

T.C.  
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Doktora Tezi

**BAŞ-BOYUN SKUAMÖZ HÜCRE KARSİNOMASI VE MAKROFAJ  
HÜCRELERİNİN APELİN/APJ EKSENİNDE MOLEKÜLER  
BAĞLANTILARININ ARAŞTIRILMASI**

**Fatma SEÇER ÇELİK**

Danışman

Prof. Dr. Ercan KURAR

Bu araştırma Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 201418006 proje numarası ile desteklenmiştir.

**Konya-2022**

## TEZ ONAY SAYFASI

Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Doktora Öğrencisi **Fatma SEÇER ÇELİK**'in "**Baş-Boyun Skuamöz Hücre Karsinoması ve Makrofaj Hücrelerinin Apelin/APJ Ekseninde Moleküler Bağlantılarının Araştırılması**" başlıklı tezi tarafımızdan incelenmiş; amaç, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans/Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

KONYA/ 12.01.2022

Tez Danışmanı Prof. Dr. Ercan KURAR  
NEÜ Meram Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji A.D.

Üye Prof. Dr. Hasibe VURAL  
NEÜ Meram Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji A.D.

Üye Prof. Dr. Mehmet ARTAÇ  
NEÜ Meram Tıp Fakültesi İç Hastalıkları A.D.

Üye Prof. Dr. Hasibe ARTAÇ  
Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları A.D.

Üye Prof. Dr. Tülin ÇORA  
Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Tıbbi Genetik A.D.

Yukarıdaki tez, Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun 27/02/2022 tarih ve 3/2 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Kısmet Esra NURULLAHOĞLU ATALIK  
Enstitü Müdürü

## BEYANAT

Bu tezin tamamının kendi çalışmam olduğunu, planlanmasından yazımına kadar hiçbir aşamasında etik dışı davranışımın olmadığını, tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları kaynaklar listesine aldığımı, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

20/12/2021

Fatma SEÇER ÇELİK

## BENZERLİK RAPORU

Tezin Tam Adı : Baş-boyun skuamöz hücre karsinoması ve makrofaj hücrelerinin apelin/APJ ekseninde moleküler bağlantılarının araştırılması  
Öğrencinin Adı Soyadı : Fatma SEÇER ÇELİK  
Dosyanın Toplam Sayfa Sayısı: 89

### BAŞ-BOYUN SKUAMÖZ HÜCRE KARSİNOMASI VE MAKROFAJ HÜCRELERİNİN APELİN/APJ EKSENİNDE MOLEKÜLER BAĞLANTILARININ ARAŞTIRILMASI

#### ORJİNALLİK RAPORU

**%8** BENZERLİK ENDEKSİ  
**%7** İNTERNET KAYNAKLARI  
**%1** YAYINLAR  
**%5** ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

#### BİRİNCİL KAYNAKLAR

<b>1</b>	<b>Submitted to Konya Necmettin Erbakan University</b> Öğrenci Ödevi	<b>%4</b>
<b>2</b>	<b>acikerisim.erbakan.edu.tr</b> İnternet Kaynağı	<b>%1</b>
<b>3</b>	<b>acikerisimarsiv.selcuk.edu.tr:8080</b> İnternet Kaynağı	<b>%1</b>

Danışman Öğretim Üyesi Adı Soyadı : Prof.Dr. Ercan KURAR  
İmzası :

## ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca bilgisiyle, tecrübeleriyle yol gösterici olan, maddi ve manevi desteğini her an hissettiğim değerli danışmanım Prof.Dr. Ercan KURAR'a, Anabilim Dalı öğretim üyeleri Prof.Dr. Hasibe VURAL ve Doç.Dr. Hatice Gül DURSUN'a, bu süreçte her zaman yanımda olan, eksik yönlerimi tamamlayan benim için hem bir arkadaş hem de bir mentör olan Dr. Canan EROĞLU GÜNEŞ'e, Anabilim Dalı araştırma görevlileri Dr. İlknur ÇINAR AYAN ve Dr. Ebru GÜÇLÜ'ye,

Yüksek lisans eğitimimden itibaren daima yanımda olan değerli dostum Dr.Öğr.Üyesi Aysel KALAYCI YİĞİN'a, yıllardır hem bir abla hem de bir yol gösterici olan, bu tezi gerçekleştirmekte bana yardımlarını esirgemeyen Öğr.Gör.Dr. Emine YAVUZ'a, desteklerini hep hissettiğim yol arkadaşlarım Hüseyin DÖNMEZ, Safaa ALTWEİSH, Hatice Kübra YILDIZ, Esra YETİŞGİN ve Dilara YENİTERZİ'ye,

YÖK 100/2000 "Tümör İmmünolojisi" öncelikli alanında destekleyen YÖK'e, tez çalışmama 201418006 nolu proje ile maddi destek sağlayan Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne,

Emek ve sevgiyle bugüne gelmeme vesile olan, her daim yanımda hissettiğim canım annem Nokta SEÇER ve canım babam Aziz SEÇER'e, değerli ablalarım Safiye ve Hacer'e ve kız kardeşlerim Tuğba ve Ayşegül'e,

Doktora eğitimim sırasında dünyaya gelen kızlarım Melda ve Meva'ya, tüm lisansüstü eğitimim boyunca bana eşlik eden oğlum Muhammed Musab'a ve bu yolda yıldıgım, yorulduğum her an beni güçlü ve azimli kılan eşim Uzm.Dr. Ümit ÇELİK'e,

Teşekkür ederim.

Bu tez çalışmasını kızlarım Melda ve Meva'ya ithaf ediyorum.

Fatma SEÇER ÇELİK

## İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI.....	ii
BEYANAT .....	iii
BENZERLİK RAPORU .....	iv
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR.....	v
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xi
TABLolar LİSTESİ.....	xiii
<b>1. GİRİŞ VE AMAÇ .....</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER.....</b>	<b>3</b>
2.1. Baş-Boyun Skuamöz Hücre Karsinoması.....	3
2.1.1. Epidemiyolojisi .....	3
2.1.2. Risk Faktörleri.....	5
2.1.3. Tanı .....	6
2.1.4. Tedavi.....	7
2.1.5. İmmünoterapötik Yaklaşımlar .....	9
2.2. Makrofajlar.....	10
2.2.1. Kökeni ve Genel Bilgi.....	10
2.2.2. Fizyolojik Önemi .....	12
2.2.3. Makrofaj Polarizasyonu .....	13
2.2.4. Makrofaj-Kanser İlişkisi .....	15
2.2.5. Makrofajların Terapötik Kullanımı.....	16
2.3. Apelin ve Apelin Reseptörü.....	17
2.3.1. Apelinin Yapısı .....	18
2.3.3. Apelinin Karsinogenezdeki Rolü .....	19
2.4. Gen İfadesinin Manipülasyonu .....	21
2.4.1. siRNA ve miRNA .....	21

2.4.2. shRNA.....	23
2.4.3. miR-30 Adapte shRNA .....	24
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM .....</b>	<b>25</b>
3.1. Hücre Kültürü.....	25
3.2. SCCL MT1 Hücrelerinin Transdüksiyonu.....	26
3.2.1. pGIPZ plazmidini .....	26
3.2.2. Viral Stok Dilüsyonlarının Hazırlanması.....	27
3.2.3. Transdükte Birim Sayısının Belirlenmesi .....	27
3.2.4. Hedef Hücrelerin Transdüksiyonu .....	28
3.2.5. Puromisin Seleksiyon.....	29
3.2.5.1. Optimum Puromisin Miktarının Belirlenmesi .....	29
3.2.5.2. Puromisin Uygulanması .....	30
3.3. Floresan Mikroskopik Görüntüleme .....	30
3.4. SCCL MT1 ve RAW264.7 Hücrelerinin Ko-kültürlenmesi .....	31
3.5. Gen Ekspresyon Seviyesinin Belirlenmesi .....	31
3.5.1. Hücre Hatlarından Total RNA İzolasyonu.....	31
3.5.2. RNA Miktarının Belirlenmesi.....	32
3.5.3. cDNA Sentezi.....	33
3.5.4. Primer Dizaynı .....	33
3.5.5. Gerçek-Zamanlı PZR Reaksiyonu .....	34
3.6. ELISA Yöntemiyle Sitokin Miktarlarının Belirlenmesi .....	35
3.7. İstatistiksel Analizler.....	35
<b>4. BULGULAR .....</b>	<b>36</b>
4.1. Hücre Mono Kültürlerinin Oluşturulması.....	36
4.2. Transdüksiyon Ünitesinin Belirlenmesi.....	36
4.3. Puromisin Uygulanan SCCL MT1 Hücrelerinde Kill Curve Analizi .....	37
4.4. Transdükte Hücrelerin TurboGFP Proteinini İfadesinin Floresan Mikroskopik İncelenmesi .....	37

4.5. shRNA ile Transdükte Edilen SCCL MT1 Hücrelerindeki Apelin ifadesinin RT-PZR Analizi ile Kontrolü .....	38
4.6. SCCL MT1 ve RAW264.7 Hücrelerinin Ko-kültürasyonu .....	39
4.7. Transdükte Olan ve Olmayan SCCL MT1 Hücreleri ile Ko-kültüre Edilen RAW264.7 Hücrelerinin Morfolojik Değişimleri.....	41
4.9. Transdükte Olan ve Olmayan SCCL MT1 Hücreleri ile Ko-kültüre Edilen RAW264.7 Hücrelerindeki İnflamatuar Sitokinlerin İfadesi .....	43
4.10. SCCL MT1 Hücrelerinde Transdüksiyon Sonrası Migrasyon ve İnvazyon İlişkili Genlerin İfadesi .....	45
4.11. RT-PCR Analizinde İfadesi Anlamlı Çıkan Sitokinlerin ELISA Yöntemiyle İncelenmesi .....	46
<b>5. TARTIŞMA .....</b>	<b>50</b>
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>	<b>58</b>
<b>7. KAYNAKLAR.....</b>	<b>60</b>
<b>8. ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>71</b>
<b>9. EKLER.....</b>	<b>74</b>



## KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

<b>ABP</b>	: Aktin bağlayıcı proteinler
<b>Ape</b>	: Apelin
<b>APLNR/APJ</b>	: Apelin reseptörü
<b>Arg1</b>	: Arjinin 1
<b>AT1</b>	: Anjiotensin II reseptörü
<b>BBK</b>	: Baş boyun kanseri
<b>BBSHK</b>	: Baş boyun skuamöz hücre karsinoması
<b>BMI</b>	: Beden kütle endeksi
<b>DH</b>	: Dentritik hücre
<b>DM</b>	: Diabetes mellitus
<b>dsRNA</b>	: Çift iplikli RNA
<b>EMT</b>	: Epitelyal-mezenkimal geçiş
<b>EBV</b>	: Epstein–Barr virüs
<b>FNA</b>	: İnce iğne aspirasyonu
<b>GLOBOCAN</b>	: Küresel Kanser Gözlemevi
<b>GSTM1</b>	: Glutasyon S transferaz Mu1
<b>HKH</b>	: Hematopoietik kök hücre
<b>HPV</b>	: Human papilloma virüs
<b>IARC</b>	: Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı
<b>ICAM</b>	: Hücre içi adhezyon molekülü 1
<b>IFNG</b>	: İnterferon gama
<b>IgG4</b>	: İmmunoglobulin G4
<b>IL1B</b>	: İnterlökin 1 beta
<b>IL4</b>	: İnterlökin 4
<b>IL6</b>	: İnterlökin 6
<b>IL10</b>	: İnterlökin 10
<b>IL13</b>	: İnterlökin 13
<b>IRF</b>	: İnterferon cevap faktörü
<b>JAK</b>	: Januz kinaz
<b>KH</b>	: Kupffer hücresi
<b>Kİ</b>	: Kemik iliği
<b>LH</b>	: Langerhans hücresi
<b>LPS</b>	: Lipopolisakkarit
<b>M1</b>	: Makrofaj tip 1
<b>M2</b>	: Makrofaj tip 2
<b>MCP-1</b>	: Monosit kemoatrakt protein 1
<b>miRNA</b>	: mikroRNA
<b>mRNA</b>	: Mesajcı RNA
<b>NF-κB</b>	: Nükleer faktör kapa B
<b>NSCLC</b>	: Küçük hücreli akciğer kanseri
<b>OS</b>	: Genel sağkalım
<b>PAMP</b>	: Patojen ilişkili moleküler patern
<b>PD1</b>	: Programlı ölüm-1
<b>PDL1</b>	: Programlı ölüm ligand-1
<b>piRNA</b>	: Piwi etkileşimli RNA
<b>RB</b>	: Retinoblastom
<b>RISC</b>	: RNA kaynaklı susturma kompleksi
<b>RNAi</b>	: RNA interferans

<b>RNaz</b>	: Ribonükleaz
<b>SEER</b>	: Sürveyans, Epidemiyoloji ve Son Sonuçlar
<b>shRNA</b>	: Küçük saç tokası RNA
<b>siRNA</b>	: Küçük interferans yapan RNA
<b>STAT</b>	: Sinyal dönüştürücüler ve transkripsiyon aktivatörü
<b>TAM</b>	: Tümör ilişkili makrofaj
<b>TGFB</b>	: Transforme büyüme faktörü beta
<b>TLR4</b>	: Toll benzeri reseptör 4
<b>TME</b>	: Tümör mikro çevresi
<b>TNFA</b>	: Tümör nekroz faktör alfa
<b>VCAM</b>	: Vasküler hücre adezyon molekülü 1
<b>VEGF</b>	: Vasküler endotel büyüme faktörü



## ŞEKİLLER LİSTESİ

<u>Şekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1. Baş-boyun kanserlerinin köken aldığı bölgeler .....	3
Şekil 2.2. Apelinin moleküler yapısı .....	18
Şekil 2.3. Pre-pro-apelin proteolitik kesimi ile oluşan çeşitli apelin peptidleri.....	18
Şekil 2.4. Apelin reseptörü uyarıldıktan sonra aktive edilen moleküler yollar... ..	20
Şekil 2.5. Endojen ve ekzojen kaynaklı miRNA'ların hücresel süreci .....	23
Şekil 3.1. pGIPZ plazmidinin ana yapısı .....	26
Şekil 3.2. Viral stok dilüsyonlarının hazırlanması.....	27
Şekil 3.3. Viral dilüsyonlarının hücrelere uygulanması.....	28
Şekil 3.4. Kanser hücrelerinin transdüksiyonu sırasında olası plazmid klonlarının hücrelere dağılımı .....	29
Şekil 3.5. Puromisin dilüsyonlarının hücrelere uygulanması.....	30
Şekil 3.6. SCCL MT1 ve RAW264.7 hücrelerinin mono kültürlerinden ko-kültürlerinin insört sistem ile oluşturulması.....	31
Şekil 4.1. RAW264.7 (A) ve SCCL MT1 (B) hücrelerinin 20X büyütmedeki mikroskopik görüntüleri.....	36
Şekil 4.2. Puromisinin farklı dozlarda hücre canlılığına olan etkisi.....	37
Şekil 4.3. SCCL MT1 hücrelerinin floresan mikroskopik görüntüleri.....	38
Şekil 4.4. Apelin geninin shRNA uygulamalarından sonra kontrole kıyasla kat değişimi .....	39
Şekil 4.5. İndirekt ko-kültürasyon; 6 kuyucuklu pleyte ekilen RAW264.7 hücreleri ile insörtlere ekilen SCCL MT1 hücrelerinin birlikte kültüre edilmesi .....	40
Şekil 4.6. İnsört içinde yer alan SCCL MT1 hücreleri ve insört boşluklarının mikroskopik olarak görünüşü (10X) .....	40
Şekil 4.7. Transdükte olmayan SCCL MT1 hücreleri (A) ve transdükte olan SCCL MT1 hücreleriyle (B) ko-kültüre edilen RAW264.7 hücrelerinin morfolojik değişimi .....	41
Şekil 4.8. RNA agoroz jel görüntüsü.....	42
Şekil 4.9. RT-PCR analizinde oluşan ürünlerin agoroz jel elektroforezinde görüntülenmesi.....	42
Şekil 4.10. RT-PCR analizi gerçekleştirilen genlerden bazılarında ait erime eğrisi grafikleri .....	43

<b>Şekil 4.11.</b> RAW264.7 hücrelerinin SCCL MT1 hücreleriyle ko-kültürasyonunun inflamatuvar gen ifadelerine olan etkisi .....	<b>44</b>
<b>Şekil 4.12.</b> Transdükte SCCL MT1 Ape (-) hücrelerindeki migrasyon ve invazyon ilişkili genlerin ifadelerindeki kat değişimleri .....	<b>46</b>
<b>Şekil 4.13.</b> RAW264.7 hücrelerinden salınan IL1 miktarları.....	<b>47</b>
<b>Şekil 4.13.</b> RAW264.7 hücrelerinden salınan IL6 miktarları.....	<b>47</b>
<b>Şekil 4.13.</b> RAW264.7 hücrelerinden salınan IL10 miktarları.....	<b>48</b>
<b>Şekil 4.13.</b> RAW264.7 hücrelerinden salınan TGF $\beta$ miktarları.....	<b>49</b>
<b>Şekil 4.13.</b> RAW264.7 hücrelerinden salınan TNF $\alpha$ miktarları.....	<b>49</b>



## TABLolar LİSTESİ

<b><u>Tablo No</u></b>	<b><u>Sayfa No</u></b>
<b>Tablo 3.1.</b> Apelin geni 3'-UTR bölgesine hedefli shRNA dizileri .....	<b>27</b>
<b>Tablo 3.2.</b> Transdüksiyon dilüsyonları.....	<b>28</b>
<b>Tablo 3.3.</b> Çalışmada kullanılan genler .....	<b>33</b>
<b>Tablo 3.4.</b> İfade analizi yapılan genlerin simgeleri, primer dizileri ve baz çifti uzunlukları .....	<b>34</b>



## ÖZET

T.C.  
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

### **Baş-Boyun Skuamöz Hücre Karsinoması ve Makrofaj Hücrelerinin Apelin/APJ Ekseninde Moleküler Bağlantılarının Araştırılması**

Fatma SEÇER ÇELİK

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Doktora Tezi / Konya-2022

Kanser, kardiyovasküler hastalıklardan sonra dünyada en çok ölüm oranlarına sahip hastalıktır. Günümüzde kanser tedavisi kemoterapi, radyoterapi ve cerrahi müdahalelerle gerçekleştirilmektedir. Yakın zamanda bu tedavi girişimlerine ek olarak immünoterapötik yaklaşımlar da kullanılmaya başlanmıştır. Mevcut tedavilere ek olarak kullanılan immünoterapötik ajanlar tedavi yanıtlarında gözle görülür iyileşme sağlamıştır. Makrofajlar mononükleer sistemin ana hücreleridir. Sahip oldukları yüksek plastisite yetenekleri makrofajları birçok metabolik hastalığın patolojisinde etkin rol oynamasını sağlarken, yapılan çalışmalar kanser tedavisinde de kullanılabilir bir alternatif olduğunu göstermiştir. Bu çalışmanın amacı; apelinin makrofaj polarizasyonuna olan etkisinin araştırılmasıdır.

Bu tez çalışmasında; RAW264.7 fare makrofaj hücreleri ile baş-boyun hücre karsinoması hücre hattı SCCL MT1 hücreleri kullanılmıştır. SCCL MT1 hücrelerinde apelin gen ifadesi shRNA yöntemiyle baskılanmıştır. Apelin geni aktif ve bastırılan SCCL MT1 hücreleri RAW264.7 hücreleriyle ko-kültüre edilmiştir. Ko-kültürasyonun RAW264.7 hücrelerindeki inflamatuvar genler üzerine etkisi ve apelinin baskılanmasının SCCL MT1 hücrelerindeki migrasyon ve invazyon ilişkili genler üzerine etkisi RT-PZR analizi ile belirlenmiştir. Anlamli değişiklik gösteren genlere ait protein seviyeleri ELISA ile değerlendirilmiştir.

Apelinin baskılanması, SCCL MT1 hücrelerinden apelin ifadesinin azalmasına ve ko-kültüre edildiği makrofajlarda kontrole kıyasla pro-inflamatuvar cevabın artmasına neden olmuştur. IL1 $\beta$ , IL6 ve TNF $\alpha$  gen ifadelerinde anlamli artış görölmüştür. Anti-inflamatuvar sitokin genlerinde ise IL10 gen ifadesi anlamli olarak azalmıştır. Apelinin baskılanmadığı grupta ise pro-inflamatuvar genlerde düşüş gözlenirken anti-inflamatuvar genlerde artış görölmüştür. Bunların yanı sıra apelinin SCCL MT1 hücrelerinde baskılanması, kanser hücrelerinde migrasyon ve invazyon yeteneğini azaltmıştır. E-kadherin ifadesi artarken N-kadherin ifadesi anlamli olarak azalmıştır. Ayrıca Twist, Slug, Snail ve CD44 ekspresyon seviyeleri de anlamli olarak düşmüştür. Makrofaj polarizasyonunda etkili genler olan IL1 $\beta$ , IL6, IL10, TGF $\beta$  ve TNF $\alpha$  protein seviyesinde ifadelerindeki gözlenen anlamli değişimler RT-PZR analizi verileriyle uyumlu sonuçlara ulaşılmıştır.

Apelinin SCCL MT1 hücrelerinde baskılanması RAW264.7 hücrelerinde pro-inflamatuvar cevabı arttırmıştır. Bu sonuçlara göre kanser hücrelerinden salınan apelinin makrofajların polarizasyonuna doğrudan etki ettiği görölmektedir. Elde edilen sonuçlar, kanser mikroçevresinde M2 tip makrofajların yoğun olarak bulunmasının apelin peptidi ile ilişkili olabileceğini ve apelinin kanser hücrelerinde terapötik hedeflenmesinin makrofajların, kanser progresyonunun durdurulmasında rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca apelin kanser hücrelerinin migrasyon ve invazyon yeteneğini arttırarak agresif bir fenotip oluşmasını sağlamaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** Apelin, Baş-boyun, Kanser, Makrofaj, shRNA

## ABSTRACT

REPUBLIC OF TURKEY  
NECMETTİN ERBAKAN UNIVERSITY  
HEALTH SCIENCES INSTITUTE

### **Investigating Molecular Connections of the Head and Neck Squamous Cell Carcinoma and Macrophage Cells in the Apelin/APJ axis**

Fatma SEÇER ÇELİK

Department of Medical Biology

PhD Thesis / Konya-2022

Cancer is the disease with the highest mortality rate in the world after cardiovascular diseases. Today, cancer treatment is carried out with chemotherapy, radiotherapy and surgical interventions. Recently, immunotherapeutic approaches have been used along with these interventions and have resulted in significant improvement in treatment responses. Macrophages are the main cells of the mononuclear system. While their high plasticity abilities enable macrophages to play an active role in the pathology of many metabolic diseases, studies have shown that they are an alternative that can also be used in cancer treatment. The aim of this study is to investigate the effect of apelin on macrophage polarization.

In this thesis, mouse macrophage cell line RAW264.7 cells and head and neck cell carcinoma cell line SCCL MT1 cells were used. The apelin expression was knockdown by shRNA method in SCCL MT1 cells. Then, apelin gene activated and suppressed SCCL MT1 cells were co-cultured with RAW264.7 cells. The effect of co-culture on inflammatory genes in RAW264.7 cells and the effect of apelin suppression on migration and invasion-related genes in SCCL MT1 cells were determined by RT-PCR analysis. Finally, protein levels of genes with significant changes were evaluated by ELISA method.

Suppression of apelin reduced apelin expression from SCCL MT1 cells and increased pro-inflammatory response in co-cultured macrophages compared to control. Significant increases were observed in IL1 $\beta$ , IL6 and TNF $\alpha$  gene expressions whereas anti-inflammatory cytokine genes, IL10 and TGF $\beta$  gene expressions were significantly decreased. However, in the treatment group where apelin was not suppressed, a decline was observed in pro-inflammatory genes, while an incline was observed in anti-inflammatory genes. In addition, suppression of apelin in SCCL MT1 cells decreased the migration and invasion ability of cancer cells. E-cadherin expression was increased while N-cadherin was significantly decreased. Moreover, Twist, Slug, Snail and CD44 gene expression levels were also significantly decreased. Due to the significant changes in the gene expression levels of IL1 $\beta$ , IL6, IL10, TGF $\beta$ , and TNF $\alpha$  which are effective in macrophage polarization, their protein levels were examined; and, the results were consistent with the RT-PCR analysis.

In conclusion, suppression of apelin in SCCL MT1 cells increased the pro-inflammatory response in RAW264.7 cells. According to these results presented here, it was found that apelin released from cancer cells directly affects the polarization of macrophages and the intense presence of M2 type macrophages in the cancer microenvironment may be related to the apelin peptide.. The therapeutic targeting of apelin in cancer cells may play a role of macrophages in cancer progression of. In addition, apelin increases the migration and invasion ability of cancer cells and provides an aggressive phenotype.

**KeyWords:** Apelin, Cancer, Head and Neck, Macrophage, shRNA

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kardiyovasküler hastalıklardan sonra dünya çapında en büyük mortalite oranları kanser ölümlerine aittir (Global Cancer Statistics, 2020). Kanser moleküler biyolojisinin karmaşıklığı hastalığın elimine edilmesinde en büyük engeldir. Kanser tedavisinde kemoterapi, radyoterapi ve cerrahi girişimler kullanılmaktadır. Günümüzde etkili tedavilerin geniş yan etkileri sebebiyle hedefe yönelik tedaviler kullanılmaya başlanmıştır. Bunun yanı sıra, hastanın bağışıklık cevabının artırılması, immün hücrelerin kanser hücrelerine hedeflenmesi gibi farklı mekanizmalar kullanılarak yeni tedavi yaklaşımları oluşturulmuştur. İmmünoterapi olarak adlandırılan bu tedaviler, yan etkisi daha az, bireysel bir tedavi olarak görülse de mono tedavi yaklaşımı olarak henüz kullanılmamaktadır. Kemoterapi, radyoterapi ya da cerrahi girişim sonrası ya da bunlarla eş zamanlı olarak uygulanmaktadır.

Apelin ilk olarak mide ekstraktından izole edilerek tanımlanmıştır. Daha sonra apelinin obezite, diyabet gibi metabolik hastalıkların patolojisinde yer aldığı gösterilmiştir. Apelinin ayrıca nörodejeneratif hastalıkların fizyolojisinde de rol oynadığı bulunmuştur. Son dekatta yapılan çalışmalarda ise apelinin kanser hücrelerinde aşırı ifade edildiği tespit edilmiştir. Tüm bu çalışmalara dayanarak apelinin immün hücreler üzerindeki etkisi tam olarak ortaya konulmamıştır. Makrofaj hücrelerinin apelin reseptörüne sahip olduğu gösterilmiştir. Makrofajlar kanser mikroçevresinde yaygın olarak en fazla bulunan immün hücrelerdir (Boutilier ve Elsawa 2021). Kanser hücrelerinden ifade edilen apelinin kanser mikroçevresinde bulunan hücrelere etkisi, özellikle makrofajlar üzerine olan etkisi tam olarak bilinmemektedir. Makrofajlar kanser mikroçevresinde plastisitesi en yüksek hücreler olduğu, apelin ifadesine nasıl cevap verecekleri bu çalışmanın araştırma konusunu oluşturmaktadır.

Bu tez projesinin amacı; kanser hücreleri tarafından aşırı ifade edilen apelin peptidinin kanser mikroçevresinde bulunan makrofajlar üzerine olası etkileri, özellikle makrofaj polarizasyonu üzerine etkisini araştırmaktır. Bu çalışmanın hipotezi; kanser hücrelerinden ifade edilen apelin peptidinin kanser mikroçevresinde bulunan makrofajların M2 tip yönünde polarize olmasını indüklemektedir. Bu amaç doğrultusunda, SCCL MT1 hücrelerinde apelin ifadesini baskılamak amacıyla



lentiviral shRNA yöntemi kullanılmıştır. Apelin ifadesi baskılanan hücreler TurboGFP ışmasıyla ayırt edilmiş ve puromisin seleksiyonuna tabi tutulmuştur. Elde edilen Ape (+) ve Ape (-) SCCL MT1 hücreleri mürin makrofaj hücreleri olan RAW264.7 hücreleriyle ko-kültüre edilmiştir. Oluşturulan ko-kültür gruplarında aday genlerin ifade değişiklikleri gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu analizi ile belirlenmiştir. Gen ifade analizi RAW264.7 hücrelerinde polarizasyonu gösteren sitokin genleri olan IL1, IL6, IL10, TNFA, TGFB için yapılırken, apelin ifadesinin baskılanmasının SCCL MT1 hücrelerinde migrasyon ve invazyon üzerine etkisi CDH1, CDH2, Vimentin, Twist, Slug, Snail, CD44 genleri için gerçekleştirilmiştir. Anlamlı değişiklik gerçekleşen sitokin genlerinin protein düzeyindeki miktarlarını belirlemek için ELISA yöntemi kullanılmıştır.

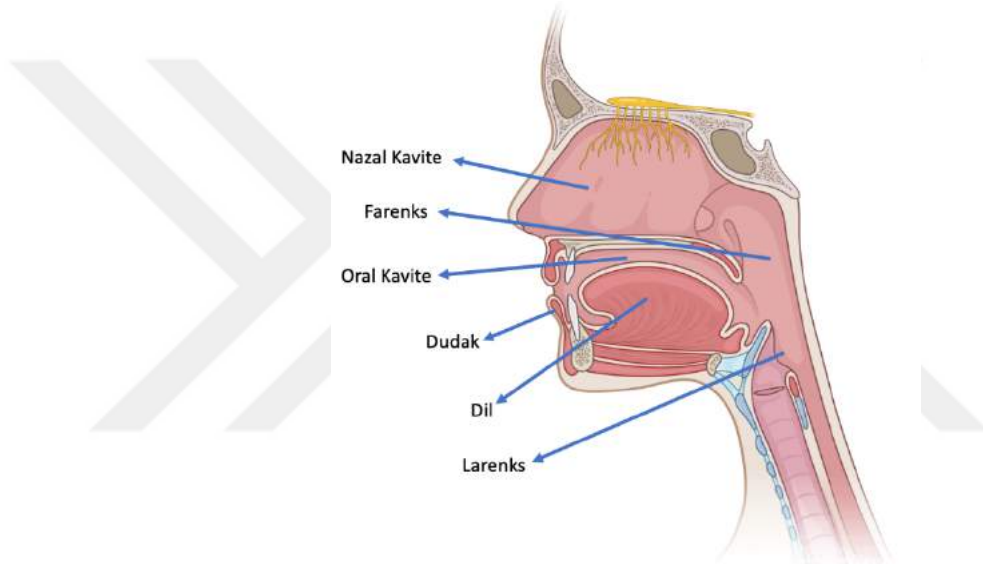


## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Baş-Boyun Skuamöz Hücre Karsinoması

#### 2.1.1. Epidemiyolojisi

Baş-boyun kanserleri (BBK) dünya çapında erkeklerde 8., kadınlarda ise 15. sırada yer alan malignitedir ve yıllık yaklaşık 800.000 yeni vaka insidansına sahiptir (Global Cancer Statistics, 2020). Bu vakaların %90'ı histolojik olarak skuamöz hücre karsinoması olarak sınıflandırılmaktadır (Bray ve ark. 2018). Baş-boyun tümörleri üst solunum yolu mukozal epitel hücreleri ve beslenme yolu (oral kavite, orofarinks, larinks ve hipofarinks) epitel hücrelerinden köken almaktadır (Şekil 2.1.).



