İLAYDA MEMİŞ

İMMUNOLOJİ ANA BİLİM DALI YÜKSEK LİSANS TEZİ

2025

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIP FAKÜLTESİ
İMMUNOLOJİ ANA BİLİM DALI

ÜÇLÜ NEGATİF MEME KANSERİNDE (ÜNMK) MAGNEZYUMUN TÜMÖR-İLİŞKİLİ MİYELOİD HÜCRELERE ETKİSİ

İLAYDA MEMİŞ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

BURSA-2025

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIP FAKÜLTESİ
İMMUNOLOJİ ANA BİLİM DALI

ÜÇLÜ NEGATİF MEME KANSERİNDE (ÜNMK) MAGNEZYUMUN TÜMÖR-İLİŞKİLİ MİYELOİD HÜCRELERE ETKİSİ

İlayda MEMİŞ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

DANIŞMAN:
Doç. Dr. Diğdem YÖYEN ERMİŞ

BURSA-2025

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK BEYANI

Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum"ÜÇLÜ NEGATİF MEME KANSERİNDE (ÜNMK) MAGNEZYUMUN TÜMÖR-İLİŞKİLİ MİYELOİD HÜCRELERE ETKİSİ"adlı çalışmanın, proje safhasından sonuçlanmasına kadar geçen bütün süreçlerde bilimsel etik kurallarına uygun bir şekilde hazırlandığını ve yararlandığım eserlerin kaynaklar bölümünde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir ve beyan ederim.

İlayda MEMİŞ
Tarih ve İmza

TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU

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

Adı Soyadı: İlayda MEMİŞ
Anabilim Dalı: İmmunoloji
Tez Konusu: Üçlü negatif meme kanserinde magnezyumun, tümörle ilişkili miyeloid hücreler aracılığıyla T hücre aktivasyonuna etkileri

ÖZELLİKLER	UYGUNDUR	UYGUN DEĞİLDİR	AÇIKLAMA
Tezin Boyutları	■	❑	
Dış Kapak Sayfası	■	❑	
İç Kapak Sayfası	■	❑	
Kabul Onay Sayfası	■	❑	
Sayfa Düzeni	■	❑	
İçindekiler Sayfası	■	❑	
Yazı Karakteri	■	❑	
Satır Aralıkları	■	❑	
Başlıklar	■	❑	
Sayfa Numaraları	■	❑	
Eklerin Yerleştirilmesi	■	❑	
Tabloların Yerleştirilmesi	■	❑	
Kaynaklar	■	❑	

DANIŞMAN ONAYI

Doç.Dr.Diğdem YÖYEN ERMİŞ

İmza:

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN……II
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE III
TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU IV
İÇİNDEKİLER V
TÜRKÇE ÖZET VI
İNGİLİZCE ÖZET VII
1. GİRİŞ 1
2. GENEL BİLGİLER 3
2.1. Meme Kanserinin Tanımı 3
2.2. Üçlü Negatif Meme Kanseri ve Alt Tipleri 5
2.3. Meme Kanseri Tanı ve Tedavi Yöntemleri 8
2.4. Meme Kanseri Görülme Sıklığı ve Ölüm Oranları 9
2.5. Meme Kanseri Metastazı 12
2.6. Meme Kanseri Tümör Mikroçevresi 15
2.7. Miyeloid Hücrelerin Meme Kanserindeki Rolü 21
2.8. Kanserde İyon Dengesi 28
2.9. Magnezyum ve Kanser 29
2.10. Magnezyumun ve İmmün Sistem 31
3. GEREÇ VE YÖNTEM 39
3.1. Deneylerde Kullanılan Malzemeler 39
3.2. Yöntem 40
3.2.1. Hücrelerin kültürlenme süreçleri 40
3.3. Hücrelerin Ko-Kültürü 41
3.3.1. MTT (3- (4, 5-dimetiltiyazol-2-il) -2, 5-difeniltetrazolyum bromür, atetrazol) yöntemiyle canlılık tayini 41
3.4. *İn Vivo* Balb/c Dişi Farelere Yapılan Deneyler 42
3.4.1. 8 haftalık balb/c dişi farelere yapılan magnezyum klorür enjeksiyonu 42
3.4.2. 8 haftalık BALB/C dişi farelere yapılan 4T1 meme kanseri hücresinin ve magnezyum klorür enjeksiyonu 43
3.4.3. Sakrifiye edilen farelerin kemik iliğinden hücre izolasyonu ve fenotip karakterizasyonu 43
3.4.4. Sakrifiye edilen farelerin kan örneklerinden mononükleer hücre izolasyonu ve fenotip karakterizasyonu 44
3.4.5. Sakrifiye edilen farelerin dalaklarından splenosit izolasyonu ve fenotip karakterizasyonu 45
3.4.6. Farelerin dalaklarından izole edilen splenositlerin floresan aktive hücre ayırma cihazı (*fluorescence-activated cell sorting*, FACS) ile ayrıştırılması 47
3.4.7. Farelerin dalaklarından izole edilen splenositlerin CFSE işaretlenmesi ve fenotip karakterizasyonu 48
3.4.8. Farelerin tümörlerinden hücre izolasyonu ve immünofenotiplendirmesi 48
4. BULGULAR 50
4.1. Üçlü Negatif Meme Kanseri, Mikroglia/Makrofaj ve Fibroblast Hücre Hatlarının Magnezyum Klorür ile Kültürledikten Sonra MTT (3- (4,5-Dimetiltiyazol-2-il) -2, 5-difeniltetrazolyum bromür, atetrazol) Yöntemiyle Canlılık Analizi 50
4.2. Sağlıklı BALB/C Farelere $MgCl_2$ Uygulaması Sonrası Lenfosit ve Miyeloid Hücre Değişimi 53

4.2.1. Magnezyum klorür enjeksiyonu sonrası lenfosit belirteçlerinin yüzdesi 53
4.2.2. Magnezyum klorür enjeksiyonu sonrası miyeloid hücre belirteçlerinin yüzdesi 55
4.2.3. 4T1 ÜNMK meme kanser modelinde magnezyum klorür enjeksiyonu 62
4.2.4. 4T1 ÜNMK meme kanser modelinde magnezyum klorür enjeksiyonu sonrası hayvan ağırlıkları 62
4.2.5. 4T1 ÜNMK meme kanser modelinde magnezyum klorür enjeksiyonu sonrası dalak ağırlık ve boyutları 63
4.2.7. 4T1 ÜNMK meme kanser modelinde magnezyum klorür enjeksiyonu ile değişiklik gösteren MDSC alt-grupları 66
4.2.8. 4T1 ÜNMK meme kanser modelinde magnezyum klorür enjeksiyonu sonrası gelişen M-MDSC ve G-MDSC hücrelerinin baskılama kapasitesinin CFSE yöntemi ile değerlendirilmesi 69
4.2.9. 4T1 ÜNMK meme kanser modelinde magnezyum klorür enjeksiyonu sonrası gelişen M-MDSC ve G-MDSC hücrelerinin lenfositler üzerine baskılama kapasitesinin CFSE yöntemi ile değerlendirilmesi 71
4.2.10. 4T1 ÜNMK meme kanser modelinde magnezyum klorür enjeksiyonu sonrası gelişen M-MDSC ve G-MDSC hücrelerinin splenositler üzerine baskılama kapasitesinin CFSE yöntemi ile değerlendirilmesi 73
5. TARTIŞMA VE SONUÇ 77
6. KAYNAKLAR 84
7. SİMGELER VE KISALTMALAR 93
8. EKLER 95
9. TEŞEKKÜR 97
10. ÖZGEÇMİŞ 98

TÜRKÇE ÖZET

Üçlü negatif meme kanseri (ÜNMK), hormonal ve HER2 reseptörlerinin ekspresyonunun bulunmadığı, invaziv ve tedaviye dirençli bir alt tiptir. Bu tümörlerde mikroçevre, genellikle artmış PD-L1 ekspresyonu ve $CD8^+$ T hücre infiltrasyonu ile karakterize immün baskılayıcı bir yapıya sahiptir. Myeloid kaynaklı baskılayıcı hücreler (MDSC), bu ortamda T hücre yanıtlarını baskılayarak tümör progresyonunu destekler. MDSC'lerin immün regülasyondaki kritik rolleri, bu hücreleri hedefleyen tedavileri önemli hale getirmektedir.

Bu çalışmada, $MgCl_2$ formundaki magnezyumun MDSC'ler ve lenfositler üzerindeki etkileri in vitro, ex vivo ve in vivo düzeylerde incelenmiştir. BV-2, N9 ve Raw 264.7 miyeloid hücre hatlarında $MgCl_2$'nin seçici sitotoksik etkisi gösterilmiş; $MgCl_2$ varlığında 4T1 meme kanseri hücrelerinin proliferasyonunun azaldığı gözlemlenmiştir. Ex vivo kültürlerde splenosit canlılığı ve proliferasyonu artmıştır. Sağlıklı farelerde düşük (30 mg/kg) ve yüksek (60 mg/kg) doz uygulamaları, miyelopoezi artırmış ve $CD4^+/CD8^+$ T hücre oranlarını etkilemiştir.

4T1 tümör modelinde yüksek doz ve tümör sonrası $MgCl_2$ uygulamaları sağ kalımı anlamlı şekilde artırmıştır. Bu gruptan izole edilen MDSC alt grupları, T hücrelerini baskılamak yerine proliferasyonlarını desteklemiştir. Sonuçlar, $MgCl_2$'nin MDSC fonksiyonlarını yeniden programlayarak anti-tümöral bağışıklığı güçlendirebileceğini göstermektedir.

Anahtar kelimeler: Üçlü negatif meme kanseri, Magnezyum Klorür, Miyeloid kökenli baskılayıcı hücreler, T hücreler, baskılama kapasitesi, proliferasyon

İNGİLİZCE ÖZET

THE EFFECT OF MAGNESIUM ON TUMOR-ASSOCIATED MYELOID CELLS IN TRIPLE NEGATIVE BREAST CANCER (TNBC)

Triple-negative breast cancer (TNBC) is an invasive and treatment-resistant subtype characterized by the absence of hormonal and HER2 receptor expression. Its tumor microenvironment (TME) often exhibits an immunosuppressive structure with increased PD-L1 expression and $CD8^+$ T cell infiltration. Myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) contribute to this suppressive milieu by inhibiting T cell responses, thereby promoting tumor progression. Given their pivotal role in immune regulation, targeting MDSCs is considered a promising immunotherapeutic strategy.

This study investigates the selective effects of magnesium in the form of $MgCl_2$ on MDSCs and lymphocytes at in vitro, ex vivo, and in vivo levels. $MgCl_2$ showed selective cytotoxicity in myeloid cell lines (BV-2, N9, Raw 264.7), and its presence reduced the proliferation and survival of 4T1 breast cancer cells in co-culture. Ex vivo cultures revealed enhanced splenocyte viability and proliferation. In healthy mice, low (30 mg/kg) and high (60 mg/kg) doses of $MgCl_2$ induced myelopoiesis, increased neutrophil precursors, and modulated $CD4^+$/$CD8^+$ T cell distributions.

In vivo experiments using the 4T1 tumor model demonstrated that high-dose, post-tumoral $MgCl_2$ administration significantly improved survival. M-MDSC and G-MDSC subsets isolated from these animals supported, rather than suppressed, T cell proliferation. These findings indicate that $MgCl_2$ not only inhibits tumor growth but also reprograms MDSC phenotype and function to promote anti-tumor immune responses.

Overall, the study suggests that magnesium modulates MDSC function in a dose- and timing-dependent manner, potentially opening new avenues for immunotherapy in TNBC.

Keywords: Triple-negative breast cancer, Magnesium Chloride, Myeloid-derived suppressor cells, T cells, suppressive capacity, proliferation

BUÜ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TEZ KONUSUNUN KÜRESEL SÜRDÜRÜLEBİLİR KALKINMA HEDEFLERİ İLE İLİŞKİSİ



Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum"Üçlü Negatif Meme Kanserinde (ÜNMK) Magnezyumun Tümör-İlişkili Miyeloid Hücrelere Etkisi"başlıklı tez 2.ve 3. Küresel Sürdürülebilir Kalkınma Hedefleri ile ilişkilidir.

Anahtar kelimeler aşağıdaki bağlantı üzerinden https://incites.help.clarivate.com/Content/Resources/Docs/SDG2023.xlsx seçilme

1. GİRİŞ

Meme kanseri, farklı alt tipleri olan heterojen bir neoplazmdır. Bu alt tipler genellikle hormon reseptörlerinin immünohistokimyasal ekspresyonuna dayanarak östrojen reseptörü pozitif (ER +), progesteron reseptörü pozitif (PR +), insan epidermal büyüme faktörü reseptörü pozitif (HER2 +) ve bahsedilen reseptörlerden herhangi birinin ekspresyonunun olmaması ile karakterize edilen üçlü negatif meme kanseri olmak üzere dört farklı kategoriden oluşmaktadır (Orrantia-Borunda E. ve ark. 2022).

Üçlü negatif meme kanseri, invaziv meme kanserinin yaklaşık %15'ini oluşturur (Sukumar J. ve ark. 2021). Üçlü negatif meme kanserinde (ÜNMK), tümör mikroçevresi genelde PD-L1 ekspresyonunun arttığı ve CD8+T hücre infiltrasyonunun görüldüğü bir immün manzara sergiler (Deepak KGK. ve ark. 2020). MDSC'ler, tümör mikroçevresinde T hücresi aracılı bağışıklık yanıtlarını baskılayarak tümör progresyonuna katkıda bulunan immün regülatör hücrelerdir (Zheng H. ve ark. 2021). Farelerde, miyeloid soy belirteci CD11b ve granülositik belirteç Gr1'i ifade eder. M-MDSC'ler, daha düşük Gr1 ifadesi seviyelerine sahiptken Ly6C'yi (CD11bLy6G+−/Ly6C) yüksek seviyede eksprese ederler, PMN-MDSC'ler daha yüksek Gr1 seviyelerine sahiptir ve Ly6G'yi (CD11b+Ly6G/Ly6C++low) yüksek seviyede eksprese eder (Kalathil SG. Ve ark. 2021). LFA-1, CD11a ve CD18 etkileşimi ile hücre adhezyonunu sağlayan ve T hücre Reseptör (T Cell Receptor, TCR) sinyal iletiminin doğru şekilde gerçekleşmesini sağlar. Mg^{2+}'nın CD18 ve CD11a üzerinde bulunan metal iyonuna bağımlı adezyon bölgelerine (Metal Ion Dependent Adhesion Zone, MIDAS) bağlanması ile konformasyonel değişiklikleri etkilediği ve TCR sinyalizasyonunda görev aldığı bildirilmiştir (Walling BL. ve ark. 2018).

Yüksek etkili bir dergide yayınlanan bir çalışmada Mg^{2+}'nin, lenfosit fonksiyonu üzerindeki kritik etkisi gösterilmiştir. Lenfosit ile ilişkili antijen 1 (Lymphocyte Function-Associated Antigen 1, LFA-1) olarak adlandırılan ve CD8 + T-lenfositler üzerinde bulunan bu hücre yüzey proteininin düzgün çalışması ve sinyalin CD8+ T hücreye doğru iletilmesi için Mg^{2+}'un elzem olduğu bulunmuştur (Ashique, S ve ark. 2023). Çalışmamız kapsamında MDSC'lerin T hücreyi baskılamasındaki magnezyum

klorürün etkisi değerlendirildi. Ayrıca magnezyumun dozu ve uygulama zamanlamasının (post ve pre tedavi) tümör boyutu, fare ağırlıklarına ve farelerde sağkalıma etkisi tespit edildi.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Meme Kanserinin Tanımı

Meme kanseri kadınlarda en sık görülen malignitedir (Giaquinto AN ve ark.2022). GLOBOCAN 2020'de dünya çapındaki kanser vakaları arasında 2, 26 milyon kişinin meme kanseri tanısı aldığını (%11, 7) ve meme kanserine bağlı ölümlerin ise %6, 9 olduğunu bildirmiştir (Chhikara, B. S. ve ark. 2022).

Meme kanseri, çevresel, hormonal, genetik ve çeşitli yaşam tarzı ve beslenme faktörlerini içeren multifaktöriyel bir hastalık olması nedeniyle hastalar çeşitli klinik, patolojik ve moleküler özellikler göstermektedir. Meme kanserinin moleküler alt tipleri, östrojen reseptörü (*Estrogen Receptors*, ER), progesteron reseptörü (*Progesterone Receptor*, PR) ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2'nin (*Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*, HER2) ekspresyon profiline göre sınıflandırılmaktadır (Obidiro O. ve ark. 2023).

Son yıllarda bu sınıfların da yetersiz kaldığı tartışılmakta olup, 2013 St. Gallen Uluslararası Meme Kanseri Konferansı, meme kanseri moleküler alt tiplerinin yeni bir tanımını yayınladı. Tanımlanan alt tipler arasında ER+ ve/veya PR+ ile karakterize edilen immünohistokimyasal boyama sonuçlarını göre HER negatif olan ve düşük Ki67 ifade eden alt tip luminal A, düşük seviyede ER+ ve/veya PR+ ifade eden immünohistokimyasal boyama sonuçlarını göre yüksek Ki67 ifadesine sahip olan ve HER2+ ve/veya HER2- olarak görülebilen luminal B, diğer alt tiplere göre daha agresif olan HER2+, ER-, PR- ve HER- olarak karakterize edilen bazal benzeri üçlü negatif meme kanseri ve diğer özel alt tipler (klasik meme kanserlerinden farklı histolojik özellikler gösteren adenoid kistik, metaplastik, medüller, osteoklastik dev hücreli, müsinöz, nöroendokrin ve tübüler karsinomlar nadir meme kanseri alt grupları) yer almaktadır (Lin Y. ve ark. 2020).

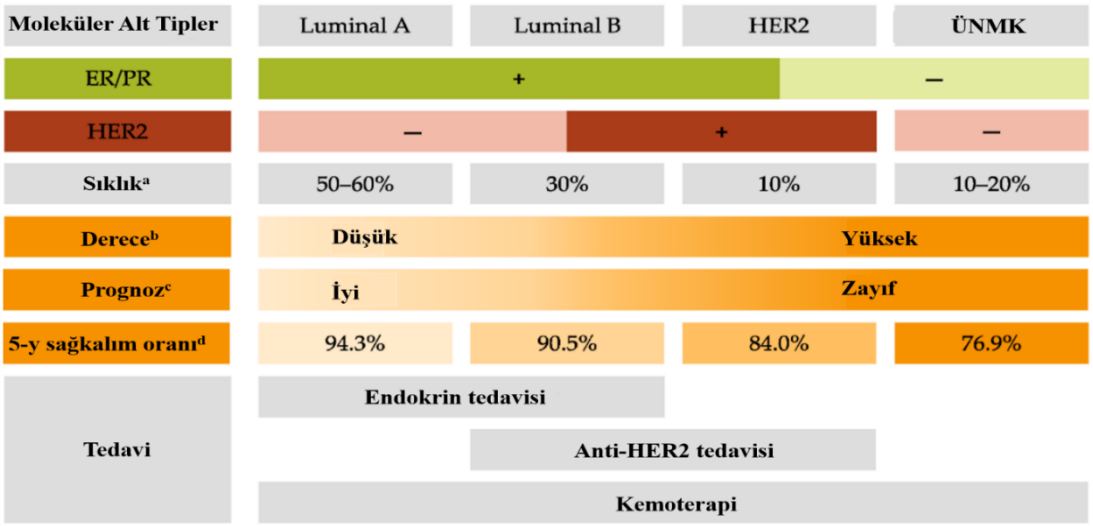
Meme kanseri moleküler alt tiplerinin %10-20' sini üçlü negatif meme kanseri oluşturmaktadır (Fan, Y. ve ark. 2022). ÜNMK, ER, PR ve HER2 geninin aşırı ekspresyonu ile tanımlanan çeşitli meme kanserlerini içeren heterojen bir tümör grubudur (da Silva, J ve ark. 2020). Üçlü negatif meme kanseri metastaz olasılığının yüksek olan, spesifik hedef ve hedefe yönelik tedavi olanaklarının bulunmadığı en agresif meme kanseri alt tipidir. Benzersiz tümör mikroçevresi (*Tumor Microenvironment*, TME) ile karakterize olan üçlü negatif meme kanseri diğer meme

kanseri alt tiplerden oldukça farklıdır (Deepak, K. G. K ve ark. 2020). İmmün yanıta katkısına göre, tümör mikroçevresi TME immünsüpresif veya immünoreaktif olarak sınıflandırılabilir (Zheng H. ve ark.2021).

Meme kanseri histolojik tipleri, doğal seyri, klinik davranışları ve tedaviye yanıtı açısından çeşitlilik gösteren bir hastalıktır. 2000' li yıllarda etkili tedavi olarak ER ve PR gibi hormon reseptörlerini eksprese eden hastalığın alt grupları için anti-HER2 tedavisi başarılı olmuştur ve meme kanserleri ER ifadelerine göre sınıflandırılmıştır (Derakhshan F. ve ark. 2022).

Meme kanseri, farklı alt tipleri olan heterojen bir neoplazmdır. Bu alt tipler genellikle hormon reseptörlerinin immünohistokimyasal ekspresyonuna dayanarak ER+, PR +, HER2+ ve bahsedilen reseptörlerden herhangi birinin ekspresyonunun olmaması ile karakterize edilen üçlü negatif meme kanseri olmak üzere dört farklı kategoriden oluşmaktadır (Orrantia-Borunda E. ve ark. 2022) (Şekil 1).

Meme kanserine duyarlılık proteinleri tip 1 (*Breast Cancer Susceptibility*, BRCA) ve BRCA2 gibi zararlı mutasyonları içeren kalıtsal faktörler, meme kanseri vakalarının %10' unu oluşturur dolayısıyla çoğu vaka dış etkenlerin sebep olduğu risk faktörlerinden kaynaklanır. Değiştirilebilir risk faktörleri arasında fiziksel hareketsizlik, obezite ve alkol tüketimi yer alırken, değiştirilemeyen risk faktörleri arasında mamografik yoğunluk, aile öyküsü, hormonal değişiklikler ve çocuklukta iyonlaştırıcı radyasyona maruz kalma yer alır (Kan LL-Y ve ark. 2023) (Şekil 1' de görüldüğü gibi).



Şekil 1. Meme kanseri moleküler alt tiplerinin özellikleri (Burguin A. ve ark. 2021).

Alt tipler arasında mutasyon yükü açısından önemli farklar mevcuttur. Luminal A alt tipi, en düşük mutasyon oranına sahipken, bazal benzeri ve HER2E alt tiplerinde en yüksek mutasyon oranı gözlemlenmiştir. Luminal A alt tipi, en sık fosfatidilinositol-4, 5-bifosfat 3-kinaz katalitik alt birim alfa (*Phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha*, PIK3CA) mutasyonu (% 45) ile öne çıkarken, Luminal B kanserinde tümör protein 53 (*Tumor Protein 53*, TP53) ve PIK3CA mutasyonları yaygındır. Bazal benzeri alt tipte yüksek sıklıkta TP53 mutasyonu (% 80) ve PIK3CA mutasyonları (%9) bulunmaktadır. HER2E alt tipi ise yüksek anöploidi, somatik mutasyon oranı ve terapötik hedeflerin DNA amplifikasyonunu gösterir.

Ayrıca, luminal tümörler çoğunlukla diploidken, Luminal B tümörleri çoğunlukla anöploidtir. Bazal benzeri alt tipte yüksek miyelositomatozis (*MYelocytomatosis*, MYC) aktivasyonu ve kromozom 8q24 amplifikasyonu görülmektedir. Genetik değişiklikler arasında ataksi-telanjiektazi gen (*Ataxia-Telangiectasia Mutated*, ATM) mutasyonu, BRCA1, BRCA2, Retinoblastom (*Retinoblastoma*, RB1) mutasyonları ve siklin E1 amplifikasyonu da bulunmaktadır. Bu bulgular, meme kanseri alt tipleri arasında önemli bir mutasyon yükü farkı olduğunu ve bunun klinik, terapötik ve biyolojik etkileri olabileceğini göstermektedir (Goff SL. ve ark. 2021).

2.2. Üçlü Negatif Meme Kanseri ve Alt Tipleri

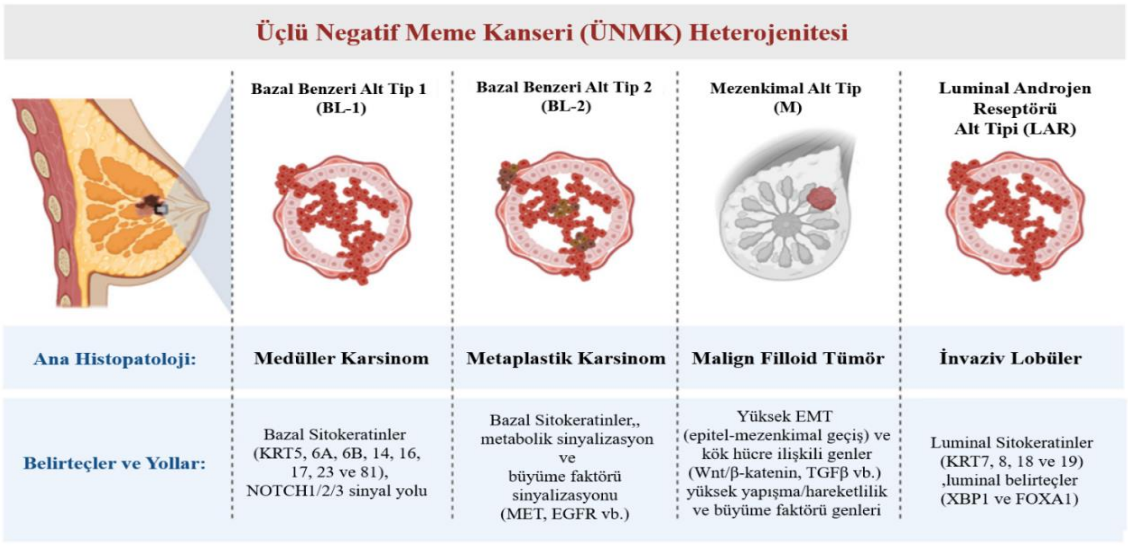
Üçlü negatif meme kanseri, invaziv meme kanserinin yaklaşık %15' ini oluşturur. ÜNMK, östrojen reseptörü/progesteron reseptörü ve HER2 ekspresyonunun olmaması ile tanımlanır. ÜNMK, premenopozal kadınlarda ve zararlı BRCA1 veya BRCA2 mutasyon taşıyıcılarında daha yaygındır. ÜNMK'nın diğer meme kanseri alt tiplerine göre prognozu kötüdür (Sukumar J. ve ark. 2021) (Hubalek M. ve ark. 2017).

2011 yılında, Lehmann ve ark. ÜNMK' nın altı moleküler alt tipini 587 ÜNMK örneğinin transkriptom profil analizi yoluyla bildirmiştir. Daha önceden kategorize edilen alt tipler ile Lehmann' ın bildirdiği alt tipler karşılaştırıldığında, bazal benzeri 1 (*Basal-Like 1*, BL1) ve 2, immünomodülatör (*Immunomodulators*, IM) ve mezenkimal (mesenchymal, M) tipleri bazal benzeri tiplere karşılık gelir, mezenkimal kök hücre benzeri (*Mesenchymal Stem Like*, MSL) tipi normal benzeri tipe benzer ve luminal androjen reseptörü (*Luminal Androgen Receptor*, LAR), luminal veya HER2 alt tipinin bir kısmı ile ortak özellikleri taşır (Lee YM. Ve ark. 2020).

Bağımsız DNA ve RNA seviyesi analizlerine dayanan fikir birliğine göre ÜNMK'nın bazal benzeri immün aktive edilmiş (*Basal-Like İmmune-Activated*, BLIA) (%20-30), bazal benzeri immün baskılanmış (*Basal-Like İmmune-Suppressed*, BLIS) (%25-40), luminal androjen reseptörü (*Luminal Androgen Receptor*, LAR) (%15-25) ve mezenkimal (%15-20) olarak kategorize edilen en az dört ana moleküler alt tipten oluştuğudur (Asleh K. ve ark. 2022).

BL1 alt tipi, hücre döngüsü ve hücre bölünmesi bileşenleri ve yollarının zenginleşmesiyle karakterizedir. BL1 alt tipindeki çoğalma yolları, artmış DNA hasar yanıtı (ATR/BRCA) yollarıyla birlikte görülmektedir. Bu alt tipin çoğalma özellikleri, immünohistokimyasal boyamalar ile yüksek Ki67 mRNA ekspresyonu gözlenmiştir. BL2 alt tipi ise büyüme faktörü sinyal yollarını (EGF, NGF, MET, Wnt/β-katenin ve IGF1R) ve ayrıca glikoliz ve glukoneojenezi içermektedir. Benzer şekilde, BL2 alt tipi EGFR, MET ve EPHA2 gibi büyüme faktörü reseptörlerinin benzersiz bir zenginleşmesine sahiptir (Hubalek M. ve ark. 2017) (Şekil 1' de görüldüğü gibi).

M alt tipi metaplastik meme kanseri olarak adlandırılır bunun sebebi yüksek oranda aktive edilmiş hücre göçü ile ilgili sinyal, hücre dışı matris-reseptör etkileşim yollarına ve farklılaşma yollarına sahip olmasıdır. M alt tipi, sarkom benzeri veya skuamöz epitel hücre benzeri doku özelliklerine sahiptir ve kemoterapötik ilaçlara direnç geliştirebilir. Bu nedenle, M-alt tipi hastalar mTOR inhibitörleri veya epitelyal-mezenkimal geçişi hedefleyen ilaçlarla tedavi edilebilir (Yin L. ve ark. 2020) (Şekil 2' de görüldüğü gibi).



Şekil 2. Üçlü meme kanseri alt tiplerindeki ana histopatoloji, belirteçler ve sinyal yollarının farklılıkları

(Mahmoud R. ve ark. 2022).

İM alt tipi, yüksek immün yanıt ve düşük M2 benzeri makrofajlarla bazal-zenginleştirilmiş olarak tanımlanan tümörleri içeren bir gruptur. Diğer alt tiplerden farklı olarak İM alt tipinde, bağışıklık hücresi gelişimde yer alan genlerin bol miktarda ifade edilir. İM alt tipinin zenginleştirilmiş gen kümeleri, bağışıklık hücresi sinyali, sitokin sinyali, antijen sunumu ve bağışıklık nükleer faktör kappa B (*Nuclear Factor kappa B*, NF-Kb), Janus kinazlar (*Janus kinases,* JAK) sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon proteinlerinin aktivatörü yolu (S*ignal Transducer And Activator Of Transcription Proteins,* STAT) ve tümör nekroz faktörü (*Tumor Necrosis Factor,* TNF) sinyali iletim yolunu içerir. Bu alt tip stromanın histolojik bulgularında lenfositik infiltrasyon görülür ve ÜNMK' ya ait diğer alt tiplere göre daha iyi bir prognoza sahiptir (Lee YM ve ark. 2020).

MSL alt tipi, epitelyal mezenkimal geçiş (*Epithelial-Mesenchymal Transition,* EMT) belirteçleri için yüksek zenginleştirme, bağışıklık tepkisi ile ilişkili genler ve kanser kök hücresi benzeri özellikleri taşır (Lehmann ve ark. 2011). MES alt tipi, düşük hücre döngüsü düzenleyicisi ve DNA onarım geni ekspresyonu, yüksek immün sinyal ve insülin benzeri büyüme faktörü (*Insulin-like growth factor,* IGF) ekspresyonu ve osteositler ve adipositler ile ilişkili genlerin anormal ekspresyonunu gösterir. Bu bulgular aynı zamanda düşük claudin eksprese eden (*Claudin Low,* CL) alt tip ile benzerliği de temsil eder (Lee YM ve ark. 2020).

2016' da Lehmann ve ark. tarafından yapılan güncellemede İM alt grubu BL1 ve BL2' ye dahil edilirken MSL alt tipi M alt tipine dahil edildi (Lehmann, B. D. ve ark. 2016).

LAR meme kanseri tipinde immünhistokimya tekniğiyle ER ekspresyonun negatif olduğu tespit edilse de östrojenle ilişkili genlerin yüksek ekspresyonu (örneğin FOXA1, GATA3, PGR ve XBP1), PIP, MUC1 ve artmış androjen reseptör sinyali ile karakterize edilirler. Gen ifadesi temelinde kullanılan PAM50 sınıflandırma çeşitleri ile LAR tipi meme kanserinin bazal olmadığı ER+ ve HER2+ özelliklere sahip olduğu tespit edilmiştir. Klinik öncesi ÜNMK modellerinde androjen sinyalizasyonunu hedeflenmiş olsa da, tamamlanan faz I/II çalışmaları bugüne kadar ÜNMK'da androjenleri hedef alan ajanlarla sınırlı etkinlik göstermiştir (Asleh K. ve ark. 2022) (Şekil 2' de görüldüğü gibi).

2.3. Meme Kanseri Tanı ve Tedavi Yöntemleri

Meme kanserli hastaların tanı, tedavi planlaması ve evrelemesinde tanısal görüntüleme ve görüntü kılavuzluğunda iğne biyopsileri merkezi bir rol oynamaktadır. Ayrıca görüntüleme seçimi her hasta için bireyselleştirilmelidir ve yaşlarına, lezyonların özelliklerine göre de değişkenlik göstermelidir (Shah R. ve ark. 2014).

Meme kanseri görüntüleme şekillerinden biri olan mamografi, memenin röntgen resmidir. Dijital mamografi bazı meme tarama hizmetlerinde konvansiyonel (film ekran) mamografinin yerini almıştır. Manyetik rezonans görüntüleme (*Magnetic Resonance Imaging*, MRG) ise zararlı radyasyon uygulanmasını gerektirmeden yüksek çözünürlüklü görüntüler üreten güçlü bir görüntüleme aracıdır. Memenin kanser dokularını aydınlatan radyoaktif bir izleyici kullanılan teknik ise moleküler meme görüntüleme (*Molecular Breast Imaging*, MBI) tekniğidir. Bu teknik Miraluma testi, sestamibi testi, sintimamografi veya spesifik gama görüntüleme olarak da adlandırılabilir. Meme kanseri teşhisi için tek kesin yöntem olarak kullanılan biyopsi tekniğinin birkaç farklı türü vardır.

Tanısal doğruluğu artırmak ve mümkün olduğunca çok sayıda yanlış negatif sonucu ortadan kaldırmak için klinik meme muayenesi, meme görüntüleme ve biyopsi aynı anda yapılır. HER-2/neu tespit testi için de protein ekspresyonunu belirlemek için bir araç olarak antikorları kullanan immünohistokimyasal boyama tekniği ve floresan etiketli DNA problarının denatüre kromozomal DNA'ya hibridizasyonu yoluyla spesifik kromozomların veya kromozomal bölgelerin varlığını tanımlamak için kullanılan FISH tekniği kullanılır. Kan bazlı tahliller ile de meme biyobelirteçlerinden CA 15-3, karsinoembriyonik antijen (CEA) ve CA 27-29 varlığını değerlendirilir (Nounou MI. Ve ark. 2015).

Tedavi seçimi, kişiselleştirilerek derece, evre ve meme kanseri moleküler alt tipine göre değişkenlik gösterir. Genelde kullanılan tedavi yaklaşımları memenin total eksizyonu (mastektomi) olup lumpektomi de tercih edilmektedir. Lumpektomi, meme tümörünün çevreleyen normal doku ile birlikte tümörün alınmasıdır. Çalışmalar, total mastektomi ve lumpektomiyi takiben ışınlamanın nükssüz ve genel sağkalım (*Overall Survival*, OS) açısından eşdeğer olduğunu göstermektedir (Burguin A. ve ark. 2021). Diğer etkili tedavilerden olan radyasyon tedavisi sadece lokal kontrolü iyileştirmekle kalmaz, hastaları lokal nüksten korur, aynı zamanda uzak metastazların oluşumunu

önleyerek sağkalımı da artırır (Jagsi R. ve ark. 2014). MK kemoterapisi, alkilleyici ajanlar, antimetabolitler ve tübülin inhibitörleri dahil olmak üzere çeşitli sitotoksik ilaç ailelerini içerir (Burguin A. ve ark. 2021).

Adjuvan kemoterapi, cerrahiye uygun meme kanseri olan kadınlarda nüks ve ölüm riskini önemli ölçüde azaltmaktadır. Bir taksanın, antrasiklin içeren bir rejime eklenmesi, antrasiklin tedavisinden sonra veya onunla eşzamanlı olarak, nüks riskini daha da azaltmaktadır. Cerrahiye uygun meme kanseri için doksorubisin ve siklofosfamid ile her 3 haftada bir dört döngü alan hastaların, dört döngü paclitaxel almaları da yeni bir tedavi standardı oluşturmuştur. Bir diğer çalışma ise, doksorubisin ve siklofosfamid ile birlikte yapılan doksetakselin, florourasil, doksorubisin ve siklofosfamidden daha etkili olduğunu göstermiştir (Sparano JA. ve ark. 2008).

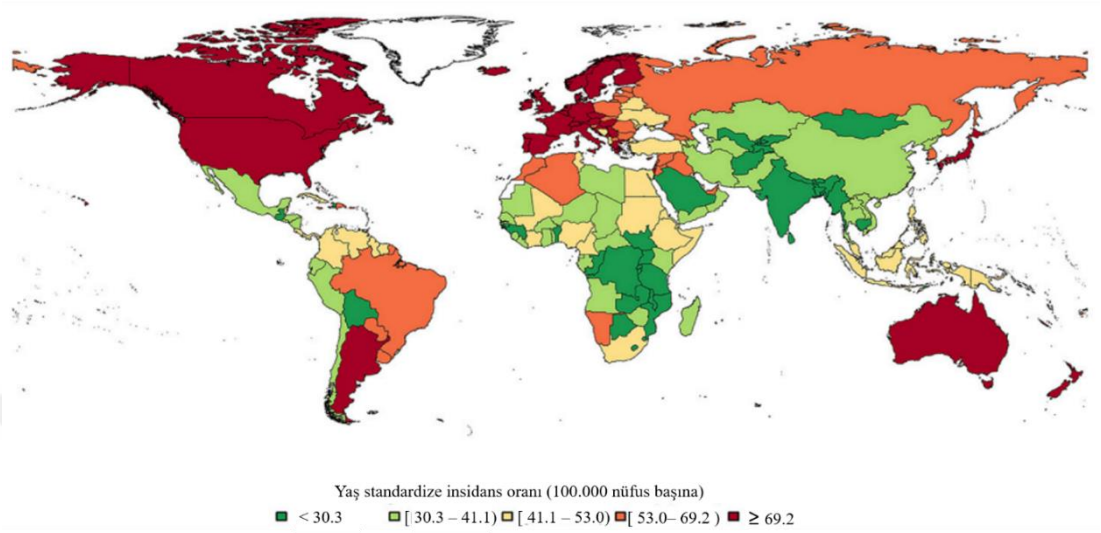
Neoadjuvan kemoterapi (*Neoadjuvant Chemotherapy*, NAC) ise operasyon öncesi sistemik tedavidir. Başlarda NAC, lokal olarak ilerlemiş veya ameliyat edilemeyen meme kanseri olan hastalar için tümör boyutunu küçültmek amaçlı kullanılmış olsa da günümüzde erken evre, ameliyat edilebilir meme kanseri olan hastalarda da kullanılmaktadır. Ulusal Cerrahi Adjuvan Meme ve Bağırsak Projesi (NSABP) ve Avrupa Kanser Araştırma ve Tedavi Örgütü (EORTC) çalışmaları, neoadjuvan (cerrahi öncesi) ve adjuvan (cerrahi sonrası) kemoterapilerin etkinliğini karşılaştırmıştır. Ulusal Cerrahi Adjuvan Meme ve Bağırsak Projesi B-18 çalışmasında doksorubisin ve siklofosfamid kombine yaklaşımı (adriamycin plus vincristine, AC) kullanılmış. Yapılan çalışmada cerrahi öncesi kemoterapinin tümör boyutunu küçültmede etkili olduğu gösterilirken genel sağkalımda anlamlı bir fark oluşturmadığı sonucuna varılmıştır (Asaoka M. ve ark. 2020).

2.4. Meme Kanseri Görülme Sıklığı ve Ölüm Oranları

2019 yılında Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tahminlerine göre, kanser 183 ülkenin 112' sinde 70 yaşından önceki ölüm nedenleri arasında birinci veya ikinci sırada yer alırken diğer 23 ülkede ise üçüncü veya dördüncü sırada yer almaktadır. Birçok ülkede inme ve koroner kalp hastalığına bağlı ölüm oranlarındaki belirgin düşüşler kansere bağlı ölümlerin daha hızlı gerçekleşmesini kısmen yansıtmaktadır (Sung H. ve ark. 2020).

En son Küresel Kanser İstatistikleri (GLOBOCAN) 2020 tahminlerine göre, kadın MK yaklaşık 2,3 milyon yeni vaka ile küresel olarak en yüksek insidansa sahip kanser

türü olarak akciğer kanserinin önüne geçmektedir. Son otuz yılda, MK için yeni vakaların sayısı ve yaşa göre standardize edilmiş oranlar artan eğilimler göstermektedir (Azadnajafabad S. ve ark. 2023).

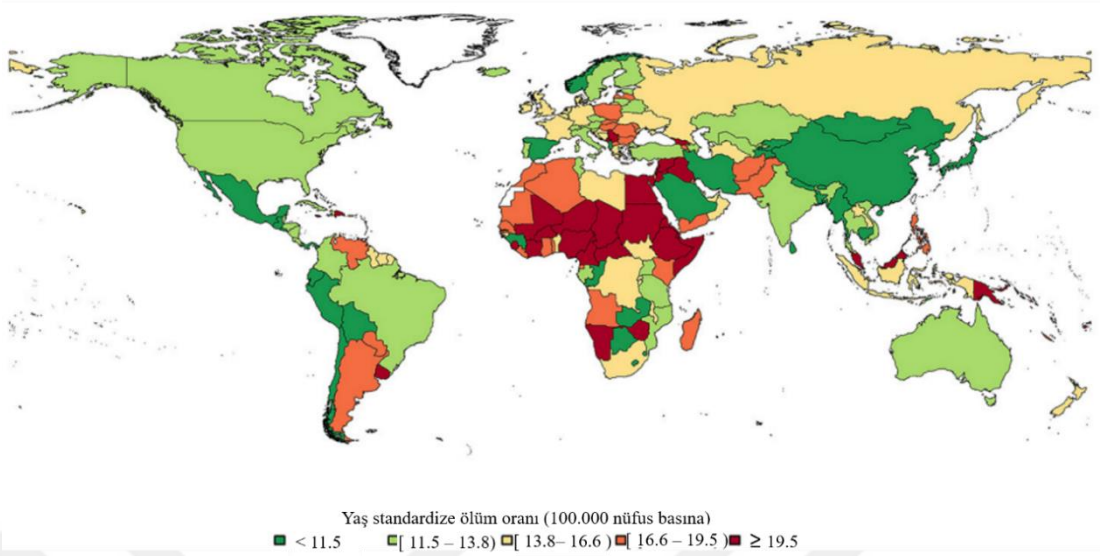


Şekil 3. Meme kanserinin küresel dağılımını gösteren yaşa göre standardize edilen insidansı gösterilmektedir (Azadnajafabad S. ve ark. 2023).

2020 yılında küresel olarak 2.261.419 (95% UI: 2.244.260–2. 278.710) yeni kadın meme kanseri vakası görüldü. Ham insidans oranı, 100. 000 kişi başına 58,5 ve tüm yaşlar için kümülatif risk %7,97 olarak hesaplandı. Meme kanseri, 2020 yılında 684. 996 kişinin (675.493 – 694.633) ölümüne yol açtı; ham mortalite oranı 17,7 iken kümülatif ölüm riski %3, 14' tü.

