T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIP FAKÜLTESİ
İMMÜNOLOJİ ANABİLİM DALI

MİKROGLİA VE T LENFOSİT ETKİLEŞİMLERİNİN MEME KANSERİ BEYİN METASTAZINDAKİ ROLÜ

Elif ÖZALP

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

BURSA-2023

Elif ÖZALP
İMMÜNOLOJİ ANABİLİM DALI YÜKSEK LİSANS TEZİ
2023

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIP FAKÜLTESİ
İMMÜNOLOJİ ANABİLİM DALI

MİKROGLİA VE T LENFOSİT ETKİLEŞİMLERİNİN MEME KANSERİ BEYİN METASTAZINDAKİ ROLÜ

Elif ÖZALP

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

DANIŞMAN:
Dr. Öğr. Üyesi Diğdem YÖYEN ERMİŞ

1481- Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi

BURSA-2023

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK BEYANI

Yüksek Lisans olarak sunduğum **''Mikroglia ve T lenfosit Etkileşimlerinin Meme Kanseri Beyin Metastazındaki Rolü''** 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.

Elif ÖZALP

Tarih ve İmza

TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU

Adı Soyadı: Elif ÖZALP
Anabilim Dalı: İmmünoloji Anabilim Dalı
Tez Konusu: Mikroglia ve T Lenfosit Etkileşimlerinin Meme Kanseri Beyin Metastazındaki Rolü

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

Unvanı Adı Soyadı: Dr. Öğr. Üyesi Diğdem YÖYEN ERMİŞ

İmza:

İÇİNDEKİLER

Dış Kapak
İç Kapak
ETİK BEYANI II
KABUL ONAY SAYFASI III
TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU IV
İÇİNDEKİLER V
TÜRKÇE ÖZET VII
İNGİLİZCE ÖZET VIII
1. GİRİŞ 1
2. GENEL BİLGİLER 2
2.1. Meme Kanseri 2
2.2. Meme Kanseri Alt Tipleri 2
2.3 Meme Kanseri Görülme Sıklığı (İnsidans) ve Ölüm Oranları (Mortalite) 5
2.4. Meme Kanseri Metastazları 7
2.5. Meme Kanseri Metastazında Yer Alan Mekanizmalar 9
2.5.1. Çevre Doku İnvazyonu /Epitelyal-Mekazkimal Dönüşüm (EMT) 11
2.5.2. İntravazasyon ve Dolaşımda Hayatta Kalma 12
2.5.3. Tutunma ve Ekstravazasyon 13
2.6. Meme Kanseri ve İmmün Yanıtlar 15
2.7. Miyeloid Hücrelerin Meme Kanser İmmün Yanıttaki Rolleri 16
2.8. İmmünoediting 18
2.9. Monosit- Makrofaj Farklılaşması ve Polarizasyonu 21
2.9.1. Meme Kanserinde Monosit ve Makrofajın Rolü 23
2.10. Ko-stimülasyon ve T Hücre Aktivasyonu 25
2.11. Doku Yerleşik Makrofajlar 26
2.12. Beyin ve Mikroglia 28
3. GEREÇ ve YÖNTEM 32
3.1. Gereçler 32
3.1.1. Çalışmada Kullanılan Maddeler 32
3.1.2. Hazırlanan Tamponlar ve Çözeltiler 32
3.2. Yöntem 33
3.2.1. Hücre Hatları 33
3.2.1.1. Hücre Hatlarının Morfolojisi 34
3.2.1.2. Hücre Hatlarının Kültürü 34
3.2.2. Makrofaj/Mikroglia Hücrelerinin Bazal Fenotip Karakterizasyonu 35
3.2.3. Ko-kültür Deneyeleri 36
3.2.3.1. CFSE ile Proliferasyon Analizi 36
3.2.3.2. Bazalda Mikroglia ve T Hücre Etkileşimi Sonucunda Ko-stimülatör Belirteçlerin Analizi 37
3.2.3.3. 4T1 Hücrelerinin Salgıladığı Faktörler ile Mikroglia-T Hücre Etkileşiminin Akım Sitometri Yöntemiyle Değerlendirilmesi 38
3.2.3.4. MTT Medhodu ile Canlılık ve Proliferasyon Analizi 39
3.2.4. İnvazyon Testi İle EMG/MEG Değişimlerinin İncelenmesi 40
3.2.5. Caudate Putamen veya Lateral Ventrikül Stereotaksik Enjeksiyonların Karşılaştırılması ve Karakterizasyonu 41
3.2.6. Balb/c Farelerden Primer Beyin Hücresi ve Mikroglia İzolasyonu 42

4. BULGULAR 44
4.1. Mikroglia/Makrofaj Hücreleri ile T hücre Etkileşimi Sonucunda Hücre Gruplarındaki Proliferasyon ve Canlılık Analizi 44
4.1.1. BV-2 ve Raw 264.7 Hücre Hatlarının Sırasıyla Köken Aldıkları C57BL/6 ve Balb/c Kaynaklı Splenositler ile Kültürü Sonucunda T Hücre Proliferasyonunun CFSE ile Değerlendirilmesi 44
4.1.2. N9 ve BV-2 Mikroglia Hücre Hatlarının Balb/c, C57BL/6 ve CD1 Kaynaklı Splenositler ile Kültürü Sonucunda Hücre Gruplarının PI Boyama ile Canlılık Analizinin Değerlendirilmesi 45
4.2. Mikroglia/Makrofaj ve T Hücre Ko-kültürü Sonrasında Ko-stimülatör Belirteçlerin Analizi 47
4.2.1. N9 Mikroglia Hücreleri ile CD1 Fare Splenositlerinin Kültürü Sonrasında Ko-stimülatör Belirteçlerin Analizi 48
4.2.2. Raw 264.7 Makrofaj Hücreleri ile Balb/c Fare Splenositlerinin Kültürü Sonrasında Ko-stimülatör Belirteçlerin Analizi 56
4.2.3. BV-2 Mikroglia Hücreleri ile C57BL/6 Fare Splenositlerinin Kültürü Sonrasında Ko-stimülatör Belirteçlerin Analizi 65
4.3. TNBC Hücrelerinin Salgıladığı Faktörlerin Mikroglia/Makrofaj Proliferasyonu ve Canlılığı Üzerindeki Etkisinin MTT Metodu ile Değerlendirilmesi 68
4.4. Mikroglia/ Makrofaj Hücrelerinin Salgıladığı Faktörlerin EMT6 Hücrelerindeki EMG/MEG Değişimlerinin İncelenmesi 69
4.5. Caudate Putamen ve Lateral Ventrikül Stereotaksik Enjeksiyon Sonuçları 69
5. TARTIŞMA VE SONUÇ 73
6. KAYNAKLAR 77
7. SİMGELER VE KISALTMALAR 87
8. EKLER 90
9. TEŞEKKÜR 92
10. ÖZGEÇMİŞ 93

TÜRKÇE ÖZET

Meme kanseri, akciğer kanserinden sonra beyin metastazının en sık görüldüğü birincil kanser tipidir. Deneysel metastaz modellerine bakıldığında dolaşımdaki meme tümörü hücreleri akciğer, karaciğer beyin ve kemiğe metastaz eğilimi gösterir. Bu metastatik yönelim faklı mekanizmalar ile açıklanmaya çalışılsa da halen belirsizliğini korumaktadır. Makrofajlar doğuştan gelen immünitedeki en önemli bileşenler olup, metastatik süreçlerde de direkt etkili hücre grubudur. M2 tip regülatör makrofajların tümörün gelişmesi, anjiyogenez ve metastazında direkt etkili olduğu raporlanmış olmala beraber, doku yerleşik makrofajların bu süreçteki rolleri halen bilinmemektedir.

Bu tez çalışmasında beyindeki yerleşik makrofaj alt-grubu olan mikroglialar ve monosit kökenli makrofajların meme kanserindeki fenotipik ve fonksiyonel farklarını araştırdık. Bu kapsamda N9 ve BV-2 mikroglial hücre hatları; Raw 264.7 monositik kökenli makrofaj hücre hattı; primer fare mikroglia hücreleri EMT6 ve 4T1 meme kanseri hücre hatları kullanıldı. Meme kanseri ve makrofaj hücreleri farklı koşullar altında ko-kültür edilerek canlılık ve metabolizma (MTT yöntemi ve PI boyama), T hücre yanıtları (CFSE yöntemi), invazyon kapasiteleri (scratch assay), ko-stimülatör belirteç değişimleri (akım sitometri) değerlendirildi.

Mikroglial hücrelerin bazal seviyede farklı düzeylerde ko-stimülatör belirteç düzeyine sahip olduğu ve özellikle monositik kökenli makrofajlara göre (Raw 264.7) oldukça yüksek düzeylerde ko-inhibitör belirteç düzeyine sahip olduğu görüldü. N9 hücrelerinde PD-L2, BV-2 hücrelerinde ise PD-L1 düzeyinin daha baskın olduğu görüldü. BV-2 hücrelerinin hem T hücre yanıtlarını çok güçlü şekilde baskılayabildiği, hem de ilginç bir şekilde tümör hücre invazyon kapasitesini (EMT6) engellediği görüldü. 4T1 hücrelerinden salgılanan faktörler ile (4T1 CM), N9 hücreleri PD-L2 düzeylerini arttırırken, BV-2 hücreleri PD-L1 düzeyini azalttı. Raw 264.7 ise, PD-L2 molekül ekspresyonu açısından N9; PD-L1 açısından ise BV-2 gibi bir davranış sergiledi. EMT6 CM ile ise, N9 hücrelerinde CD86 düzeyleri artarken, CD80 düzeyleri azaldı.

Elde edilen sonuçlar doğrultusunda momositik makrofajların ve doku yerleşik makrofajlardan mikroglia hücrelerinin meme kanserinde farklı davranış sergiledikleri ve özellikle ko-stimülatör belirteçler üzerinden etki gösterebildikleri belirlenmiştir. İleri doğrulama deneyleri (primer mikroglia etkileşimi ve *in vivo* çalışmalar) yapılarak mikroglialaların meme kanseri beyin metastazındaki pro- ve/veya anti-kanser etkinlikleri ve mekanizması aydınlatılabilecektir.

Anahtar Kelimeler: Meme kanseri, beyin metastazı, mikroglia, makrofaj, T hücre, ko-stimülasyon

İNGİLİZCE ÖZET

Breast cancer is the most common primary cancer type with brain metastasis after lung cancer. Circulating breast tumor cells have been shown to spread to the lung, liver, brain, and bone in experimental metastasis models. There have been several attempts to explain this metastatic tendency, but the answer is still remains unclear. The most crucial elements of innate immunity are macrophages, a cell type that has a direct role in the spread of disease. The functions of tissue-resident macrophages in tumor formation, angiogenesis, and metastasis remain unclear, despite reports that M2 type regulatory macrophages directly influence these processes.

In this thesis study, we investigated the phenotypic and functional differences between the resident macrophage subgroup in the brain, microglia, and monocyte-derived macrophages in breast cancer. N9 and BV-2 microglial cell lines, Raw 264.7 monocytic macrophage cell line, primary mouse microglia cells, EMT6 and 4T1 breast cancer cell lines were analysed in this context. The viability and metabolism of the co-cultured breast cancer and macrophage cells (measured by MTT and PI labeling), the T cell responses (measured by CFSE method), the invasion capacities (measured via scratch assay), and the co-stimulatory marker levels (measured by flow cytometry) were assessed.

It was observed that microglial cells had different levels of co-stimulatory markers at the basal level and had significantly higher levels of co-inhibitory markers, especially compared to monocytic macrophages (Raw 264.7). It was observed that PD-L2 level was more dominant in N9 cells and PD-L1 level was more dominant in BV-2 cells. It was observed that BV-2 cells could both strongly suppress T cell responses and, interestingly, inhibit tumor cell invasion capacity (EMT6). With factors secreted from 4T1 cells (4T1 CM), N9 cells increased PD-L2 levels, while BV-2 cells decreased PD-L1 levels. If Raw is 264.7, N9 in terms of PD-L2 molecule expression; In terms of PD-L1, it behaved like BV-2. With EMT6 CM, CD86 levels increased while CD80 levels decreased in N9 cells.

Based on these findings, it was established that monocytic macrophages and microglia cells, which are types of tissue-resident macrophages, exhibit distinct behavior in breast cancer and can particularly act through co-stimulatory markers. To further understand the pro- and/or anti-cancer activities and mechanisms of microglia in breast cancer brain metastasis, additional validation experiments, such as primary microglia interaction and in vivo studies, will be conducted.

Keywords: Breast cancer, brain metastasis, microglia, macrophage, T cell, co-stimulation

1. GİRİŞ

Meme kanseri yaygın olarak kemik, akciğer, karaciğer ve beyin bölgelerine metastaz yapmaktadır. Kötü prognozla ilişkilendirilen meme kanseri beyin metastazı (*Breast Cancer Brain Metastases,* BCBM) tüm metastatik meme kanseri vakalarının %10-30'unu oluşturur (Kanchan ve ark., 2020). Günümüzde BCBM hastaları için cerrahi, tüm beyin radyasyon tedavisi, stereotaktik radyocerrahi, kemoterapi veya bu tedavilerin bir kombinasyonu dahil olmak üzere çeşitli tedavi protokolleri mevcuttur (Ren ve ark., 2020). Buna karşın BCBM vakalarında kan-beyin bariyeri (*Blood- Brain Barrier*, BBB) ve kemorezistans nedeniyle tedavi etkinliği sınırlı olup ve hastaların yaşam süresi kısalmaktadır (Wang ve ark., 2021). Bu nedenle, yeni terapötik hedefler bulmak, tedavi etkinliğini arttırmak ve BCBM hasta prognozunu iyileştirmek için bu hastalığın altında yatan moleküler mekanizmaların aydınlatılmaya ihtiyacı vardır (Schlam, & Gatti-Mays, 2022).

Beynin kendine özgü ontolojisi ve BBB'nin seçici geçirgen yapısı sebebiyle uygulanan ilaç tedavilerinin bölgeye ulaşmaması tedavi seçeneklerini oldukça sınırlandırmaktadır. Metastatik odakta bulunan immün hücrelerin tümör prognozu ve anti tümör immün yanıttaki rolünün anlaşılması çeşitli immünoterapi yaklaşımları için oldukça önemlidir (Watase ve ark., 2021).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda meme kanseri beyin metastazı mikroçevresindeki T hücre mikroglia etkileşimine vurgu yapılmıştır. Ancak, metastatik odaktaki T hücre baskılama mekanizmaları literatürde hala net değildir. Bu mekanizmanın anlaşılabilmesi için çalışmamızda, beyin doku yerleşik makrofaj popülasyonu olan mikrogliaların ve T hücre ikili etkileşiminin tümör oluşumu ve gelişimindeki rolüne odaklanılarak CD80, CD86, PDL-1 ve PDL-2 ko-stimülatör moleküllerin T hücre immün yanıtları üzerindeki etkileri değerlendirildi. Ayrıca mikroglia ve monosit kökenli makrofaj hücrelerinin; akım sitometri, 3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) ve scrath assay metodu kullanılarak immünmodülasyon üzerindeki farklılıkları araştırıldı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Meme Kanseri

Meme kanserinde, ileri yaş, obezite, hareketsizlik, geç gebelik ve menopoz gibi parametreler tümör gelişim sürecinde etkendir. Ayrıca aile öyküsü ve genetik yatkınlık meme kanseri riskini artıran belirgin ve önemli faktörleri oluşturur. Meme kanseri duyarlılık (*Breast Cancer Susceptibility*, BRCA) 1 ve BRCA2 mutasyonları tüm kalıtsal meme kanseri vakalarının yaklaşık %30'unda görülmektedir (Dogan, 2016; Kharel ve ark., 2022).

Meme kanserinin oldukça heterojen yapısı sebebiyle genetik ve klinik olgularda bir çok alt tipi bulunur (Shaath, Elango, & Alajez, 2021). Meme kanseri belirli reseptörlerin aşırı ekspresyonuna ya da ekspresyon eksikliğine bağlı olarak karakterize edilmiş Luminal A, Luminal B, İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü-2 pozitif (*Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*+, HER2+), Üçlü Negatif Meme Kanseri (*Triple negative breast cancer*, TNBC) olmak üzere 4 alt grupta sınıflandırılır (Kavarthapu, Anbazhagan, & Dufau, 2021; Li ve ark., 2021) (Şekil 1). Meme kanseri vakalarının %75'i hormon reseptör pozitiftir (progesteron reseptör (*progesterone receptor*, PR) pozitif, östrojen reseptör (*estrogen receptors*, ER) pozitif). ER+ tümörler ER, PR ve ER ilişkili genleri eksprese eder ve lümen grubu olarak adlandırılırlar (Yersal, & Barutca, 2014). Çeşitli bağımsız çalışmaların sonucunda farklı içsel gen setlerinin tespit edilmesiyle Luminal A ve Luminal B olarak ana iki lümen grubu tanımlanmıştır (Sørlie ve ark., 2001; Sotiriou ve ark., 2003; van't Veer ve ark., 2002).

2.2. Meme Kanseri Alt Tipleri

Luminal A, en sık teşhis koyulan kanser alt tipidir ve tüm meme kanseri vakalarının %50-60'ını oluşturur. Bu alt tipin histopatolojik değerlendirmesi sınırlı olup nükleer polimorfizm ve mitotik aktivite düşüklüğü sebebiyle daha iyi prognozla ilişkilendirilir (Yersal, & Barutca, 2014).

ER+ ve/veya PR+ karakterize Luminal A meme kanseri alt tipi immünohistokimyasal değerlendirmeler sonucunda HER-2 negatif ve düşük Ki67 ifadesi göstermektedir (Carey ve ark., 2006).

Hastalığın prognozu bu alt tip için daha iyi olup nüks oranı diğer meme kanseri alt tiplerine göre anlamlı derecede düşüktür (Kennecke ve ark., 2010).

Daha agresif bir oluşum gösteren Luminal B tümörleri, meme kanseri vakalarının %15-20'sini oluşturur. İmmünopatolojik değerlendirilebilirliği ve proliferatif indeksi yüksek olup daha kötü prognozla ilişkilendirilir (Creighton, 2012). Luminal B'de proliferasyon ilişkili genlerin ifadesindeki artış, lümen grubu alt tiplerini birbirinden ayıran temel farklılıktır (Reis-Filho ve ark., 2010). HER2 pozitif veya negatif olarak görülebilen Luminal-B, genellikle HR + (ER+ ve/veya PR +) ve yüksek Ki67 indeksine sahiptir. Ki67, çoğalma kapasitesi olan hücrelerde bulunan ancak dinlenme fazına girmiş hücrelerde ifadesi olmayan bir kanser antijenidir. İmmünohistokimya boyamasıyla hücrelerdeki Ki-67 proteinin ifadesi ve dokudaki yeri tespit edilebilir (Louis ve ark., 2023).

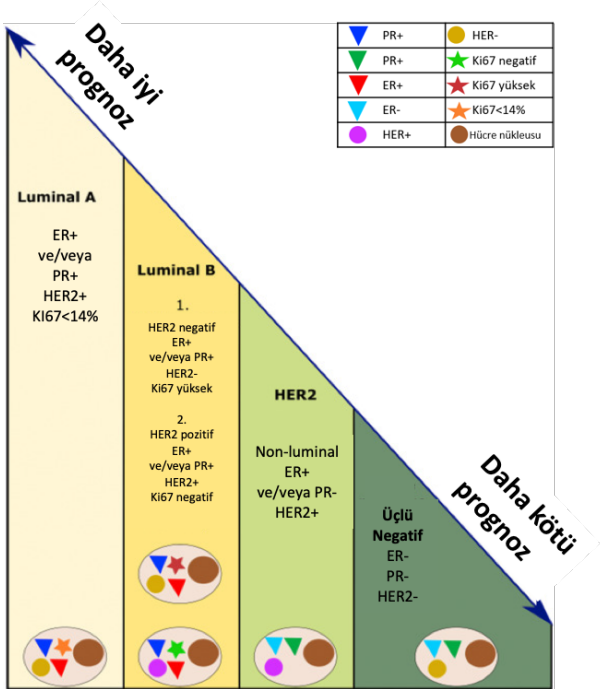
HER2+, meme kanseri alt tiplerinin %15-20'sini oluşturur ve diğer alt tiplere göre daha agresif prognoz gösterir. HER2, tirozin kinaz ailesinin bir üyesidir. HER-2 pozitif meme kanseri alt tipi, HER2 ve diğer ilişkili genlerin ifadesindeki artış ile yüksek proliferasyon kapasitesine sahiptir. Bu alt tipteki vakaların yaklaşık %50'si ER+ ve bu reseptörün varlığı düşük düzeyde ifade edilir. Bazı sitotoksik ajanlara karşı artmış hassasiyet, beyin ve iç organlara metastaz yapma eğilimi gösterir (Yersal, & Barutca, 2014).

TNBC alt tipleri, tüm meme kanseri alt tiplerinin yaklaşık %20'sini oluşturur. Genç yaşlarda oluşum göstermesi ve genellikle Afrika-Amerika kadın popülasyonundaki yaygınlığıyla bilinmektedir (Orrantia-Borunda ve ark., 2022). ER-/PR-/HER2- tümör fenotipindeki bazal benzeri alt grup, normal memenin bazal/miyoepitelyal hücrelerdeki belirteçlerin varlığı ile karakterize edilir. Hormon reseptörlerin ifadesinin olmaması ve HER2 reseptörünün yoksunluğu nedeniyle 'üçlü negatif meme kanseri' olarak sınıflandırılır (Yersal, & Barutca, 2014).

Heterojen doğası gereği bu tümörler bazal benzeri 1 (*basal-like 1*, BL1), bazal benzeri 2 (*basal-like 2*, BL2), immünomodülatör (*immunomodulators*, IM), mezenkimal (*mesenchymal*, M), mezenkimal kök hücre benzeri *(mesenchymal stem like,* MSL) ve

luminal androjen reseptörü (*luminal androgen receptor*, LAR) gibi farklı alt tiplerde sınıflandırılır. Bu alt tipler temel olarak gen ekspresyon düzeyleri ve sinyal iletim yolları açısından farklılık gösterir. TNBC hastaların %50'sini BL1 ve BL2 alt tipleri oluşturur. BL1, DNA hasar onarımı genlerinin, hücre çoğalması ile ilgili genlerin ve Ki67 proteininin yüksek ekspresyonuna sahiptir. BL2 alt tipi ise çoklu büyüme faktör ilişkili sinyal yolu genleri ile metabolik sinyal taşıma genlerinin yüksek ifadesine sahiptir. IM, immünite ilişkili ve sitokin ilişkili sinyal yollarının yüksek ifadesine sahiptir. MSL ve M alt tipleri ortak olarak epitelyal mezenkimal geçiş (*epithelial mesenchymal transition*, EMG) genleri ve hücre farklılaşma genlerinin yüksek ifadesi ile karakterizedir. MSL, düşük mitotik indeks göstererek ve hücre çoğalma proteini ile sıkı bağlantı proteinini düşük eksprese ederek M alt tipinden ayrılır. LAR alt tipi çokça hormon tarafından düzenlenen sinyal yollarını (Steroid sentezi, androjen reseptörü) içerir (Li ve ark., 2021).

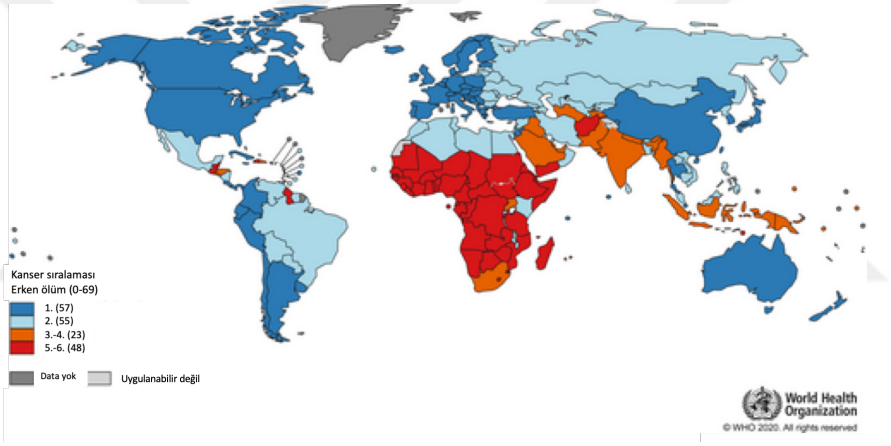
TNBC'de tümör protein 53 (*tumor protein 53*, TP53) gen mutasyonlarına sıkça rastlanır ve düzensiz integrin ekspresyonu bu kanser alt tipinin daha agresif bir prognoz göstermesine neden olur. Bu tümörlerin çoğu beyin ve akciğere nüks ile kötü prognoz gösterir (Yin ve. Ark., 2020).



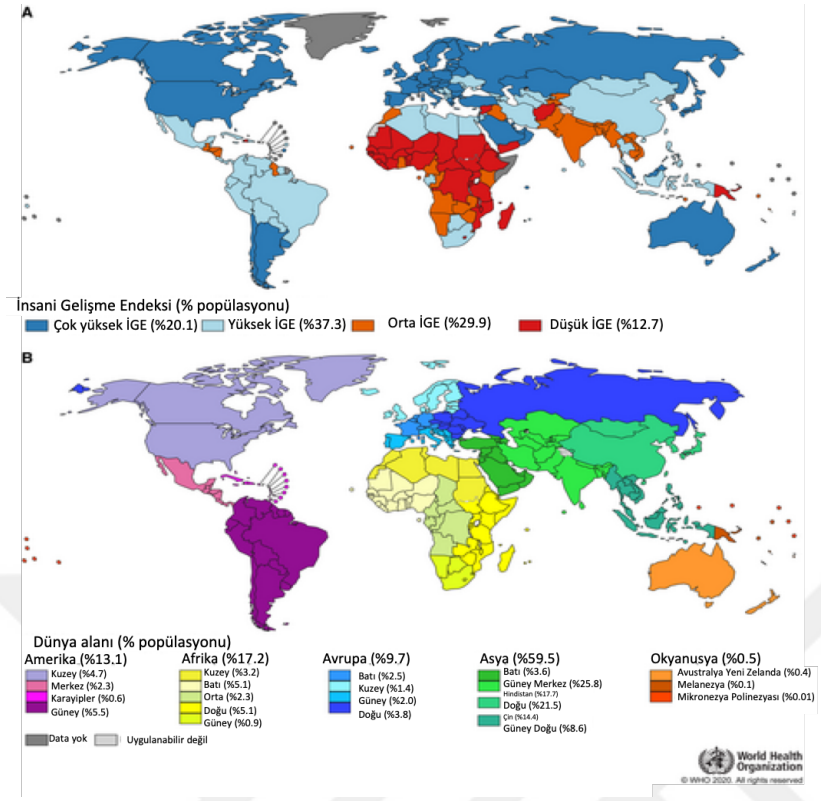
Şekil 1. Hormon reseptörlerine göre meme kanseri alt tipleri ve prognozunun şematik gösterimi. (Januškevičienė, & Petrikaitė, 2019) tarafından uyarlanmıştır.

2.3 Meme Kanseri Görülme Sıklığı (İnsidans) ve Ölüm Oranları (Mortalite)

Dünya Sağlık Örgütü (*Word Health Organization*, WHO) 2019 verilerine göre kanser 183 ülkenin 112'sinde 70 yaş altı ölüm sebepleri arasında birinci ya da ikinci, 23 ülkede ise üçüncü ya da dördüncü sırada yer almaktadır (Şekil 2). Küresel Kanser Gözlem Verisi 2020 (*Global Cancer Statistics 2020*, GLOBOCAN 2020) kanser insidansı ve ölüm oranları araştırmalarına göre dünya genelinde kanser için 19,3 milyon yeni tanı ve yaklaşık 10 milyon kanser kaynaklı ölüm meydana gelmiştir. Yapılan son çalışmalar ile birlikte en sık teşhis edilen akciğer kanserinin yerini kadınlarda görülen meme kanseri almıştır. Bunu takiben en sık tanı alan kanser tipleri sırasıyla akciğer, kolorektal, prostat ve mide kanseridir.

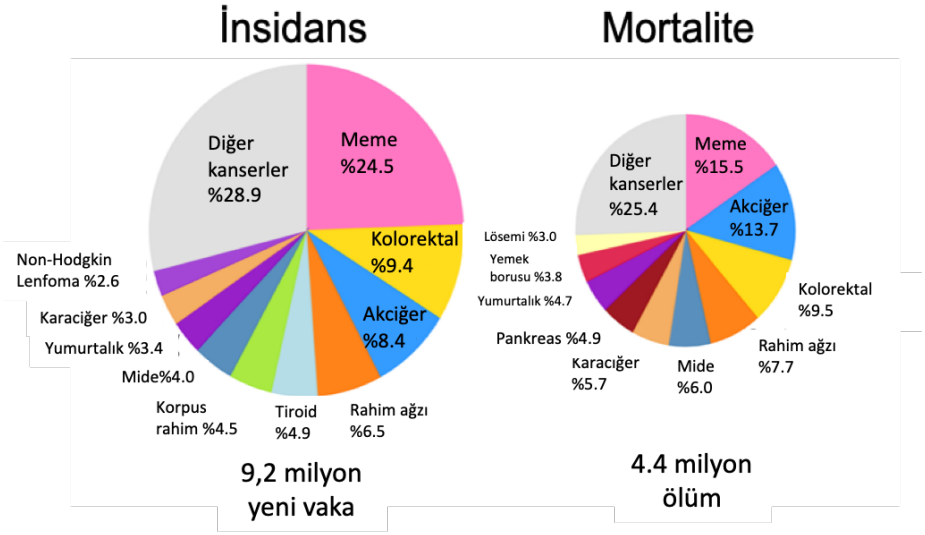


Şekil 2. Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre 70 yaş altı ölüm sebebi kanser olan ülkelerin sıralamaları Kanser insidansı ve mortalitesi hızla artış göstermektedir.

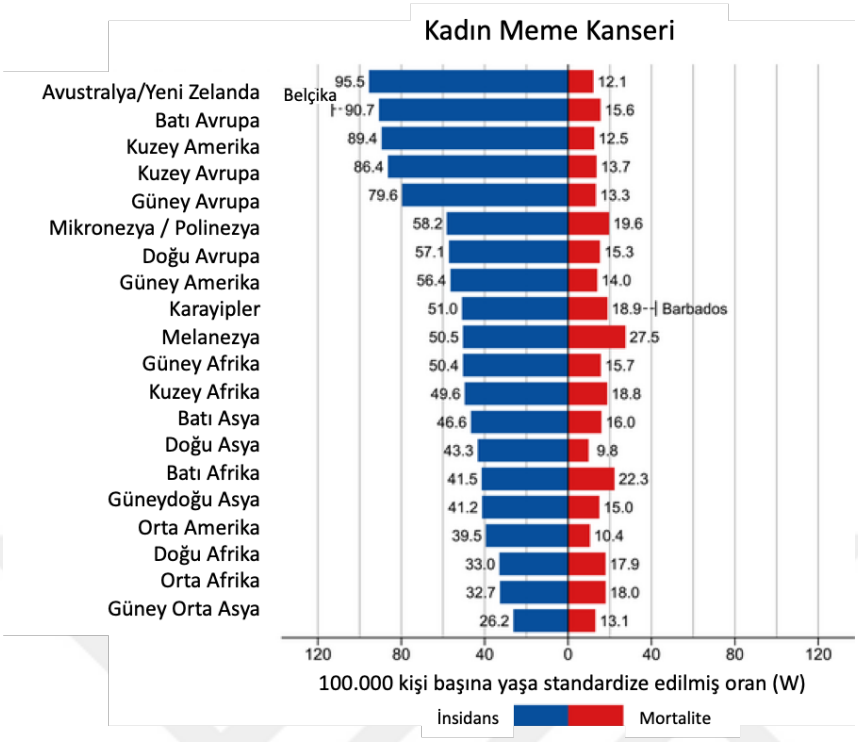


Şekil 3. Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre İnsani Gelişme İndeksinin 4 Aşamalı ve bölgelere göre popülasyonlardaki kanser oluşum sıklığı verileri.

10 farklı kanser türünün kadınlarda görülme sıklıkları ve ölüm oranları Dünya Sağlık Örgütü tarafından istatistiksel olarak değerlendirilmiştir (Şekil 4). Kadınlarda en sık teşhis edilen ve ölüm oranının en yüksek olduğu kanser türü meme kanseridir.



Şekil 4. Kadınlarda görülme sıklığı ve ölüm oranlarının pasta grafik görüntüsü. (GLOBOCAN 2020)



Şekil 5. Dünya genelinde kadınlarda görülen meme kanserinin görülme sıklığı ve ölüm oranlarının ülkelere göre çubuk grafiği. (GLOBOCAN 2020)

GLOBOCAN 2020 verilerine göre kadın meme kanseri tüm kanser vakalarının %11,7'sini oluşturur ve 2,3 milyon yeni tanı ile kanser insidansı en yüksek olan akciğer kanserini geride bırakmıştır. Meme kanseri dünya genelinde kansere bağlı ölümlerde beşinci sırada yer alır. Kadınlarda görülme sıklığı bazında 4 kanser vakasından 1'ini, ölüm bazında ise 6 kansere bağlı ölümden 1'ini oluşturmaktadır. Bölge/ülke genelinde yapılan mortalite ve insidans istatistiklerine göre kadın meme kanseri için en yüksek insidans Avustralya/Yeni Zelanda ve Batı Avrupa'dadır. Belçika en sık kadın meme kanseri vakasının tespit edildiği ülkedir. Mortalite çalışmalarına göre ise, Melanezya ve Batı Afrika da kadın meme kanserine bağlı en yüksek ölüm oranlarının görüldüğü bölgelerdir. Barbados dünya genelinde kadın meme kanserine bağlı en yüksek ölüm oranına sahip ülkedir (Sung ve ark., 2021) (Şekil 5).

2.4. Meme Kanseri Metastazları

Meme kanseri metastazları üzerine yapılan ve 20 yılı geçen istatistiksel analizler metastatik sürecin kanser alt tipine, hasta yaşına ve öncesinde uygulanan

tedaviye bağlı olarak 5-10 yıl içerisinde ölüm ile sonuçlandığını göstermektedir (Tevaarwerk ve ark., 2013; Yates ve ark., 2017). Uzak organ ve bölgesel olmak üzere iki tip metastaz gözlenir. Bölgesel metastaz %30-60 ihtimal ile uzak organ metastazının habercisidir. Özellikle tanı esnasında fark edilen lenf nodu metastazının tedavisi radyoterapi ve cerrahi müdahale ile sağlanabilir fakat bu metastaz kanser nüksüyle ilişkili kötü prognostik bir faktördür (Yates ve ark., 2017).

Histolojik olarak meme kanseri *in-situ* karsinom veya infiltre edici (*invaziv*) karsinom olarak ikiye ayrılır. *In-situ* karsinom meme epitelinde oluşum gösterirken invaziv karsinom meme epitelini geçerek stromaya yayılım gösterir. Çoğu meme kanseri *invaziv* karaktere sahiptir. *Invaziv* meme kanseri vakalarının %80'inden fazlasını *invaziv* duktal karsinomlar (*invasive ductal carcinoma*, IDC'ler), geri kalan kısmını ise invaziv lobüler karsinomlar (*invasive lobular carcinoma*, ILC'ler) oluşturur. IDC'ler akciğer, uzak lenf düğümleri ve merkezi sinir sistemi (*central nervous system,* CNS) metastazı oluşturma eğilimi gösterirler. ILC'ler ise periton, gastrointestinal sistem ve yumurtalıklarda diğer alt tipe oranla üç kat daha fazla metastaz oluşturmaktadır (Arpino ve ark., 2004; Chen ve ark., 2018).

Meme kanseri metastaz riskinin histolojik tanı ve moleküler sınıflandırma ile birlikte değerlendirilmesi daha iyi bir prognostik belirteç niteliğindedir. Meme kanseri sınıflandırılmasında hormon reseptörleri (östrojen reseptör ve progesteron reseptör), HER2, hücre proliferasyon belirteci Ki67, sitokeratin 5/6 (*cytokeratin 5/6*, CK5/6) ve epidermal büyüme faktörü reseptörü (*epidermal growth factor receptor*, EGFR) gibi belirteçler önemlidir. Çeşitli immünohistokimyasal boyamalarla ya da mikrodizi bazlı gen ekspresyon seviyeleriyle bu belirteçlerin analizi yapılır. Farklı meme kanseri alt tipleri için metastaz sonrası sağ kalım süreleri değişkenlik gösterir (Chen ve ark., 2018).

Tablo 1. Meme kanseri alt tiplerinin moleküler belirteçleri, uzak metastaz organ tercihi ve medyan sağ kalım süreleri (Chen ve ark., 2018).

Meme Kanseri Moleküler Alt Tipi	Karakterizasyon Belirteçleri	Organotropik Metastaz Sonrası Medyan Sağ Kalım	Organotropik Metastaz
Luminal A	ER+ ve/veya PR+, HER2 ve düşük Ki67 düzeyi	2.2 yıl	Uzak lenf nodu
Luminal B	ER+ ve/veya PR+, HER2- ve yüksek Ki67 düzeyi	1.6 yıl	Karaciğer, akciğer, uzak lenf nodu
Luminal-HER2	ER+ ve/veya PR+ ve HER2+	1.3 yıl	Kemik, karaciğer, beyin
HER2+	ER-, PR-, HER2+	0.7 yıl	Karaciğer, beyin, uzak lenf nodu
Bazal	ER-, PR-, HER2- ve EGFR+ veya CK5/6+	0.5 yıl	Beyin, akciğer
Üçlü Negatif (ÜNMK)	ER-, PR- HER2- Sıklıkla p53 mutasyonu. Bu alt tipin %80'i bazal benzeri fenotip ifade eder. Hem EGFR- ve hem de CK5/6- olanlara bazal olmayan TNBC denir.	0.9 yıl	Beyin, akciğer

Tablo 1'de meme kanseri alt tiplerinin belirteçleri ve metastaz sonrası medyan sağ kalımları gösterilmiştir.

2.5. Meme Kanseri Metastazında Yer Alan Mekanizmalar

Metastaz, kanser hastaları için ana ölüm nedeni olup etkili tedavi seçeneği oldukça sınırlıdır. En başta metastazın büyük tümör lezyonlarından kaynaklandığı düşünülse de son raporlara göre tespiti yapılamamış küçük lezyonlardan kaynaklı tümör hücrelerinin de dolaşımda varlığı saptanmıştır (Cominetti, Altei, & Selistre-de-Araujo, 2019).

Uzak organ metastazı meme kanseri için yüksek mortaliteye sahiptir. Diğer kanserlerde de olduğu gibi meme kanseri metastazında da kanser hücresinin çevre dokuya invazyonu, sirkülasyona katılarak uzak organa yönelimi, ekstravazasyon ile organa girişi ve sekonder tümör mikroçevresinde önce mikro daha sonra makro metastaz yaparak kanserin invaze olduğu ortama tutulumu ve yayılımı gerçekleşir (Kim, 2021).

