

T.C
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

AKCİĞER KANSER HÜCRELERİNDEN SALINAN
EKSOZOMLARIN MAKROFAJ POLARİZASYONUNA VE
FONKSİYONLARINA ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Uzm. Biol. Başak DALKIRAN

Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANKARA
2021

T.C
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

AKCİĞER KANSER HÜCRELERİNDEN SALINAN
EKSOZOMLARIN MAKROFAJ POLARİZASYONUNA VE
FONKSİYONLARINA ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Uzm. Biol. Başak DALKIRAN

Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Hande CANPINAR

Ankara

2021

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
AKCİĞER KANSER HÜCRELERİNDEN SALINAN EKSOZOMLARIN MAKROFAJ
POLARİZASYONUNA ve FONKSİYONLARINA ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI
Başak Dalkıran
Doç. Dr. Hande Canpınar

Bu tez çalışması 12.07.2021 tarihinde jürimiz tarafından "Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi Programı" nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: *Prof. Dr. A. Lale Doğan*
Hacettepe Üniversitesi

Tez Danışmanı: *Doç. Dr. Hande Canpınar*
Hacettepe Üniversitesi

Üye: *Prof. Dr. Ayşegül Atak Yücel*
Gazi Üniversitesi

Üye: *Doç. Dr. Gürcan Günaydın*
Hacettepe Üniversitesi

Üye: *Doç. Dr. Aysun Kılıç Süloğlu*
Hacettepe Üniversitesi

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

28 Temmuz 2021

Prof. Dr. *Özgehan Orhan*

Enstitü Müdürü *V.*

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.

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. ⁽¹⁾
- X Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 6 ay ertelenmiştir. ⁽²⁾
- Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. ⁽³⁾

28 /07/2021

Başak Dalkıran

i

i“**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 **danışmanın** 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 internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulunun** gerekçeli kararı ile altı ay 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 **danışmanın** 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, Doç. Dr. Hande Canpınar danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazdığımı beyan ederim.

Başak DALKIRAN

TEŞEKKÜR

“Zafer, zafer benimdir diyebilenindir. Başarı ise başaracağım diye başlayarak sonunda başardım diyebilenindir.”

MUSTAFA KEMAL ATATÜRK

Hacettepe Üniversitesi Kanser Enstitüsü Temel Onkoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisans hayatımı tamamlayabilmem için bana fırsat sunan ve desteklerini hiçbir şekilde esirgemeyen başta saygıdeğer Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Lale Doğan olmak üzere diğer tüm öğretim üyelerimize,

Bana her koşulda destek olan, sonsuz yardımlarıyla, birbirinden değerli fikirleri ve önerileri ile bu yolculuğu başarılı bir şekilde bitirmeme vesile olan saygıdeğer tez danışmanım Doç. Dr. Hande Canpınar’a,

Yüksek lisans hayatım süresince her şekilde yardımına koşan başta Dr. M. Emre Gedik olmak üzere Ceren Narin ve diğer bölüm arkadaşlarıma,

Benim bu yolda ilerlemem için teşvik eden ve destekleyen, daha sonrasında da destekleyecek ve her koşulda yanımda olan çok kıymetli aileme,

Mental olarak beni destekleyen ve yardımına koşan, ileride de destekleyeceklerinden emin olduğum, aynı şekilde başarılı olmalarını dilediğim, çok sevgili arkadaşlarım Filiz Şahin, Cemre Ertuş, Fatih Kısak, Göksu Sarıoğlu, Rengin Türker ve Ece Alkaya’ya,

Çok teşekkür ederim.

ÖZET

Dalkıran, B., Akciğer Kanseri Hücrelerinden Salınan Eksozomların Makrofaj Polarizasyonu ve Fonksiyonlarına Etkisinin Araştırılması, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi Programı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2021. Akciğer kanseri, dünya çapında hem kadınlarda hem erkeklerde en çok ölüm oranına sahip olan kanser türünden biridir. Gelişen teknoloji ve bilgi birikimimiz ile kansere yönelik tedaviler, tümör mikroçevresi, tümör kökenli eksozomlar, tümör ilişkili makrofajlar gibi kavramları hedeflemeye yönelmiştir. Eksozomlar, tümörigenez, tümör progresyonu, metastaz, tedaviye karşı direnç gibi olayları destekleyen ve içeriklerini hücrelere aktararak tümör mikroçevresinde hücreler arası iletişimi sağlayan tümör mikroçevresinin önemli bir parçasıdır. Tümör mikroçevresinin, makrofajları eğiterek Toll Like Reseptör ya da lipopolisakkaritler ile dönüşümü desteklenen ve anti-tümör aktiviteye sahip M1 makrofaj yerine M2 fenotipine sahip tümör progresyonunu destekleyen tümör ilişkili makrofajlara dönüştürdüğünden yola çıkarak bu çalışmada eksozomların ve TLR agonistlerinin bu süreçteki etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmamızda, A549 akciğer kanseri hücrelerinden salınan eksozomlar ve TLR4 agonisti ile uyarılan A549 akciğer kanseri hücrelerinden salınan eksozomlar CD9 antikoru ile boyanarak akım sitometride analiz edilmiştir. Bu eksozomların THP-1 monositik hücre dizisinde makrofaj polarizasyonu, fagositoz kapasitesi ve hücre döngüsü üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Çalışmamızın sonuçları, her iki koşulda da elde edilen eksozomların makrofaj morfolojisini değiştirdiğini, hücrelerin adezyon ve agregasyonunu arttırdığını göstermektedir. Ayrıca sonuçlarımız, TLR4 agonisti ile uyarılan A549 akciğer kanseri hücrelerinden salınan eksozomların, M2 makrofaj fenotipine sahip popülasyonu anlamlı ölçüde azalttığı ve M1/M2 fenotip karışık bir popülasyon oluşturduğunu ve TLR4 agonisti ile uyarılan eksozomların THP-1 hücrelerinde fagositoz kapasitesi ve hücre döngüsü üzerinde anlamlı ölçüde etkisinin olmadığını göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: akciğer kanseri, eksozom, makrofaj polarizasyonu, toll like reseptör, fagositoz, hücre döngüsü

ABSTRACT

Dalkiran, B., Investigation of Lung Cancer-Derived Exosomes Effects on Macrophage Polarization and Functions, Hacettepe University Graduate School of Health Sciences Tumor Biology and Immunology Program Master of Science Thesis, Ankara, 2021. Lung cancer has the highest mortality rate in both men and women worldwide. With our developing technology and knowledge, the research of methods in cancer targeted treatments have turned to target such as tumor microenvironment, tumor-derived exosomes, tumor-associated macrophages. Exosomes are part of tumor microenvironment that promote tumorigenesis, progression, metastasis, treatment resistance and provide to communication between cells, via transfer their contents to other cells in tumor microenvironment. Considering that tumor microenvironment trains macrophages to transforms them into tumor-associated macrophage, which has M2 phenotype and promotes tumor progression, rather than M1 macrophage that has anti-tumor activity and induced by Toll Like Receptors or lipopolysaccharides, we aimed to investigate the effects of exosomes and TLR agonists in this process. In our study, isolated exosomes derived from A549 lung cancer cells and exosomes derived from stimulated A549 lung cancer cells with TLR4 agonist were stained with CD9 antibody and analyzed by flow cytometry. Effects of these exosomes, on macrophage polarization, phagocytosis activity and cell cycle in THP-1 monocytic cell line were investigated. Our results demonstrated that exosomes, which isolated from both conditions, change macrophage morphology and increase the adhesion and aggregation of cells. Also our results showed that exosomes derived from stimulated A549 lung cancer cells with TLR4 agonist, significantly decreased M2 phenotype transformation and created M1/M2 mixed population. In addition, exosomes derived from stimulated A549 lung cancer cells with TLR4 agonist, do not have significant effects on phagocytosis or cell cycle of THP-1 cell lines.

Key words: lung cancer, exosomes, macrophage polarization, toll like receptor, phagocytosis, cell cycle

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN SAYFASI	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
ŞEKİLLER	xv
TABLolar	xviii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Akciğer Kanseri	3
2.1.1. Akciğer Kanserinin Moleküler Epidemiyolojisi	4
2.1.2. Akciğer Kanseri ve Tümör Mikroçevresi	5
2.2. Eksozom	7
2.2.1. Eksozomların Kanserdeki Rolü	8
2.3. Makrofaj	11
2.3.1. Makrofaj Polarizasyonu	12
2.3.2. Tümör İlişkili Makrofajlar	13
2.4. Toll Like Reseptörler	16
2.4.1. TLR'nin yapısı, Fonksiyonu ve Sinyal İletimi	18

2.4.2. TLR ve Kanser İlişkisi	19
2.4.3. TLR ve Akciğer Kanseri	20
3. GEREÇ VE YÖNTEM	23
3.1. Çalışmada Kullanılan Materyaller	23
3.2. Hücre Kültürü	24
3.3. Mikoplazma Testi	25
3.4. A549 Akciğer Kanseri Hücrelerinden Eksozom İzolasyonu	25
3.5. TLR4 Agonisti ile Uyarılan A549 Akciğer Kanseri Hücre Dizisinden Eksozom İzolasyonu	26
3.6. THP-1 Hücrelerinde Makrofaj Polarizasyonunun Akım Sitometri Yöntemi ile Belirlenmesi	27
3.7. THP-1 Hücrelerinde Fagositoz Aktivitesinin Akım Sitometri Yöntemi ile Değerlendirilmesi	27
3.8. THP-1 Hücrelerinde Hücre Döngüsünün Akım Sitometri Yöntemi ile Değerlendirilmesi	28
3.9. İstatistiksel Analizler	28
4. BULGULAR	29
4.1. Mikoplazma Testi	29
4.2. Akciğer Kanseri Hücrelerinden Elde Edilen Eksozomların THP-1 Monositik Hücrelerinin Morfolojisi Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi	30
4.3. A549 Akciğer Kanseri Hücrelerinden Elde Edilen Eksozomların Akım Sitometri ile Değerlendirilmesi	33
4.4. A549 Akciğer Kanseri Hücrelerinden Salınan Eksozomların THP-1 Hücrelerinde Makrofaj Polarizasyonuna Olan Etkilerinin Değerlendirilmesi	35

4.5. A549 Akciğer Kanseri Hücrelerinden Salınan Eksozomların THP-1 Hücrelerinde Fagositoz Aktivitesine Olan Etkisinin Değerlendirilmesi	45
4.6. A549 Akciğer Kanseri Hücrelerinden Salınan Eksozomların THP-1 Hücrelerinde Hücre Döngüsü Üzerindeki Etkisinin Değerlendirilmesi	48
5. TARTIŞMA	51
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	59
7. KAYNAKLAR	61
8. EKLER	
EK-1: Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul İzinleri	
EK-2: Tez Çalışması Orijinallik Raporu	
9. ÖZGEÇMİŞ	75

SİMGELER VE KISALTMALAR

APC	Antijen Sunan Hücre
CAF	Kanser İlişkili Fibroblast
CCL2	C-C Motifli Kemokin Ligandı 2
CCL5	C-C Motifli Kemokin Ligandı 5
CCL22	C-C Motifli Kemokin Ligandı 22
COP I	Coat Protein I
COP II	Coat Protein I
COX-2	Siklooksijenaz 2
CSC	Kanser Kök Hücresi
CTL	Sitotoksik T hücre
CTLA4	Sitotoksik T hücre ilişkili protein 4
CXCL 1	C X C Motifli Kemokin Ligand 1
CXCL 8	C X C Motifli Kemokin Ligand 8
CXCL 12	C X C Motifli Kemokin Ligand 12
CXCL 18	C X C Motifli Kemokin Ligand 18
CYP1A	Sitokrom P450 1A
DC	Dendritik Hücre
DDIT4	DNA Hasarı ile İndüklenen Transkript 4
dsRNA	Çift Sarmal RNA
EGF	Epidermal Büyüme Faktörü
EGFR	Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
EMT	Epitelyal-Mezenkimal Dönüşüm
ERK	Ekstraselüler sinyal düzenleyici kinaz
EV	Ekstraselüler vezikül
FGF	Fibroblast Büyüme Faktörü
GTPaz	Guanozin Trifosfat Hidrolaz
HER2	İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü 2
HGF	Hepatosit Büyüme Faktörü
HIF 1α	Hipoksi ile İndüklenebilir Faktörü 1 α
HIF 2α	Hipoksi ile İndüklenebilir Faktörü 2 α

HLOD	Heterojenlik Lodu
HSP70	Heat Shock Protein 70
IFN-β	İnterferon β
IFN-γ	İnterferon γ
IL-1	İnterlökin 1
IL-3	İnterlökin 3
IL-4	İnterlökin 4
IL-6	İnterlökin 6
IL-8	İnterlökin 8
IL-10	İnterlökin 10
IL-12	İnterlökin 12
IL-13	İnterlökin 13
IRAK2	İnterlökin 1 İlişkili Kinaz 2
IRAK4	İnterlökin 1 İlişkili Kinaz 4
IRF	İnterferon Düzenleyici Faktör
IRF3	İnterferon Düzenleyici Faktör
IRF8	İnterferon Düzenleyici Faktör
K-ras	Kirsten Sarkoma
LPS	Lipopolisakkarit
LRR	Lösinden Zengin Tekrar Bölgeleri
MAPK	Mitojenle İlişkili Protein Kinaz
MHC	Majör Histokompabilite Kompleksleri
miRNA	MikroRNA
MKNK1	MAP Kinaz ile Aktive Edilmiş Protein Kinaz
MMP	Matriks Metalloproteinaz
MSC	Mezenkimal Kök Hücre
mTOR	Memeli-Rapamisin Moleküler Hedefi
MV	Multiveziküller
MyD88	Myeloid Differensiyasyon Faktör 88
NK	Doğal Öldürücü Hücre
NSCLC	Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri

PAH	Polisiklik Aromatik Hidrokarbon
PAMP	Patojen İlişkili Moleküler Patern
PD-1	Programlı Hücre Ölümü 1
PDGF	Platellet Kökenli Büyüme Faktörü
PD-L1	Programlı Hücre Ölümü Ligandı 1
PGE2	Prostaglandin E2
PRR	Patern Tanıma Reseptörleri
S100A8	S100 Kalsiyum Bağlayıcı Protein A8
S100A9	S100 Kalsiyum Bağlayıcı Protein A9
SAA3	Serum Amiloid A3
SCLC	Küçük Hücreli Akciğer Kanseri
SNARE	N-etilmaleimide Duyarlı Faktör Bağlanma Protein Reseptörleri
STAT	Sinyal Dönüştürücüleri ve Transkripsiyon
STAT 3	Sinyal Dönüştürücü ve Transkripsiyon 3 Aktivatörü
STAT 5	Sinyal Dönüştürücü ve Transkripsiyon 5 Aktivatörü
TAM	Tümör İlişkili Makrofaj
Th1	Yardımcı T Hücre 1
Th2	Yardımcı T Hücre 2
TIL	Tümör İnfiltrate Eden Lenfositler
TIR	İntraselüler Toll/ İnterlökin 1 Reseptör
TIRAP	TIR İlişkili Protein
TGF-α	Dönüştürücü Büyüme Faktörü α
TGF-β	Dönüştürücü Büyüme Faktörü β
TLR	Toll Like Reseptör
TME	Tümör Mikroçevresi
TNF-α	Tümör Nekroz Faktörü α
TRAM	TRIF ile ilişkili adaptör molekül
Treg	Regülatör T Hücre
TRIF	IFN-beta İndükleyen Adaptör Proteini
VEGF	Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü
ZO-1	Sıkı Bağlantı Proteini 1

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Akciğer kanserinin karsinogenezi	4
2.2. Eksozomların genel yapısı	7
2.3. Eksozom izolasyon yöntemleri ve kanserdeki temel rolleri	10
2.4. Eksozomların akciğer kanseri karsinogenezindeki rolü	11
2.5. Tümör İlişki Makrofajların kanserdeki rolü	15
2.6. TLR ifade eden immün hücreler	18
2.7. Akciğer kanserinde TLR aracılı metastaz	22
3.1. Eksozom izolasyonu	26
4.1. A549 hücre dizisi Mikoplazma testi görüntüsü	29
4.2. THP-1 hücre dizisi Mikoplazma testi görüntüsü	29
4.3. A549 akciğer kanseri hücre dizisinin ışık mikroskobu altında 1/100 oranında büyütülmüş görüntüsü	31
4.4. THP-1 monositik hücre dizisinin ışık mikroskobu altında 1/100 oranında büyütülmüş görüntüsü	31
4.5. A549 akciğer kanseri hücrelerinden salınan eksozomlarla birlikte kültüre alınmış THP-1 hücrelerinin ışık mikroskobu altında 1/100 oranında büyütülmüş görüntüsü	32
4.6. TLR4 agonisti ile uyarılan A549 akciğer kanseri hücrelerinden salınan eksozomlarla birlikte kültüre alınmış THP-1 hücrelerinin ışık mikroskobu altında 1/100 oranında büyütülmüş görüntüsü	32
4.7. PMA ile uyarılan THP-1 insan monositik hücre dizisinin ışık mikroskobu altında 1/10 büyütülmüş görüntüsü	33

- 4.8.** A549 akciğer kanseri hücre dizisinde sırasıyla 5×10^6 ve 15×10^6 yoğunluktaki hücrelerden elde edilen eksozomların akım sitometri analizi histogramları 34
- 4.9.** TLR4 agonisti ile uyarılan A549 akciğer kanseri hücre dizisinde sırasıyla 5×10^6 ve 15×10^6 yoğunluktaki hücrelerden elde edilen eksozomların akım sitometri analizi histogramları 35
- 4.10.** Farklı koşullarda THP-1 hücrelerinde M1 ve M2 fenotipli makrofaj dağılımı 37
- 4.11.** M0 makrofaj fenotipinin akım sitometri analizi histogramları 37
- 4.12.** M0 makrofaj fenotipi belirteçlerinin 38
- 4.13.** Akciğer kanseri hücrelerinden salınan eksozom varlığında THP-1 hücrelerinde M1 ve M2 belirteçlerinin grafik olarak dağılımı 40
- 4.14.** Akciğer kanseri hücrelerinden salınan eksozom varlığında THP-1 Hücrelerinde M1 ve M2 belirteçlerinin akım sitometri histogramları 40-41
- 4.15.** TLR4 agonisti ile uyarılan akciğer kanseri hücrelerinden salınan eksozom varlığında M1 ve M2 belirteçlerinin grafik olarak dağılımı 42
- 4.16.** TLR4 agonisti ile uyarılan akciğer kanseri hücrelerinden salınan eksozom varlığında M1 ve M2 belirteçlerinin akım sitometri histogramları 42-43
- 4.17.** PMA içeren THP-1 hücrelerinde M1 ve M2 makrofaj belirteçlerinin

grafik olarak dağılımı	44
4.18. PMA içeren THP-1 hücrelerinde M1 ve M2 makrofaj belirteçlerinin akım sitometri histogramları	44-45
4.19. Akciğer kanseri hücrelerinden salınan eksozomlarla kültüre alınan THP-1 hücrelerinde fagositoz kapasitesinin akım sitometri histogramı	46
4.20. TLR4 agonisti ile uyarılan akciğer kanseri hücrelerinden salınan eksozomlarla kültüre alınan THP-1 hücrelerinde fagositoz kapasitesinin akım sitometri histogramı	47
4.21. PMA içeren THP-1 hücrelerinde fagositoz kapasitesinin akım sitometri histogramı	47
4.22. PMA, eksozom ve TLR4 agonisti+eksozom varlığındaki THP-1 hücrelerinin fagositoz aktivite kapasitelerinin grafik olarak dağılımı	48
4.23. PMA içeren THP-1 hücrelerinin hücre döngüsü dağılımını gösteren akım sitometri histogramı	49
4.24. Akciğer kanseri hücrelerinden salınan eksozomlar varlığında THP-1 hücrelerinin hücre döngüsü dağılımını gösteren akım sitometri histogramı	50
4.25. TL4 agonisti ile uyarılan akciğer kanserinden salınan eksozomlar varlığında THP-1 hücrelerinin hücre döngüsü dağılımını gösteren akım sitometri histogramı	50
4.26. Farklı koşulların THP-1 hücrelerinde hücre döngüsündeki faz dağılımını gösteren grafik	51

TABLULAR

Tablo	Sayfa
2.1. Akciğer kanserinde en sık görülen gen mutasyonları	5
2.2. Toll Like Reseptör agonistleri	17
4.1. A549 akciğer kanseri hücrelerinden salınan eksozomlarda ortalama CD9 ekspresyonu yüzdesi	34
4.2. Farklı koşullarda THP-1 hücrelerinde M1 ve M2 makrofaj belirteçlerinin dağılımı	39
4.3. PMA, eksozom ve TLR4 agonisti+eksozom varlığındaki THP-1 hücrelerinin fagositoz aktivite kapasiteleri	48
4.4. Farklı koşullarda THP-1 hücrelerinde hücre döngüsü dağılımı	51

1. GİRİŞ

Akciğer kanseri, dünya genelinde düşük sağkalıma sahip olması nedeniyle kanser sebepli ölümlerde en yüksek yüzdeye sahip kanser türüdür. Hastaların çoğunda tümör ileri evrelerde ortaya çıkmaktadır bu da tedavi imkanını zorlaştırmaktadır. Günümüzde artık akciğer kanserinin karsinogenezinde yer alan molekül hedefli tedaviler geliştirilmeye çalışılmaktadır (1,2).

Son zamanlarda molekül hedefli tedavilerde en çok araştırılan moleküller eksozomlardır. Eksozomlar boyutları 30-200 nm arasında değişen içeriklerinde protein, lipid, nükleik asit gibi moleküller barındıran veziküllerdir (3). Eksozomlarla ilgili yapılan araştırmalarda eksozomların hücreler arası molekül taşıyarak yeni hücre-hücre iletişim aracı olabileceği ön görülmektedir (4). Bunlara ek olarak eksozomlar tümörigenez, progresyon, tedavi yanıtı gibi olayları etkileyen tümör mikroçevresinin önemli bir parçasıdır ve eksozomların bazı içerikleri kanser hücreleri arasında ya da tümör mikroçevresiyle ilişkili hücreler ile kanser hücreleri arasında mediatör olarak görev yapmaktadır (5).

Son zamanlarda farklı kanser türlerinde yapılmış çalışmalardan elde edilen bilgilerle tümör hücrelerinden köken alan eksozomların içerdikleri moleküller yardımıyla çeşitli yolakları upregüle ve downregüle ederek makrofajları tümör mikroçevresinde Tümör İlişkili Makrofajlar (TAM) adı verilen anjiyojenik faktörler salgılayan, tümör büyümesine ve metastazına yardım eden M2 fenotipli makrofajlara farklılaşması sağladığı görülmüştür (6-9). Makrofajlar bağışıklık yanıtına polarize olarak tepki verirler. M2 benzeri Tümör İlişkili Makrofajlar adı verilen bu tip makrofajlar interlökin-10 (IL-10), dönüştürücü büyüme faktörü β (TGF- β) üreterek tümöre karşı immün yanıtı baskılar buna karşılık M1 fenotipli makrofajlar, interlökin-12 (IL-12) üretimini destekleyerek tümöre karşı yanıt oluşmasını sağlar (10). Bütün bu bilgilere ek olarak pattern tanıma reseptörler olan Toll Like Reseptör (TLR) agonistlerinin de M1 fenotipli makrofajları indüklediği bilinmektedir. M1 makrofajlar yardımcı T hücre 1 (Th1) yanıtına destek olarak patojenin yok edilmesine yardım ederler (11). Bu sebeple TAM'ların kontrolü ve düzenlenmesine yönelik yeni tedavi

yaklaşımı içinde TLR agonistlerinin kullanımı yer alma potansiyeli taşımaktadır (12–14).

Bu bilgiler ışığında bu tez çalışmasında TLR agonistleri ile uyarılan tümör hücrelerinde salınan çözüner faktörlerin tümör mikroçevresindeki makrofaj polarizasyonunun pro-inflamatuar M1 fenotipinde gelişerek tümöre karşı yanıtı arttıracığı düşünülmüştür. Bu tez çalışmasında akciğer kanseri hücrelerinden salınan eksozomlar ve TLR4 agonisti ile uyarılan akciğer kanseri hücrelerinden salınan eksozomların makrofaj polarizasyonu, fagositoz fonksiyonları ve hücre döngüsü üzerindeki etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Akciğer Kanseri

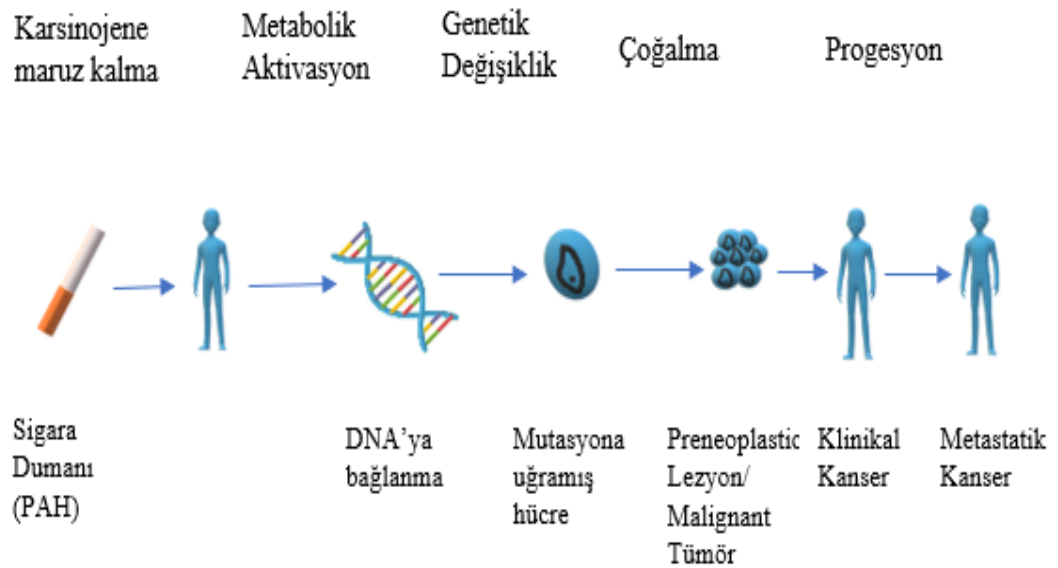
Akciğer kanseri, dünya genelinde kanser nedeniyle görülen ölümlerin en yaygın sebeplerinden biridir (15) . 2018 yılı verilerine göre 2,09 milyon insan akciğer kanseri tanısı alırken 1,76 milyon insan akciğer kanseri sebebiyle hayatını kaybetmiştir. Akciğer kanseri her ne kadar erkeklerde kadınlara oranla daha fazla görülse de son zamanlarda kadınlarda görülme oranı ve ölüm oranı da artmıştır. Erkeklerde prostat kanserinden sonra en çok görülen ikinci, kadınlarda ise meme kanserinden sonra en çok görülen ikinci kanser türü olarak yer almaktadır. Kanser kadınlarda görülme sıklığının ve ölüm oranının erkeklere göre daha az olmasının sebepleri arasında kadınların erkeklere oranla kadınlara daha erken yaşta teşhis konulması ve kanserin daha çok adenokarsinom olarak görülmesi gösterilmektedir (16,17).

