

**THP-1 KÖKENLİ MAKROFAJ VE A549 AKCİĞER
KANSERİ KO-KÜLTÜR MODELİNDE EPİTELYAL-
MEZENKİMAL DEĞİŞİM YOLAĞINA
İMMÜNTERAPÖTİK YAKLAŞIMLAR
Doktora Tezi**

**Selin ENGÜR ÖZTÜRK
Eskişehir 2020**

**THP-1 KÖKENLİ MAKROFAJ VE A549 AKCİĞER KANSERİ KO-KÜLTÜR
MODELİNDE EPİTELYAL-MEZENKİMAL DEĞİŞİM YOLAĞINA
İMMÜNTERAPÖTİK YAKLAŞIMLAR**

Selin ENGÜR ÖZTÜRK

DOKTORA TEZİ

Farmakoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Miriş DİKMEN

Eskişehir

Anadolu Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Ağustos 2020

Bu tez çalışması Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu 319S088 ve Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonunca kabul edilen 1704S095 no.lu projeler kapsamında desteklenmiştir.

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Selin ENGÜR ÖZTÜRK'ün “THP-1 Kökenli Makrofaj ve A549 Akciğer Kanseri Ko-Kültür Modelinde Epitelyal-Mezenkimal Değişim Yolağına İmmünterapötik Yaklaşımlar” başlıklı tezi 13/08/2020 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek “Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca, Farmakoloji Anabilim dalında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

<u>Unvanı Adı Soyadı</u>		<u>İmza</u>
Üye (Tez Danışmanı) :	Prof. Dr. Miriş DİKMEN	
Üye :	Prof. Dr. Yusuf ÖZTÜRK	
Üye :	Prof. Dr. İlknur DAĞ	
Üye :	Doç. Dr. Emel ERGENE	
Üye :	Doç. Dr. Zerrin CANTÜRK	

.....

Enstitü Müdürü

ÖZET

THP-1 KÖKENLİ MAKROFAJ VE A549 AKCİĞER KANSERİ KO-KÜLTÜR MODELİNDE EPİTELYAL-MEZENKİMAL DEĞİŞİM YOLAĞINA İMMÜNTERAPÖTİK YAKLAŞIMLAR

Selin ENGÜR ÖZTÜRK

Farmakoloji Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ağustos 2020

Danışman: Prof. Dr. Miriş DİKMEN

Akciğer kanseri, kanser nedenli ölümlerin başında gelir ve ölüm sebebi büyük oranda metastazdır. Akciğer kanserinin oluşumu ve metastazı, kanser hücrelerinin mikroçevresiyle olan etkileşimine ve özellikle de tümör ilişkili makrofajlara bağlıdır. Bu nedenle epitelyal mezenkimal değişim (EMT), kanser metastaz sürecinde önemli bir rol oynar.

Çalışmamızda akciğer kanserinde makrofajların EMT ilişkili rolünü aydınlatabilmek amacıyla, THP-1 insan monosit hücrelerinden farklı fenotipe polarize olmuş M1, M2a ve M2c makrofajlar ile A549 hücreleri *in vitro* ko-kültür modelleri oluşturularak, NF-kB inhibitörlerinden bortezomib ve ixazomibin, bu ko-kültür modellerinde anti-proliferatif, anti-apoptotik ve EMT mekanizmaları üzerine etkilerini araştırdık. Ayrıca A549 hücrelerinde, bortezomib ve ixazomibin anti-proliferatif etkilerini 2D ve 3D kültürü ortamında karşılaştırdık.

Sonuç olarak A549 hücrelerinde, M1 makrofaj ko-kültüründe, anti-proliferatif ve anti-apoptotik etkilerin yüksek bulunmasına ek olarak M1 makrofajın, bortezomib ve ixazomibin anti-proliferatif ve anti-apoptotik etkilerini arttırdığı belirlenmiştir. Ayrıca özellikle M2c makrofajların A549 hücrelerinde vimentin, fibronektin, NF-kB, CCL-17 ve VEGF seviyelerini arttırıp, E-kaderin seviyelerini azaltarak EMT yolağını indüklediği, ixazomibin ise bu etkiyi inhibe ettiği sonuçlarımızla gösterilmiştir. Son olarak, A549 hücrelerinde 3D ortamdaki IC₅₀ değeri 2D kültür ortamına göre bortezomib için yaklaşık 15, ixazomib için ise yaklaşık 9 kat yüksek olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Sözcükler: A549, Makrofaj, EMT, NF-kB, Bortezomib, İxazomib.

ABSTRACT

IMMUNOTHERAPEUTIC APPROACHES TO EPITHELIAL TO MESENCHYMAL TRANSITION PATHWAY IN THP-1 DERIVED MACROPHAGE AND A549 LUNG CANCER CO-CULTURE MODEL

Selin ENGÜR ÖZTÜRK

Department of Pharmacology

Anadolu University, Graduate School of Health Sciences, July 2020

Supervisor: Prof. Dr. Miriş DİKMEN

Lung cancer is the leading cause of cancer-related deaths and the cause of death is largely metastasis. Initiation and metastasis of lung cancer, the interaction with the microenvironment of cancer cells and is primarily dependent on tumor associated macrophages. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) plays an important role in the cancer metastasis.

In our study, in order to clarify the EMT related role of macrophages in lung cancer, *in vitro* co-culture models were designed in A549 cells with M1, M2a and M2c macrophages polarized to phenotype different from THP-1 human monocyte cells. In our study, we aimed to determine the effects of bortezomib and ixazomib ‘inhibitors of NF-kB’ and M1, M2a and M2c polarized macrophages on anti-proliferative, anti-apoptotic and EMT mechanisms in A549 lung cancer co-culture. We also determined the antiproliferative effects of bortezomib and ixazomib on A549 cells in both 2D and 3D cultures.

As a result, it was determined that anti-proliferative and anti-apoptotic effects were high in A549 cells in co-culture with M1 macrophage. In addition, it has been determined that M1 macrophage causes increased anti-proliferative and anti-apoptotic effects of bortezomib and ixazomib. Our results have been demonstrated by increasing the levels of vimentin, fibronectin, NF-kB, CCL-17 and VEGF in A549 cells, reducing the levels of E-cadherin, and inhibiting this effect by ixazomib. Finally, the IC₅₀ value in 3D culture in A549 cells was determined approximately 15 times higher for bortezomib and about 9 times higher for ixazomib than 2D culture medium.

Keywords: A549, Macrophages, EMT, NF-kB, Bortezomib, Ixazomib.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimimle başlayan ve doktora süreci ile devam ettiğim 10 yıl boyunca, tezimi ve tüm akademik hayatımı yönlendiren, deneyimlerini benden hiç esirgmeden her zaman hem yanımda hem arkamda olan, umudumu hiç kaybetmeden devam etmem için motivasyonumu sağlayan, beni kendi kızlarından ayırmayan ve üzerimde çok emeği olan, hayat boyu fikirlerine her zaman önem vereceğim değerli danışman hocam sayın Prof. Dr. Miriş DİKMEN'e,

Laboratuvar çalışmalarında, tezimin yönlendirilmesinde destek olan ve bunların dışında her zaman motivasyon kaynağı olarak yanımda olan, hayat tecrübelerine önem verdiğim, her zaman dinlediğim sevgili hocam Doç. Dr. Zerrin CANTÜRK'e,

Lisansüstü eğitimim boyunca bana her konuda destek olan başta sayın hocam Prof. Dr. Yusuf ÖZTÜRK olmak üzere Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim dalının tüm saygıdeğer üyelerine,

Destegini her zaman hissettiğim, laboratuvarında geçen uzun sürelerde hep yan yana olduğum, birlikte hem gülüp hem her şeyin üstesinden geldiğimiz günlerin sonunda, doktora tezimizi aynı anda bitirirken de yanımda olan, farmakolojinin bana kazandırdığı ve daha çok zamanımızın olduğunu bildiğim canım arkadaşım Araş. Gör. Elif KAYA TİLKİ'ye, iyi ki tanımışım dediğim ve doktora süresi boyunca pozitif enerji kaynağım olan arkadaşım Araş. Gör. Mustafa Güçlü ÖZARDA'ya,

Eğitim hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini hiç esirgemeyen, özellikle doktora sürecime pes etmeden devam etmem için cesaret veren, her koşulda anlayışlarını, bana olan güvenlerini her zaman bildiğim canım aileme, babam Turhan ENGÜR, annem Yasemin ENGÜR ve kardeşim Simay ENGÜR'e

Doktora süresince bilgisayar başında geçen uzun saatlere rağmen anlayışını esirgemeyen, yaptığım işle hep gurur duyan ve destekleyen sevgili eşim Yiğit ÖZTÜRK'e

Sonsuz teşekkür ederim.

Selin ENGÜR ÖZTÜRK

Ağustos, 2020

2..1/082020

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

Selin ENGÜR ÖZTÜRK

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
BAŞLIK SAYFASI.....	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
TABLolar DİZİNİ.....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xix
1. GİRİŞ ve AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Kanser.....	3
2.1.1. Kanser ve bağışıklık sistemi.....	4
2.1.2. Akciğer kanseri.....	5
2.1.2.1. Akciğer kanseri ve mikroçevre.....	6
2.2. Tümör ilişkili Makrofajlar.....	8
2.3. Epitelyal-Mezenkimal Değişim.....	11
2.3.1. EMT ve nükleer faktör kappa B.....	13
2.4. Proteazom İnhibitörleri ‘Bortezomib ve İxazomib’.....	15
2.5. 3 Boyutlu (3D) Hücre Kültür Modeli.....	18
3. GEREÇLER.....	19
3.1. Deneylerde Kullanılan Hücreler.....	19
3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Cihazlar.....	20
3.3. Kullanılan malzemelerin steril edilmesi.....	22
3.4. Kullanılan Kimyasal Maddelerin ve İlaçların Hazırlanması.....	22
3.4.1. Forbol 12-miristat 13-asetat (PMA)	22
3.4.2. Lipopolisakkarit (LPS).....	22
3.4.3. Rekombinant insan IFN- γ	22
3.4.4. Rekombinant insan IL-4 ve IL-13.....	23
3.4.5 Hidrokortizon.....	23

3.4.6. Bortezomib ve İxazomib (MLN2238).....	23
4. YÖNTEMLER.....	24
4.1. THP-1, A549 ve CCD-19Lu Hücrelerinin Kültür Ortamında	
Çoğaltılması ve Deneylere Hazırlık.....	25
4.1.1. Hücre sayımları.....	25
4.2. 2D Hücre Kültürü Çalışmaları.....	25
4.2.1. WST-1 yöntemi ile THP-1 hücrelerinde sitotoksitenin	
belirlenmesi	25
4.2.2. THP-1 hücrelerinin makrofaja dönüştürülmesi optimizasyon	
çalışmaları.....	26
4.2.2.1. <i>THP-1 insan monosit hücrelerinin THP-1 kökenli</i>	
<i>makrofaja (M0) farklılaştırılması çalışmalarının akış</i>	
<i>sitometri yöntemi ile belirlenmesi.....</i>	27
4.2.2.2. <i>THP-1 kökenli makrofaj hücrelerinin M1, M2a ve M2c</i>	
<i>polarize alt türlerine farklılaştırılması çalışmalarının</i>	
<i>akış sitometri yöntemi ile belirlenmesi.....</i>	28
4.2.2.3. <i>THP-1 kökenli makrofaj hücrelerinin M1, M2a ve M2c</i>	
<i>polarize alt türlerine farklılaştırılması çalışmalarının</i>	
<i>RT-PCR yöntemi ile belirlenmesi.....</i>	29
4.2.3. WST-1 yöntemi ile M0 makrofaj, A549 ve CCD-19Lu	
hücrelerinde bortezomib ve ixazomibin sitotoksik etkilerinin	
belirlenmesi.....	30
4.2.4. Gerçek zamanlı hücre analiz sistemi (RTCA DP) ile A549 ve	
CCD-19Lu hücrelerinde bortezomib ve ixazomibin anti-	
proliferatif etkilerinin belirlenmesi.....	31
4.2.5. Ko-Kültür çalışmaları.....	32
4.2.5.1. <i>Gerçek zamanlı hücre analiz sisteminde (RTCA DP) M1,</i>	
<i>M2a ve M2c polarize makrofaj ve A549 ko-kültür</i>	
<i>ortamlarında hücre proliferasyonunun belirlenmesi.....</i>	34
4.2.5.2. <i>Akış sitometride annexin V-PI yöntemi ile apoptotik</i>	
<i>etkinin belirlenmesi.....</i>	35
4.2.5.3. <i>Akış sitometride kaspaz-3 aktivasyonu ile apoptotik</i>	
<i>etkinin belirlenmesi.....</i>	36

4.2.5.4. Akış sitometride JC-1 boyama yöntemi ile hücrelerin mitokondrial membran bütünlüğünün belirlenmesi.....	36
4.2.5.5. Akış sitometride interlökin 1 beta (IL-1 β) seviyelerinin belirlenmesi.....	37
4.2.5.6. EMT yolağına ilişkin genlerin mRNA ekspresyon seviyelerinin RT-PCR yöntemi ile belirlenmesi.....	37
4.2.5.7. Akış sitometride TNF-alfa ve IL-10 sitokin seviyelerinin EMT yolağına ilişkin etkilerinin belirlenmesi.....	39
4.2.5.8. Vimentin ve e-kaderin seviyelerinin belirlenmesi.....	39
4.3. 3D Hücre Kültürü Çalışmaları.....	40
4.3.1. 3 Boyutlu (3D) hücre kültür modeli.....	40
4.3.2. A549 hücrelerinde 2D ve 3D kültür yöntemlerinde bortezomib ve ixazomibin sitotoksik etkilerinin belirlenmesi.....	41
4.4. İstatistiksel Değerlendirmeler.....	41
5. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	42
5.1. 2D Hücre Kültürü Çalışmalarının Değerlendirilmesi.....	42
5.1.1. WST-1 yöntemi THP-1 hücrelerinde PMA'nın sitotoksik etkilerinin değerlendirilmesi	42
5.1.2. THP-1 hücrelerinin makrofaja dönüştürülmesi optimizasyon çalışmalarının değerlendirilmesi.....	43
5.1.2.1. THP-1 ve THP-1 kökenli makrofaj dönüşümünde CD-14 ve CD-68 antikor seviyelerinin akış sitometri yöntemi ile değerlendirilmesi.....	43
5.1.2.2. THP-1 kökenli makrofaj hücrelerinin M1, M2a ve M2c polarize alt tiplerine farklılaştırma çalışmalarının değerlendirilmesi.....	46
5.1.2.3. THP-1 kökenli makrofaj hücrelerinin M1, M2a ve M2c polarize alt türlerine farklılaştırılması çalışmalarının RT-PCR yöntemi ile değerlendirilmesi.....	52
5.1.3. WST-1 yöntemi ile M0 makrofaj, A549 ve CCD-19Lu hücrelerinde bortezomib ve ixazomibin sitotoksik etkilerinin belirlenmesi.....	56

5.1.4. Gerçek zamanlı hücre analiz sistemi (RTCA DP) kullanılarak hücre proliferasyonlarının değerlendirilmesi.....	61
5.1.5. Ko-kültür çalışmalarının değerlendirilmesi.....	66
5.1.5.1. Gerçek zamanlı hücre analiz sisteminde M1, M2a ve M2c polarize makrofaj ve A549 ko-kültür ortamlarında hücre proliferasyonunun değerlendirilmesi.....	66
5.1.5.2. Akış sitometride annexin V-PI yöntemi ile apoptotik etkinin değerlendirilmesi	71
5.1.5.3. Akış sitometride kaspaz-3 aktivasyonu ile apoptotik etkinin değerlendirilmesi.....	75
5.1.5.4. Akış sitometride JC-1 boyama yöntemi ile hücrelerin mitokondrial membran bütünlüğünün değerlendirilmesi	79
5.1.5.5. Akış sitometride interlökin 1-beta seviyelerinin değerlendirilmesi.....	82
5.1.5.6. Akış sitometride TNF-alfa ve IL-10 sitokin seviyelerinin EMT yolağına ilişkin etkilerinin değerlendirilmesi.....	85
5.1.5.7. EMT yolağına ilişkin genlerin mRNA ekspresyon seviyelerinin RT-PCR yöntemi ile değerlendirilmesi.....	86
5.1.5.8. Vimentin ve E-kaderin seviyelerinin ve EMT yolağına ilişkin etkilerin değerlendirilmesi.....	93
5.2. 3D hücre kültürü çalışmalarının değerlendirilmesi.....	97
5.2.1. 3 Boyutlu hücre kültür modelinin oluşturulması.....	97
5.2.2. A549 hücrelerinin 2D ve 3D kültürlerinde bortezomib ve ixazomibin sitotoksik etkilerinin karşılaştırılması.....	99
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	104
KAYNAKÇA.....	109
ÖZGEÇMİŞ.....	126

TABLÖLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 4.1. Yapılan çalışmalar ve uygulanan yöntemlerin şematik olarak gösterilmesi.....	24
Tablo 4.2. Genlerin dizilimleri.....	30
Tablo 4.3. Deney grupları.....	33
Tablo 4.4. Genlerin dizilimleri.....	38
Tablo 5.1. Farklı konsantrasyonlarda PMA uygulaması ile farklılaştırılan THP-1 kökenli Makrofajlarda (M0) CD-68 ve CD-14 seviyeleri	45
Tablo 5.2. IFN- γ ve farklı LPS konsantrasyonları ile farklılaştırılan M1 polarize makrofajlarda akış sitometri yöntemi ile belirlenen CD-80 seviyeleri.....	47
Tablo 5.3. IL-4 ve IL-13 konsantrasyonları ile farklılaştırılan M2a polarize makrofajlarda akış sitometri yöntemi ile belirlenen CD-206 ve CD-23 seviyeleri.....	48
Tablo 5.4. Hidrokortizon konsantrasyonları ile farklılaştırılan M2c polarize makrofajlarda akış sitometri yöntemi ile belirlenen CD-206 ve CD-163 seviyeleri.....	49
Tablo 5.5. M1 ve M2 (M2a, M2c) polarize makrofaj ilişkili genlere ait mRNA ekspresyonlarının % normalize değerleri.....	54
Tablo 5.6. Bortezomib ve ixazomibin A549 ve CCD-19Lu hücrelerinde gerçek zamanlı hücre analiz sistemi ile belirlenen 48. saat IC ₅₀ değerleri.....	65
Tablo 5.7. A549 hücrelerinde tekli ve makrofaj ile ko-kültür gruplarında bortezomib (IC ₅₀ : 45 nM) ve ixazomibin (IC ₅₀ : 2 μ M) Annexin-PI apoptoz sonuçları.....	73
Tablo 5.8. A549 hücrelerinde tekli ve makrofaj ile ko-kültür gruplarında bortezomib (IC ₅₀ : 45 nM) ve ixazomibin (IC ₅₀ : 2 μ M) kaspaz-3 seviyeleri sonuçları.....	76
Tablo 5.9. A549 hücrelerinde tekli ve makrofaj ko-kültür gruplarında bortezomib (IC ₅₀ : 45 nM) ve ixazomib (IC ₅₀ : 2 μ M)'in JC-1 seviyeleri sonuçları.....	80

Tablo 5.10.	A549 hücrelerinde tekli ve makrofaj ko-kültür gruplarında bortezomib (IC ₅₀ : 45 nM) ve ixazomibin (IC ₅₀ : 2 µM) IL-1β seviyelerine etkisi.....	83
Tablo 5.11.	A549 hücrelerinde kontrol grubuna göre EMT yolağına ilişkin genlere ait % mRNA ekspresyonları normalize değerleri.....	88
Tablo 5.12.	A549 hücreleri ve M2a polarize makrofaj ko-kültüründe EMT yolağına ilişkin genlere ait mRNA ekspresyonlarının % normalize değerleri.....	90
Tablo 5.13.	A549 hücreleri ve M2c polarize makrofaj ko-kültüründe EMT yolağına ilişkin genlere ait mRNA ekspresyonlarının % normalize değerleri.....	90
Tablo 5.14.	A549 kontrol ve M2a, M2c ile ko-kültür gruplarında E-kaderin ve vimentin seviyeleri.....	94
Tablo 5.15.	2D ve 3D A549 hücre kültür ortamlarında bortezomib ve ixazomibin 48. saatteki IC ₅₀ değerleri.....	102

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Tümör mikroçevresi.....	7
Şekil 2.2. Makrofajın stimülasyonu ve farklılaşması sonucu sinyal moleküllerinin, sitokin ekspresyon profilinin ve kemokin profilinin şematik olarak gösterilmesi.....	10
Şekil 2.3. 26S Proteozom Kompleksi Tarafından Düzenlenen NF-kB'nin Fonksiyonları.....	14
Şekil 2.4. NF-kB, Farklılaşma ve EMT.....	15
Şekil 2.5. Bortezomibin kimyasal formülü.....	16
Şekil 2.6. İxazomibin oral kullanımdan sonra metabolizasyonu.....	17
Şekil 2.7. Hücre kültürlerinin 2D ve 3D şematik gösterimi.....	19
Şekil 4.1. M0 makrofajdan M1, M2a ve M2c makrofaj polarizasyonu ve ko-kültür yönteminin şematik olarak gösterilmesi.....	34
Şekil 4.2. E-plate insert plakasının şematik olarak gösterilmesi.....	35
Şekil 5.1. PMA konsantrasyonlarının THP-1 hücrelerinde WST-1 yöntemine göre hesaplanan 24. saatteki % hücre canlılık değerleri ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi.....	42
Şekil 5.2. THP-1 hücrelerinde (kontrol) akış sitometri yöntemi ile belirlenen CD-14 ve CD-68 seviyeleri.....	43
Şekil 5.3. Farklı konsantrasyonlarda PMA uygulaması ile farklılaştırılan THP-1 kökenli makrofajlarda (M0), CD-14 seviyelerinin akış sitometri yöntemi ile belirlenmesi.....	44
Şekil 5.4. Farklı konsantrasyonlarda PMA uygulaması ile farklılaştırılan THP-1 kökenli makrofajlarda (M0), CD-68 seviyelerinin akış sitometri yöntemi ile belirlenmesi.....	44
Şekil 5.5 IFN- γ ve farklı LPS konsantrasyonları ile 24 saat inkübasyon sonucu farklılaştırılan M1 polarize makrofajlarda CD-80 seviyelerinin akış sitometri yöntemi ile belirlenmesi.....	47

Şekil 5.6.	IL-4 ve IL-13 (25 ng/mL) konsantrasyonları ile 24 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri sonunda farklılaştırılan M2a polarize makrofajlarda CD-206 ve CD-23 seviyelerinin akış sitometri yöntemi ile belirlenmesi.....	48
Şekil 5.7.	Hidrokortizon konsantrasyonları (1 ve 10 µM) ile 24 ve 72 saatlik inkübasyon sonunda farklılaştırılan M2c polarize makrofajlarda CD-206 ve CD-163 seviyelerinin akış sitometri yöntemi ile belirlenmesi.....	49
Şekil 5.8.	THP-1, THP-1 kökenli makrofaj (M0), M1, M2a ve M2c polarize makrofaj hücrelerinin ışık mikroskop görüntüsü.....	51
Şekil 5.9.	M1 ve M2 (M2a, M2c) polarize makrofaj ilişkili genlere ait mRNA ekspresyonları.....	53
Şekil 5.10.	M0 makrofaj hücrelerinde bortezomib konsantrasyonlarının WST-1 yöntemine göre hesaplanan 24 ve 48aatteki % canlılık değerleri ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi.....	56
Şekil 5.11.	M0 makrofaj hücrelerinde ixazomib konsantrasyonlarının WST-1 yöntemine göre hesaplanan 24 ve 48. saatteki % canlılık değerleri ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi.....	57
Şekil 5.12.	A549 hücrelerinde bortezomib konsantrasyonlarının WST-1 yöntemine göre hesaplanan 24 ve 48. saatteki % canlılık değerleri ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi.....	58
Şekil 5.13.	A549 hücrelerinde ixazomib konsantrasyonlarının WST-1 yöntemine göre hesaplanan 24 ve 48. saatteki % canlılık değerleri ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi.....	58
Şekil 5.14.	CCD-19Lu sağlıklı akciğer hücrelerinde bortezomib konsantrasyonlarının WST-1 yöntemine göre hesaplanan 24 ve 48. saatteki % canlılık değerleri ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi	59
Şekil 5.15.	CCD-19Lu sağlıklı akciğer hücrelerinde ixazomib konsantrasyonlarının WST-1 yöntemine göre hesaplanan 24 ve 48. saatteki % canlılık değerleri ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi	59
Şekil 5.16.	Bortezomib konsantrasyonlarının 48 saatlik A549 hücre proliferasyon eğrileri.....	62

Şekil 5.17.	RTCA-DP sisteminde bortezomibin A549 hücrelerinde 48. saatteki hücre indeks değerlerine göre IC_{50} değerinin hesaplandığı konsantrasyon-hücre indeksi eğrisi.....	62
Şekil 5.18.	İxazomib konsantrasyonlarının 48 saatlik A549 hücre proliferasyon eğrileri.....	62
Şekil 5.19.	RTCA-DP sisteminde ixazomibin A549 hücrelerinde 48. saatteki hücre indeks değerlerine göre IC_{50} değerinin hesaplandığı konsantrasyon-hücre indeksi eğrisi.....	63
Şekil 5.20.	Bortezomib konsantrasyonlarının 48 saatlik CCD-19Lu hücre proliferasyon eğrileri.....	63
Şekil 5.21.	RTCA-DP sisteminde bortezomibin CCD-19Lu hücrelerinde 48. saatteki hücre indeks değerlerine göre IC_{50} değerinin hesaplandığı konsantrasyon- hücre indeksi eğrisi.....	63
Şekil 5.22.	İxazomib konsantrasyonlarının 48 saatlik CCD-19Lu hücre proliferasyon eğrileri.....	64
Şekil 5.23.	RTCA-DP sisteminde ixazomibin CCD-19Lu hücrelerinde 48. saatteki hücre indeks değerlerine göre IC_{50} değerinin hesaplandığı konsantrasyon- hücre indeksi eğrisi.....	64
Şekil 5.24.	A549 kontrol ve E-plate insert kullanılarak A549 ve M1, M2a ve M2c polarize makrofa hücreleri ile oluşturulan ko-kültür modellerinin gerçek zamanlı hücre analiz sisteminde belirlenen proliferasyon eğrileri.....	66
Şekil 5.25.	Gerçek zamanlı hücre analiz sistemi ile belirlenen 48. saat cell indeks değerlerine göre çizilen slope grafiği ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi.....	67
Şekil 5.26.	A549 ve M1 polarize makrofaj ko-kültür modelinde bortezomib (IC_{50} : 45 nM) ve ixazomib (IC_{50} : 2 μ M) konsantrasyonlarının gerçek zamanlı hücre analiz sistemi ile belirlenen proliferasyon eğrileri.....	67
Şekil 5.27.	Gerçek zamanlı hücre analiz sistemi ile belirlenen 48. saat hücre indeks değerlerine göre çizilen slope grafiği ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi.....	68

Şekil 5.28.	A549 ve M2a polarize makrofaj ko-kültür modelinde bortezomib (IC ₅₀ : 45 nM) ve ixazomib (IC ₅₀ : 2 µM) konsantrasyonlarının gerçek zamanlı hücre analiz sistemi ile belirlenen proliferasyon eğrileri.....	68
Şekil 5.29.	Gerçek zamanlı hücre analiz sistemi ile belirlenen 48. saat hücre indeks değerlerine göre çizilen slope grafiği ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi.....	69
Şekil 5.30.	A549 ve M2c polarize makrofaj ko-kültür modelinde bortezomib (IC ₅₀ : 45 nM) ve ixazomib (IC ₅₀ : 2 µM) konsantrasyonlarının gerçek zamanlı hücre analiz sistemi ile belirlenen proliferasyon eğrileri.....	69
Şekil 5.31.	Gerçek zamanlı hücre analiz sistemi ile belirlenen 48. saat hücre indeks değerlerine göre çizilen slope grafiği ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi.....	70
Şekil 5.32.	A549 hücrelerinde tekli ve makrofaj (M1, M2a ve M2c) ko-kültür gruplarında bortezomib (IC ₅₀ : 45 nM) ve ixazomibin (IC ₅₀ : 2 µM) apoptotik etkilerinin akış sitometride belirlenmesi.....	71
Şekil 5.33.	A549 hücrelerinde tekli ve makrofaj ko-kültür gruplarında bortezomib (IC ₅₀ : 45 nM) ve ixazomibin (IC ₅₀ : 2 µM), A549 kontrol grubuna göre toplam apoptotik hücre ölümü yüzdesi ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi.....	73
Şekil 5.34.	A549 hücrelerinde tekli ve makrofaj (M1, M2a ve M2c) ko-kültür gruplarında bortezomib (IC ₅₀ : 45 nM) ve ixazomibin (IC ₅₀ : 2 µM) kaspaz-3 seviyelerinin akış sitometride belirlenmesi.....	75
Şekil 5.35.	A549 hücrelerinde tekli ve makrofaj ko-kültür gruplarında bortezomib (IC ₅₀ : 45 nM) ve ixazomib (IC ₅₀ : 2 µM)'in A549 kontrol grubuna göre kaspaz-3 seviyelerindeki değişim yüzdesi ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi.....	77
Şekil 5.36.	A549 hücrelerinde tekli ve makrofaj (M1, M2a ve M2c) ko-kültür gruplarında bortezomib (IC ₅₀ : 45 nM) ve ixazomibin (IC ₅₀ : 2 µM) mitokondrial membran bütünlüğüne olan etkilerinin akış sitometride belirlenmesi.....	79

Şekil 5.37.	A549 hücrelerinde tekli ve makrofaj ko-kültür gruplarında bortezomib (IC ₅₀ : 45 nM) ve ixazomibin (IC ₅₀ : 2 µM), A549 kontrol grubuna göre mitokondrial depolarizasyon seviyeleri yüzdesi ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi.....	81
Şekil 5.38.	A549 hücrelerinde tekli ve makrofaj (M1, M2a ve M2c) ko-kültür gruplarında bortezomib (IC ₅₀ : 45 nM) ve ixazomibin (IC ₅₀ : 2 µM), IL-1β seviyelerine etkisinin akış sitometride belirlenmesi.....	82
Şekil 5.39.	A549 hücrelerinde tekli ve makrofaj ko-kültür gruplarında bortezomib (IC ₅₀ : 45 nM) ve ixazomibin (IC ₅₀ : 2 µM), A549 kontrol grubuna göre IL-1β pozitif hücre yüzdesi ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi.....	84
Şekil 5.40.	A549 hücreleri ile M1, M2a ve M2c polarize makrofaj ko-kültür gruplarında ölçülen TNF-alfa ve IL-10 sitokin seviyeleri.....	85
Şekil 5.41.	A549 ve M1, M2a ve M2c makrofaj ko-kültürlerinde EMT yolağına ilişkin genlere ait % mRNA ekspresyonları.....	87
Şekil 5.42.	A549 hücreleri ile M2a ve M2c makrofaj ko-kültür gruplarında bortezomib (IC ₅₀ : 45 nM) ve ixazomibin (IC ₅₀ : 2 µM) EMT yolağına ilişkin genlere ait % mRNA ekspresyonları değişimleri...	89
Şekil 5.43.	A549 kontrol ve M2a, M2c makrofaj ko-kültür gruplarında E-kaderin ve vimentin seviyelerinin akış sitometride belirlenmesi.....	94
Şekil 5.44.	A549 ve M2a ve M2c makrofaj ko-kültüründe vimentin ve E-kaderin seviyelerinin % değişim sonuçları ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi.....	94
Şekil 5.45.	A549 kontrol ve M2c makrofaj ile ko-kültür grubunda bortezomib (IC ₅₀ : 45 nM) ve ixazomib (IC ₅₀ : 2 µM) konsantrasyonlarının vimentin (kırmızı), e-kaderin (yeşil) seviyelerinin immünfloresans görüntüleri	95
Şekil 5.46.	A549 hücreleri ve M2c makrofaj ko-kültüründe bortezomib (IC ₅₀ : 45 nM) ve ixazomibin (IC ₅₀ : 2 µM), vimentin ve E-kaderin seviyelerine etkileri.....	96
Şekil 5.47.	A549 hücrelerinin AlgiMatrix plakalarına ekildikten sonra 3, 5 ve 7. günde görüntülenmesi ve sferoid analizi.....	98

Şekil 5.48.	A549 hücrelerinin farklı günlerde çekilen hücre görüntülerinden elde edilen sferoid boyutları.....	99
Şekil 5.49.	A549 hücrelerinin sferoid oluşumlarının hoechst 33258 ile Cytation 3 Cell Imaging Multi-mode Reader’da floresans olarak görüntülenmesi.....	99
Şekil 5.50.	2D ve 3D A549 hücre kültürlerinin 7 gün inkübasyonundan sonra uygulanan bortezomib konsantrasyonlarının WST-1 yöntemine göre hesaplanan 48. saatteki % canlılık değerleri ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi.....	101
Şekil 5.51.	2D ve 3D A549 hücre kültürlerinin 7 gün inkübasyonundan sonra uygulanan ixazomib konsantrasyonlarının WST-1 yöntemine göre hesaplanan 48. saatteki % canlılık değerleri ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi.....	102

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
ACTB	: Aktin-beta
AIDS	: Kazanılmış Bağışıklık Yetersizliği Sendromu
ANOVA	: Varyans Analizi
ATCC	: <i>American Type Culture Collection</i>
BSA	: Sığır serum albümin
CAF	: Kanser ilişkili fibroblast
CCL	: Kemokin (C-C motif) ligandı
cDNA	: Komplementer deoksiribo nükleik asit
CI	: Hücre indeksi
CXCL	: Kemokin (C-X-C motif) ligandı
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
DMSO	: Dimetilsülfoksit
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
EGF	: Epidermal büyüme faktörü
EMEM	: Eagle minimum essential medium
EMT	: Epitelyal mezenkimal değişim
FBS	: Fötal sığır serumu
FDA	: U.S. Food and Drug Administration
FITC	: Floresein izotiyosiyanat
GAPDH	: Gliseraldehid-3-fosfat dehidrogenaz
IC ₅₀	: Medyan inhibitör konsantrasyon
IFN- γ	: İnterferon- γ
I κ B	: İnhibitör kappa B
IL-4	: İnterlökin-4
IL-6	: İnterlökin-6
IL-8	: İnterlökin-8
IL10	: İnterlökin-10
IL-12	: İnterlökin-12
IL-13	: İnterlökin-13
IL-18	: İnterlökin-18

IL-23	: İnterlökin-23
IL-1 β	: İnterlökin-1 β
LPS	: Lipopolisakkarit
M-CSF	: Makrofaj koloni uyarıcı faktör
MMP-9	: Matriks Metalloproteinaz-9
MTT	: 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromid
n	: Tekrar sayısı
n.s.	: Anlamlı değil
NF-kB	: Nükleer faktör-kappa B
NK	: Doğal öldürücü hücreler
P	: İstatistiksel anlamlılık
PBS	: Fosfat tamponlu salin solüsyonu
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
PET	: Polietilen tereftalat
PI	: Propidyum iyodid
PMA	: Forbol 12-miristat 13-asetat
PS	: Fosfatidilserin
RNA	: Ribonükleik asit
RPM	: Dakikadaki Dönme Sayısı
RTCA DP	: Gerçek zamanlı hücre analiz sistemi
RT-PCR	: Gerçek zamanlı-polimeraz zincir reaksiyonu
STAT-1	: Sinyal transdüseri ve transkripsiyon aktivatörü-1
TAM	: Tümör ilişkili makrofaj
TGF- β	: Dönüştürücü büyüme faktörü- β
TNF- α	: Tümör nekroz faktör- α
VEGF	: Vasküler endotel büyüme faktörü

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser çeşitli genetik ve epigenetik bozukluklara bağlı olarak hücrelerin kontrolsüz olarak çoğalması olarak tanımlanır ve dünyada kardiyovasküler hastalıklardan sonra ikinci sırada gelen ölüm nedenidir. Kanser karmaşık bir mekanizma olmasının sebebi; proliferasyon, indüklenen anjiyogenez, invazyon ve metastazın aktivasyonu, hücre ölümüne karşı direnç ve tümör mikroçevresi tarafından gerçekleştirilen immünolojik mekanizmalar olarak gösterilmektedir (Siegel vd., 2019, Denisenko vd., 2018).

Akciğer kanseri dünya genelinde kansere bağlı mortalitenin en yaygın nedenidir ve bu nedenle, akciğer kanseri önemli bir küresel hastalık yükünü temsil etmektedir (Ferlay vd., 2015). Günümüzde akciğer kanseri araştırmalarının ana hedefi, yeni erken teşhis teknolojilerini ve belirteçlerini aramak, akciğer kanseri patogenezinin moleküler yollarını özellikle metastaz yapabilme kabiliyetinin spesifik mekanizmalarını daha ayrıntılı keşfetmek ve terapötik etkiyi bilimsel ve etkin bir şekilde değerlendirmektir (Yu vd., 2017). Bütün bunları yaparken de tümör mikroçevresindeki diğer hücreleri de göz ardı etmemek ve birlikte değerlendirmek önemli güncel yaklaşımlar arasındadır.

Mikroçevre, tümör dokusu içindeki kanser hücresi olmayan hücre ve yapılarını tanımlar ve solid tümörlerde tümör kitlesinin %5-40'ı tümör ilişkili makrofajlardan oluşmaktadır (Tsai vd., 2014; Sousa vd., 2015). Tümör ilişkili makrofajlar kronik inflamasyon ve kanser arasındaki önemli ilişkinin merkezinde yer alan hücrelerdir (Mosser ve Edwards, 2008; Martinez ve Helming, 2009) ve kanser progresyonu, kanser hücrelerinin epitelyal-mezenkimal geçişi (EMT), anjiyogenez, kanser metastazı ve ilaç direncinin gelişiminde anahtar rol oynarlar (Tsai vd., 2014).

Özellikle M2 polarize makrofaflar tarafından desteklenen metastaz; ayrılma, migrasyon, invazyon ve yeni tümör modülünün oluşumu da dahil olmak üzere çeşitli aşamaları kapsar. EMT hücrelerin, epitelyal-polarize fenotipten, mezenkimal fibroblastoid fenotipe doğru morfolojik olarak değişim geçirdikleri bir süreçtir ve kanser metastaz sürecinde önemli bir rol oynar (Gao vd., 2012). Dengeli bir epitelyal-mezenkimal geçiş, gelişim sürecinde esastır, düzensiz EMT ise, epitelyal homeostazını sekteye uğratarak, kanser gibi hastalıkların patagonezinde rol oynar (Micalizzi vd., 2010). Nükleer faktör kappa B (NF-kB), kanserde invazyon ve EMT'nin önemli belirteçidir (Podo vd., 2010; Hsu vd., 2012). NF-kB, sitokinler, kemokinler, büyüme faktörleri, hücre-adezyon molekülleri ve yüzey reseptörleri benzeri molekülleri kodlayan genlerin

düzenlenmesinde görevli bir transkripsiyon faktörüdür ve bağışıklık yanıtına, inflamasyona ve apoptoza etkin olarak katılır (Shishodia ve Aggarwal, 2002). Son yıllarda, tümör invazyonu hedeflenmiş NF-kB ekseninde odaklanan bazı yeni tedavi yaklaşımları önerilmiştir. Bizde bu nedenle tez çalışmamızda güncel bir tedavi yaklaşımı olan proteazom inhibitörlerinden bortezomib ve ixazomibin ‘NF-kB inhibitörü olmaları nedeniyle’, M1, M2a ve M2c polarize makrofaj ile oluşturulan A549 akciğer kanseri ko-kültüründe anti-proliferatif, apoptotik ve EMT mekanizmaları üzerine etkilerini belirlemeyi amaçladık.

Bu tez çalışmasında, THP-1 kökenli makrofaj hücrelerini (M0 makrofaj) çeşitli ajanlar (LPS, IFN- γ , IL-4, IL-13 ve hidrokortizon) kullanarak M1, M2a ve M2c polarize makrofaj haline çevirmeyi optimize ederek, A549 hücreleri ile ko-kültür modellerinde proteazom inhibitörlerinden bortezomib ve ixazomibin, anti-proliferatif, apoptotik ve EMT mekanizmaları üzerine etkileri belirlemek amaçlanmıştır. Ayrıca hem 2D hem de 3D kültür yöntemleri kullanılarak da bortezomib ve ixazomibin A549 akciğer kanser hücrelerinde anti-proliferatif etkileri karşılaştırılmıştır. Literatür çalışmaları sonucunda özellikle M2c polarize makrofaja ait kısıtlı sayıda literatür bilgisi olduğu ve yapılan çalışmalarda THP-1 hücrelerinin M2c makrofaja farklılaştırılması sırasında IL-10 kullanıldığı dikkatimizi çekmiştir. Literatür bilgilerine farmakolojik bir yaklaşımla bakıldığında M2c farklılaşmasında glukokortikoid kullanımının mümkün olabileceği belirtilmesine rağmen bu sadece kitabi bilgi olarak kalmış ve üzerine çalışma yapılmamıştır. Buradan yola çıkarak doktora tezi kapsamında *in vitro* koşullarda, klinikte astma, kronik akciğer hastalıkları, bazı kemoterapi ilaçlarıyla ilişkili sıkça kullanılan bir ilaç olan hidrokortizon ile oluşturulmuş THP-1 kökenli M2c polarize makrofaj hücre modeli de ilk kez bu tez çalışmasında gerçekleştirilmiş olup bu hücre kültür modeli tümör mikroçevresini çok iyi yansıtmaması ve günümüzde kullanılan *in vivo* koşullara yaklaşması nedeniyle önem taşımaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Kanser, endüstrileşmiş dünyada kardiyovasküler hastalıklardan sonra ikinci sırada gelen ölüm nedenidir ve kanserle yaşayan insan sayısının her geçen gün arttığı bilinmektedir. Kadınlarda en sık rastlanan malignite meme kanseri olup, erkeklerde ise prostat kanseridir. Akciğer kanseri ise hem erkek hem de kadınlarda ikinci en sık teşhis edilen kanser türüdür (Siegel vd., 2019).

Kanser, çeşitli genetik ve epigenetik bozukluklara bağlı heterojen ve kompleks bir hastalık grubunu kapsar. "Kanserin özellikleri" malign transformasyon ve tümörün gelişimi için gerekli olan bir dizi hücresel özellik içerir. Bunların arasında proliferatif sinyalizasyon, indüklenen anjiyogenez, invazyon ve metastazın aktivasyonu, hücre ölümüne karşı direnç, immünolojik yanıtlar bulunmaktadır (Denisenko vd., 2018).

Kanser, tümör hücrelerinin kontrolsüz büyümesinden kaynaklanan hücresel bir hastalıktır. Çok miktarda tümör hücresi, vücudun bir veya daha fazla kısmında birikmekte ya da yayılmaktadır. Kalıtsal ve çevresel faktörler (ultraviyole radyasyon, kirlilik vb.) insan kanserlerinin başlıca nedenleri olarak kabul edilirken, son dönemdeki araştırmalar vücudumuzdaki genetik materyallerin (genom) çoğalmasında meydana gelen rastgele hataların kanserde önemli rol oynadığını göstermiştir (Tomasetti vd., 2017).

Normal hücrelerin aksine kanser hücreleri, çoğalmaları üzerindeki kontrollerini kaybetmiş durumda bulunurlar. Vücudumuzdaki hücrelerin değişimlerini takip etmek için hem iç hem de dış kontrol sistemlerimiz mevcuttur. Bütün bu kontrol sistemleri başarısız olursa, tümör hücreleri çoğalarak tüm vücut boyunca yayılır ve sonuçta tedavi edilmezse bu durum ölümle sonuçlanır (Dong, 2018). İç kontrol sistemi, esas olarak, "programlanmış hücre ölümü" adı verilen bir süreçte mutant hücrelerin gelişimini ve büyümesini baskılayan tümör baskılayıcı genlerden oluşur (Gibbons Johnson ve Dong, 2017). Tümör hücreleri bu programlanmış ölümden kaçarlarsa, dış kontrol olarak adı geçen immün sistem tarafından yönetilen bir kontrolle karşı karşıya kalacaklardır. İmmün sistem hücrelerdeki küçük değişiklikleri kontrol etme yeteneğine sahiptir ve hücrelerini buna göre aktive etmektedir. Burada proteinlerin rolü büyüktür çünkü kanser hücreleri genellikle proteinleri kodlayan genomdaki hatalardan dolayı ya da hücrelerin erken aşamalarında olgunlaştığı zaman kapatılması gereken bazı proteinlerin kontrolsüz üretimi nedeniyle birçok değişik ve anormal protein barındırırlar. Bazı çevresel faktörler,

genomda hasara neden olabilir bu da aynı zamanda değiştirilmiş proteinlerin üretimi ile sonuçlanır. İmmün hücreleri bu sürece dahil olarak, bu değiştirilmiş proteinleri tümör hücrelerinin yüzeylerinde tespit ederek tanır, aktive olur ve tümör hücrelerini yok etmeye başlama yeteneğine sahiptir (Chen ve Mellman, 2013). İmmün sistemimiz, bu değişiklikleri herhangi bir kanser hücresinde tanıdığı sürece, kanser hücreleri çoğalamaz ve ilerleyemez. Bu nedenle, kanser immün sistemden kurtulan tümör hücrelerinin sınırsız/kontROLSÜZ büyümesinin neden olduğu bir hastalıktır (Dong, 2018).

2.1.1. Kanser ve bağışıklık sistemi

Kanser ve immün sistemin ayrılmaz bir bütün olması nedeniyle kanser immünoterapisi, kansere karşı savaşmak için hastanın kendi bağışıklık sistemini artırmayı amaçlamaktadır. Son yıllarda kanser immünoterapisi kanser tedavisinde ümit verici bir model olarak ortaya çıkmıştır (Mellman vd., 2011).

