPS ve IFN- γ ile uyarılan monosit-türevli makrofajlarda NOS2 ekspresyonunun olmamasının sebepleri arasında *in vitro* ortamın NOS2 ekspresyonunun uyarılmasında etkili olan faktörleri tam sağlayamadığı görüşündedir (69,70).

Fare alveolar makrofajları herhangi bir uyarana karşı NO üretirken, aynı uyarılar varlığında insan makrofajlarının çok az miktarda NO ürettiği veya NO üretiminin olmadığı görülmektedir. Bunun yanında fare modellerinde NO üretimi engellendiğinde hücre içi patojenlerin ortadan kaldırılmasında sorunlar meydana gelirken, aynı durum insan makrofajlarında gözlenmemiştir (71).

Kronik inflamatuvar hastalıkları olan bireylerden alınan alveolar makrofajlarda çok düşük miktarlarda NO üretimi olduğu gösterilmiştir. Bu doğrultuda yapılan moleküler çalışmalarda, insan makrofajlarının inflamatuvar sinyallerle indüksiyonu sonucunda bile NO üretmediğini bulmuşlardır. Ayrıca fare

makrofajlarının aksine insan makrofajlarında NOS2 geni tarafından kodlanan saptanabilir seviyelerde NOS2 proteini ifade edilmediği sonucuna varılmıştır. Buna neden olarak da insan NOS2 promoter bölgesinin transkripsiyon başlangıç bölgesine yakın CpG motiflerinin, metillenmiş olduğu gösterilmiştir. Fare makrofajlarında ise bu durum tam aksinedir (72).

Fare ve insan NOS2 gen promotörleri incelendiğinde; insan NOS2 promotöründe ekspresyonu sağlayan transkripsiyon faktörü bağlayıcı elementler, transkripsiyon başlangıç bölgesinin 3 ila 13 kb yukarısında yer alırken, fare promotör bölgesine bağlanabilen faktörlerin çoğu, transkripsiyon başlangıç bölgesinin 1 kb içindedir. Ayrıca, insan NOS2 promotörü endojen fare NOS2 promotörüne kıyaslandığında ekspresyon düzeyinde farklılıklar gösterir (73).

NOS2 ekspresyonunun düzenlenmesinde de türler ve hücreler arasında farklılık mevcuttur. NOS2'nin protein yapısı ve NO sentezinin kimyası fareler ve insanlar arasında benzer iken; NOS2 ekspresyonunun düzenlenmesi laboratuvar fareleri ve insanlar arasında farklıdır (74). *In vitro* ortamda fare makrofajları, LPS ve sitokinler dahil birçok uyarana yanıt olarak yüksek seviyelerde NOS2 eksprese eder, insan makrofajlarında ise durum biraz daha farklıdır (73). Örneğin, tüberküloz ile enfekte olmuş bireylerin makrofajlarında NOS2 saptanmasına rağmen; *in vitro* ortamda insan makrofajlarında aynı uyarana yanıt olarak NOS2 ifadesi görülmez (74).

İnsan peritoneal, alveolar ve kan kökenli makrofajların, LPS ve IFN- γ ile tedaviden sonra bile önemli miktarlarda NO salgıladığı bulunmamıştır. Ayrıca, fizyolojik koşullar altında kararsız olan NO'nun oksidasyon ürünü olan nitrit, LPS ve IFN- γ ile uyarılan insan makrofajlarından alınan süpernatantlarda da saptanmamıştır (75).

İnsanda NOS2 ekspresyonu olmadığını belirten araştırmaların aksine ekspresyonun varlığını ileri süren çalışmalar da mevcuttur (63, 76-78). İnsanda NOS2 ekspresyonunun varlığını göstermek amacıyla Buscher ve arkadaşları, fare ve insan makrofajlarında LPS yanıtının varyasyonunu ortaya çıkarmak amacıyla transkripsiyonel aktivasyon moleküllerini karşılaştırmışlardır. LPS'ye maruziyet

sonrasında insan makrofajlarında NF-kB transkripsiyon faktörü ile NOS2 ve IL-12b gen ekspresyonlarının arttığı bulunmuştur. Aynı şekilde, fare makrofajlarında da bu gen ekspresyonlarının artış gösterdiği ancak tür içi varyasyonun insan makrofajlarındaki gibi olmadığı tespit edilmiştir (76).

Hibbs ve arkadaşları, insan makrofajları üzerinde yaptıkları denemelerde fizyolojik koşullarda insan makrofajlarının NO üretmediğini; enfeksiyon veya inflamasyon durumunda ise NO üretiminin olduğunu göstermişlerdir. Bunu durumu da enfekte insanların doku makrofajlarındaki artmış NOS2 proteinini göstererek kanıtlamışlardır (77). İnsan monosit ve makrofajlarında NOS2 mRNA ifadesi LPS ve IFN- γ ile uyarmı sonucu gösterilmiştir. Bunun yanında, insan meme kanserinde tümör infiltre eden makrofajlarda NOS2 varlığı gösterilmiş ancak kanser hücrelerinde gözlenmemiştir. Bu tespit, insan makrofajlarının NO üretimi için kanser hücreleri ile doğrudan uyarılabildiğini ancak bazı tümör hücrelerinin makrofajların sadece belli bir popülasyonunda NO üretimini indüklediğini göstermektedir (63). Bir diğer çalışmada ise; *Mycobacterium avium* ve insan immün yetmezlik virüsü tip 1 (*human deficiency virüs type 1*, HIV1) ile enfeksiyondan sonra veya CD23 ve CD69 yüzey antijenlerinin ligasyonu ardından insan makrofajlarında NOS2 ekspresyonu ve NO üretimi de gösterilmiştir. Ancak NO üretebilen makrofajların her zaman CD23⁺ olmadığı da belirtilmiştir. Bu bulgular ile insan makrofajlarında NOS2 ekspresyonuna yol açan farklı aktivasyon mekanizmalarının olduğu sonucuna varılmıştır (63,78).

TNF- α 'nın parakrin etkisinin IFN- γ ile birlikte muamelesi sonucunda NO üretiminde artışa sebep olduğu sıçan ve insan alveolar makrofajlarında da tespit edilmiştir. IFN- α ve IFN- β fare makrofajlarında tek başına NOS2 indüksiyonuna neden olmaz iken, LPS ile beraber muamele edildiklerinde nitrit üretimini arttırmaktadırlar (63).

Fare makrofajlarında tüberküloza direnç NOS2 ekspresyonu ile ilişkilendirilmiştir. Aynı durum insan makrofajlarında tartışmalıdır. NOS2 eksprese eden makrofajlar tüberküloza sahip bireylerin akciğerlerinde tanımlansa da yetersiz olduğu görüşü mevcuttur. Bu da insan makrofajlarında da NOS2 eksprese edildiğini ancak fare makrofajlarındaki kadar yüksek oranlarda olmadığını göstermektedir

(79). NOS2 eksikliği olan farelerin kullanıldığı deneysel çalışmalar, vahşi tipteki (*wild type*) türlerine göre çok çeşitli bulaşıcı hastalıklara ve sepsise daha duyarlı olduklarını belirlemiştir. Bu da koruyucu immün yanıtlar için NOS2 tarafından NO üretiminin gerekli olduğunu göstermiştir. Aynı çalışmalar tüberkülozu olan hastalarda tekrarlandığında fare çalışmalarlarıyla tutarlı olduğu gözlenmiştir (80).

Sitokin uyarımı ve transkripsiyon faktörleri NOS2 ekspresyonunun uyarılmasında rol alır. IL-1 β ve TNF α stimülasyonu, NF- κ B'nin aktivasyonuna ve nükleer translokasyonuna yol açarken, IFN- γ stimülasyonu STAT-1 ve IRF-1 aktivasyonu ile sonuçlanır (81,82). İnsan NOS2 promotörü bu faktörlere ek olarak, AP-1, C/EBP, CREB, GATA, HIF, KLF6, NFAT, Oct1, PARP1, p53 için de bağlanma bölgelerine sahiptir (83). Vera ve arkadaşları AKN-1 insan hepatosit hücre hattı ile yaptıkları çalışmada TNF- α , IFN-1 β , IFN- γ ve LPS ile uyarımlar sonucunda NOS2 gen ekspresyonunun zamana bağlı olarak indüklendiğini ve 4.saatte maksimum olarak eksprese edildiğini göstermişlerdir. IFN- γ 'nın NOS2 ekspresyonunu indüklemeye etkili sitokin olduğunu belirtmişlerdir (84,85).

2.4. Myeloid Hücreler ve NOS2 ilişkisi

2.4.1. Myeloid Hücreler

Myeloid hücreler; granüositler, monositler, makrofajlar ve dendritik hücrelerden oluşan hücre grubudur (Şekil 3). Bu hücreler kan ve lenfatik sistemde dolaşan hücrelerdir. Doku hasarı ve enfeksiyon gibi durumlarda çeşitli kemokin reseptörleri ile hızla bu bölgelere göç etmektedir. Kandan dokulara geçtiklerinde aktive olup, fagositoz yapabilme yeteneği ve inflamatuvar sitokinleri salgılama özellikleri kazanarak koruyucu bağışıklıkta önemli rol oynamaktadır. Ayrıca homeostazisin kontrolü, doku onarımı gibi durumlarda dokularda kalabilirler (86).

Granüositler, kan dolaşımında en fazla bulunan myeloid hücre grubu olup; nötrofiller, eozinofiller ve bazofiller olmak üzere 3 alt grupta incelenmektedir (86). Nötrofiller, bakteriyal ve fungal enfeksiyonlara karşı ilk savunma hattı olup, dolaşımda en çok bulunan lökositlerdir. Kısa ömürlü hücreler arasındadır ve kemik iliğinden sürekli olarak üretilmektedir. Patojenlere karşı savunma sistemlerini

antimikrobiyal ajanlar, örneğin reaktif oksijen radikalleri (*reactive oxygen species*, ROS) üreterek gerçekleştirirler. Bunun dışında, çeşitli otoimmün ve inflamatuvar hastalıklarda doku hasarı oluşturarak kanserin ilerlemesine de sebep olabilirler (87). Eozinofiller, parazitlere ve alerjenlere karşı immün yanıtlarda önemli hücreler olup, gastrointestinal sistem ve kemik iliği gibi çeşitli organlarda bulunmaktadır. Bu hücrelerin çok az bir kısmı periferik kanda dolaşımına katılır ve iltihap bölgelerine Th2 hücreleri tarafından uyarıldıkları zaman infiltre olurlar (88). Bazofiller, dolaşımda en az bulunan hücrelerdir. Bu hücreler düz kaslar, bağ dokusu, mukozal bezler ve inflamatuvar hücreler üzerinde etkilidirler ve histamin, proteazlar, kemotaktik faktörler üreterek inflamasyonda ve ani gelişen alerjik reaksiyonlarda görev alırlar (89).

Kırmızı kan hücreleri (RBC) olarak da adlandırılan eritrositler, kanda en bol bulunan hücre grubudur. Vücuttaki tüm fizyolojik süreçlerde rol almakla beraber temel görevleri tüm hücre ve dokulara oksijenin taşınmasıdır (90).

Megakaryositler, trombosit üretiminden sorumlu hücreler olup, kemik iliğindeki en büyük hücrelerdir (91).

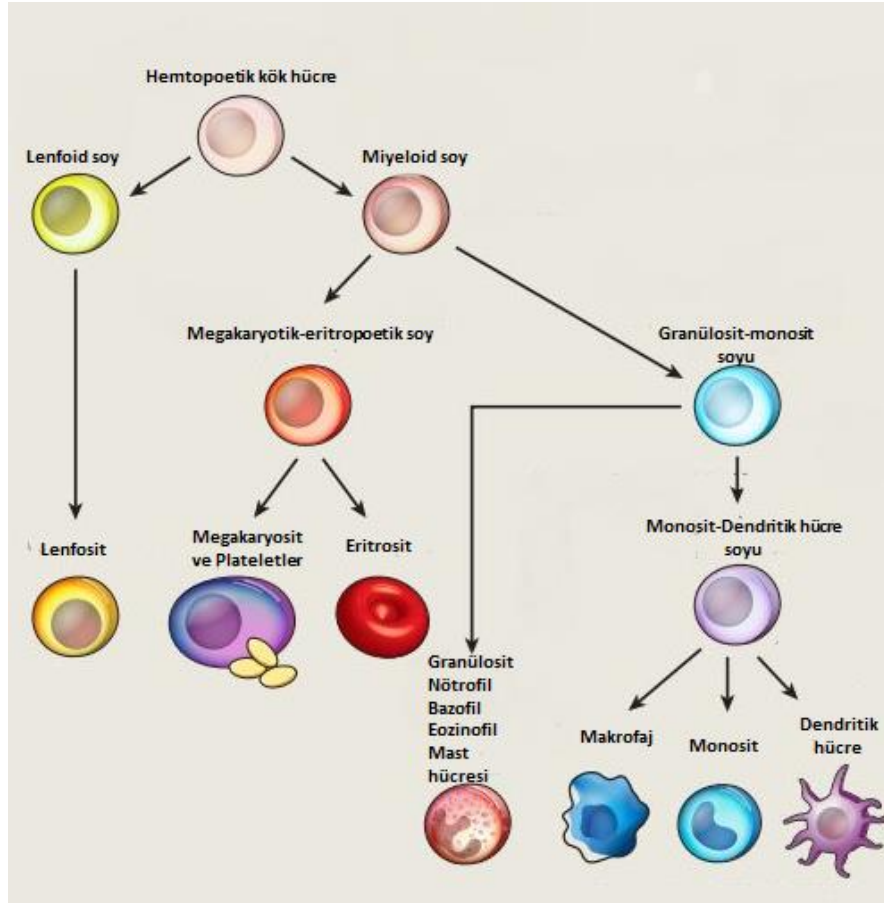
Mast hücreleri, bağ dokularında bulunan myeloid kökenli hücrelerdir. Bu hücreler fizyolojik koşullarda vazodilatasyon, vasküler homeostaz, doğuştan gelen ve kazanılmış immün tepkilerin oluşturulması, anjiyogenez ve zehir detoksifikasyonunu düzenlemektedir. Bununla birlikte, alerji, astım, anafilaksi, gastrointestinal bozukluklar, birçok malignite türü ve kardiyovasküler hastalıklar gibi birçok hastalığın patofizyolojisinde de rol oynamaktadır (92).

Dendritik hücreler, antijen işleyen ve sunan özelleşmiş hücrelerdir. Bu özellikleri ile kazanılmış immün yanıtların başlatılmasında ve düzenlenmesinde büyük işlevlere sahiptirler. Ayrıca immünolojik hafıza ve toleransın gelişmesinde de büyük rol oynarlar (93).

Monositler, kan, kemik iliği ve dalakta bulunan hücrelerdir. Enfeksiyon sırasında kandan dokulara göç ederek kemokin reseptörleri ve patojen tanıma reseptörleri ile aktive olan inflamatuvar dendritik hücrelere veya makrofajlara

dönüşürler. İnflamatuvar sitokinler üreterek bağışıklık savunmasında görev almaktadırlar (94).

Makrofajlar, lenfoid ve lenfoid olmayan dokularda yerleşik fagositik hücrelerdir ve apoptotik hücrelerin temizlenmesi ve büyüme faktörlerinin üretimi yoluyla doku homeostazına katkıda bulunurlar (86).



Şekil 2.3. Kemik iliği kaynaklı Miyeloid projenitor hücrelerden köken alan Miyeloid hücre alt grupları (96)

2.4.2. Monosit-Makrofaj Farklılaşması ve Makrofaj Polarizasyonu

Doğal bağışıklık sistemi, hücre içi ve dışı tehlike sinyallerine ve çeşitli mikroorganizmalara karşı ilk savunma hattını oluşturarak; inflamasyonun başlangıcı, gelişimi, sonlanması ile doku bütünlüğünün yeniden sağlanmasında görevli sistemdir (43). Bu sistem içinde temel olarak rol oynayan hücre grubu mononükleer fagosit sistem (*mononuclear phagocyte system*, MPS) hücreleridir. MPS hücreleri, hem

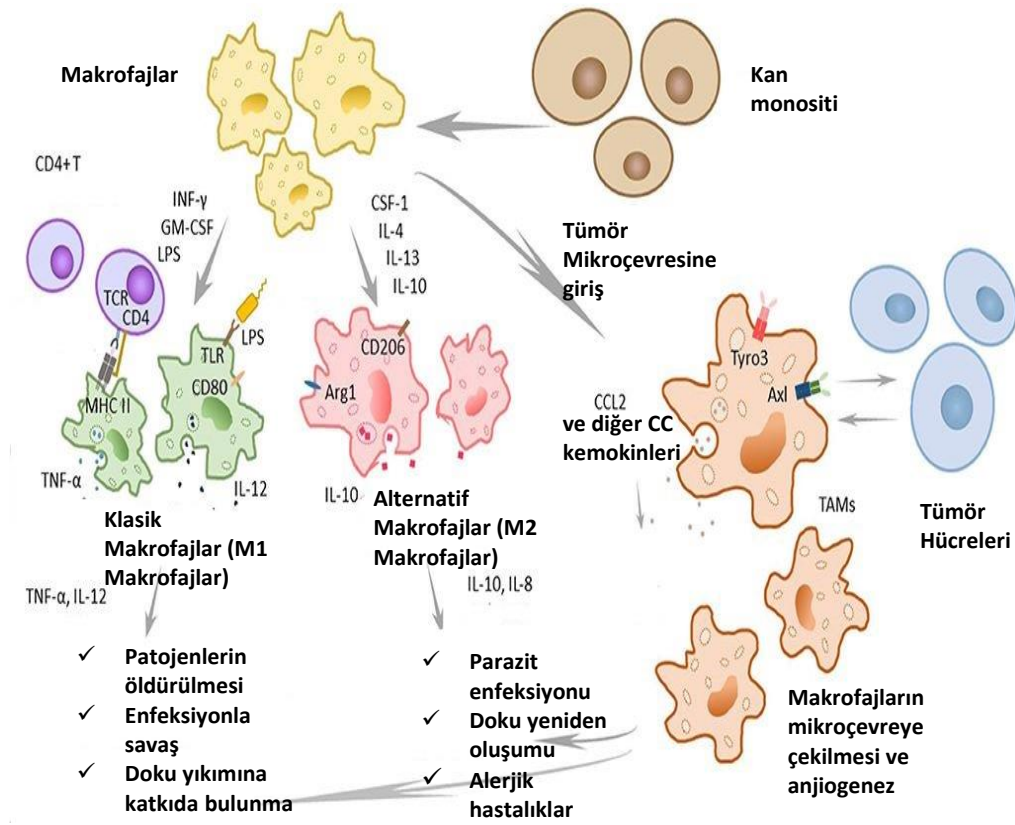
yabancı ajanın ortadan kaldırılması hem de inflamatuvar sürecin kontrol edilerek inflamasyon oluşmasını ve organizmanın savunmasını sağlayan hücrelerdir (43). Bu hücre grubunu kemik iliğinden köken alan dolaşımdaki monositler, doku makrofajları ve dendritik hücreler oluşturmaktadır. Mononükleer fagosit sistem hücrelerinin gelişimi, proliferasyonu, farklılaşması ve işlevleri koloni uyarıcı faktör (*colony stimulating factor*, CSF-1) ve IL-34 tarafından düzenlenmektedir (95).

Monositler, kanda, kemik iliğinde ve dalakta dolaşan hücreler olup; insanlarda toplam lökositlerin yaklaşık % 10'unu, farelerde ise %2-4'ünü oluşturmaktadır. Düzensiz bir hücre şekline, oval veya böbrek şeklinde çekirdeğe, sitoplazmik veziküllere ve yüksek sitoplazma/çekirdek oranına sahiplerdir (43). Bir veya iki gün kan dolaşımında bulunup; bu süreçte herhangi bir tehlike sinyali ile karşılaşmadıkları durumda dokulara geçiş yapmadan apoptoza uğrayarak ölmektedirler. Monositlerin kan aracılığı ile vücuttaki çeşitli dokulara yerleşme ve burada olgunlaşarak makrofajlara dönüşme kapasiteleri vardır (96).

Makrofajlar, patojenlere karşı immün cevapta efektör hücreler olup, doğuştan gelen ve kazanılmış bağışıklık tepkilerinin düzenlenmesinde temel rol oynamaktadır. İnflamasyon varlığında makrofajların sayıları artarak hasara yol açan patojenleri fagosite ederler ve ardından ROS, NO ile IL-1 β , IL-6 gibi sitokinler üreterek bu patojenleri ortadan kaldırırlar (97). Ayrıca, dokunun yeniden şekillenmesi ve onarımında da öneme sahiplerdir (86).

Makrofajların bir diğer önemli özelliği de antijen sunumunda rol oynamalarıdır. Majör doku uygunluk kompleksi (*major histocompatibility complex*, MHC) molekülleri aracılığı ile fagosite ettikleri patojenlerden kaynaklı antijenleri doku mikroçevresinde bulunan T hücrelerine sunarlar (98). Dokuya yerleşik halde bulunan makrofajların yolk kesesi, fetal karaciğer ve kemik iliği olmak üzere üç ayrı gelişim yeri bulunmaktadır. Başlangıçta yolk kesesinde bulunan öncül hücrelerden, sonrasında farklı organlara göç eden fetal karaciğerdeki monositlerden gelişirler (99). Doğumdan sonrasında ise gelişim yeri kemik iliğidir (98). Dokuya yerleşik halde bulunan makrofajlar, yetişkin memelilerin hemen hemen tüm dokularında bulunan ve toplam hücre sayısının yaklaşık %10-15'ini oluşturan heterojen ve değişken

yapıda hücrelerdir (Şekil 2.4). Bu oran, inflamatuvar uyarılara yanıt sırasında artmaktadır (43). Doku makrofajları, buldukları dokularda farklı isimler almaktadırlar. Kemikte osteoklast, akciğerde alveolar makrofajlar, beyinde mikroglia hücreleri, bağ dokuda histiyosit, karaciğerde Kuppfer hücreleri ve deride Langerhans hücreleri olarak ifade edilir (100). Bütün makrofaj popülasyonları aynı fonksiyonel özelliklere sahip olup; doku gelişiminde, patojenlere karşı oluşturulan bağışıklık yanıtta, dokuda meydana gelen değişikliklerin izlenmesinde ve homeostazın sağlanmasında görevlidirler (43). Doku makrofajlarının çoğalması, kendi kendilerini yenileme şeklinde gerçekleşmektedir. Bu süreç büyüme faktörleri, CSF-1 ve GM-CSF gibi sitokinleri tarafından düzenlenmektedir. Doku makrofajlarının sayıları inflamasyon sırasında artış göstermektedir (101, 102).



Şekil 2.4. inflamatuvar yanıtlarda makrofaj polarizasyonu (1)

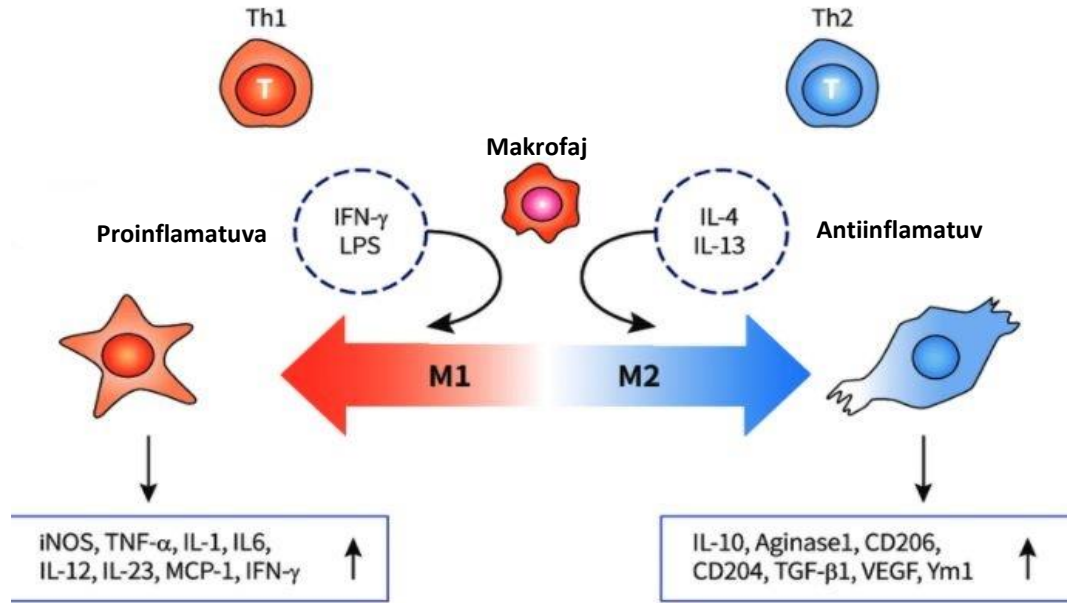
Makrofaj polarizasyonu, zamana ve dokuya bağılı olarak, sitokinler, büyüme faktörleri, yağ asitleri, prostaglandinler ve patojenden türetilmiş moleküller olmak üzere içsel, dışsal ve doku mikroçevresi uyarılarını içeren bir süreçtir (103). Makrofajların fonksiyonel plastisitesi, doku hasarının ve enfeksiyonun ortadan kaldırılmasında önemli bir özelliktir (43). Dokuda meydana gelen inflamasyon varlığında, dokuda bulunan monosit-kökenli makrofajlar, çeşitli pro-inflamatuvar ve anti-inflamatuvar sinyallere cevap olarak M1 veya M2 fenotiplerine polarize olmaktadır (Şekil 2.5) (43, 104).

Klasik olarak aktive edilmiş makrofajlar veya M1 makrofajları, hücre içi patojenlere karşı ilk savunma hattını oluşturur, CD4 hücrelerinin Th-1 polarizasyonunu destekler. Toll benzeri reseptörler (*toll like receptor*, TLR), LPS gibi mikrobiyal ürünler ve IFN- γ sinyalleri ile indüklenerek (105), IL-1 β , IL-6, IL-12, TNF α ve tip I IFN gibi pro-inflamatuvar sitokinler ile CXCL1, CXCL3, CCL3, CXCL16 gibi kemokinleri üreterek, akut inflamatuvar uyarılara cevap oluştururlar. Aynı zamanda IL-12 aracılı Th1 hücrelerinin aktivasyonunu destekler, MHC moleküllerinin ekspresyonu ile kompleman aracılı fagositozu sağlarlar (106). M1 makrofajları, reaktif oksijen ve nitrojen ara ürünlerinin kaynağı olup, antimikrobiyal ve antikanser direncine de aracılık eder (107).

İnflamasyon bölgesinde M1 makrofajlar, patojenlerin ve kanser hücrelerinin ortadan kaldırılmasında ve meydana gelen hücre kalıntılarının da ortamdan uzaklaştırılmasında görevlidir. Dokuda onarımın ve yeniden şekillenmenin indüklendiği anti-inflamatuvar sinyaller, M1 makrofaj fenotipinin M2 makrofaj fenotipine dönüşümünde rol alır (108).

Alternatif olarak aktive edilmiş makrofajlar veya M2 makrofajları, temel olarak yara iyileşmesinde ve doku onarımında rol oynar, Th2 lenfositlerinin efektör işlevlerini destekler, inflamasyonun baskılanmasını sağlayıp, neovaskülarizasyona sebep olurlar. Ayrıca, alerjik reaksiyonlarda ve parazitlerin yok edilmesinde de etkindirler. M2 makrofajlar, arginaz-1, IL-10 ve TGF β gibi anti-inflamatuvar sitokinler, mannoz ve çöpçü (*scavenger*) reseptörlerini eksprese etmektedir (104). M2 makrofajları kendi içinde üç alt gruba ayrılmaktadır: M2a, IL-4 ve IL-13 sitokinleri

tarafından uyarılır ve profibrotik özelliğe sahiptir. M2b, immün kompleksler, Toll benzeri reseptörler veya IL-1 reseptör agonistleri tarafından indüklenmektedir. M2c ise, IL-10, TGF- β ve glukokortikoidler tarafından uyarılır (109).



Şekil 2.5. Makrofaj polarizasyonu ile ilişkili belirteçler (2)

Makrofajlar, tümör mikroçevresinde bulunan önemli hücrelerdendir. Tümör-ilişkili makrofajlar (*tumor-associated macrophages*, TAM) ise bu hücrelerin büyük bir kısmını oluşturmaktadır (110). TAM'ların CD8⁺ sitotoksik T lenfositlerinin infiltrasyonunu ve etkisini önleme, vasküler endotelial büyüme faktörünü (*vascular endothelial growth factor*, VEGF) eksprese ederek anjiyogenezi etkinleştirme ve tümör hücresi proliferasyonu ile metastazını uyarma gibi çeşitli görevleri vardır (111). TAM'lar mikroçevreden gelen sinyallere bağlı olarak fenotiplerini değiştirebilen hücrelerdir. Bu özelliklerine bağlı olarak tümör hücrelerini öldürebilmekte veya tümör hücre büyümesini ve metastazını desteklemektedir. Tyro3, Axl ve MerTK dahil olmak üzere TAM reseptör ailesinden oluşan bazı özel reseptör tirozin kinazlar vardır ve bu reseptörler sadece tümör hücreleri ile

etkileşimde önemli olmakla kalmaz, aynı zamanda makrofaj polarizasyonu ve otoimmün hastalıkta da rol oynamaktadırlar (112).

2.4.3. Makrofajlarda NOS2 ekspresyonu:

NOS2 üretiminde önemli olan makrofajlar, hücre içi patojenlere, virüslere ve tümör hücrelerine karşı antimikrobiyal ve sitotoksik savunmada etkilidir. LPS, gram negatif bakterilerin hücre duvarında bulunan temel moleküllerden biri olup, tek başına veya IFN- γ ile birlikte makrofaj aktivasyonunu gerçekleştirerek NO üretimini sağlamaktadır (45). Makrofajlar tarafından artmış NO üretimi, TLR4'ün LPS ile aktivasyonu ile ilişkilidir (113). Makrofajlar TLR4 ile uyarıldıklarında MyD88 bağımlı ve MyD88 bağımsız Toll / IL-1 reseptörünü (TIR) içeren sinyal yolları aktive olup, çeşitli sitokinlerin ve mediyatörlerin salınımı gerçekleşir (113). LPS, MyD88'e bağımsız sinyal yolağı aktive olduğunda IRF3 transkripsiyon faktörünü aktive etmektedir. MyD88'e bağımlı sinyal yolağı aktive olduğunda ise; NF- κ B transkripsiyon faktörünün aktivasyonu gerçekleşmektedir (114). TLR'den bağımsız olarak NOS2 ekspresyonu, *Mycobacterium tuberculosis* enfeksiyonunda IFN- α ve IFN- β üretimi ve STAT1 aktivasyonu yoluyla gerçekleşir. Bu durumda IFN uyarımı sonucunda IFN düzenleyici faktör 1 (*interferon regulating factor 1*, IRF1) 'in aktivasyonu ile NOS2'nin promotör aktivitesi ve ekspresyonu artış göstermektedir (113).

LPS ile uyarılan makrofajlarda, protein kinaz C (*protein kinase C*, PKC) aktivasyonu olur. PKC aktivasyonu sonucu NOS2 ekspresyonu indüklenerek NO üretimi artmaktadır. (115). LPS patojen ve hasarla ilişkili moleküler aracılığı tanıyan TLR reseptör ailesinden olan TLR4'e bağlanır. Bu reseptörler gen transkripsiyonunu uyararak eden ve proinflamatuvar yanıtın indüklenmesini sağlayan sinyaller oluşturur. Bunun sonucunda makrofajlarda sitokin üretimi, antijen sunumu ve NOS2 ekspresyonunun artışı ile NO üretimi gerçekleşir (86). NO, makrofajlar tarafından kanser hücresi büyümesinin inhibisyonu için gereklidir. Yapılan çalışmalarda, aktive edilmiş makrofajlarda NOS2'nin indüksiyonu hem NO üretimini arttırmış hem de tümör hücrelerinin büyümesinin azaltılarak tümörün yok edilmesine neden

olmuştur. Dolayısıyla, aktive edilmiş makrofajlar tarafından NOS2'nin indüksiyonu, tümörisidal M1 makrofajların ayırt edici özelliği olarak belirlenmiştir (115).

Akut ve kronik inflamatuvar koşullar altında makrofajlarda artan NOS2 ekspresyonu ve NO üretiminin yanı sıra ROS üretiminde de artış görülmektedir. Buna ilişkin bir çalışmada, LPS ve IFN- γ 'nın birlikte kombinasyonu *in vitro* ortamda Raw264.7 makrofajlarının aktivasyonunu sağlamıştır. Bu makrofajlarda NADP⁺/NADPH oranında artış sonucunda Nox2 (NADPH oksidaz 2) seviyelerinin arttığı gözlenmiş ve ROS üretiminde artış tespit edilmiştir (116).