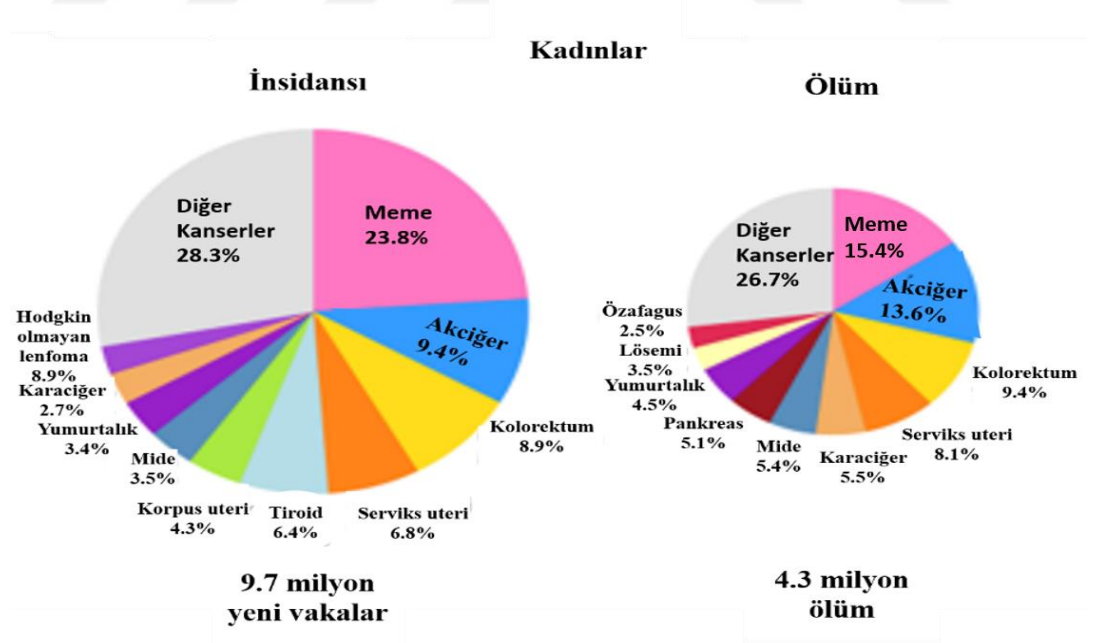
Meme kanseri yaş standardize edilmiş insidans oranı en yüksek olduğu WHO bölgeleri Avrupa (69,7), ardından Amerika kıtası (68,0) iken, en düşük yaş standardize edilmiş insidans oranı Güneydoğu Asya' da (28,3) ve Afrika' da (38,7) kaydedildi. Meme kanseri yaş standardize edilmiş mortalite oranı en yüksek Afrika'da (19,1) ve Doğu Akdeniz'de (17,7), en düşük ise Batı Pasifik' te (10,5) ve Güneydoğu Asya'da (12,9) idi (Şekil 3).

Kıtalara göre en yüksek ve en düşük yaş standardize edilmiş insidans oranı sırasıyla Kuzey Amerika (89,4) ve Asya (36,8) iken, en yüksek yaş standardize edilmiş mortalite oranı Afrika' da (19,4) ve en düşük Asya' da (11,9) idi (Şekil 3' de görüldüğü gibi) (Şekil 4' de görüldüğü gibi).

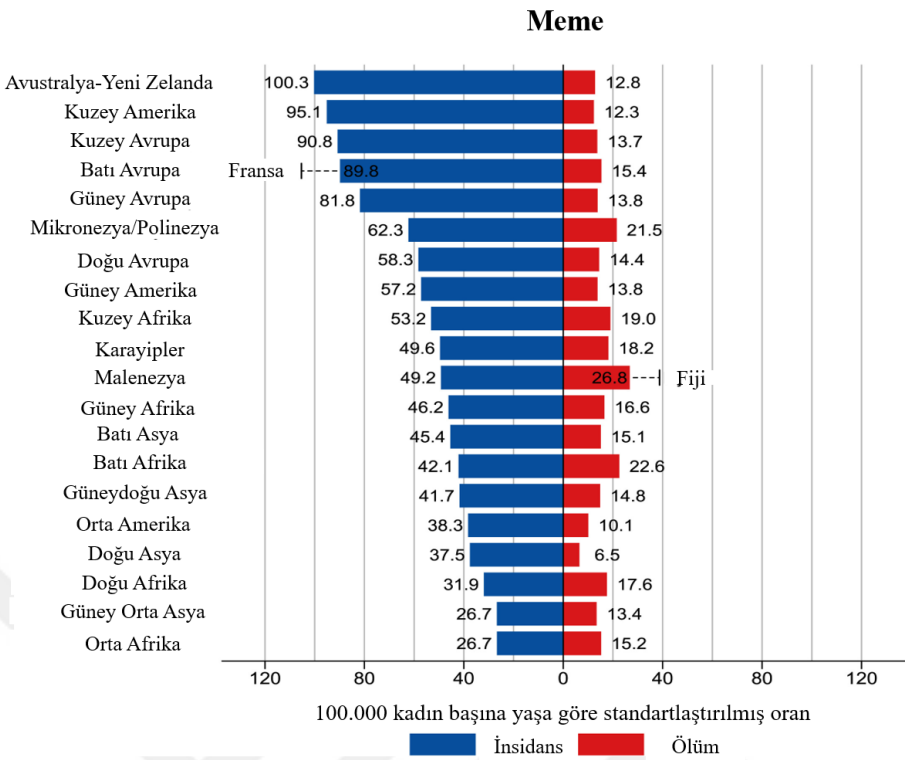


Şekil 4. Meme kanserinin küresel dağılımını gösteren yaşa göre standardize edilen mortalitesi gösterilmektedir (GLOBOCAN 2022).

GLOBOCAN 2022' ye göre kadınlarda en sık teşhis edilen ve kanser ölümlerinin önde gelen nedeni meme kanseridir bunu hem kanser vakaları hem de ölümler için akciğer ve kolorektal kanser izlemektedir (Azadnajafabad S. ve ark. 2023) (Şekil 5' de görüldüğü gibi).



Şekil 5. Kadınlarda ilk beş kanser için vaka ve ölümlerin dağılımını içeren pasta grafiği görüntüsü (GLOBOCAN 2022).



Şekil 6. 2022'de kadın meme kanseri için bölgeye özgü insidans ve mortalite yaşa göre standardize edilmiş oranların çubuk grafiği (GLOBOCAN 2022).

Dünya çapında kadınlarda her dört kanser vakası ve altı kanser ölümünden biri olan meme kanserinin en yüksek insidans oranları Fransa' dadır. Avustralya/Yeni Zelanda, Kuzey Amerika ve Kuzey Avrupa Güney - Orta Asya ve Orta Afrika'dan dört kat daha yüksek insidans oranına sahiptirler (Şekil 5). Gelişmiş ülkelerde yaşayan kadınlar, gelişmekte olan ülkelerindekilere kıyasla önemli ölçüde daha yüksek insidans oranlarına sahip olsalar da (sırasıyla 100.000' de 54, 1'e karşı 30,8), önemli ölçüde daha düşük ölüm oranlarına sahiptirler (sırasıyla 100.000' de 11.3 'e karşı 15. 3). En yüksek ölüm oranları Melanezya' da bulunur. Fiji, Batı Afrika ve Mikronezya/ Polinezya ile birlikte dünyanın en yüksek ölüm oranına sahiptir (Şekil 6’ da görüldüğü gibi) (Bray F. ve ark. 2022).

2.5. Meme Kanseri Metastazı

Bir hücrenin invazyon, ekstravazasyon ve ikincil konuma göç ederek tümörojeniteyi tamamladığı karmaşık süreç metastaz olarak adlandırılır (Lawson JC. ve ark. 2009).

Steven Paget, 120 yıldan daha uzun bir süre önce önerdiği”tohum ve toprak”teorisiyle tümörlerin rastgele olmayan yayılmasını metastatik tümör

hücrelerini”tohuma”ve organ mikro çevresini”toprağa”benzeterek açıklamıştır. Günümüze kadar yapılan çok sayıda çalışma bu hipotezi doğrulamaktadır. 1970' lerde, Fidler ve Kripke deneysel metastaz deneylerinde, tümör hücrelerinin tüm organların damar sistemine ulaşabilmesine rağmen, metastazların sadece belirli organlarda geliştiğini gösterdi ve metastaz sonucunun tümör hücreleri ile konak doku arasındaki çapraz konuşmaya bağlı olduğunu göstermişlerdir (Witzel I. Ve ark. 2016).

Bu süreçte kanser kök hücrelerinin (*Cancer Stem Cell,* CSC) rolü önemli olup, metastazı indüklemek için gerekli olan tümörojenik, invaziv ve migrasyon özelliklerine sahip olmaları nedeniyle tümör büyümesini başlatabilen tek hücre alt kümesidir ve böylece metastatik sürece dahil olabilir (Lawson JC. ve ark. 2009)(Şekil 7’ de görüldüğü gibi).

Meme kanserinin önlenmesi, saptanması ve adjuvan tedavisindeki ilerlemelere rağmen, hastaların büyük bir kısmı ya ilk muayenelerinde (%5) ya da tedavi sırasında (%30) metastatik hastalık tanısı almaktadır. Metastatik meme kanseri genelde tedavi edilemez ve konvansiyonel kemoterapiler, hastaların çoğunda sadece semptomları hafifletici etkilere sahiptir. Bu başarısızlık, meme kanserinin alt tiplere (örneğin luminal veya bazal hastalık) sınıflandırılmasını sağlayan meme kanserinin içsel heterojenliği de dahil olmak üzere çoklu biyolojik mekanizmalarla ilişkilendirilmiştir (Mego M. ve ark. 2010).

Epigenetik gen ekspresyonu veya kromozomal stabilitedeki kalıtsal değişiklikler olarak tanımlanır. İnsanlarda dokuya özgü gen ekspresyonunun normal gelişimi ve sürdürülmesi için epigenetik mekanizmalar gereklidir. Epigenetik değişiklikler meme kanseri metastazı ile yakından ilişkilidir. Meme kanserindeki epigenetik anormallikler, hücresel durumu normalden kötü huylu hale getirerek tümör başlangıcına, ilerlemesine ve metastaza yol açabilir. Önemli epigenetik değişiklikler arasında DNA metilasyonu, asetilasyon ve hedef genlerin histon modifikasyonları yer alır.

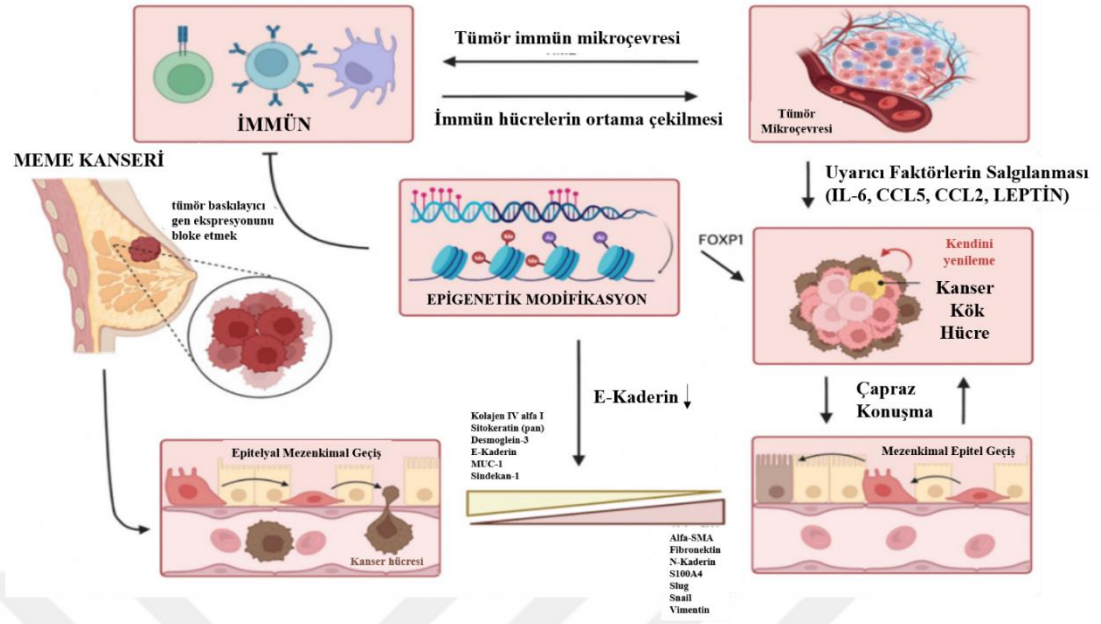
Epitel özelliklerine sahip hücrelerin mezenkimal hücrelere dönüşümü kanser metastazında yer alan ana mekanizma olup ‘’ epitelyal mezenkimal geçiş ’’ olarak adlandırılır. Mezenkimal hücreler epitel hücrelerine veya diğer hücrelere yeniden farklılaşabilir. Epitelyal mezenkimal geçiş (*Epithelial-Mesenchymal Transition* , EMT) ve mezenkimal epitelyal geçiş (*Mesenchymal Epithelial Transition,* MET), yara iyileşmesi, fibroz ve tümör ilerlemesi boyunca meydana gelir. EMT hem bir

organizma içinde gelişmekte olan hücre popülasyonlarında normal artan farklılaşma sürecinde hem de kanser hücreleri maligniteye ilerledikçe göç etmesinde ve aktif hale gelmesinde rol oynar (Park M. ve ark. 2022).

Primer meme TME' sinin bir diğer önemli bileşeni, hem pro hem de anti-tümör aktivitesini ortaya çıkarabilen bağışıklık hücreleridir. Meme TME' sinde çeşitli bağışıklık hücreleri bulunur fakat en yaygın olanı makrofajlardır. Makrofajlar, anti-tümör (M1) veya pro-tümör (M2) olarak meme TME' de ikili rol oynar. M1 makrofajları, MK eliminasyonuna katkıda bulunan antitümör aktiviteye sahip proinflamatuar sitokinler üretirken, M2 makrofajları MK ilerlemesini destekleyen anti-inflamatuar sitokinler üretir, genellikle TAM' lar olarak isimlendirilen bu hücreler M2 fenotipindedir.

Ayırt edici hücre yüzeyi belirteçleri CD163, CD206, CD209, CD200R, CD301, IgG' nin Fc fragmanları, C-tipi lektin alanları, ısı şoku proteinleri olarak tanımlanır. TAM' ların, epidermal büyüme faktörü-1 (*Epidermal Growth Factor*, EGF-1), Transforme edici büyüme faktörü beta (*Transforming Growth Factor Beta*, TGF-β), interlökin 6 (*Interleukin 6*, IL-6), interlökin 10 (*Interleukin 10*, IL-10) ve Tümör Nekroz Faktörü (*Tumor Necrosis Factor*, TNF-α) salgılayarak primer tümör hücrelerinin dolaşıma kaçışını teşvik eder ve bu da EMT' yi destekleyerek kanser hücrelerinin sağkalımını, invazivliği ve çevredeki vaskülatüre göçü arttırır.

Meme tümörleri, M2 makrofaj oluşumunu uyararak veya programlanmış hücre ölümü-1 ligandı (*Programmed Cell Death-1 Ligand*, PD-L1) ekspresyonunu artırarak bağışıklık aracılı eliminasyondan da kaçınabilir (Terceiro LEL. ve ark. 2021) (Şekil 7' de görüldüğü gibi).



Şekil 7. Meme kanserinin metastazında hücre adezyonu, epitel-mezenkimal geçiş, anjiogenez, bağışıklık sisteminden kaçış ve tümör mikroçevresinin etkileri (Park M. ve ark. 2022).

2.6. Meme Kanseri Tümör Mikroçevresi

Meme kanserinde tümör mikroçevresi (TME), hücresel, çözünür ve fiziksel bileşenlerden oluşmakta olup, tümörün memede ve uzak bölgelerde ilerlemesinde enzimler, sitokinler ve büyüme faktörleri gibi bu çözünür ve fiziksel faktörler önemli rol oynamaktadır (Tablo 2' de görüldüğü gibi).

Hücresel bileşenler lokal (intratümöral), bölgesel (meme) ve metastatik bölmelere ayrılabilir. Tümör hücrelerinin biyolojik özelliklerini ifade eden lokal kompartman lenfositler, plazma hücreleri, dendritik hücreler, makrofajlar ve nötrofiller dahil olmak üzere tümöre sızan inflamatuar hücreleri içerir. Peritümöral alan, tümör hücreleri ile stromadaki bitişik hücreler olan stromal fibroblastlar, miyoeptiel hücreler, adipositler, endotelyal ve vasküler/lenfatik endotel hücreler arasındaki etkileşimi ifade eder. Metastatik kompartman, lenf nodlarındaki ve uzak organlardaki metastatik bölgeler olarak ifade edilir ve yeni TME oluşturur (Li JJ. ve ark. 2021) (Tablo 1' de görüldüğü gibi).

BİLEŞENLER	LOKAL	BÖLGESEL	METASTATİK
Hücresel Bileşenler	Tümör hücreleri Tümör hücreleri Lenfositler T-hücreleri Yardımcı T-hücreleri Sitotoksik T-hücreleri Düzenleyici T-hücreleri Foliküler yardımcı T hücreleri B-hücreleri Plazma hücreleri Makrofajlar Nötrofiller Dendritik hücreler Plazmasitoid dendritik hücreler	Fibroblastlar Fibroblastlar Adipositler Miyoepitelyal hücreler Endotel hücreleri Kılcal Damarlar Lenfatikler	Lenf düğümü Bağışıklık hücreleri Lenfatikler Kan Periferik bağışıklık hücreleri Uzak organlar Kemik (osteoklastlar) Akciğer (alveolar makrofajlar)
Çözünür Faktörler		Matris yeniden şekillendirme enzimleri Lizil oksidaz Matris metalloproteinaz Sitokinler İnterferon-γ İnterlökinler Tümör nekroz faktörü Makrofaj koloni uyarıcı faktör Büyüme faktörleri Dönüştürücü büyüme faktörü-β Vasküler endotelyal büyüme faktörü	
Diğer		pH Oksijen seviyeleri	

Tablo 1. Meme Kanserinin Tümör Mikroçevresi (Li JJ. ve ark. 2021'den esinlenerek oluşturulmuştur)

Karsinogenez sürecindeki immün gözetimden kaçış tümör mikroçevresinde başlayıp, periferde (dalak, kemik iliği, kan ve metastatik organ) de oldukça etkili olduğu için kanser hücreleri uygun koşullarda metastaz sürecine katılabilmektedir (Janssen vd., 2017, Blomberg vd., 2018). Meme kanseri biyolojisinde immün sistemin hem tümör büyümesini ilerletici hem de engelleyici etkisi iç içe geçmiş karmaşık bir süreçtir. Tümör ve immün sistem arasındaki bu ilişki; tümörün algılanıp, baskılanması şeklinde olabileceği gibi genetik avantaja sahip tümör hücrelerinin tanınamayıp, immün sistemden kaçmaları hatta, immün sistemi kendi çıkarları doğrultusunda kullanmaları şeklinde de gerçekleşebilmektedir. Bu çift taraflı etki; immün sistem hücreleri, kanser hücreleri, stromal hücreler ve soluble faktörler arasındaki etkileşim sonucu oluşmaktadır (Cimino-Mathews vd., 2015).

‘’ 3E Kuralı ’’ olarak açıklanmaya çalışılan bu mekanizma eleminasyon (elemination), denge (equilibrium) ve kaçış (escape) aşamalarından oluşmaktadır (Dunn vd., 2004). İmmün sistem tarafından tanınabilen kanser hücre klonları öldürülürken (eleminasyon), hayatta kalabilen klonlar ve immün sistem hücreleri bir süre dengede kalmaktadır (equilibrium). Bu kanser hücre klonları daha dirençli fenotipte olup, immün sistemi pro-tümör yönde farklılaştırarak veya baskılayarak immün kaçış mekanizmaları (escape) geliştirmektedirler (Dunn vd., 2004, Kim vd., 2007).

Eliminasyon, dönüştürülmüş hücrelerin kansere karşı güçlü bir bağışıklık tepkisini aktive edebilen yetkin bir bağışıklık sistemi tarafından yok edilmesiyle gerçekleşen immünosürveyans olarak da adlandırılan ilk aşamadır. Eliminasyon fazından kurtulan tümör hücreleri ve bağışıklık hücreleri karşılıklı olarak birbirlerini şekillendirmesi ise denge fazında gerçekleşir. Genetik olarak kararsız ve hızla mutasyona uğrayan tümör hücreleri ve bağışıklık sistemi arasında bir denge kurulur. Eliminasyona karşı direnç kazanmış tümör hücresi varyantları sürecin son adımı olan kaçış aşamasına girer.

Kaçış fazı ise immünosupresif bir süreç olup TME'nin gelişmesi ile karakterize edilir (Salemme V. ve ark. 2021). Genelde eleminasyon aşamasında anti-tümör immün yanıtlar için CD8+ sitotoksik T lenfositler (*cytotoxic T cells*, CD8+T Hücresi), doğal öldürücü hücreler (*Natural Killer*, NK) ve M1 tip makrofajlar etkili rol oynamaktadırlar. Aynı zamanda eleminasyon aşamasında yüksek oranda salgılanan IFN-γ sitokini ile makrofajların M1 yönünde polarize olduğu ve IL-12, IL-23, IL-6 ve TNF-a gibi sitokinleri salgıladıkları bilinmektedir (Dunn vd., 2004, Kim vd., 2007). Fakat, makrofajlar ortamda gelişen immün yanıt sonucu M2 makrofajlara da polarize olabilmekte ve tümör ilişkili makrofajlar (*Tumor associated macrophages*, TAM) olarak nitelendirilen bu hücreler tümörün büyümesini destekleyebilmektedirler (Allavena vd., 2008). Bu hücreler genel olarak IL-4 ve IL-13 gibi sitokinlerle polarize olmakta ve pro-tümörijenik özellik kazanıp, yüksek oranda IL10, TGF-b salgılamaktadırlar (Allavena vd., 2008). Ayrıca, CD8+ sitotoksik T hücrelerin aktivasyonunu engelleyip, CD4+ hücrelerin düzenleyici T (*Regulatory T*, Treg) hücrelerine dönüşümünü de desteklemektedirler (Elliott vd., 2017, Awad vd., 2018).

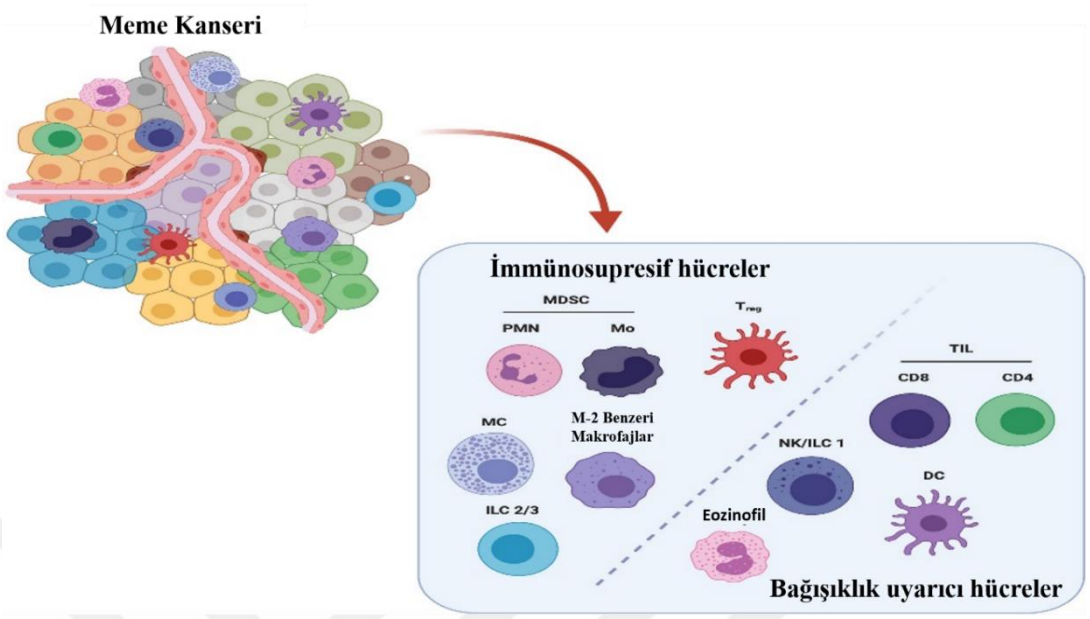
Eleminasyon aşamasında salgılanan en güçlü anti-tümör sitokinlerden olan IFN-

γ’ ya karşı kanser hücreleri ve özellikle TAM’ların bazı alt grupları ‘ adaptif direnç ’ (Kursunel ve Esendagli, 2016) denilen bir mekanizma geliştirmekte ve üzerlerinde PD-L1 baskılayıcı ligandını yüksek düzeylerde ifade etmeye başlamaktadırlar. Tümörde bulunan CD8+ T hücreler de IFN-γ sitokini ile belirli düzeylerde aktifleşirken, eş zamanlı olarak üzerlerinde PD-L1’ in reseptörü olan PD-1’ i taşımaya başlamaktadırlar. Bu reseptör ligand etkileşiminin tümör mikroçevresinde bulunması tümöre saldırmak üzere infiltre olmuş CD8+ T hücrelerini yanıtsızlaştırmaktadır (Kursunel ve Esendagli, 2016, Elliott vd., 2017, Yoyen-Ermis vd., 2019).

Peranzoni ve diğerlerinin çalışmasında tümör mikroçevresine infiltere olabilen CD8+ T hücre varlığının olduça az olduğu, bu nedenle tek başına anti-PD-1 tedavisinin yeterli olamayacağı, ek olarak tümör mikroçevresine CD8+ T hücrelerin infitrasyonunu arttırıcı stratejilerin de kullanılması gerektiği vurgulanmıştır. Fare kanser modelinde tümörle ilgili makrofajları hedeflemek için CD115 (*Colony-Stimulating Factor-1 Receptor*, CSF-1R) inhibitörü uygulandığında, CD8+ T hücrelerin tümörlü bölgeye infiltrasyonunun arttığı gösterilmiştir (Peranzoni vd., 2018). Ayrıca, CD115+ TAM hücrelerinin kanser hücre migrasyonunda etkili olduğu ve metastazı desteklediği gösterilmiştir. Bu hücreler, kanser hücrelerine hayatta kalma sinyali iletmekte, VEGF aracılı vasküler geçirgenliği, anjiyo ve lenfanjiyogenezi uyarmaktadırlar (Lin vd., 2007, Lin ve Pollard, 2007, Blomberg vd., 2018).

İmmün düzenleme sürecinde yer alan doğuştan gelen ve adaptif immün hücre popülasyonlarının aktivitesine dayanarak, immün hücreler immünosupresif ve immüno-uyarıcı hücreler olmak üzere iki alt sınıfa ayırabilirler (Salemme V. ve ark. 2021). Miyeloid hücreler arasında miyeloid kaynaklı baskılayıcı hücreler (*Myeloid Derived Supressor Cell*, MDSC), tümörle ilişkili nötrofiller (*Tumor-Associated Neutrophils*,TAN 'lar), tümörle ilişkili makrofajlar (*Tumor-Associated Macrophages*, TAM' lar), dendritik hücreler (*Dendritic Cells*, DC' ler), mast hücreleri (*Mast Cells* , MC' ler) vb. bulunur.

Sitotoksik efektör fonksiyonlara sahip doğuştan gelen lenfoid hücrele olan doğal öldürücü (*Natural Killer*, NK) hücreler anti-tümör bağışıklığında çok önemli bir rol oynarlar. Lenfoid hücreler, tümör antijenlerine özgü anti-tümör bağışıklığında merkezi bir rol oynayan B lenfositleri ve çok sayıda T- lenfosit alt kümesini içerir (Akinsipe T. ve ark. 2024) (Şekil 8’ de görüldüğü gibi).



Şekil 8. Meme kanseri tümör mikroçevresinde bulunan immün hücreler (Salemme V. ve ark. 2021).

Meme kanserinde, normal meme dokusuna kıyasla bağışıklık hücrelerinin varlığının arttığı bilinmektedir. Hem lenfoid hem de miyeloid soyunun bağışıklık hücreleri, tümör ilerlemesi sırasında görülen dinamik değişikliklere katkıda bulunur. ÜNMK çoğunlukla CD8 + ve CD4 + T hücrelerinden oluşan yüksek TIL infiltrasyonuna sahiptir. ÜNMK' da B hücreleri ve NK hücreleri de diğer alt tiplere kıyasla artar.

ÜNMK' daki ana B hücresi alt popülasyonu bellek B hücreleriyken, naif B hücreleri ve plazma hücrelerinin miktarı düşüktür. Treg'ler ağırlıklı olarak immün infiltre ÜNMK ve ER-HER2+ alt tiplerinde bulunur. Yüksek immün infiltrasyonlu ÜNMK, neoadjuvan tedavi sırasında artmış sağkalım oranları ve artmış patolojik tam yanıt (*Pathological Complete Response,* pCR) gösterir. CD8 + T hücrelerinin artışı ER ve PR negatifliği ile ilişkili olduğu bildirilmektedir ve ER tümörlerinde olumlu prognostik değere sahiptir.

NK hücrelerinin varlığı ER + ve HER2 + meme kanseri hastalarında olumlu bir prognoz ile ilişkilendirilirken, ÜNMK'da yüksek bir varlık kötü prognoz ile ilişkilidir. Bunun sebebi NK hücrelerinin ikili rolü olup pro-tümör fonksiyonları da sergileyebilmesidir. Meme ve kolon kanserlerinde CD56brightCD16dim belirteçlerine sahip olan NK hücrelerinin, tümörün beslendiği damarların oluşumunda ve immünosupresif bir ortamın gelişmesinde önemli bir role sahip olan pro-anjiyojenik

faktör vasküler endotelyal büyüme faktörünü (*Vascular Endothelial Growth Factor,* VEGF) eksprese ettiği bulunmuştur. NK hücreleri, baskılayıcı bir tümör immün mikroçevresinde (*Tumor Immune Mıcroenvironment,* TIME) tümör hücreleri tarafından üretilen moleküler sinyaller ve hipoksi ve besin yoksunluğu gibi çevresel faktörler nedeniyle işlevsiz hale gelebilir (Otterlei Fjørtoft M. ve ark. 2024).

Miyeloid hücreler arasında miyeloid kaynaklı baskılayıcı hücreler MDSC'ler, TAN'lar, TAM'lar, DC'ler, MC'ler vb. hücre grupları bulunur (Akinsipe T. ve ark. 2024). TAM'lar meme tümörlerinde inflamatuar infiltratın önemli bir bileşenini temsil eder. Monositlerin ve makrofajların tümör ortamına çekilmesinde kemokinler ve sitokinler gibi tümör kaynaklı büyüme faktörleri rol oynar. TAM'ların tümöre alınmasından sorumlu en iyi karakterize edilen sitokinlerden biri, monosit kemoatraktan protein 1 (*Monocyte Chemotactic Protein,* MCP-1) olarak da bilinen kemokin ligand 2'dir (*C-C motif ligand 2,* CCL2).

Hem stromal hücreler hem de tümör hücreleri tarafından eksprese edilen CCL2, meme kanserinde kötü prognoz ile ilişkilidir (Mehta AK. ve ark. 2021). Makrofajlara ek olarak, dendritik hücreler de TLR agonistleri tarafından uyarılır ve bu hücreler arasında pDC alt kümesi, tip I IFN'lerin üretilmesinde en güçlü olanıdır (Mantovani A. ve ark. 2021).

Mast hücreleri, tümör mikroçevresindeki TAM' lar ile çekilir ve klasik (VEGF, fibroblast büyüme faktörü-2 (FGF-2) ve klasik olmayan anjiyojenik faktörleri (ör. Proteazlar) serbest bırakarak tümör anjiyogenezini ve lenfanjiyogenezini teşvik eder. Ek olarak, mast hücreleri, TNF-α, histamin ve IL-10' u serbest bırakarak ve T hücrelerini ve NK’ yı baskılayarak immünosüpresif aktiviteleri ile tümör invazivliğini destekler (Ribatti D. ve ark. 2021).

TAN' lar, protümör özellikteyse N1 ve antitümör aktivitelere sahip ise N2 olarak tanımlanıp alt tiplerine ayrılmıştır. Nötrofiller kemik iliğinden kökenlenir ve olgunlaşmaları granülosit CSF, GM-CSF ve IL-6 tarafından düzenlenir. Miyelomonositik hücreler tümör taşıyan farelerde ve kanser hastalarında hematopoietik süreçte değişiklikler meydana gelir, bu da nötrofiliye ve kanda olgunlaşmamış miyeloid hücrelerin ortaya çıkmasına neden olur (Mantovani A. ve ark. 2021).

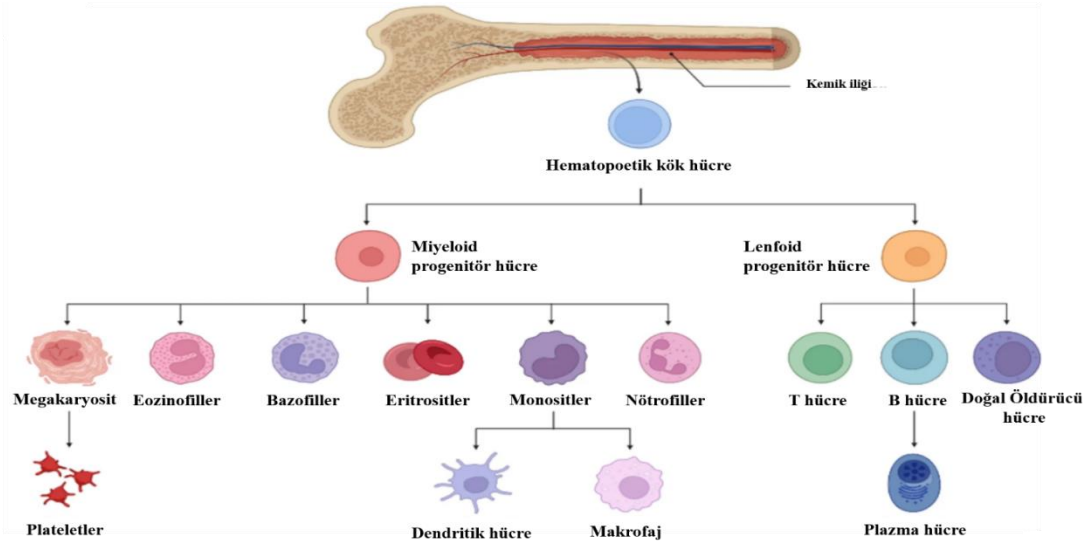
Dolaşımdaki ve tümöre sızan MPC' lerin bir alt kümesi olan ve doğuştan gelen

immün baskılayıcı aktiviteleri nedeniyle MDSC' ler olarak tanımlanır. Günümüzde, granülositik (*Granulocytic,* G) veya polimorfonükleer (*Polymorphonuclear*, PMN), monositik (*Monocytic,* M) ve olgunlaşmamış veya erken (i veya e) olmak üzere tanınmış üç MDSC türü vardır. İnsan fenotipleri hala belirsizliğini korumaya devam etse de, günümüzde çoğu araştırmacı, insan MDSC' lerinin soy-negatif (Lin−) olduğu, yani T hücresi (CD3), B hücresi (CD19) ve NK hücresi (CD56) belirteçlerinden yoksun oldukları ve CD11b+ CD33+ HLA-DR- fenotipini taşıdıkları konusunda hemfikirdir. Bilinen üç MDSC alt grubu, granülosit belirteçleri olan CD15 veya CD66b ve monosit belirteci CD14' ün ifadelerine göre farklılaşır. Üçüncü MDSC alt grubu (i-MDSC), granülosit ve monosit belirteçlerinden yoksun olduğu halde CD33' ü ifade eden bir hücre alt grubu olarak tanımlanmıştır (Cole K. ve ark. 2021).

2.7. Miyeloid Hücrelerin Meme Kanserindeki Rolü

Hematopoetik kök hücreler (*Hematopoietic Stem Cell,* HSC' ler), bağışıklık hücrelerinin ve tüm kan soylarının ortak öncüleridir. Genetik, immünolojik veya hematolojik hastalıkları olan hastaların hematopoetik sistemlerinin yeniden oluşturulmasında HSC' ler ve çoklu hematopoietik progenitör hücreler (*Hematopoietic Progenitor Cells,* HPC' ler) içeren kemik iliği (*Bone Marrow,* BM) hücrelerinin aşılanması etkilidir (Zhang P. ve ark. 2019).

HSC' ler hematopoietik farklılaşmanın birincil kaynağıdır. HSC' ler, yavru hücreler üretmek için asimetrik bölünmeye uğrayarak daha fazla çoğalır ve esas olarak ortak lenfoid progenitör hücrelere ve miyeloid progenitör hücreler olmak üzere iki dala ayrılarak tam bir hematopoietik soya farklılaşır. Son olarak, lenfoid soydaki T hücreleri, B hücreleri ve NK hücrelerinin yanı sıra kırmızı kan hücreleri, trombositler, granülositler, makrofajlar ve dendritik hücreler dahil olmak üzere her soyda periferik efektör hücreler kurulur (Tang X. ve ark. 2023)(Şekil 9' da görüldüğü gibi).



Şekil 9. Kemik iliği hematopoetik kök hücrelerinin çok soylu farklılaşması (Tang X. ve ark. 2023).

Tümör mikroçevresi, bağışıklık sistemi elemanları (makrofajlar ve lenfositler dahil), kan damarları, fibroblastlar, miyofibroblastlar, mezenkimal kök hücreler, adipositler ve hücre dışı matriks (*Extracellular Matrix,* ECM) bileşenleri dahil olmak üzere tümör bölgesinde bulunan tümör kitlesinin transforme edilmemiş konak hücresel bileşenlerini içerir. Bunlar arasında, tümörle ilişkili miyeloid hücreler (*Tumor-Associated Myeloid Cells*, TAMC' ler), bağışıklık hücrelerinin bir alt kümesidir ve TAM' lar, MDSC' ler, TAN' lar, Tie2' ekspresе eden monositler (*Tie2-Expressing Monocytes*, TEM 'ler) ve tümörle ilişkili dendritik hücreler (*Tumor-Associated Dendritic Cells*, TADC' ler) olarak sınıflandırılır (Cha YJ. ve ark. 2020).

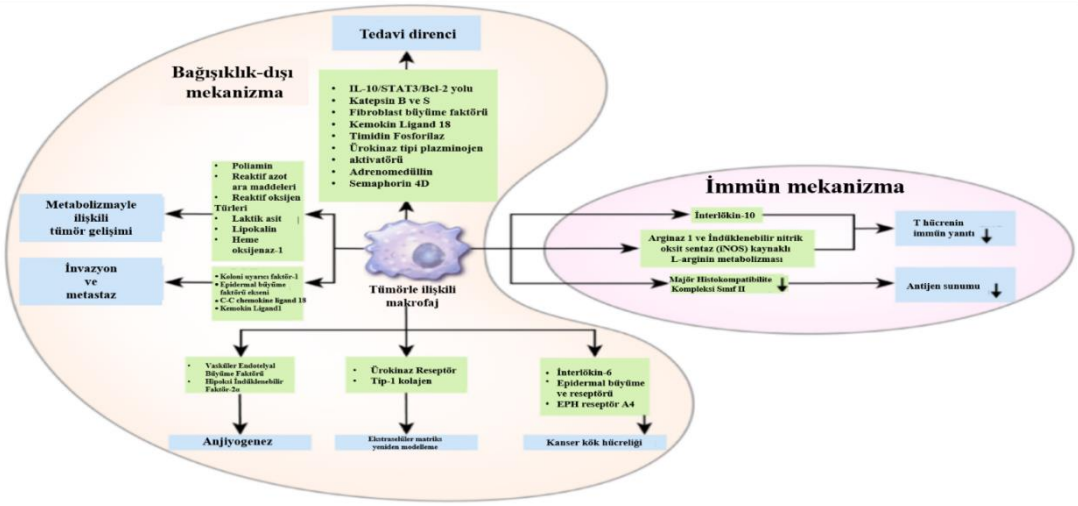
TAM' lar, meme kanserinin başlangıcını, ilerlemesini, metastazı ve terapötik ajanlara yanıtı etkileyen çeşitli mekanizmalar yoluyla etkiler. Bu nedenle, TAM' lar meme kanseri prognozunu da etkileyebilir. TAM' lar tümör immün kaçınma mekanizmalarından biri olan antitümör T hücre yanıtlarının baskılamasında rol oynayan anti-inflamatuar sitokinleri salgılarlar (Cha YJ. ve ark. 2020).

Meme kanserinde TAM' lar, IL-10, Arg1 ve iNOS ile ilişkili L-arginin salgılanmasını etkileyen immünojenik mekanizmalar aracılığıyla T hücresi yanıtını ve antijen sunumunu baskılar. Bu mekanizma, özellikle majör histouyumluluk kompleksi (*Major Histocompatibility Complex,* MHC) sınıf II seviyelerinin azaltılmasıyla ilişkilidir. İmmünojenik olmayan mekanizmalarda ise TAM' lar, VEGF ve hipoksi ile indüklenebilir faktör- 2α (*Hypoxia İnducible Factor-2α,* HIF-2α) salgılayarak anjiyogenezi destekler, ürokinaz reseptörü (*Urokinase Receptor,* uPAR) ve tip I

kollajen salgıyarak hücre dışı matrisin yeniden şekillenmesini sağlar. Ayrıca, IL-6, EGF/EGFR sinyali ve EphA4 yolaklarıyla kanser kök hücrelerini harekete geçirir (Cha YJ. ve ark. 2020).

4T1 hücreleri ile oluşturulmuş sinjenik ÜNMK modelinde ise, TAM' ların 4T1 hücrelerinde MAPK sinyal yolağını uyardığı, TAM ve MEK inhibisyonu birlikte yapıldığında tümör büyümesinin azalıp, T lenfosit infiltrasyonunun arttığı gözlenmiştir (Zhang vd., 2019). TAM hücreleri belirtilen mekanizmalar ile kanser ve T hücreleri üzerine etkilerinin yanı sıra, salgıladıkları pro- inflamatuvar sitokinler ile kemik iliğini de uyararak buradaki miyeloid kökenli baskılayıcı hücre grubunun da artışını desteklemektedir (Blomberg vd., 2018). Fare ve insan TAM hücreleri farklı belirteçler taşımakta olup, farede bu hücrelerin varlığı genellikle CD11b+, F4/80+, Ly6Cdüşük, Ly6G, CD206+, MHC-II düşük, PD-L1+ fenotip olarak bildirilmiştir.

TAM' lar, CSF1-EGF ekseni, CCL18 ve CXCL1 aracılığıyla kanserin invazyon ve metastaz oluşumunu desteklerken, TAM metabolitleri (poliaminler, reaktif nitrojen ara ürünleri (*Reactive Nitrogen İntermediates*, RNI), ROS, laktik asit, lipokalin (*Lipocalin,* LCN) ve hem oksijenaz-1 meme kanserinin ilerlemesine katkıda bulunur. Son olarak, TAM' lar tedavi direncinin gelişiminde önemli bir rol oynar. Bu mekanizmalar arasında IL-10/STAT3/Bcl-2 yolağı, katepsin B ve S, fibroblast büyüme faktörü, CCL18, timidin fosforilaz, ürokinaz tipi plazminojen aktivatörü (*Urokinase-Type Plasminogen Activator* , uPA), adrenomedullin (*Adrenomedullin,* ADM) ve Sema4D gibi moleküller yer alır (Cha YJ. ve ark. 2020) (Şekil 10' da görüldüğü gibi).