İmmün sistemin iki türü bulunmaktadır; bunlar tepkileri tanıma ve yanıt hızındaki özgüllükler yönünden farklılık gösterirler. İmmün cevabın birinci türü adaptif bağışıklıktır (sonradan kazanılmış bağışıklık) ve bu bağışıklık türünün hücreleri, hedeflerini tanımada çok özgüldürler. Ancak genellikle hedeflerine gecikmiş bir yanıt verirler çünkü gerekli molekülleri üretmek için daha fazla zamana ihtiyaç duyarlar. Adaptif bağışıklık hücrelerinin T lenfositleri ve B lenfositleri olarak da adlandırılan iki büyük alt popülasyonu bulunmaktadır: T hücrelerindeki “T”, bu hücrelerin timusta geliştiği ve B hücrelerindeki “B” nin kemik iliğinde geliştiği anlamına gelmektedir. Sadece çok spesifik bir antijen için tasarlanmış olan reseptörlerini kullanarak hedef hücreleri veya patojenleri tanır. Bu özgünlük çok detaylı olduğundan, T lenfositleri veya B lenfositleri bir protein molekülündeki küçük değişiklikleri bile fark edebilirler ve bu nedenle kanser çalışmalarında büyük önem taşırlar (Iwasaki ve Medzhitov, 2010).

İmmün sistemin ikinci türü doğuştan gelen bağışıklık olarak adlandırılır ve doğuştan gelen bağışıklık hücrelerinin, hedeflerini tanımada kesin bir özgüllükten yoksun oldukları, ancak hızlı bir şekilde yanıt verdikleri bilinmektedir. Makrofajlar ve doğal öldürücü (NK) hücreler doğuştan gelen bağışıklığın esas hücreleridir ve hedef hücreler veya patojenler tarafından eksprese edilen moleküllere dayanarak hedeflerini tanır (Dong, 2018).

İmmün sistem ile tümör arasındaki etkileşim, eliminasyon, denge ve kaçış olarak adlandırılan üç aşamaya dayanmaktadır. Eliminasyon; aktive sitotoksik T lenfositlerinin önemli rol oynadığı doğal ve adaptif bağışıklık sistemlerinin birlikte erken tümör

hücrelerini tespit edip yok ettiği, kanserin immün düzenlenmesinin bir safhasıdır. Denge evresi; bağışıklık sisteminin tümörü fonksiyonel dinlenme durumunda tuttuğu evre olarak bilinmektedir (Denisenko vd., 2018). Kaçış evresi ise; tümör büyümesinin sınırlandırılmasında immün düzenlemenin yetersizliği ile karakterizedir. Tümörlerin immünolojik süreçlerde kaçma yeteneği kanserin özelliklerinden biridir. Kaçış aşamasına giren tümör hücreleri, normal koşullar altında bağışıklığın düzenlenmesine yardımcı olan ve sağlıklı dokuların hasar görmesini engelleyen mekanizmaları yıkarak tümör mikroçevresinde bir bağışıklık baskılayıcı durum oluşturma eğilimindedirler (Mittal vd., 2014).

2.1.2.Akciğer kanseri

Akciğer kanseri, ABD'de (Siegel vd., 2019) ve dünya genelinde kansere bağlı mortalitenin en yaygın nedenidir. Bu nedenle, akciğer kanseri önemli bir küresel hastalık yükünü temsil etmektedir (Ferlay vd., 2015).

Akciğer kanseri, bronş ve akciğerde başlayan bir çeşit malign tümördür. Kanser hücrelerinin morfolojisine göre akciğer kanseri, küçük hücreli akciğer kanseri ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri olarak iki kategoriye ayrılmaktadır (Yu vd., 2017; Denisenko vd., 2018; Sher vd., 2008). Görülme sıklıklarına bakıldığında küçük hücreli olmayan akciğer kanserinin oranı, küçük hücreli akciğer kanserine göre 4 kat daha fazladır. Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri; skuamöz hücreli karsinoma, adenokarsinoma ve büyük hücreli karsinoma olmak üzere üç tipe ayrılmaktadır. Skuamöz hücreli karsinom tüm akciğer kanseri olgularının %25-30'unu oluşturur. Akciğer kanserinin en yaygın türü adenokarsinoma olup, tüm akciğer kanseri olgularının yaklaşık %40'ını oluşturmaktadır. Akciğer adenokarsinomları mukus ve diğer maddeleri salgılayan küçük hava yolu epiteli (tip II alveolar) hücrelerden gelişir. Büyük hücreli karsinom ise tüm akciğer kanseri olgularının %5-10'unu oluşturmaktadır (Zappa ve Mousa, 2016; Denisenko vd., 2018).

Tıp alanındaki gelişmeler sayesinde akciğer kanserinin mortalite oranı azalmaktadır; ancak halen akciğer kanseri en yüksek mortalite oranına sahip kanser türüdür. Akciğer kanseri hastalarında 5 yıllık post-operatif sağ kalım oranı sadece yaklaşık %13'tür (Chen vd., 2015). Bu durumun temel nedenleri maddeler halinde kısaca özetlenmiştir;

- 1- Akciğer kanserinin erken klinik semptomları belirgin değildir ve etkili erken tanı yaklaşımları yoktur.
- 2- Akciğer kanserinin patogenezi ve moleküler alt tiplmesi oldukça karmaşıktır.
- 3- Bireysel farklılıklar önemlidir bu bağlamda akciğer kanseri, farklı akciğer kanseri tiplerine ve bireysel hastalara özgü terapötik hassas ilaç rejimleri açısından yoksundur (Yu vd., 2017).
- 4- Akciğer tümörü mikroçevresi, malign ve malign olmayan popülasyonlar dahil olmak üzere çok çeşitli hücreleri içermektedir. Bu hücreler, tümör oluşumunun inhibe edilmesine katkı sağlayabileceği gibi tam tersine, tümör büyümesinin ve ilerlemesinin gelişmesine de yol açabilirler (Jackute vd., 2018).
- 5- Akciğer kanserinde diğer kanserlerin çoğuna benzer şekilde akciğerlere ve diğer uzak organlara erken metastaz yapabilme kabiliyetinin çok yüksektir ve bu nedenle de akciğer kanserine bağlı mortalitenin büyük çoğunluğunu metastaz oluşturmaktadır (Savary vd., 2009). Akciğer Kanserlerinin başlaması ve metastazı, sadece kanser hücrelerinin genetik ve moleküler özelliklerine değil, aynı zamanda bağışıklık sistemi ile tümör çevresiyle olan etkileşimine de bağlıdır (Forde vd., 2014).

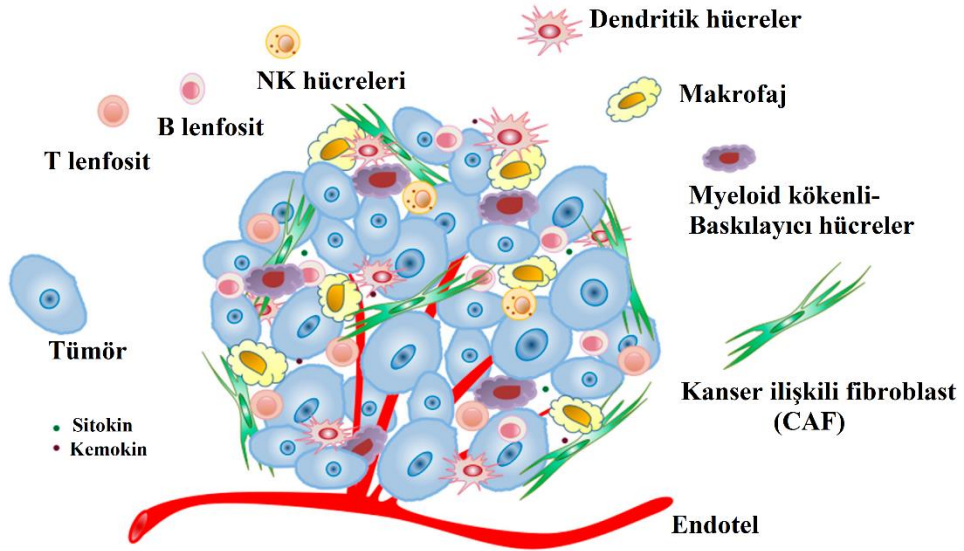
Bu nedenle, günümüzde akciğer kanseri araştırmalarının ana hedefi, yeni erken teşhis teknolojileri ve belirteçleri aramak, akciğer kanseri patogenezinin moleküler mekanizmalarını daha ayrıntılı keşfetmek ve terapötik etkiyi bilimsel ve etkin bir şekilde değerlendirmektir (Yu vd., 2017). Bütün bunları yaparken akciğer kanserinde tedavinin zor olmasının en önemli sebebi olarak gösterilen metastazla ilişkili mekanizmaları merkeze almak ve tümör mikroçevresinde bulunan hücre tiplerini (düzenleyici T lenfositler, myeloid kökenli baskılayıcı hücreler ve tümör ilişkili makrofajlar) değerlendirmek büyük önem taşımaktadır ve güncel yaklaşımlar arasındadır (Mellman vd., 2011). Bu konu tez çalışmamızın da temelini oluşturmaktadır.

2.1.2.1. Akciğer kanseri ve mikroçevre

Tümör mikroçevresi, tümör biyolojisinde uzun zamandan beri önemli bir konu olarak araştırılmaya devam etmektedir. Mikroçevre, tümör dokusu içindeki kanser hücresi olmayan hücre ve yapıları tanımlar (**Şekil 2.1.**). Bu tümör mikroçevresindeki hücreler; endotelial hücreleri, kanser ilişkili fibroblastları (CAFs), tümör ilişkili

makrofajları (TAMs) veya dendritik hücreleri içine alan çok geniş çeşitliliğe ve birçok kökene sahip hücreler olarak bilinirler. Buna ek olarak, tümör ortamı, çoğunlukla nötrofiller, makrofajlar ve miyeloid türevli baskılayıcı hücreler olarak adlandırılan immünsüpresif miyeloid hücreler olmak üzere, kemik iliği kaynaklı hücreleri de barındırmaktadır (Tsai vd., 2014; Suarez-Carmona vd., 2017).

Akciğer Kanserlerinin başlaması ve metastazı, sadece kanser hücrelerinin genetik ve moleküler özelliklerine değil, aynı zamanda immün sistemin tümör mikroçevresiyle olan etkileşimine de bağlıdır (Forde vd., 2014). Tümör mikroçevresi, kanser progresyonu, kanser hücrelerinin EMT, anjiyogenezi, kanser metastazı ve ilaç direncinin gelişiminde anahtar rol oynamaktadır (Tsai vd., 2014). Bu bağlamda, tümör mikroçevresinde bulunan inflamatuvar hücreler ve mediyatörleri kanserin ayırt edici özelliği olan inflamasyon, tümör hücrelerinin proliferasyonu, metastazı ve anjiyogenezi için önemli olan büyüme faktörleri veya matriksi bozan enzimlerin kaynağı olarak yer almaktadırlar (Hanahan ve Weinberg, 2011; Mantovani ve Allavena, 2015; Yuan vd., 2015).



Şekil 2.1. Tümör mikroçevresi (Cui ve Guo, 2016).

Tümör mikroçevresinde bulunan anahtar immün hücre tipleri; T lenfositler, B lenfositler, NK hücreleri ve tümörle ilişkili makrofajlar'dır (Mellman vd., 2011). İnflamatuvar hücreler, özellikle tümör ilişkili makrofajlar, tümör hücreleri tarafından

toplanır ve tümör dokularına infiltre olurlar (Solinas vd., 2009; Qian ve Pollard, 2010). Solid tümörlerde tümör kitlesinin %5-40'ını tümör ilişkili makrofajlar (TAM) oluşturmaktadır (Sousa vd., 2015). Bu nedenle TAM'lar kronik inflamasyon ve kanser arasındaki önemli ilişkinin merkezinde yer alan hücrelerdir (Mosser ve Edwards, 2008; Martinez vd 2009).

2.2. Tümör İlişkili Makrofajlar

Makrofajlar, patojen tanıma, temizlenme, antijen işleme ve sunum, inflamasyon ve doku tamirinin yanı sıra pro ve anti-tümöral yanıtlarla ilişkili olduğu bildirilen mononükleer fagositik hücrelerdir (Mantovani vd., 2014; Foey, 2014). Monosit/makrofaj kökenli hücreler, kronik inflamatuvar hastalıklardan otoimmüniteye, ateroskleroz ve kansere kadar birçok patolojik durumun temel bileşenleridir. (Martinez vd., 2009; Mosser ve Edwards, 2008; Mantovani vd., 2014). Makrofajlar dokularda önemli homeostatik işlevleri yerine getirmek için bulunurlar ve bulundukları dokuya göre de farklı isimler alırlar; beyinde mikroglia, akciğerde alveoler makrofaj, karaciğerde Kupfer hücresi, kemikte osteoklastın yanı sıra dalak, bağırsak, kemik iliği gibi birçok önemli dokuya özgü formda bulunurlar. Bu nedenle makrofajların, doğal bağışıklık sisteminde inflamatuvar mekanizmaların hem hücre içi hem de hücre dışı patojenlere adaptif yanıtların oluşmasının yanı sıra, immün regülasyon ve tümör denetlemesinin başlatılması için merkezi bir noktada oldukları belirlenmiştir (Foey, 2014).

Epidemiyolojik ve deneysel kanıtlar, kronik inflamasyonun tümör mikroçevresinin sürekli ve değişmeyen özelliklerinden biri olduğunu göstermektedir. Tümör ilişkili makrofajlar, birçok tümör infiltrasyonunun ana bileşenidir ve bu nedenle inflamasyon ve kanser arasındaki bağlantının kilit düzenleyicileridirler (Mantovani vd., 1992).

Makrofajlar farklı mikroçevresel sinyallere yanıt olarak farklı fenotiplere farklılaşma özelliği göstermeleri nedeni ile tümör mikroçevresinde pro-tümöral ve anti-tümöral fonksiyonları ifade edebilirler. Bu durum, monosit-makrofaj kökenli hücrelerin diğer mikroçevre hücrelerinden ayırt edici bir özelliğidir ve bu durum tümör gelişiminde oynadığı rolü karmaşık hale getirmektedir (Mantovani vd., 2014). TAM'ların tümör destekleyici aktivitelerinin arasında, malign hücrelerin proliferasyonu ve invazyonu, adaptif immünitinin yıkımı, hücre dışı matriksin yeniden şekillenmesi (remodeling) ve anjiyogenez yer alır (Mantovani vd., 2008; Hanahan ve Weinberg, 2011; Qian ve Pollard, 2010).

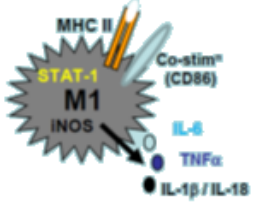
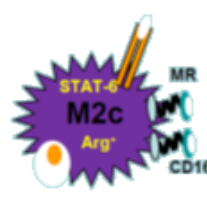
Makrofajlar, çeşitli fonksiyonel özellikleri olan alt gruplarda bulunurlar ve farklı fenotipik özellikler gösterirler. Bununla birlikte, makrofaj alt-gruplarının farklı aktivasyon sinyalleri kullanılarak mı yoksa daha uzun süreli kültür / farklılaşmanın bir sonucu olarak üretildiğine mi, yoksa monositlerde önceden programlanmış mı olduğu konusunda belirli bir netlik yoktur (Zeigler-Heitbrock vd., 1993; Zeigler-Heitbrock, 1996).

Makrofajlar işlevsel olarak ayrı iki form olarak incelenmektedir; pro-inflamatuar alt-grup (klasik olarak aktive edilmiş, tip I veya M1) ve anti-inflamatuar / düzenleyici alt-grup (alternatif aktivasyon, tip II veya M2) (Mills vd., 2000; Anderson ve Mosser, 2002; Foey, 2014) (**Şekil 2.2**).

Klasik olarak aktive edilmiş makrofajlar olarak da adlandırılan M1 makrofajlar, anti-mikrobiyal (hücre içi patojenlere aracılık eden), doku yıkıcı ve anti-tümöral özellikler gösteren gösteren, genellikle pro-inflamatuar makrofajlardır (Mosser, 2003; Biswas ve Mantovani, 2010). Aktivasyon sonucunda, bu makrofajlar aşırı miktarda pro-inflamatuar sitokinler (Tümör Nekroz Faktör Alfa (TNF- α), İnterlökin 1 Beta (IL-1 β), İnterlökin 6 (IL-6), İnterlökin 12 (IL-12), İnterlökin-18 (IL-18) ve İnterlökin 23 (IL-23)), kemokinler (CXCL1, 2, 3, 5, 8, 9, 10, CCL2, 3, 4, 5, 11, 17 ve 22) eksprese ederler (Van Ginderachter vd., 2006). Makrofajlar, interferon gama (IFN- γ) varlığında ve Lipopolisakkarit (LPS) veya TNF- α gibi inflamatuvar uyaranlarla kombinasyon halinde M1 fenotipine polarize edilebilirler (Finnin vd., 1999; Verreck vd., 2006). Listelenen faktörlere ilave olarak, M1 efektör fenotipinin genel profili IL-10^{düşük}, IL-12^{yüksek}, IL-23^{yüksek} olarak bildirilmiştir (Mantovani vd., 2007). IFN- γ ve LPS ilişki olarak gerçekleşen M1 polarizasyonu sonucunda, hücre içi sinyal bileşenlerinin farklı ekspresyonu ve aktivasyonu meydana gelir. M1 polarizasyonu, Sinyal transdüseri ve transkripsiyon aktivatörü-1 (STAT-1) ve Nükleer Faktör Kappa B (NF-kB) transkripsiyon faktörleri aracılığıyla dönüştürülür (Liu vd., 2008). Bu noktada, M1-spesifik transkripsiyon faktörü STAT-1'in, STAT-6 aktivasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir ki; STAT-6'da M2 polarizasyonu için gerekli bir faktördür. Böylece M1 ilişkili bir transkripsiyon faktörü olan STAT-1 M2 polarizasyonunu bastırır (Sica ve Bronte, 2007).

Alternatif olarak aktive edilmiş makrofajlar olarak da adlandırılan M2 makrofajların, M1'e göre fonksiyonel olarak ayrı bir fenotip gösterdiği bulunmuştur. M2 makrofajları, farklı uyaranlar ile M2a, M2b ve M2c makrofajlarına polarize edilirler. M2a

polarizasyonu, İnterlökin-4 (IL-4)'ün mannoz reseptörünü indüklemesinin ardından İnterlökin-13 (IL-13)'ün devreye girmesi ile gerçekleşir. M2b makrofajları ise immün komplekslerin IL-1 β veya LPS uyarıları ile polarize olur ve yara iyileşmesinde rol oynarlar (Stein vd., 1992; de Waal Malefy vd., 1993). İmmün-supresif M2c makrofajlar ise IL-10, Transforme Edici Büyüme Faktörü Beta (TGF- β), glukokortikoidler veya immün komplekslerce zengin ortamların sonucunda oluşmaktadırlar (Foey, 2014). M2 makrofajların yüzey marker profili, CD23, tutucu reseptörler CD163 ve CD204, mannoz reseptörü CD206 ekspresyonunu içermektedir. M2c makrofajları, IL-10 ve matriks metalloproteinazlar gibi matriks-yeniden modelleme faktörleri üretirler. Yüksek CD163 ekspresyonu, M2c polarizasyonunun onaylanmış bir belirteçidir (Sousa vd., 2015).

STİMÜLASYON/FARKLILAŞMA				
LPS, IFN- γ , GM-CSF		IL-4/IL-13		IL-10, TGF- β , Glukokortikoidler
				
*STAT-1, STAT-4, SOCS-3		*STAT-3		*STAT-6
**		**		**
IL-10 ^{düşük} TNF- α		IL-10 ^{yüksek} IL-1 ra		IL-10 ^{yüksek} TGF β
IL-12 ^{yüksek} IL-6		IL-12 ^{düşük} TGF β		IL-12 ^{düşük}
IL-23 ^{yüksek} IL-1 β		IL-23 ^{düşük}		IL-23 ^{düşük}
***		***		***
CCL-2, 3, 4, 5, 11, 17, 22		CXCL-1, 2, 3, 5, 8, 9, 10, 11, 16		CCL-17, 18, 22, 24
				CCL-16, 18
				CXCL-13

Şekil 2.2. Makrofajın stimülasyonu ve farklılaşması sonucu *sinyal moleküllerinin, **sitokin ekspresyon profilinin ve ***kemokin profilinin şematik olarak gösterilmesi (Foey, 2014).

TAM'lar, IL-10'a, TGF- β , M-CSF'ye (monosit koloni uyarıcı faktör) ve diğer immünsüpresif uyaranlara maruz kaldıkları için daha çok M2 tipine polarize olarak bulunma eğilimi gösterirler (Mantovani vd., 2002) ve bu nedenle gelişimin ve kanserin ortak özellikleri olan epitelyal büyümeyi, invazyonu, migrasyonu ve Epitelyal-mezenkimal geçişi teşvik etmektedirler (Pollard, 2008; Gyorki vd., 2009; Dehai vd., 2014; Sousa vd., 2015). Yapılan çalışmalarda IL-10, akciğer adenokarsinoma hastalarında tümör stromasına infiltre olan M2 makrofaj sayısı ile anlamlı olarak ilişkili bulunmuştur ve akciğer kanseri tümör mikroçevresinde M2 polarize makroraj popülasyonun M1 polarize makrofaj sayısından çok daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Ohtaki vd., 2010; Jackute vd., 2018).

Sonuç olarak klasik M1 makrofaj hücreleri, tümörlere karşı direnç olarak rol oynarken, M2 makrofaj hücreleri Th1 adaptif bağışıklığı bastırır, anti-inflamatuvardır, yara iyileşmesini, anjiyogenezi, doku yeniden modellemesini (remodeling) ve tümör progresyonunu desteklerler (Biswas ve Mantovani, 2010). Tez çalışmasında A549 kanser hücrelerinde hem M1 hemde M2 makrofaj hücreleri ile ko-kültür çalışması yapmamız bu temele dayanmaktadır.

2.3. Epitelyal-Mezenkimal Değişim

Akciğer kanserinde tanı genelde ileri aşamaya ulaşan hastalarda mümkün olmaktadır, bu da hastalığın seyrinin metastazla sonuçlanmasına ve düşük sağ kalım oranlarına sebep olmaktadır (Zhang vd., 2015). Metastaz kanser hücrelerinin kan veya lenf sistemi yoluyla vücudun diğer bölümlerine yayılması ile oluşan çok aşamalı bir süreçtir (Li vd., 2015). Tümör metastazı ayrılma, migrasyon, invazyon ve yeni tümör modülünün oluşumu da dahil olmak üzere çeşitli aşamaları kapsar bu aşamaların başlangıcında ise Epitelyal-mezenkimal değişim önemli bir rol alır (Gao vd., 2012).

EMT hücrelerin, epitelyal-polarize fenotipten, mezenkimal fibroblastoid fenotipe doğru morfolojik olarak değişim geçirdikleri bir süreçtir. Epitelyal-mezenkimal geçiş, hücre-hücre adezyonlarının, polaritenin ve epitelyal belirteçlerin kaybı ve hareketli mezenkimal hücreler ile karakterizedir (Micalizzi vd., 2010). EMT başlangıcında, adherent ve açıklık bağlantıları (gap junctions) da dahil olmak üzere hücre-hücre bağlantıları parçalanmaya başlar ve alttaki bazal membran bozulur. Sırasıyla komşu hücrelere ve bazal membranın epitel bağlantılarına aracılık eden E-kaderin ve integrinler gibi hücre yüzeyi proteinlerinin yerini, mezenkimal fenotip için hücreyi besleyen daha geçici yapışkan özellikler sağlayan n-kaderin alır. Ayrıca hücre iskeleti elemanları

yeniden organize olur ve sitokeratin ara filamentlerinin yerini vimentin alır (Song vd., 2017). Dengeli bir epitelyal-mezenkimal geçiş, gelişim sürecinde esastır, düzensiz EMT ise, epitelyal homeostazını sekteye uğratarak, çeşitli hastalıkların patagonezinde rol oynar (Micalizzi vd., 2010). Önceki çalışmalar, EMT'nin küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hastalarının olumsuz prognozu ile ilişkili olduğunu bildirilmiştir (Bremnes vd., 2002; Dehai vd., 2014). Akciğer kanserinin kötü prognozu ek olarak EMT, karsinogenez (Mizutani vd., 2010) ve kanser hücrelerinin metastaz yeteneğinin artışında önemli bir rol oynadığı bulunmuştur (Chaffer ve Weinberg, 2011). Ayrıca tümör hücrelerinde EMT benzeri değişikliklerin kazanılması; invaziv özellikler, DNA hasarına direnç, kemoterapinin neden olduğu apoptoz, immünoşüpresyon mekanizmalarıyla birlikte, meme kanseri (Jang vd., 2015), kolorektal kanser (Roepman vd., 2014), baş ve boyun kanserleri (Pan vd., 2016) dahil olmak üzere çok sayıda kanser varlığında kötü sonuçlanan hasta grupları ile yüksek oranda ilişkili bulunmuştur (Suarez-Carmona vd., 2017).

Artan literatür verileri, kansere bağlı EMT ve kronik inflamasyon arasındaki bağlantıyı vurgulamaktadır. İnflamatuar mediyatörler (çözünebilir faktörler, oksidatif stres veya hipoksi gibi), kanser hücrelerinde EMT benzeri özelliklerin kazanılmasını desteklemektedir (Suarez-Carmona vd., 2017). Akut inflamasyon, doku hasar kontrol ve onarımının vazgeçilmez bir ajanı iken, kronik inflamasyon ise, neredeyse tüm tümörlerde ortaya çıkan tümöre bağlı iltihaplanma ve tümörün ilerlemesini destekleyen türü olması sebebi ile araştırmaların esas konusunu oluşturmaktadır (Pesic ve Greten, 2016). Tümör oluşumu sırasında; kanser hücreleri, doğal immün hücreleri (örneğin dendritik hücreler veya tümör ile ilişkili makrofajlar ve aktive olmuş yerleşik hücreler (kanseri ilişkili fibroblastlar veya endotel hücreleri gibi) tümörden gelen tehlike sinyallerine karşı çeşitli sitokinler ve kemokinler üretirler. Bu da tümör hücresinin sağ kalımını ve proliferasyonunu, immünoşüpresyonunu ve anjiyogenezini desteklemektedir (Suarez-Carmona vd., 2017; Crusz ve Balkwill, 2015).

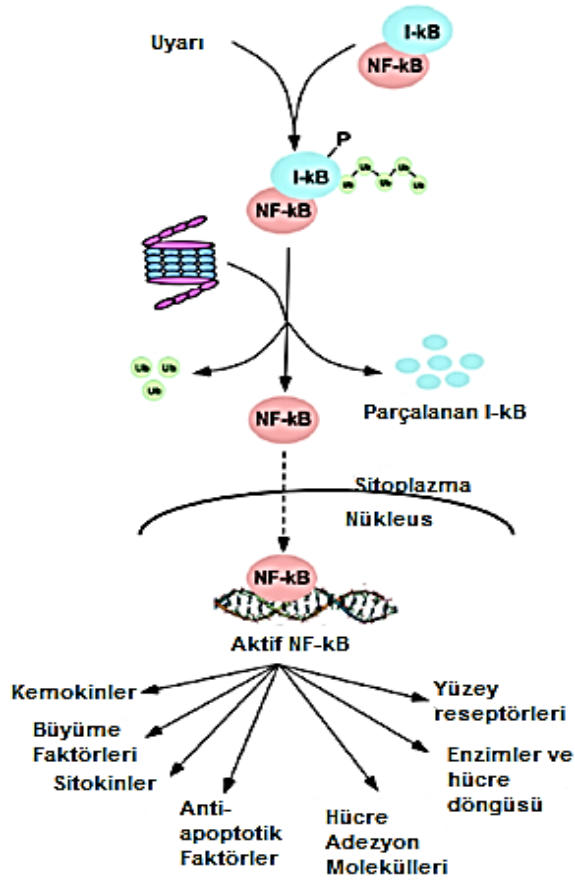
Tümör hücrelerinin genetik ve fenotipik açıdan çok heterojen olduğunun anlaşılması, farklı tümör hücresi fenotiplerinin tümör ilişkili inflamasyon ile ne kadar ilgili olabileceğini araştırmayı amaçlayan çalışmaları arttırmıştır. Epitelyal tümörlerin metastatik ilerlemesi sırasında tümör hücreleri gerçekten de çevresel uyaranlarla yönlendirilen fenotipik değişikliklere uğrarlar ve böylece tümör hücreleri karşılaşıldıkları farklı mikro çevreye uyum sağlarlar. Epitel-mezenkimal değişim

günümüzde bu fenotipik dönüşümleri modüle eden önemli bir aktör olarak görülmektedir (Suarez-Carmona vd., 2017).

2.3.1. EMT ve nükleer faktör kappa B

Nükleer faktör kappa B (NF-kB), bir transkripsiyon faktörüdür ve sitokinleri, büyüme faktörlerini, kemokinleri, hücre yapışma moleküllerini ve yüzey reseptörlerini kodlayan genlerin aktivasyonunda rol oynar (Luqman ve Pezzuto, 2010; Engür ve Dikmen, 2017). Ayrıca NF-kB, çeşitli tepkilerin anahtar transkripsiyonel bir düzenleyicisidir ve inflammatuar sinyalin düzenlenmesinde de önemli bir rol oynar. NF-kB stres veya yaralanma, inflammatuar sitokinler, virüs ve bakteriyel toksinler tarafından aktive edilerek hücresel çoğalma, farklılaşma ve apoptozda rol oynar (Chen vd., 1999).

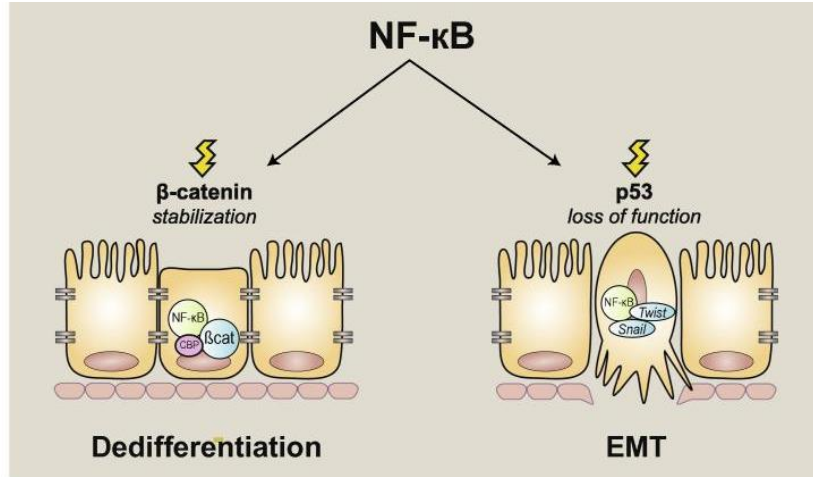
NF-kB transkripsiyon faktörleri, DNA'ya fare ve insandaki beş olası alt birimden oluşan hetero- veya homodimer aracılığı ile bağlanırlar. Bunlar; RelA/p65, c-Rel, RelB, p50, and p52 olarak bildirilmiştir. Bu Rel homoloji alanları DNA bağlanmasına ve dimerizasyonuna, inhibitör kB (IkB) proteinleri olarak bilinen inhibitör faktörlerle aracılık ederler. Rel / p65 ve p50 alt birimleri her yerde ifade edilirken, p52, c-Rel ve RelB alt birimleri belirli farklı hücre tiplerinde fonksiyonel olarak daha önemlidir (Karin vd., 2002). Uyarılmamış hücrelerin çoğunda NF-kB dimerleri, NF-kB'nin nükleer lokalizasyon sekansını maskeleyen ve böylece sitoplazmada tutan ve DNA bağlanmasını önleyen IkB proteinleri ile ilişkisi nedeniyle etkisizdir. Birkaç IkB proteini NF-kB aktivitesinin kontrolünde rol oynarken, bunlardan üçü (IkB α , IkB β ve IkB ϵ) uyarana bağlı bir şekilde negatif düzenleyiciler olarak hareket ederler. Hücrelerin, örneğin TNF- α ve IL-1 gibi pro-inflamatuar sitokinlerle uyarılması, proteinlerin N-terminal alanı içinde bulunan iki serin tortusunda IkB'nin fosforilasyonuna neden olur (Ghosh vd., 1998). IkB'nin bu fosforilasyonu, 26S proteazomu tarafından bozunma sinyalini temsil eden yakındaki lizin tortularının ubiquitinasyonu ile sonuçlanır. IkB proteinlerinin bozulması NF-kB'nin serbest bırakılmasıyla sonuçlanır ve nükleer translokasyona izin verir. Sonuç olarak, bağışıklık ve inflammatuar yanıtlarda ve apoptozun düzenlenmesinde ve ayrıca hücre büyüme kontrolünde yer alan bu genlerin transkripsiyonu indüklenir (Karin ve Ben-Neriah, 2000) (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. 26S proteozom kompleksi tarafından düzenlenen NF-kB'nin fonksiyonları (Frankland-Searby ve Bhaumik, 2012).

NF-kB'nin sitokinleri, sitokin reseptörlerini ve hücre adezyon moleküllerini kodlayan genlerin ekspresyonunu indüklemeye yeteneği sayesinde hücre proliferasyonu, apoptoz ve onkogenезin kontrolünde rol oynadığı ve lösemi, lenfoma ve solid tümörler gibi birçok kanser türünde ayırt edici özellik olarak ortaya çıktığı bildirilmiştir. Ayrıca NF-kB, bağışıklık ve inflamatuvar fonksiyonlarının ana aktivatörü olarak keşfedilmiş ve araştırmalar hala bu konu üzerinde devam etmektedir (Orlowski ve Baldwin, 2002; Huber vd., 2004; Engür vd., 2016; Engür ve Dikmen, 2017). NF-kB'nin Kazanılmış Bağışıklık Yetersizliği Sendromu (AIDS), ateroskleroz, kanser gibi inflamasyon ve otoimmünitenin yol açtığı çok sayıda patolojik durumun gelişimi için çok önemli olduğu gösterilmiştir. Bu bağlamda TAM'ların inflamatuvar yanıtı ile yakın ilişkili olan EMT ve NF-kB arasındaki ilişki yeterince anlaşılamamıştır (Thiery, 2003). Ancak NF-kB'nin EMT'nin geç evre tümör progresyonunun *in vitro* olarak önemli bir ilişkisini temsil ettiğini gösteren

kanıtlar birikmiştir. Günümüzde ise NF- κ B'nin epitelyal-mezenkimal geçişte önemli bir rol oynadığı bilinmektedir (Moon vd., 2017).



Şekil 2.4. NF- κ B, farklılaşma ve EMT (Varga vd.,2014).

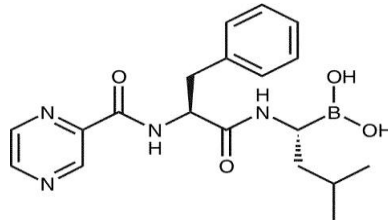
Sonuç olarak, NF- κ B'yi içeren sinyalleme kaskadı, farmakolojik müdahale için birincil hedef olarak kabul edilmiştir ve bu yolun ubiquitinasyon gibi önemli aşamalarını hedefleyen çok çeşitli ilaçlar test edilmiştir (Gadina vd., 2017; Zhang vd., 2017). I κ B kinaz aktivasyonu ve bunun sonucunda ortaya çıkan I κ B fosforilasyonu ve proteazom aracılı degradasyonun, birçok NF- κ B aktivasyon yolunun ilk ortak basamağını temsil ettiği düşünüldüğünde, çeşitli kanser tedavilerinde zaten etkili olduğu gösterilen en belirgin strateji olan proteazom inhibitörleri ön plana çıkmaktadır (Gupta vd., 2010). Bortezomib (Velcade), multipl miyelomun klinik tedavisi için onaylanan ilk proteazom inhibitörü olmuştur. Ayrıca inflamasyon ile ilişkili olan lupus nefriti, kolit, MS ve myastenia gravis murin modellerinde yapılan klinik öncesi çalışmalar bortezomib etkinliği göstermiştir (Gadina vd., 2017). Benzer şekilde, proteazom alt birim beta tip-5'i seçici ve geri dönüşümlü olarak inhibe eden ve multipl miyelom tedavisinde kullanılan ixazomib (Ninlaro) inflamatuvar hastalıklar ile ilişkilendirilmiş olup şu anda lupus nefrit tedavisi için faz I'de bulunmaktadır (Furie vd., 2015).

2.4. Proteazom İnhibitörleri 'Bortezomib ve İxazomib'

Ubikuitin proteazom sistemi, büyüme, hücre döngüsü regülasyonu ve apoptozda yer alan proteinler dahil olmak üzere hücrel proteinlerin çoğuyla yakından ilişkilidir

(Chattopadhyay vd., 2015) bu nedenle de proteazom inhibitörlerinin kanser tedavisinde 20 yılı aşan bir geçmişi vardır. Proteazom inhibitörleri ilk tedavi araştırmaları olan Multiple Myeloma hücreleri ve onun mikroçevresi üzerinde geniş bir etki yelpazesi göstermişlerdir. Bu etkiler, hücre döngüsü, NF-kB inhibisyonu ve apoptotik regülatörler üzerindeki etkileri, IL-6 üretiminin ve sinyalleşmesinin inhibisyonunu gibi birçok mekanizmayı içinde barındırmaktadır (Moreau vd., 2012).

İlk proteazom inhibitörü bortezomib (Velcade, Millennium Pharmaceuticals), 2003 yılında multipl miyelom tedavisi için FDA tarafından onaylanmıştır (Kupperman vd., 2010) (**Şekil 2.5.**). Bortezomib, klinik çalışmalarda açık arayla en kapsamlı değerlendirilen proteazom inhibitörüdür. Klinik öncesi çalışmalar, bortezomibin hem hematolojik hem de solid tümör malignitelerine karşı anti-tümör aktivite sergilediğini göstermiştir (Johnson Daniel, 2015). Solid tümörler arasında küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, baş ve boyun yassı epitel hücreli karsinom, hepatoselüler karsinom, melanom, prostat kanseri, pankreas kanseri, renal hücreli karsinom ve kolon kanseri modellerinde klinik öncesi çalışmalarda antikanser aktivite gözlenmiştir. Ayrıca prostat, akciğer, meme, pankreas, mide ve kolon dahil olmak üzere solid tümörlerden türetilen çok çeşitli kanser hücre hatlarında bortezomibin antiproliferatif etkisi daha önce gösterilmiştir (Johnson Daniel, 2015; Engür ve Dikmen, 2017).

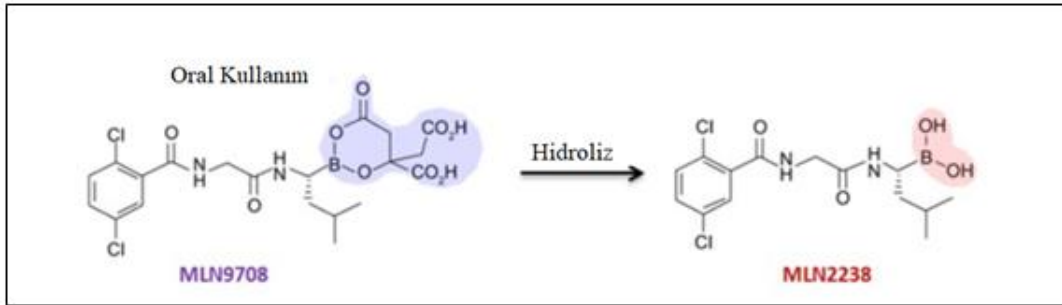


Şekil 2.5. Bortezomibin kimyasal formülü (Muz vd., 2016).

Bortezomibin solid tümörler üzerindeki olumlu klinik öncesi sonuçlarına rağmen, klinik denemelerinde genellikle daha az umut verici sonuçlar ile karşılaşmış ve bunun nedeni olarak, dokulara nüfuz edememesi ve bu hedef bölgelerde terapötik olarak gerekli konsantrasyonlara ulaşamamasından kaynaklanabileceği bildirilmiştir. Bu nedenle, farklı fizikokimyasal veya farmakokinetik özelliklere sahip proteazom inhibitörlerinin tanımlanmasına büyük bir ihtiyaç duyulmuştur (Kupperman vd., 2010). Bortezomibin başarısını iyileştirmek ve bu ajanla ilişkili bazı sınırlamaların üstesinden gelmek için,

ixazomib (MLN2238, Ninlaro, Takeda Oncology) dahil olmak üzere yeni nesil proteazom inhibitörlerinin tanımlanması ve geliştirilmesi için birçok çalışma yapılmıştır (Johnson Daniel, 2015).

İxazomib, bortezomibden türetilen, seçici, güçlü ve geri dönüşümlü bir proteazom inhibitörüdür. İkinci nesil proteazom inhibitörleri arasında sınıflandırılan ixazomib, 2015 yılında FDA tarafından onaylanan üçüncü proteazom inhibitörüdür. İxazomib, oral yolla kullanılabilen ilk proteazom inhibitörüdür ve hızla biyoaktif boronata hidrolize olan bir ön ilaç (MLN9708) olarak uygulanabilir (Kupperman vd., 2010, Muz vd., 2016) (**Şekil 2.6.**). Bununla birlikte ixazomibin 20S proteozom ayrışma yarı ömrü bortezomibden daha kısadır (6 kat daha hızlıdır) bu yüzden ixazomibin doku dağılımında bortezomibe göre avantajlı olduğu kanıtlanmıştır (Kupperman vd., 2010; Chauhan vd., 2011; Engür vd., 2016; Engür ve Dikmen, 2017). Bu nedenle bortezomib ile doğrudan karşılaştırma yapıldığında, ixazomibin gelişmiş bir farmakokinetik ve farmakodinamik profile sahip olduğu ve solid tümörlerde üstün antitümör aktivite gösterdiğini belirlenmiştir (Kupperman vd., 2010; Engür ve Dikmen, 2017).



Şekil 2.6. İxazomibin oral kullanımdan sonra metabolizasyonu (Muz vd., 2016).

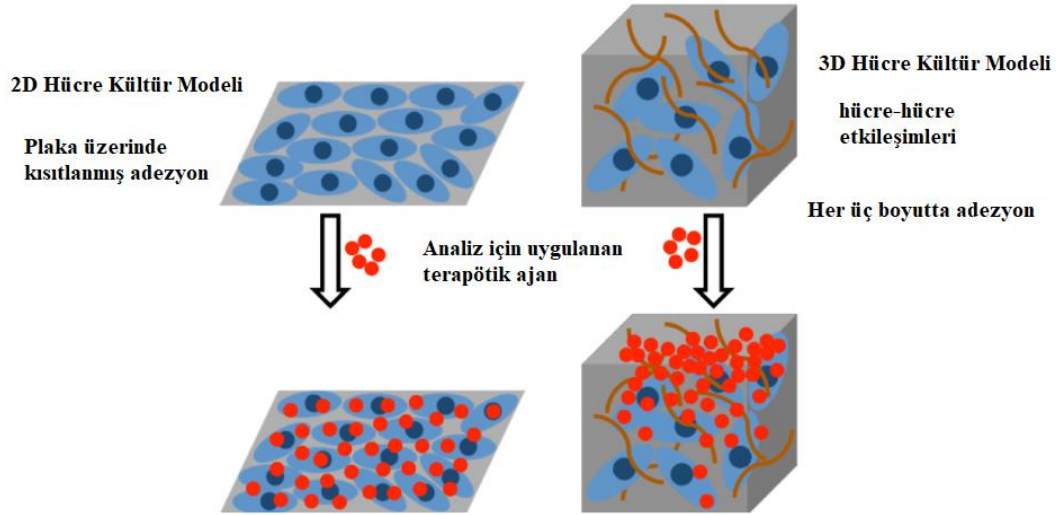
İxazomib’de tıpkı bortezomib gibi birçok kanser hücre hattına karşı güçlü antikanser aktivite göstermektedir (Kupperman vd., 2010; Chauhan vd., 2011; Engür vd., 2016; Engür ve Dikmen, 2017). Klinik olmayan çalışmalarda, in vitro olarak tümör hücrelerinin hücre büyümesini inhibe ettiği bildirilmiştir (Chattopadhyay vd., 2015). Ayrıca ixazomib küçük hücreli akciğer kanserinin de yer aldığı faz 1 klinik çalışmalarda da araştırılmaya başlanmıştır (Smith vd., 2015).

2.5. 3 Boyutlu (3D) Hücre Kültür Modeli

Antikanser ilaçların etkinliğini test etmek için *in-vivo* koşulları taklit eden daha iyi *in vitro* modeller oluşturmak amacıyla yeni stratejiler her geçen zaman gelişme göstermektedir (Mitra vd., 2012).

Geleneksel olarak, *in-vitro* hücre kültürlerinin çoğu, iki boyutlu (2D) ortamlarda yetiştirilmektedir. Kanser çalışmalarında, tümörün anjiyogenezi, invazyonu ve metastazı gibi kompleks mekanizmalarını incelemek için 2D *in vitro* çalışmalara ve *in vivo* hayvan modelleri üzerine yoğunlaşmıştır (Szot vd, 2011). Geleneksel 2D tek tabakalı kültürde, hücreler düz bir yüzeye yapışır ve büyür. Bu da tüm hücrelerin büyüme sırasında ortamdan homojen bir miktarda besin ve büyüme faktörü almasına izin verir (Acrani vd., 2010). Tek katmanlı tabaka, esas olarak çoğalan hücrelerden oluşur, çünkü nekrotik hücreler genellikle yüzeylerden ayrılır. Ayrıca 2D kültüründe büyütülen hücreler genellikle *in vivo* ortamda olduklarından daha düz ve daha gergindirler. 2D kültürdeki anormal hücre morfolojisi, hücre proliferasyonu, farklılaşması, apoptoz, gen ve protein ekspresyonu dahil olmak üzere birçok hücresel süreci etkiler. Sonuç olarak, 2D kültürlü hücreler vücuttaki gibi davranmayabilir, çünkü bu model *in vivo* ortamı yeterince taklit etmez (Hou vd., 2002).