**Şekil 2.1.** Baş-boyun kanserlerinin köken aldığı bölgeler.

Ağız boşluğu ve larengeal kanserler dünya çapında en yaygın baş ve boyun kanseridir. BBSHK görülme sıklığı yükselme trendinde olup, 2030 yılına kadar %30 artması beklenmektedir (Küresel Kanser Gözlemevi; GLOBOCAN; Bray ve ark. 2018).

Baş ve boyun kanserlerinin %90'ından fazlası, üst aerodinamik sistemin mukozal astar epitelinden kaynaklanan baş ve boyun skuamöz epitel hücreli karsinomdur (BBSHK; Ferlay ve ark. 2019). Baş ve boynun anatomik bölgeleri baz alındığında baş ve boyun kanseri %44 oral kavite, %31 larenks ve %25 farenks dağılımı göstermektedir. Görünüş itibariyle homojen bir kökene sahip olduğu halde karsinogenez sonrası oldukça heterojen bir yapıya dönüşmektedir. Bunun sebebi

olarak geliştiği dokunun karmaşık anatomisi gösterilebilir. Aynı zamanda bu heterojenitenin bir diğer sebebi de farklı etiyolojiler ve karsinogenezi yönlendiren çok çeşitli moleküler değişikliklerde olabilmektedir. BBSHK hastaların yaklaşık %60'ı ileri evrelerde (III veya IV) teşhis edilir ve hastaların yaklaşık %10'u uzak metastaz yapmaktadır (Cohen ve ark. 2018).

Güneydođu Asya ve Avustralya gibi bölgelerde BBSHK'nın yüksek prevalansı, spesifik kanserojen içeren ürünlerin tüketimiyle ilişkili bulunmuştur. Human papilloma virüs (HPV) ile artan orofaringeal enfeksiyon oranları, A.B.D. ve Batı Avrupa'da BBSHK'nın yüksek prevalansına katkıda bulunmaktadır (Hashibe ve ark. 2007; Mehanna 2013; Jiang ve ark. 2019). Genel olarak, erkeklerin BBSHK'ya yakalanma sıklığı kadınlardan 2-4 kat daha fazladır. Viral olmayan BBSHK için ortalama tanı yaşı 66 iken, HPV kaynaklı orofaringeal kanser ve Epstein–Barr virüsü (EBV) kaynaklı nazofaringeal kanser için ortalama tanı yaşı 50'dir (Fung ve ark. 2016; Windon ve ark. 2018). BBSHK için hayatta kalma süresi son otuz yılda artmıştır. Örneğin, Sürveyans, Epidemiyoloji ve Son Sonuçlar (SEER; Surveillance, Epidemiology, and End Results) kayıtlarına göre, tüm yaş grupları ve anatomik bölgeler analiz edildiğinde, 5 yıllık sağkalım 1992–1996 döneminde %55'ten 2002–2006 döneminde %66'ya yükselmiştir (Pulte ve Brenner 2010). Yaşlı hastalar (>75 yaş) dışında tüm yaş gruplarında ve sağkalımın durgun olduğu larinks hariç tüm anatomik bölgelerde iyileşmiş sağkalım gösterilmiştir. Hayatta kalmadaki iyileşme, kısmen, multimodel tedavi yaklaşımlarının gelişmesinden ziyade, ileri prognoza sahip bir popülasyon olan HPV ile ilişkili BBSHK'nın ortaya çıkmasına atfedilebilir. HPV için doku değerlendirmesi sonrasında yapılan SEER analizi, HPV-pozitif BBSHK'lı hastalarda iyileşmiş sağkalımı gösterirken, HPV-negatif BBSHK'lı hastalarda göstermemektedir (Chaturvedi ve ark. 2011). Doğrudan BBSHK'nın neden olduğu ölümlere ek olarak, bu kanser sebebiyle intihar eden vakalar sıralamasında pankreas kanseri olanlardan (100.000 kişide 86.4 vaka) sonra ikinci en yüksek intihar oranına (100.000 kişide 63.4 vaka) sahiptir. Psikolojik sıkıntılar ve riskli yaşam kalitesi muhtemelen intiharın altında yatan anahtar faktörlerdir (Osazuwa-Peters ve ark. 2018).

### 2.1.2. Risk Faktörleri

Epidemiyolojik çalışmalar, 2020 Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO; World Health Organization) Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC; International Agency for Research on Cancer) tarafından sınıflandırılan BBSHK için çok çeşitli risk faktörlerini ortaya çıkarmıştır. Bu risk faktörleri arasında tütün ve alkol tüketimi, çevresel kirleticilere maruz kalma ve HPV/EBV gibi viral ajanlarla enfeksiyon yer almaktadır. İlginç bir şekilde, çeşitli risk faktörleri coğrafi veya kültürel olarak yaygınlık göstermektedir. Tütün ve alkol tüketimi coğrafi olarak en yaygın olarak ortaya çıkan yüksek riskli faktörlerdir. Her iki maddenin de yoğun kullanıcılarının BBSHK geliştirme riski >35 kat daha yüksektir (Blot ve ark. 1988). Bazı Asya-Pasifik popülasyonları arasında ağız boşluğu kanseri, areca fıstığı (*Areca catechu*), betel yaprağı (*the leaf of Piper betle*), söndürülmüş misket limonu ve tütünün yanı sıra yerel geleneklere göre kullanılan baharatlarla ilişkilendirilmiştir. Areca fıstığı veya betel yaprağı ürünlerinin kullanımı, Hindistan'da (Hintli erkeklerde ve kadınlarda sırasıyla birinci ve dördüncü en yaygın kanser), Tayvan'da ve Çin anakarasındaki bazı bölgelerde özellikle yüksek ağız boşluğu kanseri oranları ile bağlantılıdır (Zhang ve ark. 2018). Genel olarak, HPV (-) BBSHK insidansı için yüksek erkek/kadın oranları, yukarıda bahsedilen madde kullanımları dahil olmak üzere cinsiyete özgü değişebilen risk durumlarını göstermektedir (WHO Global Report, 2015).

Elektronik sigaraların BBSHK riski üzerindeki etkisi bilinmemektedir ancak önümüzdeki yıllarda ortaya çıkacaktır. Organik ve inorganik kimyasallar ve ayrıca partikül maddeler dahil kanserojen hava kirleticilerine maruz kalma, özellikle Hindistan ve Çin gibi hava kirliliğinin kötüleştiği gelişmekte olan ülkelerde ve bölgelerde BBSHK için bir risk faktörüdür (Datta ve ark. 2014). Diğer risk faktörleri arasında yaşlanma, kötü ağız hijyeni ve sebzeler açısından eksik beslenme yer almaktadır (Guha ve ark. 2007; Freedman ve ark. 2008). Enfeksiyöz ajanlar açısından, HPV ve EBV ile kalıcı enfeksiyon, sırasıyla orofarenks ve nazofarenksten kaynaklanan BBSHK için bilinen etiyolojik risk faktörleridir (Hennessey ve ark. 2009; Tseng ve ark. 2020). HPV pozitif BBSHK insidansı için erkek/kadın oranı 3-6 kat arasında değişmektedir (Viens ve ark. 2016), bu da anogenital HPV enfeksiyonunun benzer prevalanslarına rağmen erkeklerde daha yüksek persistan orofaringeal HPV enfeksiyonu oranları ile açıklanmaktadır (Gillison ve ark. 2012; Gillison ve ark. 2015).

Genetik faktörler de BBSHK riskine katkıda bulunur. Bozulmuş DNA onarım mekanizmaları ile karakterize, nadir görülen kalıtsal bir genetik hastalık olan Fanconi anemisi olan bireylerde (FANC gen mutasyonuna sahip), özellikle ağız boşluğu kanserleri olan BBSHK gelişme riski 500-700 kat artmıştır (Velleuer ve Dietrich 2014). Fanconi anemisi olan hastaların BBSHK geliştirme eğiliminden sorumlu mekanizmalar bilinmemekle birlikte, Fanconi anemi yolağı genlerindeki değişikliklerin bir rolü olması muhtemeldir.

Meta analizler, kanserojen metabolizmasında ve bağışıklıkta yer alan genlerdeki polimorfizmlerin, CTLA4 (rs231775 ve rs4553808), IL10 (1082A> G), sitokrom P450 1A1 (CYP1A1; 462Val) ve glutatyon S-transferaz M1'in (GSTM1; boş polimorfizm) etkili olabileceğini göstermiştir (Cadoni ve ark. 2012; Fang ve ark. 2018). Bu nedenle, karsinojenleri metabolize etme yeteneğinin azalması ve bağışıklık sisteminin zayıflaması BBSHK'ye katkıda bulunabilmektedir. Tütün ürünlerinin kullanımının azalması, ağız sağlığının iyileştirilmesi ve yaygın HPV aşılması, BBSHK'nin küresel insidansını azaltmaya yardımcı olacaktır (Chan ve ark. 2017).

### **2.1.3. Tanı**

BBSHK tanısı, primer tümör ve/veya boyun kitlesinin biyopsisi ile konulmaktadır (Pynnonen ve ark. 2017). Biyopsi yöntemi lezyonun konumuna bağlıdır. Primer tümörlere tipik olarak cup forseps, insizyonel biyopsi veya eksizyonel biyopsi ile yaklaşıırken şüpheli servikal boyun kitlesine ince iğne aspirasyonu (FNA; fine needle aspiration) yapılmalıdır. Bir boyun kitlesinin eksizyonel biyopsisi, FNA biyopsi örneği kalıcı olarak tanısal olmadığı, kesitsel görüntüleme veya panendoskopide birincil bölge belirlenmediği ve/veya eşzamanlı servikal olmayan lenfadenopati nedeniyle lenfoma şüphesi olmadığı sürece önerilmemektedir.

BBSHK, üst solunum-sindirim mukozasının tabakalı epitelden türetildiği için, histopatolojik spektrum, hücresel atipi ve skuamöz farklılaşmanın boyutu ile karakterize edilmektedir. İyi diferansiye bir tümör, en klasik olarak bir 'keratin inci' olarak adlandırılan, düzensiz keratinizasyonlu katmanlar halinde organize olan olgun görünen hücreler ile tabakalı epitelden oluşmaktadır. Kötü farklılaşmış bir tümör,

minimal organize tabakalaşma veya keratinizasyon ile nükleer pleomorfizm ve atipik mitozlu olgunlaşmamış hücreler ile karakterize edilmektedir. Ayrıca gözlemlenen skuamöz farklılaşma derecesi etiyoloji ile yakından ilişkilendirilmektedir. HPV (-) BBSHK'ler, tabakalaşma ve keratinizasyonun korunmasıyla daha sık, orta veya iyi farklılaşırken, HPV (+) BBSHK'ler histopatolojik analizde zayıf şekilde farklılaşır ve hatta bazaloid morfolojisi göstermektedirler (Pai ve Westra 2009).

BBSHK tanısı genellikle hematoksilin ve eozin boyama ile rutin histopatoloji temelinde yapılabilmektedir. Ancak, kötü diferansiye veya bazaloid tümörlerde, epitelyal kökeni doğrulamak için immünohistokimyal analizler gerekli olmaktadır. BBSHK tümörleri rutin olarak pansitokeratin antikoları ve sitokeratin 5, sitokeratin 6 ve p63 antikoları dahil olmak üzere skuamöz farklılaşma belirteçleri ile boyanmaktadır (Yi ve ark. 2017). Modern evreleme ve prognoz ana belirleyicisi olduğundan, tüm orofaringeal veya bilinmeyen primer tümörler için HPV testi zorunlu tutulmaktadır. HPV durumunun belirlenmesi için, E6 ve E7 mRNA (ters transkripsiyon PZR ile), HPV DNA (PCR veya in situ hibridizasyon ile) veya hücre döngüsü proteini p16INK4A (immünohistokimya ile) (Taberna ve ark. 2017) dahil olmak üzere birçok teknik mevcuttur. Amerikan Patologlar Heyet'inin (The College of American Pathologists) konsensus önerileri, tümör hücrelerinin >%70'inde yaygın nükleer ve sitoplazmik boyanma tanı eşiği ile, p16INK4A için immünohistokimya ile HPV için yeni teşhis edilen tüm orofaringeal kanserlerin test edilmesini içermektedir (Lewis ve ark. 2018). Ek olarak, p16INK4A seviyesi, HPV enfeksiyonunun doğrudan bir ölçüsü değildir. p16INK4A, RB'nin (Retinablastom proteini) bozunması durumunda yukarı regüle edilir ve bu nedenle onkoprotein E7'nin seviyeleri için işlevsel bir aday olmaktadır.

#### **2.1.4. Tedavi**

Her bir hastaya yönelik tedavi yaklaşımı anatomik alt bölge, evre, hastalık özellikleri, fonksiyonel hususlar ve hasta istekleri tarafından yönlendirilmektedir. Lokal veya bölgesel olarak sınırlı BBSHK için küratif tedaviler rezeksiyon, radyasyon ve sistemik tedavidir. Tedavi planlaması, organın fonksiyonunun korunmasını sağlarken, en yüksek küratif yaklaşımı hedeflemelidir. Klinik nodal tutulumu olmayan veya sadece tek bir nod tutulumu olan hastalarda, tek müdahale (rezeksiyon veya

radasyon) ile %80'in üzerinde tedavi oranları elde edilebilmektedir (Lee ve ark. 2018). Ağız boşluğu kanserleri için cerrahi, faringeal ve laringeal kanserler için radyasyon daha yaygın olarak kullanılmaktadır. Laringeal kanserler için, orta derecede hipofraksiyone radyasyon programı, standart radyasyon tedavisine göre daha iyi lokal-bölgesel kontrol ve sağkalım ile sonuçlanmaktadır (Lyhne ve ark. 2015). Transoral robotik veya lazer rezeksiyon ve larinks koruyucu parsiyel larenjektomi dahil olmak üzere minimal invaziv rezeksiyondaki gelişmeler ve ayrıca iyileştirilmiş rekonstrüktif teknikler, birincil cerrahi tedavi endikasyonlarını genişletmiştir (Weinstein ve ark. 2012; Forastiere ve ark. 2018). Drenaj yapan servikal lenf nodlarında oluşan gizli metastazlar, küçük invaziv primer tümörü olan hastalarda bile mevcut olabilir ve elektif boyun diseksiyonu kullanımı sağkalımı iyileştirmektedir (D'Cruz ve ark. 2015). Tek yönlü radyasyon veya cerrahi sonrası tedavinin başarısız olması durumunda, alternatif bir tedavi yaklaşımı ile kurtarma, yüksek bir tedavi şansı sunar (Forastiere ve ark. 2003; Forastiere ve ark. 2018). Daha ileri tümör evresi olan hastalar için, patolojik risk faktörleri tarafından yönlendirilen postoperatif radyasyon veya kemoradyasyon, nüks riskini azaltmakta ve sağkalımı iyileştirmektedir. Artmış nüks riskinin göstergesi olan patolojik özellikler arasında ekstra nodal genişleme, yakın veya ilgili cerrahi sınırlar veya perinöral invazyon; bunlar mevcut olduğunda, radyasyonla birlikte yüksek doz sisplatin kemoterapisinin uygulanması sağkalımı daha da iyileştirmektedir ve en yüksek risk gruplarında sağkalımı etkilemektedir (Cooper ve ark. 2004).

HPV (+) orofaringeal kanserli ve beşten fazla düğümü olan hastalarda >%50 uzak metastaz olasılığı vardır. Bu tür hastalar, kemoterapinin mikrometastazlar üzerindeki potansiyel olumlu etkisi göz önüne alındığında, ilk cerrahi tedavi için de zayıf adaylardır (Lee ve ark. 2018). Kemoradyoterapi ile kesin tedavi, ileri T evresi ( $\geq T3$ ) olan, birden fazla tutulmuş düğümü veya tek bir hacimli düğümü olan hastalarda ve organ işlevinin korunması için cerrahi olmayan tedavi olarak önerilmektedir. Standart kemoterapi rejimi, her 3 haftada bir 100 mg/m<sup>2</sup>'de verilen tek ajanlı sisplatin ve ağırlıklı olarak HPV (-) bir popülasyonda 3 yıllık sağkalım %37'dir. Bununla birlikte, önceden var olan iştah kaybı veya böbrek hasarı nedeniyle yüksek doz sisplatin için zayıf aday olan hastalarda, haftalık 40 mg/m<sup>2</sup> sisplatin uygulaması karşılaştırılabilir bir sonuca ulaştırmaktadır (Bauml ve ark. 2019).

HPV ile ilişkili orofaringeal kanserli, küçük tümörlü veya hafif sigara öyküsü olan hastaların istisnai olarak yüksek sağkalıma sahip olduğu görülmüştür (Fakry ve ark. 2008; Ang ve ark. 2010). Ağırlıklı olarak tedaviye daha dirençli HPV (-) popülasyonda değerlendirilen agresif multimodalite tedavi rejimleri uygulanmıştır. Ancak böyle bir tam doz tedavinin toksisitelerinin ve risklerinin her zaman garanti edilip edilmediği sorusunu gündeme getirmiştir. Bir dizi tek yönlü çalışma, sigara içmeyen ve büyük hacimli tümörleri olmayanlarda, indüksiyon kemoterapisine verilen yanıtın, radyasyon dozunun 70 Gy'den 54 Gy'ye güvenli bir şekilde düşürülebildiği ölçüde radyasyon duyarlılığını öngördüğünü göstermektedir (Marur ve ark. 2017). Bununla birlikte, bu yaklaşımı doğrulamak için randomize çalışmalara ihtiyaç vardır.

### **2.1.5. İmmünoterapötik Yaklaşımlar**

Tekrarlayan veya metastatik BBSHK'li hastalar arasında, bazıları kurtarma rezeksiyonu, yeniden ışınlama (özellikle nazofaringeal kanser için) veya metastazektomi (özellikle HPV (+) kanser için) ile tedavi edilebilmektedir (Fakry ve ark. 2014). Kalan hastalar sistemik tedavi için düşünülmektedir. Birinci basamak tedavi, alta yatan bir otoimmün bozukluk nedeniyle immünoterapiye kontrendikasyon olmadıkça, programlanmış ölüm ligand-1 (PDL1) eksprese eden tümörleri veya mikro uydu instabilitesi olan hastalarda programlanmış hücre ölümü proteini-1'e (PD1) karşı bir IgG4 insanlaştırılmış antikor olan immün kontrol noktası inhibitörü pembrolizumabı içermektedir. Bir faz III çalışmasında, pembrolizumab monoterapisini veya pembrolizumab ile platinleştirici bir ajan ve 5-florourasil kombinasyonunu aynı kemoterapi ile setuksimab ile kombinasyonu karşılaştırmıştır (Burtneş ve ark. 2019). Kemoterapi+pembrolizumab, kemoterapi+setuksimab ile değerlendirildiğinde (sırasıyla 10,7 aya karşı 13 ay; HR 0,77, P=0,0034), karşılaştırılabilir yanıt ve toksisite sonuçlarıyla genel sağkalımı (Overall Survival; OS) iyileştirmiştir. Tek başına pembrolizumab, BBSHK'li tüm hastalar arasında kombinasyon kemoterapisi artı setuksimabdan daha düşük değildir (sırasıyla medyan OS 11,6 ay ve 10,7 ay; HR 0,85).  $\geq 20$  veya  $\geq 1$  kombine pozitif skor (CPS; combine positive score) olarak tanımlanan biyobelirteç PDL1 ekspresyonu olan hastalar arasında pembrolizumab monoterapisi için sağkalım, kemoterapi+setuksimabtan daha üstün bulunmuştur (sırasıyla 14,9'a karşı 12,3 ay). Bununla birlikte, kemoterapi kombinasyonu için yanıt gösteren hastaların oranı daha yüksektir. Bu nedenle birçok



uzman, hastalık yükü daha yüksek olan hastalarda ve daha semptomatik olanlarda pembrolizumab ve kemoterapi kombinasyonunu tercih etmektedir. Pembrolizumab monoterapisini ise daha düşük tümör hacmine ve en yüksek PDL1 ekspresyonuna sahip olanlara ayırmaktadır. Bağışıklık kontrol noktası inhibisyonu ile tedavi edilen BBSHK'li hastaların küçük bir kısmı, sıklıkla hiperprogresyon olarak adlandırılan hızlandırılmış hastalık progresyonu yaşayabilmektedir (Saada-Bouzid ve ark. 2017). Hiperprogresyon, HPV (-) hastalarda veya hacimli lokal veya bölgesel nüksü olanlarda ve kemoterapi olmadan immünoterapi kullanıldığında daha olasıdır. Hiperprogresyon daha kötü bir sonuçla ilişkilendirilse de, bu ortamda kemoterapiye objektif ve hatta kalıcı yanıtlar gözlemlenebilmektedir. Hastalık kontrolünü en üst düzeye çıkarmak ve tedavide hızlı değişiklik sağlamak önemlidir (Saleh ve ark. 2019). Pnömonit, kolit veya diğer organ yaralanmaları gibi bağışıklıkla ilgili advers olaylar yaşayan hastalarda tedaviye ara verilmesi ve sistemik kortikosteroidler endike olmaktadır (Puzanov ve ark. 2017). Metastatik ve/veya tekrarlayan BBSHK'li hastalar için, yeni immünoterapilerin yanı sıra çok hedefli kinaz inhibitörleri ve diğer anti-anjiyogenik ajanlar ile umut verici immün kontrol noktası inhibisyon kombinasyonlarını araştıran birçok klinik çalışma mevcuttur (Taylor ve ark. 2020).

Tedavi boyunca semptom yönetimi, fonksiyonel rehabilitasyon ve palyatif bakım hizmetlerinin uygun şekilde dahil edilmesi, hastalar için performans durumunu ve yaşam kalitesini korumanın anahtarıdır.

## **2.2.Makrofajlar**

### **2.2.1. Kökeni ve Genel Bilgi**

Makrofajlar ilk olarak Metchnikoff (Metchnikoff 1853) tarafından adaptif bağışıklık mekanizmalarından yoksun ilkel hayvanlar üzerinde yaptığı çalışmalar sırasında tanımlanmıştır. Hücrelere, Yunanca fajin (yemek için) ve sitler (hücreler) 'den fagosit adı verilmiştir. Daha sonra makrofajlar, güncel haliyle 1970'lerin ortalarında Steinman ve Cohn (1973) tarafından keşfedildikten sonra dahil edilen monositler ve dendritik hücreler (DH'ler) ile birlikte van Furth ve Cohn (1968) tarafından kurulan mononükleer fagosit sisteminin bir parçası olarak sınıflandırılmıştır (Merad ve ark. 2013; Mildner ve Jung 2014). Mononükleer fagosit kavramı,

yetişkinlikte dokuda yerleşik makrofajlara kemik iliği (Kİ) türevli kan monositleri tarafından sürekli kaynak sağlandığını ileri sürmektedir (van Furth ve ark. 1972). Bununla birlikte, doku makrofajları ve kan monositleri arasındaki doğal gelişimsel bağlantı fikri, yıllar boyunca tartışılmıştır. Kendi kendini yenilemeye dayanan yetişkin doku makrofajlarının uzun süreli kalıcılığı iyi bilinmektedir. Ayrıca, dolaşımdaki monositlerin ortaya çıkmasından önce belirli embriyonik makrofaj popülasyonları oluşturulmaktadır. Son olarak, monositopenik hayvanlar görünüşte normal doku makrofaj popülasyonu sergiler ve dokuda yerleşik makrofajların sayısı da monositopeniden muzdarip hastalarda büyük ölçüde etkilenmemektedir (Ginhoux ve Jung 2014). Yapılan deneyler, bu hücrelerin monositik olmayabileceğini ortaya çıkarmıştır ve böylece monosit-makrofaj ekseninin revizyonuna yol açmıştır.

Makrofajlar, mezoderm kaynaklı hematopoietik hücrelerdir. Embriyonik hematopoez, bağımsız dalgalar halinde meydana gelir ve organlar arasında zamansal ve mekansal olarak koordineli bir şekilde yer değiştirmektedir. Kemirgenlerde, ilk dalga genellikle geçici olarak kabul edilir ve ekstraembriyonik yolk kesesinin kan adalarında embriyonik 7. günde (E7) başlamaktadır. İlkel çekirdekli eritrositler ve miyeloid hücreleri üretir ancak lenfosit üretmemektedir (Palis ve ark. 1999; Bertrand ve ark. 2015). Dalak ve Kİ gibi doğum sonrası mürin birincil hematopoietik organları, dolaşım sistemi yoluyla fetal karaciğer kaynaklı hematopoietik progenitörler tarafından kolonize edilmektedir ve nihayetinde özel nişlerde hematopoietik kök hücrelere (HKH'ler) ev sahipliği yapmaktadırlar (Cumano ve Godin 2007; Orkin ve Zon 2008).

Embriyonik makrofajların yetişkinliğe kadar devam edip etmediği ve eğer öyleyse, bu hücrelerin ve dolayısıyla ilkel hematopoezin yetişkin doku makrofajlara önemli ölçüde katkıda bulunup bulunmadığı uzun süredir belirsizliğini korumaktadır. Ancak ilkel olmayan hematopoezde seçici mutant farelerin analizinde, yakın zamanda yolk kesesinden türetilen hücrelerin gerçekten de erişkin dokularında yerleşik makrofaj popülasyonlarının bir parçası olabileceğini ortaya koymuştur (Schulz ve ark. 2012). Spesifik olarak, bu deneyler, Myb transkripsiyon faktörünün yolk sac miyelopoezi için vazgeçilmez olduğu, ancak kesin HKH türevli hematopoez için gerekli olduğu gerçeğinden yararlanmıştı (Sumner ve ark. 2000; Lieu ve Reddy 2009). İlginç bir şekilde, Myb eksikliği olan embriyolar, karaciğer Kupffer hücreleri

(KH), epidermis Langerhans hücreleri (LH) ve beyin mikroglia hücreleri dahil olmak üzere birçok organda normal dokuda yerleşik makrofajları barındırmaktadır (Schulz ve ark. 2012). Kayda değer bir şekilde, bu veriler, kesin hematopoez yokluğunda, normal doğum sonrası dokuda yerleşik makrofaj popülasyonları da sergileyen Myb mutant zebra balığındaki gözlemlerle tutarlı bulunmuştur (Soza-Ried ve ark. 2010).

### 2.2.2. Fizyolojik Önemi

Metchnikoff'un keşfinden sonra fagositoz işleminin başlangıçta doku emiliminin homeostatik süreçlerinde ve besinlerin alınmasında rol oynadığı kabul edilmiştir. Daha sonra Metchnikoff, bu sürecin vücudu işgalcilere karşı korumak için de kullanılabileceği sonucuna varmıştır. Makrofajlar, vücuttaki hemen hemen tüm dokularda bulunur. Demir, bilirubin, kalsiyum, lipitler ve amino asitlerin metabolizmasında rol alırlar ve vücutta bu maddelerin oldukça sabit seviyelerde tutulmasına katkıda bulunurlar (Suda ve ark. 1992; Kostelli ve ark. 2010). Bu homeostatik işlevlerin çoğu, denizyıldızında 100 yıldan daha uzun bir süre önce tanımlanan ilkel bir süreç olan efferositoz ile ilgilidir. Makrofajlar fagositozu, ölü hücre ve doku kalıntılarının uzaklaştırılmasına ve geri dönüştürülmesi süreçlerinde kullanır. Aksi takdirde birikmeleri durumunda organ işlevi engellemektedir. Bu tür bir temizleme tüm organizmalarda meydana gelir ve adaptif immün yanıtların yokluğunda bozulmadan işlemektedir.

Yüksek omurgalıların erken embriyonik dönemlerinde, kan damarlarının gelişmesinden önce, doku makrofajları iyileşme ve doku yenilenmesi sürecine katkıda bulunmaktadır. Makrofajlar, tipik olarak dokuda yerleşik tek "bağışıklık" hücreleri oldukları için önemli rollere sahiptirler. Göz (Chinnery ve ark. 2017), eklem (Kurowska ve Alivernini 2017), meme bezi (Chua ve ark. 2010) ve yumurtalıklarda (Wu ve ark. 2004) yerleşik makrofajlar, dokulardan gelen giriş sinyalleri entegre ederek ve komşu stromal hücrelere talimatlar göndererek doku bütünlüğünü korunmasını sağlamaktadır. Ayrıca, inflamasyonun kontrolünde ve ilerlemesinde regülatör görev yapmaktadırlar. Kısacası vücuttaki her organda bulunan tek hücre tipi makrofajlardır. Makrofajlar, epidermiste, korneada ve kan damarlarının bulunmadığı eklemlerin iç kısımlarında da bulunmaktadır. Bu bağlamda makrofajlar, dokulardan bilgi toplanması ve gerekli reaksiyonların tetiklenmesinde işlev gören hayati

hücrelerdir. Bu reaksiyonlar tipik olarak o organın günlük çalışması için gerekli olan fizyolojik işlevlerle ilgilidir.

Makrofajlar, mikro ortamı algılayabilen ve organın ihtiyaçlarına cevap verebilen hücreler olarak birçok farklı durumda tanımlanmıştır. Metchnikoff'un belirttiği gibi, makrofajlar her zaman denge ararlar, ancak aynı zamanda organın benzersiz bireysel işlevlerini yerine getirmesine yardımcı olurlar. Örneğin; makrofajlar hamilelik sırasında hormonlardan gelen sinyalleri algırlar ve embriyonun reddedileceği bir ortamda gelişmesine izin vermek için bağışıklık toleranslı bir ortamın oluşturulmasını sağlarlar. Aynı zamanda plasentanın oluşmasına da yardımcı olurlar. Bu ortam oluşturulmadan fetal gelişim gerçekleşmemektedir (Renaud ve ark. 2008). Kalpteki makrofajlar, kardiyomiyositlerle etkileşime girer, onları algılar ve repolarizasyonlarını hızlandırarak kalp iletimini sürdürürler. Makrofajların tükenmesi ilerleyici atriyoventriküler bloğu indükler (Hulsmans ve ark. 2017). Yapılan çalışmalar, makrofajların dokulardan ozmotik sinyalleri iletebildiğini ve yüksek tuzlu diyetle beslenen fare ve sıçanlarda kan basıncını kontrol edebildiğini göstermiştir (McHnik ve ark. 2009). Aslında makrofajlar, NaCl hipertansiyonundan kaynaklanan sinyalleri tanıyabilir ve yüksek tuz konsantrasyonu yönünde hareket edebilirler (Müller ve ark. 2013). Bunlar, bu hücrelerin en önemli işlevi olan homeostazı korumak için sadece birkaç örnektir. Makrofajlar dönüştürücü olarak işlev görerek buldukları ortamları yorumlar ve dengeyi korumak için komşu hücreleri uyarılmaktadır. Hücre dışı matrisi yeniden şekillendiren matris metaloproteinazları ve anjiyogenezi indükleyen trombospondini ve vasküler endotelial büyüme faktörünü (VEGF), yara iyileşmesini destekleyen büyüme faktörlerini içerebilmektedir. Tüm bu fonksiyonları ele alındığında makrofajları yalnızca “bağışıklık hücresi” olarak düşünmek uygun değildir.