Kemik iliği kökenli makrofajların *in vitro* koşullarda hipoksiye maruziyeti sonucunda M1 benzeri fenotipin indüklendiği ve NO üretimi ile inflamatuvar yanıtta katkıda buldukları rapor edilmiştir.(117).

GM-CSF veya IFN- γ gibi sitokinler veya LPS gibi mikrobiyal uyarımlar makrofajların M1 alt tipine polarizasyonunu sağlamaktadır. M1 makrofajlar yüksek düzeyde IL-12, IL-1, IL-6, IL-23, TNF- α ve CXCL10 eksprese edip, Th-1 hücre aktivasyonuna sebep olurlar (44). IFN- γ , M1 makrofajların hücre içi patojenlere karşı aktivasyonunda, inflamasyonda ve konakçı savunmasında anahtar rol oynar. Ayrıca, NF-KB ve STAT1 gibi transkripsiyon faktörlerini aktive ederek NOS2 promotörüne bağlanmasına sebep olur ve NOS2 ekspresyonunu sağlar. RAW264.7 makrofaj hücrelerinde IFN- γ ve IL-17 sitokinleri ile birlikte uyarım sağlandığında bu hücrelerde STAT1 ve NF-kB sinyal yollarının aktivasyonu sonucunda NOS2 ekspresyonu ve NO üretiminin gerçekleştiği bulunmuştur. (48).

M1 makrofajları ile ilişkili transkripsiyon faktörlerinden biri IRF ailesinden IRF5 olup, tip I interferon, TNF, IL-6, IL-12 ve IL-23'ü aktive eden genlerin aktivasyonunda rol alır (118). Farelerde IRF5, *Leishmania donovani* enfeksiyonu sonucunda NOS2 ekspresyonunu aktive eder. IRF5 geni susturulmuş fareler, Newcastle hastalığı virüsü enfeksiyonu sonucunda tip I IFN indüksiyonunun azaltmıştır (44). IRF5 insan M1 makrofajları için de oldukça önemli olup, vücutta yerleşen bakterileri NF-kB, MAPK ve AKT sinyal yollarının aktivasyonu aracılığıyla NOS2 ekspresyonunu indükleyerek ortadan kaldırmaktadır. (119).

M1 makrofajlar mikroorganizmalara ve neoplastik hücrelere karşı yüksek düzeyde reaktif oksijen ara ürünlerini üreterek sitotoksik aktivite gösterirler. Aynı zamanda M1 makrofajlar LPS'ye yanıt olarak trombosit aktive edici faktör, prostaglandinler, enzimler ve nitrik oksit gibi serbest radikaller olmak üzere çok çeşitli moleküllerin salınmasını da aktive ederek, istilacı patojenlerin büyümesini ve yayılmasını önlemektedir (120). Tümör mikroçevresinde makrofaj polarizasyonu kanserden ve tümör mikroçevresi kaynaklı faktörlerden etkilenmektedir (121). Tümör oluşumunun erken dönemlerinde tümör mikroçevresinde bulunan dokuya infiltre makrofajlar M1 karakteri ile bağışıklık tepkisini oluşturmak adına inflamasyonu başlatmaktadır. Bunun yanında, M1 makrofajlar tümörün büyümesini baskılayarak ve metastazı engelleyerek kanser derecesinin ilerlemesini engellemektedir (122). Bunun yanında IFN- γ uyarımına bağlı olarak M1 fenotipine polarize olan makrofajlar anjiyogenezi önlemektedir. Diğer taraftan IFN- γ sinyali, kanser hücrelerinde MHC1 sunumunun uyarılmasına katkıda bulunur ve böylece kanser hücrelerini sitolize duyarlı hale getirerek tümöre karşı savunmada katkıda bulunur (121).

Ma ve arkadaşları, lenf nodu metastazı olan küçük hücreli akciğer kanseri hastalarında lenf nodu metastazı olmayan hastalara göre yoğun M1 makrofaj popülasyonu bulmuşlardır. Bu durum M1 makrofajların ürettikleri reaktif oksijen ve nitrojen ara ürünleri ile TNF α gibi sitokinler aracılığıyla tümör büyümesinin/ilerlemesini engellediklerini göstermektedir (123).

2.4.4. Meme Kanseri ile ilişkili TAM hücreleri ve NOS2 ekspresyonu

TAM'lar, tümör mikroçevresinde dokuda yerleşik makrofajlar ve dolaşımdaki monositler olmak üzere iki ana hücreden köken alıp, M-CSF, CCL2 ve CCL5 gibi büyüme faktörleri ile kemokinler tarafından uyarılmaktadır (124).

Meme kanseri, kadınlarda en sık görülen kanser türü olup, kansere bağlı ölümlerin %30'unu oluşturmaktadır (125). TAM infiltrasyonu, meme kanserinde kötü prognoz ile ilişkilidir. Kanserde TAM'lar, tümör büyümesine ve ilerlemesine aracılık eder ve tedaviye direnç göstererek tümör gelişimine sebep olur. TAM'lar

meme kanserinde intra-tumoral hücre popülasyonunun %50'sinden fazlasını oluşturur (126). Ayrıca, meme kanserinde yüksek düzeyde TAM infiltrasyonunun negatif hormon reseptör varlığı ile korele olduğu gösterilmiştir (111).

Meme kanseri ile ilgili yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda, kanser hücreleri tarafından salgılanan M-CSF-1, TAM'ların tümör mikroçevresine lokalizasyonu ile ilişkilidir. M-CSF-1, Epidermal büyüme faktörünün (*epidermal growth factor*, EGF) ekspresyonunu arttırarak anjiyogenezi desteklemektedir. EGF'in yanı sıra vasküler endotelial büyüme faktörü-A (*vascular endothelial growth factor-A*, VEGF-A), IL-4 ve IL-10 varlığında TAM infiltrasyonu ve M2 polarizasyonunu indükleyerek tümör büyümesine katkıda bulunmaktadır (127). TAM'lar tarafından salınan matriks metaloproteinazlar (MMP), metastatik sürece katkıda bulunur. Tümör mikroçevresinde bulunan dokuya yerleşik makrofajlar, ilgili dokuya monosit geçişini devam ettirir ve TAM birikimini sürdürür. Monositler ilk olarak M1 fenotipine polarize olarak ROS, NO ve IL-12 salımını arttırarak tümör hücrelerini yutma ve öldürme işlevine sahiptir. Ardından polarize olan M2 popülasyonuna ait TAM'lar ise IL-10, VEGF salımını arttırarak anjiyogenez ve tümörigenezi desteklemektedir (128, 129).

TAM'lar, tümör oluşumunun erken aşamalarında, tümör hücresi apoptozunu başlatmak için NOS2 aktiviteleri aracılığı ile yüksek düzeylerde NO üretirler (110). Tümör hücresi apoptozdan kaçıp büyümeye devam ettiğinde ise yeniden programlanırlar ve tümör büyümesini teşvik etmek için daha düşük miktarlarda NO sentezlerler. (111).

NOS2'nin yüksek düzeyde ekspresyonunun ve artan NO üretiminin, meme kanseri hücrelerinin kemoresistansını ve metastazını düzenlediği kanıtlanmıştır (130). Meme kanserinde NOS2 aktivitesi sonucu NO üretiminin tümör mikroçevresinde hipoksinin oluşumu ile IFN- γ ve ekzojen NO üretimine bağlı olarak gerçekleştiği gösterilmiştir (124).

Metastatik MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattı ile yapılan bir çalışmada, IFN- γ ile uyarmı sonucunda IFN/JAK/STAT sinyal yolağının aktivasyonu ile NOS2 ekspresyonunun ve nitrit miktarının arttığı gösterilmiştir (131). NOS2 ekspresyonu

ve nitrit artışı, tümör hücreleri fenotipinin daha agresif olmasına ve klinik açıdan daha dirençli tümörlerin gelişmesine neden olmaktadır (132).

NOS2 ekspresyonu, ER⁻ meme kanseri kadın hastalarda kötü prognoz ve sağkalım süresinin azalması ile ilişkilidir. Ayrıca, NOS2 varlığının, artmış mikro-damar yoğunluğu, p53 tümör baskılayıcı genin inaktivasyonu ve aktive edilmiş EGFR belirteçleri ile korelasyonu gösterilmiştir (133). ER⁺ ve ER⁻ tümörlerde tümör mikroçevresindeki bazı farklılıkların da NO üretimini etkilediği belirtilmiştir. ER⁻ tümörler, ER⁺ tümörlere kıyaslandığında daha fazla TAM varlığına sahip olma eğilimindedir. Dolayısıyla ER⁻ tümörlerde daha yüksek seviyelerde proinflamatuvar sitokin üretilmektedir. Buna bağlı olarak, ER⁻ tümörlerde üretilen NO miktarı ER⁺ tümörlere göre daha fazladır (131).

Bu bilgiler doğrultusunda yapılan çalışmada, monosit-makrofaj dönüşümü sırasında myeloid hücrelerin geçirdiği eş zamanlı aktivasyon ve farklılaşma süreçlerinin NOS2 ifadesini ne şekilde değiştirdiği ve insan myeloid hücrelerinde NO ekspresyonu incelendi.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Çalışmada Kullanılan Malzemeler

Dulbecco's modified eagle medium (DMEM), RPMI 1640, penisilin/streptomisin çözeltisi, L-glutamin, fetal siğır serumu (fetal bovine serum, FBS), 10x Tripsin–EDTA (Biological Industries, İsrail; Lonza, İsviçre; Biowest, Fransa); fosfat tamponlu tuz çözeltisi (phosphate buffered saline, PBS) (Advansta, ABD); tripan mavisi, sodyum florür, fenilmetilsülfonil florit (phenylmethanesülfonil flüoride, PMSF), etilen diamin tetra asetik asit (EDTA), tris, β -merkaptoetanol, etanol, dietilpirokarbonat (diethylpyrocarbonate, DEPC), radyo-immün presipitasyon analizi (radio-immunoprecipitation assay, RIPA) tampon çözeltisi, proteaz inhibitör kokteyli, siğır serum albümin (bovine serum albumine, BSA), protein belirteci, polivinildiflorid (PVDF) membran, filtre kağıdı, bikinkoninik asit (bicinchoninic asit, BCA) protein analiz kiti, DNaz enzimi (DNase I), Dream Taq tampon çözeltisi, Taq polimeraz enzimi, 25 mM dNTP çözeltisi, 50 baz çifti (bç) DNA belirteci, oligo(dT) primerler, 4x reaksiyon tampon çözeltisi, ribonükleaz inhibitörü (RiboLock), ters (reverse) transkriptaz (RT) enzimi (Thermo Scientific, ABD); 100 bç DNA belirteci (GeneDirex OneMark 100, ABD) calyculin A, β -aktin tavşan anti-insan monoklonal antikoları, anti-fare IgG HRP bağılı sekonder antikolar (Cell Signaling, ABD); forbol 12-miristat 40 13-asetat (phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA), sodyum dodesil sülfat (SDS) (JT Baker, ABD); amonyum persülfat (APS), tetrametiletildiamin (TEMED), SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix çözeltisi (BioRad, ABD); glisin, metanol, MayGrünwald çözeltisi, Giemsa çözeltisi, entellan (Merck, Almanya); tween-20 (AppliChem, Almanya); yağsız süt tozu (Pınar, Türkiye); RNeasy Mini Kit (Qiagen, ABD); RNA temizleme ve konsantre etme kiti (Zymo Research, ABD); yükleme boyası (6x; Thermo Scientific, ABD; BioRad, ABD); Tris Borat EDTA (10x; Gibco, ABD); agaroz (Lonza, İsviçre); polimeraz zincir reaksiyonlarında (PZR) kullanılan oligonükleotitler (Sentegen, Türkiye); rekombinant insan IFN- γ , LPS (R&D, ABD); fiksasyon ve permeabilizasyon çözeltisi (Cytofix/Cytoperm), permeabilizasyon yıkama tampon çözeltisi (1x; PermWash Buffer), fare anti-insan fibronektin

monoklonal antikoru (BD, ABD); karboksi-diklorodihidrofloresan diasetat (H₂DCFDA), 4,5-diaminofloresan Diasetat (DAF₂DA), monoklonal anti-NOS2 antikoru (BioLegend), Griess kiti (Thermo Scientific, ABD).

3.2. Çalışmada Kullanılan Çözeltiler

Tam DMEM Besiyeri: Ticari olarak temin edilen yüksek glikoz (4.5 g/L) ve L-glutamin (2 mM) içeren DMEM besiyeri ortamına son konsantrasyonu %10 olacak şekilde ısı ile inaktive edilmiş (56°C, 20 dk.) FBS ve son konsantrasyonu %1 olacak şekilde penisilin/streptomisin eklendi. Hazırlanan tam besiyeri 4°C'de saklandı.

Tam RPMI 1640 Besiyeri: Ticari olarak temin edilen RPMI 1640 besiyeri ortamına son konsantrasyonu %10 olacak şekilde ısı ile inaktive edilmiş (56°C, 20 dk.) FBS ve son konsantrasyonu %1 olacak şekilde penisilin/streptomisin eklendi ve hazırlanan tam besiyeri 4°C'de saklandı.

%20 FBS içeren Tam RPMI 1640 Besiyeri: Ticari olarak temin edilen RPMI 1640 besiyeri ortamına son konsantrasyonu %20 olacak şekilde ısı ile inaktive edilmiş (56°C, 20 dk.) FBS ve son konsantrasyonu %1 olacak şekilde penisilin/streptomisin eklendi ve hazırlanan tam besiyeri 4°C'de saklandı.

PBS Tampon Çözeltisi (1x): Ticari olarak temin edilen ve 150 mM sodyum klorür ile 10 mM sodyum fosfat içeriğinde toz formundaki PBS, 500 mL distile suda (dH₂O) çözülerek, 7.2 pH değerine sahip 1x PBS tampon çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan çözelti hücre kültürü deneyleri için otoklavlanarak sterilize edildi ve 4°C'de saklandı.

TBS-Tween-20 (TBS-T) Tampon Çözeltisi: Western-Blot deneylerinde kullanılmak üzere 1 M konsantrasyonunda Tris (pH = 8, 20 ml), 5 M konsantrasyonunda NaCl çözeltisi (30 ml) ve Tween 20 (5 ml) solüsyonu karıştırıldı; distile su ile son hacim 1 lt'ye tamamlandı. Hazırlanan çözelti 4°C'de saklandı.

Jel Yürütme Tampon Çözeltisi: Western Blot deneylerinde kullanılmak üzere, kit içeriğinde bulunan 10x konsantrasyonundaki Tris/Glisin/SDS tampon çözeltisi distile su ile 1x konsantrasyona seyreltilti. Hazırlanan jel yürütme tampon çözeltisi oda sıcaklığında saklandı.

SDS-jel Yükleme Tampon Çözeltisi: Çeker ocağın içinde Western Blot kit içeriğinde bulunan 4x örnek yükleme tamponundan 95 µl, β-merkaptolanol'den ise 5 µl alınarak, 2 ml'lik tüp içerisinde çözelti hazırlandı. Hazırlanan çözelti 4°C'de saklandı. 4x örnek yükleme tamponu içeriğindeki Tris-HCl, tampon görevi görürken, gliserol örneklerin kuyulara çökmesini sağlamakta, bromfenol mavisi ise örneğin jelde yürütülürken takibinde yardımcı olmaktadır. β-merkaptolanol ise protein konformasyonunun primer yapıya dönüşmesini sağlamaktadır.

Transfer Tampon Çözeltisi: Final konsantrasyonu; 24 mM tris ve 200 mM glisin olacak şekilde distile su içerisinde 5x konsantrasyonda hazırlandı. Elde edilen çözelti +4°C'de saklandı. Transfer tampon çözeltisi kullanılmadan önce; absolut metanol ve distile su ile 1:1:3 oranında karıştırılarak 1x konsantrasyona seyreltildi.

Tripan Mavisi: Toz formunda bulunan tripan mavisi son konsantrasyonu %0,4 olacak şekilde 1x PBS içerisinde çözüldü ve oda sıcaklığında saklandı.

Liziz Tampon Çözeltisi: Protein lizati eldesinden önce 4°C'de hazırlanarak taze olarak kullanıldı. Bunun için ticari olarak temin edilen 25 mM Tris-HCl (pH 7,6), 150 mM NaCl, %1 NP-40, %1 sodyum deoksikolat, %0.1 SDS içeriğine sahip RIPA tampon çözeltisine; 200 mM sodyum florür (NaF), 5 mM EDTA, 1x proteaz inhibitör kokteyli (protease inhibitor cocktail, PIC), 50 nM Calyculin A, ve 1 mM PMSF eklendi.

Sodyum Florür (NaF) Çözeltisi: Son konsantrasyonu 5 M olacak şekilde (10.5 g NaF/50 mL dH₂O) hazırlandı. Hazırlanan çözelti 4°C'de saklandı.

PMSF Çözeltisi: Son konsantrasyonu 200 mM olan stok çözelti hazırlamak için, toz halinde bulunan 35 mg PMSF, 1 mL izopropil alkol içinde çözüldü. Hazırlanan çözelti -20°C'de saklandı.

EDTA Çözeltisi: Son konsantrasyonu 0.5 M olan stok çözelti hazırlamak için, toz halindeki 7.3 g EDTA, 50 mL dH₂O içinde çözüldü. Hazırlanan çözelti 4°C'de saklandı.

Calyculin A Çözeltisi: Son konsantrasyonu 50 µM olan stok çözelti hazırlamak için, liyofilize halde bulunan Calyculin A, 200 µL DMSO içinde çözüldü. Çözelti -20°C'de saklandı.

Forbol 12-miristat 13-asetat (PMA) Çözeltisi: Steril koşullar altında, liyofilize halde bulunan 1 mg PMA, 1 mL DMSO içinde çözülerek 1.6 mM ana çözelti hazırlandı. Bu ana çözelti serum içermeyen RPMI 1640 besiyeri ile seyreltilerek 80 µM (50 µg/mL) konsantrasyonda ara stok çözelti elde edildi. Ara stok çözelti serum içermeyen 1640 besiyeri ile seyreltilerek 20 µM konsantrasyonda 2. ara stok çözelti hazırlandı. Hazırlanan ara stok ve stok çözeltiler alikotlar halinde -20°C'de saklandı.

Rekombinant İnsan Pro-inflamatuvar Sitokinleri: Liyofilize halde bulunan sitokinler steril koşullar altında %0.1 BSA içeren 1x PBS tampon çözeltisinde hazırlandı. Bu çözelti için IFN- γ dH₂O içerisinde 0.2 mg/mL konsantrasyonda ve LPS dH₂O içerisinde 1 mg/ml konsantrasyonda olacak şekilde karıştırılarak stok çözeltiler hazırlandı. Bu stoklardan, IFN- γ için FBS içermeyen RPMI 1640 besiyeri içerisinde 20 µg/mL; LPS için 100 µg/mL olacak şekilde ara stok çözeltileri hazırlandı. Hazırlanan stok ve ara stok çözeltiler alikotlar halinde -80°C'de saklandı.

Karboksi-diklorodihidrofloresan Diasetat (H₂DCFDA): Liyofilize halde bulunan 100 mg H₂DCFDA steril koşullar altında DMSO içinde çözülerek 100 mM çözelti hazırlandı ve alikotlar halinde -80°C'de saklandı.

4,5-diaminofloresan Diasetat (DAF₂DA): Liyofilize halde bulunan 100 mM DAF₂DA steril koşullar altında DMSO içerisinde çözülerek 500 µM konsantrasyonunda ara stok çözeltiler hazırlandı. Hazırlanan çözeltiler alikotlar halinde -80°C'de saklandı.

Primer ve Sekonder Antikorlar: Western-Blot analizlerinde kullanılan ve β-aktin fare anti-insan monoklonal antikorları ve fare anti-insan NOS2 monoklonal antikorları ile anti-fare IgG HRP bağlı sekonder antikorlar TBS-T çözeltisi içinde belirtilen konsantrasyonlarda (primer antikorlar:, 1/10000; β-aktin, 1/1000; NOS2, sekonder antikorlar: 1/5 anti-fare IgG HRP) seyreltildi.

Tris Borat EDTA (TBE) Tampon Çözeltisi: 800 mM konsantrasyonunda Tris, 900 mM konsantrasyonunda borik asit ve 25 mM konsantrasyonunda EDTA bileşenlerinden oluşan çözelti 10x konsantrasyonda hazırlandı ve distile su ile 1x konsantrasyona seyreltildi.

3.3. Hücre Kültürü

Tez çalışması kapsamında MDA-MB-231 ve HCC38 bazal benzeri karaktere sahip insan meme kanseri hücre hatları; SW982 insan fibroblast hücre hattı; THP-1 insan monositik hücre hattı, J774A.1 fare monositik hücre hattı, 4T1 fare meme kanseri hücre hattı ve EMT6/AR1 fare meme tümörü hücre hattı kullanıldı.

Bu hücre hatlarından MDA-MB-231, HCC38, SW982, 4T1, EMT6/AR1 hücre hatları aderan, J774A.1 yarı aderan, THP-1 ise süspanse özelliğe sahiptir.

Hücre hatlarından MDA-MB-231 tam DMEM besiyerinde; HCC38, SW982, 4T1, EMT6/AR1 ve THP-1 tam RPMI 1640 besiyerinde; J774A,1 %20 FBS içeren tam RPMI 1640 besiyerinde çoğaltıldı. Tüm hücre hatlarının kültürü %5 CO₂ içeren 37°C'deki nemli inkübatörde gerçekleştirildi.

3.3.1. Hücre Hatlarının Dondurulması ve Çözülmesi

Hücre hatları 5 ml tam besiyeri ile süspanse hale getirildikten sonra 4 ml FBS ve 1 ml DMSO eklenerek dondurma çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan çözelti her vial 1 ml olacak şekilde aktarıldıktan sonra alikotlanarak 'Mr. Frosty' dondurma kabına yerleştirilip -80°C'de 1 gece saklandı. Ardından -196°C sıvı azot içeren tankta buhar fazında bulunan kaplara aktarıldı.

Hücre hatlarının çözülmesi işleminde; sıvı azot içeren tankın buhar fazında bulunan kaplarından alınan vialler, daha öncesinde 37°C'lik su banyosunda ısıtılan ve içerisinde distile su bulunan beherlere aktarıldı. Daha sonra etil alkol ile steril hale getirilerek hücre kültürü ortamına alındı ve pastör pipeti kullanılarak 37°C'ye getirilmiş tam besiyeri içeren 50 ml'lik tüplere aktarıldı. DMSO'yu uzaklaştırmak için santrifüj (oda sıcaklığında; 1800 rpm, 5 dk) edildi. Santrifüj sonrası süpernatant kısmı atılıp, hücreler tam besiyerinde süspanse hale getirildi ve T25 flasklara alınarak %5 CO₂ içeren 37°C'de nemli inkübatörde kültürü yapıldı.

3.3.2. Hücrelerin Pasajlanması

Hücre kültürü kaplarında çoğalan hücrelerin %80 yoğunluğa ulaşması ile aderan hücrelerden besiyeri uzaklaştırıldı. Ardından 1x PBS çözeltisi ile flask

duvarında bulunan hücreler yıkandı ve 10x konsantrasyona sahip tripsin-EDTA çözeltisi (T25 flasklar için 300 µL; T75 flasklar için 600 µL) eklenerek inkübatörde 2-5 dk. bekletildi. İnkübasyon sonunda flasklara tam besiyeri eklendi ve hücreler toplanarak 50 mL'lik tüplere aktarıldı. Hücre sayımı gerçekleştirilerek (Bkz. Hücre sayımı) analizlerde kullanılacak hücre sayısı belirlendi. Diğer yandan hücre çoğalmasının devamlılığını sağlamak için T75 flasklarda 2-3 ml hücre süspansiyonuna son hacim 18-20 ml olacak şekilde tam besiyeri eklenerek hücrelerin kültürüne inkübatörde devam edildi.

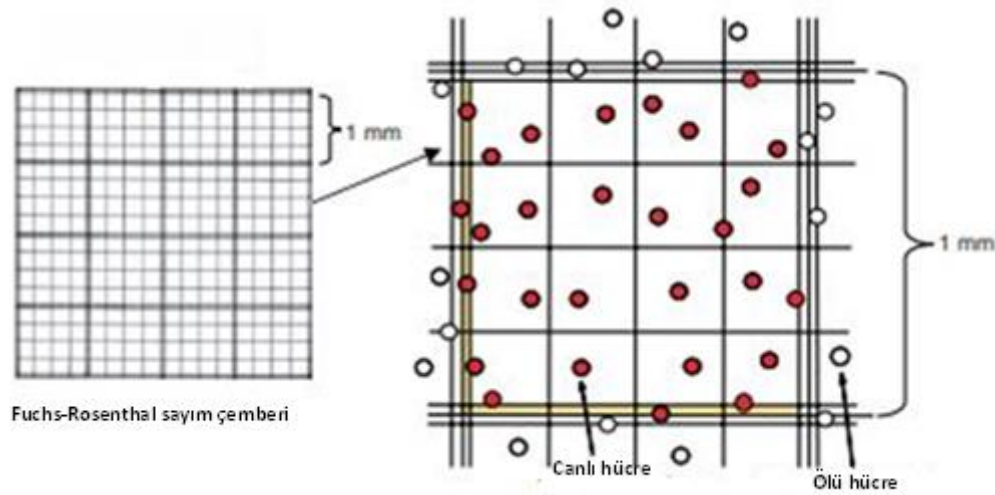
Yarı aderan çoğalan hücrelerin pasajlama işleminde, kazıyıcı (*scraper*) yardımı ile flask tabanında bulunan hücrelerin kaldırılması sağlandı. Flask içerisine seyreltme oranı 1:15 olacak şekilde tam besiyeri eklendi ve hücreler pipetaj yapılarak homojen şekilde dağıtıldı. Daha sonra hücre sayımı gerçekleştirilerek (Bkz. Hücre sayımı) analizlerde kullanılacak hücre sayısı belirlendi. Hücre çoğalmasının devamlılığı için de, T25 flask içerisindeki 1-2 ml hücre süspansiyonuna son hacim 10 ml olacak şekilde tam besiyeri eklenerek hücreler inkübatöre kaldırıldı.

Süspanse olarak çoğalan hücrelerin pasajlama işleminde ise, hücrelere pipetaj yapılarak dibe çöken hücreler kaldırıldı ve flask içerisinde homojen bir dağılım sağlandı. Hücrelerin ½'si alınarak 50 ml'lik tüplere aktarıldı ve hücre sayımı gerçekleştirilerek (Bkz. Hücre sayımı) analizlerde kullanılacak hücre sayısı belirlendi. Hücre çoğalmasının devamlılığı için de, flaskta kalan hücrelerin üzerine 1:1 olacak şekilde tam besiyeri eklenerek hücreler inkübatörde kültüre edildi.

3.3.3. Hücre Sayımı

Hücre sayımında dikkat edilmesi gereken en önemli konu, sayılacak hücrelerin homojen dağılım göstermesi ve tek hücrelerden oluşmasıdır. Süspanse hale getirilen hücrelerden (Bkz. Hücrelerin pasajlanması) pipetaj yapılarak 10 µl alındı ve 10 µl tripan mavisi ile 1:1 oranında karıştırıldı. Hücreler, Fuchs-Rosental hemositometrisinde lam ile lamel arasına aktararak 10x büyütme ışık mikroskopunda sayıldı. Sayım işlemi gerçekleştirilirken boyayı içine almayan yani canlı hücre sayımına dikkat edildi ve 16 küçük kareden oluşan alan içerisindeki her

satır ve sütundan birer adet olacak şekilde 4 küçük kare sayıldı. Fuchs-Rosenthal hemositometrisinde (Şekil 3.1) sayım yapılan alanların ölçüleri 1 mm x 1 mm ; lam ile lamel arasındaki uzaklık ise 0.1 mm'dir. Bu değerlerden yola çıkılarak Formül 3.1'e göre hücre sayısı hesaplanmıştır.



Şekil 3.1. Fuchs-Rosenthal hemositometrisinin (Hausser Scientific, ABD) mikroskop altında şematik görünümü. Bir kenarı 1 mm olan bir kare, kenarları 0,25 mm olan 16 küçük kare içerir.

$$\text{Alan} = 1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm} = 1 \text{ mm}^2$$

$$\text{Hacim} = 1 \text{ mm}^2 \times 0.1 \text{ mm} = 1 \text{ mm}^3 = 1 \times 10^{-4}$$

$$\text{Hücre sayısı/ml} = (\text{Sayılan Toplam Hücre} \times \text{Seyreltme Faktörü}) / \text{Sayılan alan} \times 10.000 \quad (3.1)$$

3.3.4. Meme Kanseri Hücre Hatları ve Fibroblast Hücre Hattından Süpernatant Eldesi

İnsan MDA-MB-231, HCC38 bazal benzeri meme kanseri hücre hatları; SW982 fibroblast hücre hattı ile fare 4T1 ve EMT6/AR1 meme kanseri hücre hatları tam RPMI 1640 besiyeri içerisinde 5×10^5 hücre/ml olacak şekilde T75 flasklara aktarıldı. Ardından 48 saat boyunca %5 CO₂ içeren 37°C'lik nemli inkübatörde kültüre edildi. İnkübasyon sonunda flasklardan besiyeri toplanarak 50 ml'lik tüplere aktarıldı. Hücre ve hücre atıklarından uzaklaştırmak için santrifüj (1800 rpm, 5 dk.,

oda sıcaklığı) edildikten sonra süpernatant kısmı alınarak 15 ml'lik tüplere 3'er ml paylaştırıldı ve -80°C 'de saklandı.

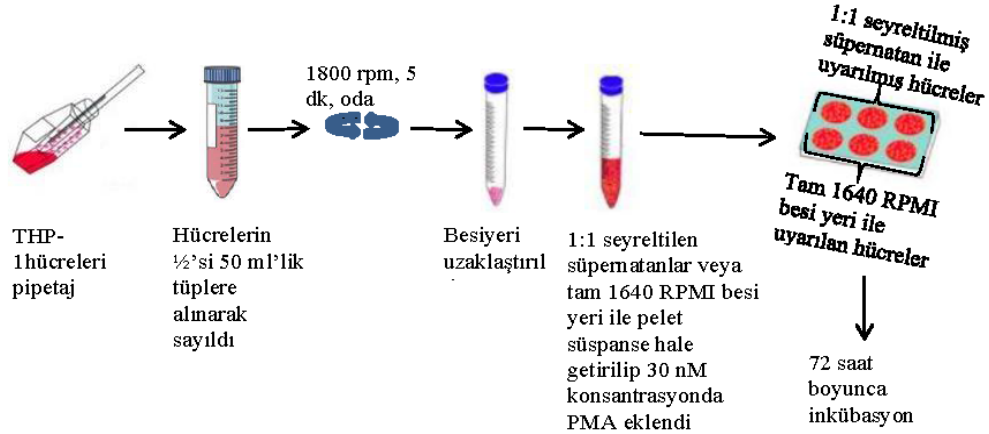
3.3.5. THP-1 İnsan Monositik Hücre Hattının Elde Edilen Süpernatantlar ile Uyarılması

MDA-MB-231, HCC38 insan bazal benzeri meme kanseri hücre hatları ile SW982 insan fibroblastik hücre hattından elde edilen ve -80°C 'ye kaldırılan süpernatantlar buz üzerinde çözüldü. 3 ml süpernatantın üzerine 3 ml tam RPMI besiyeri eklenerek 1:1 oranında seyreltildi.

T75 flaskta bulunan THP-1 hücreleri flask içerisinde pipetaj yapılarak homojen şekilde dağıtıldı ve besiyeri içerisinde bulunan THP-1 hücrelerinin $\frac{1}{2}$ 'si 50 ml'lik tüpe alınarak hücre sayımı yapıldı. Ardından hücre sayısı 3×10^6 hücre/ml olacak şekilde 15 ml'lik tüplere aktarıldı ve santrifüj (1800 rpm, 5 dk., oda sıcaklığı) yapıldı. Santrifüj sonrası besiyeri uzaklaştırılarak, pelet halinde hücreler 1:1 oranında seyreltilen MDA-MB-231, HCC38 ve SW982 süpernatantları ile ayrı ayrı süspansiyon haline getirildi. Süspansiyon hücrelere 30 nM konsantrasyonda PMA eklendi ve pipetaj yapılarak hücrelerin PMA ile etkileşimlerinin homojen olması sağlandı. Süpernatantlar ile süspansiyon haline getirilip PMA ile uyarılan THP-1 hücreleri, 6 kuyucuklu plaklara her bir kuyucuk içerisinde 5×10^5 hücre/ml olacak şekilde pipetlendi ve 72 saat boyunca %5 CO_2 içeren 37°C 'lik nemli inkübatörde kültüre edildi. Böylece THP-1 hücrelerinin aderan özellik kazanmaları ve makrofaj hücrelerine farklılaşmaları sağlandı.