Akciğer kanserinin görülmesinde sigara kullanımı en büyük etkeni oluşturmaktadır. Sigara kullanımı skuamöz hücre karsinomu ve küçük hücreli akciğer kanserinde (SCLC) daha güçlü bir etki göstermektedir. Bu bilgilere ek olarak asbest, silika, ağır metaller ve fosil yakıtların yakılması sonucu havada asılı kalan polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH) gibi partiküllerin uzun süre solunması sigara içmeyen kişiler için büyük risk kaynağıdır. Ayrıca, yapılan bir çalışmada yemek pişirme ya da ısınmak için odun veya kömürün kullanıldığı alanlarda evlerin havalandırılmasının akciğer kanseri riskini %50 azaltabileceği bulunmuştur (1,18).

Bu etkenlerin dışında genetik yatkınlık da kanser riskini belirlemektedir. Sigara içenlerin yalnız %15'i akciğer kanseri oluştururken %10 gibi bir oran sigara içmeyenlerde görülmektedir. Sigara içmeyenlerde akciğer kanseri oluşturma çoğunlukla nadir olarak yüksek miktarda heterojenlik lodu (HLOD)'nun 6q kromozomuna bağlanması ile, yaygın olarak 15q kromozomu akciğer kanseri riski ile ilişkilidir. 15q kromozomu CHRNA3, CHRNA5 ve CHRNA4 alt birimlerinden oluşan nöronal nikotinik asetilkolin reseptörü gen kümesinden oluşur. Buradaki genetik bir varyasyon artan akciğer kanseri ile ilişkilendirilmektedir (19).

2.1.1.Akciğer Kanserinin Moleküler Epidemiyolojisi

PAH, bazı aromatik ve heterosiklik aminler gibi karsinojenlerin DNA'ya bağlanarak nokta mutasyonları, translokasyonlar ve amplifikasyonlar aracılığıyla onkogen aktivasyonu yaptığı bilinmektedir (Şekil 2.1). Akciğer kanseri de diğer kanser türleri gibi intra-tümoral heterojenite ile sonuçlanan farklı moleküler özelliklere sahip alt hücre popülasyonlarından veya klonlardan oluşur. Yapılan araştırmalara göre akciğer kanserinde en çok rastlanan mutasyonlar insan epidermal büyüme faktörü 2 (HER2), Kirsten sarkoma (*K-ras*) ve epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) genlerinde meydana gelen mutasyonlardır (Tablo 2.1). Tümör hücrelerinde epidermal büyüme faktörü (EGF) ya da dönüştürücü büyüme faktörü- α (TGF- α)'nın fazla salgılanması EGFR ekspresyonunu arttırmaktadır ve yüksek TGF- α ise hastalığın kötü prognozu ile ilişkilidir. Bu mutasyonların dışında *myc* ailesi onkogenlerinin amplifiye olmasıyla başka büyüme faktörlerinin uyarıldığı ve tümör progresyonunun ilerlemesi arasında ilişki olduğu görülmektedir (15,20).



Şekil 2.1. Akciğer kanserinin karsinogenezi.

Akciğer kanseri ile yakından ilişkili olan sigaradaki karsinojenlerin oksidasyonundan sorumlu P450 sitokrom enzimleri cyp ailesi genleri tarafından

kodlanmaktadır ve literatürde sitokrom P450 1A 1 (CYP1A1) poliformizmlerinin sigara kullanımında akciğer kanseri ile ilişkili olduğu bilgisi yer almaktadır (21).

Tablo 2.1. Akciğer kanserinde en sık görülen gen mutasyonları. (IARC (1)'den alınmıştır.)

Alt Tip	Sıklıkla Görülen Mutasyonlar
Adenokarsinom in situ	EGFR
Asiner	EGFR
Solid adenokarsinom	KRAS
Papiller	EGFR
Mikropapiller	HER2
Müsinöz	KRAS

*Adenokarsinomların çoğu birçok alt tipi aynı anda barındırır.

2.1.2. Akciğer Kanseri ve Tümör Mikroçevresi

Tümör Mikroçevresi (TME), tümörün insan sisteminde bulunduğu hücresel ortamdır. Kan damarlarını, fibroblastları, bağışıklığa katkıda bulunan hücreleri, kemik iliğinden köken alan inflamatuvar hücreleri, lenfositleri, sinyal iletimini ve hücre dışı matrisi içermektedir. Tümör, hücre dışı sinyaller salarak mikroçevre ile etkileşime girmekte ve tümör anjiyogenezini desteklemektedir. Ayrıca, tümör mikroçevresindeki

immün hücreler, diğer hücrelerle etkileşime girerek tümör büyümesini ve hücrelerin metastazını indüklemektedir (22).

Tümör mikroçevresinde yaygın olarak bulunan kanser ilişkili fibroblastların (CAF), akciğer kanserinde tümör gelişimini, tümör büyümesi veya ilaç yanıtını düzenlemek gibi yollar aracılığıyla lokal invazyonu, pro-metastatik faktörler salgılayarak da metastazı desteklediği bilinmektedir (23). Tümör mikroçevresinde bulunan mezenkimal kök hücrelerin (MSC), platelet kökenli büyüme faktörü (PDGF), fibroblast büyüme faktörü 2 (FGF-2), fibroblast büyüme faktörü 6 (FGF-6), interlökin 6 (IL-6), interlökin 8 (IL-8), vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ve angiopietin-1 gibi anjiyojenik faktörlerin salınmasında görevli olduğu yapılan çalışmalar aracılığıyla gösterilmektedir. Ayrıca, MSC'ler akciğer kanserinde dendritik hücre olgunlaşmasını, T hücre proliferasyonunu ve doğal öldürücü hücre (NK), B hücre aktivasyonunu baskılayarak immünsüpresif yanıtlar oluşturmaktadır (23).

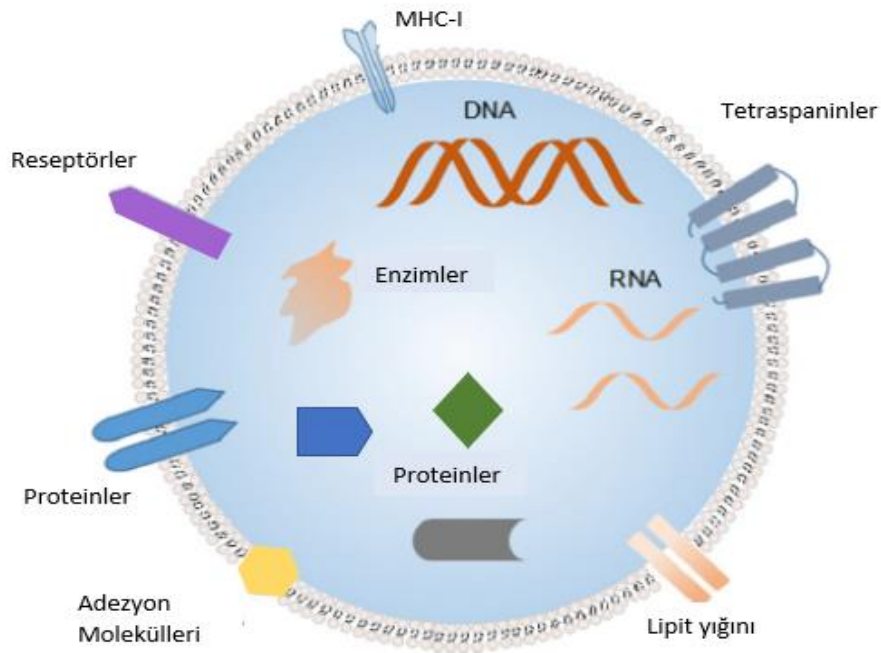
Bilindiği üzere hipoksi, akciğer kanseri gibi solid tümörlerde, tümör progresyonunu ve tedaviye direnci arttırmaktadır. Hipoksinin etkileri genel olarak hipoksi ile indüklenebilir faktörler 1- α ve 2- α (HIF1- α ve HIF2- α) aracılığı ile anjiyogenezi, sağkalımı ve kemoterapötik ilaçlara karşı direnci destekleyerek gerçekleşmektedir. Hipoksik mikroçevre, tümörlerde kanser kök hücrelerinin (CSC'ler) kalıcılığını destekleyen önemli bir kök hücre nişidir. Akciğer kanserinde hipoksinin, ilaca karşı dirençli EGFR mutasyonu barındıran akciğer CSC'lerinin popülasyonunu arttırdığı bilinmektedir (24).

Tümörü infiltre eden lenfositler (TIL'ler) sıklıkla TME'de bulunur ve tümöre karşı bir bağışıklık tepkisi olduğu bilinmektedir. TIL'lerin dışında regülatör T hücreleri (Treg) de bulunmaktadır. Treg'lerin kanserde, efektör T hücreleri baskıladığı bilinmektedir (24). VEGF-A, TGF β ve tümör nekroz faktörü- α (TNF- α) dahil olmak üzere tümör tarafından salgılanan faktörler, akciğer endotel hücreleri tarafından S100 kalsiyum bağlayıcı protein A8 (S100A8) ve tarafından S100 kalsiyum bağlayıcı protein A9 (S100A9) gibi kemoatraktan maddelerin ekspresyonunu indükler ve serum amiloid A3 (SAA3) aracılığı ile tümör hücrelerinin premetastatik bölgelerde bulunmasını kolaylaştırır. SAA3 ise, makrofajlarda TLR4 aracılığıyla nükleer faktör kappa B (NF- κ B) sinyalini uyarmakta ve metastazı kolaylaştırmaktadır (24).

TME'deki kritik hüresel ve moleküler yolların tanımlanması, kanserin savunmasız taraflarını yakalamak için potansiyel stratejiler sağlamaktadır. Bu nedenle, TME bileşenlerini hedefleyen ilaçlar klinik deneylerde araştırılmaktadır (25) .

2.2. Eksozom

Eksozomlar, boyutları 30-200 nm arasında değişen lipitler, proteinler, DNA ve RNA gibi nükleik asitler içeren çift tabakalı, CD9, CD63, CD81, CD82 transmembran proteinleri ve Majör Histokompatibilite Kompleksi (MHC) barındıran ekstraselüler veziküller (EV) ailesine aittir (Şekil 2.2.) (26,27) . Eksozomlar, hemen hemen her memeli hücresi tarafından salınırlar. Dendritik hücre, makrofajlar, lenfositler ve çeşitli tümör hücreleri tarafından salınan eksozomlar, immünolojik olarak aktiflerdir (28).



Şekil 2.2. Eksozomların genel yapısı. (Bu ve ark. (26)'dan uyarlanmıştır.)

Eksozomlar, multiveziküler cisimlerin (MVB) bir formu olan geç endozomlardan meydana gelirler. Bazı MVB'ler parçalanmak için lizozomlara ilerlerken bazıları hücre membranıyla birleşerek hücre dışına vezikül bırakırlar. Bu mekanizma, klatrin, coat proteini kompleksi I ve II (COPI ve II), çözünür N-etilmaleimide duyarlı faktör bağlanma protein reseptörleri (SNARE'ler) ve guanozin

trifosfat hidrolazlar (GTPaz) gibi birçok proteini içerir. Bu MVB'lerden oluşan eksozomların görevleri köken aldıkları yere göre değişmektedir. Başlıca görevleri içeriklerini başka hücelere aktararak hücre-hücre iletişiminin sağlanması iken immün hücrelerden köken alanlar patojenlere karşı adaptif immün cevaba aracılık eder, kanser kökenli olanlar ise karsinogenez, metastaz, tedaviye yanıt, onkogenlerin, mikroRNA (miRNA)'ların kanser hücreleri arasında transferini sağlar (29,30) .

2.2.1. Eksozomların Kanserdeki Rolü

Literatürdeki birçok çalışmada eksozomların, proliferasyon, metastaz, ilaç direnci gibi malignan biyolojik fenotipin düzenlenmesinde önemli ölçüde yer aldığı gösterilmektedir. Bu çok işlevli veziküllerin, doğrudan ya da dolaylı olarak baskılayıcı proteinleri immün hücelere ileterek, immün hücrelerin matürasyonunu ve anti-tümör aktivitelerini etkilemekte ve hedef genlerin ifade edilmesi, tümör mikroçevresi ile tümör hücreleri arasında transmiseyona aracılık eden reseptör hücrelerin hücre transformasyonu, sinyal yollarının düzenlenmesini sağladığı bilinmektedir. Bu bilgilere ek olarak veziküllerin üzerinde yüksek miktarda bulunan tetraspaninlerin (CD9, CD82 vb.) integrinlerle etkileşime girdiklerinde kanser hücrelerinin invazyon ve migrasyonunu inhibe edebilecekleri *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarla kanıtlanmıştır (31,32).

Bilindiği üzere epitelyal-mezenkimal dönüşüm (EMT) hücrelerin migrasyonu için önemli bir adımdır. Bu süreçte E-kaderin miktarı azalır, N-kaderin ya da vimentin miktarı artar ve bu süreç TGF- β , Wnt proteinleri, EGF, hepatosit büyüme faktörü (HGF), matriks metalloproteinaz (MMP) aracılığıyla indüklenebilir. Son yapılmış çalışmalarda eksozomların EMT sürecinde önemli bir rol oynadıkları gösterilmiştir. Çeşitli kanser türlerinde yapılmış çalışmalarda kanser kökenli eksozomların TGF- β 1 yolağı aracılığıyla E-kaderin ve β -katenin ekspresyonunu azaltarak, Vimentin, Snail, Twist ekspresyonlarını arttırdığı gözlemlenmiştir. Ayrıca, eksozomal miRNA'ların TGF- β 1 E-kaderin sentezini inhibe ederek EMT sürecini desteklediği de önemli bulgular arasındadır. Çalışmalar derinleştikçe kanser kökenli eksozomların, kanser invazyonunu desteklemekten sorumlu MMP-2'yi aktive ettikleri ve aynı şekilde eksozomal miRNA aracılığıyla MMP-2, MMP-9, MMP-13 gibi hücre migrasyon ve

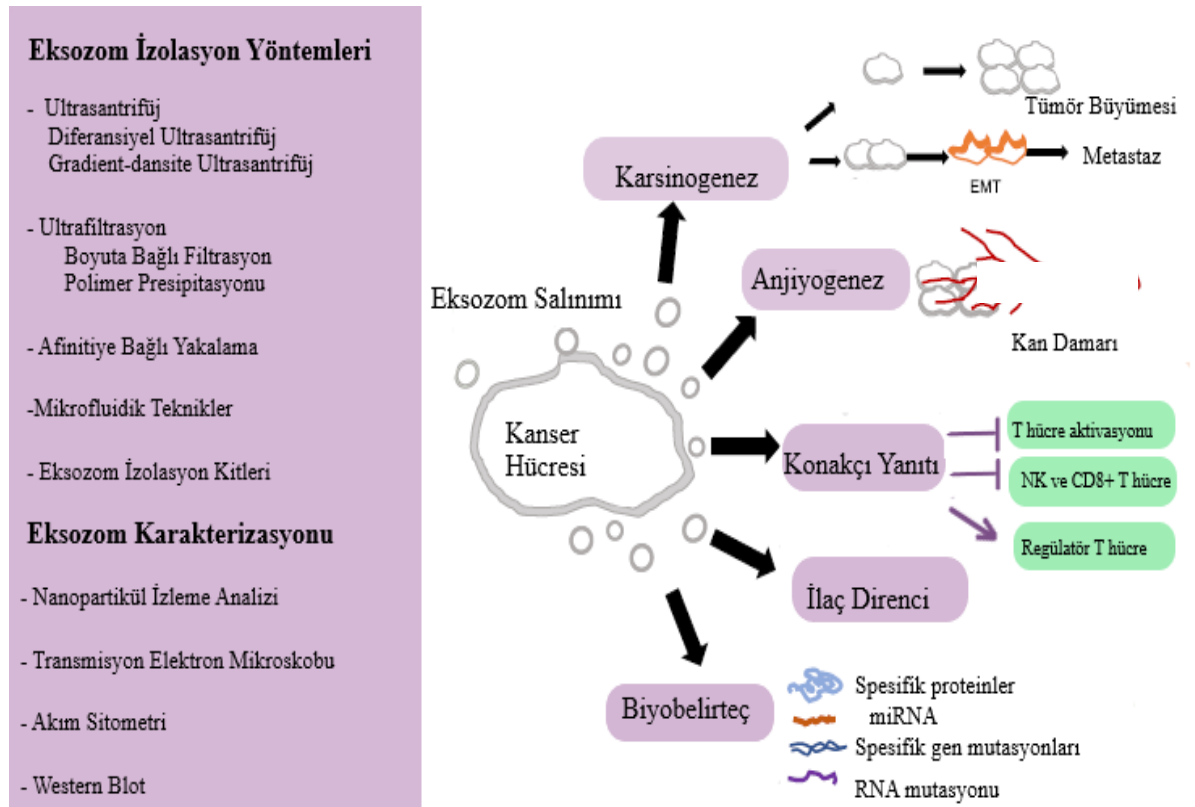
invazyonunu destekleyen proteinlerin aktivasyonunu gerçekleştirdikleri gösterilmiştir (33–36).

Tümör hücreleri, büyümek için gerekli olan içeriklere anjiyogenez (kan damarlarının neovasküler forma dönüşmesi) ile ulaşırlar. Eksozomlarla ilgili yapılan çalışmalarda, eksozomların tümör anjiyogenezini desteklediği gösterilmektedir. Kanser hücrelerinden köken alan eksozomların içinde bulunan miR-105, miR-23a gibi eksozomal miRNA'lar sıkı bağlantı protein 1 (ZO-1)'i downregüle ederek neovaskülarizasyonu destekler ya da farklı miRNA'lar aracılığıyla anjiyojenik faktörlerin salınmasını kolaylaştırırlar. Bu bilgiler kapsamında, kanser kökenli eksozomların anjiyogenezi anjiyojenik proteinlerin eksozomal miRNAlar transferi aracılığıyla kolaylaştırdığı ve yeni metastatik niş olabilecekleri ön görülmektedir (31,37,38).

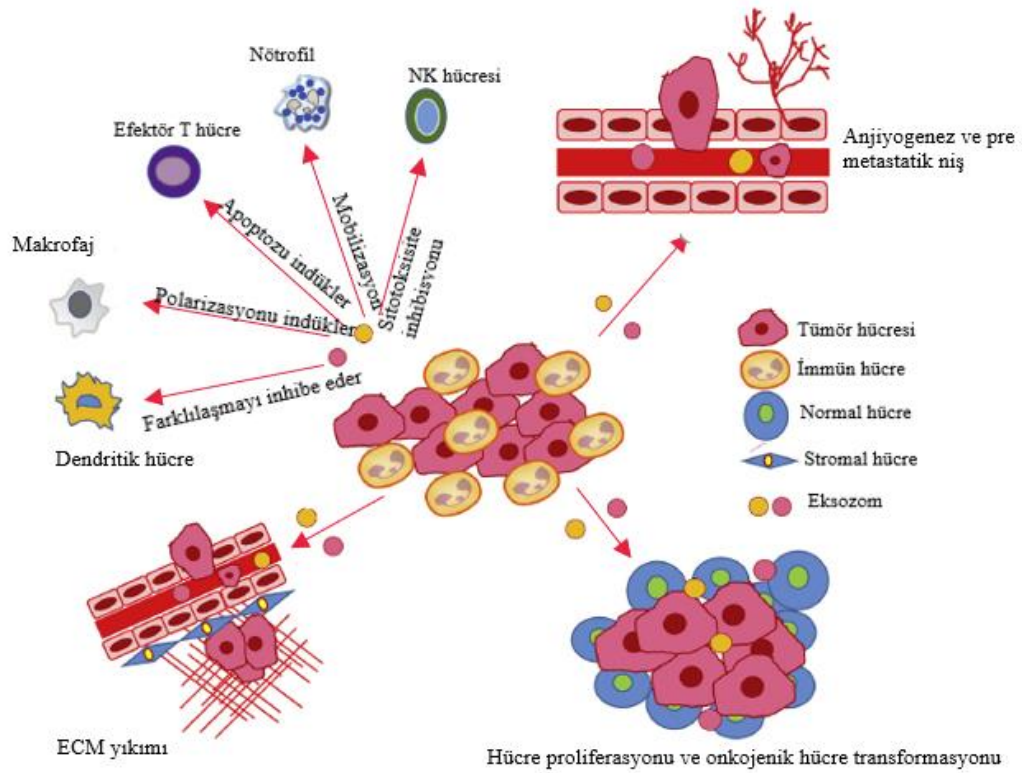
Akciğer kanserinde yapılmış modellerde, tümör kökenli eksozomların makrofajlara aktif EGFR taşıyıp, interferon düzenleyici faktör (IRF3) baskılanması ve tip I interferon ekspresyonu ile sonuçlandığı görülmüştür(39). Aynı şekilde akciğer kanseri ile yapılmış modellerde tümör kökenli eksozomlarda bulunan miRNA'ların makrofajlarda TLR transkripsiyonunu susturup, makrofajlardan pro-inflamatuar sitokinlerin salınmasını uyararak tümörün yayılmasını desteklediği görülmüştür. Tümör kökenli eksozomlar T hücre aktivasyonunu baskılama yeteneği olan olgunlaşmamış myeloid hücrelerini TLR2 aracılığıyla aktive ederek sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü 3 (STAT3) yolağının aktivasyonuna ve IL-6 üretimine yol açmaktadır. Bazı tümör kökenli eksozomların ise Fas ligand ekspresyonu ile CD8+ T hücrelerde apoptozu indükleyerek immün yanıtı baskılayıcı etki uyguladıkları gösterilmektedir. Aynı şekilde kanser hücreleri, Treg hücrelerinin çoğalmasını uyararak eksozomları serbest bırakarak tümör mikroçevresinde immün yanıtı baskılayıcı etkide bulunurlar (40,41). Bu bilgiler dışında tümör kökenli eksozomların normal NK hücrelerinin sitolitik aktivitesini azalttığı ve tümör kökenli eksozom ilişkili TGF- β 1 aracılığıyla malignitelere NK hücrelerinin fonksiyonlarında bozukluğa yol açtığı bilinmektedir (42).

Akciğer kanseri ile çalışılmış bir modelde, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (NSCLC) hastalarında eksozomal protein miktarının sağlıklı kişilere oranla

daha fazla olup, ekspresyon miktarının da tümör metastazıyla ilişkili olduğu gösterilmektedir (43). Akciğer kanserinden köken alan eksozomların siklooksijenaz 2 (COX-2)'yi indükleyip prostaglandin E2 (PGE2), VEGF üretimine ve tümör mikroçevresinde ise COX-2 aracılı inflamatuvar yanıtlara neden oldukları bilinmektedir (44). Eksozomların yüksek stabiliteyi, ürün ve kandan kolayca toplanabilme özellikleri ile likit biyopside önemli bir adım olacağı çeşitli eksozomal protein ve miRNA içermeleri ile de kanser tanısında potansiyel biyobelirteç olabilecekleri düşünülmektedir (Şekil 2.3). Akciğer kanserindeki araştırmalar günümüzde hala devam etmektedir (27). Akciğer kanserinde eksozomlar içeriklerini alıcı hücrelere aktararak kanser hücrelerinin büyümesi için gerekli mikroçevreyi hazırlar, tümör progresyonunu ve metastazını destekler, immün yanıtı etkiler (Şekil 2.4) (45).



Şekil 2.3. Eksozom izolasyon yöntemleri ve kanserdeki temel rolleri. (Li ve ark. (44)'dan alınmıştır)



Şekil 2.4. Eksozomların akciğer kanseri karsinogenezindeki rolü. (Zhou ve ark. (45)'dan uyarlanmıştır.

2.3. Makrofaj

Monositler dokuya girdiklerinde olgunlaşarak oldukça çeşitli makrofaj türlerine dönüşürler (46). Makrofajlar, en çok fagositoz yapabilme yetenekleriyle bilinirler (47). Makrofajlar, mikroplar gibi patojenlere karşı savunmada, ölü hücreler ve kalıntıların atılarak homeostazın sağlanmasında ve doku onarımında görevlidir. Bununla birlikte, makrofajlar, T hücrelerine antijen sunma ve hücre aracılı bağışıklık için efektör olarak görev görürler (48). Makrofajlar homojen değildir ve mikroçevreye göre belirli işlevleri yerine getiren karaciğerde Kupffer hücreleri ve beyinde mikroglial hücreler gibi değişken karışık popülasyonlardan oluşur (49). Makrofajlar, iki şekilde aktive olur. Klasik yoldan aktive olursa M1, alternatif yoldan aktive olursa M2 şeklinde farklılaşırlar (50).

2.3.1. Makrofaj Polarizasyonu

M1 fenotipli makrofajlar, sitotoksikite yeteneğine sahip makrofajlardır ve interferon γ (IFN- γ), lipopolisakkarit (LPS) ya da TNF- α ile uyarılarak bu fenotipe sahip olurlar. Th1, CD8+ T hücreler, NK hücreleri, antijen sunan hücreler (APC) ve B hücreler IFN- γ üretirler ve reseptörler tarafından tanınıp bağlanmasıyla M1 fenotipli makrofajların aktivasyonu ve farklılaşmasına neden olur. Bu makrofajlar IL-12 salgılar ve iyileşme sürecinin erken safhalarında güçlü pro-inflamatuar Th1 immün yanıtını desteklerler. M2 tipli makrofajlar ise birçok yoldan uyarılıp farklılaşabilirler. M2 fenotipinin gelişmesinde interlökin 4 (IL-4), interlökin 13 (IL-13), glukokortikoidler, immunoglobulin kompleksleri başlıca uyarılar arasında gösterilmektedir. M2 makrofajlarının inflamasyonu ve adaptif yardımcı T hücre 2 (Th2) immünitesini kontrol ettiği, anjiyogenezi desteklediği, hasarlı dokunun yeniden cilalanması ve onarımı, kalıntıları temizlediği ve tümörün ilerlemesine yardımcı olduğu bilinmektedir(51,52) . M2 makrofajlar, bu fenotipe farklılaşmaya neden olan uyarılarca M2a, M2b, M2c ve M2d olmak üzere alt gruplara ayrılırlar (53).

M1 fenotipini uyarıcı sinyaller, interferonlar ve TLR sinyali, interferon düzenleyici faktör (IRF)- sinyal dönüştürücüleri ve transkripsiyon (STAT) yolağını etkinleştirirken, IL-4 ve IL-13 makrofajları M2 fenotipine doğru farklılaşmasını destekler. M1 fenotipinin anahtarı interferon düzenleyici 5 (IRF5)'tir. IRF5 Th1 ve yardımcı T hücre 17 (Th17) yanıtlarının ortaya çıkmasında rol oynayan sitokinlerin (IL-12 ve TNF) indüklenmesinde rol oynar. Ayrıca, M1 makrofaj ile ilişkili genlerin %50'si ayrıca, MAP kinaz ile aktive edilmiş protein kinaz (MKNK1) genine TLR4 yoluyla interlökin 1 ilişkili kinaz 2 (IRAK2)'ye bağlı sinyaller aracılığıyla interferon düzenleyici 8 (IRF8) proteininin sentezini indükleyen Notch yolağı tarafından desteklenmektedir. Tip I ve Tip II IL-4 reseptörlerinin ve interlökin 3 (IL-3) aracılığıyla sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü 5 (STAT5) yolağının aktivasyonunun da M2 polarizasyonu ile ilişkili olduğu bilinmektedir (54) .