### **2.2.3. Makrofaj Polarizasyonu**

Makrofajlar, mikroçevresel ipuçlarına tepki verebilen plastisitesi yüksek hücreler olduklarından, lipopolisakkarit (LPS) gibi patojenle ilişkili patenleri (PAMP'ler) tanıyan ve ilk yanıt veren hücreler arasındadır (Kawai ve Akira 2010). LPS, transkripsiyon faktörlerini örneğin; interferon düzenleyici faktörler (IRF'ler) ve nükleer faktör kappaB (NF-κB) aktive etmek için makrofajların yüzeyindeki Toll

benzeri reseptör 4'ü (TLR4) inaktive ederek inflamatuvar yanıt oluşturmaktadır. Uyarılan makrofajlar; IL1 $\beta$ , IL6 ve TNF $\alpha$  dahil çeşitli pro-inflamatuvar sitokinleri salgılayarak, patojenik hasara karşı savaşmak için daha fazla makrofaj ve lökositin yangı alanına toplanmasını kolaylaştırmaktadır (Malyshev ve Malyshev 2015).

Hasarlı mikroçevrelerde, inflamatuvar sitokinlerin yoğun salınımı, genel doku onarımı için potansiyel olarak zararlıdır. Bu sebeple makrofajlar, hasarlı hücreler tarafından salınan sitokinler IL4 ve IL13'e yanıt vererek, Janus kinaz-sinyal dönüştürücüler ve transkripsiyon aktivatörleri (JAK-STAT) yoluyla STAT6 transkripsiyon faktörünün aktivasyonu ile sonuçlanır. STAT6 arginaz (Arg1) ve rezistin benzeri molekül  $\alpha$  gibi genleri etkin bir şekilde uyararak anti-inflamatuvar reaksiyonunun oluşmasını sağlamaktadır (Takeda ve ark. 1996; Gordon ve Martinez 2010). Bu gen düzenleyici yollar, daha fazla uyarılmış makrofajın oluşturulmasını, bağışıklık düzenleyici sitokinlerin salınmasını, anjiyogenez ve bazal membranın yeniden şekillenmesi gibi süreçlerin indüklenmesini kolaylaştırmaktadır (Martinez ve ark. 2009; van Dyken ve Locksley 2013).

Makrofajların farklı uyarılar altındaki pro-inflamatuvar ve anti-inflamatuvar işlevlerine dayanarak fenotiplerine göre sınıflandırılmıştır. M1 makrofajlar pro-inflamatuvar, LPS veya interferon gama (IFN $\gamma$ ) tarafından klasik olarak aktive edilmiştir. M2 makrofajlar ise anti-inflamatuvar, IL4, IL13 veya IL10 tarafından alternatif olarak aktive edilmiştir (Italiani ve Boraschi 2014). İlginç bir şekilde, bu pro-inflamatuvar ve anti-inflamatuvar yollar birbirleriyle birleşebilmektedir. Çoğu zaman hasar bölgeleri de patojen saldırısına karşı hassastır, bu nedenle hasarın eliminasyonu için makrofaj türleri arasında bir denge gerekmektedir. Bu nedenle, hem işlevleri yerine getiren makrofajlar hem de M1 ve M2 spektrumunun tamamen dışında olan makrofajlar dahil olmak üzere her iki makrofaj türü de bu ortamlarda bulunmaktadır (Murray ve ark. 2014; Martinez ve Gordon 2014). Açıkçası belirli bir çevre içinde, belirli bir hastalık veya homeostatik durumda makrofaj işlevleri karmaşıktır. Bu nedenle, makrofajlar önemli bir potansiyel terapötik hedefdir (Zhou ve ark. 2014; Malyshev ve Malyshev 2015).

#### 2.2.4. Makrofaj-Kanser İlişkisi

Makrofajların çevrelerini algılama kapasitesi sadece fizyolojik değildir, aynı zamanda kanser gibi hastalıkların tanı ve tedavisi için de kullanılabilir. Kanser tedavisinin en büyük zorluklardan birisi, erken metastazın saptanamamasıdır. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada; arginaz-1 promotörünün kontrolü altında lusiferaz ifade eden bir makrofaj geliştirilmiştir. Makrofajlar tümör mikroçevresine çekildiğinde, tümörle ilişkili bir profile (tümörle ilişkili makrofaj, TAM) sahip olur. TAM'lar lusiferazı ifade etmeye başlar, bu durumda olası metastazı kolayca tespit edilebilir (Aalipour ve ark. 2019). Makrofajların dönüştürücü işlevlerini daha iyi anlamaya başladığımızda, makrofajların basit M1/M2 sınıflandırmasının yeterli olmadığını ve bu hücrelerin uyarı bağımlı şekilde manüple olabileceği açıkça görülmektedir.

Makrofajlar, tümör mikro çevresine (TME; tumor micro environment;) lökosit infiltrasyonunun büyük bir bileşenidir. Son birkaç dekada TAM'lar, tümör ilerlemesini bloke eden veya çoğaltan lökositler, sitokinler ve inflamatuvar araçlar üzerindeki etkileri nedeniyle yoğun bir çalışmanın konusu olmuştur. Yalnızca kanserde değil, diğer hastalıkların inflamasyon tablosu için makrofajların kritik görevleri bir itici güç olarak tanımlanmıştır. Bilindiği üzere, inflamatuvar barsak hastalığı, silikoz ve asbestoz gibi hastalıklardan kaynaklanan kronik inflamasyon, bu bölgeleri kanser gelişimine yatkın hale getirmektedir. İlginç bir şekilde, makrofajlar, bir yandan tümör elimasyonunu teşvik ederken (M1), diğer yandan artan tümörögenezi destekleyen (M2) farklı tiplere dönüşebilmektedir. Yaklaşık yarım yüzyıl önce yapılan çalışmalar, M1 makrofajlarının yabancı maddeleri uzaklaştırmak için birincil fizyolojik işlevine uygun olarak tümör hücrelerini öldürme ve uzaklaştırma kapasitesine sahip olduğunu göstermiştir (Evans ve Alexander 1970). M1 hücreleri, TME içinde sitokin üretimini başlatır ve pro-immün uyarıcı lökositlerin alımı ve tümör hücrelerinin fagositozu yoluyla tümör hücresi yıkımını kolaylaştırmaktadır. Bununla birlikte, diğer çalışmalar, M2 makrofajlarının tümör yayılımında merkezi bir role sahip olduğunu göstermektedir (Wang ve Joyce 2010). M2 hücreleri, bazal membran parçalanması ve birikmesi, anjiyogenez, lökositlerin toplanması ve genel bağışıklığın baskılanmasına katkılarıyla hem birincil hem de metastatik bölgelerde tümör gelişimini yönlendirdiği ortaya konulmuştur (Quail ve Joyce 2013). Normal

homeostaz gibi, TME içindeki makrofajların M1 veya M2 durumları ile sınırlı olmadığına dikkat etmek önemlidir. Bu spektrumun içinde veya dışında bulunabilirler. Polarizasyon durumundan bağımsız olarak tüm makrofaj popülasyonlarının ortamdan çıkarılması hem birincil hem de metastatik tümörjenezde önemli bir azalma olduğu için potansiyel bir terapötik seçenek olarak ortaya çıkmıştır (Ostuni ve ark. 2015). Öte yandan, makrofaj, polarizasyon durumundan bağımsız olarak, mikroçevresel ipuçlarının bir fonksiyonu olarak fenotipler arasında geçiş yapma yeteneği de dahil olmak üzere, plastisite kapasitesini korumaktadır. Bu nedenle, TME içindeki makrofaj fenotipinin immün baskılayıcıdan immün destekleyiciye değiştirilmesi, şu anda terapötik uygulamalar için araştırılmaktadır (Quail ve Joyce 2016).

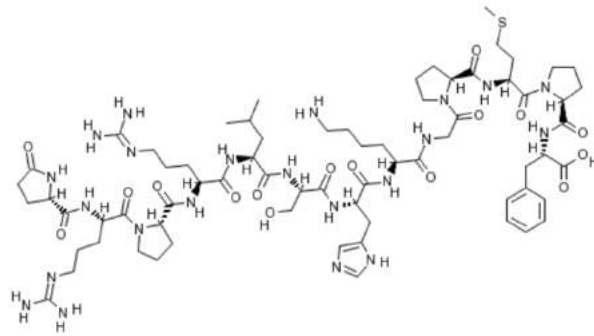
### **2.2.5. Makrofajların Terapötik Kullanımı**

İlaç yüklü nanopartiküllerin doğru immün sistemi uyarıcı ile ortama verilmesiyle yüksek fagositik kapasiteye sahip makrofajların bir ilaç taşıyıcı olarak, kanser hücrelerini doğrudan öldürme yetenekleri büyük ilgi görmektedir (Lee ve ark. 2016). Örneğin, peritoneal makrofajlar toplanıp nanoparçacık/lipozom formülasyonlarıyla inkübe edilerek ilacın makrofaja yüklenmesi sağlanmaktadır ve daha sonra hayvanlara/hastalara geri infüze edilebilmektedir (Choi ve ark. 2012; Madsen ve ark. 2012). *In vivo* olarak enjekte edilen ilaçlar, sürekli salınım için vücutta yerleşik olan makrofajlar/TAM'lar tarafından alınmaktadır (Tanei ve ark. 2016). Her iki stratejide de ilaçların dolaşım yarı ömrünü önemli ölçüde arttırırken, makrofajın uzun vadeli hayatta kalması ilacın toksisitesi ile sınırlıdır. Bu nedenle ilaçların çoğu, akut toksisiteyi azaltmak için makrofaj taşıyıcısına nanopartikül veya lipozom formülasyonlarına yüklenerek kullanılmaktadır (Choi ve ark. 2012; Ikehara ve ark. 2016). İlacın makrofajlar için toksik olmadığı durumda, uygun formülasyon, Dou ve ark. (2006; 2009) tarafından indinavir nanoparçacık yüklü makrofajlar için gösterildiği gibi, yüklenen ilacın makrofajlardan en az 2 haftaya kadar sürekli salınımını sağlamaktadır. Hücre içi stabilizasyon amacıyla, uygun nanoparçacık kapsülleme stratejileri kullanılarak proteinleri makrofajlara yüklemek bile mümkündür (Klyachko ve ark. 2014). Etkili ilaç yüklemesi için önemli olan, ilaç yüklü makrofajların tümöre göç etme yeteneğidir. Chang ve ark. (2013) tarafından yapılan bir araştırmada, makrofajlar tarafından alınan nanoparçacıkların boyutunun, makrofajların hareket kabiliyetini önemli ölçüde değiştirebildiğini göstermektedir. ayrıca daha küçük

nanoparçacıkların (30 ve 50 nm), daha büyük nanoparçacıklara kıyasla (100 ve 500 nm) makrofajlar tarafından daha yüksek fagosite olduğu gösterilmiştir. Makrofajların göç hızının yavaşlatılması için 100 nm nanopartiküllerin kullanılmasının etkili ilaç yükleme ve makrofaj göçü için iyi bir denge sağladığını ileri sürmektedir (Chang ve ark. 2013). Taşıyıcı makrofajlarda ilaç aktivitesi üzerindeki kontrolü sağlamak için makrofajlar tetiklenmiş salınım için sıcaklığa duyarlı lipozomlar (İkehara ve ark. 2006), fototermal terapi için altın silika nanokabuklar (Madsen ve ark. 2012) ve elektromanyetik indüksiyon ve ikili izleme kullanılarak demir oksit nanoparçacıkları ile yüklenmektedir (Choi ve ark. 2012; Han ve ark. 2016). Amfifilik polimerle modifiye edilmiş iyon oksit (IO) ve altın (Au) nanopartiküllerle yapılan bir çalışmada makrofajların, vakuolizasyonunun ve polarizasyonunun arttığı tespit edilmiştir. Daha küçük boyutlardaki nanopartiküllerin (4 nm) büyük boyutlardakine (14 nm) kıyasla anlamlı oranda makrofaj polarizasyonuna etki ettiği ve lizozomal hasara sebep olduğu gösterilmiştir. Makrofajlar tarafından nanopartiküllerin alımı sırasında büyük miktarlarda vakuollerin oluştuğu, bunun bağışıklık tepkisini arttırdığı ve makrofajları M1 polarizasyonuna doğru indüklediğini göstermiştir (Cheng ve ark. 2019)

### 2.3.Apelin ve Apelin Reseptörü

Anjiyotensin reseptörü-benzeri 1 olarak da adlandırılan apelin reseptörü (APJ/APLNR) ilk olarak 1993 yılında klonlanmıştır. APJ, anjiyotensin II reseptörü (AT1) ile transmembran alanlarında %54 homoloji ve tüm sekans için %31 homolojiye sahiptir. Bununla birlikte, APJ, anjiyotensin II'yi bağlamamaktadır (O'Dowd ve ark. 1993). APJ reseptörünün ilk endojen ligandı olan Apelin, Tatemoto ark. (1998) tarafından sığır mide ekstraktlarında tanımlanmıştır (Şekil 2.2).



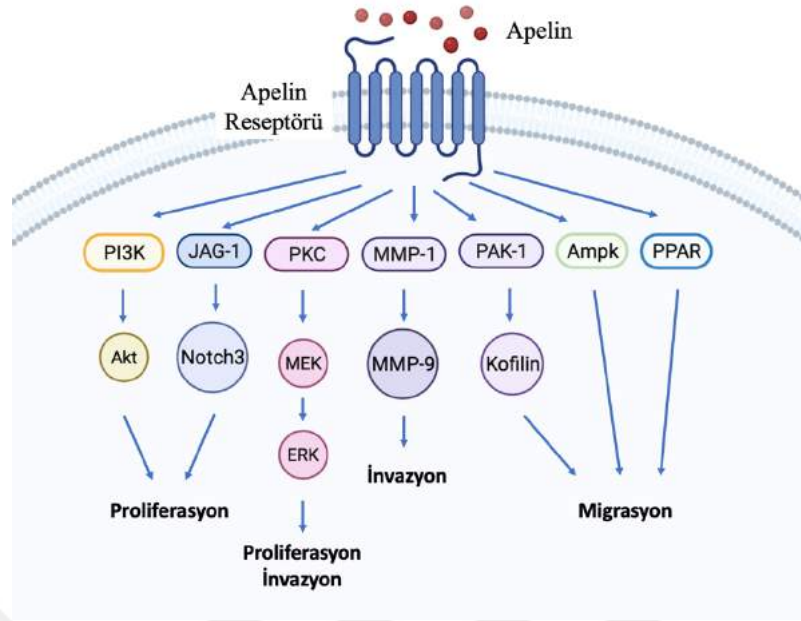
Şekil 2.2. Apelinin moleküler yapısı (Tatemoto ve ark. 1998).





### 2.3.3. Apelinin Karsinogenezdeki Rolü

Yüksek apelin seviyeleri, kanser progresyonu için potansiyel bir belirteç olarak görev yapan kolanjiyokarsinom, prostat, oral, yumurtalık, kolon, endometriyal, akciğer ve gastroözofageal kanserlerle ilişkilendirilmiştir. Apelin, artan proliferasyon, göç, invazyon ve apoptoza direnç yoluyla metastazı teşvik edebilir (Lacquaniti ve ark. 2015; Wysocka ve ark. 2018). Apelin seviyesi küçük hücreli dışı akciğer kanseri (NSCLC; non small cell lung cancer) örneklerinde normal akciğer dokusuna göre artmış ve yüksek apelin düzeyleri hastanın genel sağkalımının kötü olması ile ilişkili bulunmuştur (Berta ve ark. 2010). Hepatoselüler karsinom tümörlerinde (Lin ve Chuang 2013) ve insan kolon adenomlarında ve adenokarsinomlarında sağlıklı dokuya kıyasla daha yüksek apelin ve APJ ekspresyon seviyeleri saptanmıştır. Ekzojen apelinin, kolon kanseri hücreleri üzerinde anti-apoptotik etkilere sahip olduğu bulunmuştur (Picault ve ark. 2014). İnsan kolon kanseri hücre hatlarında bu peptidin JAG-1/Notch3 sinyal yolu üzerinden proliferasyonu arttırdığı tespit edilmiştir (Chen ve ark. 2017). Hücre göçü, embriyogenez, yara iyileşmesi, anjiyogenez ve metastaz gibi birçok fizyolojik ve patolojik süreçte önemli bir rol oynamaktadır. Hücre hareketinin düzenlenmesinde rol oynayan ana faktörlerden biri, aktin hücre iskeletidir (Blanchoin ve ark. 2014). Aktin, kas kasılması, hücre motilitesi, adezyon ve şeklinin korunması gibi birçok farklı süreçle ilişkili konservatif bir proteindir (Khaitlina 2007; Simiczjew ve ark. 2017). Aktin hücre iskeletinin organizasyonu, aktin monomerik ve polimerleştirilmiş (filamentli) formu arasındaki dinamik dengeyi düzenleyen çoklu aktin bağlayıcı proteinler (ABP; actin binding protein) bulunmaktadır. Bu oran kanser hücrelerinde bozulabilir (Gross 2013). ABP'lerden biri, hem monomerik hem de filamentli aktin ile etkileşime giren kofilindir. Bu protein, aktin hücre iskeletinin dinamik olarak yeniden şekillenmesini etkiler ve iki şekilde hareket edebilir. Bunlar; aktin filamanlarının kesilmesi ve monomerlerin aktin filamanlardan ayrılmasını sağlayarak depolimerizasyon hızının artırılması sağlanmaktadır (Bravo-Cordero ve ark. 2013). Ayrıca apelinin etkilenen kofilinin akciğer kanseri hücrelerinin göçünü uyarabileceğini göstermiştir (Şekil 2.4; Lv ve ark. 2016).



**Şekil 2.4.** Apelin reseptörü ile aktive olan moleküler yollar (Lv ve ark. 2016).

Gastroözofagal kanserler üzerine yapılan bir çalışmada, 53 skuamöz hücre karsinomasına sahip hasta ve 27 sağlıklı bireyde, apelin ekspresyonunun lenf nodu metastazı olan tümör dokularında ve serum seviyelerinde kontrole göre önemli ölçüde arttığı bulunmuştur. Bunun tersine evre-4 kanserli hastalarda ve nod/uzak metastazı olan bireylerin serum düzeyinin ise azaldığı tespit edilmiştir (Diakowska ve ark. 2018). Bir adipokin olan apelin ve reseptörü APJ, lenfatik invazyonu etkileyebilmektedir. Obez endometriyal kanser hastalarında serum apelin düzeyleri, normal BMI endeksine sahip hastalarına göre daha yüksek bulunmuştur (Altınkaya ve ark. 2015). Yüksek dereceli seröz yumurtalık kanseri tanısı alan 30 hasta üzerinde yapılan çalışma da ise lenf nodu metastazının apelin immünoreaktivitesiyle güçlü ilişki gösterdiği bulunmuştur (Ünal ve ark. 2020)

Apelin ekspresyonu hipoksi, stres, açlık ve besleme gibi faktörler tarafından düzenlenmekte (Han ve ark. 2008; Izgut-Uysal ve ark. 2014) ve TNF $\alpha$  gibi inflamatuvar araçlar tarafından indüklenmektedir (Daviaud ve ark. 2006). İnflamatuvar araçlar tarafından uyarılan apelin transkripsiyon aktivitesi ve bağırsak dokusunda inflamasyon sırasında artan apelin ekspresyonu gösterilmiştir (Han ve ark. 2008). Apelinin, kültürlenmiş J774 makrofajlarının üst fazındaki IL6 ve MCP-1 proteini konsantrasyonlarını azalttığı ve ayrıca damar duvarında makrofaj birikimini önlediği bildirilmiştir. Ayrıca, LPS uyarılmasından önce, pyr-apelin-13 ile ön muamele, J774.1

hücrelerinde IL6'nın mRNA ekspresyonunu ve protein salgılanmasını önemli ölçüde azaltmıştır (Obara ve ark. 2014). Bununla birlikte, apelin, lökositin inflamatuvar bölgeye göçünde önemli bir rol oynayan VCAM-1, ICAM-1 ve E-selektin gibi yapışma moleküllerinin ekspresyonunu modüle etmemektedir (Leeper ve ark. 2009). Nöral makrofajlar apelin çok az ifade etse de (Choe ve ark. 2000), Leeper ve ark. (2009) çalışmasında, mürin monositlerinin ve makrofajların apelin reseptörünü eksprese ettiğini, bu da makrofajların APJ yoluyla apeline yanıt verdiğini göstermiştir. Kültüre edilmiş hücrelerde inflamatuvar sitokinlerin ve kemokinlerin ifadesini düzenleyen apelinin anti-inflamatuvar etkisi gösterilmiştir (Leeper ve ark. 2009).

## **2.4. Gen İfadesinin Manipülasyonu**

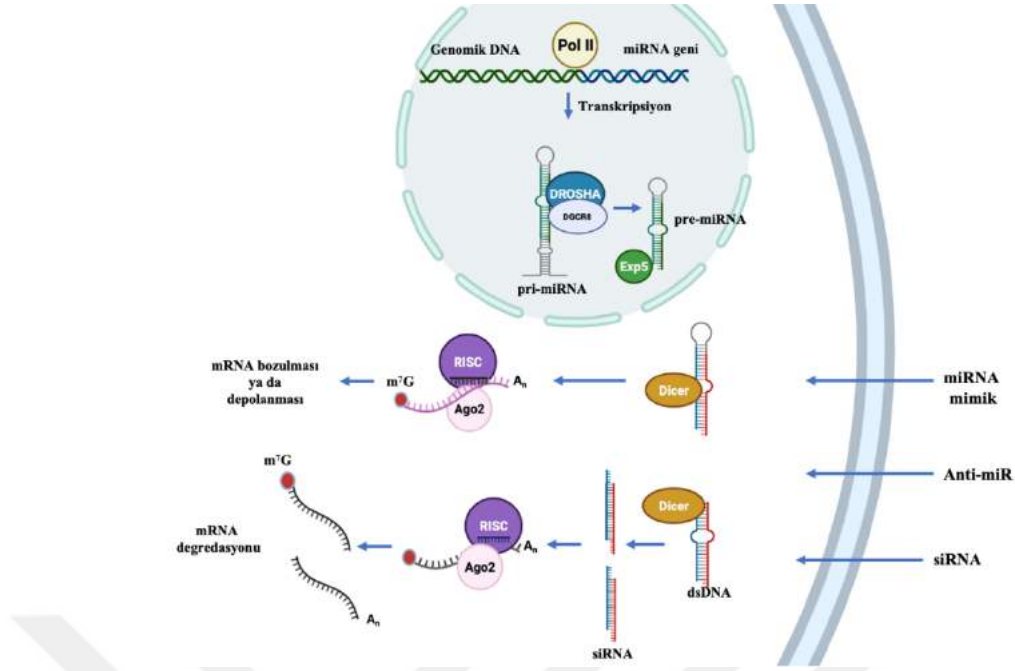
Gen ifadesinin hem posttranskripsiyonel hem de epigenetik olarak düzenlenmesinde hücrelere eksojen olarak sokulan çift sarmallı RNA'lar tarafından susturulabileceğinin keşfi moleküler çalışmalar için çığır açmıştır. RNAi'nin (RNA interferans) en önemli özelliği, dsRNA'nın gen susturmasını ortaya çıkarmış olmasıdır. Üç farklı RNAi yolu bilinmektedir; küçük interferans yapan RNA (siRNA), mikroRNA (miRNA) ve Piwi-etkileşimli RNA (piRNA; Kim ve ark. 2009). Her biri, Argonat/PIWI (Ago/PIWI) protein ailesi üyelerine yüklenen olgun küçük RNA'ların ortak özelliği ile farklı biyogenez, hücresel işlevler ve koruma modellerine sahiptir. Küçük RNA'lar, Ago/PIWI proteinleri ile kompleks halindeyken hedef RNA'ları bağlamaktadırlar. Bazı Ago/PIWI proteinleri, hedef RNA'yı küçük RNA'nın 10. bazına bağlı bazda bölen "dilimleyici" ribonükleaz (RNaz) aktivitesine sahiptir (Sheu-Gruttadauria ve MacRae 2017).

### **2.4.1. siRNA ve miRNA**

siRNA'lar, uzun dsRNA'dan kesilen bir RNase III enzimi olan Dicer enzim aktivitesinin ürünleridir. dsRNA, uzun bir molekül içi saç tokası veya bir uzatılmış dubleks RNA formunda olabilmektedir. Böceklerdeki siRNA yolu, tüm omurgalılar gibi diğer hayvan türlerinde bulunmaz ve eklembacaklılara özgü Dicer (Dicer 2) ve Argonat 2 (Ago2) proteinleri aracılığıyla gerçekleşmektedir (Wynant ve ark. 2017). dsRNA'nın Dicer 2 ile işlenmesi, 3' tek sarmallı çıkıntılar sergileyen ~21 nt RNA dupleksleri oluşturmaktadır. Dubleksin her iki ipliği de Ago2'ye yüklenir, ardından Hen1 metiltransferaz terminal 2' hidrosilleri metiller. Ago2, siRNA hedef

transkriptlerini parçalayan dilimleyici aktiviteye sahiptir. Ago2 dilimleme ile hedeflerin yok edilmesi, siRNA'lar tarafından susturma için kritik öneme sahiptir. siRNA ve hedef RNA'nın 10. bazındaki uyumsuzluklar nedeniyle dilimleyicinin bozulması, gen susturma kaybına yol açar. Bu nedenle, siRNA aracılı susturma, hedef RNA ve siRNA arasında mükemmel yakın eşleşmeyi gerektirmektedir.

Memelilerde ise Dicer 2 enzimi yerine DGCR8 ve Drosha enzim kompleksi aracılığıyla çalışmaktadır. Sitosolik siRNA yolunda, genellikle uzun eksojen (örneğin viral kaynaklı) RNA dupleksleri, RNaz Dicer tarafından 3' uçlarında 2 nt çıkıntıları olan kısa siRNA duplekslerine (19 nt) işlenir, bunlar daha sonra RNA kaynaklı susturma kompleksine (RISC) dahil edilmektedir. RISC içinde, iki siRNA dizisinden biri bozulurken, diğeri olan kılavuz dizi, RISC'yi mRNA bozunmasını indüklemek için endonükleaz Ago2 tarafından bölünen tamamlayıcı mRNA dizilerine hedeflemek için kullanılmaktadır. Bu durum, RNAi'nin yüksek verimliliğini açıklayan katalitik bir işlemdir (siRNA kılavuz ipliği ile yüklenen bir RISC, birçok tamamlayıcı mRNA molekülünü parçalayabilmektedir). Endojen miRNA yolunda ise, genomik olarak kodlanmış miRNA'lar çekirdekte RNA polimeraz II tarafından kopyalanır. Bu pri-miRNA'ların Drosha ve DGCR8 tarafından işlenmesinden sonra, elde edilen pre-miRNA'lar çekirdekten sitoplazmaya exportin-5 (EXP5) yoluyla taşınmaktadır. Bununla birlikte, siRNA ve miRNA yolları, kılavuz iplik seçiminden sonra farklılık gösterir. siRNA'lar hedef mRNA'ya tamamen tamamlayıcıdır ve yıkımlanmasını indükler. miRNA iplikleri ise, RISC'yi esas olarak, yalnızca kısmi baz eşleştirme etkileşimleri oluşturdukları hedef mRNA'larının 3'-UTR'sine yönlendirir. miRNA'nın yaygın biyolojik etkileri, protein biyosentezinin 5' başlığa bağlı başlatılmasının inhibisyonu ve/veya sitoplazmik mRNA'nın degradasyonu, mRNA'ların 5' ucunda 7-metil-guanozin-5',5'-trifosfat başlığı ve mRNA'ların 3' ucundaki poli (A) kuyruğunun degradasyonu ile sağlanmaktadır (Şekil 2.5.; Grünweller ve Hartmann 2016).



**Şekil 2.5.** Endojen ve ekzojen kaynaklı miRNA'ların hücresel süreci (Grünweller ve Hartmann 2016).

#### 2.4.2. shRNA

Kimyasal olarak sentezlenen kısa interferans yapan RNA oligonükleotitlerinin (siRNA'lar) doğrudan sitozole transfeksiyonunu içeren yaklaşımla birlikte RNAi'nin birkaç yöntemi zaman içinde gelişmiştir. siRNA'ların aktarımı birçok hücre türünde uygulanabilir. Ancak bu uygulamanın başarısı, siRNA aracılı gen susuturmanın yalnızca transfeksiyon yapılan hücreler ile sınırlanmaktadır. RNAi'nin başka bir formu, vektör aracılı üretim ile hücre içinde sentezlenen kısa saç tokası RNA'ların (shRNA; short hairpin RNA) kullanımını içermektedir. siRNA'lar gibi shRNA'lar, RNA pol III veya modifiye edilmiş pol II promotörleri tarafından kopyalanan shRNA'ları kodlayan plazmit vektörleri kullanılarak transfekte edilebilmektedir. Ancak viral vektörler de kullanılarak memeli hücrelerine aktarılabilmektedir. siRNA teknolojisinde siRNA dubleksleri doğrudan sitozole aktarılmaktadır. Endojen miRNA'da bulunan saç tokasına benzer şekilde, shRNA'lar 4-11 nt'lik kısa bir döngü ile bağlanan iki tamamlayıcı 19-22 nt RNA dizisinden oluşmaktadır. Transkripsiyonun ardından, shRNA dizisi sitozole aktarılır. Burada, shRNA'yı siRNA duplekslerine işleyen endojen bir enzim olan Dicer tarafından tanınmaktadır. Eksojen olarak iletilen sentetik siRNA oligonükleotitleri gibi, endojen olarak türetilmiş siRNA, hedef mRNA'ya

bağlanmak için RISC kompleksine katılır gen ifadesi baskılanır (Kutter ve Svoboda 2008).