Şekil 10. Tümör ile ilişkili makrofaj hücrelerinin meme kanserindeki rolü (Cha YJ. ve ark. 2020).

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

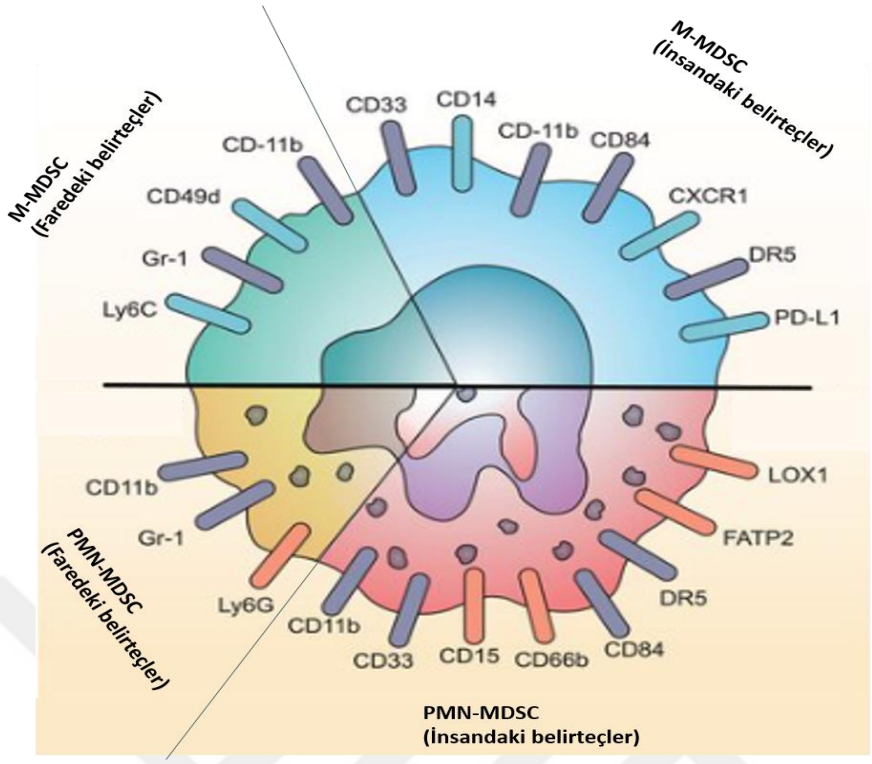
Bu hücreler hem tümör dokusunda hem de periferde yetersiz immün uyarım ve/veya immün baskılama yaparak özellikle T hücre yanıtlarını sekteye uğratabilmektedirler. Bu etkilerini, eksik antijen sunumu yapmaları, T hücrelere negatif eşuyaran sinyal göndermeleri, baskılayıcı yönde etkili T hücre alt-tipi farklılaşmasını desteklemeleri ile gerçekleştirirler (Srivastava vd., 2010, Sica vd., 2012). MDSC ler, NO ve ROS süperoksitlerini kullanarak başta CD8+ T hücreleri olmak üzere T hücre reseptör sinyalizasyonunu bozmak, Arjinaz-1 salgılayarak T hücrelerin çoğalması için gerekli birincil nutrienti ortamda parçalamak, Treg hücrelerinin oluşumunu desteklemek ve diğer miyeloid hücrelerin antijen sunum kapasitelerini engellemek gibi işlevlere sahiptirler (Nagaraj vd., 2010, Kumar vd., 2016, Ohl ve Tenbrock, 2018, Bruger vd., 2019, Groth vd., 2019). Fare modellerinde yapılan çalışmalarda özellikle invaziv kanserlerde anormal miyelopoezin aktifleştiği ve immün baskılayıcı özellikteki immatür hücrelerin artış gösterdiği bilinmektedir (Gabrilovich vd., 2012).

Bu hücreler granülositik ve monositik alt-tipte olup CD11b ve Gr-1 belirtecini taşırlar. Monositik olanları (M-MDSC olarak bilinen) bu belirteçlere ek olarak Ly6C+, Ly6G-, iNOS+, Arg-1+ F4/80orta/yüksek, CD115orta/yüksek ve ROS üretim kapasiteleri orta düzey fenotipte iken; granülositik olanlar (polimorfonükleer MDSC) CD11b ve Gr-1 belirteçlerine ek olarak Ly6G+, Arg-1+, Ly6Cdüşük/-, iNOS-, F4/80düşük/-, CD115düşük/- ve ROS üretim kapasiteleri oldukça yüksek fenotiptedir (Ostrand-Rosenberg ve Fenselau, 2018). Bu hücre alt-tiplerinden özellikle M-MDSC' lerin meme kanserinde kötü prognoz ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Bergenfelz vd., 2015). M-MDSC hücre grupları kemik iliğinde artış gösterdikten sonra sistemik

dolaşıma geçmekte; dalak, karaciğer ve metastatik organlarda birikmektedir. Ayrıca, tümör mikroçevresine infiltre olduktan sonra TAM hücrelerine farklılaşarak immün baskılama yapabilmektedirler (Tcyganov vd., 2018).

Özellikle M-MDSC ve TAM hücreleri sahip oldukları plastisite sebebi ile miyeloid belirteçleri bulundukları doku ve koşula göre farklı düzeylerde taşımakta ve birbirlerine farklılaşabilmektedirler. Dolayısıyla bu hücreleri iyi karakterize edebilmek için, geniş bir immünfenotipleme, fonksiyonel analizler ve T hücre baskılama deneyleri planlanmalıdır ve elde edilen sonuçlar bütüncül bir yaklaşımla değerlendirilmelidir (Bronte vd., 2016, Elliott vd., 2017, Awad vd., 2018). M-MDSC ve TAM hücreleri metastaz ve kanser prognozunda direkt etkilerini anjiyogenezi ve metastatik niş formasyonunu destekleyerek göstermekle beraber, en önemli fonksiyonları özellikle CD8+ T hücre yanıtlarını baskılamaları ve CD4+ yardımcı T hücreleri Treg hücrelerine farklılaştırmalarıdır (Bronte vd., 2016, Elliott vd., 2017, Bruger vd., 2019).

MDSC' lerin gelişimi, farklılaşması ve genişlemesi ile ilişkili bazı sitokinler bulunmaktadır. Bunlar arasında granülosit koloni uyarıcı faktör (*Granulocyte Colony Stimulating Factor*, G-CSF), makrofaj koloni uyarıcı faktör (*Macrophage Colony Stimulating Factor*, M-CSF), granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör (*Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*, GM-CSF), IL-6, IL-1β, makrofaj göç inhibitör faktörü (*Macrophage Migration İnhibitör*, MIF) ve TGF-β yer almaktadır. Ayrıca MDSC' lerin TME' ye çekilmesini teşvik eden bir grup kemokin, C-X-C motifli kemokin ligandları 5 (*Chemokine ligands with C-X-C motifs 5*, CXCL5), CCL1, CCL2, CCL5 ve MCP-1 gibi molekülleri içerir. Bunun yanı sıra, MDSC'lerin meme kanserinin ana metastatik nişlerine çekilmesini destekleyen diğer önemli faktörler arasında S100 kalsiyum bağlayıcı protein A8 *(S100 calcium-binding protein A8*, S100A8) ve A9 *(S100 calcium-binding protein A9*, S100A9) yer almaktadır (Sánchez-León ML. ve ark. 2023).



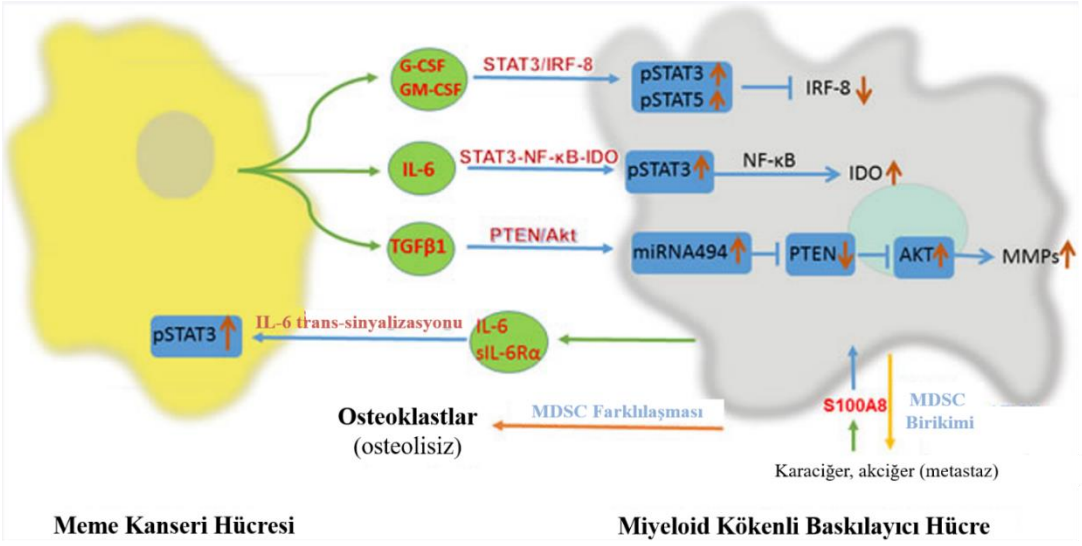
Şekil 11. PMN-MDSC' lerini ,M-MDSC' lerden ayırt etmek için hayvan ve insanda kullanılabilecek yüzey belirteçlerini göstermektedir (Ren, R. ve ark. 2023).

Farelerde, miyeloid soy belirteci CD11b ve granülositik belirteç Gr1' i ifade eder. Gr1, Ly6C ve Ly6G olmak üzere iki farklı belirteci içerir. M-MDSC' ler, daha düşük Gr1 ifadesi seviyelerine sahiptir ve Ly6C' yi (CD11bLy6G+−/Ly6C) yüksek seviyede eksprese ederken, PMN-MDSC' ler daha yüksek Gr1 seviyelerine sahiptir ve Ly6G' yi (CD11b+Ly6G/Ly6C++low) yüksek seviyede eksprese eder. İşlevsel olarak, fare M-MDSC'leri, yüksek seviyelerde nitrik oksit (*Nitric Oxide*, NO) ve indüklenebilir NO sentazı ile karakterize edilirken, PMN-MDSC' ler daha yüksek seviyelerde reaktif oksijen türleri (*Reactive Oxygen Species*, ROS) üretir (Kalathil SG. Ve ark. 2021).

Bu durum granülositleri tanımlamak için kullanılan fenotipik özellikler PMN-MDSC' lerin tanımlanmasında da kullanılırken monositleri tanımlamak için kullanılan fenotipik özellikler M-MDSC' lerin tanımlanması için de kullanılır ve farelerde MDSC' ler diğer bağışıklık hücrelerini baskılama yeteneklerine göre fonksiyonel olarak ayırt edilir. Örneğin, PMN-MDSC' ler tercihen ROS, peroksinitrit, arginaz 1 ve prostaglandin E2 kullanarak (*Prostaglandin E2*, PGE2) immün baskılanmaya aracılık ederken, M-MDSC' ler, NO, IL-10 ve TGFβ gibi immünosüpresif sitokinler ve PD-L1 gibi immün düzenleyici moleküllerin ekspresyonunu kullanır (Veglia F. ve ark. 2021) (Şekil 11' de gösterildiği gibi).

Meme tümörlerinde, MDSC' ler birkaç yolak aracılığıyla güçlü immünsüpresif fonksiyonlarını gösterir. Tümör ortamında var olan IL-6, MDSC' lerde STAT-3' ü aktive ederek STAT3-NF-κB-IDO yolunu başlatır. Aktive olan STAT-3 inflamatuar ile ilişkili genlerin ekspresyonunu modüle eder ve IDO ekspresyonunu artırır ve böylece bağışıklık gözetimini zayıflatır ve bağışıklık toleransını inhibe eder. T-hücresi aktive olmasının TCR yoluyla baskılanmasına ve Treg' lerin çoğalmasının indüklenmesine neden olur. STAT3/interferon düzenleyici faktör 8 (*Interferon Regulatory Factor 8*, IRF8) yolu ise G-CSF ve GM-CSF' nin, Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü 3 (*Signal transducer and activator of transcription 3*, STAT3) ve STAT5 yolakları aracılığıyla IRF-8' in düşük ekspresyonunu teşvik ettiği bir yolaktır. MDSC'lerin negatif düzenleyicisi olan IRF-8'in düşük ekspresyon seviyeleri MDSC sayısının artmasıyla ilişkilidir.

Son olarak, düşük PTEN ekspresyonunun AKT yolunun (mTOR ve NF-κB yollarını içeren) aktivasyonunu teşvik etmesi ve invazyonu ve metastazı artıran metalloproteinazların (MMP'ler; MMP2, MMP13, ve MMP14 gibi) ekspresyonunu artırarak, tümör metastazını teşvik ettiği yol ise PTEN/AKT yoludur (Şekil 12'de görüldüğü gibi).



Şekil 12. Miyeloid kökenli baskılayıcı hücre grubunun meme kanserinde immunsupresif etkisini göstermek için kullandığı yolaklar (Shou D. ve ark. 2016).

Nötrofiller, dolaşımdaki en yaygın lökosit popülasyonunu temsil eder ve tümörlere infiltre olduklarında TAN' lar olarak adlandırılırlar (Fridlender ve Albelda, 2012). Tümör mikroçevresi içindeki sitokinlerin etkisi altında TAN pro-tümörijenik (N2 fenotipi) ya da pro-inflamatuar ve anti-tümörijenik (N1 fenotipi) olacak şekilde polarizasyona uğrar (Fridlender ve diğerleri, 2009). Bu polarizasyonu oluşturan kesin mekanizmalar ve her bir TAN fenotipinin kendine özgü özellikleri tam olarak aydınlatılamamıştır (Soto-Perez-de-Celis E. ve ark. 2017).

TEM' ler, M2-polarize TAM'ler ile birlikte tümörün gelişimini ve tümörde kan damarı oluşumunu teşvik ederek anjiyogenezi artırır. Tümöre sızan TEM' ler, tedaviye bağlı vasküler hasarı takiben vasküler büyümeyi teşvik eder bu sebeple TEM' leri hedeflemek, miyeloid hücre aracılı anjiyogenezi ve tedaviye direnci etkisiz hale getirerek antianjiyojenik tedavilerin etkinliğini artırabilir (Mazzieri R. ve ark. 2011).

TADC' lar antitümör bağışıklığında kritik bir rol oynar. Ancak bağışıklık yanıtlarını baskılayan düzenleyici T hücrelerinin (*Regulatory T Cells*, Treg) harekete geçirilmesiyle de ilişkilidir ve bu durum tümör toleransına katkıda bulunabilir. Tümörle ilişkili dendritik hücreler, tümör mikroçevresi tarafından tolerojenik yanıtları destekleyecek şekilde şartlandırılır ve bu da hastalığın ilerlemesine yol açabilir (Sisirak V. ve ark. 2012).

2.8. Kanserde İyon Dengesi

İnsan vücudunun dengeli işleyişi için gerekli olan metal ve ametallerden oluşan yirmi element bulunmaktadır. Normal biyolojik işlevler için gerekli kabul edilen metaller arasında dört ana grup elementi sodyum (Na), potasyum (K), magnezyum (Mg) ve kalsiyum (Ca) ile altı d-blok geçiş metali olan manganez (Mn), demir (Fe), kobalt (Co), bakır (Cu), çinko (Zn) ve molibden (Mo) yer alır (Jomova, K ve ark 2022).

Bu iyonlar arasından sodyum, potasyum, kalsiyum ve magnezyum gibi metal iyonları, vücudun asit-baz dengesini ve osmotik basıncını düzenlemekte hayati bir rol oynar. Vücudun dokuları ve sıvılarında bulunarak yaşam için gerekli fizikokimyasal süreçleri destekler. Metal iyonları, enzim reaksiyonlarında substratların dönüştürülmesine yardımcı olurken, bazıları enerji üretimi ve kullanımı için önemli olan redoks reaksiyonlarında elektron alışverişi yapar. Tüm canlılar, yaşam süreçlerinin devamı için bu inorganik elementlere ihtiyaç duyar (Mabrouk M. ve ark 2023).

İyon taşınması, elektriksel impuls üretimi ve sinirler boyunca iletimi, hücreler içinde ve hücre zarları boyunca sıvı dengelemesi ve hücreler içinde ve arasında sinyal iletimi dahil olmak üzere çok çeşitli biyolojik süreçlerde önemli bir bileşendir (Mendes, P. M. V. ve ark. 2018). Kanallar açıldıktan sonra iyonların hücresel boşluklar arasında yeniden dağıtılması, elektriksel uyarımdan harekete kadar çok sayıda hücresel süreci etkileyebilir. Bu süreçler arasında hücre proliferasyonu, göç ve apoptoz gibi normal doku homeostazını sürdürmek vardır. Bu nedenle, kanalların anormal ifadesi ve/veya işlevi, kanserin ayırt edici özellikleri olan kontrolsüz çoğalma ve yayılma sergileyen normal hücrelerin kötü huylu türevlere dönüşmesine neden olabilir (Prevarskaya N ve ark. 2018).

Son birkaç yıl içinde, iyon kanalı işlev bozukluğuyla ilişkili insan hastalıklarının sayısı hızla artmıştır. Özellikle, hem voltaj kapılı hem de ligand kapılı kanallar dahil olmak üzere iyon kanallarının, çeşitli insan kanserlerinin ilerlemesi ve patolojisinde rol oynadığına dair artan kanıtlar bulunmaktadır. Geçici reseptör potansiyeli (*Transient receptor potential,* TRP) kanalları vasküler geçirgenlik ve anjiyogenezde rol oynar ve tümör büyümesi ve metastazı ile ilişkilendirilmiştir (Ko JH. ve ark. 2013). İyon kanallarının TRP süper ailesi, memelilerde yaklaşık otuz üye içerir, seçici olmayan katyon geçirgen kanalların yeni bir ailesini oluşturur ve dizi homolojilerine göre TRPM1/TRPM3, TRPM2/TRPM8, TRPM4/TRPM5 ve TRPM6/TRPM7 olmak üzere yedi alt gruba ayrılır. Bu kanallar kalsiyuma karşı farklı geçirgenliklere sahiptir, TRPM4/5 üyeleri kalsiyuma karşı geçirimsizdir ve TRPM6/TRPM7 üyeleri kalsiyum ve magnezyuma karşı oldukça geçirgendir (Cordier C. ve ark. 2021).

2.9. Magnezyum ve Kanser

Vücutta en bol bulunan ikinci hücre içi katyon olan ve çok sayıda enzim için bir kofaktör görevi gören magnezyum (Mg^{2+}), hücre çoğalması, inflamasyon, enerji üretimi ve nükleik asit metabolizması dahil olmak üzere 300' den fazla biyolojik reaksiyonda önemli roller oynar (Tao MH. ve ark. 2015). Hemoglobin sentezindeki kritik rolü olan Mg^{2+} eksik olması durumunda eritrosit enerji metabolizmasını ve inflamatuar süreci bozularak anemi gelişimine yol açabileceği raporlanmıştır (Rolić, T. ve ark. 2024).

Magnezyum eksikliğinin kardiyovasküler hastalık, diabetes mellitus, metabolik sendrom ve çeşitli kanser türleri dahil olmak üzere bazı hastalıkların riski ile ilişkili

olduğu bildirilmiştir. Kanda Mg^{2+} eksikliği ile karakterize hipomagnezemi, esas olarak böbrek veya gastrointestinal sistemde Mg^{2+} kaybını teşvik eden koşullardan kaynaklanır ve kardiyak, nörolojik ve nöromüsküler bozukluklardan sorumludur (Bocchi, F. ve ark. 2024).

Tümör hücrelerinde yüksek hücre içi Mg^{2+} konsantrasyonu gözlenmesine rağmen düşük hücre içi Mg^{2+} konsantrasyonlarının karsinogenez ve metastaz oranlarının artmasıyla ilişkili olduğu tespit edilmiştir (de Baaij, J. H. ve ark. 2015). Magnezyum takviyesinin, hücre çoğalması ve metabolizmasının modülatörü olarak hareket etmesi nedeniyle kanser hastaları için faydalı olabileceğine dair bazı spekülasyonlar vardır (Draghi, P. F. ve ark. 2022). Kanser hastalarının yaşam kalitesini doğrudan etkileyen ve hastalık ilerledikçe seyreden tat değişikliği, bulantı, kusma, iştahsızlık gibi iste istenmeyen etkileri azaltmak için mikro besinlerin takviyesi kullanılmaktadır. Mikro besinler, monoklonal antikorlar, kemoterapötik ilaçlar ve radyasyon tedavileri gibi standart tedaviyi iyileştirmek veya tedavinin ve altta yatan hastalığın olumsuz etkilerini azaltmak için kullanılabilir (Gröber U. ve ark. 2016). Magnezyum takviyesinin, hücre çoğalması ve metabolizmasının modülatörü olarak hareket etmesi nedeniyle kanser hastaları için faydalı olabileceğine dair bazı spekülasyonlar vardır (Draghi, P. F. ve ark. 2022).

Cho ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada magnezyum iyonlarının SVCT2 ekspresyonunu artırarak L-askorbik asitin anti-kanser etkilerini desteklediği ortaya koymuşlardır. Vitamin C olarak da bilinen L-askorbik asit (AA) kanser tedavisinde yalnızca yüksek dozlarda etkili olur. L-askorbik asitin thücresel emilimi, sodyum bağımlı vitamin-C taşıyıcı ailesi-2 (*Sodium-dependent vitamin C transporters,* SVCT2) tarafından belirlenir. Li ve arkadaşları, valproik asit (*Valproic Acid,* VPA) ile magnezyum klorürü kombine tedavi olarak UC3 hücre hattına (mesane kanseri hücre hattı) verdiklerinde bu hücre hattının çoğalmasını, göçünü ve tümör oluşturma potansiyelinin inhibe olduğunu bulmuşlardır. Santos ve arkadaşları, $MgCl_2$' nin apoptoza neden olduğunu ve kanser hücrelerinin göçünü yavaşlattığını keşfetmiştir. $MgCl_2$, V-H+-ATPaz ve miyozin II ekspresyonunu azaltarak, vimentin ekspresyonunu baskılar ve E-kadherin ekspresyonunu artırarak metastazı inhibe eder, böylece EMT' yi tersine çevirir. Ayrıca, magnezyum klorür *(Magnesium Chloride,* $MgCl_2$) NF-kB ekspresyonunu inhibe ederek kromatin yoğunlaşmasını teşvik eder ve endokrin

kanserlerde olumlu etkiler gösterdiğini raporlamıştır (Ashique S. ve ark. 2023).

Fizyolojik koşullarda, diyetle alınan magnezyumun yaklaşık %30-50'si ince bağırsak boyunca paraselüler pasif transport veya transelüler aktif transport yoluyla emilir. Paraselüler pasif transport, magnezyumun bir elektro-kimyasal gradyana uygun şekilde akışını ifade eder ve mineralin büyük çoğunluğu bu yolla emilir. Ayrıca küçük bir miktar magnezyum aktif olarak hücre içine taşınmasında TRPM6 ve TRPM7 olarak bilinen melastatin tipi 6 ve 7 geçici potansiyel reseptörleri rol oynar. Bu reseptörlerin pek çok hücrede bulunması, magnezyumun dengede tutulmasında kritik bir işlev gördüklerini ortaya koyar (Mendes, P. M. V. ve ark. 2018).

Son yıllarda çoklu Mg^{2+} taşıyıcılarının (Acdp2, MagT1, Mrs2, Paracellin-1, SLC41A1, SLC41A2, TRPM6 ve TRPM7) moleküler tanımlanması ve biyofiziksel karakterizasyonu, Mg^{2+} homeostaz regülasyonu konusundaki anlayışı geliştirmiş ve Mg^{2+}' nın bağışıklık sistemindeki rolünü araştırmak için bir temel sağlamıştır (Brandao, K. ve ark. 2013).

TRPM7, hem iyon kanalı hem de serin/treonin kinaz olan bir protein, yani ”kanal” ve ”enzim” işlevlerini birleştiren bir yapıdır. Bu kanalın açılma olasılığı, kinaz aktivitesi ile kontrol edilir. Kinaz bölgesi, fosfolipaz C (*Phospholipase C*, PLC) adlı enzimle, özellikle de PLC'nin C2 bölgesi ile doğrudan etkileşime girerek, PLC'nin TRPM7 kanalını açıp kapatmasını sağlar. TRPM7' nin aktivitesi, hücre içindeki magnezyum (Mg^{2+}) ve Mg- ATP seviyelerine bağlıdır. Özellikle, Mg- ATP seviyesi 1 mM'nin altına düştüğünde kanal aktif hale gelir. Bu nedenle, TRPM7 hücrenin enerji durumuna duyarlı bir kanaldır (Cordier C. ve ark. 2021).

2.10. Magnezyumun ve İmmün Sistem

Bağışıklık yetersizliklerinden kansere kadar uzanan hastalıkları tedavi etmek veya önlemek için yeni stratejilerin geliştirilmesinde Mg^{2+}' nin takviye olarak alınmasının etkisine dair stratejiler geliştirilmektedir (Schmitz C. ve ark. 2017).

Dengeli olacak şekilde bağışıklık hücresi tepkileri için organizmadaki magnezyum seviyelerinin korunması önemlidir. Mg^{2+} yokluğunda, bağışıklık hücrelerinin işlevi tehlikeye girer (Brandao K. ve ark. 2013). Mg^{2+}' nin hem doğuştan gelen hem de adaptif bağışıklık sistemlerinde immünolojik yanıt üzerinde önemli bir etkiye sahiptir ve immünoglobulin üretimin çok önemli bir kofaktör olarak görev alır (Ashique S. ve ark. 2023).

Mg^{2+}'nin doğuştan gelen bağışıklığa etkisinde, akut faz yanıtı, makrofajların işlevi ve sitokinlere üretimi üzerinde etkileri vardır. Monositlerde, toll benzeri reseptör (*Toll-Like Receptor,* TLR) stimülasyonundan sonra Mg^{2+} takviyesinin sitokin üretimini azalttığı gösterilmiştir. Bu immünoregülasyon fonksiyonu, aktive edilmiş B hücresi translokasyonunun NF-κB aktivitesinin azalmasına neden olan artmış bir IκBα seviyesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Mg^{2+} eksikliği olan sıçanlar ayrıca artmış fagositoz ve oksidatif patlama ile ilişkili periferik nötrofili göstermiştir. Ek olarak, histamin salgılanması ile ilgili olarak mast hücrelerinin işlevinde bir bozukluk vardı. Mg^{2+}'nin doğuştan gelen bağışıklığa etkisi ise, lenfositlerin gelişimi, farklılaşması ve çoğalması üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Bu bağlamda, Mg^{2+} eksikliğinin apoptoz sürecine müdahale ettiği düşünülmektedir (Weyh C. ve ark. 2022).

Magnezyum doğal bir kalsiyum antagonisti olarak işlev gördüğünden, hücre dışı magnezyumun azalmasının hücre içi kalsiyumda bir artışa yol açması ve hücre dışı magnezyumdaki bir artışın ters etkiye sahip olması olasılığı vardır. Bu nedenle, gereken durumlarda hücre dışı magnezyum konsantrasyonunun artmasıyla birlikte anti-enflamatuar etkiye sahip olabilirken, hücre dışı magnezyum konsantrasyonundaki bir azalma fagositik hücre aktivasyonuna katkıda bulunabilir. Bunun sonucunda çok sayıda sitokin ve diğer bağışıklık yanıtı genlerinin gen ekspresyonunun düzenlenmesi yoluyla bağışıklık ve inflamatuar yanıtların önemli adımlarının düzenlenmesinde rol oynayan bir grup indüklenebilir transkripsiyon faktöründen oluşan NF-κB aktive olabilir (Mazur A. ve ark. 2007).

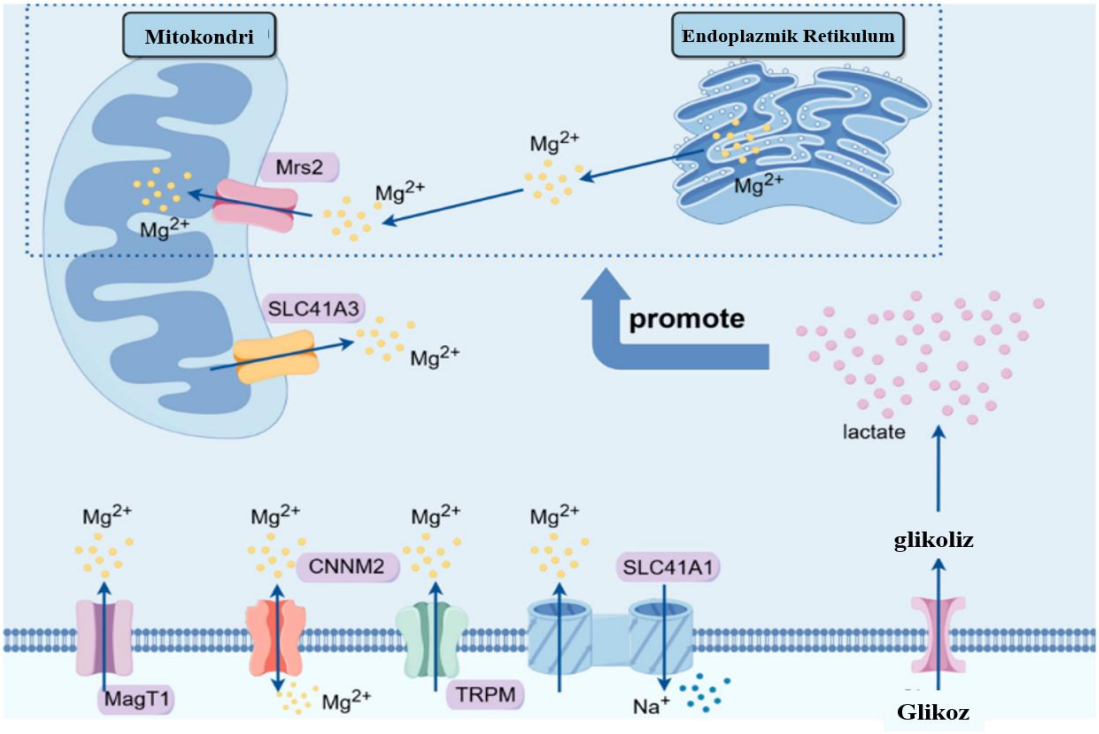
Çeşitli düzenlenmiş Mg^{2+} taşıma proteinlerinin varlığına dair kapsamlı kanıtlara rağmen , yalnızca melastatin ilişkili TRP ailesinden geçici reseptör potansiyel katyon kanalı alt ailesi M üyesi 6 ve 7 (*Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily M Member 6/7,* TRPM6/7) iyon kanalları ile iç mitokondriyal membranda yer alan mitokondriyal RNA ekleme 2 proteini (*Mitochondrial RNA Splicing 2 Protein,* MRS2) kanalı olmak üzere iki plazma membranı ile lokalize protein moleküler düzeyde tanımlanmıştır. Son zamanlarda, bu kanallara ek olarak çözünür taşıyıcı ailesinin 41. üyelerinin (*Solute Carrier Family 41,* SLC41) A1 ve A2 alt grupları, magnezyum taşıyıcı 1 (*Magnesium Transporter 1,* MagT1) adı verilen bir protein eklenerek hücresel Mg^{2+} taşıma sistemlerine yönelik araştırma alanını önemli

ölçüde genişletmiştir (Kolisek M. ve ark. 2008).

MagT1 proteini hücre içi magnezyum iyon konsantrasyonunu düzenler, bu da makrofaj polarizasyonunu ve bağışıklık hücresi fonksiyonunu etkiler. MagT1, tümör hücrelerinin büyümesinin düzenlenmesinde de önemli bir rol oynar. Zheng ve arkadaşları, MagT1 ekspresyonu ile kolorektal kanser hastalarında kötü prognoz arasında yakın bir ilişki raporlamıştır (Huang L. ve ark.2024). Mg^{2+} taşıyıcı 1 (*Magnesium Transporter 1,* MAGT1) ekspresyonunun kaybına bağlı olarak bireylerde Epstein–Barr virüsü ve neoplazi (*Epstein-Barr Virus (EBV) İnfection And N-Linked Glycosylation Defect*, XMEN) hastalığı gelişir. XMEN hastalığı CD4 lenfopeni, ciddi kronik viral enfeksiyonlar ve defektif T-lenfosit aktivasyonu ile karakterizedir (Kanellopoulou C. ve ark. 2019) (Watson CM. ve ark. 2022).

Mitokondri hücresel enerji metabolizmasından sorumlu organeldir ve mitokondrilerdeki ATP sentezinin organilin içindeki Mg^{2+} konsantrasyonu tarafından düzenlendiği bildirilmiştir (Shindo Y. ve ark. 2011). Maya ve memeli iç mitokondriyal zarlarında bulunan Mitokondriyal RNA ekleme 2 magnezyumu mitokondri içine taşıyarak mitokondriyal magnezyum homeostazını gerçekleştirir (Goytain A. ve ark. 2005).

Magnezyum emilimi ve sekresyonundan sorumlu olan TRPM6 proteinin son yıllarda bağışıklık hücrelerinde de var olduğu tespit edilmiştir. İnsan monositlerinde, oksidatif stres durumları sırasında TRPM6’ nın ekspresyon seviyesinin arttığı ve ayrıca insan periferik kan lenfositlerinde, B lenfositte varlığı tespit edilirken T hücrelerinde tespit edilememiştir (Brandao K.ve ark.2013) (Şekil 13’ de görüldüğü gibi).



Şekil 13. Magnezyumun homeostazı ve magnezyum taşıyan kanallar (Huang L. ve ark. 2024).

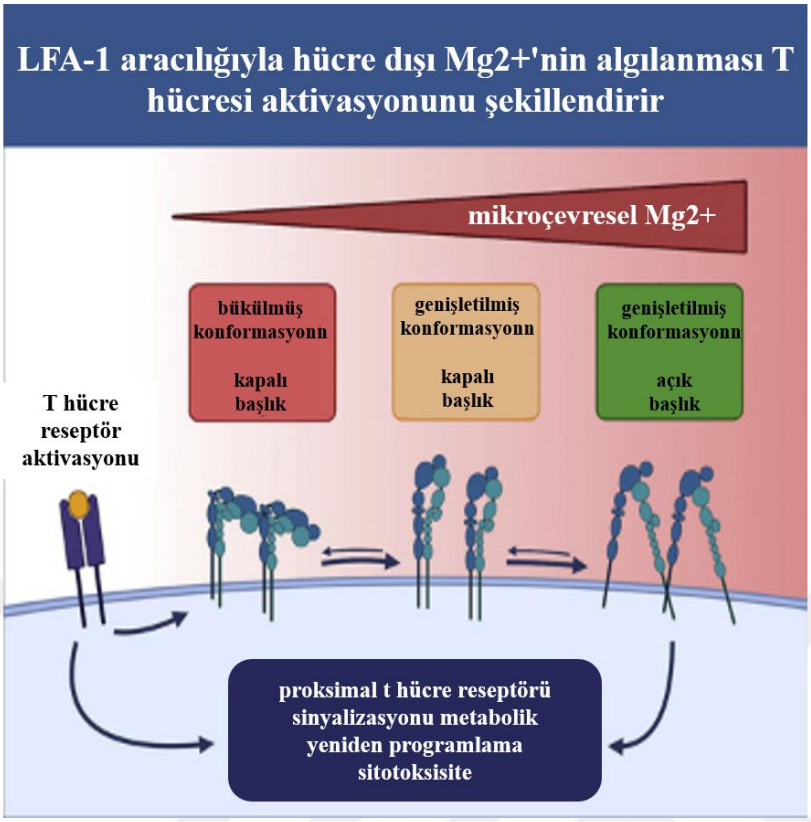
TRPM7 kanalı hem Ca^{2+} ve Mg^{2+} katyonlarına geçirgen olan bir iyon kanalı hem de bir kinaz olma özelliğine sahiptir. İmmünolojik fonksiyonları düzenlemede önemli bir rol oynayan TRPM7, mast hücresinin hayatta kalması için gereklidir ve hücre içi Ca^{2+} ve hücre dışı Mg^{2+} konsantrasyonlarına duyarlılığını değiştirerek degranülasyon sürecini düzenler (Maier JA. ve ark. 2021). TRPM7' nin ayrıca monosit ve makrofajların aktivasyonu ve çoğalmasıyla bağlantılı olduğu gösterilmiştir. TRPM7 kanal aktivitesi, makrofajların M2 anti-inflamatuar alt tipine polarizasyonu için gereklidir dolayısıyla M2 alt tipi polarizasyonundan sorumlu olan IL4, TRPM7 aktivitesini artırır. TRPM7 inhibisyonuyla da IL4' ün LPS kaynaklı TNF-α ekspresyonu üzerindeki inhibe edici etkisini azalır ve pro-inflamatuar M1 tipi polarizasyonun edinilmesine yol açar. Adaptif bağışıklık sisteminin hücreleriyle ilişkili olarak, TRPM7' nin fonksiyonel B ve T lenfositlerinin gelişiminde bir rolü olduğu bilinmektedir (Maier JA. ve ark. 2021).

Bağışıklık hücrelerinde serbest Mg^{2+} homeostazının diğer düzenleyicileri arasında SLC ailesinden SLC41A1 ve SLC41A2 yer alır. SLC41A1/2' nin serbest Mg^{2+} homeostazındaki rolü, TRPM7 eksikliği olan B hücre dizisinde ektopik ekspresyon sonucu azalmış hücre içi Mg^{2+} seviyelerinin ve bozulmuş çoğalmanın düzeltilmesiyle

ortaya konmuştur (Chaigne-Delalande B. ve ark. 2014). Yapılan çalışmalarda, Mg^{2+}' nin T ve B hücrelerinin çoğalması için önemli olduğunu göstermiş, ancak bunun kofaktör rolünden mi, sinyal iletim rolünden mi yoksa her ikisinden mi kaynaklandığı belirsiz kalmıştır (Chaigne-Delalande B. ve ark. 2014).

Lenfosit fonksiyonuyla ilişkili antijen-1 (*Lymphocyte function-associated antigen-1,* LFA-1), CD11a ve CD18 etkileşimi ile hücre adhezyonunu sağlayan ve T hücre Reseptör (*T Cell Receptor,* TCR) sinyal iletiminin doğru şekilde gerçekleşmesini sağlar. Mg^{2+}' nın CD18 ve CD11a üzerinde bulunan metal iyonuna bağımlı adezyon bölgelerine (*Metal Ion-Dependent Adhesion Zone,* MIDAS) bağlanması ile konformasyonel değişiklikleri etkilediği ve TCR sinyalizasyonunda görev aldığı bildirilmiştir (Walling BL. ve ark. 2018). Spesifik olarak, Mg^{2+}' nın MIDAS bölgesine bağlanması, zincirler arası allosterik röleyi (sap uzantısı) ve harici ligand afinitesini (başlık yapısı) modüle eder.

Mg^{2+}-modülasyonlu bir şekilde, T hücresi aktivasyonu proksimal ve distal sinyal aktivitesini (sırasıyla fokal adezyon kinaz (*Focal Adhesion Kinase,* FAK) ve hücre dışı sinyalle düzenlenen protein kinaz 1/2 (*Extracellular regulated kinase 1/2,* ERK1/2) fosforilasyonu, besin (*Glucose/Nutrient,* 2-NBDG) alımını, TNF üretimini ve CD107a ve CD69 ekspresyonunu daha da tetikleyebilmektedir (Lötscher J. ve ark. 2022). Mg^{2+}' nin immün sistemindeki gizemli mekanizması Lötscher ve meslektaşları tarafından daha detaylı ve mekanistik olarak açıklanmaya çalışılmıştır. Yüksek etkili bir dergide yayınlanan bir çalışmada Mg^{2+}' nin, lenfosit fonksiyonu üzerindeki kritik etkisi gösterilmiştir. LFA-1 olarak adlandırılan ve CD8 + T-lenfositler üzerinde bulunan bu hücre yüzey proteininin düzgün çalışması ve sinyalin CD8+ T hücreye doğru iletilmesi için Mg^{2+}' un elzem olduğu bulunmuştur (Ashique, S ve ark. 2023) (Şekil 14'de görüldüğü gibi).



Şekil 14. Yeterli seviyedeki magnezyum varlığını algılayan LFA-1' in T hücre aktivasyonuna etkisi (Lötscher J. ve ark. 2022).

Deney hayvanlarında yapılan çalışmalarda, akut Mg^{2+} eksikliğinin patolojisinde inflamasyon, şiddetlenen bağışıklık stres tepkisi e ve spesifik bağışıklık tepkilerinde azalmaya yol açması gösterilmiştir. Ayrıca Mg^{2+} eksikliği serbest radikal türlerinin üretiminde önemli bir artışa ve ardından doku hasarına neden olur (Schmitz C. ve ark. 2017).

B lenfositlerinde adaptif bağışıklığı düzenlemede Mg^{2+}'nin rolünü araştırmayı amaçlayan çalışmalar, B hücresi reseptörü (*B cell receptor*, BCR) aktivasyonuna veya iyonofor tedavisine yanıt olarak serbest hücre içi Mg^{2+} konsantrasyonunda bir artış ve ardından hücre içi Ca^{2+} konsantrasyonunda bir artış olduğunu göstermiştir (Rijkers ve Griffioen, 1993; Rijkers ve diğerleri, 1993).

İsim	Yapı-Fonksiyon	Doku Dağılımı	Açıklamalar
MagT1	Dört TM bölgesi, N ve C-terminaller hücre dışı veya sitozolik olabilir. N-terminal bölünmesiyle sinyal peptidi oluşur. Mg^{2+} seçici iyon kanalı, taşınma hidrojen iyonu (H^+) ve voltaja bağlıdır.	Yaygın; dalak, timüs, T lenfositleri	MagT1 mutasyonları X'e bağlı bağışıklık yetmezliği ile ilişkilidir. TCR stimülasyonuna bağlı Mg^{2+} akışını bozarak bağışıklık yanıtını zayıflatır. TRPM7 içermeyen DT40 B lenfositlerinde aşırı ifade edilmesi kısmi kurtarma sağlar.
Mrs2	İki TM bölgesi; Mg^{2+} ve Mn^{2+} geçişine izin verir; mitokondri iç zarına özgü.	Yaygın; B lenfositleri	Mitokondriye Mg^{2+} alımını düzenler. Hafif Mg^{2+} eksikliği oluşturur.
SLC41A1	On bir TM bölgesi; N-terminus hücre dışı ve C-terminus sitozolik (veya tersine çevrilebilir). Tercihen Mg^{2+} taşır, ayrıca Ba^{2+}, Cm^{2+}, Zn^{2+} gibi iyonlar da giriş yapabilir.	Yaygın	Kemik iliği, dalak, lenf düğümleri, lenfoid hücre hatlarında (Jm1, BV173, Jurkat) eksprese edilir.
SLC41A2	On bir TM bölgesi; N-terminus hücre içi ve C-terminus hücre dışı olabilir. Tercihen Mg^{2+} taşır, ayrıca diğer di-/trivalan iyonları da (Ba^{2+}, Ni^{2+}, Ca^{2+}, Fe^{2+}, Mn^{2+}) geçirir.	Hematopoetik hücrelerde eksprese olabilir.	Lenfoid hücrelerde eksprese edilir (Jurkat, Raji, K-562, NamL6, OCI-Ly3, OCI-Ly10).
TRPM6 (CHAK2)	Altı TM bölgesi; fonksiyonel bir poredir. C-terminal intrinsik Ser/Thr α-kinaz bölgesine sahiptir. TRPM7 ile birlikte çalışır. Yüksek Mg^{2+} ve Ca^{2+} geçirgenliği vardır.	Kısıtlı eksprese edilir (böbrek, bağırsak, monositler, periferik kan B lenfositleri, T hücrelerinde eksprese olmaz).	TRPM6 mutasyonları hipomagnezemiye neden olur. Mg^{2+} takviyesi ile hayatta kalınabilir ancak eksiklik devam eder. DT40 B lenfositleri için kurtarma sağlayamaz.
TRPM7 (LTRPC7, TRP-PLIK, CHAK1)	Altı TM bölgesi; fonksiyonel pore oluşturur. C-terminal intrinsik Ser/Thr α-kinaz bölgesi mevcuttur. Yüksek Mg^{2+} ve Ca^{2+} geçirgenliği olup, diğer divalan iyonları da geçirebilir (Ni^{2+}, Ba^{2+}, Co^{2+}, Mn^{2+}, Sr^{2+}, Cd^{2+}).	Yaygın	$TRPM7^{-/-}$ embriyo gelişiminde öldürücüdür. $TRPM7^{-/-}$ farelerde TCR aracılı T hücre aktivasyonu bozulur. Kinaz bölgesi iyon geçişi için gerekli değildir.