Metastatik organotropizm (organ seçilimi) kanser alt tipine, kanser hücresinin moleküler özelliğine ve konakçının sahip olduğu immün mikroçevreye göre düzenlenen bir süreçtir. Primer tümörün metastatik aktivasyonu için bulunduğu

mikroçevreden salgılanan faktörler, mikroçevre kaynaklı eksozomlar ve çeşitli dokulardan hücre infiltrasyonu gibi düzenlemeler ile metastaz öncesi bir niş oluşturulur (Chen ve ark., 2018). Yakın zamanda primer tümörü terk ederek kanda ya da lenfatik damarlarda dolaşan hücrelere sirküle tümör hücreleri (*Circulating tumor cells*, CTC) denir. Bu hücreler dolaşımda kendilerini korumak için trombositlerle birlikte bulunurlar. CTC'lerin trombositler ile birlikte bulunması, tümör hücrelerinin bağışıklık sistemi gözetiminden kaçışına yardımcı olur. Kan dolaşımı ile yayılım metastataz için ana yol olarak bilinse de lenfatik sistem de tümör hücrelerinin yayılımında önemli bir role sahiptir. Lenfatik kılcalların düz kas hücreleri ve bazal membran bulundurmaması kan damarları ile yayılıma göre lenf damarlarıyla yayılımı metastazda daha avantajlı hale getirir. Lenfatik damarlar sıkı bağlantılardan yoksun tek katlı endotel tabaka ile çevrilidir. Bu sebeple interstisyel sıvıların, makromoleküllerin ve hatta bakterilerin geçişini kolaylaştırır (Cominetti ve ark., 2019).

Tohum-toprak hipotezi (*seed and soil theory*) metastatik organotropizmin anlaşılmasında önemli bir yere sahiptir. CTC'lerin uzak organlardaki tutulumunu açıklayan bu teori, metastazın gerçekleşeceği organı 'toprak', bu ortamın önceden hazırlanmasını sağlayan primer kanser hücresini 'tohum' olarak isimlendirir. İkincil tümör çevresindeki pre-metastatik niş oluşumunda primer tümör kaynaklı bileşenler, tümörle birlikte hareket eden kemik iliği kaynaklı hücreler ve tümör mikro-ortamı (primer veya sekonder tümör mikro-ortamı) önemli üç ana faktörü oluşturur (Liu ve Cao, 2016). Bu bileşenlerin oluşumunda hipoksik mikroçevre ve enflamasyonun önemli bir yere sahip olduğu düşünülmektedir. Vasküler sızıntı oluşumuyla ekstraselüler matrix ve dokuda bulunan fibroblastların karakteri değişerek sirküle kanser hücreleri için uygun ortam sağlanmış olur (Kim, 2021). Tümör hücreleri mikroçevrelerinde bulunan oksijenden daha fazlasına ihtiyaç duyarlar. Hücreler damarlardan uzaklaştıkça oksijenin yayılımı azalır ve hipoksik bir ortam oluşur. Oksijenden yoksun bu ortam hipoksi ile indüklenebilir faktör (*Hypoxia-inducible factor*, HIF) yolu dahil olmak üzere birçok hücre içi sinyal yolunu aktive eder.

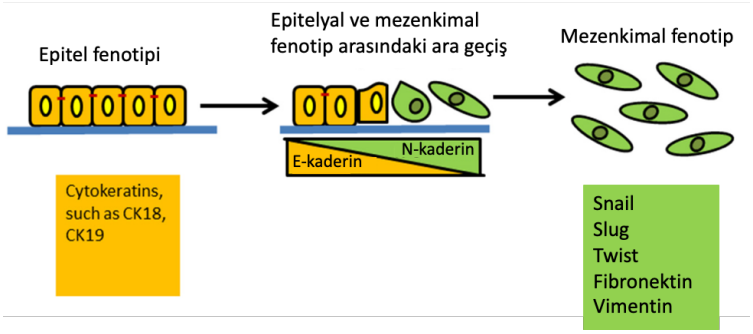
HIF gen ailesi anjiyojenik ve hematopoietik büyüme faktörü genlerinin ifadesinde artışı sağlayarak hücre ve dokuların kronik veya akut hipoksiye adaptasyonuna katkı sağlar (Cominetti ve ark., 2019).

2.5.1. Çevre Doku İnvazyonu /Epitelyal-Mekazkimal Dönüşüm (EMT)

Epitel hücreleri, e-kaderin ve sitokeratin gibi adhezyon moleküleriyle etkileşime girerler ve sıkı bağlatı, yapışık bağlantı, boşluk bağlantı ve dezmozomal yapılar ile epitel hücrelerin birbirleriyle bağlantısı sağlanır. Ayrıca bu hücreler apikal-bazal polariteye sahiptir (Cominetti, Altei, & Selistre-de-Araujo, 2019). Hücre adhezyon moleküllerindeki değişiklikler ile sekonder bölgeye migrasyonun başlaması metastatik sürecin ilk adımıdır. Epitelyal-mezenkimal dönüşüm (*epithelial mesenchymal transition*, EMT), lokal invazyonu açıklayan en önemli mekanizmadır. Bu mekanizma temel olarak epitel hücreler arasındaki bağlantıların kopması ve mezankimal yapıların oluşmasıyla karakterizedir. Notch, Wnt ve Transforme edici büyüme faktör-β (*transforming growth factor-β*, TGF-β) gibi sinyal yollarının aktifleşmesiyle ya da kanser mikroçevresindeki stromal hücrelerin yardımıyla EMT gerçekleşir (Kim, 2021).

Aktif hale gelen bu yolaklar ile çinko parmak veya temel sarmal-döngü-sarmal *basic helix-loop-helix*, bHLH) ailelerine ait Twist-ilişkli protein (*twist-related protein 1*, TWIST1), Çinko parmak e-box bağlayıcı homeobax1/2 (*zinc finger E-box binding homeobox1/2*, ZEB1/2) ve Snail gibi EMT transkripsiyon faktörleri indüklenir (Romero ve ark., 2018). Zonula oklüdens-1 (zonula occludens-1, ZO-1) ve e-kaderin gibi epitel belirteç ifadesinde azalma, mezankimal belirteçlerden Vimentin, fibronektin ve N-kaderin ifadesinde artış görülür (Kim, 2021) (Şekil 6).

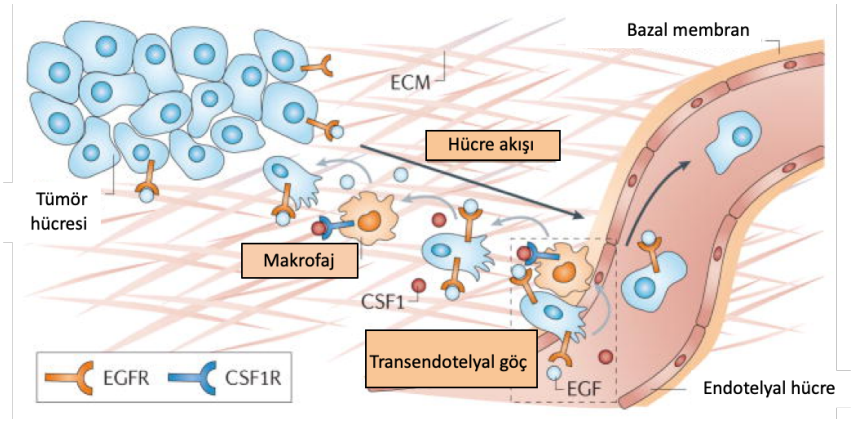
HER-2 pozitif ve luminal A/B meme kanserlerinde epitel fenotipin korunduğu, üçlü negatif veya bazal alt tipler için mezenkimal fenotipin varlığı histolojik olarak karakterize edilmiştir. Özellikle bazal-benzeri meme kanseri hücrelerindeki mezenkimal belirteçlerin artışıyla bu alt tipin daha metastatik karakter sergilediği klinik ve histolojik değerlendirmelerle gösterilmiştir (Felipe Lima ve ark., 2016) .



Şekil 6. Epitel-mezenkimal fenotip belirteçleri
(Wu, Sarkissyan, and Vadgama 2016) tarafından uyarlanmıştır.

2.5.2. İntravazasyon ve Dolaşımda Hayatta Kalma

Meme kanseri metastazı lenfatik yol ve/veya hematojen yolla gerçekleşir. Lenf damarları sıkı intraendotelyal bağlantıları bulundurmaz bu nedenle bazal membran yapısı kesintilidir. Bu da kanser hücrelerinin lenf damarlarına erişimini kolay hale getirir. Böylece meme kanseri lenf nodu metastazı, meme kanseri evrelemesinde önemli bir belirteç niteliğinde olup uzak organ metastaz riskini artırır. Kan damarı ile yayılım gösteren meme kanseri için perivasküler makrafaj gibi farklı hücre grupları metastatik odakta rol alır. Perivasküler makrofajlardan salınan EGF (*epidermal growth factor*, EGF) kanser hücresi migrasyonunu ve kanser hücrelerinden koloni stimüle edici faktör 1 (*colony stimulating factor 1*, CSF-1) 'in salgılanmasını sağlar ve böylece ortama daha çok makrofaj infiltre olur (Şekil 7). Metastatik tümör mikroçevresinde, makrofajlar tarafından sağlanan EGF kemotaksisi başlatır ve tümör hücreleri tarafından CSF1 üretimini destekler. Ortama infiltre olan makrofajlar CSF-1'e yönelim göstererek iki hücre arasında röle-kemotaksis oluşturur. İnvaziv meme tümör dokularındaki makrofaj ve endotel hücre birlikteliği mikrometastaz oluşumuyla ilişkilendirilmiştir (Kim, 2021; Roussos, Condeelis, & Patsialou, 2011).



Şekil 7. Meme tümörü hücreleri tarafından salgılanan koloni stimüle edici faktör 1 (*colony stimulating factor 1*, CSF-1) ile mikroçevreye infiltre olan makrofajlar tümör birlikteliği intarvazasyona katkı sağlar (Roussos ve ark., 2011).

Primer bölgeden ayrılarak dolaşıma katılan tümör hücreleri bazı engellere maruz kalır. Bunlardan biri anoikistir. Anoikis, hücrelerin doğal hücre dışı matrisinden ayrılmasıyla başlayan ve ayrılan hücrelerin vücudun diğer organlarına bağlanmasını apoptoz ile sınırlandıran bir süreçtir. Tümör hücrelerinin invaziv hale gelebilmesi için anoikise karşı direnç geliştirmesi gerekir. Meme kanseri hücreleri bu direnci TrKB, EMT, PI3K, vb. dahil olmak üzere çeşitli sinyal yollarını aktive ederek sağlar (Kim, 2021; Tajbakhsh ve ark., 2019).

2.5.3. Tutunma ve Ekstravazasyon

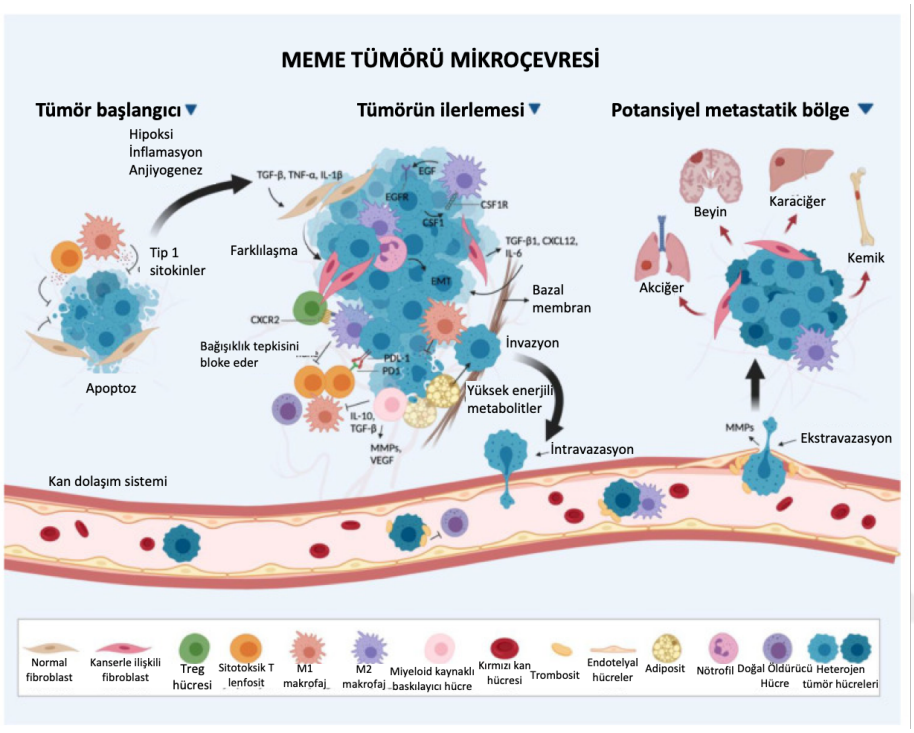
Tümör hücrelerinin sekonder organa tutunup epiteli geçişi için invazyona zıt bir seri aşamanın gerçekleşmesi gerekir. Sekonder organa ulaşan CTC'ler hücre-hücre bağlantılarını yeniden kurmak, çoğalmak ve belirli bir tümör kitlesini oluşturabilmek için epitelyal hücre fenotipini geri kazanmalıdır. Mezenkimal-epitelyal dönüşüm (*mesenchymal–epithelial transition*, MET) ile epitelyal karakter geri kazanılır ve ikincil tümör oluşur (Cominetti ve ark., 2019).

Sekonder organa tümörün invazyonunda, farklı organlar içi farklı engeller bulunur. Örneğin meme kanseri mikroçevresinde TGF-β sitokini varlığının akciğer metastazını desteklediğine dair çalışmalar mevcuttur. Entotelyal tabakanın bozulması metastatik süreç için önemlidir. Bu metastatik süreç TGF-β tarafından Anjiyopoietin benzeri 4'ün (*angiopoietin-like 4*, ANGPTL4) indüklenmesi ile gerçekleşmektedir.

Tümör hücresi tarafınan eksprese edilen ANGPTL4, vasküler endotel hücre-hücre bağlantılarını bozarak, akciğer kılcal damarlarının geçirgenliğini arttırır ve tümör hücrelerinin trans-endotelyal geçişine katkıda bulunur (Padua ve ark., 2008). Bir diğer örnek meme kanseri beyin metastazı için beyinde bulunan kan beyin bariyerinin (*blood-brain-barrier*, BBB) varlığıdır. BBB yapısı kılcal duvarlara ek olarak perisit ve astrositler ile güçlendirilmiş bir sistemdir. *ST6 N-acetylgalactosaminide alpha-2,6-sialyltransferase 5* (*ST6GalNac5)*, *Cyclooxygenase-2 (COX2)*, *Heparin-binding EGF-like growth factor* (*HBEGF)*, *Matrix metalloproteinase-2 (MMP2) ve Katepsin S (cathepsin S, CTSS)* gibi birçok genin regülasyonu ile beyin metastazı için uygun ortam sağlanır (Cominetti ve ark., 2019; Kim 2021). *Katepsin S*, BBB'nin bütünlüğünü düzenleyen sıkı proteinlerin ifadesinden sorumlu gendir. *Katepsin S*, dolaşımda bulunan metastatik tümör hücrelerinin BBB'ne göçüne aracılık eder (Sevenich ve ark., 2014). İnvaziv meme kanseri hücreleri immün yanıttan kaçış mekanizmaları geliştirerek stromal hücreler tarafından salgılanan anti-metastatik sinyalizasyonu bloke eder ve primer tümörden farklı bir niş oluşumunu sağlayarak sekonder organdaki mikroçevreyi büyümeleri için uygun hale getirir (Kim, 2021).

Metastatik süreci özetlemek gerekirse, tümör gelişimi sitotoksik T lenfosit'ler (*cytotoxic T lymphocytes*, CD8+T'ler), M1 makrofaj ve fibroblast hücrelerinin ürettiği anti-tümör sinyallerce zengin bir mikroçevrede başlar. Transforme olan hücreler, konakçının stroma hücre yapısını değiştirerek pro-tümörijenik özellik kazanmasını sağlar. TGF-β, interlökin (*interleukin*, IL) -1β ve tümör nekroz faktör (*tumor necrosis factor*- α, TNF- α) gibi enflamatuvar sitokinler, fibroblast hücrelerinin kanser ilişkili fibroblast (*cancer associated fibroblast*, CAF) yapıya dönüşümlerini indükler. Aynı zamanda EMT sürecinde tümör gelişimi için önemli TGF-β, C-X-C kemokin ligand (*C-X-C motif chemokine ligand*, CXCL) 12, IL-6 gibi çözünür faktörler ortama salınır. Mikroçevredeki M2 makrofaj ve nötrofiller EMT'yi destekleyeci pro-tümörijenik sitokin sekrete ederler. Tümör gelişimi ve invazyonunu destekleyici CXCL5-CXCR (*C-X-C motif chemokine receptor*, CXCL) 2 ve TGF-β sitokinler ile CD8+T, doğal öldürücü hücreler (*natural killer*, NK) ve M1 makrofajlar inaktif hale getirilir. Aynı zamanda bu sitokinler immün sürveyansı bozan düzeleyici T hücre'leri (*regulatory T cell*, Treg'leri) ve miyeloid baskılayıcı hücrelerin (*myeloid derived suppressor cell*, MDSC'lerin) mikroçevreye alınarak aktifleşmesini sağlar. Salgılanan matriks

metalloproteinaz (*matrix metalloproteinase*, MMP) ve vasküler endotelyal büyüme faktörü (*vascular endothelial growth factor*, VEGF) ile primer tümör hücrelerinin dolaşıma çıkışı gerçekleşir. Trombosit ve M2 makrofajlar sirküle tümör hücrelerinin çevredeki immün yanıttan kaçışına yardımcı olur ve tümör hücrelerine sekonder bölgeye kadar eşlik ederler (Terceiro ve ark., 2021) (Şekil 8).

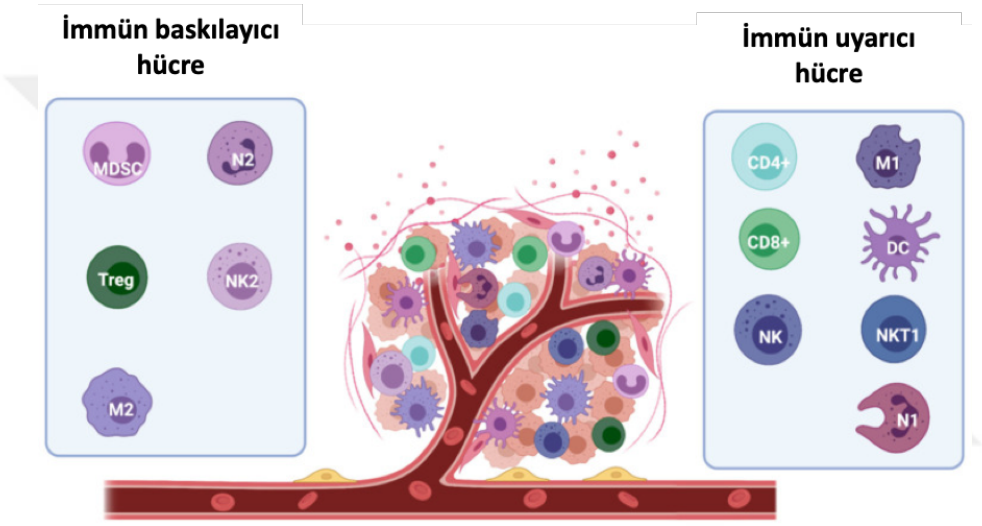


Şekil 8. Meme kanserinin kademeli metastatik süreci. Primer tümör hücreleri invaziv hale gelerek EMT'ye uğrar. Dolaşıma katılan sirküle tümör hücrelerinin lenf ya da kan damarlarıyla sekonder bölgeye yönelimleri başlar. Ekstravazasyon ile dolaşımdaki damardan çıkan CTC'ler, MET adı verilen ters bir EMT sürecine girerek sekonder organda kolonize olurlar.
(Terceiro ve ark., 2021) tarafından uyarlanmıştır.

2.6. Meme Kanseri ve İmmün Yanıtlar

Tümör mikroçevresine infiltre olan immün/immün olmayan hücreler ve bu hücrelerden salgılanan mediatörler anti-tümör ya da pro-tümör yanıtların oluşmasında önemli bir yere sahiptir (Şekil 9). Salgılanan bu meadiatörler, hücre fenotipini etkilediği gibi tümör mikroçevresini de enflamatuar ya da anti-enflamatuar olarak modifiye eder (Lan ve ark., 2021). Treg'ler, düzenleyici B hücreler (*regulatory B cell*, Breg'ler), tümör ilişkili makrofajlar (*tumor associated macrophage*, TAM'lar), düzenleyici doğal öldürücü hücreler (*regulatory natural killer cell,* NKreg'ler),

MDSC'ler, tümör ilişkili nötrofiller (*tumor associated neutrophil*, TAN'lar) ve mezenkimal kök hücreler mikroçevredeki homeostazın sağlanmasında oldukça önemlidir (Gatti-Mays ve ark., 2019; Lan ve ark., 2021). Bağışıklık toleransı, organizmanın kendinden olmayan antijenleri tanıması ve yanıt oluşturmasını sağlarken dokularındaki self-antijenlere yanıt vermemesi durumudur. Treg'ler, Breg'ler, tolerojenik dendritik hücreler (*tolerogenic dendritic cell,* tolDC'ler) ve M2 makrofajlar bağışıklık yanıtındaki tolerans ve aktivasyon durumlarının dengesini sağlayan önemli bağışıklık hücre alt gruplarıdır (Sakowska ve ark., 2022).

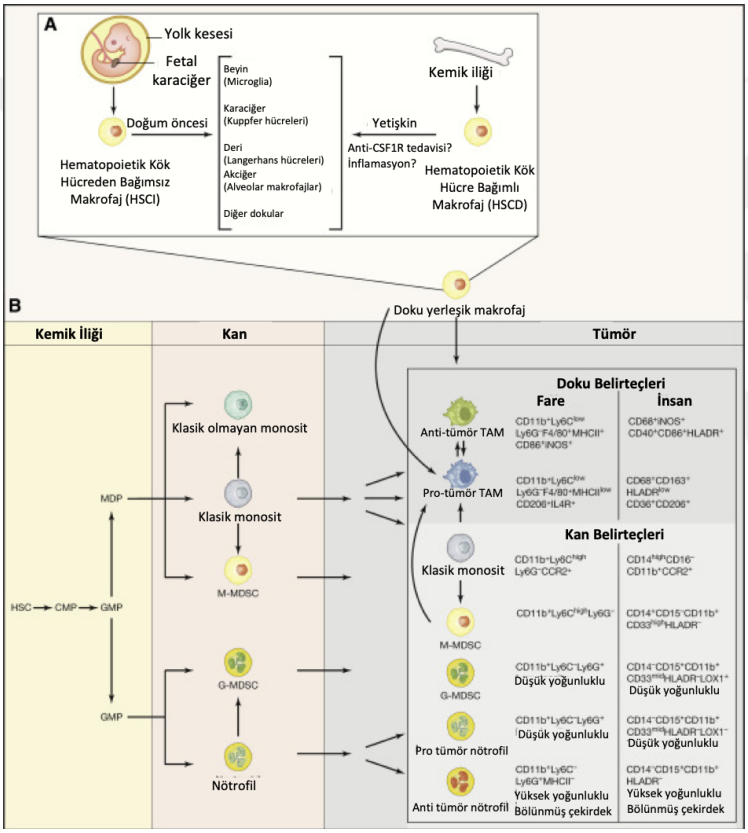


Şekil 9. Meme kanseri mikroçevresinde bulunan immün hücreler ve tümör gelişimdeki rolleri.
İmmün hücreler tümör teşvik edici ya da baskılayıcı fenotipte olabilir. Başlıca anti-tümör aktiviteye sahip hücreler M1 makrofajları, CD8 + ve CD4+ lenfositler, NK, NKT1, DC'ler ve N1 nötrofillerdir. Tümör oluşumunu engelleyici IFNγ, TNFa, IL-1β, IL-2 ve IL-12 gibi sitokinlerin salgılanmasını sağlarlar. Başlıca pro-tümör aktiviteye sahip hücreler MDSC'ler, mast hücreler, Treg'ler, M2 makrofajlar ve N2-TAN'lardır. Bu hücreler, immüno-inhibitör TGF-β, VEGF, IL-6, IL-8 ve IL-10 gibi pro-tümör sitokinlerin salgılanmasında görev alırlar.
(Cilibrasi ve ark., 2021) tarafından uyarlanmıştır.

2.7. Miyeloid Hücrelerin Meme Kanser İmmün Yanıttaki Rolleri

Kemik iliğinden kaynaklı hematopoetik kök hücre (*hematopoietic stem cell*, HSC), kan ve kemik iliğinde bulunan tüm hücreleri oluşturabilme yeteneğindeki multipoptent bir kök hücredir. HSC'lerin farklılaşarak olgun ve fonksiyonel özellikteki kan hücrelerini oluşturma sürecine hematopoez denir (Weiskopf ve ark., 2016). Embriyolojik gelişim sırasında, en erken hematopoez yolk sac kan adalarında

gerçekleşir ve sonrasında fetal karaciğere ve hematopoietik organlara göç eder. HSC'ler ortak myeloid hücrelerden (*common myeloid progenitor*, CMP'den) türevlenen monosit-granülosit progenitor hücrelere (*granulocyte-monocyte progenitor*, GMP'lere) farklılaşırlar. GMP'ler, monositik (monositler, makrofajlar, monositik miyeloid kaynaklı baskılayıcı hücreler) veya granülositik (nötrofiller, granülositik miyeloid kaynaklı baskılayıcı hücreler) öncüleri olan makrofaj/dendritik hücre progenitörlerine (*macrophage/dendritic cell progenitors*, MDP'lere) farklılaşır (Güç, & Pollard, 2021; Weiskopf ve ark., 2016) (Şekil 10).



Şekil 10. Makrofaj, nötrofil ve MDSC'lerin kökenlenmesi, bu hücrelerin insan ve hayvan tümör mikroçevresindeki belirteçleri.
a) Embriyonik dönemde yolk sac progenitörlerinden veya fetal karaciğerden türevlenen doku yerleşik makrofaj popülasyonu tümör mikroçevresinde anti-tümör ya da pro-tümör immün aktivite gösterebilir.
b) Miyeloid hücrelerin kökenlenmesi ve tümör mikroçevresindeki belirteçleri şematize edilmiştir. Sistemik ve lokal bazı faktörler ile TAM ve nötrofillerin pro-tümör ya da anti-tümör fenotipe farklılaşmasının kontrolü sağlanır.
(Güç, & Pollard, 2021) tarafından uyarlanmıştır.

Makrofaj hücreleri, meme tümörü mikroçevresinde bulunan hücre popülasyonunun %50'siden fazlasını oluşturur. Makrofajların, klasik (M1) veya alternatif (M2) polarizasyonuna bağlı olarak tümör mikroçevresinde ikili role sahiptir.

M1 makrofajlar bulundukları çevreye ürettikleri pro-inflamatuvar sitokinleri salarak anti-tümör yanıtın oluşmasını desteklerken, M2 makrofajlar ürettikleri anti-inflamatuvar sitokinler ile meme kanseri ilerlemesinde rol alır. Tümör mikroçevresinde bulunan M2 polarize makrofaj popülasyonu TAM olarak isimlendirilir. M2 makrofajlar, farklı aktivasyon yolakları ile metastatik odakta M2a, M2b ve M2c olmak üzere üç alt tipte farklılaşabilirler (Hill ve ark., 2020; Terceiro ve ark., 2021). TAM'lar EGF-1, TGF-β, IL-6, IL-10 ve TNF-α gibi EMT geçişi sağlayan sitokinleri sekrete eder böylece tümörün metastatik hareketle sekonder bölgeye göçü sağlanır (Terceiro ve ark., 2021).

MDSC'ler heterojen yapıya sahip olgunlaşmamış miyeloid kökenli hücre grubudur. Bu hücre grubu monositik-MDSC'ler (CD11b + CD14 + HLA-DR -/düşük CD15 -) ve granülositik-MDSC'ler (CD11b + CD14 - HLA-DR düşük/- CD15 +) olarak ikiye ayrılır (Cha, & Koo, 2020). MDSC'ler IL-10, TGF-beta ve VEGF gibi faktörleri salgılayarak meme kanseri metastazı için anjiyogenezi uyararak immün yanıtı sınırlar (Terceiro ve ark., 2021).

Miyeloid öncüllerden türevlenen nötrofil hücreleri beyaz kan hücrelerinin önemli hücresel kısımlarını oluşturur. Nötrofiller enflamasyon halinde ilk doğal bağışıklık yanıtı oluşturan hücrelerdir. Kısa ömürlü (3-24 saat) olmaları sebebiyle tümör mikroçevresindeki roller uzun süre ihmal edilmiştir. Son yıllarda nötrofillerin tümör mikroçevresinde daha uzun süre (5 ya da 5 güden fazla) hayatta kaldığına dair yapılan artan çalışmalar ile nötrofillerin konak savunması dışında immünmodülatör özellikleri çalışma konusu haline gelmiştir. Tümör mikroçevresindeki davranışlarına göre N1 (anti-tümör nötrofil) ve N2 (pro-tümör nötrofil) olarak sınıflandırılır (Wu ve ark., 2019). Tümör ilişkili nötrofil hücreleri meme kanseri dahil birçok solid tümörde pro-tümör özellik gösterir (Shaul, & Fridlender, 2017).

2.8. İmmünoediting

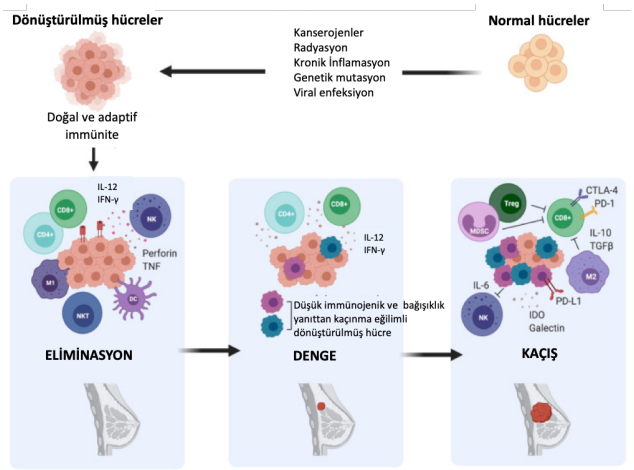
Bağışıklık sisteminin kendinden olmayanı ayırıp elimine etmesi fikri ilk kez 1900'lü yıllarda Ehrlich tarafından öngörülse de, bu fikir tam anlamıyla 20. yüzyılın sonlarında Burnet ve Thomas'ın immün gözetim hipoteziyle kabul görmüştür. İmmün sürveyans, bağışıklık sistemi hücrelerinin kanser hücrelerini tanıyıp ortadan

kaldırmasında önemli bir kavramdır. Bu süreç eliminasyon, denge ve kaçış olmak üzere üç dinamik aşamadan oluşur. Eliminasyon fazı doğal ve adaptif bağışıklık tepkilerinin kombinasyonunu içeren bir süreçtir. NK ve doğal öldürücü T hücre (*natural killer T cell*, NKT) gibi efektör hücreler, oluşan tümör hücreleri, tümörü çevreleyen stromal yapılar ve makrofajlar tarafından salgılanan inflamatuvar sitokinler tarafından doğal immün yanıt aktive edilir. IL-12 ve interferon gamma (IFN-γ) gibi pro-infalamatuvar sitokinler yardımıyla mikroçevreye daha fazla bağışıklık hücresi infiltre olur. NK hücreleri perforin, granzim ve tümör nekrozis faktör ilişkili apoptozis indükleyici ligand (*tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*, TRAIL) aracılı öldürme sağlayarak ortama tümör ilişkili antijenlerin (*tumor-associated antigen*, TAA'ların) salınmasını sağlar. Ortama salınan bu antijenler adaptif yanıtı tetikler. NK ve dendritik hücre (*dendritic cell*, DC) arasındaki çapraz konuşma DC'lerin olgunlaşması ve tümör hücrelerinin lenf düğümlerine göçünü tetikler. CD8+ T'lerin klonal genişlemesi artan antijen sunumuyla gerçekleşir. Tümör çevresine giden TAA'ya özgü T lenfosit popülasyonları IFN-γ üretimiyle direkt tümör hücrelerine saldırarak eliminasyon sağlanır. İmmünoediting'in bir sonraki aşaması olan denge fazında imün sisteme dirençli hücrelerin üretimi gerçekleşir. İmmün hücrelere yanıt veren klonların eliminasyonunu sağlayan bu faz immün düzenleme aşamasının en uzun aşamasını oluşturur. IFN-γ sitokini ve T lenfositler aracılığıyla bağışıklığı bastırıcı mutasyonları içeren dirençli tümör varyantları seçilir (klonal seçilim). Denge fazında, immünojenik fenotipe sahip olmayan (bağışıklık yanıttan kaçabilen) veya direnç kazanarak hayatta kalan kanser hücreleri baskılanır fakat yok edilmez, bu da fonksiyonel uyku hali (dormansi) ile sonuçlanır (Şekil 11).

Bağışıklık tepkimeleri ile kanser hücrelerinin eliminasyonunda ortamdaki TAA'lar oldukça önemlidir. Bu antijenlerin ortamdaki eksikliği oluşacak yanıtları kısıtlar. Aynı zamanda T hücre yanıtlarında oldukça önemli CD3-ζ zinciri, antijen bağlanmasında dönüştürücü işlevi gören T hücre reseptör (*T cell receptor*, TCR)-CD3 kompleksinin bir parçasını oluşturur. Bu yapı TCR'de büyük bir intrasitoplazmik homodimer olarak bulunur. Ortamdaki T lenfositlerde CD3-ζ zinciri kaybı ve TAA eksikliği sayesinde tümör hücreleri immün yanıttan kaçmayı başarır (Cilibrasi ve ark., 2021; Kim, Emi, & Tanabe, 2007; Tower, Ruppert, & Britt, 2019).

Tümör ilişkili antijen epitoplarının sunumu bağışıklık tepkisi oluşumunun ilk adımdır. İmmün yanıttan kaçmayı kolaylaştırmak için tümör hücreleri, antijen işleme ve sunum yollarında farklı mutasyonlar edinebilir. Edinilen mutasyonlar ile tümör büyümesinin erken evrelerinde tümörle ilişkili antijenlerin düşük düzeyde ekspresyonu, antijenik epitopların kaybı ve tümör hücresinin sitotoksik T hücrelerinden kaçmasına izin veren majör histo-uyumluluk kompleksi (*major histocompatibility complex,* MHC*)* sınıf I'in düşük ekspresyonu veya kaybı gerçekleşir. Gen mutasyonları, heterozigotluğun kaybı ve transkripsiyonel düzenlemelerdeki bozukluklar sebebiyle meme kanserinde insan lökosit antijen (*human leucocyte antigen*, HLA) sınıf 1'in ifadesi düşüktür (Cilibrasi ve ark., 2021).

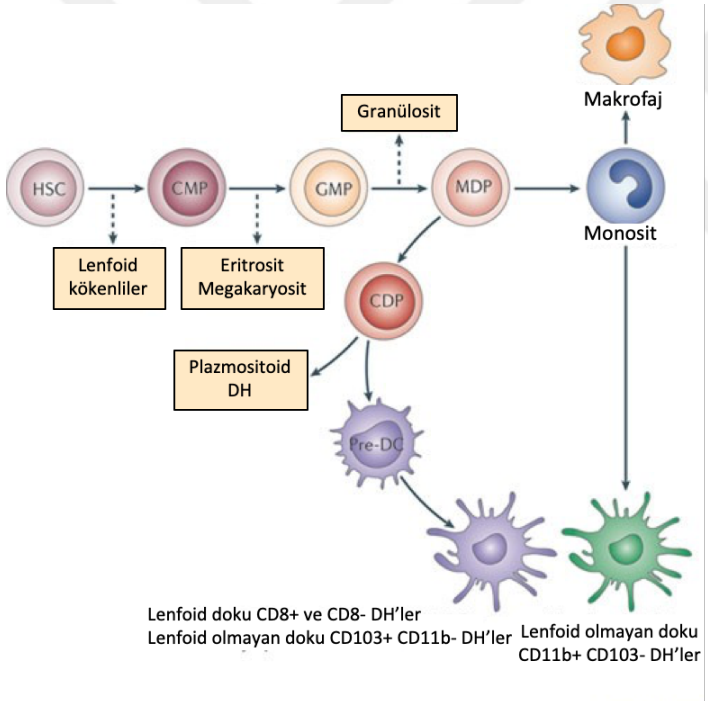
Yan Liu ve ark. tarafından yapılan vaka analizi çalışmasında antijen sunumu için gerekli moleküllerin ve HLA sınıf I moleküllerine yüklendiği kompleks basamakta kritik işleve sahip β2-mikroglobulin, TAP (antijen işleme ile ilişkili taşıyıcı) 1, TAP2 ve *calnexin*'in ifadesi incelenmiştir. Meme kanseri beyin metastazı lezyonlarında meme kanserine kıyasla β2-mikroglobulin, TAP1 ve calnexin'in ifadesinin düşük olduğu bulgulanmıştır. Ayrıca meme kanseri beyin metastazı vakalarında primer meme tümörüne göre CD8+T hücre infiltrasyonunun daha düşük olduğu gösterilmiştir (Liu ve ark., 2012).



Şekil 11. Meme kanserinde immünoediting mekanizması.
İmmün sürveyansın ilk aşaması olan eliminasyon fazında adaptif bağışıklık hücrelerinden M1 makrofaj, NK ve NKT hücrelerinin ortama infiltrasyonu ve beraberinde doğal bağışıklık yanıt indüklenir. Bu aşamada ortamdaki dendritik hücrelerin olgunlaşması ve tümör hücrelerinin eliminasyonu gerçekleşir. Elimine edilemeyip, immün yanıttan kaçabilen seçilmiş klonlar denge fazına geçer. MDSC, IL-6, galektin, IL-10 ve TGF-β gibi inhibitör komponentlerle zenginleştirilerek bağışıklığa toleranslı hale getirilmiş mikroçevre, immün kaçış ve tümörün büyümesine olanak tanır.
(Cilibrasi ve ark., 2021) tarafından uyarlanmıştır.

2.9. Monosit- Makrofaj Farklılaşması ve Polarizasyonu

Vücutta bulunan monosit, makrofaj ve DC özelleşmiş mononükleer fagositik sistemin bir parçasıdır. Doğal bağışıklık yanıtın adaptif bağışıklık sistemini aktifleştirmesinde, yabancı ajanların doğrudan elimine edilmesinde, anti-patojen savunmasında ve doku homeostazısının sağlanmasında mononükleer fagositik sistem görevlidir (Hettinger ve ark. 2013; Italiani ve Boraschi 2014; McGrath, Frame, ve Palis 2015). Mononükleer fagositik sistem hücreleri MDP'lerden türevlenir. MDP'lerin monosit hücrelerine veya DC öncüllerine (CDP'lere) farklılaşmasıyla ortak progenitörden türevlenen farklı mononükleer fagositik hücrelerin oluşumu gerçekleşir (Chow, Brown, & Merad, 2011; McGrath ve ark. 2015) (Şekil 12).