Makrofajlar, özel olarak fagositoz yapıp doku homeostasisını sağlamak için kalıntıları ve ölü hücreleri yutabilme kapasitesine sahip hücrelerdir. M2 makrofajları ve dokuda yerleşik M2 fenotipine benzer makrofajlar, hücre debrisini ve ölü hücreleri

fagositozla temizler. Bu nedenle, M2 makrofajları genellikle yüksek fagositik aktivite sergiler (55).

Makrofaj polarizasyonu ile kanser arasında önemli bir bağlantı olduğu bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda tümör mikroçevresinde M2 miktarının artmasının tümör büyümesi ile bağlantılı olduğu ortaya konulmuştur. İntravazasyon, invazyon ve metastaz M2 fenotipli makrofajlar tarafından gerçekleştirilir ve TME içerisindeki kanser hücreleri ile etkileşimleri aracılığıyla bunu gerçekleştirir. Bunun dışında, TME ortamında bulunan M1 fenotipli makrofajlar M2 makrofajların aktivitesini baskılayabilir (56). Bazı durumlarda örneğin tümörün erken evreleri, gerileyen ya da ilerlemeyen tümörlerde M2 fenotipe sahip Tümör İlişkili Makrofajlar diye adlandırılan makrofajlar, anjiyogenezi inhibe ederek ya da antitümör yanıt oluşturacak sitokinler salgılayarak M1 fenotipine benzer özellik gösterirler (57) .

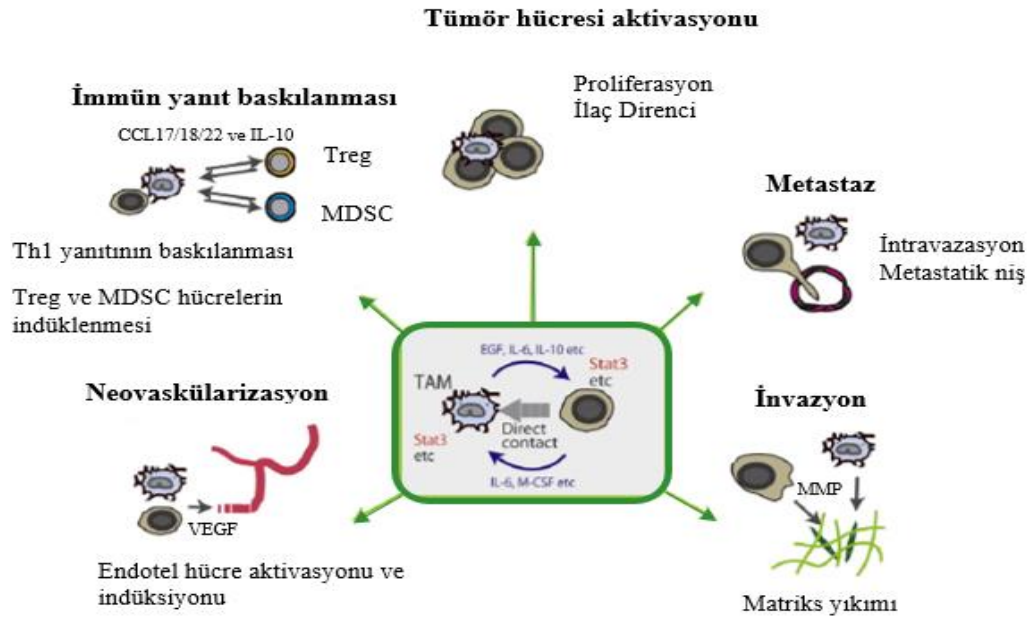
Akciğer kanseri hücreleri yapılmış bir çalışmada, M1 makrofajların kullanılan hücre dizilerinde hücre döngüsünü inhibe ettikleri ve hücre döngüsünün inhibisyonu ile ilgili mRNA'ların ekspresyonunun arttığı görülmektedir (58) . Akciğer kanseri ile yapılmış farklı bir çalışmada ise akciğer kanseri hastalarında, hastalığın kötü prognozu ile ilişkili olan bir miRNA'nın M1 makrofajlarda upregüle olduğu görülürken M2 makrofajlarda ve akciğer kanseri tanısı almış hastalarda downregüle olduğu görülmektedir (59). Başka bir çalışmada ise M1 makrofajların akciğer kanseri hücrelerinin proliferasyonunu azalttığı görülmüştür (60). Hipoksik koşullar altında yapılmış bir çalışmada ise hipoksinin IL-6 ile indüklenen ekstraselüler sinyal düzenleyici kinaz (ERK) yolağını aktive ederek akciğer kanserinde M2 makrofaj polarizasyonunu ve tümorigenezi desteklediği görülmektedir (61) . Bu sebeple M2 makrofajların M1 makrofajlara dönüştürülmesinin hedeflenmesi yeni bir tedavi yöntemi içinde yer almaktadır (62).

2.3.2. Tümör İlişkili Makrofajlar

Tümör mikroçevresinde bulunan makrofajlar, tümör hücrelerinden salınan çözünür faktörlerin aracılığıyla tümörün ilerlemesini ve metastazını desteklemek üzere Tümör İlişki Makrofajlar (TAM) adı verilen makrofaj tipine farklılaşırlar (63).

Özellikle akciğer kanseri hücre dizilerinde yapılmış bir çalışmada TAM'ların akciğer kanseri hücrelerinin hareketini ve invazyonunu desteklediği görülmektedir (64). Literatürdeki bilgiler de TAM'lar tümör proliferasyonu, progresyonu ve metastazını destekleyen M2 fenotip makrofaj fenotipiyle uyduğunu desteklemektedir. (Şekil 2.5) (65) . TAM'ların düşük interlökin 12 (IL-12) ve yüksek seviyede immün yanıtı baskılayıcı IL-10 üretmeleri, düşük seviyede MHC molekülleri üretmeleri gibi özellikleri ile M2 fenotipli makrofajlara olan benzerlikleri anlaşılmaktadır (14).

TAM'lar M2 makrofajlarda olduğu gibi MMP aracılığıyla anjiyogenezi destekler(66). Kolon kanseri hücre modeliyle yapılan çalışmada TAM'ların MMP-9'u indükleyerek kanser hücrelerinde EMT ve invazyonu desteklediği gösterilmiştir (67). MMP aracılı anjiyogeneze ek olarak TAM'lar tarafından üretilen C X C motifli kemokin ligand 1 (CXCL1), C X C motifli kemokin ligand 8 (CXCL8), C X C motifli kemokin ligand 12 (CXCL12), C X C motifli kemokin ligand 13 (CXCL13), C-C motifli kemokin ligand 2 (CCL2) ve C-C motifli kemokin ligand 5 (CCL5) gibi kemokinler tümör dokusunda anjiyojenik değişim üzerinde etkili olarak anjiyogenezi destekler. CCL5 ve CXCL8 hasta sağkalımı ile ters orantılıdır (66). Aynı şekilde TAM'lar tarafından üretilen C X C motifli kemokin ligand 18 (CXCL18) de Treg hücrelerinin tümör nişine alınmasına sebep olarak IL-10 üretimi ve çeşitli büyüme faktörlerinin ekspresyonuna neden olarak neoplastik hücre dönüşümüne yardımcı olmaktadır (68). TAM'lar özellikle hipoksik alanlarda fazlaca bulunur ve MMP-2, MMP-7, MMP-9, siklooksijenaz-2 gibi anjiyogenezin düzenlenmesinden sorumlu moleküllerin ifade edilmesini destekleyebilirler. Aynı şekilde hipoksi ortamındaki TAM'lar memeli rapamisin moleküler hedefi (mTOR) proteinin negatif regülatörü olan DNA hasarı ile indüklenen transkript 4 (DDIT4)'ün güçlü bir şekilde ifade edilmesini sağlarken, DDIT4 aracılı mTOR inhibisyonu ile anormal kan damarlarının oluşmasını sağlayabilir (69) .



Şekil 2.5. Tümör İlişki Makrofajların kanserdeki rolü. (Komohara ve ark (70)'dan uyarlanmıştır.)

TAM'ların IL-10 üreterek programlı hücre ölümü ligandı-1 (PDL-1) için kosütümalatör moleküllerin ifade edilmesini sağlayarak tümör mikroçevresinde sitotoksik T hücre (CTL) yanıtını inhibe ettiği bilinmektedir (71). Tümör hücresinden köken alan faktörlerin, TAM'larda PDL-1 ekspresyonunun artmasına neden olduğu ve makrofajlarda eksprese edilen sitotoksik T hücre ilişkili protein 4 (CTLA4) ligandlarının T hücresi aktivasyonunu baskıladığı da bilinmektedir(70). TAM'lar oksijen radikalleri, nitrojen türleri gibi moleküllerle L-arjinin metabolizmasını kullanarak CD8+ T hücre yanıtını doğrudan inhibe edebilir ve C-C motifli kemokin ligandı 22 (CCL22) aracılığıyla Treg çağırarak T hücre yanıtının daha çok baskılanmasına neden olmaktadır (69).

TAM'lar tümör gelişimini destekleyen rolleri nedeniyle inflamatuvar tümör mikroçevresini azaltmak ya da anti-tümör aktiviteyi arttırmak için kullanılabilir anti tümör terapi yöntemlerinden biridir (72). Yapılmış bir çalışmada, TAM'lar tarafından programlı hücre ölümü-1 (PD-1) eksprese edilmesi kanser hücrelerinin fagosit edilmesini engellemiştir. Bu nedenle TAM'ların PD-1 ve PDL-1 antikorlarıyla hedef alınmasıyla tümöre karşı efektif bir yanıt oluşturulması tedavi yöntemleri içinde yer

almaktadır (73). TAM-hedefli tedavilere başka bir yaklaşım şekli ise TLR-4 agonisti kullanılarak TAM'ları anti-tümör aktiviteye sahip M1 fenotipine geri programlamak olarak karşımıza çıkmaktadır (74).

2.4. Toll like reseptörler (TLR)

Doğal immün cevap, mikrobiyal ajanlara karşı olan hızlı ve önemli bir savunma mekanizmasıdır. Doğal immün cevapta, Toll like reseptörler (Toll benzeri reseptörler; TLR), mikroorganizmaları patojenle ilişkili moleküler paternler (PAMP) ile tanıyarak konakçı savunmasında önemli rol oynayan proteinlerdir (75). Aynı zamanda edinsel immün cevabın da aktive olmasını sağlayarak konak immünesinde çok önemli rol oynarlar. Doğal ve edinsel immün sistem birbiriyle çok hassas bir denge içerisinde ve yardımlaşma ile çalışarak konağı patojenlere karşı korumaktadır. Doğal immünite, bir patojenle karşılaşınca ilk cevabı doğumdan itibaren oluşturabilen ve konağın kendisine ait olan ve olmayan antijenik yapıyı tanıma kapasitesine sahip olan savunma sistemidir. Doğal immün sistem, hücreleri; polimorfonükleer lökosit, monosit, makrofaj, eozinofil, mast hücre ve bazofiller, çözünür faktörler ise sitokinler, akut faz reaktanları ve kompleman sisteminden oluşur (76).

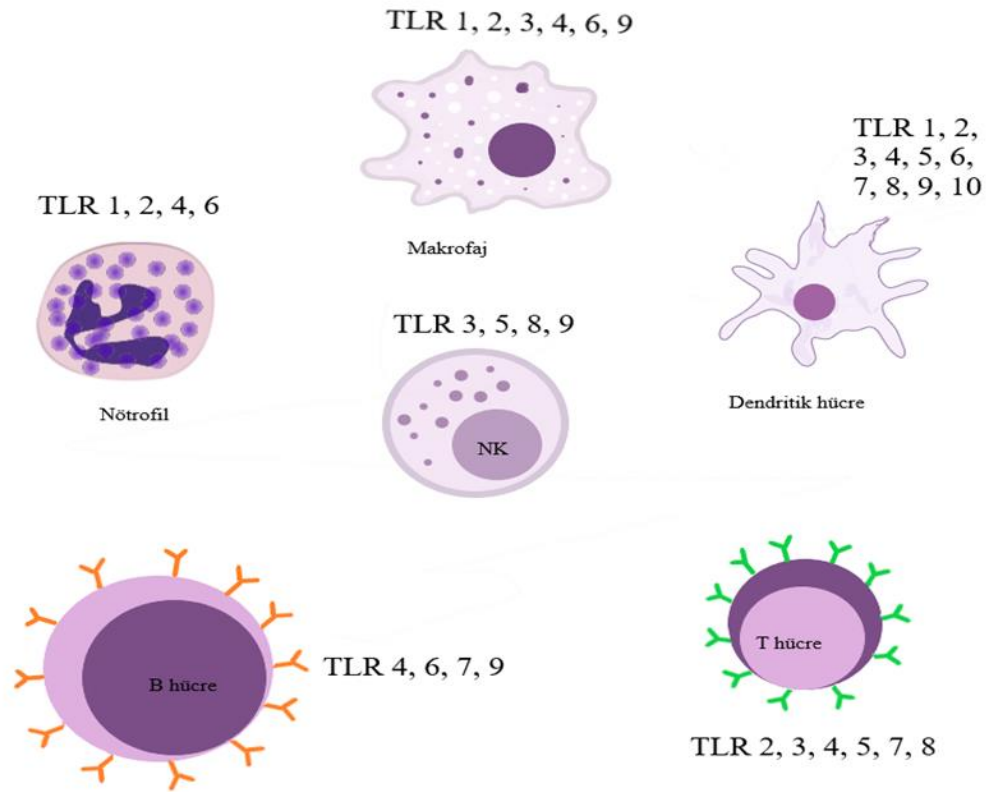
Organizmanın infeksiyonlarla mücadelesinde doğal immün sistem, adaptif immüniteyle kıyaslandığında patojenleri tanıyan reseptörler açısından daha kısıtlı bir repertuara sahiptir. Edinsel immün sistemin, antijen tanıma kapasitesi çok geniş bir reseptör repertuarıyla spesifisiteyi sağlarken, doğal immün sistem patojenlerde ortak olan bir dizi moleküler yapıyı tanıyabilmekte ve böylece konağa ait olan ve olmayanı belirleyerek savunmayı başlatabilmektedir. Patojenler üzerinde bu evrimsel olarak korunmuş moleküler yapılara PAMP denilmektedir. Doğal immün sistem hücreleri üzerinde bunları tanıyan reseptörlere de "Patern Tanıma Reseptörleri (PRR)" adı verilmektedir. Bu reseptörler, endositik, sekrete edilen ve sinyal ileten olmak üzere üç gruba ayrılır. Sinyal ileten reseptör grubunu TLR ailesi oluşturmaktadır (77).

TLR'ler, mikrobiyal ajanlar tarafından üretilen PAMP'ları tanırlar. Bir grup PRR olan ve patojen tanınmasında, inflamatuvar ve immün sistem cevabının başlatılmasında oldukça önemli bir role sahip olan TLR, karakteristik olarak ekstraselüler lösinden zengin tekrar bölgeleri (LRR) ve intraselüler toll/interlökin (IL)-

1 reseptör (TIR) domaininden oluşur. TLR, PAMP ile bağlandığında, intrasitoplazmik TIR domaini aracılığı ile bir dizi sinyal iletim yolağı aktive olur. Bunun sonucu olarak antimikrobiyal protein ve inflamatuvar sitokinler sentezlenmektedir. Günümüzde, toplam 13 tane TLR tanımlanmıştır ve bunlardan 10 tanesi insanda bulunmaktadır. Her bir TLR agonistinin spesifisitesi farklıdır (Şekil 2.6) (Tablo 2.2) (78).

Tablo 2.2. Toll Like Reseptör agonistleri. (Patel ve ark (79) ‘dan alınmıştır.)

Toll Like Reseptör	Agonist
TLR1	Lipopeptitler
TLR2	Lipoprotein, lipoteikoik asit, diğerleri
TLR3	Çift sarmal RNA
TLR4	Lipopolisakkarit (LPS)
TLR5	Flagellin
TLR6	Lipoprotein, lipoteikoik asit, diğerleri
TLR7	Viral RNA
TLR8	Viral RNA
TLR9	Metillenmemiş CpG içeren DNA
TLR10	Bilinmiyor
TLR11	Profilin



Şekil 2.6. TLR ifade eden immün hücreler.

2.4.1. TLR'nin Yapısı, Fonksiyonu ve Sinyal İletimi

TLR, sitoplazmik ve ekstrasellüler bölgeden oluşan tip 1 transmembran proteinidir. Sitoplazmik bölgesi, IL-1 reseptörü ile yüksek derecede benzerlik gösterir ve bu nedenle Toll/IL-1 reseptör (TIR) bölgesi olarak adlandırılır. Reseptörlerin ekstrasellüler bölgesinde her biri 24-29 amino asit içeren, lösinden zengin tekrar (LRR) motifleri bulunur. Bu LRR bölgelerinin farklı patojenlerin tanınmasından sorumlu olduğu düşünülür. İnsanlarda TLR ailesinin tanımlanmış 10 üyesi (TLR1-10) mevcuttur. TLR 1, 2, 4, 5, 6, 10 tipleri hücre yüzeyinde, TLR 3, 7, 8, 9 sitoplazmada özellikle endozomlarda bulunur. Doğal immün sistem hücrelerinde bulunan TLR'ler PAMP adı verilen bölgeleri taşıyan endojen veya eksojen ligandlar tarafından uyarılır (77).

TLR sinyalizasyonunda, myeloid differensiyasyon faktör 88'e (MyD88) bağımlı ve bağımsız sinyal yolu olmak üzere 2 yol tanımlanmıştır. Bu sinyal yollarında başlıca dört adaptör molekül rol oynar: MyD88, TIR bölgesi interferon- β (IFN- β)

indükleyen adaptör proteini (TRIF), TRIF ile ilişkili adaptör molekül (TRAM) ve TIR ilişkili protein (TIRAP). MyD88, TLR3 dışındaki tüm TLR tiplerinde, TLR aracılığı ile oluşan doğal immün yanıtın aktivasyonu için başlıca elemandır. Ligandın bağlanması ile uyarılan TLR'nin TIR bölgesi MyD88 ile birleşir. Bu birleşmeyle uyarılan IL-1R ilişkili kinaz 4 (IRAK 4) ve tümör nekrozis faktör reseptör ilişkili faktör 6 (TRAF 6) aracılığıyla NFkB, mitojenle ilişkili protein kinazı (MAPK) aktive eder ve inflamatuvar cevaba neden olur. MyD88 bağımsız sinyal yolu ise başlıca TLR 3 ve 4 tarafından kullanılmaktadır. Bu sinyal yolunda TLR 3, TRIF üzerinden TRAF ve IRF3'ü TIRAP proinflamatuvar sitokinlerin (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10), TRIF ve TRAM ise interferonların yapımından sorumludur (77) .

2.4.2. TLR ve Kanser İlişkisi

Kanserde; sitokin, kemokin, büyüme faktörleri ve toll like reseptör agonistlerinin fonksiyonları önemli rol oynar. Bu faktörler, tümör hücrelerinin proliferasyonunu ve apoptozisini düzenleyen önemli proteinler olup tümör hücrelerinin progresyonununu artırır (80). TLR'ler tümör hücrelerinde metastaz ve ilaç direnci gelişiminde anahtar düzenleyici olarak görev almaktadır. TLR'ler hücre yüzeyinde "sensör" olarak bulunurlar ve TLR agonistlerine bağlanmasıyla hücrede sinyal iletim yolları aktif hale gelerek tümör hücrelerinin proliferasyonu, apoptozun inhibisyonu ve kemoterapötik ilaçlara karşı direnç gelişimine neden olurlar (80).

Son yıllarda yapılan çalışmalar, akciğer kanseri, meme kanseri, glioma, gastrointestinal sistem ve larinks kanser hücrelerindeki TLR'lerin tümörün immün sistem denetiminden kaçarak, invazyon ve metastazdaki önemini göstermiştir. Fare metastatik meme kanser modelinde, LPS ile indüklenen tümör hücrelerinde anjiyenez, damar geçirgenliğinde artım sonucu tümör hücre invazyonunda artım bulunmuştur. TLR'ler NF-kB sinyal yolağının güçlü aktivatörlerinden biridir ve karsinogenezdeki rolleri bu yolağın ve ilgili genlerin aktivasyonuna bağlıdır(81). Bu yol ile çeşitli sitokinlerin üretilmesini sağlayarak, tümör mikroçevresinde, anti apoptotik etki ya da anjiyogenez aracılığıyla tümör hücrelerinin hayatta kalmasını destekler (81).

TLR4'lerin blokajı ile de tümör büyümesinde gerileme olduğu gösterilmiştir. TLR'lerin tümör hücrelerindeki varlığı tümör gelişimi üzerine fayda sağlasa da uygun adjuvanlar kullanılarak tümör antijenlerine karşı immün cevabın artırılması

sonucunda etkin antikor üretimi ve NK hücre fonksiyonları artmaktadır. Öyle ki dendritik hücreler (DC) üzerinde bulunan TLR3, çift sarmal RNA (dsRNA) ile aktive olur ve bunun sonucunda DC'ler tip I IFN salgılayarak, NK hücre sitotoksitesini arttırlar sonuçta tümör hücreleri apoptoza gider. "Imiquimod" bir TLR 7 agonisti olup bazal hücreli karsinomun tedavisinde kullanılması onaylanan bir ajandır (82) . TLR agonistleri ile TLR7 ve 9'un uyarılması sonucunda NK ve sitotoksik T hücre aktivitesi artar ve sonuçta tümör hücreleri apoptoza giderek ortadan kaldırılır. TLR agonistleri, aynı zamanda tümör mikroçevresini değiştirerek anjiyogenezi inhibe eder. TLR7, 8 ve 9'un aktivasyonu tip I IFN sentezi artımı ile antijen sunumu kuvvetlenir. Bunun sonucunda da sitotoksik T hücrelerinin aktivasyonu ile Th1 cevabının artımı yönünde etkin immün cevap gelişimine katkıda bulunur (83) .

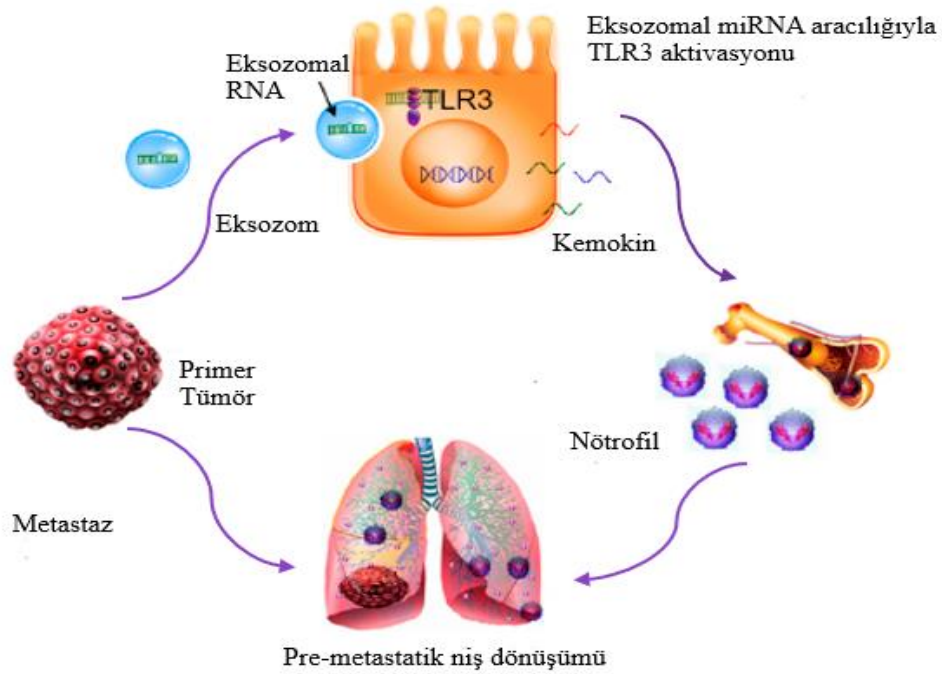
2.4.3. Toll Like Reseptörler ve Akciğer Kanseri

Sağlıklı akciğer hücreleri ve etrafındaki infiltrate immün hücreler TLR eksprese ederler. Akciğer kanseri ile yapılan çalışmalara göre, tümör hücreleri immün sistem denetiminden kaçarlar fakat TLR eksprese eden tümörlerde TLR aktivasyonu ile immün sistem aktive olur ve tümör regresyonuna aracılık eder. Literatürdeki tüm bu bilgilerle birlikte TLR'lerin tümör hücrelerinde iki farklı davranışı bulunmaktadır. TLR'ler aktive oldukları zaman bazı tümörlerde, tümöre karşı etki yaparken bazı tümörlerde de tümörün lehine davranarak tümör hücrelerin gelişimine ve yayılmasına imkân sağlar. Bu bulgular, kanser hücrelerinde TLR'lerin önemli bir düzenleyici olduğunu göstermektedir (84) .

Akciğer kanseri hücreleri ile yapılan çalışmalar, TLR2, TLR4 ve TLR9'un protümoral etkisi olan TLR'ler olduğunu göstermiştir. TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8 ve TLR9'un akciğer kanseri hücrelerinde ekspresyonu bulunmuştur. TLR'lerin tümör hücrelerinde varlığı TLR agonistlerinin tedavi amaçlı kullanım imkanını oluşturmuştur. Bugüne kadar TLR agonistleri ile çeşitli kanserlerde yapılan klinik çalışmalar devam etmektedir. Özellikle immünojen olmayan yani immün denetimden kaçan akciğer kanseri gibi kanser tiplerinde tek başına veya kemoterapi ile kombine tedavi olarak kullanılmaktadır (84) .

TLR'ler ve eksozomlar arasındaki ilişkiye dair yumurtalık kanserinde yapılmış bir çalışmada TLR3 agonisti ile uyarılan kanser hücrelerinden salınan eksozomların

makrofajlarda M1 polarizasyonunu indüklediği kanıtlanmıştır (85). Akciğer kanserinde ise tümör hücrelerinden salınan eksozomlar, TLR 2/6 kompleksini aktive ederek TNF- α üretimine yardım eder ve tümör metastazını desteklediği bilinmektedir (86). Aynı şekilde, tümör kökenli eksozomal miRNA'lar da immün hücrelerdeki TLR7 ve TLR8'e bağlanarak tümör metastazını desteklemektedir (86). Akciğer kanseri hücreleriyle yapılmış bir çalışmada, TLR3 barındıran hücrelerin pre-metastatik niş ile bağlantılı S100A8, S100A9 ve MMP9 gibi genlerin ifade edildiği görülmektedir(86). TLR3 baskılanmış farelerde nötrofil çağırımı ve tümör metastazının azaldığı görülmektedir. Daha sonraki aşamalarda tümör kökenli eksozomların TLR3'ü aktive ederek akciğer kanserinde metastazı desteklediği gösterilmektedir. Tümör kökenli eksozomal RNA'ların NF- κ B ve MAPK sinyal yollarını aracılığıyla akciğer epitel TLR3 ifadesini upregüle ederek nötrofillerin çağırılmasını ve pre-metastatik niş dönüşümü desteklediği gösterilmektedir (Şekil 2.7) (86).



Şekil 2.7. Akciğer kanserinde TLR aracılı metastaz. (Liu ve ark (86)'dan uyarlanmıştır.)