Tablo 2. Magnezyum taşıyan kanalların fonksiyonları ve mutasyonlarının immün hücrelere etkisi (Schmitz C. ve ark. 2017' den esinlenerek oluşturulmuştur).

Magnezyum, bir anti-enflamatuar iyon olarak tanımlanmıştır ve bir kalsiyum kanal blokeri olarak işlev görür. Düşük hücre dışı magnezyum seviyeleri, hücre içi kalsiyum konsantrasyonunu artıran L tipi kalsiyum kanalını ve N-metil-D-aspartat reseptörünü aktive eder (Drenthen LCA. ve ark. 2024).

Magnezyum (Mg^{2+}), N -metil-D-aspartat (*N-methyl-D-aspartate*, NMDA)

reseptörlerinin temel düzenleyici iyonudur. Magnezyum ve çinko, NMDA reseptörü üzerindeki bölgelere bağlanır ve transmembran iyon kanalını bloke eder. Bu tıkanıklık kalsiyum iyonlarının girmesini engeller. NMDA reseptörü ortamda yüksek kalsiyum bulunduğunda ya da bir ligand bağlandığında bu kanal açılabilir. İlk olarak, 2 glisin ekstrasinaptik reseptörlere bağlanırken serin ise sinaps içindeki reseptörlere bağlanır. Sonrasında 2 molekül glutamat karşılıklı olarak reseptöre bağlanmaları gerekmektedir (Jewett BE ve ark. 2022) (Tablo 2' de görüldüğü gibi).

Magnezyum, NMDA reseptörlerinin fizyolojik bir modülatörü olarak hareket etmesine ve öğrenme ve hafızanın altında yatan sinaptik plastisiteyi etkilemesine rağmen, Mg^{2+} bağlanma yeri ve moleküler mekanizmaları hala çözülmeyi beklemektedir (Huang X. ve ark. 2025).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deneylerde Kullanılan Malzemeler

Fosfat tamponlanmış tuz çözeltisi (PBS) (Sigma, Japonya); Fetal Bovine Serum (FBS) (Gibco, Thermo Fisher Scientific, ABD); Penisilin-Streptomisin (Gibco, Thermo Fisher Scientific, ABD); RPMI 1640 (Gibco, Thermo Fisher Scientific, ABD); Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Biowest, Fransa); Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 (DMEM F12) (Gibco, Thermo Fisher Scientific, ABD); Ficoll 1.077g/mL (Capricorn Scientific, Almanya); Karboksifloresan Süksinimidil Ester (CFSE) (Biolegend, ABD); FACS Flow Cell Wash (BD, ABD); Tripsin EDTA (Gibco, Thermo Fisher Scientific, ABD); APC anti-mouse CD11b (klon: M1/70) mAb (Biolegend, ABD) ; APC-Cy7 anti-mouse CD11b (klon: M1/70) mAb (Biolegend, ABD); APC-Cy7 anti-mouse LY6C (klon: HK1.4) mAb (Biolegend, ABD); FITC anti-mouse LY6C (klon: HK1.4) mAb (Biolegend, ABD); PE anti-mouse LY6G (klon: 1A8) mAb (Biolegend, ABD)

PBS Çözeltisi: Her 1000 mL dH2O' ya 5 tablet steril PBS eklenecek şekilde çözelti hazırlandı (1X). Otoklav cihazında uygun programda steril edildi. Kullanıma hazır olan sıvı formdaki PBS +4^{o}C' de muhafaza edildi.

%10 FBS, %1 Penisilin Streptomisin İçeren RPMI 1640 Hücre Kültürü Ortamı: L-glutamin ilaveli olarak satılan RPMI 1640 besi yeri içerisine son konsantrasyonu %10 FBS, %1 penisilin streptomisin olacak şekilde hesaplanarak besi yeri hazırlandı ve +4°C' de saklandı.

%10 FBS DMEM Hücre Kültürü Ortamı: L-glutamin ilaveli olarak satılan DMEM besi yeri içerisine son konsantrasyonu %10 FBS, %1 penisilin streptomisin olacak şekilde hesaplanarak besi yeri hazırlandı ve +4°C' de saklandı.

%5 FBS DMEM Hücre Kültürü Ortamı: L-glutamin ilaveli olarak satılan DMEM besi yeri içerisine son konsantrasyonu %5 FBS, %1 penisilin streptomisin olacak şekilde hesaplanarak besi yeri hazırlandı ve +4°C' de saklandı.

%10 FBS DMEM F12 Hücre Kültürü Ortamı: L-glutamin ilaveli olarak satılan DMEM-F12 besi yeri içerisine son konsantrasyonu %10 FBS, %1 penisilin streptomisin olacak şekilde hesaplanarak besi yeri hazırlandı ve +4°C' de saklandı.

Karboksifloresan Süksinimidil Ester (CFSE) çözeltisi: Toz formunda satılan CFSE (50µg) üzerine önerilen miktar olan 18µl DMSO eklenerek çözüldü ve -86°C' de

saklandı.

Tripan Mavisi Çözeltisi: Steril ortamda tartım sonrasında 1X PBS ile 0,4' lük çözelti hazırlandı ve 0,22µm' lik filtreden geçirildi. Oda sıcaklığında (25°C) muhafaza edildi.

3.2. Yöntem

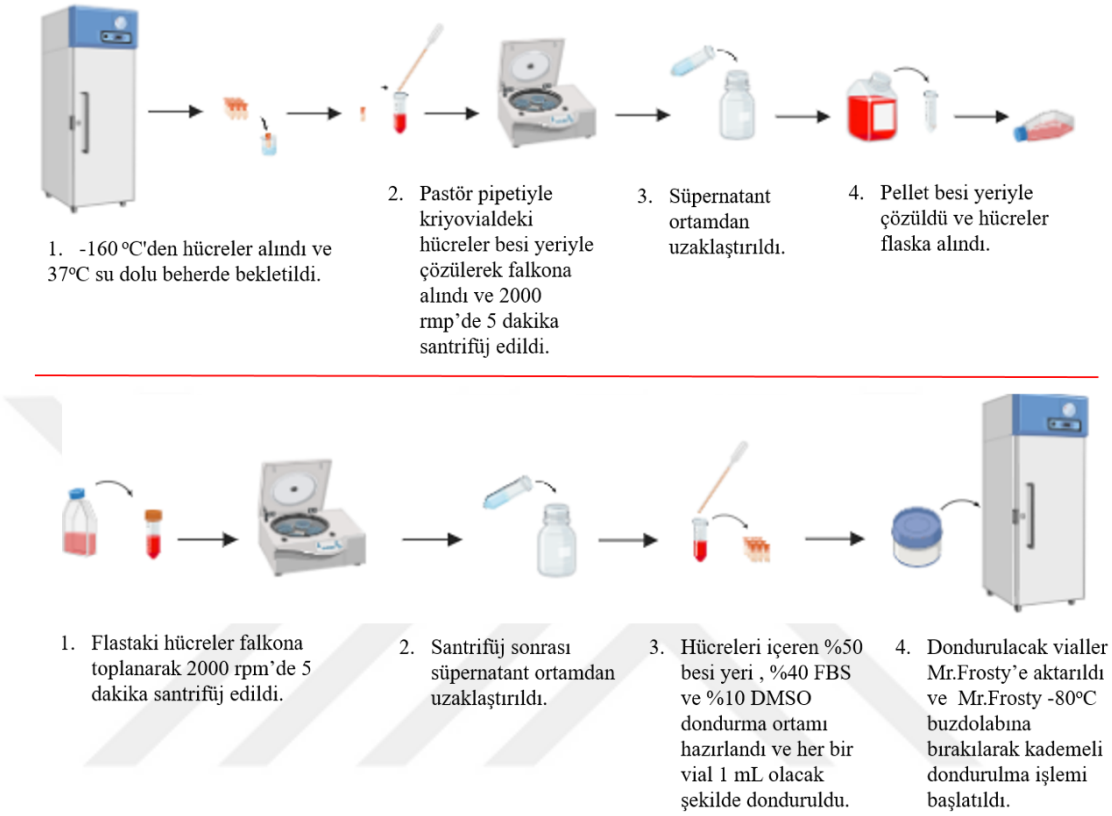
Bu çalışmada fare fibroblast hücre hattı olarak L929, fare üçlü negatif meme kanseri hücre hattı olarak 4T1, fare mikroglia hücre hatları olarak N9, BV-2, fare makrofaj hücre hattı olarak RAW 264.7 kullanıldı. Çalışma, 2024/13-03 sayılı karar ile, 01 Ekim 2024 tarihinde etik kurul onayı alarak yürürlüğe girmiştir.

3.2.1. Hücrelerin kültürlenme süreçleri

4T1, L929, BV-2, N9 ve Raw 264.7 hücreleri -160°C' den alınarak, 37°C' ye önceden ısıtılmış su banyosunda bulunan, içi steril dH_2O ile dolu behere aktarıldı. Tam çözünmeleri beklenmeden, hücrelerin bulunduğu tüpler alkollendi ve laminer akım kabinine alındı. Üzerlerine önceden 37°C' ye ısıtılmış tam besi yeri kültür ortamı, pastör pipeti ile eklendi. Hücreler, hızlı bir şekilde donduruldukları tüplerden yeni tüplere alınarak santrifüj edildi. Ardından süpernatant hızlıca uzaklaştırıldı ve hücreler, taze tam hücre kültür ortamında yeniden süspanse edildi. Hücreler öncelikle 25 cm^2' lik hücre kültür kabına aktarıldı. Kültür kabını doldurduklarında, besiyeri ile birlikte 75 cm^2' lik kültür kaplarına alındı ve tam hücre kültür ortamında büyütüldü. Hücreler istenilen yoğunluğa ulaştığında (~$1x10^6$ hücre/mL) pasajlanarak ilgili deneylerde kullanıldı. Pasajlama haftada iki kez gerçekleştirildi ve hücre kültürünün devamlılığı sağlandı. Hücrelerin pasaj sayısı 7-10 defadan fazla devam ettirilmedi ve bu pasaj sayısına ulaşan hücreler atılarak her defasında yeni hücreler açıldı. Hücreler 37°C' de, nemli ve %5 CO_2 içeren inkübatörde muhafaza edildi. Hücrelerin açılma ve dondurma aşamaları görselleştirildi (Şekil 15' de görüldüğü gibi).

Hücreler istenilen yoğunluğa ulaştığında, kültür ortamı uzaklaştırıldı ve PBS (Fosfat Tamponlu Salin) ile yıkandı. Ardından, hücreler tripsin-EDTA ile muamele edilerek yüzeyden ayrılması sağlandı. Bu işlem sonrasında, tripsinizasyonu durdurmak için tam besi yeri eklendi ve hücreler falkona doldurularak 2000 rpm' de, 5 dakika boyunca oda sıcaklığında santrifüj edildi. Santrifüj işlemi tamamlandıktan sonra süpernatant uzaklaştırıldı ve hücreler, dondurma solüsyonu (%50 besi yeri + %40 FBS + %10 DMSO) içinde yeniden süspanse edildi. Hazırlanan hücre süspansiyonu, steril

kriyotüplere 1 ml'lik hacimlerde bölünerek aktarıldı. Hücrelerin kontrollü bir şekilde dondurulması için kriyotüpler Mr. Frosty' ye yerleştirildi ve -80°C' de en az 4 saat boyunca kademeli olarak dondurulduldu (Şekil 15' de görüldüğü gibi).

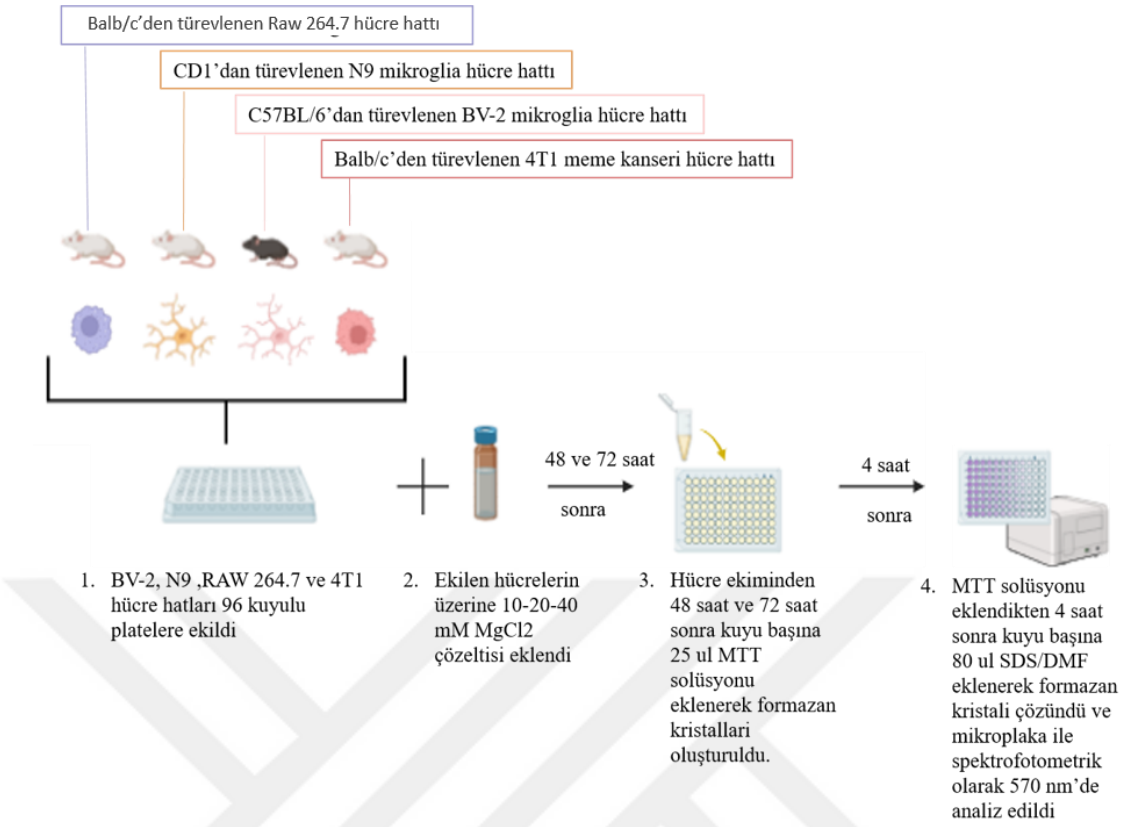


Şekil 15. Hücrelerin açılma ve dondurulma süreci (biorender.com kullanılarak hazırlanmıştır).

3.3. Hücrelerin Ko-Kültürü

3.3.1. MTT (3- (4, 5-dimetiltiyazol-2-il) -2, 5-difeniltetrazolyum bromür, atetrazol) yöntemiyle canlılık tayini

Fare fibroblast hücre hattı, fare kanser hücre hattı, fare miyeloid hücre hatları ve fare makrofaj hücre hatlarının magnezyum klorür ile kültürlendikten sonra canlılıkları MTT yöntemiyle analiz edildi. 96 kuyulu plaklara ekilen hücrelerin üzerine 10/20/40 Mm $MgCl_2$ eklendi ve 48 saat, 72 saat kültürlendi. 48. saat ve 72. saat sonunda 25 ul (1mg/mL) MTT eklendi ve 4 saat formazan kristallerinin oluşması beklendikten sonra 80 uL lizis tamponu SDS/DMF eklenerek kristaller çözündü. Mikroplaka okuyucu ile 570 nm' de hücrelerin kendi aralarındaki etkileşimi ve magnezyum klorürün hücreler üzerinde IC50 (inhibitör konsantrayonu) belirlendi (Şekil 16' da görüldüğü gibi).



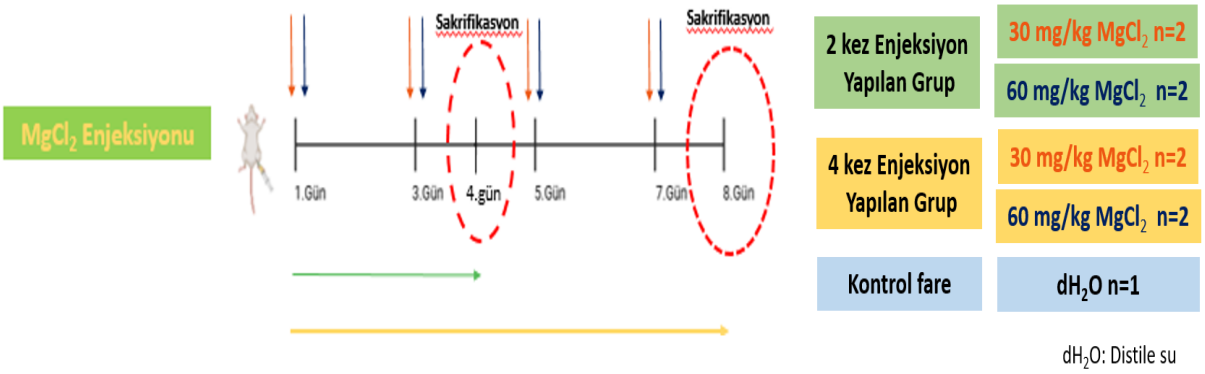
Şekil 16. Hücre hatlarının $MgCl_2$ ile kültürlendikten sonra MTT yöntemiyle canlılık tayini (biorender.com kullanılarak hazırlanmıştır).

3.4. *İn Vivo* Balb/c Dişi Farelere Yapılan Deneyler

3.4.1. 8 haftalık balb/c dişi farelere yapılan magnezyum klorür enjeksiyonu

8 haftalık Balb/c dişi farelerin ağırlıkları tartıldı ve beş gruba ayrıldı. Gruplardan biri kontrol grubu olarak belirlenip yalnızca PBS uygulanırken, iki gruba 30 mg/kg (düşük doz) ve 60 mg/kg (yüksek doz) $MgCl_2$ enjeksiyonu iki kez, diğer iki gruba ise aynı dozlarda enjeksiyon dört kez yapıldı (Şekil 17' de görüldüğü gibi).

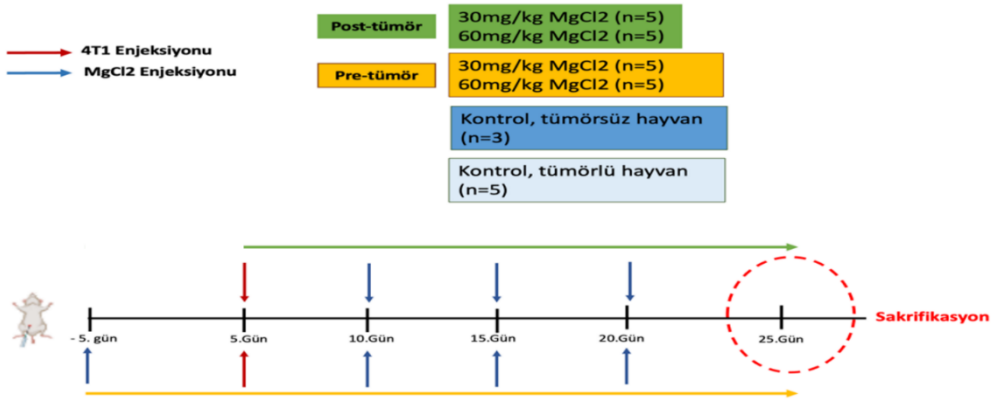
Belirtilen dozlarda $MgCl_2$ enjeksiyonundan sonra sakrifiye edilen hayvanların kan, kemik iliği ve dalaklarından hücreler izole edildi.



Şekil 17. Yüksek (60 mg/kg) ve düşük doz (30 mg/kg) $MgCl_2$ enjeksiyonu yapılan farelerin deney şeması (biorender.com kullanılarak hazırlanmıştır).

3.4.2. 8 haftalık BALB/C dişi farelere yapılan 4T1 meme kanseri hücresinin ve magnezyum klorür enjeksiyonu

Farelerden izofluran (Merck 100996) anestezisi eşliğinde sol meme bölgesindeki deri hafifçe kaldırılarak meme yağ pedi içine $25x10^3$ hücre /100 ul içeren 0,1 ml PBS (Fosfat Tamponlu Salin) hücre süspansiyonu, 26G künt uçlu 0,45x13 mm iğne ucu ile 100 ul (0,1 ml) hacimde inoküle edildi.Tümör oluşumu 10.günde şekillendikten sonra tümör ölçümü yapıldı (Şekil 18' de görüldüğü gibi).

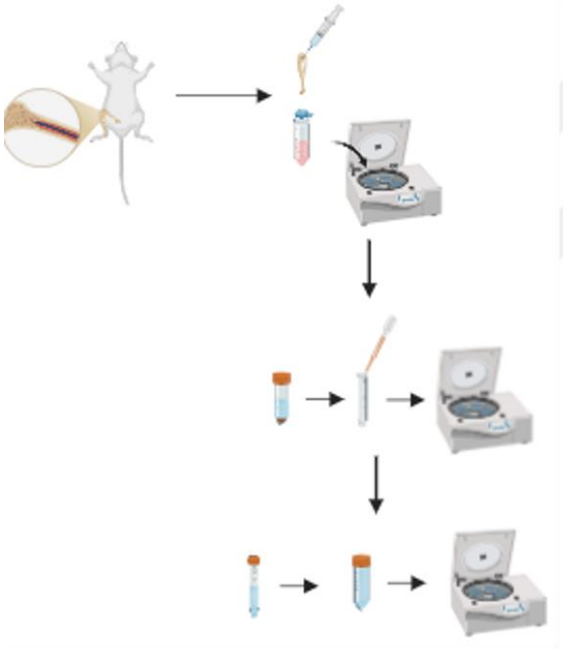


Şekil 18. 4T1 enjeksiyonu yapılarak meme kanseri modeli oluşturulan BALB/C dişi farelerde $MgCl_2$ tedavisi deney planı (biorender.com kullanılarak hazırlanmıştır).

3.4.3. Sakrifiye edilen farelerin kemik iliğinden hücre izolasyonu ve fenotip karakterizasyonu

Fareleri IACUC onaylı yöntemle ötenazi yapıldı. Her iki arka ayağından femur ve tibia ayrıldı. Femur ve tibiadan 26G künt uçlu 0,45x13 mm iğne ile PBS geçirilerek kemik iliği elde edilerek için steril 15 mL konik tüpüne toplandı. Toplanan numuneler 1500 rpm' de (yaklaşık 505 × g) 5 dakika santrifüjlenerek süpernatanı uzaklaştırıldı.

Pellet RPMI 1640 besi yerinde çözüldükten sonra Histopaque®-1119' a yayılarak 2500 RPM' de 20 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası pellet 10 mL steril PBS ile nötralize edildi ve 1500 rpm'de (yaklaşık 505 × g) 5 dakika son kez santrifüjlendi. Tripan blue ile 1:1 oranda boyanarak Thoma lamında hücre sayımı yapıldı. Hücre sayısı elde edildikten sonra kemik iliği hücrelerinin bir kısmı CD3, CD4 antikorları ile işaretlenerek akım sitometride lenfosit yüzdesini belirlerken; CD11b, Ly6G, Ly6C antikorları ile işaretlenerek miyeloid ve miyeloid kökenli baskılayıcı hücrelerin yüzde ekspresyonları analiz edildi. Kemik iliğinin hücrelerinin kalan kısmı ise 20 mM $MgCl_2$ ile 72 saat boyunca kültürlendikten sonra aynı antikorlar ile işaretlendikten sonra akım sitometri cihazıyla belirteçlerin ekspresyon seviyeleranaliz edildi (Şekil 19' da görüldüğü gibi).

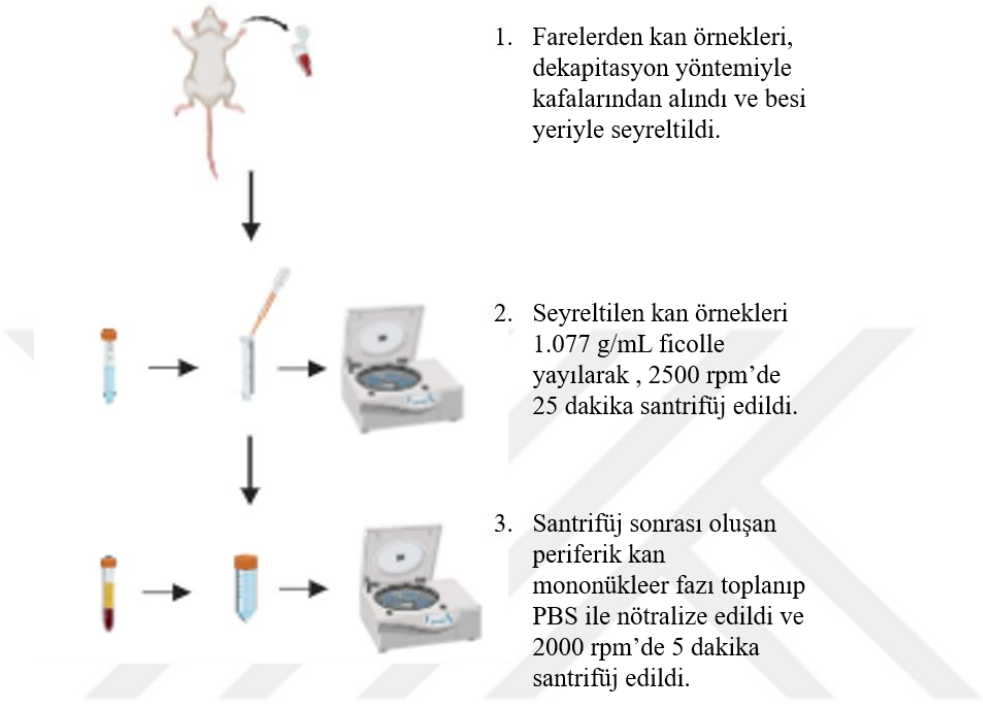


Şekil 19. Farelerin kemik iliğinden hücre izolasyonunun şematik gösterimi (biorender.com kullanılarak hazırlanmıştır).

3.4.4. Sakrifiye edilen farelerin kan örneklerinden mononükleer hücre izolasyonu ve fenotip karakterizasyonu

Fare gruplarına dekapitasyon yaptıktan sonra grup içindeki tüm farelerin kan örnekleri lenfosit ayırma medyumu 1.077 g/mL ficolle yayılarak, 2500 rpm' de 25 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası 2 Faz oluştuktan sonra aradaki faz toplanıp üzeri PBS ile tamamlandı. 2000 rpm' de 5 dakika santrifüj yapıldı ve sonrasında süpernatant atılıp pellet serumsuz besi yeriyle çözdürüldü. Elde edilen periferik kan

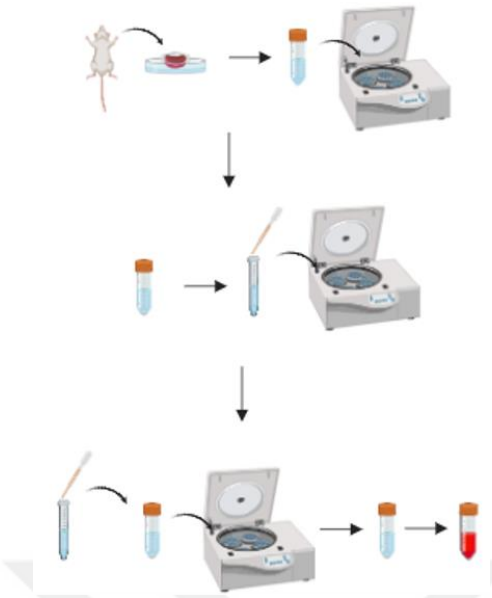
mononükleer hücreler tripan blue ile 1:1 oranda boyanarak Thoma lamında hücre sayımı yapıldı. Sayımı yapılan hücreler CD3, CD4, CD11b, Ly6G, Ly6C antikorları ile işaretlendikten sonra akım sitometri cihazında analiz edildi (Şekil 20' de görüldüğü gibi).



Şekil 20. Farelerin kan örneklerinden hücre izolasyonunun şematik gösterimi (biorender.com kullanılarak hazırlanmıştır).

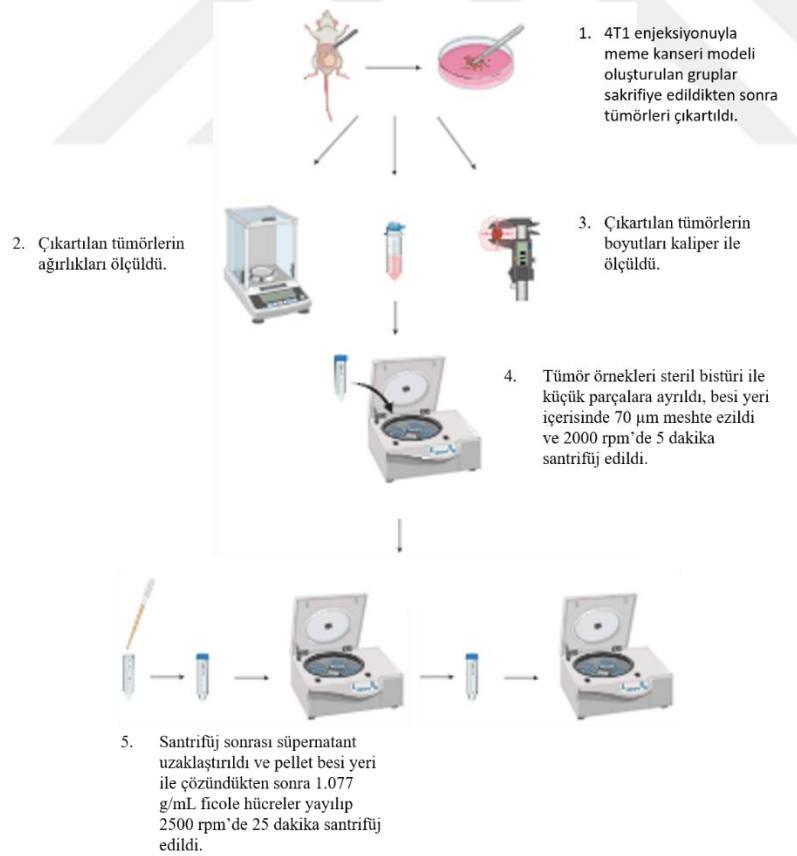
3.4.5. Sakrifiye edilen farelerin dalaklarından splenosit izolasyonu ve fenotip karakterizasyonu

Sakrifiye edilen gruplardaki balb/c farelerin dalağı çıkarıldıktan sonra 70 µm meshte ezildi ve 2000 rpm' de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant dökülüp pellet RPMI ile çözüldükten sonra lenfosit ayırma medyumu 1.077 g/mL ficole hücreler yayılıp 2500 rpm' de 25 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası oluşan iki fazdan aradaki faz toplandı ve üzeri PBS ile tamamlandı. Toplanan faz 2000 rpm' de 5 dakika santrifüj yapıldı ve santrifüj sonrası elde edilen pellet serumsuz besi yeriyle çözdürüldü. Dalaktan izole edilen splenositler tripan blue ile 1:1 oranda boyanarak Thoma lamında hücre sayımı yapıldı. Splenositlerin bir kısmı CD3, CD4, CD11b, Ly6G, Ly6C antikorları ile işaretlendikten sonra akım sitometri cihazında analiz edildi (Şekil 21' de görüldüğü gibi).



1. Sakrifiye edilen farelerden alınan dalaklar önce 70 µm meshte ezildi ve 2000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.
2. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırıldı ve hücreler 1.077 g/mL ficole yayılıp 2500 rpm'de 25 dakika santrifüj edildi.
3. 1.077 g/mL ficoll sonrası oluşan ara faz toplandı ve PBS ile nötralize edilip 2000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası pellet besi yerinde çözündü.

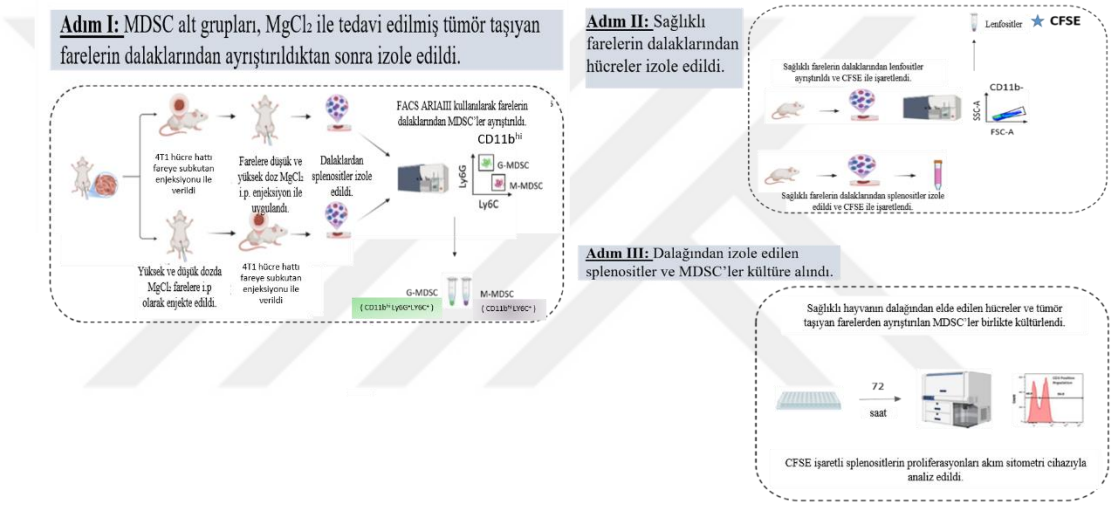
Şekil 21. Farelerin dalak örneklerinden hücre izolasyonunun şematik gösterimi (biorender.com kullanılarak hazırlanmıştır).



Şekil 22. Farelerin tümör örneklerinden hücre izolasyonunun şematik gösterimi (biorender.com kullanılarak hazırlanmıştır).

3.4.6. Farelerin dalaklarından izole edilen splenositlerin floresan aktive hücre ayırma cihazı (*fluorescence-activated cell sorting*, FACS) ile ayrıştırılması

Pre-tümör ve post-tümör grupların yüksek doz olarak 60 mg/kg $MgCl_2$ uygulanan farelerin dalakları CD11b, Ly6G, Ly6C antikorları ile işaretlendi. İşaretlenen antikorlar floresan aktive hücre ayırma cihazından geçirilerek bu gruplardaki farelerin havuzlanan dalaklarından G-MDSC ve M-MDSC ayrıştırıldı. Farelerin havuzlanan dalaklarından ayrıştırılan G-MDSC ve M-MDSC hücreleri hem sağlıklı hayvanların dalaklarından izole edilen CFSE işaretli splenositlerle hem de sağlıklı hayvanların dalaklarından ayrıştırılan CFSE işaretli T lenfositler ile belirli oranlarda kültürlendiler (Şekil 23' de görüldüğü gibi).



Şekil 23. 4T1 tümör enjeksiyonunu $MgCl_2$ tümör tedavisinden önce ve sonra alan fare grupların tümör enjeksiyonundan 25 gün sonra tedavi süreci tamamlanıp hayvanların dalaklarından MDSC hücre popülasyonu ayrıştırılıp sağlıklı hayvanların dalaklarından elde edilen lenfosit ve splenosit gruplarıyla kültürlenmesinin T hücre proliferasyon kapasitesine etkisinin analizinin şematik gösterimi (biorender.com kullanılarak hazırlanmıştır).

Kültür Koşulları:

12.500 hücre G-MDSC: 200.000 hücre
25.000 hücre G-MDSC: 200.000 hücre
50.000 hücre G-MDSC: 200.000 hücre
100.000 hücre G-MDSC: 200.000 hücre
200.000 hücre G-MDSC: 200.000 hücre
12.500 hücre M-MDSC: 200.000 hücre
25.000 hücre M-MDSC: 200.000 hücre

MDSC: Splenosit/Lenfosit

Pre-tümör ve post-tümör grupların yüksek doz olarak 60 mg/kg $MgCl_2$ uygulanan farelerin dalakları için geçerli ve iki grubun da G-MDSC, M-MDSC hücreleri sağlıklı hayvanların dalaklarından izole edilen splenositlerle ya da sağlıklı hayvanların dalaklarından ayrıştırılan lenfositler ile kültürlendi.

3.4.7. Farelerin dalaklarından izole edilen splenositlerin CFSE işaretlenmesi ve fenotip karakterizasyonu

Dalaklardan splenosit izole edilip hücre sayımından sonra karanlık ortamda 5 µM (1 µl CFSE/mL) final konsantrasyon olacak şekilde CFSE splenositlerin üzerine eklendi. Pastör pipet yardımıyla karışması sağlandıktan sonra, 37 ° C inkübatörde 15 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra CFSE işaretlenen splenositler 10-15 mL soğuk tam RPMI 1640 hücre kültürü ortamı eklendi ve beş dakika boyunca buz içerisinde inkübe edildi. Hücreler 2 kez tam RPMI 1640 hücre kültürü ortamı içerisinde 2000 rpm, 4°C programda 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatan atıldıktan sonra hücre kültürü ortamı eklendi ve hücreler yeniden süspanse edildi.

CFSE işaretli splenositler tek başına ve 4T1 hücreleri ile belirlenen MgCl2 varlığından veya tek başına kültüre edilecektir. Splenositler makrofajlar ve T hücreler için temel biyolojik kaynağı oluşturduğu için kültüre ekstradan bir miyeloid hücre eklenmeyecektir. 72 saatlik inkübasyon süresinin sonunda CFSE boyasının seyrelme düzeyine göre değerlendirilecektir.

$MgCl_2$ enjeksiyonu yapılan (2 ve 4 kez) gruplardaki CFSE işaretli splenositler tek başlarına ve 20 mM $MgCl_2$ ile kültürlenirken, CFSE işaretli splenositler pre-tümör ve post-tümör grupların yüksek doz olarak seçilen 60 mg/kg $MgCl_2$ uygulanan farelerin dalaklarından ayrıştırılan MDSC hücreleri ile kültürlenmiştir ve her iki deney şemasında da 72 saatin sonunda CD3, CD4, CD11b, Ly6G, Ly6C yüzey belirteçlerinin ekspresyonları akım sitometri cihazıyla analiz edildi (Şekil 23’ de görüldüğü gibi).

3.4.8. Farelerin tümörlerinden hücre izolasyonu ve immünofenotiplendirmesi

Çalışmada yapılan tümör enjeksiyonundan 25 gün sonra sakrifiye edilen hayvanların tümörleri çıkartıldı. Çıkartılan tümörlerin ağırlıkları tartılıp kaliper ile tümör boyutları ölçülerek her hayvanın tümör boyutu hesaplandı. Tümörler steril bistüri ile küçük parçalara ayrıldı, besi yeri içerisinde 70 µm meshte ezildi ve 2000 rpm’ de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant dökülüp pellet RPMI ile çözüldükten

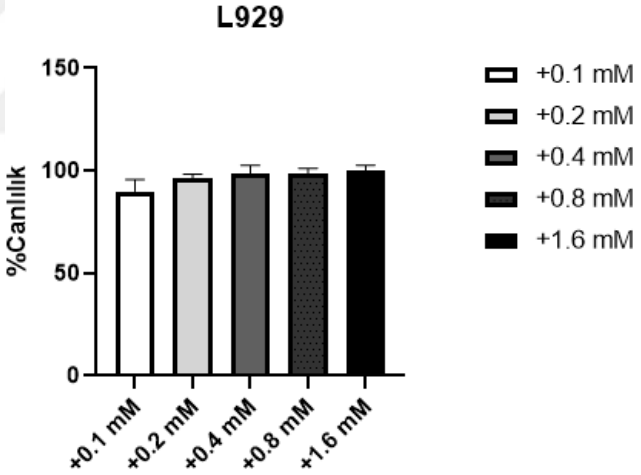
sonra lenfosit ayırma medyumu 1,077 g/mL ficole hücreler yayılıp 2500 rpm' de 25 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üst faz toplandı ve üzeri PBS ile tamamlandı. Toplanan faz 2000 rpm' de 5 dakika santrifüj yapıldı ve santrifüj sonrası elde edilen pellet serumsuz besi yeriyle çözdürüldü. Elde edilen tümör hücreleri tripan blue ile 1:1 oranda boyanarak Thoma lamında hücre sayımı yapıldı ve CD11b, Ly6G, Ly6C antikorları ile işaretlendikten sonra akım sitometri cihazında analiz edildi (Şekil 23' de görüldüğü gibi).

4. BULGULAR

4.1. Üçlü Negatif Meme Kanseri, Mikroglia/Makrofaj ve Fibroblast Hücre Hatlarının Magnezyum Klorür ile Kültürledikten Sonra MTT (3- (4,5-Dimetiltiyazol-2-il) -2, 5-difeniltetrazolyum bromür, atetrazol) Yöntemiyle Canlılık Analizi

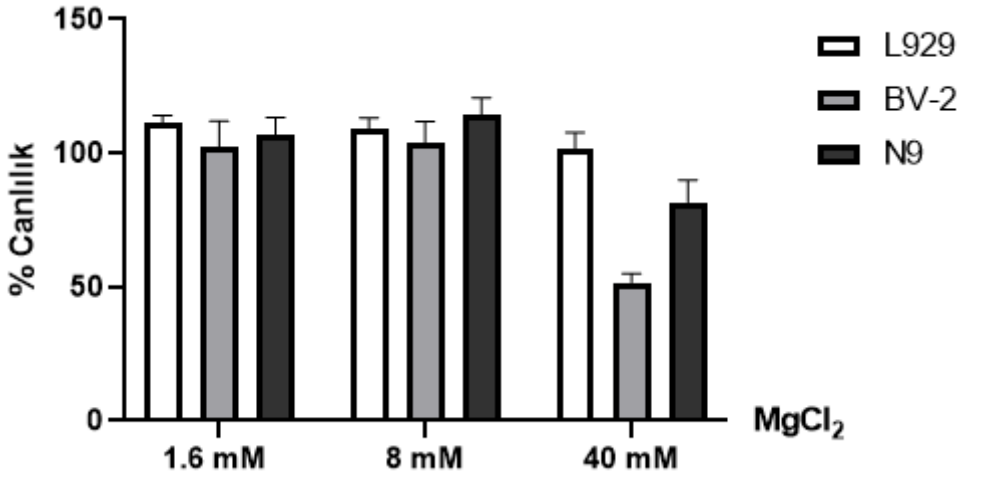
N9 ve BV-2 mikroglia hücre hatları, RAW 264.7 makrofaj hücre hattı ve L929 fare fibroblast hücre hattı artan dozlarda magnezyum klorür ile kültürlenerek MTT metoduyla magnezyum klorürün toksisite analizleri yapılmıştır.