Matris temelli 3D *in vitro* kültür modelleri, kanser oluşumu ve ilerlemesi sırasında *in vivo* meydana gelen farklılaşma, ilaç metabolizması, ekspresyon (gen, protein), genel hücre faaliyetleri, morfolojileri, çoğalmaları, uyarana karşı verdikleri tepkileri ve canlılıkları gibi olayları daha yakından taklit eden hücre yanıtlarına izin verdikleri için kanser araştırmalarında giderek daha önemli bir araç haline gelmektedirler (Kim, 2005; Fischbach vd., 2009). Ayrıca bilindiği üzere insan doku ve hücreleri sadece birbirileri ile değil aynı zamanda ekstraselüler matriks (ECM) olarak adlandırılan destek yapıları ile de iletişim halindedirler, *in vivo* tümör progresyonu sırasında gözlenen hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimleri 2D modellerde incelenemezken 3D modeller bu koşulları taklit edebilmektedir (Kim, 2005). Bütün bu nedenlerden dolayı 3D *in vitro* kültürler, fizyolojik mikro çevrenin tekrar edilmesi ve *in vivo* koşullarla uyumlu olması bakımından daha çok kabul görmektedir (Godugu vd., 2013).



Şekil 2.7. 2D ve 3D hücre kültürlerinin şematik gösterimi (Ustyugov vd. 2018; <http://1>).

Çoğu 3D sistem hücre sferoid agregatları ve iskele kültür sistemleri kullanır. Bu sistemler, yapay olarak üretilen hücre dışı homologlar (örn. Kollajen, matrigel, iskeleler) ile 3D hücre büyümesini destekleyerek hücre yapışmasını ve toplanmasını kolaylaştırır (Amann vd., 2014). Ancak 3 boyutlu hücre kültürleri daha yeni yeni çalışılmaya başlayan güncel bir yöntem olduğu için karşılaşılabilecek bazı zorlukları da beraberinde getirir. Bunlardan bazıları oksijen sağlama sıkıntısı, ortamın 2D hücre kültürlerine göre daha heterojen yapıda olması, büyüme faktörlerinin dağılımı, görüntülemeye yaşanan zorluklar ve daha özel yapıda hücre kültürü plakaları gerektirmesi olarak daha önce yapılmış çalışmalarla belirlenmiştir (Tibbitt vd., 2009).

Tez çalışmamızda, 2D kültür deneylerimize ilave olarak 3D kültürünün avantajlarını kullanarak bortezomib ve ixazomibin IC_{50} konsantrasyonlarını hem 2D hemde 3D kültür ortamlarında belirleyerek ileride yapılacak *in vivo* çalışmalara yeni bir pencere açmayı hedefledik.

3. GEREÇLER

3.1. Deneylerde Kullanılan Hücreler

Çalışmamızda kullanılan hücreler ATCC (Amerikan Tissue Culture Collection)'den sağlanmıştır. THP-1 insan monosit hücresi (ATCC kodu: TIB-202), A549 küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (ATCC kodu: CCL-185), CCD-19Lu insan sağlıklı akciğer fibroblast hücresi (ATCC kodu: CCL-210) deneylerde kullandığımız hücre hatlarıdır.

3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Cihazlar

0.2 mL'lik PCR tüpü	Greiner Bio-One, ABD
10, 100, 1000 ve 5000 µL'lik pipetör	Eppendorf, Kanada
10, 200, 1000 µL'lik mikropipet ucu	Greiner bio-one, ABD
12 kanallı otomatik pipet	Axygen, İngiltere
15 ve 50 mL'lik santrifüj tüpleri	Isolab, Almanya
Penisilin/Streptomisin	Gibco, ABD
Thermo Flask, Filtreli Kapak (75 cm ²)	Thermo Scientific, ABD
Thermo Flask, Filtreli Kapak (25 cm ²)	Thermo Scientific, ABD
2 mL'lik Eppendorf tüp	Greiner bio-one, ABD
5-10 ve 25 mL'lik cam pipet	Isotherm, Türkiye
6 ve 96 kuyucuklu hücre kültür plakası	TPP, İsviçre
Dimetilsülfoksit (DMSO)	Sigma-Aldrich, Almanya
Fetal Bovine Serum (FBS)	Sigma-Aldrich, Almanya
Cedex Smart Slide	Roche, Almanya
L-glutamin	Sigma-Aldrich, Almanya
Parafilm	Pechiney, Fransa
Eagle Minimum Essential Medium	Sigma-Aldrich, Almanya
Şarjlı pipetör	Starlab, Almanya
Trypsin-EDTA 10X	Pan Biotech, Almanya
Trypan mavisi	Roche, Almanya
Kryotüp (2mL)	Greiner Bio-One, ABD
Hücre kazıyıcı	Greiner Bio-One, ABD
Phosphate Buffer Saline (PBS)	Invitrogen, Almanya
Bortezomib	BioChemica, Almanya

Ixazomib (MLN2238)	Activebiochem, ABD
Hidrokortizon	Sigma–Aldrich, Almanya
Forbol 12-miristat 13-asetat (PMA)	Sigma–Aldrich, Almanya
Lipopolisakkarit (LPS)	Sigma–Aldrich, Almanya
Rekombinant İnsan IFN- γ	Peptotech, ABD
Rekombinant İnsan IL-13	Peptotech, ABD
Rekombinant İnsan IL-4	Peptotech, ABD
WST-1 Solüsyonu 25 mL	Roche, Almanya
96 kuyucuklu hücre kültür plakası	TPP, İsviçre
E-plate 16	Roche, Almanya
Matrijel	BD Biosciences, ABD
Cytofix/Cytoperm	BD Biosciences, ABD
Hoechst 33258	Sigma–Aldrich, Almanya
Alexa Fluor® 594 Conjugate, Anti-rabbit	Cell Signaling Technology, Hollanda
Immunofluorescence Application Kit	Cell Signaling Technology, Hollanda
Annexin V and PI Apoptosis Kit	Biotium, ABD
24 kuyucuklu ko-kültür plakası,	Corning, ABD
HERAcell 150 Steril CO ₂ inkübatörü	Thermo Scientific, ABD
Laminer flow kabini	Heal Force, Çin
Masaüstü soğutmalı santrifüj	Eppendorf, Almanya
Hücre sayımı için Cedex XS	Innovatis, ABD
Cytation 3 Multi-Mode Reader	Bio-Tek, ABD
RTCA DP	Roche, Almanya
Derin dondurucu buzdolabı	Altus, Türkiye
DNA-RNA çalışma kabini	UVP, Kanada
Hassas terazi	Ohaus, Avustralya
Inverted mikroskop	Leica, Almanya
MagNA Lyser	Roche, Almanya
MagNA Pure Compact	Roche, Almanya
Mikro santrifüj	Hettich, Almanya
NanoDrop 2000 Spektrofotometre	Thermo Scientific, ABD
Otoklav	Alp, Türkiye
Otomatik pipetler	Eppendorf, Almanya

PCR Thermal Cycler (Gradient PCR)	Takara, Japonya
Sterilizatör	Nüve, Türkiye
Su banyosu	Nüve, Türkiye
Vorteks	Daihan, Güney Kore

3.3. Kullanılan malzemelerin steril edilmesi

Çalışmalarda kullanılacak cam ve metal malzemeler alüminyum folyolara sarılı olarak sterilizatörde 180°C’de 2 saat, sıvı solüsyonlar ise otoklavda 121 °C, 1.5 atm/Hg’de 20 dakika steril edilmiştir. Kullanılan tüm sıvı kimyasallar selüloz nitrat filtreden geçirilerek steril edilmiştir.

3.4. Kullanılan Kimyasal Maddelerin ve İlaçların Hazırlanması

3.4.1. Forbol 12-miristat 13-asetat (PMA)

Toz halindeki PMA (Katalog No: P8139, Sigma) dimetilsülfoksit (DMSO) içinde çözülerek 50 mg/mL konsantrasyonda ana stok hazırlanmıştır. Hazırlanan ana stok, aliquatlanarak -20 °C’de saklanmıştır. Stok solüsyondan, kültür medyumunda çeşitli seyreltme işlemleri yapılarak, gerekli deney konsantrasyonları taze olarak hazırlanmıştır. Tez çalışmamızda THP-1 insan monosit hücrelerini makrofaja (M0) dönüştürmek için kullanılmıştır.

3.4.2. Lipopolisakkarit (LPS)

Lipopolisakkaritler, gram-negatif bakterilerin hücre duvarının karakteristik bileşenleridir. Çalışmamızda liyofilize hale bulunan LPS (Katalog No: L4391, Sigma) Steril PCR grade su ile çözülerek 500 µg/mL konsantrasyonda ana stok hazırlanmıştır. Hazırlanan ana stok, aliquatlanarak -20°C’de saklanmıştır. Stok solüsyondan, kültür medyumunda çeşitli seyreltme işlemleri yapılarak, gerekli deney konsantrasyonları taze olarak hazırlanmıştır. Tez çalışmamızda THP-1 insan monosit hücreleri PMA ile M0 makrofaja dönüştürüldükten sonra M1 polarizasyonu sağlamak amacıyla IFN-γ ile kullanılmıştır.

3.4.3.Rekombinant insan IFN-γ

Liyofilize halde bulunan IFN-γ (Peprotech, Katalog No:AF-300-02) daha uzun saklama koşullarını sağlamak amacıyla içerisinde %0.1 konsantrasyonda Sığır serum albümin (BSA) bulunan PBS ile çözülerek 100 µg/mL konsantrasyonda ana stok hazırlanmıştır. Hazırlanan ana stok, aliquatlanarak -80°C’de saklanmıştır. Stok solüsyondan, kültür medyumunda çeşitli seyreltme işlemleri yapılarak, gerekli deney konsantrasyonları taze olarak hazırlanmıştır. Tez çalışmamızda THP-1 insan monosit

hücreleri PMA ile M0 makrofaja dönüştürüldükten sonra M1 polarizasyonu sağlamak amacıyla LPS ile kullanılmıştır.

3.4.4. Rekombinant insan IL-4 ve IL-13

Liyofilize halde bulunan IL-4 (Peprotech, Katalog No: AF-200-04) ve IL-13 (Peprotech, Katalog No:200-13) daha uzun saklama koşullarını sağlamak amacıyla içerisinde %0.1 konsantrasyonda Bovine Serum Albumin (BSA) bulunan PBS ile çözülerek sırasıyla 20 ve 10 µg/mL konsantrasyonda ana stok hazırlanmıştır. Hazırlanan ana stok, aliquatlanarak -80°C’de saklanmıştır. Stok solüsyondan, kültür medyumunda çeşitli seyreltme işlemleri yapılarak, gerekli deney konsantrasyonları taze olarak hazırlanmıştır. Tez çalışmamızda THP-1 insan monosit hücreleri PMA ile M0 makrofaja dönüştürüldükten sonra M2a polarizasyonunu sağlamak amacıyla IL-4 ve IL-13 kullanılmıştır.

3.4.5 Hidrokortizon

Toz halinde bulunan hidrokortizon (H0396, sigma) steril PCR grade su ile çözülerek 100 mM konsantrasyonda ana stok hazırlanmıştır. Hazırlanan ana stok, aliquatlanarak -80°C’de saklanmıştır. Stok solüsyondan, kültür medyumunda çeşitli seyreltme işlemleri yapılarak, gerekli deney konsantrasyonları taze olarak hazırlanmıştır. Tez çalışmamızda THP-1 insan monosit hücreleri PMA ile M0 makrofaja dönüştürüldükten sonra M2c polarizasyonu sağlamak amacıyla kullanılmıştır.

3.4.6. Bortezomib ve İxazomib (MLN2238)

Toz halindeki bortezomib (BioChemica- A7737, Almanya) ve ixazomibden (Activebiochem, Amerika) DMSO içinde çözülerek 100 mM konsantrasyonda ana stok hazırlanmıştır. Hazırlanan ana stok, aliquatlanarak -80°C’de saklanmıştır. Stok solüsyondan, kültür medyumunda çeşitli seyreltme işlemleri yapılarak, gerekli deney konsantrasyonları taze olarak hazırlanmıştır.

4. YÖNTEMLER

Tez çalışmamızda, THP-1 kökenli makrofaj hücreleri M1, M2a ve M2c polarize makrofaj haline farklılaştırılmış ve A549 akciğer kanseri ko-kültüründe anti-proliferatif, anti-apoptotik ve EMT mekanizmaları üzerine etkileri araştırılmıştır. Kullanılan yöntemler **Tablo 4.1**'de gösterilmektedir.

Tablo 4.1. Yapılan çalışmalar ve uygulanan yöntemlerin şematik olarak gösterilmesi.

2D HÜCRE KÜLTÜRÜ ÇALIŞMALARI	
Tekli Hücre Kültürü Çalışmaları	Ko-Kültür Çalışmaları
1. THP-1 Hücrelerinin Makrofaja Dönüştürülmesi Optimizasyon Çalışmaları	1. A549 Hücreleri ve M1, M2a ve M2c Makrofaj Ko-Kültüründe, Bortezomib ve İxazomib'in Apoptotik Etkilerinin Akış Sitometride Belirlenmesi Çalışmaları
a. THP-1 Hücrelerinde WST-1 Yöntemi ile PMA'nın Sitotoksik Etkilerinin Belirlenmesi	a. Annexin V-PI Yöntemi ile Bortezomib ve İxazomibin Apoptotik Etkilerinin Belirlenmesi
b. THP-1 ve THP-1 Kökenli Makrofaj (M0) Dönüşümünde, CD-14 ve CD-68 Antikor Seviyelerinin Akış Sitometri Yöntemi ile Belirlenmesi	b. Kaspaz-3 Aktivasyonu ile Bortezomib ve İxazomibin Apoptotik Etkilerinin Belirlenmesi
c. THP-1 Kökenli Makrofaj Hücrelerinin (M0), M1, M2a ve M2c Polarize Alt Türlerine Farklılaştırılması Çalışmalarının Akış Sitometri Yöntemi ile Belirlenmesi	c. JC-1 Boyama Yöntemi ile Bortezomib ve İxazomibin Mitokondrial Membran Bütünlüğüne Etkisinin Belirlenmesi
d. THP-1 Kökenli Makrofaj Hücrelerinin (M0), M1, M2a ve M2c Polarize Alt türlerine Farklılaştırılması Çalışmalarının RT-PCR Yöntemi ile Belirlenmesi	d. IL-1 β Seviyeleri ile Bortezomib ve İxazomibin Apoptotik Etkilerinin Belirlenmesi
2. A549 Hücrelerinde Bortezomib ve İxazomibin Antiproliferatif Etkilerinin Belirlenmesi Çalışmaları	2. EMT Yolağına İlişkin Etkilerin Belirlenmesi Çalışmaları
a. A549 Hücrelerinde, WST-1 Yöntemi ile Bortezomib ve İxazomibin Sitotoksik Etkilerinin Belirlenmesi	a. A549 Hücreleri ve M1, M2a ve M2c makrofaj ko-kültüründe TNF-alfa ve IL-10 Sitokin Seviyelerinin EMT Yolağına İlişkin Etkilerinin Belirlenmesi
b. A549 Hücrelerinde, Bortezomib ve İxazomibin Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sisteminde (RTCA DP), IC ₅₀ Konsantrasyonlarının Belirlenmesi	b. A549 hücreleri ve M1, M2a ve M2c makrofaj ko-kültüründe, bortezomib ve ixazomibin, EMT Yolağına İlişkin Genlerin mRNA Ekspresyon Seviyelerinin RT-PCR Yöntemi ile Belirlenmesi
	c. A549 hücreleri ve M2c makrofaj ko-kültüründe Akış Sitometride Vimentin ve E-Kaderin Seviyeleri ile EMT Yolağına İlişkin Etkilerin Belirlenmesi
3D HÜCRE KÜLTÜRÜ ÇALIŞMALARI	
1- 3 Boyutlu (3D) Hücre Kültür Modelinin Optimizasyonu	
2- A549 Hücrelerinde 2D ve 3D Kültür Modelinde Bortezomib ve İxazomibin Sitotoksik Etkilerinin Karşılaştırılması	

4.1. THP-1, A549 ve CCD-19Lu Hücrelerinin Kültür Ortamında Çoğaltılması ve Deneylere Hazırlık

THP-1 insan monosit ve A549 küçük hücreli olmayan insan akciğer kanser hücreleri, %10 fetal bovine serum, %1 penisillin/streptomisin içeren RPMI-1640 besiyerinde, CCD-19Lu insan sağlıklı akciğer fibroblast hücreleri ise %10 fetal bovine serum, %1 penisillin/streptomisin, %1 L-glutamin içeren Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) besiyerinde, %5 CO₂'li etüvde, %95 bağıl nem'de 37 °C'de kültür ortamında çoğaltılmıştır. Kültür flaskı %70 oranında hücre yoğunluğuna sahip olduğu zaman alt kültürle ayrılarak büyümesi sağlanmıştır. Çoğaltılan hücrelerin bir kısmı -80°C'ye kaldırılarak çalışmanın sonraki deneyleri için stoklanmıştır.

4.1.1. Hücre sayımları

Flasklarda bulunan THP-1, A549 ve CCD-19Lu hücreleri PBS ile yıkanmıştır. A549 ve CCD-19Lu hücreleri adhere hücre oldukları için flasktan 1X tripsin ile kaldırılırken, THP-1 hücreleri süspanse olmaları sebebi ile flasktan direk santrifüj tüpüne alınmışlardır. Hücreler, gerçekleştirilecek olan yöntemler uygulanmadan önce tripan mavisi solüsyonu ile boyanarak hücre sayım cihazı (Cedex, Roche) ile sayılmış ve deneylere uygun sayılarda canlı hücreler kullanılarak çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

4.2. 2D Hücre Kültürü Çalışmaları

4.2.1. WST-1 yöntemi ile THP-1 hücrelerinde sitotoksitenin belirlenmesi

WST-1 (4-[3-(4-iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene disulfonate), bir tetrazolyum tuzu olup, canlı hücrelerin mitokondrilerinde süksinat-dehidrogenaz enzimine spesifik olarak bağlanır ve suda çözünmeyen formazan tuzlarına dönüşür. Bu dönüşüm canlı hücrelerde nikotinamid adenin dinükleotit fosfatın glikolitik üretimine bağlıdır. Bu nedenle oluşan formazan miktarı direkt olarak kültürde metabolik olarak aktif hücreleri (canlı hücreleri) göstermektedir. WST-1 yönteminde spektrofotometrik olarak ölçülen absorbans değeri, kültürdeki hücrelerin metabolik aktivitelerini gösterir ve bu değer de yaşayan hücre sayısı ile ilişkilidir. Proliferasyon arttıkça, formazan tuzu oluşumuna bağlı olarak absorbans değeri de artış gösterir (Carmicheal vd., 1987; Lian vd., 2003; Engur ve Dikmen, 2017).

THP-1 hücreleri %10'luk Fetal Bovine Serum ve %1 Penisilin-Streptomisin içeren besiyeri ortamında kültüre edildikten sonra, hücreler yeterince çoğalmaları için inkübe edilmiştir. Daha sonra hücre sayımı yapılarak, 96 kuyucuklu plakalara 10.000 hücre/kuyucuk olacak şekilde besiyeri ortamında ekilmiş ve PMA konsantrasyonları (1,

10, 100 ve 1000 ng/mL) uygulanmış ve 24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süreleri sonunda her bir 96'lık kuyucuktaki hücreler üzerine, WST-1 kit (Katalog no:11644807001, Roche) prosedürü talimatlarına göre 10 µL WST-1 reaktifi ilave edilerek, hücreler 3 saat inkübatörde inkübe edilmiş ve inkübasyon sonunda absorbanslar 420 nm dalga boyunda ELİZA okuyucu cihazında (Cytation 3 Multi-mode Reader, Biotek) her bir grupta 8 kuyucuk olacak şekilde okunmuştur. Deneyler birbirinden bağımsız 3 tekrar olarak çalışılmıştır. Renk oluşumuna göre alınan absorbans değerleri, hücre canlılığı ile direkt olarak ilişkilendirilmiştir. Sonuçlar canlılık formülüne göre hesaplanıp % hücre canlılık olarak belirlenmiştir.

4.2.2. THP-1 hücrelerinin makrofaja dönüştürülmesi optimizasyon çalışmaları

Tümör mikroçevresinde makrofajlar M1 ve M2 polarize alt tipleri olarak karakterize edilmişlerdir. M1 makrofajlar veya diğer adıyla klasik olarak aktive edilmiş makrofajlar, bakteriyel ve viral enfeksiyona karşı savunmada ve tümör regresyonunda yer alırlar. M1 fenotipi, M0 makrofajlarından IFN-γ gibi Th1 sitokinleri ile farklılaştırılırlar. M1 fenotipi, TNF-alfa, IL-1 Beta, IL-6, IL-8 gibi pro-inflamatuvar sitokinlerin yüksek üretimi ile karakterizedir (Biswas ve Mantovani, 2010).

M2 makrofajlar veya diğer adıyla alternatif olarak aktive edilmiş makrofajlar, parazit enfeksiyonu, doku modellemesi, immüno-regülasyon, alerji ve tümör ilerlemesinde rol oynar. M2 makrofajlar, M0 makrofajlardan, IL-4 ve/veya IL-13 gibi Th2 sitokinlerine maruz bırakılarak türetilmektedirler. M2 makrofajların M2a, M2b ve M2c olarak 3 alt grubu tanımlanmıştır. Bunlardan M2a makrofajlar IL-4 ve/veya IL-13 sitokinleri ile, M2c ise IL-10 veya glukokortikoid ile uyarılarak farklılaştırılmaktadırlar (Foey, 2014).

THP-1 hücreleri içeriğinde %1 penisilin-streptomisin, %10 fetal sığır serumu bulunan RPMI-1640 medyum besiyerinde kültüre edilmiştir. Hücreler yeterince çoğaldıktan sonra hücre sayımı yapılarak, 6 kuyucuklu plakalara her bir kuyucukta 10^6 hücre olacak şekilde besiyeri ortamında ekilmiş ve WST-1 yöntemine göre sitotoksik etki belirlemediğimiz konsantrasyonlar ile THP-1 hücreleri 24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır (PMA konsantrasyon uygulaması sırasında farklılaşmayı desteklemek amacıyla besiyeri serumu %1 olarak kullanılmıştır). Daha sonra PMA etkisini uzaklaştırılmak için, hücreler 48 saat normal besiyerinde inkübe edilmiştir.

Ko-kültür çalışmalarına geçmeden önce makrofafların M0, M1, M2a ve M2c polarizasyonunda kullanılacak ajanların uygun konsantrasyon ve inkübasyon zamanını

belirlemek amacıyla her bir makrofaj tipine özgül spesifik yüzey antikorunu seçilerek, akış sitometri yöntemiyle analizleri yapılmıştır. Kullanılan antikorlar aşağıda verilmiştir;

CD-14 (THP-1 belirteci) (katalog no: 367116, Biolegend)

CD-68 (M0 belirteci) (katalog no: 333806, Biolegend)

CD-80 (M1 belirteci) (Katalog no: 305208, Biolegend)

CD-206 (M2 belirteci) (Katalog no: 321104, Biolegend)

CD-23 (M2a belirteci) (Katalog no: 338506, Biolegend)

CD-163 (M2c belirteci) (Katalog no: 326506, Biolegend)

Ayrıca M0, M1, M2a ve M2c makrofajları Leica DM invert ışık mikroskobu ile morfolojik olarak fotoğraflanmıştır.

4.2.2.1. THP-1 insan monosit hücrelerinin THP-1 kökenli makrofaja (M0) farklılaştırılması çalışmalarının akış sitometri yöntemi ile belirlenmesi

THP-1 insan monosit hücrelerinin M0 makrofaj hücrelerine farklılaşmasını optimize etmek amacıyla PMA'nın konsantrasyonları ile 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. Daha sonra PMA'nın etkisini elemine etmek amacıyla taze besiyeri ile 48 saatlik dinlenme inkübasyonuna bırakılmışlardır. CD-14 yüzey antikorunu için "Biolegend Hücre Yüzeyi İmmünofloresan Boyama Protokolü" uygulanmıştır. Bu protokole göre hücrelerin inkübasyon süreleri sonunda her bir 6'lık kuyucuktaki hücreler kaldırılarak 1200 RPM'de 5 dakika santrifüj edilmiş ve supernatant uzaklaştırılmıştır. Hücre peleti 2 ml soğuk PBS ile 2 kez yıkanmıştır. Son yıkamadan sonra kalan pellet 100 µL PBS ile resuspanse edilerek üzerine 5 µl CD-14 antikorunu (FITC anti-human CD14 Antibody, Katalog no:367116, Biolegend) ilave edilmiştir. Daha sonra buzun üzerinde ve karanlıkta 20 dakika inkübasyona bırakılan tüpler inkübasyon sonunda 2 mL PBS ile 2 kez daha yıkanarak 30 dakika içinde akış sitometri cihazında okuması yapılmıştır. CD-68 antikorunda ise "Biolegend Hücre Yüzeyi İmmünofloresan Boyama Protokolü" uygulanmış olup; inkübasyon süreleri sonunda her bir 6'lık kuyucuktaki hücreler kaldırılarak 1200 RPM'de 5 dakika santrifüj edilmiş ve supernatant uzaklaştırılmıştır. Hücre peleti soğuk PBS ile 2 kez yıkanmıştır. Son yıkamadan sonra tüplerin üzerindeki supernatant dökülmüş ve pelletin üzerine fiksasyon ve hücrelerin geçirgenliğini sağlamak için, 500 µL cytofix/cytoperm solüsyonu ilave edilerek 20 dk buzun içinde bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda 1200 RPM'de 5 dk santrifüj yapılmış ve pellet 2 kez 500 µL "perm wash" ile yıkanmıştır. Son yıkamadan sonra hücre pelleti 100 µL perm wash ile resuspanse edilerek üzerine 5 µL CD-68 antikorunu (FITC anti-human CD68 Antibody,

Katalog no: 333806, Biolegend) eklenmiş ve 20 dk oda ısısında ve karanlıkta inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda her bir tüpe 1000 µL perm wash ilave edilerek santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda pellet 350 µL perm wash ile akış sitometri cihazında analiz edilmiştir.

4.2.2.2. THP-1 kökenli makrofaj hücrelerinin M1, M2a ve M2c polarize alt türlerine farklılaştırılması çalışmalarının akış sitometri yöntemi ile belirlenmesi

THP-1 insan monosit hücreleri, %1 serumlu besiyerinde PMA'nın 100 ng/mL konsantrasyonu ile 24 saat inkübe edilerek, M0 makrofaj hücrelerine farklılaştırılmış (konsantrasyon CD-14 ve CD-68 akış sitometri sonuçlarına göre belirlenmiştir) ve daha sonra diğer deneylere geçmeden önce PMA'lı medyum uzaklaştırılıp, hücreler 48 saat normal besiyerinde inkübasyona bırakılmıştır.

M0 makrofajların, M1 polarizasyona optimizasyonu için sırasıyla IFN-γ ve LPS'nin farklı konsantrasyonları 24 saatlik inkübasyon sürelerinde uygulanarak (20 ng/mL IFN-γ + 20 ng/mL LPS veya 20 ng/mL IFN-γ + 1µg/mL LPS) M1 polarize makrofaja özgü yüzey belirteci olan CD-80 antikor seviyeleri akış sitometri yöntemiyle belirlenmiştir. M0 makrofajların M2a polarizasyona optimizasyonu için ise, 25 ng/mL IL-4 ve 25 ng/mL IL-13 sitokinleri ile 24 veya 72 saatlik inkübasyon süreleri boyunca uyarılarak farklılaştırıldıktan sonra spesifik yüzey belirteçleri olarak CD-206 ve CD-23 antikor seviyeleri belirlenmiştir. Son olarak M0 makrofajların M2c polarize makrofaja farklılaşması için hidrokortizon konsantrasyonları (1 ve 10 µM) ile 24 veya 72 saatlik inkübasyon süreleri sonunda CD-206 ve CD-163 antikor seviyeleri belirlenerek optimizasyon çalışmaları yapılmıştır.

Akış sitometri yönteminde CD-80, CD-206, CD-23 ve CD-163 yüzey antikorları için "Biolegend Hücre Yüzeyi İmmünofloresan Boyama Protokolü" uygulanmıştır. Bu protokole göre hücrelerin inkübasyon süreleri sonunda her bir 6'lık kuyucuktaki plaka tabanından kazınan hücreler 1200 RPM'de 5 dakika santrifüj edilmiş ve supernatant uzaklaştırılmıştır. Hücre peleti 2 ml soğuk PBS ile 2 kez yıkanmıştır. Son yıkamadan sonra kalan pellete 100 µL PBS ile resüspanse edilerek üzerine 5 µl antikor ilave edilmiştir. Herbir antikor için ayrı kuyulardan kazınan hücreler ayrı tüplerde çalışılmıştır. Daha sonra buzun üzerinde ve karanlıkta 20 dakika inkübasyona bırakılan tüpteki hücreler, inkübasyon sonunda 2 mL PBS ile 2 kez daha yıkanarak 30 dakika içinde akış sitometri cihazında okuması yapılmıştır.

4.2.2.3. THP-1 kökenli makrofaj hücrelerinin M1, M2a ve M2c polarize alt türlerine farklılaştırılması çalışmalarının RT-PCR yöntemi ile belirlenmesi

Akış sitometri yöntemi ile belirlenen M0, M1, M2a ve M2c makrofajların farklılaşmasını kanıtlamak amacıyla bazı genlerin mRNA ekspresyon düzeyleri gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) yöntemi ile belirlenmiştir.

Bu yöntemde RNA'dan cDNA sentezi ve kalıp cDNA'dan da makrofaj polarizasyonunu doğrulamak amacıyla anahtar rol oynayan bazı genlerin (IL-1 β , IL-8, IL-18, CXCL-1, CXCL-3, CCL-22, CCL-24, TGF- β) amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir. Housekeeping gen olarak GAPDH kullanılmıştır.

Akış sitometri yöntemiyle belirlenen konsantrasyon ve inkübasyon süreleri sonunda, M0 (100 ng/mL PMA, 24 saat), M1 (20 ng/mL IFN- γ + 20 ng/mL LPS, 24 saat), M2a (25 ng/mL IL-4 + IL-13, 72 saat) ve M2c (1 μ M hidrokortizon, 72 saat) polarize makrofajlardan total RNA, izolasyon robotu (Magna Pure Compact, Roche) kullanılarak izole edilmiştir. RNA verimi 260 nm ve 280 nm optik dansitede, nanodrop spektrofotometrik ölçüm yapılarak belirlenmiştir. Daha sonra cDNA sentezi için her bir örnekten eşit miktarda RNA (100 ng/örnek) kullanılmıştır.

cDNA sentezi için Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis kit (katalog no:05091284001, Roche) prosedürü uygulanmıştır. PCR tüplerine örnek başına 100 ng total RNA, 1 μ l Oligo (dT)18 primeri (2.5 μ M) koyularak toplam hacim 11.4 μ l'ye steril distile su ile tamamlanmıştır. Tüpler PCR Thermal Cycler'da 10 dakika 65°C'de denature edilmiştir. Tüplerin içeriğine, 4 μ l Transcriptor High Fidelity Reverse Transcriptase Reaction Buffer (1X ve 8 mM MgCl₂ içerir), 0.5 μ l RNase inhibitörü (20 U), 2 μ l dNTP karışımı (her biri 10mM), 1 μ l DTT (5mM), 1.1 μ l Transcriptor High Fidelity Reverse Transcriptase (10 U) ilave edilerek toplam hacim 20 μ l'ye tamamlanmıştır. Daha sonra tüpler PCR Thermal Cycler'da 55°C'de 30 dk, 85 °C'de 5dk inkübe edilmiştir. Elde edilen cDNA'lar, Light Cycler 480 PCR cihazında amplifikasyon için kullanılmıştır. RT-PCR yöntemi, cihaza uygun kit (Syber Green Master Mix, Roche) ve primerler kullanılarak tek adımda uygulanmıştır. Elde edilen cDNA'lar, LightCycler® 480 RT-PCR cihazında, genlere spesifik primerler ve PCR kit kullanılarak kit protokolüne göre cihazda çoğaltılmıştır. Housekeeping gen olarak GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) kullanılmıştır. IL-1 β , IL-8, IL-18, CXCL-1, CXCL-3, CCL-22, CCL-24, TGF- β genlerinin mRNA seviyeleri M0 makrofaj gen ifadeleri ile karşılaştırmalı olarak analiz edilmiştir.

Tablo 4.2. Genlerin dizilimleri.

Genler	Kısa adı	Baz Dizisi (Forward Primer- Reverse Primer)
İnterlökin-1 Beta	IL-1 β	Forward: 5'-AAGATGCTGGTTCCCTGCC-3' Reverse: 5'-GCGTGCAGTTCAGTGATCGTAC-3'
İnterlökin-8	IL-8	Forward: 5'-CCGGAAGGAACCATCTCACT-3' Reverse: 5'-ACTTCTCCACAACCCTCTGC-3'
İnterlökin-18	IL-18	Forward: 5'- GATAGCCAGCCTAGAGGTATGG -3' Reverse: 5'- CCTTGATGTTATCAGGAGGATTCA -3'
Kemokin Ligandı-1	CXCL-1	Forward: 5'- AGCTTGCCTCAATCCTGCATCC -3' Reverse: 5'- TCCTTCAGGAACAGCCACCAGT -3'
Kemokin Ligandı-3	CXCL-3	Forward: 5'- TTCACCTCAAGAACATCCAAAGTG-3' Reverse: 5'- TTCTTCCCATTCTTGAGTGTGGC -3'
Transforme Edici Büyüme Faktörü Beta	TGF-Beta	Forward: 5'- TACCTGAACCCGTGTTGCTCTC-3' Reverse: 5'- GTTGCTGAGGTATCGCCAGGAA-3'
Kemokin Ligandı-22	CCL-22	Forward: 5'- TCCTGGGTTCAAGCGATTCTCC -3' Reverse: 5'- GTCAGGAGTTCAAGACCAGCCT -3'
Kemokin Ligandı-24	CCL-24	Forward: 5'- TGAGAACCGAGTGGTCAGCTAC -3' Reverse: 5'- TTCTGCTTGGCGTCCAGGTTCT -3'
Gliseraldehid-3-fosfat dehidrogenaz	GAPDH	Forward: 5'- GTCAAGGCTGAGAACGGGAA -3' Reverse: 5'- AAATGAGCCCCAGCCTTCTC -3'

4.2.3. WST-1 yöntemi ile M0 makrofaj, A549 ve CCD-19Lu hücrelerinde bortezomib ve ixazomibin sitotoksik etkilerinin belirlenmesi

Ko-kültür çalışmalarında A549 hücreleri ile THP-1 kökenli makrofaj hücreleri (M0) kullanılacağı için bortezomib ve ixazomib sitotoksik etkilerini belirlemek amacıyla WST-1 yöntemi uygulanmıştır. Ayrıca bortezomib ve ixazomibin sağlıklı akciğer fibroblast hücreleri olan CCD-19Lu hücrelerinde de sitotoksik etkileri araştırılmıştır.

M0 Makrofaj, A549 ve CCD-19Lu hücreleri %10'luk Fetal Bovine Serum ve %1 Penisilin-Streptomisin içeren besiyeri ortamında kültüre edildikten sonra, hücreler yeterince çoğalmaları için inkübe edilmiştir. Daha sonra hücre sayımı yapılarak, 96 kuyucuklu plakalara 10.000 hücre/kuyucuk olacak şekilde besiyeri ortamında ekilmiştir. Bortezomib ve ixazomib konsantrasyonları (0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 ve 100 μ M) ana stoktan hücre kültür besiyeri içinde gerekli seyreltmeler yapılarak hazırlanmıştır. Kontrol grubundaki hücrelerde %0.1 oranında DMSO içeren besiyeri uygulanmıştır. Daha sonra plakalar 24 ve 48 saatlik inkübasyonlara bırakılmıştır. İnkübasyon süreleri sonunda her

bir 96'lık kuyucuktaki hücreler üzerine, WST-1 kit (Katalog no:11644807001, Roche) prosedürü talimatlarına göre 10 µL WST-1 reaktifi ilave edilerek, hücreler 3 saat inkübatörde inkübe edilmiş ve inkübasyon sonunda absorbanslar 420 nm dalga boyunda ELİZA okuyucu cihazında (Cytation 3 Multi-mode Reader, Biotek) her bir grupta 8 kuyucuk olacak şekilde okunmuştur. Deneyler birbirinden bağımsız 3 tekrar olarak çalışılmıştır. Renk oluşumuna göre alınan absorbans değerleri, hücre canlılığı ile direkt olarak ilişkilendirilmiştir. Sonuçlar canlılık formülüne göre hesaplanıp % hücre canlılık olarak belirlenmiştir.

4.2.4. Gerçek zamanlı hücre analiz sistemi (RTCA DP) ile A549 ve CCD-19Lu hücrelerinde bortezomib ve ixazomibin anti-proliferatif etkilerinin belirlenmesi

Bortezomib ve ixazomibin, WST-1 yöntemiyle belirlenmiş olan konsantrasyonlarının gerçek zamanlı hücre analiz sisteminde (RTCA DP) A549 ve CCD-19Lu hücre proliferasyonları ile IC₅₀ değeri belirleme çalışmaları yapılmıştır. RTCA DP sistemi, elektriksel empedans ölçümü ile hücre canlılığını tespit ederek gerçek zamanlı veriler oluşturur. E-plakadan sistem tarafından alınan değerler, literatürde kabul edilen birimsiz 'cell index (CI)' (hücre indeksi) değeri olarak hesaplanır. Bu değer, hücreler E-plakanın tabanını kaplayıp çoğaldıkça verilen elektriksel yanıtla paralel olarak artmaktadır (Limame vd., 2012; Özkay vd., 2016).

Hücreler yeterince çoğaldığında, canlılığının belirlenmesi için Cedex cihazında hücreler sayılmıştır. Çalışmada kullanılacak E-plakalara önce 100 µL besiyeri eklenmiş ve cihazda ilk okuma alındıktan sonra E-plakalar cihazdan çıkarılıp 100 µL besiyeri üzerine 100 µL içinde 10.000/kuyucuk hücre ekilmiştir. 30 dakika steril kabinde bekletilen plakalar daha sonra cihaza yerleştirilmiş ve saatte 1 ölçüm alacak şekilde cihaz programlandıktan sonra deney başlatılmıştır. A549 ve CCD-19Lu hücreleri belirli bir hücre indeks değerine ulaşınca cihaz durdurulmuş ve hücre-besiyeri karışımından 100 µL çekilip atılmıştır. Hazırlanan bortezomib ve ixazomib konsantrasyonları (0.001, 0.01, 0.1, 1 ve 10 µM) E-plaka kuyucuklarına 100 µL medyum içinde uygulanmış (x2 konsantrasyon olarak) ve program kaldığı yerden devam ettirilmiştir. RTCA DP ile elde edilen hücre indeks değerlerine göre bortezomib ve ixazomibin IC₅₀ değerleri RTCA DP Software 1.2.1 programı kullanılarak hesaplanmıştır.

4.2.5. Ko-Kültür çalışmaları

THP-1 hücrelerinin M0, M1, M2a ve M2c makrofaja polarizasyonu gerçekleştirildikten sonra A549 hücreleri ile ko-kültür çalışmalarına başlanmıştır. İki hücrenin aynı ortamda yaşaması için alt ve üst odaları birbirinden 0.4 µm çapta gözeneklere sahip olan bir zar ile ayrılan özel ko-kültür plakaları kullanılmıştır. A549 hücreleri alt odacığa ve THP-1 hücrelerinden farklılaştırılmış makrofajlar da (M0, M1, M2a ve M2c polarize makrofajlar) ayrı ayrı üst odacığa belli sayılarda ekilerek ko-kültür modeli oluşturulmuştur. Deneylerde 24 kuyucuklu ko-kültür plakası kullanılmıştır. Deneyler arası paralelliğin sağlanması amacıyla her deneyde alt odacığa ekilen A549 hücresi sayısının 5 katı kadar sayıda THP-1 hücresi üst odacığa ekilmiştir. Bu bağlamda; 24 kuyucuklu plakalarda alt odacıktaki A549 hücre sayısı 2×10^5 iken THP-1 hücre sayısı 10^6 olarak ekilmiştir.

THP-1 hücreleri, optimizasyon çalışmaları ile belirlenen 100 ng/mL PMA konsantrasyonu ile %1 FBS içeren farklılaştırma besiyeri ile plakanın üst odacığında 24 saat inkübe edilerek M0 makrofaj hücrelerine dönüşmeleri sağlanmıştır. Daha sonra hücrelerden PMA'nın etkisini uzaklaştırmak için 3 kez PBS ile yıkanmış ve deney öncesinde normal besiyeri ile %5 CO₂ içeren 37°C'lik etüvde 48 saat dinlenme inkübasyonuna bırakılmışlardır. Daha sonra M0 makrofaj hücrelerinin M1, M2a ve M2c polarizasyonu için, flow sitometri yöntemiyle belirlenen konsantrasyonlar ve izlenen yöntem şu şekildedir;

M0 makrofajlar 48 saatlik dinlenme inkübasyonundan sonra M1 makrofaja polarize olması amacıyla 20 ng/mL IFN-γ ve 20 ng/mL LPS ile %1'lik FBS içeren farklılaşma besiyeri ile 24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır.

M0 makrofajlar 48 saatlik dinlenme inkübasyonundan sonra M2a makrofaja polarize olması amacıyla 25 ng/mL IL-4 ve 25 ng/mL IL-13 ile %1'lik FBS içeren farklılaşma besiyeri ile 72 saatlik inkübasyona bırakılmıştır.

M0 makrofajlar 48 saatlik dinlenme inkübasyonundan sonra M2c makrofaja polarize olması amacıyla 1 µM hidrokortizon ile %1'lik FBS içeren farklılaşma besiyeri ile 72 saatlik inkübasyona bırakılmıştır.

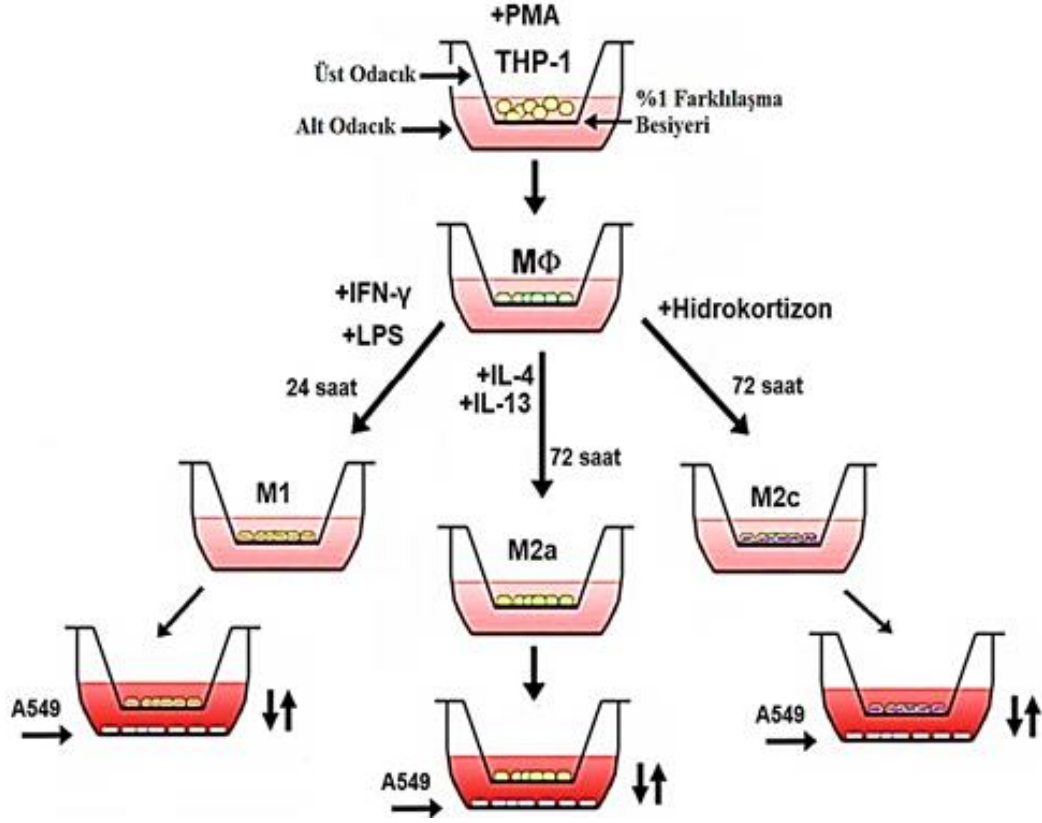
Ayrı bir plakanın alt odacığına makrofajların polarizasyonu tamamlanmadan bir gün önce A549 hücreleri ekilmiş ve 24 saat yapışması beklenmiştir. Böylece ko-kültür sürecine hazır olan hücreler serumsuz besiyeri ortamında, ko-kültür plakasının alt ve üst odacığı bir araya getirilerek inkübasyona bırakılmışlardır. Ayrıca A549 hücrelerinin

makrofajsız ortamda deney grubu da oluşturulmuştur. Ko-kültür modelinin oluşturulmasından sonra polarize makrofajlar için sitotoksik olmadığı belirlenmiş olan bortezomib (45 nM) ve ixazomibin (2 µM) IC₅₀ konsantrasyonları ko-kültür plakasının alt kuyucuklarına ve tek başına ekimi yapılan A549 hücrelerine uygulanmış, 48 saat inkübasyonun ardından uygulanacak olan yöntemle geçilmiştir. Buna göre oluşturulan deney grupları **Tablo 4.3**'te gösterilmiştir.

Tablo 4.3. Deney grupları (bortezomib IC₅₀: 45 nM, ixazomib IC₅₀: 2 µM).

TEKLİ KÜLTÜR GRUPLARI		
A549 Kontrol	A549 Bortezomib (IC ₅₀)	A549 İxazomib (IC ₅₀)
KO-KÜLTÜR GRUPLARI		
A549 + M1 Makrofaj Kontrol		
A549 + M1 Makrofaj Bortezomib (IC ₅₀)		
A549 + M1 Makrofaj İxazomib (IC ₅₀)		
A549 + M2a Makrofaj Kontrol	A549 + M2c Makrofaj Kontrol	
A549 + M2a Makrofaj Bortezomib (IC ₅₀)	A549 + M2c Makrofaj Bortezomib (IC ₅₀)	
A549 + M2a Makrofaj İxazomib (IC ₅₀)	A549 + M2c Makrofaj İxazomib (IC ₅₀)	

Şekil 4.1' de açıklanan bu ko-kültür modellerinde, bortezomib ve ixazomibin A549 hücrelerindeki apoptotik etkilerinin araştırılması amacıyla akış sitometri de Annexin-PI, Kaspaz-3 ve JC-1 yöntemleri, EMT yolağına olan etkilerin belirlenmesi için de bu yolla anahtar proteinler olan vimentin ve E-kaderin seviyeleri ile gerçekleştirilmiştir. Ayrıca konsantrasyonların uygulandığı 48 saat inkübasyondan sonra A549 hücrelerinden RNA izolasyonu gerçekleştirilerek RT-PCR yöntemi ile apoptoz ve EMT yolağı ilişkili genlerin ifade düzeyleri araştırılmıştır. Hücre süpernatantlarından ise TNF-alfa ve IL-10 sitokin seviyeleri akış sitometri yöntemi kullanılarak belirlenmiştir.