### **2.4.3. miR-30 Adapte shRNA**

Kısa shRNA yapıları, insan mikroRNA-30 (miR-30) birincil transkriptleri olarak ifade edilmektedirler. Bu tasarım, saç tokası yapısına bir Drosha işleme bölgesi ekleyerek gen susturma verimliliğini büyük ölçüde arttırdığı gösterilmiştir (Boden 2004). Saç tokası sapı, dsRNA'nın 22 nükleotidinden ve insan miR-30'undan gelen 19 nükleotid halkasından oluşmaktadır. Saç tokasının her iki tarafına miR-30 halkası ve 125 nükleotitlik miR-30 yan dizisinin eklenmesi, geleneksel shRNA tasarımlarıyla karşılaştırıldığında, ifade edilen saç tokalarının Drosha ve Dicer işlenmesinde >10X artışa neden olmaktadır (Silva 2005). Artan Drosha ve Dicer işleme, daha fazla shRNA üretimi ve ifade edilen saç tokaları için daha fazla etki anlamına gelmektedir. miR-30 tasarımının kullanılması, hedef dizi seçimi için 'kural tabanlı' tasarımların kullanılmasına da izin vermektedir. Bu kural, antisens zincirin 5' ucunun destabilize edilmesidir ve mikroRNA/siRNA'ların RISC kompleksine dahil edilmesiyle sonuçlanmaktadır. Tescilli tasarım algoritması, kodlama bölgelerindeki dizileri ve insan veya fare genomlarındaki diğer herhangi bir diziyle 3'ten fazla uyumsuzluk içermeleri şartıyla 3'-UTR'yi hedeflemektedir.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın etik kurul onayı 08.05.2020 tarihli ve 2020/2473 karar sayısı ile Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi İlaç ve Tıbbi Cihaz Dışı Araştırmalar Etik Kurulundan alınmıştır (Bkz. Ek-1).

#### 3.1.Hücre Kültürü

Çalışmada kullanılan skuamöz hücre karsinoması hücre hattı SCCL-MT1, University of Southern California (Los Angeles, CA, USA)'dan ve mürin makrofaj hücre hattı RAW264.7 ise American Type Culture Collection (ATCC)'den temin edilmiştir. Dondurulmuş hücreler önce 37°C'de çözüldükten sonra 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj yapılmıştır. Pellette toplanan hücreler, %10 Fetal Sığır Serum (Heat Inactivated FBS, Gibco, A.B.D.) ve %1 penisilin/streptomisin (P/S; 100 U/ml penisilin ve 100 µg/ml streptomisin; Gibco, A.B.D.) içeren RPMI (Hyclone, A.B.D.) kültür besiyeri bulunan flasklara alınarak %95 nemli ve %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde 37°C'de inkübe edilmiştir.

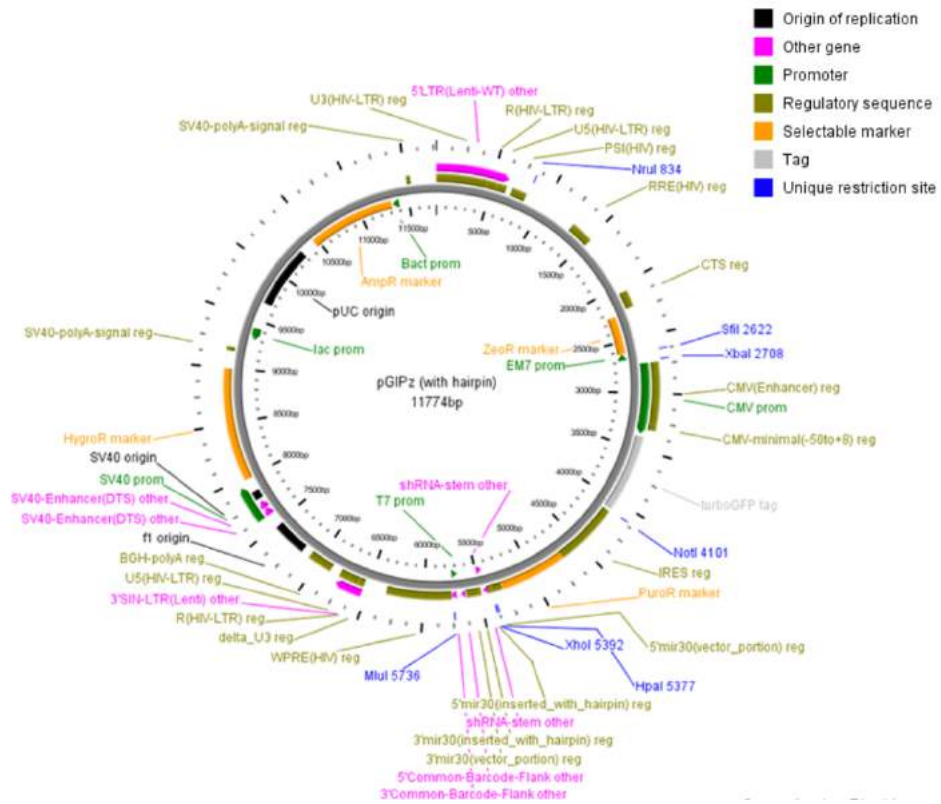
Hücreler flaskta %80'lik alanı doldurduktan sonra steril olarak %0,25 tripsin (Hyclone, A.B.D.) solüsyonu muamelesi ile kaldırılarak, 5 ml fosfat buffer saline (PBS; Gibco, A.B.D.) ile yıkanmıştır. T25 flaskına (Orange Scientific, A.B.D.) 2 ml ve T75 flaskına 5 ml steril %0,25 trypsin solüsyonu eklenerek, 5 dakika 37°C'de inkübe edilmiştir. Daha sonra 10X ışık mikroskopunda (Olympus CKX41, Almanya) hücrelerin kalkıp kalkmadıkları gözlenmiştir. Hücrelerin kalktığından emin olunduktan sonra tripsin inaktivasyonu için iki kat hacimde tam bir kültür besiyeri (%10 FBS ve %1 P/S içeren RPMI) eklenmiştir. Hücre solüsyonu 15 ml'lik falkonlara (ISOlabs, Çin) aktararak, 1200 RPM'de 5 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant atılmıştır. Hücre peleti 5 ml tam bir kültür besiyerinde çözdürülmüştür ve hemositometri lamında (Hausser Bright-Line, A.B.D.) hücre sayımı yapılmıştır.



## 3.2. SCCL MT1 Hücrelerinin Transdüksiyonu

### 3.2.1. pGIPZ plazmidini

Çalışmada kullanılan pGIPZ plazmidini, Dharmacon™ GIPZ™ Lentiviral shRNA Kütüphanesi, Cold Spring Harbor Laboratuvarı'ndan Dr. Greg Hannon ve Harvard Tıp Okulu'ndan Dr. Steve Elledge tarafından geliştirilmiştir. Bu kütüphane, birincil ve bölünmeyen hücreler dahil çoğu hücre tipinde RNA interferansı (RNAi) üretebilen güçlü bir mikroRNA'ya uyarlanmış shRNA'nın pGIPZ lentiviral vektörü (Şekil 3.1.) ile birleştirilmesiyle oluşturulmuştur.



Şekil 3.1. pGIPZ plazmidinin ana yapısı.

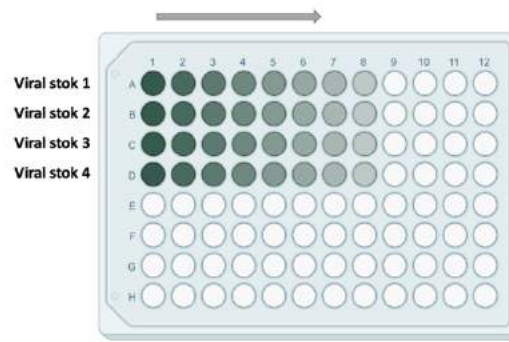
Ticari olarak temin edilen plazmidler apelin genine özgü miRNA-adapte shRNA sekansına sahip iki farklı viral stok olarak temin edilmiştir. Bu plazmid klonları sırasıyla V3LHS\_401189 ve V3LHS\_401190 klonlarıdır (Dharmacon, Birleşik Krallık). Viral stoklar soğuk zincirle temin edilmiş olup, -80°C'de muhafaza edilmiştir. Çalışmadan hemen önce oda ısısında 5 dakika inkübe edilmiştir. 3'-UTR dizine hedeflenmiş olan plazmidlerin uygun antisens dizileri Tablo 3.1'deki gibidir.

**Tablo 3.1.** Plazmid içinde yer alan apelin geni 3'UTR bölgesine hedefli shRNA dizileri.

Plazmid ID	Antisens Dizisi
V3LHS_401189	TTACAAACATTGAACACAG
V3LHS_401190	TTCTTAATGAACAGGGCCT

### 3.2.2. Viral Stok Dilüsyonlarının Hazırlanması

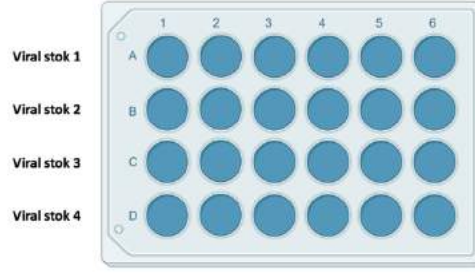
Kullanılacak viral dilüsyon miktarının belirlenmesi için öncelikle serumsuz besiyerinde 96'lık kuyucuklu pleytte seyreltme yapılmıştır (Şekil 3.2). Her kuyucuğa 80 µL serumsuz besiyeri eklenmiştir. Sütun 1'e ilk dilüsyon olarak 20 µL çözülmüş virüs stoğu eklenmiştir. Daha sonra sırasıyla önceki kuyucuktan sonrakine 20 µL olacak şekilde 5X dilüsyonlar hazırlanmıştır.



**Şekil 3.2.** Viral stok dilüsyonlarının hazırlanması.

### 3.2.3. Transdükte Birim Sayısının Belirlenmesi

Hedef hücre transdüksiyonundan hemen önce çalışılacak hücrelerde transdükte birim sayısı belirlenmiştir. Her kuyucuğuna tam besiyerinde  $5 \times 10^4$  hücre olmak üzere 24'lük pleytin tüm kuyucuklarına ekilmiştir (Şekil 3.3). 24 saat etüvde inkübe edildikten sonra Tablo 3.2'ye göre hazırlanmış viral stok dilüsyonlarından her kuyucuk için 25 µL viral stok dilüsyonu ve 225 µL serumsuz besiyeri olacak şekilde kuyucuklara 250 µL besiyeri eklenmiştir. Dört saat 37°C'de inkübe edildikten sonra 1 mL tam besiyeri RPMI eklenerek 48 saat kültüre edilmiştir. Bu süre sonunda floresan mikroskopta (Zeiss Colibri 7, Almanya) TurboGFP ışımaya sahip koloniler sayılmıştır.



**Şekil 3.3.** Viral dilüsyonların hücelere uygulanması.

**Tablo 3.2.** Transdüksiyon dilüsyonları.

Kuyucuk Numarası			
96'lık pleyttteki	24'lük pleyttteki	İlk viral partikül dilüsyon hacmi	Dilüsyon faktörü (DF)
kuyucuk numarası	kuyucuk numarası		
A1		25 µL	5
A2	A1	25 µL	25
A3	A2	25 µL	125
A4	A3	25 µL	625
A5	A4	25 µL	3125

Transdüksiyon ünitesinin (TU/mL) belirlenmesinde aşağıdaki formül kullanılmıştır;

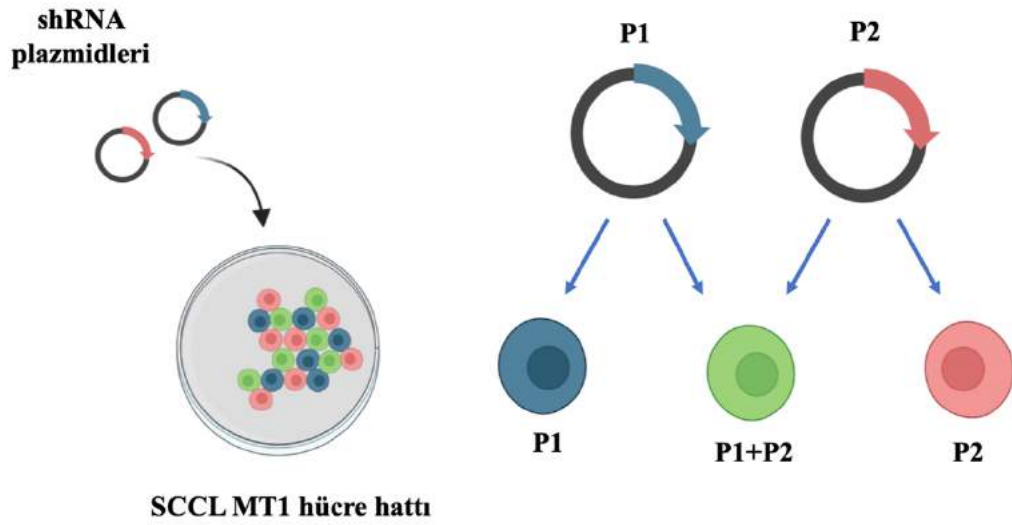
$$= \text{TurboGFP pozitif koloni sayısı} \times \text{Dilüsyon Faktörü} \times 40$$

### 3.2.4. Hedef Hücrelerin Transdüksiyonu

İlk gün (0. gün) SCCL MT1 hücreleri 24'lük pleytlere  $5 \times 10^4$  hücre olacak şekilde tam kültür besiyeri içinde ekilmiştir. Hücreler %5 CO<sub>2</sub>'lik etüvde 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir.

Birinci gün pleyttteki mevcut besiyeri aspire edilerek her bir kuyucuğa 225 µL serumsuz RPMI besiyeri ve 25 µL önceden belirlenmiş olan 25 dilüsyon faktörüne sahip viral partiküller eklenmiştir. Yaklaşık 4-6 saat post transdüksiyon gerçekleştirilmiştir. Süre sonunda 1 mL tam besiyeri RPMI (%10 FBS ve %1 P/S) tüm kuyucuklara eklenmiştir. Hücreler %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde 37°C'de 48 saat inkübe edilerek,

raportör gen varlığı TurboGFP ifadesine bağlı olarak mikroskopik olarak incelenmiştir (Şekil 3.4). Bu aşama transdüksiyon için ilk indikatördür.



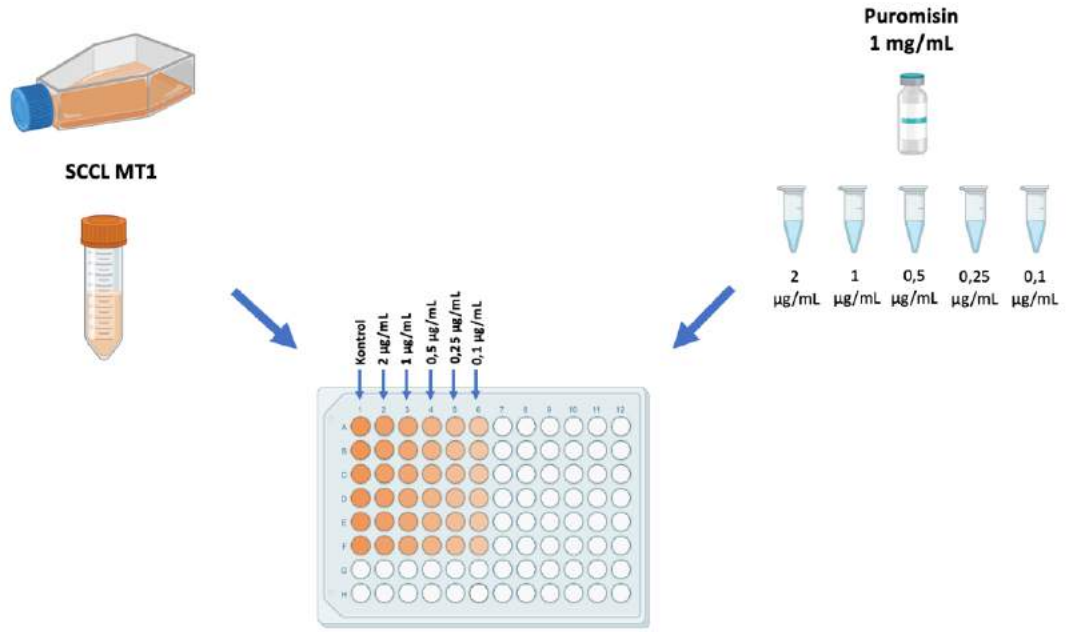
Plazmid Klon ID; P1: V3LHS\_401189, P2: V3LHS\_401190

**Şekil 3.4.** Kanser hücrelerinin transdüksiyonu sırasında olası plazmid klonlarının hücrelere dağılımı.

### 3.2.5. Puromisin Seleksiyon

#### 3.2.5.1. Optimum Puromisin Miktarının Belirlenmesi

Memeli hücreleri için uygun olan 0-10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  puromisin miktarının SCCL MT1 hücreleri için optimizasyonu yapılmıştır. T25'lik flasktan toplanan hücreler 96 kuyucuklu pleytlere  $2 \times 10^4$  hücre olacak şekilde ekilmiş ve  $37^\circ\text{C}$  etüvde 24 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra hazırlanan puromisin dilüsyonları ve antibiyotiksiz kontrol besiyeri hücrelere uygulanmıştır (Şekil 3.5). Uygulama sonrası 24 ve 48. saatlerde mikroskopik olarak hücre ölümleri gözlemlenmiştir.



**Şekil 3.5.** Puromisin dilüsyonlarının hücelere uygulanması.

### 3.2.5.2. Puromisin Uygulanması

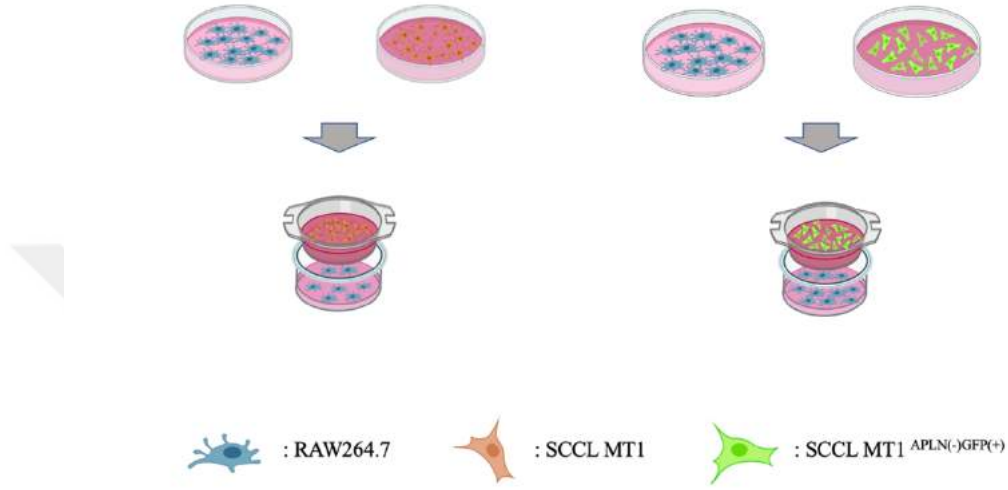
Post-transdüksiyondan 48 saat sonra hücelerin TurboGFP ifadesi takip edilmiştir. TurboGFP ifadesi %90 altında kaldığında hücelere puromisin muamelesi yapılarak transdükte olmayan hücelere elimine edilmiştir. Transgen ifadesinden 24-72 saat sonra her 2-3 günde bir 0,1 µg/mL olarak şekilde tam besiyeri RPMI'a (%10 FBS ve %1 P/S) puromisin eklenmiş ve hücelere günlük takip edilmiştir. Transdükte hücelerin kalıcı seçilimine 10-15 gün devam edilmiştir. Stabil olarak GFP ifade eden hücelere -80°C'de stoklanmıştır.

### 3.3. Floresan Mikroskopik Görüntüleme

Transdükte olan SCCL MT1 hücelerinin TurboGFP ışığa takibi floresan mikroskop (Zeiss Colibri 7, Almanya) ile incelenmiş ve excitation 555 nm, emission 475 nm olacak şekilde ölçümler alınmıştır. Görüntüleme ve hücre/koloni sayımları gerçekleştirilmiştir.

### 3.4. SCCL MT1 ve RAW264.7 Hücrelerinin Ko-kültürlenmesi

Hücrelerde gen ifadesi ve sitokin miktarlarının tayini amacıyla öncelikle mono kültürler olarak daha sonra 6 kuyucuklu pleyt ve 0,4 µm'lik insörtleriyle indirekt olarak ko-kültüre edilmiştir. Hücrelerin ko-kültürlenmesi Şekil 3.6'de şematize edilmiştir.



**Şekil 3.6.** SCCL MT1 ve RAW264.7 hücrelerinin mono kültürlerinden ko-kültürlerinin insört sistemi ile oluşturulması.

SCCL MT1 hücreleri 6 kuyucuklu pleyt yüzeyine  $5 \times 10^4$  hücre olmak üzere RPMI besiyerinde ekilmiştir. Eş zamanlı olarak insörtlere de RAW264.7 hücreleri  $5 \times 10^4$  hücre olarak DMEM besiyerinde ekilmiştir. Her iki hücre grubu 24 saat %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde 37°C'de inkübe edilmiş, 24 saatin sonunda insörtler SCCL MT1 hücrelerinin bulunduğu 6 kuyucuklu pleytlere geçirilmiştir. Ko-kültür 24, 48 ve 72. saatlerde olmak üzere ile mRNA analizine hazırlanmıştır.

### 3.5. Gen Ekspresyon Seviyesinin Belirlenmesi

#### 3.5.1. Hücre Hatlarından Total RNA İzolasyonu

SCCL MT1 ve RAW264.7 hücre hatlarından mRNA ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi için total RNA izolasyonu RiboEx (GeneAll, Seul, Güney Kore) total RNA izolasyon solüsyonu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. 6 kuyucuklu pleytlere ve ko-kültür insörtlerine ekilen hücreler, 1 ml RiboEx total RNA izolasyon solüsyonu eklenerek toplanmıştır. Toplanan hücreler endorf tüplere alınarak, 10 dakika oda

ısısında inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası her bir ependorfa 200 µl kloroform eklenmiş ve pipetaj yapılmıştır. Ependorflar 15 dk oda ısısında inkübe edildikten sonra +4°C’de 15.000 g’de 20 dakika santrifüj (Hettich 200R, Almanya) edilerek üst faz toplanıp, ayrı ependorf tüplere aktarılmıştır. Toplanan üst fazın üzerine 500 µl isopropanol eklenmiş ve 10 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Ardından tüpler 15 dakika +4°C’de 15.000 g’de santrifüj edilerek, süpernatant atılıp pelletin üzerine %70’lik etanol ilave edilmiştir. Daha sonra tüpler +4°C’de 12.000 g’de 10 dakika santrifüj edilerek, süpernatant tekrar atılıp pellet kurutulurken etanol uzaklaştırılmıştır. Daha sonra pellet 40 µl RNase-DNase free su ile dilue edilmiştir.

### **3.5.2. RNA Miktarının Belirlenmesi**

Hücre hatlarından elde edilen RNA’ların kalitesi ve miktarı Nanodrop cihazı (Maestrogen, Tayvan) kullanılarak belirlenmiştir. İşlem sırasında oluşabilecek fenol, protein ve genomik DNA kontaminasyonlarını belirlemek için A260/A280 ve A260/A230 oranları değerlendirilmiştir. Absorbans değerlerinin A260/A280 için  $2 \pm 0,1$  ve A260/A230 için 2,0-2,4 arasında olan RNA örnekleri seçilerek analizlerde kullanılmıştır. Total RNA örneklerinin kalitesinin belirlenmesi amacıyla 1-10 µl konsantrasyonundaki RNA üzerine 6X yükleme boyasından 2 µl eklenmiştir. %1’lik agaroz jel elektroforezinde etidyum bromür (EtBr) ile boyanan RNA bantlarının kalitesi görüntüleme sistemi (Syngene Gbox Chemi 16) ile değerlendirilmiştir.

DNA kontaminasyonlarını elimine etmek için DNase-I (Thermo Scientific, A.B.D.) enzim reaksiyonu uygulanmıştır. Üretici protokolüne göre 2-20 µL total RNA üzerine 1 U/µL DNase-I enziminden 2 µL konularak 37°C’de 30 dk inkübe edilmiştir. Reaksiyonu durdurmak amacıyla 50 mM EDTA’dan 2 µL ilave edilip 65°C’de 10 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Total RNA örnekleri -80°C derecede muhafaza edilmiştir.

### 3.5.3. cDNA Sentezi

Miktar ve kalitesi belirlenmiş RNA örneklerinden cDNA sentez kiti (Bio-Rad iScript cDNA Synthesis, A.B.D.) kullanılarak üretici firmanın protokolüne göre cDNA sentezlenmiştir. Total RNA'dan tek zincir cDNA üretilmesi için 4 µL 5X iScript reaksiyon karışımı ve 1 µL Reverz Transkriptaz RNA üzerine ilave edilmiştir. Daha sonra 25°C'de 5 dakika, 42°C'de 30 dakika ve 85°C'de 5 dakika protokolüne göre cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir.

### 3.5.4. Primer Dizaynı

Bu tez çalışmasında apelin, apelin reseptörü ve makrofaj polarizasyonunda etkili olan genlerden gerçek-zamanlı PCR analizlerinde kullanılanların listesi Tablo 3.3'de verilmiştir.

**Tablo 3.3.** Çalışmada kullanılan genler

No	Gen Sembolü	Gen Tanımı
1	Ape	Apelin
2	IL1B	Interleukin 1, beta
3	IL4	Interleukin 4
4	IL6	Interleukin 6
5	IL10	Interleukin 10
6	TNF $\alpha$	Tumor necrosis factor, alpha
7	TGF $\beta$	Transforming growth factor, beta
8	MCP-1	Monocyte chemoattractant protein 1
9	CDH1	Cadherin 1, E-cadherin
10	CDH2	Cadherin 2, N-cadherin
11	VIM	Vimentin
12	TWIST1	Twist homolog 1
13	Slug	SNAI2, Snail homolog 2
14	Snail	Snail
15	CD44	CD44 molecule
16	GAPDH	Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase



Seçilen genlere ait mRNA dizi bilgilerine Gen Bankası (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) üzerinden ulaşılmıştır. Alınan diziler Primer Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) ve IDT PrimerQuest Tool ([www.idtdna.com](http://www.idtdna.com)) programları kullanılarak gerçek-zamanlı PZR’de kullanılacak primerler tasarlanmıştır (Tablo 3.4).

**Tablo 3.4.** İfade analizi yapılan genlerin simgeleri, primer dizileri ve baz çifti uzunlukları

Gen	Forward Primer (5'→3')	Reverse Primer (5'→3')	PZR (bp)
Ape	TGCTCTGGCTCTCCTTGA	AAAGGCATGGGTCCCTTATG	166
IL1	GATCCCAAACAATACCCAAAGAAG	AGGTGCTGATGTACCAGTTG	118
IL6	CTTCCATCCAGTTGCCTTCT	CTCCGACTTGTGAAGTGGTATAG	134
IL10	CTATGCTGCCTGCTCTTACTG	GGGAAGTGGGTGCAGTTATT	83
TNF $\alpha$	CGATGGGTTGTACCTTGTCTAC	GCAGAGAGGAGGTTGACTTTC	129
TGF $\beta$	CTGAACCAAGGAGACGGAATAC	GGGCTGATCCCGTTGATTT	101
MCP-1	TCCACTCTACTCCCTGGTATTC	TGGCCAAGTTGAGCAGATAG	119
CDH1	GAGAGCGGTGGTCAAAGAG	AGCTGGCTCAAGTCAAAGT	117
CDH2	GCTGACCAGCCTCCAAC	CATGTGCCCTCAAATGAAACC	112
VIM	TCCAAGCCTGACCTCAC	CACCTGTCTCCGGTACTC	189
TWIST1	CCGCAGTCTTACGAGGAG	TTGCTCAGCTTGTCCGA	137
Slug	TCAGTGCAATTTATGCAATAAGACC	GCTCACATATTCCTTGTACAGTA	127
Snail	AGCTGCACTGCCACCTG	GTGCGGATGTGCATCTTGAG	97
CD44	TTCTGGATCAGGCATTGATGA	GTCCAGTCCTGGTTCTGTTT	99
TGF $\beta$	GCCTGGACACGCAGTACA	TTGCAGGAGCGCACGAT	172
GAPDH	TGAACGGGAAGCTCACTGG	TCCACCACCCTGTTGCTGTA	307

### 3.5.5. Gerçek-Zamanlı PZR Reaksiyonu

Tablo 3’de verilen genlerin mRNA düzeyinde ekspresyon seviyeleri Gerçek-Zamanlı PZR Sistemi (Bio-Rad CFX, Singapur) kullanılarak belirlenmiştir. Boya olarak çift iplikli DNA’ya bağlanabilen EvaGreen (Solis BioDyne, 5X Hot FIREPol EvaGreen qPCR Mix Plus, Estonya) kullanılmıştır. Reaksiyon final konsantrasyonu 1X olacak şekilde 5X EvaGreen miksi, 12,5 pMol forward, 12,5 pMol reverse primer, 2  $\mu$ L cDNA kalıbı ve toplam steril RNase-DNase free su ile 20  $\mu$ L’ye tamamlanmıştır. Reaksiyon 8’li PZR stripleri içinde gerçekleştirilmiştir. PZR profili olarak 95°C 15 dakika denatürasyon sonrası 40 döngü 95°C 15 saniye, 60°C 20 saniye, 72°C 20 saniye kullanılmıştır. Daha sonra 60°C’den 95°C’ye 0.5°C/saniye kademeli optik ölçümler yapılarak erime eğrisi (melting curve) analizi gerçekleştirilmiştir. Gerçek-zamanlı

PZR reaksiyonunda optik ölçümlerden elde edilen Ct değerleri kaydedilmiştir ve hedef genlerin ifade düzeyleri GAPDH referans geni ile normalize edilmiştir.

### 3.6. ELISA Yöntemiyle Sitokin Miktarlarının Belirlenmesi

mRNA düzeyinde ifadesi anlamlı çıkan genlerin protein düzeyinde miktarlarının belirlenmesi için ELISA kitleri (Sunlong Biotech, Çin) kullanılmıştır. Hücrelerin mono kültürleri ve ko-kültürlerinden elde edilen besiyeri süpernatantları 3000 rpm’de 20 dakika santrifüj edilmiştir. 96’lık kuyucuklu pleytlere örnekler 10 µl olacak şekilde dağıtılmıştır. Her kuyucuğa 40 µL dilüsyon tamponu eklenmiştir. 30 dakika 37°C’de pleyt inkübe edilmiştir. Daha sonra kuyucuklar yıkama tamponu ile dolacak şekilde 30 saniye bekletilerek 5 defa yıkanmıştır. Tampon aspire edilip 50 µL HRP-konjuge reaktifi eklenerek 30 dakika 37°C’de inkübe edilmiştir. Kuyucuklar yıkama tamponu ile doldurularak ve 5’er saniye bekletilerek 5X yıkanmıştır. Yıkama tamponu çekildikten sonra 50 µL kromojen solüyonu A ve 50 µL kromojen solüyonu B eklenip nazikçe çalkalanmıştır. 37°C ve ışıksız ortamda 15 dakika inkübe edilmiş, 50 µL sonlandırma solüsyonu eklenerek reaksiyon durdurulmuştur. Sonlandırma solüsyonu eklendikten 15 dk sonra 450 nm OD olacak şekilde absorbanları ELISA okuyucu sistemi (Epoch, A.B.D.) kullanılarak ölçülmüştür.