Ayrıca, 4T1 kanser hücre hattı, L929 fare fibroblast hücre hattı, N9, BV-2 mikroglia hücre hatlarıyla ve RAW 264.7 makrofaj hücre hattıyla birlikte artan magnezyum klorür dozlarına göre kültürlendikten sonra hücreler arası etkileşimlerin canlılığa etkisi MTT yöntemiyle analiz edilmiştir. Bu sonuçlar baz alınarak hücre hatlarının birbiriyle etkileşimi ve bu etkileşime magnezyum klorür dahil edilmesinin hücre canlılığı üzerindeki etkisi tespit edilmiştir (Şekil 24' de görüldüğü gibi).



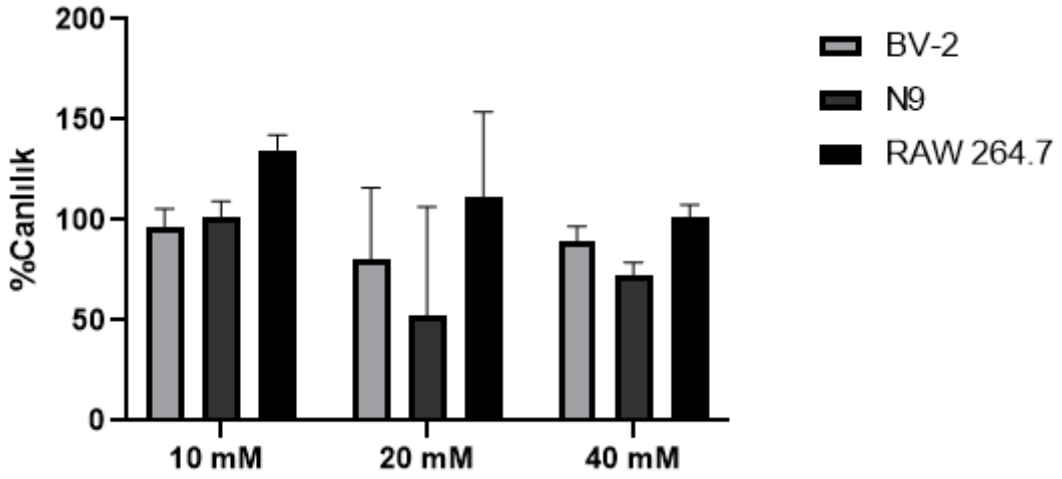
Şekil 24. L929 fare fibroblast hücre hattının artan magnezyum klorür dozlarıyla (0,1; 0,2; 0,4; 0,8; 1,6 mM $MgCl_2$) 72 saat kültürlenerek IC50 değerinin MTT metoduyla analiz edilmesi

L929 fare fibroblast hücre hattı kuyu başına 10.000 hücre olacak şekilde artan magnezyum klorür dozlarıyla F-bottom plateye ekildi ve 72 saatin sonunda $MgCl_2$'nin L929 hücre hattıyla etkileşimi sonucunda $MgCl_2$'nin etkin dozu tespit edildi. Sonuç olarak 1,6 mM $MgCl_2$'nin L929 fare fibroblast hücre hattı üzerinde etkin doz olduğu belirlendi.



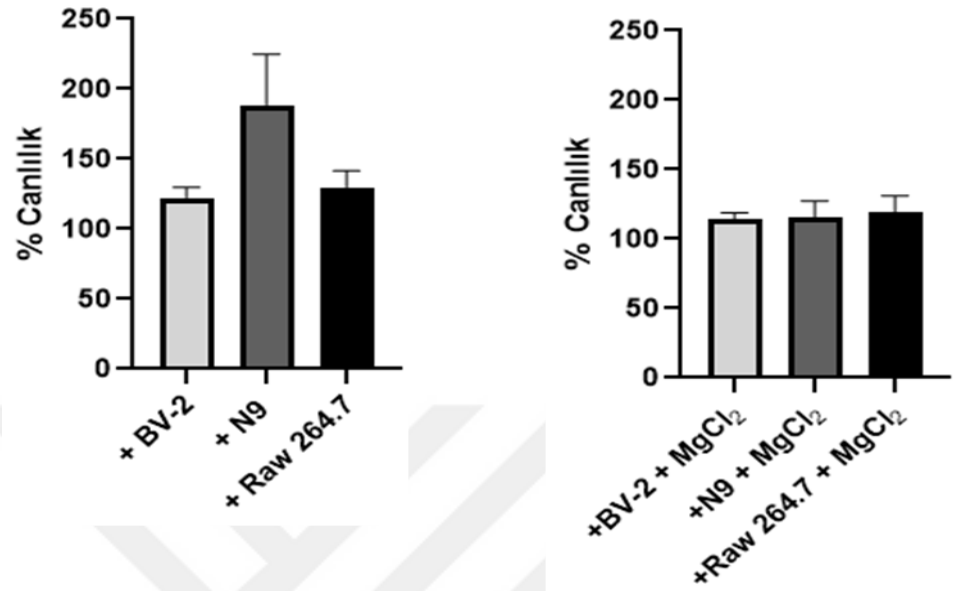
Şekil 25. L929 fare fibroblast hücre hattı, BV-2 fare mikroglia hücre hattı, N9 fare mikroglia hücre hattının (1,6; 8; 40 mM $MgCl_2$) 72 saat kültürlenerek IC50 değerinin MTT metoduyla analiz edilmesi

L929, BV-2, N9, hücre hatları artan dozlarda MgCl2 ile kültürlendikten 72 saat kültürlendikten sonra $MgCl_2$' nin bu hücre hatlarının canlılıklarına etkisi mikroplaka okuyucu ile 570 nm' de analiz edildi. Sonuç olarak $MgCl_2$' nin 40 mM dozunun BV-2 hücre hattına toksik geldiği tespit edildi (Şekil 25' de görüldüğü gibi).



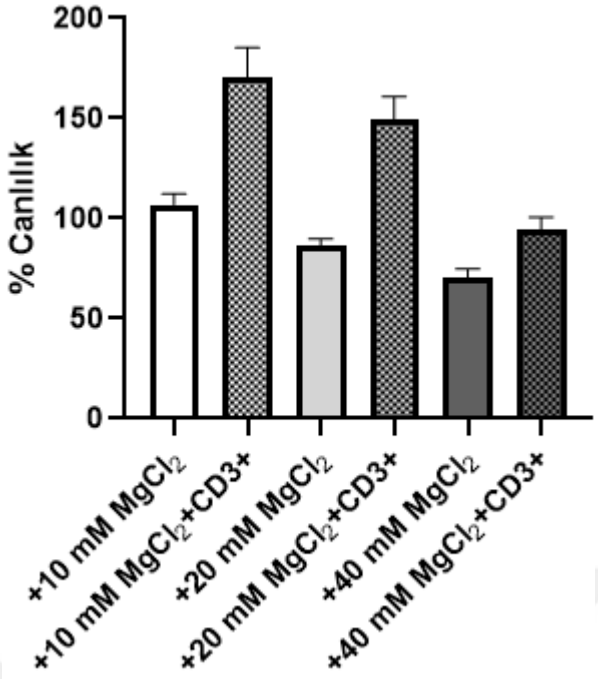
Şekil 26. N9, BV-2 mikroglia hücre hatları ve RAW 264.7 makrofaj hücre hattının artan magnezyum klorür dozlarıyla (10/20/40 mM $MgCl_2$) 48 saat kültürlenerek IC50 değerinin MTT metoduyla analiz edilmesi

N9, BV-2 mikroglia hücre hatları ve RAW 264.7 makrofaj hücre hattının artan magnezyum klorür dozlarıyla (10/20/40 mM $MgCl_2$) 48 saat kültürlendikten sonra $MgCl_2$' nin bu hücre hatlarının canlılıklarına etkisi mikroplaka okuyucu ile 570 nm' de analiz edildi. Sonuç olarak magnezyum klorürün hücreler üzerinde IC50 değeri 40 mM olarak seçildi (Şekil 26' da görüldüğü gibi).



Şekil 27. N9, BV-2 mikroglia hücre hatları ve RAW 264.7 makrofaj hücre hattının 4T1 meme kanseri hücre hattı ile 48 saat kültürlenmesi sonucu MTT metoduyla canlılık analizi ve aynı koşulların daha önceden IC50 değeri 40 mM olarak tespit edilen $MgCl_2$ ile 48 saat kültürlenmesi sonucu MTT metoduyla canlılık analizi (4T1'e göre normalize edilmiştir).

40 mM doz temel alınarak, N9, BV-2 ve RAW 264.7 hücre hatları, 4T1 üçlü negatif meme kanseri hücre hattı ile birlikte ko-kültüre edilmiştir. Karşılaştırma yapabilmek amacıyla, aynı hücre kombinasyonlarının $MgCl_2$ içermeyen fakat 4T1 hücre hattı içeren koşulları da kontrol grubu olarak değerlendirilmiştir. Bu veriler 4T1' in tek başına kültürlendiği koşuldan elde edilen verilere göre normalize edilmiştir. N9 hücre hattının canlılığı 4T1 ile kültürlendiği koşula göre 4T1 ve 40 mM $MgCl_2$ ile kültürlendiği koşula göre canlılığının azaldığı tespit edilirken BV-2 ve RAW 264.7 hücre hatlarının 4T1 ile kültürlendikleri koşula göre 4T1 ve 40 mM $MgCl_2$ ile kültürlendikleri koşullarda değişiklik tespit edilememiştir. (Şekil 27'de gösterildiği gibi).



Şekil 28. Fare dalaklarından izole edilen splenosit artan dozlarda $MgCl_2$ ile kültürlenerek splenositler üzerinde $MgCl_2$' ni IC50 değeri MTT metoduyla saptanmıştır.

Farelerden izole edilen splenositler, U-bottom plaklara her bir kuyuya 200.000 hücre olacak şekilde CD3 antikoru ile uyarılan ve uyarılmayan koşullarda kültüre edildi. CD3 antikoru ile uyarılan ve uyarılmayan koşullardaki hücrelere artan konsantrasyonlarda magnezyum klorür ($MgCl_2$) [10 mM, 20 mM ve 40 mM] ilave edildi. Bu düzenleme ile $MgCl_2$'nin, T hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir. Artan konsantrasyonlarda magnezyum klorür ile kültürlenen uyarımlı koşullardan elde edilen veriler $MgCl_2$'siz kültürlenen uyarımlı splenosit hücrelerden elde edilen verilere göre normalize edilirken; artan konsantrasyonlarda magnezyum klorür ile kültürlenen uyarımsız koşullardan elde edilen veriler ise $MgCl_2$' siz kültürlenen uyarımsız splenosit hücrelerden elde edilen verilere göre normalize edildi.Sonuç olarak splenositler için uygun 20 mM $MgCl_2$ doz değeri seçildi (Şekil 28' de görüldüğü gibi).

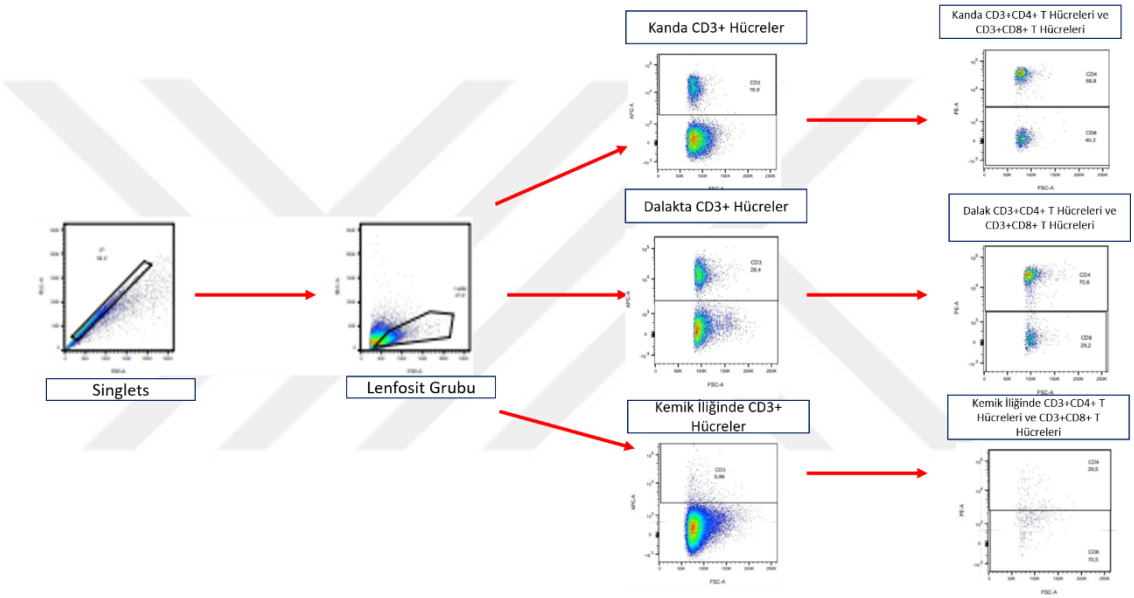
4.2. Sağlıklı BALB/C Farelere $MgCl_2$ Uygulaması Sonrası Lenfosit ve Miyeloid Hücre Değişimi

4.2.1. Magnezyum klorür enjeksiyonu sonrası lenfosit belirteçlerinin yüzdesi

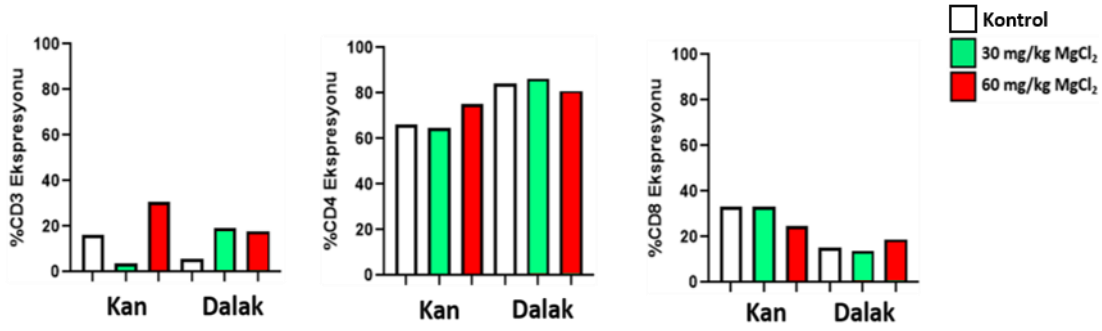
Yapılan deneyde 8 haftalık dişi balb/c farelere düşük doz (30 mg/kg) ve yüksek

doz (60 mg/kg) magnezyum klorür ($MgCl_2$) uygulanarak dozlar arası karşılaştırmalar yapılmıştır. Ayrıca doz sayıları arasında da karşılaştırma yapabilmek için belirli gruplara 2 doz düşük ve yüksek $MgCl_2$ enjeksiyonu yapılırken belirli gruplara 4 doz düşük ve yüksek $MgCl_2$ enjeksiyonu yapılmıştır. Bir grup fare de kontrol grubu olarak tayin edilerek sadece steril distile su enjeksiyonu yapılmıştır ve böylelikle $MgCl_2$'nin hematopoeze etkisi değerlendirilmiştir.

Enjeksiyonlar bittikten sonra yapılan sakrfikasyon sonucunda kan, dalak ve kemik iliği örnekleri CD3, CD4 antikorları ile boyanarak lenfosit popülasyon yüzdeleri arasındaki farklar tespit edilmiştir (Şekil 29' da görüldüğü gibi).



Şekil 29. Sakrifikasyon sonrasında CD3, CD4 antikorları ile boyanan kan, dalak ve kemik iliğinin lenfosit kapılama stratejisi



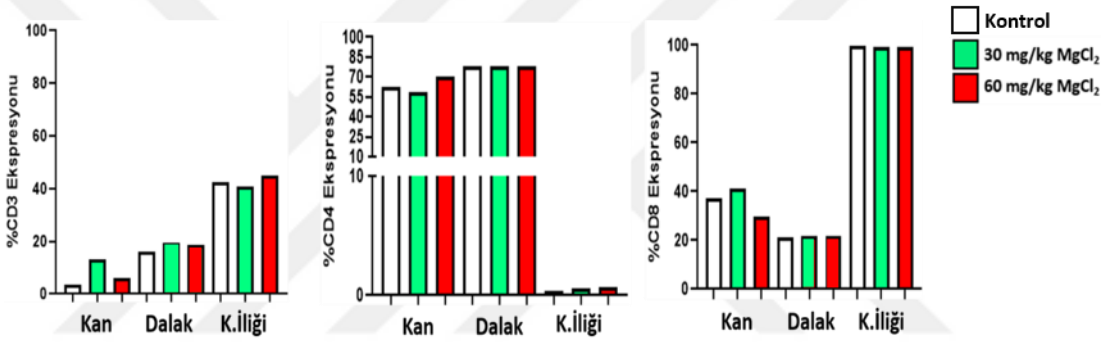
Şekil 30. 2 kez tedavi alan grupların sakrifikasyon sonrasında CD3, CD4 antikorları ile boyanan kan ve dalak örneklerinin $CD3^+$, $CD3^+CD4^+$ ve $CD3^+CD4^-CD8^+$ yüzde ekspresyon seviyeleri

2 kez 30 mg/kg dozunda $MgCl_2$ tedavisi alan grubun kan örneğindeki CD3+ hücre popülasyonu seviyesi kontrol grubundaki $CD3^+$ hücre popülasyonu seviyesine göre azaldığı görülürken 2 kez 60 mg/kg dozunda $MgCl_2$ tedavisi alan grubun kan

örneğindeki $CD3^+$ hücre popülasyonunun kontrol grubundaki $CD3^+$ hücre popülasyonuna göre arttığı gözlemlenmiştir.Dalak örneklerinde ise kontrol grubuna göre 30 mg/kg ve 60 mg/kg dozunda $MgCl_2$ tedavisi alan iki grubunda $CD3^+$ hücre popülasyonu seviyesinde artış olduğu tespit edilmiştir (Şekil 29' da görüldüğü gibi).

$CD3^+CD4^+$ hücre popülasyonu seviyesi, kan örneklerinde kontrol grubuna göre 60 mg/kg dozunda $MgCl_2$ tedavisi alan grupta arttığı görülürken dalakta ise kontrol grubuna göre 60 mg/kg dozunda $MgCl_2$ tedavisi alan grubun $CD3^+CD4^+$ hücre popülasyonu seviyesinin azaldığı tespit edildi.

$CD3^+CD4^-CD8^+$hücre popülasyonu seviyesi, kan örneklerinde kontrol grubuna göre 60 mg/kg dozunda $MgCl_2$ tedavisi alan grupta azaldığı gözlemlenirken dalak örneklerinde ise bu hücre popülasyonunun kontrol grubuna göre arttığı tespit edildi.

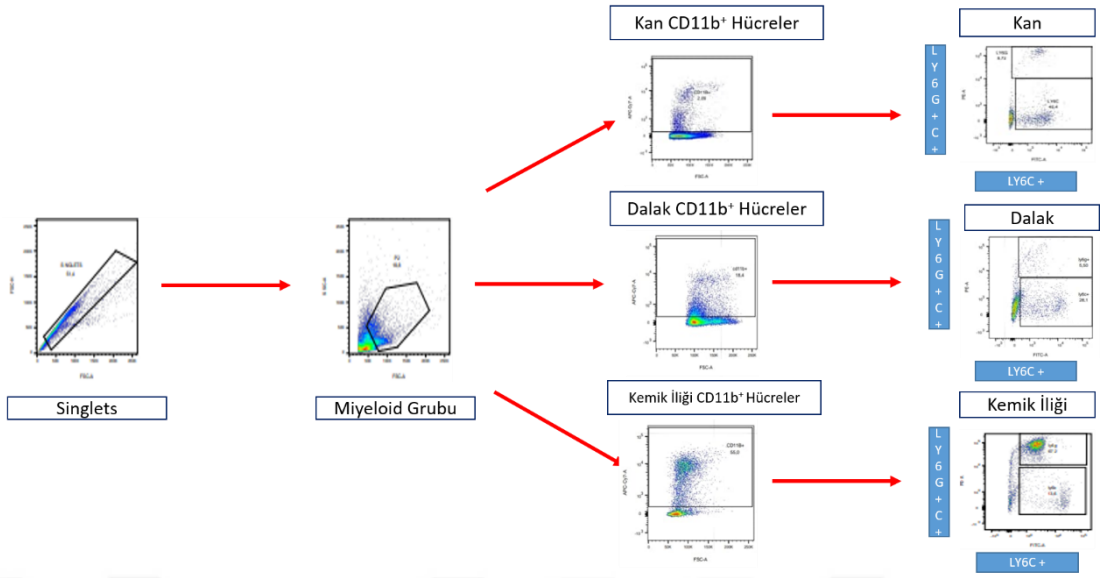


Şekil 31. 4 kez tedavi alan grupların sakrifikasyon sonrasında CD3, CD4 antikorları ile boyanan kan, splenosit ve kemik iliği örneklerinin $CD3^+$, $CD3^+CD4^+$ ve $CD3^+CD4^-CD8^+$ yüzde ekspresyon seviyeleri

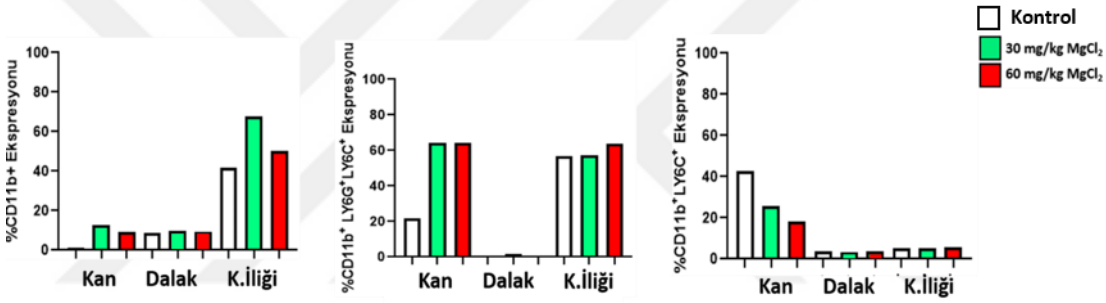
4 kez 30 mg/kg dozunda $MgCl_2$ tedavisi alan grubun kan örneğinde $CD3^+$ hücre popülasyonunun seviyesini kontrol grubuna göre arttığı gözlemlenirken, splenosit ve kemik iliği örneklerinde değişiklik tespit edilememiştir. $CD3^+CD4^+$ hücre popülasyonunun kandaki seviyesinde ise kontrol grubuna göre 60 mg/kg $MgCl_2$ tedavisi alan grupta artış tespit edildi. $CD3^+CD4^-CD8^+$ hücre popülasyonunun kan örneğindeki seviyesi kontrol grubuna göre 30 mg/kg $MgCl_2$ tedavisi alan grupta yükseldiği gözlemlenirken splenosit ve kemik iliği örneklerinde belirgin bir fark tespit edilemedi (Şekil 31' de görüldüğü gibi).

4.2.2. Magnezyum klorür enjeksiyonu sonrası miyeloid hücre belirteçlerinin yüzdesi

Enjeksiyonlar bittikten sonra yapılan sakrfikasyon sonucunda kan, dalak ve kemik iliği örnekleri CD11b, Ly6G, Ly6C antikorları ile boyanarak monosit, nötrofil ve MDSC (M-MDSC ve G-MDSC) popülasyon yüzdeleri arasındaki farklar tespit edilmiştir (Şekil 31' de görüldüğü gibi).

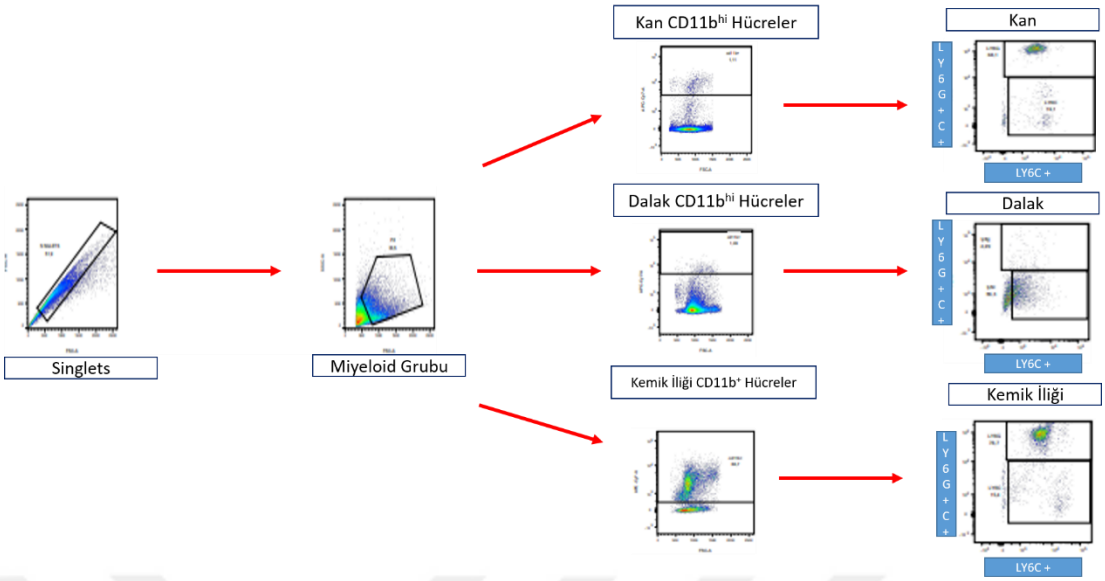


Şekil 32. Sakrifikasyon sonrasında CD11b, Ly6C ve Ly6G antikorları ile boyanan kan, dalak ve kemik iliğinin nötrofil kapılama stratejisi

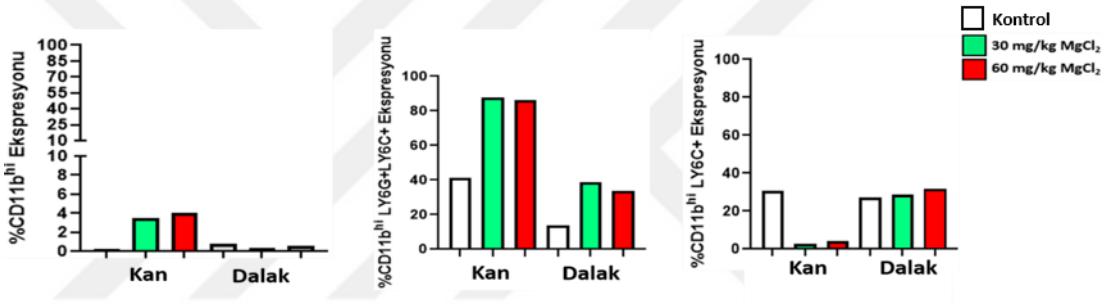


Şekil 33. 4 kez tedavi alan grupların sakrifikasyon sonrasında CD11b, Ly6G, Ly6C antikorları ile boyanan kan, dalak ve kemik iliği örneklerinin nötrofil popülasyonlarının yüzdelerinin seviyeleri

4 kez tedavi alan grupların $CD11b^+$ hücre popülasyonunun kan örneklerindeki seviyelerinde kontrol grubuna göre 30 mg/kg ve 60 mg/kg $MgCl_2$ tedavisi alan gruplarda arttığı gözlemlenirken kemik iliğinde ise bu hücre popülasyonunun 30 mg/kg $MgCl_2$ tedavisi alan grupta olduğu tespit edildi. M-MDSC'nin kan örneklerindeki seviyesi kontrol grubuna göre 30 mg/kg ve 60 mg/kg $MgCl_2$ tedavisi alan gruplarda arttığı gözlemlenirken splenositlerde 30 mg/kg tedavi alan grupta en yüksek iken kemik iliği örneğinde 60 mg/kg $MgCl_2$ tedavi alan grupta diğer gruplara göre arttığı tespit edildi.G- MDSC'nin kan örneklerindeki seviyesinde kontrol grubuna göre $MgCl_2$ tedavisi alan iki grupta da azaldığı gözlemlenirken splenositlerde ve kemik iliğinde gruplar arasında fark tespit edilemedi (Şekil 33' de görüldüğü gibi).



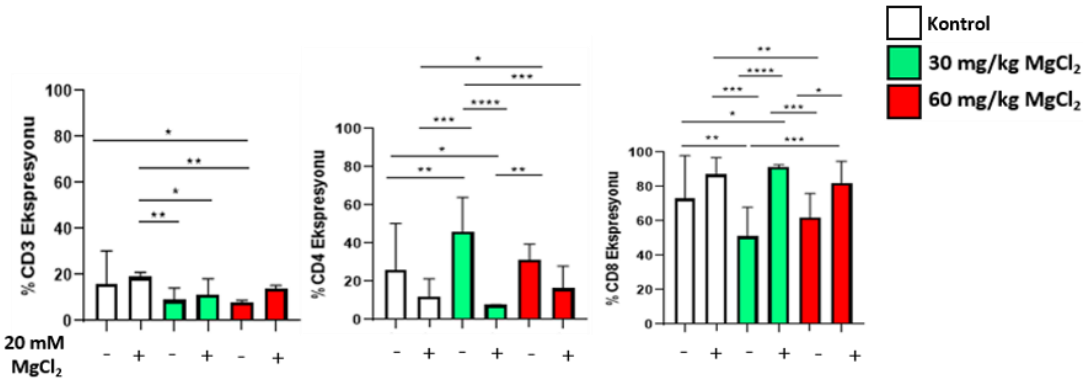
Şekil 34. Sakrifikasyon sonrasında CD11b, Ly6C ve Ly6G antikorları ile boyanan kan, dalak ve kemik iliğinin MDSC kapılama stratejisi



Şekil 35. 4 kez tedavi alan grupların sakrifikasyon sonrasında CD11b, Ly6G,Ly6C antikorları ile boyanan kan örneklerinin MDSC popülasyon yüzdesinin seviyeleri

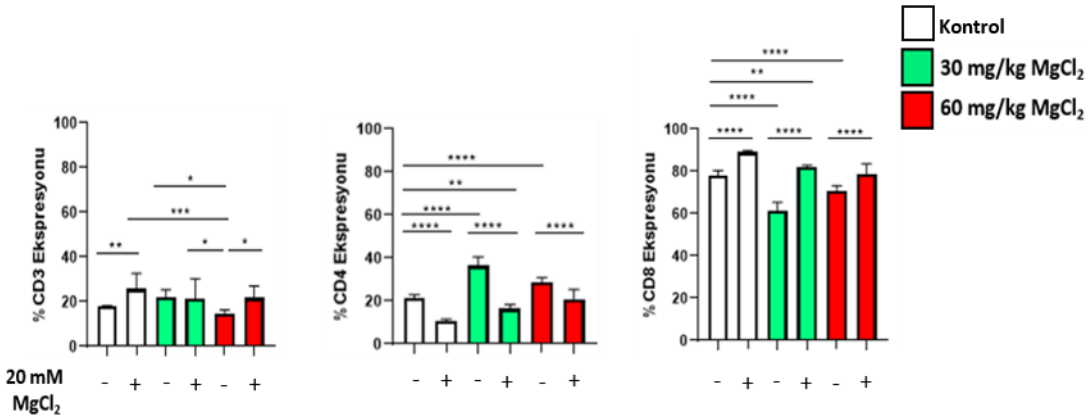
4 kez tedavi alan grupların CD11b+ hücre popülasyonunun kan örneklerindeki seviyelerinde kontrol grubuna göre 30 mg/kg ve 60 mg/kg $MgCl_2$ tedavisi alan gruplarda artış gözlemlenirken splenosit örneklerinin CD11b+ hücre popülasyonunda gruplar arasında önemli bir fark tespit edilemedi. G-MDSC ($CD11b^{hi}$ $Ly6G^{+}Ly6C^{+)}$ popülasyonunun kan ve splenosit örneklerinde kontrol grubuna göre $MgCl_2$ alan gruplarda arttığı tespit edildi. M-MDSC ($CD11b^{hi}$ $Ly6C^{+)}$ hücre popülasyonunun kan örneklerinde $MgCl_2$ tedavisi alan grupların kontrol grubuna göre azaldığı gözlemlenirken splenositlerde kontrol grubuna göre 60 mg/kg $MgCl_2$ tedavisi alan grupta arttığı tespit edildi (Şekil 35'de görüldüğü gibi).

Dört kez tedavi uygulanmış gruplardan, sakrifikasyon sonrası 3 gün kültüre edilen kemik iliği örnekleri, CD3, CD4 antikorlarıyla boyanarak $CD3^{+}$, $CD3^{+}CD4^{+}$ ve $CD3^{+}CD4^{-}CD8^{+}$yüzde ekspresyon seviyeleri belirlendi.



Şekil 36. 4 kez tedavi alan grupların sakrifikasyon sonrasında 3 gün kültürlenen örneklerin CD3, CD4 antikorları ile boyanan kemik iliği örneklerinin sırasıyla $CD3^+$, $CD3^+CD4^+$ ve $CD3^+CD4^-CD8^+$ popülasyon yüzdesinin seviyeleri ($p<0,05$*; $p<0,01$**; $p<0,001$***; $p<0,0001$****).

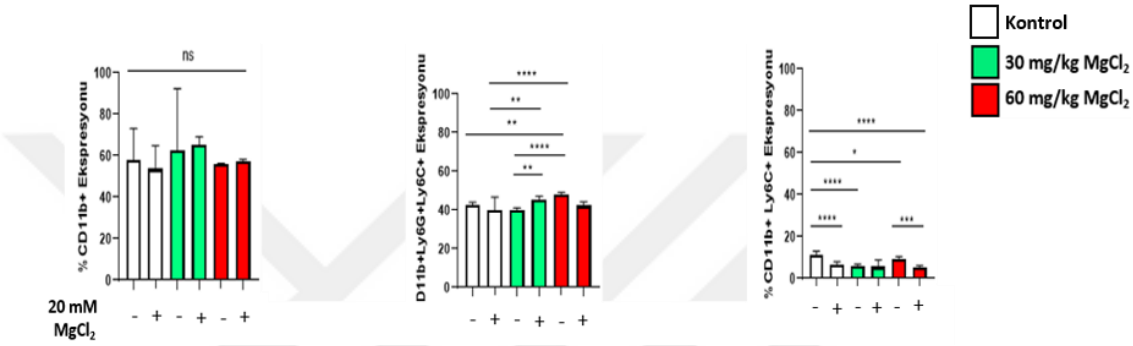
4 kez tedavi alan grupların sakrifikasyon sonrası izole edilen kemik iliği örneklerinde kontrol grubuna göre $MgCl_2$ tedavisi alan iki grupta da $CD3^+$ hücre popülasyonu seviyesinde anlamlı şekilde azalma tespit edildi (Şekil 36' da görüldüğü gibi). $CD3^+CD4^+$ hücre popülasyonu seviyesinde ise kontrol grubuna göre $MgCl_2$ alan iki grupta da anlamlı şekilde artış olduğu ve en yüksek $CD3^+$ $CD4^+$ hücre popülasyonu seviyesine sahip olan grubun 30 mg/kg $MgCl_2$ alan grup olduğu tespit edildi. $CD3^+$ $CD4^-$ $CD8^+$ hücre popülasyonu seviyesi ise kontrol grubuna göre $MgCl_2$ alan iki grupta azaldığı gözlemlenirken 30 mg/kg $MgCl_2$ alan grubun $CD3^+$ $CD4^-$ $CD8^+$ hücre popülasyonu seviyesi 60 mg/kg $MgCl_2$ alan gruba göre daha az olduğu tespit edildi (Şekil 36' da görüldüğü gibi).



Şekil 37. 4 kez tedavi alan grupların sakrifikasyon sonrasında 3 gün kültürlenen örneklerin CD3, CD4 antikorları ile boyanan splenosit örneklerinin sırasıyla $CD3^+$, $CD3^+CD4^+$ ve $CD3^+CD4^-CD8^+$ popülasyon yüzdesinin seviyeleri ($p<0,05$*; $p<0,01$**; $p<0,001$***; $p<0,0001$****).

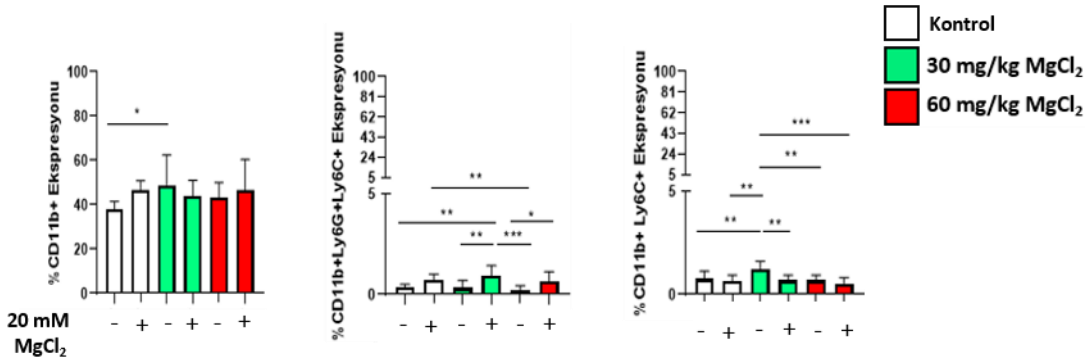
4 kez tedavi alan grupların sakrifikasyon sonrası kontrol grubunun ve 60 mg/kg $MgCl_2$ alan grubun splenosit hücreleri 20 mM $MgCl_2$ ile kültürlendiğinde $MgCl_2$' siz kültürlenmiş koşuluna göre $CD3^+$ hücre popülasyonunda artış tespit edildi. $CD3^+CD4^+$

hücre popülasyonu seviyesinde bu durum tam tersi olarak tüm grupların splenosit hücreleri 20 mM $MgCl_2$ ile kültürlendiğinde $MgCl_2$'siz kültürlenmiş koşuluna göre azalış gösterdi. Ayrıca kontrol grubuna göre $MgCl_2$ tedavisi alan grupların $CD3^+CD4^+$ hücre popülasyonunda anlamlı artış tespit edildi. $CD3^+CD4^-CD8^+$ hücre popülasyonunda tüm grupların splenosit hücreleri 20 mM $MgCl_2$ ile kültürlendiğinde $MgCl_2$' siz kültürlenmiş koşuluna göre artış gözlemlenirken en yüksek $CD3^+CD4^-CD8^+$ hücre popülasyonuna sahip koşulun kontrol grubu splenositlerinin 20 mM $MgCl_2$ ile kültürlendiği koşul olduğu tespit edildi (Şekil 37' de görüldüğü gibi).



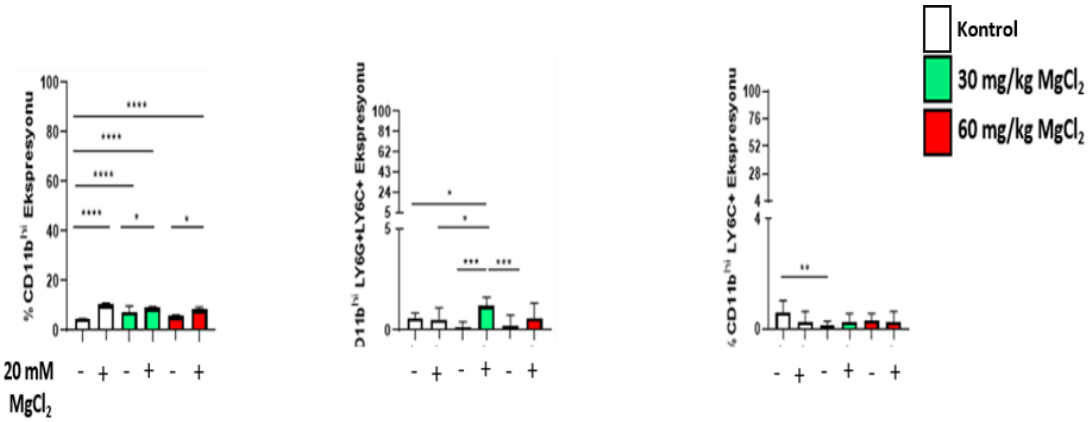
Şekil 38. 4 kez tedavi alan grupların sakrifikasyon sonrasında 3 gün kültürlenen örneklerin CD11b, Ly6G, Ly6C antikorları ile boyanan kemik iliği örneklerinin miyeloid ve nötrofil yüzdeleri tespit edilmiştir
(p<0,05*; p<0,01**; p<0,001***; p<0,0001****).

4 kez tedavi alan grupların sakrifikasyon sonrası kemik iliği örneklerindeki $CD11b^+$ seviyelerinde anlamlı bir fark tespit edilemedi. $CD11b^+Ly6G^+Ly6C^+$ ekspresyonunda, kemik iliği hücrelerinin 20 mM $MgCl_2$ ile kültürlendiği koşul $MgCl_2$' siz kültürlenmiş koşuluna göre anlamlı artış gösteren tek grubun 30 mg/kg $MgCl_2$ tedavisi alan grup olduğu tespit edildi. $CD11b^+Ly6C^+$ ekspresyonunda kontrol grubuna göre $MgCl_2$ tedavisi alan gruplarda anlamlı şekilde azaldığı tespit edildi. Ayrıca kontrol grubu ve 60 mg/kg $MgCl_2$ tedavisi alan grubun kemik iliği hücrelerinin 20 mM $MgCl_2$ ile kültürlendiği koşullarda $MgCl_2$' siz kültürlenmiş koşullara göre $CD11b^+Ly6C^+$ ekspresyonunda anlamlı azalma olduğu göstermiştir (Şekil 38' de görüldüğü gibi).



Şekil 39. 4 kez tedavi alan grupların sakrifikasyon sonrasında 3 gün kültürlenen örneklerin CD11b, Ly6G, Ly6C antikorları ile boyanan splenosit örneklerinin miyeloid ve nötrofil yüzdeleri tespit edilmiştir (p<0,05*; p<0,01**; p<0,001***; p<0,0001****).

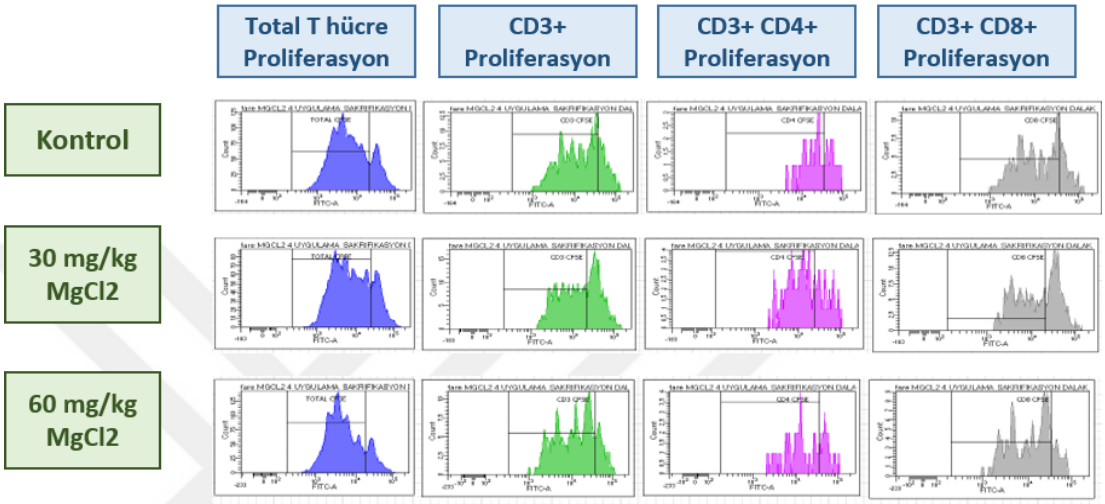
4 kez tedavi alan grupların sakrifikasyon sonrası splenosit örneklerinde $CD11b^+$ seviyesinde kontrol grubuna göre 30 mg/kg $MgCl_2$ tedavi alan grupta anlamlı artış gözlemlendi. $CD11b^+Ly6G^+Ly6C^+$ seviyelerinin 20 mM $MgCl_2$ ile kültürlenen koşulların $MgCl_2$'siz kültürlenen splenositlere göre tüm gruplarda anlamlı artış gösterdiği gözlemlendi. Ayrıca $CD11b^+$ $Ly6G^+Ly6C^+$ seviyesinin en yüksek olduğu koşul 30 mg/kg $MgCl_2$ tedavisi alan grubun splenosit örneklerinin 20 mM MgCl2 ile kültürlendiği koşul olduğu tespit edildi. $CD11b^+$ $Ly6C^+$ ekspresyon seviyesi kontrol grubuna göre 30 mg/kg $MgCl_2$ tedavisi alan grupta anlamlı şekilde artış gözlemlenirken bu grubun splenositi 20 mM $MgCl_2$ ile kültürlendiğinde $CD11b^+$ $Ly6C^+$ ekspresyon seviyesi anlamlı şekilde azaldığı tespit edildi (Şekil 39' da görüldüğü gibi).