Şekil 4.1. M0 makrofajdan M1, M2a ve M2c makrofaj polarizasyonu ve ko-kültür yönteminin şematik olarak gösterilmesi

4.2.5.1. Gerçek zamanlı hücre analiz sisteminde (RTCA DP) M1, M2a ve M2c polarize makrofaj ve A549 ko-kültür ortamlarında hücre proliferasyonunun belirlenmesi

E-Plate insert, RTCA DP sistemi üzerinde hücre-hücre etkileşimi analizleri yapmak için kullanılan tek kullanımlık plakalardır. Şekil 4.2.'de görüldüğü gibi E-Plate insert, bir plaka kapağı, insert bölümü (ko-kültür için efektör hücreler bu bölüme ekilir) ve bir alt veri alıcı plaka (proliferasyonu belirlenmek istenen hedef hücre bu plakaya ekilir) içerir. Insert kuyularının alt kısmında ise ko-kültür hücrenin birbirine karışmasını engelleyen bir mikro gözenekli polietilen tereftalat (PET) membranı bulunmaktadır.

Proliferasyon çalışmasında 16 kuyucuklu altın elektrot kaplı E-Plate insert kullanılmıştır. Ko-kültür gruplarında A549 hücrelerinin proliferasyonunun belirlenmesi amacıyla THP-1 hücreleri 50.000 hücre/kuyucuk olacak şekilde insert bölümüne ekilmiş ve gerekli şartlar altında M1, M2a ve M2c makrofajlara polarizasyonları gerçekleştirilmiştir. Daha sonra A549 hücreleri alt plakaya 10.000 hücre/kuyu olacak şekilde ekilmiş ve yapışması için 1 gün süreyle beklenmiştir. E-plate insert içinde bulunan

ve ko-kültür sürecine hazır olan makrofajlar ile A549 hücreleri birleştirilerek (ko-kültür süreci bütün yöntemlerimizde serumsuz besiyeri ortamında devam etmiştir) RTCA DP cihazında programlama başlatılmış ve gerçek zamanlı olarak ölçümler alınmıştır. (Alt plakada 100 µL içinde A549 hücreleri yapıştıktan sonra üzerine insert bölümü ‘medyumu dökülmüş halde’ yerleştirilmiştir. Bortezomib (IC₅₀:45 nM) ve ixazomib (IC₅₀:2 µM) konsantrasyonları direkt insert içine 80 µL serumsuz besiyeri içinde hazırlanarak verilmiştir. RTCA DP ile elde edilen hücre indeks değerlerine göre grupların proliferasyon grafikleri RTCA DP Software 1.2.1 programı kullanılarak çizilmiştir.



Şekil 4.2. E-plate insert plakasının şematik olarak gösterilmesi.

4.2.5.2. Akış sitometride annexin V-PI yöntemi ile apoptotik etkinin belirlenmesi

Normal hücrelerde hücre zarının sitoplazmik yüzünde membran lipidlerinden biri olan fosfatidilserin (PS) bulunmamaktadır. Eğer hücre apoptoza giderse normalde iç yüzde yerleşmiş olan PS molekülleri hücre zarının dış yüzüne transloke olurlar. Bu yer değiştirme, hücre membran bütünlüğünün bozulmadığı apoptotik hücre ölümünün erken dönemlerinde meydana gelir. Annexin-V, hücrenin dış yüzeyine yerleşen fosfatidilserine bağlanabilen bir protein olduğu için, floresan bir madde ile işaretlenerek apoptotik hücre görünür hale getirilmektedir. Propidyum iyodid (PI) ise, DNA ya da çift sarmallı RNA'ya bağlandığından, membran yapısı bozulmuş geç apoptotik ve nekrotik hücrelerin belirlenmesinde kullanılmaktadır (Gatti vd., 1998; Kopman vd., 1994).

Bu çalışma için Annexin V Apoptosis Detection Kit (Katalog no: 556547, BD) protokolü uygulanmıştır. Bortezomib (IC₅₀:45 nM) ve ixazomib (IC₅₀:2 µM) uygulanarak 48 saat inkübe edilmiş tekli ve ko-kültür hücre gruplarından, A549 hücreleri, kaldırılarak

toplanmış ve 1200 RPM’de 5 dakika satrifüj edilmiş ve supernatant uzaklaştırılmıştır. Hücre peleti 2 ml soğuk PBS ile 2 kez yıkanmıştır. Son yıkamadan sonra kalan pellet 100 µL PBS ile resuspanse edilerek ependorfa aktarılmış, üzerine 5 µl Annexin V ve 5 µl PI ilave edilmiştir. Oda sıcaklığında ve karanlıkta 20 dakika inkübasyon sonunda tüplere 250 µl “Annexin V bağlama tamponu” eklenerek 30 dakika içinde akış sitometri cihazında (Accuri C6, BD) grupların apoptotik okumaları yapılmıştır.

4.2.5.3. Akış sitometride kaspaz-3 aktivasyonu ile apoptotik etkinin belirlenmesi

Kaspaz-3, apoptoz mekanizmasında yer alan kaspazlardan ve hem dışsal (apoptotik) hem de içsel (mitokondriyal) apoptotik yolak üzerinden aktifleşebilmektedir. Bu nedenle bir hücrede kaspaz-3 enzim aktivitesinin belirlenmesi, o hücrede apoptozun varlığının en önemli göstergelerinden biridir (Slee vd., 2001; Engür vd., 2016).

Kaspaz-3 aktivasyonunun belirlenmesinde ‘PE Active Caspase-3 Apoptosis Kiti (Katalog no: 550914, BD)’ kullanılmıştır. Bortezomib (IC₅₀: 45 nM) ve ixazomib (IC₅₀: 2 µM) uygulanarak 48 saat inkübe edilmiş tekli ve ko-kültür hücre gruplarından A549 hücreleri, kaldırılarak toplanmış ve 1200 RPM’de 5 dakika satrifüj edilmiş, süpernatant uzaklaştırılmıştır. Hücre peleti soğuk PBS ile 2 kez yıkanmıştır. Son yıkamadan sonra tüplerin üzerindeki süpernatant dökülmüş ve pelletin üzerine fiksasyon ve hücrelerin geçirgenliğini sağlamak için, 500 µL cytofix/cytoperm solüsyonu ilave edilerek 20 dk buzun içinde bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda 1200 RPM’de 5 dk santrifüj yapılmış ve pellet 2 kez 500 µL “perm wash” ile yıkanmıştır. Son yıkamadan sonra hücre pelleti 50 µL perm wash ile resüspanse edilerek üzerine 10 µL antibody (PE Rabbit Anti kaspaz-3) eklenmiş ve 30 dk oda ısısında inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda her bir tüpe 1000 µL perm wash ilave edilerek santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda herbir örneğe ait pellet 350 µL perm wash ile flow tüpüne aktarılarak akış sitometri cihazında (Accuri C6, BD) okutularak analiz edilmiştir.

4.2.5.4. Akış sitometride JC-1 boyama yöntemi ile hücrelerin mitokondrial membran bütünlüğünün belirlenmesi

Apoptozda mitokondriyal bozukluğu içeren iki önemli etken ortaya konmuştur. Bunlardan biri mitokondri zarının geçirgenliğinin değişmesi ve membran potansiyelinin kaybolmasıdır (Chen vd., 2008). Mitokondriyal membran potansiyelinin belirlenmesi için katyonik voltaj bağımlı bir boya olan JC-1 (5,5’, 6,6’- tetrachlo-1,1’, 3,3’- tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide) kullanılmaktadır. JC-1 mitokondriyal membran potansiyeli’nin polarizasyon durumunu gösterir ve hücrelerde mitokondriyal

membran potansiyelini ölçülmesine aracılık eder (Iijima, 2006). Mitokondriyal membran potansiyelinin kaybolması apoptozun önemli bir göstergesidir (Yao vd., 2007).

Hücrelerin mitokondriyal membran bütünlüğünün belirlenmesinde akış sitometri mitokondriyal membran potansiyeli belirleme kiti (Katalog no:551302, BD) kullanılmıştır. Bortezomib (IC₅₀: 45 nM) ve ixazomib (IC₅₀: 2 µM) uygulanarak 48 saat inkübe edilmiş tekli ve ko-kültür hücre gruplarından, A549 hücreleri, kaldırılarak toplanmış ve 1200 RPM'de 5 dakika satrifüj edilmiş, süpernatant uzaklaştırılmıştır. Her bir tüpe kit içeriğindeki bileşenler uygun şekilde karıştırılarak elde edilen çalışma solüsyonu eklenmiş ve 37°C'de 15 dakika etüvde inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda hücreler yine kit içinde bulunan 1000 µL Assay solüsyonu ile yıkanmıştır. Yıkama işleminden sonra, hücreler 250 µL Assay solüsyonu ile süspansiyon edilmiş ve akış sitometri cihazında (Accuri C6, BD) okutularak analiz edilmiştir

4.2.5.5. Akış sitometride interlökin 1 beta (IL-1β) seviyelerinin belirlenmesi

İnterlökin-1 beta (IL-1β) kansere bağlı kronik enflamasyonda rol oynayan temel sitokinlerden biridir (Crusz ve Balkwill, 2015).

Hücrelerde IL-1β seviyelerini belirlemek amacıyla antikor için uygun olan fiksasyon ve permeabilizasyon protokolü uygulanmıştır. Bu yöntemde FITC anti-human IL-1β Antibody (Katalog No: 508206) kullanılmıştır. Bortezomib (IC₅₀:45 nM) ve ixazomib (IC₅₀:2 µM) uygulanarak 48 saat inkübe edilmiş tekli ve ko-kültür hücre gruplarından, A549 hücreleri, kaldırılarak 1200 RPM'de 5 dakika satrifüj edilmiş ve süpernatant uzaklaştırılmıştır. Hücrelerin fiksasyon ve permeabilizasyonu için 500 µL cytofix/cytoperm solüsyonu (Katalog no: 550914, BD) ilave edilerek tüpler, 20 dk buz içinde bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda 1200 RPM'de 5 dk santrifüj yapılmış ve pellet 2 kez 500 µl PBS ile yıkanmıştır. Son yıkamadan sonra hücre pelleti PBS içinde 5 µL antibody ile 30 dakikalık inkübasyondan sonra PBS ile yıkama işleminin ardından örnekler akış sitometri cihazında (Accuri C6, BD) okunarak analiz edilmiştir.

4.2.5.6. EMT yolağına ilişkin genlerin mRNA ekspresyon seviyelerinin RT-PCR yöntemi ile belirlenmesi

A549 hücreleri ile M1, M2a ve M2c polarize makrofajlar ile oluşturulan ko-kültür modelinde öncelikle epitelyal mezenkimal değişimin varlığını kanıtlamak amacıyla vimentin, fibronektin, E-kaderin, NF-kB, VEGF ve CCL-17 mRNA ekspresyon düzeyleri gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) yöntemi ile belirlenmiştir.

Ko-kültür yöntemlerinde uygulanan konsantrasyonlar ve inkübasyon sürelerinden sonra A549 hücrelerinden total RNA, izolasyon robotu (Magna Pure Compact, Roche) kullanılarak izole edilmiştir. RNA verimi 260 nm ve 280 nm optik dansitede, nanodrop spektrofotometrik ölçüm yapılarak belirlenmiştir. Daha sonra cDNA sentezi için her bir örnekten eşit miktarda RNA (100 ng/örnek) kullanılmıştır.

cDNA sentezi için Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis kit (katalog no:05091284001, Roche) prosedürü uygulanmıştır. PCR tüplerine örnek başına 100 ng total RNA, 1 µl Oligo (dT)18 primeri (2.5 µM) koyularak toplam hacim 11.4 µl'ye steril distile su ile tamamlanmıştır. Tüpler PCR Thermal Cycler'da 10 dakika 65°C'de denature edilmiştir. Tüplerin içeriğine, 4 µl Transcriptor High Fidelity Reverse Transcriptase Reaction Buffer (1X ve 8 mM MgCl₂ içerir), 0.5 µl RNase inhibitörü (20 U), 2 µl dNTP karışımı (her biri 10mM), 1 µl DTT (5mM), 1.1 µl Transcriptor High Fidelity Reverse Transcriptase (10 U) ilave edilerek toplam hacim 20 µl'ye tamamlanmıştır. Daha sonra tüpler PCR Thermal Cycler'da 55°C'de 30 dk, 85 °C'de 5dk inkübe edilmiştir. Elde edilen cDNA'lar, Real Time-PCR yönteminde genlerin amplifikasyon düzeylerini belirlemek için kullanılmıştır. RT-PCR yöntemi, cihaza uygun kit (Syber Green Master Mix, Roche) ve primerler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Housekeeping gen olarak GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) kullanılmıştır. Grupların vimentin, fibronektin, E-kaderin, NF-kB, VEGF ve CCL-17 genlerinin mRNA ifade seviyeleri, kontrol grubu ile karşılaştırmalı olarak analiz edilmiştir (Engür ve Dikmen, 2017).

Tablo 4.4. Genlerin dizilimleri.

Genler	Kısa adı	Baz Dizisi (Forward Primer- Reverse Primer)
Vimentin	VIM	Forward: 5'- GGACCAGCTAACCAACGACA -3' Reverse: 5'- AAGGTCAAGACGTGCCAGAG -3'
Fibronektin	FN1	Forward: 5'- CCCTGATTGGAACCCAGTCC -3' Reverse: 5'- CTGTCACACGAGCCCTTCTT -3'
E-kaderin	CDH1	Forward: 5'- AGCTCTGCTGCCTCGTCTAT -3' Reverse: 5'- GGCCTCTCTTGGTTAGGAGG -3'
Nükleer Faktör Kappa B	NF-kB	Forward: 5'- CGCCGCTTAGGAGGGAGA -3' Reverse: 5'- GGTATGGGCCATCTGCTGTT -3'
Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü	VEGF-A	Forward: 5'- GCAAGACAAGAAAAATGTGACAA-3' Reverse: 5'- TGGTTTCTGTATCGATCGTTCT-3'
Kemokin (C-C motif) ligandı-17	CCL-17	Forward: 5'- TGTTCGGACCCCAACAACAA -3' Reverse: 5'- TAGTCCCGGGAGACAGTCAG -3'

4.2.5.7. Akış sitometride TNF-alfa ve IL-10 sitokin seviyelerinin EMT yolağına ilişkin etkilerinin belirlenmesi

EMT yolağıının aktive olup olmadığının belirlenmesi amacıyla A549 hücreleri ile M1, M2a ve M2c polarize makrofajlar kullanılarak oluşturulan ko-kültür gruplarından inkübasyon süreleri sonunda toplanan hücre süpernatantlarından TNF-alfa ve IL-10 sitokin seviyeleri akış sitometri yöntemi kullanılarak belirlenmiştir.

Bu yöntem için ‘insan inflamasyon sitokin kiti’ (BD 551811) kullanılmıştır. Kit içinde bulunan TNF- α , interlökin-10 düzeyleri kit prosedürüne uygun olarak belirlenmiştir. Bu amaçla, önce kit içinde bulunan sitokin standartları 1:2-1:256 aralığında dilüe edilmiş ve üzerine 300 μ L dilüsyon tamponu eklenerek cihazda okumaları gerçekleştirilmiştir. Standartların ardından, -80°C saklanmış olan örneklerle ait süpernatantların sitokin seviyelerini belirlemek amacıyla kit prosedüründe belirtilen yıkama ve inkübasyon işlemlerine gerçekleştirilmiş ve 1.5 saat boyunca sitokin boncuklarını içeren kitle süpernatantlar inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra tekrar yıkama işlemi yapılmış ve tekrar santrifüj edildikten sonra örneklerin sitokin seviyeleri akış sitometri cihazı (Accuri C6, BD) kullanılarak ölçülmüş ve FCAP Array Software kullanılarak veriler analiz edilmiştir.

4.2.5.8. Vimentin ve e-kaderin seviyelerinin belirlenmesi

Epitelyal-mezenkimal değişim süreci birçok efektör tarafından uyarılır ve düzenlenir. Bu efektörler büyüme faktörleri, sitokinler ve ekstrasellüler matriks bileşenleridir. Bu süreç E-kaderin gibi epitel belirteçlerin kaybı, vimentin gibi mezenkimal belirteçlerin artmasıyla karakterizedir (Mizutani vd., 2010)

Hücrelerde E-kaderin ve vimentin seviyelerini belirlemek amacıyla antikorlar için uygun olan fiksasyon, permeabilizasyon ve immün boyama protokolü uygulanmıştır. Hücrelerin fiksasyon ve permeabilizasyonu için 500 μ L cytofix/cytoperm solüsyonu (Katalog no: 550914, BD) kullanılmıştır. Bu amaçla E-kaderin monoklonal antibody (E-Cadherin (4A2) Mouse mAb, Katalog no: 14472, Cell Signaling) ve E-kaderine uygun sekonder antibody için de Anti-mouse Alexa Fluor 488 (Katalog no: ab150113, Abcam) kullanılmıştır. Yine aynı şekilde vimentin seviyelerinin belirlenmesi için de vimentin monoklonal antibody (Vimentin (D21H3) XP® Rabbit mAb, Katalog no:5741, Cell Signaling) ve vimentine uygun sekonder antibody için de Anti-rabbit Alexa Fluor 594 (Anti-rabbit IgG (H+L), F(ab')₂ Fragment (Alexa Fluor® 594 Conjugate, Katalog No:8889, Cell Signaling) kullanılmıştır. Dilüsyon oranları; E-kaderin için 1:400,

Vimentin için 1:50 olarak uygulanmıştır. Dilüsyon için İmmüno Floresan Uygulama Çözümleri Kit (Immunofluorescence Application Solutions Kit, Katalog no: 12727, Cell Signaling) içeriğinde bulunan antibody dilüsyon buffer kullanılmıştır.

A549 kontrol ve M2a, M2c ko-kültür gruplarında vimentin ve E-kaderin seviyeleri akış sitometride (Accuri C6, BD) okutularak analiz edilmiştir. Daha sonra daha anlamlı bulunan M2c makrofaj ko-kültür gruplarında, vimentin ve E-kaderin seviyelerinin immünfloresans yöntemiyle görüntülenmesi Cytation 3 Cell İmaging Multi-mode Reader'da yapılmıştır.

4.3. 3D Hücre Kültürü Çalışmaları

4.3.1. 3 Boyutlu (3D) hücre kültür modeli

3D kültür ortamı oluşturmak için 'AlgiMatrix® 3D Kültür Sistemi' kullanılmıştır. Bu sistem 3 boyutlu hücre kültürünün oluşumunu kolaylaştıran biyolojik bir iskelet görevi görmektedir. Her biyolojik iskelet yaklaşık 50-200 µm gözenek boyutuna sahip bir aljinat süngerdir. Bu sünger iskelet ortamında yetiştirilen hücreler, normal hücre morfolojisi ve davranışıyla daha yakından eşleşir ve toksikoloji, ilaç geliştirme, kanser araştırması gibi birçok araştırma alanında 3D hücre kültürü modelleri için uygun bir ortam sağlar. Tez çalışmamızda AlgiMatrix® 3D Kültür Sisteminin özel 96 ve 6 kuyucuklu plakalarını kullanarak A549 hücreleri ile 3D hücre kültür modeli oluşturulmuştur. Bu bağlamda öncelikle A549 hücrelerinin 96 kuyucuklu plakalara ekilmesi amacıyla şu sıra izlenmiştir;

- Hücreler standart hücre kültürü ortamında süspansiyon haline getirilmiş ve daha sonra besiyeri içine %10 AlgiMatrix® Sıkılaştırıcı Tampon eklenmiştir.
- Bu aşamada hücreler sayılarak her bir kuyucukda 2×10^4 olacak şekilde sıkılaştırıcı tampon içeren besiyeri içinde ekim yapılmıştır (Hücre sayısı AlgiMatrix® 3D Kültür Sistemi kullanım önerilerine göre belirlenmiştir).
- Hücrelerin süngerlerin içine inoküle olmasını sağlamak amacıyla plaka 100 x g'de 4 dakika santrifüj edilmiştir.
- Son olarak, Şıkıştırma Tamponu olmadan her süngerin üst kısmına 100 µL ek hacimlerde besiyeri eklenerek plaka inkübasyona bırakılmıştır. Ekim günü 0. gün olarak kabul edilerek; 3, 5 ve 7. günlerde hücreler fotoğraflanarak oluşan sferoidlerin çapları ölçülmüştür. Hücrelerin fotoğrafları Leica DM 300 Inverted mikroskop ile sferoidlerin alanlarının analizi için 3, 5 ve 7. günler olmak üzere en

az 5 sferoid bulunan 5 adet fotoğraf olmak üzere toplamda 25 fotoğraf rasgele çekilmiştir. Sferoidlerin alanı Leica DM analiz programı ile μm^2 cinsinden ölçülmüştür. Sıfırıncı gün sferoid oluşumu başlamadığı için analize dahil edilmemiştir.

4.3.2. A549 hücrelerinde 2D ve 3D kültür yöntemlerinde bortezomib ve ixazomibin sitotoksik etkilerinin belirlenmesi

A549 %10'luk Fetal Bovine Serum ve %1 Penisilin-streptomisin içeren RPMI-1640 ortamında, 37°C'de %5 CO₂ inkübatöründe kültüre edilmişlerdir. A549 hücreleri yeterince çoğaldıktan sonra hücre sayımı yapılarak, 96 kuyucuklu plakalara her bir kuyucukta 20.000 hücre (3D kültür plakasına ekilen sayılara paralel olarak) olacak şekilde hem 2D kültür hem 3D kültür plakasına besiyeri ortamında ekilmiş ve 7 gün inkübasyona bırakılmışlardır (3D kültür plakalarında A549 hücrelerinin sferoid oluşumu önceden optimize edildi ve 7 gün olarak belirlendi). Daha sonra bortezomib ve ixazomib konsantrasyonları (0.1, 1, 10, 100 ve 400 μM) 48 saat uygulanarak hücre canlılığına olan etkisi belirlenmiş ve IC₅₀ değerleri excel programı kullanılarak hem 2D hem 3D kültür için hesaplanmıştır.

4.4. İstatistiksel Değerlendirmeler

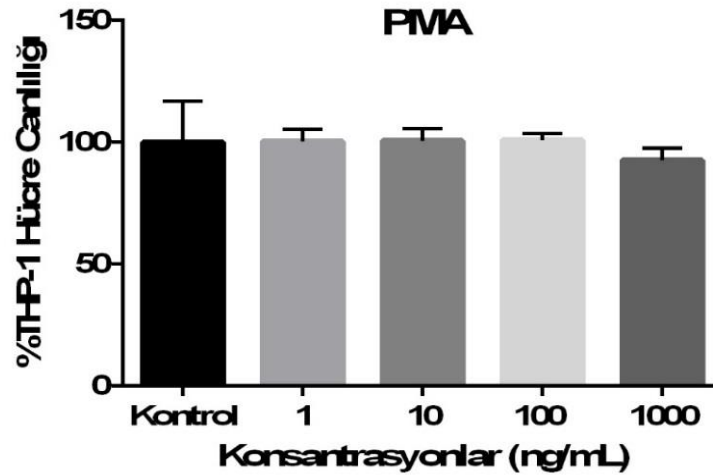
İstatistiksel değerlendirmeler ve grafiklerin çizilmesi için GraphPad Prism 6.0 programı kullanılmıştır. Elde edilen veriler tek yönlü ANOVA ile post-hoc olarak Tukey testi uygulanarak analiz edilmiştir. Anlamlılık değerleri; $p>0.05$ fark yok, $p<0.05^*$ fark var, $p<0.01^{**}$ anlamlı fark var, $p<0.001^{***}$ önemli fark var ve $p<0.0001^{****}$ çok önemli fark var olarak değerlendirilmiştir.

5. BULGULAR ve TARTIŞMA

5.1. 2D Hücre Kültürü Çalışmalarının Değerlendirilmesi

5.1.1. WST-1 yöntemi THP-1 hücrelerinde PMA'nın sitotoksik etkilerinin değerlendirilmesi

THP-1 hücre hattı içeriğinde 2 mM L-glutamin, 10 mM HEPES, 1 mM sodyum pürivat, 4500 mg/L glukoz ve 1500 mg/L sodyum bikarbonat, %1 penisilin-streptomisin, %10 fetal sıgır serumu bulunan RPMI-1640 medyum besiyerinde kültüre edilmiştir. Hücreler 96 kuyucuklu plakalara, her bir kuyucukta 10.000 hücre olacak şekilde besiyeri ortamında ekilmiş ve PMA konsantrasyonlarının (1, 10, 100 ve 1000 ng/mL) WST-1 yöntemi ile 24 saatlik inkübasyonlarda hücre canlılığına olan etkisi araştırılmıştır (Şekil 5.1).



Şekil 5.1. PMA konsantrasyonlarının THP-1 hücrelerinde WST-1 yöntemine göre hesaplanan 24. saatteki % hücre canlılık değerleri ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi (kontrol: %0.1 DMSO, $n=8$, ortalama±standart sapma, $p>0.05$ fark yok).

THP-1 hücrelerinde 24. saatteki % canlılık değerleri, kontrole göre 1, 10, 100, 1000 ng/mL PMA konsantrasyonlarında sırasıyla 100.44, 100.65, 100.98 ve 92.66 olarak hesaplanmıştır. İstatistiksel olarak, kontrol grubuna göre hiçbir grupta anlamlılık belirlenmemiştir. Bu sonuca göre, THP-1 hücrelerinin M0 makrofaja dönüşümünde 24 saatlik inkübasyon süresince uygulanacak olan 100 ng/mL PMA'nın toksik etkisinin olmadığı belirlenmiştir.

Yapılan bazı çalışmalarda THP-1 hücrelerinde PMA konsantrasyonu için; 30 ng/mL (Bongiovanni vd., 2015), 10 ng/mL (Smith vd., 2015), 500 ng/mL (Sueki vd.,

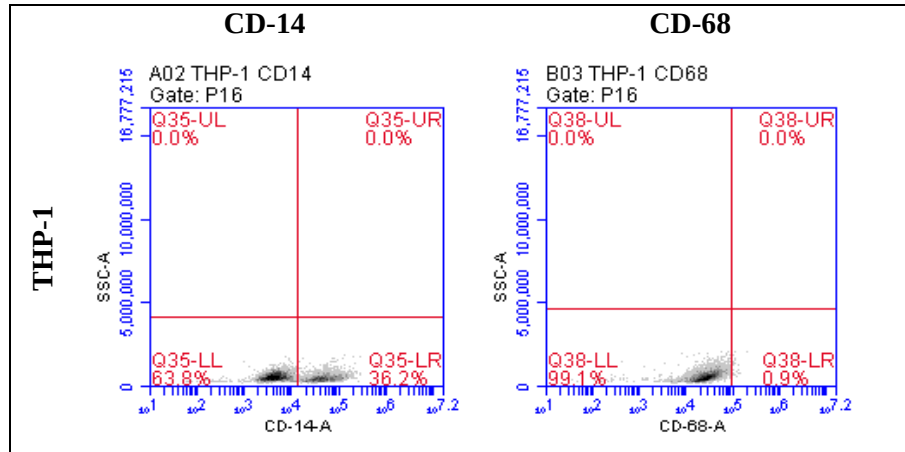
2014) kullanıldığı görülmüştür. Bu nedenle bizim kullandığımız ve hücrelerde sitotoksik etkinin görülmediği 100 ng/mL PMA konsantrasyonu, bu çalışmalarda kullanılan PMA konsantrasyonları arasındadır.

5.1.2. THP-1 hücrelerinin makrofaja dönüştürülmesi optimizasyon çalışmalarının değerlendirilmesi

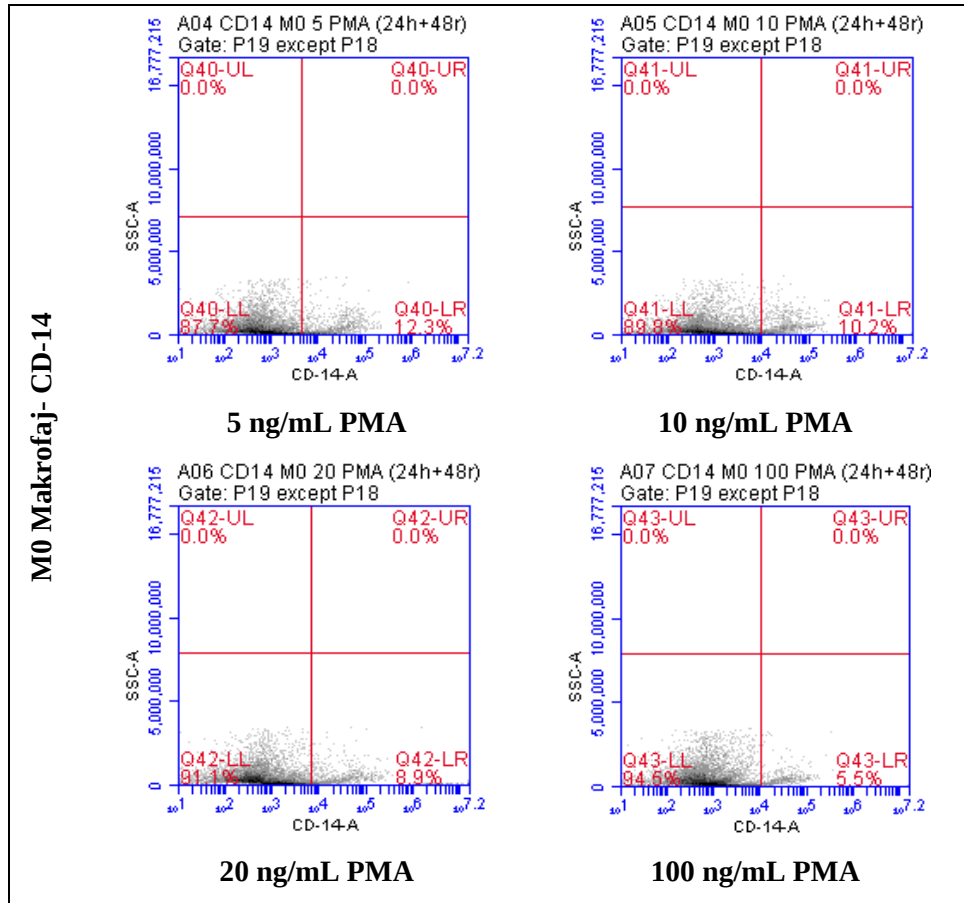
Bu çalışmalar öncelikle THP-1 hücrelerinin makrofaja (M0) farklılaşması için uygun PMA konsantrasyonun seçilmesi ve daha sonra ise M0 makrofajın M1, M2a ve M2c makrofaja polarize olması amacıyla farklılaşmada kullanılacak ajanların (M1 için; IFN- γ ve LPS, M2a için; IL-4 ve IL-13, M2c için; hidrokortizon) uygun konsantrasyon ve inkübasyon sürelerini belirlemek amacıyla yapılmıştır.

5.1.2.1. THP-1 ve THP-1 kökenli makrofaj dönüşümünde CD-14 ve CD-68 antikor seviyelerinin akış sitometri yöntemi ile değerlendirilmesi

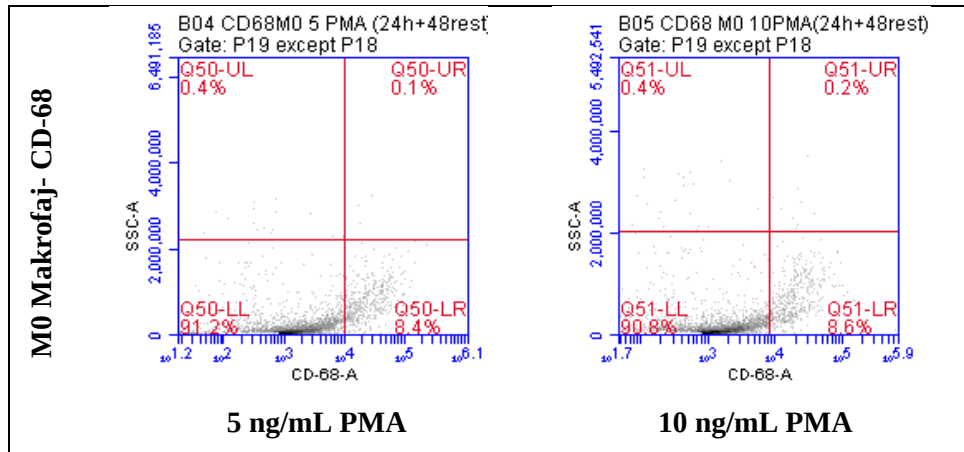
THP-1 insan monosit hücrelerini M0 makrofaj hücrelerine farklılaştırmada kullanılacak en uygun PMA konsantrasyonunu belirlemek amacıyla PMA'nın 5, 10, 20 ve 100 ng/mL konsantrasyonları 24 saatlik inkübasyon süresince uygulanmıştır. Daha sonra hücreler PMA'nın etkisini elemine etmek amacıyla taze besiyeri ile 48 saatlik dinlenme inkübasyonuna bırakılmışlardır. Kontrol grubu olarak THP-1 hücrelerinde, aynı sürelerde ve ortamlarda bekletildikten sonra PMA uygulaması yapılmadan akış sitometri yöntemiyle CD-14 ve CD-68 seviyeleri belirlenmiş ve **Şekil 5.2** ve **Tablo 5.1**'de gösterilmiştir. Farklılaşmanın kontrolü için M0 hücrelerinde, CD-14 (THP-1 belirteci) ve CD-68 (M0 belirteci) antikorları akış sitometri yönteminde belirlenmiş ve **Şekil 5.3, 5.4** ve **Tablo 5.1**'de gösterilmiştir.



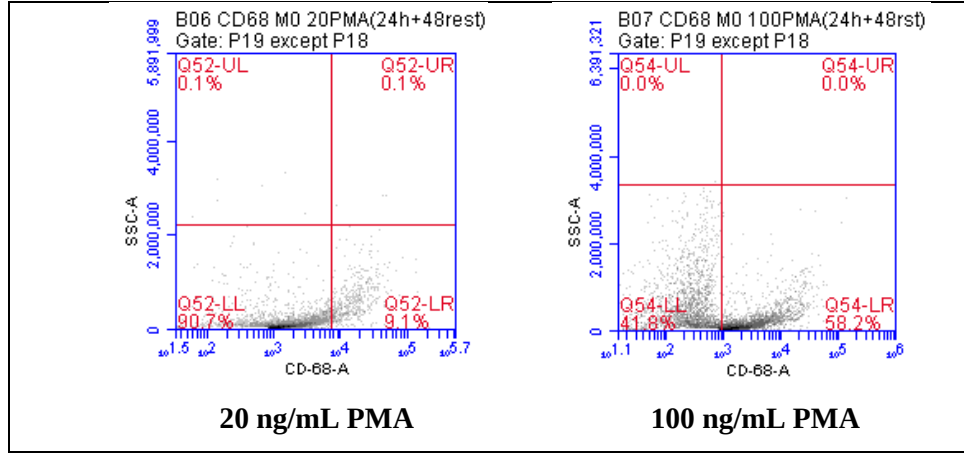
Şekil 5.2. THP-1 hücrelerinde (kontrol) akış sitometri yöntemi ile belirlenen CD-14 ve CD-68 seviyeleri.



Şekil 5.3. Farklı konsantrasyonlarda PMA uygulaması ile farklılaştırılan THP-1 kökenli makrofajlarda (M0), CD-14 seviyelerinin akış sitometri yöntemi ile belirlenmesi.



Şekil 5.4. Farklı konsantrasyonlarda PMA uygulaması ile farklılaştırılan THP-1 kökenli makrofajlarda (M0), CD-68 seviyelerinin akış sitometri yöntemi ile belirlenmesi.



Şekil 5.4. (Devam) Farklı konsantrasyonlarda PMA uygulaması ile farklılaştırılan THP-1 kökenli makrofajlarda (M0), CD-68 seviyelerinin akış sitometri yöntemi ile belirlenmesi.

Tablo 5.1. Farklı konsantrasyonlarda PMA uygulaması ile farklılaştırılan THP-1 kökenli Makrofajlarda (M0) CD-68 ve CD-14 seviyeleri.

	THP-1		M0		
	(Kontrol)		(Farklılaşma)		
PMA (ng/mL)	THP-1	5	10	20	100
CD-14 (THP-1 Marker)	%36.2	% 12.3	%10.2	%8.9	%5.5
CD-68 (M0 Marker)	%0.9	%8.4	%8.6	%9.1	%58.2

Şekil 5.2 ve Tablo 5.1’de görüldüğü gibi, THP-1 hücrelerine özgü bir belirteç olan CD-14 seviyeleri kontrol grubunda %36.2 pozitif olarak belirlenmiştir. Makrofaj belirteci olan CD-68 ise THP-1 kontrol hücrelerimizde bulunmamıştır (%0.9). Bu sonuç bize deneylerde kullandığımız THP-1 hücrelerimizin sağlıklı ve kullanılabilir olduğunu göstermektedir.

Makrofaja farklılaştırma sürecinde kullanılacak olan PMA konsantrasyonunu belirlemek amacıyla yine CD-14 ve CD-68 seviyeleri analiz edilmiştir. Akış sitometri sonuçlarına göre en düşük CD-14 (%5.5) ve en yüksek CD-68 (%58.2) seviyesi sonuçları ile 100 ng/mL PMA bizim THP-1 hücrelerini farklılaştırmak için kullanacağımız konsantrasyon olarak belirlenmiştir (Şekil 5.3 ve 5.4, Tablo 5.1).

Kapsamlı bir literatür taraması yapıldığında makrofaj hücreleri ile kanser hücrelerinin ko-kültür ortamında *in vitro* çalışmalarda, THP-1 insan monosit hücrelerinin; forbol 12-miristat 13-asetat (PMA), 1 α , 25-dihydroxy vitamin D3, makrofaj koloni uyarıcı faktör (M-CSF) gibi çeşitli uyarıcı ajanlarla makrofaj hücrelerine farklılaştığı rapor edilmiştir. Literatür bilgileri ışığında PMA'nın, THP-1 monosit türevi makrofaj elde

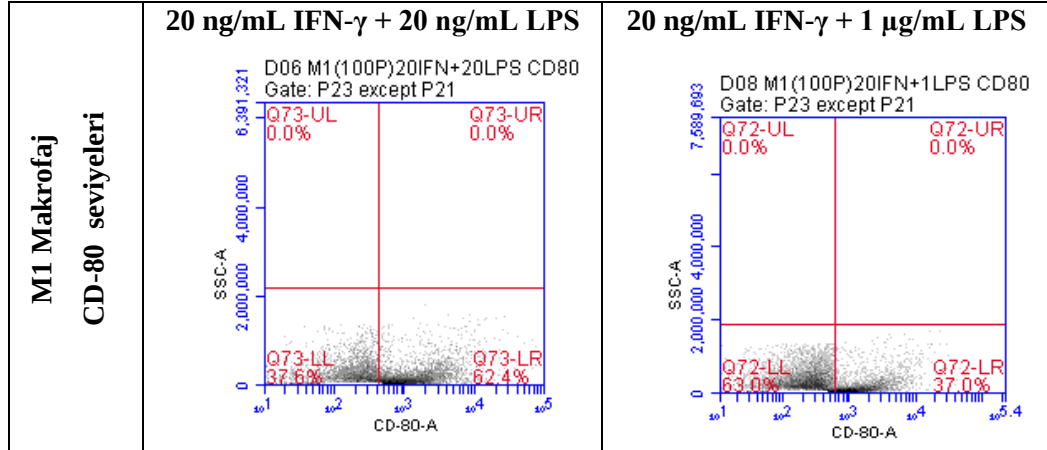
etmek için en etkili farklılaşma ajanı olduğu açıklanmıştır (Chanput vd., 2012; Bastiaan-Net vd., 2013; Chanput vd., 2014). THP-1, monosit / makrofaj fonksiyonlarını, mekanizmaları, sinyal yollarını ve besin ve ilaç etkisini incelemek için yaygın olarak kullanılan bir insan lösemi monositik hücre hattıdır. Bu hücre hattı, monosit ve makrofaj aktivitelerinin modülasyonunu araştırmak için ortak bir modeldir. Bu nedenle THP-1 kökenli makrofajlar, *in vitro* hücre-hücre etkileşimini incelemek için bir en uygun seçeneklerden biridir ve *in vivo* koşulları daha iyi taklit için çalışmalarda önemli bir model olarak önerilmektedir (Chanput vd., 2014).

Çalışmamızda belirlediğimiz PMA konsantrasyonu ve inkübasyon süresi birçok çalışma ile paralellik göstermektedir. Yapılan bir çalışmada THP-1 hücrelerinin M0 makrofaja farklılaşması için 100 ng/mL PMA konsantrasyonu 48 saatlik inkübasyon süresinde uygulanmıştır (Zhang vd., 2015). Bizim sonuçlarımızla özellikle paralel olarak, THP-1 hücrelerinin makrofaja farklılaşmasının yapıldığı bir çalışmada PMA'nın 100 ng/mL konsantrasyonu 24 saat inkübasyon süresinde uygulanmış ve ardından hücreler 24 saat dinlenme inkübasyonuna bırakılmıştır (Chanput vd., 2013). Bu çalışmaların dışında sırasıyla birçok çalışmada PMA, THP-1 hücrelerinin M0 makrofaja farklılaşması için farklı birçok konsantrasyonda kullanılmıştır. Bunlar 30 ng/mL PMA ile 24 saat inkübasyon (Bongiovanni vd., 2015), 500 ng/mL PMA ile 96 saat inkübasyon (Sueki vd., 2014), 150 nM PMA ile 24 saat inkübasyon (Genin vd., 2015) ve 100 nM PMA ile 48 saat inkübasyon (Zhou vd., 2015) olarak rapor edilmiştir.

5.1.2.2. THP-1 kökenli makrofaj hücrelerinin M1, M2a ve M2c polarize alt tiplerine farklılaştırma çalışmalarının değerlendirilmesi

Tez çalışmamızda M0 makrofaj hücreleri %1 serumlu besiyerinde PMA'nın 100 ng/mL konsantrasyonu 24 saat boyunca uygulanarak farklılaştırılmış (konsantrasyon CD-14 ve CD-68 akış sitometri sonuçlarına göre belirlenmiştir) ve daha sonra diğer deneylere geçmeden önce hücreler, 48 saat PMA'dan uzaklaştırmak amacı ile normal besiyerinde dinlenme inkübasyonuna bırakılmıştır. Daha sonra M1 polarize makrofajların optimizasyonu için sırasıyla IFN- γ ve LPS'nin farklı konsantrasyonları 24 saatlik inkübasyon süresince uygulanmış (20 ng/mL IFN- γ + 20 ng/mL LPS veya 20 ng/mL IFN- γ + 1 μ g/mL LPS) ve M1 belirteci olan CD-80 antikoru seviyeleri akış sitometri yöntemiyle belirlenmiştir (Şekil 5.5 ve Tablo 5.2). M2a polarize makrofajlar ise IL-4 ve IL-13 sitokinleri ile uyarılarak farklılaştırıldıktan sonra belirteç olarak CD-206 ve CD-

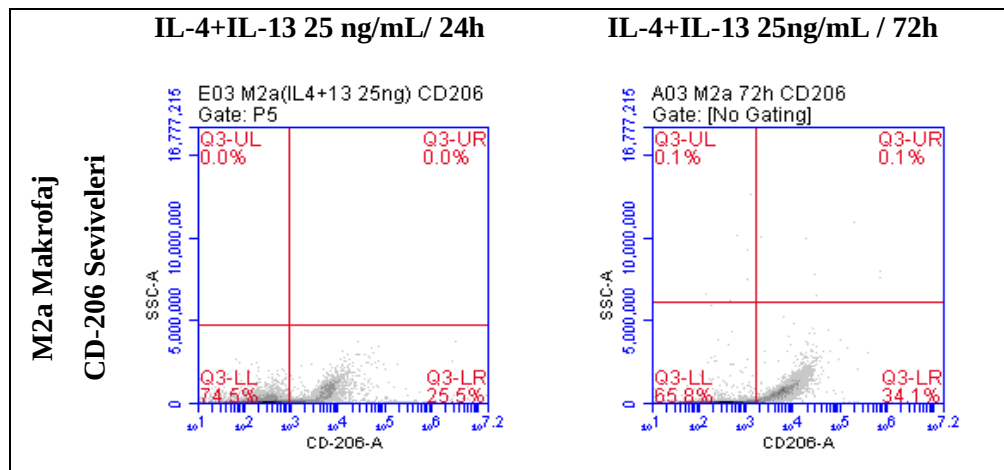
23 seviyeleri belirlenmiştir (Şekil 5.6 ve Tablo 5.3). Son olarak da M2c polarize makrofaj dönüşümü için hidrokortizon konsantrasyonları (1 ve 10 μ M) ile optimizasyon çalışmaları yapılarak CD-206 ve CD-163 seviyeleri akış sitometride belirlenmiştir (Şekil 5.7 ve Tablo 5.4). Sonuçlar Şekil 5.5, 5.6, 5.7 ve Tablo 5.2, 5.3 ve 5.4'te gösterilmiştir.