T75 flaskta bulunan ve $\frac{1}{2}$ 'si 50 ml'lik tüplere alınarak sayılan THP-1 hücrelerinin bir kısmı da santrifüj (1800 rpm, 5 dk., oda sıcaklığı) sonrasında besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra tam RPMI 1640 besiyeri ile süspansiyon haline getirildi. Süspansiyon hücrelerin üzerine 30 nM konsantrasyonda PMA eklendi ve pipetaj yapılarak hücrelerin PMA ile etkileşimlerinin homojen olması sağlandı. Tam RPMI 1640 besiyeri ile süspansiyon haline getirilip PMA ile uyarılan THP-1 hücreleri, 6 kuyucuklu plaklara her bir kuyucuk içerisinde 5×10^5 hücre/ml olacak şekilde pipetlendi ve 72 saat boyunca %5 CO_2 içeren 37°C 'lik nemli inkübatörde kültüre edildi (Şekil 3.2).

Böylece THP-1 hücrelerinin aderan özellik kazanmaları ve makrofaj hücrelerine farklılaşmaları sağlandı.



Şekil 3.2. MDA-MB-231 hücrelerinden elde edilen süpernatantlar varlığında uyarılan THP-1 hücrelerinin deney tasarımı

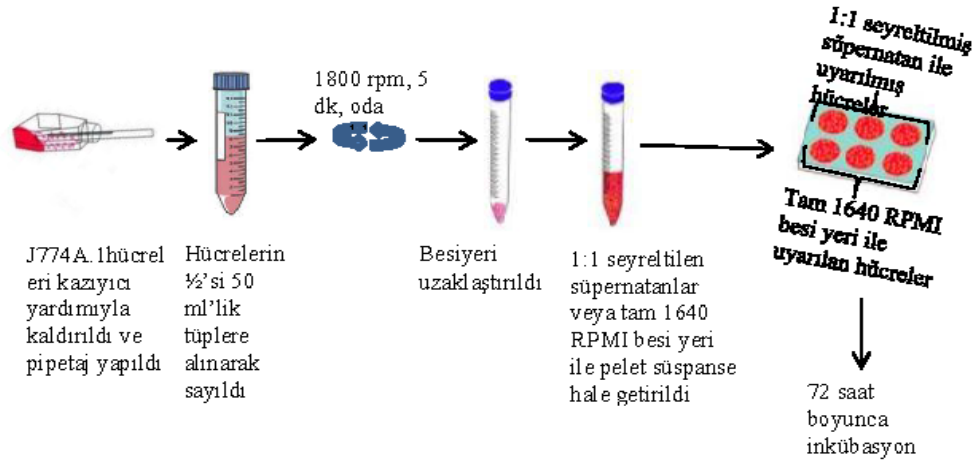
3.3.6. J774A.1 Fare Makrofaj Hücre Hatlarının Elde Edilen Süpernatantlar ile Uyarılması

4T1 ve EMT6/AR1 fare meme kanseri hücre hatlarından elde edilen ve -80°C'ye kaldırılan süpernatantlar buz üzerinde çözüldü. 2 ml süpernatantın üzerine 2 ml tam 1640 RPMI besiyeri eklenerek 1:1 oranında seyreltildi.

T25 flaskta bulunan J774A.1 hücreleri kazıyıcı yardımı ile kaldırıldıktan sonra flask içerisinde pipetaj yapılarak homojen şekilde dağıtıldı ve J774A.1 hücrelerinin 1/2'si 50 ml'lik tüpe alınarak hücre sayımı yapıldı. Hücre sayısı 2×10^5 hücre/ml olacak şekilde 15 ml'lik tüplere aktarıldı ve santrifüj (1800 rpm, 5 dk., oda sıcaklığı) yapıldı. Santrifüj sonrası besiyeri uzaklaştırılarak, pelet halinde hücreler 1:1 oranında seyreltilen 4T1 ve EMT6/AR1 süpernatantları ile ayrı ayrı süspansiyon hale getirildi. Süpernatantlar ile süspansiyon hale getirilen J774A.1 hücreleri, 6 kuyucuklu plaklara her bir kuyucuk içerisinde 5×10^4 hücre/ml olacak şekilde pipetlendi ve 72 saat boyunca %5 CO₂ içeren 37°C'lik nemli inkübatörde kültüre edildi.

T25 flaskta bulunan ve 1/2'si 50 ml'lik tüplere alınarak sayılan J774A.1 hücrelerinin bir kısmı da santrifüj (1800 rpm, 5 dk., oda sıcaklığı) sonrasında besiyeri

uzaklaştırıldıktan sonra tam RPMI 1640 besiyeri ile süspansiyon haline getirildi. Tam RPMI 1640 besiyeri ile süspansiyon haline getirilen J774A.1 hücreleri, 6 kuyucuklu plaklara her bir kuyucuk içerisinde 5×10^4 hücre/ml olacak şekilde pipetlendi ve 72 saat boyunca %5 CO₂ içeren 37°C'lik nemli inkübatörde kültüre edildi (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. 4T1 hücrelerinden elde edilen süpernatantların varlığında uyarılan J774A.1 hücrelerinin deney tasarımı

3.3.7. Miyeloid Hücrelerin Pro-inflamatuvar Sitokinler ile Uyarılması

MDA-MB-231, HCC38 insan bazal benzeri meme kanseri hücre hatları veya SW982 insan fibroblast hücre hattından elde edilen süpernatantlar ile uyarılan THP-1 hücreleri ve tam 1640 besiyeri ile uyarılan THP-1 hücrelerinin 72 saat süren inkübasyonu sonunda; tam 1640 RPMI besiyeri veya 1:1 oranında seyreltilen süpernatantlar uzaklaştırılarak, taze tam 1640 RPMI besiyeri veya taze 1:1 oranında seyreltilen süpernatantlar eklendi. Böylece PMA ortamdan uzaklaştırıldı. Ardından, 6 kuyucuklu plağın 2 kuyucuğu 100 ng/ml konsantrasyonda IFN- γ ile; 2 kuyucuğu 1 μ g/ml konsantrasyonda LPS ile uyarıldı. Diğer 2 kuyucukta ise herhangi bir uyarım yapılmadı. Bu şekilde hücreler 48 saat boyunca %5 CO₂ içeren 37°C'lik nemli inkübatörde kültüre edildi.

4T1 ve EMT6/AR1 fare meme kanseri hücre hatlarından elde edilen süpernatantlar ile uyarılan J774A.1 hücreleri ile yapılan çalışmada da aynı şekilde deney uygulandı. Bu hücreler için IFN- γ uyarımı olmayıp; kuyulardan üçü 1 μ g/ml

konsantrasyonda LPS ile uyarıldı, diğer 3 kuyuda ise herhangi bir uyarım yapılmadı. Ardından hücreler 48 saat boyunca %5 CO₂ içeren 37°C'lik nemli inkübatörde kültüre edildi.

72 saatlik inkübasyonun ardından 48 saat boyunca pro-inflamatuvar sitokinler varlığında süpernatant veya tam 1640 besiyeri içerisinde inkübe edilen THP-1 veya J774A.1 hücrelerinden besiyerleri uzaklaştırılarak 1x PBS ile yıkama işlemi gerçekleştirildi. Daha sonra 10x tripsin-EDTA çözeltisi eklenerek etüvde 3-4 dakika inkübe edildi. İnkübasyonun ardından hücrelere *Cell Wash* çözeltisi eklendi ve 15 ml'lik tüplere aktarıldı. Santrifüj (1800 rpm, 5 dk., oda sıcaklığı) sonrası *Cell Wash* çözeltisi uzaklaştırılarak hücreler 1 ml tam besiyeri ile süspansiyon haline getirilip sayıldı.

3.4. Akım Sitometri

Süpernatantlar veya tam RPMI 1640 besiyeri ile inkübasyonu tamamlanan THP-1 ve J774A.1 hücreleri süspansiyon haline getirilip sayıldıktan sonra, her bir antikor için 1×10^5 hücre akım sitometri tüplerine aktarıldı.

Akım sitometrik analizi için süspansiyon hücrelere özgül antikorlar eklendi ve 4°C'de 40 dakika inkübasyon yapıldı (Tablo 3.1). Ardından, hücrelerin üzerine *Cell Wash* çözeltisi eklenerek santrifüj (1800 rpm, 5 dk., oda sıcaklığı) edildi. Bu şekilde hücreler ile etkileşime girmeyen antikorlar ortamdan uzaklaştırıldı. Santrifüj sonrası tüplerden süpernatant kısmı uzaklaştırıldı ve 100 µl *Cell Wash* çözeltisi ile hücreler tekrar süspansiyon haline getirildi. Hücrelerin fenotip belirteçlerinin düzeyi FACS Aria II akım sitometri cihazı (BD, ABD) ve FACS Diva yazılımı (BD, ABD) kullanılarak floresan yoğunluğuna göre analiz edildi. Hücrelerin tek tek analizini yapabilmek için *forward scatter height* (FSC-H) ve *forward scatter area* (FSC-A) dağılım grafiği oluşturuldu. Bu hücrelerin granülaritesi ve boyutlarına göre analizini gerçekleştirmek amacıyla ise *side scatter area* (SSC-A) ve FSC-A dağılım grafiği kullanıldı.

Tablo 3.1. Akım sitometride kullanılan antikörlara ilişkin bilgiler

Antikör	Klonu	Üretici	Florokrom	Tüp Başına Koyulan Miktar (μ l)
CD14	M5E2	BD, ABD	FITC	5
CD11c	S-HCL3	BD, ABD	PE	5
MD2	18H10	Abcam, İngiltere	FITC	3
CD40	FC	Biolegend, ABD	FITC	1
IFN γ R	B27	Biolegend, ABD	PE	1
TLR4	HTA125	Biolegend, ABD	PE	1
F4/80	Cl:A3-1	Abcam, İngiltere	FITC	1

3.4.1. ROS/NO Analizi

Süpernatantlar veya tam RPMI 1640 besiyeri ile inkübasyonu tamamlanan THP-1 ve J774A.1 hücreleri süspansiyon haline getirilip sayıldıktan sonra, ROS ve NO analizi için 1×10^5 hücre akım sitometri tüplerine aktarıldı.

ROS ve NO analizi için hücreler karanlık ortamda 2 μ l hacminde H₂DCFDA ve 1 μ l hacminde DAF₂DA ile muamele edildikten sonra %5 CO₂ içeren 37°C'deki nemli inkübatörde 30 dk. boyunca inkübe edildi. Inkübasyon sonunda hücreler buz üzerine alınıp *Cell Wash* çözeltisi eklenerek santrifüj (1800 rpm, 5 dk., +4°C) edildi. Santrifüj sonrası tüplerden süpernatant kısmı uzaklaştırıldı ve 100 μ l *Cell Wash* çözeltisi ile hücreler tekrar süspansiyon haline getirilerek buz üzerine alındı.

ROS/NO düzeyleri akım sitometride (495 nm eksitasyon, 529 nm emisyon) değerlendirilerek (Bkz. Akım sitometri 3.4); hücrelerin ROS/NO üretim kapasitelerinin analizi ortanca floresan yoğunluğu değerlerine göre yapıldı (Formül 3.2).

Normalize OFY değeri = Özgün antikör ile işaretli hücre OFY değeri / İzotipik kontrol antikörü ile işaretli hücre OFY değeri (3.2)

3.5. Western Blot Analizleri

3.5.1. Protein Lizatı Hazırlama

Protein lizatları 6 kuyucuklu plaklarda ekilip MDA-MB-231 hücre hattından elde edilen süpernatant içerisinde ayrı ayrı IFN- γ ve LPS ile uyarılan THP-1 hücreleri ve 6 kuyucuklu plaklarda ekilip tam 1640 RPMI besiyeri içerisinde IFN- γ ve LPS ile

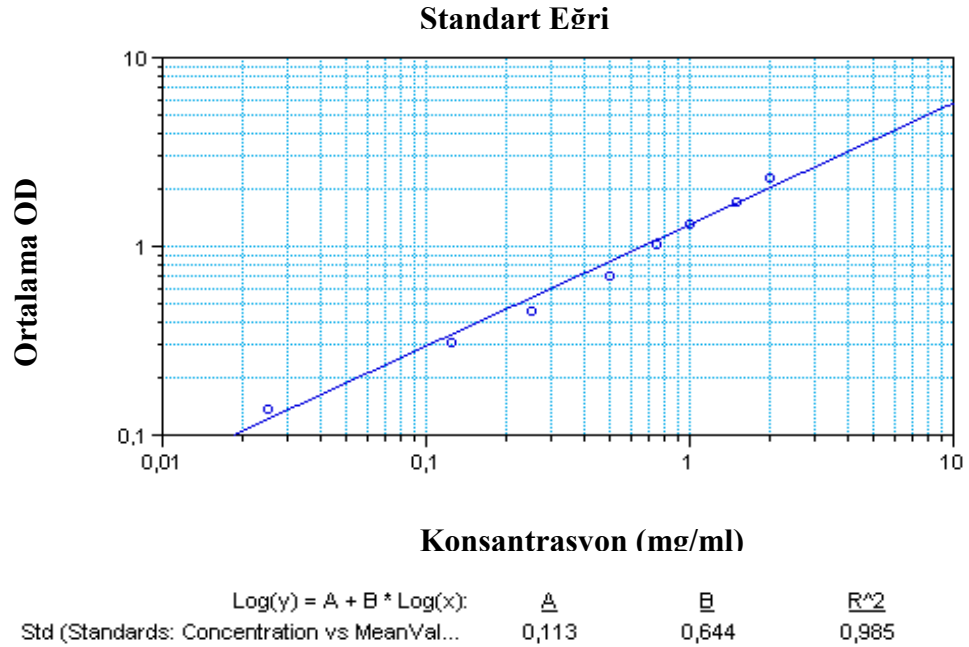
uyarılan THP-1 hücrelerinden elde edildi. Bu amaçla MDA-MB-231 süpernatanı veya tam RPMI 1640 besiyeri içinde aktive edilen hücreler belirlenen inkübasyon süresinin sonunda buz üzerine alındı ve süpernatan veya besiyeri uzaklaştırıldı. Ardından hücrelerin bulunduğu kuyucuklar 2 kere soğuk 1x PBS ile yıkandı. 1x PBS'in kuyucuklardan tamamen uzaklaştırılmasına dikkat edildi. Her bir kuyucuk üzerine 25 µl liziz tampon çözeltisi eklenerek hücrelerin *kazıyıcı* yardımı ile kuyucukların tabanından kaldırılması sağlandı. Kaldırılan hücreler 1,5 ml'lik tüplere aktarılarak 5 dk. vorteks yapıldı. Ardından 4°C'de soğuk odada bulunan dikey karıştırıcıya tutturularak 20 dakika boyunca alt-üst şeklinde karışması sağlandı. Hücreler santrifüj edildikten sonra (14000 rpm, 10 dk., 4°C) süpernatan kısımları 1,5 ml'lik tüplere aktarıldı ve -80°C'de saklandı.

3.5.2. Protein Konsantrasyonu Ölçümü

Örneklerdeki protein miktarlarının belirlenmesinde bikinkoninik asit (*bicinchoninic asit assay, BCA*) yöntemi kullanıldı. Bu amaçla, lizat haline getirilen hücreler buz üzerine alınarak çözüldü. Standartlar, BCA kitinde bulunan 2 mg/mL BSA'dan liziz tampon çözeltisi ile seri dilüsyonlar yapılarak (2 mg/mL, 1,5 mg/mL, 1 mg/mL, 0,75 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,25 mg/mL, 0,125 mg/mL ve 0,025 mg/mL) hazırlandı. Her bir örnek ve standart iki tekrarlı çalışılarak; toplamda standartlar için 16 kuyucuk, lizatlar için 12 kuyucuk kullanıldı. Örnekler ve standartlar düz-tabanlı 96 kuyucuklu plaklara pipetlendi. BCA kitinde bulunan Çözelti A ve Çözelti B 50:1 oranında karıştırılarak hazırlandı ve her kuyucuğa 200 µl hacimde eklendi. Ardından kuyucuklara standart ve örnekler de 25 µl eklenerek inkübe edildi (%5 CO₂, 37°C, 30 dk.). İnkübasyon sonunda plaklar inkübatörden çıkarıldı. Spektrofotometrik ölçüm öncesinde örnekler ve standartların bulunduğu plaka cihaz içerisinde titreşim yapılarak her bir örneğin homojen dağılması sağlandı. Spektrofotometrik ölçüm için Softmax Pro programında bulunan Basic Endpoint Assay protokolü kullanıldı. Ölçümler 562 nm dalga boyunda gerçekleştirildi.

Lizatlardaki protein konsantrasyonları, standartların optik yoğunluk (*optical density, OD*) değerlerine göre ortaya çıkan standart eğri grafikleri kullanılarak

hesaplandı (Şekil 3.4). Kuyulara yüklenecek hacimlerin hesaplanmasında Formül 3.3 kullanıldı.



Şekil 3.4. BCA analizine ilişkin spektrofotometrik ölçümlerde, protein konsantrasyonlarının hesaplanması için “log-log” algoritmasına göre oluşturulan standart eğri grafiği.

$$\text{Protein hacim } (\mu\text{L}) = \text{Protein miktarı } (\mu\text{g}) / \text{Protein konsantrasyonu } (\mu\text{g}/\mu\text{L}) \quad (3.3)$$

3.5.3. Protein Örneklerinin Denatürasyonu

Örnekler poliakrilamid jele yüklenmeden önce denatüre edildi. BCA kiti içerisinde bulunan 4x çözeltisine 1:20 oranında β -merkaptoetanol eklenerek protein örneklerinin denatürasyonu için çözelti hazırlandı. Ardından protein miktarı hesaplanan örnekler, denatürasyon tamponu ile 1:3 oranında karıştırıldı ve 100°C’de 5 dakika inkübe edildikten sonra buz üzerine alındı. Denatüre edilen protein örnekleri (30 μg) poliakrilamid jele yüklendi.

3.5.4. Poliakrilamid Jel Elektroforezi

Jel hazırlamak için TGX FastCast Akrilamid Kiti (BioRad, ABD) kullanılarak %10’luk poliakrilamid jel hazırlandı. Yürütme jeli (*Resolving Gel*) hazırlarken kit

içeriğinde bulunan Resolver A ve Resolver B çözeltileri 50 ml'lik tüpte 1:1 oranında karıştırıldı. Ardından 90 µl amonyum persülfat (APS) çözeltisinden eklenerek polimerizasyonun gerçekleşmesi; 9 µl tetrametiletildiamin (TEMED) eklenerek de polimerizasyonun hızlanması sağlandı. Yükleme jeli (Stacking Gel) hazırlanırken kit içeriğinde bulunan Stacker A ve Stacker B çözeltileri 50 ml'lik tüpte 1:1 oranında karıştırıldı. Jel hazırlama kasetlerinde 30 µl APS ve 3 µl TEMED jele eklendi. Daha sonra yükleme kuyularının oluşması için taraklar yerleştirildi ve jellerin polimerizasyonunun sağlanması amacıyla 30 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyonun sonunda jel yürütme kasetleri Western Blot elektroforez tankına yerleştirildi ve 1x yürütme tamponu ile dolduruldu. Eşit miktarda hazırlanan örnekler ile protein belirteci kuyulara yüklendi ve elektroforez gerçekleştirildi (75 V, 2,5 sa, oda sıcaklığı). Elektroforez işlemi sonunda jel tanktan çıkarılarak kurumaması için ıslak bir spatula yardımıyla, jel yürütme kasetlerinden ayrıldı. Örnek içermeyen kısımlar kesilerek uzaklaştırıldı.

3.5.5. Transfer, Blotlama ve Primer Antikor ile İnkübasyon

Elektroforez işlemi sonrası örneklerin membrana transfer edilme işlemi gerçekleştirildi. Transfer sırasında kullanılan polivinildiflorid (PVDF) membran ve filtre kağıtları jele uygun olacak şekilde kesildi. PVDF membranı porların açılması için absolut metanol ile 3 dakika muamele edildi. Bu sırada jel ve filtre kağıtları da 1x transfer tampon çözeltisi içerisinde bekletildi. Transfer cihazına (Pierce Fast Semi-dry Blotter, Thermo Scientific, ABD) sırasıyla filtre kağıdı, PVDF membran, jel ve filtre kağıdı olmak üzere yerleştirilerek; cihazın alt kısmı anot, üst kısmı da katot olacak şekilde güç kaynağına bağlandı ve transfer işlemi (25 V, 150 KDa, 7 dk, oda sıcaklığı) gerçekleştirildi. Transfer işleminin ardından membran 1x TBST çözeltisi ile hazırlanan %5'lik süt tozu içerisine alınarak çalkalayıcıda 100 rpm hızda, 1 saat boyunca inkübe edildi ve blokasyon işlemi tamamlanmış oldu. Blokasyon işleminden sonra PVDF membran 1 kere 1x TBST çözeltisi ile yıkandı. Daha sonra 1x TBST ile hazırlanan %5'lik süt tozu içerisinde hazırlanmış primer antikor ile çalkalayıcıda 100 rpm, gece boyunca, 4°C'de inkübe edildi (Tablo 3.2).

Tablo 3.2. Western Blot analizlerinde kullanılan primer antikorlar

Antikor	Konakçı Tür	Klon	Dilüsyon	Firma
<i>NOS2</i>	Fare	5C1B52	1/1000	BioLegend
<i>β-aktin</i>	Fare	8H10D10	1/10000	CST, ABD

CST: Cell Signaling Technologies

3.5.6. Sekonder Antikor ile İnkübasyon

Primer antikor ile inkübasyonun ardından membran 3 kere 10'ar dakika boyunca soğuk 1x TBST çözeltisi ile yıkandı. Daha sonra 1x TBST ile hazırlanan %5'lik süt tozu içerisinde hazırlanmış sekonder antikor ile çalkalayıcıda (100 rpm, 1 sa, oda sıcaklığı) inkübasyona bırakıldı (Tablo 3.3). İnkübasyonun ardından membran 3 kere 10'ar dakika boyunca soğuk 1x TBST çözeltisi ile yıkandı.

β -aktin proteininin ifade düzeyleri ile PVDF membrandaki yükleme miktarları normalize edildi. Bu amaçla membran önce 1x soğuk TBS-T çözeltisi ile çalkalayıcıda (100 rpm, 10 dk., oda sıcaklığı) 3 kere yıkandı. Ardından 1x TBST çözeltisi ile hazırlanan %5'lik süt tozu içerisine alınarak çalkalayıcıda 100 rpm hızda, 1 saat boyunca inkübe edilerek bloke edildi ve süt tozu çözeltisi uzaklaştırıldı. Membran 1x soğuk TBS-T ile 3 kere 10'ar dk. boyunca yıkandı.

NOS2 proteininin ifade düzeyleri ile PVDF membrandaki yükleme miktarları normalize edildi. Bu amaçla membran önce 1x soğuk TBS-T çözeltisi ile çalkalayıcıda (100 rpm, 10 dk., oda sıcaklığı) 3 kere yıkandı. Ardından 1x TBST çözeltisi ile hazırlanan %5'lik süt tozu içerisine alınarak çalkalayıcıda 100 rpm hızda, 1 saat boyunca inkübe edilerek bloke edildi ve süt tozu çözeltisi uzaklaştırıldı. Membran 1x soğuk TBS-T ile 3 kere 10'ar dk. boyunca yıkandı.

Tablo 3.3. Western Blot analizlerinde kullanılan sekonder antikor

Antikor	Konakçı Tür	Dilüsyon	Firma
<i>Anti-fare IgG HRP</i>	At	1:1000	CST, ABD

CST: Cell Signaling Technologies, IgG: İmmünglobülin G, HRP: Horseradish peroksidaz

3.5.7. Kemoluminesans Görüntüleme ve Bant Dansitesinin Ölçümü

Primer antikor ile muamelenin ardından sekonder antikor ile inkübe edilen membran soğuk 1x TBST ile (100 rpm, 10 dk., oda sıcaklığı) 3 kere yıkandı. Membrandan 1x TBST çözeltisi uzaklaştırıldı ve kit içeriğinde bulunan Super Signal West-femto Maximum Sensitivity Substrate kiti (Thermo Scientific, ABD) çözeltilerden 1:1 oranında hazırlanarak membranın yüzeyini kaplayacak şekilde eklendi. 5 dk. inkübasyonun ardından membran IVIS (Newton 7.0) görüntüleme sistemi ile görüntülenerek dansitometrik analizi yapıldı. Protein bant yoğunlukları β -aktin bant yoğunluğuna göre normalize edilerek değerlendirildi.

3.6. Gen İfadesi Analizleri

3.6.1. RNA İzolasyonu

Gen ekspresyon analizleri MDA-MB-231 insan bazal benzeri meme kanseri hücre hattından elde edilen süpernatant ile uyarılan THP-1 monositik hücre hattı ve tam RPMI 1640 besiyeri ile uyarılan THP-1 monositik hücre hattı ile oluşturulan deneyler üzerinde yapıldı. Bu amaçla süpernatantlar veya tam RPMI 1640 besiyeri içinde aktive edilen THP-1 hücrelerinden belirlenen inkübasyon süresinin sonunda E.Z.N.A Total RNA Kit I (Omega Biotek, ABD) protokolüne uygun bir şekilde RNA izolasyonu gerçekleştirildi. İzolasyon için kullanılan pipet uçları ve tüpler dietilpirokarbonat (DEPC) ile muamele edilerek, DNA ve RNA'dan arındırıldı. Protokole uygun olarak, 6 kuyucuklu plaklarda farklı uyarım koşullarında uyarılan hücrelerden besiyeri ve süpernatantlar uzaklaştırılıp, 1x PBS ile yıkama gerçekleştirildikten sonra tripsin/EDTA ile 3-5 dakika muamele edildi. Ardından hücreler 1x PBS tampon çözeltisi ile 15 ml'lik tüplere aktararak santrifüj (1800 rpm, 5 dk., +4°C) edildi. Santrifüj sonrasında ortamda bulunan PBS tamamen uzaklaştırıldı. Tüpte kalan pelete, kit içeriğinde bulunan TRK liziz tamponunun içerisine (1 ml'de 20 μ l) β -merkaptotanol eklenerek hazırlanan çözeltilerden 100 μ l eklendi ve 5 dk. karıştırıldı. Bu şekilde hücrelerin iyice parçalanması sağlandı. Hücrelere 1:1 hacimde %70 etanol eklenerek hafifçe vorteks yapıldı ve 700 μ l filtrelili

kolonlara aktarılarak santrifüj yapıldı (10000 rpm, 1 dk., 4°C). Santrifüj sonunda toplama tüplerine geçen sıvı kısım uzaklaştırıldı. Kolonlara 250 µl RNA Wash Buffer I eklenerek santrifüj (10000 rpm, 1 dk., 4°C) yapıldı ve toplama tüpüne geçen sıvı uzaklaştırıldı. Ardından örneklerin bulunduğu her kolona 73,5 µl DNase-1 Digestion Buffer ve 1,5 µl DNase-1 (20 Kunitz/µL)'den oluşan 75 µl'lik karışım eklendi ve 15 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyonun sonunda kolonlara 250 µl Wash Buffer-1 eklenerek 2 dk. oda sıcaklığında bekletildikten sonra santrifüj yapıldı (10000 rpm, 1 dk., 4°C). Ardından, toplama tüplerine geçen sıvı uzaklaştırıldı ve kit içeriğinde bulunan, %100 etanol içeren RNA Wash Buffer- II'den 500 µl kolonlara eklenerek santrifüj yapıldı (10000 rpm, 1 dk., 4°C). Toplama tüplerine geçen sıvı uzaklaştırıldı ve RNA Wash Buffer – II adımı tekrarlanarak santrifüj edildi (14000 rpm, 2 dk., 4°C). Yüksek hızda santrifüj ile kolonların kuruması ve etanolün uzaklaştırılması sağlandı. Sonrasında toplama tüpleri uzaklaştırıldı ve filtreli kolonlar da öncesinde DEPC ile muamele edilmiş 1.5 ml'lik tüplere aktarılarak, nükleaz içermeyen 40 µL ddH₂O (*ultra pure and sterile water*), filtreli kolonlara eklendi ve santrifüj yapıldı (14000 rpm, 2 dk., 4°C). Son aşamada filtreler uzaklaştırıldı ve RNA örneklerinin bulunduğu tüpler -80°C'de saklandı.

RNA örneklerinin konsantrasyon ve saflıkları UV Spektrofotometre (NanoDrop ND-1000, ABD) ile 230 nm, 260 nm ve 280 nm' de ölçüldü. RNA örneklerinin kalitesinin belirlenmesinde A260/280 oranının 1,8-2,0; A260/230 oranının ise 2,0-2,2 aralığında olmasına dikkat edildi.

3.6.2. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

Komplementer DNA (*complementer DNA, cDNA*) sentezi ProtoScript II First Strand cDNA Sentez Kiti (New England BioLabs, ABD)'nin protokolüne uygun olarak yapıldı. Buna göre, konsantrasyonu 50 µM olan oligo d(T) pimerinden 2 µl, izole edilen RNA örneklerinden 1 µg mikrosantrifüj tüplerine konuldu ve son hacim 8 µl olacak şekilde ddH₂O ile tamamlandı. Elde edilen karışım ardından PZR (Polimeraz zincir reaksiyonu) cihazında (Thermal Cycler, Thermo Scientific, ABD) 65°C'de 5 dk. inkübe edildi. Mikrosantrifüj yapıldı ve örnekler hızla buz üzerine alındı. Tüplere kit

içeriğinde bulunan 2x reaksiyon tamponundan 10 µl ile 10x enzim karışımından (M-MuLV Reverse Transkriptase ve RNase İnhibitörü) 2 µl eklenip 42°C'de 60 dk. ve hemen ardından 85°C'de 5 dk. olacak şekilde *Thermal Cycler*'da inkübe edildi. Elde edilen cDNA örnekleri -20°C'de saklandı.

3.6.3. Polimer Zincir Reaksiyonu (PZR)

Gen ifadelerinin analizinde kullanılan primer dizilerine ait bilgiler Tablo 3.4'te verilmiştir.

Tablo 3.4. PZR analizlerinde kullanılan primerlere ilişkin bilgiler

Gen	Forward Primer (5'-3')	Reverse Primer (5'-3')	Ürün bazçifti	Genbank No.
<i>NOS1</i>	AAAAGACACCGATGA GGTTTTCA	GTTCATGCACCCGT GAGTT	320	NM_001204213.2
<i>NOS2</i>	GGAACCTACCAACTG ACGGG	GTCGATGCACAGCTG AGTGA	348	NM_000625.4
<i>NOS3</i>	TAAAGAAGTGGCCAA CGCCG	TTCCGGAAGAGTCTC CCCAG	144	NM_001160109.2
<i>ACTB</i>	CTGGAACGGTGAAGG TGACA	AAGGGACTTCCTGTA ACAATGCA	139	NM_001101

NOS1: Nitrik oksit sentaz 1; NOS2: Nitrik oksit sentaz 2; NOS3: Nitrik oksit sentaz 3; ACTB: β-aktin

Standart PZR için kullanılan bileşenler ve ilgili protokol tabloda (Tablo 3.5) belirtilmiştir. Deneye başlamadan önce bütün bileşenler oda sıcaklığına getirildi. cDNA'lar ve Taq DNA polimeraz (Thermo Fisher Scientific, ABD) dışında kalan tüm bileşenler vorteks yapılarak iyice karıştırıldı. cDNA'lar ve Taq DNA polimeraz da pipetaj yapılarak homojen şekilde reaksiyona eklendi. Deney ile ilgili tüm aşamalar buz üzerinde gerçekleştirildi.

Tablo 3.5. Standart PZR bileşenleri

Bileşen	Hacim (µl)	Son Konsantrasyon
Taq Tampon Çözeltisi (10x)	2,5	1x
dNTP mix (2 mM)	2,5	0,2 mM
MgCl ₂ (25 mM)	2,5	2,5 mM
Forward Primer	1	0,2 µM
Reverse Primer	1	0,2 µM
Taq DNA Polimeraz (5 U/µL)	0,25	0,05 U/µL
ddH ₂ O	14,25	
cDNA	1	
Son Hacim	25	

Tabloda verilen bilgiler doğrultusunda 1,5 ml'lik tüp içerisine sırasıyla ddH₂O, Taq tampon çözeltisi, dNTP, primerler ve MgCl₂ eklenerek vorteks yapıldı ve karışımın homojen olması sağlandı. Taq DNA polimeraz enzimi de eklendikten sonra karışım 200 µl'lik PZR tüplerine 24 µl olarak eşit hacimde dağıtıldı. Pozitif kontrol olarak analizi yapılan genleri ifade ettiği bilinen bir cDNA örneği kullanılırken, negatif kontrol olarak cDNA örneği içermeyen karışım hazırlandı. Tüpler *Thermal Cycler*'a yerleştirilerek tabloda belirtilen koşullar doğrultusunda gradyan PZR gerçekleştirildi (Tablo 3.6). Bu şekilde her bir gen için optimal bağlanma sıcaklığı belirlendi.