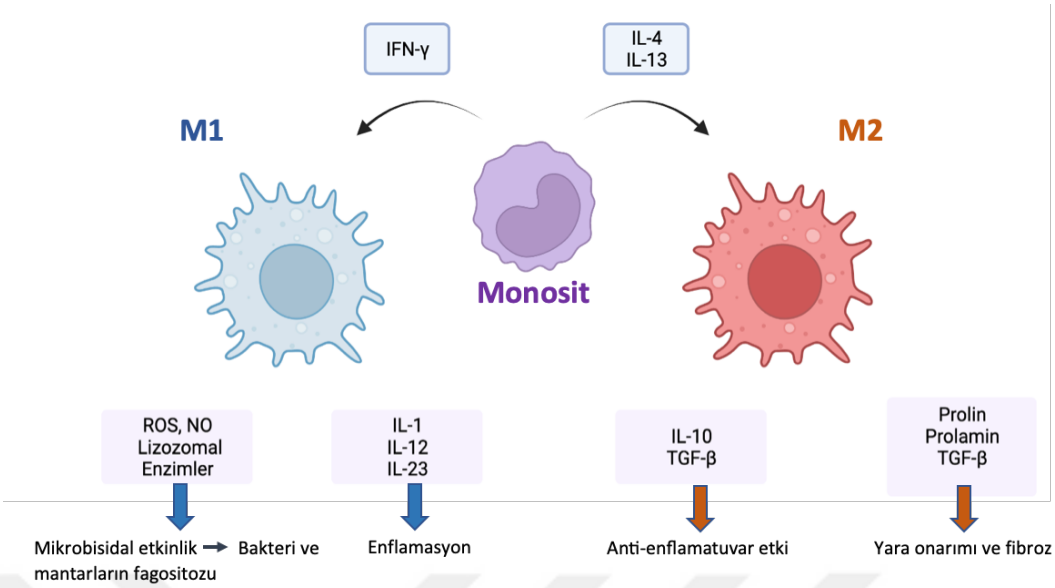


Şekil 12. Mononükleer Fagosit Hücrelerin Oluşumu
Monosit, makrofaj ve dendritik hücrelerin gelişimi makrofaj ve MDP oluşumuyla gerçekleşir. MDP'ler, CDP'leri veya monositleri oluşturabilir. CDP'ler lenfoid dokularda CD8+ ve CD8- DC'leri, periferik lenfoid olmayan dokularda ise CD103+ CD11b DC'leri oluşturur. MDP'lerden türevlenen monositler CD11b+ CD103- DC'leri veya makrofajları oluşturur.
(Chow ve ark., 2011) tarafından uyarlanmıştır.

Kemik iliğinde üretilerek kan dolaşımına geçen monositler inflamasyon sırasında salınan çeşitli mediatörler ile uyarılır ve endoteli geçerek makrofaj olarak isimlendirilir (Geissmann ve ark., 2010; Viola ve ark., 2019). Vücutta yaygın olarak

bulunan makrofajlar homeostazın sürdürülmesi, patojenler ile mücadelenin sağlanması ve apoptatik kalıntıların uzaklaştırılması ile görevli olup doku bütünlüğünü koruyan yerleşik hücrelerdir (Yunna ve ark., 2020). Makrofajlar bulundukları yerel çevreden gelen sinyallere göre işlevsel profillerini modüle edebilen oldukça plastik bir yapıya sahiptir ve işlevlerine göre ikiye ayrılır (Viola ve ark., 2019) (Şekil 13). Klasik makrofaj etkinleşmesi, toll benzeri reseptörler (*toll-like receptor,* TLR'ler) üzerinden doğal ve edinsel bağışıklık hücrelerince üretilen IFN-γ sitokini ile tetiklenir. Bu sitokin ile uyarılan makrofaj tipi M1 olarak da adlandırılır. M1 makrofajlar bakteriler, virüsler ve protozoalar dahil olmak üzere çeşitli mikroorganizmalara karşı proinflamatuar sitokin üreterek diğer bağışıklık hücrelerinin inflamasyonlu bölgeye infiltre olmasını sağlar. Böylece inflamatuar yanıtların başlatılması ve sürdürülmesini sağlayarak konağın savunmasını destekler. Klasik olarak aktive edilmiş makrofajlar yüksek oranda fagositiktir, aktifleşmesi sonucunda fazla miktarda reaktif oksijen ve nitrojen türleri üreterek Th1 tepkisini destekler. M1 makrofajlar yüksek antijen sunumu kapasitesini sahiptir ve iki önemli inflamatuar sitokin olan IL-12 ve IL-23'ü yüksek seviyede salgılar (Evita Weagel ve ark., 2015; Montes ve ark., 2013; Viola ve ark., 2019; Xu ve ark., 2016).

Güçlü TLR uyarısının olmadığı koşullarda IL-4, IL-13 sitokin uyarısı ile alternatif makrofaj etkinleşmesi ortaya çıkar, M2 olarak da adlandırılır. M2 makrofajlar, inflamasyonun giderilmesi ve doku bütünlüğününün sağlanmasında görevlidirler (Evita Weagel ve ark., 2015). M2 makrofajları, Dectin-1, Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3 grabbing non-integrin (DC-SIGN), mannoz reseptörü, çöpçü reseptörü A, çöpçü reseptörü B-1, CD163, CCR2, CXCR1 ve CXCR2' nin ifadelerindeki artış ile karakterize edilir. Bulundukları ortama IL-10 ve TGF-β gibi anti-inflamatuar mediatör sekrete ederler ve arginaz yoluyla ornitin ve poliamin üretimini sağlarlar (Wang, Liang, & Zen, 2014).



Şekil 13. Makrofaj Polarizasyonu.
Klasik makrofaj etkinleşmesi ortamda bulunan IFN-gama sitokini ile gerçekleşir. Aktifleşen M1 makrofaj çeşitli mikroorganizmalara karşı pro-inflamatuar sitokin üretimi yapar. Alternatif makrofaj etkinleşmesi ise ortamda bulunan IL-4 ve IL-13 ile sağlanır. Aktifleşen M2 makrofajlar anti-inflamatuar sitokinlerin sekresyonunda, fibrosiz ve yara onarımında görevlidir (biorender.com kullanılarak hazırlanmıştır).

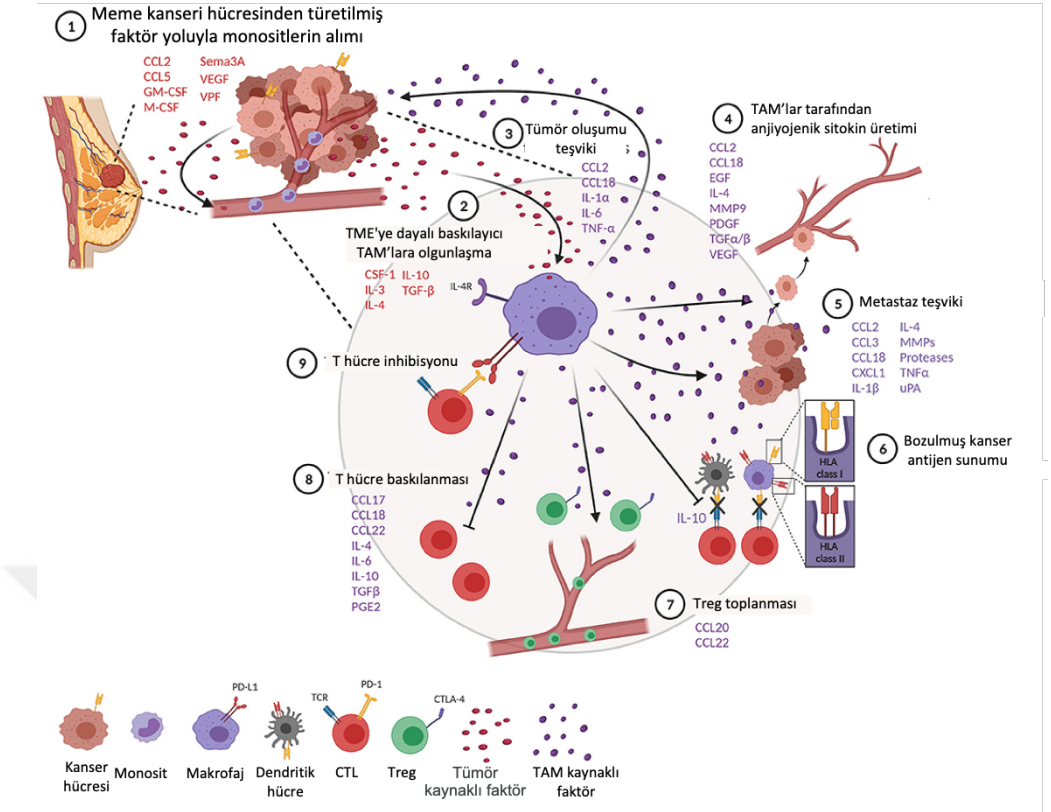
2.9.1. Meme Kanserinde Monosit ve Makrofajın Rolü

Makrofajlar, doku homeostazını sağlayan ve patojenlere karşı savunma yapan doğal bağışıklık hücreleridir. Bu hücrelerin meme tümörü mikroçevresine infiltrasyonu kötü prognoz ile ilişkilendirilir. Meme tümörü tarafından salgılanan kemokin, sitokin ve büyüme faktörleri monosit ve makrofajların tümör mikroçevresine alınmasını kolaylaştırır (Mehta ve ark., 2021).

Tümör mikroçevresindeki IFNγ, TNF-α ve granülosit makrofaj-koloni uyarıcı faktör (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor,* GM-CSF) gibi proinflamatuar uyaranların varlığıyla tümör hücrelerinin eliminasyonuna yönelik klasik makrofaj polarizasyonu gerçekleşir. M1 makrofajlar; süperoksit anyonları, nitrojen serbest radikalleri ve IL-1, IL-2, IL-6 ve IL-12 gibi immünojenik sitokin üretimini sağlayarak antitümör bağışıklığı destekler ve adaptif bağışıklığı etkinleştirmek üzere tümör antijenlerini T hücresine sunma yeteneğine sahiptir.
Fakat meme tümörü mikroçevresinde tümör kaynaklı IL-4, IL-10, IL-13 ve TGF-β gibi anti-enflamatuar sitokinlerin varlığı, glukokortikoidler ve hücre dışı matris bileşenleri tümöre infiltre olan makrofajların çöpçü, mannoz ve galaktoz reseptörlerinin

ekspresyonunu ve VEGF, COX-2'den türetilmiş prostaglandin E2'yi (PGE2'i) ve IL-10 üretimini arttırır. Meme tümörü mikroçevresinde CD4+ T hücreleri tarafından üretilen IL-4'e maruz kalan makrofajlar, immünosüpresif TAM fenotipine polarize olarak Arjinaz 1 (*arginase 1*, Arg1) ve TGF- β 'yi eksprese ederler (Ostuni ve ark., 2015; Tariq ve ark., 2017; Williams, Yeh, & Soloff, 2016).

Monosit kemoatraktan protein-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*, MCP-1/CCL2), TAM göçünü düzenleyen anahtar kemokinlerden biridir. CCL2 ligandı endotelyal, fibroblastlar, epitelyal, düz kas, mezengial, astrositik, monositik, mikroglial hücreler ve tümör hücreleri dahil birçok hücre tipi tarafından eksprese edilir. Fare meme kanseri modeliyle CCR2 eksprese eden monositlerin mikroçevreye infiltrasyonu ile akciğer metastazı gösterilmiştir (Deshmane ve ark., 2009; Mehta ve ark. 2021; Qian ve ark., 2011). CCL5, TAM'ları meme tümörü mikroçevresine çeken bir başka kemokindir. Meme tümörü epitel hücrelerinde eksprese edilir ve kötü prognozla ilişkilendirilir. CCL5 reseptörünü yüksek düzeyde ifade eden makrofaj hücreleri tümör mikroçevresine infiltre olarak tümör prognozunun şekillenmesinde rol alır (An ve ark., 2019; Mantovani ve ark., 2007).



Şekil 14. Meme kanseri mikroçevresinde bulunan TAM'lar anti-tümör bağışıklık tepkisini sınırlandırır. (1) Monositler, tümör kaynaklı faktörler ile mikroçevreye infiltre olur. (2) Tümör ilişkili monositler baskılayıcı TAM'lara olgunlaşır. (3) TAM'lar, tümör hücresi çoğalmasını ve hayatta kalmasını sağlayan faktörler üretir. (4,5) TAM'lar anjiyogenezi ve metastazı teşvik eder. (6) TAM'lar, DC'ler tarafından üretken antijen sunumunu bozar ve kendi yüzeyindeki MHC sınıf I ve II moleküllerinin ekspresyonunu düşürür. TAM'lar, Treg'ler toplanması (7), efektör T hücrelerinin baskılanması (8) ve ko-inhibitör moleküllerin ifadesindeki artış (9) ile T hücre inhibisyonuna neden olur.
(Mehta ve ark., 2021) tarafından uyarlanmıştır.

2.10. Ko-stimülasyon ve T Hücre Aktivasyonu

Ortamda bulunan antijenin eliminasyonu ilk olarak doğal bağışıklığın ve ardından adaptif yanıtın tetiklenmesiyle sağlanır. Etkili bir bağışıklık yanıtı için öncelikle antijen spesifik lenfosit aktivasyonu gereklidir. Aktive olan T hücrelerin sayıca artışıyla antijenik yapıların eliminasyonu sağlanır. Aynı antijene maruziyet durumunda etkili bir bağışıklık yanıt için uzun süreli bellek hücreler gereklidir (Chambers, & Allison, 1999; Cronin, & Penninger, 2007).

T hücreleri, kemik iliğindeki ortak lenfoid progenitörden köken alır ve kan dolaşımı yoluyla birincil lenfoid organları olan timusa göç eder. T hücreleri; CD3 sinyal kompleksi, CD4 ve CD8 gibi hücre yüzeyi koreseptörlerin ekspresyon

değişiklikleri ve TCR yeniden düzenlenmesi gibi olgunlaşma süreçlerinden geçerler ve böylece öze tepkili reseptör taşıyan T hücrelerin negatif seçilimi sağlanır.
Öz antijenlere tepki oluşturmayan T hücreler timustan ayrılarak periferik T hücre repertuarını oluşturur (Skapenko ve ark., 2005).

T hücre aktivasyonu iki sinyal ile sağlanır. İlk sinyal antijen sunan hücrenin (*antigen-presenting cell*, APH'nin) yüzeyindeki peptit-MHC kompleksine TCR ile sağlanır. Patojen ilişkili antijenler işlenerek küçük peptitler haline getirilir, sonrasında MHC molekülleri üzerinden T hücrelere antijenik peptitlerin sunumu yapılır. TCR'nin antijen yüklü MHC'ye bağlanmasına ek olarak hem yardımcı T hücrelerinin hem de sitotoksik T hücrelerinin aktivasyonu ve immün yanıt oluşturabilmesi için B7 aile üyeleri gibi ko-reseptörlerden gelen bir dizi ikincil sinyal gereklidir. CD28, APC yüzeyindeki CD80 (B7-1) ve CD86 (B7-2) moleküllerine bağlanan en önemli yardımcı uyarıcı reseptördür. CD28 ve ligasyonu ile başlatılan sinyal yolları optimal T hücre aktivasyonunu indüklemek, canlılığı desteklemek ve anerjiyi önlemek için gereklidir. Ko-stimülatör ve ko-inhibitör molekül dengesi T hücre yanıtının kaderini belirler (Azuma 2019; Cronin, & Penninger, 2007; Maj ve ark., 2013; Skapenko ve ark., 2005).

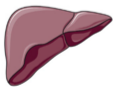
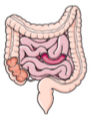
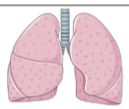
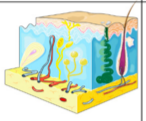
2.11. Doku Yerleşik Makrofajlar

Doku yerleşik makrofajlar hem intra hem de extra embriyonik öncüllerden türevlenerek doğumdan önce ilgili organlarda oluşum gösterirler (Cotechini, Atallah, & Grossman, 2021). Doku yerleşik makrofajlar yolk sac kesesi, fetal karaciğer ve kemik iliğindeki hematopoetik kök hücrelerde türetilen kaynaklardan türevlenebilir. Yapılan gen ekspresyon analizi çalışmaları ile doku yerleşik makrofajların farklı dokuya özgü transkripsiyonel ve epigenetik programlamalar ile bulunduğu anatomik dokuya özgü işlev kazandığı gösterilmiştir. Makrofajlar tüm vücut dokularına yayılmış olup, yerleştiği yerde özel isimleri ile anılmaktadır (Şekil 15). Karaciğerde kupffer, deride langerhans hücreleri, akciğerde alveolar makrofajlar, beyinde mikroglial hücreler, böbrekte mezenşimal hücreler, kemikte osteoklastlar ve bağ dokuda histiosit olarak isimlendirilir (Cotechini ve ark. 2021; Guilliams, & Scott, 2017; Okabe, & Medzhitov, 2016; Shapouri-Moghaddam ve ark., 2018; Wu, & Hirschi, 2021).

Monopoez ve makrofaj ontolojisi erken embriyogenez döneminde incelenen deneysel çalışmalar içermesi nedeniyle büyük ölçüde farelerde araştırılmıştır.

Fare makrofajları ardışık üç hematopoietik gelişim dalgası ile üretilir. Makrofaj oluşumunun ilk dalgası, yolk kesesinde gereçkleşen ilkel hematopoez sırasında meydana gelir ve ilkel eritroid, megakaryosit ve makrofaj progenitörlerinin ortaya çıkmasına neden olur. Bu "ilkel" makrofaj öncülleri beyindeki mikroglia hücrelerini oluşturur. İkinci dalga yolk sac kesesinde meydana gelir ve doku yerleşik makrofajların üretiminde görevli multipotent eritro-miyeloid progenitörleri (*erythro-myeloid progenitor*, EMP'leri) üretir. EMP'den türetilen dokuda yerleşik makrofajlar, beyin dışındaki farklı dokuların çeşitli nişlerinde bulunur ve bulunduğu dokuya özgü işlev kazanır. Makrofaj oluşumunun üçüncü dalgası, embriyonun aorta-gonad-mezonefroz (*aorta-gonad-mesonephros*, AGM) bölgesinde oluşarak fetal karaciğere göç eden ve orada kolonileşen HSC'lerden kaynaklanır. HSC türevli makrofaj üretimi yetişkinlik boyunca devam eder (Wu, & Hirschi, 2021).

Kemik iliğinden kaynaklı monosit türevli makrofajlar yüzeylerinde CD11b, MHC-II ve CCR2, yolk kesesi ya da fetal karaciğerden farklılaşan doku yerleşik makrofajlar ise F4/80 ve CX3CR1 gibi yüzey belirteçlerini yüksek derecede eksprese eder. Monosit türevli makrofajlar enfeksiyon sırasında patojenleri fagosite ederler ve proinflamatuar durumlarda sitokin salgılarlar. Doku yerleşik makrofajlar ise apoptotik hücreleri fagosite ederek doku hemostazını sürdürür ve dokunun yeniden şekillenmesinde görevlidir (Shapouri-Moghaddam ve ark., 2018; Sreejit ve ark., 2020).

Organ	Makrofaj alt tipi	Fonksiyon
	Mikroglia Perivasküler makrofaj Meningel makrofaj Koroid pleksus makrofaj	Bağışıklık gözetimi Fagositoz Nöromodülasyon Sinaptik budama
	Kupffer hücresi	Detoksifikasyon Bağışıklık gözetimi Demir geri dönüşümü Fagositoz Kolestrol geri dönüşümü Hepatosit metabolizması
	Kırmızı pulpa Marjinal zon makrofaj Marjinal metalofiller	Detoksifikasyon Bağışıklık gözetimi Demir geri dönüşümü DH'ye antijen sunumu
	Lamina propria makrofaj Muskularis bağırsak makrofaj	Bağışıklık gözetimi Düz kas kasılması Mukozal immünite Mikrobiyom etkileşimi Bağırsak antijen alımı Bağırsak hemostazı
	Alveolar makrofaj İnterstisyel makrofajlar	Bağışıklık gözetimi Zarar veren maddelerin uzaklaştırılması Alerjen ve toksik partiküllerin uzaklaştırılması
	Langerhans hücreler Dermal makrofaj	Yara onarımı Bağışıklık gözetimi
	Damar makrofajları	Arteriyel hemostazın sürdürülmesi
	Osteoklast	Kemik tamiri Kök hücre niş bakımı Nötrofil yapımı

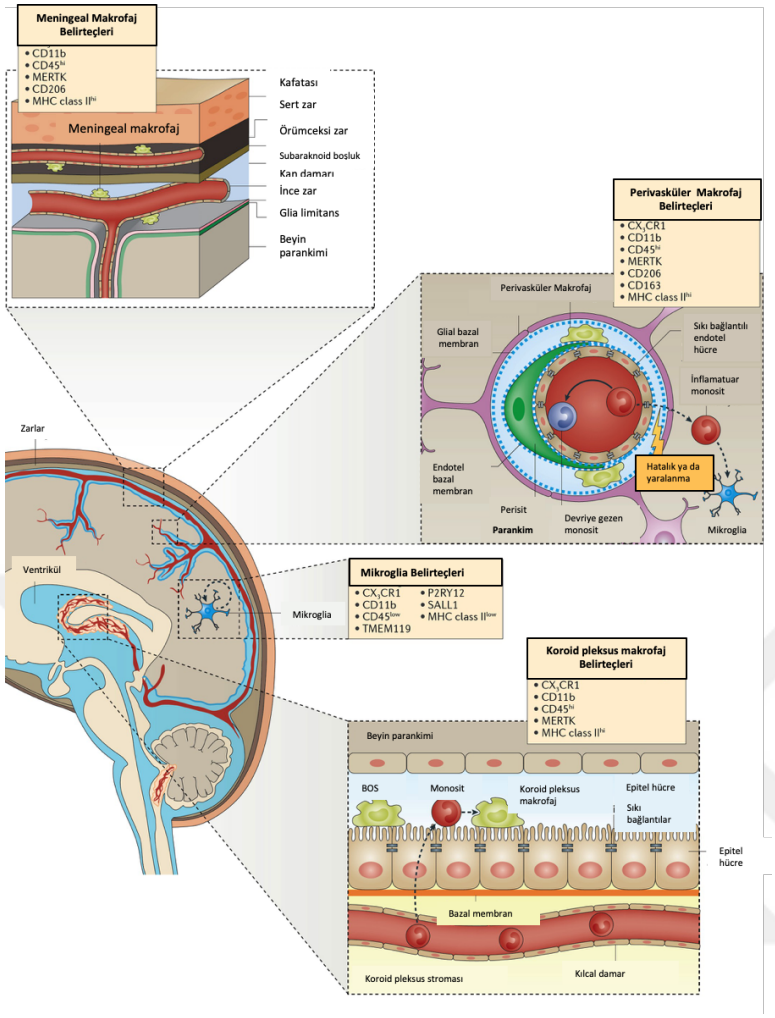
Şekil 15. Makrofajların dokuya göre isimlendirilmesi ve görevleri
Doku mikroçevresindeki bileşenler transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonunu tetikleyerek makrofaları bulundukları organa özgü işlevleri üstlenecek şekilde özelleştirir. Doku yerleşik makrofajların bulundukları mikroçevreye özgü kimliği için dokuya özgü birden fazla sinyal gereklidir.
(Sreejit ve ark., 2020) tarafından uyarlanmıştır.

2.12. Beyin ve Mikroglia

Beyin parankiminde bulunan oligodendrositler, nöronlar, glial hücreler ve mikroglialar ana hücre bileşenleridir. Beyin parankim bölgeleri; meningeal bariyer ve BBB ile dış ortamdan, dolaşımdaki kandan ve beyin omurilik sıvısından (*cerebrospinal fluid,* CSF'den) ayrılır. Patolojik durumlarda, nötrofiller veya monositler gibi dolaşımda bulunan miyeloid hücreler beyin parankimine sızabilir. İnfiltre olan monositler, makrofajlara veya mikroglia benzeri hücrelere farklılaşabilir (Lee ve ark., 2021).

Beyinde bulunan sıkı bağlantılarla karakterize kan beyin bariyeri varlığı, klasik lenfatik drenaj sisteminin olmaması nedeniyle uzun yıllar merkezi sinir sisteminin immün hücrelerden izole olduğu kabul görmüştür. Son yıllarda yapılan çalışmalarla CNS'de fonksiyonel lenfatik damarların olduğu ve CNS'yi içinde mikroglia, makrofajlar, astrositler ve DH gibi APC'lerin varlığı kanıtlanmıştır. Servikal lenf düğümlerinde biriken CNS antijenlerinin aktif T hücrelere sunumu yapılır. CNS'de bağışıklık yanıt diğer organlara göre farklılık gösterse de yetersiz değildir (Sampson ve ark., 2020).

Beyinde bulunan yerleşik makrofajlar parankimal ve parankimal olmayan şeklinde sınıflandırılarak beynin farklı bölümlerinde lokalizedir (Şekil 16). Parankimal makrofaj mikroglialar ve parankimal olmayan makrofajlar ise meningeal, perivasküler ve koroid pleksus makrofajları olarak sınıflandırılır (Lee ve ark., 2021).

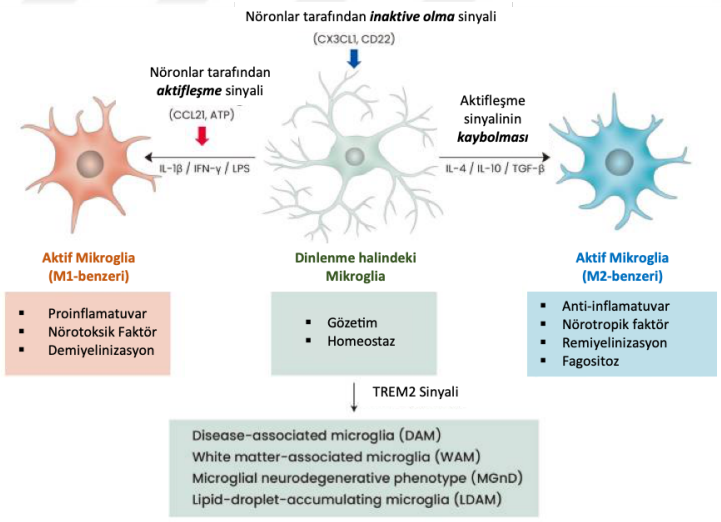


Şekil 16. Beyinde bulunan makrofajlar ve konumları.
Mikroglia hücreleri parankimde bulunan nöronlar, astrositler ve oligodendrositler ile etkileşime girebilen beyindeki tek makrofaj popülasyonudur. Tüm beyin makrofajları gen ekspresyonu ve fonksiyonel özellikleri açısından farklı nişlerde lokalizedir. Endotel hücreleri ve koroid pleksus epitel hücreleri arasındaki sıkı bağlantılar sırasıyla BBB ve CSF bariyerinin temel yapısını oluşturur (Li, & Barres, 2018) tarafından uyarlanmıştır.

Mikroglia, beyin parankimindeki en çok bulunan immün hücre popülasyonunu temsil ederken diğer hücre tipleri, beyin parankimi ile dolaşım arasındaki arayüzde lokalizedir (Lee ve ark., 2021). Beyindeki tüm hücrelerin %5-10'unu oluşturan mikroglialar yolk sac miyeloid progenitörlerinden kökenlenir ve erken embriyogenez sırasında CNS kolonize eden doğal bağışıklık hücreleridir (Prinz, & Priller, 2014). Mikrogliaların astrosit ve oligodendrositlerden önce gelişim göstermesi nörogenez, programlı hücre ölümü, sinapslarının ortadan kaldırılması ve yeniden şekillenmesi gibi CNS'deki gelişimsel süreçlere katkısı için olanak sağlar (Li, & Barres, 2018). Mikroglia hücreleri CNS'de en bol bulunan mononükleer fagositlerdir. Özelleşmiş

fonksiyonları ve özgün ontojeni ile karakterize olan mikroglialar periferik makrofajlardan farklı transkripsiyonel imzaya sahiptirler (Butovsky ve ark., 2014). Mikroglialar çeşitli sınırsız uzantılarıyla beyin parankimi ve omuriliği denetler, fagositik ve apoptatik kalıntıları uzaklaştırır, nöral düzenlenmeleri yapar ve inflamasyonu başlatmadan CNS homeostazını sağlar (Ginhoux ve ark., 2013; Nimmerjahn, Kirchhoff, & Helmchen, 2005).

Fizyolojik koşullarda mikroglialar dinlenme halindedir ve dallanmış bir morfolojiye sahiptir. CNS hemostazındaki herhangi bir bozukluk durumunda mikroglialar aktif hale gelir. Nöronlardan gelen sinyaller, mikroglia aktivasyonunun kontrolünü sağlar. CX3CL1, CD22, nörotransmiterler veya nötrofinler sağlıklı nöronlar tarafından üretilerek mikrogliaların dinlenme halinde kalmasını sağlarken, hasarlı nöronlarca üretilen CCL21, CCL10 veya adenozin trifosfat (*adenosine triphosphate*, ATP) molekülleri mikroglia aktivasyonunu hızla tetikler (Şekil 17). Mikroglia hücrelerinde M1-M2 polarizasyonu beyne özgü bölgesel farklılıklar ve kendine özgü patolojisi nedeniyle periferik makrofajlardan daha heterojen bir spektrum içerir (Lee ve ark., 2021).



Şekil 17. Mikrogliaların aktivasyonu ve fenotipi
CNS'de dinlenme halindeki mikroglialar PAMP'lar (LPS) veya DAMP'lar (ATP) tarafından M1 benzeri mikrogliaya aktive edilir. M1 benzeri mikroglia; ameboid morfolojiye, yüksek CD68 ekspresyonuna ve proinflamatuar fenotipe sahiptir. Ortamda anti-inflamatuar sinyallerin kaybolmasıyla, mikroglia'nın M2 benzeri fenotipe aktivasyonu gerçekleşir. (Lee ve ark., 2021) tarafından uyarlanmıştır.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Gereçler

3.1.1. Çalışmada Kullanılan Maddeler

Bu tez kapsamında kullanılan biyolojik malzemeler ve kimyasallar firmaları ile sıralanmıştır.

Fosfat tamponlanmış tuz çözeltisi (PBS) (EUROIMMUN, Almanya) ; 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); Percoll (Sigma Aldrich, ABD); Papain solüsyonu (Sigma Aldrich, ABD); Karboksifloresan Süksinimidil Ester (CFSE) (Biolegend, ABD); FACS Flow Cell Wash (BD, ABD); Tripsin EDTA (Gibco, Thermo Fisher Scientific, ABD); Propidyum İodür Çözeltisi (Biolegend, ABD); 7-AAD canlılık boyası (Beckman Coulter, ABD); Pe/Cyanine7 anti-mouse CD273 (B7-DC PD-L2) (klon: TY25) mAb (Biolegend, ABD); PerCP/Cyanine 5.5 anti mouse CD86 (klon: GL-1) mAb (Biolegend, ABD); APC anti mouse CD80 (klon: 16-10A1) mAb (Biolegend, ABD); Brillant Violet 421 anti-mouse F4/80 (klon:BM8) mAb (Biolegend, ABD); PE anti-mouse CD274 (B7-H1, PD-L1) (klon:MIH6) mAb (Biolegend, ABD)

3.1.2. Hazırlanan Tamponlar ve Çözeltiler

PBS Çözeltisi: Her 1000mL dH2O'ya 1 adet steril PBS eklenecek şekilde çözelti hazırlandı (1X). Sterilizasyonu otoklav ile sağlandı. +4 ºC'de muhafaza edildi.

%10 FBS RPMI 1640 Hücre Kültürü Ortamı: L-glutamin içeren RPMI 1640 üzerine son konsantrasyonu %10 v/v olacak şekilde FBS (ısı-inaktive), %1 v/v olacak şekilde penisilin/streptomisin eklendi ve +4°C'de saklandı.

%10 FBS DMEM Hücre Kültürü Ortamı: L-glutamin içeren DMEM üzerine son konsantrasyonu %10 v/v olacak şekilde FBS (ısı-inaktive), %1 v/v olacak şekilde penisilin/streptomisin eklendi ve +4°C'de saklandı.

%5 FBS DMEM Hücre Kültürü Ortamı: L-glutamin içeren DMEM üzerine son konsantrasyonu %5 v/v olacak şekilde FBS (ısı-inaktive), %1 v/v olacak şekilde penisilin/streptomisin eklendi ve +4°C'de saklandı.

%10 FBS DMEM F12 Hücre Kültürü Ortamı: L-glutamin içeren DMEM üzerine son konsantrasyonu %10 v/v olacak şekilde FBS (ısı-inaktive), %1 v/v olacak şekilde penisilin/streptomisin eklendi ve +4°C'de saklandı.

Karboksifloresan Süksinimidil Ester (CFSE) çözeltisi: CFSE tuzu (50µg) üzerine 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

3.2.1. Hücre Hatları

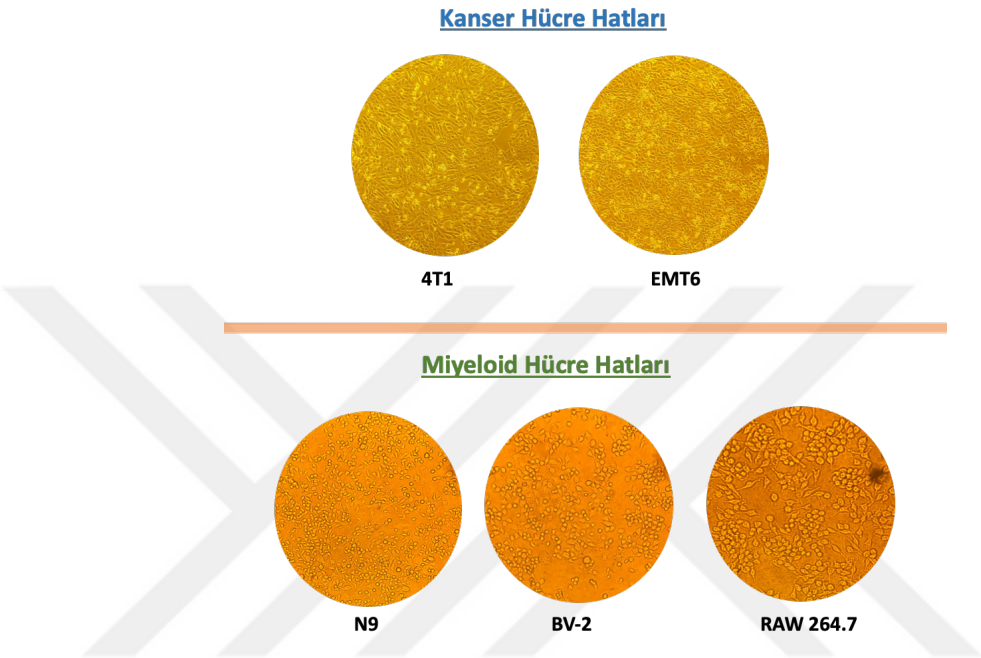
Tez çalışmasında fare meme kanseri hücre hatları 4T1 ve EMT6, fare mikroglia hücre hatları N9, BV-2 ve fare makrofaj hücre hattı Raw 264.7 kullanıldı. Hücre hatlarının özellikleri Tablo 2'de gösterildi.

Tablo 2. Deneylerde kullanılan hücre hatlarının özellikleri.

Hücre Hatları	**Raw 264.7**	**N9**	**BV-2**	**4T1**	**EMT6**
Organizma	Fare	Fare	Fare	Fare	Fare
Irk	Balb/c	CD1	C57BL/6	Balb/c	Balb/c
Hücre Tipi	Monosit/Makrofaj	Mikroglia	Mikroglia	Üçlü negatif meme kanseri hücresi	Üçlü negatif meme kanseri hücresi
Büyüme Özelliği	Adherant	Adherant	Adherant	Adherant	Adherant

3.2.1.1. Hücre Hatlarının Morfolojisi

Deneyde kullanılan kanser ve miyeloid hücrelerin ışık mikroskobundaki morfolojik görüntüleri Şekil 18'de gösterilmiştir.

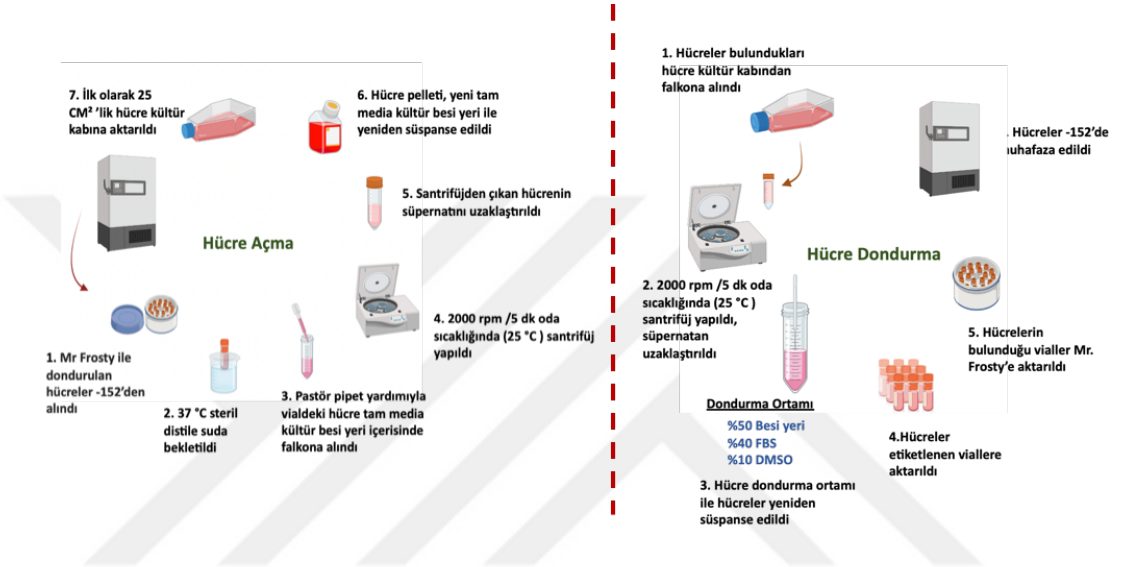


Şekil 18. Deneylerde kullanılan miyeloid ve kanser hücre hatlarının morfolojileri.

3.2.1.2. Hücre Hatlarının Kültürü

Raw 264.7, N9, BV-2, 4T1 ve EMT6 hücreleri -152°C'den alınarak, 37°C'ye önceden ısıtılmış su banyosunda bulunan içi steril dH2O ile dolu behere alındı. Tam çözünmeden hücrelerin bulunduğu vialler alkollenerek laminer akım kabinine alındı, üzerlerine önceden 37°C'ye ısıtılmış tam media kültür ortamı pastör pipeti ile eklenerek hücrelerin köpürtülmeden çözünmesi sağlandı. Hücreler hızlı bir şekilde donduruldukları viallerden 50 mL'lik tüplere alınarak santrifüj edildi ve hızlıca üst kısım (süpernatan) uzaklaştırıldı. Yeni tam hücre kültür ortamında hücreler pastör pipet yardımıyla yeniden süspanse edildi. Hücreler öncelikle 25 cm2'lik hücre kültür kabına aktarıldı, kültür kabını doldurdukları zaman taze besi yeri ile 75 cm2'lik kültür kaplarına alındı ve tam hücre kültür ortamında büyütüldü. Gün gün hücrelerin morfolojileri ve yoğunlukları ışık mikroskobu ile takip edildi. Hücreler istenilen

yoğunluğa ulaştığında (~1x10^6 hücre/mL) pasajlanarak ilgili deneylerde kullanıldı. Pasajı ilerlemeden açılan hücreler dondurulurak stoklandı. Pasajlama haftada üç kez gerçekleştirildi ve hücre kültürünün devamlılığı sağlandı. Hücrelerin pasaj sayısı 10 defadan fazla devam ettirilmedi ve pasajı ilerleyen hücreler atılarak yeni hücreler açıldı. Hücreler 37°C'de, nemli ve %5 CO2 içeren inkübatörde çoğalmaları gözlendi. Hücre açma ve dondurma protokolleri şematik olarak gösterildi (Şekil 19).



Şekil 19. Hücre hatlarının açılma ve dondurulma süreci (biorender.com kullanılarak hazırlanmıştır).