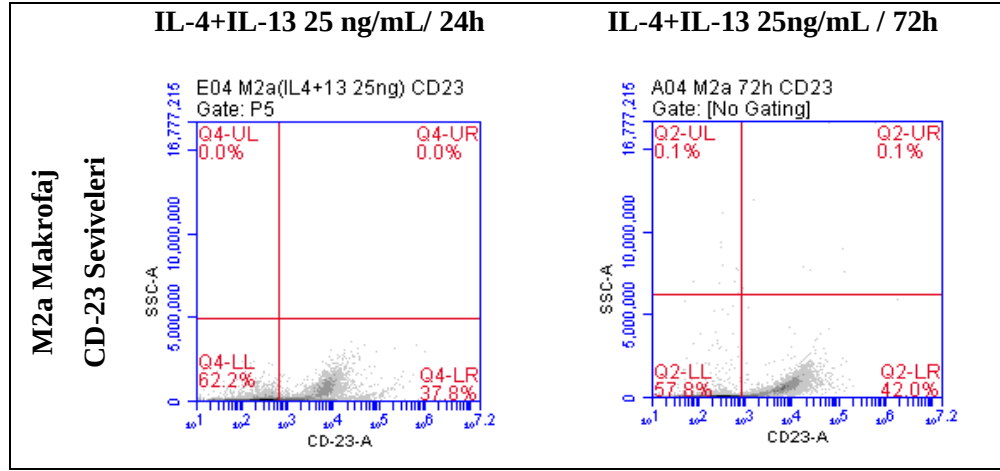
Şekil 5.5. IFN- γ ve farklı LPS konsantrasyonları ile 24 saat inkübasyon sonucu farklılaştırılan M1 polarize makrofajlarda CD-80 seviyelerinin akış sitometri yöntemi ile belirlenmesi.

Tablo 5.2. IFN- γ ve farklı LPS konsantrasyonları ile farklılaştırılan M1 polarize makrofajlarda akış sitometri yöntemi ile belirlenen CD-80 seviyeleri.

Konsantrasyonlar	20 ng/mL IFN- γ + 20 ng/mL LPS	20 ng/mL IFN- γ + 1 μ g/mL LPS
CD-80 (M1 marker)	%62.4	%37.0



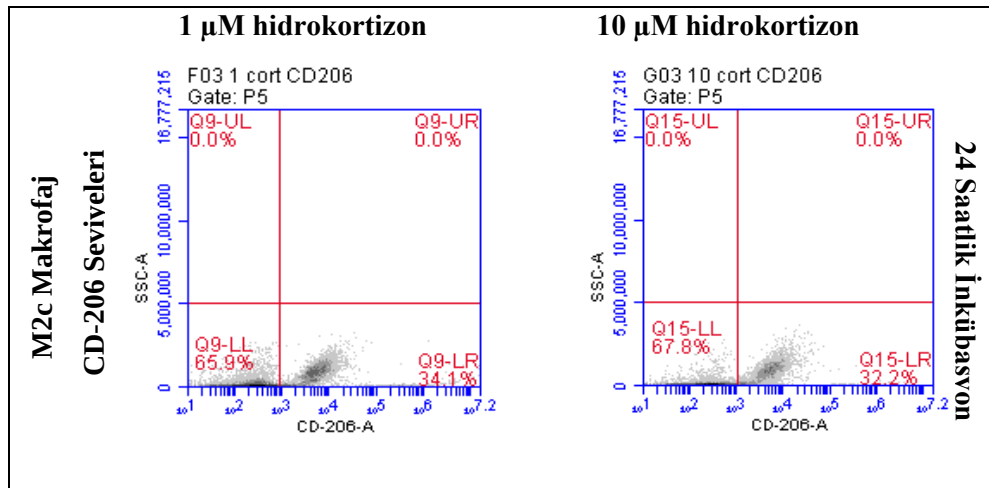
Şekil 5.6. IL-4 ve IL-13 (25 ng/mL) konsantrasyonları ile 24 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri sonunda farklılaştırılan M2a polarize makrofajlarda CD-206 ve CD-23 seviyelerinin akış sitometri yöntemi ile belirlenmesi.



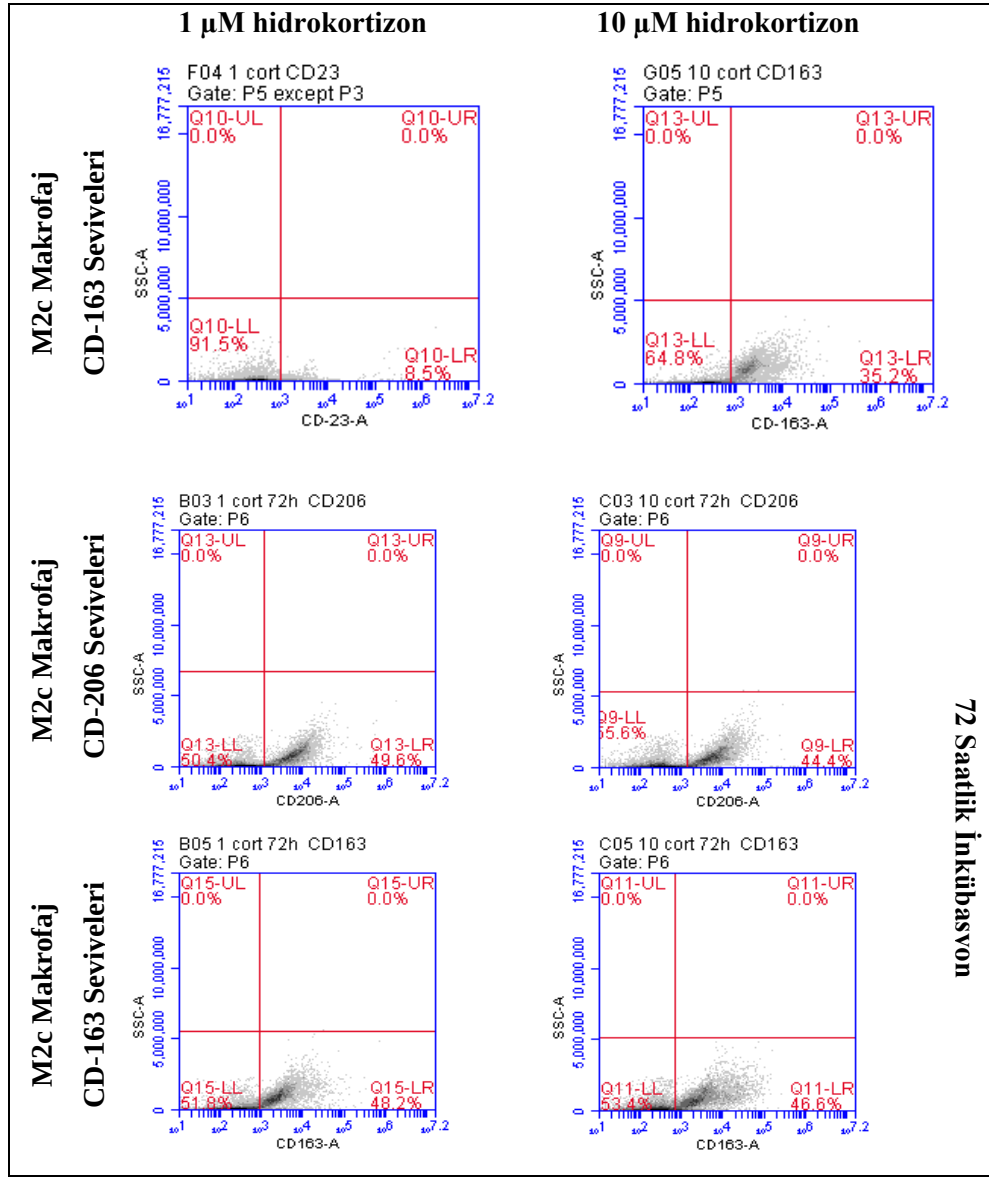
Şekil 5.6. (Devam) IL-4 ve IL-13 (25 ng/mL) konsantrasyonları ile 24 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri sonunda farklılaştırılan M2a polarize makrofajlarda CD-206 ve CD-23 seviyelerinin akış sitometri yöntemi ile belirlenmesi.

Tablo 5.3. IL-4 ve IL-13 konsantrasyonları ile farklılaştırılan M2a polarize makrofajlarda akış sitometri yöntemi ile belirlenen CD-206 ve CD-23 seviyeleri.

Konsantrasyonlar	IL-4+IL-13 25ng/mL/ 24h	IL-4+IL-13 25ng/mL/ 72h
CD-206 (M2 marker)	%25.5	%34.1
CD-23 (M2a marker)	%37.8	%42.0



Şekil 5.7. Hidrokortizon konsantrasyonları (1 ve 10 µM) ile 24 ve 72 saatlik inkübasyon sonunda farklılaştırılan M2c polarize makrofajlarda CD-206 ve CD-163 seviyelerinin akış sitometri yöntemi ile belirlenmesi.



Şekil 5.7. (Devam) Hidrokortizon konsantrasyonları (1 ve 10 μ M) ile 24 ve 72 saatlik inkübasyon sonunda farklılaştırılan M2c polarize makrofajlarda CD-206 ve CD-163 seviyelerinin akış sitometri yöntemi ile belirlenmesi.

Tablo 5.4. Hidrokortizon konsantrasyonları ile farklılaştırılan M2c polarize makrofajlarda akış sitometri yöntemi ile belirlenen CD-206 ve CD-163 seviyeleri.

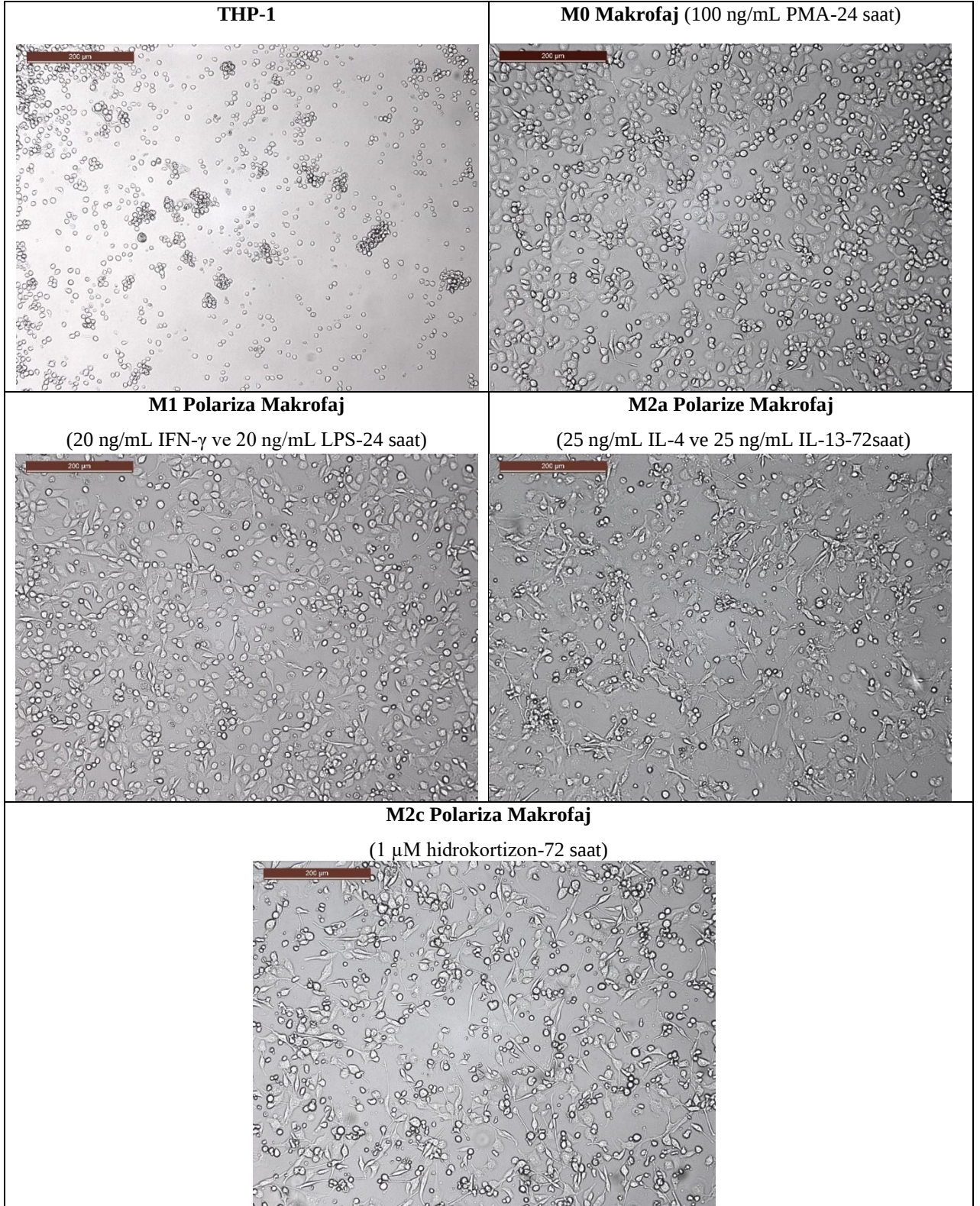
Hidrokortizon	1 μ M /24h	10 μ M /24h	1 μ M /72h	10 μ M /72h
Konsantrasyonları				
CD-206 (M2 marker)	%34.1	%32.2	%49.6	%44.4
CD-163 (M2c marker)	%8.5	%35.2	%48.2	%46.6

Şekil 5.5 ve **Tablo 5.2**'de görülen sonuçlara göre, M1 polarize makrofajların optimizasyonu için kullanılan 20 ng/mL IFN- γ +20 ng/mL LPS konsantrasyonlarında CD-80 seviyeleri %62.4, 20 ng/mL IFN- γ +1 μ g/mL LPS konsantrasyonlarında ise %37.0 olarak analiz edilmiştir. Bu sonuca göre de M1 polarizasyonu için CD-80 seviyesinin daha yüksek olduğu için 20 ng/mL IFN- γ +20 ng/mL LPS konsantrasyonu 24 saatlik inkübasyon süresince uygulanmak üzere belirlenmiştir.

Şekil 5.6 ve **Tablo 5.3**'te M2a polarizasyonu için IL-4+IL-13 25ng/mL konsantrasyonunun, 24 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri denenmiş ve CD-206 ve CD-23 seviyeleri belirlenmiştir. Bu sonuçlara bakıldığında CD-206 seviyeleri 24 ve 72 saatlik inkübasyonlarda sırasıyla %25.5 ve %34.1 ve CD-23 seviyeleri de sırasıyla, %37.8 ve %42.0 olarak analiz edilmiştir. Sonuç olarak M2a polarizasyonu için en yüksek CD-206 ve CD-23 seviyelerinin elde edilmesini sağlayan IL-4+IL-13 25ng/mL konsantrasyonu 72 saatlik inkübasyon süresince uygulanmak üzere belirlenmiştir.

Şekil 5.7 ve **Tablo 5.4**'te ki sonuçlar ise M2c polarizasyonu için hidrokortizon konsantrasyonun ve inkübasyon süresinin belirlenmesi için CD-206 ve CD-163 seviyelerinin analizi yapılmıştır. Bu sonuçlara göre 1 ve 10 μ M hidrokortizon konsantrasyonlarının CD-206 seviyeleri sırasıyla 24 saat için; %34.1, %32.2 ve 72 saat için de; %49.6, %44.4 ve CD-163 seviyeleri 24 saat için; %8.5, %35.2, 72 saat için de; %48.2 ve %46.6 olarak analiz edilmiştir. Bu sonuçlara göre M2c polarizasyonu için en yüksek CD-206 ve CD-163 seviyelerinin 1 μ M hidrokortizon ve 72 saatlik inkübasyon sonunda meydana geldiği belirlenmiştir.

Ayrıca M0, M1, M2a ve M2c makrofajları Leica Leica DM invert ışık mikroskobu ile fotoğraflanmış ve **Şekil 5.8**'da gösterilmiştir.



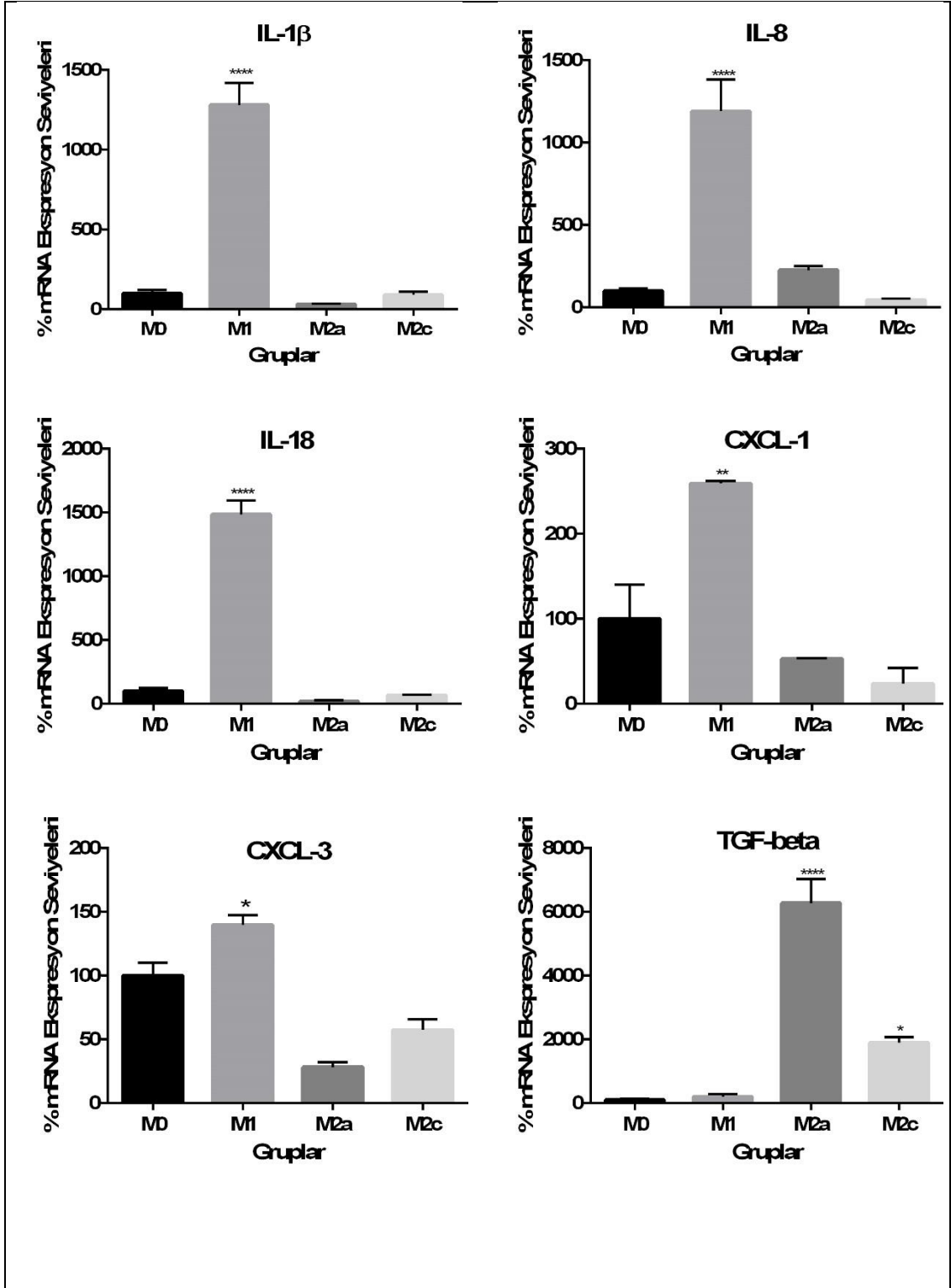
Şekil 5.8. THP-1, THP-1 kökenli makrofaj (M0), M1, M2a ve M2c polarize makrofaj hücrelerinin ışık mikroskop görüntüsü (MB:10X).

Makrofajların, IFN- γ varlığında ve LPS veya TNF- α gibi inflamatuvar uyarılarla kombinasyon halinde M1 fenotipine polarize olduğu birçok çalışmada bildirilmiştir

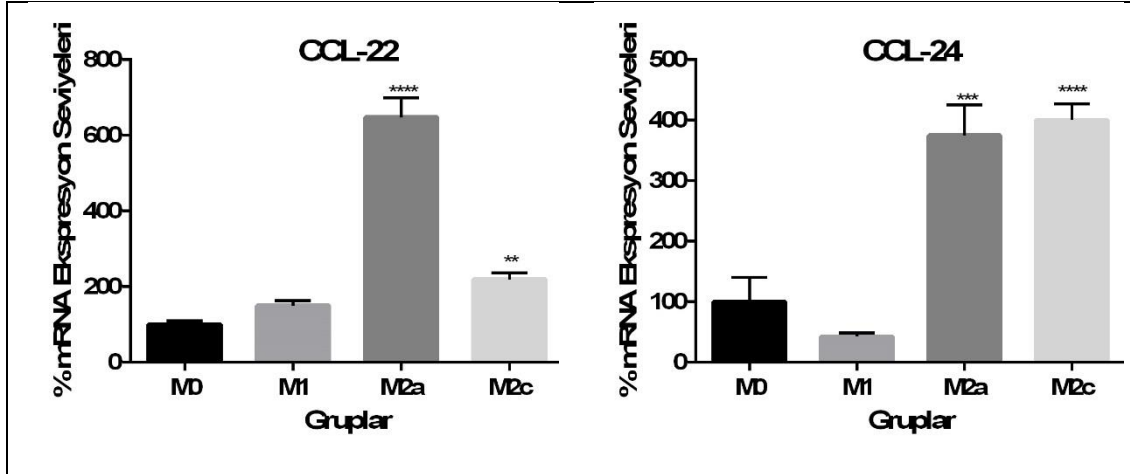
(Finnin vd., 1999; Verreck vd., 2006; Chanput vd., 2013; Yeung vd., 2015; Yuan vd., 2015; Zhang vd., 2015). Yeung ve diğerlerinin yaptığı bir çalışmada THP-1 hücrelerinin 25 ng/mL IFN- γ ve 150 ng/mL LPS ile 24 saat inkübasyonu sonunda M1 polarizasyonunun gerçekleştirildiği (Yeung vd., 2015) ve başka bir çalışmada da M0 makrofajların, M1 fenotipine farklılaşması için 20 ng ml IFN- γ + 1 mg/ml LPS ile 24 saatlik inkübasyona bırakıldığı (Chanput vd., 2013) bildirilmiştir. M2 makrofajları, farklı uyarılar ile M2a ve M2c makrofajlarına polarize edilirler. M2a polarizasyonunun, IL-4 ve IL-13 sitokinleri ile gerçekleştiği birçok çalışmada bildirilmiştir (Stein vd., 1992; de Waal Malefy vd., 1993; Varin ve Gordon, 2009; Gordon ve Martinez, 2010). Bu çalışmalarda kullanılan IL-14 ve IL-13 konsantrasyonlarının 20-25 ng/mL aralığında ve 24, 48 ve 72 saat inkübasyon sürelerinde olduğu belirlenmiştir (Genin vd., 2015; Smith vd., 2015; Yeung vd., 2015). M2c makrofajları ise IL-10, TGF- β , glukokortikoidler ile polarize olmaktadır (Foey, 2014; Tu vd., 2017; Huang vd., 2018,). Literatür çalışmaları sonucunda özellikle M2c polarize makrofaja ait kısıtlı sayıda literatür bilgisi olduğu ayrıca yapılan çalışmalarda THP-1 hücrelerinin M2c makrofaja farklılaştırılması sırasında IL-10 (20 ng/ml) kullanıldığı bildirilmiştir (Yuan vd., 2015; Chanput vd., 2013). Hidrokortizon kullanılarak M2c polarizasyonu yapılan çalışmaya ise rastlanılmamıştır. Bu yüzden M2c polarizasyonun bir glukokortikoid olan hidrokortizon ile yapılması ilk kez bu tez çalışmasında gösterilmiştir.

5.1.2.3. THP-1 kökenli makrofaj hücrelerinin M1, M2a ve M2c polarize alt türlerine farklılaştırılması çalışmalarının RT-PCR yöntemi ile değerlendirilmesi

Akış sitometri yöntemi ile belirlenen M0, M1, M2a ve M2c makrofajların farklılaşmasını desteklemek amacıyla bazı genlerin mRNA ekspresyon düzeyleri gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) yöntemi ile belirlenmiştir. Bu yöntemde RNA'dan cDNA sentezi ve kalıp cDNA'dan da IL-1 β , IL-8, IL-18, CXCL-1, CXCL-3, CCL-22, CCL-24, TGF- β amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir. Housekeeping gen olarak GAPDH kullanılmıştır. Sonuçlar 'Advanced Relative Quantification' programı (Software Release 1.5.0 SP4 version 1.5.0.39) kullanılarak analiz edilmiştir. Sonuçlar **Şekil 5.9**'te gösterilmiştir.



Şekil 5.9. M1 ve M2 (M2a, M2c) polarize makrofaj ilişkili genlere ait mRNA ekspresyonları (n=3, ortalama±standart sapma, M0 makrofaj grubuna göre istatistiksel anlamlılık: $p>0.05$ fark yok, $p<0.05$ *, $p<0.01$ **, $p<0.001$ ***, $p<0.0001$ ****).



Şekil 5.9. (Devam) M1 ve M2 (M2a, M2c) polarize makrofaj ilişkili genlere ait mRNA ekspresyonları (n=3, ortalama±standart sapma, M0 makrofaj grubuna göre istatistiksel anlamlılık: $p>0.05$ fark yok, $p<0.05^*$, $p<0.01^{**}$, $p<0.001^{***}$, $p<0.0001^{****}$).

Tablo 5.5. M1 ve M2 (M2a, M2c) polarize makrofaj ilişkili genlere ait mRNA ekspresyonlarının % normalize değerleri (M0 makrofaj gen ekspresyonları %100 kabul edilmiştir).

Genler	M1	M2a	M2c
IL-1 β	1282.2	32.7	90.9
IL-8	1191	226.9	45.3
IL-18	1486	19.1	66.8
CXCL-1	259	52.7	23.5
CXCL-3	139.6	28.2	57.3
TGF- β	202.5	6273.6	1895.5
CCL-22	150	647.6	219.8
CCL-24	42.8	374.75	400.2

Şekil 5.9 ve Tablo 5.5'te görüldüğü gibi, IL-1 β , IL-8, IL-18, CXCL-1 ve CXCL-3 mRNA ekspresyon seviyeleri M0 makrofaja göre, M1 polarize makrofajda sırasıyla 12.8, 11.9, 14.86, 2.59 ve 1.3 kat arttığı belirlenirken, aynı genlerin M2a ve M2c polarize makrofajlarda ise azaldığı belirlenmiştir. M1 polarize makrofajda özellikle IL-1 β , IL-8 ve IL-18 ekspresyon seviyelerindeki artış M0 makrofaja göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.0001^{****}$). CXCL-1 ve CXCL-3 ekspresyon seviyelerindeki artışlar ise sırasıyla $p<0.01^{**}$ ve $p<0.05^*$ olarak belirlenmiştir. Çalışmamızın sonucunda M1 polarize makrofaj belirteci anahtar genler olan IL-1 β , IL-8, IL-18, CXCL-1 ve CXCL-3, M0 makrofaja göre artış göstererek M1 polarize makrofaj farklılaşmasının doğruluğunu desteklemiştir. Yine M2 polarize makrofajlara özgü olan TGF- β , CCL-22 ve CCL-24

mRNA ekspresyon seviyeleri M0 makrofaja göre, M2a polarize makrofajlarda sırasıyla; 62.7, 6.4, 3.7 ve M2c polarize makrofajlarda sırasıyla; 18.9, 2.1, 4.0 kat artış göstermiştir. TGF- β , CCL-22 ve CCL-24 mRNA ekspresyon seviyeleri M2a ve M2c polarize makrofajlarda istatistiksel olarak önemli derece anlamlı bulunmuştur ($p<0.05^*$, $p<0.01^{**}$, $p<0.001^{***}$ ve $p<0.0001^{****}$). Bu çalışma sonucunda M0 makrofaja göre, M2 polarize makrofaj belirteci olan anahtar genler olan TGF- β , CCL-22 ve CCL-24, M0 makrofaja göre artış göstererek, M2 polarizasyonunun gerçekleştiğini göstermiştir.

Bizim bulgularımıza paralel olarak yapılan çalışmalarda, THP-1 hücrelerinden M0 makrofaja farklılaşmanın ardından M1 ve M2 polarizasyonun kontrolü sitokinler, kemokinler (CXCL) ve kemokin ligandları (CCL) ile belirlenmiştir. Kemokin genlerinden olan CXCL-1, 2 ve 3'ün, M1 polarize makrofajlarda yüksek oranda eksprese edildiği bildirilmiştir. Ayrıca M2 makrofaj polarizasyonu CCL1, CCL16, CCL17, CCL18, CCL22 ve CCL24 gibi kemokin genlerinin ekspresyonu ile karakterizedir (Chanput vd., 2013).

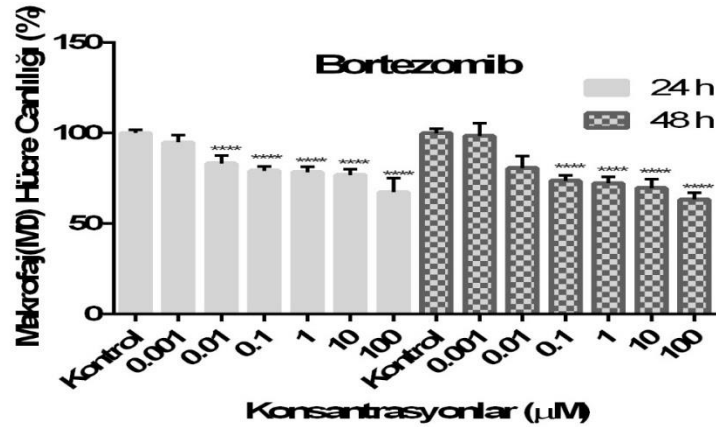
IL-1 β ve IL-8 kansere bağlı kronik enflamasyonda rol oynayan temel sitokinlerdir (Hwang vd., 2011; Crusz ve Balkwill, 2015). Yapılan bir çalışmada IL-1 β ve IL-8 mRNA ekspresyonunun, M0 makrofaja göre M1 makrofajda sırasıyla; 250 ve 550 kat artış gösterdiği, M2a makrofajda ise azaldığı bildirilmiştir. CCL-22 mRNA ekspresyonları ise, M0 makrofaja göre, M2a makrofajda 300 kat artarken, M1 makrofajda ise 12 kat artış göstermiştir (Yeung vd., 2015). Bu bulgu bizim sonuçlarımızda da M0 makrofaja göre, CCL-22 mRNA ekspresyonlarında görülen M1 makrofajdaki artışı desteklemektedir. Ayrıca bir çalışmada IL-8 mRNA ekspresyon düzeylerinde M1 makrofajda M2a makrofaja göre 4 kat artış bildirilmiştir (Bizim çalışmamızda da 5 kat artmıştır) (Chanput vd., 2013). Ayrıca RAW264.7 makrofaj hücrelerinde yapılan bir çalışmada, IL-1 β and IL-18 sitokin seviyeleri ELISA yöntemi ile belirlenmiş ve M1 makrofajlarda M0 makrofajlara göre 3 kat artış bildirilmiştir (Zhang vd., 2018).

TGF- β , bağışıklık hücreleri üzerinde etkisi geniş olan kansere bağlı inflamasyonun önemli bir faktörüdür, eozinofiller, makrofajlar ve mast hücrelerinin kemotaksisini organize eder. Tümör mikro çevresinde TGF- β üretimi, tümör hücreleri, fibroblastlar, makrofajlar, lökositler ve endotel hücreleri gibi birçok hücre tarafından gerçekleştirilir (Papageorgis ve Stylianopoulos, 2015). TGF- β , büyümenin inhibisyonundan, apoptozun indüklenmesinden, EMT'nin tetiklenmesine kadar uzanan rollere sahip çok fonksiyonlu bir sitokindir, bu sitokinin çeşitli kanser hücrelerinde moleküler etkilerinin daha fazla

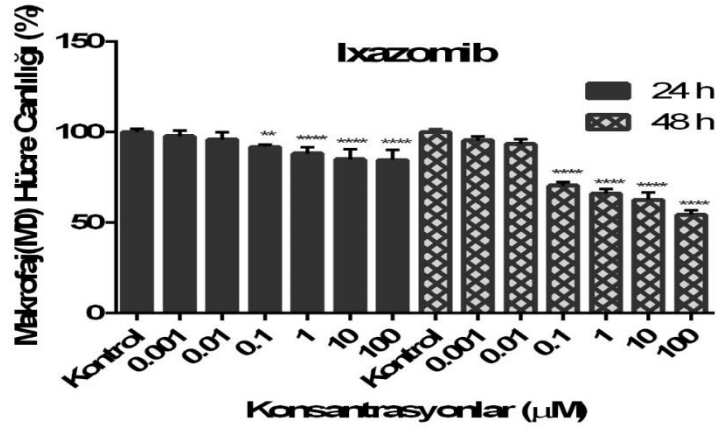
araştırılması ihtiyacını daha da vurgulamaktadır (Dash vd.,2018). İnsan monosit hücrelerin primer kültüre edildiği bir çalışmada, M1, M2a ve M2c makrofaja polarizasyonun ardından, hücre süpernatantlarından TGF- β seviyeleri belirlenmiş ve M2a, M2c makrofajlarda, M1 makrofaja göre TGF- β seviyelerinde 2 kat artış bildirilmiştir. Yine aynı çalışmada IL-1 β seviyeleri M1 makrofajda 60 pg/mL olarak belirlenirken, M2a ve M2c makrofajlarda yaklaşık 5 pg/mL olarak bildirilmiştir (Yang vd., 2017).

5.1.3. WST-1 yöntemi ile M0 makrofaj, A549 ve CCD-19Lu hücrelerinde bortezomib ve ixazomibin sitotoksik etkilerinin belirlenmesi

Ko-kültür deneylerinde kullanılacak olan M0 makrofaj hücrelerinde, bortezomib ve ixazomibin sitotoksik etkilerini belirlemek amacıyla önce THP-1 hücreleri 100 ng/mL PMA ile 24 saat inkübasyona bırakılmış daha sonra PMA'nın etkisinden arındırılmak için hücreler 48 saat dinlenme inkübasyonuna bırakılmıştır. Sonra THP-1 monosit hücrelerinden farklılaştırılmış olan M0 makrofaj hücrelerinde bortezomib ve ixazomibin 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 ve 100 μ M konsantrasyonlarında, 24 ve 48 saatlik inkübasyonda WST-1 yöntemi ile sitotoksik etkileri çalışılmıştır (Şekil 5.10 ve Şekil 5.11).



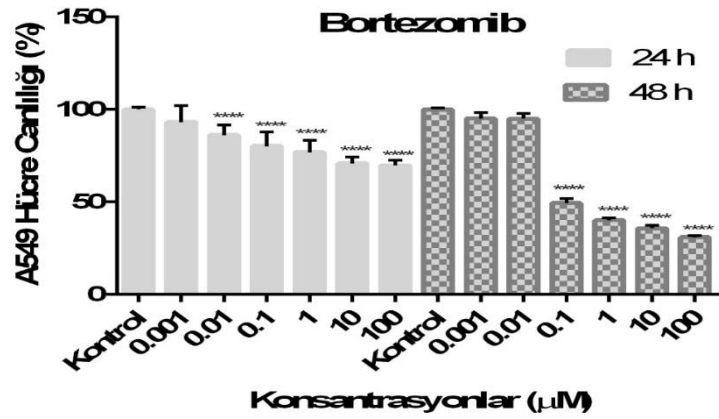
Şekil 5.10. M0 makrofaj hücrelerinde bortezomib konsantrasyonlarının WST-1 yöntemine göre hesaplanan 24 ve 48. saatteki % canlılık değerleri ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi (kontrol: %0.1 DMSO, n=8, ortalama $\pm$ standart sapma, $p>0.05$ fark yok, $p<0.0001$ ****).



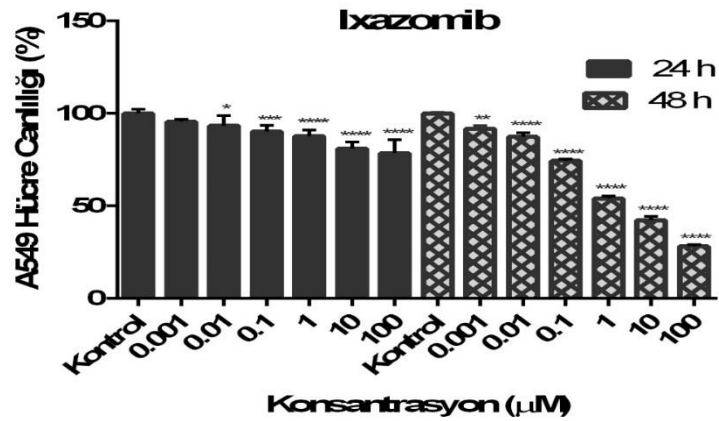
Şekil 5.11. M0 makrofaj hücrelerinde ixazomib konsantrasyonlarının WST-1 yöntemine göre hesaplanan 24 ve 48. saatteki % canlılık değerleri ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi (kontrol: %0.1 DMSO, n=8, ortalama±standart sapma, $p>0.05$ fark yok, $p<0.01$ **, $p<0.0001$ ***).

Bortezomib uygulanan THP-1 kökenli makrofaj (M0) hücrelerinde % hücre canlılık değerleri, kontrole göre 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 100 µM bortezomib konsantrasyonlarında sırasıyla 24. Saatte; 94.83, 83.24, 79.14, 78.45, 76.92, 67.32 ve 48. saatte; 98.23, 81.02, 73.75, 73.13, 70.26, 62.66 olarak hesaplanmıştır. İxazomib uygulanan THP-1 kökenli makrofaj (M0) hücrelerinde % canlılık değerleri, kontrole göre 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 100 µM ixazomib konsantrasyonlarında sırasıyla 24. saatte; % 97.65, 95.98, 91.75, 88.18, 84.95 84.52 ve 48. saatte; %95.46, 93.46, 70.48, 66.10, 62.51, 54.28 olarak hesaplanmıştır. WST-1 sonuçlarına göre, M0 makrofaj hücrelerinde hem 24 hemde 48 saat inkübasyon sürelerinde bortezomib ve ixazomibin sitotoksik etkileri istatistiksel olarak belirlendiğinde hücre canlılığını %50'nin altına düşürmediği gösterilmiştir.

Ko-kültür deneylerinde kullanılacak olan A549 hücrelerinde, bortezomib ve ixazomibin sitotoksik etkilerini belirlemek amacıyla WST-1 yöntemi, bortezomib ve ixazomibin 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 ve 100 µM konsantrasyonlarının 24 ve 48 saatlik uygulamaları ile gerçekleştirilmiştir (Şekil 5.12 ve Şekil 5.13).



Şekil 5.12. A549 hücrelerinde bortezomib konsantrasyonlarının WST-1 yöntemine göre hesaplanan 24 ve 48. saatteki % canlılık değerleri ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi (kontrol: %0.1 DMSO, n=8, ortalama±standart sapma, $p>0.05$ fark yok, $p<0.0001$ ****)

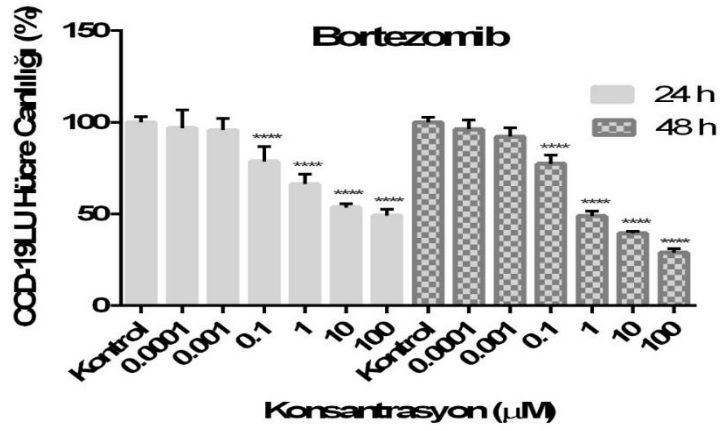


Şekil 5.13. A549 hücrelerinde ixazomib konsantrasyonlarının WST-1 yöntemine göre hesaplanan 24 ve 48. saatteki % canlılık değerleri ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi (kontrol: %0.1 DMSO, n=8, ortalama±standart sapma, $p>0.05$ fark yok, $p<0.05$ *, $p<0.01$ **, $p<0.001$ *** ve $p<0.0001$ ****).

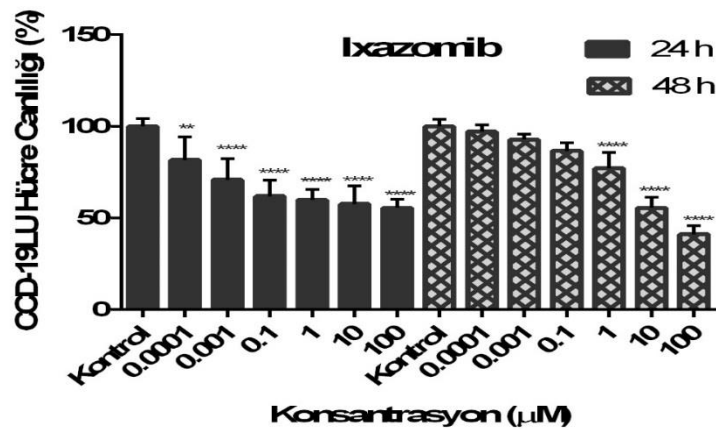
Bortezomib konsantrasyonları uygulanan A549 hücrelerinde % hücre canlılık değerleri, kontrole göre 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 100 µM bortezomib konsantrasyonlarında sırasıyla 24. saatte; %93.23, 86.24, 80.21, 76.99, 70.93, 69.76 ve 48. saatte; % 95.22, 95.05, 49.47, 40.21, 35.78, 30.95 olarak hesaplanmıştır. İxazomib uygulanan A549 hücrelerinde 24 ve 48. saatteki % hücre canlılık değerleri, kontrole göre 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 100 µM ixazomib konsantrasyonlarında sırasıyla 24. saatte; %95.61, 93.48, 90.36, 87.81, 81.12, 78.53 ve 48. saatte; %91.81, 87.41, 74.49, 54.09, 42.29, 28.14 olarak hesaplanmıştır. **Şekil 5.12** ve **5.13**'te görüldüğü gibi, bortezomib ve ixazomib

konsantrasyonlarının 48 saatlik inkübasyon süreleri sonunda, A549 hücre canlılığını %50'nin altına indirdiği görülmektedir.

Bu tez çalışmasında, CCD-19Lu sağlıklı insan akciğer hücreleri kullanılarak bortezomib ve ixazomibin sitotoksik etkileri sağlıklı bir hücre hattında da araştırılmıştır. Bu nedenle, sağlıklı akciğer hücrelerinde bortezomib ve ixazomibin 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 ve 100 μ M konsantrasyonlarının 24 ve 48 saatlik inkübasyonları sonunda hücre proliferasyonu üzerine etkileri WST-1 yöntemi ile araştırılmıştır (Şekil 5.14 ve Şekil 5.15).



Şekil 5.14. CCD-19Lu sağlıklı akciğer hücrelerinde bortezomib konsantrasyonlarının WST-1 yöntemine göre hesaplanan 24 ve 48. saatteki % canlılık değerleri ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi (kontrol: %0.1 DMSO, n=8, ortalama±standart sapma, $p>0.05$ fark yok, $p<0.0001$ ****).



Şekil 5.15. CCD-19Lu sağlıklı akciğer hücrelerinde ixazomib konsantrasyonlarının WST-1 yöntemine göre hesaplanan 24 ve 48. saatteki % canlılık değerleri ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi (kontrol: %0.1 DMSO, n=8, ortalama±standart sapma, $p>0.05$ fark yok, $p<0.01$ **, $p<0.0001$ ****).

Bortezomib konsantrasyonları uygulanan CCD-19Lu sağlıklı akciğer hücrelerinde % hücre canlılık değerleri, kontrole göre 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 100 μ M bortezomib konsantrasyonlarında sırasıyla 24. saatte; %96.95, 95.82, 78.70, 66.28, 53.66, 49.16 ve 48. saatte; %96.35, 92.30, 77.41, 48.97, 39.55, 28.96 olarak hesaplanmıştır. İxazomib konsantrasyonları uygulanan A549 hücrelerinde % hücre canlılık değerleri, kontrole göre 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 100 μ M ixazomib konsantrasyonlarında sırasıyla 24. saatte; %81.71, 70.96, 61.88, 59.92, 57.66, 55.50 ve 48. saatte; %97.17, 92.77, 86.68, 77.19, 55.51, 41.23 olarak hesaplanmıştır. **Şekil 5.14** ve **5.15**'te görüldüğü gibi, bortezomib ve ixazomibin CCD-19Lu hücrelerinde hücre canlılığını %50'nin altına indirdiği konsantrasyonların özellikle 48 saatlik inkübasyonda A549 hücrelerine göre yüksek konsantrasyonlarda olduğu görülmektedir.

Proteozom inhibitörleri, proteozomların fonksiyonlarını inhibe eder, protein yapımını güçleştirir ve çoklu sinyal iletimini engellerler. Sinyal iletimi kesilince kanserli hücreler ölür ve tümörün büyümesi baskılanır (Kupperman vd., 2010; Engür vd., 2016; Engür ve Dikmen, 2017). THP-1 kökenli M0 makrofaj hücrelerinde bortezomib ya da ixazomib uygulamasına ilişkin literatür bilgisine rastlanmamıştır. Sadece THP-1 hücreleri ve bortezomibin kullanıldığı çok kısıtlı sayıda *in vitro* çalışma mevcuttur. Yapılan bir çalışmada, THP-1 hücrelerinde bortezomibin 0-1000 nM konsantrasyon uygulamasında hücre canlılığının kontrole göre %80'in altına düşmediği belirlenmiştir (Choy vd., 2015). Yapılan başka bir hücre canlılığını belirleme çalışmasında ise 50 nM bortezomib konsantrasyonunun hücre canlılığını %50'nin altına indirmediği bildirilmiştir (Chu vd., 2017). Ayrıca yine bortezomib ile yapılan başka bir çalışmada, primer monosit hücrelerinde MTT yöntemi ile hücre canlılığı belirlenmiş ve bortezomibin 400 nM (0.4 μ M) konsantrasyon uygulamasında (4 saatlik inkübasyon) canlılığı kontrole göre yaklaşık yüzde 50'nin altına düşürdüğü ve IC_{50} konsantrasyonunun 274.0 ± 3.6 nM olduğu bildirilmiştir (Liu vd., 2019). Bu sonuçlar bizim WST-1 sonuçlarımız ile paralellik göstermektedir.