Tablo 3.6. Gradyan PZR protokolü

İlk Denatürasyon	95°C	30 sn	} 40 döngü
Denatürasyon	95°C	30 sn	
Bağlanma	58-65°C	30 sn	
Uzama	72°C	20 sn	
Son Uzama	72°C	5 dk	

3.6.4. Gerçek Zamanlı PZR

NOS1, *NOS2* ve *NOS3* genlerinin ekspresyonu gen ekspresyonu için bağlanma sıcaklıkları belirlendi ve gerçek zamanlı PZR ile bu gen ifadeleri kantitatif olarak analiz edildi. Bu analiz için gerekli bileşenler ve protokol tabloda belirtilmiştir (Tablo 3.7). Deneye başlamadan önce bütün bileşenler oda sıcaklığına getirildi ve cDNA'lar dışında tüm bileşenler vorteksenerek homojen şekilde karıştırıldı. cDNA'lar ise pipetaj yapılarak deney tüplerine eklendi.

Tablo 3.7. Gerçek zamanlı PZR bileşenleri

Bileşen	Hacim (µL)	Son Konsantrasyon
SYBR Green Supermix çözeltisi (2x)	5	1x
Forward Primer (5 µM)	1	0,5 µM
Reverse Primer (5 µM)	1	0,5 µM
cDNA örneği	1	
ddH₂O	2	
Toplam	10	

Tablo 3.7'de belirtildiği şekilde 1,5 ml'lik deney tüpüne sırasıyla SYBR green Süpermiks çözeltisi, ddH₂O, *forward primer* ve *reverse primer* eklendi ve vorteks

yapılarak homojen bir karışım elde edildi. Elde edilen bu karışım PZR tüplerine (Biorad, ABD) 9 µl olacak şekilde eşit hacimde dağıtıldı. cDNA örneklerinden 1 µl eklendikten sonra tüpler gerçek zamanlı PZR cihazına (BIO-RAD Real Time PCR Detection System, ABD) yerleştirilerek Tablo 3.8’de belirtilen protokol doğrultusunda reaksiyon gerçekleştirildi. Genlerin kantitatif analizinin gerçekleştirilmesinde Formül 3.4 kullanıldı. Referans gen olarak β-aktin kullanıldı.

Tablo 3.8. Gerçek zamanlı PZR protokolü

Polimeraz Aktivasyonu/DNA Denatürasyonu	95°C	3 dk
Denatürasyon	95°C	15 sn
Bağlanma	*Primere özgü (55-65°C)	30 sn
Uzama	72°C	20 sn
Melting-curve analizi	55-95°C, (0.5°C artış)	5 sn/adım

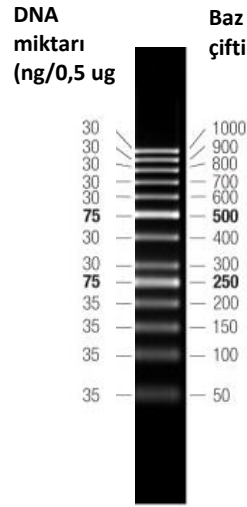
* NOS1 = 59,6°C; NOS2 = 60°C; NOS3 = 63,8°C

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-(\Delta Ct \text{ hedef örnek} - \Delta Ct \text{ referans örnek})}$$

$$= 2^{-[(Ct \text{ hedef gen} - Ct \text{ referans gen}) \text{ hedef örnek} - (Ct \text{ hedef gen} - Ct \text{ referans gen}) \text{ referans örnek}]} \quad (3.4)$$

3.6.5. Agaroz Jel Elektroforezi

PZR ürünleri reaksiyon sonunda jel elektroforezinde yürütüldü. 1x TBE tampon çözeltisi içerisinde %2’lik agaroz jel hazırlandı. Hazırlanan jel mikrodalga fırınında eritilip, sıcaklık 60°C’ye ulaştığında final konsantrasyonu 10 mg/ml olacak şekilde etidyum bromür eklendi ve kalıba dökülerek taraklar yerleştirildi. Oda sıcaklığında 1 saat inkübasyon gerçekleştirdikten sonra taraklar çıkarılarak jel 1x TBE tampon çözeltisi içinde yürütme tankına yerleştirildi. Her bir PZR ürününden 15 µl alındı ve 1 µl 6x yükleme boyası ile karıştırıldı ve jele yüklendi. 5 µl DNA belirteci ampikon büyüklüğünün kontrolünde kullanıldı (Şekil 3.5). Yürütme işlemi (100 V, 45 dk., oda sıcaklığında) tamamlandıktan sonra PZR ürünleri görüntüleme sisteminde (IVIS, Newton 7.0) UV ışık altında görüntülendi.



Şekil 3.5. 50 bç DNA belirteci (Thermo Scientific, ABD), bç: baz çifti

3.7. İmmü floresan Boyama

3.7.1. Hücre-içi İmmü floresan Boyama

İmmü floresan boyamalar MDA-MB-231 insan bazal benzeri meme kanseri hücre hattından elde edilen süpernatant ile uyarılan THP-1 hücreleri ve tam RPMI 1640 besiyeri ile uyarılan THP-1 hücreleri ile oluşturulan deneyler üzerinde yapıldı. Bu amaçla MDA-MB-231 süpernatantı veya tam RPMI 1640 besiyeri içinde aktive edilen hücrelerden belirlenen inkübasyon süresinin sonunda tripsin-EDTA protokolüne göre besiyeri veya süpernatantlar uzaklaştırılıp, hücreler toplandıktan sonra 1x PBS ile yıkandı (1800 rpm, 5 dk., oda sıcaklığı). Süpernatant kısım uzaklaştırıldıktan sonra hücreler 2 ml 1x PBS ile süspansiyon edildi ve lam üzerine yerleştirilen sitospin (*cytospin*) aparatının kuyularına aktarılarak sitospin cihazında (Hettich Universal 320, Almanya) santrifüj yapıldı (50xg, 3 dk., oda sıcaklığı). Süpernatant kısım uzaklaştırıldı ve sitospin aparatı çıkarıldı. Filtre kağıdı lam üzerinde bırakılarak kurutmanın sağlanması için örnekler bir kez daha sitospin cihazında santrifüj edildi (150 xg, 1 dk., oda sıcaklığı). Santrifüj sonrasında fiksasyonun sağlanması amacıyla hücreler oda sıcaklığında ve karanlıkta 1 gece inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından hücreler bloklama işlemi için 1x PBS ile 1:10 oranında seyreltilen %1 BSA içerisinde 30 dakika boyunca inkübe edildi. Bloklamının

ardından BSA ortamdan uzaklaştırıldı ve 1x PBS içeren %1 BSA içerisinde 1:100 oranında seyreltilen NOS2 primer antikoru eklenerek oda sıcaklığında 1,5 saat inkübe edildi. Hücreler 3 kez 1x PBS ile yıkandı ve %1 BSA ile 1:500 oranında seyreltilmiş Alexa488 (Abcam, Birleşik Krallık) floresan konjugeli sekonder antikoru ile 1:1000 oranında seyreltilmiş DAPI çekirdek boyası ile oda sıcaklığında, karanlık ortamda 1,5 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda hücelere 3 kez 1x PBS ile yıkanarak 100 µL kapatma solüsyonu (*mounting media*) eklendi ve lamlara 0,17 mm kalınlığındaki lameller kapatıldı. Hücrelerde kurumanın önlenmesi için lamellerin etrafı yapıştırıcı bir solüsyon ile kaplandı ve bir gece oda sıcaklığında, karanlık ortamda inkübe edildi. İnkübasyonun sonunda örnekler 4°C'ye kaldırıldı.

Floresan görüntüleme için örneklerin bulunduğu lameller üzerine immersiyon yağı damlatıldı ve 100x objektif altında örnekler epifloresan mikroskoba (Olympus BX51, Japonya) yerleştirilerek soğutmalı 5,0 mega piksel CCD renkli kamera (DC5000i, Euromex, Hollanda) ile görüntülendi. Dijital analizler, Image-J (NIH, ABD) yazılımı ile yapıldı.

3.7.2. Uyarılmış THP-1 Hücre Polarizasyonunun İmmünfloresan Boyama ile Gösterilmesi

Polarizasyon deneyleri, MDA-MB-231 hücre hattından elde edilen süpernatantlar ile uyarılan THP-1 hücreleri ve tam 1640 RPMI besiyeri ile uyarılan THP-1 hücrelerinde gerçekleştirildi. Polarizasyon deneylerinde, ilgili yüzeylere tutunarak büyüyen hücrelerin çevresi, alanı ve kutupsallık indeksi parametreleri değerlendirildi. Kutupsallık indeksi hücrenin aktin iskeletinin yönsel analizi ile hesaplanmaktadır. Hesaplama, her görüntüye yönsel bileşenleri tayin eden yapısal görüntü filtresi uygulanmaktadır (Directionality; Fourier Components Analysis; Nbins = 90, angle = -90; build orientation map). Ardından filtreleme ile elde edilen dağılım (dispersion), miktar (amount) ve örtüşme (goodness) değerleri ile hücre kutupsallık indeksi hesaplanmaktadır (Formül 3.4)

$$\text{Kutupsallık indeksi} = \frac{\text{Miktar} \times \text{Örtüşme}}{(180 - \text{Dağılım})/180} \quad (3.4)$$

Bu deneyde, ilk olarak 24 kuyucuklu plakların tabanına 10 mm çapında daire şeklinde lameller yerleştirildi. Ardından lamellerin üzerine 12 kuyuya fibronektin (20 µg/ml) diğer 12 kuyuya da matrijel (120 µg/ml) eklenerek 4 saat boyunca %5 CO₂ içeren 37°C inkübatörde kültüre edildi. İnkübasyonun sonunda lamellerin üzerinden fibronektin ve matrijel uzaklaştırıldı ve MDA-MB-231 süpernatanı ile süspansiyon edilen THP-1 hücreleri ile tam RPMI 1640 besiyeri ile süspansiyon edilen THP-1 hücreleri 500 µl hacminde 24 kuyucuklu plaklara ekildi. Hücre ekimi için uygulanan prosedür Bölüm 3.3.5'te anlatıldığı gibidir. 120 saat %5 CO₂ içeren 37°C inkübatörde kültüre edilen hücrelerden inkübasyon sonunda besiyeri ve süpernatant ortamdaki uzaklaştırılarak kuyular 1x PBS ile yıkandı. Ardından %4 paraformaldehit çözeltisi kuyulara eklenerek hücreler 15 dakika boyunca inkübe edildi ve fikse edilmeleri sağlandı. İnkübasyon sonunda kuyular 1x PBS ile 3 kez yıkandı ve 3 dk boyunca da %0,1 Triton X-100 ile muamele edildi. Deneylerin devamı Bölüm 3.7.1'de belirtildiği şekilde olup, kullanılan NOS2 primeri 1:200 oranında seyreltilip; sekonder antikorlardan Alexa488-konjuge falloidin ve Alexa555-konjuge sekonder antikor da 1:500 oranında seyreltildi. Çekirdek boyası olan DAPI ise 1:1000 oranında seyreltilerek kullanıldı.

Floresan görüntüleme için örneklerin bulunduğu lameller üzerine immersiyon yağı damlatıldı ve 100x objektif altında örnekler epifloresan mikroskoba (Olympus BX51, Japonya) yerleştirilerek soğutmalı 5,0 mega piksel CCD renkli kamera (DC5000i, Euromex, Hollanda) ile görüntülendi. Dijital analizler Image-J (NIH, ABD) yazılımı ile yapıldı.

3.8. Sitokimyasal Boyama

3.8.1. May-Grünwald-Giemsa Boyama

Sitokimyasal boyamalar 6 kuyucuklu plaklarda ekimi yapılan MDA-MB-231 hücre hattından elde edilen süpernatantlar ile uyarılan THP-1 hücreleri ve 6

kuyucuklu plaklarda ekilip tam 1640 RPMI besiyeri içerisinde ekilen THP-1 hücreleri kullanılarak yapıldı. Bu amaçla Bölüm 3.7.1’de belirtildiği şekilde lam yüzeyine yapıştırılan hücreler, şalelere yerleştirildi. Ardından distile su ile 1:10 oranında seyreltilen May-Grünwald boyası ile örnekler, çalkalayıcıda oda sıcaklığında 10 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonunda örneklerin bulunduğu camlar distile su ile yıkandı. Daha sonra distile su ile 1:10 oranında seyreltilen Giemsa boyası ile örnekler çalkalayıcıda oda sıcaklığında 10 dk boyunca inkübe edildi. Ardından örnekler distile su ile yıkanarak havada kurumaya bırakıldı. Kuruyan örneklerin üzerine kapatma solüsyonu (Entellan, Merck, Almanya) damlatıldı ve lamel kapatıldı. Görüntüler dijital kameralı ışık mikroskobu (DM 6000, Leica, Almanya) ile değerlendirildi.

May-Grünwald - Giemsa boyamasında hücre içi bazik alanlar metilen mavisi ile mavi tonda, hücre içi asidik alanlar ise eosin ile pembe/kırmızı tonda boyanarak işaretlenmektedir.

3.9. İstatistiksel Analiz

Sonuçlar en az üç bağımsız deneyden elde edildi ve Student’s paired veya unpaired testleri, ANOVA, Mann-Whitney U testi veya Ki-kare testleri ile istatistiksel farklılıklar gösterildi. P değerleri $\leq 0,05$, $\leq 0,001$ ve $\leq 0,0001$ olduğunda elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Grafiklerdeki ortalama değerler standart sapma veya standart hata ile birlikte gösterildi.

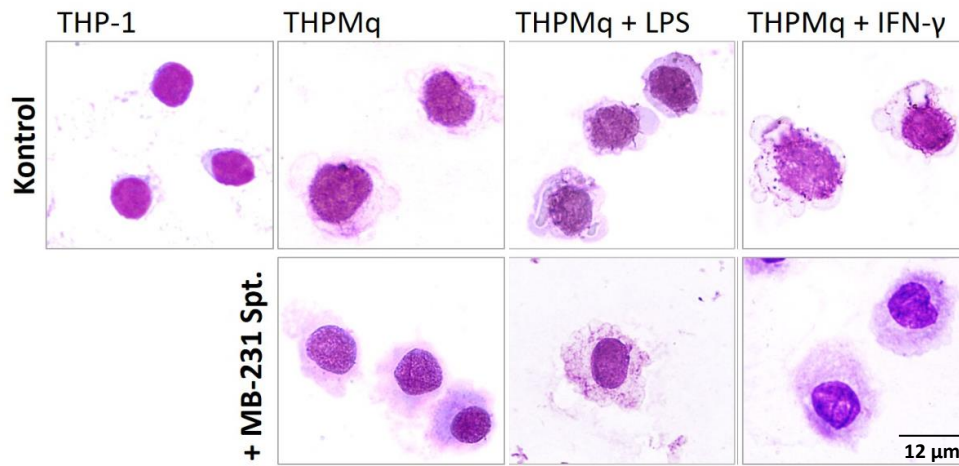
4. BULGULAR

4.1. Bazal-benzeri Meme Kanseri Hücrelerinden Salgılanan Faktörlerin Makrofaj Farklılaşmasına Etkisi

Monositler dolaşım yoluyla çeşitli dokulara yerleşme ve burada olgunlaşarak makrofajlara dönüşme kapasitesine sahip hücrelerdir. Makrofajların fonksiyonel polarizasyonu, zamana ve dokuya bağlı olarak, sitokinler, büyüme faktörleri, yağ asitleri, prostaglandinler ve patojenlerden köken alan molekülleri kapsayan içsel, dışsal ve doku mikroçevresi uyarınları tarafından düzenlenmektedir (43).

Gerçekleştirilen bu tez çalışmasında, makrofaj farklılaşması morfolojik ve immünofenotipik analizler ile değerlendirildi. Bu amaçla, farklılaşma deneylerinde sıklıkla kullanılan insan monositik hücre hattı THP-1 ve insan bazal-benzeri meme kanseri hücre hattı olan MDA-MB-231 hücre hattı kullanıldı. MDA-MB-231 hücrelerinden elde edilen süpernatantların varlığında kültürü yapılan THP-1 hücrelerinde ayrıca protein kinaz C yolağı da uyarılarak makrofaj farklılaşması sağlandı. Bu hücreler makrofajlara farklılaştıkları bilindiğinden THP-Mq olarak adlandırıldı. Hücre kültüründe kullanılan süpernatantların olası besin eksikliğinin giderilmesi için tam RPMI besiyeri ile 1:1 oranında seyreltildi. Ardından makrofajların 48 saat boyunca IFN- γ veya LPS ile uyarımı yapılarak M1 karakterine polarizasyonu gerçekleştirildi. Bu sürenin sonunda makrofaj yönünde farklılaşması sağlanan THP-1 monositik hücreleri morfolojik olarak incelendi (Şekil 4.1). Buna göre, kontrol THP-1 hücrelerinde nükleusun sitoplazmayı daraltan, yuvarlak şekilli olduğu gözlemlendi. THP-1 monositik hücrelerinin PKC aktivatörü ile muamele edilmesi hücrenin boyutunda artışa neden oldu ve nükleusun oval şeklini alarak sitoplazmanın genişlediği görüldü. IFN- γ veya LPS ile inkübasyonun sonunda hücrelerin sitoplazmalarının daha da genişlediği gözlemlendi. Belirgin bir granüler sitoplazma, THP-1 monositik hücrelerde izlenmezken, süpernatantla inkübe edilen hücrelerde belirginleşti. IFN- γ veya LPS ile uyarım sonucunda ise, bu hücrelerde de sitoplazmik alanın artışı görüldü (Şekil 4.1).

Eş-zamanlı olarak MDA-MB-231 süpernatanı ve PKC aktivatörü ile eş zamanlı olarak uyarılan THP-1 hücrelerin nükleusu da, kontrol THP-1 hücrelerine göre büyüme eğilimi gösterdi. Böbrek şekilli nükleus yapısı da kontrol THP-1 ve THPMq hücrelerine göre daha belirgin idi. Süpernatan ile eş zamanlı uyarımın ardından 48 saat boyunca IFN- γ veya LPS ile muamele edilen hücrelerin sitoplazmalarının büyüklüğünde de artış görülürken, IFN- γ ile meydana gelen uyarımda bu artışın daha belirgin olduğu görüldü. Ayrıca IFN- γ 'nın bu hücrelerde sitoplazmik vakuollerin oluşmasına neden olduğu ve azurofilik boyanma pozitifliğinin arttığı gözlemlendi (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. THP-1 monositik hücre hattının, insan bazal-benzeri meme kanseri hücre hattı olan MDA-MB-231 hücrelerinden elde edilen süpernatanlar varlığında 5×10^5 hücre/mL olacak şekilde eş zamanlı gerçekleştirilen kültüründe PMA ile 72 saat inkübasyonun ardından 48 saat boyunca LPS veya IFN- γ ile muamelesi sonucunda M1 makrofaja farklılaşan hücrelerin May-Grünwald Giemsa boyaması ile elde edilen morfolojik görüntü analizleri. Ölçek çubuğu $12 \mu\text{m}$ 'dir.

4.1.1. Makrofaj Yönünde Farklılaşmanın İmmünofenotip Analizi İle Değerlendirilmesi

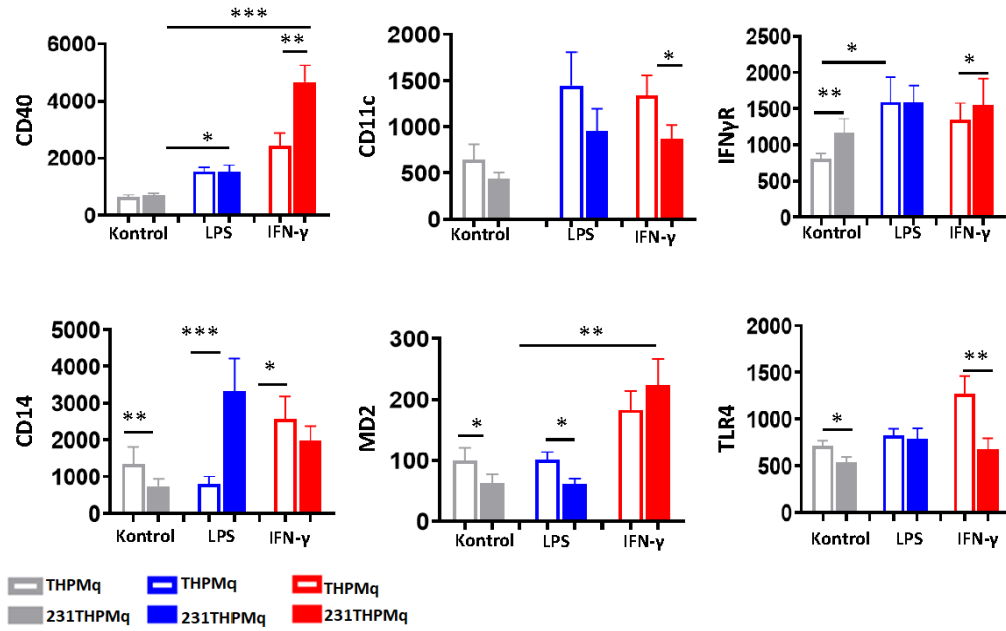
MDA-MB-231 bazal-benzeri meme kanseri süpernatanı varlığında farklılaştırılan THP-1 hücrelerinde CD40, CD14, CD11c, TLR4, MD2 ve IFN γ R yüzey belirteçlerinin düzeyleri incelendi. Yalnızca PKC aktivatörü ile uyarılmış kontrol

THPMq hücreleri, meme kanseri süpernatanı varlığında geliştirilen hücreler ile karşılaştırıldığında, IFN γ R belirtecinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülürken, diğer belirteçlerde azalma olduğu belirlendi ($p < 0.05$). IFN γ R'nin ortalama floresan yoğunluk (OFY) düzeyi, THPMq hücrelerinde $808,3 \pm 69,7$; MDA-MB-231 süpernatanı varlığında geliştirilen hücrelerde ise $1178,5 \pm 171,7$ olarak bulundu. CD40, CD14, CD11c, TLR4 ve MD2 düzeylerinin THPMq hücrelerindeki değerleri sırasıyla $632,1 \pm 74,5$, $646,4 \pm 152,1$, $1349,4 \pm 469,4$, $725,7 \pm 46,9$ ve $100,5 \pm 18,2$ olarak belirlendi. Süpernatan varlığındaki hücrelerde ise bu belirteçlerin OFY değerleri sırasıyla $697,4 \pm 74,9$, $748,4 \pm 161,2$, $437 \pm 57,8$, $536,6 \pm 59,4$ ve $63 \pm 13,1$ olarak bulundu (Şekil 4.2.A.). Morfolojik farklılıklara ve miyeloid belirteçlerde izlenen farklılıklara istinaden MDA-MB-231 hücrelerinin süpernatantları varlığında kültüre edilen hücreler 231THPMq olarak adlandırıldı.

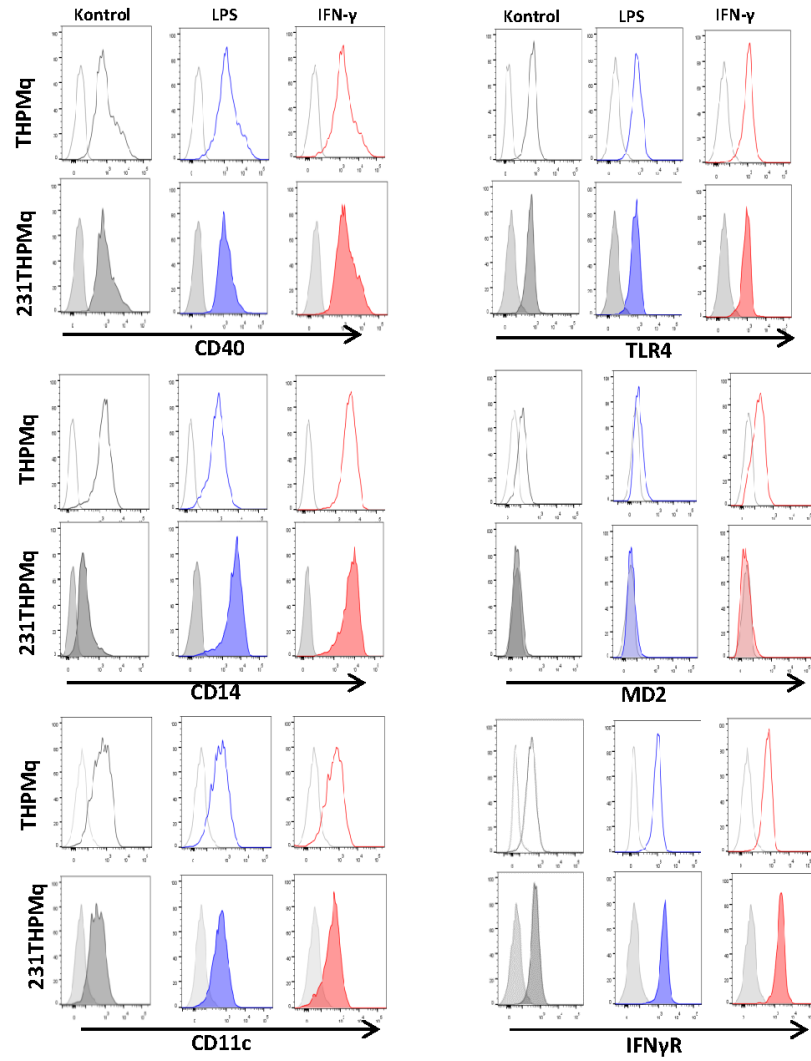
Kontrol 231THPMq ve kontrol THPMq hücrelerinin LPS ile muamelesi sonucunda, 231THPMq hücrelerinin CD14 belirtecinde THPMq hücrelerine göre belirgin bir artış gözlenirken, CD11c ve MD2 yüzey belirteçlerinde anlamlı düzeyde azalmanın olduğu görüldü. LPS ile muamele edilen THPMq hücrelerinin CD14, CD11c ve MD2 düzeyleri sırasıyla $798,2 \pm 198,8$, $1454,4 \pm 334,9$ ve $102 \pm 12,4$ olarak belirlenirken, LPS ile muamele edilen 231THPMq hücrelerinde bu değerler sırasıyla $3325 \pm 782,7$, $954,7 \pm 214,4$ ve $62,3 \pm 7,7$ olarak belirlendi (Şekil 4.2.B.). IFN- γ ile muamele edilen 231THPMq ve THPMq hücrelerinde ise 231THPMq hücrelerinin CD40, MD2 ve IFN γ R belirteçlerinde anlamlı artış olduğu görülürken ($p < 0.05$), diğer belirteçlerde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma ($p < 0.05$) eğilimi görüldü. IFN- γ ile muamele edilen THPMq hücrelerinde CD40, CD11c, IFN γ R, CD14 TLR4 ve MD2 belirteçlerine ait değerler sırasıyla $2427,6 \pm 422,4$, $1275,1 \pm 188,2$, $1343,8 \pm 206,9$, $2577,3 \pm 614$, $1337 \pm 207,4$ ve $182,8 \pm 32,3$ olarak bulundu. Aynı belirteçlerin değeri 231THPMq hücrelerinde ise $4659,9 \pm 602,8$, $224,7 \pm 36,3$, $1554,8 \pm 316,5$, $1992,2 \pm 312,9$, $684 \pm 110,1$ ve $876,9 \pm 145,8$ olarak belirlendi.

THPMq ve 231THPMq hücreleri IFN- γ veya LPS ile uyarıldığında tüm belirteçlerde istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptandı. Bu artışın en çok IFN- γ ile uyarılan 231THPMq hücrelerinde olduğu belirlendi. LPS ile uyarılan 231THPMq

hücrelerinde ise kontrole göre anlamlı bir artış olduğu saptandı. LPS ile uyarılan THPMq hücrelerinin CD11c düzeyinin kontrole göre daha yüksek olduğu belirlendi (Şekil 4.2.B).



Şekil 4.2.A. THP-1 hücreleri ile elde edilen sonuçları gösteren temsili akım sitometri histogramları. Boş histogramlar THP-1 hücrelerinin tam RPMI besiyeri ile muamele edilmiş gruplardaki OFY değerlerini, dolu histogramlar ise MDA-MB-231 süpernatantları varlığında muamele edilmiş gruplardaki OFY değerlerini, dolu histogramlar ise MDA-MB-231 süpernatantları varlığında muamele edilen THP-1 hücrelerinin OFY değerlerini yapılan göstermektedir.

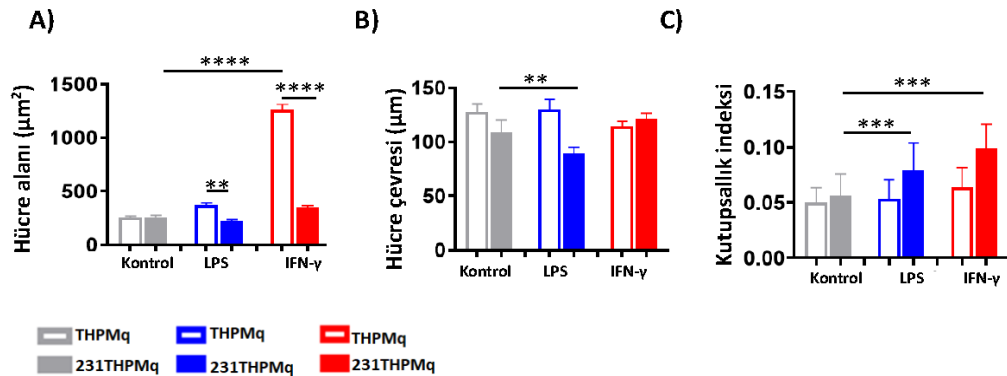


Şekil 4.2.B. THP-1 hücreleri ile elde edilen sonuçları gösteren temsili akım sitometri histogramları. Boş histogramlar THP-1 hücrelerinin tam RPMI besiyeri ile muamele edilmiş gruplardaki OFY değerlerini, dolu histogramlar ise MDA-MB-231 süpernatantları varlığında muamele edilmiş gruplardaki OFY değerlerini, dolu histogramlar ise MDA-MB-231 süpernatantları varlığında muamele edilen THP-1 hücrelerinin OFY değerlerini yapılan göstermektedir.