3.2.2. Makrofaj/Mikroglia Hücrelerinin Bazal Fenotip Karakterizasyonu

Raw 264.7, N9 ve BV-2 hücrelerinin morfolojileri ışık mikroskobu ile kontrol edilerek pasajlanacak hale geldiğinde hücreler bulundukları kaplardan kaldırılarak akım sitometri tüplerine toplandı. 1'er kez PBS (1X) ile yıkması yapılan hücreler 100 uL serumsuz besi yerinde yeniden süspanse edildi ve hücrelerin bulunduğu tüplere anti-mouse F480, CD80, CD86, PDL-1 ve PDL-2 antikorları (0,2 mg/mL) 1'er uL eklenerek belirtilen belirteçlerinin analizi akım sitometri ile yapıldı. Tüpler vortekslenerek oda sıcaklığında (25 °C) ve karanlıkta inkübe edildi. Antikorlar ile işaretlenen hücreler inkübasyon süresinin sonunda PBS (1X) ile yıkanarak 100 uL'de serumsuz besi yeri ile yeniden süspanse edildi. Canlılık analizi için ilgili antikorlar ile işaretli hücrelerin olduğu tüplere 1 uL Propidium İyodür (propidium iodide, PI) veya 7-amino-aktinomisin D (7-amino-actinomycin D, 7AAD) eklenerek 10 dk oda sıcaklığında (25 °C) ve karanlıkta inkübe edildi. Hücreler akım sitometri cihazında

değerlendirildi. Tek tek düşen canlı hücreler kapılandı. Bunun için forward scatter (FSC)-A ve FSC-H grafiğinden diagonal alanda saçılım gösteren hücreler analiz edildi (doublet discrimination). Bu hücrelerden granülarite (side scatter-area, SSC-A) ve boyutları (FSC-A) göz önünde bulundurularak yeni bir grafik daha çizildi ardından PI veya 7AAD negatif hücreler kapılanarak antikorların konjuge edildiği renkleri gösteren histogram veya nokta saçılım grafikleri çizildi. İlgili canlı hücrelerin yüzdesi ve gerektiğinde ortalama/ortanca floresan yoğunlukları (mean/median fluorescence intensity, MFI) hesaplandı (Şekil 33).

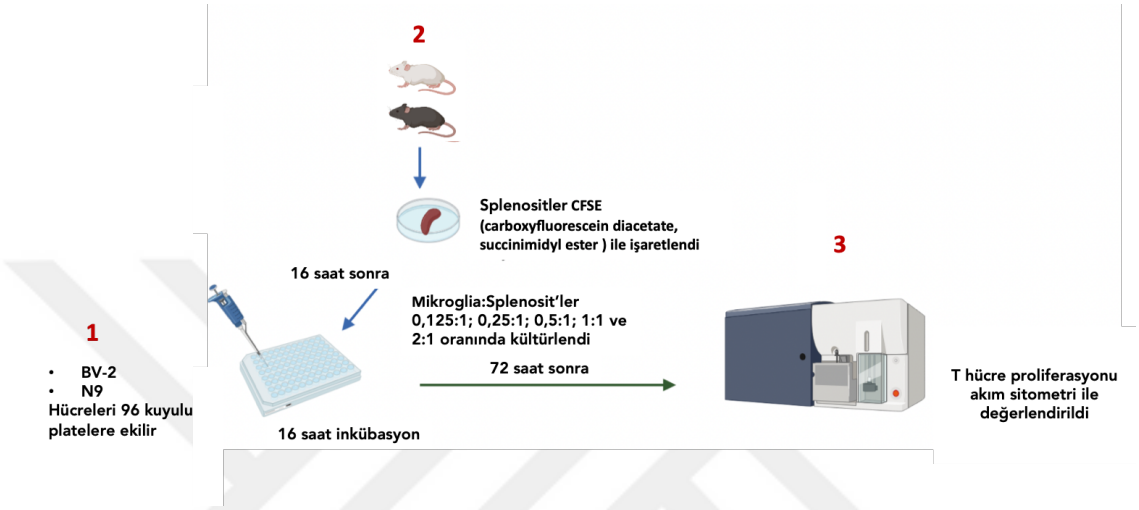
3.2.3. Ko-kültür Deneyleri

Mikroglia/makrofaj ve T hücre etkileşiminin meme kanseri beyin metastazı üzerine olan etkisini yorumlayabilmek için farklı ko-kültür stratejileri uygulandı.

3.2.3.1. CFSE ile Proliferasyon Analizi

Farelerden izole edilen splenosit sayıları sabit tutularak artan oranda mikroglia hücreleri (N9, BV-2, RAW 264.7) ile birlikte kültürlenen T hücrelerin proliferasyonu Karboksi floresan süksinimidil ester (Carboxyfluorescein succinimidyl ester, CFSE) yöntemi ile akım sitometride değerlendirilmiştir Eter ile sakrifikasyon sonrasında ilgili hücre hatlarının köken aldığı fare cinsleri alkol ile steril edilerek kabine alındı. Sadece steril alanda kullanılan ve steril edilmiş cerrahi setler yardımıyla fare dalakları steril cerrahi aletler yardımıyla çıkarılarak hücreler 70 µm meshten süzülerek geçirildi. 1.077g/mL ficoll ile splenositler elde edildi. Splenosit hücreleri 1x106 hücre/1mL olacak şekilde 50 mL'lik tüplerde serumsuz RPMI1640 eklenerek süspanse edildi. Bu aşamadan sonraki işaretleme adımları karanlıkta gerçekletirildi. 5 µM (1 µl CFSE/mL) final konsantrasyon olacak şekilde CFSE eklendi. Tüpte karışması sağlandıktan sonra (hahfifçe el ile pıt pıt yapılarak), su banyosunda inkübasyona (15 dk, 37°C) bırakıldı. Yıkama işlemi için 10-15 mL soğuk tam RPMI 1640 hücre kültürü ortamı eklendi ve beş dakika boyunca buz içerisinde inkübe edildi. Hücrelerin 2 kez tam RPMI 1640 hücre kültürü ortamı içerisinde santrifüj (1800 rpm, 5 dk, 4°C) ile yıkaması yapıldı. Süpernatan atıldıktan sonra kuyu başına 2x105 hücre/100uL olacak şekilde tam RPMI

1640 hücre kültürü ortamı eklenerek hücreler yeniden süspanse edildi ve 96 kuyulu plaklara ekimi yapıldı. 72 saatlik inkübasyon süresinin sonunda mikroglia ve makrofaj hücrelerinin splenositlerin çoğalması üzerine olan etkileri CFSE boyasının seyrelme düzeyine göre değerlendirildi. İlgili analizler FACS Aria III akım sitometri (BD) cihazında değerlendirildi (Şekil 20).



Şekil 20. Mikroglia ve T hücre etkileşimi sonucunda CFSE işaretli T hücrelerin proliferasyonu akım sitometri ile değerlendirilmiştir.

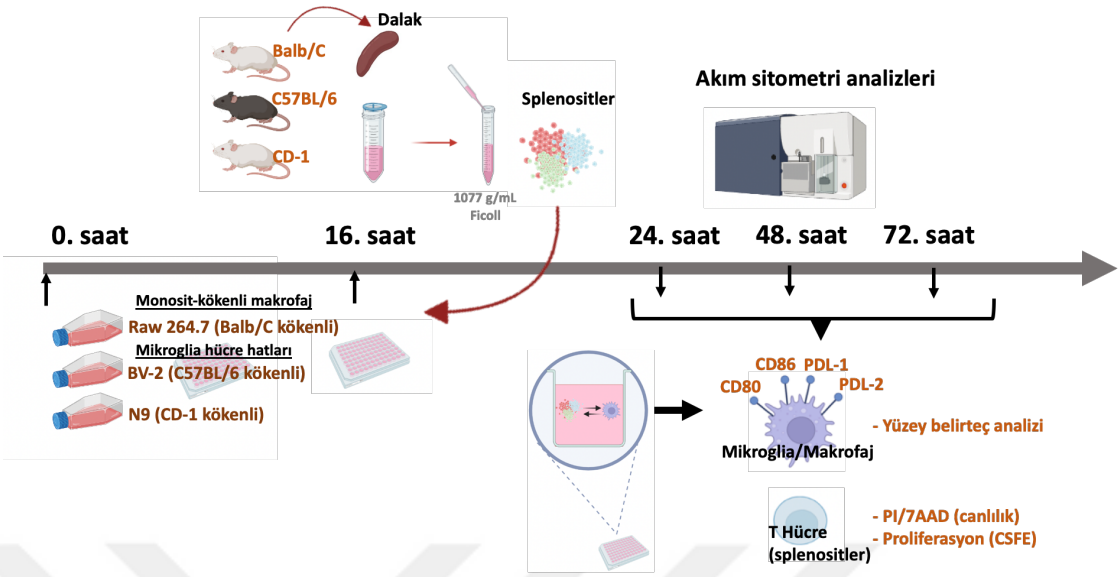
3.2.3.2. Bazalda Mikroglia ve T Hücre Etkileşimi Sonucunda Ko-stimülatör Belirteçlerin Analizi

Miyeloid hücrelerin 16 saat yapışması beklendikten sonra üzerlerine köken aldıkları fareler dalaklarından 3.2.3.1'de anlatıldığı şekilde izole edilen splenositler eklendi. Mikroglia-T hücre etkileşimi sonrasında 24., 48., 72. saatlerde canlılıkları mikroglialarının yüzeyindek ko-stimülatör belirteçler olan CD80, CD86, PDL-1 ve PDL-2'nin analizi akım sitometri yöntemi ile değerlendirildi (Şekil 21).

Deney Grupları:

-Raw 264.7+ Balb/c kökenli splenosit
-N9 + CD1 kökenli splenosit
-BV-2 + C57BL6 kökenli splenosit

+/- anti-fare CD3 antikoru



Şekil 21. Mikroglia/makrofaj ve T hücre etkileşimi sonucunda mikroglia/makrofaj CD80, CD86, PDL-1 ve PDL-2 hücre yüzey belirteçlerinin 24., 48., 72. saatlerde değerlendirilmesi (biorender.com kullanılarak hazırlanmıştır).

3.2.3.3. 4T1 Hücrelerinin Salgıladığı Faktörler ile Mikroglia-T Hücre Etkileşiminin Akım Sitometri Yöntemiyle Değerlendirilmesi

96 kuyulu plaklara miyeloid (mikroglia/makrofaj) hücrelerinin ekimi yapıldı. Miyeloid hücrelerin 16 saat yapışması beklendikten sonra üzerlerine köken aldıkları farelerin splenositleri 3.2.3.1'de anlatıldığı gibi izole edildi ve 4T1 süpernatanı ile yeniden süspanse edilerek kuyulara eklendi. Süpernatanı elde edilecek hücreler 1.000.000/1mL yoğunlukta olacak şekilde hücre kültür kaplarına ekildi ve 16 saat boyunca 37°C, %5 CO2 içeren inkübatörde inkübe edildi. 16. saatin sonunda yapışan ve faktörlerini salgılayan hücrelerin süpernatanı tüplere alınarak 2.000 rpm/5 dk soğukta (4°C) santrifüj edildi. Pellet dağıtılmadan üst kısım pastör pipet yardımıyla toplandı ve yeni tüplere alınarak -20°C'de muhafaza edildi. Toplanan süpernatanlar birden fazla don-çöz yapılmadı. Toplanan ve stok yapılan bu hücre süpernatanları "şartlı besi yeri" (condition medium, CM) olarak isimlendirildi. Kanser hücrelerinin salgıladığı faktörlerle kültürlenen Mikroglia-T hücre etkileşimi sonrasında 24., 48., 72. saatlerde canlılıkları mikrogliaların yüzeyindek ko-stimülatör belirteçler olan CD80,

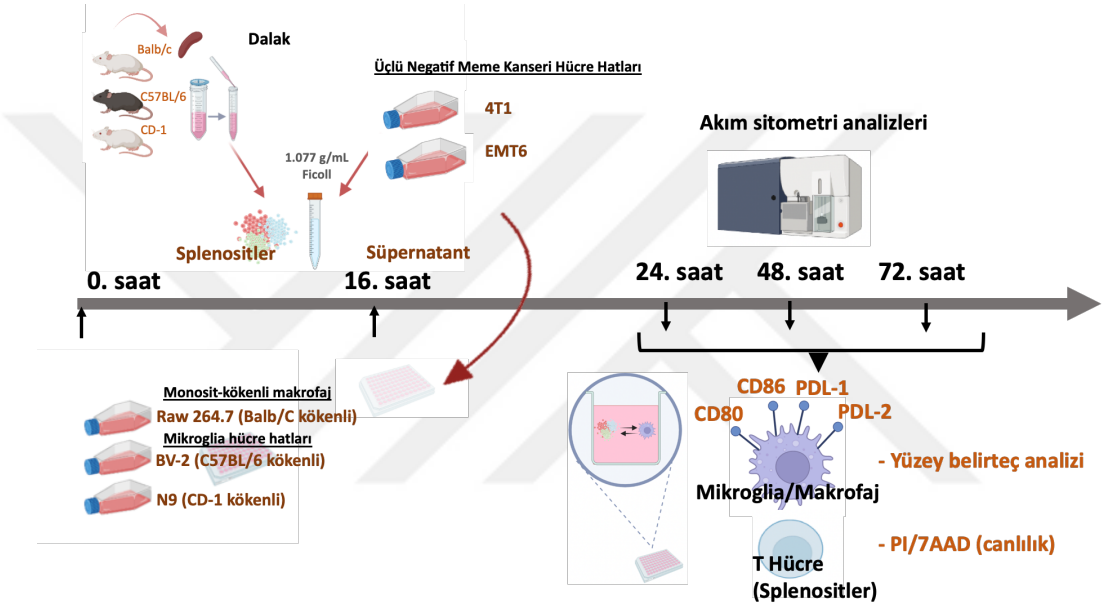
CD86, PDL-1 ve PDL-2'nin analizi akım sitometri yöntemi ile değerlendirildi (Şekil 22).

Deney Grupları

-Raw 264.7+ Balb/c kökenli splenosit
-N9 + CD1 kökenli splenosit
-BV-2 + C57BL6 kökenli splenosit

+/- 4T1 CM
+/- EMT6 CM

+/- anti-fare CD3 antikoru

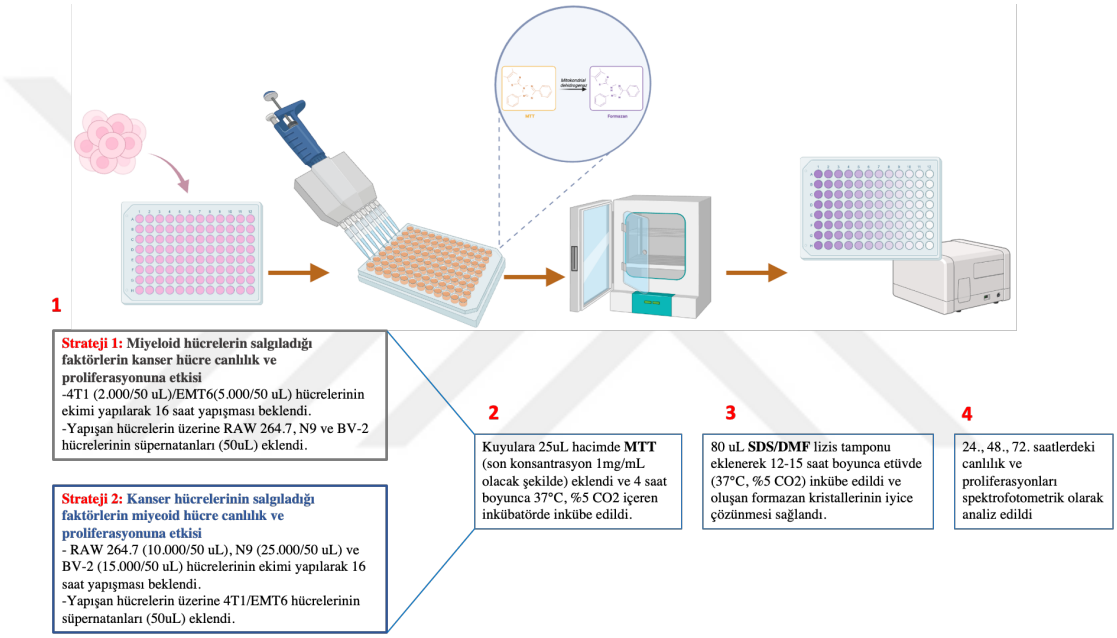


Şekil 22. Kanser hücrelerinin salgıladığı faktörler ile kültürlenen mikroglia/makrofaj ve T hücre etkileşimi sonucunda mikroglia/makrofaj CD80, CD86, PDL-1 ve PDL-2 hücre yüzey belirteçlerinin 24., 48., 72. saatlerde değerlendirilmesi (biorender.com kullanılarak hazırlanmıştır).

3.2.3.4. MTT Medhodu ile Canlılık ve Proliferasyon Analizi

Kanser hücreleri ve miyeloid (mikroglia/makrofaj) hücrelerin beraber etkileşimi sonucunda meydana gelen canlılık ve proliferasyonu analiz etmek için 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) yöntemi kullanıldı. Miyeloid hücrelerin salgıladığı faktörlerin kanser hücreleri üzerindeki ve kanser hücrelerinin salgıladığı faktörlerin miyeloid hücreleri üzerindeki proliferasyon ve canlılık etkisi olmak üzere iki MTT stratejisi uygulandı. 96 kuyulu plaklara miyeloid ve kanser hücreleri ekildi. 16 saat yapışmasına izin verildikten sonra üzerlerine miyeloid ve kanser hücrelerinden toplanan CM'ler eklendi. Hücrelerin

salgıladığı faktörlerle birlikte hücreler 24 saat 48 saat ve 72 saat kültürlendi. Kuyulara 25uL (1mg/mL) MTT eklendi. Sarı renkli bir tetrazol olan MTT, canlı hücrelerde mor formazana indirgenir. Oluşan ve suda çözünmeyen formazan kristalleri oluştuktan 4 saat sonra 80uL lizis tamponu SDS/DMF gibi bir çözücü eklenerek kristallerin çözünmesi sağlandı. 12-15 saat boyunca etüvde inkübasyonunun ardından MTT'den türetilen formazanın 570 nm'de optik yoğunluğu (OD) spektrofotometrik olarak değerlendirildi. MTT basamakları ve deneyde kullanılan miyeloid/kanser hücre sayıları Şekil 23'te gösterilmiştir.



Şekil 23. Kanser hücreleri ve miyeloid hücrelerin canlılık ve proliferasyon analizinin MTT metodu ile değerlendirilmesi (biorender.com kullanılarak hazırlanmıştır).

3.2.4. İnvazyon Testi İle EMG/MEG Değişimlerinin İncelenmesi

Scratch assay metoduyla miyeloid hücrelerin salgıladığı faktörlerin kanser hücre invazyonu üzerine etkisi değerlendirildi. EMT6 hücreleri 1mL'de 300.000 hücre olacak şekilde 6-kuyulu plakalara ekildi, (çoğalma hızları göz önüne alınarak hücre sayısı ön deneyler ile belirlenmiştir) 16 saat boyunca adherent faza geçmelerine ve bulukları yüzeyi doldurmalarına izin verildi. Üzerlerine 1.000.000/1mL'de olacak şekilde toplanan miyeloid hücre (Raw 264.7, N9, BV-2) süpernatanları hücrelerin üzerlerine 1 mL eklendi. İnkübasyon sonunda kuyular tam ortadan çizilerek EVOS'ta

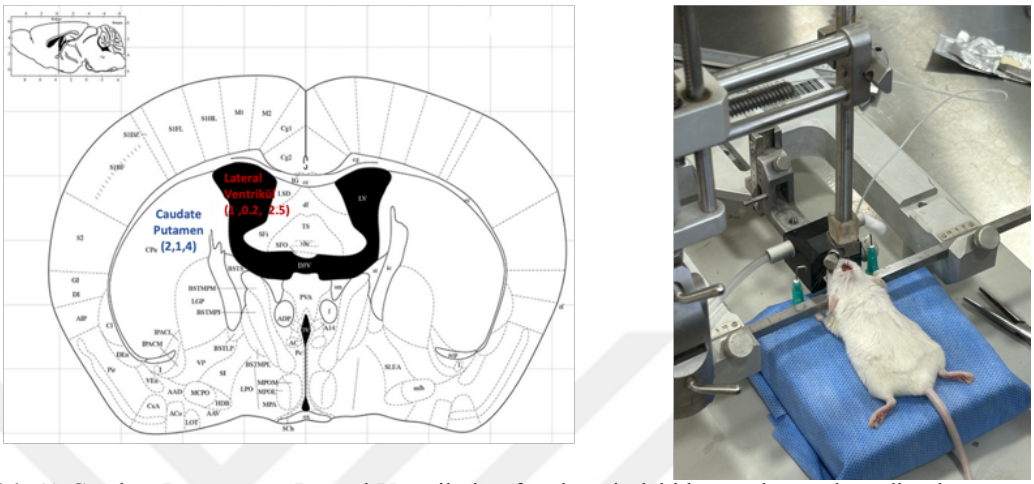
fotoğraflandı. Yaralanan alanın ne kadar kapandığını ölçmek için 0., 24., 48., 72. saatlerde aynı alan baz alınarak görüntülendi. İlgili fotoğraflar Image J programında analiz edilerek yara kapanma hızı ölçüldü. Image J ile hücreler ve hücrenin bulunmadığı aradaki boşluklar arasındaki kontrast farkı bandfass filter ayarı ve ardından treshold ile sağlandı. Bu şekilde hücrenin olmadığı alanlar beyaz, hücrenin bulunduğu yerler siyah şekilde oluşturularak kontrast farkına göre yara kapanmaları Image J ile görüntülendi.

3.2.5. Caudate Putamen veya Lateral Ventrikül Stereotaksik Enjeksiyonların Karşılaştırılması ve Karakterizasyonu

Stereotaksi yöntemiyle BALB/c (6-8 haftalık) farelerin farklı beyin bölgelerine floresan işaretli işaretli 4T1 hücreleri enjekte edildi (Şekil 26). Fare beyin atlası sitesinden yararlanılarak beyin bölgelerinin koordinatları doğrulandı. Tez kapsamında caudate putamen ve lateral ventriküle 4T1 hücresi enjeksiyonu için FITC-kanalda ışıma verebilen bir floresan molekül olan CFSE'den yararlanıldı. CFSE işaretli 4T1 hücresinin 500.000hücre /10uL ve 1.500.000 hücre/ 20uL olarak farklı oranlarda caudate putamen ve ve lateral ventriküle enjeksiyonu yapıldı. CFSE ile 4T1 hücreleri işaretlenirken yöntem kısmındaki protokol takip edildi (3.2.3.1.). CFSE, hücreler prolifera oldukça floresan yoğunluğu azalan bir molekül olduğu için süre mümkün olduğu kısa tutuldu ve enjeksiyondan 48 saat sonrasında hayvanlar sakrifiye edildi ve 4T1'in tutulumunu incelemek için beyin bölgeleri hem enzimatik işlemler ile hücrelerine ayrıştırıldı hem de beyin matrixi yardımıyla 1mm'lik ince sagital kesitler alınarak floresan mikroskopta (Evos) hücre infitrasyon bölgeleri değerlendirildi. Lateral ventrikül'e komşu beyin bölgeleri olan beyincik, thalamus, orta beyin ve kortex ayrı ayrı enzimatik işlemlere maruz bırakılarak 4T1'in bölgelere infiltarsyonu kıyaslandı (Şekil 27, total beyin hücresi eldesi). Akım sitometri ile tek tek düşen canlı hücreler kapılandı. Bunun için forward scatter (FSC)-A ve FSC-H grafiğinden diagonal alanda saçılım gösteren hücreler analiz edildi (doublet discrimination). Bu hücrelerden granülarite (side scatter-area, SSC-A) ve boyutları (FSC-A) göz önünde bulundurularak yeni bir grafik daha çizildi ve ilgilenilen hücreler yeniden kapılandı. Bu genel kapılama stratejisinin ardından CFSE'nin konjuge olduğu rengi gösteren

histogram veya nokta saçılım grafikleri çizildi, ilgili canlı hücrelerin yüzdesi ve gerektiğinde ortalama/ortanca floresan yoğunlukları (mean/median fluorescence intensity, MFI) hesaplandı.

A) **B)**

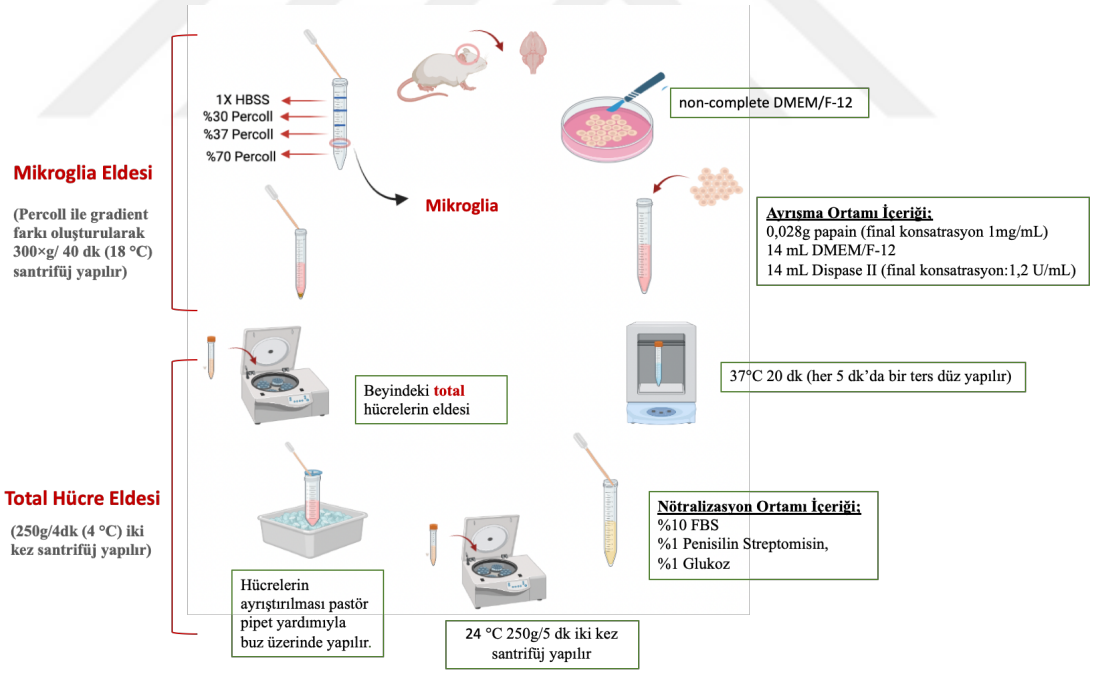


Şekil 24. A) Caudate Putamen ve Lateral Ventrikülün fare beynindeki konumları ve koordinatları (http://labs.gaidi.ca/mouse-brain-atlas/ sitesinden yararlanılmıştır)
B) Stereotaksik enjeksiyon uygulaması

3.2.6. Balb/c Farelerden Mikroglia İzolasyonu

Balb/c taze perfüze edilmiş yetişkin beyni 15 T neşter bıçağı kullanılarak 2 mL serumsuz ortamda petri içinde mümkün olduğunca ince bir şekilde kıyıldı. Ezilen beyin 3 mL ayrışma ortamı içeren 15 mL tüpe aktarıldı. Ayrışma ortamı içeriği; 0,028g papain(final konsatrasyon 1mg/mL) +1 4 mL DMEM/F-12 + 14 mL DispaseII(final konsatrasyon:1,2 U/mL). 37°C 95 rpm ’de 20 dk shakerda enzimin etkin aktivitesi sağlanarak beyin kimyasal olarak parçalandı. 5 mL nötralizasyon ortamı ekleyerek ayrışma ortamındaki enzimler nötralize edildi. Nötralizasyon ortamı içeriği; %10 FBS (Fetal Bowine Serum), %1 Penisilin Streptomisin, %1 Glukoz’dur. Sonrasında oda sıcaklığında 250×g'de 5 dakika santrifüj edilerek süpernatan uzaklaştırıldı. Sonraki aşamalar buz akülerinin üzerinde yapıldı. 3 mL DMEM/F12 eklenerek büyük beyin doku kümeleri parçalanana kadar pastör pipetiyle al ver yapıldı. Büyük kümeler dibe çökene kadar 1 dakika bekletilerek, iyice ayrışan üst kısım ayrı bir 15 mL’lik tüpe aktarıldı. Büyük doku kümelerinin bulunduğu alt faz pastör pipet yardımıyla iyice al-ver yapıldı ve diğer tüpe aktarıldı. 40 µM mesh ile hücreler süzüldü ve 4 dakika

250g'de santrifüj edildi. Sonrasında 5 mL DMEM/F-12 ile yeniden süspanse edilerek aynı santrifüj işlemi tekrarlandı. Percoll gradiyentiyle miylein kılıf uzaklaştırılarak mikrogliaların izolasyonu sağlandır. HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution) ile percoll %30, %37 ve %70'lik oranlarda seyreltildi. 4 mL %70'lk percoll 15 mL'lik tüpün en altına pipetlendi ve ardından 4 mL %37'lik percoll ile hücreler yeniden süspanse edilerek dikkatlice üzerine pipetlendi. Üzerine 4 mL %30'luk percoll eklendi. Son olarak 15 mL'lik tüpün en üstüne 2 mL HBSS pipetlendi. 40 dakika 300×g'de (18 °C) santrifüj yapıldı. Pastör pipet yardımıyla mikrogliaların bulunduğu %70-37 arasındaki hücre fazının 2.0-2.5 mL'si nazikçe toplanarak yeni bir 15 mL'lik tüpe aktarıldı. 4 °C'de 500 x g'de 7 dakika santrifüj edildi. %10 FBS DMEM/F-12 ile yeniden süspanse edildi. Percoll gradiyenti oluşturularak elde edilen mikroglia hücreleri toma lamı ile ışık mikroskobunda sayılarak deneyde kullanıldı. Total beyin hücresi izolasyonu için percoll ile gradiyent oluşturulmadan aynı protokol uygulandı. (Burns, Ransohoff, & Mingueneau, 2021; Lee, &Tansey, 2013; Milner ve ark., 2022) (Şekil 25).



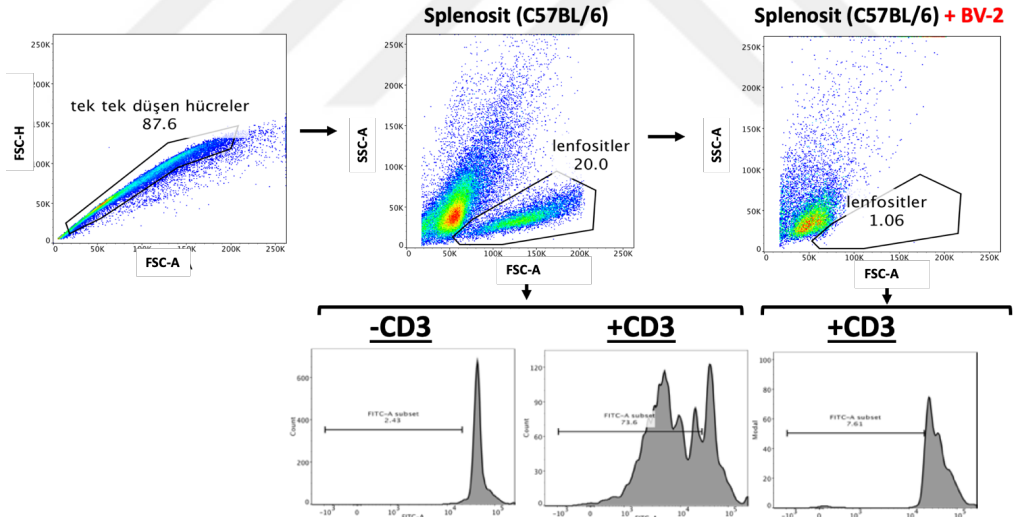
Şekil 25. Beyinden total hücre ve mikroglia hücrelerinin izolasyonun şematik gösterimi (biorender.com kullanılarak hazırlanmıştır).

4. BULGULAR

4.1. Mikroglia/Makrofaj Hücreleri ile T hücre Etkileşimi Sonucunda Hücre Gruplarındaki Proliferasyon ve Canlılık Analizi

N9 ve BV-2 mikroglia hücreleri ve Raw 264.7 monosit kökenli makrofaj hücresinin T hücreler ile kültürlenmesi sonucunda hücre gruplarının proliferasyon ve canlılığının değerlendirilmesi akım sitomeri yöntemiyle yapılmıştır. Bu değerlendirme kapsamında proliferasyon için CFSE metodu, hücre gruplarının gün gün canlılık analizi için PI boyama metodu uygulanmıştır.

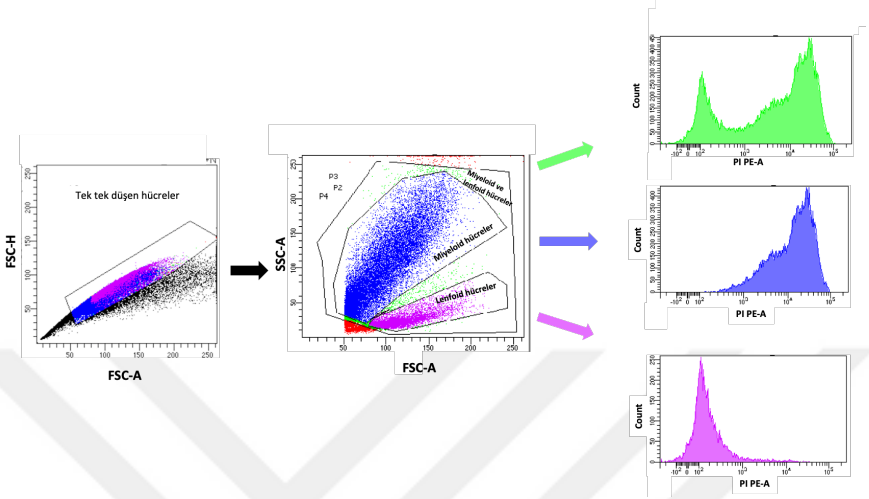
4.1.1. BV-2 ve Raw 264.7 Hücre Hatlarının Sırasıyla Köken Aldıkları C57BL/6 ve BALB/c Kaynaklı Splenositler ile Kültürü Sonucunda T Hücre Proliferasyonunun CFSE ile Değerlendirilmesi



Şekil 26. BV-2 ve köken aldığı C57BL/6 farelerinin splenositlerinin ko-kültürü sonucunda T hücrelerin CFSE ile proliferasyon analizi kapılama stratejisi ve sonuçları.

T hücre sabit tutularak artan oranlarda mikrogliarın ko-kültürü yapılmıştır. CFSE yöntemi kullanılarak T hücre proliferasyonları akım sitometride değerlendirilmiştir. 72 saatlik inkübasyon sonrasında yalnızca splenositlerin proliferasyonu gözlenirken, mikroglialar ile birlikte kültürlenen T hücrelerin proliferasyonu uyarılamadı (Şekil 26).

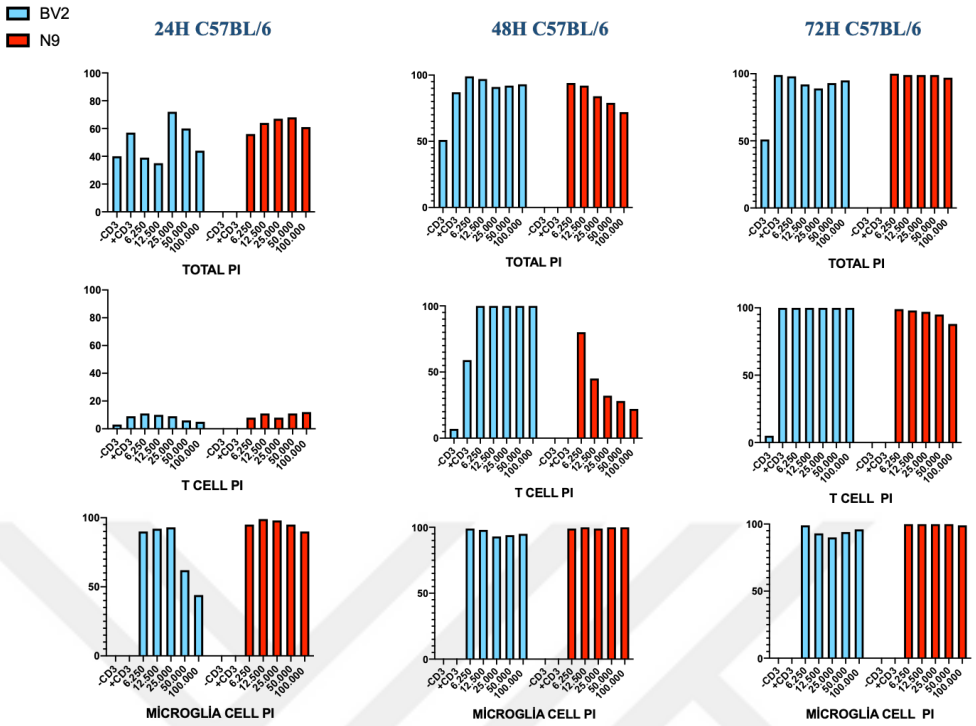
4.1.2. N9 ve BV-2 Mikroglia Hücre Hatlarının Balb/c, C57BL/6 ve CD1 Kaynaklı Splenositler ile Kültürü Sonucunda Hücre Gruplarının PI Boyama ile Canlılık Analizinin Değerlendirilmesi



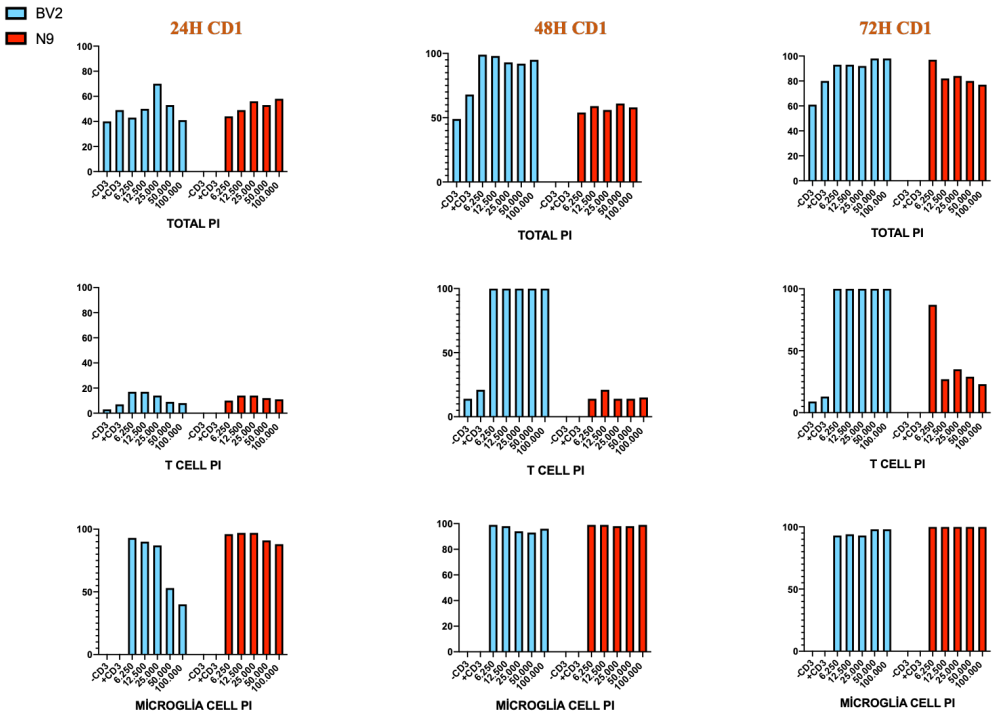
Şekil 27. Mikroglia hücre hatlarının splenositler ile ko-kültüründeki PI boyama kapılama stratejisi.