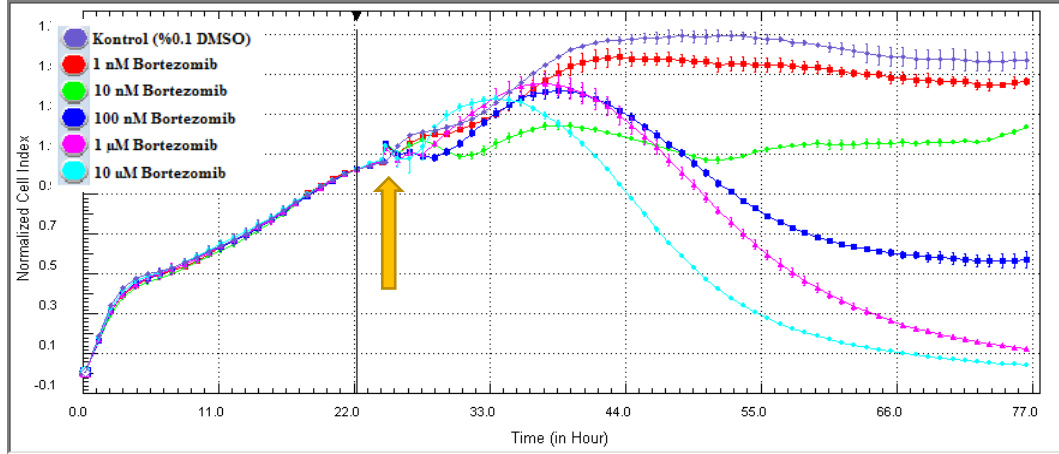
Çalışmamızda da bortezomib ve ixazomib zaman ve konsantrasyona bağımlı olarak A549 akciğer kanseri hücrelerinde antiproliferatif etkiler meydana getirmiştir. Bir çalışmada A549 hücrelerinde 10 nM (0.01 μ M) bortezomibin % hücre canlılığını 24. saatte kontrol grubuna göre %80 azalttığı belirlenmiştir (Shulepko vd., 2020). Bizim bulgularımıza paralel olarak, MTT yöntemiyle hücre canlılığının belirlendiği bir çalışmada bortezomibin A549 hücre canlılığını belirlemek için 1.25-20 μ M

konsantrasyon aralıkları seçilmiş ve kontrole göre hücre canlılığının konsantrasyona bağlı olarak azaldığı belirlenmiştir (Wang vd., 2019). Bugüne kadar A549 hücrelerinde ixazomib uygulamasına ilişkin herhangi bir *in vitro* literatür bilgisi bulunamamıştır. Ancak yapılan bir çalışmada A375 (akciğer), H460 (akciğer), HCT-116 (kolon) ve HT-29 (kolon) hücrelerinde ixazominin üstün sitotoksik aktivite gösterdiği (Kupperman vd., 2010) ve ixazomibin 20S proteozom ayrışma yarı ömrünün bortezomibten daha kısa olması (6 kat daha hızlıdır) bu yüzden doku dağılımında bortezomibe göre avantajlı olduğu bildirilmiştir (Kupperman vd., 2010; Chauhan vd., 2011)

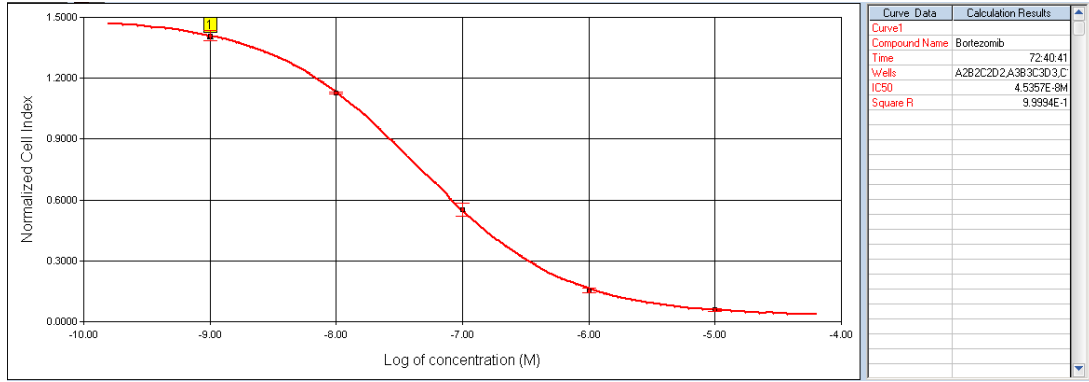
Çalışmamızda bortezomib ve ixazomibin CCD-19Lu hücrelerinde hücre canlılığını %50'nin altına indirdiği konsantrasyonların özellikle 48 saatlik inkübasyonda A549 hücrelerine göre yüksek konsantrasyonlarda olduğu görülmektedir. Yapılan literatür taramalarında CCD-19Lu hücrelerinde bortezomib ya da ixazomibin çalışıldığı literatüre rastlanılmamıştır. Ancak başka tip sağlıklı hücre hattı kullanan benzer çalışmalar incelenmiştir. Sağlıklı insan alveolar epitel hücre hatlarında yapılan bir çalışmada bortezomib konsantrasyonları 10-100 nM konsantrasyon aralığında 72 saat uygulanmış ve hücre canlılığını 50-100 nM aralığında kontrole göre %50 inhibe ettiği bildirilmiştir (Semren vd., 2015). Yine bortezomib ile yapılan bir çalışmada, L929 fibroblast hücre hattında, MTT yöntemi ile hücre canlılığı belirlenmiş ve 6000 nM (6 µM) konsantrasyon uygulamasında (4 saatlik inkübasyon) canlılığı kontrole göre yaklaşık yüzde 50'nin altına düşürdüğü bildirilmiştir (Liu vd., 2019).

5.1.4. Gerçek zamanlı hücre analiz sistemi (RTCA DP) kullanılarak hücre proliferasyonlarının değerlendirilmesi

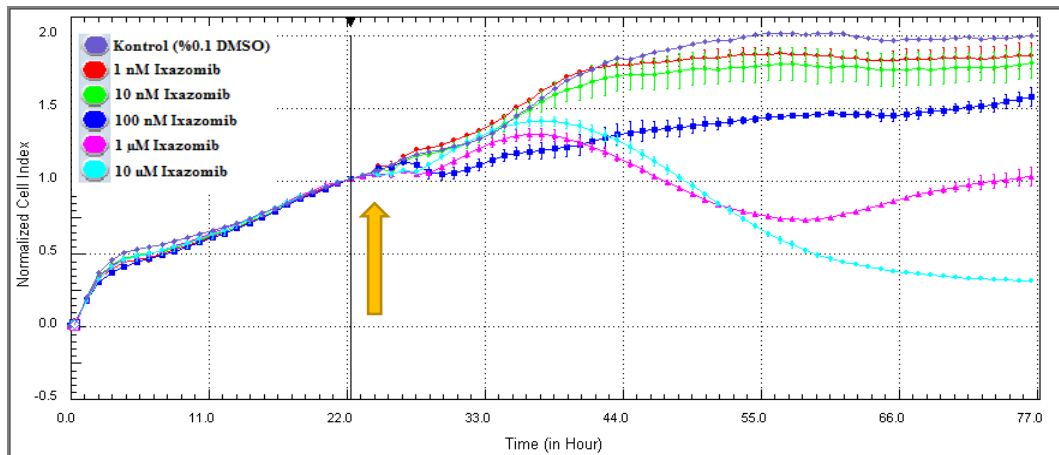
Gerçek zamanlı hücre analiz sisteminde hücre proliferasyonunun analizi için WST-1 yöntemi ile belirlediğimiz bortezomib ve ixazomib konsantrasyonları (0.001, 0.01, 0.1, 1 ve 10 µM) A549 ve CCD-19Lu hücreleri bulunan E-plaka kuyucuklarına 100 µL medyum içinde uygulanmıştır. Konsantrasyon uygulamasından 48 saat sonra (toplamda 72 saat sonra) cihaz tamamen durdurulmuş ve analiz aşamasına geçilmiştir. RTCA DP ile elde edilen hücre indeks değerlerine göre bortezomib ve ixazomib için A549 ve CCD-19Lu hücrelerinin IC₅₀ değerleri RTCA DP Software 1.2.1 programı kullanılarak hesaplanmıştır (Şekil 5.16, 5.17, 5.18, 5.19, 5.20, 5.21, 5.22, 5.23, Tablo 5.6).



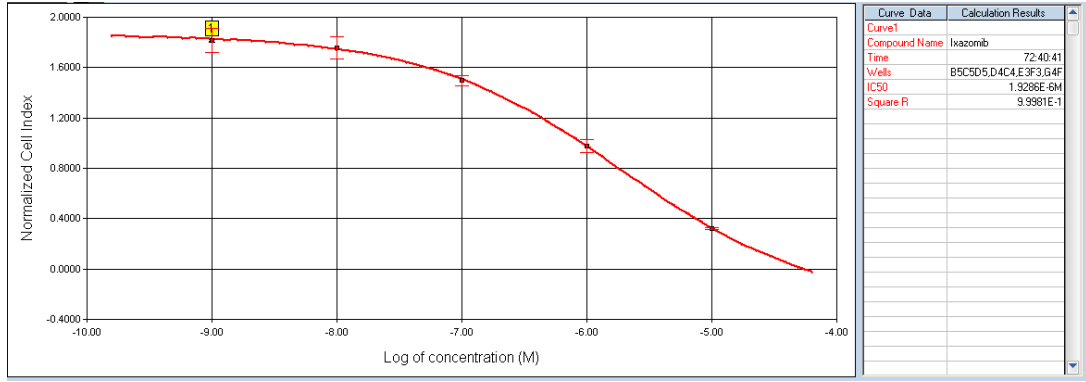
Şekil 5.16. Bortezomib konsantrasyonlarının 48 saatlik A549 hücre proliferasyon eğrileri (sarı ok: konsantrasyon uygulaması, $n=6$, ortalama±standart sapma).



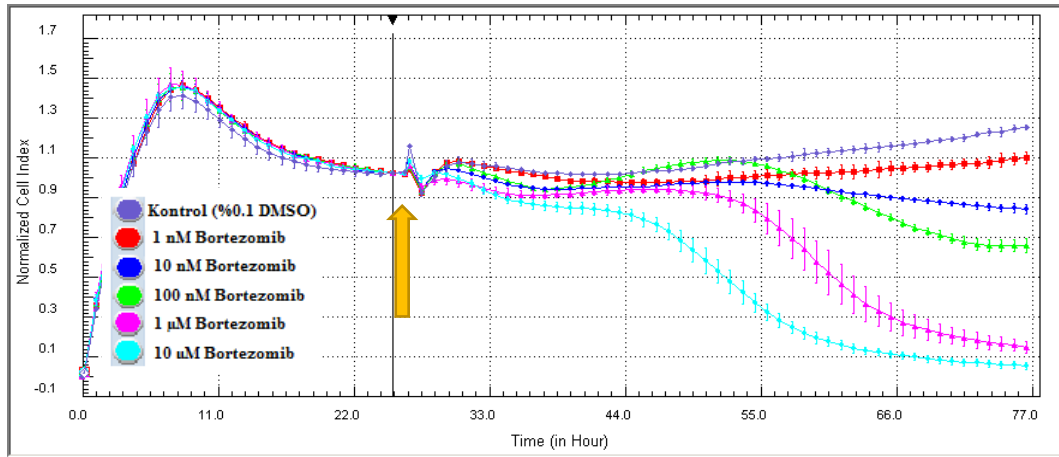
Şekil 5.17. RTCA DP sisteminde bortezomibin A549 hücrelerinde 48. saatteki hücre indeks değerlerine göre IC_{50} değerinin hesaplandığı konsantrasyon-hücre indeksi eğrisi (IC_{50} : 45 nM).



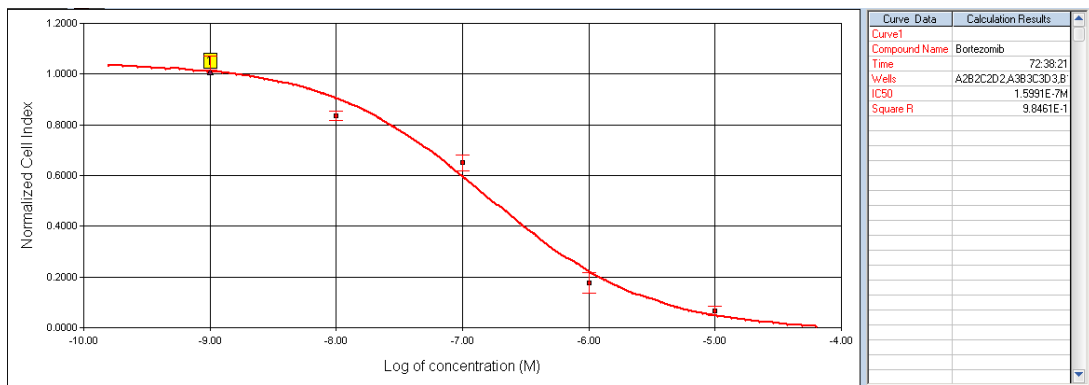
Şekil 5.18. İxazomib konsantrasyonlarının 48 saatlik A549 hücre proliferasyon eğrileri (sarı ok: konsantrasyon uygulaması, $n=6$, ortalama±standart sapma).



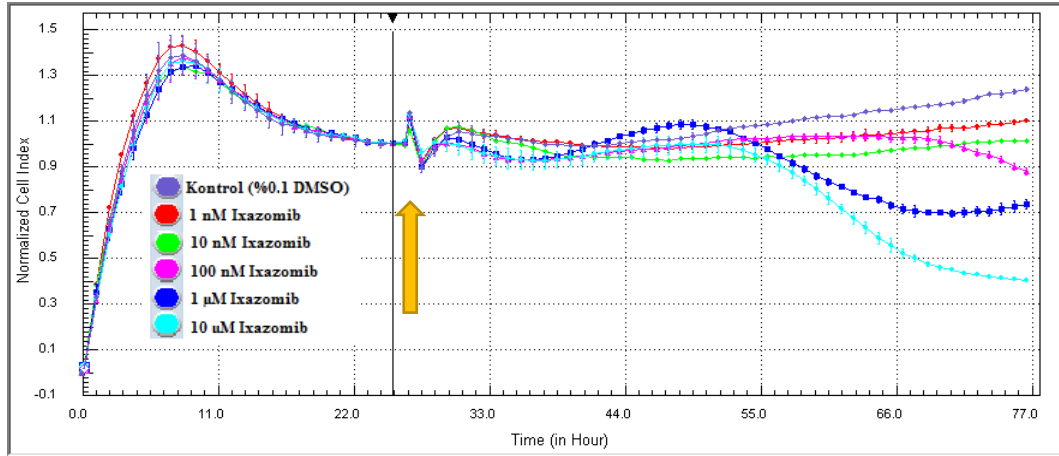
Şekil 5.19. RTCA DP sisteminde ixazomibin A549 hücrelerinde 48. saatteki hücre indeks değerlerine göre IC_{50} değerinin hesaplandığı konsantrasyon- hücre indeksi eğrisi (IC_{50} : 2 μ M).



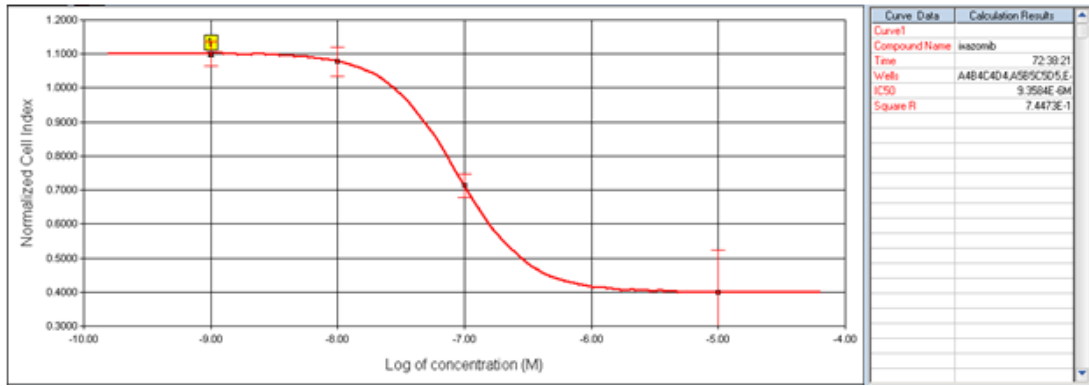
Şekil 5.20. Bortezomib konsantrasyonlarının 48 saatlik CCD-19Lu hücre proliferasyon eğrileri (sarı ok: konsantrasyon uygulaması, $n=6$, ortalama±standart sapma).



Şekil 5.21. RTCA DP sisteminde bortezomibin CCD-19Lu hücrelerinde 48. saatteki hücre indeks değerlerine göre IC_{50} değerinin hesaplandığı konsantrasyon-hücre indeksi eğrisi (IC_{50} : 160 nM).



Şekil 5.22. İxazomib konsantrasyonlarının 48 saatlik CCD-19Lu hücre proliferasyon eğrileri (sarı ok: konsantrasyon uygulaması, $n=6$, ortalama±standart sapma).



Şekil 5.23. RTCA DP sisteminde ixazomibin CCD-19Lu hücrelerinde 48. saatteki hücre indeks değerlerine göre IC_{50} değerinin hesaplandığı konsantrasyon- hücre indeksi eğrisi (IC_{50} : 10µM).

Şekil 5.16, 5.18, 5.20 ve 5.22’te A549 ve CCC-19LU hücrelerinde bortezomib ve ixazomib konsantrasyonlarının antiproliferatif etkileri, gerçek zamanlı (saat başı veri alınmıştır) olarak görülmektedir. Şekil 5.17, 5.19, 5.21, 5.23’te ve Tablo 5.6’de RTCA DP Software 1.2.1 programı kullanılarak konsantrasyon- hücre indeksi eğrileri sonucu hesaplanan IC_{50} değerleri gösterilmiştir. Bortezomibin A549 hücrelerinde 48. saatte IC_{50} değeri; 45 nM (Şekil 5.17), ixazomibin ise 2 µM (Şekil 5.19) olarak hesaplanmıştır. CCD-19Lu sağlıklı akciğer hücrelerinde IC_{50} değerleri bortezomib için; 160 nM (Şekil 5.21) ve ixazomib için 10 µM olarak belirlenmiştir (Şekil 5.23).

Tablo 5.6. *Bortezomib ve ixazomibin A549 ve CCD-19Lu hücrelerinde gerçek zamanlı hücre analiz sistemi ile belirlenen 48. saat IC₅₀ değerleri.*

IC ₅₀ Konsantrasyonları	Bortezomib	İxazomib
A549	45 nM	2 µM
CCD-19Lu	160 nM	10 µM

Bu sonuçlara göre bortezomib ve ixazomib için; A549 akciğer kanseri hücrelerinde belirlenen IC₅₀ değerinin, CCD-19Lu hücrelerinde belirlenen IC₅₀ değerlerine göre daha düşük olduğu bulunmuştur. Böylece uygulanacak bortezomib ve ixazomib konsantrasyonlarının CCD-19Lu hücrelerinde, A549 hücrelerinde olduğu kadar toksik etki oluşturmadığı da belirlenmiştir.

A549 hücreleri, gerçek zamanlı hücre analiz sistemine uygun bir hücre hattıdır ve E-plakalara ekilmesinin ardından 24 saat içinde gerekli cell indeks değerlerine ulaştığı daha önceki çalışmalarımız ile belirlenmiştir (Özkay vd., 2016; Dikmen vd., 2020). A549 hücrelerinde bortezomibin bu yöntemle belirlenen, IC₅₀ konsantrasyon çalışmaları bulunmamaktadır. Diğer yöntemler (MTT ve koloni oluşum yöntemleri gibi) kullanılarak belirlenen IC₅₀ konsantrasyonlarına ilişkin çalışmalar özetlenmiştir; A549 hücrelerinde bortezomibin 48 saatlik inkübasyon sonunda IC₅₀ konsantrasyonu; MTT yöntemi ve Calculus analiz program ile hesaplanmış ve 7.8 nM olarak belirlenmiştir (Hanke vd., 2018). Başka bir çalışmada, A549 hücrelerinde bortezomibin 96 saatlik inkübasyonu sonunda hücre büyümesini inhibe edici etkilerinin agar koloni oluşum yöntemi ile araştırıldığı ve IC₅₀ konsantrasyonu doz-yanıt eğrisi ile hesaplanarak 15 nM olarak belirlendiği bildirilmiştir (Cascone vd., 2008). Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücreleri ile yapılan bir çalışmada, H292, H460, H1299, H322, A549, H1703 ve SW1573 hücrelerinde bortezomibin 72 saatlik inkübasyonu sonunda SigmaPlot programı ile hesaplanan IC₅₀ konsantrasyonları sırasıyla; 83, 69, 61, 49, 29, 8 ve 5 nM olarak belirlenmiştir (Voortman vd., 2007). Son olarak MTT yöntemi ile belirlenen ve A549 hücrelerinin bortezomibin 24 saatlik inkübasyonu sonucunda Microsoft Excel kullanılarak hesaplanan IC₅₀ değeri 751.07 ± 37.89 nM olarak bildirilmiştir (Sahoo vd., 2020).

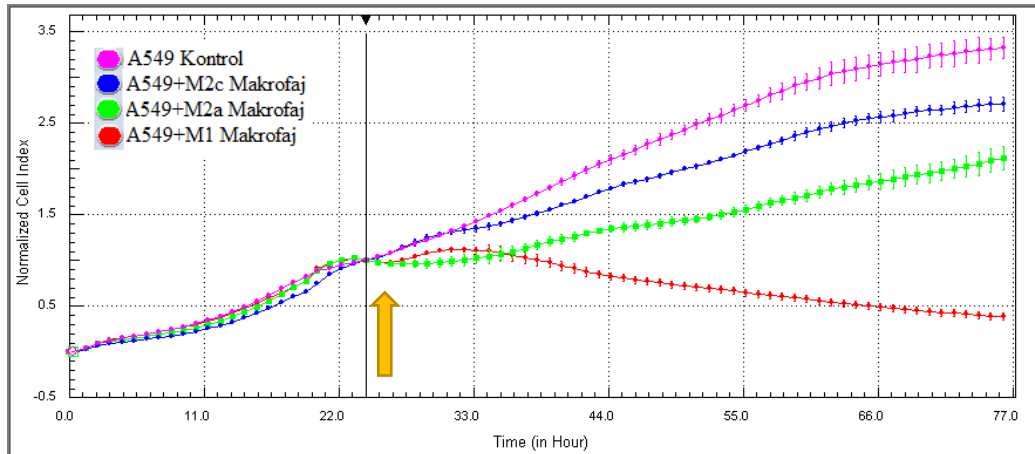
Bugüne kadar A549 hücrelerinde ixazomib, CCL-19Lu hücrelerinde ise hem bortezomib hemde ixazomib uygulamalarına ilişkin herhangi bir literatür bilgisi bulunamamıştır. Yapılan bir çalışmada küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücrelerinde

(primer hücre) koloni oluşum yöntemi ile ixazomibin IC₅₀ konsantrasyonları belirlenmiş ve hücre hattına bağlı olarak 34-272 nM aralığında olduğu rapor edilmiştir (Chattopadhyay vd., 2015).

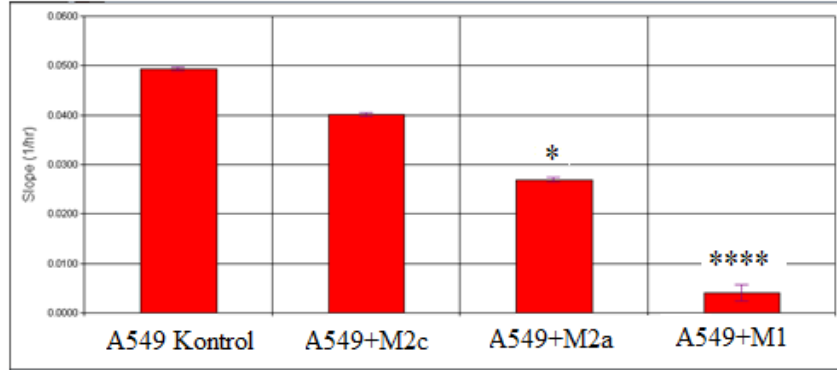
5.1.5. Ko-kültür çalışmalarının değerlendirilmesi

5.1.5.1. Gerçek zamanlı hücre analiz sisteminde M1, M2a ve M2c polarize makrofaj ve A549 ko-kültür ortamlarında hücre proliferasyonunun değerlendirilmesi

Proliferasyon çalışmasında 16 kuyucuklu E-plaka insert kullanılmıştır. **Tablo 4.2’de** gösterilen ko-kültür gruplarında A549 hücrelerinin proliferasyonunun belirlenmesi amacıyla THP-1 hücreleri insert bölümüne ekilmiş ve gerekli farklılaşma sürelerinde M1, M2a ve M2c makrofajlara polarizasyonları gerçekleştirilmiştir. Daha sonra A549 hücreleri alt alıcı E-plate’e ekildikten sonra cihaz programı başlatılmış ve 1 gün süreyle beklenmiştir. Daha sonra E-plate insert içinde bulunan ve ko-kültür sürecine hazır olan makrofajlar ile A549 hücreleri birleştirilerek RTCA DP cihazı tekrar başlatılmış ve gerçek zamanlı olarak ölçüm alınmıştır. **Şekil 5.24** ve **5.25’te** M1, M2a ve M2c polarize makrofajların A549 hücre proliferasyonuna direkt etkileri araştırılmıştır. RTCA DP ile elde edilen hücre indeks değerlerine göre grupların proliferasyon slope grafikleri RTCA DP Software 1.2.1 programı kullanılarak çizilmiştir. Sonuçlar **Şekil 5.24, 5.25, 5.26, 5.27, 5.28, 5.29, 5.30 ve 5.31’de** görülmektedir.

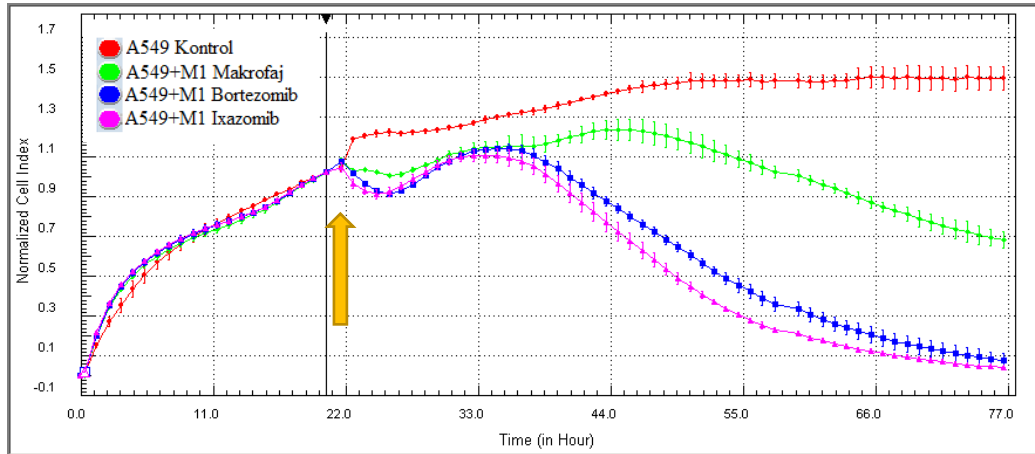


Şekil 5.24. A549 kontrol ve E-plate insert kullanılarak A549 ve M1, M2a ve M2c polarize makrofaj hücreleri ile oluşturulan ko-kültür modellerinin gerçek zamanlı hücre analiz sisteminde belirlenen proliferasyon eğrileri (sarı ok: A549 ve makrofajların birleştirilmesi, n=6, ortalama±standart sapma).

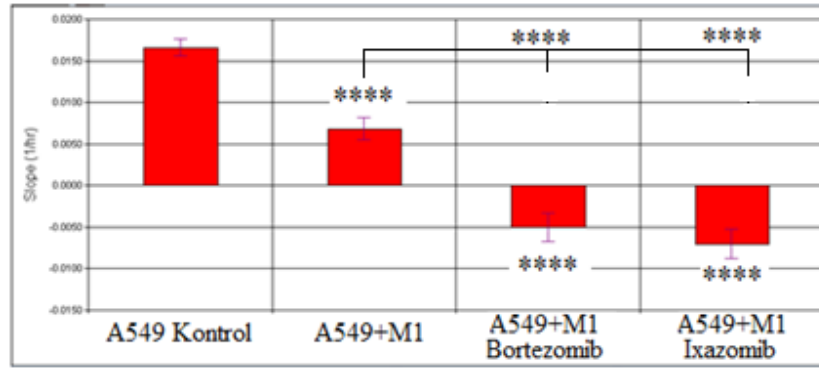


Şekil 5.25. Gerçek zamanlı hücre analiz sistemi ile belirlenen 48. saat cell indeks değerlerine göre çizilen slope grafiği ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi ($n=6$, ortalama±standart sapma, $p<0.05^*$, $p<0.0001^{****}$).

Şekil 5.24 ve 5.25'te A549 tekli kontrol grubuna göre, A549 ve M1, M2a ve M2c polarize makrofaj ko-kültür gruplarında, A549 hücre proliferasyonları karşılaştırılmıştır. Bu sonuçlara göre Şekil 5.25'te verilen istatistiksel değerlendirmelere göre, M2c polarize makrofajın A549 hücrelerinde fark oluşturacak derecede anti-proliferatif etki yapmadığı M2a'nın ise proliferasyonu azalttığı belirlenmiştir ($p<0.05^*$). M1 polarize makrofajların ise A549 hücrelerinde önemli derecede ($p<0.0001^{****}$) anti-proliferatif etki meydana getirmiştir.

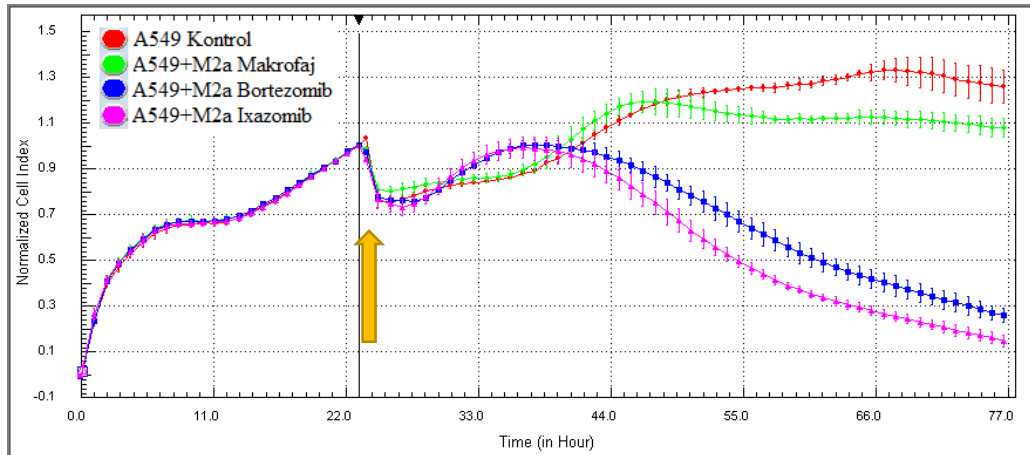


Şekil 5.26. A549 ve M1 polarize makrofaj ko-kültür modelinde bortezomib ($IC_{50}:45$ nM) ve ixazomib ($IC_{50}:2$ μ M) konsantrasyonlarının gerçek zamanlı hücre analiz sistemi ile belirlenen proliferasyon eğrileri (sarı ok: konsantrasyon uygulaması, $n=6$, ortalama±standart sapma).

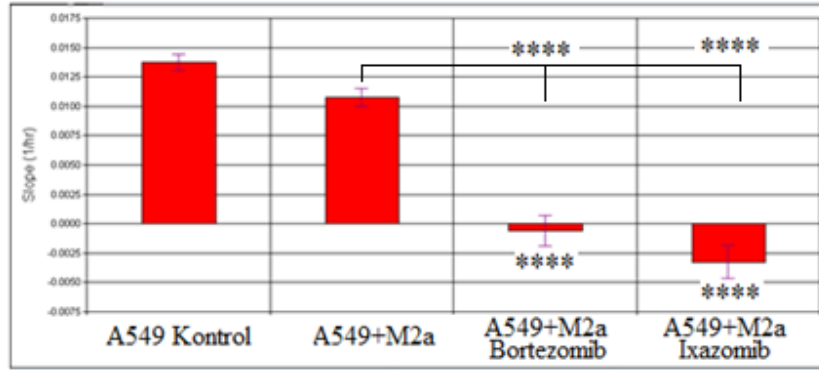


Şekil 5.27. Gerçek zamanlı hücre analiz sistemi ile belirlenen 48. saat hücre indeks değerlerine göre çizilen slope grafiği ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi ($n=6$, ortalama±standart sapma, $p<0.0001$ ****).

Şekil 5.26 ve 5.27’de hem A549 tekli kontrol hem de M1 polarize makrofaj+A549 ko-kültür grubuna göre, bortezomib ve ixazomibin IC_{50} konsantrasyonları ile 48 saat inkübe edilen A549+M1 makrofaj ko-kültür gruplarında A549 hücrelerinin proliferasyonu önemli derecede azalmıştır ($p<0.0001$ ****).

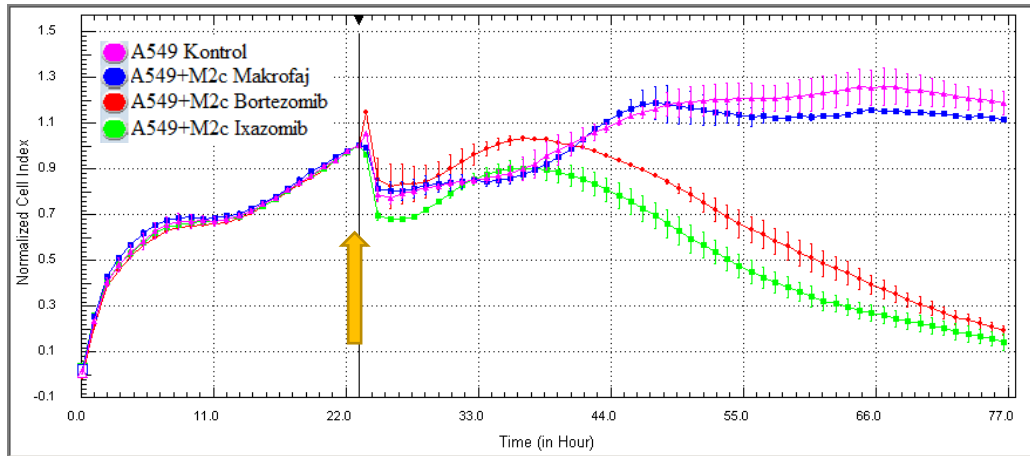


Şekil 5.28. A549 ve M2a polarize makrofaj ko-kültür modelinde bortezomib (IC_{50} : 45 nM) ve ixazomib (IC_{50} : 2 μ M) konsantrasyonlarının gerçek zamanlı hücre analiz sistemi ile belirlenen proliferasyon eğrileri (sarı ok: konsantrasyon uygulaması, $n=6$, ortalama±standart sapma).

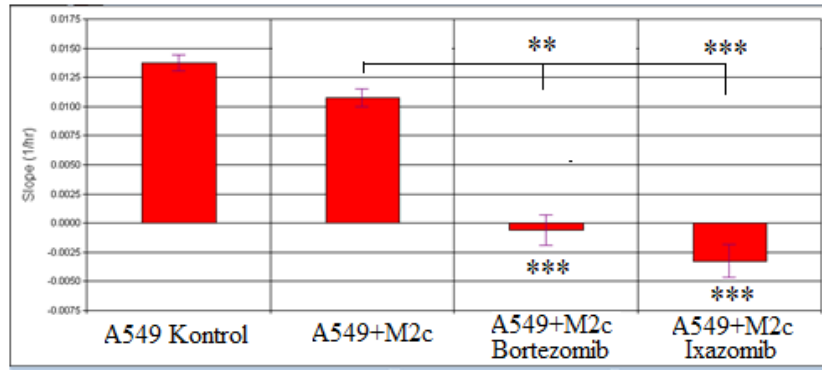


Şekil 5.29. Gerçek zamanlı hücre analiz sistemi ile belirlenen 48. saat hücre indeks değerlerine göre çizilen slope grafiği ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi ($n=6$, ortalama±standart sapma, $p<0.0001$ ****).

Şekil 5.28 ve 5.29’da hem A549 tekli kontrol hemde M2a polarize makrofaj+A549 ko-kültür grubuna göre, bortezomib ve ixazomibin IC_{50} konsantrasyonları ile 48 saat inkübe edilen A549+M2a makrofaj ko-kültür gruplarında A549 hücrelerinin proliferasyonu önemli derecede azalmıştır ($p<0.0001$ ****).



Şekil 5.30. A549 ve M2c polarize makrofaj ko-kültür modelinde bortezomib (IC_{50} :45 nM) ve ixazomib (IC_{50} : 2 μ M) konsantrasyonlarının gerçek zamanlı hücre analiz sistemi ile belirlenen proliferasyon eğrileri (sarı ok: konsantrasyon uygulaması, $n=6$, ortalama±standart sapma).



Şekil 5.31. Gerçek zamanlı hücre analiz sistemi ile belirlenen 48. saat hücre indeks değerlerine göre çizilen slope grafiği ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi ($n=6$, ortalama±standart sapma, $p<0.01^{**}$, $p<0.001^{***}$).

Şekil 5.30 ve 5.31’de hem A549 tekli kontrol hemde M2c polarize makrofaj+A549 ko-kültür grubuna göre, bortezomib ve ixazomibin IC_{50} konsantrasyonları ile 48 saat inkübe edilen A549+M2c makrofaj ko-kültür gruplarında A549 hücrelerinin proliferasyonu önemli derecede azalmıştır ($p<0.01^{**}$ ve $p<0.001^{***}$).

Tümör ilişkili makrofajlarla etkileşimin, kanser hücrelerinin proliferasyonunu ve kemoterapi ajanlarına duyarlılıklarını değiştirebildiğini kanıtlamıştır. Tümör çevresinde bulunan farklı makrofaj alt-tipleri (M1, M2a ve M2c gibi), hücre proliferasyonunu farklı şekilde etkilediği açıklanmıştır (Yuan vd., 2015). M1 makrofajların, tümör büyümesine ve anjiyogenezin baskılanmasına katkıda bulunduğu ve tümörün kemoterapi ajanlarına duyarlılıklarını arttırdığı, M2 polarize makrofajların ise tümör büyümesini ve ilerlemesini desteklediği rapor edilmiştir (Genin vd., 2015; Yuan vd., 2015; Zhang vd., 2018).

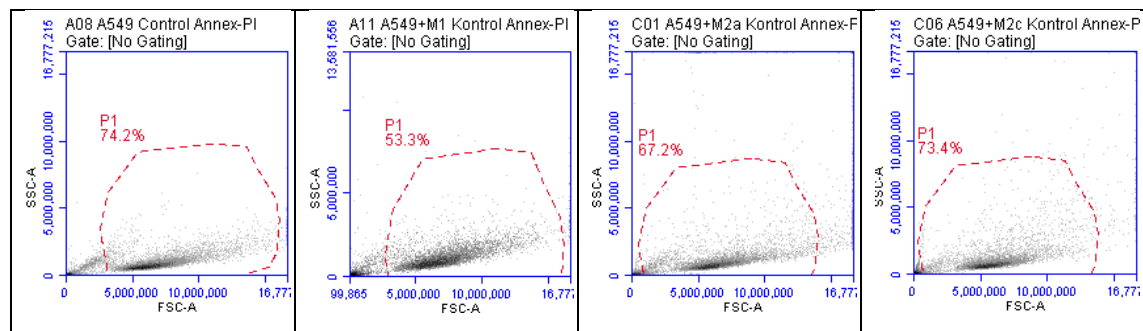
Literatürde, gerçek zamanlı hücre analiz sistemi ile yapılan benzer bir çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmamızda A549 hücrelerinin M1, M2a ve M2c polarize makrofaj hücreleri ile ko-kültüründe kullanılan, E-plate insert sayesinde aynı kültür ortamında bulunması ve proliferasyonunun gerçek zamanlı olarak ölçülmesi sayesinde sonuçlarımız daha hassas olarak belirlenmiştir. A549 hücreleri ce M1, M2a ve M2c makrofaj ko-kültürlerinde bortezomib ve ixazomibin anti-proliferatif etkileri ilk kez bu tez çalışmasında araştırılmıştır. Çalışmamızda özellikle A549 ile M1 makrofaj ko-kültür grubunda bortezomib ve ixazomibin anti-proliferatif etkisinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bulgularımıza paralel olarak yapılan bir çalışmada, A549 hücreleri ile M1, M2a ve M2c makrofajlarından alınan kültür medyumları 5 gün boyunca inkübe edilmiş ve daha sonra A549 hücre canlılığını ve proliferasyonunu belirlemek amacıyla hücre

sayım ve MTT yöntemleri kullanılmıştır. Sonuçlar, M1 polarize makrofajın A549 kontrole göre hücre canlılığını azalttığını (*P <0.05) bildirilmiştir. M2a ve M2c makrofajda ise A549 kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık görülmemiştir (Yuan vd., 2015).

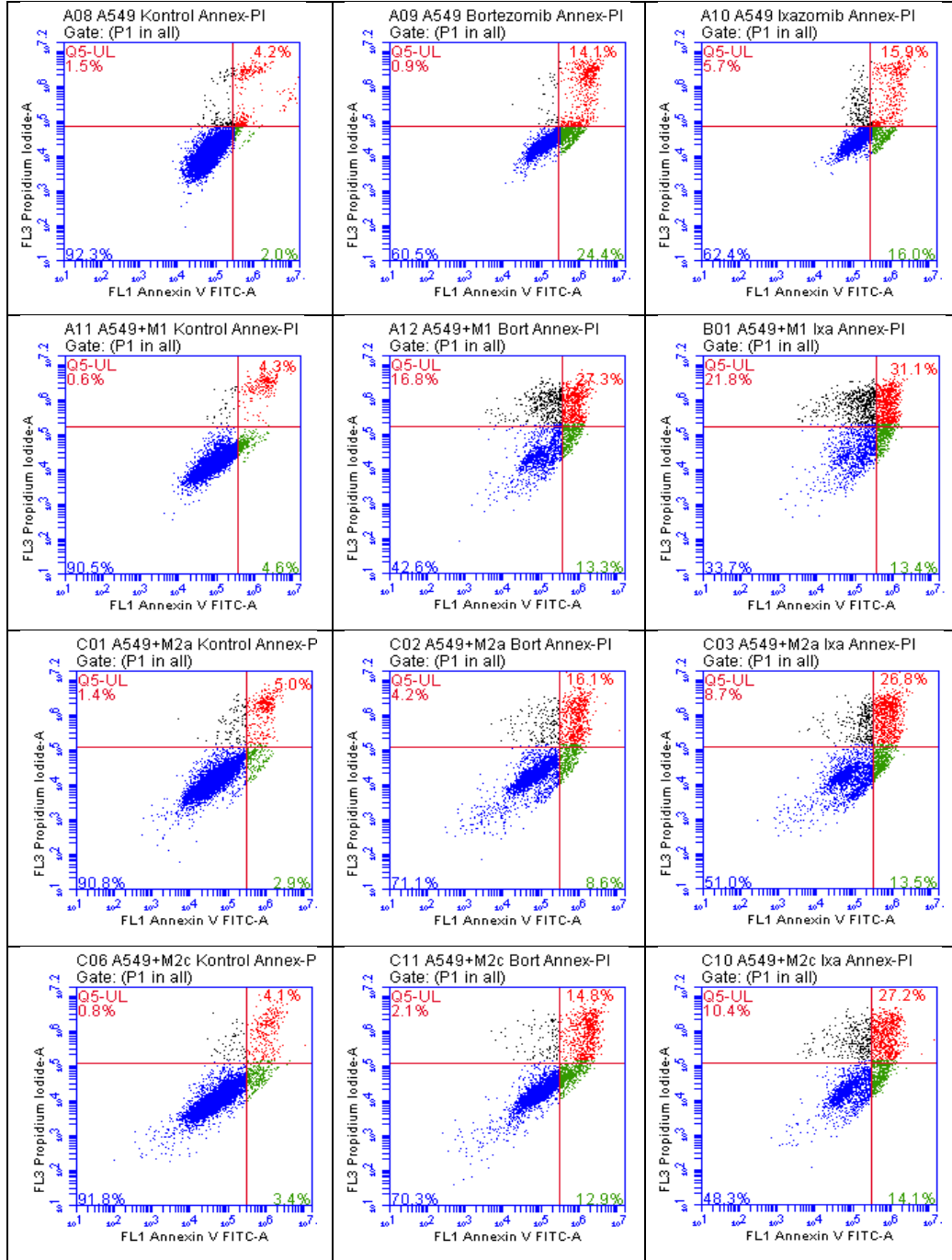
Literatürde A549 hücreleri ile M1 makrofaj ko-kültüründe etkinliği bilinen sisplatin, etoposid gibi ilaçların, antiproliferatif etkilerinin ve duyarlılığının arttığı bildirilen çalışmalar bizim bulgularımız ile paralellik göstermektedir (Genin vd., 2015; Yuan vd., 2015). Ayrıca literatürde bulgularımızı destekleyecek nitelikte, insan retinal pigment epitel hücrelerinde (H-RPE) yapılan bir çalışmada, bortezomibin TGF- β ile indüklenen hücre proliferasyonunu (M2a/M2c polarize makrofaj ko-kültüre benzer etki) inhibe ettiğini gösteren bir çalışma da mevcuttur (Moon vd., 2017).

5.1.5.2. Akış sitometride annexin V-PI yöntemi ile apoptotik etkinin değerlendirilmesi

A549 hücreleri ile tekli kültür ve makrofaj ile ko-kültür modelinin oluşturulmasından sonra bortezomib (IC_{50} : 45nM) ve ixazomib (IC_{50} : 2 μ M) konsantrasyonları A549 hücrelerine uygulanmıştır. Daha sonra plakalar 48 saatlik inkübasyonlara bırakılmıştır. İnkübasyon süreleri sonunda herbir gruba ait A549 hücreleri kaldırılarak, “Annexin-V Fitc Apoptosis Detection Kit (Katalog no: 556547, BD)” protokolü uygulanmıştır. Daha sonra örnekler akış sitometri cihazında (Accuri C6, BD) ölçülerek analiz edilmiştir. Sonuçlar Şekil 5.32, 5.33 ve Tablo 5.7’da verilmiştir.