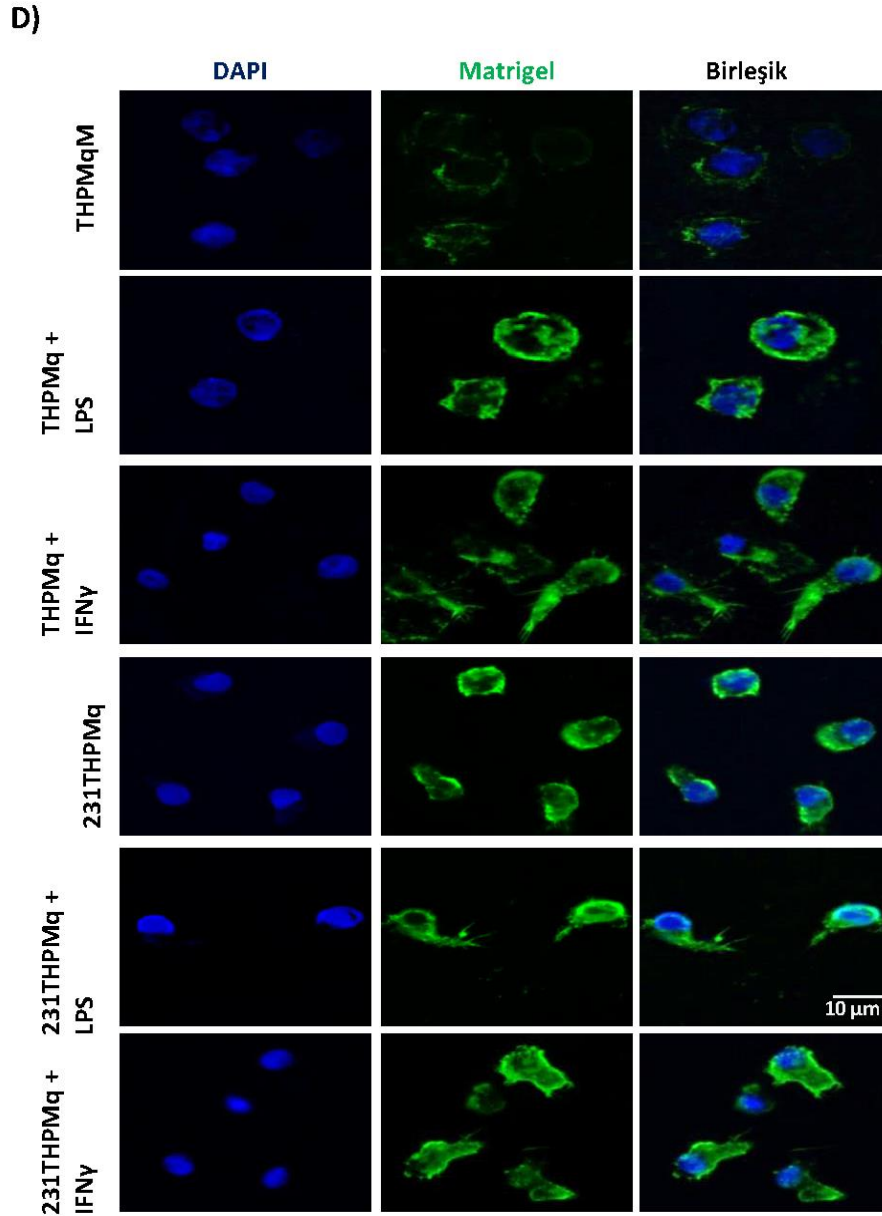
4.1.2. Farklı Yüzeylerin THP-1 Hücrelerinde Makrofaj Farklılaşması Üzerine Etkisi

THPMq ve 231THPMq hücrelerinin IFN- γ veya LPS uyarımı koşulunda ekstraselüler matriks proteini olan fibronektin ve Matrigel ile kaplanan yüzeylerdeki davranışları incelendi (Şekil 4.3 D ve Şekil 4.4 D). Bu amaçla, ilgili yüzeylere

tutunarak büyüyen hücrelerin çevresi, alanı ve kutupsallık indeksi parametreleri değerlendirildi. Yapılan analizlerin sonucunda, Matrigel kaplı yüzeylerde, IFN- γ ile uyarılan THPMq hücrelerinin alanının en büyük olduğu görüldü. Bunun yanında, LPS ile uyarılan THPMq hücrelerinin çevresi en geniş olup, IFN- γ ile uyarılan THPMq hücrelerinin çevresi ile arasında anlamlı bir fark olmadığı belirlendi (Şekil 4.3.A-D). Matrigel kaplı yüzeyde THPMq, LPS ile uyarılan THPMq ve IFN- γ ile uyarılan THPMq hücrelerinin alanları sırasıyla $257,5 \pm 12,6$, $373,8 \pm 18,1$ ve $333 \pm 10,2 \mu\text{m}^2$ iken; çevreleri sırasıyla $128 \pm 7,3$, $130 \pm 9,7$ ve $114,4 \pm 5 \mu\text{m}$ olarak belirlendi. Kutupsallık indeksleri sırasıyla $0,05 \pm 0,01$, $0,05 \pm 0,01$ ve $0,06 \pm 0,02$ olarak bulundu. IFN- γ veya LPS ile muamele edilen 231THPMq hücrelerinin LPS veya IFN- γ ile uyarımları sonucunda ise alanları $260,6 \pm 15,9$, $223,6 \pm 12,7$ ve $355,2 \pm 13,1 \mu\text{m}^2$ olarak belirlenirken, hücre çevreleri $109 \pm 11,4$, $89,2 \pm 5,8$ ve $121 \pm 5,4 \mu\text{m}$ olarak bulundu. 231THPMq, LPS ile uyarılmış 231THPMq ve IFN- γ ile uyarılmış 231THPMq hücrelerinin kutupsallığı sırasıyla $0,06 \pm 0,02$, $0,07 \pm 0,02$ ve $0,1 \pm 0,02$ olarak saptandı.



Şekil 4.3. A-C. Protein kinaz C agonisti ile 72 saat muamelenin ardından 48 saat boyunca LPS veya IFN- γ etkisi altında hücrelerin Matrigel ile kaplı yüzeylerde izlenen (A) hücre alanı, (B) hücre çevresi ve (C) kutupsallık indeksleri, aktin iskeleti boyaması ile belirlendi. (** p<0.01; **** p<0.0001; n≥15).

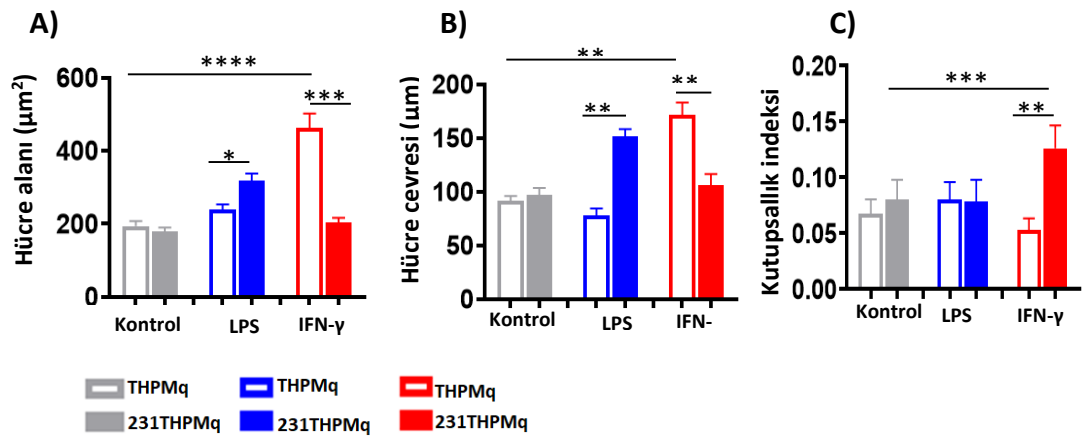


Şekil 4.3.D. Protein kinaz C agonisti ile 72 saat muamelenin ardından 48 saat boyunca LPS veya IFN- γ etkisi altında hücrelerin Matrigel ile kaplı yüzeylerde izlen aktin iskeleti boyama sonuçlarını gösteren temsili floresan mikroskop görüntü analizleri (yeşil, phalloidin; mavi, DAPI) Ölçek çubuğu 10 μ m'dir.

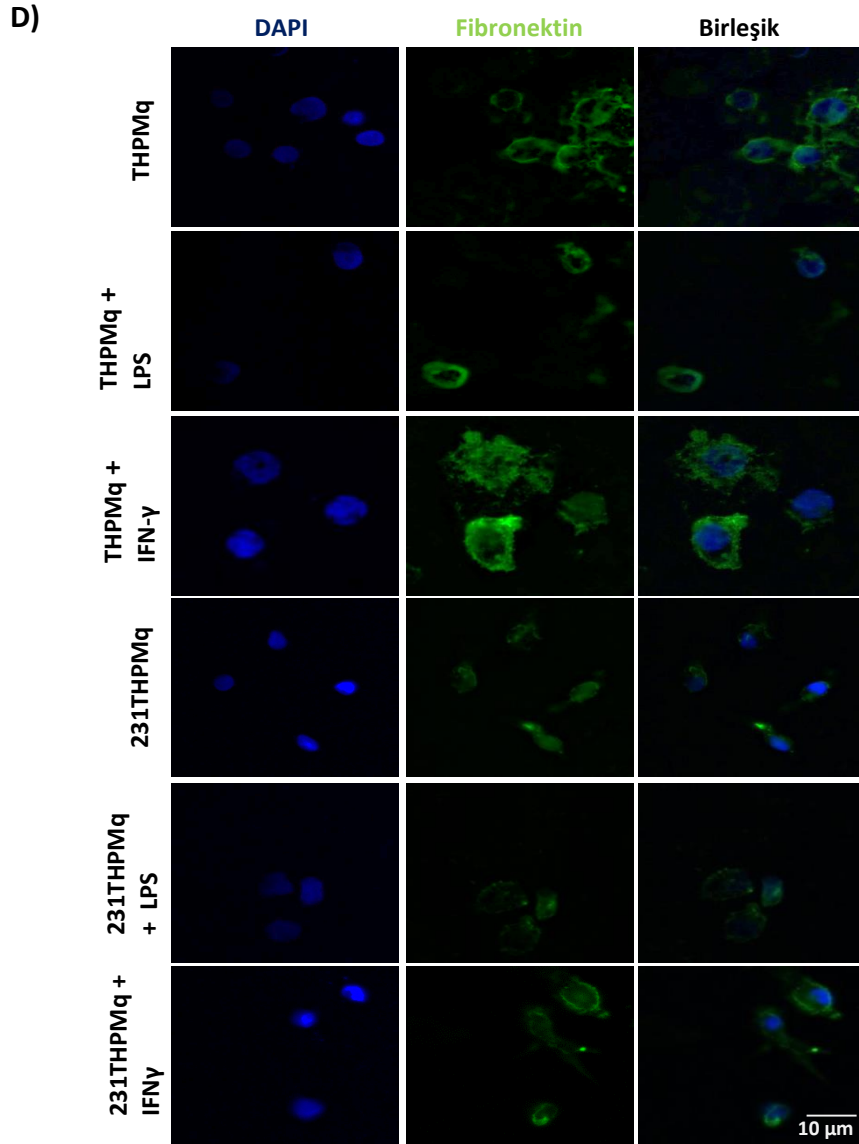
Fibronektin kaplı yüzeylerde ise, IFN- γ ile uyarılan THP1Mq hücrelerinin alanının ve çevresinin en büyük olduğu görüldü. LPS ile uyarılan 231THPMq hücrelerinin alan ve çevresinin LPS ile uyarılan THPMq hücrelerinden anlamlı olarak daha büyük olduğu belirlendi (Şekil 4.4.A-B). Fibronektin kaplı yüzeyde kontrol

THPMq hücreleri ve LPS veya IFN- γ ile muamele edilen hücrelerin alanları sırasıyla $194,1 \pm 13,9$, $240 \pm 13,9$ ve $463,8 \pm 38,6 \mu\text{m}^2$; hücre çevreleri sırasıyla $91,2 \pm 4,9$, $78,3 \pm 4$ ve $171,8 \pm 11,4 \mu\text{m}$ olarak belirlendi. Fibronektin kaplı yüzeylerde incelenen kutupsallık indeksi incelendiğinde, IFN- γ ile muamele edilen 231THPMq hücrelerinin kutupsallık indeksi en yüksek tespit edildi. Ayrıca bu hücrelerin kutupsallık indeksi IFN- γ ile uyarılan THPMq hücrelerine göre kıyaslandığında daha yüksek idi.

231THPMq hücrelerinin LPS veya IFN- γ uyarımları sonucunda hücre alanları $180,2 \pm 10,3$, $318,1 \pm 20,1$ ve $205,7 \pm 11,3 \mu\text{m}^2$ olarak belirlenirken, hücre çevreleri sırasıyla $96,8 \pm 7$, $151,7 \pm 6,4$ ve $106,4 \pm 9,9 \mu\text{m}$ olarak belirlendi. Bunun yanında kontrol THPMq ile kontrol 231THPMq hücrelerinin alanı, çevresi ve kutupsallık indeksleri arasında anlamlı bir fark olmadığı belirlendi (Şekil 4.4.C.).



Şekil 4.4. A-C. Protein kinaz C agonisti ile 72 saat muamelenin ardından 48 saat boyunca LPS veya IFN- γ etkisi altında hücrelerin fibronektin ile kaplı yüzeylerde izlenen (A) hücre alanı, (B) hücre çevresi ve (C) kutupsallık indeksleri aktin iskeleti boyaması ile belirlendi. (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; $n \geq 15$).



Şekil 4.4.D. Protein kinaz C agonisti ile 72 saat muamelenin ardından 48 saat boyunca LPS veya IFN- γ etkisi altında hücrelerin Fibronektin ile kaplı yüzeylerde izlen aktin iskeleti boyama sonuçlarını gösteren temsili floresan mikroskop görüntü analizleri (yeşil, phalloidin; mavi, DAPI) Ölçek çubuğu 10 μ m'dir.

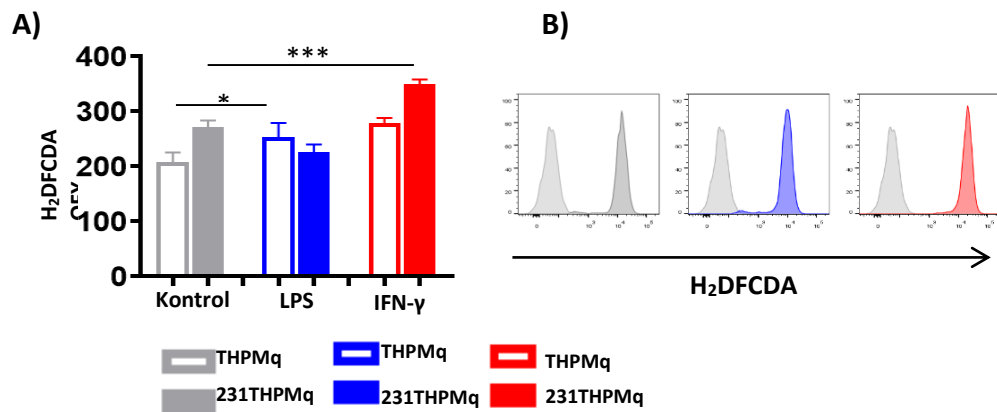
4.2. MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücrelerinden Salgılanan Faktörler Varlığında Farklılaştırılan THP-1 Hücrelerinde ROS ve NO Üretimi

Makrofajlar, reaktif oksijen türleri ve nitrojen ara ürünlerini üreterek patojenlere karşı toksik yanıt oluşturur (43). Protein kinaz C aktivatörü ile uyarılan monositlerde, ROS üretimini uyarıcı sinyal yolları uyarılır ve ROS üretimi artar. LPS

veya IFN- γ ile uyarılan makrofajlarda da çeşitli proinflamatuvar genlerin ifadelerinde de artış meydana gelir. Bu durum ROS ve NO üretimine de katkı sağlar (134).

THP-1 monositik hücrelerinin MDA-MB-231 bazal-benzeri meme kanseri süpernatantları varlığında veya kontrol kültür ortamında makrofaj yönünde farklılaştırıldı. LPS veya IFN- γ ile uyarımları gerçekleştirildi. LPS ve IFN- γ , THPMq hücrelerinin ROS üretimini arttırdı; ancak, bu artışın anlamlı bir düzeyde olmadığı görüldü (Şekil 4.5). 231THPMq hücrelerinde ROS üretiminin ise THPMq hücrelerine göre arttığı saptandı.

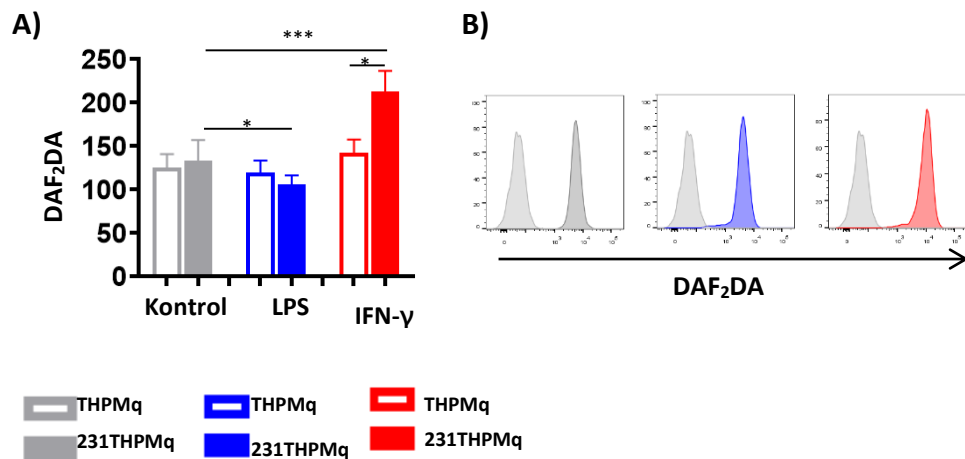
IFN- γ ile uyarımı sağlanan 231THPMq hücrelerinde ROS üretiminde anlamlı bir artış olduğu görülürken, LPS ile uyarımda ise azalmanın olduğu; ancak bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı düzeyde olmadığı belirlendi. IFN- γ ile uyarılan 231THPMq hücrelerinde de IFN- γ ile uyarılan THPMq hücrelerine göre anlamlı artış saptandı (Şekil 4.5). LPS ile uyarım sonucunda THPMq ve 231THPMq hücrelerindeki ROS üretimi sırasıyla $252,6 \pm 19,2$ ve $226,4 \pm 12,3$ olarak bulundu. IFN- γ ile muamele sonucunda meydana gelen ROS üretim kapasiteleri ise $278,5 \pm 8$ ve $349,6 \pm 7,4$ olarak hesaplandı (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. Protein kinaz C agonisti ile 72 saat muamelenin ardından 48 saat boyunca LPS veya IFN- γ varlığında THPMq ve 231THPMq hücrelerinin ROS üretimi (A) Otofloresan yoğunluğuna göre normalize edilmiş H₂DFCDA OFY ve (B) temsili akım sitometri histogramları. Boş histogramlar THPMq hücrelerini, dolu histogramlar ise 231THPMq hücrelerini göstermektedir (Gri renk, kontrol grubu; mavi renk, LPS ile uyarım; kırmızı renk, IFN- γ ile uyarım (* p < 0.05; *** p < 0.001 ; n \geq 6)

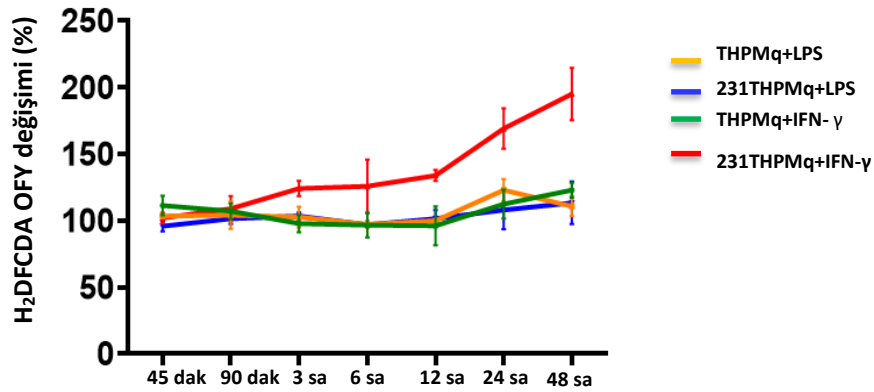
NO üretiminin DAF₂DA boyası ile boyanarak akım sitometrik analizlerinin sonucunda ise, LPS veya IFN- γ ile uyarılan THPMq hücrelerinin NO üretiminde kontrol THPMq hücrelerine göre herhangi bir değişimin olmadığı görüldü. Kontrol grubunda NO üretimi sırasıyla 125 \pm 15,8 ve 133,9 \pm 3,4 olarak belirlendi (Şekil 4.6). Kontrol 231THPMq hücrelerinin NO üretiminde kontrol THPMq hücrelerine göre artış saptandı, ancak bu artış anlamlı düzeyde belirlenmedi. IFN- γ uyarımı gerçekleştirilen 231THPMq hücrelerinin NO üretiminde kontrol 231THPMq hücrelerine göre anlamlı bir artış saptandı; ancak LPS ile uyarılan hücrelerde azalma yönünde bir değişim elde edildi (Şekil 4.6). LPS ile uyarım sonucunda THPMq ve 231Mq hücrelerindeki NO üretimine ilişkin floresan yoğunluğu sırasıyla 120 \pm 14,9 ve 106,5 \pm 10 olarak bulundu.

IFN- γ ile uyarılan THPMq hücreleri ile 231THPMq hücreleri karşılaştırıldığında, meme kanseri süpernatanı ile muamele edilmiş hücrelerin daha fazla NO ürettiği gösterildi (Şekil 4.6). (THPMq OFY; 142,2 \pm 13,3; 231THPMq OFY; 212,5 \pm 24,3)



Şekil 4.6. Protein kinaz C agonisti ile 72 saat muamelenin ardından 48 saat boyunca LPS veya IFN- γ etkisi altında THPMq ve 231THPMq hücrelerinde meydana gelen NO üretimlerine ait akım sitometri analiz sonuçlarının (A) bar grafiği, (B) histogramları. Boş histogramlar THPMq hücrelerini, dolu histogramlar ise 231THPMq hücrelerini göstermektedir. Gri renk kontrol grubunu, mavi renk LPS ile uyarımı, kırmızı renk IFN- γ ile uyarımı ifade etmektedir. (** p < 0.01; *** p < 0.001; n \geq 6).

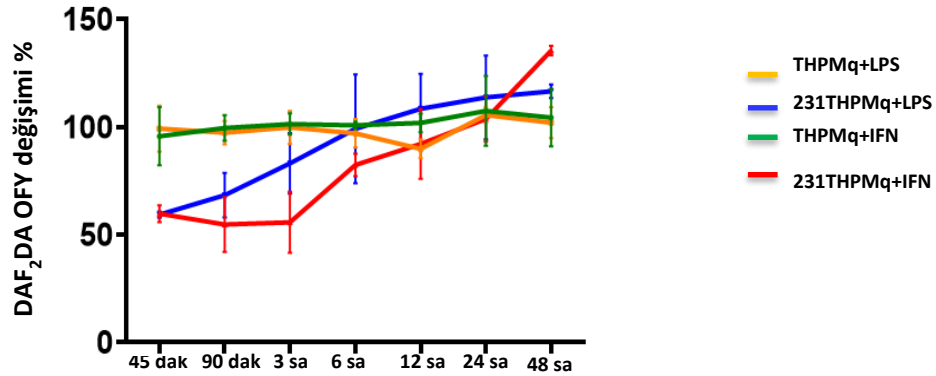
THP-1 monositik hücre hattının MDA-MB-231 bazal-benzeri meme kanseri süpernatanı varlığında makrofaj yönünde farklılaştırıldığı ve IFN- γ veya LPS ile farklı sürelerde uyarıldığı koşullarda (45 dak., 90 dak., 3 sa., 6 sa., 12 sa., 24 sa. ve 48 sa.) ROS üretim düzeyi incelendi. LPS veya IFN- γ uyarımı varlığında THPMq ve 231THPMq hücrelerinde 12 saate kadar ROS üretiminde belirgin bir değişim gözlenmezken, 12. saatin sonunda IFN- γ ile uyarılan 231THPMq hücrelerinin ROS üretiminde %50'den fazla bir artış olduğu belirlendi (Şekil 4.7). IFN- γ ile uyarılan THPMq hücrelerinde ise 48. saate doğru ROS düzeyinde bir artış eğilimi izlendi. LPS ile uyarılan THPMq hücrelerinde ise ROS üretiminin 24. saatte artış eğiliminde idi (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. Protein kinaz C agonisti ile 72 saat muamelenin ardından LPS veya IFN- γ ile artan inkübasyon sürelerinde uyarılmış THPMq ve 231THPMq hücrelerinin ROS üretim düzeylerinin yüzde değişimi uyarılmamış hücrelere göre hesaplanmıştır. Yeşil renk IFN- γ ile uyarılan THPMq hücrelerini, sarı renk LPS ile muamele edilen THPMq hücrelerini, kırmızı renk IFN- γ ile uyarılan 231THPMq hücrelerini, mavi renk ise LPS ile muamele edilen 231THPMq hücrelerini ifade etmektedir.

ROS üretiminin zamana bağlı değişimine benzer şekilde NO üretimleri incelenen hücrelerde, IFN- γ veya LPS ile uyarılan 231THPMq hücrelerinin NO üretiminde artış görüldü. LPS ile uyarılan 231THPMq hücrelerinde NO üretiminin uzatılan inkübasyon süresi ile artış olduğu görülürken, IFN- γ ile uyarılan 231THPMq hücrelerinde 3. saate kadar herhangi bir artışın olmadığı belirlendi. En yüksek NO

üretime 48. saatte ulaşıldı (Şekil 4.8). LPS veya IFN- γ ile uyarılan THPMq hücrelerinde 48 saatin sonunda NO üretiminde başlangıca göre anlamlı bir değişiklik saptanmadı.



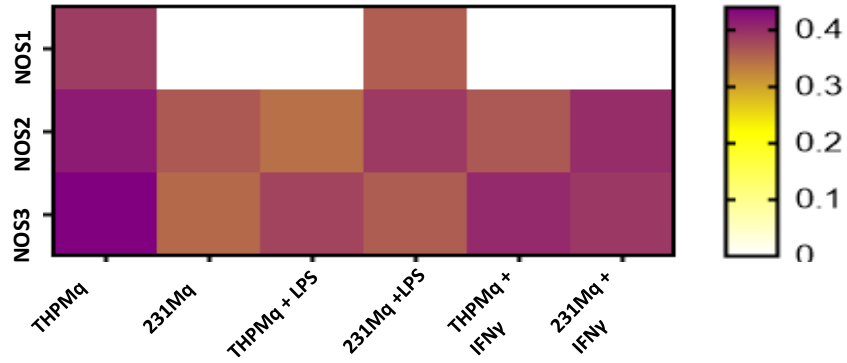
Şekil 4.8. Protein kinaz C agonisti ile 72 saat muamelenin ardından LPS veya IFN- γ ile artan inkübasyon sürelerinde uyarılmış THPMq ve 231THPMq hücrelerinin NO üretim düzeylerinin yüzde değişimi, uyarılmamış hücelere göre hesaplanmıştır. Yeşil renk IFN- γ ile uyarılan THPMq hücrelerini, sarı renk LPS ile muamele edilen THPMq hücrelerini, kırmızı renk IFN- γ ile uyarılan 231THPMq hücrelerini, mavi renk ise LPS ile muamele edilen 231THPMq hücrelerini ifade etmektedir (n \geq 3).

4.3. Bazal-benzeri Meme Kanseri Hücrelerinden Salgılanan Faktörler

Varlığında Farklılaştırılan Makrofajların NOS2 Düzeyleri

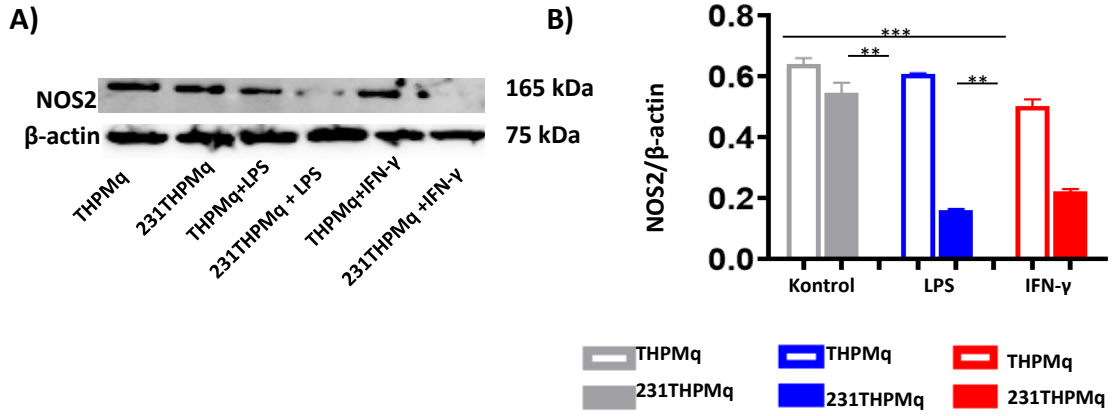
Fare makrofajlarında NO üretiminin olduğu açık bir şekilde gösterilmiş iken, insan makrofajları için bu durumu tartışan pek çok yayın vardır (62-65). THP-1 monositik hücre hattının MDA-MB-231 süpernatantları varlığında makrofaj yönünde farklılaştırılmasının NOS enzimlerinin düzeylerine etkisi gen ekspresyonu düzeyinde analiz edildi. THPMq hücrelerinde NOS3 mRNA düzeyinin en yüksek olduğu, onu NOS2 ve NOS1 ekspresyonlarının takip ettiği görüldü. LPS veya IFN- γ ile muamele sonucunda her üç enzimin ifadesinde de azalma görülürken, LPS veya IFN- γ ile muamele edilen THPMq hücrelerinde NOS1 ekspresyonunun azaldığı belirlendi (Şekil 4.9.A). 231THPMq hücrelerinde ise NOS izoform ekspresyonlarının mRNA düzeyinde THPMq'ya göre azaldığı saptandı. NOS1 gen ifadesinin olmadığı görüldü. NOS2 mRNA düzeyindeki azalmanın ise diğer izoformlara kıyasla belirgin değildi. IFN- γ ile muamele edilen 231THP1Mq hücrelerinde NOS2 ve NOS3 izoformunda

artış görülürken NOS1 gen ekspresyonu değişmedi. LPS ile uyarılan 231THPMq hücrelerinde ise, her üç izoformda artış olduğu görüldü. Sonuç olarak, NOS2 ifade düzeyleri incelendiğinde LPS veya IFN- γ ile muamele edilen 231THPMq hücrelerinde, LPS veya IFN- γ ile muamele edilen THPMq hücrelerine göre artış olduğu görüldü (Şekil 4.9)



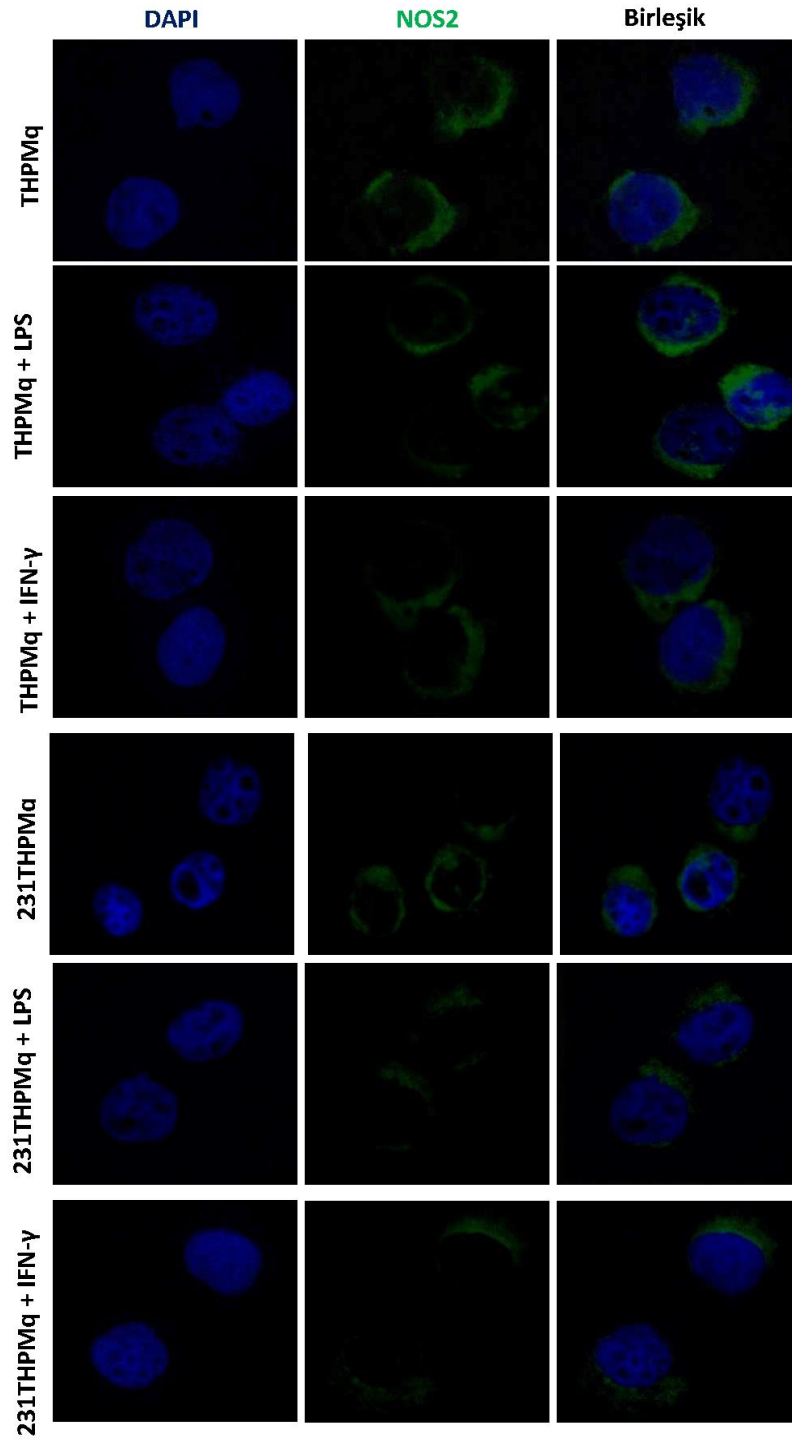
Şekil 4.9. Protein kinaz C agonisti ile 72 saat muamelenin ardından 48 saat boyunca LPS veya IFN- γ ile muamele edilen THPMq ve 231THPMq hücrelerinde NOS2 gen ifadesine ait qPCR sonuçları. MDA-MB-231 süpernatanı varlığında makrofaj yönünde farklılaştırılan THP-1 hücrelerinde NOS1, NOS2 ve NOS3 gen ifadesi RT-PCR ile değerlendirildi. β -aktin referans gen olarak kullanılarak kontrol hücrelerinden elde edilen verilere göre normalizasyon yapıldı (n \geq 4).