Akciğer kanseri hücreleriyle yapılmış başka bir çalışmada ise, kanser hücrelerinden köken alan eksozomlarla birlikte kültüre alınan MSC hücrelerinde IL-6, IL-8 ve MCP-1 gibi sitokinlerin üretimini arttırdığı gözlenmektedir (87). Akciğer kanseri hücrelerinden köken alan eksozomlarla birlikte kültüre alınan MSC hücrelerinde NF- κ B yolağının aktif olduğu ve TLR2, TLR7, TLR8 ekspresyonunun fazla olduğu gösterilmektedir. Eksozomlarla, kültüre alınan MSC hücrelerinde TLR2'nin daha fazla ifade edildiği ve TLR2 ise baskılandığında NF- κ B yolağının inhibe olduğu, eksozomların indüklediği inflamatuvar faktörlerin ifadesinin azalmasına neden olduğu gösterilmektedir. Ek olarak, MSC'lerde TLR2 sinyalini tetikleyen eksozomların yüzeylerinde Heat shock protein 70 (HSP70) ifade ettikleri de bilinmektedir (87). Bu bilgiler doğrultusunda MSC'leri HSP70 inhibitörü kullanarak tümör mikroçevresinde yeniden programlamak ile tümör progresyonunun kontrol altına alınabileceği gösterilmektedir (87) .

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, Hacettepe Üniversitesi Kanser Enstitüsü Temel Onkoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında Eylül 2020- Mayıs 2021 tarihleri arasında yapılmıştır.

3.1. Çalışmada Kullanılan Materyaller

Hücre Dizileri

A549 Hücre Dizisi (Akciğer alveolar basal epitel hücreli adenokarsinom hücresi, ATCC; USA)

THP-1 (Akut monoblastik lösemi hücreleri, ATCC; USA)

Hücre Kültürü Besiyeri

Fetal Bovine Serum (FBS, Biochrom, Deutschland)

L-Glutamine (Biological Industries, Israel)

Penicillin-Streptomycin (Biological Industries, Israel)

RPMI-1640 (Biological Industries, Israel)

Phorbol Myristate Acetate (PMA P 8139 Sigma-Aldrich, USA)

Accutase (Biolegend)

Mikoplazma Kiti

EZ-PCR Mycoplasma Detection Kit (Biological Industries, Israel)

Akım Sitometride Kullanılan Monoklonal Antikorlar

CD68 PE (Katalog no:333806, Clone Y1/82A BioLegend)

CD11b PE (Katalog no:101208, Clone M1/70 BioLegend)

CD206 FITC (Katalog no:321106, Clone 15-2 BioLegend)

HLA-DR PE (Katalog no:307606, Clone L243 BioLegend)

CXCR2 PE (Katalogno:320706, Clone5P8/CXCR2BioLegend)

CXCR7 FITC(Katalog no:331104, Clone 8F1-M1b BioLegend)

CD45 FITC/ CD14 PE (Cytognos, Salamanca, Spain)

CD33 FITC (BD Biosciences, USA)

IG1 FITC / IG1 PE Kontrol (BD Biosciences, USA)

TLR Agonisti

TLR4 agonist- (E coli'den elde edilen pürüfiye edilmiş lipopolisakkarit (LPS), InvivoGen, USA)

Eksozom İzolasyon Kiti

Exosome Isolation and Analysis Kit- Flow Cytometry, Cell culture (CD63 / CD9) (Katalog no: ab267478, Abcam, United Kingdom)

Fagositoz Kiti

Cayman Chemical Phagocytosis Assay Kit (IgGFITC) (Catalog no:500290, USA)

Hücre Siklusunda Kullanılan Kimyasallar

RNase (Sigma-Aldrich R6513)

Propidium Iodide (Sigma-Aldrich P4170)

3.2. Hücre Kültürü

Çalışmada, Temel Onkoloji Anabilim Dalı Kriyobiyoloji laboratuvarında bulunan hücre dizisi koleksiyonundan akciğer adenokarsinom hücre dizisi olan A549 hücre dizisi ile THP-1 monositik hücre dizileri kullanıldı. A549 hücreleri ve THP-1 hücreleri %10 FBS, %1 Penisillin-Streptomisin ve %1 L-Glutamin içeren RPMI1640 medyumu içinde %5 CO₂ ve 37°C etüvde kültür ortamında çoğaltıldı. THP-1 süspanse hücre özelliği göstermektedir. A549 hücreleri ise aderent hücre özelliğinde olmaları nedeniyle tripsin EDTA ile hücre kültür flaskından kaldırılarak tüplere alınarak deneyler yapıldı.

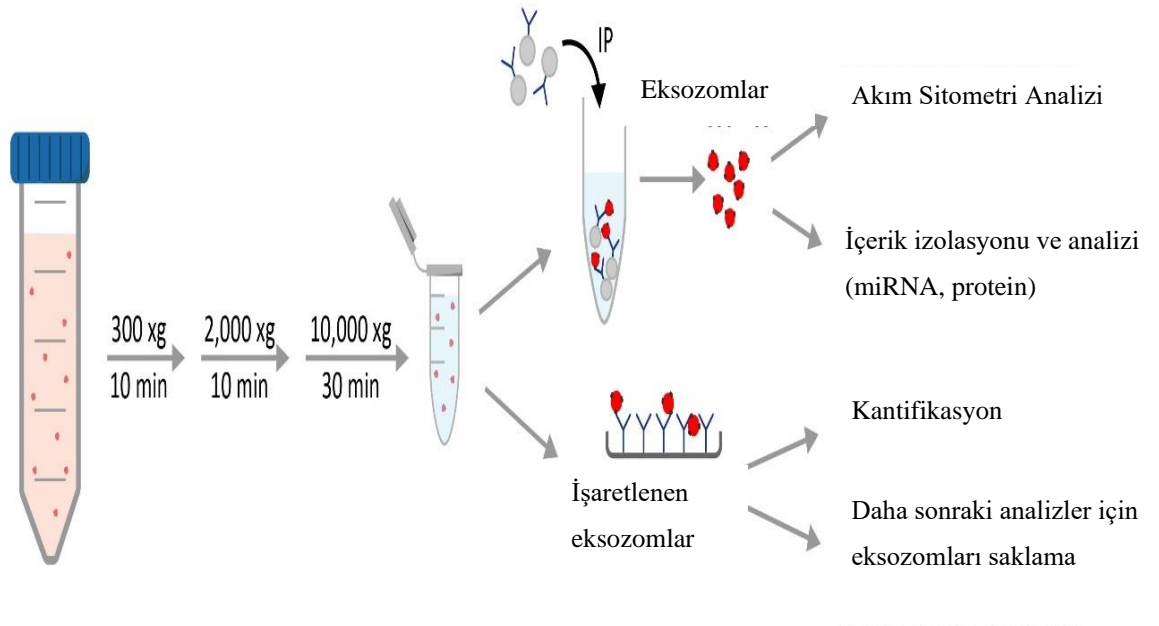
3.3. Mikoplazma Testi

Çalışmada kullanılacak hücre dizilerinde mikoplazma enfeksiyonunu kontrol etmek amacıyla hem A549 hem THP-1 hücre dizilerinde Mikoplazma testi yapılmıştır. Hücrelerin çoğaltıldığı kültür flasklardan örnekler alınarak 2000 rpm'de 90 sn santrifüj edilerek toplanan süpernatantlar tüplere aktarıldı. Örnekler, 14000 rpm'de 20 dk santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırıldı. Tüpte kalan pellete 50 µl Assay Buffer

eklenerek 95 °C'de 3 dakika inkübe edildi. Daha sonra PCR için gerekli karışım hazırlanarak PCR testinde kullanılan 0,5 ml'lik eppendorf tüplere aktarıldı. Her bir tüpteki PCR'in çalıştığını göstermek amacıyla Internal Control DNA eklendi ve total 50 µl örnek volümü hazırlandı. Daha sonra PCR cihazında 35 döngülük PCR süreci başlatıldı. PCR süreci tamamlandıktan sonra tüplerin içindeki örnekler elektroforeze uygulandı elektroforez süresi sonunda oluşan bantların görüntülemesi yapıldı.

3.4. A549 Akciğer Kanseri Hücrelerinden Eksozom İzolasyonu

Öncelikle hücre kültür besiyeri içinde bulunan A549 akciğer kanseri hücreleri, eksozomların, kontamine olmaması için serumsuz RPMI 1640 içinde kültüre alınmıştır. T25 flask için 5×10^6 hücre, T75 flask için 15×10^6 hücre olacak şekilde hücreler 48 saat boyunca serumsuz besiyerinde inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda hücrelerin süpernatantları eppendorf tüplere alındı. Süpernatantlar önce 4°C 2170 rpm'de 10 dk santrifüj edildi sonrasında süpernatantı toplandı. Toplanan süpernatantlar 4°C'de 4339 rpm'de santrifüj edildi tekrar süpernatantlar toplandı. Daha sonra, süpernatant 4°C'de 11481 rpm'de santrifüj edilerek tekrar süpernatant alınarak tüpün dibinde kalan pellet atıldı. (Şekil 3.1). Toplanan süpernatantlardan 200 µl alınarak 50 µl eksozom izolasyon kiti içindeki manyetik boncuklar ile süspanse edilerek ve 18 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası tüpler, 1 ml 1X Assay Buffer ile yıkandı ve 2,500 g'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı ve pellete 5 µl Anti-CD9 antikoru eklenerek 4°C'de karanlıkta 1 saat inkübe edildi. Süre sonunda 1 ml 1X Assay Buffer ile yıkanarak 2,500 g'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra 350 µl 1X Assay Buffer eklenerek akım sitometride analiz yapıldı.



Şekil 3.1. Eksozom izolasyonu. (Arigo Biolaboratories (88)'den alınmıştır.)

3.5. TLR4 Agonisti ile Uyarılan A549 Akciğer Kanseri Hücre Dizisinden Eksozom İzolasyonu

A549 hücreleri serumlu RPMI 1640 besiyerinde, T25 flask için 5×10^6 hücre, T75 flask için 15×10^6 hücre olacak şekilde, 1 ml için 2,5 μ l TLR4 agonisti olacak şekilde uygun miktarlarda eklenerek 24 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. Daha sonra, besiyeri uzaklaştırılarak flasklar PBS ile 3 defa yıkanıp serumsuz RPMI 1640 içerisinde 48 saat boyunca etüv içerisinde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda hücrelerin besiyeri uzaklaştırılıp ependorf tüplere aktarılmıştır. Ependorf tüpler ilk olarak 4°C 2170 rpm'de 10 dk santrifüj edildi daha sonra süpernatanı toplandı. Toplanan süpernatan 4°C 'de 4339 rpm'de tekrar santrifüj edilerek süpernatanı toplandı. Daha sonra, süpernatan 4°C 'de 11481 rpm'de santrifüj edildi tekrar süpernatan alınıp, pelleti atıldı. Toplanan süpernatandan 200 μ l alınarak 50 μ l eksozom izolasyon kiti içindeki manyetik boncuklar ile tekrar süspanse edildi ve 18 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası tüpler, 1 ml 1X Assay Buffer ile yıkanır ve 2,500 g'de 5 dakika santrifüj edilir. Süpernatanı alındı daha sonra pellete 5 μ l Anti-CD9 antikorunu eklenerek 4°C 'de karanlıkta 1 saat inkübe edildi. Süre sonunda 1 ml 1X Assay Buffer ile yıkanarak 2,500 g'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatan

uzaklaştırıldıktan sonra 350 µl 1X Assay Buffer eklenerek akım sitometride analizi yapıldı.

3.6. THP-1 Hücrelerinde Makrofaj Polarizasyonunun Akım Sitometri Yöntemi ile Belirlenmesi

THP-1 hücreleri 6-kuyulu plaklar içerisinde, her kuyuda 2×10^6 hücre olacak şekilde RPMI 1640 besiyerinde, 200nM Phorbolmyristate asetat (PMA) eklenerek 24 saat boyunca etüv içerisinde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası, kuyulardaki besiyerleri toplandı ve 3 defa PBS ile yıkandıktan sonra serum içermeyen RPMI 1640 eklendi. Her kuyuda 350 µl A549 hücrelerinden elde edilen eksozomlar ve 350 µl TLR4 agonisti ile uyarılan A549 hücrelerinden elde edilen eksozom olacak şekilde farklı plaklara eklenerek 48 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. Sadece PMA içeren THP-1 hücreleri 24 saat sonunda scraper ya da accutase enzimi ile plak yüzeyinden sökülerek toplandı. Makrofajlarda M1 farklılaşmasını belirlemek için CD11b, CD68, CXCR7 ve HLA-DR yüzey işaretleri için boyama ve M2 farklılaşmasını belirlemek için CD206, CXCR2 ve spesifik monoklonal antikorlar ile işaretlenerek $+4^{\circ}\text{C}$ 'de karanlıkta 25 dakika inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda, tüpler PBS ile yıkanarak 1800 rpm'de 5dk santirüj edildi. Süpernatant atılarak 500 µl PBS ile süspansiyon edildi. Daha sonra, akım sitometri cihazında 10.000 hücre sayılarak eksozomların yüzde değerleri belirlendi. Aynı işlemler, eksozom içeren THP-1 hücreleri için 48 saatlik inkübasyon sonrası tekrarlandı.

3.7. THP-1 Hücrelerinde Fagositoz Aktivitesinin Akım Sitometri Yöntemi ile Değerlendirilmesi

THP-1 hücreleri 6-kuyulu plaklar içerisinde, her kuyuda 2×10^6 hücre olacak şekilde RPMI 1640 besiyerinde, 200nM Phorbolmyristate asetat (PMA) eklenerek 24 saat boyunca etüv içerisinde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası, kuyulardaki besiyerleri çekilerek, 3 defa PBS ile yıkandıktan sonra serum içermeyen RPMI 1640 eklendi. Her kuyuda 350 µl A549 hücrelerinden elde edilen eksozomlar ve 350 µl TLR4 agonisti ile uyarılan A549 hücrelerinden elde edilen eksozom olacak şekilde farklı plaklara eklenerek 48 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. Sadece PMA içeren

THP-1 hücreleri 24 saat sonunda scraper ya da accutase enzimi ile plak yüzeyinden sökülerek toplandı. Hücreler 1/500 oranında lateks-boncuklar ile işaretlenip 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. 24 saat sonra, hücreler toplanıp, 400 g'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırılarak 500 µl AssayBuffer ile süspansiyon edildi ve akım sitometri cihazında 10.000 hücre sayılarak analiz edildi. Aynı işlemler, eksozom içeren THP-1 hücreleri için 48 saatlik inkübasyon sonrası tekrarlandı.

3.8. THP-1 Hücrelerinde Hücre Döngüsünün Akım Sitometri Yöntemi ile Değerlendirilmesi

THP-1 hücreleri 6-kuyulu plaklar içerisinde, her kuyuda 2×10^6 hücre olacak şekilde RPMI 1640 besiyerinde, 200nM Phorbolmyristate asetat (PMA) eklenerek 24 saat boyunca etüv içerisinde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası, kuyulardaki besiyerleri çekilerek, 3 defa PBS ile yıkandıktan sonra serum içermeyen RPMI 1640 eklendi. Her kuyuda 350 µl A549 hücrelerinden elde edilen eksozomlar ve 350 µl TLR4 agonisti ile uyarılan A549 hücrelerinden elde edilen eksozom olacak şekilde farklı plaklara eklenerek 48 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. Her koşuldaki hücre inkübasyon sonrası toplanıp, 1 ml PBS ilave edildi. PBS eklendikten sonra hücreler, 2 ml %99 saf alkol ile fikse edildi. Bir gece inkübasyon sonrası hücreler iki kez PBS ile yıkandı. Daha sonra hücrelerin üzerine 70µl RNase ve 100 µl propidium iodide ilave edildi. Yarım saat karanlıkta inkübe edildikten sonra 50.000 hücre sayılarak akım sitometri cihazında (Cytoflex; BeckmanCoulter) hücre siklusu analizi Go/G1, Sentez ve G2/M oranları iki değişkenli histogramlardan yapıldı.

3.9. İstatistiksel Analizler

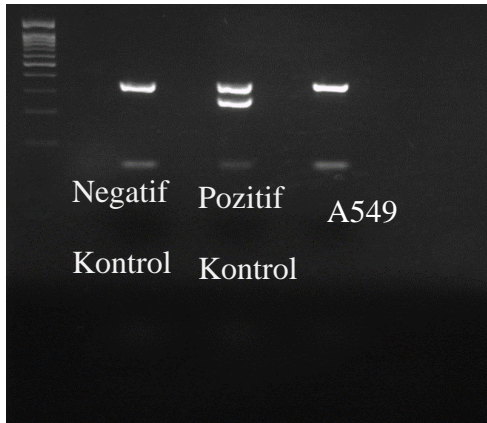
Gruplar arası farkların belirlenmesi için nonparametrik ANOVA olan Friedman testi kullanıldı. İkili karşılaştırmalar Wilcoxon testi kullanılarak yapıldı. Analizler için IBM® SPSS© 20 yazılımı grafik çizimleri için ise GraphpadPrism 9 yazılımı kullanıldı.

4. BULGULAR

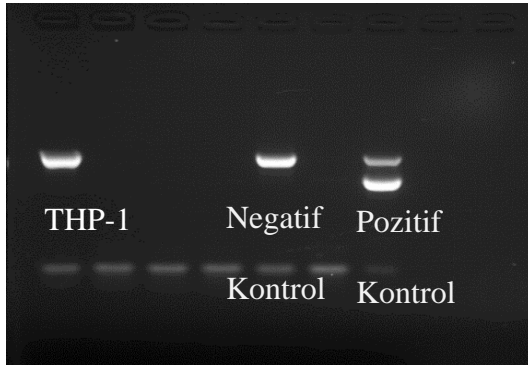
Bu çalışmada, hem A549 akciğer kanseri hücre dizisinden elde edilen eksozomların hem de TLR4 agonisti ile uyarılan A549 akciğer kanseri hücre dizisinden elde edilen eksozomların, THP-1 insan monositik hücre dizisi ile kültürü yapılmıştır. Eksozomların, makrofaj polarizasyonu, fagositoz kapasitesi, hücre döngüsü üzerine etkileri araştırılmıştır.

4.1. Mikoplazma Testi

Çalışmada kullanılan A549 ve THP-1 hücre dizilerinin bir hücre içi bakterisi olan mikoplazma kontaminasyonunu belirlemek amacıyla mikoplazma testi uygulandı. Test, EZ-PRC Mycoplasma Detection Kit ile yapıldı ve çalışma kapsamında kullanılan hücre dizisi örneklerinde mikoplazma kontaminasyonu tespit edilmedi (Şekil 4.1, 4.2).



Şekil 4.1. A549 hücre dizisi Mikoplazma testi görüntüsü.

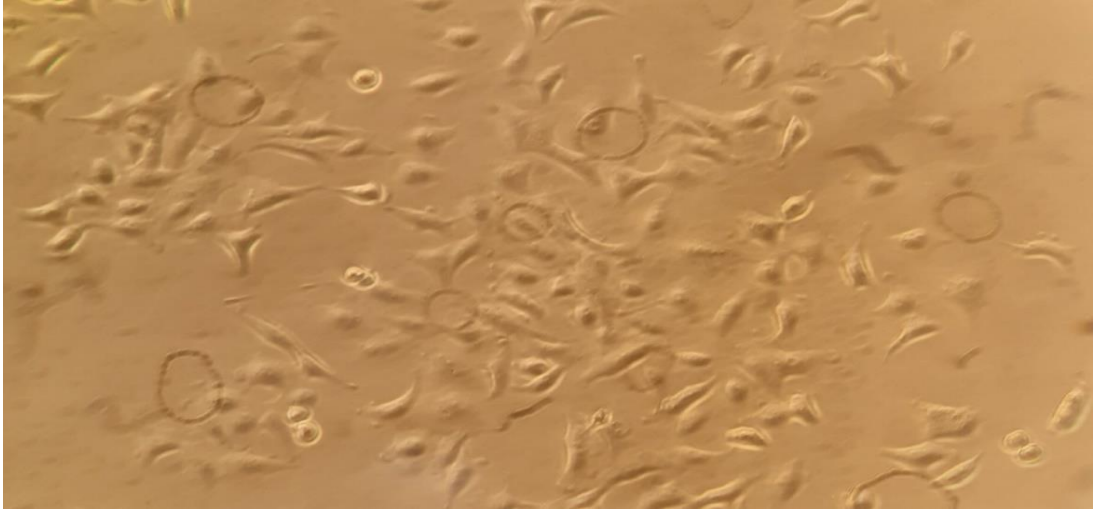


Şekil 4.2. THP-1 hücre dizisi Mikoplazma testi görüntüsü.

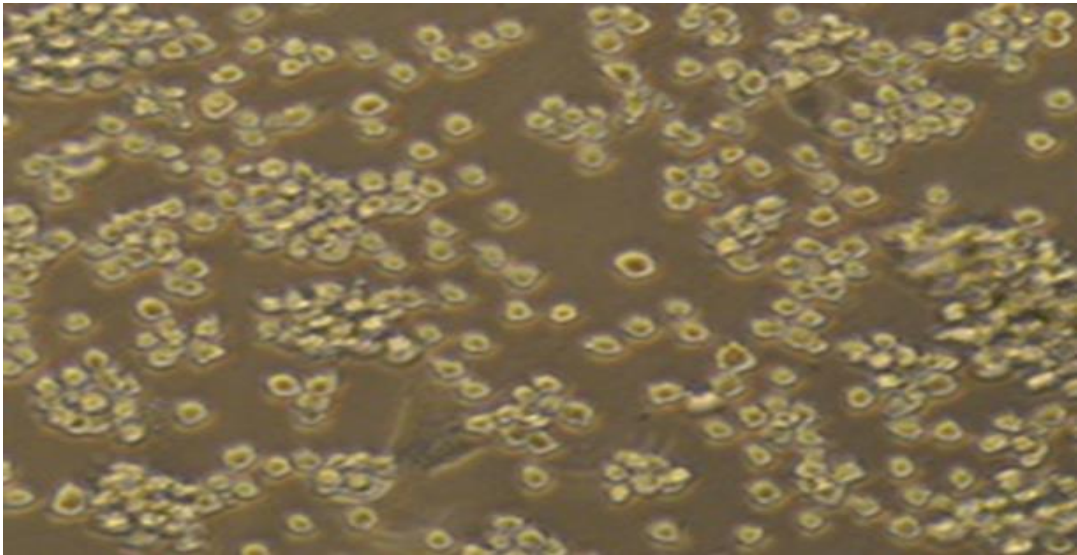
4.2. Akciğer Kanseri Hücrelerinden Elde Edilen Eksozomların THP-1 Monositik Hücrelerinin Morfolojisi Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi

Akciğer kanseri hücrelerinden salınan eksozomların ve TLR4 agonisti ile uyarılan akciğer kanseri hücrelerinden salınan eksozomların THP-1 monositik hücrelerinin morfolojisi üzerine etkisi değerlendirildi. Akciğer kanseri hücrelerinden salınan eksozomlar, hücre kültür süpernatantları toplanarak eksozom izolasyonu yapıldı. TLR4 agonisti ile 48 saat inkübe edildi daha sonra akciğer kanseri hücrelerinin süpernatantlarından eksozom izolasyonu yapıldı. Ayrıca, THP-1 hücrelerinde makrofaj farklılaşmasını göstermek için PMA ile de uyarıldı. THP-1 hücreleri mikroskopik olarak normalde yuvarlak olarak bulunurken, eksozom ve TLR4 agonisti ile uyarılan akciğer kanseri hücrelerinden elde edilen eksozomlar ile inkübasyonu sonucunda hücrelerin uzamış iğsi morfolojiye dönüştüğü izlendi. Şekil 4.4'te THP-1 hücrelerinin hücre kültür medyumundaki ışık mikroskopundaki morfolojik görüntüsü Şekil 4.5 'te eksozomlar ile inkübasyonu sonucundaki morfolojik görüntüsü, Şekil 4.6'da TLR4 agonisti varlığında elde edilen eksozomlar ile inkübe edilen THP-1 hücrelerinin morfolojik görüntüsü ve Şekil 4.7'de PMA ile uyarılan THP-1 hücrelerinin ışık mikroskopundaki morfolojik görüntüsü ve gösterilmiştir.

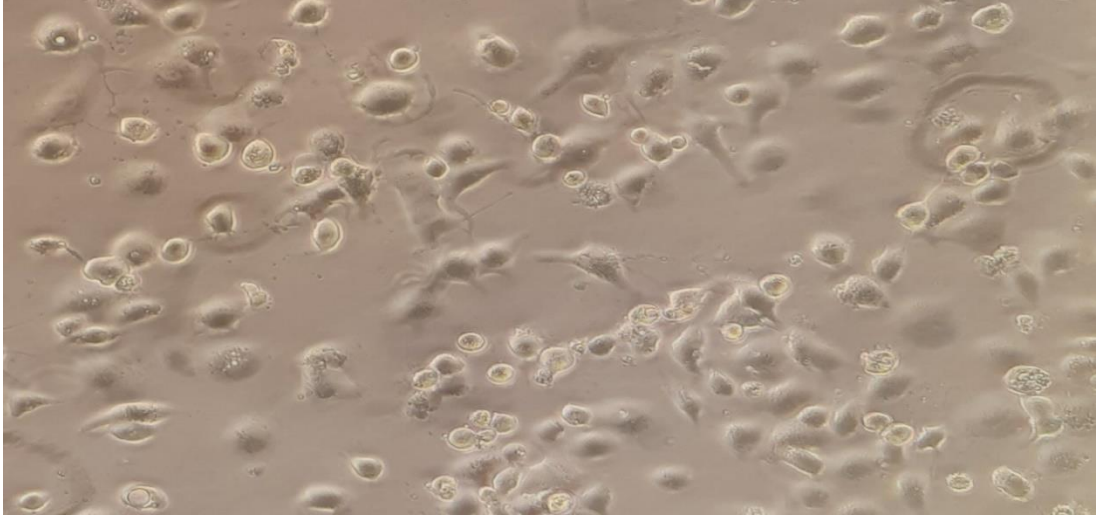
Akciğer kanseri hücrelerinden salınan eksozomlar, TLR4 agonisti ile uyarılmasından sonra akciğer kanseri hücrelerinden elde edilen eksozomların, THP-1 hücrelerinin morfolojilerini değiştirdiği uzamış iğsi hücre morfolojine dönüştürdüğü ve hücrelerin adezyonunu ile agregasyonunu arttırdığı gözlemlendi.



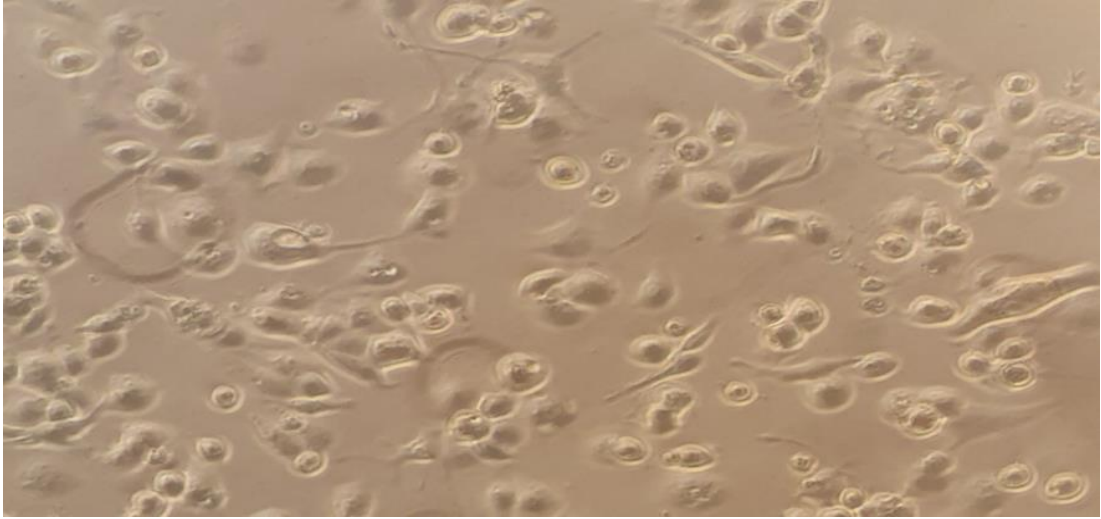
Şekil 4.3. A549 akciğer kanseri hücre dizisinin ışık mikroskobu altında 1/100 oranında büyütülmüş görüntüsü.