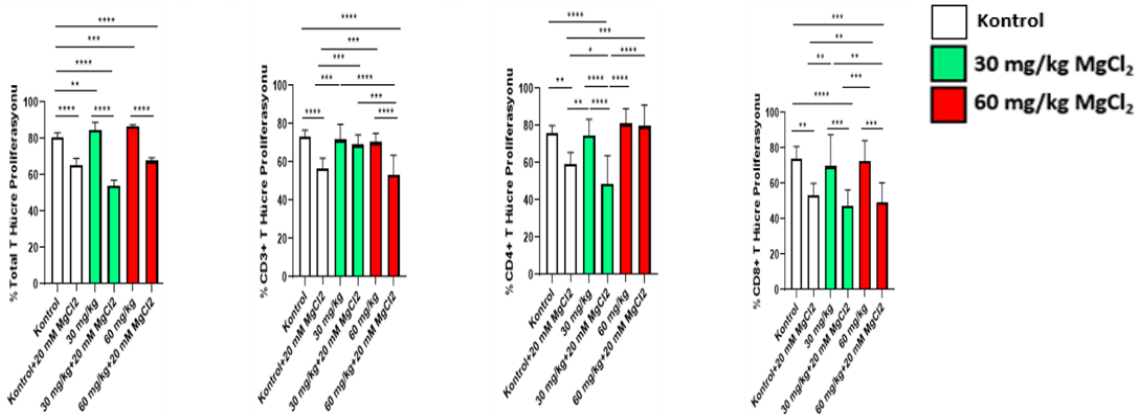
Şekil 40. 4 kez tedavi alan grupların sakrifikasyon sonrasında 3 gün kültürlenen örneklerin CD11b, Ly6G, Ly6C antikorları ile boyanan splenosit örneklerinin miyeloid ve MDSC yüzdeleri tespit edilmiştir (p<0,05*; p<0,01**; p<0,001***; p<0,0001****).

4 kez tedavi alan grupların sakrifikasyon sonrası splenosit örneklerinde $CD11b^{hi}$ seviyesinde kontrol grubuna göre $MgCl_2$ tedavisi alan gruplarda anlamlı artış

gözlemlendi. Ayrıca tüm gruplarda 20 mM $MgCl_2$ ile kültürlenen koşullar $MgCl_2$' siz kültürlenen koşullara göre $CD11b^{hi}$ seviyesinin anlamlı şekilde arttığı tespit edildi. $CD11b^{hi}Ly6G^{+}Ly6C^{+}$ seviyesinin en yüksek olduğu koşulun 30 mg/kg $MgCl_2$ tedavisi aldıktan sonra 20 mM $MgCl_2$ ile kültürlenen koşul olduğu tespit edilmiştir. $CD11b^{hi}Ly6C^{+}$ seviyesi kontrol grubuna göre 30 mg/kg $MgCl_2$ tedavisi alan grupta anlamlı şekilde azaldığı tespit edilmiştir (Şekil 40' da görüldüğü gibi).



Şekil 41. 4 kez tedavi alan grupların sakrifikasyon sonrasında izole edilen CFSE işaretli splenositleri kültürlendikten 72 saat sonra CD3, CD4 antikorları ile boyanarak lenfositlerin proliferasyon yüzdelerinin gruplar arasındaki farkları karşılaştırıldı.



Şekil 42. 4 kez tedavi alan grupların sakrifikasyon sonrasında izole edilen splenositleri CFSE işaretlendikten sonra belirli koşullarda ekimi yapıldıktan 72 saat sonra CD3, CD4 antikorları ile boyanarak lenfositlerin proliferasyon yüzdeleri tespit edilmiştir ($p<0,05$*; $p<0,01$**; $p<0,001$***; $p<0,0001$****).

4 kez tedavi alan grupların sakrifikasyon sonrası izole edilen ve CFSE işaretlenen splenosit örneklerinde total T hücre proliferasyonu tüm gruplarda $MgCl_2$'siz kültürlenen koşullara göre 20 mM $MgCl_2$ ile kültürlenen koşullarda anlamlı şekilde azaldığı tespit edildi. Ayrıca kontrol grubuna göre $MgCl_2$ tedavisi alan iki grubun da total T hücre proliferasyonda anlamlı artış gözlemlendi. CD3+ T hücre proliferasyonu

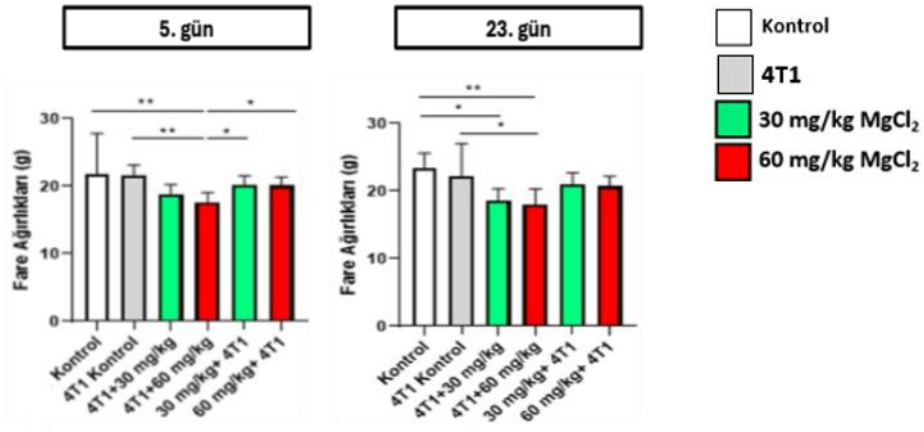
kontrol grubunda ve 60 mg/kg $MgCl_2$ tedavisi alan grubun $MgCl_2$' siz koşullara göre 20 mM $MgCl_2$ ile kültürlenen koşullarda anlamlı şekilde azaldığı tespit edildi. CD4+ T hücre proliferasyonu kontrol grubunda ve 30 mg/kg $MgCl_2$ tedavisi alan grubun $MgCl_2$'siz koşullara göre 20 mM $MgCl_2$ ile kültürlenen koşullarda anlamlı şekilde azaldığı tespit edildi. Ayrıca 20 mM $MgCl_2$ ile kültürlenen koşullarda en yüksek CD4+ T hücre proliferasyonuna sahip grubun ise 60 mg/kg $MgCl_2$ tedavisi alan grup olduğu tespit edildi. CD8+ T hücre proliferasyonu tüm grupların $MgCl_2$' siz koşullarına göre 20 mM $MgCl_2$ ile kültürlenen koşullarda anlamlı şekilde azaldığı tespit edildi (Şekil 41'de görüldüğü gibi) (Şekil 42' de görüldüğü gibi).

4.2.3. 4T1 ÜNMK meme kanser modelinde magnezyum klorür enjeksiyonu

8 haftalık balb/c dişi farelerin önce ağırlıkları tartıldı ve kontrol grubu olarak steril distile su enjesiyonu yapılacak grup, sadece 4T1 enjeksiyonu yapılacak grup, düşük ve yüksek doz $MgCl_2$' nin intraperitoneal olarak enjeksiyonunun yapılacağı post ve pre tedavi olmak üzere 6 gruba ayrıldı. Gruplara 5 günde bir düşük ve yüksek doz $MgCl_2$ ya da steril distile su verildi. Bu süreç boyunda 5 kez fare ağırlıkları ölçülürken tümör enjeksiyonundan 10 gün sonra tümör boyutu kaliper yardımıyla 4 kez ölçüldü. Tümör enjeksiyonundan 25 gün sonra sakrifiye edilen grupların dalak ve tümörlerinin ağırlık ve volümleri ölçüldü.

4.2.4. 4T1 ÜNMK meme kanser modelinde magnezyum klorür enjeksiyonu sonrası hayvan ağırlıkları

8 haftalık balb/c dişi farelerin ağırlıkları 4T1 enjeksiyonu ve tedavi yapılmadan önce tartılarak gruplar homojen şekilde dağıtıldı. 4T1 enjeksiyonunun, $MgCl_2$'nin düşük ve yüksek dozlarda enjeksiyonunun farelerin ağırlıklarına etkisi incelendi.



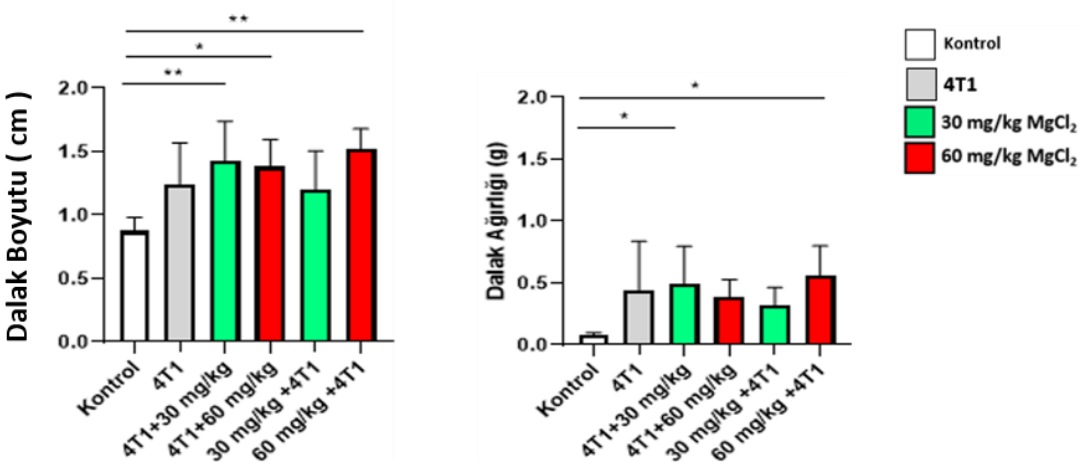
Şekil 43. 8 haftalık BALB/c dişi farelerde 4T1 enjeksiyonu ve düşük ve yüksek $MgCl_2$ tedavisinin fare ağırlıklarındaki değişimler. Kontrol: Sağlıklı BALB/c + dH2O enjeksiyonu (i.p.) ($p<0,05$*; $p<0,01$**; $p<0,001$***; $p<0,0001$****).

Yapılan ilk tartımın sonucu olarak sadece steril distile su enjeksiyonu yapılan gruba göre 4T1+60 mg/kg $MgCl_2$ tedavisi yapılan gruptaki farelerin ağırlıklarının anlamlı şekilde azaldığı tespit edildi. 4T1 tümör modeli oluşturulduktan sonra steril distile su tedavisi oluşturulan gruba göre 4T1+60 mg/kg $MgCl_2$ tedavisi yapılan gruptaki farelerin ağırlıklarının anlamlı şekilde azaldığı tespit edilirken 4T1+60 mg/kg $MgCl_2$ tedavisi yapılan gruptaki farelere göre 60 mg/kg $MgCl_2$ +4T1 tedavisi alan grubun farelerinin ağırlıklarının anlamlı şekilde arttığı tespit edildi. Yapılan ikinci ölçümde ise yine 4T1 tümör modeli oluşturulduktan sonra steril distile su tedavisi oluşturulan gruba göre 4T1+60 mg/kg $MgCl_2$ tedavisi yapılan gruptaki farelerin ağırlıklarının anlamlı şekilde azaldığı tespit edildi (Şekil 43'de görüldüğü gibi).

Yapılan üçüncü tartımda tüm bu sonuçlara ek anlamlı olarak 4T1+30 mg/kg $MgCl_2$ tedavisi yapılan grubun farelerinin ağırlıkları anlamlı olarak azaldığı tespit edildi. Dördüncü ve beşinci tartımın sonucu olarak sadece steril distile su enjeksiyonu yapılan gruba göre 4T1+30 mg/kg $MgCl_2$ ve 4T1+60 mg/kg $MgCl_2$ tedavi alan grupların ağırlıklarının anlamlı olarak azaldığı tespit edildi (Şekil 43' de görüldüğü gibi).

4.2.5. 4T1 ÜNMK meme kanser modelinde magnezyum klorür enjeksiyonu sonrası dalak ağırlık ve boyutları

8 haftalık balb/c dişi farelere 4T1 enjeksiyonu yapıldıktan ve belirli gruplara 5 günde bir olacak şekilde $MgCl_2$ tedavisi uygulandıktan 25 gün sonra tüm gruplar sakrifiye edildi. Sakrifikasyondan sonra dalakların volümleri kaliper ile ölçüldü ve dalakların ağırlıkları tartılarak gruplar arasında farklar tespit edildi.

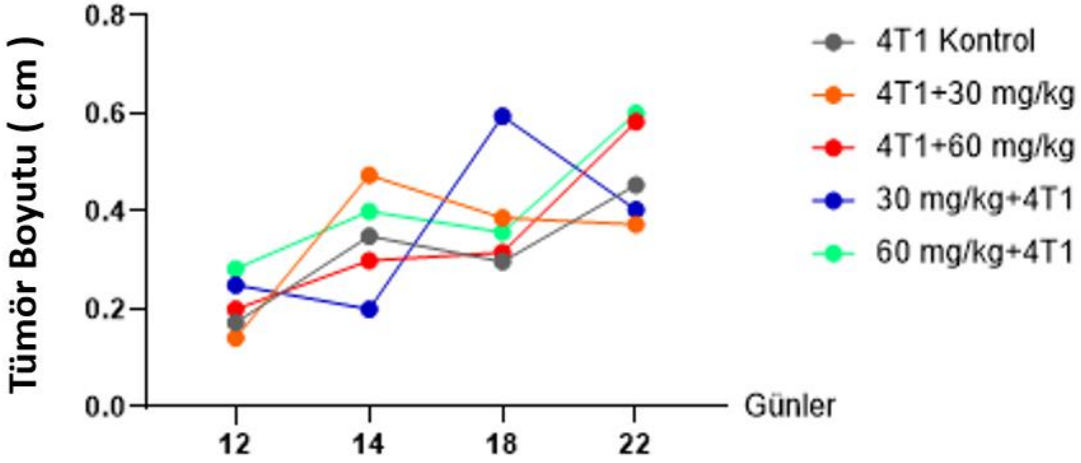


Şekil 44. 8 haftalık balb/c dişi farelerde 4T1 enjeksiyonu ve düşük/yüksek $MgCl_2$ tedavisi yapılması sonrasında dalakların volüm (geometric ortalama) ve ağırlıklarının gruplar arasındaki değişimi ($p<0,05$*; $p<0,01$**; $p<0,001$***; $p<0,0001$****).

Dalak volümünde $MgCl_2$ tedavisinin hem düşük/yüksek dozunun oluşturduğu hem de bu tedavilerin 4T1 enjeksiyonundan önce ve sonra gerçekleşmesinin oluşturduğu farklılık tespit edilmek istendi. Sonuç olarak, sadece steril distile su enjeksiyonu yapılan fare grubunun dalak volümlerine göre 4T1+30 mg/kg $MgCl_2$, 4T1+60 mg/kg $MgCl_2$ ve 60 mg/kg $MgCl_2$+4T1 tedavisi yapılan gruptaki farelerin dalak volümlerinde anlamlı artış tespit edildi. Ayrıca kontrol grubuna göre 4T1+30 mg/kg $MgCl_2$ ve 60 mg/kg $MgCl_2$+4T1 tedavisi yapılan gruplardaki farelerin dalaklarının ağırlıkları anlamlı olarak artış gösterdi (Şekil 44'de görüldüğü gibi).

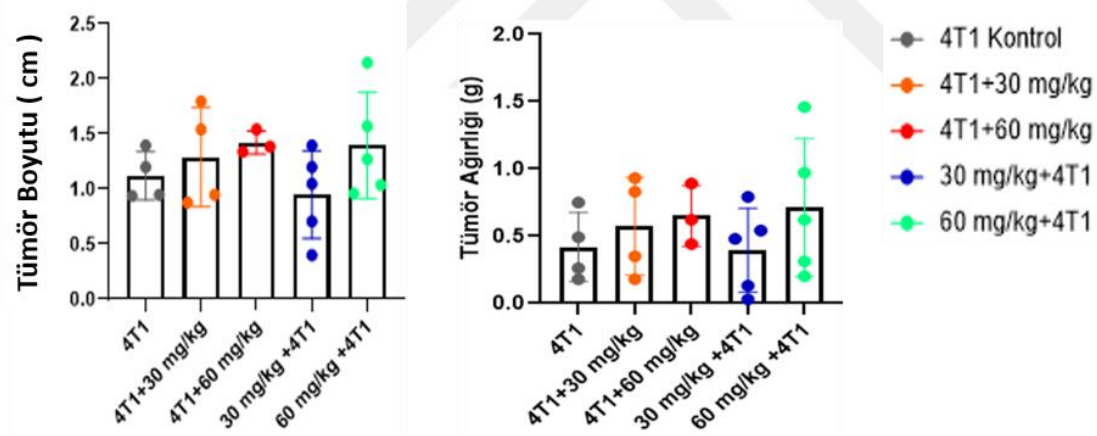
4.2.6. 4T1 ÜNMK meme kanser modelinde magnezyum klorür enjeksiyonu sonrası tümör hacim, ağırlık ve hayatta kalım eğrisi

8 haftalık balb/c dişi farelere 4T1 enjeksiyonu yapıldıktan 10 gün sonra farelerde tümör oluşumu gözlemlendi, $MgCl_2$'nin düşük ve yüksek dozlarda enjeksiyonu yapılan gruplardaki tümör boyutları sadece 4T1 enjeksiyonu yapılan farelerdeki tümör boyutlarıyla kıyaslanarak tümör boyutuna $MgCl_2$'nin düşük ve yüksek dozlarının etkisi analiz edildi.



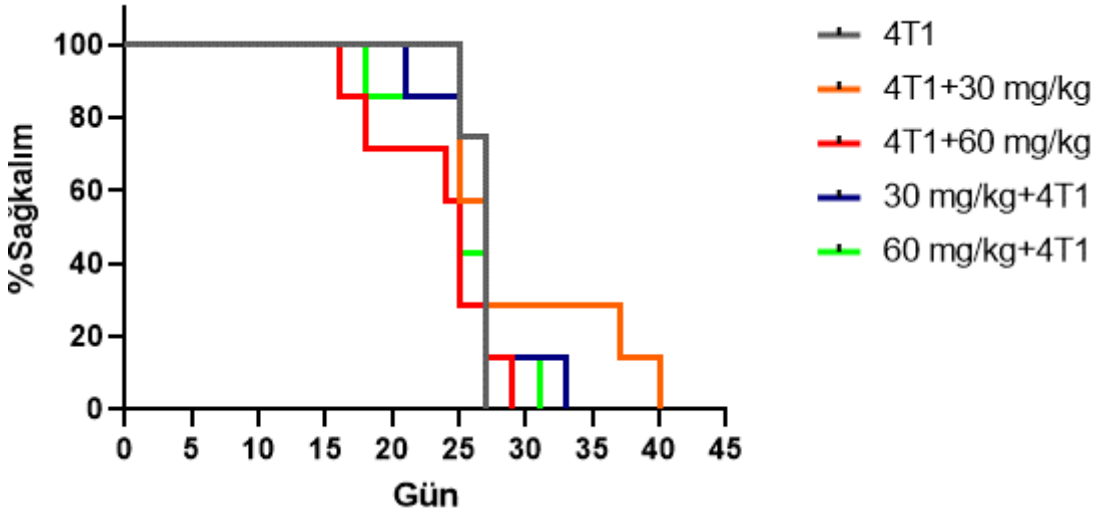
Şekil 45. 8 haftalık BALB/c dişi farelerde 4T1 enjeksiyonu ve düşük ve yüksek $MgCl_2$ tedavisinin farelerde oluşturulan tümör boyutlarındaki değişimler (p<0,05*; p<0,01**; p<0,001***; p<0,0001****).

8 haftalık balb/c dişi farelere 4T1 enjeksiyonu yapıldıktan 10 gün sonra farelerde tümörün şekillendiği gözlemlendi ve 4T1 enjeksiyonu yapıldıktan sonraki 25 gün boyunca tümör boyutları belirli aralıklarla kaliper yardımıyla ölçüldü fakat anlamlı bir sonuç elde edilemedi (Şekil 45'de görüldüğü gibi).



Şekil 46. 8 haftalık BALB/c dişi farelerde 4T1 hücre enjeksiyonunu takiben uygulanan düşük ve yüksek $MgCl_2$ tedavisinin ardından, sakrifikasyon sonrası tümör volümü (geometrik ortalama) ve ağırlığındaki değişimler (p<0,05*; p<0,01**; p<0,001***; p<0,0001****).

8 haftalık balb/c dişi farelere 4T1 enjeksiyonu yapıldıktan 25 gün sonra tüm gruplar sakrifiye edildi. Sakrifiye edilen tüm grupların tümörleri cerrahi olarak çıkarıldıktan sonra tümörlerin volümleri ve ağırlıkları ölçüldü fakat anlamlı bir farklılık gözlemlenemedi (Şekil 46' da görüldüğü gibi).



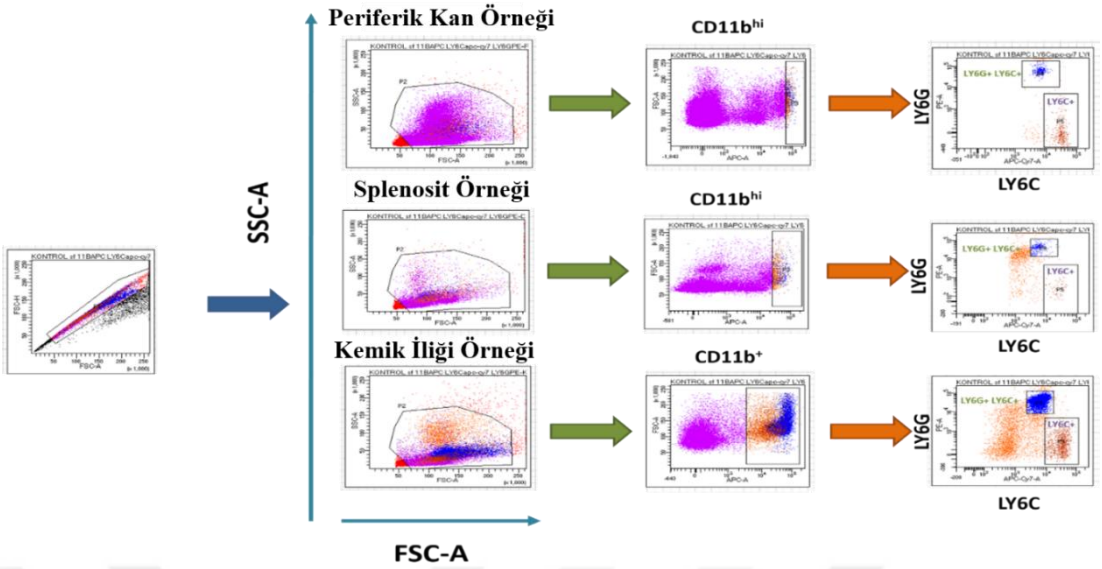
Şekil 47. 8 haftalık balb/c dişi farelerde 4T1 hücre enjeksiyonu kontrol grubu belirlenip diğer gruplara ise 4T1 enjeksiyonu öncesi ve sonrasında düşük ve yüksek $MgCl_2$ tedavisinin uygulanmasının gruplardaki sağkalım yüzdelerine etkisi

8 haftalık balb/c dişi farelerde oluşturalan 4T1 üçlü negatif meme kanseri üzerinde $MgCl_2$ tedavisinin etkisini saptamak için 4T1 enjeksiyonundan önce (pre) ve sonra (post) olmak üzere düşük (30 mg/kg) ve yüksek (60 mg/kg) $MgCl_2$ tedavisi uygulandı. Sonuç olarak 4T1 enjeksiyonundan sonra 30 mg/kg (4T1+30 mg/kg $MgCl_2$) tedavi grubunun diğer gruplardan daha uzun sağkalıma sahip olduğu tespit edildi (Şekil 47' de görüldüğü gibi).

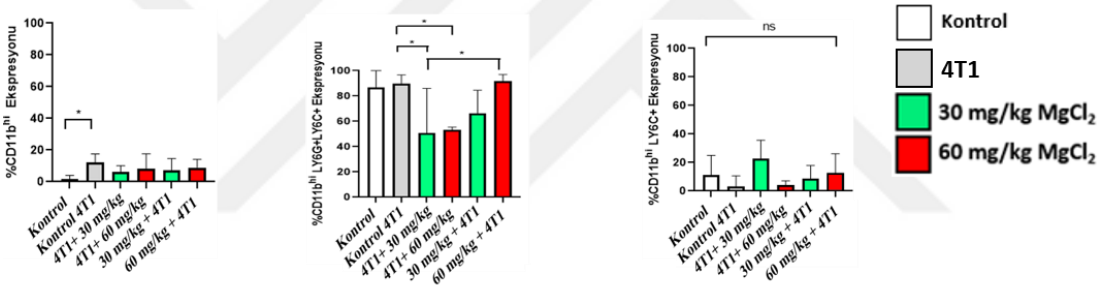
4.2.7. 4T1 ÜNMK meme kanser modelinde magnezyum klorür enjeksiyonu ile değişiklik gösteren MDSC alt-grupları

Yapılan deneyde, 8 haftalık dişi BALB/c farelere tümör modeli oluşturulmadan önce düşük doz (30 mg/kg) ve yüksek doz (60 mg/kg) magnezyum klorür ($MgCl_2$) tedavisi intraperitoneal (i.p.) olarak uygulanarak dozlar arası karşılaştırma yapılmıştır. Ayrıca, tümör modeli oluşturulduktan sonra aynı dozlarda $MgCl_2$ tedavisi uygulanarak, tedavi öncesi (pre) ve sonrası (post) uygulamalar karşılaştırılmıştır. Kontrol grubundaki farelere ise yalnızca steril distile su enjeksiyonu yapılmış ve böylece $MgCl_2$'nin hematopoez üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir.

Enjeksiyonlar bittikten sonra yapılan sakrfikasyon sonucunda kan, dalak, kemik iliği ve tümör örnekleri CD11b, Ly6G, Ly6C antikorları ile boyanarak miyeloid, M-MDSC ve G-MDSC popülasyon yüzdeleri arasındaki farklar tespit edilmiştir.

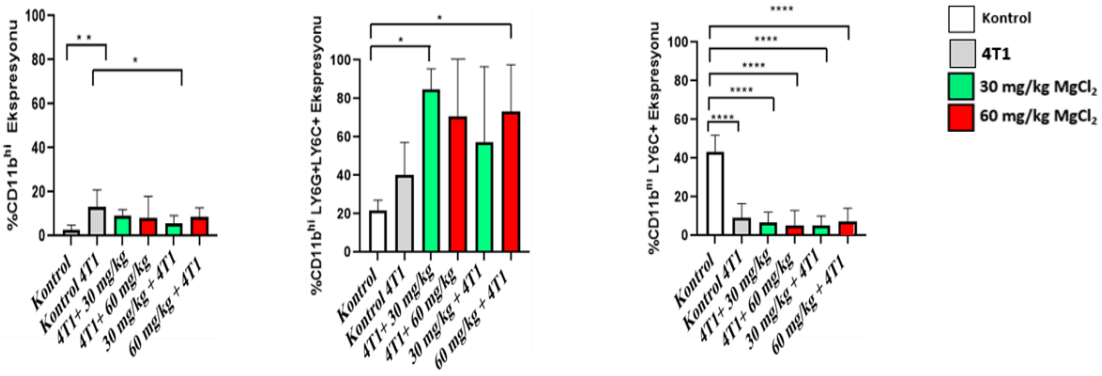


Şekil 48. Sakrifikasyon sonrasında periferik kan, splenosit ve kemik iliği örneklerinin örneklerinin CD11b, Ly6G, Ly6C antikorları ile boyanarak miyeloidlerin ve MDSC hücre gruplarının proliferasyon yüzdelerini tespit ederken uyguladığımız kapılama stratejisi



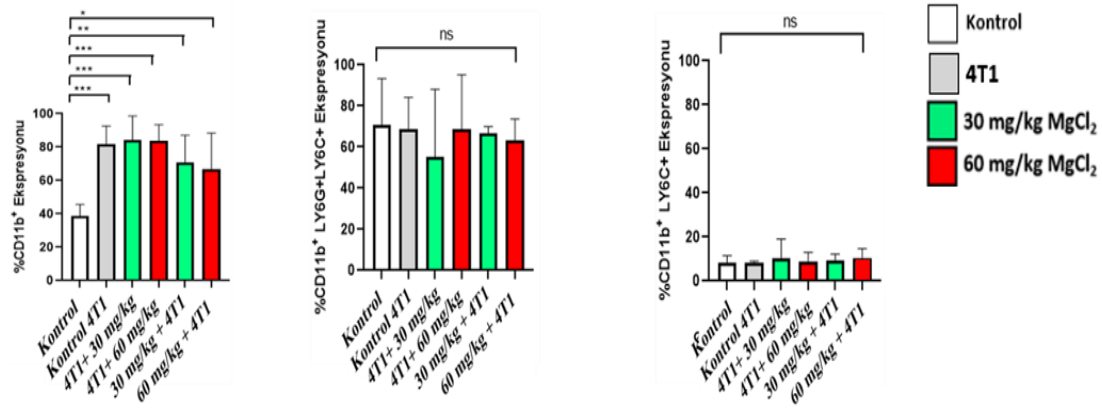
Şekil 49. Sakrifikasyon sonrasında kan örneklerinin CD11b, Ly6G, Ly6C antikorları ile boyanarak miyeloidlerin ve MDSC hücre gruplarının proliferasyon yüzdeleri tespit edilmiştir. Kontrol: Sağlıklı BALB/c + dH_2O ($p<0,05$*; $p<0,01$**; $p<0,001$***; $p<0,0001$****).

Kontrol grubuna göre 4T1 tümörü taşıyan farelerin kan örneklerinde $CD11b^{hi}$ seviyesinde anlamlı olarak arttığı tespit edildi. $CD11b^{hi}$ $Ly6G^{+}$ ekspresyon seviyeleri 4T1 tümörü taşıyan gruba göre tümör enjeksiyonundan sonra 30 mg/kg ve 60 mg/kg $MgCl_2$ tedavisi alan gruplarda anlamlı şekilde azaldığı tespit edildi. $CD11b^{hi}$ $Ly6C^{+}$seviyelerinde gruplar arasında anlamlı fark gözlenmedi (Şekil 49' da görüldüğü gibi).



Şekil 50. Sakrifikasyon sonrasında splenositlerin CD11b, Ly6G, Ly6C antikorları ile boyanarak miyeloidlerin ve MDSC hücre gruplarının proliferasyon yüzdeleri tespit edilmiştir (p<0,05*; p<0,01**; p<0,001***; p<0,0001****).

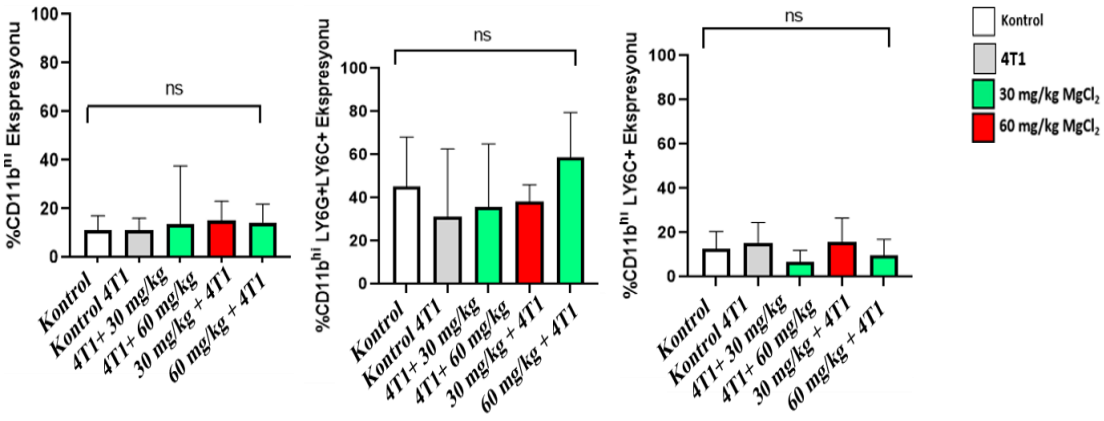
Kontrol grubuna göre 4T1 tümörü taşıyan farelerin splenosit örneklerinde $CD11b^{hi}$ seviyesinde anlamlı artış gözlemlendi.30 mg/kg $MgCl_2$ tedavisinden sonra 4T1 tümör modeli oluşturulan grubun (30 mg/kg + 4T1) $CD11b^{hi}$ seviyesinin 4T1 tümörü taşıyan gruba göre $CD11b^{hi}$ ekspresyon seviyesinin anlamlı şekilde azaldığı tespit edildi. $CD11b^{hi}Ly6G^{+}Ly6C^{+}$ ekspresyon seviyesinin kontrol grubuna göre 4T1 tümör modeli oluşturulduktan sonra 30 mg/kg $MgCl_2$ tedavisi alan grupta (4T1+30 mg/kg) ve 60 mg/kg $MgCl_2$ tedavisi aldıktan sonra 4T1 tümör modeli oluşturulan grupta (60 mg/kg+4T1) anlamlı şekilde arttığı tespit edildi. $CD11b^{hi}Ly6C^{+}$ seviyesi kontrol grubuna göre tüm gruplarda anlamlı şekilde azaldığı tespit edildi (Şekil 50'de görüldüğü gibi).



Şekil 51. Sakrifikasyon sonrasında kemik iliği örneklerinin CD11b, Ly6G, Ly6C antikorları ile boyanarak miyeloidlerin ve MDSC hücre gruplarının proliferasyon yüzdeleri tespit edilmiştir (p<0,05*; p<0,01**; p<0,001***; p<0,0001****).

Kontrol grubuna göre tüm grupların kemik iliği örneklerindeki $CD11b^{hi}$ seviyesinde anlamlı artış gözlemlenirken $CD11b^{hi}Ly6G^{+}Ly6C^{+}$ ve $CD11b^{hi}Ly6C^{+}$

seviyelerinde gruplar arasında anlamlı fark bulunamamıştır (Şekil 51' de görüldüğü gibi).

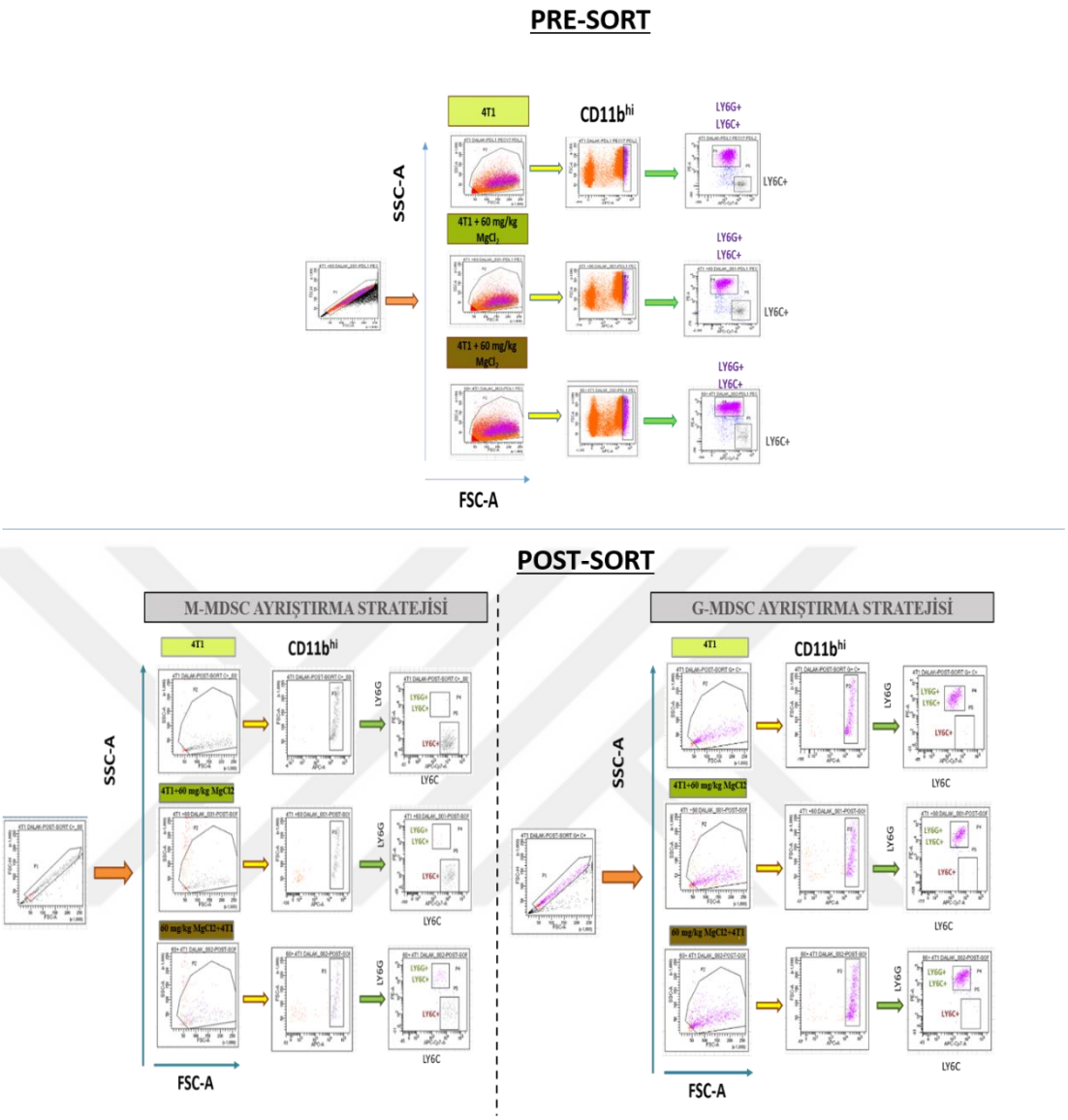


Şekil 52. Sakrifikasyon sonrasında tümör örneklerinin CD11b, Ly6G, Ly6C antikorları ile boyanarak miyeloidlerin ve MDSC hücre gruplarının proliferasyon yüzdeleri tespit edilmiştir ($p<0,05$*; $p<0,01$**; $p<0,001$***; $p<0,0001$****).

Tümör hücrelerinin $CD11b^{hi}$, $CD11b^{hi}Ly6G^{+}Ly6C^{+}$ ve $CD11b^{hi}Ly6C^{+}$ seviyelerinde gruplar arasında anlamlı fark bulunamamıştır (Şekil 52' de görüldüğü gibi).

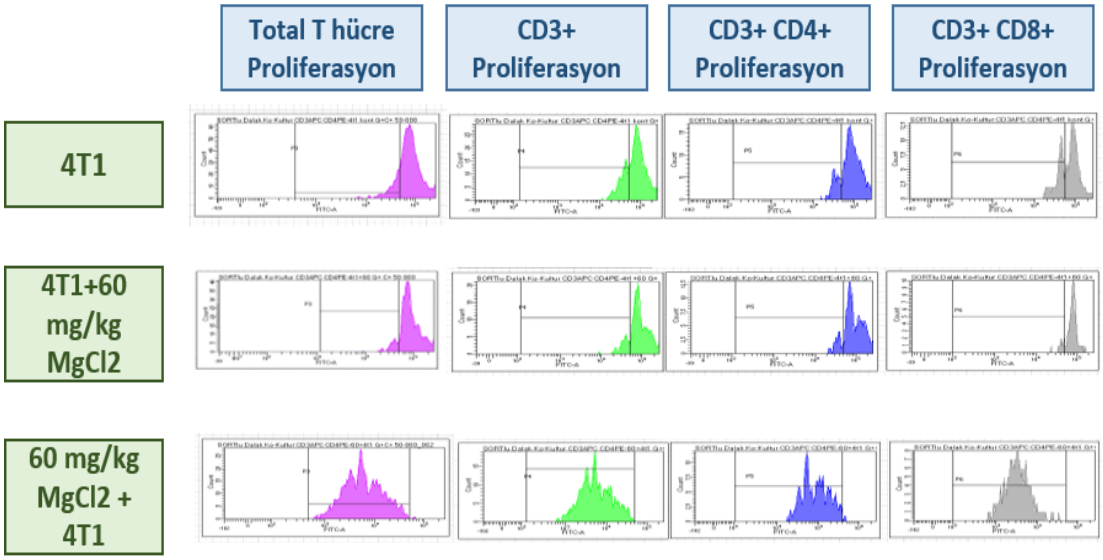
4.2.8. 4T1 ÜNMK meme kanser modelinde magnezyum klorür enjeksiyonu sonrası gelişen M-MDSC ve G-MDSC hücrelerinin baskılama kapasitesinin CFSE yöntemi ile değerlendirilmesi

Seçilen pre-tümör ve post-tümör gruplarda, yüksek doz (60 mg/kg) $MgCl_2$ uygulanan farelerin havuzlanan dalaklarından CD11b, Ly6G ve Ly6C antikorları ile işaretleme sonrası G-MDSC ve M-MDSC hücreleri ayrıştırıldı. (Şekil 53'de görüldüğü gibi). Bu hücreler, sağlıklı farelerin dalaklarından izole edilen CFSE ile işaretli splenositler ve T lenfositlerle belirli oranlarda kültürlendi. 72 saat sonunda CD3, CD4, CD11b, Ly6G ve Ly6C yüzey belirteçlerinin ekspresyonları akım sitometri ile analiz edildi (Şekil 56' da görüldüğü gibi) (Şekil 57' de görüldüğü gibi).