NOS2 protein düzeyi Western Blot ile analiz edildi. LPS veya IFN- γ ile muamele edilen THPMq ve 231THPMq hücrelerinin NOS2 protein düzeylerinde anlamlı düzeyde bir azalmanın olduğu görüldü. Bu azalma 231THPMq hücrelerinde çok daha belirgin idi (Şekil 4.10 A-B.).



Şekil 4.10. Protein kinaz C agonisti ile 72 saat muamelenin ardından 48 saat boyunca LPS veya IFN- γ ile muamele edilen THPMq ve 231THPMq hücrelerinin NOS2 proteinine ait Western blot sonuçları. (A) NOS2 proteinine ait Western Blot bandlarının agaroz jel elektroforezi sonrasında görüntüsü. (B) THP-1 hücrelerinin MDA-MB-231 süpernatanı varlığında makrofaja farklılaştırılması sonrasında Western Blot analizi gerçekleştirildi. β -aktin referans protein olarak kullanılarak kontrol hücrelerinden elde edilen verilere göre normalizasyon yapıldı. (n \geq 2)

THPMq ve 231THPMq hücrelerinin NOS2 protein düzeyi floresan mikroskobu ile de analiz edilerek meme kanseri süpernatanlarının NOS2 protein düzeyi üzerindeki etkisi değerlendirildi. (Şekil 4.11).

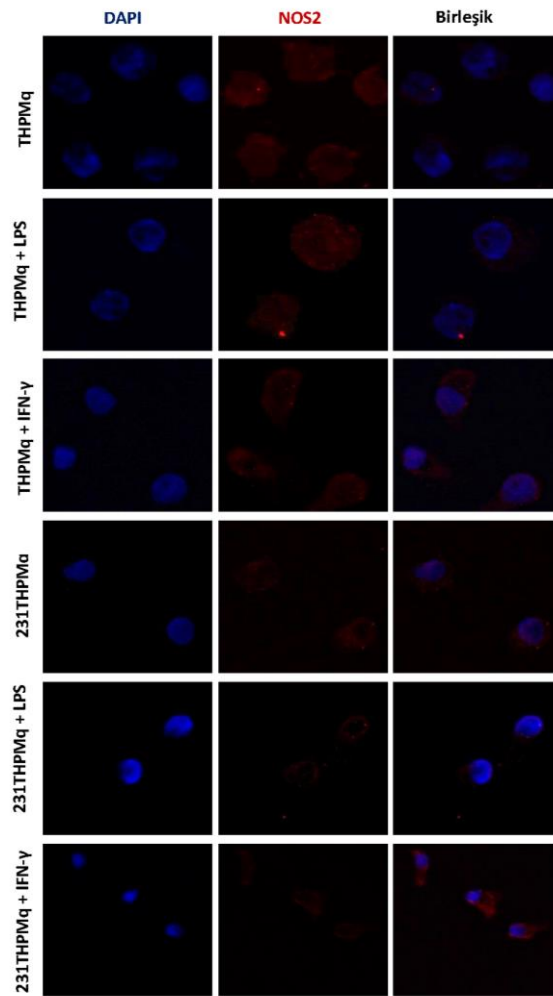


Şekil 4.11. Protein kinaz C agonisti ile 72 saat muamelenin ardından 48 saat boyunca LPS veya IFN- γ ile muamele edilen hücrelerin NOS2 protein boyamalarının temsili resimleri (nükleus (DAPI), mavi; NOS2, yeşil) (n \geq 15) Ölçek çubuğu 10 μ m'dir.

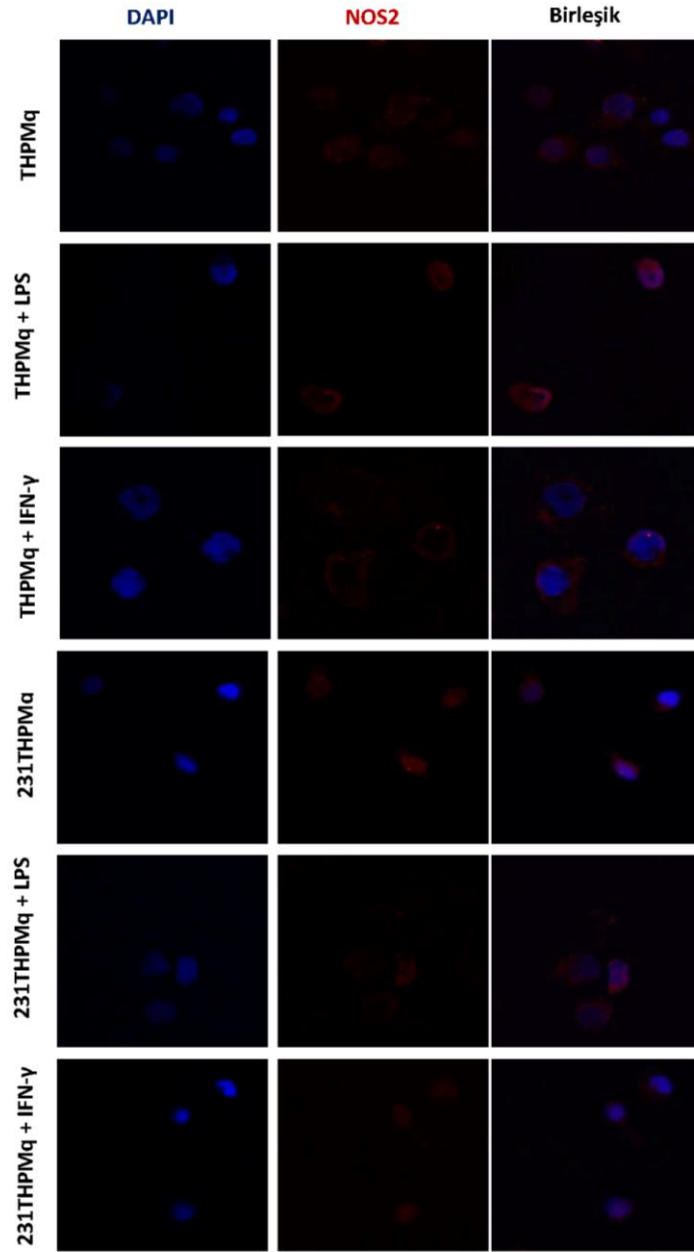
Alternatif olarak, immünfloresan ile NOS2 protein ekspresyonu, fibronektin ve Matrigel kaplanan yüzeylerde büyütülen hücreler ile de incelendi.

Matrigel kaplı yüzeylerde yapılan analizler incelendiğinde, NOS2 varlığı 231THPMq hücrelerinde saptandı (Şekil 4.12A). Özellikle IFN- γ ile uyarım THPMq ve 231THPMq hücrelerinde NOS2 pozitifliğini arttırdı. LPS ile uyarılan THPMq hücrelerinde de NOS2 pozitifliği elde edildi (Şekil 4.12.A).

Fibronektin kaplı yüzeylerde ise; LPS ile uyarılan THPMq ve kontrol 231THPMq hücrelerinde NOS2 protein ekspresyonu saptandı (Şekil 4.12B).



Şekil 4.12. A. Protein kinaz C agonisti ile 72 saat muamelenin ardından 48 saat boyunca LPS veya IFN- γ etkisi altındaki THPMq ve 231THPMq hücrelerinin Matrigel kaplı yüzeylerde immünfloresan boyama ile gösterilmesi (nükleus (DAPI), mavi; NOS2,kırmızı)(n \geq 15).Ölçek çubuğu 10 μ m'dir.



Şekil 4.12.B. Protein kinaz C agonisti ile 72 saat muamelenin ardından 48 saat boyunca LPS veya IFN- γ etkisi altındaki THPMq ve 231THPMq hücrelerinin fibronektin kaplı yüzeylerde immünfloresan boyama ile gösterilmesi (nükleus (DAPI), mavi; NOS2, kırmızı) ($n \geq 15$) Ölçek çubuğu $10 \mu\text{m}$ 'dir.

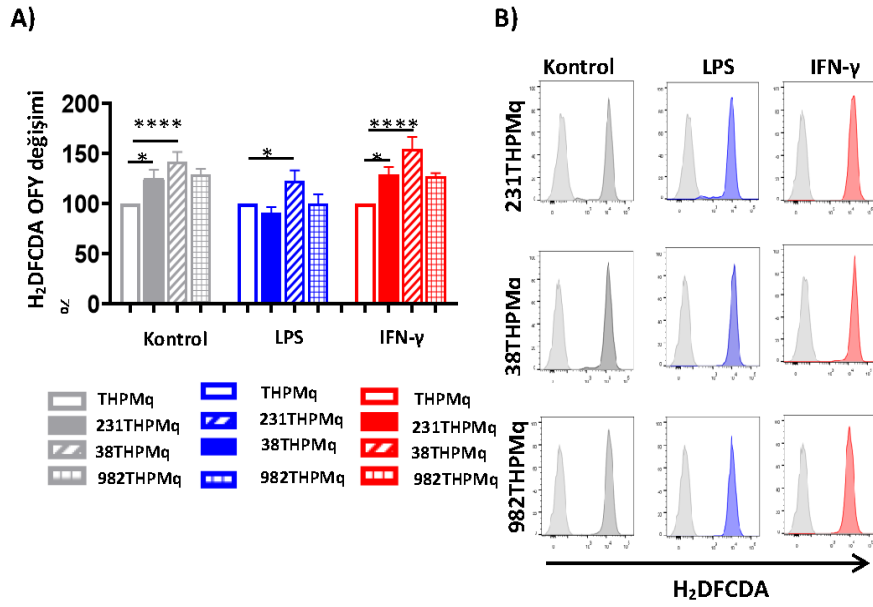
4.4. Farklı Mezenkimal Karaktere Sahip Hücre Hatlarından Salgılanan

Faktörler Varlığında Farklılaştırılan Makrofajların ROS ve NO Düzeyleri

MDA-MB-231 hücreleri ile gerçekleştirilen makrofaj farklılaştırılması analizlerine ek olarak, THP-1 monositik hücre hattının, bazal-benzeri meme kanseri

hücre hattından (HCC38) ve fibroblastik hücre hattından (SW982) elde edilen süpernatantlar varlığında PKC agonisti ile uyarımı gerçekleştirildi. Benzer şekilde bu hücreler de 48 saat boyunca LPS veya IFN- γ ile muamele edildi. THPMq hücrelerine göre HCC38 süpernatantları varlığında geliştirilen 38THPMq ve SW982 süpernatantları varlığında kültüre edilen 982THPMq hücrelerinin ROS üretiminde anlamlı düzeyde bir artış saptandı. 38THPMq hücrelerinin ROS üretiminin 231THPMq hücrelerine göre arttığı; ancak bu artışın, istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edildi. 982THPMq hücrelerinde ROS üretimi ise 231THPMq hücrelerine benzer şekildeydi (Şekil 4.13).

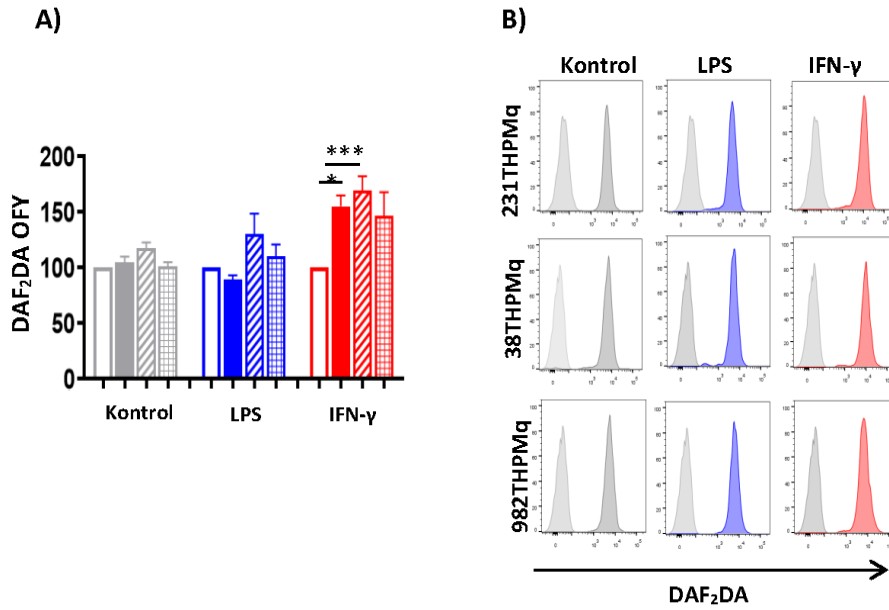
LPS ile uyarılan 231THPMq hücrelerinde olduğu gibi, LPS ile uyarılan 38THPMq ve 982THPMq hücrelerinde de kontrol gruplarına göre ROS üretiminin azaldığı saptandı. LPS ile muamele edilen 38THPMq hücreleri ise aynı şekilde uyarıma sahip 231THPMq ve 982THPMq hücrelerine göre en yüksek düzeyde ROS üretimi yapmaktaydı (Şekil 4.13). IFN- γ ile uyarılan 38THPMq hücrelerinde ROS üretiminin, IFN- γ ile uyarılan THPMq ve 231THPMq hücrelerine göre daha yüksek olduğu tespit edildi (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. Protein kinaz C agonisti ile 72 saat muamelenin ardından 48 saat boyunca LPS veya IFN- γ etkisi altında, 231THPMq, 38THPMq ve 982THPMq hücrelerinin ROS üretimlerinde meydana gelen (A) yüzde değişim grafikleri (B) temsili akım sitometri histogramları. Elde edilen sonuçlar kontrol THPMq hücrelerine göre % değişimi hesaplanarak sunulmuştur (** p<0.01; **.* p<0.0001; n \geq 3).

MDA-MB-231, HCC38 ve SW982 hücrelerinden elde edilen süpernatantlar varlığında makrofaj yönünde farklılaştırılan THP-1 hücrelerinin DAF₂DA ajanı ile NO üretim analizleri gerçekleştirildi. 38THPMq hücrelerinin NO üretimi 231THPMq hücrelerine göre kıyaslandığında kısmen daha yüksekti (Şekil 4.14).

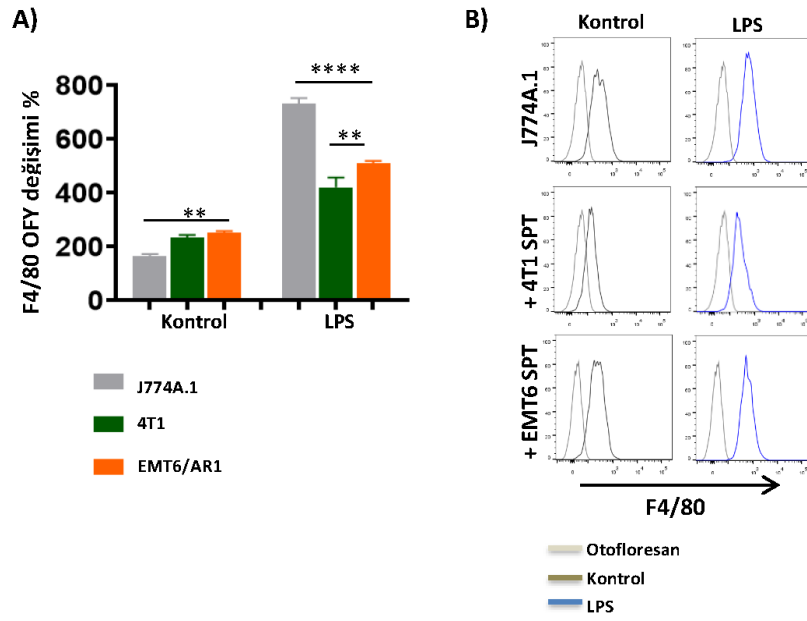
IFN- γ ile uyarılan hücrelerde NO üretimi kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde daha yüksek idi; ancak bu durum LPS uyarımı ile tespit edilmedi. IFN- γ ile uyarılan 38THPMq hücrelerinde IFN- γ ile uyarılan 231THPMq hücrelerine göre NO üretimi kısmen daha yüksekti (Şekil 4.14)



Şekil 4.14. Protein kinaz C agonisti ile 72 saat muamelenin ardından 48 saat boyunca LPS veya IFN- γ etkisi altında, 231THPMq, 38THPMq ve 982THPMq hücrelerinin NO üretimlerinde meydana gelen (A) yüzde değişim grafikleri (B) temsili akım sitometri histogramları. Elde edilen sonuçlar kontrol THPMq hücrelerine göre % değişimi hesaplanarak sunulmuştur (** p<0.01; *** p<0.001; n \geq 3).

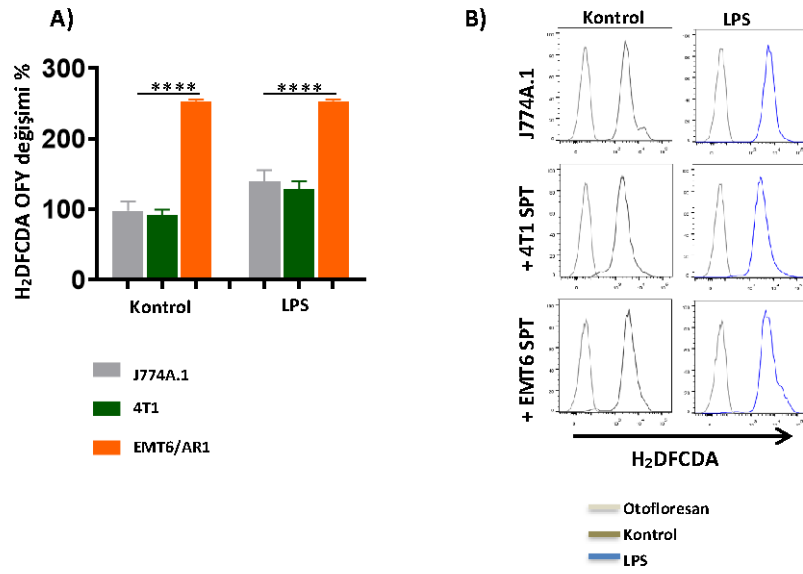
4.5. Fare Kökenli Bazal-Benzeri Meme Kanseri Hücrelerinden Salgılanan Faktörlerin Fare Kökenli Makrofaj Hücre Hattında ROS ve NO Üretimine Etkisi

J774A.1 fare makrofajlarının fare bazal-benzeri meme kanseri 4T1 ve EMT6/AR1 hücre hatlarından elde edilen süpernatant varlığında kültürü gerçekleştirildi. Ardından, 48 saat boyunca LPS ile uyarımı yapıldı. LPS ile muamele edilen J774A.1 hücrelerinin F4/80 düzeyinde kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde artış olduğu saptandı (Şekil 4.15). 4T1 veya EMT6 süpernatantlarının ise F4/80 düzeyini arttırırken, LPS'nin bu belirteç üzerindeki uyarıcı etkisini sınırladığı görüldü. Bu değişimlerin J774A.1 hücreleri, 4T1 süpernatant varlığında uyarılan J774a.1 hücreleri ve EMT6/AR1 süpernatant varlığında uyarılan J774A.1 hücrelerinin F4/80 belirtecinde görülen OFY değerleri sırasıyla 733,33 \pm 3,79, 421,50 \pm 62,51, 510 \pm 26,31 olarak belirlendi.



Şekil 4.15. 4T1 ve EMT6/AR1 meme kanseri hücrelerinin süpernatanı ile kültürü yapılan J774A.1 makrofaj hücrelerinin 48 saat boyunca LPS uyarımı ile hücre hattında F4/80 belirtecini akım sitometri ile analizi. A) F4/80 belirteciye ait ortanca floresan yoğunluğu (OFY) % değişimi. Kontrol hücreleri otofloresan verisine göre normalize edilmiştir. B) F4/80 ifadesine ait akım sitometri histogramları (* $p < 0.05$; *** $p < 0.0001$; $n \geq 6$).

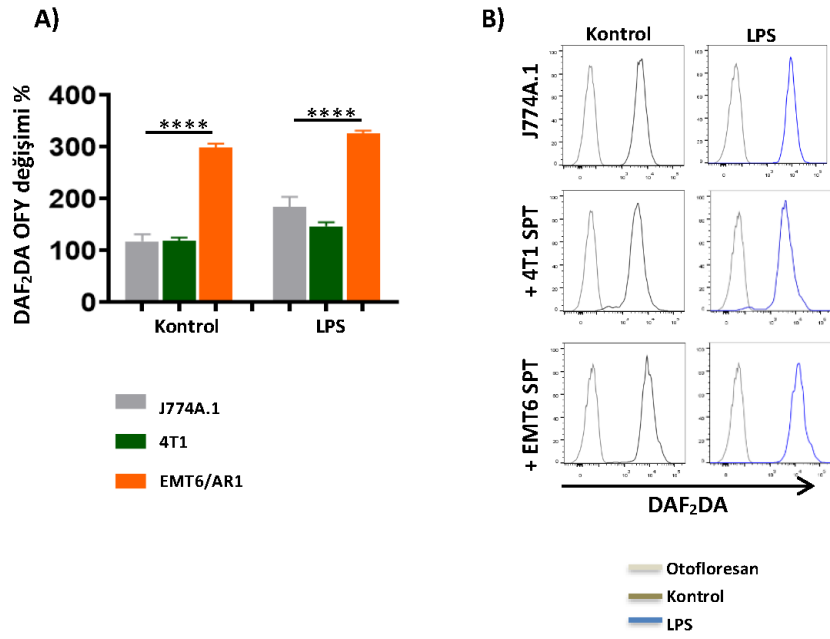
J774A.1 hücrelerinin 4T1 ve EMT6/AR1 süpernatantları içerisinde kültürünün gerçekleştirilmesi ve LPS ile uyarımı sonucunda hücrelerin ROS üretimindeki değişim analiz edildi. Kontrol J774A.1 hücrelerinin 4T1 ve EMT6/AR1 süpernatantları ile muamelesi sonucunda, 4T1 hücrelerinin ROS düzeyine etki etmediği, EMT6/AR1 süpernatantının ise ROS üretimini anlamlı düzeyde artırdığı görüldü (Şekil 4.16). LPS ile uyarılan kontrol ve 4T1 süpernatantı ile muamele edilen J774A.1 hücrelerinin ROS üretiminde artış görülürken, bu artış istatistiksel olarak anlamlılık düzeyine ulaşmadı. LPS ve EMT6/AR1 süpernatantı ile uyarılan J774A.1 hücrelerinde ROS üretimi yükseldi; ancak LPS varlığının ilave bir etki yaratmadığı sonucu elde edildi (Şekil 4.16).



Şekil 4.16. 4T1 ve EMT6/AR1 meme kanseri hücrelerinin süpernatanı ile kültürü yapılan J774A.1 makrofaj hücrelerinin 48 saat boyunca LPS uyarımı ile hücre hattında H2DFCDA belirtecinin akım sitometri ile analizi. A) H2DFCDA belirteci için ortanca floresan yoğunluğu (OFY) % değişimi. Kontrol hücreleri otofloresan verisine göre normalize edilmiştir. B) H2DFCDA ifadesine ait akım sitometri histogramları (***) $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$; $n \geq 6$)

DAF₂DA boyası ile analiz edilen NO üretim kapasitesi de ROS üretimine benzer şekilde değişim gösterdi. Kontrol J774A.1 hücrelerinde 4T1 süpernatanı varlığında bir değişim gözlenmezken, EMT6/AR1 süpernatanı ile NO üretimi anlamlı düzeyde arttı (Şekil 4.17).

LPS ile uyarılan J774A.1 hücrelerinde NO üretimi artış gösterirken, 4T1 süpernatanı bu durumu negatif yönde etkiledi. EMT6/AR1 süpernatanı varlığında LPS ile uyarılan J774A.1 hücrelerinde ise NO düzeyinin etkilenmediği görüldü (Şekil 4.17).



Şekil 4.17. 4T1 ve EMT6/AR1 meme kanseri hücrelerinin süpernatanı ile kültürü yapılan J774A.1 makrofaj hücrelerinin 48 saat boyunca LPS uyarımı ile hücre hattında DAF2DA belirtecini akım sitometri ile analizi. A) DAF2DA belirteci için ortanca floresan yoğunluğu (OFY) % değişimi. Kontrol hücreleri otofloresan verisine göre normalize edilmiştir. B) DAF2DA ifadesine ait akım sitometri histogramları (*** p<0.0001; n≥6).

5. TARTIŞMA

Monositler, insanlarda periferik kan lökositlerinin yaklaşık % 10'unu, farelerde ise lökositlerin yaklaşık % 4' ünü oluşturmakla beraber; kemik iliğinde granülositler ile ortak bir progenitörden gelişmektedir. Dolaşıma katıldığında çoğalma yeteneğini kaybeden bu hücreler miyeloid hücreler olarak yer alırlar. Makrofajlar, monositlerden türevlenen daha ileri düzeyde olgunlaşmış hücreler olup; morfolojik olarak, daha büyük oval nükleuslu, geniş sitoplazmalı ve daha granüllü yapıdadırlar (86).

Serin/treonin kinaz ailesinden olan protein kinaz C (*protein kinase c*, PKC)'ler, çeşitli sinyal iletim basamaklarında önemli rol oynar. Forbol miristat asetat (*Phorbol myristate acetate*, PMA), PKC'yi aktive ederek çeşitli sinyal iletim yolları ile bu yollar ile ilişkili moleküllerin ifadesini tetikler (135). Forbol esterler, gen transkripsiyonu, hücre büyümesi, farklılaşması, programlanmış hücre ölümü ve inflamasyon ilişkili yolların aktivasyonunu sağlayabilir (134, 135). Forbol esterlerden biri olan PMA, çeşitli hormonlar ve sitokinler tarafından uyarılan hücre mekanizmaları incelemek için model bir ajan olarak kabul edilmektedir (134).

THP-1 hücre hattı, süspanse karakterde monositik hücrelerdir. THP-1 hücrelerinin PMA ile uyarımı sonrasında, hücrelerin büyümesi durur ve buldukları hücre kültür kabının yüzeyine yapışarak aderan özellik kazanırlar (136). PMA ile uyarılan THP-1 hücreleri makrofaj yönünde farklılaşma gösterirler (135). Bu nedenle, THP-1 hücreleri miyeloid farklılaşma ve olgunlaşma çalışmaları için prototip olarak tercih edilmektedir (136). Bunun yanında, THP-1 hücre hattı, akut miyeloid lösemi çalışmalarında fonksiyonel analizlerin yapılması ve klinik öncesi terapötik hedef moleküllerin tanımlaması için de deneysel bir model oluşturmaktadır (137).

Bu tez çalışmasında, THP-1 monositik hücrelerinin PMA ile uyarımı sonrası makrofajlara farklılaşması sağlanmıştır. Hücrelerin boyutlarında tespit edilen artış ve sitoplazmik alanda belirginleşme ile miyeloid belirteçlerdeki değişim, makrofaj yönündeki farklılaşmayı destekler niteliktedir. Makrofajlara farklılaştıran hücrelerde LPS uyarımı sonucunda granül içeriğinde azalma izlenmiştir. LPS ile uyarımları

sonucunda hücrelerde vakuol oluşumu da gözlenmiş, sitoplazma hacimleri artmıştır. Vakuoller makrofaj gibi fagositik hücrelerde bakteri öldürme mekanizmasında görevli yapılardır ve LPS ile uyarım sonucunda bu yapıların varlığı gösterilmiştir (138).

Makrofajlar, farklı çevresel uyarılara yanıt olarak alt gruplara polarize olabilen, farklılaşma yetenekleri olan hücrelerdir. Uyarıların özelliğine bağlı olarak klasik aktive makrofajlar (M1) ve alternatif aktive makrofajlar (M2) olarak polarize olurlar (43). *In vitro* ortamda LPS gibi bakteri hücre duvarı bileşenleri ve/veya IFN- γ kullanılarak makrofajların M1 karaktere polarize olması sağlanır. M1 makrofajlar, TNF- α , IL-1 β , IL-6 ve IL-12 gibi proinflamatuvar sitokinlerin üretimi ile karakterize edilir. Ayrıca, yüksek düzeyde reaktif oksijen ve nitrojen türleri üretirler (106).

Monositler ve doku makrofajlarının büyük çoğunluğu CD14 ifadesine sahiptir (139). LPS uyarımı; LPS-bağlama proteini (*LPS-binding protein*, LBP) CD14, miyeloid farklılaşma faktörü (*myeloid differentiation factor 2*, MD2) ve TLR4'ün etkileşimi ile gerçekleşir (140). LBP ve MD2 olmadan da LPS'in TLR4 sinyalini uyarabildiği daha önce gösterilmiştir (141). Bu çalışmada kullanılan THPMq ve 231THPMq hücrelerinde de, CD14 ve MD2 düzeyleri değişiklik göstermemesine rağmen LPS ile uyarımın biyolojik etkileri gözlemlenmiştir. TLR4'ün tetiklediği bir diğer sinyal mekanizması ise, CD14'ün internalizasyonu sonucunda endozoma geçerek Tip I İnterferon (IFN) ifadesini düzenleyen transkripsiyon faktörü IRF3'ün aktivasyonuna aracılık etmektedir. Bu durum, TLR4'ün LPS ile indüklenen endositozunda CD14'ün gerekli olduğunu göstermektedir (142, 143).

IFN- γ 'nın TLR4 transkripsiyonunu ve yüzey ifadesini arttırdığı bilinmektedir. LPS ile uyarılan THPMq hücrelerinde ve MDA-MB-231 hücre süpernatanı ile kültürü yapılan THP-1 hücrelerinde TLR4 kompleksine ait belirgin bir değişim gözlenmezken, IFN- γ ile uyarılan THPMq hücrelerinde TLR4 belirteç düzeyinin arttığı görülmüştür. LPS ile uyarım sonucunda THPMq hücrelerinin CD14 yüzey belirtecinin ekspresyonunda meydana gelen azalmanın ise CD14 internalizasyonu nedeniyle olabileceği düşünülmektedir. IFN- γ uyarımı ile THPMq hücreleri ve 231THPMq

hücrelerinin yüzey belirteçlerinde artış olması da, bu hücrelerin diğer bir mekanizma olan tip 1 IFN üretimi yoluna gittiklerini düşündürmektedir.

THP-1 hücrelerinin meme kanseri süpernatantları varlığında farklılaşmasının hedeflenmesi ile tümör mikroçevresinin etkisinin modellenmesi amaçlanmıştır. Buna göre; bazal-benzeri meme kanseri hücre süpernatantları varlığında THP-1 hücrelerinde CD14 düzeylerinde azalma olmasına rağmen, LPS veya IFN- γ ile uyarım sonucunda bu hücrelerde CD14 düzeyinde artış olduğu tespit edilmiştir. Bu artış, LPS ile uyarımda IFN- γ ile uyarıma göre daha fazladır.

CD11c ve CD40, miyeloid hücre farklılaşması ile artan belirteçlerdir (139, 144, 145). Yapılan çalışmalarda, kanser hücrelerinin miyeloid hücre hatlarının olgunlaşmasına ve farklılaşmasına etki ederek makrofaj benzeri karakter kazanmasına katkıda bulunabileceği gösterilmiştir. Bu çalışmada literatür ile uyumlu olarak, CD40 belirteç ekspresyonunun MDA-MB-231 hücre süpernatantı ile uyarılan THP-1 hücrelerinde arttığı saptanmıştır. Dolayısıyla bazal-benzeri meme kanseri hücrelerinden salgılanan faktörlerin THP-1 hücrelerinin olgunlaşmasında etkili olduğu görülmektedir. Diğer taraftan, meme kanseri hücre süpernatantı ile kültürü yapılan THP-1 hücrelerinde CD14, MD2 ve TLR4 belirteç düzeylerinde azalma tespit edilmiştir.