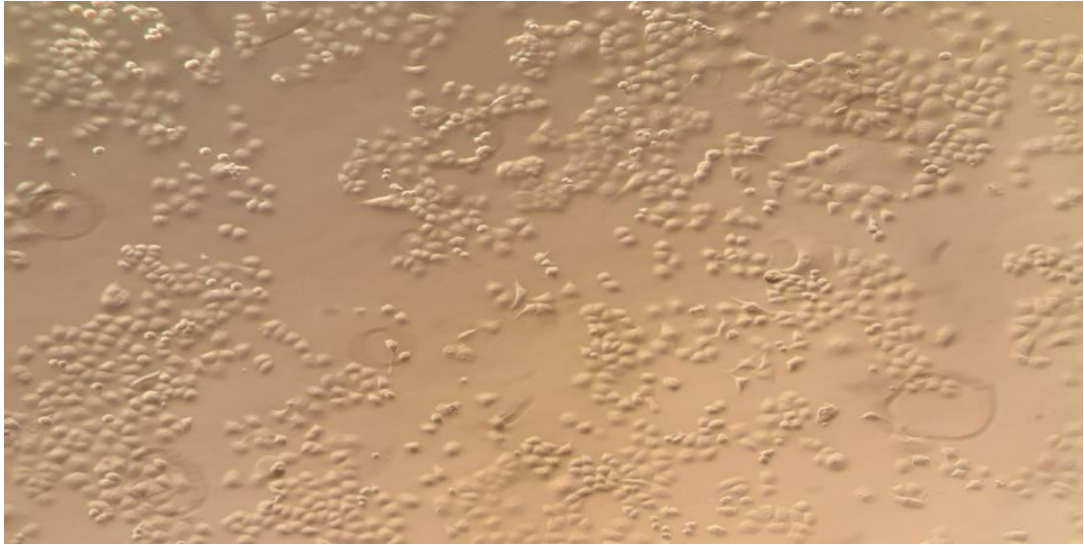
Şekil 4.4. THP-1 monositik hücre dizisinin ışık mikroskobu altındaki 1/100 oranında büyütülmüş görüntüsü.



Şekil 4.5. A549 akciğer kanseri hücrelerinden salınan eksozomlarla birlikte kültüre alınmış THP-1 hücrelerinin ışık mikroskobu altında 1/100 oranında büyütülmüş görüntüsü.



Şekil 4.6. TLR4 agonisti ile uyarılan A549 akciğer kanseri hücrelerinden salınan eksozomlarla birlikte kültüre alınmış THP-1 hücrelerinin ışık mikroskobu altında 1/100 oranında büyütülmüş görüntüsü.



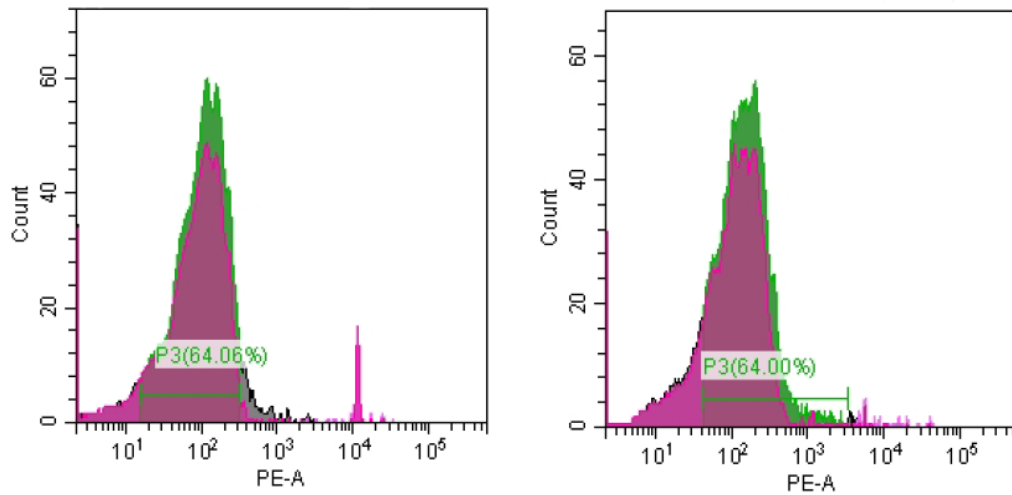
Şekil 4.7. PMA ile uyarılan THP-1 insan monositik hücre dizisinin ışık mikroskobu altında 1/10 oranında büyütülmüş görüntüsü.

4.3. A549 Akciğer Kanseri Hücrelerinden Elde Edilen Eksozomların Akım Sitometri ile Değerlendirilmesi

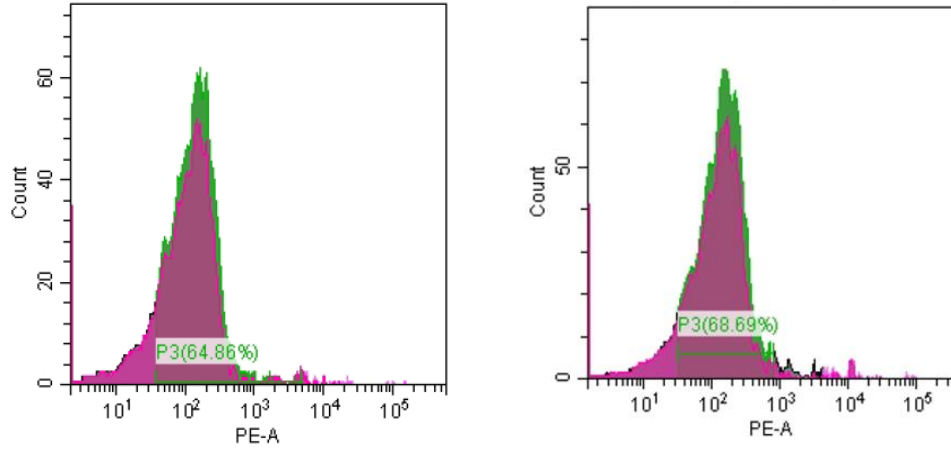
Akciğer kanseri hücreleri T25 ve T75 flasklarda hücre kültür besiyeri içinde çoğaltıldıktan sonra hem akciğer kanseri hücreleri hem de TLR4 agonisti ile 48 saat uyarılan akciğer kanseri hücrelerinin süpernatantları toplanarak eksozomların izolasyonu yapıldı daha sonra toplanan eksozomlar CD9 antikoruna ile işaretlenerek akım sitometri cihazında değerlendirildi. Akciğer kanseri hücrelerinden elde edilen eksozomlar %46, %60, %62,5, %62,75, %64, %64,86, %68,69, oranlarında bulundu. En yüksek eksozom izolasyonu oranı %68,69 olarak bulunmuştur. Deneylede %64 ve %68 oranında elde edilen eksozomlar kullanılmıştır. Tablo 4.1’de A549 akciğer kanseri hücrelerinden elde edilen eksozomların ortalamaları gösterilmiştir. Şekil 4.8 ve 4.9 ‘de A549 akciğer kanseri hücrelerinden elde edilen eksozomların akım sitometri analiz histogramları gösterilmektedir.

Tablo 4.1. A549 akciğer kanseri hücrelerinden salınan eksozomlarda ortalama CD9 ekspresyonu yüzdesi. (n=4)

A549 Hücrelerinden Salınan Eksozomlar		TLR4 Agonisti ile Uyarılan A549 Hücrelerinden Salınan Eksozomlar	
5x10 ⁶ Hücreden Elde Edilen	63,38±0,88	5x10 ⁶ Hücreden Elde Edilen	63,73±4,47
15x10 ⁶ Hücreden Elde Edilen	55±12,78	15x10 ⁶ Hücreden Elde Edilen	64,86 (1 kez denenmiştir)



Şekil 4.8. A549 akciğer kanseri hücre dizisinde sırasıyla 5x10⁶ ve 15x10⁶ yoğunluktaki hücrelerden elde edilen eksozomların akım sitometri analizi histogramları. (n=4)



Şekil 4.9. TLR4 agonisti ile uyarılan A549 akciğer kanseri hücre dizisinde sırasıyla 5×10^6 ve 15×10^6 yoğunluktaki hücrelerden elde edilen eksozomların akım sitometri analizi histogramları. (n=4)

4.4. A549 Akciğer Kanseri Hücrelerinden Salınan Eksozomların THP-1 Hücrelerinde Makrofaj Polarizasyonuna Olan Etkilerinin Değerlendirilmesi

THP-1 hücreleri, akciğer kanseri hücrelerinden salınan eksozomlar, TLR4 agonisti ve PMA inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında M1 ve M2 hücre yüzey belirleyicileri akım sitometri yöntemiyle değerlendirildi. Yüzey belirleyicisi olarak CD68, CD11b, CD206, HLA-DR ve kemokin reseptörleri olan CXCR2 ve CXCR7 yüzey belirleyicileri spesifik monoklonal antikorlar ile işaretlenerek değerlendirildi. Tablo-4.2 'de THP-1 hücrelerinin tüm deney koşullarında hücre yüzey belirleyicilerinin özellikleri gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre, CD68, CD11b, CXCR7 ve HLA-DR M1 tipi makrofaj belirleyicileri THP-1 hücrelerinde, akciğer kanseri hücrelerinden salınan eksozomlar varlığında ve TLR4 agonisti varlığındaki koşullar karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark izlenmedi ($p=0,75$). PMA ile uyarılan makrofajlarda CD68, CD11b, CXCR7 ve HLA-DR M1 tipi makrofaj belirleyicilerin oranı eksozom ve TLR4 agonisti varlığında elde edilen eksozomlar ile

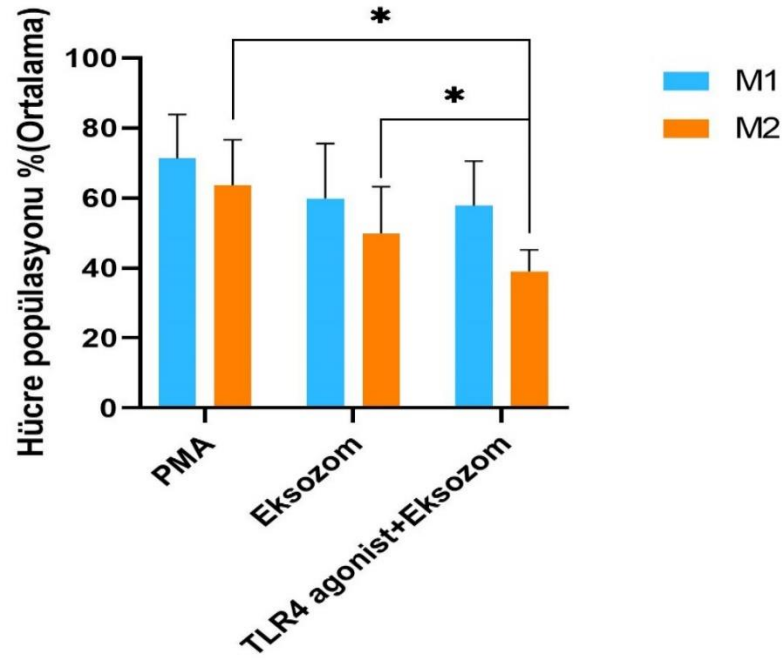
inkübe edilen THP-1 hücrelerindeki CD68, CD11b, CXCR7 ve HLA-DR M1 tipi makrofaj belirleyicilerine göre yüksek oranda bulundu ($p=0,02$) (Şekil 4.10) .

CD206, CXCR2 M2 tipi makrofaj belirleyicileri THP-1 hücrelerinde, akciğer kanseri hücrelerinden salınan eksozomlar varlığındaki koşul ile TLR4 agonisti varlığında salınan eksozom koşulu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark izlendi ($p=0,018$) (Şekil 4.10) .

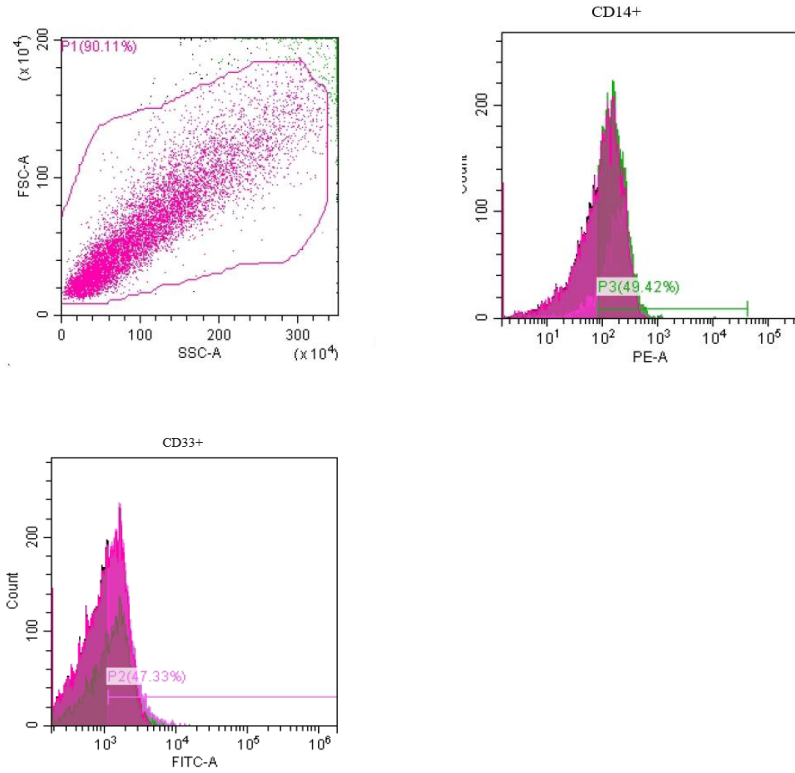
PMA ile uyarılan makrofajlarda CD206, CXCR2 M2 tipi makrofaj belirleyicilerin oranları arasındaki fark eksozom ve TLR4 ligand varlığında elde edilen eksozomlar ile inkübe edilen THP-1 hücrelerindeki CD68, CD11b, CXCR7 ve HLA-DR M1 tipi makrofaj belirleyicilerine göre yüksek oranda bulundu ($p=0,012$). THP-1 hücreleri PMA ile uyarılarak M0 tipindeki makrofaj yüzey belirleyicileri olan CD14 ve CD33 ile de boyanarak akım sitometride analiz edilmiştir (Şekil 4.11, 4.12).

Sonuç olarak, THP-1 hücrelerinde akciğer kanseri hücrelerinden salınan eksozomlar M1/M2 karışık tipinde makrofaj farklılaşması yönünde etkilerken, TLR4 agonisti ile uyarılan akciğer kanseri hücrelerinden salınan eksozomlar varlığında M2 tipi makrofajların azalması yönünde etki ettiği bulunmuştur. Aynı koşullarda M1 tipi makrofaj farklılaşmasına etki etmediği bulunmuştur.

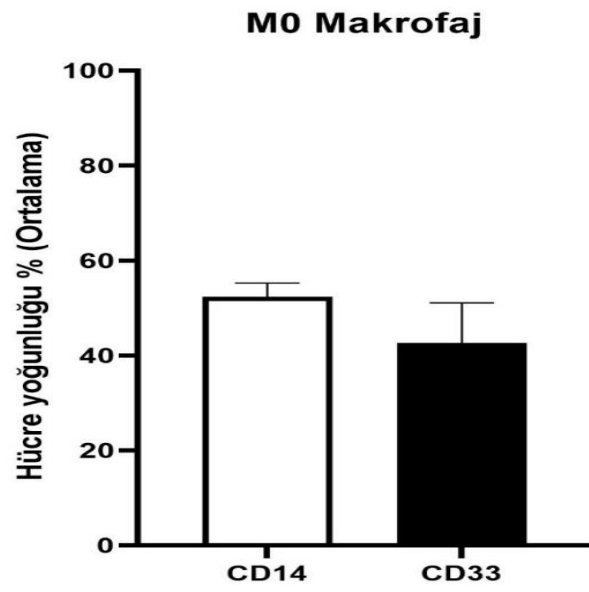
Tüm deney koşullarındaki THP-1 hücrelerinin; akciğer kanseri hücrelerinden salınan eksozomlar varlığında, TLR4 agonisti ile uyarılan akciğer kanseri hücrelerinden salınan eksozomlar varlığında ve PMA ile uyarılan koşulda THP-1 hücrelerindeki CD68, CD206, HLA-DR, CXCR2 ve CXCR7 yüzey ekspresyonlarını dağılımı akım sitometri histogramları ve grafik olarak gösterilmiştir. Şekil 4.13'te THP-1 hücrelerinin akciğer kanseri hücrelerinden salınan eksozom varlığında CD11b, CD68, CD206, HLA-DR, CXCR2 ve CXCR7 yüzey ekspresyonlarının dağılımı grafik olarak, Şekil 4.14'te akım sitometri histogramları olarak gösterilmiştir. Şekil 4.15'te THP-1 hücrelerinin TLR4 agonisti ile uyarılan akciğer kanseri hücrelerinden salınan eksozomlar varlığında CD11b, CD68, CD206, HLA-DR, CXCR2 ve CXCR7 yüzey ekspresyonlarının dağılımı grafik olarak, Şekil 4.16'da akım sitometri histogramları olarak gösterilmiştir. Şekil 4.17'de PMA ile uyarılan THP-1 hücrelerindeki CD68, CD11b, CD206, HLA-DR, CXCR2 ve CXCR7 yüzey ekspresyonlarının dağılımı grafik olarak, Şekil 4.18'de akım sitometri histogramları olarak gösterilmiştir.



Şekil 4.10. Farklı koşullarda THP-1 hücrelerinde M1 ve M2 fenotipli makrofaj dağılımı



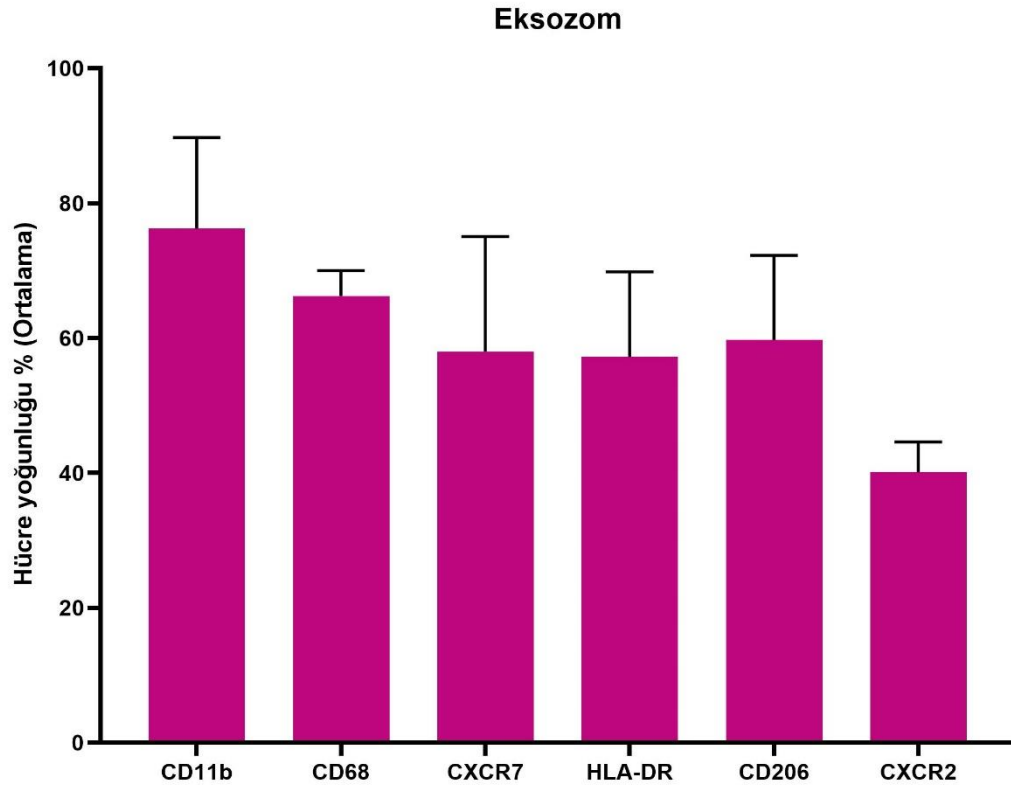
Şekil 4.11. M0 makrofaj fenotipinin akım sitometri analizi histogramları.



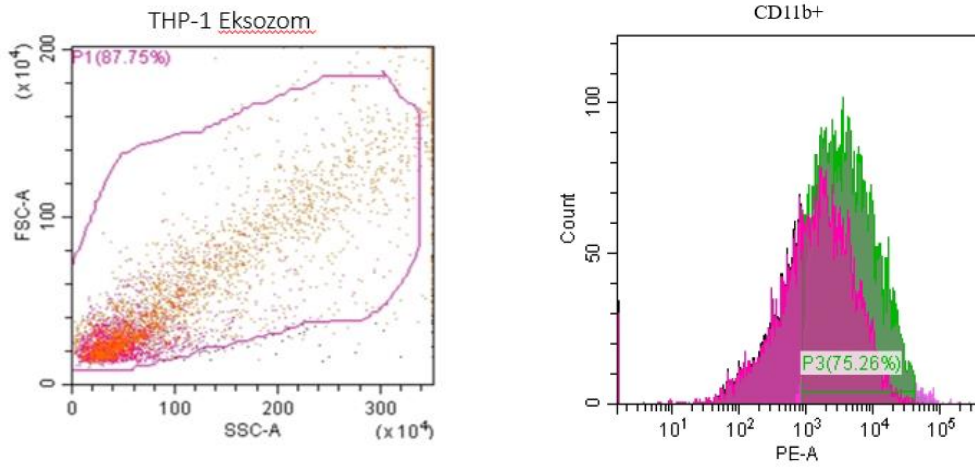
Şekil 4.12. M0 makrofaj fenotipi belirteçlerinin dağılımı. (n=4)

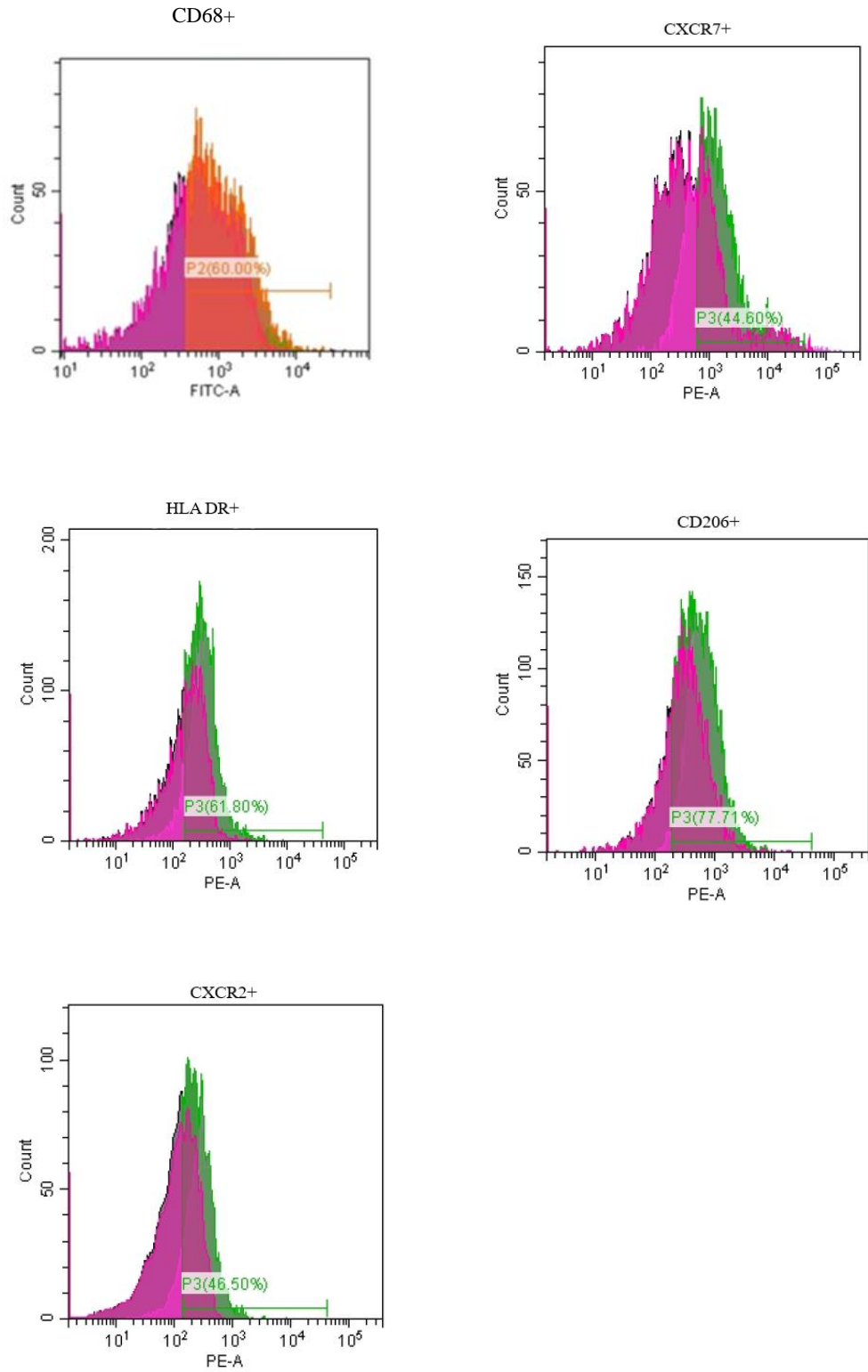
Tablo 4.2. Farklı koşullarda THP-1 hücrelerinde M1 ve M2 makrofaj belirteçlerinin dağılımı. (n=4)

	CD11b	CD68	CXCR7	HLA-DR	CD206	CXCR2
THP-1+ Eksozom	76,25±13,5	66,25±3,77	58±17,07	57,25±12,58	59,75±12,5	40,13±4,48
THP1 +TLR4 +EKSOZ OM	69±12,94	66,13±4,33	56,5±19,82	58,5±1,91	44,25±1,5	33,75±3,77
THP-1 +PMA	82±13,29	69±4,97	71,75±18,3	67,25±4,11	75,25±2,75	51,50±3,11