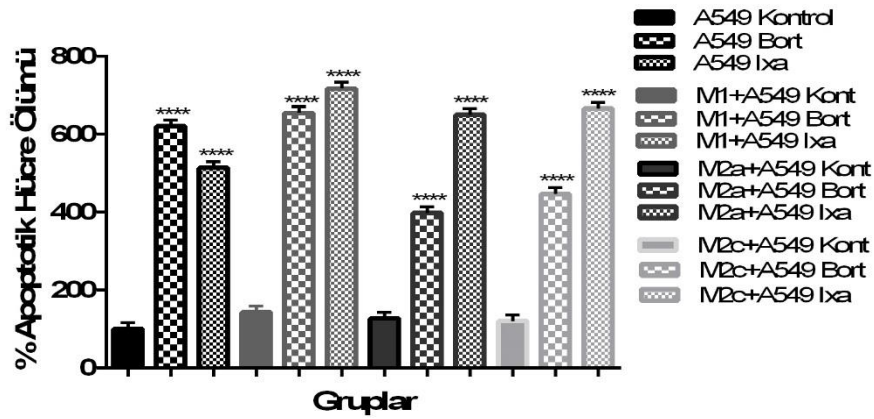
Şekil 5.32. A549 hücrelerinde tekli ve makrofaj (M1, M2a ve M2c) ko-kültür gruplarında bortezomib (IC_{50} : 45 nM) ve ixazomibin (IC_{50} : 2 μ M) apoptotik etkilerinin akış sitometride belirlenmesi.



Şekil 5.32. (Devam) A549 hücrelerinde tekli ve makrofaj (M1, M2a ve M2c) ko-kültür gruplarında bortezomib (IC_{50} :45 nM) ve ixazomibin (IC_{50} : 2 μ M) apoptotik etkilerinin akış sitometride belirlenmesi.

Tablo 5.7. A549 hücrelerinde tekli ve makrofaj ile ko-kültür gruplarında bortezomib (IC_{50} : 45 nM) ve ixazomibin (IC_{50} : 2 μ M) Annexin-PI Apoptoz Sonuçları (%).

Gruplar	Canlı hücre %	Nekrotik hücre%	Erken Apoptotik hücre %	Geç Apoptotik hücre %	Toplam Apoptotik Hücre %
A549 Kontrol	92.3	1.5	2.0	4.2	6.2
A549 Bortezomib	60.5	0.9	24.4	14.1	38.5
A549 İxazomib	62.4	5.7	16.0	15.9	31.9
M1 +A549 Kontrol	90.5	0.6	4.6	4.3	8.9
M1 +A549 Bortezom	42.6	16.8	13.3	27.3	40.6
M1 +A549 İxazomib	33.7	21.8	13.4	31.1	44.5
M2a +A549 Kontrol	90.8	1.4	2.9	5.0	7.9
M2a +A549 Bortezomib	71.1	4.2	8.6	16.1	24.7
M2a +A549 İxazomib	51.0	8.7	13.5	26.8	40.3
M2c +A549 Kontrol	91.8	0.8	3.4	4.1	7.5
M2c +A549 Bortezomib	70.3	2.1	12.9	14.8	27.7
M2c +A549 İxazomib	48.3	10.4	14.1	27.2	41.3



Şekil 5.33. A549 hücrelerinde tekli ve makrofaj ko-kültür gruplarında bortezomib (IC_{50} : 45 nM) ve ixazomibin (IC_{50} : 2 μ M), A549 kontrol grubuna göre toplam apoptotik hücre ölümü yüzdesi ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi (kontrol: %0.1 DMSO, n=3, ortalama±standart sapma, $p>0.05$, $p<0.0001$ ****).

Şekil 5.32, 5.33 ve Tablo 5.7 de görüldüğü gibi bortezomib ve ixazomibin toplam apoptotik etkisi (erken apoptoz+geç apoptoz) hem tekli kültür hemde M1, M2a ve M2c polarize makrofajlar ile oluşturulan ko-kültür gruplarında artış göstermiştir. En fazla

nekrotik hücre ölümünün kontrole göre, M1 polarize makrofaj ko-kültür grubunda olduğu belirlenmiş olup, M1 makrofaj + A549 bortezomib ve M1 makrofaj + A549 ixazomib gruplarında sırasıyla %16.8 ve %21.8 olarak analiz edilmiştir. En fazla apoptotik hücre ölümü, ko-kültür M1 polarize makrofaj bortezomib ve ixazomib gruplarında olduğu belirlenmiştir. M1 makrofaj + A549 bortezomib ve M1 makrofaj + A549 ixazomib gruplarında sırasıyla toplam apoptotik yüzde %40.6 ve %44.5 olarak hesaplanmıştır. Tekli kültür grubunun A549+bortezomib ve A549+ixazomib gruplarında toplam yüzde apoptotik oranları sırasıyla; %38.5 ve %31.9 olarak belirlenmiştir. M2a ve M2c polarize ko-kültür gruplarında M1 polarize makrofaj ko-kültür gruplarına göre, nekrotik hücre ölümüne benzer şekilde apoptotik hücre ölümünde de azalma belirlenmiştir. Bortezomib (IC₅₀: 45 nM) ve ixazomib (IC₅₀: 2 µM) konsantrasyonu uygulanan tüm gruplar, A549 kontrol grubuna göre toplam apoptotik hücre ölüm yüzdesine bakımından anlamlı (p<0.0001****) bulunmuşlardır.

Bortezomib ve ixazomibin apoptotik etkileri karşılaştırıldığında, ixazomibin A549 hücrelerinde ko-kültür gruplarında toplam apoptotik hücre oranının bortezomibe göre daha yüksek olduğu M1 Makrofaj + A549 ixazomib, M2a Makrofaj + A549 ixazomib ve M2c Makrofaj + A549 ixazomib gruplarında sırasıyla; %44.5, %40.3, %41.3 bulunmuş olup, ixazomibin apoptotik hücre ölümüne etkisinin, makrofajların farklı polarize durumlarından etkilenmediği belirlenmiştir.

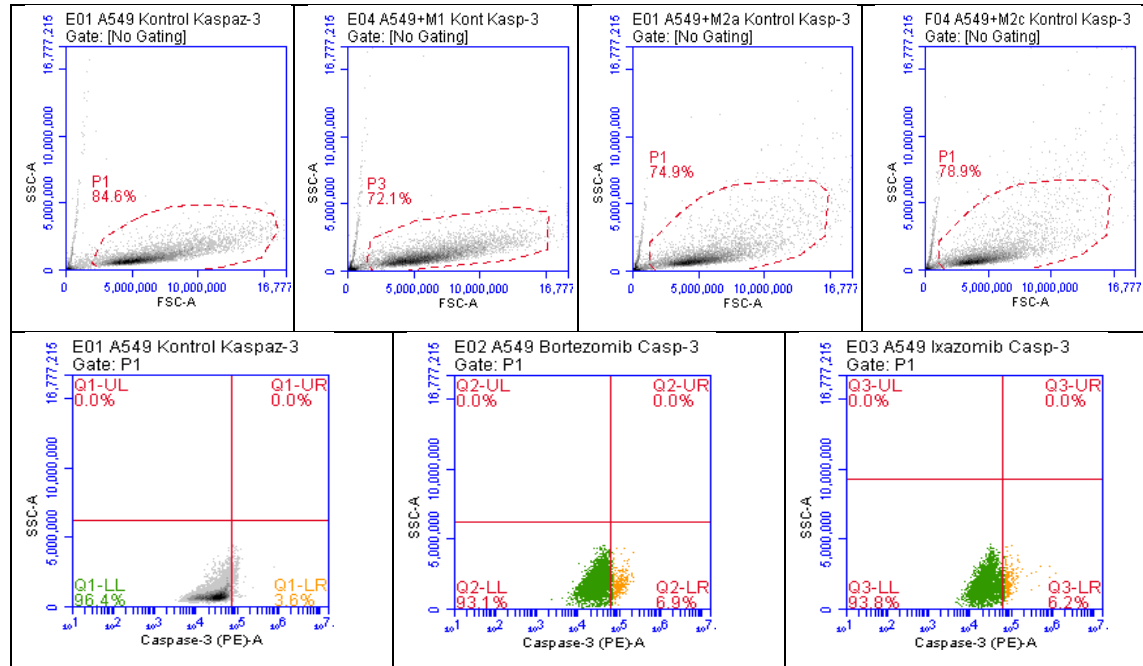
A549 hücreleri ve M1, M2a ve M2c makrofaj ko-kültür gruplarında (ilaç uygulaması yapılmayan) erken apoptoz sonuçlarında A549 kontrole göre, A549 + M1 makrofaj grubunda 2 kat artış belirlenirken, A549 + M2a ve A549 + M2c grubunda kat artışı bulunamamıştır. Bu sonuçlarımıza paralel olarak Yuan ve diğerlerinin yaptığı çalışmada, polarize makrofajların A549 hücreleri üzerindeki apoptotik etkileri Annexin-PI akış sitometri yöntemi ile araştırılmış ve A549 kontrol, A549 + M1 makrofaj, A549 + M2 makrofaj ve A549+M2c makrofaj erken apoptoz yüzdeleri sırasıyla; 1.1, 15.06, 6.0 ve 1.5 olarak bildirilmiştir (Yuan vd., 2015).

Apoptoz hücre-içi ve hücre-dışı yollar tarafından aktive edilen ve birçok protein tarafından regüle edilen, kontrollü ve programlı bir hücre ölümüdür (Raff, 1998). Proteozom inhibitörlerinin, kanser hücrelerinde apoptoza neden oldukları önceki çalışmalarda bildirilmiştir (Dutaud vd., 2002; Chauhan vd., 2011). Annexin V-PI sonuçlarımıza göre, bortezomib ve ixazomibin IC₅₀ konsantrasyonlarının A549 tekli kültür grubunda, kontrole göre apoptotik etkilerinin istatistiksel olarak aynı olduğu

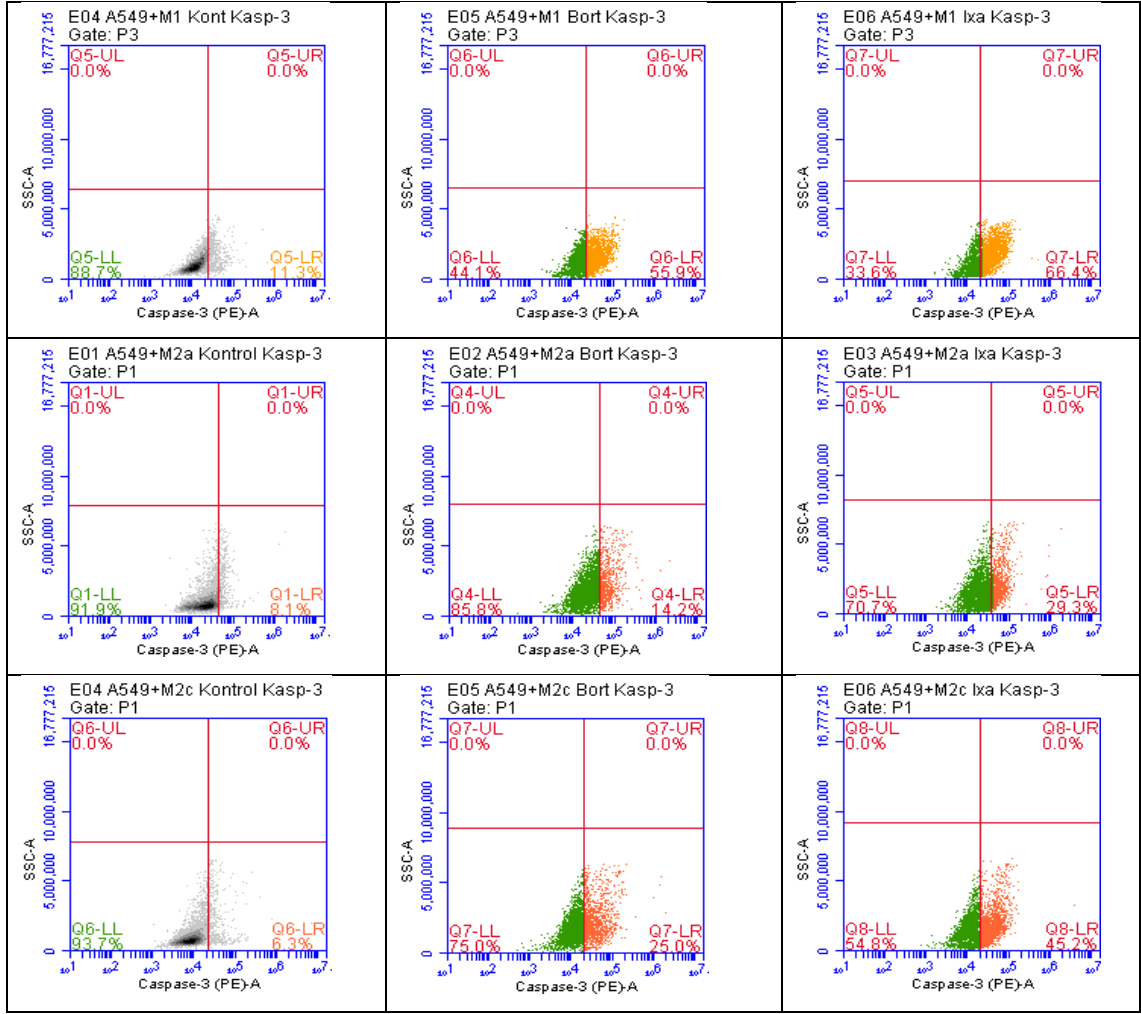
belirlenmiştir. Bortezomibin A549 hücreleri üzerinde apoptotik etkisi önceki çalışmalarda araştırılmıştır ve sonuçlar bizim bulgularımız ile paraleldir. Cascone ve diğerlerinin yaptığı bir çalışmada 25 nM bortezomib konsantrasyonu ile 48 saat inkübe edilen A549 hücrelerinde, akış sitometride belirlenen apoptotik yüzdesi kontrole 6 kat artış göstermiştir (Cascone vd., 2008). İxazomib'in A549 hücrelerinde apoptotik etkisini araştırıldığı çalışmaya rastlanmamış fakat birçok solid tümör hücre hatlarında (kolon, prostat, hepatoselüler karsinom hücreleri) apoptotik etkileri olduğu bildirmiştir (Wei vd., 2014; Engür ve Dikmen, 2017; Augello vd., 2018)

5.1.5.3. Akış sitometride kaspaz-3 aktivasyonu ile apoptotik etkinin değerlendirilmesi

A549 hücreleri ile tekli kültür ve makrofaj ile ko-kültür modelinin oluşturulmasından sonra bortezomib (IC₅₀: 45 nM) ve ixazomibin (IC₅₀: 2 µM) konsantrasyonları A549 hücrelerine uygulanmıştır. Daha sonra hücreler 48 saatlik inkübasyonlara bırakılmıştır. İnkübasyon süreleri sonunda herbir gruba ait A549 hücreleri kaldırılarak, kaspaz-3 aktivasyonun belirlenmesi amacıyla 'PE Active Caspase-3 Apoptosis Kit (Katalog no: 550914, BD)' protokolü uygulanmıştır. Daha sonra örnekler akış sitometri cihazında (Accuri C6, BD) ölçülerek analiz edilmiştir. Sonuçlar **Şekil 5.34**, **5.35** ve **Tablo 5.8**'da verilmiştir.



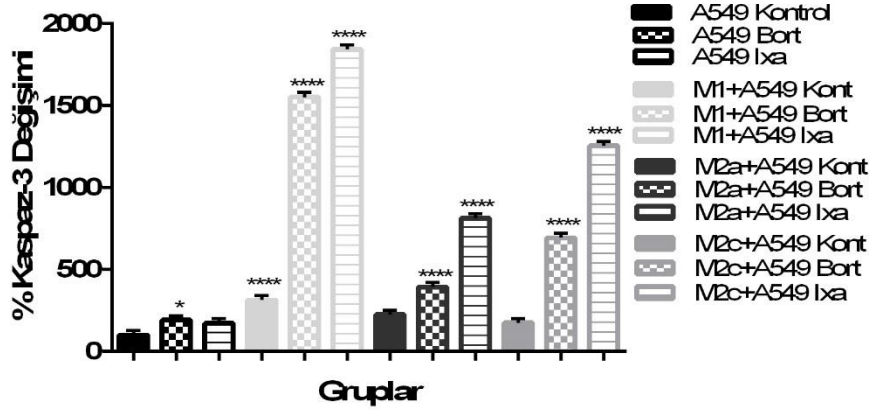
Şekil 5.34. A549 hücrelerinde tekli ve makrofaj (M1, M2a ve M2c) ko-kültür gruplarında bortezomib (IC₅₀:45 nM) ve ixazomibin (IC₅₀: 2 µM) kaspaz-3 seviyelerinin akış sitometride belirlenmesi.



Şekil 5.34. (Devam) A549 hücrelerinde tekli ve makrofaj (M1, M2a ve M2c) ko-kültür gruplarında bortezomib ve ixazomibin kaspaz-3 seviyelerinin akış sitometride belirlenmesi.

Tablo 5.8. A549 hücrelerinde bortezomib ve ixazomibin kaspaz-3 seviyeleri (%).

Gruplar	Kaspaz-3 Negatif (%)	Kaspaz-3 Pozitif (%)
A549 Kontrol	96.4	3.6
A549 Bortezomib	93.1	6.9
A549 İxazomib	93.8	6.2
M1+A549 Kontrol	88.7	11.3
M1+A549 Bortezomib	44.1	55.9
M1+A549 İxazomib	33.6	66.4
M2a+A549 Kontrol	91.9	8.1
M2a+A549 Bortezomib	85.8	14.2
M2a+A549 İxazomib	70.7	29.3
M2c+A549 Kontrol	93.7	6.3
M2c+A549 Bortezomib	75.0	25.0
M2c+A549 İxazomib	54.8	45.2



Şekil 5.35. A549 hücrelerinde tekli ve makrofaj ko-kültür gruplarında bortezomib (IC_{50} :45 nM) ve ixazomib (IC_{50} :2 μ M)'in A549 kontrol grubuna göre kaspaz-3 seviyelerindeki değişim yüzdesi ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi (kontrol: %0.1 DMSO, $n=3$, ortalama $\pm$ standart sapma, $p>0.05$, $p<0.05^*$, $p<0.001^{***}$, $p<0.0001^{****}$).

Şekil 5.34, 5.35 ve Tablo 5.8' de görüldüğü gibi A549 kontrol grubuna göre bütün deney gruplarında, Annexin/PI apoptoz sonuçlarına paralel olarak, kaspaz-3 seviyelerinde de belirgin bir artış belirlenmiştir. Şekil 5.35'te A549 hücrelerinde, bortezomib ve ixazomibin kaspaz-3 seviyelerine olan etkisine bakıldığında, A549 kontrol grubuna göre, tekli kültür grubunda sadece A549+bortezomib grubundaki kaspaz-3 pozitif hücre sayısındaki artış anlamlı bulunmuştur ($p<0.05^*$). M1 makrofaj+A549 (kontrol), M1 makrofaj+A549 bortezomib, M1 makrofaj+A549 ixazomib ve M2 (M2a ve M2c) polarize makrofajlar ile oluşturulmuş A549 ko-kültür bortezomib ve ixazomib gruplarında kaspaz-3 aktivasyonlarında önemli artışlar belirlenmiştir ($p<0.0001^{****}$). Kaspaz-3 seviyelerinde en fazla artış M1 polarize makrofaj ile oluşturulan ko-kültür grubunda analiz edilmiştir. M1 makrofaj +A549 (kontrol), M1 makrofaj +A549 bortezomib ve M1 makrofaj +A549 ixazomib gruplarında sırasıyla kaspaz-3 pozitif hücre yüzdeleri, %11.3, 55.9 ve 66 dır. Özellikle M1 polarize makrofaj ile oluşturulan ko-kültür kontrol grubundaki kaspaz-3 pozitif hücre yüzde artışı, deney sonuçlarımız arasında önemli olan bir bulgudur ($p<0.0001^{****}$). (Şekil 5.35).

Apoptoz sonuçlarımıza paralel olarak, bütün ko-kültür gruplarında ixazomibin kaspaz-3 seviyelerini bortezomibe göre daha fazla arttırdığı belirlenmiştir. M1 makrofaj+A549 ixazomib, M2a makrofaj+A549 ixazomib ve M2c makrofaj+A549 ixazomib gruplarında kaspaz-3 seviyeleri sırasıyla; %66.4, %29.3, %45.2'dir.

İxazomib'in, A549 hücrelerinde kaspaz-3 seviyelerini hem M1 hemde M2c makrofaj ko-kültür gruplarında, kendi kontrol gruplarına göre yaklaşık 6 kat arttırarak, bortezomibe göre daha etkili olduğu belirlenmiştir.

Kaspazlar hücre ölümüne ve inflamasyona aracılık eden hücre içi sistein proteazlarıdır. Kaspaz-3 hem apoptotik hem de nekrotik hücre ölümünün önemli bir aracısıdır. Kaspaz-1, sitokinlerin interlökin-1beta (IL-1beta) ve interlökin-18'in (IL-18) aktivasyonu ile inflamasyona aracılık eder (Faubel ve Edelstein, 2005). Makrofajlarının enfeksiyonu (LPS benzeri etki/M1 makrofaj) kaspaz-1 aktivasyonuna ve IL-1 β ve IL-18 üretimine ve ayrıca kaspaz-3, -7, -8 ve -9 aktivasyonuna yol açmaktadır (Cohen, 1997).

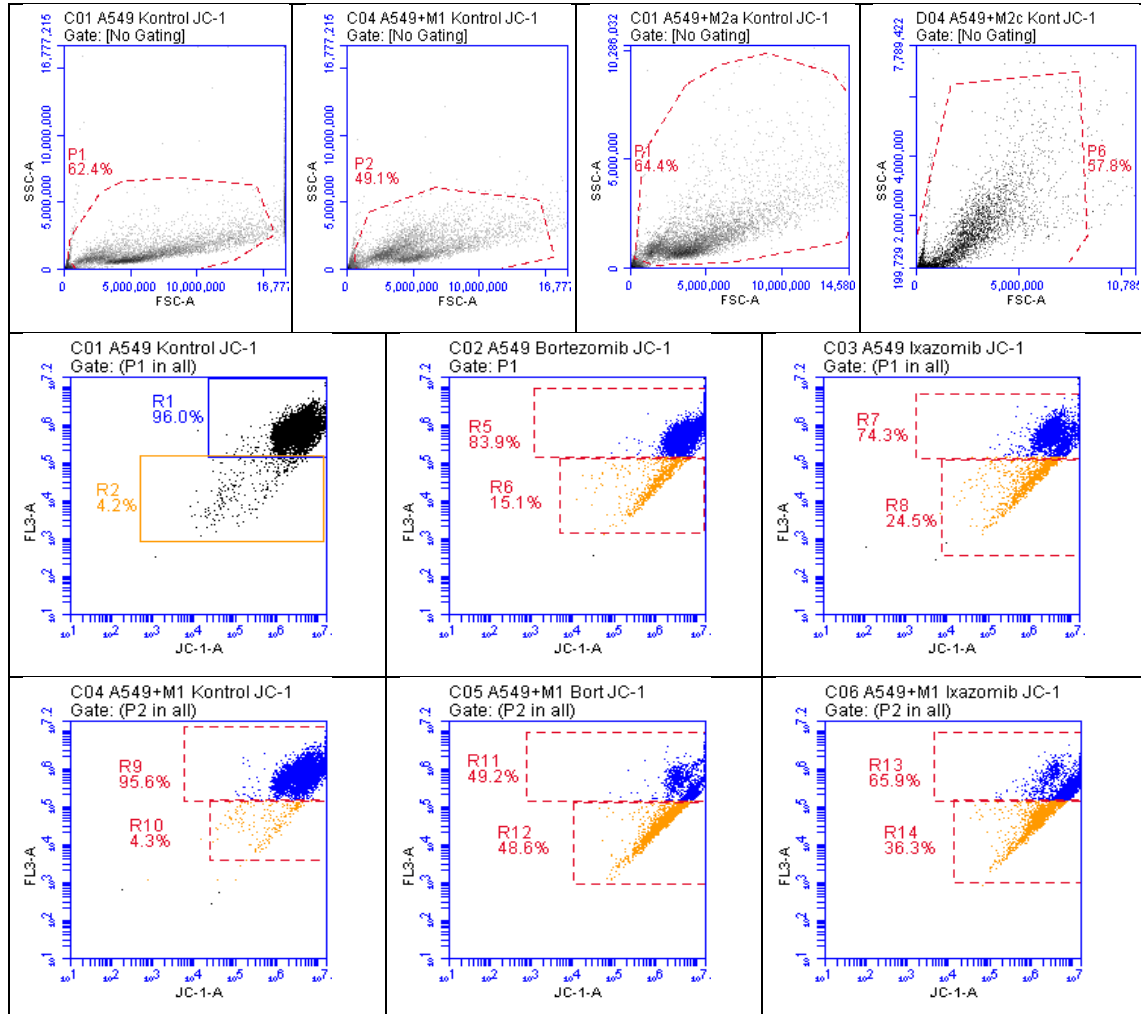
Bu tez çalışmasında tümör mikroçevresinde bulunarak pro-inflamatuvar sitokinlerin artışına sebep olan ve kanser progresyonu önlediği bilinen M1 polarize makrofajların (Mosser, 2003; Biswas ve Mantovani, 2010), A549 hücreleri ile ko-kültürü sonucunda, A549 kontrol grubuna göre aktif kaspaz-3 seviyelerini arttırdığı ilk kez bu çalışmada belirlenmiştir. Sonuçlarımıza paralel olarak, murin meme kanseri hücreleri 4T1 ile M1 ve M2 polarize RAW264.7 makrofaj hücreleri ile yapılan bir çalışmada M1 makrofaj ile ko-kültür sonucunda 4T1 hücrelerinin kaspaz-3 mRNA seviyelerinin kontrole göre 3 kat arttığı, M2 makrofaj +4T1 grubunda ise kontrole göre ekspresyonun arttığı fakat istatistiksel olarak anlamlı bulunmadığı bildirilmiştir (Wang vd., 2019).

Literatürde, A549 hücrelerinde bortezomibin kaspaz-3 seviyelerine etkisi RT-PCR, kolorimetrik (Li ve Yang, 2012), western blot (Mortenson vd., 2004; Wu vd., 2014), florometrik (Denlinger vd., 2004) gibi farklı yöntemler ile değerlendirilmiş ve bütün bu çalışmalarda kaspaz-3 seviyelerini arttırmış olduğu bildirilmiştir. İxazomib'in A549 hücrelerinde kaspaz-3 seviyelerinin değerlendirildiği bir çalışmaya ise rastlanmamıştır.

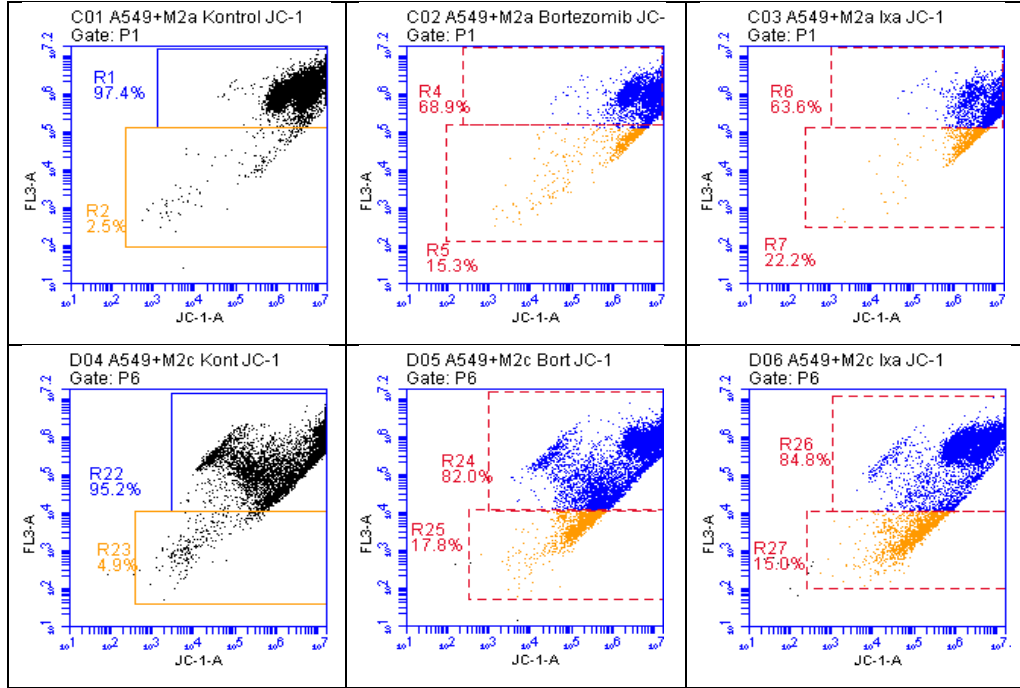
Çalışmamız A549 hücreleri ile tekli kültür ve makrofaj ile ko-kültür modelinin oluşturulmasından sonra bortezomib ve ixazomibin kaspaz-3 seviyelerine etkisinin karşılaştırılmalı olarak belirlendiği ilk çalışmadır. Yapılan bir çalışmada bulgularımıza paralel olarak HepG2 ve A549 hücrelerinin, M0, M1 ve M2 makrofaj ko-kültür gruplarında etoposet konsantrasyonunun, hem HepG2 hemde A549 hücrelerinde M1 makrofaj ile oluşturulan ko-kültür grubunda kontrole göre kaspaz-3 seviyelerinin artış gösterdiği western blot yöntemi ile belirlenerek bildirilmiştir. (Genin vd., 2015). Ayrıca çalışmamızda A549 hücrelerinde ile ko-kültür edilen M2 makrofajların farklı alt tiplere (M2a ve M2c) göre değerlendirilmesi çalışmamıza özgün değer katmaktadır.

5.1.5.4. Akış sitometride JC-1 boyama yöntemi ile hücrelerin mitokondrial membran bütünlüğünün değerlendirilmesi

A549 hücreleri ile tekli kültür ve makrofaj ile ko-kültür modelinin oluşturulmasından sonra bortezomib (IC_{50} : 45 nM) ve ixazomib (IC_{50} : 2 μ M) konsantrasyonları A549 hücrelerine uygulanmıştır. Daha sonra plakalar 48 saatlik inkübasyonlara bırakılmıştır. İnkübasyon süreleri sonunda her bir gruba ait A549 hücreleri kaldırılarak, hücrelerin mitokondriyal membran bütünlüğünün belirlenmesi amacıyla “Mitokondriyal Membran Potansiyeli Belirleme Kit (Katalog no:551302, BD)” protokolü uygulanmıştır. Daha sonra örnekler akış sitometri cihazında (Accuri C6, BD) ölçülerek analiz edilmiştir. Sonuçlar Şekil 5.36, 5.37 ve Tablo 5.9’da verilmiştir.



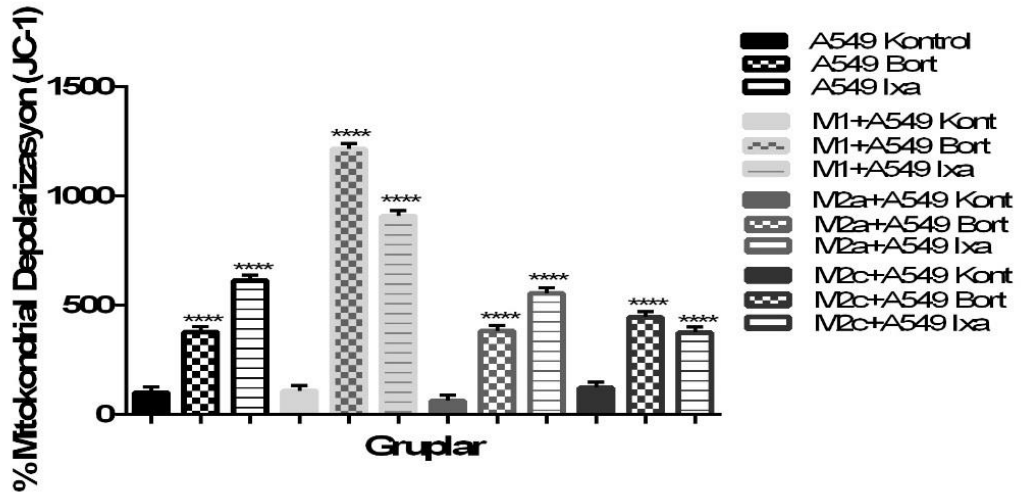
Şekil 5.36. A549 hücrelerinde tekli ve makrofaj (M1, M2a ve M2c) ko-kültür gruplarında bortezomib (IC_{50} :45 nM) ve ixazomibin (IC_{50} :2 μ M) mitokondrial membran bütünlüğüne olan etkilerinin akış sitometride belirlenmesi.



Şekil 5.36. (Devam) A549 hücrelerinde tekli ve makrofaj (M1, M2a ve M2c) ko-kültür gruplarında bortezomib (IC_{50} :45 nM) ve ixazomib (IC_{50} :2 μ M) mitokondrial membran bütünlüğüne olan etkilerinin akış sitometride belirlenmesi.

Tablo 5.9. A549 hücrelerinde tekli ve makrofaj ko-kültür gruplarında bortezomib (IC_{50} : 45 nM) ve ixazomib (IC_{50} : 2 μ M)'in JC-1 seviyeleri (%).

Gruplar	JC-1 Negatif (%)	JC-1 Pozitif (%)
A549 Kontrol	96.0	4.0
A549 Bortezomib	83.9	15.1
A549 İxazomib	74.3	24.5
M1+A549 Kontrol	95.6	4.3
M1+A549 Bortezomib	49.2	48.6
M1+A549 İxazomib	65.9	36.3
M2a+A549 Kontrol	97.4	2.5
M2a +A549 Bortezomib	68.9	15.3
M2a+A549 İxazomib	63.6	22.2
M2c +A549 Kontrol	95.2	4.9
M2c +A549 Bortezomib	82.0	17.8
M2c +A549 İxazomib	84.8	15.0



Şekil 5.37. A549 hücrelerinde tekli ve makrofaj ko-kültür gruplarında bortezomib (IC_{50} : 45 nM) ve ixazomibin (IC_{50} : 2 μ M), A549 kontrol grubuna göre mitokondrial depolarizasyon seviyeleri yüzdesi ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi (kontrol: %0.1 DMSO, $n=3$ ortalama $\pm$ standart sapma, $p>0.05$, $p<0.0001$ ****).

Şekil 5.36, 5.37 ve Tablo 5.9’ de görüldüğü gibi A549 hücrelerinde kontrol grubuna göre bütün deney gruplarında, apoptoz ve kaspaz-3 sonuçlarına benzer şekilde, mitokondrial depolarizasyon seviyelerinde de artış belirlenmiştir. A549 hücrelerinde en yüksek mitokondrial depolarizasyon M1 makrofaj ile oluşturulan ko-kültür grubunda analiz edilmiş olup, JC-1 pozitif hücre yüzdeleri, M1 makrofaj kontrol grubuna (%4.3), göre, M1 makrofaj+A549 bortezomib grubunda (%48.6) 11 kat ve M1 makrofaj+A549 ixazomib grubunda (%36.3) 8 kat artış göstermiştir. Ayrıca Şekil 5.37’de görüldüğü gibi hem tekli kültür gruplarında hem de M1, M2a ve M2c makrofajlar ile oluşturulan ko-kültür gruplarında kontrole göre tüm bortezomib ve ixazomib gruplarındaki mitokondrial depolarizasyon artışı anlamlı ($p<0.0001$ ****) belirlenmiştir.

Yapılan çalışmalarda, mitokondrial membran bütünlüğünün bozulmasının artışı, apoptozun bir göstergesi olarak bildirilmiştir (Yao vd., 2007; Shanker vd, 2008; Chitambar ve Purpi, 2010). Çalışmamızda A549 kontrol grubuna göre M1, M2a ve M2c makrofajlar ile ko-kültür olan A549 hücrelerinin mitokondrial depolarizasyon seviyelerinde istatistiksel olarak fark belirlenememiştir. A549 hücrelerinde özellikle M1 makrofaj ko-kültür grubunda, bortezomib ve ixazomibin mitokondrial depolarizasyon artışı yapması apoptoz ve kaspaz-3 sonuçlarımızı desteklemektedir.

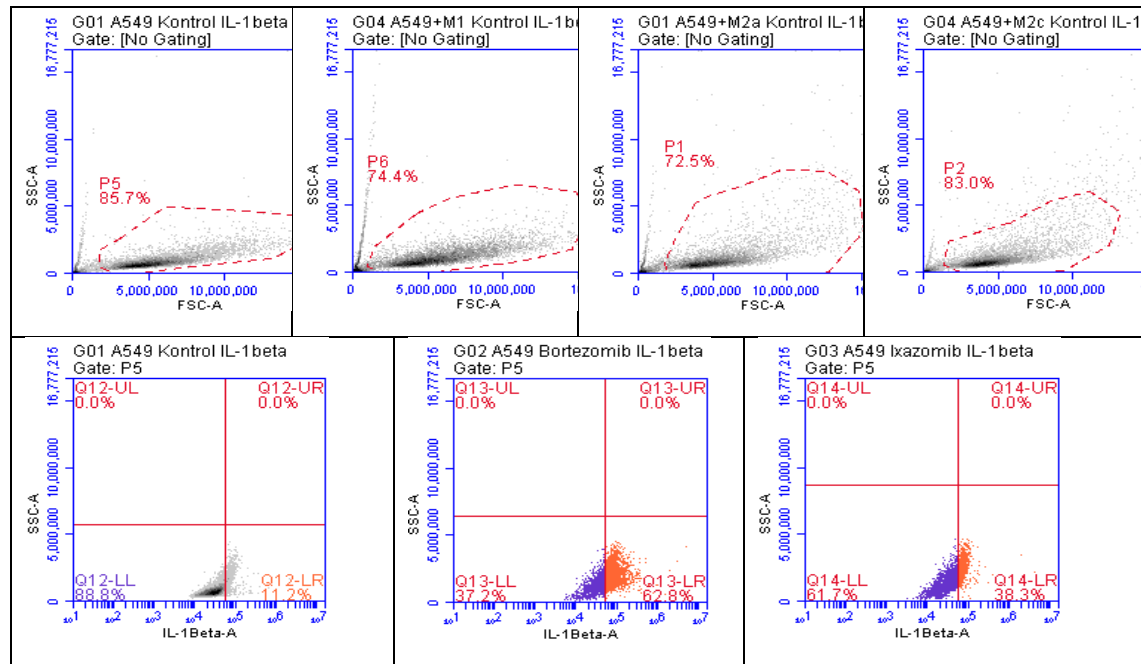
Yapılan bir çalışmada, A549 hücrelerinin bortezomibin 10, 15 ve 20 nM konsantrasyonları ile inkübe edilmesinin mitokondrial membran potansiyelinin

bozulmasını, kontrole göre sırasıyla 2, 3 ve 4 kat arttırdığı bildirilmiştir (Wu vd., 2014). Önceki çalışmalarda ixazomibin A549 hücrelerinde mitokondrial depolarizasyona etkisinin belirlendiği çalışma bulunmamakla beraber, Caco2 kolon kanseri hücrelerinde yapılan bir çalışmada; MLN2238 (ixazomib)'nin 10 ve 20 μ M konsantrasyonlarında JC-1 seviyelerinin istatistiksel olarak ($p < 0.01^{**}$) arttığı bildirilmiştir (Engür ve Dikmen, 2017).

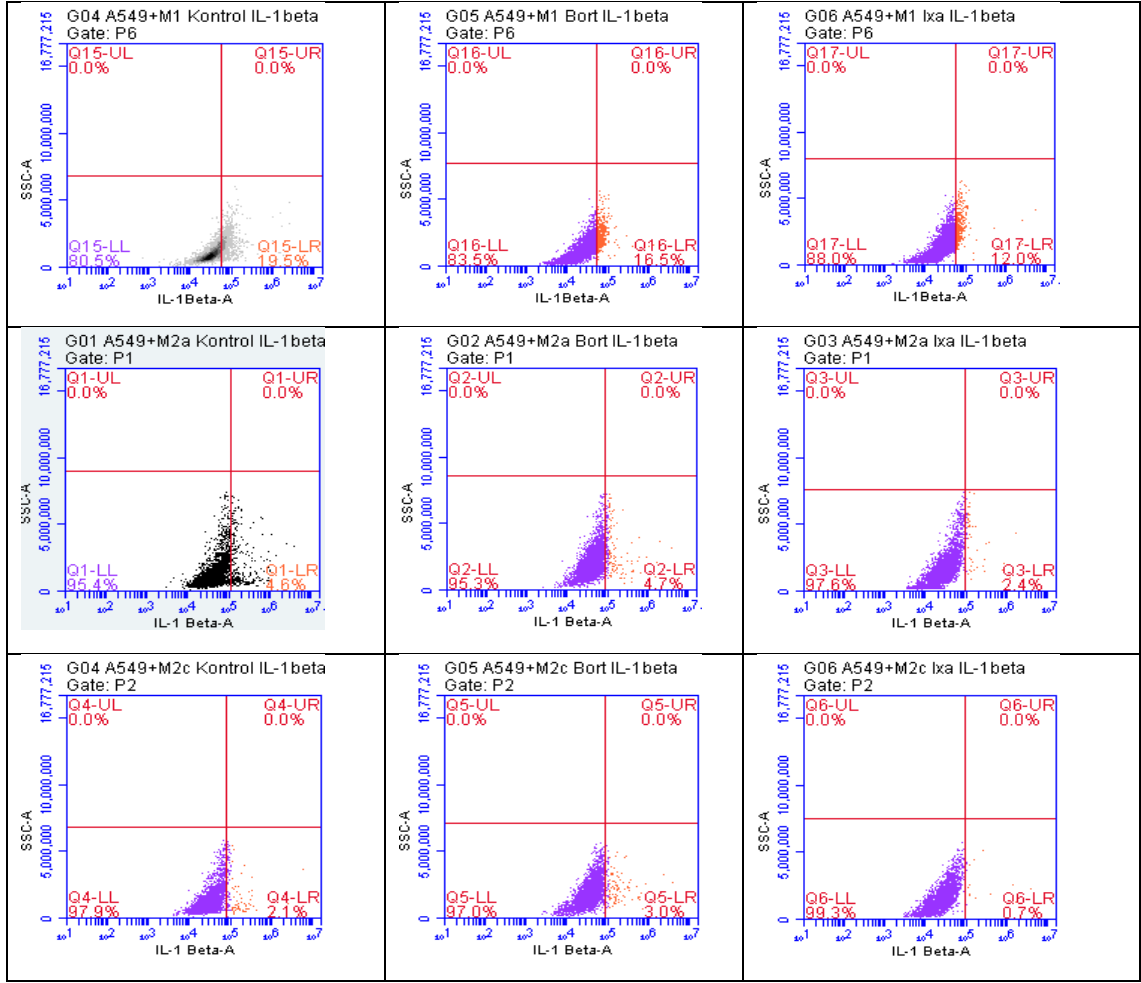
Çalışmamız A549 hücreleri ile tekli kültür ve M1, M2a, M2c makrofaj ile ko-kültür modelinin oluşturulmasından sonra bortezomib ve ixazomibin mitokondrial membran kaybına etkisinin etkisinin karşılaştırılmalı olarak belirlendiği ilk çalışmadır literatürde karşılaştırma yapılabilecek başka bulguya rastlanılmamıştır.

5.1.5.5. Akış sitometride interlökin 1-beta seviyelerinin değerlendirilmesi

A549 hücreleri ile tekli kültür ve makrofaj ile ko-kültür modelinin oluşturulmasından sonra bortezomib (IC_{50} :45 nM) ve ixazomibin (IC_{50} :2 μ M) konsantrasyonları A549 hücrelerine uygulanmıştır. Daha sonra hücreler 48 saatlik inkübasyonlara bırakılmıştır. İnkübasyon süreleri sonunda herbir gruba ait A549 hücreleri kaldırılarak, hücre içi IL-1beta seviyeleri akış sitometri yöntemi ile belirlenmiş ve analiz edilmiştir. Sonuçlar Şekil 5.38, 5.39 ve Tablo 5.10'da verilmiştir.



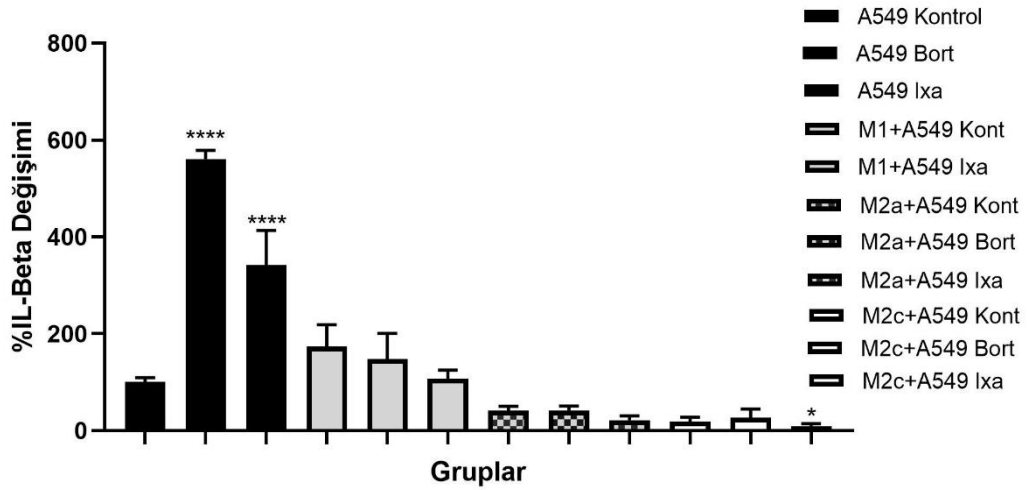
Şekil 5.38. A549 hücrelerinde tekli ve makrofaj (M1, M2a ve M2c) ko-kültür gruplarında bortezomib (IC_{50} : 45 nM) ve ixazomibin (IC_{50} : 2 μ M), IL-1 β seviyelerine etkisinin akış sitometride belirlenmesi.