M1 makrofajları bakterisidal fonksiyona sahiptir ve istilacı patojenlere karşı savunma birincil görevleridir. Patojenle temas halinde ROS ve NO üretimini gerçekleştirerek patojenleri öldürürler (12). LPS, ROS üretimini doğrudan uyarır ve bu üretim NADPH oksidaz (*NADPH oxidase*, Nox) enzimi aracılığıyla gerçekleşir. Bunun yanı sıra ROS, MAPK ve NF- κ B gibi sinyal yollarını aktive ederek, LPS kaynaklı sinyal iletiminde ikincil haberci olarak da fonksiyon görür. Bu sinyal iletim yollarının H₂O₂ tarafından aktivasyonu, proinflatuvar genlerin ifadesini destekler. RAW264.7 fare makrofaj hücre hattı ile yapılan bir çalışmada ROS üretimi sırasında Nox2 geninin aktivasyonu gösterilmiştir (12). İnsan monositik hücre hatlarının *in vitro* ortamda makrofajlara farklılaşması sonucunda ROS üretiminin tetiklendiği gözlenmiştir (13). İnsan promonositik hücre hattı olan U937 hücreleri ile yapılan bir çalışmada, PMA ile uyarılan hücrelerin makrofaja farklılaşması

sonucunda ROS üretiminin arttığı ve proinflamatuvar sitokinlerin üretiminde de artış olduğu tespit edilmiştir (13). Dolayısıyla, elde edilen sonuçlar, ROS üretimi ile monosit-makrofaj farklılaşması arasında dolaylı ve/veya doğrudan bir ilişki olduğuna işaret etmektedir.

Çalışmamızda, bazal-benzeri meme kanseri hücre süpernatanı varlığında kültürü yapılan THP-1 hücreleri makrofajlara farklılaştırılmış ve ROS üretiminin arttığı gözlenmiştir. Bu durum, meme kanseri süpernatanından salgılanan faktörlerin de ROS üretimini desteklediği veya makrofaj yönünde farklılaşmayı ilerlettiğinin göstergesi olabilir. LPS veya IFN- γ ile uyarılan THP-1 hücrelerinin ROS üretiminde artış olması da pozitif kontrol olarak değerlendirilebilir. IFN- γ ile uyarılmış 231THPMq hücrelerinin ROS üretimi ve farklılaşmasında görülen pozitif etki ise, IFN- γ 'nın hem makrofajların M1 yönünde farklılaşmasına hem de makrofajların bakterisidal etkisini artırmasına yönelik yorumlanabilir.

LPS veya IFN- γ ile zamana bağlı yapılan çalışmaların sonucunda, IFN- γ ile uyarılan 231THPMq hücrelerinin ROS üretim kapasiteleri artış göstermiştir. Bu durum LPS ile yapılan uyarımlarda zaman parametresinden bağımsız olarak izlenmiştir. Elde edilen bu veriler 48 saatlik LPS veya IFN- γ uyarımlarının makrofajların aktivasyonu için uygun bir süre olabileceğini göstermektedir.

Makrofajlar, buldukları mikroçevreye göre farklılaşan ve fonksiyonel polarizasyon gösteren, yüksek plastisite özelliğine sahip hücrelerdir. Polarizasyonları sırasında her ne kadar bakteriyel ürünler ve çeşitli sitokinler etkin olsa da hücre-dışı matriks bileşenleri de oldukça önemlidir (146, 147). Hücre adezyon molekülleri hücrelerin diğer hücrelerle veya hücre dışı matriksle bağlanmasında rol alan membran yüzey proteinleridir (148). Kollajen, laminin ve fibronektin başlıca hücre-dışı matriks bileşenleridir (149). Fibronektin, integrinlere kollajene ve heparan sülfat gibi diğer hücre dışı matriks proteinlerine bağlanan yüksek moleküler ağırlıklı bir glikoproteindir (150). Hücre göçüne aracılık eder. Fibronektin ile makrofaj etkileşimi, inflamasyon ve konak savunmasının yanı sıra yara iyileşmesi, kronik inflamatuvar süreçler ve karsinogenez durumunda da düzenlenir (151, 152)

Monositlerin kandan dokuya göçleri sırasında fibronektin ile yaptıkları etkileşimler, PU.1 transkripsiyon faktörünün aktivasyonunu sağlayarak monosit-makrofaj farklılaşmasında rol oynamaktadır. PU.1 transkripsiyon faktörü makrofaj farklılaşması için gerekli olan makrofaj koloni uyarıcı faktör (macrophage colony-stimulating factor, M-CSF) reseptörünün ifadesini sağlamaktadır (148). Fibronektin ile kaplanmış yüzeylerde MDA-MB-231 süpernatantlarının etkisiyle makrofaj yönünde farklılaştırılan THP-1 hücrelerinin IFN- γ uyarımı kutupsallık indeksinde diğer uyarımlara göre daha büyük bir artış görülmüş, LPS veya IFN- γ hücrelerin çevresi ve alanında bir artış saptanmıştır. Bu durum, fibronektinin makrofaj farklılaşmasını desteklediğine dair yorumlanmıştır. Beklendiği üzere, IFN- γ , 231THPMq hücrelerinin polarizasyonunda daha etkili bulunmuştur.

Hücre dışı matriks bileşenlerinin hücrelerdeki gen ifadesini değiştirebilme ve tümör davranışlarını değiştirme kapasitesi vardır. Matrigel™ birçok dokuda bulunan, laminin ve kollajen IV açısından zengindir. Tümör hücrelerinden saflaştırıldığından dolayı hücre dışı matrikse çok benzer ve in vitro ortamda tümör mikroçevresinin substratı olarak kullanılan bir karışımdır (153, 154). Makrofajların varlığında tümör hücreleri hücre dışı matriksi istila eder. İnsan makrofajları ile ilgili yapılan bir çalışmada, makrofajların tek başlarına veya tümör hücresiyle beraber Matrigel'in üzerine ekimi gerçekleştirilmiş ve göç kapasiteleri incelenmiştir. Çalışmanın sonucunda tümör hücreleri ile beraber ekimi yapılan makrofajların göç kapasitelerinde ciddi artış olduğu görülmüştür. Bu durum Matrigel'in makrofaj hareketliliğinde ve biyolojik fonksiyonlarının düzenlenmesinde etkili bir substrat olduğunu göstermektedir (154). Çalışmamızda, fibronektin kaplanmış yüzeylerle karşılaştırıldığında Matrigel kaplı yüzeylerin fibronektine göre THP-1 hücrelerinin makrofaj yönünde farklılaştırmasında etkili olduğu söylenebilir. Ayrıca IFN- γ 'nın Matrigel üzerinde büyüyen hücrelerin makrofaja dönüşümünü de daha etkin şekilde uyarabildiğine dair bulgularımız, hücre büyüme yüzeyinin ve polarizasyon-aktivasyona yol açan sitokin kombinasyonunun önemini ortaya çıkarmıştır.

Matrigel ve fibronektin kaplı yüzeylerde kültürü yapılan THPMq ve 231THPMq hücrelerinde NOS2 ve NO üretimi analizlerinin yanı sıra yüzey

moleküllerinden bağımsız olarak bu hücrelerde bazal düzeyde NOS2 ekspresyonu incelendi. NOS enziminin üç izoformunun arasında mRNA düzeyinde THPMq hücrelerinde en fazla NOS3 ekspresyonu olduğu gösterilmiştir. Bunun yanında 231THPMq hücrelerinde NOS2 ve NOS3 ifadesi belirlendi. 231THPMq hücrelerinde ise, her üç NOS izoformunda da THPMq hücrelerine göre azalma olduğu görüldü. Bu hücrelerde NOS2 ifadesinin düşük olması, meme kanseri mikroçevresinden salgılanan faktörlerin M1 farklılaşmasına gitmek yerine farklı mekanizmaları kullandığını düşündürülebilir. IFN- γ ise NOS2 ifadesini LPS'e göre daha fazla desteklemiştir. Meme kanserinden salgılanan faktörlerin NOS ifadesini azalttığı görülsede, IFN- γ 'nın bu etkiyi ortadan kaldırdığına dair bulgular elde edilmiştir. Bu veriler, literatürde belirtildiği üzere, LPS veya IFN- γ 'nın NOS2 ifadesini artırması ile tutarlıdır. LPS veya IFN- γ ile uyarılan THPMq hücrelerinde ise azalan NOS2 gen ifadesinin bu hücrelerde aşırı aktivasyona karşı post-transkripsiyonel olarak düzenlenebileceğini düşündürmektedir. Elde edilen bu sonuçlar NO üretiminin zamana bağlı olarak azalmasını gösteren verilerimizle de örtüşmektedir.

NOS2 ifadesinin varlığı protein düzeyinde incelendiğinde, kontrol THPMq hücreleri ile LPS veya IFN- γ uyarımı olan THPMq hücrelerinde NOS2 protein miktarı çok yüksektir. Bununla beraber, 231THPMq hücrelerinde LPS veya IFN- γ uyarımı olduğunda NOS2 ifadesinin azaldığı görülmüştür. Bu şekilde NOS2'nin transkripsiyonel ve translasyonel düzeyde düzenlenmesi söz konusudur (155).

NOS2 fare makrofajlarında varlığı kanıtlanan, insan makrofajlarında ise varlığı ve düzeyi tartışmalı olan bir enzimdir. İnsanda NOS2 ifadesine hücreler dinlenme durumunda iken nadiren rastlanmaktadır; ancak, sitokinler, LPS ve çeşitli uyarılara cevap olarak bu enzimlerin düzeyi ile NO üretimi belirlenebilmektedir (155). Bazı çalışmalarda, insan makrofajlarında NOS2 ekspresyonunun varlığı in vivo olarak gösterilmiştir. In vitro ortamda yapılan çalışmalarda ise insan makrofajlarında NOS2 proteininin saptanabilir olduğu bulunmuş; ancak, NOS2 aracılığıyla üretilen NO miktarının çok az olduğu gösterilmiştir (156).

NOS2'nin transkripsiyonel düzenlenmesinde yer alan moleküler mekanizmaları aydınlatan çalışmalar, sadece fare makrofajlarında NOS2 gen

ifadesinin varlığını göstermiştir. İnsan NOS2 genini ve 5' ucundaki proksimal 400 baz çiftinin farelerdeki NOS2 gen bölgesine %66 benzerlik gösterildiği bulunmuştur. İnsan NOS2 promotör bölgesinin LPS veya IFN- γ ile uyarımına faredeki analoguna göre daha az açık olduğu saptanmıştır (157). Bunun yanı sıra farelerden farklı olarak insanlarda AKN-1 hücre hattı ile yapılan bir çalışmada NOS2 ifadesi için sadece IFN- γ 'nın etkili olduğu gösterilmiştir (158). LPS ve IFN- γ ile uyarımdan sonra insan makrofajlarında NOS2 mRNA varlığı ifade edilmiş; ancak NOS2 üzerinden üretilen NO saptanmamıştır (66).

Bakteriyel enfeksiyona sahip olan kişilerin kanlarından izole edilen monositlerle yapılan analizlerde NOS2 proteini saptanabilmiştir. İzole edilen bu monositlerin in vitro ortamda IFN- γ ile uyarımları yapıldığında NOS2 ifade düzeyinin arttığı gözlenmiştir (107). İnsan periferik kan mononükleer hücrelerinden izole edilip makrofaja dönüştürülen kan hücreleri ile THP-1, U937 gibi insan monositik hücre hatlarında eş-zamanlı yapılan mRNA düzey tespiti çalışmasında, insan monositik hücrelerinin NOS2 mRNA'sının, 4 saatlik inkübasyondan sonra ortaya çıktığı ve 20 saat sonra halen saptanabilir olduğu gösterilmiştir. Denis ve arkadaşları (159), insan makrofajlarında fare makrofajlarından farklı olarak, NOS2 ile üretilen NO'nun tespit edilebilirliğinin zor olduğu görüşünü bildirmişlerdir. Ancak, sitokinler veya bakteriyel ürünlerle uyarılan insan makrofajlarında NO üretimi olduğunu savunmuşlardır. Tüm bu bilgiler ışığında insanda NOS2 ve NO üretiminin sıkı bir şekilde kontrol edildiği, literatürdeki çelişkilerin deney koşulları, çalışma kurguları ve kullanılan yöntemler arasındaki farklılıklar nedeniyle olduğu değerlendirilmiştir.

NOS2 ayrıca, insanlarda büyük hava yollarındaki hücrelerde ve mononükleer hücre hatlarında yapısal olarak ifade edilebilir durumdadır (67). Patojene maruziyet sonrasında makrofajlarda NOS2 ifadesinin belirlenebilir düzeye çıkması söz konusudur. Bu amaçla, tüberkülozlu hastaların akciğerlerindeki NOS2 ifadesi incelenmiştir. Enfekte bireylerdeki NOS2 düzeyi sağlıklı bireylerin akciğerlerindeki NOS2 düzeyine göre yüksektir. İnsan akciğer kanserinin yanı sıra meme, beyin, prostat, kolorektal ve pankreas karsinomlarında yapılan çalışmalarda da dokularda NOS2 seviyeleri gözlemlenmiştir (160). Sepsiste LPS'e yanıt olarak makrofajlarda NO

üretimi, sitokin sekresyonu ve prostaglandin sentezi olmak üzere çeşitli inflamatuvar yanıtlar oluşur. Sepsis sırasında meydana gelen doku hasarının, NOS2 aktivitesi nedeniyle aşırı NO üretimi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (161).

Makrofajlardaki NOS2, TNF- α , IL-1, IFN- γ , endotoksinler veya LPS uyarımı ile gerçekleşir. Lokal olarak uzun süre ve mikromolar konsantrasyonda NO üretir. NOS2 seviyesi, inflamasyonun ciddiyetini yansıtabilir (162). İnsan promiyelositik hücre hattı olan HL-60 ile yapılan bir çalışmada, LPS uyarımı sonucunda makrofaja dönüştürülen hücrelerin, önemli miktarlarda NO üretme yeteneği kazandığı bildirilmiştir. İnsan makrofajlarında NOS2 ifadesi ve NO üretimini belirlemek amacıyla yapılan in vitro çalışmalara rağmen tutarlı bilgiler bulunamamıştır. Farelerde, NOS2'nin IFN- γ , TNF- α , LPS ve çeşitli mikroorganizmalar tarafından uyarıldığında büyük miktarda NO üretebildiği bilinmektedir. Bununla birlikte, benzer koşullar altında, insan makrofajlarında NO üretiminin ya düşük seviyelerde olduğu ya da hiç olmadığına dair bulgular çoğunluktadır. Yapılan son çalışmalarda, alveolar makrofajların uyarımdan sonra in vitro ortamda daha belirgin seviyede NO üretebildiği gösterilmiştir (162).

MDA-MB-231 bazal-benzeri meme kanseri süpernatanı içerisinde makrofaj yönünde uyarılan THP-1 hücrelerinin yanında HCC38 meme kanseri süpernatanı ve SW982 fibroblast hücre hatlarının süpernatanlarında uyarılan THP-1 hücrelerinin ROS ve NO üretim kapasiteleri de artmıştır. Bu hücrelerde LPS veya IFN- γ uyarımı yapıldığında IFN- γ 'nın ROS üretim kapasitesinde en etkili sitokin olduğu da doğrulanmıştır.

Fare makrofajlarında NOS2 ifadesinin varlığı insan makrofajlarının aksine yapılan çalışmalarla netleştirilmiştir. Fare makrofajları LPS ile uyarıldıklarında NOS2 ve NO üretimi artmaktadır. Fare makrofajlarına özgül yüzey belirteci F4/80 ifadesi hücrelerin fizyolojik durumuna göre sıkı bir şekilde düzenlenmektedir. Fare monositlerinde makrofajlara göre daha düşük seviyelerde F4/80 ifadesi vardır ve herhangi bir uyarı ile aktive edilen makrofajlarda daha yüksek seviyelere ulaşır (163). Elde ettiğimiz sonuçlar doğrultusunda LPS ile uyarımı gerçekleştirilen J774A.1 fare makrofaj hücrelerinin, 4T1 meme kanseri süpernatanı ile uyarılan J774A.1

hücrelerinin ve EMT6/AR1 süpernatanı ile uyarılan J774A.1 hücrelerinin F4/80 belirteç ekspresyonlarında LPS ile uyarımı olmayan koşula göre artış olduğu saptanmıştır.

LPS'in, RAW264.7 fare makrofaj hücreleri üzerinde yapılan bir çalışmada, Rac1'e bağlı bir yol aracılığıyla ROS üretimini ve IkappaB kinazları (IKK) aracılığıyla NF- κ B'nin aktivasyonunu sağladığı bulunmuştur. Bunun yanında fare peritoneal makrofajları ile J774A.1 monosit/makrofaj hücre hattında yapılan çalışmada LPS'in NADPH oksidazı aktive ederek NF- κ B üzerinden ROS üretimini gerçekleştirdiği gösterilmiştir (164). J774A.1 makrofaj hücrelerinin 4T1 süpernatanı ve EMT6/AR1 hücre süpernatanının ROS üretim kapasitesi incelendiğinde, EMT6/AR1 süpernatanı ile uyarılan hücrelerin ROS üretim kapasiteleri en yüksek düzeydedir. Bununla beraber, LPS ile uyarım sonucunda, uyarılan hücrelerin ROS üretim kapasitelerinde anlamlı bir artış olmadığı saptanmıştır.

4T1 meme kanseri hücrelerinden salınan faktörler, LPS gibi bakteriyel agonistlere karşı makrofaj inflamatuvar yanıtlarında bir artışa yol açar. Ayrıca, 4T1 tümör taşıyan farelerden izole edilen makrofajlarda, LPS'ye karşı gelişen proinflamatuvar sitokinlerde de artış görülmüştür (165). Yaptığımız çalışmada fare makrofaj hücreleri ile meme kanseri ile fibroblast hücresi süpernatanı ile uyarılan hücrelerin NO üretim kapasitesi de ROS üretim kapasitesinde olduğu gibi, EMT6/AR1 süpernatanı ile uyarılan J774A.1 hücrelerinde artmış; 4T1 süpernatanı ile uyarılan J774A.1 hücrelerinde ise değişim belirlenmemiştir.

Sonuç olarak, gerçekleştirilen bu tez çalışması kapsamında bazal-benzeri meme kanseri hücreleri tarafından üretilen faktörlerin monosit-makrofaj farklılaşması üzerine olan etkisi, makrofaj yönünde farklılaşan bu hücrelerin NO ve ROS üretim kapasitesi ve NOS2 ifade düzeyleri analiz edilmiştir. NO üretiminin insan makrofajları tarafından gerçekleştirilebileceği yönünde bulgular elde edilmiştir. Ayrıca, meme kanseri hücrelerinin makrofaj dönüşümünü desteklerken NO ve ROS üretim kapasitesini de değiştirebileceği saptanmıştır. Bu çalışma kapsamında THP-1 insan monositik hücre hattı in vitro olarak kullanılmıştır. Elde edilen bulgular THP-1

hücrelerinin makrofaj farklılaşmasının modellenmesi açısından da önem arz etmektedir.

THP-1 hücrelerinde farklı koşullarda gerçekleştirilen makrofaj yönündeki farklılaşma sırasında NOS2 varlığı, uyarılabilirliği ve ifadesinin düzenlenmesi incelenirken farklı yöntemlerden elde edilen sonuçlar kullanılmıştır.

Gerçek zamanlı PCR, Western-Blot, NO üretim kapasitesi ve immünfloresan görüntüleme verileri meme kanseri süpernatantları varlığında makrofaj farklılaşması ile NOS2 enziminin ifade edilebildiğini göstermiştir.

Farklılaşmanın farklı ekstraselüler matriks komponentleri ile değişiklik gösterme durumu da göz önünde bulundurularak immünfloresan görüntüleme analizleri ile NOS2 varlığı incelenmiştir.

Matrigel ve meme kanseri süpernatantları tümör mikroçevresini taklit edebilen en iyi koşul olarak ele alındığında, IFN- γ 'nın bu ortamda bile NOS2'yi artırması, ancak LPS'nin etkin olmaması, tümör mikroçevresinin M1-aracılı inflamasyon üzerindeki olumsuz etkisine işaret etmektedir. Diğer taraftan, fibronektin yüzeylerde LPS oldukça etkin bir şekilde NOS2 uyarımını yapabilmektedir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

- Protein kinaz C (PKC) agonisti olan forbol miristat asetat (phorbol myristate acetate, PMA)'ın in vitro ortamda monosit karakterli THP-1 hücrelerinin makrofaj karakterine farklılaşmasında etkili olduğu bulundu. Makrofaj yönünde farklılaşan hücreler THPMq olarak adlandırılırken, MDA-MB-231 süpernatanı varlığında farklılaşması sağlanan hücreler 231THPMq olarak adlandırıldı.
- THPMq hücrelerinin nükleuslarının büyüyerek oval şeklini aldığı ve sitoplazmik alanının arttığı bulundu. 231THPMq hücrelerinin nükleuslarının da kontrol THP-1 hücrelerine göre büyüme eğilmi gösterdiği görüldü. 231THPMq hücrelerinde böbrek şekilli nükleus yapısının THPMq hücrelerine göre daha belirgin olduğu tespit edildi. Bunun yanında LPS veya IFN- γ ile muamele edilen THPMq ve 231THPMq hücrelerinin sitoplazmik alanında artış görüldü. 231THPMq hücrelerinde LPS veya IFN- γ ile muamele sonucunda granüllü yapının daha belirgin olduğu görüldü. Ayrıca IFN- γ 'nın 231THPMq hücrelerinde sitoplazmik vakuol oluşturduğu bulundu.
- MDA-MB-231 süpernatanı varlığında farklılaştırılan THP-1 hücrelerinin IFN γ R belirtecinde kontrol THPMq hücrelerine göre anlamlı artış olduğu bulundu. Bunun yanında, genel olarak THPMq ve 231THPMq hücreleri IFN- γ ile uyarıldığında CD40, CD11c, CD14, TLR4, MD2 ve IFN γ R belirteçlerinin ifadesinin arttığı görüldü. Bu artışın en çok IFN- γ ile uyarılan 231THPMq hücrelerinde olduğu belirlendi. LPS ile uyarılan 231THPMq hücrelerinde de kontrole göre anlamlı bir artış olduğu bulundu. LPS ile uyarılan THPMq hücrelerinde ise CD40, CD11c ve IFN γ R düzeylerinde kontrole göre anlamlı artış olduğu bulundu.
- Matrigel kaplı yüzeylerde IFN- γ ile uyarılan THP1Mq hücrelerinin alanının en büyük olduğu görüldü. Bunun yanında, LPS ile uyarılan THPMq hücrelerinin çevresi en geniş olduğu bulundu. Fibronektin kaplı yüzeylerde ise, IFN- γ ile uyarılan THP1Mq hücrelerinin alanının ve çevresinin en büyük olduğu görüldü. LPS ile uyarılan 231THPMq hücrelerinin alan ve çevresinin LPS ile uyarılan

THPMq hücrelerinden anlamlı olarak daha büyük olduğu belirlendi. Bu sonuçlara göre Matrigel ve fibronektin yüzeylerinin LPS veya IFN- γ ile uyarımlarının THPMq hücrelerinin farklılaşmasında 231THPMq hücrelerine göre daha etkili olduğu söylenebilir.

- Bazal benzeri meme kanseri süpernatantından salgılanan faktörlerin ROS üretiminde etkili olduğu bulundu. IFN- γ ile uyarımı sağlanan 231THPMq hücrelerinde ROS üretiminin arttığı görüldü. LPS veya IFN- γ ile uyarılan THPMq hücrelerinin ise ROS üretiminde kontrol THPMq hücrelerine göre artış olsa da, artışın anlamlı olmadığı bulundu.
- NO üretiminde de 231THPMq hücreleri üzerinde IFN- γ 'nın LPS'e göre daha etkili bir uyarıcı olduğu bulundu. THPMq hücrelerinde LPS veya IFN- γ 'nın NO üretiminde anlamlı bir etkinliği görülmedi.
- LPS veya IFN- γ uyarımı olan THPMq ve 231THPMq hücrelerinin ROS üretiminde 12.saaate kadar belirgin bir değişiklik gözlenmedi. 12.saatin sonunda ise IFN- γ ile uyarılan 231THPMq hücrelerinin ROS üretiminde artış olduğu saptandı. Bu artışın 48.saatte en yüksek seviyeye ulaştığı bulundu. THPMq hücrelerinde ise 12.saatin sonunda ROS üretiminde artış eğilimi görülse de, bu artışın belirgin bir artış olmadığı görüldü.
- IFN- γ veya LPS ile uyarılan 231THPMq hücrelerinin NO üretiminde de artış görüldü ve en yüksek üretime 48. saatte ulaşıldı. LPS veya IFN- γ ile uyarılan THPMq hücrelerinde 48 saatin sonunda NO üretiminde başlangıca göre belirgin bir değişiklik olmadığı gözlemlendi.
- NOS izoformlarının gen ifadesi düzeyinde etkisine bakıldığında, THPMq hücrelerindeki NOS3 mRNA düzeylerinin en yüksek, NOS1'in en düşük, NOS2'nin ise bu iki enzimin arasında bir değerde eksprese olduğu bulundu. LPS veya IFN- γ ile muamele edilen THPMq hücrelerinde her üç enzimin ekspresyonunda azalma görüldü. 231THPMq hücrelerinde ise NOS izoformlarının mRNA düzeylerinin THPMq'ya göre azalma yönünde olduğu tespit edildi. LPS veya IFN- γ ile muamele edilen 231THPMq hücrelerinde aynı koşullarda uyarılmış THPMq hücrelerine göre artış olduğu tespit edildi.

- LPS veya IFN- γ ile muamele edilen THPMq ve 231THPMq hücrelerinin NOS2 protein düzeylerinde uyarımsız koşullarda bulunan THPMq ve 231THPMq hücrelerine göre belirgin azalmanın olduğu bulundu.
- 231THPMq hücrelerinin floresan mikroskopisi kullanılarak bakılan NOS2 düzeylerinde NOS2 protein düzeyinde azalma olduğu tespit edildi.
- Fibronektin ve Matrigel kaplı yüzeylerde immünfloresan yöntemi ile NOS2 varlığı incelendiğinde; Matrigel kaplı yüzeylerde LPS veya IFN- γ ile uyarılan 231THPMq hücrelerinde NOS2 varlığının belirgin hale geldiği görüldü. IFN- γ 'nın bu hücrelerde NOS2 boyamasını arttırdığı bulundu. Fibronektin kaplı yüzeylerde ise LPS ile uyarılan 231THPMq hücrelerinde NOS2 varlığının arttığı bulundu.
- 38THPMq ve 982THPMq hücrelerinde IFN- γ ile muamelenin bu hücrelerde ROS ve NO üretimini arttırdığı bulundu. 38THPMq hücrelerinde IFN- γ ile muamele sonucunda ROS ve NO üretiminin IFN- γ uyarımı olan 231THPMq ile 982THPMq hücrelerinden daha fazla olduğu belirlendi.
- 4T1 süpernatanı veya EMT6/AR1 süpernatanı varlığında uyarılan j774A.1 hücrelerinde ROS ve NO üretiminin en çok EMT6/AR1 süpernatanı varlığında uyarılan j774A.1 hücrelerinde olduğu bulundu.
- MDA-MB-231 bazal-benzeri meme kanseri hücrelerinden elde edilen süpernatantlar varlığında yapılan çalışmalarda THP-1 miyeloid hücre hattının, fenotipik olgunlaşma ve farklılaşma çalışmaları için uygun monosit-makrofaj modeli olarak belirlenmesi için CD68, CD80, CD86 ve CD206 belirteçlerinin düzeyleri araştırılabilir.
- MDA-MB-231 hücrelerinden elde edilen süpernatantlar varlığında THP-1 hücrelerinin LPS ile uyarımı sonucunda LPS-LBP-CD14-TLR4 kompleksinde CD14 endositozunun ROS ve NO üretimine etkisi incelenebilir.
- MDA-MB-231 hücrelerinden elde edilen süpernatantlar varlığında LPS veya IFN- γ uyarımı altında THP-1 hücrelerinin NO üretimine NF- κ B, MAPK ve AP-1 gibi mekanizmaların etkisi incelenebilir.

- Makrofaja farklılaşması sağlanan THP-1 hücreleri ile bazal-benzeri meme kanseri hücre süpernatantları varlığında uyarılan THP-1 hücrelerinde NOS2 proteinin epigenetik olarak susturulup susturulmadığı test edilebilir. Aynı zamanda LPS veya IFN- γ 'nın NOS2 proteinine etkisi de epigenetik olarak incelenebilir.
- Meme kanseri hastalarından elde edilen kan ve dokularda NOS2 düzeyleri ve NO üretimi fonksiyonel ve moleküler yöntemlerle incelenip, elde edilen sonuçlar yapılan in vitro çalışmalarla kıyaslanabilir.

7. KAYNAKLAR

1. Bohlson SS, O'Conner SD, Hulsebus HJ, Ho M-M, Fraser DA. Complement, C1q, and C1q-Related Molecules Regulate Macrophage Polarization. *Frontiers in Immunology*. 2014;5.
2. Forstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J*. 2012;33(7):829-37, 37a-37d.
3. Tuteja N, Chandra M, Tuteja R, Misra MK. Nitric Oxide as a Unique Bioactive Signaling Messenger in Physiology and Pathophysiology. *J Biomed Biotechnol*. 2004;2004(4):227-37.
4. Lee MY, Sun KH, Chiang CP, Huang CF, Sun GH, Tsou YC, et al. Nitric oxide suppresses LPS-induced inflammation in a mouse asthma model by attenuating the interaction of IKK and Hsp90. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2015;240(4):498-507.
5. Chakroborty S, Kim J, Schneider C, West AR, Stutzmann GE. Nitric oxide signaling is recruited as a compensatory mechanism for sustaining synaptic plasticity in Alzheimer's disease mice. *J Neurosci*. 2015;35(17):6893-902.
6. Sharma JN, Al-Omran A, Parvathy SS. Role of nitric oxide in inflammatory diseases. *Inflammopharmacology*. 2007;15(6):252-9.
7. Krol M, Kepinska M. Human Nitric Oxide Synthase-Its Functions, Polymorphisms, and Inhibitors in the Context of Inflammation, Diabetes and Cardiovascular Diseases. *Int J Mol Sci*. 2020;22(1).
8. Maron BA, Michel T. Subcellular localization of oxidants and redox modulation of endothelial nitric oxide synthase. *Circ J*. 2012;76(11):2497-512.
9. Jones ML, Ganopolsky JG, Labbe A, Wahl C, Prakash S. Antimicrobial properties of nitric oxide and its application in antimicrobial formulations and medical devices. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2010;88(2):401-7.
10. Wink DA, Mitchell JB. Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radic Biol Med*. 1998;25(4-5):434-56.
11. Schairer DO, Chouake JS, Nosanchuk JD, Friedman AJ. The potential of nitric oxide releasing therapies as antimicrobial agents. *Virulence*. 2012;3(3):271-9.
12. Mikkelsen RB, Wardman P. Biological chemistry of reactive oxygen and nitrogen and radiation-induced signal transduction mechanisms. *Oncogene*. 2003;22(37):5734-54.
13. Lundberg JO, Weitzberg E, Gladwin MT. The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*. 2008;7(2):156-67.

14. Hess DT, Matsumoto A, Kim SO, Marshall HE, Stamler JS. Protein S-nitrosylation: purview and parameters. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005;6(2):150-66.
15. Reiter CD, Teng RJ, Beckman JS. Superoxide reacts with nitric oxide to nitrate tyrosine at physiological pH via peroxynitrite. *J Biol Chem.* 2000;275(42):32460-6.
16. Gladwin MT, Shelhamer JH, Schechter AN, Pease-Fye ME, Waclawiw MA, Panza JA, et al. Role of circulating nitrite and S-nitrosohemoglobin in the regulation of regional blood flow in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(21):11482-7.
17. Kim SF. The role of nitric oxide in prostaglandin biology; update. *Nitric Oxide.* 2011;25(3):255-64.
18. Pfeilschifter J, Eberhardt W, Beck KF. Regulation of gene expression by nitric oxide. *Pflugers Arch.* 2001;442(4):479-86.
19. Lugowski M, Saczko J, Kulbacka J, Banas T. [Reactive oxygen and nitrogen species]. *Pol Merkur Lekarski.* 2011;31(185):313-7.
20. Brown GC. Nitric oxide and neuronal death. *Nitric Oxide.* 2010;23(3):153-65.
21. Lefebvre RA. Pharmacological characterization of the nitrergic innervation of the stomach. *Verh K Acad Geneesk Belg.* 2002;64(3):151-66.
22. Forstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. *European Heart Journal.* 2011;33(7):829-37.
23. Bryan NS, Bian K, Murad F. Discovery of the nitric oxide signaling pathway and targets for drug development. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2009;14:1-18.
24. Pipili-Synetos E, Kritikou S, Papadimitriou E, Athanassiadou A, Flordellis C, Maragoudakis ME. Nitric oxide synthase expression, enzyme activity and NO production during angiogenesis in the chick chorioallantoic membrane. *British Journal of Pharmacology.* 2000;129(1):207-13.
25. Vannini F, Kashfi K, Nath N. The dual role of iNOS in cancer. *Redox Biology.* 2015;6:334-43.
26. Król M, Kepinska M. Human Nitric Oxide Synthase—Its Functions, Polymorphisms, and Inhibitors in the Context of Inflammation, Diabetes and Cardiovascular Diseases. *International Journal of Molecular Sciences.* 2020;22(1).
27. Muriel P, Pérez-Rojas JM. Nitric oxide inhibits mitochondrial monoamine oxidase activity and decreases outer mitochondria membrane fluidity. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology.* 2003;136(3):191-7.
28. Brown GC, Neher JJ. Inflammatory Neurodegeneration and Mechanisms of Microglial Killing of Neurons. *Molecular Neurobiology.* 2010;41(2-3):242-7.