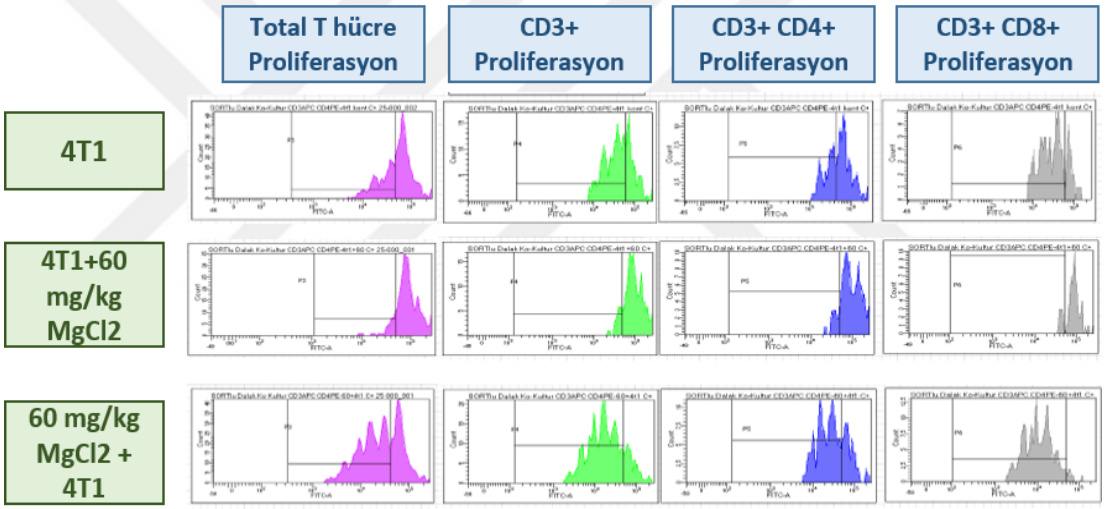


Şekil 53. Sakrifikasyon sonrasında 4T1, 4T1+60 mg/kg $MgCl_2$, 60 mg/kg $MgCl_2$ +4T1 gruplarının splenosit örnekleri CD11b, Ly6G, Ly6C antikorları ile boyanarak M-MDSC ve G-MDSC hücre gruplarının FACS ARIA III cihazıyla ayrıştırılmasının stratejisi

4T1, 4T1+60 mg/kg $MgCl_2$ ve 60 mg/kg $MgCl_2$ +4T1 gruplarının dalaklarından izole edilen splenositler CD11b, Ly6G, Ly6C ile boyandıktan sonra FACS ARIA III cihazıyla M-MDSC ve G-MDSC hücre grupları olmak üzere ayrıştırıldı (Şekil 53). Sağlıklı hayvanın dalaklarından izole edilen splenosit ve/veya dalaklardan ayrıştırılan lenfositler CFSE işaretlenerek ve hücre sayıları sabit tutularak belirli hücre oranlarındaki G-MDSC ve M-MDSC hücre gruplarıyla kültürlendi. Grupların sahip olduğu MDSC hücrelerinin T hücre baskılama kapasiteleri arasındaki farklılıkların tespit edilmesi amaçlandı.



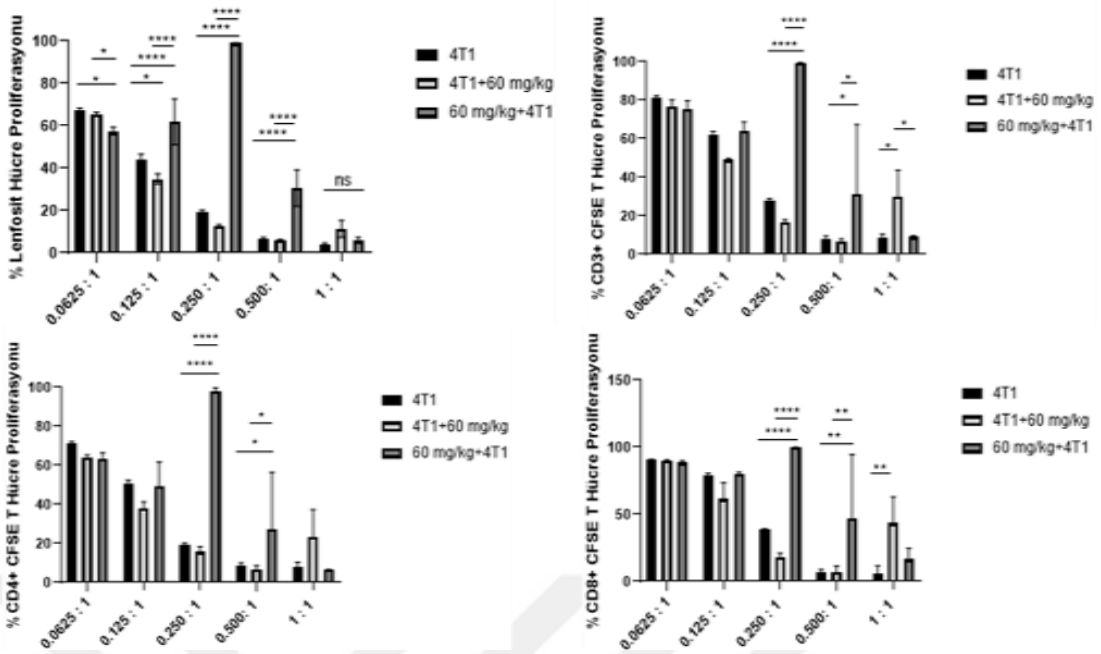
Şekil 54. Sakrifikasyon sonrası ayrıştırılan G-MDSC hücreleri (4T1, 4T1 + $MgCl_2$ ve $MgCl_2$ + 4T1 gruplarına ait), 0.250:1 oranında CFSE ile işaretlenmiş lenfositlerle birlikte kültüre edilerek, T hücre çoğalmasına etkileri gruplar arasında değerlendirilmiştir.



Şekil 55. Sakrifikasyon sonrası ayrıştırılan M-MDSC hücreleri (4T1, 4T1 + $MgCl_2$ ve $MgCl_2$ + 4T1 gruplarına ait), 0.125:1 oranında CFSE ile işaretlenmiş lenfositlerle birlikte kültüre edilerek, T hücre çoğalmasına etkileri gruplar arasında değerlendirilmiştir.

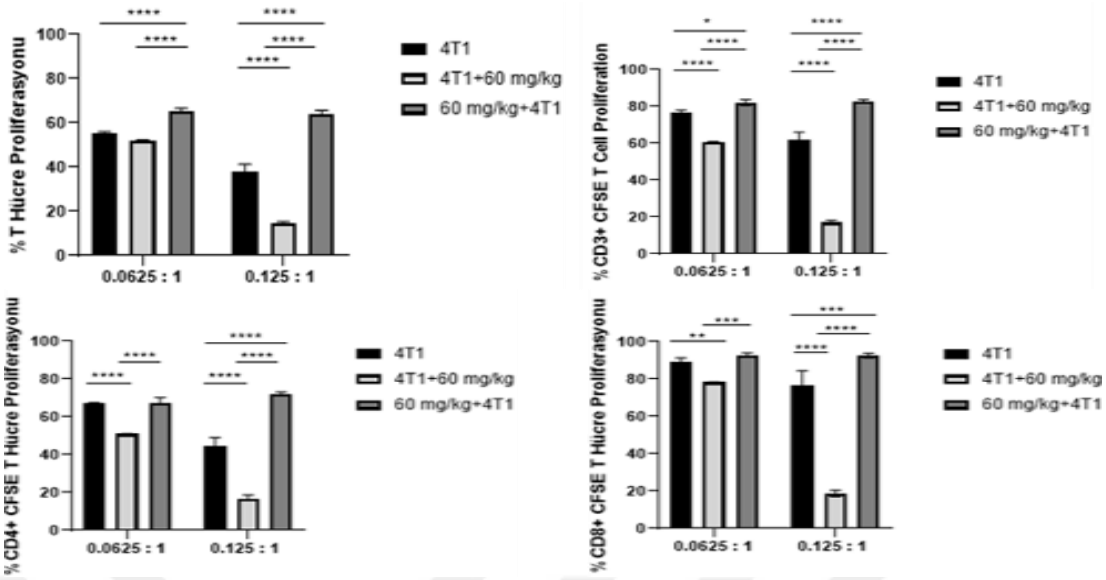
4.2.9. 4T1 ÜNMK meme kanser modelinde magnezyum klorür enjeksiyonu sonrası gelişen M-MDSC ve G-MDSC hücrelerinin lenfositler üzerine baskılama kapasitesinin CFSE yöntemi ile değerlendirilmesi

Pre-tümör ve post-tümör gruplarda, yüksek doz (60 mg/kg) $MgCl_2$ uygulanan farelerin havuzlanan dalaklarından izole edilen G-MDSC'ler, lenfosit sayısı sabit tutularak **0,0625:1, 0,125:1, 0,250:1 ve 0,500:1** oranlarında kültüre edilirken M-MDSC'ler lenfosit sayısı sabit tutularak **0,0625:1, 0,125:1** oranlarında kültüre edilmiştir.



Şekil 56. Tümör taşıyan hayvan gruplarının dalaklarından ayrıştırılan belirli oranlarda G-MDSC' lerin lenfositlerle kültürlenmesinin T hücresi proliferasyonuna etkisi ($p<0,05$*; $p<0,01$**; $p<0,001$***; $p<0,0001$****).

Lenfositlerin proliferasyonunun 0, 0625:1 oranında G-MDSC' lerle ekim yapılan koşulda 4T1 tümör modeline göre $MgCl_2$ alan iki grupta da anlamlı şekilde azaldığı tespit edildi. 0,0625:1 oranında ekim yapılan koşula göre 0,125:1 ve 0,250:1 koşulunda 4T1 ve 4T1 tümör modeli oluşturulduktan sonra 60 mg/kg $MgCl_2$ tedavisi alan grubun (4T1+60 mg/kg) T hücre proliferasyon kapasiteleri düşerken 60 mg/kg $MgCl_2$ tedavisi alan grupta (60 mg/kg+4T1) arttığı tespit edildi. 0,0625:1, 0,125:1 ve 0,250:1 koşuluna göre 0,500:1 koşulundaki lenfosit proliferasyonunun düştüğü gözlemlenirken 0,500:1 koşulunda en yüksek lenfosit proliferasyonunun 60 mg/kg+4T1 grubunda olduğu tespit edildi. CD3+ T, CD4+ T ve CD8+ T hücrelerinin proliferasyonunda ise 0,250:1 koşulunda en düşük proliferasyon seviyesi 4T1+60 mg/kg grubunda gözlenmlenirken en yüksek proliferasyon seviyesi 60 mg/kg+4T1 grubunda olduğu tespit edildi (Şekil 56' da görüldüğü gibi).



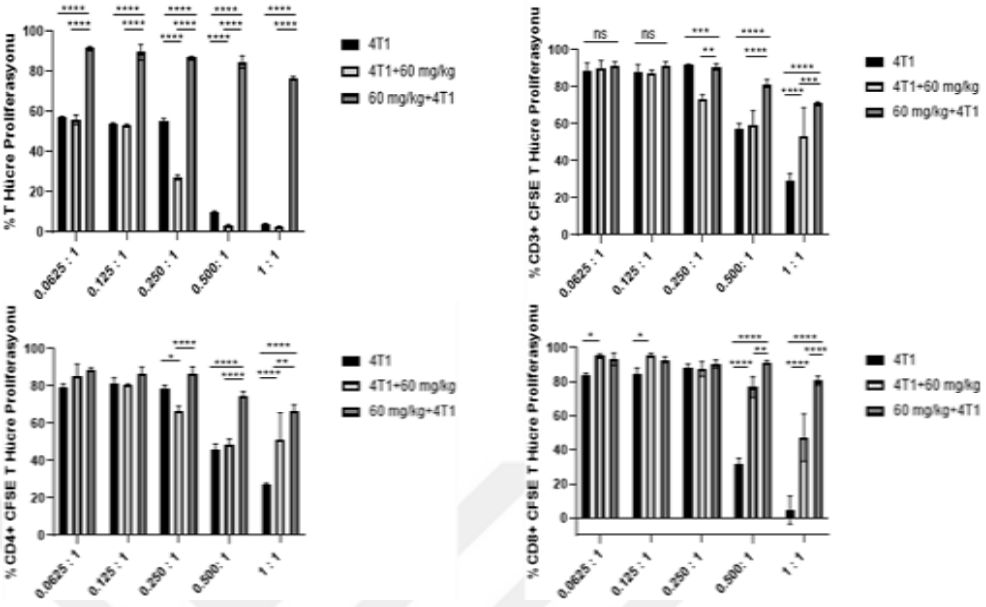
Şekil 57. Tümör taşıyan hayvan gruplarının dalaklarından ayrıştırılan belirli oranlarda M-MDSC' lerin lenfositlerle kültürlenmesinin T hücresi proliferasyonuna etkisi (p<0,05*; p<0,01**; p<0,001***; p<0,0001****).

Lenfositlerin proliferasyonunun 0,0625:1 oranında M-MDSC' lerle ekim yapılan koşulda en yüksek olduğu tedavi grubu önce 60 mg/kg $MgCl_2$ tedavisi aldıktan sonra 4T1 tümör modeli oluşturulan grup (60 mg/kg+4T1) olduğu tespit edildi.0, 0625:1 koşuluna göre 0, 125:1 koşulunun lenfositlerin proliferasyonunun 4T1 ve 4T1+60 mg/kg $MgCl_2$ tedavisi alan grupta azaldığı gözlemlenmiştir. Ayrıca 0,125:1 koşulundaki lenfositlerin proliferasyonunun diğer gruplara göre 60 mg/kg+4T1 koşulunda anlamlı olarak arttığı tespit edildi.CD3+T hücre, CD4+T ve CD8+T proliferasyonu 0, 0625:1 ve 0, 125:1 4T1 grubuna göre 4T1+60 mg/kg grubunda anlamlı olarak azaldığı gözlemlenirken 60 mg/kg+4T1 grubunda anlamlı olarak arttığı tespit edildi. Sonuç olarak 60 mg/kg $MgCl_2$ tedavisi aldıktan sonra 4T1 tümör modeli oluşturulan grubun M-MDSClerinin T hücrelerini baskılama kapasitesinin düştüğünü tespit etmiş olduk (Şekil 57' de görüldüğü gibi).

4.2.10. 4T1 ÜNMK meme kanser modelinde magnezyum klorür enjeksiyonu sonrası gelişen M-MDSC ve G-MDSC hücrelerinin splenositler üzerine baskılama kapasitesinin CFSE yöntemi ile değerlendirilmesi

Önceden seçilen pre-tümör ve post-tümör gruplarda, yüksek doz (60 mg/kg) $MgCl_2$ uygulanan farelerin havuzlanan dalaklarından izole edilen G-MDSC'ler, splenosit sayısı sabit tutularak 0,0625:1, 0,125:1, 0,250:1 ve 0,500:1 oranlarında kültüre edilirken M-MDSC'ler splenosit sayısı sabit tutularak 0,0625:1, 0,125:1

oranlarında kültüre edilmiştir.

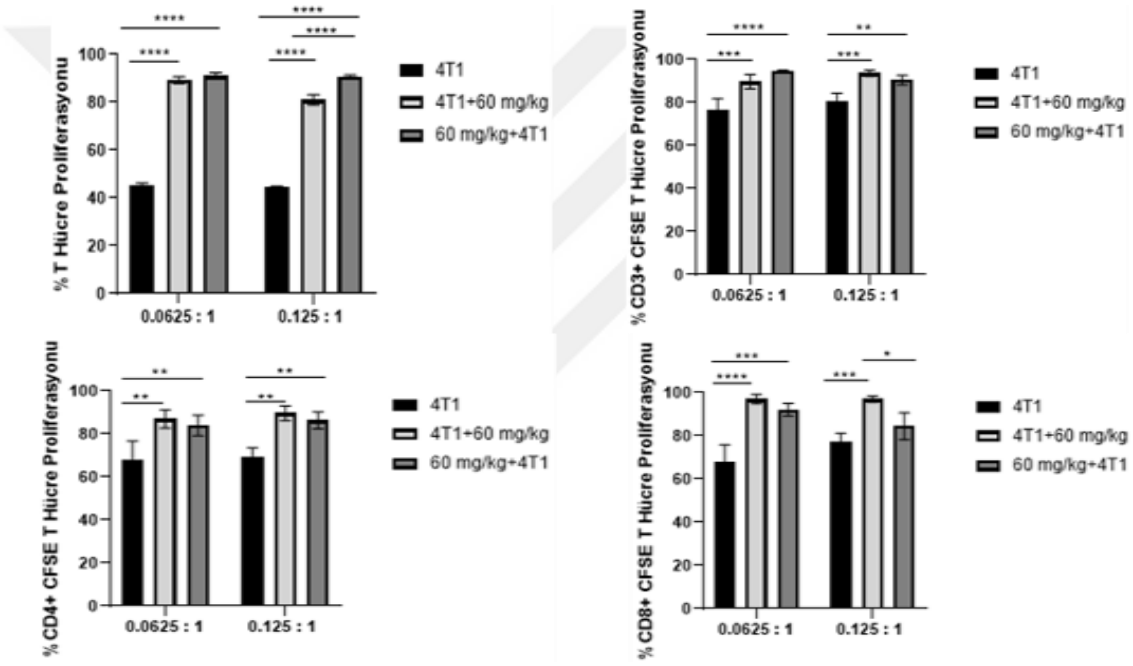


Şekil 58. Tümör taşıyan hayvan gruplarının dalaklarından ayrıştırılan belirli oranlarda G-MDSC' lerin splenositlerle kültürlenmesinin T hücresi proliferasyonuna etkisi (p<0,05*; p<0,01**; p<0,001***; p<0,0001****).

Splenosit proliferasyonunun 0,0625:1 ve 0,125:1 oranlarındaki G-MDSC koşullarında 60 mg/kg $MgCl_2$ tedavisi aldıktan sonra 4T1 tümör modeli oluşturulan grubun (60 mg/kg+4T1) diğer grupların lenfositlerin proliferasyonuna göre anlamlı şekilde arttığı gözlemlendi. 0,250:1 ve 0,500:1 oranındaki G-MDSC koşulunda 4T1 grubundaki splenositlerin proliferasyonuna göre 4T1+60 mg/kg grubunun lenfositlerin proliferasyonu anlamlı olarak azalırken 60 mg/kg+4T1 grubunun splenositlerinin proliferasyonu anlamlı olarak arttığı tespit edildi. 4T1 ve 4T1+60 mg/kg grubuna göre 60 mg/kg+4T1 grubunun 0,250:1 ve 0,500:1 oranlarındaki G-MDSC koşullarında CD3+T hücre proliferasyonu anlamlı olarak arttığı tespit edildi. 1:1 koşulunda 4T1 tümörü taşıyan gruba kıyasla $MgCl_2$ tedavisi alan grupların CD3+T hücre proliferasyonu anlamlı olarak arttığı tespit edildi.

Ayrıca 1:1 koşulunda en yüksek CD3+T hücre proliferasyonuna sahip olan grubun 60 mg/kg+4T1 grubu olduğu tespit edildi. 0,250:1 koşulundaki 4T1'e göre 4T1+60 mg/kg grubunun CD4+T hücre proliferasyonunun anlamlı azaldığı gözlemlenirken 60 mg/kg+4T1 grubunun CD4+T hücre proliferasyonunun anlamlı olarak arttığı tespit edildi. 0,500:1 oranındaki G-MDSC koşulunda en yüksek CD4+T hücre proliferasyonunun 60 mg/kg+4T1 grubunun olduğu tespit edildi. 1:1 oranındaki G-

MDSC koşulunda 4T1'e kıyasla 4T1+60 mg/kg grubu ve 60 mg/kg+4T1 grubunun CD4+T hücre proliferasyonunun anlamlı şekilde arttığını gözlemlerken bu koşulda en yüksek CD4+T hücre proliferasyonuna sahip grubun 60 mg/kg+4T1 grubunun olduğu tespit edildi. 0,0625:1 ve 0,125:1 oranlarındaki G-MDSC koşullarında 4T1 grubuna göre 4T1+60 mg/kg grubunun CD8+T hücre proliferasyonunun anlamlı şekilde arttığı gözlemlendi. 0,500:1 ve 1:1 oranlarındaki G-MDSC koşullarında 4T1 grubuna göre 4T1+60 mg/kg grubu ve 60 mg/kg+4T1 grubunun CD8+T hücre proliferasyonunun anlamlı şekilde arttığı gözlemlendi. Ayrıca iki koşulda da 60 mg/kg+4T1 grubunun en yüksek CD8+T hücre proliferasyonuna sahip grubun 60 mg/kg+4T1 grubu olduğu tespit edildi (Şekil 58' de görüldüğü gibi).



Şekil 59. Tümör taşıyan hayvan gruplarının dalaklarından ayrıştırılan belirli oranlarda M-MDSC' lerin splenositlerle kültürlenmesinin T hücresi proliferasyonuna etkisi (p<0,05*; p<0,01**; p<0,001***; p<0,0001****).

0,0625:1 ve 0,125:1 oranlarındaki M-MDSC koşullarında 4T1 grubuna göre 4T1+60 mg/kg ve 60 mg/kg+4T1 grubunun splenosit proliferasyonunun anlamlı şekilde arttığı gözlemlenirken 0,125:1 oranındaki en yüksek splenosit proliferasyonuna sahip olan grubun 60 mg/kg+4T1 grubu olduğu tespit edildi. 0,0625:1 ve 0,125:1 oranlarındaki M-MDSC koşullarında 4T1 grubuna göre 4T1+60 mg/kg ve 60 mg/kg+4T1 grubunun CD3+T hücre prıliferasyonu ve CD4+T hücre prıliferasyonu anlamlı artış gösterdiği gözlemlendi. 0,0625:1 ve 0,125:1 oranlarındaki M-MDSC koşullarında 4T1 grubuna göre 4T1+60 mg/kg ve 60 mg/kg+4T1 grubunun

CD8+T hücre prıliferasyonu anlamlı artış gösterdiği gözlemlenirken 0,125 oranındaki M-MDSC 4T1+60 mg/kg $MgCl_2$ grubuna göre 60 mg/kg+4T1 grubunun CD8+T hücre prıliferasyonunun anlamlı olarak azaldığı tespit edildi (Şekil 59’ da görüldüğü gibi).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

ÜNMK, meme kanserlerinin %10-20'sini oluşturan özel bir meme kanseri alt tipidirDiğer meme kanseri alt tiplerine göre kötü prognoza sahip olan ÜNMK benzersiz mikroçevresiyle karakterize edilir (Hubalek M. ve ark. 2017). ÜNMK çoğunlukla CD8 + ve CD4 + T hücrelerinden oluşan yüksek TIL infiltrasyonuna sahiptir (Otterlei Fjørtoft M. ve ark. 2024).

İmmün alt gruplarda, CD8 + lenfositler, anti-tümör immün yanıtının ana efektörleridir. Tümör hücreleri üzerinde eksprese edilen majör histouyumluluk kompleksi (MHC) molekülleri tarafından aktive edilen CD8+ T lenfositleri, tümör hücrelerini öldürmek ve anti-tümör yanıt oluşturmak için interferon-γ (IFN-γ) salgılayan sitotoksik CD8+T lenfositlerine farklılaşır. ÜNMK' da daha iyi klinik sonuçlar ve sistemik tedavisine CD8+ T lenfositlerin varlığında daha iyi yanıt ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Fan, Y. ve ark.2022).

Literatürde ko-uyarıcı hücre yüzeyi molekülü LFA-1' in, CD8 T hücrelerinin aktif konformasyonu için magnezyum gerektirdiğini, böylece kalsiyum akışını, sinyal iletimini, metabolik yeniden programlamayı, immün sinaps oluşumunu ve sonuç olarak spesifik sitotoksisiteyi artırdığını gösterilmiştir (Lötscher J. ve ark. 2022).

Yapılan çalışmada 2 kez 60 mg/kg $MgCl_2$ tedavisi alan grubun kan örneğinde lenfosit sayısında artış gözlemlendi. Ayrıca 4 kez 30 mg/kg $MgCl_2$ tedavisi alan grubun kan örneğinde CD3+CD8+ ekspresyonunda artış tespit edildi. Ayrıca 3 gün boyunca düşük ve yüksek doz magnezyum klorür ile kültürlenen splenosit hücrelerinin kontrol grubuna göre CD4+ hücre ekspresyonunun seviyesinin 30 mg/kg $MgCl_2$ tedavisi alan grupta daha fazla olmak üzere 60 mg/kg $MgCl_2$ tedavisi alan grupta da anlamlı şekilde arttığını tespit edildi.

Literatürde Mg^{2+}'deki bozuklukların etkisini gösteren çalışmalar kemik iliğindeki hematopoietik hücrelerin farklılaşma, proliferasyon ve olgunlaşma mekanizmaları üzerine homeostazının nadir olacağı vurgulanmaktadır (Rude RK. ve ark.2003). Yapılan çalışmada 4 kez 30 mg/kg $MgCl_2$ tedavisi alan grup en çok artış gösteren grup olmakla birlikte 60 mg/kg $MgCl_2$ tedavisi alan grupta da CD11b+ hücre popülasyonunda artış gözlemlendi. Kontrol grubuna göre $MgCl_2$ tedavisi alan grupların CD3+ ve CD8+ ekspresyonları anlamlı şekilde azalırken CD4+ ekspresyonları anlamlı şekilde artmıştır.

Miyeloid türevli baskılayıcı hücreler (MDSC'ler), kanser ve diğer patolojik durumlarda immün yanıtların ana düzenleyicileri olarak ortaya çıkmıştır (Bronte V.ve ark. 2016). MDSC'lerin yüzey ifadesi, yoğunluk ve morfolojiye bağlı olarak Monositik (M-MDSC) ve polimorfonükleer (PMN-MDSC) veya granülositik MDSC (G-MDSC) olmak üzere iki alt kümesi tanımlanır. M-MDSC'ler enflamatuar monositlere çok benzer ve PMN-MDSC' ler nötrofillerle bazı benzer özellikleri paylaşır Bu benzerliklerden bağımsız olarak, MDSC alt kümeleri çok farklı bir popülasyondur ve fenotipik olarak CD11bLy6G+-Ly6Chigh (M-MDSC) veya CD11bLy6GLy6C++low (PMN-MDSC' ler) ekspresyonu ile ayırt edilir (Lakshmanachetty S. ve ark 2021).

Literatürde splenik MDSC'lerin oranı naif farelerde %1-2'den birçok kanserde %10-15 veya daha fazlasına yüksek olduğundan bahdesilir. Ayrıca farelerin kemik iliği ve periferik kanında, MDSC hücrelerinin oranındaki farklılıklar daha küçük olduğunu kanıtlayan çalışmalar mevcuttur (Bronte V.ve ark. 2016). Yapılan deney sonucunda dalakta CD11b+ ekspresyonu ve CD11b+ Ly6C+ ekspresyonu kontrol grubuna göre 4 kez 30 mg/kg $MgCl_2$ tedavisi alan grupta anlamlı şekilde artmıştır. Ayrıca kontrol grubuna göre 4 kez 30 mg/kg $MgCl_2$ ve 4 kez 60 mg/kg $MgCl_2$ tedavisi gruplarında total T hücre proliferasyonunun anlamlı şekilde arttığını tespit ettik.

MDSC biyolojisinin en tartışmalı yönlerinden biri, nötrofillere ve monositlere benzer morfoloji ve fenotipe sahip hücrelerin neden PMN-MDSC ve M-MDSC' nin bir tanımını gerektirmesi gerektiğidir. Nötrofillerden farklı olan G-MDSC' lerin temel özelliği, baskılayıcı aktiviteleridir (Lim HX. ve ark.2020). Yapılan çalışmada 4 kez tedavi alan grupların sakrifikasyon sonrası splenosit örneklerinde CD11b+seviyesinde kontrol grubuna göre 30 mg/kg $MgCl_2$ tedavi alan grupta anlamlı artış gözlemlendi. CD11b+Ly6G+Ly6C+ seviyesinde kontrol grubuna göre 30 mg/kg $MgCl_2$ tedavisi alan grubun splenositler 20 mM $MgCl_2$ ile kültürlenen koşulda anlamlı artış gözlemlendi.

4 kez tedavi alan grupların sakrifikasyon sonrası splenosit örneklerinde CD11bhi seviyesinde kontrol grubuna göre 30 mg/kg $MgCl_2$ tedavisi alan grupta anlamlı artış gözlemlendi. Ayrıca kontrol grubuna göre G-MDSC hücre popülasyonunun seviyesi kontrol grubuna göre 30 mg/kg $MgCl_2$ tedavisi aldıktan sonra 20 mM $MgCl_2$ ile kültürlenen koşulda artış gözlemlendi. M-MDSC hücre popülasyonunun seviyesi

kontrol grubuna göre 30 mg/kg $MgCl_2$ tedavisi alan grupta anlamlı olarak azaldığını gözlemlendi.

Literatürde kanserin fare modellerinde, ekstramedüller hematopoez ve miyeloid türevli baskılayıcı hücreler (MDSC) olarak kabul edilen heterojen bir olgunlaşmamış miyeloid hücre popülasyonunun birikimi nedeniyle dalağın genişlemesi gözlenir (Guha P. ve ark. 2020). Yapılan enjeksiyon deneylerinde 4T1 tümör modeli oluşturulmadan önce ve sonra olacak şekilde düşük/yüksek doz $MgCl_2$ tedavisi verilen gruplarda özellikle yüksek doz $MgCl_2$ tedavisi (60 mg/kg $MgCl_2$ +4T1) uygulanan grup olmak üzere 4T1 modeli oluşturulduktan sonra düşük/yüksek doz $MgCl_2$ tedavisi oluşturulan gruplarda kontrol grubuna göre dalak volümünün anlamlı olarak arttığı tespit edildi. Bunu takiben dalak ağırlığı da kontrol grubuna göre 60 mg/kg $MgCl_2$ +4T1 grubunda anlamlı artış gözlemlendi.

Literatürde kemik iliğinde, kemik iliği rezervi olarak adlandırılan büyük bir olgun nötrofil depolama havuzu varlığından bahsedilmektedir. Bu nötrofiller, enflamatuar bir atak sırasında veya enfeksiyona yanıt olarak hızla harekete geçirilebilir ve bu da dolaşımdaki nötrofil sayılarında dramatik bir artışa neden olabilir (Furze RC.ve ark. 2008). Yapılan çalışmalarda kemik iliğinde nötrofil fonksiyonunun, kemik iliğinden mobilizasyondan sonra ve primer tümörün infiltrasyonundan sonra dolaşımda tutulan bir fenotipe değiştirildiğini göstermiştir. Ayrıca, bir meme kanseri modelinde pro-tümöral nötrofillerin infiltrasyonuna katkıda bulunan kemik iliği içindeki nötrofil regülasyonunun benzer sonuçlarını göstermiştir (Alsamraae M ve ark. 2021).

Yapılan çalışmada distile su enjeksiyonu yapılan kontrol grubunun kemik iliği örneklerine göre 4T1 enjeksiyonundan önce veya sonra düşük/yüksek doz $MgCl_2$ tedavisi alan grupların kemik iliği örneklerinde CD11b+ seviyesinin anlamlı olarak arttığı gözlemlendi. Fakat nötrofil hücre grubunda anlamlı bir fark tespit edilemedi.

Yapılan çalışmalarda, meme kanseri hastalarında MDSC seviyelerinin klinik evre ve metastatik hastalık yükü ile ilişkili olabileceği hipotezine destek sağlamıştır. Diaz-Montero ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, tam kan MDSC'lerinin yüzdesi akış sitometrisi ile ölçüldü ve daha ileri evre meme kanseri olan hastalarda artmış bulunmuştur (Markowitz, J. ve ark 2013). Bu çalışmada sadece 4T1 enjeksiyonu yapılan kontrol grubunun kan örneklerindeki CD11bhi Ly6G+Ly6C+ seviyesine göre 4T1+60 mg/kg $MgCl_2$ kan örneklerindeki CD11bhi Ly6G+Ly6C+

seviyesinin azaldığı tespit edildi. 4T1+60 mg/kg $MgCl_2$ grubunun kan örneklerindeki CD11bhi Ly6G+Ly6C+ seviyesine göre 60 mg/kg $MgCl_2$+4T1 grubunun CD11bhi Ly6G+Ly6C+ seviyesinde anlamlı artış gözlemlendi.

Literatürde yapılan çalışmalarda Balb/c fareye yapılan 4T1 meme kanseri enjeksiyonu sonucu dalağın volümünde ağırlığında artışlar gösterdiği yapılan çalışmalarda bildirilmektedir (Sevmis M. ve ark. 2017) (Garritson J. ve ark. 2020). Bu çalışmada sadece steril distile su enjeksiyonu yaptığımız gruba göre 4T1 enjeksiyonu yapıldıktan sonra 30 mg/kg ve 60 mg/kg $MgCl_2$ tedavisi verdiğimiz grupta ve 4T1 enjeksiyonundan önce 60 mg/kg $MgCl_2$ tedavi verdiğimiz üç grupta anlamlı artış tespit edildi. Buna ek olarak steril distile su enjeksiyonu yapılan gruptaki farelerin dalaklarının ağırlıklarına göre 4T1 enjeksiyonu yapıldıktan sonra 30 mg/kg $MgCl_2$ enjeksiyonu yapılan fare grubunun ve 60 mg/kg $MgCl_2$ tedavisi yapıldıktan sonra 4T1 enjeksiyonu yapılan grubun farelerinin dalaklarının ağırlıklarında anlamlı artış gözlemlendi.

Ayrıca 4T1 taşıyan kontrol grubunun splenosit örneklerindeki CD11bhi seviyesine göre 30 mg/kg $MgCl_2$+4T1 grubunun CD11bhi seviyesi anlamlı olarak azalırken kontrol grubundaki CD11bhi Ly6G+Ly6C+ ekspresyon seviyesine göre 4T1+30 mg/kg $MgCl_2$ ve 30 mg/kg $MgCl_2$+4T1 grubundaki CD11bhi Ly6G+Ly6C+ ekspresyon seviyesi arttığı gözlemlendi. Buna ek olarak kontrol grubuna göre CD11bhi Ly6C+ ekspresyon seviyesi tüm gruplarda anlamlı olarak azalmıştır.

Literatürdeki murin çalışmaları, CD11b + Ly6C + Ly6G-fenotipik belirteçler ile karakterize edilen monositik MDSC' lerin, hem antijene bağımlı hem de antijenden bağımsız olarak anti-tümör T hücresi yanıtlarını baskılayabildiğini göstermektedir. Bununla birlikte, CD11b+Ly6C-Ly6G+fenotipik belirteçler ile karakterize granülolitik MDSC' ler, immün baskılayıcı fonksiyon sağlayabilir veya sağlamayabilir (Manjili MH. 2012).

2022 yılında yayınlanan çalışmada Lötscher ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada magnezyumun T hücre aktivasyonunda aldığı rolden bahsedilirken Sun ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada insan monositik hücre hattını M2 makrofaj fenotipine ait belirteçlerde artışa sebep olduğu gösterilmiştir (Lötscher J. ve ark. 2022)(Sun L. ve ark. 2020). Chaigne-Delalande ve arkadaşları yaptığı çalışmada Mg^{2+}'nin doğal öldürücü ve CD8+ T hücrelerinde doğal öldürücü aktive edici reseptör NKG2D'nin

kusurlu ekspresyonuna neden olduğunu ve magnezyum takviyesi NKG2D'nin ekspresyonunun arttığını tespit etmişlerdir (Chaigne-Delalande B. ve ark. 2013).

Fakat magnezyum ile Miyeloid-Kökenli Baskılaycı Hücreler (MDSC) arasındaki etkileşim üzerine doğrudan odaklanan bilimsel çalışmalar sınırlıdır. Bu sebeple bu çalışmada 4T1 tümör enjeksiyonu yapılmadan önce ve sonraki düşük/yüksek doz $MgCl_2$ almasına göre gruplara ayırdığımız farelerin dalaklarındaki G-MDSC ve M-MDSC' lerinin T hücreleri baskılama kapasitesi incelendi. G-MDSC ve M-MDSC'leri farelerin dalaklarından ayrıştırarak belirli oranlarda sabit lenfosit/splenosit hücreleri CFSE işaretlenerek kültürlendi. Sonuç olarak önce yüksek dozda $MgCl_2$ alıp sonrasında 4T1 tümör enjeksiyonu yapılan grubun G-MDSC ve M-MDSC hücrelerinin sağlıklı hayvanın dalağından ayrıştırılan lenfosit hücreleriyle kültürlenmesi sonucunda T hücre baskılama kapasitelerinin anlamlı şekilde azaldığı bulundu. Buna ek olarak yüksek dozda $MgCl_2$ alıp sonrasında 4T1 tümör enjeksiyonu yapılan grubun G-MDSC hücrelerinin sağlıklı hayvanın dalağından izole edilen splenositlerle kültürlenmesinin sonucunda T hücre baskılama kapasitelerinin anlamlı şekilde azaldığı tespit edilerken $MgCl_2$ tedavisin 4T1 enjeksiyonundan önce ve sonra alan grupların M-MDSC hücrelerinin T hücre baskılama kapasitelerinin anlamlı şekilde azaldığını tespit ettik.

Özetle, MDSC' ler sağlıklı hayvanın dalağından ayrıştırılan T hücreleriyle kültürlendiği zaman elde edilen T hücresinin proliferasyonu MDSC' leri sağlıklı hayvanın splenositleriyle kültürlenen koşullarda elde edilen T hücresinin proliferasyonundan daha düşük olduğu bulundu. Bunun sebebinin MDSC hücre grubuyla T hücresi direkt etkileştiği ve daha çok maruz kaldığı için olduğunu varsayılmaktadır. Splenosit ortamında dendritik hücreler, NK hücreleri, makrofajlar ve T hücre bulunduğu için MDSC'nin T hücreyi baskılayıcı etkisini sınırlayabileceği düşünülmektedir.

Literatürde MDSC' ler ve T hücreleri arasındaki doğrudan temas sırasında T hücresi reseptörünü (TCR) ve CD8 moleküllerini nitratlayabilir ve CD8 T hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ederek bağışıklık aktivitesinin aşağı regülasyonuna neden olabileceği ve MDSC'lerin MHC sınıf II ekspresyonunu inhibe ederek T hücresi fonksiyonunu doğrudan bozabileceği yer almaktadır (Ma T. ve ark. 2022).

Ayrıca yapılan bir çalışmada ayrıştırılmış T hücreleriyle MDSC hücrelerinin ko-

kültürleri sonucunda, MDSC' lerin T hücreyi doğrudan hedeflemesi sebebiyle T hücresinin proliferasyonunu çok daha fazla düşürerek seçici şekilde maksimum düzeyde baskılama gerçekleştirdiği vurgulanmaktadır. Buna karşın splenositler T hücre oranı yaklaşık %30 varsayılmasıyla yani her 1 milyon hücrede sadece 300 bin T hücresi olması sebebiyle MDSC' ler bu ortamda daha az T hücresiyle karşılaştığı için baskılamasının daha az olacağını göstererek bu çalışma doğrulanmaktadır (Reuven O. ve ark. 2022).

Sonuç olarak bu çalışma, $MgCl_2$'nin immün sistem üzerinde çift yönlü bir etkisini ortaya koymaktadır. $MgCl_2$ kemik iliğinde ve dalakta miyeloid hücre üretimini arttırmaktadır. Bu sayede kanser öncesinde etkin miyelopoezin olması halinde tümör ilişkili baskılayıcı miyelopoezden immün sistem kendini koruyabilir. Ayrıca, $MgCl_2$ immün sinapsı güçlendirdiği için bu hücreler T hücre yanıtlarını daha etkin uyarabilmektedir. Karsinogenez aracılı miyelopoez aşamasında kemik iliğinde immatür ve baskılayıcı kapasiteye sahip MDSC hücrelerinin miyelopoezi başlatılır.

Bu aşama sonrasında $MgCl_2$ miyelopoezi matürasyon yönünde değştiremeyip, sadece sinapsın güçlenmesini sağlayarak T hücre yanıtlarını daha da etkin baskılayabilir. Özellikle yüksek doz $MgCl_2$'nin tümör gelişiminden önce verilmesi durumunda sağ kalımın artması ve MDSC'lerin T hücre baskılama kapasitesinin düşmesi, $MgCl_2$'nin miyelopoezi ve aktivasyonu destekleyerek tümöre karşı daha hazırlıklı hale getirdiğini düşündürmektedir.

Bu bulgular, $MgCl_2$'nin ÜNMK gibi immün baskılanmış tümörlerde potansiyel bir destekleyici tedavi olabileceğini ortaya koymaktadır. Bu yaklaşım tümör öncesi önleyici destekleyici bir yaklaşım olarak tercih edilmelidir. Ancak, tedavi stratejilerinde kullanım ve magnezyumun immün düzenleyici etkilerinin daha derinlemesine araştırılması gerekmektedir. Literatürde Mg^{2+}-MDSC etkileşimine doğrudan odaklanan bir çalışmanın olmadığı göz önünde bulundurulduğunda, bu araştırmanın özgün katkısı daha da anlam kazanmaktadır. Elde edilen sonuçlara ek olarak planlanan ve kurgulanan deneylerde mekanistik etki daha net ortaya koyulacaktır.

Ayrıca son yıllarda yapılan çeşitli çalışmalar, iyon kanalları/taşıyıcılarının yalnızca nöronlarda değil, diğer dokularda da temel hücresel işlevlerde önemli roller oynadığını göstermektedir. Özellikle, hücre zarı üzerinden iyon taşınımının hücre

hacminin düzenlenmesine katılması nedeniyle, bu kanalların hücre çoğalmasındaki (proliferasyon) fizyolojik rolleri üzerine çalışmalar yapılmıştır. Hücre hacminin düzenlenmesi, hücre döngüsünün ilerlemesi için vazgeçilmez kabul edilmektedir (Dutta R. ve ark. 2020).

Plazma membranındaki Cl^- akımları sinir ve kas hücrelerinde uyarılabilirliğin düzenlenmesinde önemlidir. Hücre içi Cl^- kanalları üzerinden akan akımların, çeşitli hücre içi bölmelerin asitleşmesini sağlayan elektrogenik H^+-ATPaz enziminin genel olarak elektriksel nötrlükte çalışmasını sağladığı düşünülmektedir. Bunun yanı sıra, klorürün toplu taşınımı hücre hacminin düzenlenmesinde ve epitel dokular arasında iyon taşınımında (transepitelyal taşınım) önemli bir rol oynar (Jentsch, T. J. ve ark. 2002).

Kanserde klorür iyonunun etkisi incelendiğinde, hastalığın yayılmasını artırmak için göç için fizyolojik mekanizmalara el koyabileceği görülmektedir. Spesifik olarak, malign hücreler, hareketliliği ve istilayı kolaylaştırmak için NKCC1 ve Na+-K+-ATPaz tarafından oluşturulan iyonik gradyanları kullanan çeşitli K+, Cl- ve Na+ kanallarını aşırı eksprese eder. İyon kanallarının farmakolojik inhibisyonunun malign hareketliliği azalttığını gösteren birkaç ön çalışma, araştırmacıları iyon kanallarının transforme olmuş hücrelerin göçünü kolaylaştırdığı hipotezine götürmüştür (Cuddapah V. A. ve ark. 2011).