Şekil 28. BV-2 ve N9 hücreleri ile Balb/c farelerden izole edilen splenositlerin ko-kültürü sonucunda T hücrelerin PI boyamasıyla canlılık analizi.



Şekil 29. C57BL/6 farelerden izole edilen splenositlerin aynı kökenli BV-2 ve farklı kökenli N9 hücreleriyle ko-kültürü sonucunda T hücrelerin PI boyamasıyla canlılık analizi.



Şekil 30. CD1 farelerden izole edilen splenositlerin aynı kökenli N9 ve farklı kökenli BV-2 hücreleriyle ko-kültürü sonucunda T hücrelerin PI boyamasıyla canlılık analizi.

N9 ve BV-2 mikrogla hücreleriyle CD1 ve C57BL/6 farelerinin splenositlerinin ko-kültürü sonucunda her hücre grubu için PI ile canlılık analizi yapılmıştır. 24., 48. ve 72. hücre grupları ayrı ayrı kapılanarak total, T hücre ve mikroglia/makrofaj hücrelerinin canlılıkları akım sitometri ile analiz edildi. Hücre hatları ve hücre hatlarının köken aldığı fare splenositlerinin ko-kültürüne ek olarak, allojenik reaksiyonları da değerlendirmek için mikroglia hücre hatlarının farklı fare ırkından kökenlenen splenosit hücreleriyle de ko-kültürü yapıldı.

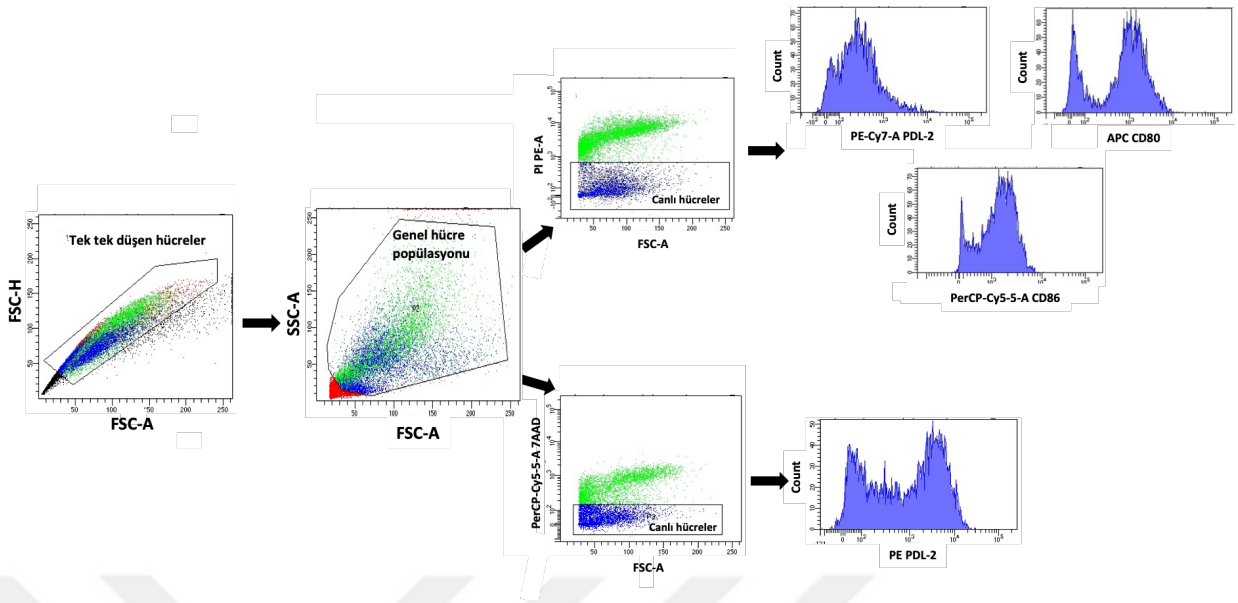
BALB/c fare splenositleriyle farklı fare ırkından köken alan BV-2 hücrelerinin ko-kültürü ile 24. saat itibariyle BV-2 hücrelerinin, 48. saat itibariyle T hücrelerin seçilimi bulgulandı. Balb/c fare splenositleriyle farklı fare ırkından köken alan N9 hücrelerinin ko-kültürü ile 24. saat itibariyle N9 hücrelerinin seçilime uğradığı, T hücrelerin ise 72. saatte tam seçilimi bulgulandı (Şekil 28).

C57BL/6 fare splenositleriyle aynı fare ırkından kökenlenen BV-2 hücrelerinin ko-kültürü ile 24. saat itibariyle BV-2 hücrelerinin seçilime uğradığı, T hücrelerin ise 48. saat itibariyle seçilimi bulgulandı (Şekil 29).

CD1 fare splenositleriyle ve aynı fare ırkından köken alan N9 hücrelerinin ko-kültürü ile 24. saat itibariyle N9 hücrelerinin seçilime uğradığı, T hücreler ise daha az bir seçilim göstererek bir kısmının canlılığını sürdürdüğü bulgulandı. CD-1 splenositleri ve N9 hücrelerinin ortak kültüründe total seçilimin büyük çoğunluğunu N9 hücreleri oluşturmuştur. CD1 fare splenositleriyle farklı fare ırkından kökenlenen BV-2 hücrelerinin ko-kültürü ile BV-2 hücreleri 24. saat itibariyle, T hücreleri ise 48. saat itibari ile seçilime uğradı. (Şekil 30).

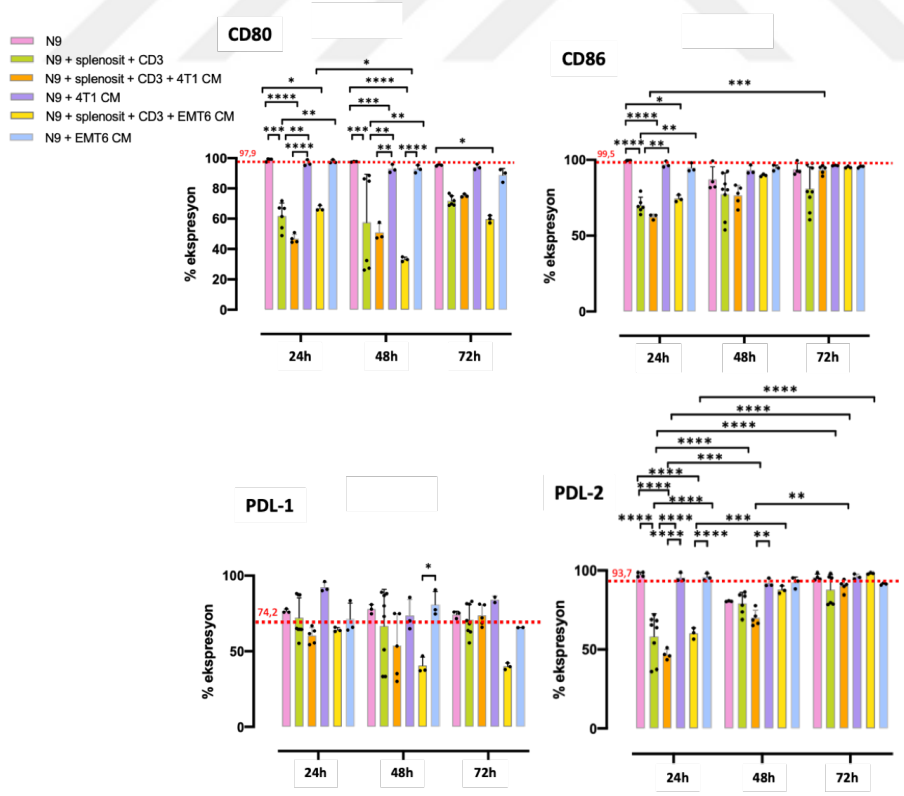
4.2. Mikroglia/Makrofaj ve T Hücre Ko-kültürü Sonrasında Ko-stimülatör Belirteçlerin Analizi

Bazal seviyede ve 4T1 ve EMT6 hücrelerinin salgıladığı koşullarda kültürlenen makrofaj/mikroglia ve T hücre etkileşiminin oluşturduğu yanıtlarda ko-stimülasyonun rolunü değerlendirmek için akım sitometri ile Şekil 31'de gösterildiği gibi bir kapılama stratejisi uygulandı. Yaptığımz çalışma kapsamında CD80, CD86 PDL-1 ve PDL-2 ko-stimülasyon moleküllerinin ifadesi değerlendirildi.



Şekil 31. Mikroglia ve makrofaj hücrelerinin T hücre ko-kültürü sonucunda, ko-stimültaör belirteçlerin değerlendirilmesinde kullanılan kapılama stratejisi.

4.2.1. N9 Mikroglia Hücreleri ile CD1 Fare Splenositlerinin Kültürü Sonrasında Ko-stimülatör Belirteçlerin Analizi



Şekil 32. N9 mikroglia hücreleriyle CD1 farelerinden izole edilen ve CD3 ile ilk uyarımı yapılmış splenositlerin ko-kültürü sonrasında ko-stimülatör moleküllerin %ekspresyonları. p<0,05*; p<0,01**; p<0,001***; p<0,0001****

N9 hücreleriyle T hücre ilk uyarımının anti- fare CD3 ile dışarıdan yapılan ekspresyon sonuçları gösterilmiştir (Şekil 32).

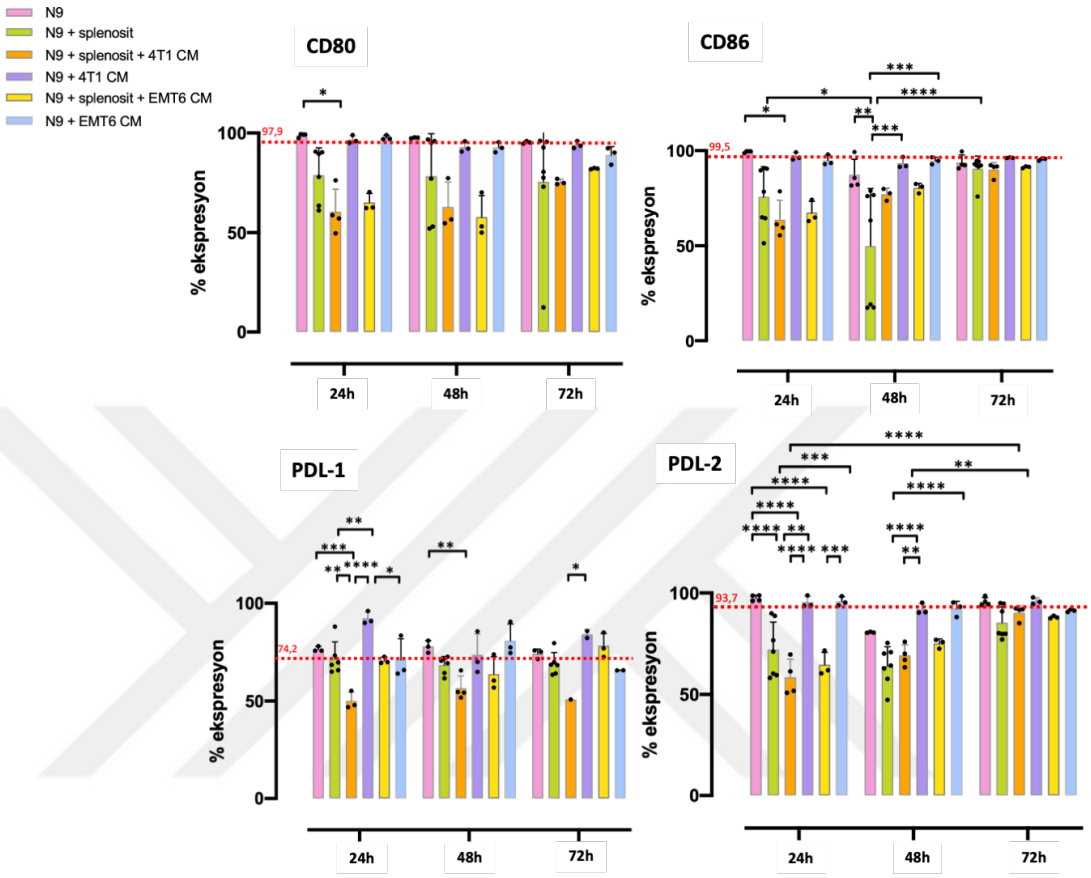
CD80 ekspresyonu özellikle kontrole oranla hem 24. hem de 48. saatlerde N9 w CD3 w 4T1 CM'li ve N9 w CD3'lü koşullara göre anlamlı bir azalma gösterdi. Yalnızca 4T1 ve EMT6 hücrelerinin salgıladığı faktörler ile kültürlenen koşullarda anlamlı bir ekspresyon farkı yok iken, T hücre ile birlikte kanser hürelerinin salgıladığı faktörlerin CD80 ekspresyonunu anlamlı düzeyde düşürdüğü bulgulandı. CD80 ekspresyonu tüm saatlerde 4T1 ve EMT6 hücrelerinin salgıladığı faktörler ile kültürlenen koşullarda anlamlı bir ekspresyon farkı yoktur sadece N9 koşulundaki ekspresyon seviyesine yakın düzeyde CD80 ifadesine sahipti. 24. saatte N9 w CD3 w EMT6 CM'li koşul, N9 w CD3 w 4T1 CM'li koşula göre daha düşük CD80 ekspresyonuna sahiptir. 48. saatte N9 w CD3 w EMT6 CM'li koşul 24. saate göre düşük CD80 ekspresyonuna sahiptir. 72. saatte N9 w CD3 w EMT6 CM'li koşul aynı saatteki yalnızca N9 ve bazal seviyedeki ekspreyona göre daha düşük CD80 ekspreyonuna sahipti.

CD86 ifadesi 24. saatte yalnızca N9 ve bazal seviyeye göre N9 w CD3 ve N9 w CD3 w 4T1 CM'li koşullarda daha düşük ekspresyona sahiptir. N9 w CD3 w 4T1 CM'li koşulunda 24., 48., ve 72. saattler içerisinde kademeli bir CD86 ifadesi artışı görülmüştür. Yalnızca 4T1 ve EMT6 hücrelerinin salgıladığı faktörler ile kültürlenen konuşallar için tüm satlerde anlamlı bir CD86 ekspresyon farkı yoktur, bazal ve yalnızca N9 ekspreyonuna yakın düzeyde CD86 ifadesine sahipti.

PDL-1 ifadesi 48. saatte N9 w CD3 w EMT6CM'li koşulunda N9 w EMT6CM'li koşuluna göre daha düşük eksprese edildi.

PDL-2 ifadesi 24. saatte N9 w CD3, N9 w CD3 w 4T1 CM ve CD3 w EMT6 CM'li koşullarda bazal ve yalnızca N9 ekspresyonlarına göre daha düşük ekspresyona sahipti. 24. saatte N9 w CD3w 4T1 CM'li koşul tüm gruplar içerisindeki en düşük PDL-2 ekspreyonuna sahipti. 24. saatteki PDL-2 ekspreyona göre N9 w CD3, N9 w CD3 w 4T1 CM ve CD3w EMT6 CM'li koşullar 72. saatte anlamlı düzeyde PDL-2 ekspreyon artışına sahipti. Yalnızca 4T1 ve EMT6 süpernatanıyla kültürlenen konuşallar için saatler arasında anlamlı bir PDL-2 ekspresyon farkı yoktu, bazal ve yalnızca N9 ekspreyonuna yakın düzeyde PDL-2 ifadesine sahipti.

72. saatte tüm koşullar yalnızca N9 ve bazal seviyedeki PDL-2 ekspreyon seviyesine sahiptir, gruplar arasında anlamlı bir ekspreyon farkı bulunmadı.



Şekil 33. N9 mikroglia hücreleriyle CD1 farelerinden izole edilen ve CD3 ile ilk uyarımı olmadan splenositlerin ko-kültürü sonrasında ko-stimülatör moleküllerin %ekspresyonları. p<0,05*; p<0,01**; p<0,001***; p<0,0001****

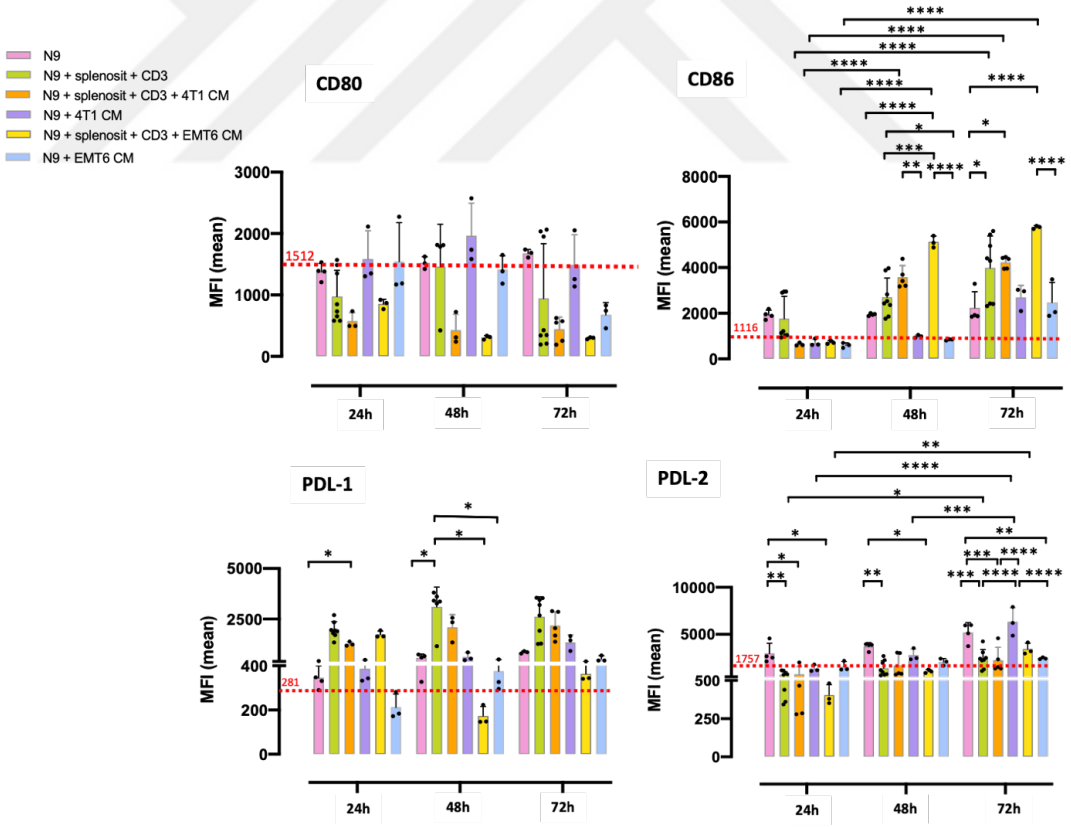
N9 hücreleriyle yapılan T hücre ilk uyarımının dışarıdan yapılmadığı koşullardaki ekspresyon sonuçları gösterilmiştir (Şekil 33).

CD80 ifadesinin 24. Saatte N9 w/o CD3 w 4T1 koşulunda sadece N9 hücrelerine göre daha düşük düzeyde eksprese edildiği bulgulandı.

CD86 ifadesinin N9 w/o CD3 koşulunda 24.ve 48. saattlerde bazal seviye ve yalnızca N9 ekspresyonuna göre daha düşük eksprese edildiği, 72. saatte ise ekspresyonunda artış gözlenerek yalnızca N9 ekspresyonuna yaklaştığı bulgulandı. CD86 seviyesinde T hücre ile kültürlenmeyen koşullarda bazal seviyeye göre anlamlı bir farklılık bulunmadı. 72. saatte tüm koşullar yalnızca N9 ve bazal seviyedeki CD86 ekspreyon seviyesine sahiptir, gruplar arasında anlamlı bir ekspreyon farkı bulunmadı.

PDL-1 ifadesi 24. 48. Saatlerde N9 w/o CD3 w 4T1CM'li koşulunda yalnızca N9'a ve bazal N9 ekspresyon seviyeye göre anlamlı derecede düşük ekspresyona sahipti. PDL-1, 24. saatte N9 w 4T1 CM koşulu için yalnızca N9 ve bazal N9 ekspresyon seviysine göre daha yüksek eksprese edilir ve gruplar içerisindeki en yüksek PDL-1 ifadesine sahipti.

PDL-2 ifadesi 24. saatte N9 w/o CD3, N9 w/o CD3 w 4T1CM ve N9 w/o CD3 w EMT6 CM koşullarında yalnızca N9 ve bazal N9 koşullarına göre daha düşük eksprese edildi. N9 w/o CD3, N9 w/o CD3 w 4T1CM'li koşullar için 72. saatte PDL-2 ifadesinde anlamlı bir artış bulgulanarak bazal seviyeye yaklaştı. N9 w 4T1CM'li ve N9 w EMT6 CM'li koşullar tüm saatlerde bazal seviyeye yakın düzeyde PDL-2 ekspresyonuna sahipti. Yalnızca 4T1 ve EMT6 süpernatanıyla kültürlenen konuşallar için tüm saatlerde anlamlı bir PDL-2 ekspresyon farkı yoktur, bazal ve yalnızca N9 ekspreyonuna yakın düzeyde PDL-2 ifadesine sahipti.



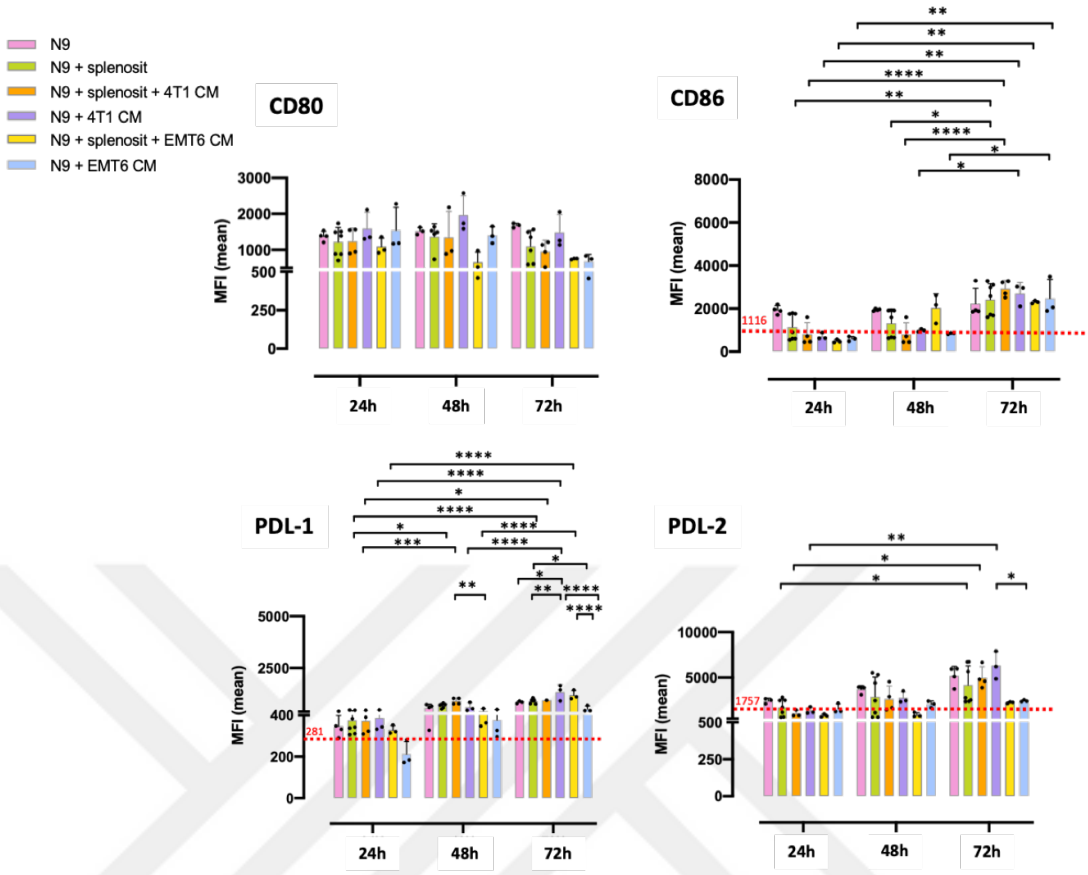
Şekil 34. N9 mikroglia hücreleriyle CD1 farelerinden izole edilen ve CD3 ile ilk uyarımı yapılmış splenositlerin ko-kültürü sonrasında ko-stimülatör moleküllerin ortalama floresan yoğunluk (*mean fluorescence intensity*, MFI) değerleri. p<0,05*; p<0,01**; p<0,001***; p<0,0001****

CD80 düzeyinde gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulgulanmadı.

24. saatteki CD86 düeyinde N9 w CD1 w CD3, N9 w CD1 w CD3 w 4T1CM ve N9 w CD1 w CD3 w EMT6CM'li koşulları için 48. ve 72. saatlerde kademeli bir MFI (mean) artışı vardır. 72. Saatte N9 w CD1 w CD3 w EMT6 CM'li koşul N9 wCD1 w EMT6 CM'li koşula oranla daha yüksek düzeyde MFI (mean) CD86 ifadesine sahiptir. Tüm grupların CD86 ifadesi bazal seviyenin üzerinde ekspresyon düzeyinde bulundu.

PDL-1 ifadesi 24. saatte N9 w CD1 w CD3 4T1CM'li koşulunda bazal N9 ve sadece N9 koşullarına göre daha yüksek MFI (mean) sahiptir. 48. saatte N9 w CD1 w CD3 koşulu N9 w CD1 w 4T1 CM ve N9 w EMT6 CM koşullarına göre anlamlı düzeyde yüksek PDL-1 MFI (mean) sahiptir. 72. saatte tüm koşullar bazal seviyenin üzerinde PDL-1 MFI (mean) sahipti.

24.saatteki PDL-2 ifadesinin N9 w CD1 w 4T1 CM, N9 w 4T1 CM ve N9 wCD1'li koşullarında 72. Saatte MFI (mean) artmıştır. 72. Saatteki PDL-2 MFI (mean) ifadesi N9 w 4T1 CM grubunda en yüksek düzeyine sahip olup bazal seviyenin üzerinde bulundu.



Şekil 35. N9 mikroglia hücreleriyle CD1 farelerinden izole edilen ve CD3 ile ilk uyarımı olmadan splenositlerin ko-kültürü sonrasında ko-stimülatör moleküllerin ortalama floresan yoğunluk (*mean fluorescence intensity*, MFI) değerleri. p<0,05*; p<0,01**; p<0,001***; p<0,0001****

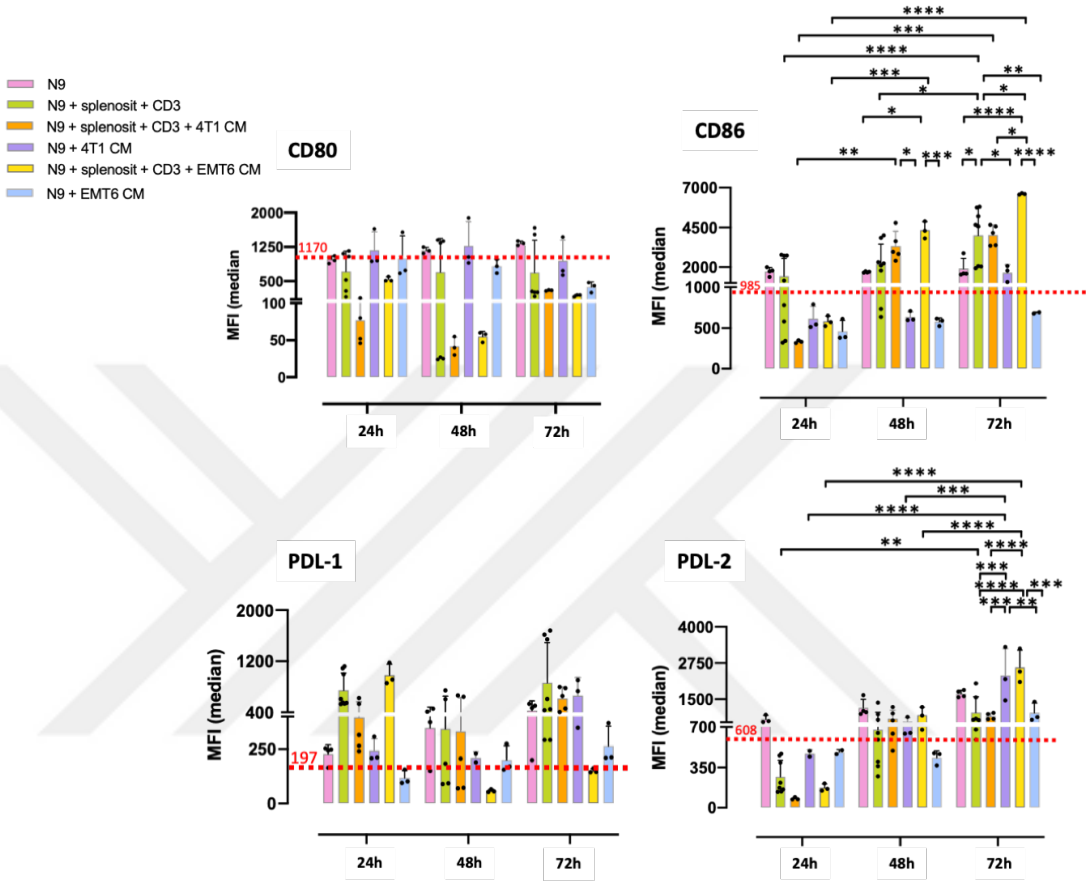
CD80 düzeyinde gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulgulanmadı.

24.saatteki CD86 ifadesinin N9 w CD1 w/o CD3, N9 w CD1 w/o CD3 w 4T1 CM, N9 w CD1 wo CD3 w EMT CM ve N9 w 4T1 CM koşullarında 72. saatte MFI (mean) değeri artmıştır. 72. saatte tüm grupların CD86 MFI (mean) değeri bazal N9 seviyesinin üzerinde bulundu.

24. saatteki PDL-1 ifadesinin N9 w CD1 w/o CD3 w 4T1 CM, N9 w CD1 wo CD3 w EMT CM ve N9 w 4T1 CM koşullarında 72. saatte MFI (mean) değeri arttı. 24. saatteki N9 w CD1 w/o CD3 koşulu için 48. saatte PDL-1 MFI (mean) değeri arttı. 72. saatte ve N9 w 4T1 CM koşulu N9 w EMT6 CM koşuluna göre daha yüksek PDL-1 MFI (mean) değerine sahipti. 72. saatte tüm grupların PDL-1 MFI (mean) değeri bazal N9 seviyesinin üzerinde bulundu.

24. saatteki PDL-2 ifadesinin N9 w CD1 w/o CD3 w 4T1 CM, N9 w CD1 wo CD3 ve N9 w 4T1 CM koşullarında 72. saatte MFI (mean) değeri artmıştır, en

yüksek artış N9 w CD1 w/o CD3 w 4T1 CM gurubunda görüldü. 72. saatte PDL-2 N9 w 4T1 CM grubunda N9 w EMT6 CM grubuna göre daha yüksek PDL-2 MFI (mean) değerine sahip bulundu.



Şekil 36. N9 mikroglia hücreleriyle CD1 farelerinden izole edilen ve CD3 ile ilk uyarımı yapılmış splenositlerin ko-kültürü sonrasında ko-stimülatör moleküllerin ortanca floresan yoğunluk (*median fluorescence intensity*, MFI) değerleri. p<0,05*; p<0,01**; p<0,001***; p<0,0001****

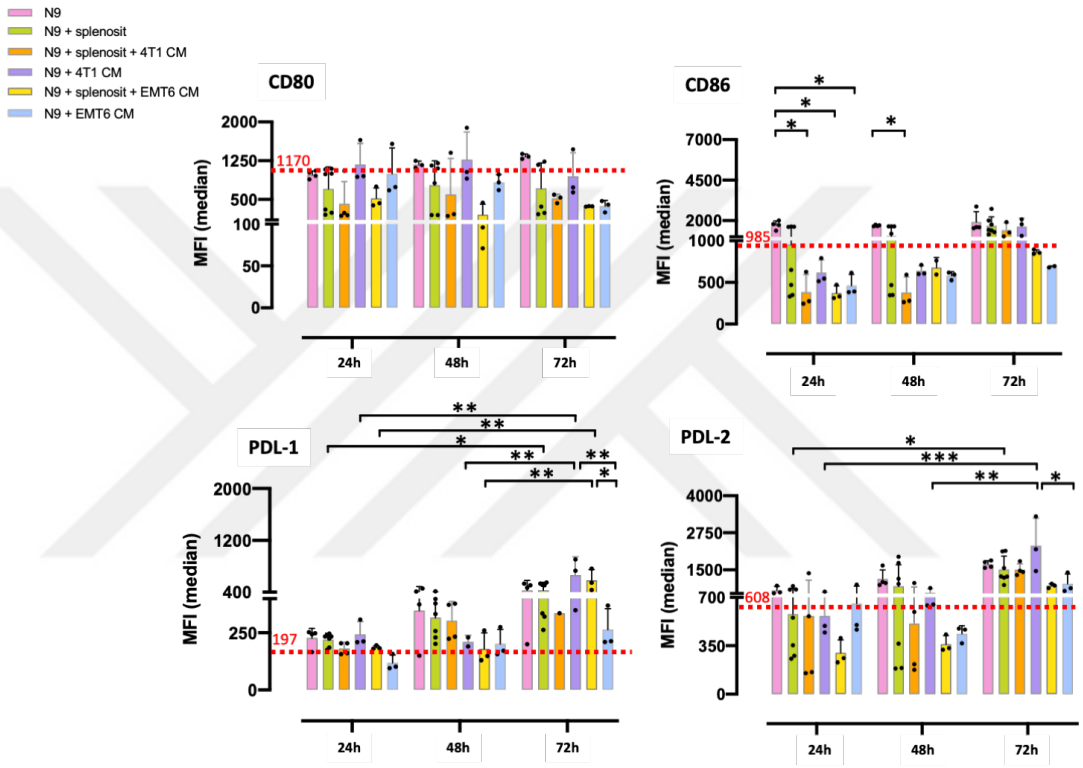
CD80 düzeyinde gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulgulanmadı.

CD86 düzeyi 24. saatteki N9 w CD1 wCD3, N9 w CD1 w CD3 w 4T1 CM ve N9 w CD1 wCD3 w EMT6 CM koşulları için 72. saatte MFI (median) düzeyleri yükseldi. N9 w CD1 w CD3 w EMT6 CM koşulu için CD86 MFI (median) değeri tüm saatlerde kademeli bir artış göstermiştir. 72. saatte N9 w CD1 w CD3 w EMT6 CM koşulunda N9 w EMT6 CM koşuluna göre CD86 MFI (median) değeri daha yüksekti. PDL-1 düzeyinde gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulgulanmadı.

24. saatteki PDL-2 için N9 w CD1 w CD3, N9 w 4T1CM ve N9 w CD1 w CD3 w EMT6 CM gruplarının 72. saatteki MFI (median) değeri daha yüksekti.

72. saatte N9 w CD3 w EMT6 CM grubunun N9 w CD1 wCD3 grubuna göre PDL-2 için MFI (median) değeri daha yüksekti.

72. saatte N9 w 4T1 CM grubunun N9 w CD1 w CD3 grubuna göre PDL-2 için MFI (median) değeri daha yüksekti. 72. saatte tüm grupların PDL-2 MFI (median) değeri bazal N9 seviyesinin üzerindedir. 72. saatte PDL-2 MFI (median) değeri en yüksek olan grup N9 w CD3 w EMT6 CM'dir.



Şekil 37. N9 mikroglia hücreleriyle CD1 farelerinden izole edilen ve CD3 ile ilk uyarımı olmadan splenositlerin ko-kültürü sonrasında ko-stimülatör moleküllerin ortanca floresan yoğunluk (*median fluorescence intensity*, MFI) değerleri. p<0,05*; p<0,01**; p<0,001***; p<0,0001****

CD80 düzeyinde gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulgulanmadı.

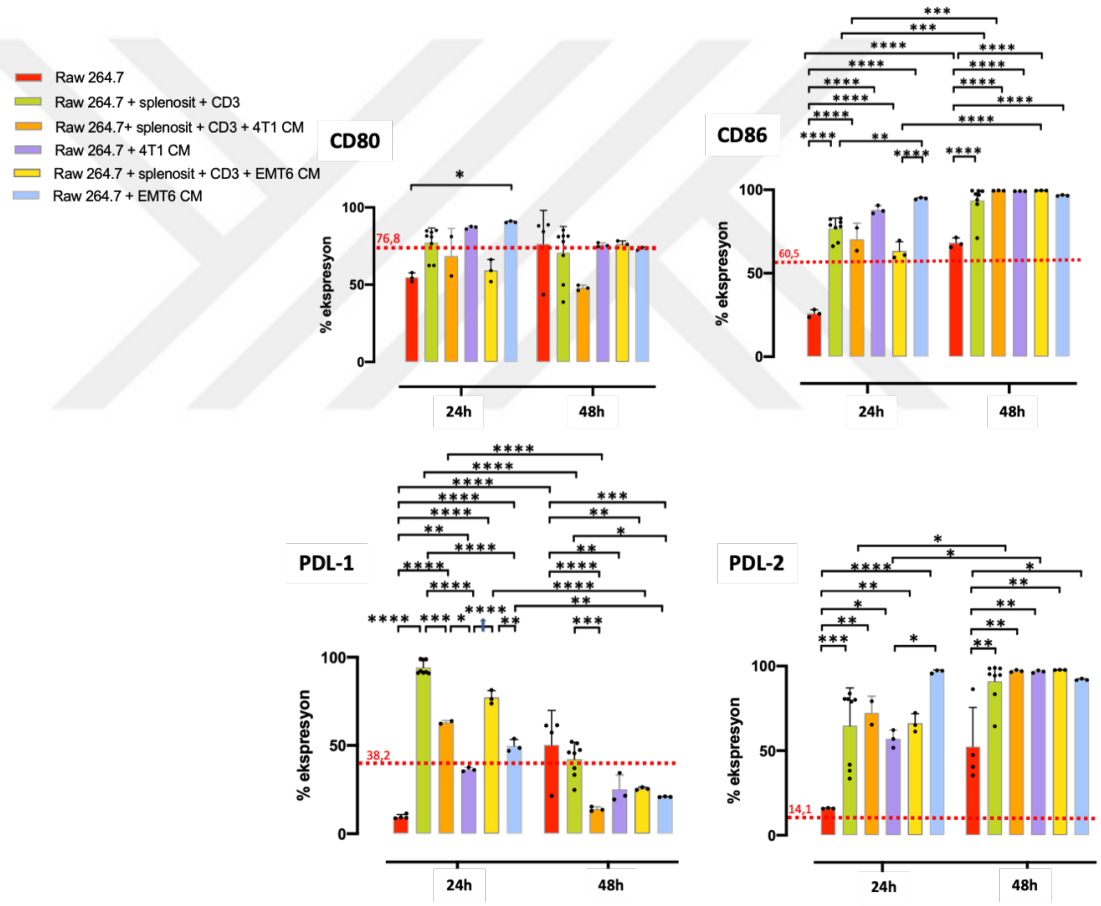
CD86 düzeyinde N9 w CD1 w/o CD3 w 4T1 CM, N9 w CD1 w/o CD3 wEMT6 CM ve N9 w EMT6 CM grupları 24. saatte bazal seviye ve yalnızca N9 hücre grubuna göre düşük MFI (median) değerine sahipti. N9 w CD1 wo CD3 w 4T1 CM grubunun CD86 MFI (median) değeri bazal seviye ve yalnızca N9 hücre grubuna göre 48. saatte düşmüştü.