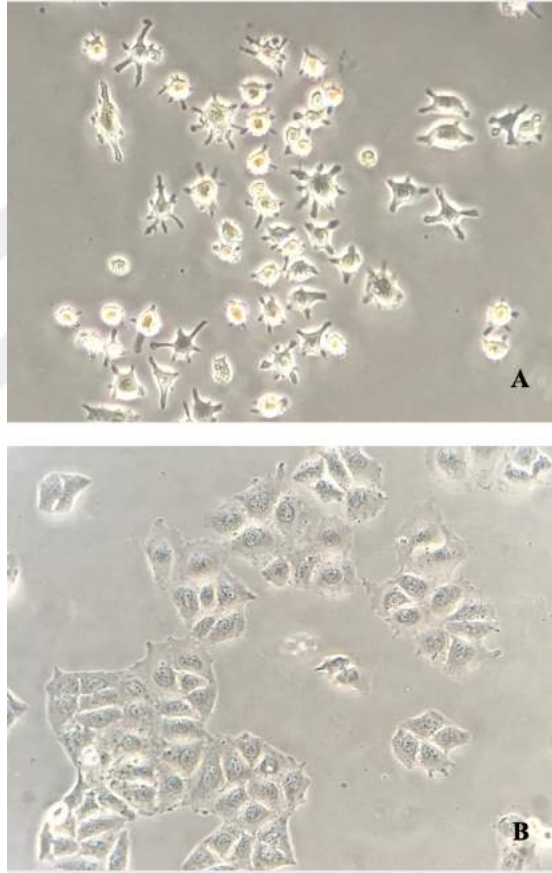
### 3.7. İstatistiksel Analizler

Çalışmada analiz edilen genlere ait Ct değerleri referans gen olarak kullanılan GAPDH Ct değerleri ile normalize edilmiştir.  $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$  değerlerinin hesaplanmasında Microsoft® Excell Sürüm 16.53 (2021) programı kullanılmıştır. Grupların istatistiksel olarak karşılaştırılması GraphPad® Prism Versiyon 9.2.0 programında yer alan “One-way Anova” ve “One sample t and Wilcoxon” testleri ile hesaplanmıştır. Tüm analizlerde  $p < 0,05$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Hücre Mono Kültürlerinin Oluşturulması

Bu tez çalışmasında kullanılan hücre hatları inverted mikroskopa morfolojik olarak incelenmiştir. Fare makrofaj hattı olan RAW264.7 hücreleri yer yer küresel olmakla birlikte hafif psödopodlu olarak gözlemlenmiştir. Baş-boyun skuamöz hücre karsinoması hücreleri olan SCCL MT1 ise daha şeffaf ve kübik bir şekle sahiptir. Her iki hücre görüntüsü orta yoğunlukta üreme sonrası fotoğraflanmıştır (Şekil 4.1).



**Şekil 4.1.** RAW264.7 (A) ve SCCL MT1 (B) hücrelerinin 20X büyütmedeki mikroskobik görüntüleri.

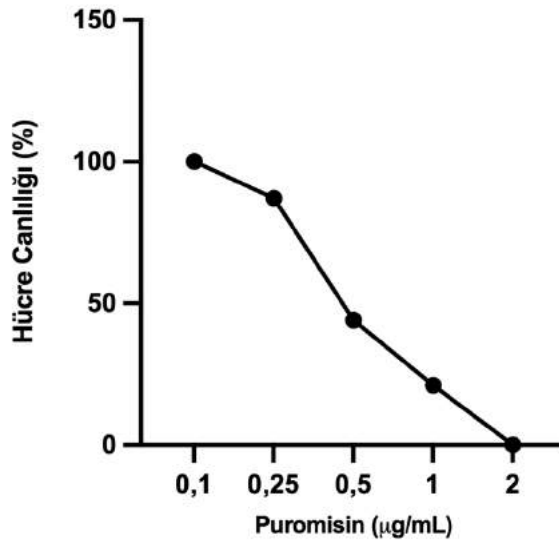
### 4.2. Transdüksiyon Ünitesinin Belirlenmesi

Transdüksiyon sonrası oluşan transdüksiyon ünitesinin belirlenmesinde TurboGFP ışımaya sahip her hücre ya da koloninin sayılmasıyla hesaplanmıştır.

Bu çalışmada transdüksiyon ünitesi 160.000 (TU/mL) olarak bulunmuştur.

### 4.3. Puromisin Uygulanan SCCL MT1 Hücrelerinde Kill Curve Analizi

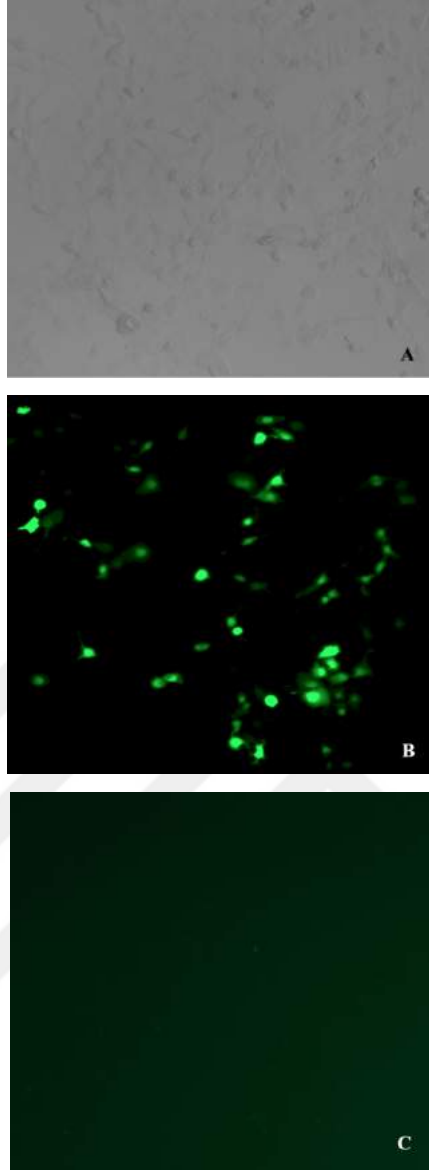
Memeli hücreleri için seçici antibiyotik olan puromisin sıklıkla ve güvenle kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalar puromisinin 2-10  $\mu\text{g/mL}$  olarak kullanılabilceğini göstermektedir. Bu çalışmada; SCCL MT1 hücreleri için bu doz aralığında ve altında kill curve analizi yapılmış ve 2  $\mu\text{g/mL}$  ve üzeri dozlar hücrelerin tamamı için sitotoksik bulunmuştur. Ancak, 1,5-2  $\mu\text{g/mL}$  dozunun transdükte olmayan SCCL MT1 hücrelerinde seçici doz olarak kullanılabilirliği tespit edilmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Puromisin hücre canlılığı üzerine etkisi.

### 4.4. Transdükte Hücrelerin TurboGFP Proteini İfadesinin Floresan Mikroskopik İncelenmesi

Transdüksiyonda ilk işaret olarak gözlenen TurboGFP ışması, post transdüksiyondan 72 saat sonra tespit edilmiştir. Düşük (>%90) ışmanın altında kalan hücrelerde ise, yaklaşık 10 günlük puromisin seleksiyonu ile transdükte hücreler ayrılmıştır. Apelin gen ekspresyonunda olduğu gibi shRNA2'nin shRNA1'e oranla daha iyi susturma yaptığı, TurboGFP ışmasının daha yüksek olduğu görülmüştür (Şekil 4.3).

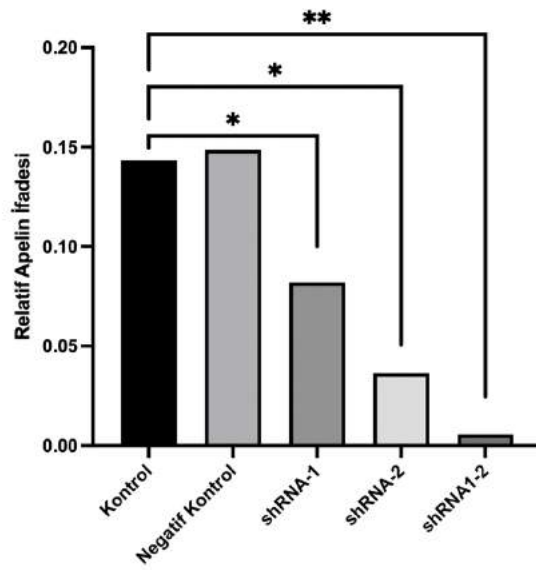


**Şekil 4.3.** SCCL MT1 hücrelerinin floresan mikroskobik görüntüleri (A. Bright Field, B. Transdükte TurboGFP, C. Transdükte olmayan TurboGFP).

#### **4.5. shRNA ile Transdükte Edilen SCCL MT1 Hücrelerindeki Apelin ifadesinin RT-PZR Analizi ile Kontrolü**

Transdükte olan ve olmayan SCCL MT1 hücrelerinin apelin ifadesi RT-PZR analizi tespit edilmiştir. Transdüksiyonda transdükte olmayan SCCL MT1 hücreleri kontrol, plazmid içermeyen viral partiküllerin uygulandığı SCCL MT1 hücreleri negatif kontrol, V3LHS\_401189 plazmidinin tek başına uygulandığı SCCL MT1 hücreleri shRNA1, sadece V3LHS\_401190 plazmidinin uygulandığı SCCL MT1 hücreleri shRNA2 ve her iki plazmidin kombine olarak uygulandığı grup ise shRNA1-

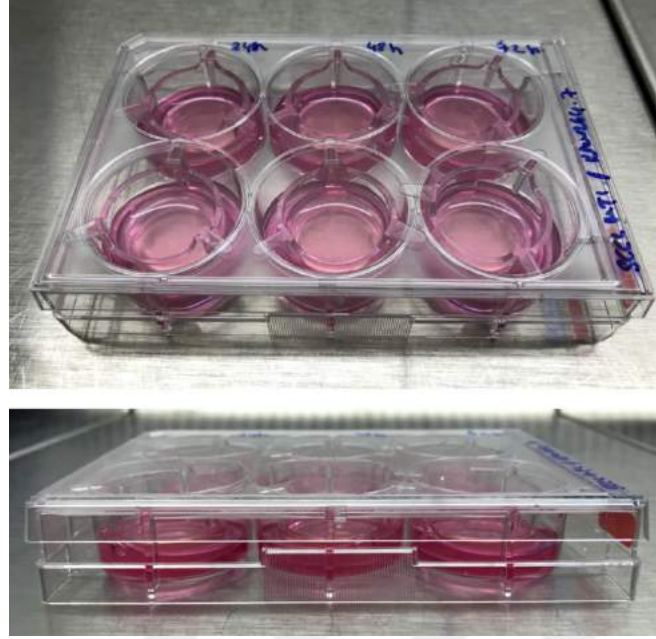
2 olarak belirlenmiştir. Uygulama sonrası yapılan apelin gen ifadesinin değişimine göre; kontrole nispeten shRNA2 grubundaki (0,082 kat) baskılanmanın shRNA1 grubundan (0,0363 kat) daha iyi olduğu bununla birlikte plazmidlerin kombine uygulanmasının (0,0056 kat) her iki sonuçtan daha iyi susturma gerçekleştirdiği görülmektedir (Şekil 4.4). Kontrole kıyasla shRNA1 ve shRNA2 gruplarında ( $p<0,05$ ) ve shRNA1-2 grubunda ( $p<0,01$ ) gen ifadesinin baskılanmasında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Negatif kontrolün ise kontrole göre anlamsız bir artışı tespit edilmiştir ( $p>0,05$ ).



**Şekil 4.4.** Apelin ifadesi shRNA uygulamalarından sonra kontrole kıyasla kat değişimi (\*  $p<0,05$ ; \*\*  $p<0,01$ ).

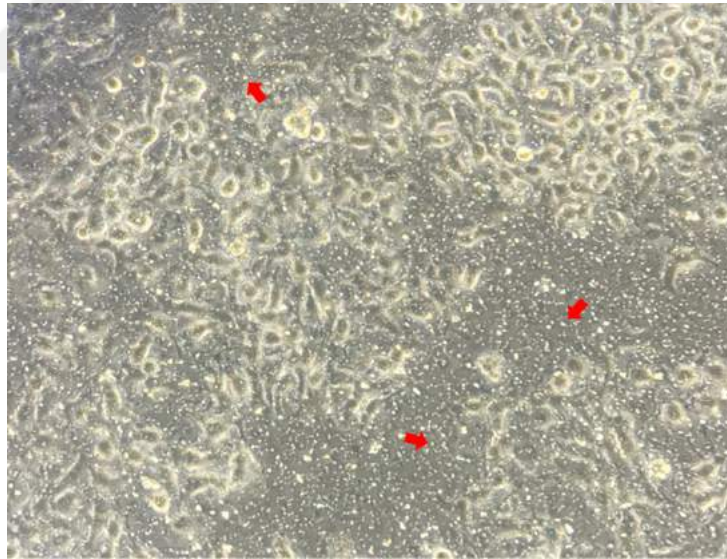
#### 4.6. SCCL MT1 ve RAW264.7 Hücrelerinin Ko-kültürasyonu

Her iki hücre hattı 24 saatlik inkübasyon sonrası RAW264.7 hücrelerinin bulunduğu 6 kuyucuklu pleytin üzerine SCCL MT1 hücrelerinin bulunduğu insörtler yerleştirilmiştir (Şekil 4.5). Hücreler ko-kültürasyon boyunca her gün mikroskopik olarak incelenmiştir.



**Şekil 4.5.** İndirekt ko-kültürasyon. 6 kuyucuklu pleyte ekilen RAW264.7 hücreleri ile insörtlere ekilen SCCL MT1 hücrelerinin birlikte kültür edilmesi.

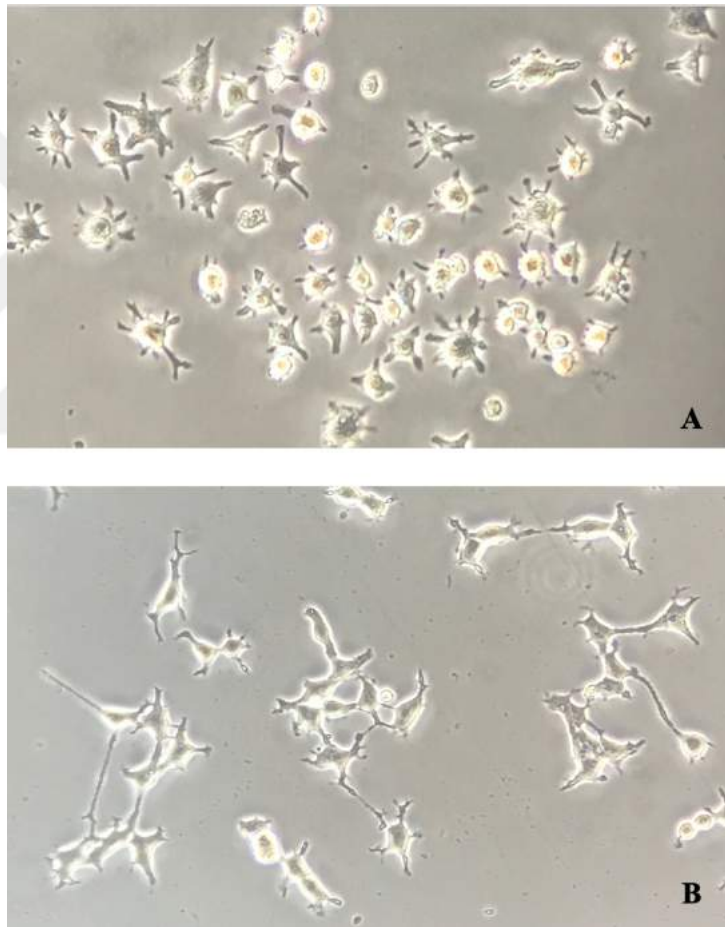
Yirmi dört saat sonra insört içindeki SCCL MT1 hücrelerinin yüzeye tutundukları görülmüştür. Ayrıca insöрте ait boşluklarda görülmektedir (Şekil 4.6).



**Şekil 4.6.** SCCL MT1 hücreleri ve insört boşluklarının (kırmızı okla gösterilmiştir) mikroskopik olarak görünüşü (10X).

#### 4.7. Transdükte Olan ve Olmayan SCCL MT1 Hücreleri ile Ko-kültüre Edilen RAW264.7 Hücrelerinin Morfolojik Değişimleri

SCCL MT1 hücreleriyle ko-kültüre edilen RAW264.7 hücrelerinde invert mikroskop altında morfolojik değişiklikler tespit edilmiştir. Transdükte olmayan SCCL MT1 hücreleriyle ko-kültüre edilen RAW264.7 hücrelerinin mono kültürdeki gibi yuvarlak, bazılarında ise psödopod gözlenirken, transdükte olan SCCL MT1 hücreleriyle ko-kültüre edilen RAW264.7 hücrelerinin belirgin, uzun ve daha fazla psöpodlara sahip olduğu görülmüştür (Şekil 4.7).

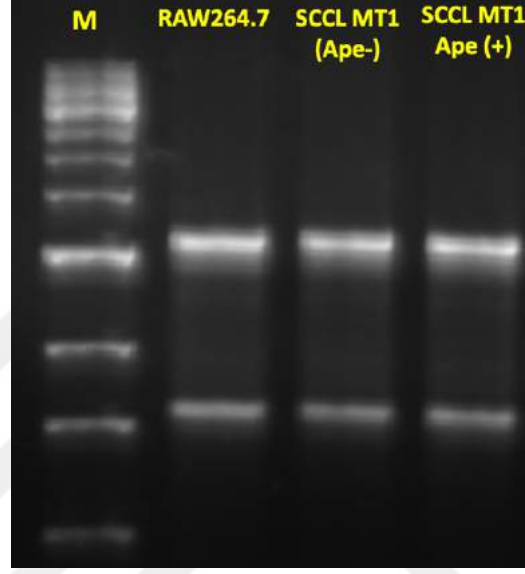


**Şekil 4.7.** Transdükte olmayan SCCL MT1 hücreleri (A) ve transdükte olan SCCL MT1 hücreleriyle (B) ko-kültüre edilen RAW264.7 hücrelerinin morfolojik değişimi.



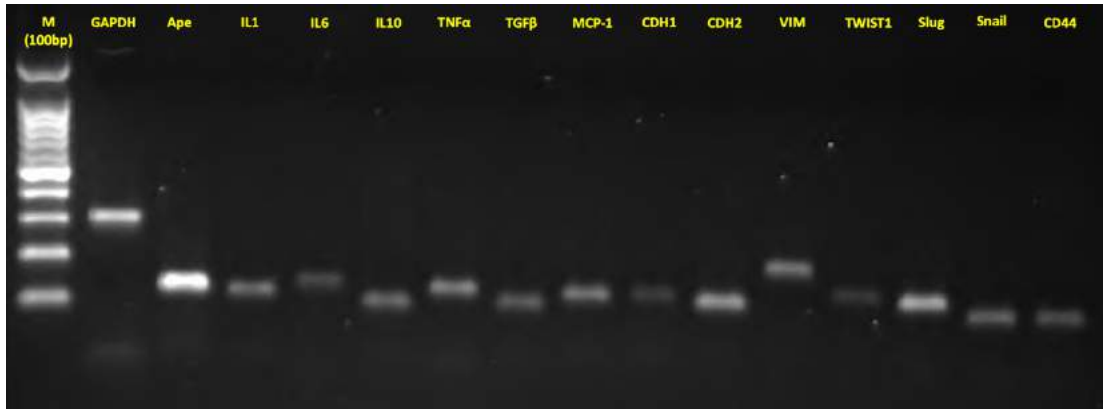
#### 4.8.Total RNA Örneklerinin ve RT-PZR ürünlerinin Jel Elektroforezinde Görüntülenmesi

Deney gruplarından toplanan RAW264.7 ve SCCL MT1 hücrelerinden RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Total RNA örneklerinin kalitesi agoroz jel elektroforezi ile kontrol edilmiştir (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. Total RNA örneklerinin agoroz jel görüntüsü.

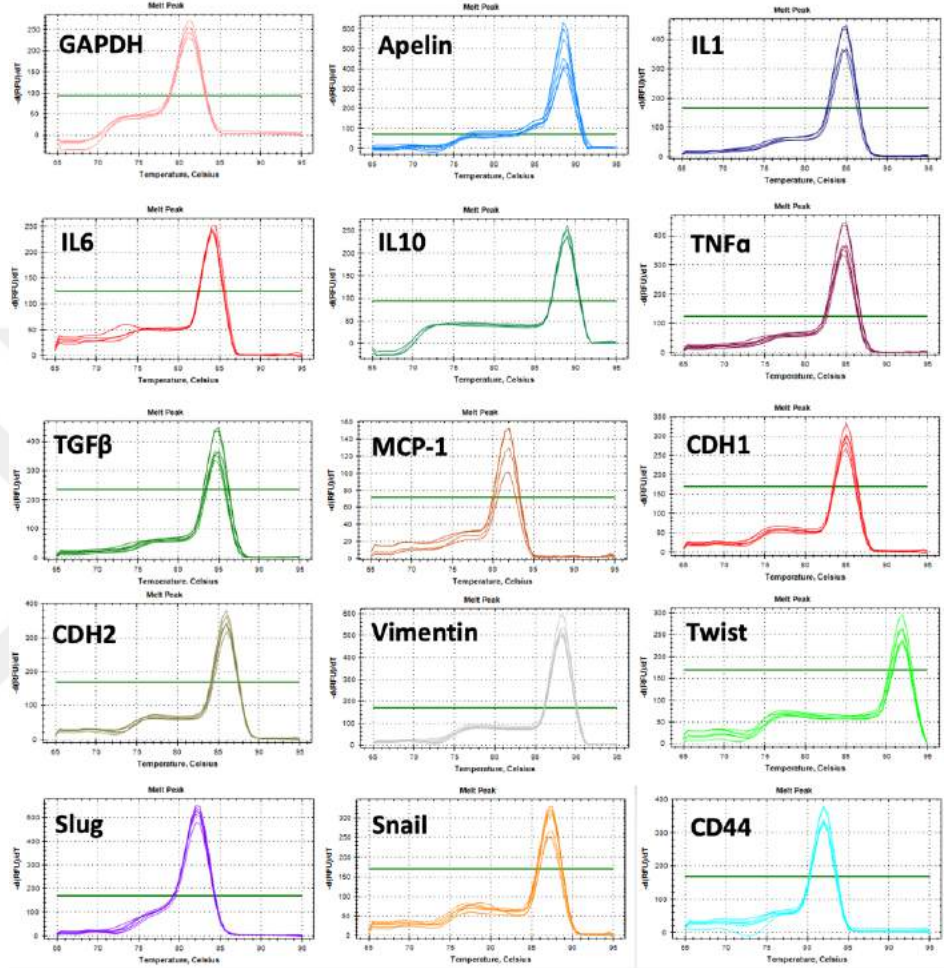
Çalışmada kullanılan hedef ve referans genlere ait RT-PZR ürünleri agoroz jeli ile kontrolü yapılmıştır (Şekil 4.9). Bütün genleri spesifik olarak yükselttiği tespit edilmiştir.



Şekil 4.9. RT-PZR analizinde oluşan ürünlerin agoroz jel elektroforezinde görüntülenmesi.

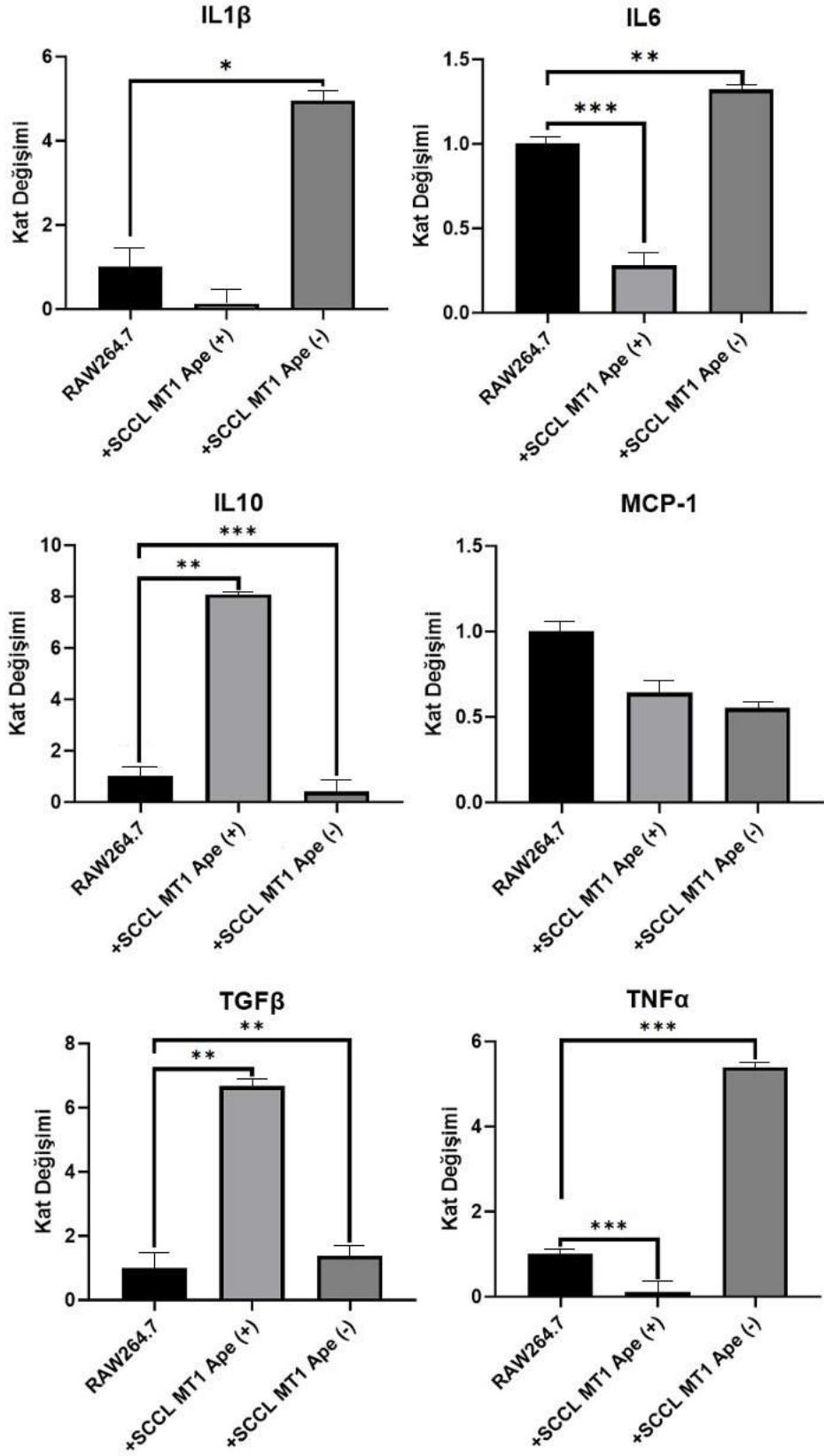
#### 4.9. Transdükte Olan ve Olmayan SCCL MT1 Hücreleri ile Ko-kültüre Edilen RAW264.7 Hücrelerindeki İnflamatuvar Sitokinlerin İfadesi

RT-PZR analizinde elde edilen erime eğrisi grafikleri Şekil 4.10’da verilmiştir.



Şekil 4.10. RT-PZR analizi gerçekleştirilen genlere ait erime eğrileri.

Elde edilen Ct değerleriyle aday genlerdeki ifade değişimleri Şekil 4.11’de gösterilmiştir.

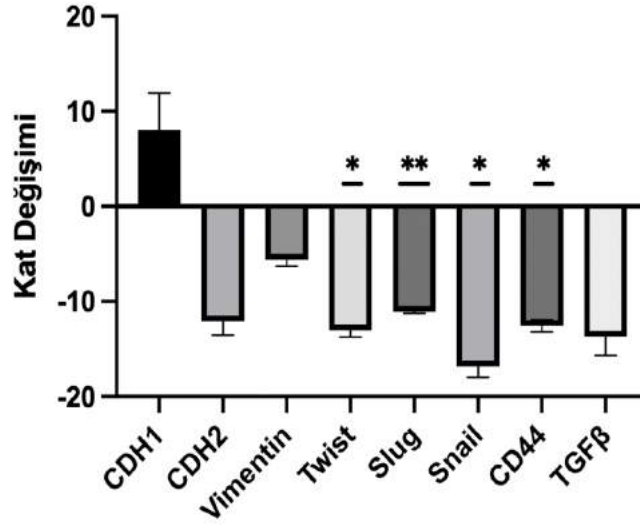


**Şekil 4.11.** RAW264.7 hücrelerinin SCCL MT1 hücreleriyle olan ko-kültürasyonunun inflamatuvar gen ifadelerine olan etkisi (\* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001).

RT-PZR analizi sonuçlarına göre; pro-inflamatuar IL1 (0,13 kat) ve IL6 (0,28 kat) genlerinin ifadesi apelin (+) grubunda anlamlı olarak baskılandığı ancak apelin (-) grubunda ise sırasıyla 4,95 ve 1,32 kat anlamlı düzeyde arttığı tespit edilmiştir. Anti-inflamatuar gen olan IL10'nun ifadesi ise apelin ifadesinin olduğu grupta (8,09 kat) anlamlı olarak artmıştır, baskılandığı grupta ise (0,4 kat) anlamlı olarak azalmıştır. Bunların yanı sıra TNF $\alpha$  geninde apelin ifadesi olan grupta (0,1 kat) azalış olduğu aynı şekilde apelin ifadesi baskılanan grupta ise (5,39 kat) artışın anlamlı olduğu tespit edilmiştir. TGF $\beta$  geninde ise apelin ifadesinin olduğu (6,67 kat) ve baskılandığı grupta (1,38 kat) olmak üzere her iki grupta da anlamlı artış olduğu görülmüştür. Son olarak MCP-1 gen ifadesinin ise apelin geninin baskılandığı ve baskılanmadığı SCCL MT1 hücrelerinin bulunduğu her iki grupta da anlamlı değişiklik gözlenmemiştir.