6. KAYNAKLAR

Akinsipe, T., Mohamedelhassan, R., Akinpelu, A., Pondugula, S. R., Mistriotis, P., Avila, L. A., & Suryawanshi, A. (2024). Cellular interactions in tumor microenvironment during breast cancer progression: new frontiers and implications for novel therapeutics. *Frontiers in immunology*, *15*, 1302587. https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1302587

Ali, A. A. (2023). Overview of the vital roles of macro minerals in the human body. *Journal of Trace Elements and Minerals*, *4*, 100076. https://doi.org/10.1016/j.jtemin.2023.100076

Allavena, P., Sica, A., Solinas, G., Porta, C., & Mantovani, A. (2008). The inflammatory micro-environment in tumor progression: The role of tumor-associated macrophages. Critical Reviews in Oncology/Hematology, 66(1), 1–9. https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2007.07.004

Alsamraae, M., & Cook, L. M. (2021). Emerging roles for myeloid immune cells in bone metastasis. *Cancer metastasis reviews*, *40*(2), 413–425. https://doi.org/10.1007/s10555-021-09965-3

Asaoka, M., Gandhi, S., Ishikawa, T., & Takabe, K. (2020). Neoadjuvant Chemotherapy for Breast Cancer: Past, Present, and Future. Breast cancer : basic and clinical research, 14, 1178223420980377. https://doi.org/10.1177/1178223420980377

Asleh, K., Riaz, N., & Nielsen, T. O. (2022). Heterogeneity of triple negative breast cancer: Current advances in subtyping and treatment implications. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*, *41*(1), 265. https://doi.org/10.1186/s13046-022-02476-1

Ashique, S., Kumar, S., Hussain, A., Mishra, N., Garg, A., Gowda, B. H. J., Farid, A., Gupta, G., Dua, K., & Taghizadeh-Hesary, F. (2023). A narrative review on the role of magnesium in immune regulation, inflammation, infectious diseases, and cancer. Journal of health, population, and nutrition, 42(1), 74. https://doi.org/10.1186/s41043-023-00423-0

Awad, R. M., De Vlaeminck, Y., Maebe, J., Goyvaerts, C., & Breckpot, K. (2018). Turn back the TIMe: Targeting tumor-infiltrating myeloid cells to revert cancer progression. Frontiers in Immunology, 9, 1977. https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01977

Azadnajafabad, S., Saeedi Moghaddam, S., Mohammadi, E., Delazar, S., Rashedi, S., Baradaran, H. R., & Mansourian, M. (2023). Patterns of better breast cancer care in countries with higher human development index and healthcare expenditure: Insights from GLOBOCAN 2020. *Frontiers in public health*, *11*, 1137286. https://doi.org/10.3389/fpubh.2023.1137286

Bergenfelz, C., Millrud, C. M., & Leandersson, K. (2015). On the origin of myeloid-derived suppressor cells. Oncotarget, 7(1), 12278–12279. https://doi.org/10.18632/oncotarget.12278

Blomberg, O. S., Spagnuolo, L., & de Visser, K. E. (2018). Immune regulation of metastasis: mechanistic insights and therapeutic opportunities. Disease models & mechanisms, 11(10), dmm036236. https://doi.org/10.1242/dmm.036236

Bocchi, F., Schietzel, S., Huynh-Do, U., Vogt, B., & Sidler, D. (2024). Magnesium matters: unveiling hidden risks in kidney transplant patients through total and ionized magnesium profiling. Frontiers in nephrology, 4, 1385447.

https://doi.org/10.3389/fneph.2024.1385447
Brandao, K., Deason-Towne, F., Perraud, A. L., & Schmitz, C. (2013). The role of Mg2+ in immune cells. *Immunologic research*, *55*(1-3), 261–269. https://doi.org/10.1007/s12026-012-8371-x
Bray, F., Laversanne, M., Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Soerjomataram, I., & Jemal, A. (2024). Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, *74*(3), 229–263. https://doi.org/10.3322/caac.21834
Bronte, V., Brandau, S., Chen, S. H., Colombo, M. P., Frey, A. B., Greten, T. F., Mandruzzato, S., Murray, P. J., Ochoa, A., Ostrand-Rosenberg, S., Rodriguez, P. C., Sica, A., Umansky, V., Vonderheide, R. H., & Gabrilovich, D. I. (2016). Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards. *Nature communications*, *7*, 12150. https://doi.org/10.1038/ncomms12150
Bruger, E. L., et al. (2019). Monocytic myeloid-derived suppressor cells from tumor tissue are a distinct subset with potent immunosuppressive activity. ImmunoHorizons, 3(12), 790–801. https://doi.org/10.4049/immunohorizons.1900031
Burguin, A., Diorio, C., & Durocher, F. (2021). Breast Cancer Treatments: Updates and New Challenges. *Journal of personalized medicine*, *11*(8), 808. https://doi.org/10.3390/jpm11080808
Cuddapah, V. A., & Sontheimer, H. (2011). Ion channels and transporters [corrected] in cancer. 2. Ion channels and the control of cancer cell migration. American journal of physiology. Cell physiology, 301(3), C541–C549. https://doi.org/10.1152/ajpcell.00102.2011
Cha, Y. J., & Koo, J. S. (2020). Role of Tumor-Associated Myeloid Cells in Breast Cancer. *Cells*, *9*(8), 1785. https://doi.org/10.3390/cells9081785
Chaigne-Delalande, B., & Lenardo, M. J. (2014). Divalent cation signaling in immune cells. *Trends in immunology*, *35*(7), 332–344. https://doi.org/10.1016/j.it.2014.05.001
Chaigne-Delalande, B., Li, F. Y., O'Connor, G. M., Lukacs, M. J., Jiang, P., Zheng, L., Shatzer, A., Biancalana, M., Pittaluga, S., Matthews, H. F., Jancel, T. J., Bleesing, J. J., Marsh, R. A., Kuijpers, T. W., Nichols, K. E., Lucas, C. L., Nagpal, S., Mehmet, H., Su, H. C., Cohen, J. I., … Lenardo, M. J. (2013). Mg2+ regulates cytotoxic functions of NK and CD8 T cells in chronic EBV infection through NKG2D. *Science (New York, N.Y.)*, *341*(6142), 186–191. https://doi.org/10.1126/science.1240094
Cimino-Mathews, A., Foote, J. B., & Emens, L. A. (2015). Immune targeting in breast cancer. Oncology (Williston Park), 29(5), 375–385. https://doi.org/10.1614/ONCOLOGY-D-14-00316
Cole, K., Pravoverov, K., & Talmadge, J. E. (2021). Role of myeloid-derived suppressor cells in metastasis. *Cancer metastasis reviews*, *40*(2), 391–411. https://doi.org/10.1007/s10555-020-09947-x
Cordier, C., Prevarskaya, N., & Lehen'kyi, V. (2021). TRPM7 Ion Channel: Oncogenic Roles and Therapeutic Potential in Breast Cancer. *Cancers*, *13*(24), 6322. https://doi.org/10.3390/cancers13246322
de Baaij, J. H., Hoenderop, J. G., & Bindels, R. J. (2015). Magnesium in man: implications for health and disease. *Physiological reviews*, *95*(1), 1–46.

https://doi.org/10.1152/physrev.00012.2014
Derakhshan F, Reis-Filho JS. Pathogenesis of Triple-Negative Breast Cancer. Annu Rev Pathol. 2022 Jan 24;17:181-204.
Derakhshan, F., & Reis-Filho, J. S. (2022). Pathogenesis of Triple-Negative Breast Cancer. *Annual review of pathology*, *17*, 181–204. https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-042420-093238
Dutta, R., Hlushchuk, R., Roy, S., & Engelhardt, B. (2020). Ion channels in cancer development and progression. International Journal of Molecular Sciences, 21(11), 4055
Draghi, P. F., Bastos Fernandes, J. C., Petri, G., Barbosa da Silva, E., Perez, M. M., da Veiga, G. R. L., Alves, B. D. C. A., & Fonseca, F. L. A. (2022). Magnesium Supplementation: Effect on the Expression of Inflammation Genes in Erlich's Tumor. *Journal of dietary supplements*, *19*(4), 483–498. https://doi.org/10.1080/19390211.2021.1897056
Drenthen, L. C. A., Ajie, M., de Baaij, J. H. F., Tack, C. J., de Galan, B. E., & Stienstra, R. (2024). Magnesium Supplementation Modulates T-cell Function in People with Type 2 Diabetes and Low Serum Magnesium Levels. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, *109*(12), e2240–e2245. https://doi.org/10.1210/clinem/dgae097
Dunn, G. P., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2004). The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. Immunity, 21(2), 137–148. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2004.07.017
Elliott, L. A., Doherty, G. A., Sheahan, K., & Ryan, E. J. (2017). Human tumor infiltrating myeloid cells: Phenotypic and functional diversity. Frontiers in Immunology, 8, 86. https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00086
Erem, S., Atfi, A., & Razzaque, M. S. (2019). Anabolic effects of vitamin D and magnesium in aging bone. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, *193*, 105400. https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2019.105400
Fan, Y., & He, S. (2022). The Characteristics of Tumor Microenvironment in Triple Negative Breast Cancer. *Cancer management and research*, *14*, 1–17. https://doi.org/10.2147/CMAR.S316700
Furze, R. C., & Rankin, S. M. (2008). Neutrophil mobilization and clearance in the bone marrow. *Immunology*, *125*(3), 281–288. https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2008.02950.x
Gabrilovich, D. I., Nagaraj, S., & Bronte, V. (2012). Regulation of suppressive function of myeloid-derived suppressor cells. Cancer and Metastasis Reviews, 31(1-2), 1–19. https://doi.org/10.1007/s10555-012-9364-2
Gallo, S., Vitacolonna, A., & Crepaldi, T. (2023). NMDA Receptor and Its Emerging Role in Cancer. *International journal of molecular sciences*, *24*(3), 2540. https://doi.org/10.3390/ijms24032540
Garritson, J., Krynski, L., Haverbeck, L., Haughian, J. M., Pullen, N. A., & Hayward, R. (2020). Physical activity delays accumulation of immunosuppressive myeloid-derived suppressor cells. *PloS one*, *15*(6), e0234548. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234548
Goff, S. L., & Danforth, D. N. (2021). The Role of Immune Cells in Breast Tissue and Immunotherapy for the Treatment of Breast Cancer. *Clinical breast cancer*, *21*(1), e63–e73. https://doi.org/10.1016/j.clbc.2020.06.011
Goytain, A., & Quamme, G. A. (2005). Identification and characterization of a novel

mammalian Mg2+ transporter with channel-like properties. *BMC genomics*, *6*, 48. https://doi.org/10.1186/1471-2164-6-48

Groth, C., Hu, X., Weber, R., Fleming, V., Altevogt, P., & Utikal, J. (2019). Immunosuppression mediated by myeloid-derived suppressor cells during tumour progression. British Journal of Cancer, 120(1), 16–25. https://doi.org/10.1038/s41416-018-0333-1

Gröber, U., Holzhauer, P., Kisters, K., Holick, M. F., & Adamietz, I. A. (2016). Micronutrients in Oncological Intervention. *Nutrients*, *8*(3), 163. https://doi.org/10.3390/nu8030163

Guha, P., Gardell, J., Rabinowitz, B., Lopes, M., DaSilva, N. A., Rowley, D., & Katz, S. C. (2021). Monocytic and granulocytic myeloid-derived suppressor cell plasticity and differentiation are organ-specific. *Oncogene*, *40*(3), 693–704. https://doi.org/10.1038/s41388-020-01559-7

Huang, L., Lin, R., Chen, J., Qi, Y., & Lin, L. (2024). Magnesium Ion: A New Switch in Tumor Treatment. *Biomedicines*, *12*(8), 1717. https://doi.org/10.3390/biomedicines12081717

Hubalek, M., Czech, T., & Müller, H. (2017). Biological Subtypes of Triple-Negative Breast Cancer. *Breast care (Basel, Switzerland)*, *12*(1), 8–14. https://doi.org/10.1159/000455820

Huang, X., Sun, X., Wang, Q., Zhang, J., Wen, H., Chen, W. J., & Zhu, S. (2025). Structural insights into the diverse actions of magnesium on NMDA receptors. *Neuron*, *113*(7), 1006–1018.e4. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2025.01.021

Jagsi R. (2014). Progress and controversies: radiation therapy for invasive breast cancer. *CA: a cancer journal for clinicians*, *64*(2), 135–152. https://doi.org/10.3322/caac.21209

Jentsch, T. J., Stein, V., Weinreich, F., & Zdebik, A. A. (2002). Molecular structure and physiological function of chloride channels. Physiological reviews, 82(2), 503–568. https://doi.org/10.1152/physrev.00029.2001

Janssen, L. M. E., Ramsay, E. E., Logsdon, C. D., & Overwijk, W. W. (2017). The immune system in cancer metastasis: friend or foe?. Journal for immunotherapy of cancer, 5(1), 79. https://doi.org/10.1186/s40425-017-0283-9

Jewett, B. E., & Thapa, B. (2022). Physiology, NMDA Receptor. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.

Jomova, K., Makova, M., Alomar, S. Y., Alwasel, S. H., Nepovimova, E., Kuca, K., Rhodes, C. J., & Valko, M. (2022). Essential metals in health and disease. *Chemico-biological interactions*, *367*, 110173. https://doi.org/10.1016/j.cbi.2022.110173

Kalathil, S. G., & Thanavala, Y. (2021). Importance of myeloid derived suppressor cells in cancer from a biomarker perspective. *Cellular immunology*, *361*, 104280. https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2020.104280

Kalluri, R., & Zeisberg, M. (2006). Fibroblasts in cancer. Nature Reviews Cancer, 6(5), 392–401. https://doi.org/10.1038/nrc1877

Kan, L. L., Chan, B. C., Leung, P. C., & Wong, C. K. (2023). Natural-Product-Derived Adjunctive Treatments to Conventional Therapy and Their Immunoregulatory Activities in Triple-Negative Breast Cancer. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *28*(15), 5804. https://doi.org/10.3390/molecules28155804

Kanellopoulou, C., George, A. B., Masutani, E., Cannons, J. L., Ravell, J. C.,

Yamamoto, T. N., Smelkinson, M. G., Jiang, P. D., Matsuda-Lennikov, M., Reilley, J., Handon, R., Lee, P. H., Miller, J. R., Restifo, N. P., Zheng, L., Schwartzberg, P. L., Young, M., & Lenardo, M. J. (2019). Mg regulation of kinase signaling and immune function. *The Journal of experimental medicine*, *216*(8), 1828–1842. https://doi.org/10.1084/jem.20181970

Kim, R., Emi, M., & Tanabe, K. (2007). Cancer immunoediting: From immune surveillance to tumor escape. Immunology, 122(1), 1–15. https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2007.02587.x

Ko, J. H., Ko, E. A., Gu, W., Lim, I., Bang, H., & Zhou, T. (2013). Expression profiling of ion channel genes predicts clinical outcome in breast cancer. *Molecular cancer*, *12*(1), 106. https://doi.org/10.1186/1476-4598-12-106

Kolisek, M., Launay, P., Beck, A., Sponder, G., Serafini, N., Brenkus, M., Froschauer, E. M., Martens, H., Fleig, A., & Schweigel, M. (2008). SLC41A1 is a novel mammalian Mg2+ carrier. *The Journal of biological chemistry*, *283*(23), 16235–16247. https://doi.org/10.1074/jbc.M707276200

Kumar, V., Patel, S., Tcyganov, E., & Gabrilovich, D. I. (2016). The nature of myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment. Trends in Immunology, 37(3), 208–220. https://doi.org/10.1016/j.it.2016.01.004

Lakshmanachetty, S., Cruz-Cruz, J., Hoffmeyer, E., Cole, A. P., & Mitra, S. S. (2021). New Insights into the Multifaceted Role of Myeloid-Derived Suppressor Cells (MDSCs) in High-Grade Gliomas: From Metabolic Reprograming, Immunosuppression, and Therapeutic Resistance to Current Strategies for Targeting MDSCs. *Cells*, *10*(4), 893. https://doi.org/10.3390/cells10040893

Lawson, J. C., Blatch, G. L., & Edkins, A. L. (2009). Cancer stem cells in breast cancer and metastasis. *Breast cancer research and treatment*, *118*(2), 241–254. https://doi.org/10.1007/s10549-009-0524-9

Lee, Y. M., Oh, M. H., Go, J. H., Han, K., & Choi, S. Y. (2020). Molecular subtypes of triple-negative breast cancer: understanding of subtype categories and clinical implication. *Genes & genomics*, *42*(12), 1381–1387. https://doi.org/10.1007/s13258-020-01014-7

Lehmann, B. D., Bauer, J. A., Chen, X., Sanders, M. E., Chakravarthy, A. B., Shyr, Y., & Pietenpol, J. A. (2011). Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *The Journal of clinical investigation*, *121*(7), 2750–2767. https://doi.org/10.1172/JCI45014

Lehmann, B. D., Jovanović, B., Chen, X., Estrada, M. V., Johnson, K. N., Shyr, Y., Moses, H. L., Sanders, M. E., & Pietenpol, J. A. (2016). Refinement of Triple-Negative Breast Cancer Molecular Subtypes: Implications for Neoadjuvant Chemotherapy Selection. PLOS ONE, 11(6), e0157368. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157368

Li, J. J., Tsang, J. Y., & Tse, G. M. (2021). Tumor Microenvironment in Breast Cancer-Updates on Therapeutic Implications and Pathologic Assessment. *Cancers*, *13*(16), 4233. https://doi.org/10.3390/cancers13164233

Lim, H. X., Kim, T. S., & Poh, C. L. (2020). Understanding the Differentiation, Expansion, Recruitment and Suppressive Activities of Myeloid-Derived Suppressor Cells in Cancers. *International journal of molecular sciences*, *21*(10), 3599. https://doi.org/10.3390/ijms21103599

Lin, J., & Pollard, J. W. (2007). STAT3 signaling in acute myeloid leukemia: ligand-dependent and -independent activation and induction of apoptosis by a novel

small-molecule STAT3 inhibitor. Blood, 109(4), 1574–1583. https://doi.org/10.1182/blood-2006-07-039812

Lötscher, J., Martí I Líndez, A. A., Kirchhammer, N., Cribioli, E., Giordano Attianese, G. M. P., Trefny, M. P., Lenz, M., Rothschild, S. I., Strati, P., Künzli, M., Lotter, C., Schenk, S. H., Dehio, P., Löliger, J., Litzler, L., Schreiner, D., Koch, V., Page, N., Lee, D., Grählert, J., … Hess, C. (2022). Magnesium sensing via LFA-1 regulates CD8 T cell effector function. *Cell*, *185*(4), 585–602.e29. https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.12.039

Ma, T., Renz, B. W., Ilmer, M., Koch, D., Yang, Y., Werner, J., & Bazhin, A. V. (2022). Myeloid-Derived Suppressor Cells in Solid Tumors. *Cells*, *11*(2), 310. https://doi.org/10.3390/cells11020310

Mabrouk M. Salama, Zahia A. Mohammed,"Metal ions and their Biological Functions in Human Body"International Journal of New Chemistry., 10 (3), 151-161 (2023).

Mahmoud, R., Ordóñez-Morán, P., & Allegrucci, C. (2022). Challenges for Triple Negative Breast Cancer Treatment: Defeating Heterogeneity and Cancer Stemness. *Cancers*, *14*(17), 4280. https://doi.org/10.3390/cancers14174280

Maier, J. A., Castiglioni, S., Locatelli, L., Zocchi, M., & Mazur, A. (2021). Magnesium and inflammation: Advances and perspectives. *Seminars in cell & developmental biology*, *115*, 37–44. https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2020.11.002

Manjili M. H. (2012). Phenotypic plasticity of MDSC in cancers. *Immunological investigations*, *41*(6-7), 711–721. https://doi.org/10.3109/08820139.2012.673670

Mantovani, A., Marchesi, F., Jaillon, S., Garlanda, C., & Allavena, P. (2021). Tumor-associated myeloid cells: diversity and therapeutic targeting. *Cellular & molecular immunology*, *18*(3), 566–578. https://doi.org/10.1038/s41423-020-00613-4

Markowitz, J., Wesolowski, R., Papenfuss, T., Brooks, T. R., & Carson, W. E., 3rd (2013). Myeloid-derived suppressor cells in breast cancer. *Breast cancer research and treatment*, *140*(1), 13–21. https://doi.org/10.1007/s10549-013-2618-7

Marvel, D., & Gabrilovich, D. I. (2015). Myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment: expect the unexpected. The Journal of Clinical Investigation, 125(9), 3356–3364. https://doi.org/10.1172/JCI80005

Mazur, A., Maier, J. A., Rock, E., Gueux, E., Nowacki, W., & Rayssiguier, Y. (2007). Magnesium and the inflammatory response: potential physiopathological implications. *Archives of biochemistry and biophysics*, *458*(1), 48–56. https://doi.org/10.1016/j.abb.2006.03.031

Mego, M., Mani, S. A., & Cristofanilli, M. (2010). Molecular mechanisms of metastasis in breast cancer--clinical applications. *Nature reviews. Clinical oncology*, *7*(12), 693–701. https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2010.171

Mehta, A. K., Kadel, S., Townsend, M. G., Oliwa, M., & Guerriero, J. L. (2021). Macrophage Biology and Mechanisms of Immune Suppression in Breast Cancer. *Frontiers in immunology*, *12*, 643771. https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.643771

Mendes, P. M. V., Bezerra, D. L. C., Dos Santos, L. R., de Oliveira Santos, R., de Sousa Melo, S. R., Morais, J. B. S., Severo, J. S., Vieira, S. C., & do Nascimento Marreiro, D. (2018). Magnesium in Breast Cancer: What Is Its Influence on the Progression of This Disease?. *Biological trace element research*, *184*(2), 334–339. https://doi.org/10.1007/s12011-017-1207-8

Mlecnik, B., Bindea, G., Pagès, F., & Galon, J. (2011). Tumor immunosurveillance in

human cancers. Cancer and Metastasis Reviews, 30(1), 5–12. https://doi.org/10.1007/s10555-011-9270-7
Nagaraj, S., Gabrilovich, D. I., & Bronte, V. (2010). Myeloid-derived suppressor cells. Nature Reviews Immunology, 10(3), 162–174. https://doi.org/10.1038/nri2725
Nounou, M. I., ElAmrawy, F., Ahmed, N., Abdelraouf, K., Goda, S., & Syed-Sha-Qhattal, H. (2015). Breast Cancer: Conventional Diagnosis and Treatment Modalities and Recent Patents and Technologies. *Breast cancer : basic and clinical research*, *9*(Suppl 2), 17–34. https://doi.org/10.4137/BCBCR.S29420
Nolan, E., Lindeman, G. J., & Visvader, J. E. (2023). Deciphering breast cancer: from biology to the clinic. *Cell*, *186*(8), 1708–1728. https://doi.org/10.1016/j.cell.2023.01.040
Obidiro, O., Battogtokh, G., & Akala, E. O. (2023). Triple Negative Breast Cancer Treatment Options and Limitations: Future Outlook. *Pharmaceutics*, *15*(7), 1796. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15071796
Ohl, K., & Tenbrock, K. (2018). Reactive oxygen species as regulators of MDSC-mediated immune suppression. Frontiers in Immunology, 9, 2499. https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02499
Otterlei Fjørtoft, M., Huse, K., & Rye, I. H. (2024). The Tumor Immune Microenvironment in Breast Cancer Progression. *Acta oncologica (Stockholm, Sweden)*, *63*, 359–367. https://doi.org/10.2340/1651-226X.2024.33008
Orrantia-Borunda, E., Anchondo-Nuñez, P., Acuña-Aguilar, L. E., Gómez-Valles, F. O., & Ramírez-Valdespino, C. A. (2022). Subtypes of Breast Cancer. In H. N. Mayrovitz (Ed.), *Breast Cancer*. Exon Publications.
Ostrand-Rosenberg, S., & Fenselau, C. (2018). Myeloid-derived suppressor cells: Immune-suppressive cells that impair antitumor immunity and are sculpted by their environment. The Journal of Immunology, 200(2), 422–431.
Park, M., Kim, D., Ko, S., Kim, A., Mo, K., & Yoon, H. (2022). Breast Cancer Metastasis: Mechanisms and Therapeutic Implications. *International journal of molecular sciences*, *23*(12), 6806. https://doi.org/10.3390/ijms23126806
Peranzoni, E., Yoyen-Ermiş, D., Tunali, G., Tavukçuoğlu, E., Horzum, U., Özkazanç, D., Sütlü, T., Büyükasık, Y., & Esendağlı, G. (2018). Myeloid maturation potentiates STAT3-mediated atypical IFN-γ signaling and upregulation of PD-1 ligands in AML and MDS. Scientific Reports, 9(1), 11697. https://doi.org/10.1038/s41598-019-48256-4
Pietras, K., & Östman, A. (2010). Hallmarks of cancer: Interactions with the tumor stroma. Experimental Cell Research, 316(8), 1324–1331. https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2010.02.045
Prevarskaya, N., Skryma, R., & Shuba, Y. (2018). Ion Channels in Cancer: Are Cancer Hallmarks Oncochannelopathies?. *Physiological reviews*, *98*(2), 559–621. https://doi.org/10.1152/physrev.00044.2016
Ren, R., Xiong, C., Ma, R., Wang, Y., Yue, T., Yu, J., & Shao, B. (2023). The recent progress of myeloid-derived suppressor cell and its targeted therapies in cancers. MedComm, 4(4), e323. https://doi.org/10.1002/mco2.323
Reuven, O., Mikula, I., Jr, Ashkenazi-Preiser, H., Twaik, N., Ben-Meir, K., Meirow, Y., Daniel, L., Kariv, G., Kurd, M., & Baniyash, M. (2022). Functional Assays Evaluating Immunosuppression Mediated by Myeloid-Derived Suppressor Cells. Current protocols, 2(10), e557. https://doi.org/10.1002/cpz1.557
Ribatti, D., Annese, T., & Tamma, R. (2021). Controversial role of mast cells in breast

cancer tumor progression and angiogenesis. *Clinical breast cancer*, *21*(6), 486–491. https://doi.org/10.1016/j.clbc.2021.08.010

Rolić, T., Yazdani, M., Mandić, S., & Distante, S. (2025). Iron Metabolism, Calcium, Magnesium and Trace Elements: A Review. *Biological trace element research*, *203*(4), 2216–2225. https://doi.org/10.1007/s12011-024-04289-z

Rude, R. K., Gruber, H. E., Wei, L. Y., Frausto, A., & Mills, B. G. (2003). Magnesium deficiency: effect on bone and mineral metabolism in the mouse. *Calcified tissue international*, *72*(1), 32–41. https://doi.org/10.1007/s00223-001-1091-1

Salemme, V., Centonze, G., Cavallo, F., Defilippi, P., & Conti, L. (2021). The Crosstalk Between Tumor Cells and the Immune Microenvironment in Breast Cancer: Implications for Immunotherapy. *Frontiers in oncology*, *11*, 610303. https://doi.org/10.3389/fonc.2021.610303

Schmitz C, Perraud A-L. Chapter 26—Magnesium and the immune response. In: Collins JF, editor. Molecular, genetic, and nutritional aspects of major and trace minerals. Boston: Academic Press; 2017. pp. 319–331.

Shah, R., Rosso, K., & Nathanson, S. D. (2014). Pathogenesis, prevention, diagnosis and treatment of breast cancer. *World journal of clinical oncology*, *5*(3), 283–298. https://doi.org/10.5306/wjco.v5.i3.283

Shindo, Y., Fujii, T., Komatsu, H., Citterio, D., Hotta, K., Suzuki, K., & Oka, K. (2011). Newly developed Mg2+-selective fluorescent probe enables visualization of Mg2+ dynamics in mitochondria. *PloS one*, *6*(8), e23684. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023684

Shou, D., Wen, L., Song, Z., Yin, J., Sun, Q., & Gong, W. (2016). Suppressive role of myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) in the microenvironment of breast cancer and targeted immunotherapies. *Oncotarget*, *7*(39), 64505–64511. https://doi.org/10.18632/oncotarget.11352

Sica, A., & Bronte, V. (2012). Myeloid-derived suppressor cells: From the tumor microenvironment to the clinic. Immunology Reviews, 248(1), 1–14. https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2012.01146.x

Sisirak, V., Faget, J., Gobert, M., Goutagny, N., Vey, N., Treilleux, I., Renaudineau, S., Poyet, G., Labidi-Galy, S. I., Goddard-Leon, S., Durand, I., Le Mercier, I., Bajard, A., Bachelot, T., Puisieux, A., Puisieux, I., Blay, J. Y., Ménétrier-Caux, C., Caux, C., & Bendriss-Vermare, N. (2012). Impaired IFN-α production by plasmacytoid dendritic cells favors regulatory T-cell expansion that may contribute to breast cancer progression. *Cancer research*, *72*(20), 5188–5197. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-3468

Soto-Perez-de-Celis, E., Chavarri-Guerra, Y., Leon-Rodriguez, E., & Gamboa-Dominguez, A. (2017). Tumor-Associated Neutrophils in Breast Cancer Subtypes. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*, *18*(10), 2689–2693. https://doi.org/10.22034/APJCP.2017.18.10.2689

Sparano, J. A., Wang, M., Martino, S., Jones, V., Perez, E. A., Saphner, T., Wolff, A. C., Sledge, G. W., Jr, Wood, W. C., & Davidson, N. E. (2008). Weekly paclitaxel in the adjuvant treatment of breast cancer. *The New England journal of medicine*, *358*(16), 1663–1671. https://doi.org/10.1056/NEJMoa0707056

Srivastava, M. K., Sinha, P., Clements, V. K., et al. (2010). Myeloid-derived suppressor cells inhibit T-cell activation by depleting cystine and cysteine. Cancer Research, 70(1), 68–77. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-1837

Sukumar, J., Gast, K., Quiroga, D., Lustberg, M., & Williams, N. (2021). Triple-

negative breast cancer: promising prognostic biomarkers currently in development. *Expert review of anticancer therapy*, *21*(2), 135–148. https://doi.org/10.1080/14737140.2021.1840984

Sun, L., Li, X., Xu, M., Yang, F., Wang, W., & Niu, X. (2020). *In vitro* immunomodulation of magnesium on monocytic cell toward anti-inflammatory macrophages. *Regenerative biomaterials*, *7*(4), 391–401. https://doi.org/10.1093/rb/rbaa010

Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, *71*(3), 209–249. https://doi.org/10.3322/caac.21660

Tao, M. H., Dai, Q., Millen, A. E., Nie, J., Edge, S. B., Trevisan, M., Shields, P. G., & Freudenheim, J. L. (2015). Associations of intakes of magnesium and calcium and survival among women with breast cancer: results from Western New York Exposures and Breast Cancer (WEB) Study. *American journal of cancer research*, *6*(1), 105–113.

Tcyganov, E., Mastio, J., Chen, E., & Gabrilovich, D. I. (2018). Plasticity of myeloid-derived suppressor cells in cancer. Current Opinion in Immunology, 51, 76–82. https://doi.org/10.1016/j.coi.2018.03.004

Terceiro, L. E. L., Edechi, C. A., Ikeogu, N. M., Nickel, B. E., Hombach-Klonisch, S., Sharif, T., Leygue, E., & Myal, Y. (2021). The Breast Tumor Microenvironment: A Key Player in Metastatic Spread. Cancers, 13(19), 4798. https://doi.org/10.3390/cancers13194798

Watson, C. M., Nadat, F., Ahmed, S., Crinnion, L. A., O'Riordan, S., Carter, C., & Savic, S. (2022). Identification of a novel MAGT1 mutation supports a diagnosis of XMEN disease. *Genes and immunity*, *23*(2), 66–72. https://doi.org/10.1038/s41435-022-00166-8

Yin, L., Duan, J. J., Bian, X. W., & Yu, S. C. (2020). Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress. *Breast cancer research : BCR*, *22*(1), 61. https://doi.org/10.1186/s13058-020-01296-5

Yoyen-Ermiş, D., Tunalı, G., Tavukçuoğlu, E., Horzum, U., Özkazanç, D., Sütlü, T., Büyükasık, Y., & Esendağlı, G. (2019). Myeloid maturation potentiates STAT3-mediated atypical IFN-γ signaling and upregulation of PD-1 ligands in AML and MDS. Scientific Reports, 9(1), 11697. https://doi.org/10.1038/s41598-019-48256-4

Zheng, H., Siddharth, S., Parida, S., Wu, X., & Sharma, D. (2021). Tumor Microenvironment: Key Players in Triple Negative Breast Cancer Immunomodulation. *Cancers*, *13*(13), 3357. https://doi.org/10.3390/cancers13133357

Zhang, P., Zhang, C., Li, J., Han, J., Liu, X., & Yang, H. (2019). The physical microenvironment of hematopoietic stem cells and its emerging roles in engineering applications. *Stem cell research & therapy*, *10*(1), 327. https://doi.org/10.1186/s13287-019-1422-7

Zhang, S., Zhang, X., Lei, W., et al. (2019). Genome-wide profiling reveals alternative polyadenylation of mRNA in human non-small cell lung cancer. *Journal of Translational Medicine, 17*, 257. https://doi.org/10.1186/s12967-019-1986-0

7. SİMGELER VE KISALTMALAR

2-NBDG	:	Glukoz/Nütrient Takibi İçin Kullanılan Florasan Glukoz Analogu
ADM	:	Adrenomedullin
AKT	:	Serin/Treonin Kinaz
ATM	:	Ataksi-Telenjiektazi Mutant Proteini
BCR	:	B Hücresi Reseptörü
BL1	:	Basal-benzeri 1
BM	:	Kemik İliği
BRCA	:	Meme Kanseri Duyarlılık Genleri
CCL2	:	C-C Motifli Kemokin Ligandı 2
CFSE	:	Karboksi-fluorescein succinimidyl ester (Hücre proliferasyonu takibinde kullanılan boya)
CSC	:	Kanser Kök Hücresi
CXCL	:	C-X-C Motifli Kemokin Ligandları
DC	:	Dendritik Hücre
EGF	:	Epidermal Büyüme Faktörü
EGFR	:	Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
EMT	:	Epitelyal-Mezenkimal Geçiş
ER+	:	Östrojen Reseptörü Pozitif
FOXA1	:	Forkhead Box Protein A1
G-CSF	:	Granülosit Koloni Uyarıcı Faktör
GATA3	:	GATA Bağlayıcı Protein 3
GLOBOCAN	:	Küresel Kanser İstatistikleri Veritabanı
G-MDSC	:	Granülositik Miyeloid Kökenli Baskılayıcı Hücre
HER2+	:	İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü 2 Pozitif
HIF-2α	:	Hipoksi İndüklenebilir Faktör 2 Alfa
HSC	:	Hematopoietik Kök Hücre
IFN-γ	:	İnterferon Gama
IL	:	İnterlökin
IM	:	İmmünomodülatör
JAK	:	Janus Kinazlar
LAR	:	Luminal Androjen Reseptörü
LFA-1	:	Lenfosit ile İlişkili Antijen-1
LPS	:	Lipopolisakkarit
M	:	Mezenkimal
M1	:	Pro-inflamatuvar (Tümör Baskılayıcı) Makrofaj
M2	:	Anti-inflamatuvar (Tümör Destekleyici) Makrofaj
MagT1	:	Magnezyum Taşıyıcı 1
MADC	:	Tümörle İlişkili Dendritik Hücre
MCP	:	Monosit Çekici Protein
MC	:	Mast Hücresi
M-CSF	:	Makrofaj Koloni Uyarıcı Faktör
MDSC	:	Miyeloid Kökenli Baskılayıcı Hücre
MET	:	Mezankimal-Epitel Geçiş
Mg^{2+}	:	Magnezyum İyonu
$MgCl_2$	:	Magnezyum Klorür

MIDAS	:	Metal İyon Bağlanma Yeri
MIF	:	Makrofaj Göç İnhibitör Faktörü
Mrs2	:	Mitokondriyal Magnezyum Taşıyıcısı
MUCI	:	Mukin 1
MYC	:	Myelositomatozis Onkogen
NF-Kb	:	Nükleer Faktör Kappa B
NK	:	Doğal Öldürücü Hücre
NMDA-R	:	N-Metil-D-Aspartat Reseptörü
NO	:	Nitrik Oksit
PAM50	:	Meme Kanseri Alt Tiplerini Sınıflandıran Gen Paneli
PD-L1	:	Programlanmış Hücre Ölüm Ligandı 1
PD-L2	:	Programlanmış Hücre Ölüm Ligandı 2
PGR	:	Progesteron Reseptörü
PIK3CA	:	Fosfatidilinositol-4,5-bisfosfat 3-Kinaz Katalitik Alt Birimi Alfa
PIP	:	Prolaktin İndüklenen Protein
PMN	:	Polimorfonükleer Hücre
PR+	:	Progesteron Reseptörü Pozitif
PTEN	:	Fosfat ve Tensin Homologu (Tümör Baskılayıcı Gen)
RB1	:	Retinoblastoma Tümör Baskılayıcı Gen
ROS	:	Reaktif Oksijen Türleri
S100A8-A9	:	Enflamasyon ve tümör progresyonunda görevli kalsiyum bağlayıcı proteinler
SLCA41	:	Magnezyum Taşıyıcı Protein
STAT	:	Transkripsiyon Aktivasyonunu Sinyalleyen Proteinler
TAM	:	Tümörle İlişkili Makrofaj
TAMC	:	Tümörle İlişkili Miyeloid Hücreler
TAN	:	Tümörle İlişkili Nötrofiller
TCR	:	T Hücre Reseptörü
TEM	:	TIE2 Eksprese Eden Makrofajlar
TIL	:	Tümör İnfiltre Eden Lenfositler
TIME	:	Tümör İmmün Mikroçevresi
TLR	:	Toll Benzeri Reseptör
TME	:	Tümör Mikroçevresi
TNF	:	Tümör Nekroz Faktörü
TRP	:	Geçici Reseptör Potansiyeli Kanalları
TRPM	:	Magnezyum ve Diğer Katyon Kanalları
Treg	:	Düzenleyici T Hücresi
ÜNMK	:	Üçlü Negatif Meme Kanseri
VPA	:	Valproik Asit
VEGF	:	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
XMEN	:	X'e Bağlı Magnezyum Eksikliği (Nadir Bağışıklık Yetmezliği Sendromu)

8. EKLER

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
Görükle Yerleşkesi, 16059 Nilüfer/ BURSA-TÜRKİYE
ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAYI

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN ADI	*Üçlü Negatif Meme Kanserinde (ÜNMK) Magnezyumun Tümör-İlişkili Miyeloid Hücrelere Etkisi*
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ KURUMU	Doç. Dr. Diğdem YÖYEN ERMİŞ BUÜ Tıp Fakültesi İmmünoloji AD
	YARDIMCI ARAŞTIRICILAR	Mol. Biol. İlayda MEMİŞ
	ARAŞTIRMANIN NİTELİĞİ	İlayda MEMİŞ'in Yüksek Lisans Tez Projesi
	ARAŞTIRMANIN SÜRESİ	01.10.2024 – 01.10.2026
	KULLANILACAK HAYVAN TÜRÜ VE SAYISI	38 Adet Dişi Fare

	Belge Adı	Tarihi
DEĞERLENDİRİLEN İLGİLİ BELGELER	ARAŞTIRMA BAŞVURU FORMU	**27.09.2024**

KARAR BİLGİLERİ	**Karar No : 2024 - 13 / 03**	**Tarih: 01.10.2024**
	Yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma projesi gerekçe, amaç ve yöntemler dikkate alınarak görüşüldü ve ilgili belgeler incelendi. Projenin etik açıdan uygun olduğuna, çalışmanın aşağıdaki hususlar dikkate alınarak yürütülmesine ve sorumlu araştırıcıya iletilmesine oy birliği/oy çokluğu ile karar verildi. 1) Projede herhangi bir değişiklik gerektiğinde kurulumuzdan onay alınması, 2) Projede çalışacağı bildirilen araştırıcılarda değişiklik olduğunda kurulumuzdan onay alınması, 3) Deney hayvanları üzerinde yapılacak girişimin başlangıç ve bitiş tarihinin bildirilmesi, 4) Çalışma süresinde tamamlanamaz ise ek süre talebinde bulunulması, 5) Çalışma tamamlandığında sonuç raporunun gönderilmesi.	

ÜYELER

Unvanı / Adı / Soyadı EK Üyeliği	Uzmanlık Dalı	Kurumu	İlişki (*)	İmza		Düşünceler
				Kabul	Ret	
Prof. Dr. Gökhan GÖKTALAY Başkan	Tıp- Farmakoloji	Tıp Fakültesi	☐ E ■ H			
Dr.Öğr. Üyesi Sezer ERER KAFA Üye	Tıp - Tıp Tarihi ve Etik	Tıp Fakültesi	☐ E ■ H			
Doç. Dr. Diğdem YÖYEN ERMİŞ Üye	Tıp- İmmunoloji	Tıp Fakültesi	■ E ☐ H			
Prof. Dr. Veli Yılgör ÇIRAK Üye	Veteriner-Parazitoloji	Veteriner Fakültesi	☐ E ■ H			
Prof. Dr. Özgür ÖZYİĞİT Üye	Veteriner-Patoloji	Veteriner Fakültesi	☐ E ■ H			
Doç. Dr. Arda SÖZCÜ Üye	Ziraat- Zootekni	Ziraat Fakültesi	☐ E ■ H			
Prof. Dr. Nilüfer ÇİNKILIÇ Üye	Fen Edebiyat - Biyoloji	Fen Edebiyat Fakültesi	☐ E ■ H			
Nedim SÖNMEZ Üye	Sivil Toplum Kuruluş Üyesi	Emekli	☐ E ■ H			
Filiz TORUN Üye	Sivil Üye	Emekli	☐ E ■ H			
Faruk KÜÇÜKYILDIZ Üye	Veteriner Hekim	BUÜ-DENHAB	☐ E ■ H			

T.C.

BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU (HADYEK)

Sayı: B.30.2.ULU.0.8Z.00.00/ 01.10.2024

Konu: Araştırma Projeniz

Sayın Doç. Dr. Diğdem YÖYEN ERMİŞ

Yürütücüsü olduğunuz *"Üçlü Negatif Meme Kanserinde (ÜNMK) Magnezyumun Tümör-İlişkili Miyeloid Hücrelere Etkisi"* isimli çalışmanız Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 01.10.2024 tarihli toplantısında görüşülmüş olup kurul kararı ekte sunulmuştur. Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

9. TEŞEKKÜR

Bu çalışma sürecinde kıymetli tecrübeleri, yol göstericiliği ve bilimsel bakış açısıyla bana her zaman destek olan; immünoloji alanında ilham kaynağım ve kuzey yıldızım olarak gördüğüm, yoluma ışık tutan değerli danışmanım Doç. Dr. Diğdem YÖYEN ERMİŞ'e

Her konuda bizlere yardımcı olan, destek ve emeklerini üzerimizde hissettiğimiz değerli hocamız Prof. Dr. H. Barbaros ORAL'a,

Geri bildirimleriyle bizi geliştiren ve ileriye götüren sevgili hocamız Dr. Öğr. Üyesi S. Haldun BAL'a

Laboratuvara alışma sürecimde ve tez çalışmalarımda büyük emekler gösteren ekip arkadaşım Onur ETGÜ'ye,

Varlıklarını her zaman hissettiren, kurduğumuz dostluklarla ekip olmayı başardığımız canım arkadaşlarım Hilal VARDAR ve İrem ÖZVERİ'ye

Bursa Uludağ Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde çalışan bana yardımı dokunan veteriner hekimlere, teknikerlere,personellere ve biyologlara,

Bugünkü beni oluşturmak için verdikleri emek ve koşulsuz sevgi için biricik babama, fedakârlıkları ve çıktığım bu yolculuğun en kıymetli temelini oluşturan biricik anneme,varlıkları bana güç ve cesaret veren sevgili kardeşlerime teşekkürlerimi sunmaktayım.

Ek olarak bu çalışma, Bursa Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından TYL-2024-1666 numaralı lisansüstü tez projesi ve TAY-2022-601 numaralı altyapı projesi ile desteklenmiştir. Projeye verdiği destekten ötürü BUÜ BAP birimine teşekkürlerimi sunarım.

10. ÖZGEÇMİŞ

Lisans eğitimini 2018-2022 yılları arasında Bursa Uludağ Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde tamamlamıştır. 2022 yılında başladığı yüksek lisans eğitimine halen Bursa Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıp Fakültesi İmmünoloji Anabilim Dalı'nda devam etmektedir. Akademik çalışmaları kapsamında ulusal kongrelerde de aktif olarak yer alan Memiş, 11-13 Kasım 2023 tarihlerinde Ankara'da düzenlenen 26. Ulusal İmmünoloji Kongresi'nde"Endometriyum Kanserinin Tümör Mikroçevresinde ve Periferik Kanda Bulunan T Hücre ve Kanser Kök Hücre Popülasyonlarının Klinik İlişkisi"başlıklı sunumla yer almıştır. Ayrıca, 28-30 Nisan 2025 tarihlerinde İstanbul'da gerçekleştirilen 6. Uluslararası Moleküler İmmünoloji ve İmmünogenetik Kongresi'nde"Effect of Magnesium on Myeloid Derived Suppressor Cells in Triple Negative Breast Cancer Tumor Microenvironment"adlı çalışmasını sunmuştur. Halen Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi İmmünoloji Anabilim Dalı'nda akademik çalışmalarını sürdürmektedir. Kendisine adresinden ulaşılabilir.