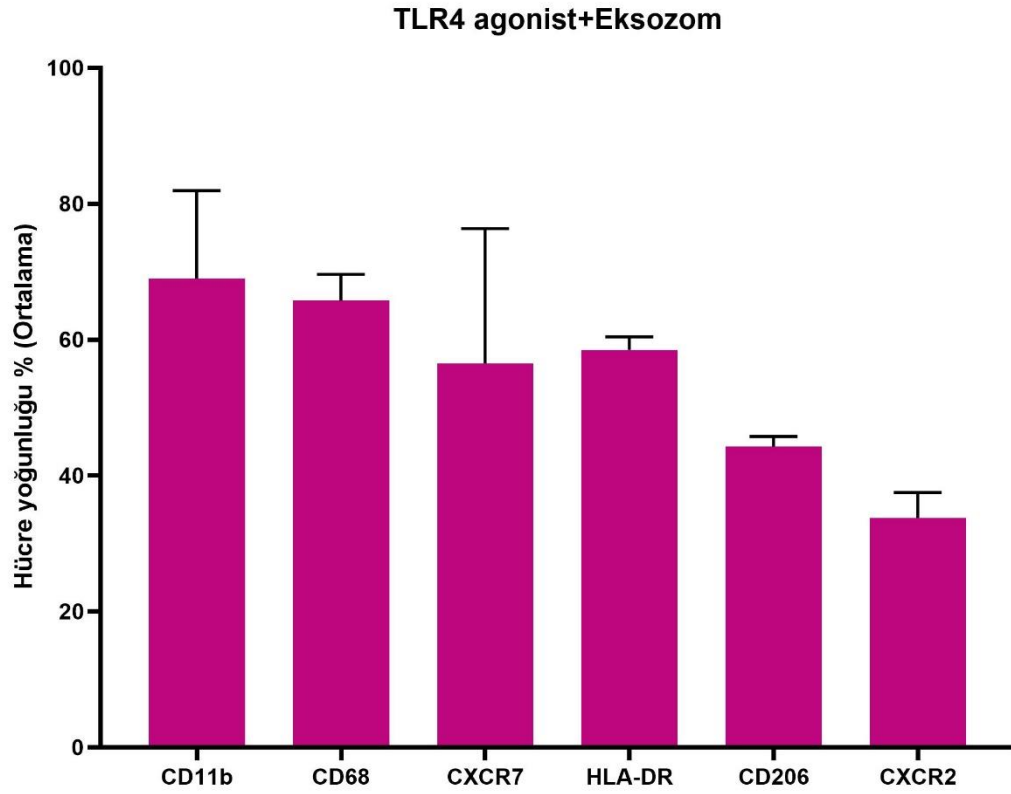


Şekil 4.13. Akciğer kanseri hücrelerinden salınan eksozomlar varlığında THP-1 hücrelerinde M1 ve M2 belirteçlerinin grafik olarak dağılımı. (n=4)

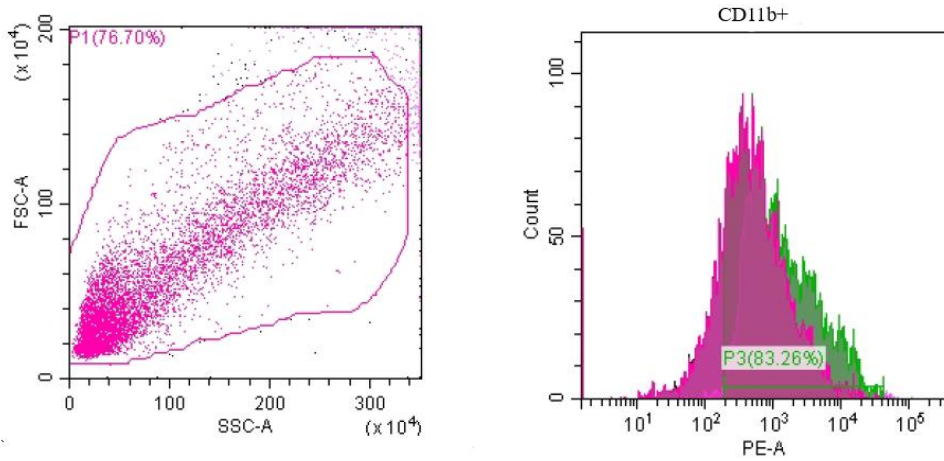


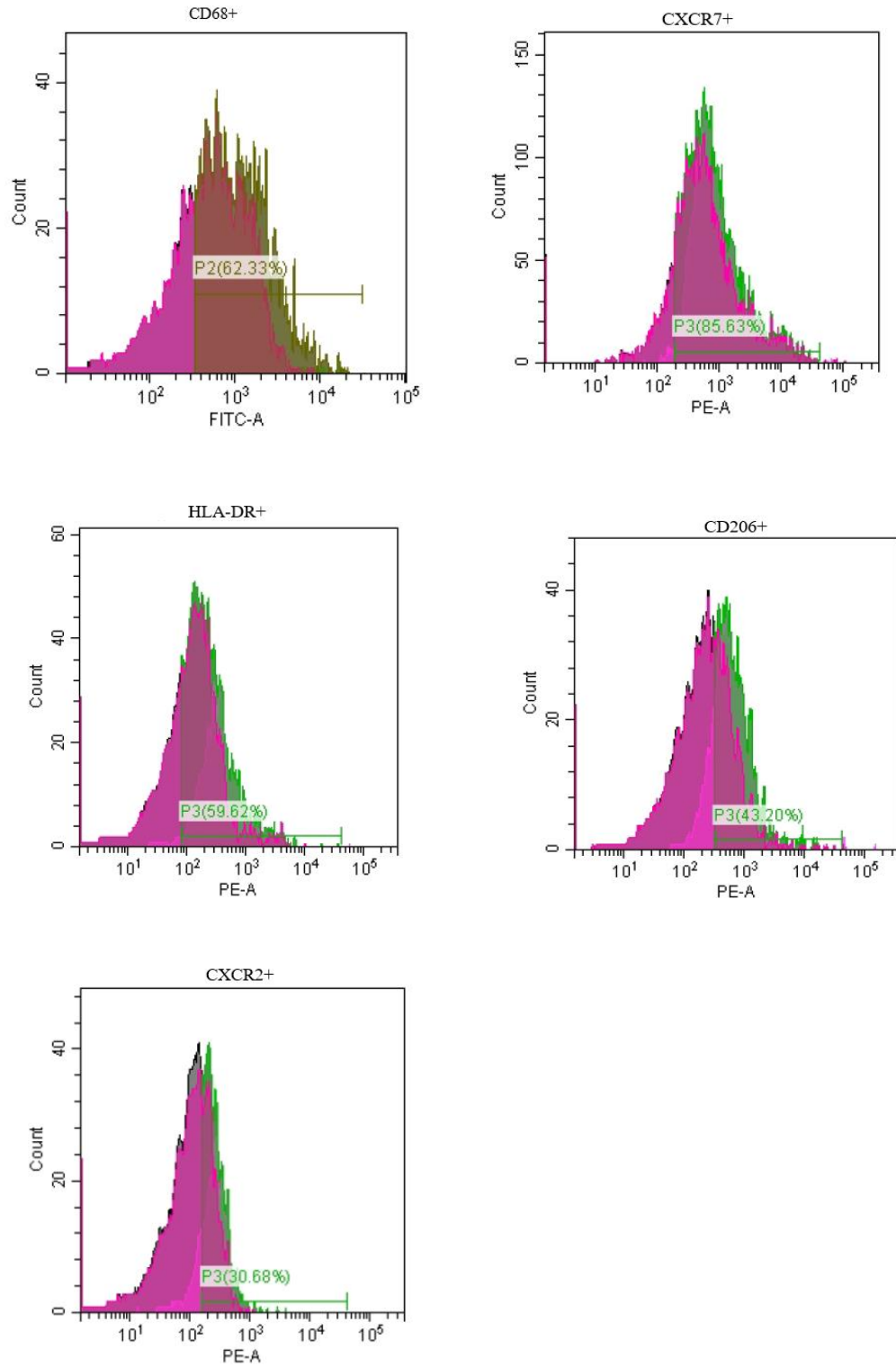


Şekil 4.14. Akciğer kanseri hücrelerinden salınan eksozomlar varlığında THP-1 hücrelerinde M1 ve M2 belirteçlerinin akım sitometri histogramları.

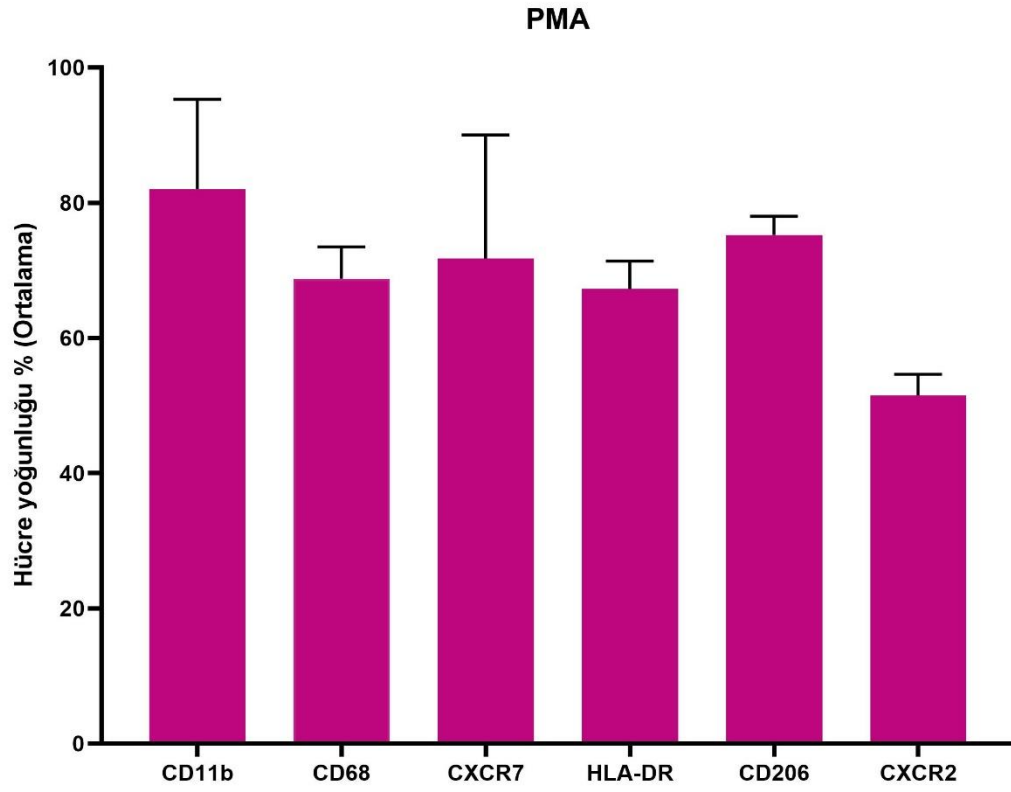


Şekil 4.15. TLR4 agonisti ile uyarılan akciğer kanseri hücrelerinden salınan eksozom varlığında M1 ve M2 belirteçlerinin grafik olarak dağılımı (n=4)

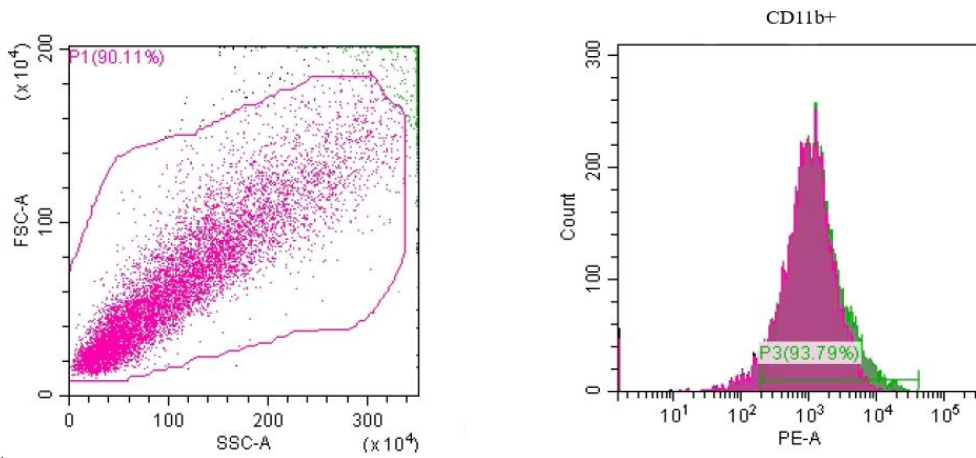


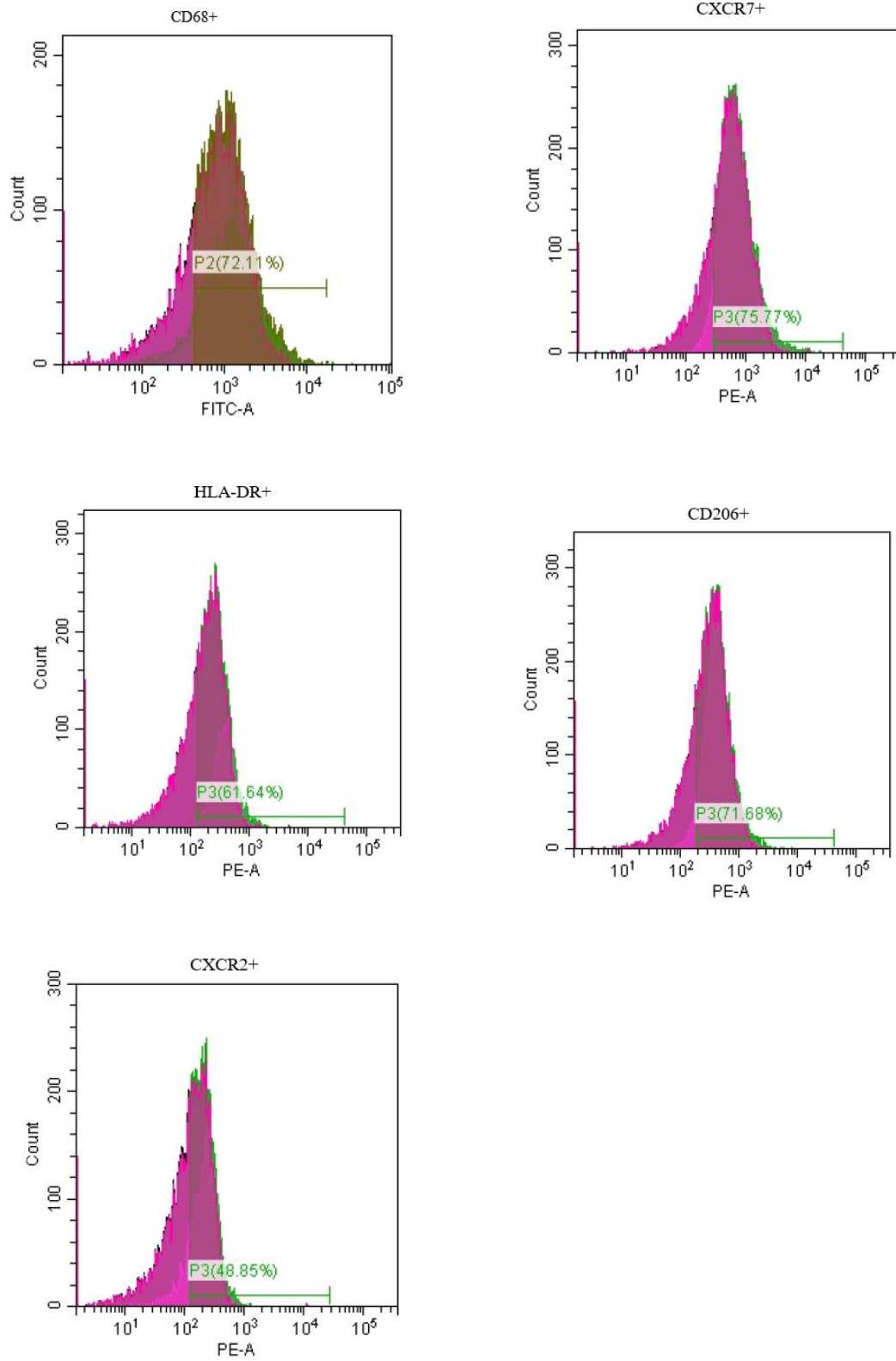


Şekil 4.16. TLR4 agonisti ile uyarılan akciğer kanseri hücrelerinden salınan ekzozom varlığında M1 ve M2 belirteçlerinin akım sitometri histogramları.



Şekil 4.17. PMA içeren THP-1 hücrelerinde M1 ve M2 makrofaj belirteçlerinin grafik olarak dağılımı. (n=4)

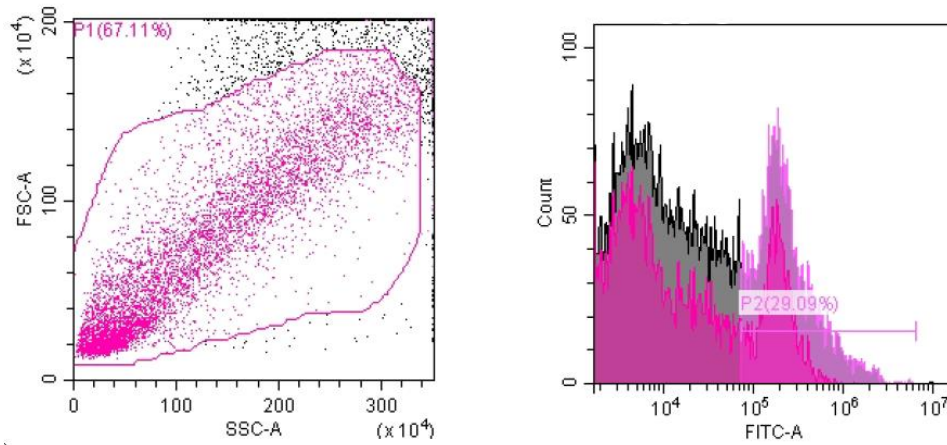




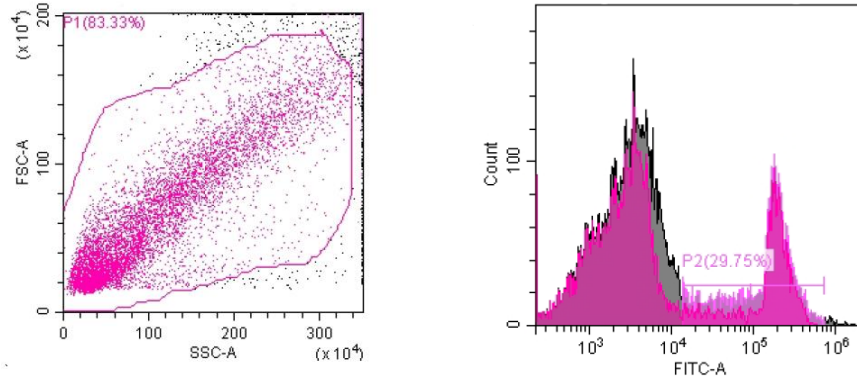
Şekil 4.18. PMA içeren THP-1 hücrelerinde M1 ve M2 makrofaj belirteçlerinin akım sitometri histogramları.

4.5. A549 Akciğer Kanseri Hücrelerinden Salınan Eksozomların THP-1 Hücrelerinde Fagositoz Aktivitesine Olan Etkisinin Değerlendirilmesi

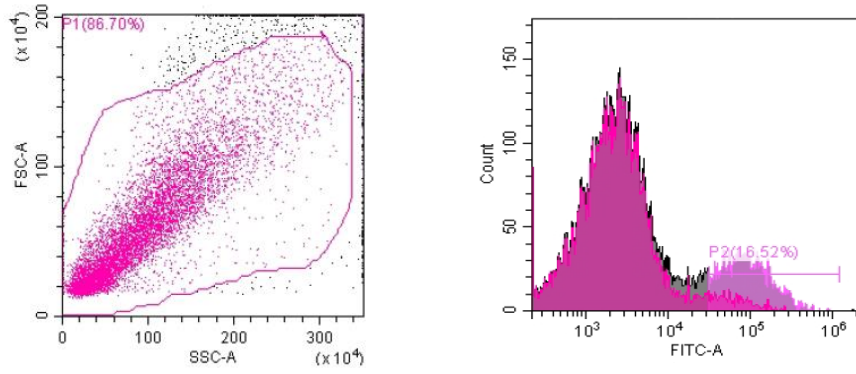
THP-1 hücreleri; akciğer kanseri hücrelerinden salınan eksozomlar, TLR4 agonisti ile inkübasyon sonrası akciğer kanseri hücrelerinden salınan eksozomlar ve PMA ile inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında hücreler 1/500 oranında lateks-boncuklar ile işaretlenerek 24 saat inkübasyon sonrasında hücrelerin fagositoz aktivitesi akım sitometri ile değerlendirildi. Fagositoz aktivitesi sonuçlarına göre, akciğer kanseri hücrelerinden salınan eksozomların fagositoz aktivitesi %34,25, TLR4 agonisti ile inkübasyon sonrası akciğer kanseri hücrelerinden salınan eksozomların fagositoz aktivitesi de %28,25 oranlarında birbirine yakın olarak bulunmuş olup iki grup arasında fark bulunmadı. (Friedman; $p=0,097$). PMA ile inkübe edilen THP-1 monositik hücrelerin fagositoz aktivitesi düşük oranda %18,5 olarak bulundu (Şekil 4.19, 4.20, 4.21, 4.22). Bulgular, her iki koşuldaki eksozomların makrofajlardaki fagositoz aktivitesi üzerinde farklı etki oluşturmadığını göstermiştir.



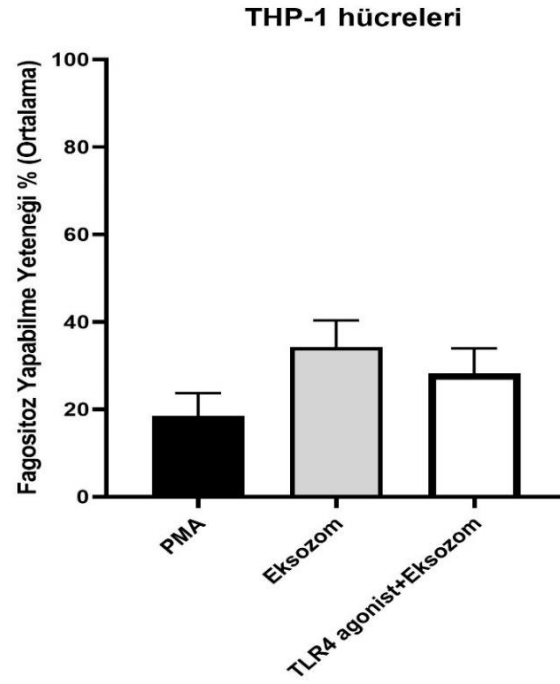
Şekil 4.19. Akciğer kanseri hücrelerinden salınan eksozomlarla kültüre alınan THP-1 hücrelerinde fagositoz kapasitesinin akım sitometri histogramı.



Şekil 4.20. TLR4 agonisti ile uyarılan akciğer kanseri hücrelerinden salınan eksozomlarla kültüre alınan THP-1 hücrelerinde fagositoz kapasitesinin akım sitometri histogramı.



Şekil 4.21. PMA içeren THP-1 hücrelerinde fagositoz kapasitesinin akım sitometri histogramı.



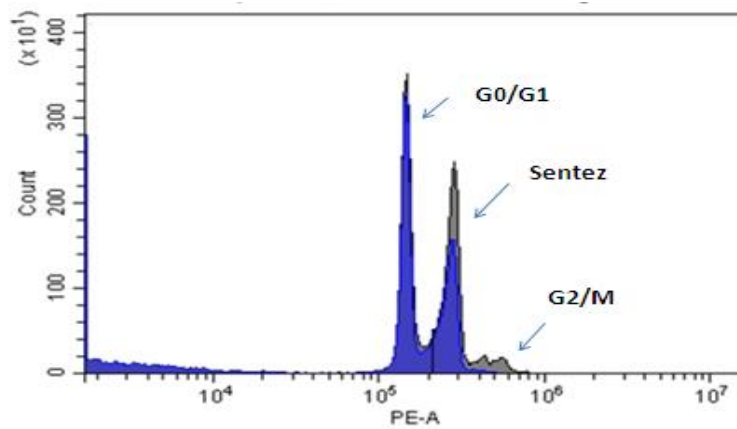
Şekil 4.22. PMA, eksozom ve TLR4 agonisti+eksozom varlığındaki THP-1 hücrelerinin fagositoz aktivite kapasitelerinin grafik olarak dağılımı. (n=4)

Tablo 4.3. PMA, eksozom ve TLR4 agonisti+eksozom varlığındaki THP-1 hücrelerinin fagositoz aktivite kapasiteleri. (n=4)

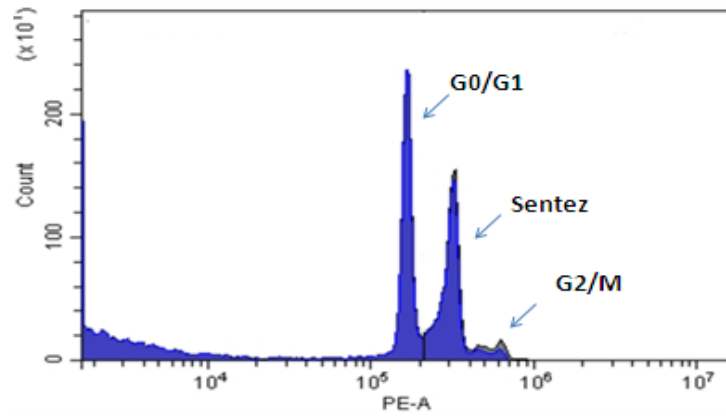
	FAGOSİTOZ YAPABİLME KAPASİTESİ (%)
THP-1+EKSOZOM	34,25±6,08
THP-1+TLR4+EKSOZOM	28,25±5,62
THP-1+PMA	18,5±5,19

4.6. A549 Akciğer Kanseri Hücrelerinden Salınan Eksozomların THP-1 Hücrelerinde Hücre Döngüsü Üzerindeki Etkisinin Değerlendirilmesi

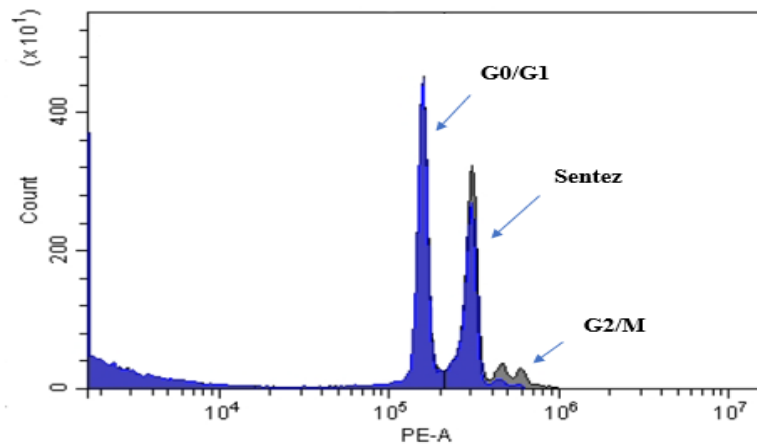
THP-1 hücreleri; akciğer kanseri hücrelerinden salınan eksozomlar, TLR4 agonisti ile inkübasyon sonrası akciğer kanseri hücrelerinden salınan eksozomlar ve PMA ile inkübe edildi. Daha sonra hücre döngüsü analizi için hücreler RNase ve propidium iodide ile işaretlenerek akım sitometri cihazında hücre döngüsü fazları analiz edildi. Çalışma koşulları içindeki akciğer kanseri hücrelerinden salınan eksozom ile inkübe edilen THP-1 hücrelerinde G0/G1 fazındaki hücreler %81, Sentez fazı %14 ve G2/M fazı %3,5 oranlarında, TLR4 agonsti ile uyarılmış hücrelerden salınan eksozomlarla inkübe edilen THP-1 hücrelerinde G0/G1 fazındaki hücreler %73, Sentez fazı %21 ve G2/M fazı %5 oranlarında ve PMA ile inkübe edilen THP-1 hücrelerinde G0/G1 fazındaki hücreler %80, Sentez fazı %15 ve G2/M fazı %4,5 oranlarında bulundu. Eksozom, eksozom+TLR4 agonisti ve PMA'nin THP-1 hücrelerinin, hücre döngüsünde ilerleyerek proliferasyon gösteren hücre döngüsü özelliğinde olduğunu gösterdi. Çalışma koşullarındaki eksozomların THP-1 hücrelerinde hücre döngüsü fazları üzerindeki etkileri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (Friedman; $p=0,368$). Şekil 4.23, Şekil 4.24, Şekil 4.25'te hücre döngüsü dağılımını gösteren akım sitometri histogramları, Şekil 4.26'da farklı koşullardaki THP-1 hücrelerinde hücre döngüsü dağılımı grafik olarak, Tablo 4.4'te ise farklı koşullardaki THP hücrelerinde hücre döngüsü fazlarının oranları gösterilmiştir.