#### **4.10.SCCL MT1 Hücrelerinde Transdüksiyon Sonrası Migrasyon ve İnvazyon İlişkili Genlerin İfadesi**

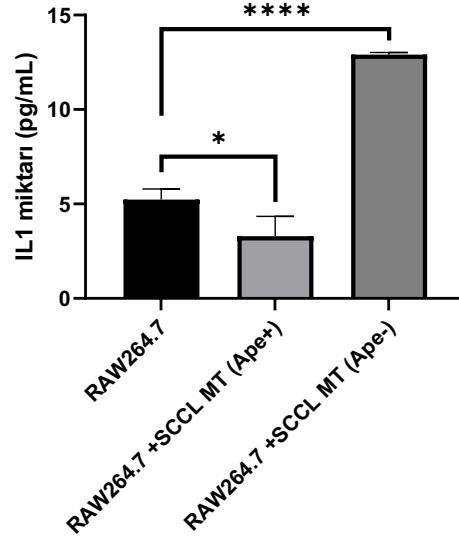
Apelin gen ifadesinin migrasyon ve invazyonla ilişkili genler üzerinde etkisi RT-PZR analizi ile incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre Twist (13,02), Slug (11,1), Snail (16,84) ve CD44 (12,58) genlerinde anlamlı derecede kat azalışı tespit edilmiştir ( $p < 0,05$ ). CDH2 (12,08), Vimentin (5,59) ve TGFB (13,7) genlerinde ise anlamlı olmayan kat azalışı görülmüştür ( $p > 0,05$ ). CDH1 (8) geninde ise anlamlı olmayan kat artışı tespit edilmiştir ( $p > 0,05$ ). Çalışılan genlere ait kat değişim grafiği Şekil 4.12'de verilmiştir.



**Şekil 4.12.** Transdükte SCCL MT1 Ape (-) hücrelerindeki migrasyon ve invazyon ilişkili genlerin ifadelerindeki kat değişimleri (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ).

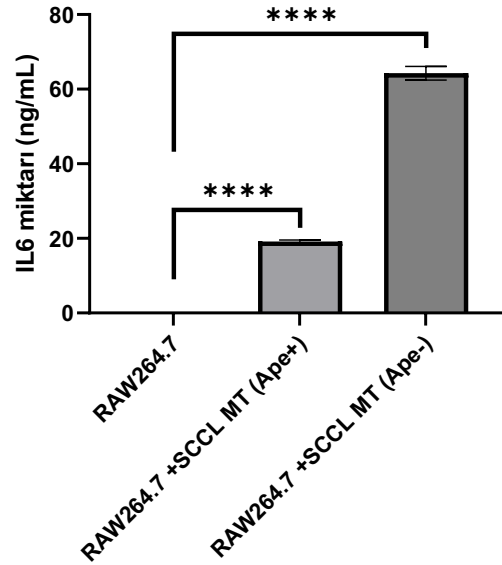
#### 4.11.RT-PCR Analizinde İfadesi Anlamlı Çıkan Sitokinlerin ELISA Yöntemiyle İncelenmesi

IL1'in protein düzeyinde ifadesi kontrol grubu olan RAW264.7 hücrelerinde 5,23 pg/mL olarak tespit edilmiştir. Apelin ifadesi olan SCCL MT1 hücreleriyle ko-kültüre edilen RAW264.7 hücrelerinde ise IL1 miktarı düşmüş ve 3,3 pg/mL olmuştur. Apelinin baskılandığı SCCL MT1 hücreleriyle ko-kültüre edilen RAW264.7 hücrelerinde ise bu miktar 12,91 pg/mL'ye yükselmiştir. (Şekil 4.13).



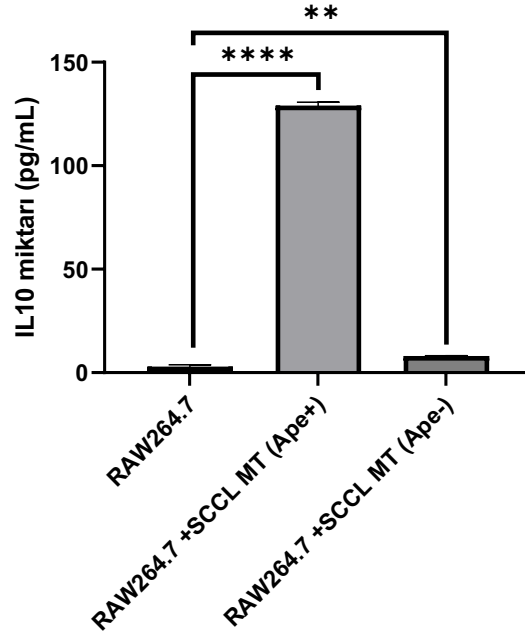
**Şekil 4.13.** RAW264.7 hücrelerinden salınan IL1 miktarları.

Bir diğer pro-inflamatuar sitokin olan IL6'nın kontrol RAW264.7 hücrelerindeki miktarı kullanılan ELISA kitinin ölçüm aralığında olmadığı için saptanmamıştır. Ancak apelin ifadesi olan SCCL MT1 hücreleriyle ko-kültüre edilen RAW264.7 hücrelerinde IL6 ifadesi 19,14 ng/mL olarak ölçülmüştür. Apelin ifadesi baskılanmış SCCL MT1 hücreleriyle ko-kültüre edilen RAW264.7 hücrelerinde ise IL6 miktarı 64,27 ng/mL yükselmiştir (Şekil 4.14)



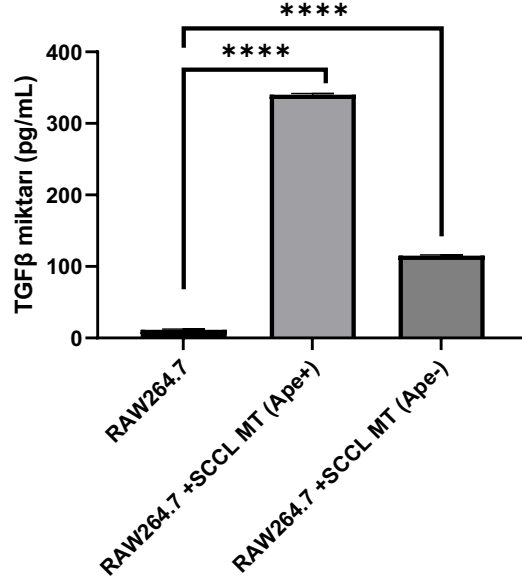
**Şekil 4.14.** RAW264.7 hücrelerinden salınan IL6 miktarları.

IL1 ve IL6'nın aksine IL10, makrofaj hücrelerindeki pro-inflamatuar sitokin üretimini baskılayarak anti-inflamatuar cevabın başlatılmasını sağlamaktadır. Kontrol RAW264.7 hücrelerinde IL10 miktarı 2,98 pg/mL olarak ölçülmüştür. Apelin ifadesi olan SCCL MT1 hücreleriyle ko-kültüre edilen RAW264.7 hücrelerinde bu miktar 129 pg/mL olurken apelin ifadesi baskılanan SCCL MT1 hücreleriyle ko-kültür yapıldığında 8,1 pg/mL olarak yaklaşık 16 kat azalmıştır (Şekil 4.15).



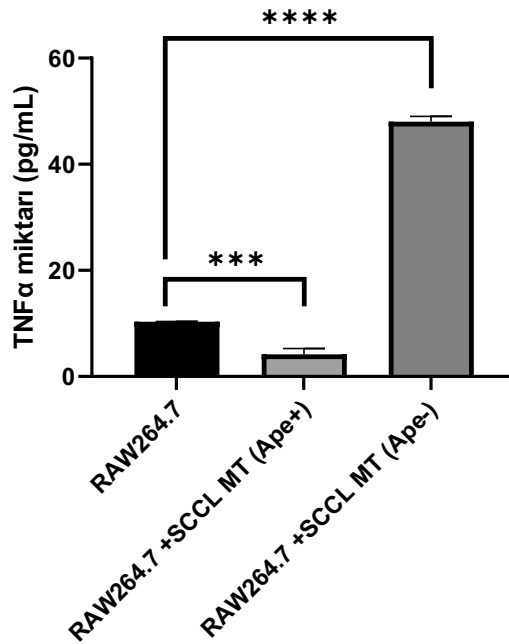
Şekil 4.15. RAW264.7 hücrelerinden salınan IL10 miktarları.

TGF $\beta$ , apelin varlığında kontrole göre TGF $\beta$ 'nın yaklaşık 30 kat artarak 340,17 pg/mL olduğu, apelinin susturulduğu durumda ise 115 pg/mL olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.16)



**Şekil 4.16.** RAW264.7 hücrelerinden salınan TGFβ miktarları.

TNF $\alpha$ , kontrol grubu olan RAW264.7 hücrelerinde normal koşullarda miktarı 10,31 pg/mL olarak ölçülmüştür. Apelin ifadesinin olduğu SCCL MT1 hücreleriyle ko-kültüre edildiğinde salınan TNF $\alpha$  miktarı 4,17 pg/mL iken, apelin ifadesinin baskılandığı SCCL MT1 hücreleriyle ko-kültüre edildiğinde 48 pg/mL'ye düşmüştür (Şekil 4.17).



**Şekil 4.17.** RAW264.7 hücrelerinden TNF $\alpha$  salınan miktarları.



## 5. TARTIŞMA

Makrofajlar, son elli yılda mononükleer sistemin ana hücreleri olarak tanımlanmıştır (Furth ve Chon 1968). Yetişkin doku makrofajları sürekli kendini yenileyen bir popülasyona sahiptir ve tartışmalı da olsa doku makrofajlarının kaynağı kan monositleri olarak düşünülmektedir. Bu görüşe muhalif olan araştırmacılar ise doku makrofajlarının kaynağının embriyonik olarak kendilerine özgü kök hücre popülasyonu olduğunu iddia etmiş ve görüşlerini destekleyici çalışmalar yapmışlardır (Ginhoux ve Jung 2014). Makrofajlar tipik olarak dokuda yerleşik tek immün hücrelerdir. Kan damarlarının olmadığı birçok alanda yer almaktadırlar. Dokuda fizyolojik regülasyonda ana role sahiptirler. Yüksek plastisite özelliklerinden dolayı inflamatuvar cevabın oluşması, sürmesi ve neticelendirilmesinde etkilidirler (Kawai ve Akira 2010). Pro-inflamatuvar sitokinlerin yoğun salınımı doku bütünlüğü için sakıncalı bir durumdur. Makrofajlar, bu durumda inflamatuvar cevabın baskılanmasını sağlamaktadırlar (Gordon ve Martinez 2010). Böylece doku temizliği ve normal fizyolojik koşullara geri dönüş gerçekleşmektedir (van Dyken ve Locksley 2013).

Apelin ilk olarak mide ekstraktından izole edilerek tanımlanmıştır (Tatemoto ve ark. 1998). Daha sonra apelinin obezite, diyabet gibi metabolik hastalıkların patolojisinde yer aldığı gösterilmiştir (Cavallo ve ark. 2012). Son yıllarda yapılan çalışmalarda ise apelinin kanser hücrelerinde aşırı ifade edildiği sonucuna ulaşılmıştır (Wysocka ve ark. 2018). Ancak, apelinin immün hücreler üzerindeki etkisi tam olarak ortaya konulmamıştır. Apelin reseptörünün aşırı ekspresyonunun kolon kanseri hücrelerinin migrasyon ve invazyon kabiliyetlerini arttırdığı bulunmuştur. Bu sürece PI3K/AKT ve MAPK sinyal yollarının aracılık ettiği belirlenmiştir. Apelinin baskılandığı durumda ise sürecin ters etki ettiği de gösterilmiştir (Podgórska ve ark. 2021). Başka bir çalışmada ise apelinin eksozomal miRNA yoluyla akciğer kanseri hücrelerinin proliferasyonunu ve invazyon kabiliyetini artırıp artırmadığını incelenmiştir. Sonuç olarak A549 hücrelerinde miR-15a-5p'nin aşırı ekspresyonu, daha az hücre proliferasyonu, göçü, invazyonu ve bastırılmış hücre döngüsü ile ilişkilendirilmiştir. Apelinin eksozomlarda kapsüllenmiş miR-15a-5p'yi baskılayarak akciğer kanseri hücrelerinin çoğalmasını ve invazyonunu destekleyebileceği yeni bir düzenleyici mekanizmayı ortaya çıkarmıştır (Ran ve ark. 2021).

Yakın zamanda yapılan bir çalışmada; mürin B16 ve insan A375 melanom hücre hatları, apelin inserti içeren vektörler ile transfekste edilerek apelinin aşırı ifade edebilir hale getirilmiştir. Apelinin aşırı ekspresyonu, *in vitro* olarak melanom hücre göçünü ve istilasını önemli ölçüde arttırmıştır, ancak proliferasyonu üzerinde hiçbir etkisi olmadığı gözlemlenmiştir. *In vivo* deneylerde ise apelin, mürin melanom hücrelerinin akciğer metastazlarının sayısını ve boyutunu önemli ölçüde arttırmıştır. Apelinin aşırı ifade eden pulmoner metastazlarda melanom hücre proliferasyon oranları, lenf ve kan mikrovasküler yoğunlukları anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur. Rekabetçi apelin reseptörü (APJ) antagonisti MM54 tarafından APJ baskılanmasıyla, apelinin *in vivo* pro-tümörojenik etkilerini önemli ölçüde azalttığı tespit edilmiştir. Ek olarak, sağlıklı kontrollere kıyasla melanomlu hastalarda dolaşımdaki apelin ve VEGF düzeylerinin önemli ölçüde yükseldiği saptanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, apelinin kan ve lenfatik vaskülarizasyonu ve cilt melanomunun pulmoner metastazlarının büyümesinde etkili olduğu tespit edilmiştir (Berta ve ark. 2021). Apelinin anjiogenez üzerine etkisi de yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Berta ve ark. 2010; Frisch ve ark. 2020).

Bu tez çalışmasında, kanser mikroçevresinde en fazla yer alan immün hücresi M2 tip makrofajların (Boutillier ve Elswa 2021) kanser hücrelerinden ifade edilen apelin ile olası ilişkisinin araştırılması hedeflenmiştir. Bu amaç doğrultusunda baş-boyun hücre karsinoması SCCL MT1 hücre hattı ve RAW264.7 fare makrofaj hücre hattı kullanılmıştır. SCCL MT1 hücrelerinde ilk olarak artmış apelin ifadesi tespit edilmiştir. Bu artış farklı kanser türleri ile benzer bulunmuştur (Altınkaya ve ark. 2015; Diakowska ve ark. 2018; Ünal ve ark. 2020). Daha sonra etkili ve stabil bir gen susturma yöntemi olan shRNA yöntemi kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan yöntem, klasik shRNA yöntemine ek olarak hücre girişini kolaylaştıran viral partikül ekli, GIPZ plazmidi içermektedir. Hedef gen olan apelin geninin sekansının kısa olması sebebiyle iki farklı antisens RNA dizayn edilebilmiştir (Tablo 3.1). Transdüksiyon gerçekleşirken floresan mikroskopi ile hücrelerdeki TurboGFP ışımaya miktarı her gün incelenmiştir. Gen susturma işlemi tamamlandıktan sonra SCCL MT1 Ape (-) ve SCCL MT1 Ape (+) kanser hücreleri makrofaj hücreleri (RAW264.7) ile ko-kültüre edilmiştir. Gruplardan elde edilen RNA ile cDNA sentezi yapılarak RT-PZR analizi yapılmıştır. Pro ve anti-inflamatuar sitokinler açısından aday genlerin ifade değişiklikleri tespit edilmiştir. Anlamlı artış olan genler için ELISA yöntemiyle

protein düzeyinde sitokin miktarları ölçülmüştür. Makrofaj hücrelerindeki polarizasyon durumu hem gen düzeyinde hem de protein düzeyinde tespit edilirken morfolojik olarak incelenmiştir. Bunların yanı sıra apelin gen ifadesi baskılanan SCCL MT1 hücrelerindeki migrasyon ve invazyon ilişkili genlerin ifade değişiklikleri de incelenmiştir.

Yeşil floresan protein (GFP) geni, biyomedikal çalışmaları kolaylaştıran *in vitro* veya *in vivo* floresan belirteçler olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır (Tsien 1998; Lippincott-Schwartz ve Patterson 2003). 2003'ten beri TurboGFP dahil olmak üzere dört yeni GFP benzeri protein gen dizisi tanımlanmıştır (Shagin ve ark. 2004) ve hücre ve organel etiketlemesi için özel olarak kullanılmaktadır. Bunun dışında moleküler çalışmalarda gen etiketlemesinde kullanışlı bir yöntemdir. Bu çalışmada kullanılan GIPZ plazmidi TurboGFP ışması sağlayacak GFP gen sekansına sahiptir. Plazmid genoma entegre olduktan sonra mikroRNA adapte shRNA ile hızlı bir şekilde hücre içinde ifade olmaktadır. Her iki sekansa sahip shRNA'ların hücre içi ifadesi arttıkça TurboGFP ışması artmaktadır. shRNA'ların etkinliği ilk etapta gözlemlenen floresans ışmalarıyla tespit edilmiştir. V3LHS\_401189 (shRNA1) plazmidi V3LHS\_401190 (shRNA2) plazmidine göre daha az TurboGFP ışması göstermiştir. Her iki plazmidin birlikte kullanımı ise en yüksek ışma değerlerine ve gen ifade analizinde en iyi gen susturma sonuçlarına ulaşmamızı sağlamıştır (Şekil 4.4). Tasarlanan iki farklı shRNA plazmidinin tasarlanmasına sebep olmuştur. Buna rağmen her iki shRNA plazmidinin kombine kullanımı %95'in üzerinde gen ifadesinin baskılanmasını sağlamıştır. Puromisin seleksiyonunun ilerletildiği hücre hattında ise stabil susturma elde edilmiştir.

IFN $\gamma$ 'ya benzer bir Toll-benzeri reseptör (TLR) 4 agonisti olan bakteriyel lipopolisakkaritin (LPS) M1 makrofajlarının oluşumunu teşvik eden bir uyarıcı olduğu bulunmuştur (Chow ve ark. 1999). Bu uyarı, klasik olarak makrofajların pro-inflamatuar cevabı başlatmayı sağlayan bir sinyaldir. IFN $\gamma$  ile ilişkili LPS'ler, M1 makrofajları için klasik uyaranlar olarak bilinmektedir. Ancak, IL4 tarafından indüklenen ve alternatif olarak aktive edilmiş M2 alt tipi makrofaj türü tanımlanmıştır (Stein ve ark. 1992). M1 belirteçleri, IL1 $\beta$ , IL12, TNF $\alpha$  ve diğer yukarı regüle edilmiş pro-inflamatuar ürünleri içermektedir. Bunlar arasında, indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) bakterisidal bir rol oynar ve arginin katabolizmasını desteklemektedir

(Corraliza ve ark. 1995). Öte yandan M2 makrofajları, diğer anti-inflamatuar ürünlerin yanı sıra L-argininden L-ornitine dönüşümü katalize ederek üre döngüsünde işlev gören arginaz 1'i (Arg1) yukarı regüle etmektedir (Munder ve ark. 1998). M2 tip makrofajlar ayrıca doku onarımında ve anti-paraziter yanıtlarda önemli roller oynamaktadırlar (Odegaard ve Chawla 2011). İleri çalışmalar, çeşitli bağışıklık tepkileri sırasında bağışıklık hücrelerinin farklı metabolik profilleri için daha fazla örnek sağlamıştır. Enfeksiyon, immünosupresyon, kanserle ilişkili anjiyogenez ve otoimmünite gibi belirli senaryolar altında aktive makrofajların temel özellikleri olarak belirli metabolik özellikler önerilmektedir (Biswas ve ark. 2008; Biswas ve Mantavoni 2010).

Makrofajlar, çeşitli faktörleri salgılayarak ve diğer bağışıklık hücrelerini etkileyerek sadece kronik inflamasyonda rol oynamakla kalmaz, aynı zamanda kanser gelişimini başlatır, teşvik eder veya bastırır. Ornitin, VEGF, EGF ve TGF $\beta$  makrofajlardan üretilen tümör teşvik edici faktörlerdir. Ayrıca, makrofajlarda iNOS tarafından üretilen nitrik oksit, tümör büyümesini baskılar (Mills ve Ley 2014; Mills 2015). TAM'lar karakteristik olarak M2 tip makrofajlardır. Yerleşik tümörlerin çoğunda TAM'lar, M2 tip makrofajların temsili özelliklerinin çoğuna sahiptir. Genellikle yüksek arginaz-1 ifadesi, mannoz reseptörü ve düşük bir MHC-II kompleksine sahip olmak gibi özellikleri bulunmaktadır. Ancak bunlarla sınırlı olmamak üzere, M2 tip makrofajlar olarak kabul görmektedirler (Mantavoni ve ark 2002). Transkriptom profil analizi, TAM'ların fetal makrofajlara daha çok benzediğini ancak inflamatuvar makrofajlara benzemediğini ortaya koymuştur (Qian ve Pollard 2010). Bununla birlikte, makrofajlar plastisitesi yüksek olduğundan, TAM'ların aslında hem M1 hem de M2 tip ekspresyon paternlerine veya M1 ve M2'den farklı ifade profiline sahip olduğunu düşündüren kanıtlar bulunmaktadır (Biswas ve ark. 2006). M1 ve M2 tipin kendine has paternleri olsa da ifadesi değişmekle birlikte aynı profili gösterebilmektedirler. Neoplazmaların %90-95'i kronik bir inflamatuvar durumla yakından ilişkili olduğundan, M1 tip makrofajların mutajenik bir mikroçevre oluşturarak tümör başlangıcını indükleyebileceği, M2 tip makrofajların ise malignite ilerlemesini desteklediği öne sürülmüştür (Salmaninejad ve ark. 2019). TAM'ları kanser tedavileri için potansiyel bir hedef haline getiren hem tümör teşvik edici hem de tümör önleyici işleve sahip olabilmeleridir (Yang ve Zhang 2017). Ayrıca TAM'ların tükenmesi anjiyogenez baskılamaktadır (Belgiovine ve ark. 2016).

IL1, güçlü bir pro-inflamatuar sitokindir. Meme kanserinin klinik öncesi modellerinde, IL-1 $\beta$  blokajı makrofaj aracılı tümör immünosupresyonunu azalttığı ve anti-IL1 $\beta$  ile anti-PD1'in birlikte uygulandığı terapide, neredeyse tam tümör eradikasyonu ile sonuçlandığı gösterilmiştir (Kaplanov ve ark. 2019). Bu tez çalışmasında; Ape (+) SCCL MT1 hücrelerinde tespit edilen IL1 $\beta$  ifadesindeki baskılanma; apelin aracılı olarak tümör progresyonunun ilerlemesini, immünsüpresif ortam oluşturulmasında etkili olabileceğini göstermektedir. M1 tip makrofajlarda NF-KB yolğunun aktive edilmesini sağlayan pozitif bir düzenleyicidir. Bunun yanısıra TAM'larda MyD88 proteinini baskılayarak M1 tip dönüşümünde rol oynamaktadır ve M2 tip makrofajlar için negatif düzenleyicilerdir (Kratochvill ve ark. 2015). Kültür hücrelerde, apelinin pro-inflamatuar sitokinlerin baskılanması yoluyla anti-inflamatuar etkisi, *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda gösterilmiştir. Apelinin sıçan peritoneal makrofajlarında TNF $\alpha$  ve IL6'yı azaltarak anti-inflamatuar etkiler gösterdiği bildirilmiştir (Xin ve ark. 2015; Cui ve ark. 2017). Bu tez çalışmasında da; TNF $\alpha$  ve IL6 ifadesi apelin (-) ortamda baskılanmış olup literatür ile uyumlu bulunmuştur. Bu durumda apelinin, aktive edilmiş makrofajların fonksiyonlarını azaltan anti-inflamatuar özelliklere sahip olduğu düşünülebilir.

IL10, her iki makrofaj tipinde de ifade edilmektedir. Ancak M1 tip makrofajlardaki miktarı çok azalmıştır. İmmün süpresif mikroçevrenin oluşmasında kilit role sahiptir. TGF $\beta$  normal fizyolojik koşullarda epitel hücrelerden salgınır ve tümör baskılayıcı görev yapmaktadır. Hücre proliferasyonu, apoptoz, farklılaşma ve motilitenin düzenlenmesinde görev almaktadır. TGF $\beta$  troid, hepatosit, kolon ve meme epitel hücreleri gibi farklı dokularda proliferasyonu sınırlamaktadır (Massagu ve ark. 2012). Kanser hücrelerinde ise somatik mutasyonlar sebebiyle hücre proliferasyonundaki sınırlayıcı etkisi ortadan kalkmaktadır (Neuzillet ve ark. 2015). IL10 ve TGF $\beta$ 'nın artışı kolaylaşan anjiogenez ve tümör kütlelerinde ve gelişiminde hızlanmaya sebep olmaktadır (Cao ve ark. 2015). Ape (+) olan grupta hem IL10 hem de TGF $\beta$ 'nın anlamlı artışı tümör progresyonu lehine süreci yönlendirdiğini göstermektedir ve literatürle uyumlu bulunmuştur.

MCP-1 (CCL2) endotelial, fibroblastlar, epitelyal, düz kas, mezanjiyal, astrositik, monositik ve mikrogial vb. farklı hücre tipi tarafından üretilmektedir

(Cushing ve ark. 1990; Barna ve ark. 1994). Bu hücreler, periferik dolaşımında ve dokularda antiviral bağışıklık tepkileri için önemlidir. Bununla birlikte, monosit/makrofajların MCP-1'in ana kaynağı olduğu bulunmuştur (Yoshimura ve ark. 1989). MCP-1 monositlerin, hafıza T lenfositlerinin ve NK'ların göçünü ve infiltrasyonunu düzenlemektedir. MCP-1'in kemokin ailesinin en çok çalışılan üyesi arasında olduğu ve multiple skleroz (Sorensen ve ark. 2004), romatoid artrit (Hayashida ve ark. 2001), ateroskleroz (Kusano ve ark. 2004) ve insüline dirençli diyabet (Sartipy ve ark. 2003) dahil olmak üzere çeşitli hastalıkların tedavisi için potansiyel bir hedef noktası olduğu gösterilmiştir. MCP-1 için nakavt farelerin (CCL2-/-) yaşabildiği ancak, monosit alımında ve sitokin ekspresyonunda anormallikler olduğu görülmüştür (Lu ve ark. 1998). Kanser hücrelerinin buldukları ortama VEGF ve MCP-1 proteinlerinin sekresyonu gösterilmiştir (Barbera-Guillem ve ark. 2002; Qian ve ark. 2011). MCP-1'in tümör mikroçevresinde M2 tip makrofajların toplanmasını sağladığı görülmüştür (Allavena ve ark. 2004). Bu tez çalışmasında ise literatüre uyumlu olarak; apelin varlığında anlamlı olmamakla birlikte MCP-1 ifadesinin arttığı tespit edilmiştir.

Bu tez çalışmasında, apelin ifadesi gösteren SCCL MT1 hücreleriyle ko-kültüre edilen RAW264.7 hücrelerinin anti-inflamatuar cevap oluşturduğu tespit edilmiştir. Tümör mikroçevresine kanser hücreleri tarafından salınan apelinin anti-inflamatuar cevabı baskıladığı görülmektedir. Daha önce yapılan bir çalışmada RAW264.7 ve J774A.1 fare makrofaj hatlarının her ikisinde de APJ ifadesinin olduğu tespit edilmiştir. Aynı çalışmada apelin uygulanan makrofaj hücreleri anti-inflamatuar etki göstermiştir (Leeper ve ark. 2009). Bu tez çalışmasında, kanser hücrelerinden salınan apelinin makrofaj hücrelerinde M2 tip farklılaşmaya sebep olduğu yapılan RT-PZR sonuçlarıyla gözlenmiştir. Gen ifade analizi sonucunda anti-inflamatuar sitokinler olan IL10, TGF $\beta$  gibi genlerin SCCL MT1 Ape (+) hücreleriyle ko-kültüre edilen RAW264.7 hücrelerinde ifadelerinin anlamlı oranda arttığı tespit edilmiştir. Bununla beraber SCCL MT1 Ape (-) hücrelerle ko-kültüre edilen RAW264.7 hücrelerinde ise M1 tip farklılaşmanın öne çıktığı görülmüştür. Pro-inflamatuar sitokin genleri olan IL1, IL6 ve TNF $\alpha$ 'nın ifadelerinde anlamlı artış olmuştur. Yapılan bir çalışmada karaciğer nakli yapılan HCV (+) hepatoselüler karsinoma (Hepatocellular Carcinoma; HCC) hastalarından alınan karaciğer örneklerinde apelin ve APJ ifadelerinin karaciğer hastalığı şiddetine göre değerlendirilmiştir. Sonuç olarak

apelin/APJ eksenini ve apoptotik belirteçler ile güçlü bir şekilde ilişkili olan IL6 ve TNF $\alpha$  mRNA ekspresyonunun arttığı bulunmuştur. Dolayısıyla, bu pro-inflamatuar sitokinlerin ilerlemede rol oynayabileceğini göstermektedir (Cabiati ve ark 2021). Makrofaj polarizasyonu ile ilgili yapılan çalışmalarda, M1 tip pro-inflamatuar dönüşümün IL1, IL6, TNF $\alpha$  genleri üzerindeki artışla ilgili olduğu gösterilmiştir (Shi ve ark. 2020). Bu sonuçlarla uyumlu olarak apelinin ifade edildiği hücreler ko-kültüre edildiği makrofaj hücrelerini M2 tip yönde polarize olmalarını sağlamıştır.

Apelin (+) SCCL MT1 hücreleriyle ko-kültüre edilen RAW264.7 hücrelerindeki morfolojik değişimler Apelin (-) SCLL MT1 hücreleriyle karşılaştırıldığında; makrofaj hücrelerinde psödopodların arttığı ve hücrelerin uzadığı gözlemlenmiştir. Bu duruma makrofajların polarizasyonunun sebep olduğu görülmektedir. Nitekim yapılan çalışmalarda polarize makrofajların morfolojik değişimleri gösterilmiştir (Shi ve ark. 2020).

Makrofajlar sadece kan damarlarının yoğunluğunu arttırmakla kalmaz, aynı zamanda tümör hücrelerinin invazyonunu ve metastazını da teşvik eder. Makrofajlar, matriks metalloproteinazları, katepsin, ürokinaz plazminojen aktivatörü ve lisil oksidaz ve osteonektin gibi matriks yeniden şekillendirme enzimlerini eksprese ederek, tümör hücresi kaçış yolunu açmak için hücre dışı matriksi çözer (Wang ve ark. 2018). Primer tümörlerdeki makrofajlara ek olarak, makrofajlar ayrıca pre-metastatik lezyonlarda tümörün hayatta kalmasına ve kolonizasyonuna yardımcı olabilmektedir. Meme kanserinin erken yayılımı için makrofajların gerekli olduğu ve erken yayılmış makrofajların geç metastaza katkıda bulunduğu gösterilmiştir (Linde ve ark. 2018).