29. Fish JE, Marsden PA. Endothelial nitric oxide synthase: insight into cell-specific gene regulation in the vascular endothelium. *Cell Mol Life Sci.* 2006;63(2):144-62.
30. Forstermann U, Munzel T. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation.* 2006;113(13):1708-14.
31. Garcia-Cardena G, Fan R, Shah V, Sorrentino R, Cirino G, Papapetropoulos A, et al. Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by Hsp90. *Nature.* 1998;392(6678):821-4.
32. Zeiher AM, Fisslthaler B, Schray-Utz B, Busse R. Nitric oxide modulates the expression of monocyte chemoattractant protein 1 in cultured human endothelial cells. *Circ Res.* 1995;76(6):980-6.
33. Arndt H, Smith CW, Granger DN. Leukocyte-endothelial cell adhesion in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Hypertension.* 1993;21(5):667-73.
34. Chen GY, Nuñez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nature Reviews Immunology.* 2010;10(12):826-37.
35. Liu T, Zhang L, Joo D, Sun S-C. NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduction and Targeted Therapy.* 2017;2(1).
36. Sun S-C. Non-canonical NF- κ B signaling pathway. *Cell Research.* 2010;21(1):71-85.
37. Vallabhapurapu S, Karin M. Regulation and Function of NF- κ B Transcription Factors in the Immune System. *Annual Review of Immunology.* 2009;27(1):693-733.
38. Huang P, Han J, Hui L. MAPK signaling in inflammation-associated cancer development. *Protein Cell.* 2010;1(3):218-26.
39. Newton K, Dixit VM. Signaling in innate immunity and inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012;4(3).
40. Clark JD, Flanagan ME, Telliez J-B. Discovery and Development of Janus Kinase (JAK) Inhibitors for Inflammatory Diseases. *Journal of Medicinal Chemistry.* 2014;57(12):5023-38.
41. Huang JS, Guh JY, Chen HC, Hung WC, Lai YH, Chuang LY. Role of receptor for advanced glycation end-product (RAGE) and the JAK/STAT-signaling pathway in AGE-induced collagen production in NRK-49F cells. *J Cell Biochem.* 2001;81(1):102-13.
42. Banerjee S, Biehl A, Gadina M, Hasni S, Schwartz DM. JAK-STAT Signaling as a Target for Inflammatory and Autoimmune Diseases: Current and Future Prospects. *Drugs.* 2017;77(5):521-46.
43. Italiani P, Boraschi D. From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation. *Frontiers in Immunology.* 2014;5.

44. Lu G, Zhang R, Geng S, Peng L, Jayaraman P, Chen C, et al. Myeloid cell-derived inducible nitric oxide synthase suppresses M1 macrophage polarization. *Nature Communications*. 2015;6(1).
45. Chan ED, Riches DW. IFN-gamma + LPS induction of iNOS is modulated by ERK, JNK/SAPK, and p38(mapk) in a mouse macrophage cell line. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2001;280(3):C441-50.
46. Ledebuer A, Breve JJ, Poole S, Tilders FJ, Van Dam AM. Interleukin-10, interleukin-4, and transforming growth factor-beta differentially regulate lipopolysaccharide-induced production of pro-inflammatory cytokines and nitric oxide in co-cultures of rat astroglial and microglial cells. *Glia*. 2000;30(2):134-42.
47. Flodstrom M, Eizirik DL. Interferon-gamma-induced interferon regulatory factor-1 (IRF-1) expression in rodent and human islet cells precedes nitric oxide production. *Endocrinology*. 1997;138(7):2747-53.
48. Gao Q, Liu Y, Wu YAN, Zhao Q, Wang L, Gao S, et al. IL-17 intensifies IFN- γ -induced NOS2 upregulation in RAW 264.7 cells by further activating STAT1 and NF- κ B. *International Journal of Molecular Medicine*. 2016;37(2):347-58.
49. Hall JP, Davis RJ. Inhibition of the p38 pathway upregulates macrophage JNK and ERK activities, and the ERK, JNK, and p38 MAP kinase pathways are reprogrammed during differentiation of the murine myeloid M1 cell line. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2002;86(1):1-11.
50. Bagaev AV, Garaeva AY, Lebedeva ES, Pichugin AV, Ataulakhanov RI, Ataulakhanov FI. Elevated pre-activation basal level of nuclear NF- κ B in native macrophages accelerates LPS-induced translocation of cytosolic NF- κ B into the cell nucleus. *Scientific Reports*. 2019;9(1).
51. Arango Duque G, Descoteaux A. Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. *Front Immunol*. 2014;5:491.
52. Sharif O, Bolshakov VN, Raines S, Newham P, Perkins ND. Transcriptional profiling of the LPS induced NF-kappaB response in macrophages. *BMC Immunol*. 2007;8:1.
53. Koundouros N, Poulogiannis G. Phosphoinositide 3-Kinase/Akt Signaling and Redox Metabolism in Cancer. *Frontiers in Oncology*. 2018;8.
54. Montezano AC, Touyz RM. Reactive Oxygen Species and Endothelial Function - Role of Nitric Oxide Synthase Uncoupling and Nox Family Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidases. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. 2012;110(1):87-94.
55. Abramson SB. Nitric oxide in inflammation and pain associated with osteoarthritis. *Arthritis Research & Therapy*. 2008;10(Suppl 2).

56. Syngle A, Garg N, Krishan P. Nitric Oxide: Link between Inflammation and Endothelial Dysfunction in Rheumatoid Arthritis. *International Journal of Angiology*. 2016;26(03):165-9.
57. Sharma JN, Al-Omran A, Parvathy SS. Role of nitric oxide in inflammatory diseases. *Inflammopharmacology*. 2008;15(6):252-9.
58. Sato E, Simpson KL, Grisham MB, Koyama S, Robbins RA. Reactive Nitrogen and Oxygen Species Attenuate Interleukin-8-induced Neutrophil Chemotactic Activity in Vitro. *Journal of Biological Chemistry*. 2000;275(15):10826-30.
59. Gobert AP, Mersey BD, Cheng Y, Blumberg DR, Newton JC, Wilson KT. Cutting Edge: Urease Release by *Helicobacter pylori* Stimulates Macrophage Inducible Nitric Oxide Synthase. *The Journal of Immunology*. 2002;168(12):6002-6.
60. Fang FC. Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. *Nat Rev Microbiol*. 2004;2(10):820-32.
61. Alvarez MN, Trujillo M, Radi R. Peroxynitrite formation from biochemical and cellular fluxes of nitric oxide and superoxide. *Methods Enzymol*. 2002;359:353-66.
62. Gross A, Dugas N, Spiesser S, Vouldoukis I, Damais C, Kolb JP, et al. Nitric Oxide Production in Human Macrophagic Cells Phagocytizing Opsonized Zymosan: Direct Characterization by Measurement of the Luminol Dependent Chemiluminescence. *Free Radical Research*. 2009;28(2):179-91.
63. Panaro MA, Brandonisio O, Acquafredda A, Sisto M, Mitolo V. Evidences for iNOS expression and nitric oxide production in the human macrophages. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord*. 2003;3(3):210-21.
64. KrÖncke, Fehsel, Kolb-Bachofen. Inducible nitric oxide synthase in human diseases. *Clinical & Experimental Immunology*. 2001;113(2):147-56.
65. Tiscornia A, Cairoli E, Marquez M, Denicola A, Pritsch O, Cayota A. Use of diaminofluoresceins to detect and measure nitric oxide in low level generating human immune cells. *Journal of Immunological Methods*. 2009;342(1-2):49-57.
66. Genin M, Clement F, Fattaccioli A, Raes M, Michiels C. M1 and M2 macrophages derived from THP-1 cells differentially modulate the response of cancer cells to etoposide. *BMC Cancer*. 2015;15(1).
67. Denis M. Human monocytes/macrophages: NO or no NO? *Journal of Leukocyte Biology*. 1994;55(5):682-4.
68. Schneemann M, Schoedon G, Hofer S, Blau N, Guerrero L, Schaffner A. Nitric Oxide Synthase Is Not a Constituent of the Antimicrobial Armature of Human Mononuclear Phagocytes. *Journal of Infectious Diseases*. 1993;167(6):1358-63.

69. Bogdan C. Nitric oxide and the immune response. *Nature Immunology*. 2001;2(10):907-16.
70. Nathan, C. Role of iNOS in Human Host Defense. *Science*. 2006;312(5782):1874b-5b.
71. Bermudez LE. Differential mechanisms of intracellular killing of *Mycobacterium avium* and *Listeria monocytogenes* by activated human and murine macrophages. The role of nitric oxide. *Clin Exp Immunol*. 1993;91(2):277-81.
72. Gross TJ, Kremens K, Powers LS, Brink B, Knutson T, Domann FE, et al. Epigenetic silencing of the human NOS2 gene: rethinking the role of nitric oxide in human macrophage inflammatory responses. *J Immunol*. 2014;192(5):2326-38.
73. Chan GC, Fish JE, Mawji IA, Leung DD, Rachlis AC, Marsden PA. Epigenetic basis for the transcriptional hyporesponsiveness of the human inducible nitric oxide synthase gene in vascular endothelial cells. *J Immunol*. 2005;175(6):3846-61.
74. Lee M, Rey K, Besler K, Wang C, Choy J. Immunobiology of Nitric Oxide and Regulation of Inducible Nitric Oxide Synthase. *Results Probl Cell Differ*. 2017;62:181-207.
75. Schneemann M, Schoedon G, Hofer S, Blau N, Guerrero L, Schaffner A. Nitric oxide synthase is not a constituent of the antimicrobial armature of human mononuclear phagocytes. *J Infect Dis*. 1993;167(6):1358-63.
76. Buscher K, Ehinger E, Gupta P, Pramod AB, Wolf D, Tweet G, et al. Natural variation of macrophage activation as disease-relevant phenotype predictive of inflammation and cancer survival. *Nature Communications*. 2017;8(1).
77. Steinhorn R, Martin RJ. Nitric oxide and the developing airway. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2002;283(6):L1190-1.
78. Moilanen E, Moilanen T, Knowles R, Charles I, Kadoya Y, al-Saffar N, et al. Nitric oxide synthase is expressed in human macrophages during foreign body inflammation. *Am J Pathol*. 1997;150(3):881-7.
79. Mattila JT, Ojo OO, Kepka-Lenhart D, Marino S, Kim JH, Eum SY, et al. Microenvironments in Tuberculous Granulomas Are Delineated by Distinct Populations of Macrophage Subsets and Expression of Nitric Oxide Synthase and Arginase Isoforms. *The Journal of Immunology*. 2013;191(2):773-84.
80. Lee M, Rey K, Besler K, Wang C, Choy J. Immunobiology of Nitric Oxide and Regulation of Inducible Nitric Oxide Synthase. *Macrophages. Results and Problems in Cell Differentiation* 2017. p. 181-207.
81. Ganster RW, Taylor BS, Shao L, Geller DA. Complex regulation of human inducible nitric oxide synthase gene transcription by Stat 1 and NF- κ B. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2001;98(15):8638-43.

82. Kwon S, Newcomb RL, George SC. Mechanisms of Synergistic Cytokine-Induced Nitric Oxide Production in Human Alveolar Epithelial Cells. *Nitric Oxide*. 2001;5(6):534-46.
83. Scavone C, Guo Z, Zheng L, Liao X, Geller D. Up-Regulation of Human Inducible Nitric Oxide Synthase by p300 Transcriptional Complex. *Plos One*. 2016;11(1).
84. de Vera ME, Shapiro RA, Nussler AK, Mudgett JS, Simmons RL, Morris SM, et al. Transcriptional regulation of human inducible nitric oxide synthase (NOS2) gene by cytokines: initial analysis of the human NOS2 promoter. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1996;93(3):1054-9.
85. Mellott JK, Nick HS, Waters MF, Billiar TR, Geller DA, Chesrown SE. Cytokine-induced changes in chromatin structure and in vivo footprints in the inducible NOS promoter. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2001;280(3):L390-L9.
86. De Kleer I, Willems F, Lambrecht B, Goriely S. Ontogeny of myeloid cells. *Front Immunol*. 2014;5:423.
87. Nemeth T, Sperandio M, Mocsai A. Neutrophils as emerging therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov*. 2020;19(4):253-75.
88. Rothenberg ME, Hogan SP. The eosinophil. *Annu Rev Immunol*. 2006;24:147-74.
89. Siracusa MC, Kim BS, Spergel JM, Artis D. Basophils and allergic inflammation. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;132(4):789-801; quiz 788.
90. Helms CC, Gladwin MT, Kim-Shapiro DB. Erythrocytes and Vascular Function: Oxygen and Nitric Oxide. *Frontiers in Physiology*. 2018;9.
91. Ru YX, Dong SX, Liang HY, Zhao SX. Platelet production of megakaryocyte: A review with original observations on human in vivo cells and bone marrow. *Ultrastruct Pathol*. 2016;40(4):163-70.
92. Krystel-Whittemore M, Dileepan KN, Wood JG. Mast Cell: A Multi-Functional Master Cell. *Frontiers in Immunology*. 2016;6.
93. Boltjes A, van Wijk F. Human dendritic cell functional specialization in steady-state and inflammation. *Front Immunol*. 2014;5:131.
94. Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, Ley K. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science*. 2010;327(5966):656-61.
95. Lin H, Lee E, Hestir K, Leo C, Huang M, Bosch E, et al. Discovery of a Cytokine and Its Receptor by Functional Screening of the Extracellular Proteome. *Science*. 2008;320(5877):807-11.
96. Fogg DK. A Clonogenic Bone Marrow Progenitor Specific for Macrophages and Dendritic Cells. *Science*. 2006;311(5757):83-7.

97. Serbina NV, Jia T, Hohl TM, Pamer EG. Monocyte-Mediated Defense Against Microbial Pathogens. *Annual Review of Immunology*. 2008;26(1):421-52.
98. Raggi F, Pelassa S, Pierobon D, Penco F, Gattorno M, Novelli F, et al. Regulation of Human Macrophage M1-M2 Polarization Balance by Hypoxia and the Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells-1. *Front Immunol*. 2017;8:1097.
99. Sieweke MH, Allen JE. Beyond Stem Cells: Self-Renewal of Differentiated Macrophages. *Science*. 2013;342(6161):1242974-.
100. Gautier EL, Shay T, Miller J, Greter M, Jakubzick C, Ivanov S, et al. Gene-expression profiles and transcriptional regulatory pathways that underlie the identity and diversity of mouse tissue macrophages. *Nature Immunology*. 2012;13(11):1118-28.
101. Wang Y, Szretter KJ, Vermi W, Gilfillan S, Rossini C, Cella M, et al. IL-34 is a tissue-restricted ligand of CSF1R required for the development of Langerhans cells and microglia. *Nature Immunology*. 2012;13(8):753-60.
102. Burgess AW, Metcalf D. The nature and action of granulocyte-macrophage colony stimulating factors. *Blood*. 1980;56(6):947-58.
103. Atri C, Guerfali FZ, Laouini D. Role of Human Macrophage Polarization in Inflammation during Infectious Diseases. *Int J Mol Sci*. 2018;19(6).
104. Orekhov AN, Orekhova VA, Nikiforov NG, Myasoedova VA, Grechko AV, Romanenko EB, et al. Monocyte differentiation and macrophage polarization. *Vessel Plus*. 2019;2019.
105. Hallam S, Escorcio-Correia M, Soper R, Schultheiss A, Hagemann T. Activated macrophages in the tumour microenvironment-dancing to the tune of TLR and NF- κ B. *The Journal of Pathology*. 2009;219(2):143-52.
106. Das A, Sinha M, Datta S, Abas M, Chaffee S, Sen CK, et al. Monocyte and Macrophage Plasticity in Tissue Repair and Regeneration. *The American Journal of Pathology*. 2015;185(10):2596-606.
107. MacMicking J, Xie Q-w, Nathan C. Nitric Oxide and Macrophage Function. *Annual Review of Immunology*. 1997;15(1):323-50.
108. Huen SC, Cantley LG. Macrophage-mediated injury and repair after ischemic kidney injury. *Pediatric Nephrology*. 2014;30(2):199-209.
109. Lech M, Gröbmayr R, Weidenbusch M, Anders H-J. Tissues Use Resident Dendritic Cells and Macrophages to Maintain Homeostasis and to Regain Homeostasis upon Tissue Injury: The Immunoregulatory Role of Changing Tissue Environments. *Mediators of Inflammation*. 2012;2012:1-15.
110. Zhou J, Tang Z, Gao S, Li C, Feng Y, Zhou X. Tumor-Associated Macrophages: Recent Insights and Therapies. *Frontiers in Oncology*. 2020;10.

111. Mwafy SE, El-Guindy DM. Pathologic assessment of tumor-associated macrophages and their histologic localization in invasive breast carcinoma. *Journal of the Egyptian National Cancer Institute*. 2020;32(1).
112. Myers KV, Amend SR, Pienta KJ. Targeting Tyro3, Axl and MerTK (TAM receptors): implications for macrophages in the tumor microenvironment. *Molecular Cancer*. 2019;18(1).
113. Töttemeyer S, Sheppard M, Lloyd A, Roper D, Dowson C, Underhill D, et al. IFN- γ Enhances Production of Nitric Oxide from Macrophages via a Mechanism That Depends on Nucleotide Oligomerization Domain-2. *The Journal of Immunology*. 2006;176(8):4804-10.
114. Müller E, Christopoulos PF, Halder S, Lunde A, Beraki K, Speth M, et al. Toll-Like Receptor Ligands and Interferon- γ Synergize for Induction of Antitumor M1 Macrophages. *Frontiers in Immunology*. 2017;8.
115. Jones E, Adcock IM, Ahmed BY, Punchard NA. Modulation of LPS stimulated NF-kappaB mediated Nitric Oxide production by PKC ϵ and JAK2 in RAW macrophages. *Journal of Inflammation*. 2007;4(1).
116. Fresta CG, Fidilio A, Lazzarino G, Musso N, Grasso M, Merlo S, et al. Modulation of Pro-Oxidant and Pro-Inflammatory Activities of M1 Macrophages by the Natural Dipeptide Carnosine. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(3).
117. Fujisaka S, Usui I, Ikutani M, Aminuddin A, Takikawa A, Tsuneyama K, et al. Adipose tissue hypoxia induces inflammatory M1 polarity of macrophages in an HIF-1 α -dependent and HIF-1 α -independent manner in obese mice. *Diabetologia*. 2013;56(6):1403-12.
118. Martinez FO. Regulators of macrophage activation. *European Journal of Immunology*. 2011;41(6):1531-4.
119. Hedl M, Yan J, Witt H, Abraham C. IRF5 Is Required for Bacterial Clearance in Human M1-Polarized Macrophages, and IRF5 Immune-Mediated Disease Risk Variants Modulate This Outcome. *The Journal of Immunology*. 2019;202(3):920-30.
120. Fujihara M, Muroi M, Tanamoto K-i, Suzuki T, Azuma H, Ikeda H. Molecular mechanisms of macrophage activation and deactivation by lipopolysaccharide: roles of the receptor complex. *Pharmacology & Therapeutics*. 2003;100(2):171-94.
121. Najafi M, Hashemi Goradel N, Farhood B, Salehi E, Nashtaei MS, Khanlarkhani N, et al. Macrophage polarity in cancer: A review. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2018;120(3):2756-65.
122. Ubil E, Caskey L, Holtzhausen A, Hunter D, Story C, Earp HS. Tumor-secreted Pros1 inhibits macrophage M1 polarization to reduce antitumor immune response. *Journal of Clinical Investigation*. 2018;128(6):2356-69.

123. Ma J, Liu L, Che G, Yu N, Dai F, You Z. The M1 form of tumor-associated macrophages in non-small cell lung cancer is positively associated with survival time. *BMC Cancer*. 2010;10(1).
124. Pollard JW. Macrophages define the invasive microenvironment in breast cancer. *Journal of Leukocyte Biology*. 2008;84(3):623-30.
125. Rivenbark AG, O'Connor SM, Coleman WB. Molecular and Cellular Heterogeneity in Breast Cancer. *The American Journal of Pathology*. 2013;183(4):1113-24.
126. Ch'ng ES, Tuan Sharif SE, Jaafar H. In human invasive breast ductal carcinoma, tumor stromal macrophages and tumor nest macrophages have distinct relationships with clinicopathological parameters and tumor angiogenesis. *Virchows Archiv*. 2013;462(3):257-67.
127. Linde N, Lederle W, Depner S, van Rooijen N, Gutschalk CM, Mueller MM. Vascular endothelial growth factor-induced skin carcinogenesis depends on recruitment and alternative activation of macrophages. *The Journal of Pathology*. 2012;227(1):17-28.
128. Pan Y, Yu Y, Wang X, Zhang T. Tumor-Associated Macrophages in Tumor Immunity. *Frontiers in Immunology*. 2020;11.
129. Allavena P, Sica A, Solinas G, Porta C, Mantovani A. The inflammatory microenvironment in tumor progression: The role of tumor-associated macrophages. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2008;66(1):1-9.
130. Granados-Principal S, Liu Y, Guevara ML, Blanco E, Choi DS, Qian W, et al. Inhibition of iNOS as a novel effective targeted therapy against triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Research*. 2015;17(1).
131. Glynn SA, Boersma BJ, Dorsey TH, Yi M, Yfantis HG, Ridnour LA, et al. Increased NOS2 predicts poor survival in estrogen receptor–negative breast cancer patients. *Journal of Clinical Investigation*. 2010;120(11):3843-54.
132. Heinecke JL, Ridnour LA, Cheng RY, Switzer CH, Lizardo MM, Khanna C, et al. Tumor microenvironment-based feed-forward regulation of NOS2 in breast cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(17):6323-8.
133. Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, Cheang M, Karaca G, Hu Z, et al. Immunohistochemical and Clinical Characterization of the Basal-Like Subtype of Invasive Breast Carcinoma. *Clinical Cancer Research*. 2004;10(16):5367-74.
134. Lee H-W, Ahn D-H, Crawley SC, Li J-D, Gum JR, Basbaum CB, et al. Phorbol 12-Myristate 13-Acetate Up-regulates the Transcription of MUC2 Intestinal Mucin via Ras, ERK, and NF- κ B. *Journal of Biological Chemistry*. 2002;277(36):32624-31.
135. Zeng C, Wang W, Yu X, Yang L, Chen S, Li Y. Pathways related to PMA-differentiated THP1 human monocytic leukemia cells revealed by RNA-Seq. *Science China Life Sciences*. 2015;58(12):1282-7.

136. Auwerx J. The human leukemia cell line, THP-1: A multifaceted model for the study of monocyte-macrophage differentiation. *Experientia*. 1991;47(1):22-31.
137. Wang Y, Yin C, Feng LEI, Ma L, Wei Y, Sheng G. Sorting, identification and enrichment of side population cells in THP-1 acute monocytic leukemia cells. *Oncology Reports*. 2013;29(5):1923-31.
138. Caras I, Tucureanu C, Lerescu L, Pitica R, Melinceanu L, Neagu S, et al. Influence of tumor cell culture supernatants on macrophage functional polarization: in vitro models of macrophage-tumor environment interaction. *Tumori*. 2011;97(5):647-54.
139. Zissel G, Riddy DM, Goy E, Delerive P, Summers RJ, Sexton PM, et al. Comparative genotypic and phenotypic analysis of human peripheral blood monocytes and surrogate monocyte-like cell lines commonly used in metabolic disease research. *Plos One*. 2018;13(5).
140. Ryu J-K, Kim SJ, Rah S-H, Kang JI, Jung HE, Lee D, et al. Reconstruction of LPS Transfer Cascade Reveals Structural Determinants within LBP, CD14, and TLR4-MD2 for Efficient LPS Recognition and Transfer. *Immunity*. 2017;46(1):38-50.
141. Wang Y, Su L, Morin MD, Jones BT, Whitby LR, Surakattula MMRP, et al. TLR4/MD-2 activation by a synthetic agonist with no similarity to LPS. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2016;113(7):E884-E93.
142. Sharif O, Bolshakov VN, Raines S, Newham P, Perkins ND. Transcriptional profiling of the LPS induced NF- κ B response in macrophages. *BMC Immunology*. 2007;8(1).
143. Tsukamoto H, Takeuchi S, Kubota K, Kobayashi Y, Kozakai S, Ukai I, et al. Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein stimulates CD14-dependent Toll-like receptor 4 internalization and LPS-induced TBK1–IKK ϵ –IRF3 axis activation. *Journal of Biological Chemistry*. 2018;293(26):10186-201.
144. Qin Z. The use of THP-1 cells as a model for mimicking the function and regulation of monocytes and macrophages in the vasculature. *Atherosclerosis*. 2012;221(1):2-11.
145. Sawa-Wejksza K, Dudek A, Lemieszek M, Kaławaj K, Kandefer-Szerszeń M. Colon cancer–derived conditioned medium induces differentiation of THP-1 monocytes into a mixed population of M1/M2 cells. *Tumor Biology*. 2018;40(9).
146. Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nature Reviews Immunology*. 2005;5(12):953-64.
147. Davies LC, Jenkins SJ, Allen JE, Taylor PR. Tissue-resident macrophages. *Nature Immunology*. 2013;14(10):986-95.

148. Yu H, Lee H, Herrmann A, Buettner R, Jove R. Revisiting STAT3 signalling in cancer: new and unexpected biological functions. *Nature Reviews Cancer*. 2014;14(11):736-46.
149. Insua-Rodríguez J, Oskarsson T. The extracellular matrix in breast cancer. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2016;97:41-55.
150. Stewart DA, Yang Y, Makowski L, Troester MA. Basal-like Breast Cancer Cells Induce Phenotypic and Genomic Changes in Macrophages. *Molecular Cancer Research*. 2012;10(6):727-38.
151. Kamoshida G, Matsuda A, Sekine W, Mizuno H, Oku T, Itoh S, et al. Monocyte differentiation induced by co-culture with tumor cells involves RGD-dependent cell adhesion to extracellular matrix. *Cancer Letters*. 2012;315(2):145-52.
152. Souza ST, Agra LC, Santos CEA, Barreto E, Hickmann JM, Fonseca EJS. Macrophage adhesion on fibronectin evokes an increase in the elastic property of the cell membrane and cytoskeleton: an atomic force microscopy study. *European Biophysics Journal*. 2014;43(12):573-9.
153. Pae H-O, Seo W-G, Kim N-Y, Oh G-S, Kim G-E, Kim Y-H, et al. Induction of granulocytic differentiation in acute promyelocytic leukemia cells (HL-60) by water-soluble chitosan oligomer. *Leukemia Research*. 2001;25(4):339-46.
154. Ogura M, Bridgeman VL, Malanchi I. Macrophages unlock progression of breast cancer cells experiencing matrigel-segregation in transplantation models. *Scientific Reports*. 2017;7(1).
155. Brüne B, Courtial N, Dehne N, Syed SN, Weigert A. Macrophage NOS2 in Tumor Leukocytes. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2017;26(18):1023-43.
156. Nicholson S, Bonecini-Almeida MdG, Lapa e Silva JR, Nathan C, Xie QW, Mumford R, et al. Inducible nitric oxide synthase in pulmonary alveolar macrophages from patients with tuberculosis. *Journal of Experimental Medicine*. 1996;183(5):2293-302.
157. Kraaij MD, Vereyken EJJ, Leenen PJM, van den Bosch TPP, Rezaee F, Betjes MGH, et al. Human monocytes produce interferon-gamma upon stimulation with LPS. *Cytokine*. 2014;67(1):7-12.
158. Kak G, Raza M, Tiwari BK. Interferon-gamma (IFN- γ): Exploring its implications in infectious diseases. *Biomolecular Concepts*. 2018;9(1):64-79.
159. Denis M. Tumor Necrosis Factor and Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor Stimulate Human Macrophages to Restrict Growth of Virulent *Mycobacterium avium* and to Kill Avirulent *M. avium*: Killing Effector Mechanism Depends on the Generation of Reactive Nitr. *Journal of Leukocyte Biology*. 1991;49(4):380-7.

160. Wang X, Gray Z, Willette-Brown J, Zhu F, Shi G, Jiang Q, et al. Macrophage inducible nitric oxide synthase circulates inflammation and promotes lung carcinogenesis. *Cell Death Discovery*. 2018;4(1).
161. Lin C-Y, Wang W-H, Chen S-H, Chang Y-W, Hung L-C, Chen C-Y, et al. Lipopolysaccharide-Induced Nitric Oxide, Prostaglandin E2, and Cytokine Production of Mouse and Human Macrophages Are Suppressed by Pheophytin-b. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017;18(12).
162. Lee J-S, Yang C-S, Shin D-M, Yuk J-M, Son J-W, Jo E-K. Nitric Oxide Synthesis is Modulated by 1,25-Dihydroxyvitamin D3 and Interferon- γ in Human Macrophages after Mycobacterial Infection. *Immune Network*. 2009;9(5).
163. dos Anjos Cassado A. F4/80 as a Major Macrophage Marker: The Case of the Peritoneum and Spleen. *Macrophages. Results and Problems in Cell Differentiation* 2017. p. 161-79.
164. Herb M, Schramm M. Functions of ROS in Macrophages and Antimicrobial Immunity. *Antioxidants*. 2021;10(2).
165. Viola JPB, Madera L, Greenshields A, Coombs MRP, Hoskin DW. 4T1 Murine Mammary Carcinoma Cells Enhance Macrophage-Mediated Innate Inflammatory Responses. *Plos One*. 2015;10(7).

8. EKLER

EK 1. Tez Çalışması Orijinallik Raporu

İNSAN MAKROFAJLARINDA NİTRİK OKSİT SENTAZ 2 (NOS2)
İFADE VE AKTİVİTESİNİN BAZAL BENZERİ MEME KANSERİ
HÜCRELERİNDEN ÜRETİLEN FAKTÖRLER VARLIĞINDA
İNCELENMESİ

ORJİNALLİK RAPORU

%8	%8	%1	%1
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	%5
2	openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	%1
3	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	<%1
4	katalog.hacettepe.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
5	www.nature.com İnternet Kaynağı	<%1
6	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Öğrenci Ödevi	<%1
7	fb8968c5-502d-436c-a825- c7c279e8e4aa.filesusr.com İnternet Kaynağı	<%1

teses.usp.br

EK 2. Dijital Makbuz

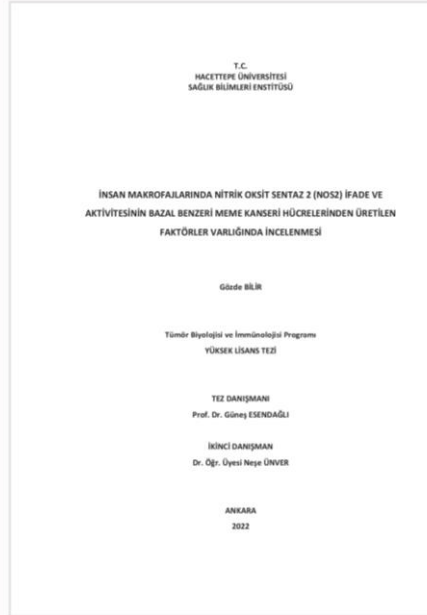


Dijital Makbuz

Bu makbuz ödevinizin Turnitin'e ulaştığını bildirmektedir. Gönderiminize dair bilgiler şöyledir:

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen: Gözde Bilir
Ödev başlığı: İNSAN MAKROFAJLARINDA NİTRİK OKSİT SENTAZ 2 (NOS2) İF...
Gönderi Başlığı: İNSAN MAKROFAJLARINDA NİTRİK OKSİT SENTAZ 2 (NOS2) İF...
Dosya adı: G_zde_Bilir_-_Y_ksek_Lisans_Tezi.pdf
Dosya boyutu: 3.46M
Sayfa sayısı: 125
Kelime sayısı: 29,000
Karakter sayısı: 191,648
Gönderim Tarihi: 11-Mar-2022 12:05ÖS (UTC+0300)
Gönderim Numarası: 1781817016



9. ÖZGEÇMİŞ