24. saatteki PDL-1 için N9 w CD1 w/o CD3, N9 w 4T1 CM ve N9 w CD1 woCD3 w EMT6 CM gruplarının MFI (median) değeri 72. saatte artış gösterdi.

72. saaatte PDL-1 için N9 w 4T1CM ve N9 w CD1 w/o CD3 w EMT6 CM gruplarının MFI (median) değeri N9 w EMT6 CM'den daha yüksekti.

24. saaatte N9 w CD1 w/o CD3 ve N9 w 4T1CM gruplarının PDL-2 MFI (median) değeri 72. saatte arttı. 72. saatte tüm grupların PDL-2 MFI (median) değeri bazal seviyenin üzerinde bulundu. 72. saatte N9 w 4T1CM, N9 w EMT6CM'ye göre daha yüksek PDL-2 MFI (median) değerine sahipti.

4.2.2. Raw 264.7 Makrofaj Hücreleri ile Balb/c Fare Splenositlerinin Kültürü Sonrasında Ko-stimülatör Belirteçlerin Analizi



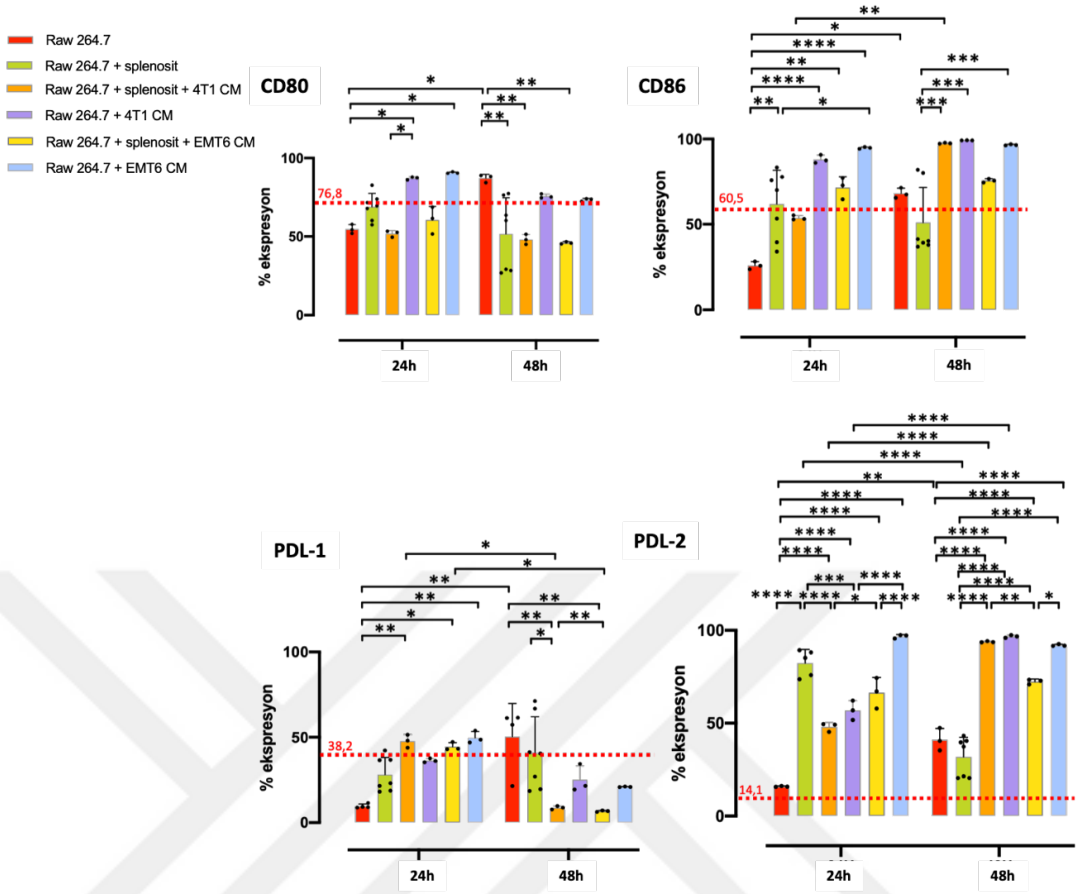
Şekil 38. Raw 264.7 makrofaj hücreleriyle Balb/c farelerinden izole edilen ve CD3 ile ilk uyarımı yapılmış splenositlerin ko-kültürü sonrasında ko-stimülatör moleküllerin %ekspresyon değerleri. p<0,05*; p<0,01**; p<0,001***; p<0,0001****

24. saatte CD80 ekspresyonu Raw w EMT6 CM koşulunda sadece Raw hücre grubuna göre daha yüksek ifadeye sahipti.

24. saatte CD86 ekspreyonu tüm koşullarda sadece Raw hücre grubuna ve bazal seviyeye göre daha yüksek ekspresyona sahipti. 24. saatteki tüm hücre grupları içerisinde Raw w EMT6 CM koşulu en yüksek CD86 ifadesine sahipti. 24. saatte bazal seviyeye yakın CD86 eksprese eden Raw w CD3 w EMT6 CM ve Raw w CD3 w 4T1 CM koşullarının 48. saatte ifadesinde anlamlı bir artış görüldü. 48. saatte tüm koşullar bazal seviye ve yalnızca Raw hücre grubuna göre yüksek CD86 ekspresyonuna sahipti.

24. saatte PDL-1 ekspresyonu sadece Raw hücre grubuna ve bazal seviyeye göre tüm koşullarda daha yüksek ekspresyona sahipti. 24. saatte Raw w Balb/c w CD3 grubu hem bazal seviyeye hem de diğer gruplara göre en yüksek ekspresyon seviyesine sahipti. 24. saatteki w CD3 ve 4T1 CM/EMT6 CM ile kültürlenen koşullar yalnızca 4T1 CM ve EMT6 CM ile kültürlenen koşullara göre daha yüksek PDL-1 ekspreyonuna sahipti. 48. saatte yalnızca Raw hücre grubu hariç diğer tüm koşulların PDL-1 ekspreyonu düştü. 48. saatte Raw w Balb/c w CD3 w 4T1 CM, Raw w 4T1 CM, Raw w Balb/c w CD3 w EMT6 CM ve Raw w EMT6 CM koşulları bazal seviyenin altında ekspreyona sahipti ve 24. saate göre anlamlı ekspresyon kaybına uğradı.

24. saatte PDL-2 tüm koşullarda sadece Raw hücre grubuna ve bazal seviyeye göre daha yüksek eksprese edildi. 24. saatte Raw w EMT6 CM koşulu Raw w 4T1 CM koşuluna göre daha yüksek PDL-2 ekspreyonuna sahipti. 48. saatte tüm koşullar Raw hücre grubuna ve bazal seviyeye göre daha yüksek PDL-2 ekspresyonuna sahipti. Raw w 4T1 CM ve Raw w Balb/c w CD3 gruplarının PDL-2 ekspreyonu 48. saatte anlamlı olarak artış gösterdi.



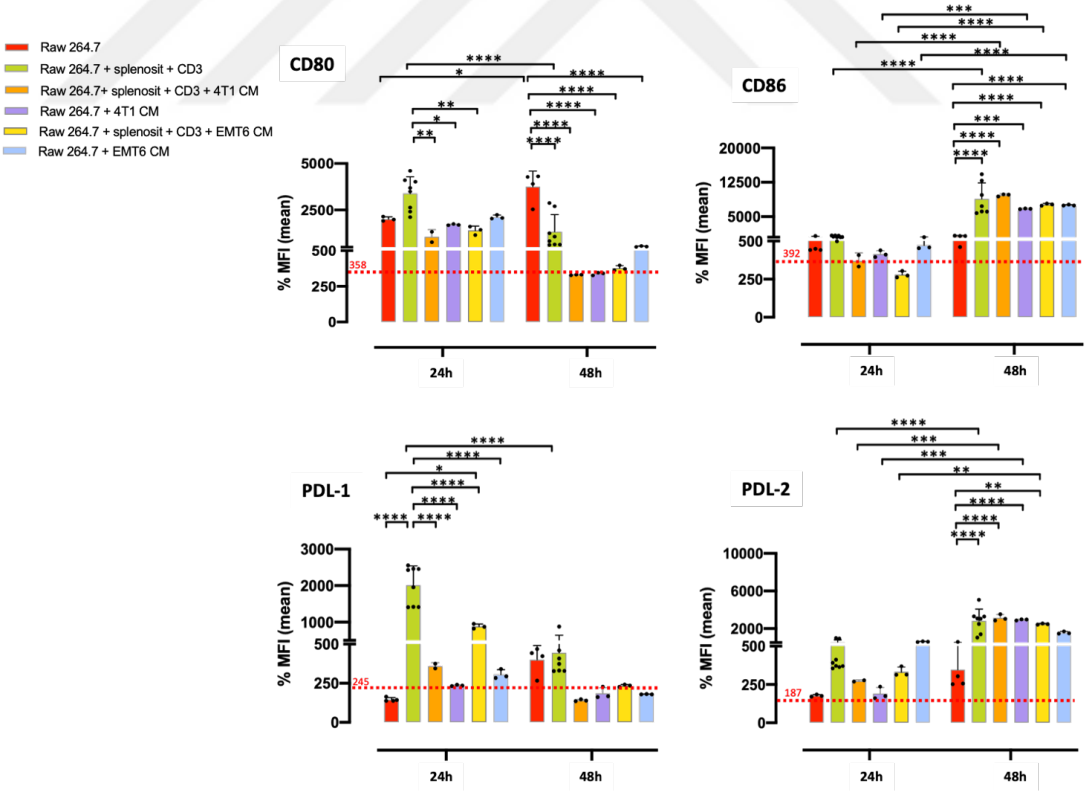
Şekil 39. Raw 264.7 makrofaj hücreleriyle Balb/c farelerinden izole edilen ve CD3 ile ilk uyarımı olmadan splenositlerin ko-kültürü sonrasında ko-stimülatör moleküllerin %ekspresyon değerleri. p<0,05*; p<0,01**; p<0,001***; p<0,0001****

24. saatte CD80 ekspresyonu Raw w 4T1 CM ve Raw w EMT6 CM koşullarında bazal seviye ve yalnızca Raw hücre grubuna göre daha yüksek eksprese edildi. 24. Saatteki gruplar içerisinde Raw w CD3 w 4T1 CM koşulu en düşük CD80 ekspresyonuna sahipti ve Raw w 4T1 CM koşuluna göre anlamlı derecede düşük CD80 ekspresyonu gözlendi. 48. saatte Raw w/o CD3 w 4T1 CM ve Raw w/o CD3 w EMT6 CM koşulları sadece Raw hücre grubuna ve bazal seviyeye göre daha düşük CD80 ekspresyonuna sahipti.

24. saatte CD86 ifadesi Raw w Balb/c w/o CD3, Raw w 4T1 CM, Raw w EMT6 CM ve Raw w Balb/c w/o CD3 w EMT6 CM koşullarında bazal seviye ve yalnızca Raw hücre grubuna göre daha yüksek ifade edildi. Raw w Balb/c w/o CD3 w 4T1 CM koşulunda 48. saatte CD86 ifadesinde anlamlı düzeyde ekspresyon artışı gözlendi. 48. saatte Raw w 4T1 CM ve Raw w Balb/c w/o CD3 w 4T1 CM koşulları Raw w Balb/c w/o CD3 koşuluna göre daha yüksek CD86 ekspresyonuna sahipti.

24. saatte PDL-1 ifadesi Raw w Balb/c w/o CD3 w 4T1 CM, Raw w Balb/c wo CD3 w EMT6 CM ve Raw w EMT6 CM koşulları bazal seviye ve yalnızca Raw hücre grubuna göre daha yüksek ekspresyona sahipti. PDL-1 ekspresyonu 48. saatte Raw w Balb/c wo CD3 w 4T1 CM ve Raw w Balb/c w/o CD3 w EMT6 CM koşullarında azalmıştır ve bu gruplar 48. saatteki en düşük PDL-1 ifadesine sahipti.

24. saatte PDL-2 ifadesi tüm gruplarda ve yalnızca Raw hücre grubuna göre daha yüksek eksprese edilir. 24. saatte Raw w EMT6 CM koşulu Raw w Balb/c w/o CD3 w EMT6 CM koşuluna göre daha yüksek PDL-2 ekspresyonuna sahipti. 48. saatte Raw w Balb/c w/o CD3 ve Raw w Balb/c w/o CD3 w 4T1 CM koşullarının PDL-2 düzeyinde artış görüldü. 48. saatte Raw w 4T1 CM, Raw w Balb/c w/o CD3 w 4T1 CM, Raw w EMT6 CM ve Raw w Balb/c w/o CD3 w EMT6 CM koşulları bazal seviye ve yalnızca Raw hücre grubuna göre daha yüksek ekspresyona sahipti. 48. saatte Raw w EMT6 CM koşulu Raw w Balb/c w/o CD3 w EMT6 CM koşuluna göre daha yüksek PDL-2 ekspresyonuna sahipti.



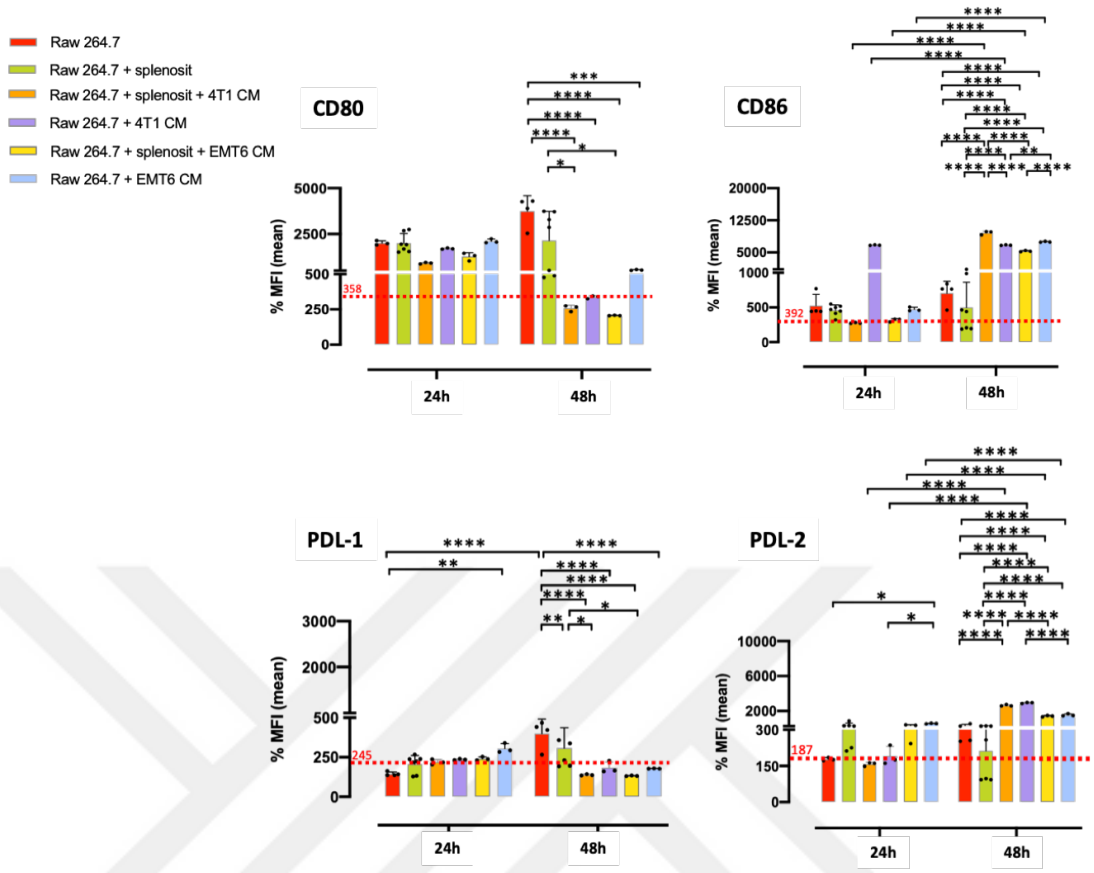
Şekil 40. Raw 264.7 makrofaj hücreleriyle Balb/c farelerinden izole edilen ve CD3 ile ilk uyarımı yapılmış splenositlerin ko-kültürü sonrasında ko-stimülatör moleküllerin ortalama floresan yoğunluk (*mean fluorescence intensity*, MFI) değerleri. p<0,05*; p<0,01**; p<0,001***; p<0,0001****

24. saatte CD80 MFI (mean) değeri Raw w Balb/c w CD3 koşulunda Raw w Balb/c w CD3 w 4T1 CM, Raw w Balb/c w CD3 w EMT6 CM, Raw w 4T1 CM ve Raw w EMT6 CM koşullarına göre daha yüksek ifade edildi. Raw w Balb/c w CD3 koşulunun CD80 ekspresyonu 48. saatte artış göstermiştir. 48. tüm koşulların MFI (mean) değeri ve yalnızca Raw hücre grubuna göre daha düşük ekpresyona sahipti.

24. saatteki tüm grupların 48. Saatteki CD86 MFI (mean) değerinde artış görüldü. 48 saatte tüm grupların yalnızca Raw hücre grubuna göre CD86 MFI (mean) değeri yüksekti.

24. saatte PDL-1 MFI (mean) değeri Raw w Balb/c w CD3 koşulunda yalnızca Raw hücre grubuna ve bazal seviyeye göre daha yüksek ifade edilir ve gruplar arasındaki en yüksek PDL-1 MFI (mean) değerine sahiptir. 24. saatteki Raw w EMT6 CM koşulu Raw w Balb/c w CD3 w EMT6 CM koşuluna göre düşük ifade edilir ve bazal seviyededir. 48. saatte Raw w Balb/c w CD3 koşulunun PDL-1 MFI (mean) değeri düşmüştü.

24. saatteki Raw w Balb/c w CD3, Raw w Balb/c w CD3 w 4T1 CM, Raw w 4T1 CM ve Raw w Balb/c w CD3 w EMT6 CM gruplarının 48. saatlerinde PDL-2 MFI (mean) değeri arttı. 24. saatteki Raw w Balb/c w CD3 ve Raw w EMT6 CM koşulları bazal seviyenin üzerinde olup bu saatteki en yüksek PDL-2 MFI (mean) değerlerine sahiplerdi. 48 saatte tüm grupların yalnızca Raw hücre grubu ve bazal seviyeye göre PDL-2 MFI (mean) değeri yüksekti.



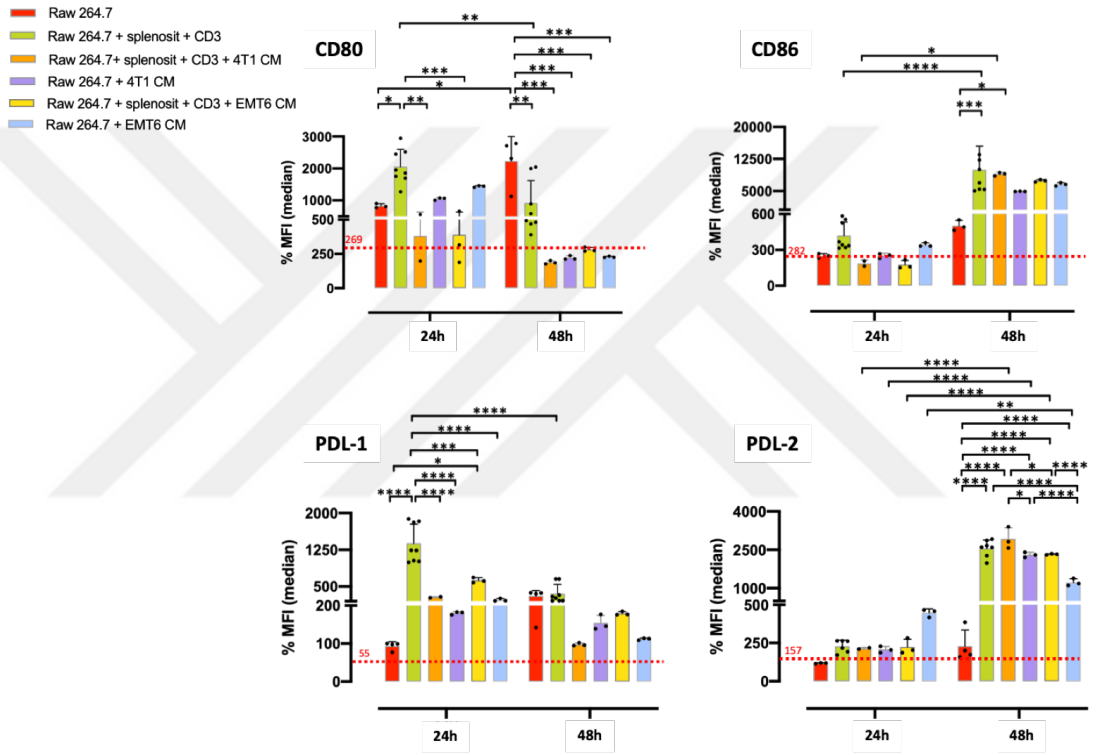
Şekil 41. Raw 264.7 makrofaj hücreleriyle Balb/c farelerinden izole edilen ve CD3 ile ilk uyarımı olmadan splenositlerin ko-kültürü sonrasında ko-stimülatör moleküllerin ortalama floresan yoğunluk (*mean fluorescence intensity*, MFI) değerleri. p<0,05*; p<0,01**; p<0,001***; p<0,0001****

24. saateki tüm koşulların CD80 MFI (mean) değeri bazal seviyenin üzerinde olup gruplar arasındaki anlamlı bir farklılık bulunmadı. 48. saatte Raw w Balb/c w/o CD3 w 4T1 CM, Raw w 4T1 CM, Raw w Balb/c w/o CD3 w EMT6 CM ve Raw w EMT6 CM kmoşulları yalnızca Raw hücre grubundan düşük CD80 MFI (mean) değerine sahip olup bazal seviyededir. 48. saatte Raw w Balb/c w/o CD3 w 4T1 CM ve Raw w Balb/c w/o CD3 w EMT6 CM koşulları Raw w Balb/c w/o CD3 koşuluna göre düşük CD80 MFI (mean) değerine sahipti.

24. saatteki CD86 MFI (mean) değeri Raw w Balb/c w/o CD3 w 4T1 CM, Raw w Balb/c w/o CD3 w EMT6 CM ve Raw w EMT6 CM koşullarında bazal seviyede ekspreyona sahipti. Bu koşullar 48. saatte artış göstererek bazal seviye ve yalnızca Raw hücre grubuna göre yüksek CD86 MFI (mean) değerine sahipti.

24. saatteki PDL-1 MFI (mean) değeri Raw w EMT6 CM koşulu bazal seviye ve yalnızca Raw hücre grubuna göre yüksek düzeydedir. 48. saatte Raw w Balb/c w/o CD3 w 4T1 CM, Raw w 4T1 CM ve Raw w Balb/c w/o CD3 w EMT6 CM koşullarının PDL-1 MFI (mean) değeri düştü.

24. saatteki Raw w Balb/c w/o CD3 w 4T1 CM ve Raw w 4T1 CM koşullarının PDL-2 MFI (mean) değeri bazal seviyede olup 48. saatte bazal ve yalnızca Raw hücre grubuna göre artış gösterdi.



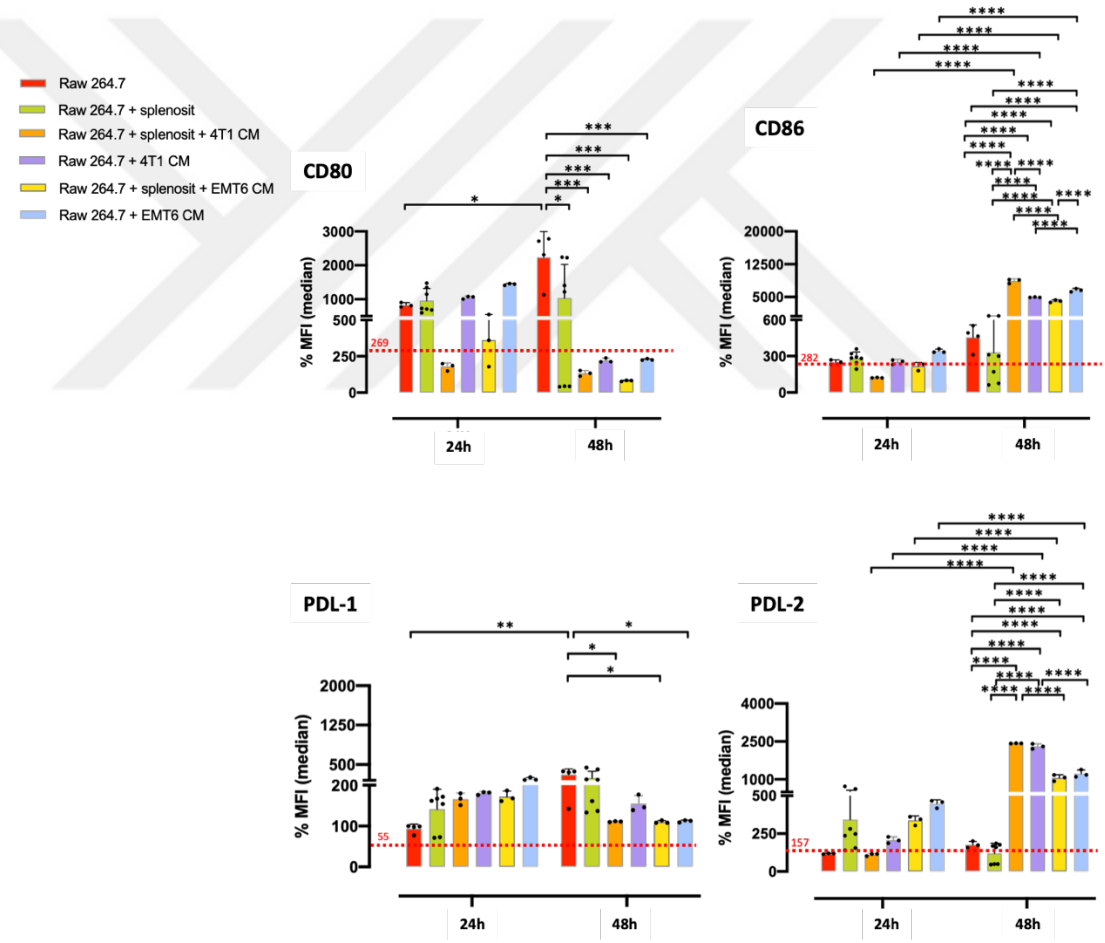
Şekil 42. Raw 264.7 makrofaj hücreleriyle Balb/c farelerinden izole edilen ve CD3 ile ilk uyarımı yapılmış splenositlerin ko-kültürü sonrasında ko-stimülatör moleküllerin ortanca floresan yoğunluk (*median fluorescence intensity*, MFI) değerleri. p<0,05*; p<0,01**; p<0,001***; p<0,0001****

24. saatteki Raw w Balb/c w CD3 koşulu Raw w Balb/c w CD3 w 4T1 CM ve Raw w 4T1 CM koşullarına göre daha yüksek CD80 MFI (median) düzeyine sahipti. 48. saatte Raw w Balb/c w CD3 w 4T1 CM, Raw w Balb/c w CD3 w EMT6 CM, Raw w 4T1 CM ve Raw w EMT6 CM bazal seviye ve yalnızca Raw hücre grubuna göre daha düşük CD80 MFI (median) düzeyine sahipti.

24. saatteki CD86 MFI (median) düzeyi Raw w Balb/c w CD3 ve Raw w Balb/c w CD3 w 4T1 CM koşullarında 48. saatte arttı. 48 saatte tüm grupların CD86 MFI (median) değeri yalnızca Raw hücre grubu ve bazal seviyeye göre yüksekti.

24. saatteki Raw w Balb/c w CD3 koşulunda PDL-1 MFI (median) düzeyi diğer tüm gruplara göre daha yüksektir. 48. Saatte Raw w Balb/c w CD3 koşulunda PDL-1 MFI (median) değeri 24. saatteki düzeyine göre düşmüştü.

24.saatteki PDL-2 MFI (median) düzeyi Raw w Balb/c w CD3, Raw w Balb/c w CD3 w 4T1 CM ve Raw w 4T1 CM koşullarında yalnızca Raw hücre grubuna ve bazal seviyeye göre düşüktü, 48. saatte bu grupların PDL-2 MFI (median) düzeyi yalnızca Raw hücre grubu ve bazal seviyeye göre yüksekti. 24. saatteki PDL-2 MFI (median) düzeyi Raw w EMT6 CM koşulu için Raw hücre grubuna ve bazal seviyeye göre yüksekti ve 48. saatte ifadesinde artış gözlendi.



Şekil 43. Raw 264.7 makrofaj hücreleriyle Balb/c farelerinden izole edilen ve CD3 ile ilk uyarımı olmadan splenositlerin ko-kültürü sonrasında ko-stimülatör moleküllerin ortanca floresan yoğunluk (*median fluorescence intensity*, MFI) değerleri. p<0,05*; p<0,01**; p<0,001***; p<0,0001****

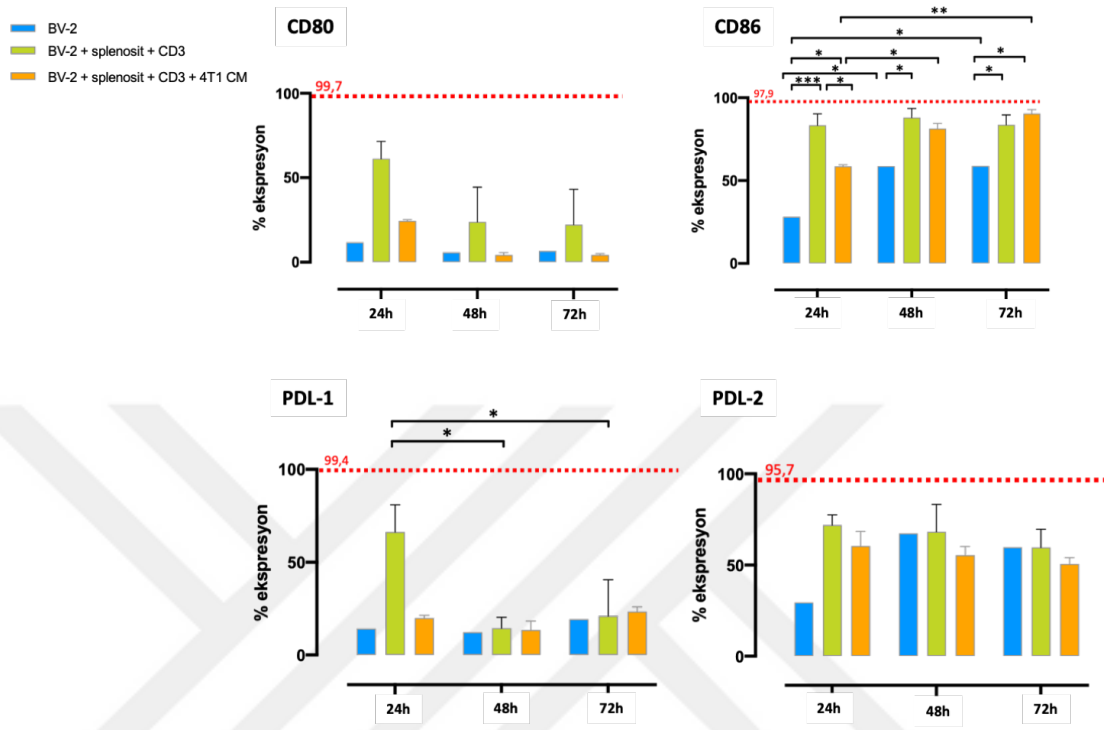
48. saatte CD80 MFI (median) düzeyi Raw w Balb/c w/o CD3 ve yalnızca Raw hücre gruplarında Raw w Balb/c w/o CD3 w 4T1 CM, Raw w Balb/c w/o CD3 w EMT6 CM, Raw w 4T1 CM ve Raw w EMT6 CM gruplarına göre yüksekti.

24. saatteki CD86 MFI (median) düzeyi Raw w Balb/c w/o CD3 w 4T1 CM, Raw w Balb/c w/o CD3 w EMT6 CM, Raw w 4T1 CM ve Raw w EMT6 CM gruplarında bazal seviyede ekspresyona sahipti. 48. Saatte bu grupların CD86 MFI (median) düzeyi artarak bazal seviyeyi geçmişti.

24. saatteki PDL-1 MFI (median) düzeyi tüm koşullar için bazal seviyeden yüksekti. 48. saatte Raw w Balb/c w/o CD3 w 4T1 CM ve Raw w 4T1 CM koşullarının PDL-1 MFI (median) düzeyi Raw w Balb/c w/o CD3 grubuna göre daha düşüktü.

24. saatteki Raw w Balb/c w/o CD3 w 4T1 CM, Raw w Balb/c w/o CD3 w EMT6 CM, Raw w 4T1 CM ve Raw w EMT6 CM gruplarının 48. saatte PDL-2 MFI (median) düzeyi artmıştı. 48. saatteki Raw w Balb/c w/o CD3 w 4T1 CM ve Raw w 4T1 CM gruplarının PDL-2 MFI (median) düzeyi Raw w Balb/c w/o CD3 w EMT6 CM ve Raw w EMT6 CM gruplarına göre daha yüksekti. 24. saatte Raw w Balb/c w/o CD3 grubunun PDL-2 MFI (median) düzeyi 48. saatte düşerek bazal seviyede ekspresyona sahipti.

4.2.3. BV-2 Mikroglia Hücreleri ile C57BL/6 Fare Splenositlerinin Kültürü Sonrasında Ko-stimülatör Belirteçlerin Analizi



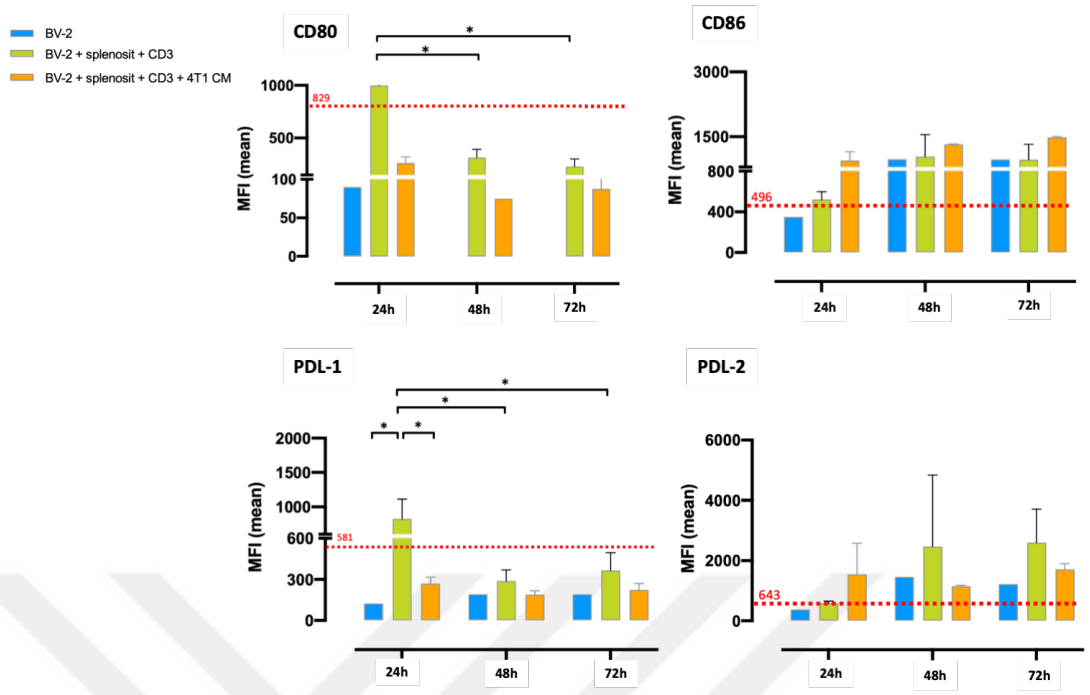
Şekil 44. BV-2 mikroglia hücreleriyle C57BL/6 farelerinden izole edilen ve CD3 ile ilk uyarımı yapılmış splenositlerin ko-kültürü sonrasında ko-stimülatör moleküllerin %ekspresyon değerleri. p<0,05*; p<0,01**; p<0,001***; p<0,0001****

CD80 düzeyinde gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulgulanmadı.

CD86 ekspresyonu BV-2 w C57BL/6 w CD3 w 4T1 CM grubunda saatler içersinde kademeli olarak artmıştı. 24. saatte BV-2 w C57BL/6 w CD3 grubunun CD86 ekspresyonu BV-2 w C57BL/6 w CD3 w 4T1 CM grubuna göre daha yüksekti.

24. saatte PDL-1 ifadesi BV-2 w C57BL/6 w CD3 grubunda diğer gruplar içerisinde en yüksek ekspresyona sahiptir, 48. ve 72. saatte PDL-1 ekspresyonu düşmüştü.

PDL-2 düzeyinde gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulgulanmadı.

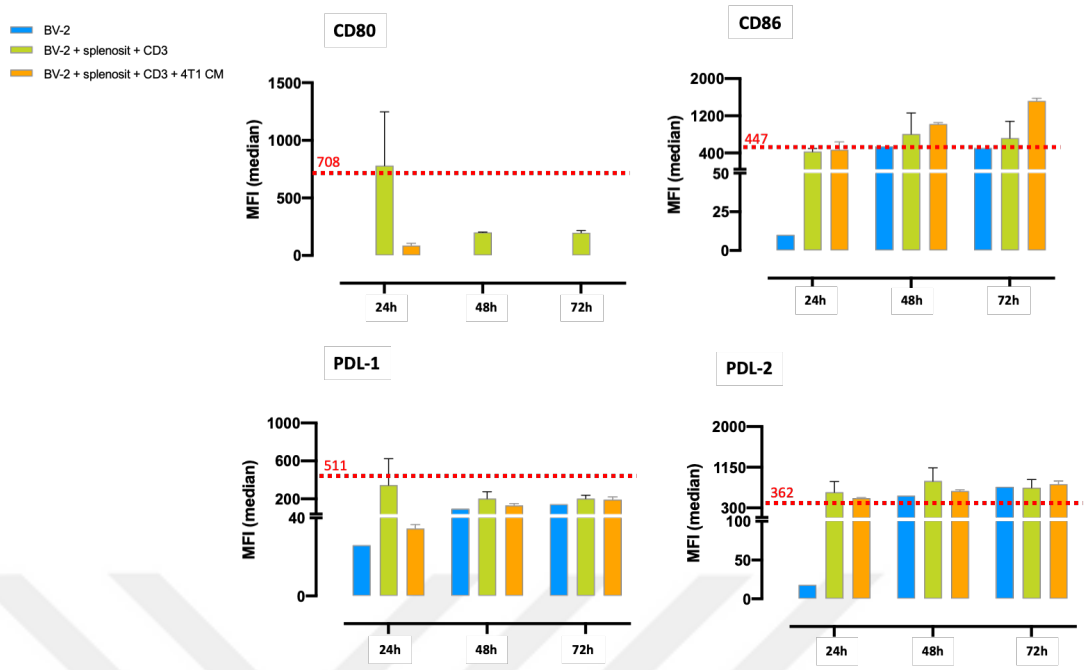


Şekil 45. BV-2 mikroglia hücreleriyle C57BL/6 farelerinden izole edilen ve CD3 ile ilk uyarımı yapılmış splenositlerin ko-kültürü sonrasında ko-stimülatör moleküllerin ortalama floresan yoğunlukları *(mean fluorescence intensity*, MFI). p<0,05*; p<0,01**; p<0,001***; p<0,0001****

24. saatteki CD80 MFI (mean) düzeyi BV-2 w C57BL/6 w CD3 grubunda 48. ve 72. saatlere göre daha yüksekti.