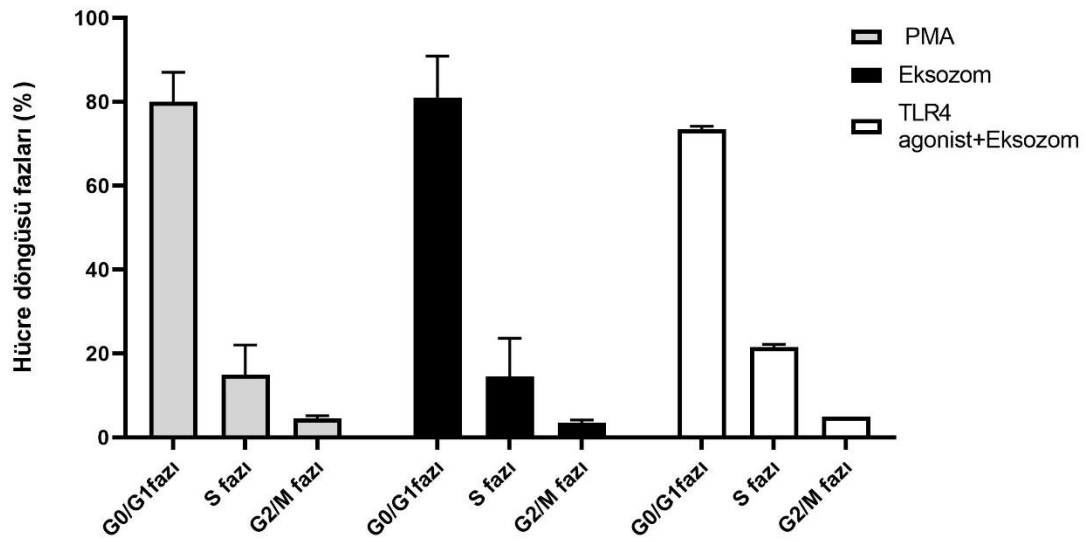
Şekil 4.23. PMA içeren THP-1 hücrelerinin hücre döngüsü dağılımını gösteren akım sitometri histogramı.



Şekil 4.24. Akciğer kanseri hücrelerinden salınan eksozomlar varlığında THP-1 hücrelerinin hücre döngüsünü gösteren akım sitometri histogramı.



Şekil 4.25. TLR4 agonisti ve akciğer kanseri hücrelerinden salınan eksozomlar varlığında THP-1 hücrelerinin hücre döngüsü dağılımını gösteren akım sitometri histogramı.



Şekil 4.26. Farklı koşulların THP-1 hücrelerinde hücre döngüsündeki faz dağılımını gösteren grafik. (n=2)

Tablo 4.4. Farklı koşullarda THP-1 hücrelerinde hücre döngüsü dağılımı. (n=2)

	G0/G1 Fazı (%)	S Fazı (%)	G2/M Fazı (%)
THP-1+EKSOZOM	81±9,8	14,5±9,1	3,5±0,7
THP1+TLR4+EKSOZOM	73±0,7	21,5±0,7	5±0,
THP-1+PMA	80±7	15±7	4,5±0,7

5. TARTIŞMA

Akciğer kanseri, dünya çapında en çok ölüm oranına sahip kanser türünden birisidir. Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri tipi akciğer kanseri tanısı alan hastaların %80-90 civarını oluşturur (89). Normal fenotipten malign akciğer kanseri fenotipine dönüşümün, bir dizi genetik ve epigenetik değişiklik yoluyla çok aşamalı bir şekilde ortaya çıktığı ve nihayetinde klonal genişleme ile invaziv kansere dönüştüğü bilinmektedir (90). Hastaların çoğunlukla geç evrede teşhis almasından dolayı cerrahi işlem mümkün olmamakta ve hastalar kemoterapi, radyoterapi tedavisini birlikte almaktadırlar (91). Bunun dışında akciğer kanserinde, hedefe yönelik tedaviler, artan bilgi birikimi ile gelişmektedir. Kanser hücrelerinin, bazı genlerin gen rearajmanını veya ekspresyonunu değiştirdikleri bilinmekte, dolayısıyla sadece bu hücreleri etkileyen veya hedef alan ilaçlar geliştirilmektedir (92). Fakat, sadece bunları hedeflemek tedavi için yetersizdir bu nedenle akciğer kanseri için yeni tedavi yöntemleri aranmaktadır. Yapılan son çalışmalar, eksozomların ve kanserin yakın bir ilişkisi olduğunu ortaya koymuştur. Bu sebepten, yeni tedavi yöntemi arayışları, kolay bir şekilde elde edilebilmelerinden ve her hücrede sentezlenmelerinden dolayı eksozomları hedeflemeye yönelmiştir. Çalışmamızda literatürdeki bilgiler doğrultusunda, akciğer kanseri hücrelerinden salınan eksozomların makrofaj polarizasyonuna ve fonksiyonlarına olan etkileri araştırılmış olup çalışma kapsamında hem A549 akciğer kanseri hücre kültür süpernatantlarından salınan eksozomların hem de TLR4 agonisti ile uyarılan akciğer kanseri hücrelerinden salınan eksozomların makrofaj morfolojisi, farklılaşması ve fagositoz fonksiyonlarına etkisi değerlendirilmiştir.

Günümüzde, eksozomları izole etmek için birçok yöntem bulunmaktadır. Bunlardan en çok kullanılanı ve eksozom izolasyonu için “altın standart” olarak düşünülen density gradient santrifüj tekniğidir. Daha öncelerde, hücre kültürü süpernatantları kullanılsa da gelişen teknoloji ile ultrasantrifüj tekniği yerini density gradient santrifüj tekniğine bırakmıştır. Density gradient santrifüj tekniği ile daha yüksek püriteye sahip eksozomlar elde edilebilir. Diğer bir yöntem ise yakalamaya yönelik izolasyon yöntemidir. Eksozomların yüzeyleri CD9, CD63, ALIX, Ep-CAM gibi membran proteinlerince zengin olduğu için manyetik boncuklar kullanılarak

yakalanıp yüksek püriteye sahip eksozomlar elde edilebilirler (93). Diğer bir teknik ise sıralı filtrasyon gibi boyuta bağlı tekniktir. Sıralı filtreleme işlemi genellikle üç adıma ayrılır. İlk adımda, hücreler ve hücre kalıntıları filtrelenir; sonra serbest proteinler tükenir ve numuneler konsantre edilir; son olarak, eksozomlar, belirli, tanımlanmış gözenek boyutlarına sahip filtreler kullanılarak sıralanır (93).

Biz de çalışmamızda öncelikle, eksozom izolasyonu için manyetik boncuklar yöntemini kullanılarak A549 akciğer kanseri hücre dizisinden eksozom izolasyonu gerçekleştirdik. Bu yöntem ile CD9 boyaması ile eksozom izolasyon oranı akım sitometri analizi ile belirlendi tekrarlayan izolasyon deneylerinde literatür ile uyumlu olarak yeterli miktarda tümör hücrelerinden eksozom elde edildi. Xiao ve ark.'nın yaptığı çalışmaya göre A549 hücreleri sınırlı eksozom üretme kapasitesine sahiptir (94). Yine aynı şekilde Alexandra Pritchard ve ark.'nın yaptıkları çalışmaya göre diğer akciğer hücre dizileriyle karşılaştırıldığında A549 hücre dizisinin yüksek miktarda eksozom ürettiği fakat daha az CD9 ekspresyon edildiği gösterilmiştir (8). Bu durum her ne kadar farklı yöntemle elde edilmiş olsalar da eksozomlarımızdaki CD9 ekspresyon yüzdesi sonuçlarımız ile uyumluluk göstermektedir. Çalışma bulgularımıza göre akciğer kanseri hücrelerinden manyetik boncuklar ve CD9 boyaması ile eksozomların kolay ve hızlı olarak izole edildiğini göstermesi nedeniyle tümör hücrelerinden eksozom izolasyonunda kullanılacak bir yöntem olduğunu göstermektedir.

Çalışmamızda, akciğer kanseri hücrelerinden salınan eksozomların ve TLR4 agonisti ile uyarılan akciğer kanseri hücrelerinden salınan eksozomların THP-1 hücrelerinin morfolojisi üzerine etkisi değerlendirildi. Eksozomlar ve TLR4 agonist varlığındaki eksozomların THP-1 monositik hücrelerin, yuvarlak morfolojiden iğsi uzamış adezyon gösteren ve agregat oluşumunun arttırdığı yeni bir morfolojik görünüm gösterdikleri gözlemlendi. Tümör hücrelerinden salınan eksozomların ve TLR4 agonistinin tümörün adezyonunu sağladığı ve agregat oluşumu ile de tümör mikroçevresindeki makrofajların toplanmasını arttırabileceği düşünülmektedir.

Tümör mikroçevresindeki hücrelerden salınan tümör kökenli eksozomlar hücre-hücre aktivitesinin düzenlenmesinde önemli araçlardır. TME'deki tümör kökenler eksozomlar, TME'deki farklı hücre tipleri boyunca sayısız sinyal aktivitesine

dahil olmaları nedeniyle kanser tedavisinde direnç oluşturmaya sebep olan faktörler olarak gösterilmekte ve tümör hücrelerine tedaviden kaçınma yeteneği sağlamaktadır (95). Dong ve ark. yaptıkları bir çalışmada meme kanserinin tedavisinde çoğunlukla kullanılan bir ilaç olan trastuzumab'a karşı dirençli meme kanseri hücre dizilerinde eksozomların yüzey belirteci olan CD9'un yüksek miktarda ifade edildiğini ve bu meme kanseri hücre dizisinde trastuzumaba karşı direncin eksozomlar aracılığı ile RNA transfer edilerek gerçekleştiğini göstermişlerdir (96).

Literatürde, akciğer kanseri ve eksozomlar arasındaki ilişkiyi açıklayan çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Eksozomlar, akciğer kanserinin karsinogenezinden sorumlu hücrelerde, hücreler arası iletişimin sağlanmasında rol oynamaktadır. Akciğer kanseri hücrelerinden salınan eksozomlar, yüksek miktarda TGF- β ve IL-10 taşıyarak kanser hücrelerinin proliferasyonunu ve migrasyonunu desteklemektedir (97). Çalışmamızda da A549 akciğer kanseri hücrelerinden salınan eksozomların tümör gelişimini ve invazyonunu arttırdığı bilgiler doğrultusunda, akciğer kanseri hücrelerinin mikroçevresinde bulunan makrofajların polarizasyonuna olan etkisini değerlendirdik. Ayrıca çalışmamızda tümör hücrelerinden salınan eksozomlar ile tümör mikroçevresindeki makrofajların polarizasyonunda Toll like reseptörler nerede yer almaktadır sorusu doğrultusunda, akciğer kanseri hücrelerinden salınan eksozomların TLR4 agonisti ile uyarılmasından sonra makrofaj polarizasyonundaki etkisini de araştırdık. İnsan THP-1 hücreleri, in vivo olarak makrofajlara benzeyen biyolojik davranışları nedeniyle makrofaj farklılaşma araştırmalarında sıklıkla kullanılan bir hücre dizisidir. Bu özelliklerinden dolayı, çalışmamızda THP-1 hücre dizisini akciğer kanseri hücrelerinden salınan eksozomların ve TLR4 agonisti ile uyarılan akciğer kanseri hücrelerinden salınan eksozomların makrofaj farklılaşmasına olan etkisini belirlemek amacıyla kullandık. Çalışma sonuçlarımız akciğer kanseri hücrelerinden salınan eksozomların makrofajların polarizasyonuna etkisinin M1/M2 tipte karışık bir fenotip göstererek daha çok M2 tipinde makrofaj farklılaşması yönünde etkilediğini tespit ettik. Buna karşılık TLR4 agonisti ile uyarılan akciğer kanseri hücrelerinden salınan eksozomlar varlığında ise M2 tipi makrofajların azalması yönünde etkilediği bulundu. Her iki koşulunda M1 tipi makrofaj farklılaşmasına artırıcı yönde bir etki yapmadığını tespit ettik. Literatürde

daha önce yapılan benzer çalışmalarda da tümör mikroçevresindeki makrofajların tümör hücrelerinden salınan eksozomların etkisi ile tümör büyümesini, invazyonunu, tümörle ilişkili anjiyogenezi, doku inflamasyonunu ve immünolojik yeniden şekillenmeyi desteklemek için sinyal yollarını uyarılmasında etkisinin M2 tipinde makrofaj fenotipi ile sağladıklarını göstermiştir (9). Çalışmamızda gösterdiğimiz M2 tipindeki makrofajların artımının tümör hücrelerinden salınan eksozomla aktive olan makrofajların artık kanser ilerlemesinde anahtar olarak görev aldığı görüşünü de desteklediğini göstermektedir.

Çalışmamızda PMA ile uyarılan makrofajlarda CD206, CXCR2 M2 tipi makrofaj belirleyicilerin oranları arasındaki fark eksozom ve TLR4 agonist varlığında elde edilen eksozomlar ile inkübe edilen THP-1 hücrelerindeki CD68, CD11b, CXCR7 ve HLA-DR M1 tipi makrofaj belirleyicilerine göre yüksek oranda bulundu. Liu ve ark'nın yaptıkları çalışmada PMA ile uyarılan THP-1 hücre dizisinde, PMA ile uyarılan THP-1 hücrelerinde uyarılmayan grupla karşılaştırıldığında CD14'ün daha az CD68'in daha fazla ifade edildiği görülmüştür (98). Bu çalışma sonucunun, bizim çalışmamızla da benzer olduğu görülmektedir.

Akciğer kanserinde ise, Pritchard ve ark'nın farklı akciğer kanseri hücreleriyle yaptıkları çalışmada, A549 hücrelerinden köken alan eksozomlarla birlikte kültüre alınan PMA ile uyarılan THP-1 hücrelerinin CD11b+ CD64+ popülasyonda CD163+, CD206+, CD163+CD206+ yani M2 makrofaj fenotipinin anlamlı derecede arttığı gözlemlenmiştir (8). Ayrıca, Chen ve ark'nın yaptıkları çalışma da A549 hücrelerinden salınan eksozomların THP-1 hücrelerinde M1/M2 karışık bir fenotipi desteklediği gösterilmiştir (99).

Linton ve ark.'nın pankreas hücre dizileriyle yapmış oldukları bir çalışmada, pankreas kanseri hücrelerinden köken alan eksozomlar, PMA ile uyarılan THP-1 monositik hücre dizisi ile kültüre alındığında AsPC-1 pankreas kanseri hücre dizisinin THP-1 hücrelerinde CD163 ve CD206 yani M2 fenotipli makrofaj belirteçlerinin anlamlı ölçüde arttığını göstermiştir. Ayrıca, PANC-1 hücre dizisinden salınan eksozomların da aynı şekilde CD163 ekspresyonunu arttırdığını göstermiştir (100). Yang ve ark. ise kolorektal kanser hücre modeli ile yaptıkları başka bir çalışmada, CRC hücrelerinin eksozomlarını direkt olarak makrofajlara transfer ederek, M2

makrofajlara dönüşümünü desteklediğini göstermişlerdir (101). Bardi ve ark.'nın melanoma hücre dizisi kullanarak yaptıkları bir çalışmada, melanom hücrelerinden salınan eksozomların naif makrofajlarla kültüre alındığında MyD88, TRAIL, IL-1 β , IL-6 ve TNF-a gibi ilgili sinyal ve sitokinlerin varlığıyla M1 veya M2 fenotiptense M1/M2 karışık bir fenotipin indüklendiği gösterilmiştir (102). Literatürdeki bulgular, çalışma sonuçlarımız ile uyumluluk göstermektedir.

Çalışmamızda, akciğer kanseri hücrelerinden salınan eksozomların makrofajlardaki fagositoz kapasitesine etki etmediği gösterilmiştir. Bu sonuçlar, akciğer kanseri hücrelerinden salınan eksozomlar ile TLR4 agonisti ile uyarılan akciğer kanseri hücrelerinden salınan eksozomlar ile karşılaştırılması sonucunda THP-1 hücrelerindeki fagositoz aktivitesine etki etmediğini göstermiştir. Eksozomların ve TLR4 agonisti varlığında eksozomların THP-1 hücrelerindeki fagositoz kapasitesi üzerindeki farklı etkisinin olmamasında makrofajların M1/M2 tipte karışık bir fenotip göstererek daha çok M1 tipinde makrofaj farklılaşması yönünde olması nedeniyle fagositoz kapasitesi üzerinde etkili olmadığını düşündürmektedir.

M1 tipinde farklılaşma gösteren makrofajlarda, fagositoz aktivitesinin artması tümör mikroçevresinde biriken debrislerin temizlenerek tümör hücrelerine ve kronik inflamasyona karşı savunma mekanizmalarının fonksiyonel olarak çalıştığının bir göstergesidir. Bu nedenle tümör mikroçevresinde ne kadar fazla M1 tipi makrofaj varsa tümör hücrelerine karşı makrofajların aktivasyonunu işaret etmektedir. Ayrıca tümör hücrelerinde eksprese olan TLR'ler de makrofajlar ile iletişimi sonucunda fagositoz aktivitesinin uyarılmasına neden olmaktadır. Tümör mikroçevresinde, M2 tipi makrofajlarda fagositoz yapma kapasitesi daha düşük olarak görülür. Literatürde, eksozomların makrofajların fagositoz yapabilme kapasitesi üzerine yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle, çalışmamızda kullandığımız akciğer kanseri hücrelerinin dirençli ve agresif özelliklere olmaları nedeniyle makrofajların bu hücrelere daha az fagositoz aktivitesi gösterebileceğini düşündürmektedir.

Akciğer kanserinde, TLR2, TLR4, TLR7, TLR8 VE TLR9 normal hücrelere göre daha fazla ifade edilmektedir. TLR'lerin aktivasyonu, onkojenik süreçte katılabilecekleri, immüno-uyarıcı veya tolerojenik hücrelerin akciğere alınmasını kolaylaştırabilir. On dokuzuncu yüzyılda, TLR'lerin kansere dahil olması ilk olarak,

William Coley tarafından tekrarlanan bakteriyel toksin enjeksiyonlarının veya LPS-Coley toksininin etkili bir anti-tümör adjuvanı olarak hizmet edebilecekleri olarak ortaya atılmıştır. TLR ligandları ve bunların anti-tümör aktiviteleri üzerine çok sayıda çalışma yapılmıştır. Bununla birlikte, TLR'lerin kanserdeki rolü hakkındaki tartışmalar hala açıktır, çünkü bunlar ya kanserli hücrelerle savaşmak için bağışıklık sisteminin aktivasyonuna katılabilirler ya da kronik inflamatuvar yanıtları arttırarak karsinogenezini teşvik edebilirler (85). He ve ark'ları TLR4 ve akciğer kanseri hakkında yaptıkları bir çalışmada, kanser hücrelerinin apoptoza karşı direncini arttırdıklarını göstermiştir (103). TLR'ler ve eksozomlarla ilgili çok fazla çok fazla çalışma bulunmamakla birlikte, TLR4 agonistlerinin kullanımının akciğer kanserinde, tümör yararına olduğuna dair çalışmalar olsa bile yaptığımız çalışma sonuçlarına göre TLR4 agonistiyle uyarılan hücrelerden salınan eksozomların CD206+, CXCR2+ ya da M2 fenotipindeki makrofaj sayısını anlamlı ölçüde azalttığı gözlemlenmiştir.

Çalışmamızda kullandığımız TLR4 agonisti ile uyarılan akciğer kanseri hücrelerinden salınan eksozomların M1 makrofajları aktive edebileceği ve M1 sayısında da artışa neden olabileceği düşünülmüştür. Ama A549 akciğer kanseri hücrelerinden salınan eksozomların, TLR4 agonisti ile uyarılan akciğer kanseri hücrelerinden salınan eksozomlar ile karşılaştırıldığında makrofajların M1/M2 tipte karışık fenotip ile M2 tipte makrofaj polarizasyonunu etkilediği görülmüştür. A549 akciğer kanseri hücre davranışının agresif olması nedeniyle M1 tipi makrofaj farklılaşmasında etkili olmadığını düşündürmektedir.

M2 ve M2'den gelişen TAM'lar çeşitli tümörleri infiltre ederek tümörlerin kötü prognozuna neden olurlar. Bundan dolayı M2 ve TAM'ların kontrolü ve regülasyonu tümörlerin prognozu için anahtar faktörü oluşturur. Toll like Reseptör agonistleri olan TLR 4 agonisti LPS makrofaj polarizasyonuna olan etkileri üzerine yapılan çalışmalar oldukça azdır. Çalışmamızda kullandığımız TLR4 agonisti, edinsel immün yanıt için adjuvant etkiye sahiptir bu nedenle kansere karşı kullanılan terapötik ajanlar içinde büyük bir potansiyele sahiptir. LPS gibi mikrobiyal moleküller ve aynı zamanda HSP'ler, fibrinojen ve endojen ligandlar TLR4 uyarımını takiben IL-6, TGF- β 1, TNF- α gibi pro-inflamatuvar sitokin üretimini indüklenmektedir. Bu nedenle tümör hücrelerinden salınan eksozom ve TLR4 agonisti ile uyarımdan sonra salınan

eksozomların makrofaj polarizasyonundaki inflamatuvar sitokinlerin salınımının rolü de önem taşımaktadır. İlerleyen çalışmalarda çalışmamızdaki koşullarda polarize olan makrofajlardaki sitokin salınımının değerlendirilmesi eksozomların etkisine açıklık getirebileceği öngörülmektedir.

Eksozom ve TLR4 agonisti ile uyarılan akciğer kanser hücrelerinden salınan eksozomların THP-1 hücrelerinde, hücre döngüsü ve hücre proliferasyonuna olan etkileri de değerlendirildi. Akciğer kanseri hücrelerinden salınan eksozomlar ile TLR4 agonisti ile uyarılan akciğer kanseri hücrelerinden salınan eksozomların THP-1 hücrelerinin hücre döngüsü fazları üzerine olan etkisi değerlendirildiğinde her iki koşuldaki eksozomların THP-1 hücrelerinin hücre döngüsünde ilerleyerek proliferasyon gösteren hücre döngüsü fazları özelliğinde olduğunu gösterdi.

Literatürde, tümörden salınan eksozomların makrofajların hücre döngüsü üzerindeki etkileri ile ilgili çok az çalışma bulunmaktadır. Yapılan bir çalışmada özefagus kanserinde, tümör kökenli eksozomların yüksek yoğunlukta bulunması hücrelerin G1'den S fazına geçişi azalttığını göstermiştir (104).

Sonuç olarak, tümör kökenli eksozomlar ve makrofajlar arasındaki ilişki henüz tam açıklığa kavuşmamıştır bu nedenle daha fazla aydınlatacak çalışmalara gereksinim vardır. Moleküler hedefli tedavilere bir yaklaşım olarak TLR agonistleri üzerinde daha çok çalışma yapılması gerekmektedir. Ayrıca, tümör mikroçevresinde makrofajların eğitilebilmesi ve makrofajların M1 fenotipine dönüşmesini sağlamak amacıyla daha çok çalışma yapılması yeni bilgiler sağlayabilir. Çalışmamızdaki sonuçlar, tümör hücrelerinden salınan eksozomların tümör mikroçevresindeki M2 tipi makrofaj polarizasyonunu azaltacak ve tümör mikroçevresindeki makrofajların M1 tipi polarizasyonuna eğitilmesini sağlaması gibi yeni terapötik yaklaşımların geliştirilmesi konusunda yapılacak çalışmalara başlamak için bir basamak olabileceğini düşündürmektedir. Çalışma sonuçlarımızın A549 akciğer kanseri hücrelerinden salınan eksozomlar ile TLR4 agonistinin eksozom salınımını etkisi ile makrofaj polarizasyonu ve makrofaj fonksiyonlarına olan etkilerinin değerlendirmesi yönünden literatüre katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

1. Çalışmamızda, A549 akciğer kanseri hücrelerinden salınan eksozomlar manyetik boncuk yöntemiyle CD9 boyaması ile izole edildi.
2. A549 akciğer kanseri hücrelerinden salınan eksozomların ve TLR4 agonisti ile uyarılan akciğer kanseri hücrelerinden salınan eksozomların THP-1 monositik hücrelerinin morfolojilerini değiştirerek uzamış iğsi hücre morfolojine dönüştürdüğü ve hücrelerin adezyonunu ile agregasyonunu arttırdığı bulundu.
3. THP-1 monositik hücrelerde akciğer kanseri hücrelerinden salınan eksozomlar M1/M2 tipinde karışık tipe makrofaj farklılaşması yönünde etkilerken, TLR4 agonisti ile uyarılan akciğer kanseri hücrelerinden salınan eksozomlar varlığında M2 tipi makrofajların azalması yönünde etki ettiği bulundu. Akciğer kanseri hücrelerinden salınan eksozom ve TLR4 agonisti varlığında salınan eksozomların THP-1 hücrelerinde M1 tipi makrofaj farklılaşmasına etki etmediği bulundu.
4. Fagositoz aktivitesi sonuçlarına göre, akciğer kanseri hücrelerinden salınan eksozomların THP-1 hücrelerindeki fagositoz aktivitesi ile TLR4 agonisti ile uyarılan akciğer kanseri hücrelerinden salınan eksozomların THP-1 hücrelerindeki fagositoz aktivitesini değiştirmediği bulundu.
5. Akciğer kanseri hücrelerinden salınan eksozom ve TLR4 agonisti varlığında salınan eksozomların THP-1 monositik hücrelerin, hücre döngüsüne olan etkisi değerlendirildi. THP-1 hücrelerinin, hücre döngüsünde ilerleyen ve proliferasyon gösteren hücre döngüsü fazları özelliğinde olduğunu bulundu.
6. Bundan sonraki çalışmalarda, farklı histopatolojik özellikteki akciğer kanser hastalarının akciğer tümör dokusundan alınan biyopsi örneklerden elde edilecek tümör hücrelerinden eksozom izolasyonu yapılması ve farklı TLR agonistleri ile uyarılarak THP-1 hücrelerinin farklılaşmasındaki etkileri araştırılabilir.
7. Tümör hücrelerinden salınan eksozomların THP-1 hücrelerindeki proinflamatuvar sitokin salınımı üzerindeki etkileri Multi ELISA Array ile belirlenerek sitokin salınımı yüksek olanların kantitasyonu sitokine spesifik ELISA ile değerlendirilebilir.