Bu çalışmada; apelin geninin baskılanmasının migrasyon ve invazyon ilişkili genler üzerine etkisi RT-PZR analizi ile incelenmiştir. Twist, Slug, Snail ve CD44 gibi metastazın gerçekleşmesine yardımcı olan genlerin ifadesinde anlamlı azalış meydana gelmiştir. Apelin peptidinin metastaz sürecine olumlu etki ettiği görülmüştür. Bunun yanı sıra epitelyal-mezenkimal geçiş (epithelial-mesenchymal transition; EMT) sürecinde etkili olan E-kadherin ve N-kadherin ifadeleri incelenmiştir. E-kadherinde anlamlı olmayan artış, ancak N-kadherinde ise anlamlı olmayan azalış görülmüştür. Her ne kadar istatistiksel olarak anlamlı olmasalar da EMT sürecinde etkili olabilecek yönde ifade değişikliği göstermiştir. Fibrositler, CCL2 (MCP-1) yoluyla Ly6C+

monositlerini toplayarak, melanom hücreleri için akciğerde premetastatik bir mikroçevre hazırladığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (van Deventer ve ark. 2013). Bunlara ek olarak, makrofajlar üzerindeki integrin alfa-4 ile tümör hücreleri üzerindeki VCAM1 arasındaki etkileşim, kanser hücrelerinin hayatta kalmasını desteklemektedir (Chen ve ark. 2011). İğfer çalışmalardan elde edilen sonuçlar, metastatik lezyonlarda dolaşımdaki tümör hücrelerinin hayatta kalmasını ve kolonizasyonu teşvik etmede premetastatik mikroçevreye alınan monosit/makrofajların rolünü desteklemektedir (Psaila ve ark. 2009; Peinado ve ark. 2012). Kanser Genom Atlası'nda yer alan doku transkriptom sonuçları üzerinden yapılan çalışmada; üçlü negatif meme kanseri (Triple-Negative Breast Cancer; TNBC) hastalarının tümör mikroçevresindeki TAM yoğunluğunun kötü prognoz ve immünoterapiye olan yanıt ile doğrudan ilişkili bulunmuştur (Bao ve ark. 2021). HCC'li hastalarda yapılan çalışmada ise M2 tip karaktere sahip TAM'ların *in vitro* ve *in vivo* olarak kanser hücrelerinin migrasyonunu pozitif yönde etkilediği bulunmuştur. Kütle spektrometrisi analiz sonuçları; integrin  $\alpha\text{M}\beta\text{2}$ 'nin (CD11b/CD18), M2 makrofaj türevli eksozomlarda (M2 eksoz) özellikle spesifik ve etkili olduğu belirlenmiştir. CD11b ve/veya CD18'in bloke edilmesi, M2 ekzos-aracılı HCC hücre metastazında önemli bir azalmaya neden olduğu görülmüştür. M2 ekzosları, tümör göçünü desteklemek için alıcı HCC hücrelerinde matris metaloproteinaz-9 sinyal yolunu aktive ederek, CD11b/CD18'in hücreler arası transferine aracılık etmektedir. Bu durum HCC hücrelerinin göç potansiyelini arttırmıştır, böylece tümör metastazı mekanizması ve TAM ilişkisi ortaya konmaktadır (Wu ve ark. 2021). M2 makrofajlar; düşük miktarlarda pro-inflamatuar sitokinleri ancak daha yüksek seviyelerde IL10 gibi anti-inflamatuar mediatörler salgılar. Ayrıca IL4, makrofajların, hayvanlarda IL10 ekspresyonunu yükselterek ağrıyı azaltan bir M2 fenotipine (Hu ve ark 2015) doğru yönlenmesi için kritiktir (Kiguchi ve ark. 2015).



## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında, kanser mikroçevresinde en yaygın bulunan immün hücresi makrofajların kanser hücreleriyle olan etkileşimi ve bu etkileşimde apelinin önemi araştırılmıştır. Apelin birçok kanser türünde aşırı ifade edilmektedir. Bu durumda apelin miktarındaki artışın makrofaj hücre polarizasyonuna olan etkisinin ve sonuçlarının gen ifadesi düzeyinde araştırılması yapılmıştır. Sonuç olarak;

- Apelin geninin ifadesi SCCL MT1 hücrelerinde başarılı şekilde shRNA yöntemiyle baskılanmıştır. Baskılanma gerçekleşen hücreler TurboGFP ışması floresan mikroskobu ile tespit edilmiştir.
- Apelin gen ifadesindeki baskılanma RT-PZR analizi gösterilmiştir.
- shRNA ile apelin geninin baskılandığı hücrelerin ayrılması için optimal puromisin dozu belirlenmiş ve uygulanmıştır. Hücrelerdeki baskılanma puromisin seleksiyonu ile stabil hale getirilmiştir.
- Transdükte olan kanser hücreleriyle ko-kültüre edilen RAW264.7 hücrelerinin M1 tip makrofaj özelliklerini gösterdiği pro-inflamutar genlerin ifadesinde artış olduğu tespit edilmiştir.
- Transdükte olmayan SCCL MT1 hücreleriyle ko-kültürü edilen RAW264.7 hücrelerinin M2 tip makrofaj özellikleri kazandığının anti-inflamatar genlerin ifadesinde artış olduğu görülmüştür.
- Gen ifadesi anlamlı bulunan IL1, IL6, IL10, TNF $\alpha$  ve TGF $\beta$  sitokin miktarları ELISA yöntemi kullanılarak tespit edilmiştir .
- Apelin gen ifadesi baskılanan SCCL MT1 hücrelerindeki invazyon ve migrasyonda etkili genlerin ifadesi mRNA seviyesinde değerlendirilmiş ve kanser hücrelerinin invazyon ve migrasyon yeteneklerinin anlamlı oranda azaldığı tespit edilmiştir.

Elde edilen sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde apelinin kanser makrofaj etkileşimde anahtar bir role sahip olduğu, makrofaj polarizasyonunda etkisi görülmektedir. Ayrıca apelinin susturulmasının kanser hücrelerinin invazif ve migratif yeteneklerini de azalttığı gösterilmiştir. Yapılan bu çalışma *in vitro* düzeyidir. Bu sebeple apelinin etkisinin *in vivo* olarak değerlendirilmesi elde edilen sonuçların anlamını güçlendirecektir. Ayrıca apelinin (i) makrofaj hücrelerinde potansiyel hedef moleküler yolaklar üzerine, (ii) miRNA yolakları üzerinden epigenetik ve (iii) kanser

progresyonunu durdurucu ya da yavaşlatıcı etkileri ile (iv) terapötik ajan olarak kullanılabilirliğinin daha ileri çalışmalarla araştırılmasına ihtiyaç bulunmaktadır.



## 7. KAYNAKLAR

- Global cancer statistics 2018 GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2020;70(4):313-44.
- Boutillier AJ, Elsawa SF. Macrophage polarization states in the tumor microenvironment. *Int J Mol Sci.* 2021;22(13):6995-99.
- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(6):394-24.
- Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Mathers C, Parkin DM, Piñeros M, Znaor A, Bray F. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int J Cancer.* 2019;144(8):1941-53.
- Cohen N, Fedewa S, Chen AY. Epidemiology and demographics of the head and neck cancer population. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am.* 2018;30(4):381-95.
- Hashibe M, Brennan P, Benhamou S, Castellsague X, Chen C, Curado MP, Dal Maso L, Daudt AW, Fabianova E, Fernandez L, Wunsch-Filho V, Franceschi S, Hayes RB, Herrero R, Koifman S, La Vecchia C, Lazarus P, Levi F, Mates D, Matos E, Menezes A, Muscat J, Eluf-Neto J, Olshan AF, Rudnai P, Schwartz SM, Smith E, Sturgis EM, Szeszenia-Dabrowska N, Talamini R, Wei Q, Winn DM, Zaridze D, Zatonski W, Zhang ZF, Berthiller J, Boffetta P. Alcohol drinking in never users of tobacco, cigarette smoking in never drinkers, and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *J. Natl Cancer Inst.* 2007;99:777-89.
- Mehanna H, Beech T, Nicholson T, El-Hariry I, McConkey C, Paleri V, Roberts S. Prevalence of human papillomavirus in oropharyngeal and nonoropharyngeal head and neck cancer--systematic review and meta-analysis of trends by time and region. *Head Neck.* 2013;35(5):747-55.
- Jiang H, Livingston M, Room R, Gan Y, English D, Chenhall R. Can public health policies on alcohol and tobacco reduce a cancer epidemic? Australia's experience. *BMC Med.* 2019;17(1):213-22.
- Fung SY, Lam JW, Chan KC. Clinical utility of circulating Epstein-Barr virus DNA analysis for the management of nasopharyngeal carcinoma. *Chin. Clin. Oncol.* 2016;5:18-30.
- Windon MJ, D'Souza G, Rettig EM, Westra WH, van Zante A, Wang SJ, Ryan WR, Mydlarz WK, Ha PK, Miles BA, Koch W, Gourin C, Eisele DW, Fakhry C. Increasing prevalence of human papillomavirus-positive oropharyngeal cancers among older adults. *Cancer.* 2018;124(14):2993-99.
- Pulte D, Brenner H. Changes in survival in head and neck cancers in the late 20th and early 21st century: a period analysis. *Oncologist.* 2010;15:994-01.
- Chaturvedi AK, Engels EA, Pfeiffer RM, Hernandez BY, Xiao W, Kim E, Jiang B, Goodman MT, Sibug-Saber M, Cozen W, Liu L, Lynch CF, Wentzensen N, Jordan RC, Altekruze S, Anderson WF, Rosenberg PS, Gillison ML. Human papillomavirus and rising oropharyngeal cancer incidence in the United States. *J Clin Oncol.* 2011;29(32):4294-01.
- Osazuwa-Peters N, Simpson MC, Zhao L, Boakye EA, Olomukoro SI, Deshields T, Loux TM, Varvares MA, Schootman M. Suicide risk among cancer survivors: Head and neck versus other cancers. *Cancer.* 2018;124(20):4072-79.
- Blot WJ, McLaughlin JK, Winn DM, Austin DF, Greenberg RS, Preston-Martin S, Bernstein L, Schoenberg JB, Stemhagen A, Fraumeni JF Jr. Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Cancer Res.* 1988;48(11):3282-87.
- Zhang H, Seikaly H, Biron VL, Jeffery CC. Utility of PET-CT in detecting nodal metastasis in cN0 early stage oral cavity squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2018;80:89-92.
- World Health Organization. WHO global report on trends in prevalence of tobacco smoking 2015.
- Datta S, Chaturvedi P, Mishra A, Pawar P. A review of Indian literature for association of smokeless tobacco with malignant and premalignant diseases of head and neck region. *Indian J Cancer.* 2014;51(3):200-08.

- Guha N, Boffetta P, Wunsch Filho V, Eluf Neto J, Shangina O, Zaridze D, Curado MP, Koifman S, Matos E, Menezes A, Szeszenia-Dabrowska N, Fernandez L, Mates D, Daudt AW, Lissowska J, Dikshit R, Brennan P. Oral health and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck and esophagus: results of two multicentric case-control studies. *Am J Epidemiol.* 2007;166(10):1159-73.
- Freedman ND, Park Y, Subar AF, Hollenbeck AR, Leitzmann MF, Schatzkin A, Abnet CC. Fruit and vegetable intake and head and neck cancer risk in a large United States prospective cohort study. *Int J Cancer.* 2008;122(10):2330-36.
- Hennessey PT, Westra WH, Califano JA. Human papillomavirus and head and neck squamous cell carcinoma: recent evidence and clinical implications. *J Dent Res.* 2009;88(4):300-06.
- Tseng YJ, Wang HY, Lin TW, Lu JJ, Hsieh CH, Liao CT. Development of a machine learning model for survival risk stratification of patients with advanced oral cancer. *JAMA Netw Open.* 2020;3(8):e2011768.
- Viens LJ, Henley SJ, Watson M, Markowitz LE, Thomas CC, Thompson TD, Razzaghi H, Saraiya M. Human papillomavirus-associated cancers - United States, 2008-2012. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2016;65(26):661-66.
- Gillison ML, Alemany L, Snijders PJ, Chaturvedi A, Steinberg BM, Schwartz S, Castellsagué X. Human papillomavirus and diseases of the upper airway: head and neck cancer and respiratory papillomatosis. *Vaccine.* 2012;30(5):34-54.
- Gillison ML, Chaturvedi AK, Anderson WF, Fakhry C. Epidemiology of human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol.* 2015;33(29):3235-42.
- Velleuer E, Dietrich R. Fanconi anemia: young patients at high risk for squamous cell carcinoma. *Mol Cell Pediatr.* 2014;1(1):9-15.
- Cadoni G, Boccia S, Petrelli L, Di Giannantonio P, Arzani D, Giorgio A, De Feo E, Pandolfini M, Galli P, Paludetti G, Ricciardi G. A review of genetic epidemiology of head and neck cancer related to polymorphisms in metabolic genes, cell cycle control and alcohol metabolism. *Acta Otorhinolaryngol Ital.* 2012;32(1):1-11.
- Fang XN, Yin M, Li H, Liang C, Xu C, Yang GW, Zhang HX. Comprehensive analysis of competitive endogenous RNAs network associated with head and neck squamous cell carcinoma. *Sci Rep.* 2018;8(1):10544.
- Chan LP, Liu C, Chiang FY, Wang LF, Lee KW, Chen WT, Kuo PL, Liang CH. IL-8 promotes inflammatory mediators and stimulates activation of p38 MAPK/ERK-NF- $\kappa$ B pathway and reduction of JNK in HNSCC. *Oncotarget.* 2017;8(34):56375-88.
- Pynnonen MA, Gillespie MB, Roman B, Rosenfeld RM, Tunkel DE, Bontempo L, Brook I, Chick DA, Colandrea M, Finestone SA, Fowler JC, Griffith CC, Henson Z, Levine C, Mehta V, Salama A, Scharpf J, Shatzkes DR, Stern WB, Youngerman JS, Corrigan MD. Clinical practice guideline: evaluation of the neck mass in adults. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2017;157:S1-S30.
- Pai SI, Westra WH. Molecular pathology of head and neck cancer: implications for diagnosis, prognosis, and treatment. *Annu Rev Pathol.* 2009;4:49-70.
- Yi J, Huang X, Xu Z, Liu S, Wang X, He X, Luo D, Luo J, Xiao J, Zhang S, Wang K, Qu Y, Tang Y, Liu W, Xu G, Gao L, Wang D. Phase III randomized trial of preoperative concurrent chemoradiotherapy versus preoperative radiotherapy for patients with locally advanced head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget.* 2017;8(27):44842-50.
- Taberna M, Mena M, Pavón MA, Alemany L, Gillison ML, Mesía R. Human papillomavirus-related oropharyngeal cancer. *Ann Oncol.* 2017;28(10):2386-98.
- Lewis JS Jr, Beadle B, Bishop JA, Chernock RD, Colasacco C, Lacchetti C, Moncur JT, Rocco JW, Schwartz MR, Seethala RR, Thomas NE, Westra WH, Faquin WC. Human papillomavirus testing in head and neck carcinomas: guideline from the college of American Pathologists. *Arch Pathol Lab Med.* 2018;142(5):559-97.
- Lee YS, Johnson DE, Grandis JR. An update: emerging drugs to treat squamous cell carcinomas of the head and neck. *Expert Opin Emerg Drugs.* 2018;23(4):283-99.

- Lyhne NM, Primdahl H, Kristensen CA, Andersen E, Johansen J, Andersen LJ, Evensen J, Mortensen HR, Overgaard J. The DAHANCA 6 randomized trial: Effect of 6 vs 5 weekly fractions of radiotherapy in patients with glottic squamous cell carcinoma. *Radiother Oncol.* 2015;117(1):91-98.
- Weinstein GS, Quon H, Newman HJ, Chalian JA, Malloy K, Lin A, Desai A, Livolsi VA, Montone KT, Cohen KR, O'Malley BW. Transoral robotic surgery alone for oropharyngeal cancer: an analysis of local control. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2012;138(7):628-34.
- Forastiere AA, Ismaila N, Lewin JS, Nathan CA, Adelstein DJ, Eisbruch A, Fass G, Fisher SG, Laurie SA, Le QT, O'Malley B, Mendenhall WM, Patel S, Pfister DG, Provenzano AF, Weber R, Weinstein GS, Wolf GT. Use of Larynx-preservation strategies in the treatment of laryngeal cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Update. *J Clin Oncol.* 2018;36(11):1143-69.
- D'Cruz AK, Vaish R, Kapre N, Dandekar M, Gupta S, Hawaldar R, Agarwal JP, Pantvaidya G, Chaukar D, Deshmukh A, Kane S, Arya S, Ghosh-Laskar S, Chaturvedi P, Pai P, Nair S, Nair D, Badwe R. Head and Neck Disease Management Group. Elective versus therapeutic neck dissection in node-negative oral cancer. *N Engl J Med.* 2015;373(6):521-29.
- Forastiere AA, Goepfert H, Maor M, Pajak TF, Weber R, Morrison W, Glisson B, Trotti A, Ridge JA, Chao C, Peters G, Lee DJ, Leaf A, Ensley J, Cooper J. Concurrent chemotherapy and radiotherapy for organ preservation in advanced laryngeal cancer. *N Engl J Med.* 2003;349(22):2091-98.
- Cooper JS, Pajak TF, Forastiere AA, Jacobs J, Campbell BH, Saxman SB, Kish JA, Kim HE, Cmelak AJ, Rotman M, Machtay M, Ensley JF, Chao KS, Schultz CJ, Lee N, Fu KK; Radiation Therapy Oncology Group 9501/Intergroup. Postoperative concurrent radiotherapy and chemotherapy for high-risk squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med.* 2004;350(19):1937-44.
- Baum JM, Vinnakota R, Anna Park YH, Bates SE, Fojo T, Aggarwal C, Limaye S, Damjanov N, Di Stefano J, Ciunci C, Genden EM, Wisnivesky JP, Ferrandino R, Mamtani R, Langer CJ, Cohen RB, Sigel K. Cisplatin every 3 weeks versus weekly with definitive concurrent radiotherapy for squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Natl Cancer Inst.* 2019;111(5):490-97.
- Fakhry C, Westra WH, Li S, Cmelak A, Ridge JA, Pinto H, Forastiere A, Gillison ML. Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial. *J Natl Cancer Inst.* 2008;100(4):261-69.
- Ang KK, Harris J, Wheeler R, Weber R, Rosenthal DI, Nguyen-Tân PF, Westra WH, Chung CH, Jordan RC, Lu C, Kim H, Axelrod R, Silverman CC, Redmond KP, Gillison ML. Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *N Engl J Med.* 2010;363(1):24-35.
- Marur S, Li S, Cmelak AJ, Gillison ML, Zhao WJ, Ferris RL, Westra WH, Gilbert J, Bauman JE, Wagner LI, Trevarthen DR, Balkrishna J, Murphy BA, Agrawal N, Colevas AD, Chung CH, Burtness B. E1308: Phase II trial of induction chemotherapy followed by reduced-dose radiation and weekly cetuximab in patients with HPV-associated resectable squamous cell carcinoma of the Oropharynx- ECOG-ACRIN Cancer Research Group. *J Clin Oncol.* 2017;35(5):490-97.
- Fakhry C, Psyrris A, Chaturvedi A. HPV and head and neck cancers: state-of-the-science. *Oral Oncol.* 2014;50(5):353-55.
- Burtness B, Harrington KJ, Greil R, Soulières D, Tahara M, de Castro G Jr, Psyrris A, Basté N, Neupane P, Bratland Å, Fuereder T, Hughes BGM, Mesía R, Ngamphaiboon N, Rordorf T, Wan Ishak WZ, Hong RL, González Mendoza R, Roy A, Zhang Y, Gumuscu B, Cheng JD, Jin F, Rischin D; KEYNOTE-048 Investigators. Pembrolizumab alone or with chemotherapy versus cetuximab with chemotherapy for recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (KEYNOTE-048): a randomised, open-label, phase 3 study. *Lancet.* 2019;394(10212):1915-28.
- Saâda-Bouزيد E, Defaucheux C, Karabajakian A, Coloma VP, Servois V, Paoletti X, Even C, Fayette J, Guigay J, Loirat D, Peyrade F, Alt M, Gal J, Le Tourneau C. Hyperprogression during anti-PD-1/PD-L1 therapy in patients with recurrent and/or metastatic head and neck squamous cell carcinoma. *Ann Oncol.* 2017;28(7):1605-11.
- Saleh K, Daste A, Martin N, Pons-Tostivint E, Auperin A, Herrera-Gomez RG, Baste-Rotllan N, Bidault F, Guigay J, Le Tourneau C, Saada-Bouزيد E, Even C. Response to salvage chemotherapy after progression on immune checkpoint inhibitors in patients with recurrent and/or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. *Eur J Cancer.* 2019;121:123-29.

- Puzanov I, Diab A, Abdallah K, Bingham CO 3rd, Brogdon C, Dadu R, Hamad L, Kim S, Lacouture ME, LeBoeuf NR, Lenihan D, Onofrei C, Shannon V, Sharma R, Silk AW, Skondra D, Suarez-Almazor ME, Wang Y, Wiley K, Kaufman HL, Ernstoff MS; Society for Immunotherapy of Cancer Toxicity Management Working Group. Managing toxicities associated with immune checkpoint inhibitors: consensus recommendations from the Society for Immunotherapy of Cancer (SITC) Toxicity Management Working Group. *J Immunother Cancer*. 2017;5(1):95-01.
- Taylor K, Michal K, Astrid BK, Farnoosh K, Brandon D, Lisa W, Scott VB, Benjamin HK, Lillian LS. Radiomic response evaluation of recurrent or metastatic head and neck squamous cell cancer (R/M HNSCC) patients receiving pembrolizumab on KEYNOTE-012 study. *Am. J. Clin. Oncol*. 2020;38(15):6545-45.
- Metchnikoff, E. *Lectures on the Comparative Pathology* (Kegan Paul, London, 1893).
- Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med*. 1973;137(5):1142-62.
- van Furth R, Cohn ZA. The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *J Exp Med*. 1968;128(3):415-35.
- van Furth R, Cohn ZA, Hirsch JG, Humphrey JH, Spector WG, Langevoort HL. The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells. *Bull World Health Organ*. 1972;46(6):845-52.
- Merad M, Sathe P, Helft J, Miller J, Mortha A. The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annu Rev Immunol*. 2013;31:563-04.
- Mildner A, Jung S. Development and function of dendritic cell subsets. *Immunity*. 2014;40(5):642-656.
- Ginhoux F, Jung S. Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. *Nat Rev Immunol*. 2014;14(6):392-04.
- Palis J, Robertson S, Kennedy M, Wall C, Keller G. Development of erythroid and myeloid progenitors in the yolk sac and embryo proper of the mouse. *Development*. 1999;126(22):5073-84.
- Bertrand JY, Jalil A, Klaine M, Jung S, Cumano A, Godin I. Three pathways to mature macrophages in the early mouse yolk sac. *Blood*. 2005;106(9):3004-11.
- Cumano A, Godin I. Ontogeny of the hematopoietic system. *Annu Rev Immunol*. 2007; 25(1):745-85.
- Orkin SH, Zon LI. Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell*. 2008;132(4):631-44.
- Schulz C, Gomez Perdiguero E, Chorro L, Szabo-Rogers H, Cagnard N, Kierdorf K, Prinz M, Wu B, Jacobsen SE, Pollard JW, Frampton J, Liu KJ, Geissmann F. A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. *Science*. 2012;336(6077):86-90.
- Sumner R, Crawford A, Mucenski M, Frampton J. Initiation of adult myelopoiesis can occur in the absence of c-Myb whereas subsequent development is strictly dependent on the transcription factor. *Oncogene*. 2000;19(30):3335-42.
- Lieu YK, Reddy EP. Conditional c-myb knockout in adult hematopoietic stem cells leads to loss of self-renewal due to impaired proliferation and accelerated differentiation. *PNAS*. 2009;106(51), 21689-94.
- Soza-Ried C, Hess I, Netuschil N, Schorpp M, Boehm T. Essential role of c-myb in definitive hematopoiesis is evolutionarily conserved. *PNAS*. 2010;107(40):17304-08.
- Suda T, Takahashi N, Martin TJ. Modulation of osteoclast differentiation. *Endocr Rev*. 1992;13:66-80.
- Kosteli A, Sogari E, Haemmerle G, Martin JF, Lei J, Zechner R, Ferrante AW. Weight loss and lipolysis promote a dynamic immune response in murine adipose tissue. *J Clin Invest*. 2010;120(10):3466-79.
- Chinnery HR, McMenamin PG, Dando SJ. Macrophage physiology in the eye. *Pflugers Arch*. 2017;469: 501-15.
- Kurowska-Stolarska, M, Alivernini S. Synovial tissue macrophages: friend or foe? *RMD Open*. 2017;3:e000527.

- Chua ACL, Hodson LJ, Moldenhauer LM, Robertson SA, Ingman WV. Dual roles for macrophages in ovarian cycle-associated development and remodelling of the mammary gland epithelium. *Development*. 2010;137:4229-38.
- Wu R, Van Der Hoek KH, Ryan NK, Norman RJ, Robker RL. Macrophage contributions to ovarian function. *Hum Reprod Update*. 2004;10:119-33.
- Renaud SJ, Graham CH. The role of macrophages in utero-placental interactions during normal and pathological pregnancy. *Immunol Invest*. 2008;37:535-64.
- Hulsmans M, Clauss S, Xiao L, Aguirre AD, King KR, Hanley A, Hucker WJ, Wülfers EM, Seemann G, Courties G, Iwamoto Y, Sun Y, Savol AJ, Sager HB, Lavine KJ, Fishbein GA, Capen DE, Da Silva N, Miquerol L, Wakimoto H, Seidman CE, Seidman JG, Sadreyev RI, Naxerova K, Mitchell RN, Brown D, Libby P, Weissleder R, Swirski FK, Kohl P, Vinegoni C, Milan DJ, Ellinor PT, Nahrendorf M. Macrophages facilitate electrical conduction in the heart. *Cell*. 2017;169(3):510-22.
- Machnik A, Neuhofer W, Jantsch J, Dahlmann A, Tammela T, Machura K, Park JK, Beck FX, Müller DN, Derer W, Goss J, Ziomber A, Dietsch P, Wagner H, van Rooijen N, Kurtz A, Hilgers KF, Alitalo K, Eckardt KU, Luft FC, Kerjaschki D, Titze J. Macrophages regulate salt-dependent volume and blood pressure by a vascular endothelial growth factor-C-dependent buffering mechanism. *Nat Med*. 2009;15(5):545-52.
- Müller S, Quast T, Schröder A, Hucke S, Klotz L, Jantsch J, Gerzer R, Hemmersbach R, Kolanus W. Salt-dependent chemotaxis of macrophages. *PLoS One*. 2013;8(9):e73439.
- Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol*. 2010;11(5):373-84.
- Malyshev I, Malyshev Y. Current concept and update of the macrophage plasticity concept: intracellular mechanisms of reprogramming and M3 macrophage "Switch" phenotype. *Biomed Res Int*. 2015;2015:341308-16.
- Takeda K, Tanaka T, Shi W, Matsumoto M, Minami M, Kashiwamura S, Nakanishi K, Yoshida N, Kishimoto T, Akira S. Essential role of Stat6 in IL-4 signalling. *Nature*. 1996;380(6575):627-30.
- Gordon S, Martinez FO. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity*. 2010;32(5):593-04.
- Martinez FO, Helming L, Gordon S. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annu. Rev. Immunol*. 2009;27:451-83.
- Van Dyken SJ, Locksley RM. Interleukin-4- and interleukin-13-mediated alternatively activated macrophages: roles in homeostasis and disease. *Annu Rev Immunol*. 2013;31:317-43.
- Italiani P, Boraschi D. From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation. *Front Immunol*. 2014;5:514-21.
- Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, Fisher EA, Gilroy DW, Goerdt S, Gordon S, Hamilton JA, Ivashkiv LB, Lawrence T, Locati M, Mantovani A, Martinez FO, Mege JL, Mosser DM, Natoli G, Saeij JP, Schultze JL, Shirey KA, Sica A, Suttles J, Udalova I, van Ginderachter JA, Vogel SN, Wynn TA. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity*. 2014;41(1):14-20.
- Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep*. 2014;6:13-19.
- Zhou D, Huang C, Lin Z, Zhan S, Kong L, Fang C, Li J. Macrophage polarization and function with emphasis on the evolving roles of coordinated regulation of cellular signaling pathways. *Cell. Signal*. 2014;26(2),192-97.
- Aalipour A, Chuang HY, Murty S, D'Souza AL, Park SM, Gulati GS, Patel CB, Beinat C, Simonetta F, Martinić I, Gowrishankar G, Robinson ER, Aalipour E, Zhian Z, Gambhir SS. Engineered immune cells as highly sensitive cancer diagnostics. *Nat Biotechnol*. 2019;37(5):531-39.
- Evans R, Alexander P. Cooperation of immune lymphoid cells with macrophages in tumour immunity. *Nature*. 1970;228(5272):620-2.
- Wang, HW, Joyce J. Alternative activation of tumor-associated macrophages by IL-4: priming for protumoral functions. *Cell Cycle*. 2010;9(24):4824-35.