CD86 düzeyinde gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulgulanmadı.

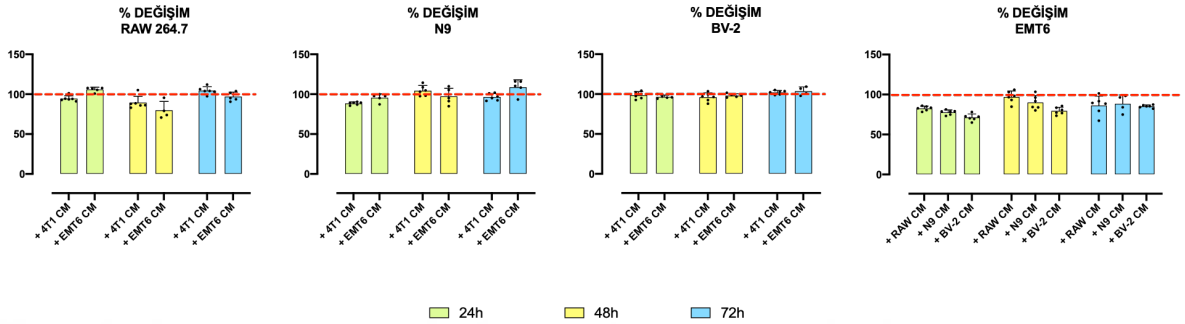
24. saatteki PDL-1 MFI (mean) düzeyi BV-2 w C57BL/6 w CD3 grubunda bazal seviye ve diğer gruplara göre daha yüksek ekspresyona sahipti. 48. saatte BV-2 w C57BL/6 w CD3 grubunun PDL-1 MFI (mean) düzeyi düşmüştü. 24. saatte PDL-1 MFI (mean) düzeyi BV-2 w C57BL/6 w CD3 grubunda BV-2 w C57BL/6 w CD3 w 4T1 CM grubuna göre daha yüksekti.



Şekil 46. BV-2 mikroglia hücreleriyle C57BL/6 farelerinden izole edilen ve CD3 ile ilk uyarımı yapılmış splenositlerin ko-kültürü sonrasında ko-stimülatör moleküllerin ortanca floresan yoğunluk (*median fluorescence intensity*, MFI) değerleri.

MFI (median) düzeyinde CD80, CD86, PDL-1 ve PDL-2 düzeyinde anlamlı bir farklılık bulgulanmadı.

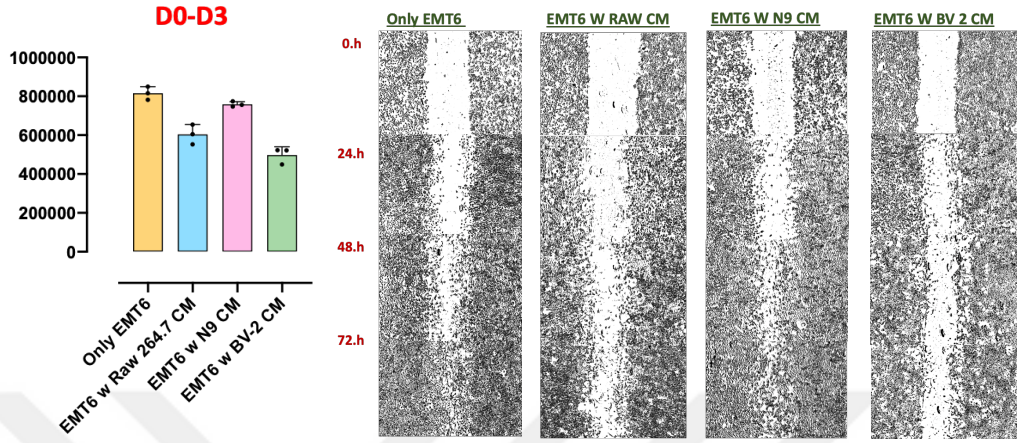
4.3. TNBC Hücrelerinin Salgıladığı Faktörlerin Mikroglia/Makrofaj Proliferasyonu ve Canlılığı Üzerindeki Etkisinin MTT Metodu ile Değerlendirilmesi



Şekil 47. TNBC hücrelerin condition medium ile kültürlenmiş miyeloid hücrelerinin ve miyeloid hücrelerin condition medium ile kültürlenmiş EMT6 hücresinin canlılık %değişim grafikleri.

EMT6 hücresinin salgıladığı faktörler ile kültürlenen Raw 264.7, BV-2 ve N9 hücrelerinin proliferasyonu ve bu miyeloid hücrelerin salgıladığı faktörler ile birlikte kültürlenen EMT6 hücrelerinin proliferasyonu MTT metoduyla değerlenirildi. MTT yüzde değişim sonuçlarına göre BV-2 hücrelerinde belli bir değişim görülmemişken özellikle EMT6 hücrelerinden salgılanan faktörler ile N9 hücre proliferasyonunda artış vardı. Raw 264.7, BV-2 ve N9 hücrelerinin salgıladığı faktörlerlerin EMT6 hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki etkilerine bakıldığında, özellikle 48. saatin sonunda BV-2'nin salgıladığı faktörler diğer hücre kaynaklı faktörlere oranla EMT6 hücrelerinin proliferasyonunu daha çok düşürdü (Şekil 47).

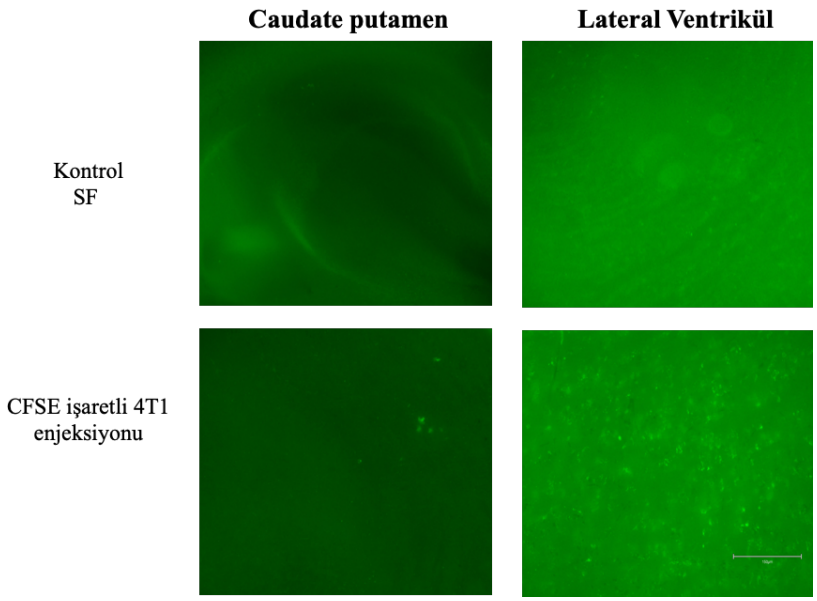
4.4. Mikroglia/ Makrofaj Hücrelerinin Salgıladığı Faktörlerin EMT6 Hücrelerindeki EMG/MEG Değişimlerinin İncelenmesi



Şekil 48. EMT6 condition medium ile kültürlenmiş Raw 264.7, N9 ve BV-2 hücrelerinin scratch assay metodu ile yara kapanma analizi sonuçları.

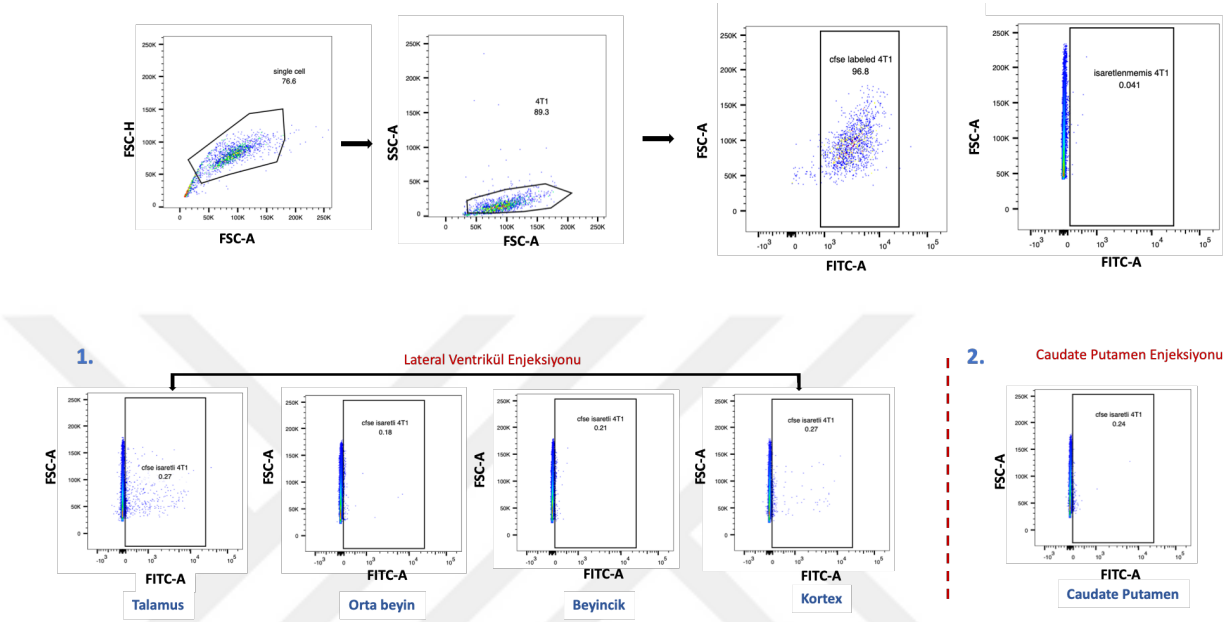
N9 condition medium ile kültürlenen EMT6 hücrelerinin yara kapanması diğer koşullara oranla daha yüksektir. BV-2 hücrelerinin EMT6 hücrelerinin yara kapanması üzerine etkisi daha stabildi (Şekil 48).

4.5. Caudate Putamen ve Lateral Ventrikül Stereotaksik Enjeksiyon Sonuçları

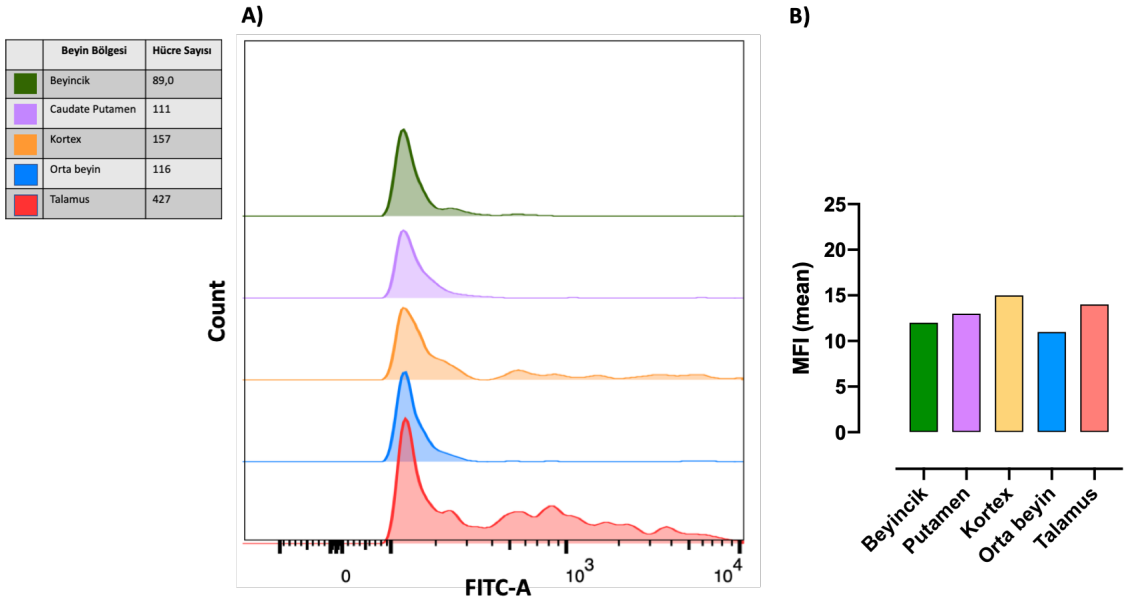


Şekil 49. Caudate Putamen ve Lateral ventrikül Sterotaksi Enjeksyonu Florasan Mikroskopi (Evos Görüntüleri)

Caudate putamen ve lateral ventrikül'e enjeksiyon yapıldıktan 48 saat sonra hayvanlar sakrifiye edildi ve 1mm'lik ince sagital kesitler alınarak (3.2.5) CFSE işarteli 4T1 hücrelerinin infiltrasyonu floresan mikroskop (Evos) ile değerlendirildi (Şekil 49).



Şekil 50. Lateral ventrikül ve caudate putamen enjeksiyonu sonrasında, ventriküle komşu olan beyincik, talamus, kortex, orta beyin ve caudate putamen bölgelerindeki 4T1 hücrelerinin 48 saat sonunda bölgelere penetrasyonunun akım sitometri ile değerlendirilmesi.



Şekil 51. CFSE işaretli 4T1 hücrelerirnin farklı beyin bölgelerine enjeksiyonu sonucunda 4T1 hücrelerinin;
A) % ekspresyon histogram grafikleri
B) Ortanca floresan yoğunluk (*median fluorescence intensity*, MFI) değerlerinin sütun garfiği.

Lateral ventrükül enjeksiyonu sonucunda, ventriküle komşu beyin bölgeleri ve caudate putamen enjeksiyonu sonrasında caudate putamen bölgesi ayrı ayrı enzimatik işlemlere maruz bırakılarak hücrelerin izolasyonu sağlanmıştır (Şekil 25'deki izolasyon protokolü izlenmiştir). Beyincik, talamus, kortex ve orta beyin bölgeleri kıyaslandığında özellikle talamus bölgesindeki işaretli 4T1 hücrelerinin varlığı FITC kanalında daha yoğun ışıma vererek bölgede daha çok 4T1 hücresinin olduğu akım sitometri ile gösterildi (Şekil 50). FITC-A ışımalarına göre 4T1 hücrelerinin farklı beyin bölgelerindeki % ekspresyon ve MFI değerleri gösterilmiştir (Şekil 51).

	CD80			CD86			PD-L1			PD-L2		
% ekspresyon	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h
N9	98,88	97,60	95,33	99,45	87,20	93,80	76,57	77,80	74,20	97,50	80,60	95,70
+4T1 CM	96,70	92,93	94,07	96,90	93,30	96,27	92,33	73,53	84,03	95,53	92,07	96,00
+EMT6 CM	97,70	92,80	88,90	94,80	94,63	95,37	71,17	80,87	65,75	95,90	92,27	91,33
+ splenosit+ CD3	61,75	57,62	71,93	70,07	77,31	81,00	72,10	66,80	70,79	58,18	79,13	87,72
+ splenosit + CD3 + 4T1 CM	46,75	51,00	75,20	62,40	76,56	93,44	60,38	53,66	73,68	46,90	69,80	90,22
+ splenosit + EMT6 CM	66,93	33,27	59,70	74,50	89,87	95,13	64,27	40,53	40,00	60,20	87,63	98,17

	CD80			CD86			PD-L1			PD-L2		
MFI	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h
N9	1378,75	1521,33	1679,67	1940,00	1948,75	2237,25	346,50	584,25	855,67	2447,00	3716,50	5198,00
+4T1 CM	1589,67	1966,00	1483,00	710,33	988,33	2698,00	386,33	621,67	1340,00	1375,67	2789,33	6331,67
+EMT6 CM	1544,00	1407,67	677,33	596,67	843,33	2477,67	212,33	376,00	532,00	1596,67	2079,00	2455,00
+ splenosit+ CD3	976,38	1458,75	945,50	1771,63	2705,88	3986,00	1958,88	3104,67	2613,50	723,50	1412,13	2402,00
+ splenosit + CD3 + 4T1 CM	575,33	424,00	438,40	636,00	3576,00	4236,20	1272,00	2079,67	2173,40	762,25	1708,20	2246,00
+ splenosit + EMT6 CM	853,00	308,67	297,33	725,67	5125,67	5770,67	1734,33	172,67	364,00	404,33	1083,00	3441,67

Şekil 52. N9 hücre hattı ile farklı koşullarda gerçekleşen ko-kültürler sonucu ko-stimülatör belirteçlerin değişimini gösteren özetleyici grafik. Değişimler üstte % ekspresyon, altta ortalama floresan yoğunluğunu (MFI) göstermektedir.

N9 hücreleri ile gerçekleştirilen ko-kültürler neticesinde anti-CD3 varlığında Tek başına 4T1 veya EMT6 CM özellikle PD-L1 düzeyini regüle edebilmiştir. 4T1CM PD-L1 düzeyini arttırırken; EMT6 CM azaltmıştır. Ko-kültürlerde tüm ko-stimülatör moleküller etkilenmiştir. CD80 ve PD-L1 ekspresyonu EMT6 CM ile drastik azalma göstermiştir (Şekil 52 üst panel). EMT6 ve 4T1 CM ile hücre başına düşen CD86 yı arttırırken, PD-L1 düzeylerini azaltmaktadır (Şekil 52 üst panel).

	Koşul			24h (% ekspresyon)				Koşul			48h (% ekspresyon)			
	anti-CD3	4T1 CM	splenosit	CD80	CD86	PD-L1	PD-L2	anti-CD3	4T1	splenosit	CD80	CD86	PD-L1	PD-L2
N9	–	–	–	98,88	99,45	76,57	97,50	–	–	–	97,60	87,20	77,80	80,60
BV-2				11,70	28,10	14,30	29,40				5,80	58,70	12,30	67,30
RAW 264.7				54,70	25,93	9,63	15,90				87,10	68,13	50,38	41,07
N9	+	–	+	61,75	70,07	72,10	58,18	+	–	+	57,62	77,31	66,80	79,13
BV-2				61,25	83,50	66,20	71,85				23,83	88,20	14,55	68,15
RAW 264.7				77,19	76,85	94,19	64,61				70,59	93,60	42,21	91,00
N9	+	+	+	46,75	62,40	60,38	46,90	+	+	+	51,00	76,56	53,66	69,80
BV-2				24,45	58,55	19,95	60,40				4,35	81,50	13,55	55,40
RAW 264.7				68,40	70,35	63,05	72,25				47,93	99,57	13,93	97,07
N9	–	–	+	78,88	75,71	71,75	72,07	–	–	+	78,35	49,89	68,42	64,07
BV-2				17,40	94,30	34,40	74,30				5,10	81,30	13,00	61,60
RAW 264.7				69,01	61,96	28,14	82,44				51,70	51,09	40,67	31,89
N9	–	+	+	60,48	63,73	50,03	58,43	–	+	+	62,87	77,00	56,63	69,15
BV-2				6,70	32,30	2,60	23,50				4,30	21,40	10,60	77,10
RAW 264.7				51,87	53,77	47,77	48,00				48,10	97,47	8,73	93,83

Şekil 53. N9, BV-2 ve Raw 264.7 hücre hatlarının 4T1 CM ile gerçekleştirilen farklı ko-kültür deneyleri sonucunda 24. Ve 48. Saatlerdeki ko-stimülatör belirteç düzeyleri.

Anti-CD3 uyarımı yapılmadan gerçekleşen ko-kültürlerde; N9 hücrelerinde birbirine yakın ekspresyon düzeyleri, BV-2 hücrelerinde CD80'nin eksik modülasyonu, Raw 264.7 hücrelerinde CD80, CD86 ve PD-L2 düzeyleri düşüktür. CD3 uyarımından bağımsız olarak 4T1 CM, Raw 264.7 ve BV-2 hücrelerinde, PD-L1 düzeyini düşürmektedir. BV-2 hücrelerinde genel olarak CD80, CD86 ve PD-L1 düzeylerinin düşük kalmasını desteklerken, N9 hücrelerinde bu belirteçlerin yüksek ekspresyonuna katkıda bulunur (Şekil 53).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Meme kanseri dünya genelinde kadınlarda en sık teşhis edilen ve en yüksek ölüm oranına sahip kanser tipidir. Üçlü negatif meme kanseri (*triple negative breast cancer,* TNBC) tüm meme kanseri alt tiplerinin %20'sini oluşturur. İmmün mikroçevre; TNBC oluşumunda, metastazında ve anjiyogenezinde ikili role sahiptir (Fan, & He, 2022). TNBC mikroçevresinde bulunan tümörle ilişkili makrofajlar (TAM'ler), miyeloid türevli baskılayıcı hücreler (*myeloid derived suppressor cells,* MDSC'ler), tümörle ilişkili nötrofiller (TAN'lar) ve Tie2 eksprese eden monositler tümörle ilişkili miyeloid hücrelerin (TAMC'ler) alt kümesini oluşturur ve immün baskılamada rol alırlar (Cha, & Koo, 2020; Liu ve ark., 2023; Nakamura, & Smyth, 2020; Schmid, & Varner, 2010; Toor ve ark., 2017; Yang ve ark., 2023).

TNBC mikroçevresindeki komponentler tümör kaynaklı kemotaktik faktörler ile dolaşımdaki monositleri toplayarak monositlerin TAM'lara farklılaşmasını indüklerler ve farklılaşan makrofajlar ortamdaki inflamasyonu başlatır. Literatüredeki çoğu çalışmada TNBC ve monosit/makrofaj etkileşiminin değerlendirilmesinde Raw 264.7 hücre hattı kullanılmıştır (Cao ve ark., 2021; Hsieh, & Wang, 2018; Lee, Lee, Lim, & Lim, 2022; Steenbrugge ve ark., 2018).

Literatürde TNBC hücre hatları olan 4T1 ve EMT6 ile kültürü yapılan Raw 264.7 hücre hattının iNos ekspresyon seviyesine göre M2 fenotipini desteklediği gösterilmiştir (Mas-Rosario ve ark., 2023).

Bizim çalışmamızda, Raw 264.7 hücre hattı tek başına kültürlendiğinde 24. saatte CD80 ve CD86 düzeyi daha yüksek iken PDL-1 ve PDL-2 ekspresyonları bazal seviyenin altında idi. İnkübasyon 48. saate devam ettirildiğinde hem CD80 ve CD86 düzeyleri hem de PDL-1 ve PDL-2 düzeyleri bazal seviyenin çok üstünde görüldü. Bu özellikleriyle Raw 264.7 hücre hattının T hücreler üzerinde güçlü bir inflamasyonu uyararak PD-1 üzerinden de inhibisyonu destekleyici bir karakterde olabileceğini düşündürmüştür. Bu hipotezimizi test etmek için de anti-fare CD3 uyarımı altında (antijen sunumu=ilk sinyali CD3 üzerinden verdiğimiz=ko-stimülasyon değerlendirmesi) Raw 264.7 hücre hatları splenositler ile beraber ko-kültür edilmiştir. Bu inkübasyonun 24. saatinde Raw 264.7 hücre hatlarında ilk başta yüksek düzeylerde PDL-1 ekspresyonu dikkat çekerken, 48. saatin sonunda baskın hücre karakterinde CD86 ve PDL-2 düzeyleri dikkat çekti. Anti-fare CD3 uyarımı yapılmayan koşullarda,

antijen spesifik yanıtların değerlendirildiği, ko-stimülasyon yanıtları değerlendirilmesi daha dolaylı olup, bu deney protokülünde anti-fare-CD3 koşulundan farklı olarak, PDL-2 düzeylerinde artış yerine ciddi bir düşüş saptandı. Bu veriler ışığında CD80, CD86, PDL-1 ve PDL-2 ko-stimülasyon aksı değerlendirildiğinde, anti-fare-CD3 koşulunda Raw 264.7 ün daha M2 karakterde davranabildiği yorumlandı. Ayrıca, 48. saatteki tek başına yapılan kültüründe de M2 karakteri litaratüre uyumlu olarak gözlendi. Raw 264.7 hücre hattı Balb/c fare türünden elde edilmiş bir hücre hattı olup (Taciak ve ark., 2018) yine bu farenin splenositleri ile ko-kültüre edildiği zaman aynı tür olduğu için T hücreleri aktive etme yönünde bir karakteri desteklenmemiştir.

TME'de bulunan miyeloid hücre popülasyonunun çoğu kemik iliği türevli olsa da doku yerleşik miyeloid hücreler de mikroçevrede bulunarak kanser prognozunda rol alır (Singh, Zhang, & Rosen, 2020; Yang ve ark., 2023). Tüm beyin tümörlerinin %20'sini primer meme kanseri beyin metastazı oluşturur. Meme kanseri metastazında beyin, akciğerden sonra ikinci görülme sıklığı olan bölgedir (Nakhjavani, Samarasinghe, & Shigdar, 2022). Metastatik meme tümörü hücreleri beyin doku yerleşik makrofajı olan mikroglia hücrelerinin polarizasyonunu etkileyerek beyin metastazı için tümör destekleyici immün yanıtın oluşmasında rol alır (Soto, & Sibson, 2018; You, Baluszek, & Kaminska, 2019).

Mikroglialaın metastatik beyin tümörü prognozundaki rolleri ile ilgili deneysel çalışmalar sınırlı olup klinik olgulardaki rollerinin anlaşılması için literatürde varolan çalışmalar yeterli değildir (Gruosso ve ark., 2019; Pukrop ve ark., 2010).
Literatürde kanser çalışmalarında kullanılan mikroglia hücre hatları sınırlı olup, nöro-inflamatuar ve mikroglial TLR sinyalizasyonu ile ilgili araştırmalarda en sık çalışılan N9 ve BV-2 mikroglia hücre hatları tez deneyleri kapsamında kullanılmıştır (Bianco ve ark., 2005; Das ve ark., 2016; Duan ve ark., 2013; Oliveira ve ark., 2021; Stansley, Post, & Hensley, 2012; Zhang, Geula, Lu, Koziel, Hatcher, & Roisen, 2003).

N9 ve Bv-2 mikroglia hücre hatlarının benzerlikleri bulunsa da bu iki farklı hücre hattının bazı farklılıkları literatürde gösterilmiştir. Yapılan çalışmaların geneli değerlendirildiğinde, bu iki hücre hattının farklı fagositik aktivitelere sahip olduğu gözlenmiştir. BV-2 hücrelerinin yoğun fagositik aktiviteye sahip olduğu fakat güçlü salgılama aktivitesi bulundurmadığı, (Blasi, Barluzzi, Bocchini, Mazzolla, & Bistoni, 1990) N9 Hücrelerinin ise yoğun salgılama aktivitesine (solid secretory activity) sahip

olarak TNF-a, IL-6, MCP-1 ve IL-8 gibi reaktif nitrojen ara maddeleri ve sitokinler ürettiği gösterilmiştir. Bu iki hücre hattının farklı fare ırklarından türevlenmesi iki hücre hattı arasındaki farklılıkların nedeni olarak öngörülmektedir (Wang, Peng, & Yan, 2021; Zhang, Geula, Lu, Koziel, Hatcher, & Roisen, 2003).

Tez kapsamında yapılan mikroglia ve T hücre ko-kültürü sonrasında PI ile canlılık analiz sonuçları BV-2 ve N9 için benzerlik gösterse de, özellikle BV-2 hücrelerinin 48 saat boyunca T hücre etkileşimi sonrasında T hücre ölümü N9' a göre daha yüksek bulunmuştur. Bu durum fagositik özelliklerden olabileceği gibi düşünülse de ileri deneyler ile bu mekanizma kanıtlanmalıdır. Yüzey belirteçleri karşılaştırıldığında, N9 tek başına kültüre edildiğinde 24. saatten itibaren CD80 ve CD86 düzeyleri % ekspresyonları değerlendirildiğinde oldukça yüksek iken, PDL-2'nin hem % ekspresyon hem de MFI değerleri yüksekti. BV-2'nin ise, tüm zaman aralıklarında CD86 ve PDL-2 düzeyleri daha yüksek idi. N9 hücre hattı 4T1 kaynaklı sekrete edilen faktörler neticesinde hem CD80 ve CD86 hem de immün baskılayıcı moleküllerden PDL-1 ve PDL-2 ekspresyonlarını arttırdı. Ayrıca, N9, Raw 264.7 ve BV-2'den salgılanan faktörler değerlendirildiğinde, sırasıyla N9> Raw 264.7> BV-2'nin EMT6 invazyonunu arttırdığı (scratch) görüldü. N9 mikroglial bir hücre hattı olup, diğer kemik iliği kaynaklı Raw 264.7 ve BV-2'den daha baskılayıcı ve meme kanseri beyin metastazını destekleyebileceği düşünülmüştür. İmmün konuşma sonrası özellikle EMT6'dan salgılanan faktörlere bakıldığı zaman ise, 48. Saatte CD86 ve PDL-2 düzeylerine en yüksek seviyede uyardığı görüldü. BV-2'nin bu etkileri ile ilgili deneyler ilerleyen süreçte tamamlanacaktır. PDL-1 düzeyi ise N9 hücrelerinde en yüksek seviyeye EMT6'dan salgılanan faktörlerle 72. Saatteki inkübasyonda görüldü (w/o CD3). N9 ile T hücre etkileşimi sonrasında PDL-2 üzerinden bir modülasyon göstermiştir. Yapılan scratch assay deneyleri ile, BV-2 hücrelerinin salgıladığı faktörlerlerin EMT6 hücreleri üzerinde N9'a göre daha stabil bir etkisinin olması, salgılama kapasitesi farkından kaynaklı olduğu düşünülmektedir.

4T1 ve EMT6, literatürede TNBC çalışmaları için en yaygın kullanılan hücre hatlarıdır (Bourgeois-Daigneault ve ark., 2018; Wang ve ark., 2020). Bu iki hücre hattı kıyaslandığında 4T1'in daha agrasif bir karaktere sahip olduğu bilinmektedir (Mas-Rosario, Medor, Jeffway, Martínez-Montes, & Farkas, 2023; Piranlioglu ve ark., 2019). Yapılan in-vivo çalışmalarda 4T1 taşıyan farelerde EMT6 taşıyan farelere

oranla daha fazla MDSC infiltrasyonu olduğu bulunmuştur ve bu sonuç 4T1'in daha invaziv olması ile ilişkilendirilmiştir (Oh ve ark., 2013).

Raw 264.7 kemik iliği türevli monosit/makrofaj hücre hattı tek başına M2 - benzeri karakter göstermişti. 4T1 ve EMT6 hücre hatlarından salgılanmış faktörler ile kültüre edildiğinde, bu hücre hattının 24. saatin sonunda PDL-1 düzeyleri artış gösterirken, 48. Saatte PDL-2 artışı her iki hücreden salgılanan faktörlerle de daha fazla desteklenmiştir. Özellikle, 4T1'den salgılanan koşullarda hem %ekspresyon hem de hücre başına düşen molekül sayısı (MFI) değerlendirildiğinde, bu artış daha belirgin görüldü. Splenositlerle yapılan ve anti-fare CD3 uyarım koşullarında bu hücrenin 4T1'den salgılanan faktörlerle CD80 düzeyinin düşüş trendinde olduğu, CD86 ve PDL-2 düzelerinin belirgin şekilde artış gösterdiği görüldü. EMT6'dan salgılanan faktörler de CD86 düzeyini arttırmış olup, bu artış % ekspresyon düzeyinde daha belirgindir. Akut miyeloid lösemide (AML) CD86+ blastlarının daha immün baskılayıcı olduğu ve bu fenotipe sahip hastaların daha kötü prognoza sahip olduğu bildirilmiştir (Dolen, & Esendagli, 2013). Bu çalışmada da, kanserden salgılanan faktörler ve T hücre etkileşiminde yine aynı alt-popülasyonun çıkması daha da immün baskılayıcı bir M2 karakterini doğrulamaktadır. Antijen spresifik yanıtlar üzerinden gerçekleşen ko-kültürlerde ise (w/o anti-fare CD3), diğer koşullara kıyasla en fazla 4T1 hücrelerinden salgılanan faktörlerin hem % ekspresyon hem de MFI düzeyinde CD86 ve PDL-2'de ciddi bir uyarımı gerçekleştirdiği görülmüştür.

Bu çalışmamızda mikroglial hücrelerin fenotipik ve fonksiyonel kapasitelerinin meme kanseri beyin metazındaki rolü üzerine etkileri araştırılmıştır. Kemik iliği kaynaklı makrofajlardan farklı bir immün modülasyona kapasitesine sahip olabildikleri özellikle ko-stimülasyon düzeyinde ilk kez ortaya koyulmuştur. Ayrıca, mikrogliaların kendi içlerindeki farklılıklarının da bu mekanizmadaki rolü ile ilgili ilk bulgular elde edilmiştir. İlerleyen çalışmalarımızda bu mekanizmanın detayları araştırılacaktır.

6. KAYNAKLAR

An, G., Wu, F., Huang, S., Feng, L., Bai, J., Gu, S., & Zhao, X. (2019). Effects of CCL5 on the biological behavior of breast cancer and the mechanisms of its interaction with tumor-associated macrophages. *Oncology Reports*, *42*(6), 2499–2511. https://doi.org/10.3892/or.2019.7344

Arpino, G., Bardou, V. J., Clark, G. M., & Elledge, R. M. (2004). Infiltrating lobular carcinoma of the breast: tumor characteristics and clinical outcome. *Breast cancer Research: BCR*, *6*(3), R149–R156. https://doi.org/10.1186/bcr767

Bianco, F., Fumagalli, M., Pravettoni, E., D'Ambrosi, N., Volonte, C., Matteoli, M., Abbracchio, M. P., & Verderio, C. (2005). Pathophysiological roles of extracellular nucleotides in glial cells: differential expression of purinergic receptors in resting and activated microglia. *Brain research. Brain Research Reviews*, *48*(2), 144–156. https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2004.12.004

Blasi, E., Barluzzi, R., Bocchini, V., Mazzolla, R., & Bistoni, F. (1990). Immortalization of murine microglial cells by a v-raf/v-myc carrying retrovirus. *Journal of Neuroimmunology*, 27(2-3), 229–237. https://doi.org/10.1016/0165-5728(90)90073-v

Bourgeois-Daigneault, M. C., Roy, D. G., Aitken, A. S., El Sayes, N., Martin, N. T., Varette, O., Falls, T., St-Germain, L. E., Pelin, A., Lichty, B. D., Stojdl, D. F., Ungerechts, G., Diallo, J. S., & Bell, J. C. (2018). Neoadjuvant oncolytic virotherapy before surgery sensitizes triple-negative breast cancer to immune checkpoint therapy. *Science Translational Medicine*, *10*(422), eaao1641. https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aao1641

Burns, J. C., Ransohoff, R. M., & Mingueneau, M. (2021). Isolation of Microglia and Analysis of Protein Expression by Flow Cytometry: Avoiding the Pitfall of Microglia Background Autofluorescence. *Bio-protocol*, *11*(14), e4091. https://doi.org/10.21769/BioProtoc.4091

Butovsky, O., Jedrychowski, M. P., Moore, C. S., Cialic, R., Lanser, A. J., Gabriely, G., Koeglsperger, T., Dake, B., Wu, P. M., Doykan, C. E., Fanek, Z., Liu, L., Chen, Z., Rothstein, J. D., Ransohoff, R. M., Gygi, S. P., Antel, J. P., & Weiner, H. L. (2014). Identification of a unique TGF-β-dependent molecular and functional signature in microglia. *Nature Neuroscience*, *17*(1), 131–143. https://doi.org/10.1038/nn.3599

Cao, X., Li, B., Chen, J., Dang, J., Chen, S., Gunes, E. G., Xu, B., Tian, L., Muend, S., Raoof, M., Querfeld, C., Yu, J., Rosen, S. T., Wang, Y., & Feng, M. (2021). Effect of cabazitaxel on macrophages improves CD47-targeted immunotherapy for triple-negative breast cancer. *Journal for Immunotherapy of Cancer, 9*(3), e002022. https://doi.org/10.1136/jitc-2020-002022

Carey, L. A., Perou, C. M., Livasy, C. A., Dressler, L. G., Cowan, D., Conway, K., Karaca, G., Troester, M. A., Tse, C. K., Edmiston, S., Deming, S. L., Geradts, J., Cheang, M. C., Nielsen, T. O., Moorman, P. G., Earp, H. S., & Millikan, R. C. (2006). Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA*, *295*(21), 2492–2502. https://doi.org/10.1001/jama.295.21.2492

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

Chambers, C. A., & Allison, J. P. (1999). Costimulatory regulation of T cell function. *Current Opinion in Cell Biology*, *11*(2), 203–210. https://doi.org/10.1016/s0955-0674(99)80027-1

Chen, W., Hoffmann, A. D., Liu, H., & Liu, X. (2018). Organotropism: new insights into molecular mechanisms of breast cancer metastasis. *NPJ Precision Oncology*, *2*(1), 4. https://doi.org/10.1038/s41698-018-0047-0

Chow, A., Brown, B. D., & Merad, M. (2011). Studying the mononuclear phagocyte system in the molecular age. *Nature Reviews. Immunology*, *11*(11), 788–798. https://doi.org/10.1038/nri3087

Cilibrasi, C., Papanastasopoulos, P., Samuels, M., & Giamas, G. (2021). Reconstituting Immune Surveillance in Breast Cancer: Molecular Pathophysiology and Current Immunotherapy Strategies. *International journal of Molecular Sciences*, *22*(21), 12015. https://doi.org/10.3390/ijms222112015

Cominetti, M. R., Altei, W. F., & Selistre-de-Araujo, H. S. (2019). Metastasis inhibition in breast cancer by targeting cancer cell extravasation. *Breast Cancer (Dove Medical Press)*, *11*, 165–178. https://doi.org/10.2147/BCTT.S166725

Cotechini, T., Atallah, A., & Grossman, A. (2021). Tissue-Resident and Recruited Macrophages in Primary Tumor and Metastatic Microenvironments: Potential Targets in Cancer Therapy. *Cells*, *10*(4), 960. https://doi.org/10.3390/cells10040960

Creighton C. J. (2012). The molecular profile of luminal B breast cancer. *Biologics: Targets & Therapy*, *6*, 289–297. https://doi.org/10.2147/BTT.S29923

Cronin, S. J., & Penninger, J. M. (2007). From T-cell activation signals to signaling control of anti-cancer immunity. *Immunological Reviews*, *220*, 151–168. https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2007.00570.x

Das, A., Kim, S. H., Arifuzzaman, S., Yoon, T., Chai, J. C., Lee, Y. S., Park, K. S., Jung, K. H., & Chai, Y. G. (2016). Transcriptome sequencing reveals that LPS-triggered transcriptional responses in established microglia BV2 cell lines are poorly representative of primary microglia. *Journal of Neuroinflammation*, *13*(1), 182. https://doi.org/10.1186/s12974-016-0644-1

Deshmane, S. L., Kremlev, S., Amini, S., & Sawaya, B. E. (2009). Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *Journal of interferon & cytokine research: the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*, *29*(6), 313–326. https://doi.org/10.1089/jir.2008.0027