8. Farklı kanser türlerinde, TLR agonistleri kullanılarak tümör hücrelerinden salınan eksozomların makrofajlar üzerindeki etkileri araştırılabilir.

7. KAYNAKLAR

1. WORLD HEALTH ORGANIZATION: REGIONAL OFFICE FOR EUROPE. WORLD CANCER REPORT : cancer research for cancer development. IARC; 2020.
2. Maghfoor I, Perry MC, Saudi A. Lung Cancer [Internet]. Vol. 25, Ann Saudi Med. Available from: www.kfshrc.edu.sa/annals
3. Fang T, Lv H, Lv G, Li T, Wang C, Han Q, et al. Tumor-derived exosomal miR-1247-3p induces cancer-associated fibroblast activation to foster lung metastasis of liver cancer. *Nature Communications*. 2018 Dec 1;9(1).
4. Liang M, Chen X, Wang L, Qin L, Wang H, Sun Z, et al. Cancer-derived exosomal TRIM59 regulates macrophage NLRP3 inflammasome activation to promote lung cancer progression. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*. 2020 Aug 31;39(1).
5. Dai J, Su Y, Zhong S, Cong L, Liu B, Yang J, et al. Exosomes: key players in cancer and potential therapeutic strategy. Vol. 5, *Signal Transduction and Targeted Therapy*. Springer Nature; 2020.
6. Wang X, Luo G, Zhang K, Cao J, Huang C, Jiang T, et al. Hypoxic tumor-derived exosomal miR-301a mediates M2 macrophage polarization via PTEN/PI3K to promote pancreatic cancer metastasis. *Cancer Research*. 2018 Aug 15;78(16):4586–98.
7. Zhao S, Mi Y, Guan B, Zheng B, Wei P, Gu Y, et al. Tumor-derived exosomal miR-934 induces macrophage M2 polarization to promote liver metastasis of colorectal cancer. *Journal of Hematology and Oncology*. 2020 Dec 1;13(1).
8. Pritchard A, Tousif S, Wang Y, Hough K, Khan S, Strenkowski J, et al. Lung Tumor Cell-Derived Exosomes Promote M2 Macrophage Polarization. *Cells*. 2020 May 24;9(5).
9. Baig MS, Roy A, Rajpoot S, Liu D, Savai R, Banerjee S, et al. Tumor-derived exosomes in the regulation of macrophage polarization. Vol. 69, *Inflammation Research*. Springer; 2020. p. 435–51.

10. Wang YC, He F, Feng F, Liu XW, Dong GY, Qin HY, et al. Notch signaling determines the M1 versus M2 polarization of macrophages in antitumor immune responses. *Cancer Research*. 2010 Jun 15;70(12):4840–9.
11. Roy S. MiRNA in macrophage development and function. Vol. 25, *Antioxidants and Redox Signaling*. Mary Ann Liebert Inc.; 2016. p. 795–804.
12. Landskron G, de La Fuente M, Thuwajit P, Thuwajit C, Hermoso MA. Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment. Vol. 2014, *Journal of Immunology Research*. Hindawi Publishing Corporation; 2014.
13. Barton GM, Kagan JC. A cell biological view of toll-like receptor function: Regulation through compartmentalization. Vol. 9, *Nature Reviews Immunology*. 2009. p. 535–41.
14. Allavena P, Sica A, Solinas G, Porta C, Mantovani A. The inflammatory microenvironment in tumor progression: The role of tumor-associated macrophages. Vol. 66, *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2008. p. 1–9.
15. Herbst RS, Morgensztern D, Boshoff C. The biology and management of non-small cell lung cancer. Vol. 553, *Nature*. Nature Publishing Group; 2018. p. 446–54.
16. Schabath MB, Cote ML. Cancer progress and priorities: Lung cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*. 2019;28(10):1563–79.
17. Bade BC, dela Cruz CS. Lung Cancer 2020: Epidemiology, Etiology, and Prevention. Vol. 41, *Clinics in Chest Medicine*. W.B. Saunders; 2020. p. 1–24.
18. Chaitanya Thandra K, Barsouk A, Saginala K, Sukumar Aluru J, Barsouk A. Epidemiology of lung cancer. *Współczesna Onkologia [Internet]*. 2021;25(1):45–52. Available from: <https://www.termedia.pl/doi/10.5114/wo.2021.103829>
19. Schwartz AG, Cote ML. Epidemiology of lung cancer. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2016;893:21–41.
20. Works CR, Gallucci BB. *Biology of Lung Cancer*. 1996.

21. Bilello KS, Murin S, Matthay RA. EPIDEMIOLOGY, ETIOLOGY, AND PREVENTION OF LUNG CANCER.
22. Wang J-J, Lei K-F, Han F. Tumor microenvironment: recent advances in various cancer treatments.
23. Wood SL, Pernemalm M, Crosbie PA, Whetton AD. The role of the tumor-microenvironment in lung cancer-metastasis and its relationship to potential therapeutic targets. Vol. 40, *Cancer Treatment Reviews*. 2014. p. 558–66.
24. Mittal V, el Rayes T, Narula N, McGraw TE, Altorki NK, Barcellos-Hoff MH. The microenvironment of lung cancer and therapeutic implications. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer New York LLC; 2016. p. 75–110.
25. Altorki NK, Markowitz GJ, Gao D, Port JL, Saxena A, Stiles B, et al. The lung microenvironment: an important regulator of tumour growth and metastasis. Vol. 19, *Nature Reviews Cancer*. Nature Publishing Group; 2019. p. 9–31.
26. Bu H, He D, He X, Wang K. Exosomes: Isolation, Analysis, and Applications in Cancer Detection and Therapy. Vol. 20, *ChemBioChem*. Wiley-VCH Verlag; 2019. p. 451–61.
27. Ma YS, Yang XL, Xin R, Liu J bin, Fu D. Power and promise of exosomes as clinical biomarkers and therapeutic vectors for liquid biopsy and cancer control. Vol. 1875, *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*. Elsevier B.V.; 2021.
28. Li Z, Wang Y, Xiao K, Xiang S, Li Z, Weng X. Emerging role of exosomes in the joint diseases. Vol. 47, *Cellular Physiology and Biochemistry*. S. Karger AG; 2018. p. 2008–17.
29. Lin J, Li J, Huang B, Liu J, Chen X, Chen XM, et al. Exosomes: Novel Biomarkers for Clinical Diagnosis. *Scientific World Journal*. 2015;2015.
30. Farooqi AA, Desai NN, Qureshi MZ, Librelotto DRN, Gasparri ML, Bishayee A, et al. Exosome biogenesis, bioactivities and functions as new delivery

- systems of natural compounds. Vol. 36, *Biotechnology Advances*. Elsevier Inc.; 2018. p. 328–34.
31. Li X, Wang Y, Wang Q, Liu Y, Bao W, Wu S. Exosomes in cancer: Small transporters with big functions. Vol. 435, *Cancer Letters*. Elsevier Ireland Ltd; 2018. p. 55–65.
 32. Wee I, Syn N, Sethi G, Goh BC, Wang L. Role of tumor-derived exosomes in cancer metastasis. Vol. 1871, *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*. Elsevier B.V.; 2019. p. 12–9.
 33. Suchorska WM, Lach MS. The role of exosomes in tumor progression and metastasis (Review). Vol. 35, *Oncology Reports*. Spandidos Publications; 2016. p. 1237–44.
 34. Steinbichler TB, Dudás J, Riechelmann H, Skvortsova II. The role of exosomes in cancer metastasis. Vol. 44, *Seminars in Cancer Biology*. Academic Press; 2017. p. 170–81.
 35. Mashouri L, Yousefi H, Aref AR, Ahadi AM, Molaei F, Alahari SK. Exosomes: Composition, biogenesis, and mechanisms in cancer metastasis and drug resistance. Vol. 18, *Molecular Cancer*. BioMed Central Ltd.; 2019.
 36. Visan KS, Lobb RJ, Moller A. The role of exosomes in the promotion of epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis. Vol. 25, *Frontiers in Bioscience*. 2020.
 37. Blackwell RH, Foreman KE, Gupta GN. The role of cancer-derived exosomes in tumorigenicity & epithelial-to-mesenchymal transition. Vol. 9, *Cancers*. MDPI AG; 2017.
 38. Kalluri R. The biology and function of exosomes in cancer. Vol. 126, *Journal of Clinical Investigation*. American Society for Clinical Investigation; 2016. p. 1208–15.
 39. Kurywchak P, Tavormina J, Kalluri R. The emerging roles of exosomes in the modulation of immune responses in cancer. Vol. 10, *Genome Medicine*. BioMed Central Ltd.; 2018.

40. Li K, Chen Y, Li A, Tan C, Liu X. Exosomes play roles in sequential processes of tumor metastasis. Vol. 144, *International Journal of Cancer*. Wiley-Liss Inc.; 2019. p. 1486–95.
41. Kahlert C, Kalluri R. Exosomes in tumor microenvironment influence cancer progression and metastasis. Vol. 91, *Journal of Molecular Medicine*. 2013. p. 431–7.
42. Whiteside TL. Immune modulation of T-cell and NK (natural killer) cell activities by TEXs (tumour-derived exosomes). In: *Biochemical Society Transactions*. 2013. p. 245–51.
43. Niu L, Song X, Wang N, Xue L, Song X, Xie L. Tumor-derived exosomal proteins as diagnostic biomarkers in non-small cell lung cancer. *Cancer Science*. 2019 Jan 1;110(1):433–42.
44. Li MY, Liu LZ, Dong M. Progress on pivotal role and application of exosome in lung cancer carcinogenesis, diagnosis, therapy and prognosis. Vol. 20, *Molecular Cancer*. BioMed Central Ltd; 2021.
45. Zhou L, Lv T, Zhang Q, Zhu Q, Zhan P, Zhu S, et al. The biology, function and clinical implications of exosomes in lung cancer. Vol. 407, *Cancer Letters*. Elsevier Ireland Ltd; 2017. p. 84–92.
46. Biswas SK, Mantovani A. Macrophages: Biology and Role in the Pathology of Diseases.
47. Varol C, Mildner A, Jung S. Macrophages: Development and tissue specialization. Vol. 33, *Annual Review of Immunology*. Annual Reviews Inc.; 2015. p. 643–75.
48. Hirayama D, Iida T, Nakase H. The phagocytic function of macrophage-enforcing innate immunity and tissue homeostasis. Vol. 19, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; 2018.
49. Hu K, Jin Y, Chroneos Z, Han X, Liu H, Lin L. Macrophage functions and regulation: Roles in diseases and implications in therapeutics. Vol. 2018, *Journal of Immunology Research*. Hindawi Limited; 2018.

50. Shapouri-Moghaddam A, Mohammadian S, Vazini H, Taghadosi M, Esmaeili SA, Mardani F, et al. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. Vol. 233, *Journal of Cellular Physiology*. Wiley-Liss Inc.; 2018. p. 6425–40.
51. Arora S, Dev K, Agarwal B, Das P, Syed MA. Macrophages: Their role, activation and polarization in pulmonary diseases. Vol. 223, *Immunobiology*. Elsevier GmbH; 2018. p. 383–96.
52. Snyder RJ, Lantis J, Kirsner RS, Shah V, Molyneaux M, Carter MJ. Macrophages: A review of their role in wound healing and their therapeutic use. *Wound Repair and Regeneration*. 2016 Jul 1;24(4):613–29.
53. Wang Y, Smith W, Hao D, He B, Kong L. M1 and M2 macrophage polarization and potentially therapeutic naturally occurring compounds. Vol. 70, *International Immunopharmacology*. Elsevier B.V.; 2019. p. 459–66.
54. Locati M, Mantovani A, Sica A. Macrophage Activation and Polarization as an Adaptive Component of Innate Immunity. In: *Advances in Immunology*. Academic Press Inc.; 2013. p. 163–84.
55. Yunna C, Mengru H, Lei W, Weidong C. Macrophage M1/M2 polarization. Vol. 877, *European Journal of Pharmacology*. Elsevier B.V.; 2020.
56. Najafi M, Hashemi Goradel N, Farhood B, Salehi E, Nashtaei MS, Khanlarkhani N, et al. Macrophage polarity in cancer: A review. Vol. 120, *Journal of Cellular Biochemistry*. Wiley-Liss Inc.; 2019. p. 2756–65.
57. Chen P, Bonaldo P. Role of Macrophage Polarization in Tumor Angiogenesis and Vessel Normalization. Implications for New Anticancer Therapies. In: *International Review of Cell and Molecular Biology*. Elsevier Inc.; 2013. p. 1–35.
58. Hedbrant A, Wijkander J, Seidal T, Delbro D, Erlandsson A. Macrophages of M1 phenotype have properties that influence lung cancer cell progression. *Tumor Biology*. 2015 Nov 1;36(11):8715–25.

59. Lin L, Lin H, Wang L, Wang B, Hao X, Shi Y. MiR-130a regulates macrophage polarization and is associated with non-small cell lung cancer. *Oncology Reports*. 2015 Dec 1;34(6):3088–96.
60. Yuan A, Hsiao YJ, Chen HY, Chen HW, Ho CC, Chen YY, et al. Opposite Effects of M1 and M2 Macrophage Subtypes on Lung Cancer Progression. *Scientific Reports*. 2015 Sep 24;5.
61. Zhang J, Cao J, Ma S, Dong R, Meng W, Ying M, et al. Tumor hypoxia enhances non-small cell lung cancer metastasis by selectively promoting macrophage M2 polarization through the activation of ERK signaling [Internet]. Vol. 5. 2014. Available from: www.impactjournals.com/oncotarget
62. Wu MF, Lin CA, Yuan TH, Yeh HY, Su SF, Guo CL, et al. The M1/M2 spectrum and plasticity of malignant pleural effusion-macrophage in advanced lung cancer. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2020 May 1;
63. Wu JY, Huang TW, Hsieh YT, Wang YF, Yen CC, Lee GL, et al. Cancer-Derived Succinate Promotes Macrophage Polarization and Cancer Metastasis via Succinate Receptor. *Molecular Cell*. 2020 Jan 16;77(2):213-227.e5.
64. Wang R, Zhang J, Chen S, Lu M, Luo X, Yao S, et al. Tumor-associated macrophages provide a suitable microenvironment for non-small lung cancer invasion and progression. *Lung Cancer*. 2011 Nov;74(2):188–96.
65. Li H, Huang N, Zhu W, Wu J, Yang X, Teng W, et al. Modulation the crosstalk between tumor-associated macrophages and non-small cell lung cancer to inhibit tumor migration and invasion by ginsenoside Rh2. *BMC Cancer*. 2018 May 22;18(1).
66. Goswami KK, Ghosh T, Ghosh S, Sarkar M, Bose A, Baral R. Tumor promoting role of anti-tumor macrophages in tumor microenvironment. Vol. 316, *Cellular Immunology*. Academic Press Inc.; 2017. p. 1–10.
67. Vinnakota K, Zhang Y, Selvanesan BC, Topi G, Salim T, Sand-Dejmek J, et al. M2-like macrophages induce colon cancer cell invasion via matrix

- metalloproteinases. *Journal of Cellular Physiology*. 2017 Dec 1;232(12):3468–80.
68. Korbecki J, Olbromski M, Dzięgiel P. Ccl18 in the progression of cancer. Vol. 21, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; 2020. p. 1–24.
 69. Pan Y, Yu Y, Wang X, Zhang T. Tumor-Associated Macrophages in Tumor Immunity. Vol. 11, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2020.
 70. Komohara Y, Fujiwara Y, Ohnishi K, Takeya M. Tumor-associated macrophages: Potential therapeutic targets for anti-cancer therapy. Vol. 99, *Advanced Drug Delivery Reviews*. Elsevier B.V.; 2016. p. 180–5.
 71. Yang L, Zhang Y. Tumor-associated macrophages: from basic research to clinical application. Vol. 10, *Journal of hematology & oncology*. 2017. p. 58.
 72. Cook J, Hagemann T. Tumour-associated macrophages and cancer. Vol. 13, *Current Opinion in Pharmacology*. Elsevier Ltd; 2013. p. 595–601.
 73. Beltraminelli T, de Palma M. Biology and therapeutic targeting of tumour-associated macrophages. Vol. 250, *Journal of Pathology*. John Wiley and Sons Ltd; 2020. p. 573–92.
 74. Yang Q, Guo N, Zhou Y, Chen J, Wei Q, Han M. The role of tumor-associated macrophages (TAMs) in tumor progression and relevant advance in targeted therapy. Vol. 10, *Acta Pharmaceutica Sinica B*. Chinese Academy of Medical Sciences; 2020. p. 2156–70.
 75. Medzhitov R, Janeway C. Immunological Reviews Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunological Reviews*. 2000;173:89–97.
 76. Abbas AK, Litchman AH, Pillai S. *Cellular and Molecular Immunology*. 7th Edition. 2012. undefined.
 77. Lee MS, Kim YJ. Signaling pathways downstream of pattern-recognition receptors and their cross talk. Vol. 76, *Annual Review of Biochemistry*. 2007. p. 447–80.

78. Rasmussen SB, Reinert LS, Paludan SR. Innate recognition of intracellular pathogens: Detection and activation of the first line of defense. Vol. 117, *APMIS*. 2009. p. 323–37.
79. Patel RM, Lin PW. Developmental biology of gut-probiotic interaction. Vol. 1, *Gut Microbes*. Landes Bioscience; 2010. p. 186–95.
80. Rakoff-Nahoum S, Medzhitov R. Toll-like receptors and cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2009 Jan 4;9(1).
81. Wolska A, Lech-Marańda E, Robak T. Toll-like receptors and their role in carcinogenesis and anti-tumor treatment. Vol. 14, *Cellular and Molecular Biology Letters*. BioMed Central Ltd.; 2009. p. 248–72.
82. Sato Y, Goto Y, Narita N, Hoon DSB. Cancer cells expressing toll-like receptors and the tumor microenvironment. In: *Cancer Microenvironment*. 2009.
83. Basith S, Manavalan B, Yoo TH, Kim SG, Choi S. Roles of toll-like receptors in Cancer: A double-edged sword for defense and offense. *Archives of Pharmacal Research*. 2012 Aug 1;35(8).
84. Pinto A, Morello S, Sorrentino R. Lung cancer and Toll-like receptors. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2011 Sep 26;60(9).
85. Srinivasan S, Su M, Ravishankar S, Moore J, Head PS, Dixon JB, et al. TLR-exosomes exhibit distinct kinetics and effector function. *Scientific Reports*. 2017 Mar 14;7.
86. Liu Y, Gu Y, Han Y, Zhang Q, Jiang Z, Zhang X, et al. Tumor Exosomal RNAs Promote Lung Pre-metastatic Niche Formation by Activating Alveolar Epithelial TLR3 to Recruit Neutrophils. *Cancer Cell*. 2016 Aug 8;30(2):243–56.
87. Li X, Wang S, Zhu R, Li H, Han Q, Zhao RC. Lung tumor exosomes induce a pro-inflammatory phenotype in mesenchymal stem cells via NF κ B-TLR signaling pathway. *Journal of Hematology and Oncology*. 2016 Apr 18;9(1).
88. Arigo Biolaboratories Exosome Isolation [Internet]. [cited 2021 Jul 1]. Available from: <https://www.arigobio.cn/news/exosome-isolation>


89. Choi DY, You S, Jung JH, Lee JC, Rho JK, Lee KY, et al. Extracellular vesicles shed from gefitinib-resistant nonsmall cell lung cancer regulate the tumor microenvironment. *Proteomics*. 2014;14(16):1845–56.
90. Lemjabbar-Alaoui H, Hassan OU, Yang Y-W, Buchanan P. Lung cancer: Biology and treatment options. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*. 2015 Dec;1856(2).
91. Jung JH, Lee MY, Choi DY, Lee JW, You S, Lee KY, et al. Phospholipids of tumor extracellular vesicles stratify gefitinib-resistant nonsmall cell lung cancer cells from gefitinib-sensitive cells. *Proteomics*. 2015 Feb 1;15(4):824–35.
92. Evans M. Lung cancer: needs assessment, treatment and therapies. *British Journal of Nursing*. 2013 Sep 26;22(Sup17).
93. Zhu L, Sun HT, Wang S, Huang SL, Zheng Y, Wang CQ, et al. Isolation and characterization of exosomes for cancer research. Vol. 13, *Journal of Hematology and Oncology*. BioMed Central Ltd; 2020.
94. Xiao X, Yu S, Li S, Wu J, Ma R, Cao H, et al. Exosomes: Decreased sensitivity of lung cancer A549 cells to cisplatin. *PLoS ONE*. 2014 Feb 21;9(2).
95. Akoto T, Saini S. Role of exosomes in prostate cancer metastasis. Vol. 22, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; 2021.
96. Dong H, Wang W, Chen R, Zhang Y, Zou K, Ye M, et al. Exosome-mediated transfer of lncRNA-SNHG14 promotes trastuzumab chemoresistance in breast cancer. *International Journal of Oncology*. 2018 Sep 1;53(3):1013–26.
97. Mohan A, Agarwal S, Clauss M, Britt NS, Dhillon NK. Extracellular vesicles: Novel communicators in lung diseases. Vol. 21, *Respiratory Research*. BioMed Central; 2020.
98. Liu H, Dong H, Jiang L, Li Z, Ma X. Bleomycin inhibits proliferation and induces apoptosis in TPC-1 cells through reversing M2-macrophages polarization. *Oncology Letters*. 2018 Sep 1;16(3):3858–66.
99. Chen L, Yang Y, Huang C, Cao P, Wu Q, Chen S, et al. [Human THP-1 macrophages activated by exosomes derived from lung adenocarcinoma cells

promote lung cancer cell invasion]. *Xi bao yu fen zi mian yi xue za zhi* = Chinese journal of cellular and molecular immunology [Internet]. 2019;35(11):967–72. Available from: <http://europepmc.org/abstract/MED/31878991>

100. Linton SS, Abraham T, Liao J, Clawson GA, Butler PJ, Fox T, et al. Tumor-promoting effects of pancreatic cancer cell exosomes on THP-1-derived macrophages. *PLoS ONE*. 2018 Nov 1;13(11).
101. Yang C, Dou R, Wei C, Liu K, Shi D, Zhang C, et al. Tumor-derived exosomal microRNA-106b-5p activates EMT-cancer cell and M2-subtype TAM interaction to facilitate CRC metastasis. *Molecular Therapy*. 2021 Jun;29(6).
102. Bardi GT, Smith MA, Hood JL. Melanoma exosomes promote mixed M1 and M2 macrophage polarization. *Cytokine*. 2018 May 1;105:63–72.
103. He W, Liu Q, Wang L, Chen W, Li N, Cao X. TLR4 signaling promotes immune escape of human lung cancer cells by inducing immunosuppressive cytokines and apoptosis resistance. *Molecular Immunology*. 2007 Apr;44(11).
104. Matsumoto Y, Kano M, Murakami K, Toyozumi T, Suito H, Takahashi M, et al. Tumor-derived exosomes influence the cell cycle and cell migration of human esophageal cancer cell lines. *Cancer Science*. 2020 Dec 1;111(12):4348–58.

8. EKLER

EK-1: Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul İzinleri



T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı : 16969557 - 331
Konu : 02.02.2021

Doç. Dr. Hande CANPINAR
Kanser Enstitüsü
Temel Onkoloji Anabilim Dalı
Öğretim Üyesi

Sayın Doç. Dr. CANPINAR,

Kurulumuza değerlendirilmek üzere sunduğunuz GO 21/197 kayıt numaralı ve *"Akciğer Kanseri Hücrelerinden Salınan Eksozomların Makrofaj Polarizasyonuna ve Fonksiyonlarına Etkisinin Araştırılması"* başlıklı proje Kurulumuzun 02.02.2021 tarihli toplantısında değerlendirilmiş olup, çalışmanın satın alınmış ticari hücre hatları üzerinde tamamlanacağı görülmüştür. Gönüllü insanlar üzerinde gerçekleştirilecek nitelikte olmayan bu tip çalışmalar Etik Kurulların kapsamı dışında kalmaktadır.

Bu yazı ilgili protokolün etik açıdan incelendiğini belirtmek için Etik Kurul kararı yerine geçmek üzere hazırlanmıştır.

Prof. Dr. Ayşe Lale DOĞAN
Başkan

EK _____ :
Toplantı Katılım Tutanağı.

Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
06100 Sıhhiye-Ankara
Telefon: 0 (312) 305 1082 • Faks: 0 (312) 310 0580 • E-posta: goetik@hacettepe.edu.tr

Ayrıntılı Bilgi için: _____

EK-2: Tez Çalışması Orijinallik Raporu

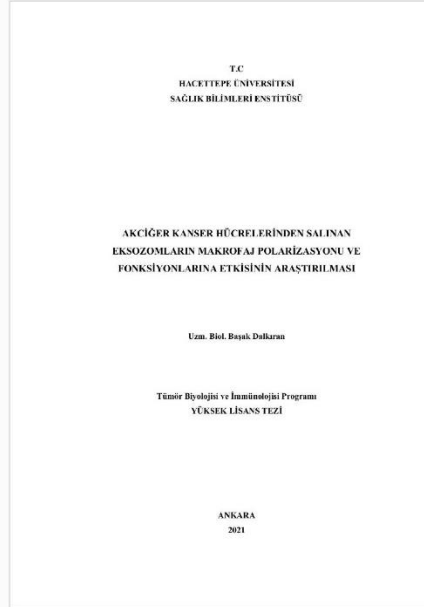


Digital Receipt

This receipt acknowledges that Turnitin received your paper. Below you will find the receipt information regarding your submission.

The first page of your submissions is displayed below.

Submission author: Başak Dalkıran
Assignment title: tez sınav sonrası
Submission title: AKCİĞER KANSER HÜCRELERİNDEN SALINAN EKSOZOMLARI...
File name: Ba_ak_Dalk_ran_Tez_S_nav_Sonras.pdf
File size: 2.03M
Page count: 63
Word count: 10,050
Character count: 70,272
Submission date: 14-Jul-2021 11:10AM (UTC+0300)
Submission ID: 1619473421



AKCİĞER KANSER HÜCRELERİNDEN SALINAN EKSOZOMLARIN MAKROFAJ POLARİZASYONU VE FONKSİYONLARINA ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

ORJİNALLİK RAPORU

%8	%6	%3	%4
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	www.tip.hacettepe.edu.tr İnternet Kaynağı	%2
2	www.journalagent.com İnternet Kaynağı	%1
3	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	%1
4	openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<%1
5	Submitted to TechKnowledge Turkey Öğrenci Ödevi	<%1
6	"Sözlü Sunum Özetleri / Abstracts Of Oral Presentations", Turkish Journal of Biochemistry, 2015 Yayın	<%1
7	Submitted to Anadolu University Öğrenci Ödevi	<%1

9.ÖZGEÇMİŞ