- Quail DF, Joyce JA. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Med.* 2013;19(11):1423-37.
- Ostuni R, Kratochvill F, Murray PJ, Natoli G. Macrophages and cancer: from mechanisms to therapeutic implications. *Trends Immunol.* 2015;36(4):229-39.
- Quail DF, Bowman RL, Akkari L, Quick ML, Schuhmacher AJ, Huse JT, Holland EC, Sutton JC, Joyce JA. The tumor microenvironment underlies acquired resistance to CSF-1R inhibition in gliomas. *Science.* 2016;352(6288):aad3018.
- Lee H, Zhang D, Zhu Z, Dela Cruz CS, Jin Y. Epithelial cell-derived microvesicles activate macrophages and promote inflammation via microvesicle-containing microRNAs. *Sci Rep.* 2016;6:35250-61.
- Choi J, Kim HY, Ju EJ, Jung J, Park J, Chung HK, Lee JS, Lee JS, Park HJ, Song SY, Jeong SY, Choi EK. Use of macrophages to deliver therapeutic and imaging contrast agents to tumors. *Biomaterials.* 2012;33(16):4195-03.
- Madsen SJ, Baek SK, Makkouk AR, Krasieva T, Hirschberg H. Macrophages as cell-based delivery systems for nanoshells in photothermal therapy. *Ann Biomed Eng.* 2012;40(2):507-15.
- Tanei T, Leonard F, Liu X, Alexander JF, Saito Y, Ferrari M, Godin B, Yokoi K. Redirecting transport of nanoparticle albumin-bound paclitaxel to macrophages enhances therapeutic efficacy against liver metastases. *Cancer Res.* 2016;76(2):429-39.
- Dou H, Destache CJ, Morehead JR, Mosley RL, Boska MD, Kingsley J, Gorantla S, Poluektova L, Nelson JA, Chaubal M, Werling J, Kipp J, Rabinow BE, Gendelman HE. Development of a macrophage-based nanoparticle platform for antiretroviral drug delivery. *Blood.* 2006;108(8):2827-35.
- Dou H, Grotepas CB, McMillan JM, Destache CJ, Chaubal M, Werling J, Kipp J, Rabinow B, Gendelman HE. Macrophage delivery of nanoformulated antiretroviral drug to the brain in a murine model of neuroAIDS. *J Immunol.* 2009;183(1):661-69.
- Klyachko NL, Haney MJ, Zhao Y, Manickam DS, Mahajan V, Suresh P, Hingtgen SD, Mosley RL, Gendelman HE, Kabanov AV, Batrakova EV. Macrophages offer a paradigm switch for CNS delivery of therapeutic proteins. *Nanomedicine.* 2014;9(9):1403-22.
- Chang YN, Guo H, Li J, Song Y, Zhang M, Jin J, Xing G, Zhao Y. Adjusting the balance between effective loading and vector migration of macrophage vehicles to deliver nanoparticles. *PLoS One.* 2013;8(10):e76024.
- Ikehara Y, Niwa T, Biao L, Ikehara SK, Ohashi N, Kobayashi T, Shimizu Y, Kojima N, Nakanishi H. A carbohydrate recognition-based drug delivery and controlled release system using intraperitoneal macrophages as a cellular vehicle. *Cancer Res.* 2006;66(17):8740-48.
- Han CZ, Juncadella IJ, Kinchen JM, Buckley MW, Klibanov AL, Dryden K, Onengut-Gumuscu S, Erdbrügger U, Turner SD, Shim YM, Tung KS, Ravichandran KS. Macrophages redirect phagocytosis by non-professional phagocytes and influence inflammation. *Nature.* 2016;539(7630):570-74.
- Cheng J, Zhang Q, Fan S, Zhang A, Liu B, Hong Y, Guo J, Cui D, Song J. The vacuolization of macrophages induced by large amounts of inorganic nanoparticle uptake to enhance the immune response. *Nanoscale.* 2019;11(47):22849-59.
- O'Dowd BF, Heiber M, Chan A, Heng HH, Tsui LC, Kennedy JL, Shi X, Petronis A, George SR, Nguyen T. A human gene that shows identity with the gene encoding the angiotensin receptor is located on chromosome 11. *Gene.* 1993;136(1-2):355-60.
- Zhang Y, Wang Y, Lou Y, Luo M, Lu Y, Li Z, Wang Y, Miao L. Elabela, a newly discovered APJ ligand: Similarities and differences with Apelin. *Peptides.* 2018;109:23-32.
- Tatemoto K, Hosoya M, Habata Y, Fujii R, Kakegawa T, Zou MX, Kawamata Y, Fukusumi S, Hinuma S, Kitada C, Kurokawa T, Onda H, Fujino M. Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;251(2):471-76.
- Kadowaki T, Yamauchi T. Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr Rev.* 2005;26(3):439-51.



- Carpéné C, Dray C, Attané C, Valet P, Portillo MP, Churrua I, Milagro FI, Castan-Laurell I. Expanding role for the apelin/APJ system in physiopathology. *J Physiol Biochem*. 2007;63(4):359-73.
- Boucher J, Masri B, Daviaud D, Gesta S, Guigné C, Mazzucotelli A, Castan-Laurell I, Tack I, Knibiehler B, Carpéné C, Audigier Y, Saulnier-Blache JS, Valet P. Apelin, a newly identified adipokine up-regulated by insulin and obesity. *Endocrinology*. 2005;146(4):1764-71.
- Castan IL, Dray C, Attané C, Duparc T, Knauf C, Valet P. Apelin, diabetes, and obesity. *Endocrine*. 2011;40(1):1-9.
- Cavallo MG, Sentinelli F, Barchetta I, Costantino C, Incani M, Perra L, Capoccia D, Romeo S, Cossu E, Leonetti F, Agati L, Baroni MG. Altered glucose homeostasis is associated with increased serum apelin levels in type 2 diabetes mellitus. *PLoS One*. 2012;7(12):e51236.
- Lacquaniti A, Altavilla G, Picone A, Donato V, Chirico V, Mondello P, Aloisi C, Marabello G, Loddo S, Buemi A, Lorenzano G, Buemi M. Apelin beyond kidney failure and hyponatremia: a useful biomarker for cancer disease progression evaluation. *Clin Exp Med*. 2015;15(1):97-105.
- Wysocka MB, Pietraszek-Gremplewicz K, Nowak D. The role of apelin in cardiovascular diseases, obesity and cancer. *Front Physiol*. 2018;9:557-66.
- Berta J, Kenessey I, Dobos J, Tovari J, Klepetko W, Jan Ankersmit H, Hegedus B, Renyi-Vamos F, Varga J, Lorincz Z, Paku S, Ostoros G, Rozsas A, Timar J, Dome B. Apelin expression in human non-small cell lung cancer: role in angiogenesis and prognosis. *J Thorac Oncol*. 2010;5(8):1120-29.
- Lin ZY, Chuang WL. Hepatocellular carcinoma cells cause different responses in expressions of cancer-promoting genes in different cancer-associated fibroblasts. *Kaohsiung J Med Sci*. 2013;29(6):312-18.
- Picault FX, Chaves-Almagro C, Progetti F, Prats H, Masri B, Audigier Y. Tumour co-expression of apelin and its receptor is the basis of an autocrine loop involved in the growth of colon adenocarcinomas. *Eur J Cancer*. 2014;50(3):663-74.
- Chen T, Liu N, Xu GM, Liu TJ, Liu Y, Zhou Y, Huo SB, Zhang K. Apelin13/APJ promotes proliferation of colon carcinoma by activating Notch3 signaling pathway. *Oncotarget*. 2017;8(60):101697-06.
- Blanchoin L, Boujemaa-Paterski R, Sykes C, Plastino J. Actin dynamics, architecture, and mechanics in cell motility. *Physiol Rev*. 2014;94(1):235-63.
- Khaïtlina SI. Mechanisms of spatial segregation of actin isoforms. *Tsitologiya*. 2007;49(5):345-54.
- Simiczyjew A, Pietraszek-Gremplewicz K, Mazur AJ, Nowak D. Are non-muscle actin isoforms functionally equivalent? *Histol Histopathol*. 2017;32(11):1125-39.
- Gross SR. Actin binding proteins: their ups and downs in metastatic life. *Cell Adh Migr*. 2013;7(2):199-13.
- Bravo-Cordero JJ, Magalhaes MA, Eddy RJ, Hodgson L, Condeelis J. Functions of cofilin in cell locomotion and invasion. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2013;14(7):405-15.
- Lv D, Li L, Lu Q, Li Y, Xie F, Li H, Cao J, Liu M, Wu D, He L, Chen L. PAK1-cofilin phosphorylation mediates human lung adenocarcinoma cells migration induced by apelin-13. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2016;43(5):569-79.
- Diakowska D, Markocka-Mączka K, Nienartowicz M, Rosińczuk J, Krzystek-Korpaczka M. Assessment of apelin, apelin receptor, resistin and adiponectin levels in the primary tumor and serum of patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Adv Clin Exp Med*. 2018;28(5):671-78.
- Altinkaya SO, Nergiz S, Küçük M, Yüksel H. Apelin levels are higher in obese patients with endometrial cancer. *J Obstet Gynaecol Res*. 2015;41:294-300.
- Unal I, Khiavi IR, Tasar GE, Goksuluk D, Boyraz G, Ozgul N, Usubutun A, Yuruker S, Zeybek ND. Tumor apelin immunoreactivity is correlated with body mass index in ovarian high grade serous carcinoma. *Biotech Histochem*. 2020;95(1):27-36.
- Han S, Wang GY, Qi X, Englander EW, Greeley GH. Involvement of a Stat3 binding site in inflammation induced enteric apelin expression. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2008;295:1068-78.

- Izgut-Uysal VN, Gemic B, Birsen I, Acar N, Ustunel I: The protective effect of apelin against water immersion and restraint stress-induced gastric damage. *J Physiol Sci.* 2014; 64: 279-89.
- Daviaud D, Boucher J, Gesta S, Dray C, Guigne C, Quilliot D, Ayav A, Ziegler O, Carpenne C, Saulnier-Blache JS, Valet P, Castan-Laurell I. TNF $\alpha$  up-regulates apelin expression in human and mouse adipose tissue. *FASEB J.* 2006;20(9):1528-30.
- Obara S, Akifusa S, Ariyoshi W, Okinaga T, Usui M, Nakashima K, Nishihara T. Pyroglutamated apelin-13 inhibits lipopolysaccharide-induced production of pro-inflammatory cytokines in murine macrophage J774.1 cells. *Mod Res Inflamm.* 2014;3:59-66.
- Leeper NJ, Tedesco MM, Kojima Y, Schultz GM, Kundu RK, Ashley EA, Tsao PS, Dalman RL, Quertermous T. Apelin prevents aortic aneurysm formation by inhibiting macrophage inflammation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2009;296(5):1329-35.
- Choe W, Albright A, Sulcove J, Jaffer S, Hesselgesser J, Lavi E, Crino P, Kolson DL. Functional expression of the seven-transmembrane HIV-1 co-receptor APJ in neural cells. *J Neurovirol.* 2000;(6)1:61-69.
- Kim SS, Garg H, Joshi A, Manjunath N. Strategies for targeted nonviral delivery of siRNAs in vivo. *Trends Mol Med.* 2009;15(11):491-500.
- Sheu-Gruttadauria J, MacRae IJ. Structural foundations of RNA silencing by argonaute. *J Mol Biol.* 2017;429(17):2619-39.
- Wynant N, Santos D, Vanden Broeck J. The evolution of animal argonautes: evidence for the absence of antiviral AGO Argonautes in vertebrates. *Sci Rep.* 2017;7(1):9230-38.
- Grünweller A, Hartmann RK. Chemical modification of nucleic acids as a key technology for the development of RNA-based therapeutics. *Pharmazie.* 2016;71(1):8-16.
- Kutter C, Svoboda P. miRNA, siRNA, piRNA: Knowns of the unknown. *RNA Biol.* 2008;5(4):181-88.
- Boden D, Pusch O, Silbermann R, Lee F, Tucker L, Ramratnam B. Enhanced gene silencing of HIV-1 specific siRNA using microRNA designed hairpins. *Nucleic Acids Res.* 2004;32(3):1154-58.
- Silva JM, Li MZ, Chang K, Ge W, Golding MC, Rickles RJ, Siolas D, Hu G, Paddison PJ, Schlabach MR, Sheth N, Bradshaw J, Burchard J, Kulkarni A, Cavet G, Sachidanandam R, McCombie WR, Cleary MA, Elledge SJ, Hannon GJ. Second-generation shRNA libraries covering the mouse and human genomes. *Nat Genet.* 2005;37(11):1281-88.
- Podgórska M, Pietraszek-Gremplewicz K, Olszańska J, Nowak D. The Role of apelin and apelin receptor expression in migration and invasiveness of colon cancer cells. *Anticancer Res.* 2021;41(1):151-61.
- Ran J, Li Y, Liu L, Zhu Y, Ni Y, Huang H, Liu Z, Miao Z, Zhang L. Apelin enhances biological functions in lung cancer A549 cells by downregulating exosomal miR-15a-5p. *Carcinogenesis.* 2021;42(2):243-53.
- Berta J, Török S, Tárnoki-Zách J, Drozdovszky O, Tóvári J, Paku S, Kovács I, Czírók A, Masri B, Megyesfalvi Z, Oskolás H, Malm J, Ingvar C, Markó-Varga G, Döme B, László V. Apelin promotes blood and lymph vessel formation and the growth of melanoma lung metastasis. *Sci Rep.* 2021;11(1):5798-05.
- Frisch A, Kälin S, Monk R, Radke J, Heppner FL, Kälin RE. Apelin controls angiogenesis-dependent glioblastoma growth. *Int J Mol Sci.* 2020;21(11):4179-96.
- Tsien RY. The green fluorescent protein. *Annu. Rev of Biochem.* 1998;67:509-44.
- Lippincott-Schwartz J, Patterson GH. Development and use of fluorescent protein markers in living cells. *Science.* 2003;300:87-91.
- Shagin DA, Barsova EV, Yanushevich YG, Fradkov AF, Lukyanov KA, Labas YA, Semenova TN, Ugalde JA, Meyers A, Nunez JM, Widder EA, Lukyanov SA, Matz MV. GFP-like proteins as ubiquitous metazoan superfamily: evolution of functional features and structural complexity. *Mol Biol Evol.* 2004;21:841-50.
- Chow JC, Young DW, Golenbock DT, Christ WC, Gusovsky F. Toll-like receptor-4 mediated lipopolysaccharide-induced signal transduction, *J Biol Chem.* 1999;274:10689-92.

- Stein M, Keshav S, Harris N, Gordon S. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity a marker of alternative immunologic macrophage activation, *J Exp Med*. 1992;176:287-92.
- Corraliza IM, Soler G, Eichmann K, Modolell M. Arginase induction by suppressors of nitric oxide synthesis (IL-4, IL-10 and PGE2) in murine bone-marrow- derived macrophages, *Biochem Biophys Res Commun*. 1995;206:667-73.
- Munder M, Eichmann K, Modolell M. Alternative metabolic states in murine macrophages reflected by the nitric oxide synthase/arginase balance: competitive regulation by CD4<sup>+</sup> T cells correlates with Th1/Th2 phenotype, *J Immunol*. 1998;160:5348-54.
- Odegaard JI, Chawla A. Alternative macrophage activation and metabolism, *Annu Rev Pathol*. 2011;6:275-97.
- Biswas SK, Sica A, Lewis CE. Plasticity of macrophage function during tumor progression: regulation by distinct molecular mechanisms, *J Immunol*. 2008;180:2011-17.
- Biswas SK, Mantovani A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm, *Nat Immunol*. 2010;11:889-96.
- Mills CD, Ley K. M1 and M2 macrophages: the chicken and the egg of immunity. *J Innate Immun*. 2014;6:716-26.
- Mills CD. Anatomy of a discovery: M1 and M2 macrophages. *Front Immunol*. 2015;6:212-25.
- Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol*. 2002;23:549-55.
- Qian BZ, Pollard JW. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell*. 2010;141:39-51.
- Biswas SK, Gangi L, Paul S, Schioppa T, Saccani A, Sironi M, Bottazzi B, Doni A, Vincenzo B, Pasqualini F, Vago L, Nebuloni M, Mantovani A, Sica A. A distinct and unique transcriptional program expressed by tumor-associated macrophages (defective NF-kappaB and enhanced IRF-3/STAT1 activation). *Blood*. 2006;107(5):2112-22.
- Salmaninejad A, Valilou SF, Soltani A, Ahmadi S, Abarghan YJ, Rosengren RJ, Sahebkar A. Tumor-associated macrophages: role in cancer development and therapeutic implications. *Cell Oncol*. 2019;42(5):591-08.
- Yang L, Zhang Y. Tumor-associated macrophages: from basic research to clinical application. *J Hematol. Oncol*. 2017;10:10-58.
- Belgiovine C, D'Incalci M, Allavena P, Frapolli R. Tumor-associated macrophages and anti-tumor therapies: complex links. *Cell Mol Life Sci*. 2016;73:2411-24.
- Kaplanov I, Carmi Y, Kornetsky R, Shemesh A, Shurin GV, Shurin MR. Blocking IL-1beta reverses the immunosuppression in mouse breast cancer and synergizes with anti-PD-1 for tumor abrogation. *Proc Natl Acad Sci*. 2019;116(4):1361-69
- Kratochvill F, Neale G, Haverkamp JM, de Velde LAV, Smith AM, Kawauchi D, McEvoy J, Roussel MF, Dyer MA, Qualls E. TNF counterbalances the emergence of M2 tumor macrophages. *Cell Rep*. 2015;12:1902-14.
- Xin Q, Cheng B, Pan Y, Liu H, Yang C, Chen J. Neuroprotective effects of apelin-13 on experimental ischemic stroke through suppression of inflammation. *Peptides*. 2015;63:55-62.
- Cui J, Ren Z, Zou W, Jiang Y. miR-497 accelerates oxidized low-density lipoprotein-induced lipid accumulation in macrophages by repressing the expression of apelin. *Cell Biol Int*. 2017;41:1012-19.
- Massague J. TGFb signaling in context. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012;13:616-30.
- Neuzillet C, Tijeras-Raballand A, Cohen R, Cros J, Faivre S, Raymond E, de Gramont A. Targeting the TGFb pathway for cancer therapy. *Pharmacol Ther*. 2015;147:22-31.

- Cao W, Peters JH, Nieman D, Sharma M, Watson T, Yu J. Macrophage subtype predicts lymph node metastasis in oesophageal adenocarcinoma and promotes cancer cell invasion in vitro. *Br J Cancer*. 2015;113:738-46.
- Cushing SD, Berliner JA, Valente AJ, Territo MC, Navab M, Parhami F, Gerrity R, Schwartz CJ, Fogelman AM. Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci*. 1990;87:5134-38.
- Barna BP, Pettay J, Barnett GH, Zhou P, Iwasaki K, Estes ML. Regulation of monocyte chemoattractant protein-1 expression in adult human non-neoplastic astrocytes is sensitive to tumor necrosis factor (TNF) or antibody to the 55-kDa TNF receptor. *J Neuroimmunol*. 1994;50:101-107.
- Yoshimura T, Yuhki N, Moore SK, Appella E, Lerman MI, Leonard EJ. Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). Full-length cDNA cloning, expression in mitogen-stimulated blood mononuclear leukocytes, and sequence similarity to mouse competence gene JE. *FEBS Lett*. 1998;244:487-93.
- Sorensen TL, Ransohoff RM, Strieter RM, Sellebjerg F. Chemokine CCL2 and chemokine receptor CCR2 in early active multiple sclerosis. *Eur J Neurol*. 2004;11:445-49.
- Hayashida K, Nanki T, Girschick H, Yavuz S, Ochi T, Lipsky PE. Synovial stromal cells from rheumatoid arthritis patients attract monocytes by producing MCP-1 and IL-8. *Arthritis Res*. 2001;3:118-26.
- Kusano KF, Nakamura K, Kusano H, Nishii N, Banba M, Ikeda T, Hashimoto K, Yamamoto M, Fujio H, Miura A, Ohta K, Morita H, Saito H, Emori T, Nakamura Y, Kusano I, Ohe T. Significance of the level of monocyte chemoattractant protein-1 in human atherosclerosis. *Circ J*. 2004;68:671-76.
- Sartipy P, Loskutoff DJ. Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci*. 2003;100:7265-70.
- Lu B, Rutledge BJ, Gu L, Fiorillo J, Lukacs NW, Kunkel SL, North R, Gerard C, Rollins BJ. Abnormalities in monocyte recruitment and cytokine expression in monocyte chemoattractant protein 1-deficient mice. *J Exp Med*. 1998;187:601-18.
- Barbera-Guillem E, Nyhus JK, Wolford CC, Friece CR, Sampsel JW. Vascular endothelial growth factor secretion by tumor-infiltrating macrophages essentially supports tumor angiogenesis, and IgG immune complexes potentiate the process. *Cancer Res*. 2002;62(23):7042-49.
- Qian BZ, Li J, Zhang H, Kitamura T, Zhang J, Campion LR, Kaiser EA, Snyder LA, Pollard JW. CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. *Nature*. 2011;475(7355):222-25.
- Allavena P, Chieppa M, Monti P, Piemonti L. From pattern recognition receptor to regulator of homeostasis: the double-faced macrophage mannose receptor. *Crit Rev Immunol* 2004;24:179-92.
- Cabiati M, Gaggini M, De Simone P. Evaluation of Apelin/APJ system expression in hepatocellular carcinoma as a function of clinical severity. *Clin Exp Med*. 2021;21:269-75.
- Shi Y, Luo P, Wang W, Horst K, Bläsius F, Relja B, Xu D, Hildebrand F, Greven J. M1 but not M0 extracellular vesicles induce polarization of RAW264.7 macrophages via the TLR4-NFκB pathway in vitro. *Inflammation*. 2020;43(5):1611-19.
- Wang W, Liu Y, Guo J, He H, Mi X, Chen C, Xie J, Wang S, Wu P, Cao F, Bai L, Si Q, Xiang R, Luo Y. miR-100 maintains phenotype of tumor-associated macrophages by targeting mTOR to promote tumor metastasis via Stat5a/IL-1ra pathway in mouse breast cancer. *Oncogenesis*. 2018;7(12):97-113.
- Linde N, Casanova-Acebes M, Sosa MS, Mortha A, Rahman A, Farias E, Harper K, Tardio E, Reyes Torres I, Jones J, Condeelis J, Merad M, Aguirre-Ghiso JA. Macrophages orchestrate breast cancer early dissemination and metastasis. *Nat Commun*. 2018;9(1):21-36.
- van Deventer HW, Palmieri DA, Wu QP, McCook EC, Serody JS. Circulating fibrocytes prepare the lung for cancer metastasis by recruiting Ly-6C<sup>+</sup> monocytes via CCL2. *J Immunol*. 2013;190(9):4861-67.
- Chen J, Yao Y, Gong C, Yu F, Su S, Chen J, Liu B, Deng H, Wang F, Lin L, Yao H, Su F, Anderson KS, Liu Q, Ewen ME, Yao X, Song E. CCL18 from tumor-associated macrophages promotes breast cancer metastasis via PITPNM3. *Cancer Cell*. 2011;19(4):541-55.

- Psaila B, Lyden D. The metastatic niche: adapting the foreign soil. *Nat Rev Cancer*. 2009;9:285–293.
- Peinado H, Alečković M, Lavotshkin S, Matei I, Costa-Silva B, Moreno-Bueno G, Hergueta-Redondo M, Williams C, García-Santos G, Ghajar C, Nitadori-Hoshino A, Hoffman C, Badal K, Garcia BA, Callahan MK, Yuan J, Martins VR, Skog J, Kaplan RN, Brady MS, Wolchok JD, Chapman PB, Kang Y, Bromberg J, Lyden D. Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat Med*. 2012;18(6):883-91.
- Bao X, Shi R, Zhao T, Wang Y, Anastasov N, Rosemann M, Fang W. Integrated analysis of single-cell RNA-seq and bulk RNA-seq unravels tumour heterogeneity plus M2-like tumour-associated macrophage infiltration and aggressiveness in TNBC. *Cancer Immunol Immunother*. 2021;70(1):189-202.
- Wu J, Gao W, Tang Q, Yu Y, You W, Wu Z, Fan Y, Zhang L, Wu C, Han G, Zuo X, Zhang Y, Chen Z, Ding W, Li X, Lin F, Shen H, Tang J, Zhang Y, Wang X. M2 macrophage-derived exosomes facilitate HCC metastasis by transferring  $\alpha\text{M}\beta\text{2}$  integrin to tumor cells. *Hepatology*. 2021;73(4):1365-80.
- Hu X, Leak RK, Shi Y, Suenaga J, Gao Y, Zheng P, Chen J. Microglial and macrophage polarization—new prospects for brain repair. *Nat Rev Neurol*. 2015;11(1):56-64.
- Kiguchi N, Kobayashi Y, Saika F, Sakaguchi H, Maeda T, Kishioka S. Peripheral interleukin-4 ameliorates inflammatory macrophage-dependent neuropathic pain. *Pain*. 2015;156(4):684-93.

## 8. ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

<b>Adı</b>	Fatma	<b>Soyadı</b>	Seçer Çelik
<b>Doğum Yeri</b>		<b>Doğum Tarihi</b>	
<b>E-mail</b>		<b>Uyruğu</b>	

### Eğitim Düzeyi

	<b>Mezun Olduğu Kurumun Adı</b>	<b>Mezuniyet Yılı</b>
<b>Lisans</b>	Fatih Üniversitesi	2011
<b>Yüksek Lisans</b>	Selçuk Üniversitesi	2015
<b>Doktora</b>	Necmettin Erbakan Üniversitesi	2022

### İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

<b>Görevi</b>	<b>Kurum</b>	<b>Süre (Yıl - Yıl)</b>
1. Biyolog	Kartal Dr. Lütfi Kırdar E.A.H.	2014-2014

<b>Yabancı Dil</b>	İngilizce
--------------------	-----------

## Yayınları

- C. Eroğlu Güneş, **F. Seçer Çelik**, M. Seçme, E. Kurar. (2021). Oleandrin activates apoptosis and inhibits metastasis of A375 human melanoma cells. *Natural Products and Biotechnology*, 1(1), 9–19.
- F. Seçer Çelik**, E. Çelen, H. K. Yıldız, S. Altweish, H. Dönmez, Y. Gürbüz, A. Demirci, E. Büyük, E. Ü. Arslan, M. Ilhan, A. S. Şahin, H. Vural. Investigation of leptin receptor and eNOS gene polymorphisms in preeclamptic umbilical cords, *World Journal of Gynecology & Women's Health*, 2018, 2641-6247,1,3,1-5.
- F. Seçer Çelik**, T. Çora, A. Kalayci Yiğın. Investigation of genotoxic and cytotoxic effects of acrylamide in HEK293 cell line. *Journal of cancer prevention and current research*, 2018, 2373-633X,9,5, 260-264. (Yüksek lisans tezinden üretilmiştir)

## Tebliğleri

- ZN. Koçaker, **F. Seçer Çelik**, C. Eroğlu Güneş, R. Ozen Koca, H. Solak, Z. Şahin, F. Uguz, M. Ak, S. Kutlu, E. Kurar. Maternal depression affects hypothalamic expression of miRNA processing pathway in the first- generation rat pups. 4<sup>th</sup> East Mediterranean Congress of Laboratory Animal Science, 9-11 December 2021.
- M. Secme, C. Eroğlu Gunes, **F. Seçer Çelik**, E. Kurar, Y. Dodurga. Thymol may inhibit cell proliferation via decreasing piRNA-651 and piRNA-823 expressions in ishikawa endometrial cancer cells. 4<sup>th</sup> International Health Sciences and Life Congress, 8-10 April 2021.
- C. Eroğlu Gunes, **F. Seçer Çelik**, E. Kurar. Anticancer effect of the cardiac glycoside oleandrin in various human cancers. International Congress on Biological and Health Sciences, 26-28 February 2021.
- F. Seçer Çelik**, C. Eroğlu Gunes, M. Secme, E. Kurar. Determination of the effect of oleandrin on melanoma cells through metastasis and invasion, 1<sup>st</sup> International Health Science and Biomedical Congress, 23-24 January 2021.
- C. Eroğlu Gunes, **F. Seçer Çelik**, M. Secme, E. Kurar. Oleandrin Shows anticancerogenic effect via apoptosis pathway in human melanoma cells. 8<sup>th</sup> Multidisciplinary Cancer Research Congress, 16-17 January 2021.
- F. Seçer Çelik**, R. Ozen Koca, H. Solak, ZI. Solak Gormus, S. Kutlu, E. Kurar. Selection of housekeeping genes for rat hippocampus expression studies: Alzheimer's Disease model. 4<sup>th</sup> International Congress of Turkish Neuroendocrinology Society, 26-28 November 2020.
- F. Seçer Çelik**, A. Kalayci Yiğın, H. Dönmez, T. Çora. Effects of acrylamide on oxidative stress modulators in HEK293 cell line. Poster, 7<sup>th</sup> International Molecular Biology and Biotechnology Congress, 25-27 April 2018.
- E. Büyük, A. Demirci, **F. Seçer Çelik**, E. Çelen, H. Dönmez, H. K. Yıldız, M. Ilhan, Y. Gürbüz, S. Altweish, E. Ü. Arslan, A. S. Şahin, H. Vural. Investigation of Gene Polymorphisms Associated with Vasodilator Effect of Leptin in in-vitro Pre-eclampsia Model, Oral Presentation, 7<sup>th</sup> International Molecular Biology and Biotechnology Congress, 25 April 2018, 27 April 2018.
- H. Dönmez, N. Koçak, M. Hitit, A. Kalayci Yiğın, **F. Seçer Çelik**, E. Kurar. Selection of Reliable Reference Genes for qPCR Analysis on MCF7 Cells with Melatonin treated. Poster, 7<sup>th</sup> International Molecular Biology and Biotechnology Congress, 25 April 2018, 27 April 2018.

**F. Seer elik**, T. ora. Determination of the source of micronuclei in the HEK293 cell line applied with acrylamide by FISH Technique. Oral Presentation, 18. National Biotechnology Congress, 18-19 December 2015.

**F. Seer elik**, T. ora. Cytotoxic Effect of Acrylamide on HEK-293 Cell Line. Poster, 11. National Medical Genetics Congress, 24-27 September 2014.

### **Sertifikalari**

Deney Hayvanlarinda Steryotaksik Uygulamalar, 2020

Deney Hayvanlari Sertifikasi 'Rat-Mouse-Cobay-Rabbit-Hemster', 2018

Hücre Kültürü Sertifikasi, 2012

### **Ödülleri**

En Genç Araştırmacı Ödülü. 4<sup>th</sup> International Health Sciences and Life Congress, 8-10 April 2021.



## 9. EKLER

### Ek 1 Etik Kurul Onayı

T.C.  
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ MERAM TIP FAKÜLTESİ  
İLAÇ VE TIBBİ CİHAZ DIŞI ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

**Toplantı Sayısı: 107**

**Toplantı Tarihi: 08 Mayıs 2020**

**Karar Sayısı: 2020/2473:** Fakültemiz Temel Tıp Bilimleri Bölümü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Ercan KURAR' ın "**Baş-Boyun Skuamöz Hücre Karsinoması ve Makrofaj Hücrelerinin Apelin/APJ Ekseninde Moleküler Bağlantılarının Araştırılması**" başlıklı doktora tez çalışması ile ilgili 04.05.2020 tarihli dilekçesi ve ekleri görüşüldü, Fatma SEÇER ÇELİK' in doktora tez çalışmasının Fakültemiz Temel Tıp Bilimleri Bölümü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Ercan KURAR' ın sorumluluğunda bütçe desteğinin sağlandığına dair belgenin İlaç ve Tıbbi Cihaz Dışı Araştırmalar Etik Kuruluna sunulduktan sonra çalışmanın başlamasının uygun olduğuna oybirliği ile karar verilmiştir.

Not: Çalışma ile ilgili gerekli izin ve yasal sorumluluk araştırmacılara aittir.

Sorumlu Araştırmacı: Prof. Dr. Ercan KURAR

Yardımcı Araştırmacı: Fatma SEÇER ÇELİK