Dogan, A.L. (2016). Biology and Genetics of Breast Cancer. In: Aydiner, A., İğci, A., Soran, A. (eds) *Breast Disease. Springer, Cham.* https://doi.org/10.1007/978-3-319-22843-3_8

Dolen, Y., & Esendagli, G. (2013). Myeloid leukemia cells with a B7-2(+) subpopulation provoke Th-cell responses and become immuno-suppressive through the modulation of B7 ligands. *European Journal of Immunology*, *43*(3), 747–757. https://doi.org/10.1002/eji.201242814

Duan, L., Chen, B. Y., Sun, X. L., Luo, Z. J., Rao, Z. R., Wang, J. J., & Chen, L. W. (2013). LPS-induced proNGF synthesis and release in the N9 and BV2 microglial cells: a new pathway underling microglial toxicity in neuroinflammation. *PloS one,* 8(9), e73768. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073768

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

Felipe Lima, J., Nofech-Mozes, S., Bayani, J., & Bartlett, J. M. (2016). EMT in Breast Carcinoma-A Review. *Journal of Clinical Medicine*, *5*(7), 65. https://doi.org/10.3390/jcm5070065

Gatti-Mays, M. E., Balko, J. M., Gameiro, S. R., Bear, H. D., Prabhakaran, S., Fukui, J., Disis, M. L., Nanda, R., Gulley, J. L., Kalinsky, K., Abdul Sater, H., Sparano, J. A., Cescon, D., Page, D. B., McArthur, H., Adams, S., & Mittendorf, E. A. (2019). If we build it they will come: targeting the immune response to breast cancer. *NPJ Breast Cancer*, *5*, 37. https://doi.org/10.1038/s41523-019-0133-7

Geissmann, F., Manz, M. G., Jung, S., Sieweke, M. H., Merad, M., & Ley, K. (2010). Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science (New York, N.Y.)*, *327*(5966), 656–661. https://doi.org/10.1126/science.1178331

Ginhoux, F., Lim, S., Hoeffel, G., Low, D., & Huber, T. (2013). Origin and differentiation of microglia. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *7*, 45. https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00045

Gruosso, T., Gigoux, M., Manem, V. S. K., Bertos, N., Zuo, D., Perlitch, I., Saleh, S. M. I., Zhao, H., Souleimanova, M., Johnson, R. M., Monette, A., Ramos, V. M., Hallett, M. T., Stagg, J., Lapointe, R., Omeroglu, A., Meterissian, S., Buisseret, L., Van den Eynden, G., Salgado, R., … Park, M. (2019). Spatially distinct tumor immune microenvironments stratify triple-negative breast cancers. *The Journal of Clinical investigation, 1*29(4), 1785–1800. https://doi.org/10.1172/JCI96313

Guilliams, M., & Scott, C. L. (2017). Does niche competition determine the origin of tissue-resident macrophages? *Nature Reviews. Immunology*, *17*(7), 451–460. https://doi.org/10.1038/nri.2017.42

Güç, E., & Pollard, J. W. (2021). Redefining macrophage and neutrophil biology in the metastatic cascade. *Immunity*, *54*(5), 885–902. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.03.022

Hettinger, J., Richards, D. M., Hansson, J., Barra, M. M., Joschko, A. C., Krijgsveld, J., & Feuerer, M. (2013). Origin of monocytes and macrophages in a committed progenitor. *Nature Immunology*, *14*(8), 821–830. https://doi.org/10.1038/ni.2638

Hill, B. S., Sarnella, A., D'Avino, G., & Zannetti, A. (2020). Recruitment of stromal cells into tumour microenvironment promote the metastatic spread of breast cancer. *Seminars in Cancer Biology*, *60*, 202–213. https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.07.028

Hsieh, C. C., & Wang, C. H. (2018). Aspirin Disrupts the Crosstalk of Angiogenic and Inflammatory Cytokines between 4T1 Breast Cancer Cells and Macrophages. *Mediators of Inflammation*, *2018*, 6380643. https://doi.org/10.1155/2018/6380643

Italiani, P., & Boraschi, D. (2014). From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation. *Frontiers in Immunology*, *5*, 514. https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00514

Januškevičienė, I., & Petrikaitė, V. (2019). Heterogeneity of breast cancer: The importance of interaction between different tumor cell populations. *Life Sciences*, *239*, 117009. https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.117009

Kanchan, R. K., Siddiqui, J. A., Mahapatra, S., Batra, S. K., & Nasser, M. W. (2020). microRNAs Orchestrate Pathophysiology of Breast Cancer Brain Metastasis: Advances in Therapy. *Molecular Cancer,* 19(1), 29. https://doi.org/10.1186/s12943-020-1140-x

Kavarthapu, R., Anbazhagan, R., & Dufau, M. L. (2021). Crosstalk between PRLR and EGFR/HER2 Signaling Pathways in Breast Cancer. *Cancers*, *13*(18), 4685. https://doi.org/10.3390/cancers13184685

Kennecke, H., Yerushalmi, R., Woods, R., Cheang, M. C., Voduc, D., Speers, C. H., Nielsen, T. O., & Gelmon, K. (2010). Metastatic behavior of breast cancer subtypes. *Journal of Clinical Oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, *28*(20), 3271–3277. https://doi.org/10.1200/JCO.2009.25.9820

Kharel, S., Shrestha, S., Yadav, S., Shakya, P., Baidya, S., & Hirachan, S. (2022). *BRCA1*/*BRCA2* mutation spectrum analysis in South Asia: a systematic review. *The Journal of International Medical Research*, *50*(1), 3000605211070757. https://doi.org/10.1177/03000605211070757

Kim M. Y. (2021). Breast Cancer Metastasis. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *1187*, 183–204. https://doi.org/10.1007/978-981-32-9620-6_9

Kim, R., Emi, M., & Tanabe, K. (2007). Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology*, *121*(1), 1–14. https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2007.02587.x

Lan, H. R., Du, W. L., Liu, Y., Mao, C. S., Jin, K. T., & Yang, X. (2021). Role of immune regulatory cells in breast cancer: Foe or friend? *International Immunopharmacology*, *96*, 107627. https://doi.org/10.1016/j.intimp.2021.107627

Lee, E., Eo, J. C., Lee, C., & Yu, J. W. (2021). Distinct Features of Brain-Resident Macrophages: Microglia and Non-Parenchymal Brain Macrophages. *Molecules and Cells*, *44*(5), 281–291. https://doi.org/10.14348/molcells.2021.0060

Lee, J. K., & Tansey, M. G. (2013). Microglia isolation from adult mouse brain. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *1041*, 17–23. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-520-0_3

Lee, S., Lee, A., Lim, J., & Lim, J. S. (2022). Regulation of tumor-associated macrophage (TAM) differentiation by NDRG2 expression in breast cancer cells. *BMB Reports*, *55*(2), 81–86. https://doi.org/10.5483/BMBRep.2022.55.2.114

Li, C. J., Tzeng, Y. T., Chiu, Y. H., Lin, H. Y., Hou, M. F., & Chu, P. Y. (2021). Pathogenesis and Potential Therapeutic Targets for Triple-Negative Breast Cancer. *Cancers*, *13*(12), 2978. https://doi.org/10.3390/cancers13122978

Li, Q., & Barres, B. A. (2018). Microglia and macrophages in brain homeostasis and disease. *Nature Reviews. Immunology*, *18*(4), 225–242. https://doi.org/10.1038/nri.2017.125

Liu, Y., & Cao, X. (2016). Characteristics and Significance of the Pre-metastatic Niche. *Cancer Cell*, *30*(5), 668–681. https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.09.011

Liu, Y., Hu, Y., Xue, J., Li, J., Yi, J., Bu, J., Zhang, Z., Qiu, P., & Gu, X. (2023). Advances in immunotherapy for triple-negative breast cancer. *Molecular Cancer,* 22(1), 145. https://doi.org/10.1186/s12943-023-01850-7

Liu, Y., Komohara, Y., Domenick, N., Ohno, M., Ikeura, M., Hamilton, R. L., Horbinski, C., Wang, X., Ferrone, S., & Okada, H. (2012). Expression of antigen processing and presenting molecules in brain metastasis of breast cancer. *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII*, *61*(6), 789–801. https://doi.org/10.1007/s00262-011-1137-9

Louis, D. M., Nair, L. M., Vallonthaiel, A. G., Narmadha, M. P., & Vijaykumar, D. K. (2023). Ki 67: a Promising Prognostic Marker in Early Breast Cancer-a Review Article. *Indian Journal of Surgical Oncology*, *14*(1), 122–127. https://doi.org/10.1007/s13193-022-01631-6

Maj, T., Wei, S., Welling, T., & Zou, W. (2013). T cells and costimulation in cancer. *Cancer Journal (Sudbury, Mass.)*, *19*(6), 473–482. https://doi.org/10.1097/PPO.0000000000000002

Mantovani, A., Marchesi, F., Porta, C., Sica, A., & Allavena, P. (2007). Inflammation and cancer: breast cancer as a prototype. *Breast (Edinburgh, Scotland)*, *16 Suppl 2*, S27–S33. https://doi.org/10.1016/j.breast.2007.07.013

Mas-Rosario, J. A., Medor, J. D., Jeffway, M. I., Martínez-Montes, J. M., & Farkas, M. E. (2023). Murine macrophage-based iNos reporter reveals polarization and reprogramming in the context of breast cancer. *Frontiers in Oncology*, *13*, 1151384. https://doi.org/10.3389/fonc.2023.1151384

McGrath, K. E., Frame, J. M., & Palis, J. (2015). Early hematopoiesis and macrophage development. *Seminars in Immunology*, *27*(6), 379–387. https://doi.org/10.1016/j.smim.2016.03.013

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

Milner, M. T., Lawrence, G. M., Holley, C. L., Bodea, L. G., Götz, J., Burgener, S. S., & Schroder, K. (2022). Isolation and culture of pure adult mouse microglia and astrocytes for *in vitro* characterization and analyses. *STAR Protocols*, *3*(2), 101295. https://doi.org/10.1016/j.xpro.2022.101295

Montes, V. N., Turner, M. S., Subramanian, S., Ding, Y., Hayden-Ledbetter, M., Slater, S., Goodspeed, L., Wang, S., Omer, M., Den Hartigh, L. J., Averill, M. M., O'Brien, K. D., Ledbetter, J., & Chait, A. (2013). T cell activation inhibitors reduce CD8+ T cell and pro-inflammatory macrophage accumulation in adipose tissue of obese mice. *PloS One*, *8*(7), e67709. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067709

Nakamura, K., & Smyth, M. J. (2020). Myeloid immunosuppression and immune checkpoints in the tumor microenvironment. *Cellular & Molecular Immunology*, 17(1), 1–12. https://doi.org/10.1038/s41423-019-0306-1

Nakhjavani, M., Samarasinghe, R. M., & Shigdar, S. (2022). Triple-negative breast cancer brain metastasis: An update on druggable targets, current clinical trials, and future treatment options. *Drug Discovery Today, 27(5),* 1298–1314. https://doi.org/10.1016/j.drudis.2022.01.010.

Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., & Helmchen, F. (2005). Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science (New York, N.Y.),* 308(5726), 1314–1318. https://doi.org/10.1126/science.1110647

Oh, K., Lee, O. Y., Shon, S. Y., Nam, O., Ryu, P. M., Seo, M. W., & Lee, D. S. (2013). A mutual activation loop between breast cancer cells and myeloid-derived suppressor cells facilitates spontaneous metastasis through IL-6 trans-signaling in a murine model. *Breast Cancer Research: BCR*, *15*(5), R79. https://doi.org/10.1186/bcr3473

Okabe, Y., & Medzhitov, R. (2016). Tissue biology perspective on macrophages. *Nature Immunology, 17(1), 9–17.* https://doi.org/10.1038/ni.3320

Oliveira, S. R., Dionísio, P. A., Gaspar, M. M., Correia Guedes, L., Coelho, M., Rosa, M. M., Ferreira, J. J., Amaral, J. D., & Rodrigues, C. M. P. (2021). miR-335 Targets LRRK2 and Mitigates Inflammation in Parkinson's Disease. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 661461. https://doi.org/10.3389/fcell.2021.661461

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.*

Ostuni, R., Kratochvill, F., Murray, P. J., & Natoli, G. (2015). Macrophages and cancer: from mechanisms to therapeutic implications. *Trends in Immunology, 36(4), 229–239*. https://doi.org/10.1016/j.it.2015.02.004

Padua, D., Zhang, X. H., Wang, Q., Nadal, C., Gerald, W. L., Gomis, R. R., & Massagué, J. (2008). TGFbeta primes breast tumors for lung metastasis seeding through angiopoietin-like 4. *Cell, 133(1), 66–77*. https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.046

Piranlioglu, R., Lee, E., Ouzounova, M., Bollag, R. J., Vinyard, A. H., Arbab, A. S., Marasco, D., Guzel, M., Cowell, J. K., Thangaraju, M., Chadli, A., Hassan, K. A., Wicha, M. S., Celis, E., & Korkaya, H. (2019). Primary tumor-induced immunity eradicates disseminated tumor cells in syngeneic mouse model. *Nature Communications*, *10*(1), 1430. https://doi.org/10.1038/s41467-019-09015-1

Prinz, M., & Priller, J. (2014). Microglia and brain macrophages in the molecular age: from origin to neuropsychiatric disease. Nature reviews. *Neuroscience, 15(5), 300–312*. https://doi.org/10.1038/nrn3722

Pukrop, T., Dehghani, F., Chuang, H. N., Lohaus, R., Bayanga, K., Heermann, S., Regen, T., Van Rossum, D., Klemm, F., Schulz, M., Siam, L., Hoffmann, A., Trümper, L., Stadelmann, C., Bechmann, I., Hanisch, U. K., & Binder, C. (2010). Microglia promote colonization of brain tissue by breast cancer cells in a Wnt-dependent way. *Glia, 58(12), 1477–1489*. https://doi.org/10.1002/glia.21022.

Qian, B. Z., Li, J., Zhang, H., Kitamura, T., Zhang, J., Campion, L. R., Kaiser, E. A., Snyder, L. A., & Pollard, J. W. (2011). CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. *Nature, 475(7355), 222–225*. https://doi.org/10.1038/nature10138

Ravindranathan, S., Nguyen, K. G., Kurtz, S. L., Frazier, H. N., Smith, S. G., Koppolu, B. P., Rajaram, N., & Zaharoff, D. A. (2018). Tumor-derived granulocyte colony-stimulating factor diminishes efficacy of breast tumor cell vaccines. *Breast cancer Research: BCR, 20(1), 126*. https://doi.org/10.1186/s13058-018-1054-3

Reis-Filho, J. S., Weigelt, B., Fumagalli, D., & Sotiriou, C. (2010). Molecular profiling: moving away from tumor philately. *Science Translational Medicine, 2(47), 47ps43*. https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3001329

Romero, S., Musleh, M., Bustamante, M., Stambuk, J., Pisano, R., Lanzarini, E., Chiong, H., Rojas, J., Castro, V. G., Jara, L., Berger, Z., & Gonzalez-Hormazabal, P. (2018). Polymorphisms in TWIST1 and ZEB1 Are Associated with Prognosis of Gastric Cancer Patients. *Anticancer Research, 38(7), 3871–3877*. https://doi.org/10.21873/anticanres.12671

Roussos, E. T., Condeelis, J. S., & Patsialou, A. (2011). Chemotaxis in cancer. *Nature Reviews. Cancer, 11(8), 573–587*. https://doi.org/10.1038/nrc3078

Sakowska, J., Arcimowicz, Ł., Jankowiak, M., Papak, I., Markiewicz, A., Dziubek, K., Kurkowiak, M., Kote, S., Kaźmierczak-Siedlecka, K., Połom, K., Marek-Trzonkowska, N., & Trzonkowski, P. (2022). Autoimmunity and Cancer-Two Sides of the Same Coin. *Frontiers in Immunology, 13, 793234*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.793234

Sampson, J. H., Gunn, M. D., Fecci, P. E., & Ashley, D. M. (2020). Brain immunology and immunotherapy in brain tumours. Nature reviews. *Cancer, 20(1), 12–25*. https://doi.org/10.1038/s41568-019-0224-7

Schlam, I., & Gatti-Mays, M. E. (2022). Immune Checkpoint Inhibitors in the Treatment of Breast Cancer Brain Metastases. *The Oncologist*, *27*(7), 538–547. https://doi.org/10.1093/oncolo/oyac064

Schmid, M. C., & Varner, J. A. (2010). Myeloid cells in the tumor microenvironment: modulation of tumor angiogenesis and tumor inflammation. *Journal of Oncology*, *2010*, 201026. https://doi.org/10.1155/2010/201026

Sevenich, L., Bowman, R. L., Mason, S. D., Quail, D. F., Rapaport, F., Elie, B. T., Brogi, E., Brastianos, P. K., Hahn, W. C., Holsinger, L. J., Massagué, J., Leslie, C. S., & Joyce, J. A. (2014). Analysis of tumour- and stroma-supplied proteolytic networks reveals a brain-metastasis-promoting role for cathepsin S. *Nature Cell Biology, 16(9), 876–888.* https://doi.org/10.1038/ncb3011

Shaath, H., Elango, R., & Alajez, N. M. (2021). Molecular Classification of Breast Cancer Utilizing Long Non-Coding RNA (lncRNA) Transcriptomes Identifies Novel Diagnostic lncRNA Panel for Triple-Negative Breast Cancer. *Cancers, 13(21), 5350.* https://doi.org/10.3390/cancers13215350

Shapouri-Moghaddam, A., Mohammadian, S., Vazini, H., Taghadosi, M., Esmaeili, S. A., Mardani, F., Seifi, B., Mohammadi, A., Afshari, J. T., & Sahebkar, A. (2018). Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *Journal of Cellular Physiology, 233(9), 6425–6440.* https://doi.org/10.1002/jcp.26429

Shaul, M. E., & Fridlender, Z. G. (2017). Neutrophils as active regulators of the immune system in the tumor microenvironment. *Journal of Leukocyte Biology, 102(2), 343–349.* https://doi.org/10.1189/jlb.5MR1216-508R

Singh, S., Zhang, X. H. F., & Rosen, J. M. (2020). TIME Is a Great Healer-Targeting Myeloid Cells in the Tumor Immune Microenvironment to Improve Triple-Negative Breast Cancer Outcomes. *Cells,* 10(1), 11. https://doi.org/10.3390/cells10010011

Skapenko, A., Leipe, J., Lipsky, P. E., & Schulze-Koops, H. (2005). The role of the T cell in autoimmune inflammation. *Arthritis Research & Therapy, 7 Suppl 2(Suppl 2), S4–S14*. https://doi.org/10.1186/ar1703

Sørlie, T., Perou, C. M., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, H., Hastie, T., Eisen, M. B., van de Rijn, M., Jeffrey, S. S., Thorsen, T., Quist, H., Matese, J. C., Brown, P. O., Botstein, D., Lønning, P. E., & Børresen-Dale, A. L. (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 98(19), 10869–10874.* https://doi.org/10.1073/pnas.191367098

Sotiriou, C., Neo, S. Y., McShane, L. M., Korn, E. L., Long, P. M., Jazaeri, A., Martiat, P., Fox, S. B., Harris, A. L., & Liu, E. T. (2003). Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 100(18), 10393–10398.* https://doi.org/10.1073/pnas.1732912100

Soto, M. S., & Sibson, N. R. (2018). The Multifarious Role of Microglia in Brain Metastasis. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 12, 414. https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00414.

Sreejit, G., Fleetwood, A. J., Murphy, A. J., & Nagareddy, P. R. (2020). Origins and diversity of macrophages in health and disease. *Clinical & Translational Immunology, 9(12), e1222.* https://doi.org/10.1002/cti2.1222

Stansley, B., Post, J., & Hensley, K. (2012). A comparative review of cell culture systems for the study of microglial biology in Alzheimer's disease. *Journal of Neuroinflammation,* 9, 115. https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-115.

Steenbrugge, J., Breyne, K., Demeyere, K., De Wever, O., Sanders, N. N., Van Den Broeck, W., Colpaert, C., Vermeulen, P., Van Laere, S., & Meyer, E. (2018). Anti-inflammatory signaling by mammary tumor cells mediates prometastatic macrophage

polarization in an innovative intraductal mouse model for triple-negative breast cancer. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research: CR*, 37(1), 191. https://doi.org/10.1186/s13046-018-0860-x

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

Taciak, B., Białasek, M., Braniewska, A., Sas, Z., Sawicka, P., Kiraga, Ł., Rygiel, T., & Król, M. (2018). Evaluation of phenotypic and functional stability of RAW 264.7 cell line through serial passages. *PloS One*, *13*(6), e0198943. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198943

Tajbakhsh, A., Rivandi, M., Abedini, S., Pasdar, A., & Sahebkar, A. (2019). Regulators and mechanisms of anoikis in triple-negative breast cancer (TNBC): A review. *Critical Reviews in Oncology/Hematology, 140, 17–27*. https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2019.05.009

Tariq, M., Zhang, J., Liang, G., Ding, L., He, Q., & Yang, B. (2017). Macrophage Polarization: Anti-Cancer Strategies to Target Tumor-Associated Macrophage in Breast Cancer. *Journal of Cellular Biochemistry, 118(9), 2484–2501.* https://doi.org/10.1002/jcb.25895

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

Tevaarwerk, A. J., Gray, R. J., Schneider, B. P., Smith, M. L., Wagner, L. I., Fetting, J. H., Davidson, N., Goldstein, L. J., Miller, K. D., & Sparano, J. A. (2013). Survival in patients with metastatic recurrent breast cancer after adjuvant chemotherapy: little evidence of improvement over the past 30 years. *Cancer, 119(6), 1140–1148.* https://doi.org/10.1002/cncr.27819

Toor, S. M., Syed Khaja, A. S., El Salhat, H., Faour, I., Kanbar, J., Quadri, A. A., Albashir, M., & Elkord, E. (2017). Myeloid cells in circulation and tumor microenvironment of breast cancer patients. *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII,* 66(6), 753–764. https://doi.org/10.1007/s00262-017-1977-z

Tower, H., Ruppert, M., & Britt, K. (2019). The Immune Microenvironment of Breast Cancer Progression. *Cancers, 11(9), 1375.* https://doi.org/10.3390/cancers11091375

van 't Veer, L. J., Dai, H., van de Vijver, M. J., He, Y. D., Hart, A. A., Mao, M., Peterse, H. L., van der Kooy, K., Marton, M. J., Witteveen, A. T., Schreiber, G. J., Kerkhoven, R. M., Roberts, C., Linsley, P. S., Bernards, R., & Friend, S. H. (2002). Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature, 415(6871), 530–536.* https://doi.org/10.1038/415530a

Viola, A., Munari, F., Sánchez-Rodríguez, R., Scolaro, T., & Castegna, A. (2019). The Metabolic Signature of Macrophage Responses. *Frontiers in Immunology, 10, 1462*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01462

Wang, N., Liang, H., & Zen, K. (2014). Molecular mechanisms that influence the macrophage m1-m2 polarization balance. *Frontiers in Immunology, 5, 614.* https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00614

Wang, Y., Peng, Y., & Yan, H. (2021). Commentary: Neuroinflammatory In Vitro Cell Culture Models and the Potential Applications for Neurological Disorders. *Frontiers in Pharmacology,* 12, 792614. https://doi.org/10.3389/fphar.2021.792614

Wang, Y., Ye, F., Liang, Y., & Yang, Q. (2021). Breast cancer brain metastasis: insight into molecular mechanisms and therapeutic strategies. *British Journal of Cancer,* 125(8), 1056–1067. https://doi.org/10.1038/s41416-021-01424-8

Wang, Z., Yang, C., Li, L., Jin, X., Zhang, Z., Zheng, H., Pan, J., Shi, L., Jiang, Z., Su, K., Li, B., Shao, X., Qiu, F., Yan, J., & Huang, J. (2020). Tumor-derived HMGB1 induces CD62Ldim neutrophil polarization and promotes lung metastasis in triple-negative breast cancer. *Oncogenesis*, *9*(9), 82. https://doi.org/10.1038/s41389-020-00267-x

Watase, C., Shiino, S., Shimoi, T., Noguchi, E., Kaneda, T., Yamamoto, Y., Yonemori, K., Takayama, S., & Suto, A. (2021). Breast Cancer Brain Metastasis-Overview of Disease State, Treatment Options and Future Perspectives. *Cancers*, *13*(5), 1078. https://doi.org/10.3390/cancers13051078

Weagel E, Smith C, Liu PG, Robison R, O'Neill K (2015) Macrophage Polarization and Its Role in Cancer. *Journal of Clinical & Cellular Immunology 06(04)*. https://doi.org/10.4172/2155-9899.1000338

Weiskopf, K., Schnorr, P. J., Pang, W. W., Chao, M. P., Chhabra, A., Seita, J., Feng, M., & Weissman, I. L. (2016). Myeloid Cell Origins, Differentiation, and Clinical Implications. Microbiology spectrum, 4(5), 10.1128/microbiolspec.*MCHD-0031-2016*. https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MCHD-0031-2016

Williams, C. B., Yeh, E. S., & Soloff, A. C. (2016). Tumor-associated macrophages: unwitting accomplices in breast cancer malignancy. *NPJ Breast Cancer, 2, 15025–*. https://doi.org/10.1038/npjbcancer.2015.25

Wu, L., Saxena, S., Awaji, M., & Singh, R. K. (2019). Tumor-Associated Neutrophils in Cancer: Going Pro. *Cancers, 11(4), 564.* https://doi.org/10.3390/cancers11040564

Wu, Y., & Hirschi, K. K. (2021). Tissue-Resident Macrophage Development and Function. *Frontiers in Cell and Developmental Biology, 8, 617879*. https://doi.org/10.3389/fcell.2020.617879

Wu, Y., Sarkissyan, M., & Vadgama, J. V. (2016). Epithelial-Mesenchymal Transition and Breast Cancer. *Journal of Clinical Medicine, 5(2), 13.* https://doi.org/10.3390/jcm5020013

Xu, Y., Romero, R., Miller, D., Kadam, L., Mial, T. N., Plazyo, O., Garcia-Flores, V., Hassan, S. S., Xu, Z., Tarca, A. L., Drewlo, S., & Gomez-Lopez, N. (2016). An M1-like Macrophage Polarization in Decidual Tissue during Spontaneous Preterm Labor That Is Attenuated by Rosiglitazone Treatment. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950), 196(6), 2476–2491.* https://doi.org/10.4049/jimmunol.1502055

Yang, C., Liu, J., Zhao, S., Shang, Q., Ren, F., Feng, K., Zhang, R., Kang, X., Wang, X., & Wang, X. (2023). Infiltrating myeloid cell diversity determines oncological characteristics and clinical outcomes in breast cancer. *Breast Cancer Research: BCR,* 25(1), 63. https://doi.org/10.1186/s13058-023-01669-6,

Yates, L. R., Knappskog, S., Wedge, D., Farmery, J. H. R., Gonzalez, S., Martincorena, I., Alexandrov, L. B., Van Loo, P., Haugland, H. K., Lilleng, P. K., Gundem, G., Gerstung, M., Pappaemmanuil, E., Gazinska, P., Bhosle, S. G., Jones, D., Raine, K., Mudie, L., Latimer, C., Sawyer, E., … Campbell, P. J. (2017). Genomic Evolution of Breast Cancer Metastasis and Relapse. *Cancer Cell, 32(2), 169–184.e7.* https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.07.005

Yersal, O., & Barutca, S. (2014). Biological subtypes of breast cancer: Prognostic and therapeutic implications. *World Journal of Clinical Oncology, 5(3), 412–424.* https://doi.org/10.5306/wjco.v5.i3.412

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

You, H., Baluszek, S., & Kaminska, B. (2019). Immune Microenvironment of Brain Metastases-Are Microglia and Other Brain Macrophages Little Helpers? *Frontiers in Immunology, 10, 1941.* https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01941

Yunna, C., Mengru, H., Lei, W., & Weidong, C. (2020). Macrophage M1/M2 polarization. *European Journal of Pharmacology, 877, 173090*. https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173090

Zhang, J., Geula, C., Lu, C., Koziel, H., Hatcher, L. M., & Roisen, F. J. (2003). Neurotrophins regulate proliferation and survival of two microglial cell lines in vitro. *Experimental Neurology*, *183*(2), 469–481. https://doi.org/10.1016/s0014-4886(03)00222-x

,

7. SİMGELER VE KISALTMALAR

7AAD: 7-amino-aktinomisin D
AGM: Aorta-gonad-mezonefroz
ANGPTL4: Anjiyopoietin benzeri 4
APC: Antijen sunan hücre
Arg1: Arjinaz 1
ATP: Adenozin trifosfat
BBB: Kan-beyin bariyeri
BCBM: Meme kanseri beyin metastazı
bHLH: Temel sarmal-döngü-sarmal
BL1: Bazal benzeri 1
BL2: Bazal benzeri 2
BRCA: Meme kanseri duyarlılık
Breg: Düzenleyici B hücre
CAF: Kanser ilişkili fibroblast
CD8+T: Sitotoksik T lenfosit
CDP: DC öncülü
CFSE: Karboksifloresan Süksinimidil Ester
CK5/6: sitokeratin 5/6
CMP: Ortak myeloid hücre
CNS: Merkezi Sinir Sistemi
COX2: Cyclooxygenase-2
CSF-1: Koloni stimüle edici faktör 1
CSF: Beyin omurilik sıvısı
CTC: Sirküle tümör hücresi
CTSS: Katepsin S
CXCL: C-X-C kemokin ligand
CXCR: (C-X-C motif kemokin reseptör
DC: Dendritik hücre
DMEM F12: Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12
DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium
EGF: Epidermal Büyüme Faktörü
EGFR: Epidermal büyüme faktörü reseptörü
EMP: Eritro-miyeloid progenitörleri
EMT: Epitelyal-mezenkimal dönüşüm
ER: Östrojen reseptör pozitif
FBS: Fetal Bovine Serum
G-MDSC: Granülositik miyeloid kaynaklı baskılayıcı hücre
GLOBOCAN: Küresel kanser gözlem verisi
GM-CSF: Granülosit makrofaj-koloni uyarıcı faktör
GMP: Monosit-granülosit progenitor hücre
HBEGF: Heparin-binding EGF-like growth factor
HER2: İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü-2
HIF: Hipoksi ile indüklenebilir faktör
HLA: İnsan lökosit antijen
HSC: Hematopoetik kök hücre
IDC: İnvaziv duktal karsinom

IFN-γ: İnterferon gamma
IL: İnterlökin
ILC: İnvaziv lobüler karsinom
IM: İmmünomodülatör
İnvaziv: İnfiltre edici
LAR: Luminal androjen reseptörü
M-MDSC: Monositik miyeloid kaynaklı baskılayıcı hücre,
M: Mezenkimal
MCP-1/CCL2: Monosit kemoatraktan protein-1
MDP: Makrofaj/dendritik hücre progenitörü
MDSC: Myeloid baskılayıcı hücre
MET: Mezenkimal-epitelyal dönüşüm
MHC: Majör histo-uyumluluk kompleksi
MMP: Matriks metalloproteinaz
MMP2: Matrix metalloproteinase-2
MSL: Mezenkimal kök hücre benzeri
MTT: (4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
MTT: 3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
N1: anti-tümör nötrofil
N2: pro-tümör nötrofil
NK: Doğal öldürücü hücre
NKreg: Düzenleyici doğal öldürücü hücre
NKT: Doğal öldürücü T hücre
NKT: Doğal öldürücü T hücre
Organotropizm: Uzak organ metastazındaki organ seçilimi
PBS: Fosfat tamponlanmış tuz çözeltisi
PD-L1: Programlanmış ölüm ligandı 1
PD-L2: Programlanmış ölüm ligandı 2
PGE2: COX-2'den türetilmiş prostaglandin
PI: Propidium İyodür
PR: Progesteron reseptör pozitif
RPMI: Roswell Park Memorial Institute
ST6GalNac5: ST6 N-acetylgalactosaminide alpha-2,6-sialyltransferase 5
TAA: Tümör ilişkili antijen
TAM: Tümör ilişkili makrofaj
TAN: Tümör ilişkili nötrofil
TAP: Antijen işleme ile ilişkili taşıyıcı
TCR: T hücre reseptör
TGF-β: Transforme edici büyüme faktör- β
TLR: Toll benzeri Reseptör
TNBC: Üçlü Negatif Meme Kanseri
TNF- α: Tümör nekroz faktör- α
tolDC: Tolerojenik dendritik hücre
TP53: Tümör protein 53
TRAIL: Tümör nekrozis faktör ilişkili apoptozis indükleyici ligand
Treg: Düzeleyici T hücre
TWIST1: Twist-ilişkli protein 1
VEGF: Vasküler endotelyal büyüme faktörü

WHO: Dünya Sağlık Örgütü
ZEB1/2: Çinko parmak e-box bağlayıcı homeobax1/2
ZO-1: Zonula oklüdens-1

8. EKLER

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU (HADYEK)

Sayı: B.30.2.ULU.0.8Z.00.00/ 23.08.2022
Konu: Araştırma Projeniz

Sayın Dr. Öğr. Üyesi Diğdem YÖYEN ERMİŞ

Yürütücüsü olduğunuz *"Mikroglia ve T lenfosit etkileşimlerinin meme kanseri beyin metastazındaki rolü"* isimli çalışmanız Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 23.08.2022 tarihli toplantısında görüşülmüş olup kurul kararı ekte sunulmuştur. Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

Prof. Dr. Gökhan GÖKTALAY
HADYEK Başkanı

9. TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim süresince bilime attığım ilk adımlarımda araştırmacılığımı ve sorgulayıcılığımı geliştiren, bilgi birikimini ve tüm içtenliğiyle sevgisini benimle daima paylaşan, sıkılmadan azimle ve istikrarla çalışmayı yaşam biçimim haline getirmemi sağlayan, çok yönlülüğünü ve araştırmacı kimliğini kendime rol model aldığım değerli danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Diğdem YÖYEN ERMİŞ'e,

İmmünoloji bölümüne merak duymamda ve bu alana yönelmemde en büyük role sahip olan, lisans dönemimde yaptığım stajla tanıdığım, bilgi birikimiyle ufkumu açan İmmünoloji AD başkanımız değerli hocam Prof. Dr. H. Barbaros ORAL'a,

Sıcakkanlılığı ve samimiyetiyle rahatlıkla fikirlerine ve bilgilerine danışabildiğim hocam Dr. Öğr. Üyesi S. Haldun BAL'a

Laboratuvara alışma dönemimde ve deneysel süreçlerimde ilk günden itibaren tüm içtenliğiyle bilgisini ve yardımını esirgemeyerek, danışmanımdan sonra bana junior hoca olan canım arkadaşım Onur ETGÜ'ye,

İn-vivo ve ex-vivo çalışmalarımda kendisine yardım duyduğum her koşulda hafta içi - hafta sonu farketmeksizin yardımını esirgemeyen, ayrıca manevi bir abim gibi hissettiğim Biyolog Erken ERMİŞ'e,

İn-vivo çalışmalarımda emeği olan ve tüm içtenlikle bilgisini benimle paylaşan Berkcan YANAR'a,

Gerek gece gündüz deneylerimde yanımda olarak verdikleri destek için, gerekse samimi arkadaşlıklarıyla bu süreçteki neşe kaynaklarım canım arkadaşlarım Hilal VARDAR, Tuba ZORCİ ve İlayda MEMİŞ'e,

Lisans döneminden bu yana her daim yanımda olan, kan bağımız olmasa da kardeşten öte hissettiğim gerek bilimsel gerek özel hayatımla ilgili tüm konularda derinlemesine sohbet edebildiğim, yüksek lisans sürecimin manevi mihenk taşı biricik dostum Mine ÇAMLIBEL'e,

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

En büyük teşekkürüm, hayatımın her anında sevgilerini ve ilgilerini üzerimden hiç eksik etmeyen, arkamda bir kale gibi varlıklarıyla kendimi her koşulda güçlü hissettiğim hayattaki en büyük şansım olan aileme; biricik babam Murat ÖZALP'e, biricik annem Semra ÖZALP'e ve canım kardeşim İclal ÖZALP'e,

İnsani değer olgumun oluşmasında büyük role sahip ve üzerimde emekleri çok olan sevgili dedem Hasan ÖZALP'e ve sevgili babaannem Esma ÖZALP'e,

Sonsuz teşekkürlerimi ve saygımı sunuyorum. Oldukça minnettar ve müteşekkirim.

10. ÖZGEÇMİŞ

Adı- Soyadı: Elif ÖZALP
Doğum Yeri- Tarihi:
Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)
Lisans: Bursa Uludağ Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü (2017-2021)
Yüksek Lisans: Bursa Uludağ Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıp Fakültesi, İmmünoloji Anabilim Dalı (2021-Halen)
e-posta:
Adres:

ULUSAL KONGRELER

Ozalp E., Etgu O., Oral H.B., Yoyen-Ermis D.
Mikroglia- T hücre Etkileşimi Sonucunda Meydana Gelen Ko-stimülatör Belirteç Değişimleri ve T hücre Yanıtları. 11. Nöroimmünoloji Okulu. 3-7 Mayıs 2023, Muğla/Türkiye
Ozalp E., Etgu O., Vardar H., Zorci T., Oral H.B., Yoyen-Ermis D. **Makrofaj/Mikroglia-T Hücre Etkileşimlerinin Meme Kanseri Beyin Metastazı Sürecindeki Rolü.** XXVI. Ulusal İmmünoloji Kongresi. 11-13 Kasım 2023, Ankara,Türkiye *(En iyi Poster Bildirisi Ödülü)*
Dundar F., Etgu O., Esen C., Yagcıoglu B., Ozalp E., Oral H.B., Yoyen-Ermis D. **Doku Yerleşik/İnfiltre Makrofajların İzolasyonu ve Organ Nişleri Korunarak Gerçekleştirilen 3 Boyutlu Hücre Kültürü Ortamında Büyütülmesi.** XXVI. Ulusal İmmünoloji Kongresi. 11-13 Kasım 2023, Ankara,Türkiye
Etgu O., Ozalp E., Dundar F., Yagcıoglu B., Esen C., Oral H.B., Yoyen-Ermis D. **Üçlü Negatif Meme Kanserinde (TNBC) Monosit/Makrofaj İlişkili İmmünmodülatör Etki Sonucu Farklılaşan TNBC Alt Gruplarının T Hücre Yanıtlarına Etkisi.** XXVI. Ulusal İmmünoloji Kongresi. 11-13 Kasım 2023, Ankara,Türkiye

ULUSLARARASI POSTER SUNUMLARI

Ozalp E., Etgu O., Dundar F, Oral H.B., Yoyen-Ermis D.
Understanding Tissue-resident Macrophage Polarization in Basal-like Breast Cancer Metastasis. 5th International Molecular Immunology and Immunogenetics Congress (MIMIC-V). 20-22 October 2022, Izmir/Turkey

Etgu O., Dundar F, Ozalp E., Oral H.B., Yoyen-Ermis D.
Monocyte/Macrophage Associated Immunomodulatory Function of CD44/CD24 Phenotype in Triple Negative Breast Cancer (TNBC) Subgroups on T Cell Responses. 5th International Molecular Immunology and Immunogenetics Congress (MIMIC-V). 20-22 October 2022, Izmir/Turkey

Dundar F., Ozalp E., Etgu O., Oral H.B., Yoyen-Ermis D.
Tissue resident/infiltrated macrophages isolation and their artificial expansion in 3D cells culture. 5th International Molecular Immunology and Immunogenetics Congress (MIMIC-V). 20-22 October 2022, Izmir/Turkey