Şekil 5.38. (Devam) A549 hücrelerinde tekli ve makrofaj (M1, M2a ve M2c) ko-kültür gruplarında bortezomib ve ixazomibin, IL-1 β seviyelerine etkisi.

Tablo 5.10. A549 hücrelerinde bortezomib ve ixazomibin IL-1 β seviyelerine etkisi (%).

Gruplar	IL-1 Beta Negatif (%)	IL-1 Beta Pozitif (%)
A549 Kontrol	88.8	11.2
A549 Bortezomib	37.2	62.8
A549 İxazomib	61.7	38.3
M1+A549 Kontrol	80.5	19.5
M1+A549 Bortezomib	83.5	16.5
M1+A549 İxazomib	88.0	12.0
M2a+A549 Kontrol	95.4	4.6
M2a+A549 Bortezomib	95.3	4.7
M2a+A549 İxazomib	97.6	2.4
M2c+A549 Kontrol	97.9	2.1
M2c+A549 Bortezomib	97.0	3.0
M2c+A549 İxazomib	99.3	0.7



Şekil 5.39. A549 hücrelerinde tekli ve makrofaj ko-kültür gruplarında bortezomib (IC_{50} :45 nM) ve ixazomibin (IC_{50} :2 μ M), A549 kontrol grubuna göre IL-1 β pozitif hücre yüzdesi ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi (kontrol: %0.1 DMSO, n=3, ortalama $\pm$ standart sapma, $p>0.05$, $p<0.05$ *, $p<0.0001$ ****).

Şekil 5.38, 5.39 ve **Tablo 5.10'** de görüldüğü gibi A549 hücrelerinde bortezomib (IC_{50} : 45 nM) ve ixazomibin (IC_{50} : 2 μ M), 48 saatlik inkübasyon sonunda A549 kontrole göre IL-1 β seviyelerini sırasıyla yaklaşık olarak 6 ve 4 kat arttırdığı belirlenmiştir ($p<0.0001$ ****). A549 hücreleri ve M1, M2a ve M2c makrofaj ile oluşturulan ko-kültür gruplarında ise sadece M2c+A549 makrofaj ixazomib grubunda istatistiksel olarak da belirlenen bir azalma belirlenmiştir ($p<0.05$ *).

Çalışmamızda **Şekil 5.9'** de verilmiş olan IL-1 β mRNA ekspresyon seviyeleri, flow sitometride belirlenmiş olduğumuz bulgular ile benzerlik göstermektedir. Bu sonuçlara göre A549 hücrelerinin M1 makrofajla ko-kültürü sonucunda IL-1 β seviyelerindeki artışın sebebi olarak, M1 makrofajın IL-1 β seviyelerinin yüksek olması olarak gösterilebilir. Ayrıca kaspaz-3 sonuçlarımızda belirlenen (**Şekil 5.35**) hem M1 makrofaj+A549 kontrol grubunda, hemde M1 makrofaj+A549 bortezomib ve ixazomib gruplarında belirlenen kaspaz-3 seviyelerinin artışları, IL-1 β seviyelerinin yüksek olmasını desteklemektedir. Çünkü makrofajlarının inflamasyonunun (LPS benzeri etki/M1 makrofaj) kaspaz-1 aktivasyonuna ve IL-1 β üretimine ve ayrıca kaspaz-3, -7, -8 ve -9 aktivasyonuna yol açtığı önceki çalışmalarda bildirilmiştir. (Cohen, 1997).

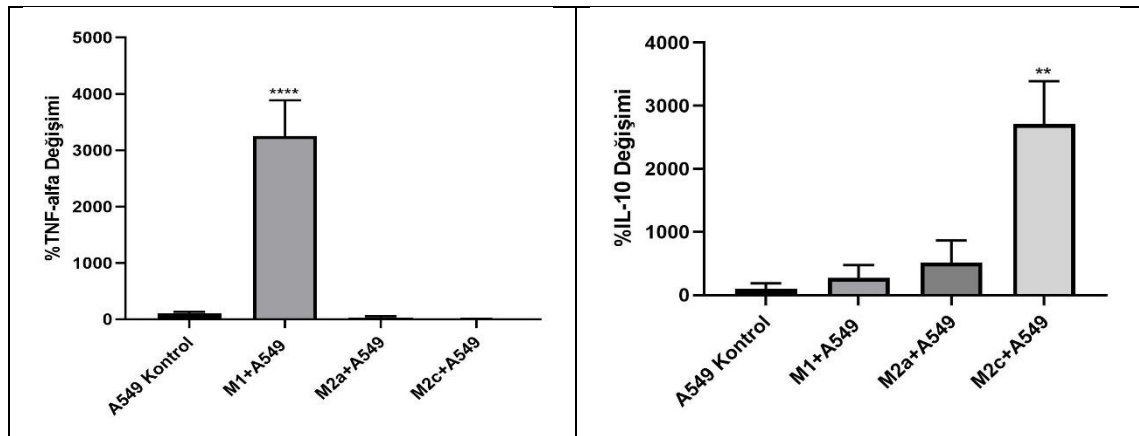
Önceki çalışmalarda, A549 hücrelerinde bortezomib veya ixazomibin IL-1 β seviyelerine etkisinin araştırıldığı bir bulguya rastlanmamıştır. Ancak farelerden izole edilen akciğer kanser hücrelerinde NF- κ B'nin farmakolojik inhibitörü olan bortezomibin

IL-1 β protein seviyelerini ve yine aynı çalışmada akciğer kanser hastalarında plazma IL-1 β düzeylerini arttırdığı bildirilmiştir (Mcloed vd., 2016).

5.1.5.6. Akış sitometride TNF-alfa ve IL-10 sitokin seviyelerinin EMT yolağına ilişkin etkilerinin değerlendirilmesi

EMT yolağının aktive olup olmadığının belirlenmesi amacıyla A549 hücreleri ile M1, M2a ve M2c polarize makrofajlar ile oluşturulan ko-kültür gruplarından alınan hücre süpernatantlarından, sitokin seviyeleri akış sitometri yöntemi kullanılarak belirlenmiştir.

TNF-alfa ve IL-10 sitokin seviyelerinin için “İnsan İnflamasyon Sitokin Kiti (BD 551811)” kullanılmış ve kit prosedürüne uygun olarak uygulanmıştır. Bu amaçla, önce kit içinde bulunan sitokin standartları 1:2-1:256 aralığında dilüe edilmiştir. Standartlar ve örnekler kit prosedürüne uygun olarak çalışılarak sitokin seviyeleri akış sitometri cihazında (Accuri C6, BD) belirlenmiş ve FCAP Array Software kullanılarak veriler analiz edilmiştir.



Şekil 5.40. A549 hücreleri ile M1, M2a ve M2c polarize makrofaj ko-kültür gruplarında ölçülen TNF-alfa ve IL-10 sitokin seviyeleri (%) (kontrol: %0.1 DMSO, n=3, ortalama±standart sapma, $p>0.05$, $p<0.05^*$, $p<0.01^{**}$, $p<0.0001^{****}$).

Şekil 5.40’ da A549 hücrelerinde kontrol grubuna göre ölçülen TNF-alfa sitokin seviyelerinde sadece M1 polarize makrofaj ile oluşturulan ko-kültür grubunda anlamlı artış ($p<0.0001^{****}$) belirlenmiştir. IL-10 sitokin seviyeleri hem M2a hemde M2c polarize makrofaj ile oluşturulan ko-kültür gruplarında artmış olup, özellikle M2c makrofaj ko-kültür grubundaki artış anlamlı bulunmuştur ($p<0.01^{**}$).

Önceki çalışmalarda, kanser hücrelerinin makrofajlar ile, birlikte kültürlemesi sonucunda, akciğer kanseri hücrelerindeki gen ekspresyon profillerinin değişebildiği bildirilmiştir (Chen vd., 2005; Mantovani vd., 2006; Yuan vd., 2015). Yapılan

çalışmalarda, IL-10 seviyelerinin artması sonucunda EMT indüklenmesi meydana geldiği bildirilmiştir (Bonde vd., 2012; Liu vd, 2013) ve bu da bizim sonuçlarımızdaki bulguyu destekler niteliktedir.

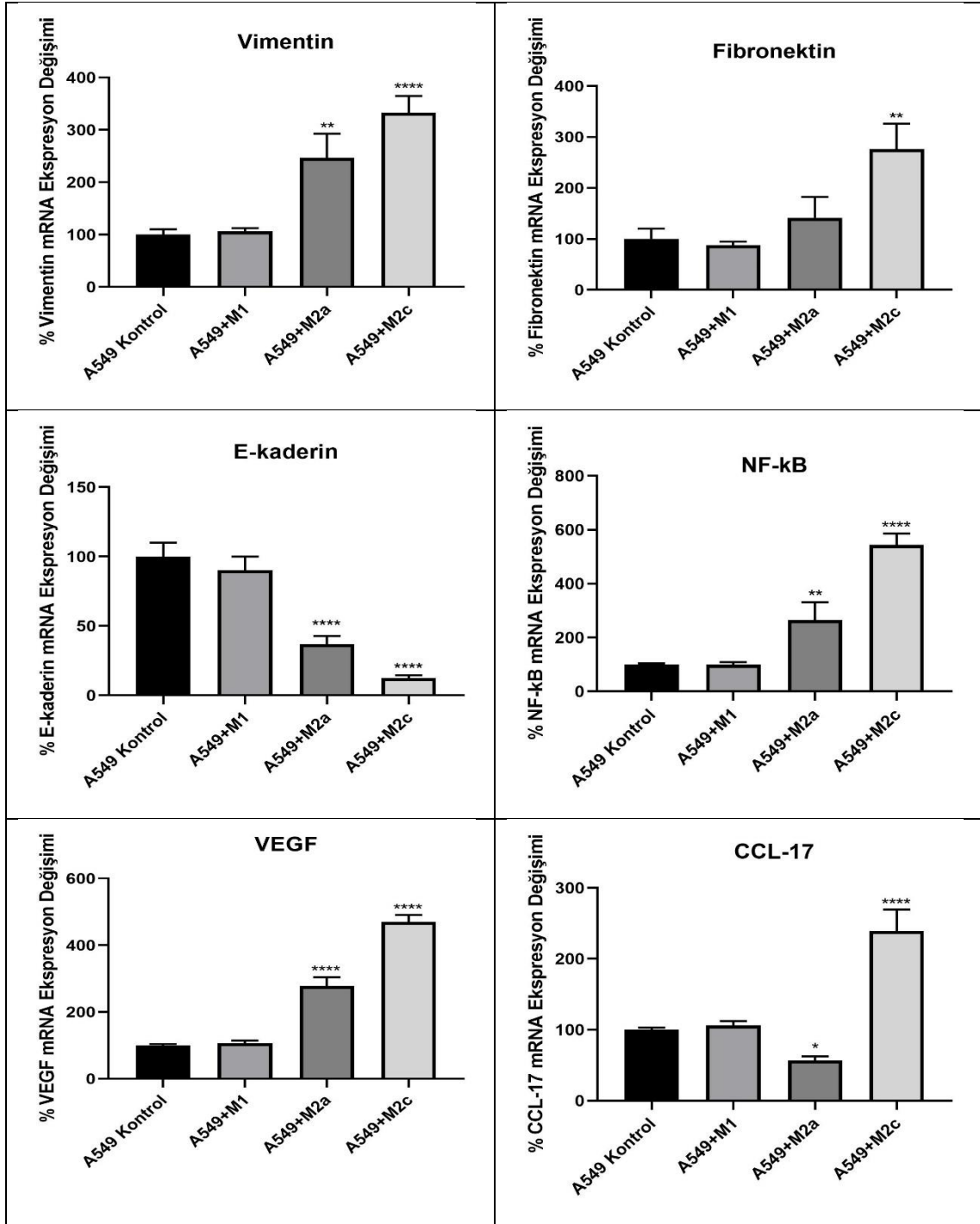
İnsan primer monosit hücreleri ile yapılan bir çalışmada artan IL-10 ekspresyonlarının IL-1 β seviyelerini azalttığı bildirmiştir (Guarda vd., 2011; Veeranki vd., 2011) Bizim sonuçlarımızda da **Şekil 5.39**'da A549+M2a ve A549+M2c makrofaj gruplarında belirlenen IL-1 β seviyelerindeki azalmanın, **Şekil 40**'ta verilen IL-10 artışı ile paralel olması bulgularımızın paralelliği açısından önem arz etmektedir.

M1 makrofajlar tarafından salınan TNF- α , birçok tümörün mikroçevresindeki inflamatuvar yanıtları modüle eden önemli bir sitokindir. (Van Ginderachter vd). Yapılan çalışmalar, genellikle tümör mikroçevresinde bulunan EGF, TGF- β , TNF- α gibi birçok çözünebilir faktörün EMT'yi indüklediğini bildirir de (Wang vd., 2013); daha yakın zamanda yapılan çalışmalarda TNF- α 'nın TGF- β seviyelerini baskılayarak EMT'yi inhibe ettiğini de bildirmiştir (Dash vd., 2018).

Yapılan *in vitro* bir çalışmada, pankreas kanseri hücrelerinin M2 polarize makrofajlarla birlikte kültürlenmesi sonucunda, azalan E-kaderin, artan vimentin ekspresyonu, iğ şeklinde morfoloji ile EMT ve invazyonda artış olduğu gösterilmiştir. IL-10 EMT'nin artışına dahil olmuş ve IL-10 inhibisyonu EMT'nin indüklenmesini etkili bir şekilde bastırmıştır (Suarez-Carmona vd., 2017).

5.1.5.7. EMT yolağına ilişkin genlerin mRNA ekspresyon seviyelerinin RT-PCR yöntemi ile değerlendirilmesi

EMT yolağına ilişkin genlerin mRNA ekspresyon seviyelerini belirlemek amacıyla öncelikle A549 kontrol grubuna göre A549+M1 makrofaj, A549+M2a makrofaj ve A549+M2c makrofaj ko-kültür gruplarında vimentin, fibronektin, E-kaderin, NF-kB, VEGF ve CCL-17 mRNA ekspresyon seviyeleri belirlenmiş ve sonuçlar **Şekil 5.41** ve **Tablo 5.11**'de verilmiştir. Daha sonra EMT yolağına ilişkin genlerdeki artışların M2a ve M2c ko-kültür gruplarında belirlenmiş olması sebebi ile bortezomib ve ixazomib uygulaması sadece M2a ve M2c makrofaj ile oluşturulan ko-kültür gruplarında gerçekleştirilmiştir. A549 hücreleri ile M2a ve M2c makrofaj ko-kültür modelinin oluşturulmasından sonra bortezomib (IC₅₀: 45 nM) ve ixazomib (IC₅₀: 2 μ M) konsantrasyonları A549 hücrelerine uygulanmış ve 48 saat inkübasyon sonunda herbir gruba ait hücrelerden RNA izolasyonları gerçekleştirilerek mRNA ekspresyon seviyeleri değerlendirilmiştir. Sonuçlar **Şekil 5.42**, **Tablo 5.12** ve **Tablo 5.13**'te verilmiştir.



Şekil 5.41. A549 ve M1, M2a ve M2c makrofaj ko-kültürlerinde *EMT* yolağına ilişkin genlere ait % mRNA ekspresyonları ($n=3$, ortalama±standart sapma, $p>0.05$, $p<0.05$ *, $p<0.01$ **, $p<0.0001$ ****).

Tablo 5.11. A549 hücrelerinde kontrol grubuna göre EMT yolağına ilişkin genlere ait % mRNA ekspresyonları normalize değerleri.

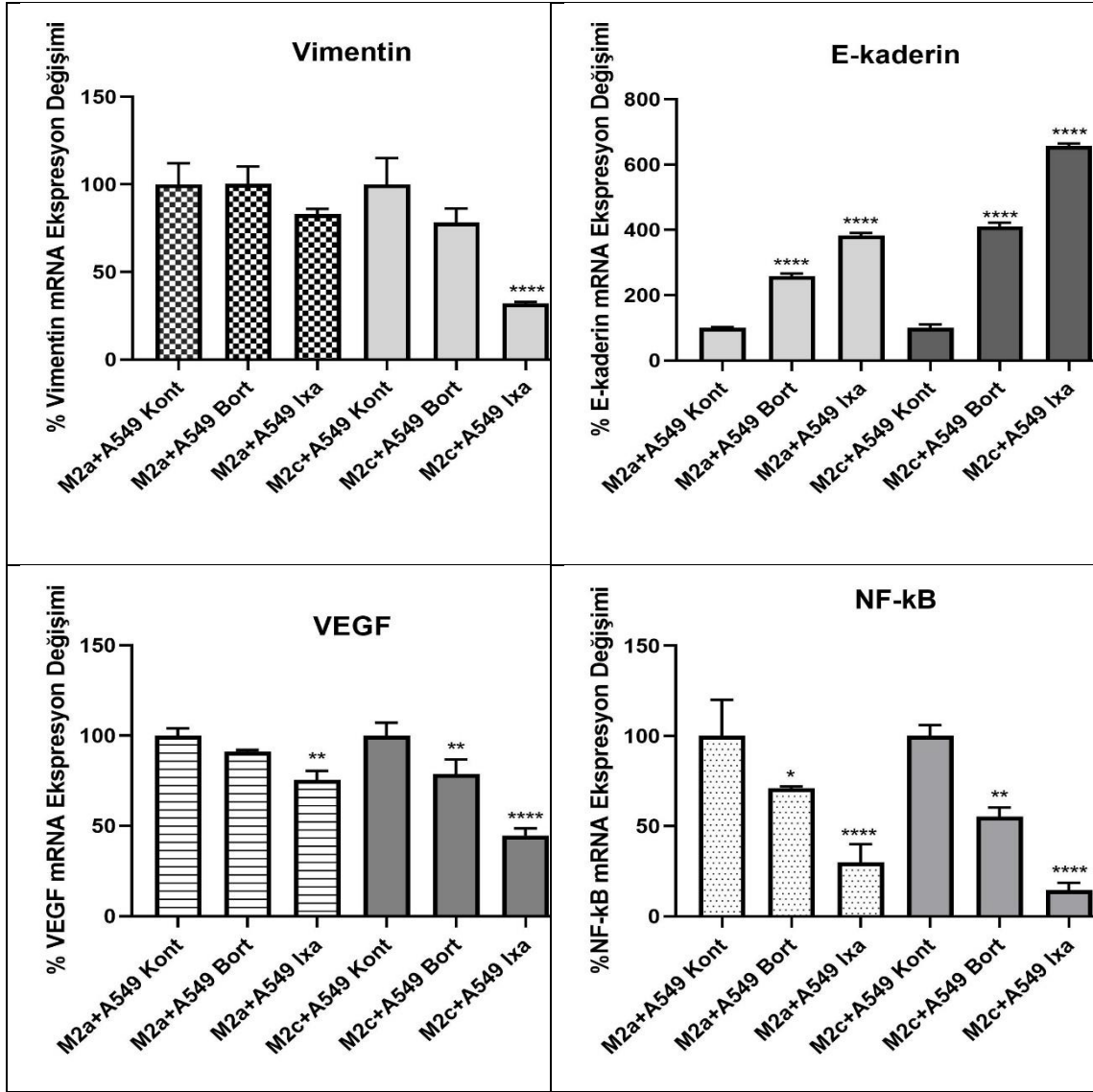
Gruplar	Vimentin	Fibronektin	E-kaderin	NF-kB	VEGF	CCL-17
A549 Kontrol	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
M1+A549 Kontrol	106.6	87.77	90.07	99.36	107.0	106.0
M2a+A549 Kontrol	246.9	141.4	36.79	265.1	277.6	56.50
M2c+A549 Kontrol	332.7	276.2	12.56	543.6	470.7	239.4

A549 hücrelerinde, M1, M2a ve M2c polarize makrofajlar ile oluşturulan ko-kültür modelinde EMT ilişkili faktörlerden, vimentin, fibronektin, E-kaderin, NF-kB, VEGF ve CCL-17 mRNA ekspresyon düzeyleri değerlendirilmiştir. **Şekil 5.41** ve **Tablo 5.11**'deki sonuçlara göre, en önemli mezenkimal faktör olan vimentin ve fibronektin, A549 hücrelerinde hem M2a hemde M2c makrofaj ile oluşturulan ko-kültür gruplarında artış göstermiştir. Epitelyal bir faktör olan E-kaderin ise yine benzer şekilde hem M2a hemde M2c makrofaj ko-kültür A549 hücrelerinde önemli düzeylerde azalmıştır. M1 makrofaj gruplarında ise EMT faktörlerinin en önemli belirteçleri olan vimentin, fibronektin ve E-kaderin mRNA ekspresyonları için önemli düzeyde bir değişim belirlenmemiştir ($p>0.05$). Bu bulgulara göre M2a ve M2c makrofaj A549 ko-kültür gruplarında EMT sürecinin başladığı vimentin, fibronektin, NF-kB, VEGF ve CCL-17 mRNA ekspresyon artışı ve E-kaderin mRNA ekspresyon azalışı ile belirlenmiştir.

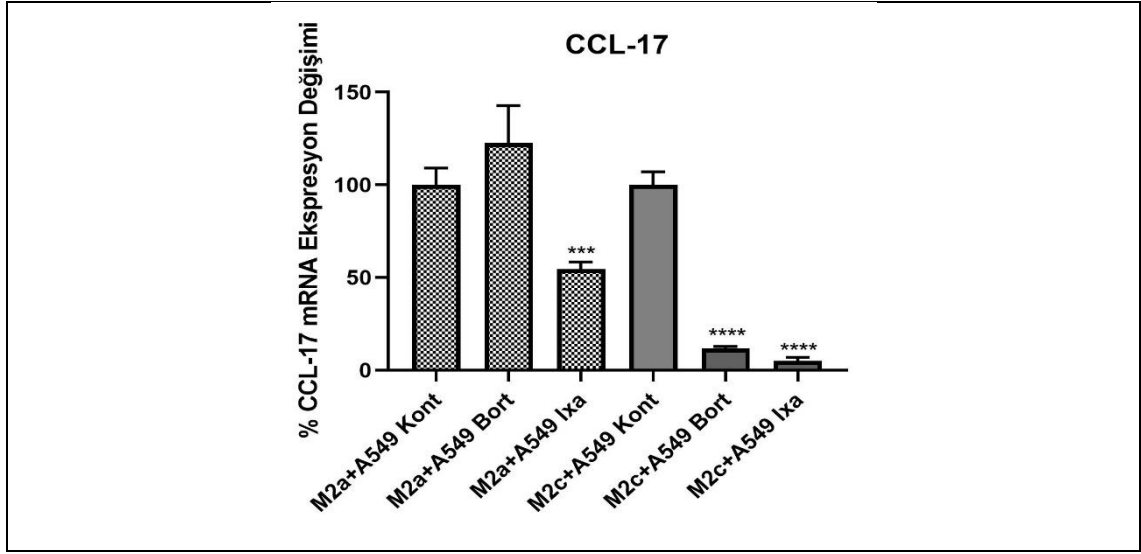
Çalışmamızda vimentin, fibronektin ve E-kaderin sonuçlarımıza paralel olarak NF-kB mRNA ekspresyon seviyelerinin A549 kontrol grubuna göre M2a polarize makrofaj ko-kültür grubunda 2.6 kat, M2c makrofaj grubunda ise 5.4 kat artış olduğu belirlenmiştir ($p<0.01^{**}$, $p<0.0001^{****}$). CCL-17 mRNA ekspresyon seviyelerinde, M1 polarize makrofaj ko-kültür grubunda anlamlı bir değişim olmadığı ($p>0.05$), M2a makrofaj grubunda ise A549 kontrol grubuna göre azaldığı belirlenmiştir ($p<0.05^{*}$). M2c makrofaj ko-kültür grubunda belirlenen anlamlı artış ($p<0.0001^{****}$), sonuçlarımız açısından ayırt edici olmuş ve EMT'nin en çok M2c polarize makrofaj ko-kültür grubunda artış gösterdiğini belirlememizi sağlamıştır.

Şekil 5.41 ve **Tablo 5.11**'de verilen bulgulara göre, A549 kontrol grubuna göre M2a ve özellikle M2c polarize makrofaj grubunda EMT yolağının indüklendiği belirlendiği için bundan sonraki EMT yolağına ilişkin çalışmalara, M2a ve M2c polarize makrofaj ile yapılan A549 ko-kültür grupları ile devam edilmiştir. A549 hücreleri ile M2a ve M2c makrofaj ko-kültürün oluşturulmasından sonra bortezomib (IC_{50} : 45 nM) ve

ixazomib (IC_{50} : 2 μ M) konsantrasyonları uygulanmıştır. Sonuçlar Şekil 5.42, Tablo 5.12 ve Tablo 5.13'te verilmiştir.



Şekil 5.42. A549 hücreleri ile M2a ve M2c makrofaj ko-kültür gruplarında bortezomib (IC_{50} : 45 nM) ve ixazomibin (IC_{50} : 2 μ M) EMT yolağına ilişkin genlere ait % mRNA ekspresyonları değişimleri ($n=3$, ortalama±standart sapma, $p>0.05$, $p<0.05$ *, $p<0.01$ **, $p<0.001$ ***, $p<0.0001$ ****).



Şekil 5.42. (Devam) A549 hücreleri ile M2a ve M2c makrofaj ko-kültür gruplarında bortezomib (IC_{50} : 45 nM) ve ixazomibin (IC_{50} : 2 μ M) EMT yolağına ilişkin genlere ait % mRNA ekspresyonları değişimleri ($n=3$, ortalama $\pm$ standart sapma, $p>0.05$, $p<0.05^*$, $p<0.01^{**}$, $p<0.001^{***}$, $p<0.0001^{****}$).

Tablo 5.12. A549 hücreleri ve M2a polarize makrofaj ko-kültüründe EMT yolağına ilişkin genlere ait mRNA ekspresyonlarının % normalize değerleri.

Gruplar	Vimentin	E-kaderin	VEGF	NF-kB	CCL-17
M2a +A549 Kontrol	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
M2a +A549 Bortezomib (IC_{50} :45 nM)	100.3	258.6	91.08	71.12	125.9
M2a +A549 İxazomib (IC_{50} :2 μ M)	83.09	382.8	75.49	30.06	54.39

Tablo 5.13. A549 hücreleri ve M2c polarize makrofaj ko-kültüründe EMT yolağına ilişkin genlere ait mRNA ekspresyonlarının % normalize değerleri.

Gruplar	Vimentin	E-kaderin	VEGF	NF-kB	CCL-17
M2c +A549 Kontrol	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
M2c +A549 Bortezomib (IC_{50} :45 nM)	78.28	411.0	78.78	55.32	11.84
M2c +A549 İxazomib (IC_{50} :2 μ M)	31.91	657.8	40.50	14.52	4.95

Şekil 5.42, Tablo 5.12 ve Tablo 5.13'teki sonuçlara göre vimentin mRNA ekspresyon seviyelerinde M2a+A549 kontrole göre M2a+A549 bortezomib ve ixazomib gruplarında istatistiksel anlamlılık belirlenemezken, M2c+A549 kontrole göre M2c+A549 ixazomib grubunda önemli derecede azalma belirlenmiştir ($p<0.0001^{****}$). E-kaderin mRNA ekspresyon seviyelerinde ise hem M2a+A549 bortezomib, ixazomib grubunda hemde M2c+A549 bortezomib, ixazomib grubunda kendi kontrol gruplarına

göre sırasıyla; 2.6, 3.8 ve 4.1, 6.5 kat artış belirlenmiştir ($p<0.0001$ ****). NF-kB ve CCL-17 mRNA ekspresyon seviyeleri ise özellikle E-kaderin seviyelerinde görülen bulgularımızı destekler nitelikte olup azalmıştır. NF-kB mRNA ekspresyonlarında M2a+A549 bortezomib, M2a+A549 ixazomib; M2c+A549 bortezomib ve M2c+A549m ixazomib gruplarında kendi kontrol gruplarına göre sırasıyla; 1.4, 3.3, 1.8 ve 6.9 kat azalma belirlenmiştir. CCL-17 seviyelerinde ise M2a+A549 ixazomib, M2c+A549 bortezomib ve M2c+A549 ixazomib gruplarında istatistiksel olarak anlamlı olan ve sırasıyla; 1.8, 8.4 ve 20.2 kat azalma belirlenmiştir. Özellikle M2c+A549 ixazomib grubunda belirlenen 20.2 kat azalma bulgularımız arasında önemlidir. Ayrıca VEGF mRNA ekspresyon seviyelerinde ise istatistiksel olarak en anlamlı azalma vimentin mRNA ekspresyonuna paralel olarak M2c+A549 ixazomib grubunda belirlenmiştir ($p<0.0001$ ****). Çalışmamız M2a ve M2c makrofaj ko-kültürü ile uyarılan A549 hücrelerinde bortezomib ve ixazomibin vimentin, E-kaderin, VEGF, NF-kB ve CCL-17 mRNA gen ekspresyon seviyelerinin belirlendiği ilk çalışmadır.

EMT hücrelerin, epitelyal fenotipten, mezenkimal fibroblastoid fenotipe doğru morfolojik olarak değişim geçirdikleri bir süreçtir ve kanser metastaz sürecinde önemli bir rol oynar (Gao vd., 2012). EMT'nin kanser hücresi invazyon ve metastazını arttırdığı, kolon, yumurtalık, meme, akciğer, prostat ve baş ve boyun kanserlerinde bildirilmiştir (Thiery vd., 2009; Nieto, 2011; Tam ve Weinberg, 2013; Varga vd., 2014). EMT sonunda kanser hücreleri ikincil bir tümör bölgesinde, metastaz oluşturur. Bu işlemi başlatmak için epitelyal tümör hücreleri önemli moleküler değişiklikler geçirirler. E-kaderin, α -katenin ve γ -katenin gibi hücre birleşme proteinlerini kodlayan genlerin ekspresyonu azalır. Özellikle, E-kaderin epitel morfolojinin ana belirteci olarak kabul edilmektedir (Tsai ve Yang 2013;). E-kaderin ekspresyonu azalırken, mezenkimal spesifik belirteç olan vimentin seviyeleri artış gösterir (Varga vd., 2014). Bu çalışmalara paralel olarak, bizim sonuçlarımızda da A549 hücrelerinde, hem M2a hemde M2c makrofaj ile ko-kültür gruplarında E-kaderin ekspresyon seviyeleri azalırken, vimentin mRNA ekspresyon seviyelerinde artış belirlenmiştir. Bu durum bize EMT'nin indüklendiğini göstermektedir.

İnsan retinal pigment epitel hücrelerinde yapılan bir çalışmada, TGF- β ile indüklenen fibroblast farklılaşmasından sonra (EMT benzeri etki/ M2a/M2c polarize makrofaj ko-kültüre benzer etki) 20 nM bortezomibin vimentin proteini seviyelerini 1.25 kat azalttığı bildirilmiştir (Moon vd., 2017). Yine yapılan bir diğer çalışmada,

bortezomibin TNF- α ile indüklenmiş rat primer böbrek dokusunda E-kaderin ve fibronektin ekspresyonunu azalttığı bildirilmiştir (Zhou vd., 2019). Çalışmamızda bu bulgulara paralel olarak, özellikle M2c makrofaj ko-kültürü ile uyarılan A549 hücrelerinde ixazomibin vimentin mRNA ekspresyonlarını önemli derecede azalttığı, M2a ve M2c makrofaj ko-kültüründe ise hem bortezomib hemde ixazomibin E-kaderin mRNA ekspresyonlarını arttırarak EMT'yi azalttığı belirlenmiştir.

NF-kB anahtar bir transkripsiyonel faktördür ve inflamatuvar sinyalin düzenlenmesinden sorumludur, hücrel çoğalma ve farklılaşmada rol oynar (Chen vd., 1999). NF-kB, kanserde invazyon ve EMT'nin önemli bir belirtecidir, EMT indüksiyonunda ve sürdürülmesinde temel rol oynar. Böylece NF-kB aktivitesinin kaybı, EMT ile ilişkili gen ekspresyonlarını azalttığı açıklanmıştır (Huber vd., 2004; Podo vd., 2010; Hsu vd., 2012). Son yıllarda, tümör invazyonu hedeflenerek, NF-kB ekseninde odaklanan bazı yeni tedavi yaklaşımları önerilmiştir. Örneğin yenebilen bir mantar türünden izole edilen panepoxydone, bir NF-kB inhibitörüdür ve proliferasyonu I κ B'yi hedef olarak inhibe ederek, apoptozu indüklemiş ve EMT'yi ters çevirmiştir (Arora vd., 2014). Ayrıca birçok çalışmanın, tümör mikroçevresindeki makrofaj popülasyonunu, M1 makrofajlarına yeniden programlanması sonucunda makrofaja anti-tümör özellik kazandırarak, NF-kB'yi immünoterapi için önemli bir hedef olarak kullanma girişimi bulunmaktadır (Yang vd., 2014; Ortega vd., 2016). Çalışmamızda 'bilinen en iyi NF-kB inhibitörlerinden biri olması sebebi ile' proteazom inhibitörlerinden, bortezomib ve ixazomibin M2a ve özellikle M2c makrofaj ile A549 ko-kültürü ortamında, EMT ilişkili genlerden olan NF-kB seviyesini özellikle M2c makrofaj ko-kültür gruplarında ixazomibin bortezomibe göre istatistiksel olarak da daha anlamlı olarak azalttığı belirlenmiştir.

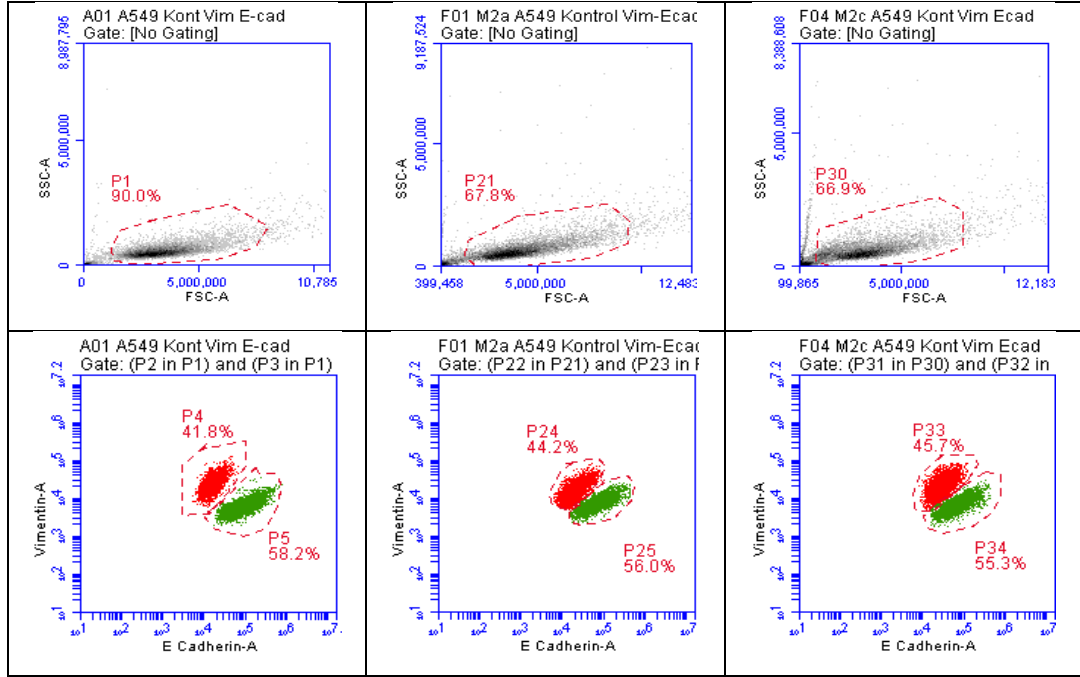
Tümör ilişkili makrofajlardan türetilen sitokinler ve CCL-17, CCL-22, TGF- β , IL-10 gibi faktörler immünosupresyona önemli bir katkıda bulunur. Bunun da kanser ilerlemesinin EMT, invazyon, migrasyon gibi çeşitli aşamalarını tetikleyip arttırdığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Sawa-Wejksza ve Kandefer-Szerszen, 2018). Yapılan bir çalışmada, mezenkimal benzeri göğüs kanseri hücrelerinden alınan koşullandırılmış medyumun makrofajları, tümör ilişkili makrofaj benzeri M2 fenotipe polarize ettiği ve makrofajlarda CD206'nın (makrofaj mannoz reseptörü/M2 polarize makrofaj belirteci) yüksek ekspresyonu ve CCL17, CCL18, CCL22 ve IL-10 seviyelerinin yüksek olduğu bildirilmiştir. Ayrıca bu etki ile meme kanserinde EMT

indüksiyonu ve dolayısıyla metastaz ile ilişkilendirilmiştir (Su et al., 2014). Çalışmamızda daha önceki yöntemlerimizde bildirilen CD206 ve IL-10 seviyeleri bu çalışma ile paraleldir. Ayrıca CCL-17 mRNA ekspresyon seviyelerine ilişkin olarak sadece M2c makrofaj ile A549 ko-kültür grubunda yüksek seviyelerde bulunmuş olması bulgularımız açısından önemli bir sonuçtur. CCL-17 seviyelerinin, A549+M2a ixazomib, A549+M2c bortezomib ve A549+M2c ixazomib gruplarında anlamlı olarak azaldığı belirlenmiştir.

Matris metalloproteinazlar-9 (MMP-9), vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) dahil olmak üzere birçok genin tümör ilişkili makrofajlar ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Wang vd., 2011). Yapılan bir *in vivo* çalışmada, farelerin iskemik dokusundan izole edilen M1 polarize makrofajların literatürdeki çalışmalara benzer olarak düşük VEGF ekspresyonu ifade ettiği bildirilmiştir (Zhang vd., 2020). Başka bir çalışmada M2 polarize makrofajların VEGF seviyelerin yüksek olduğu bildirilmiştir (He vd., 2012). Bizim sonuçlarımızda da A549 hücreleri ile M1, M2a ve M2c makrofaj ko-kültürü gruplarında VEGF mRNA seviyelerinin A549 kontrol grubuna göre M1+A549 grubunda fark oluşturmaması, M2a+A549 ve M2c+A549 gruplarında ise anlamlı olarak artış göstermesi literatür sonuçları ile uyumludur.

5.1.5.8. Vimentin ve E-kaderin seviyelerinin ve EMT yolağına ilişkin etkilerin değerlendirilmesi

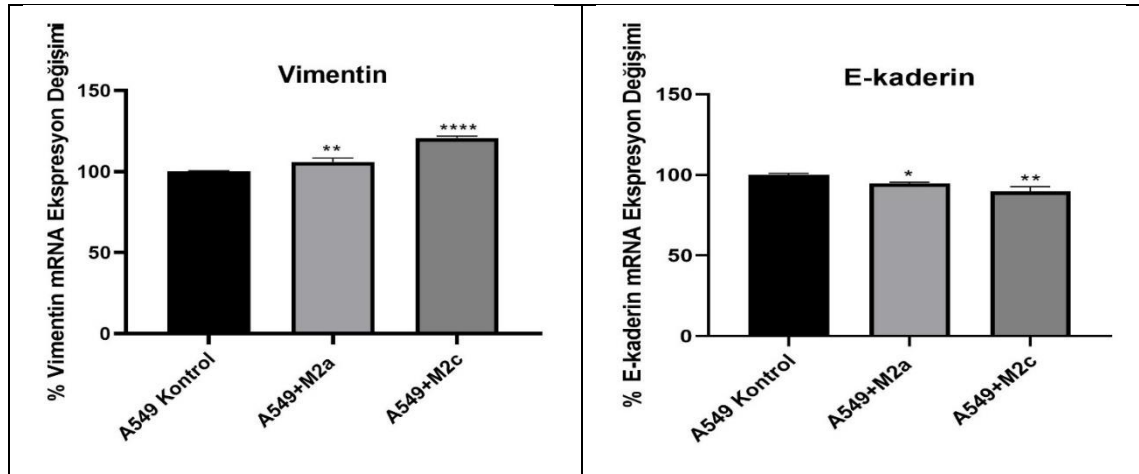
A549 hücrelerinin M2a, M2c makrofajlar ile ko-kültüründen sonra bortezomib (IC₅₀: 45 nM) ve ixazomib (IC₅₀: 2 µM) konsantrasyonları A549 hücrelerine uygulanmıştır. Daha sonra hücreler 48 saatlik inkübasyonlara bırakılmıştır. İnkübasyon süreleri sonunda herbir gruba ait A549 hücreleri kaldırılarak, EMT yolağında anahtar rol oynayan E-kaderin ve vimentin seviyelerini belirlemek amacıyla fiksasyon, permeabilizasyon ve immün boyama protokolü uygulanmıştır. Daha sonra hücreler akış sitometri cihazında (Accuri C6, BD) ölçülerek analiz edilmiştir. Sonuçlar **Şekil 5.43, 5.44** ve **Tablo 5.14**'te verilmiştir.



Şekil 5.43. A549 kontrol ve M2a, M2c makrofaj ko-kültür gruplarında E-kaderin ve vimentin seviyelerinin akış sitometride belirlenmesi.

Tablo 5.14. A549 kontrol ve M2a, M2c ile ko-kültür gruplarında E-kaderin ve vimentin seviyeleri (%).

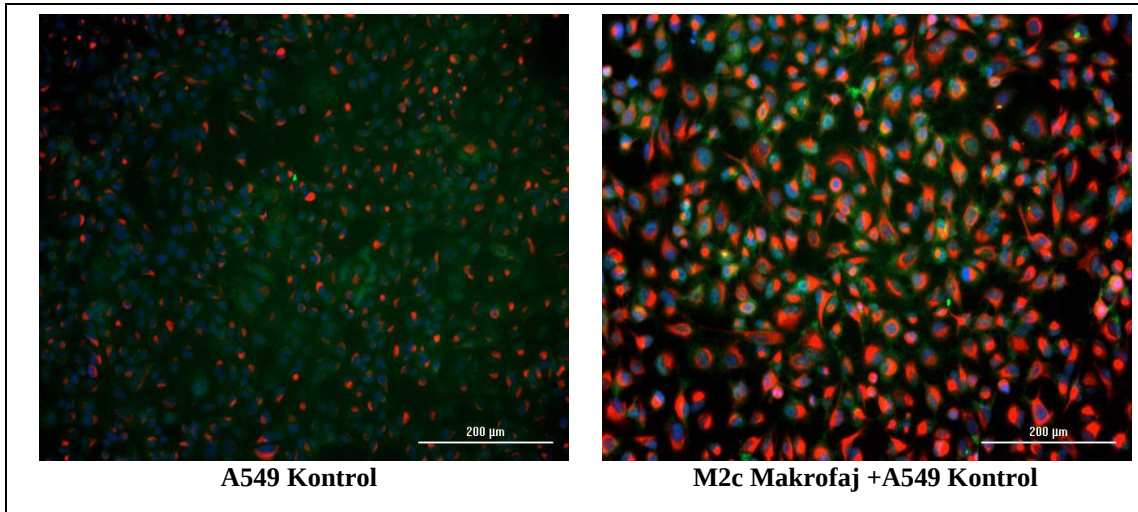
Gruplar	Vimentin (%)	E-Kaderin (%)
A549 Kontrol	41.8	58.2
M2a Makrofaj +A549 Kontrol	44.2	56.0
M2c Makrofaj +A549 Kontrol	45.7	55.3



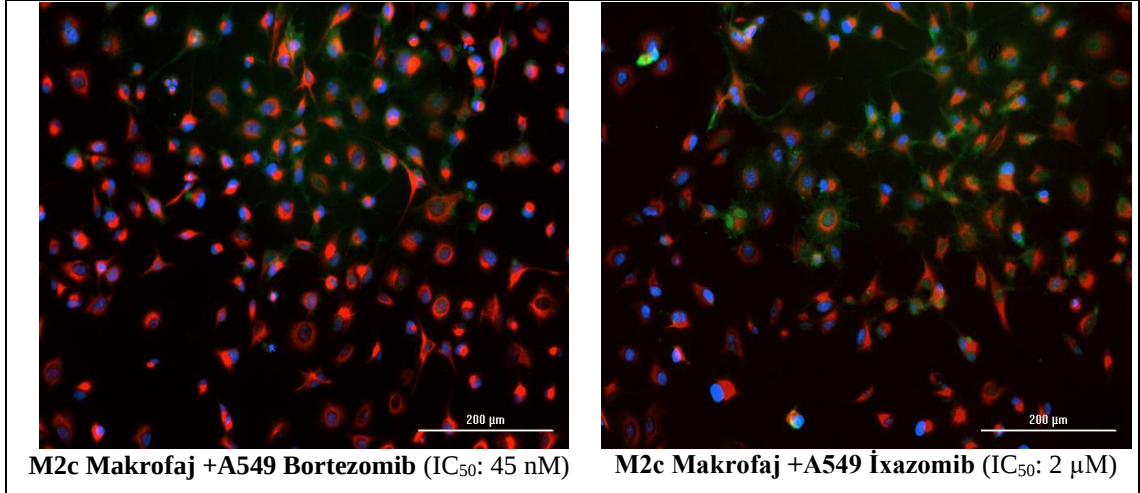
Şekil 5.44. A549 ve M2a ve M2c makrofaj ko-kültüründe vimentin ve E-kaderin seviyelerinin % değişim sonuçları ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi ($n=3$, ortalama±standart sapma, $p<0.05^*$, $p<0.01^{**}$, $p<0.0001^{****}$).

Şekil 5.43, Şekil 5.44 ve Tablo 5.14'te verilen, A549 ve M2a ve M2c ko-kültüründe vimentin ve E-kaderin monoklonal antibody seviyeleri akış sitometride analiz edilmiştir. Vimentin seviyeleri M2a ve M2c makrofaj ko-kültüründe istatistiksel olarak anlamlı artış göstermiştir ($p<0.01^{**}$, $p<0.0001^{****}$). E-kaderin seviyeleri ise, A549 hücrelerinde M2a M2c makrofaj kültür gruplarında istatistiksel olarak azalmıştır ($p<0.05^{*}$, $p<0.01^{**}$).

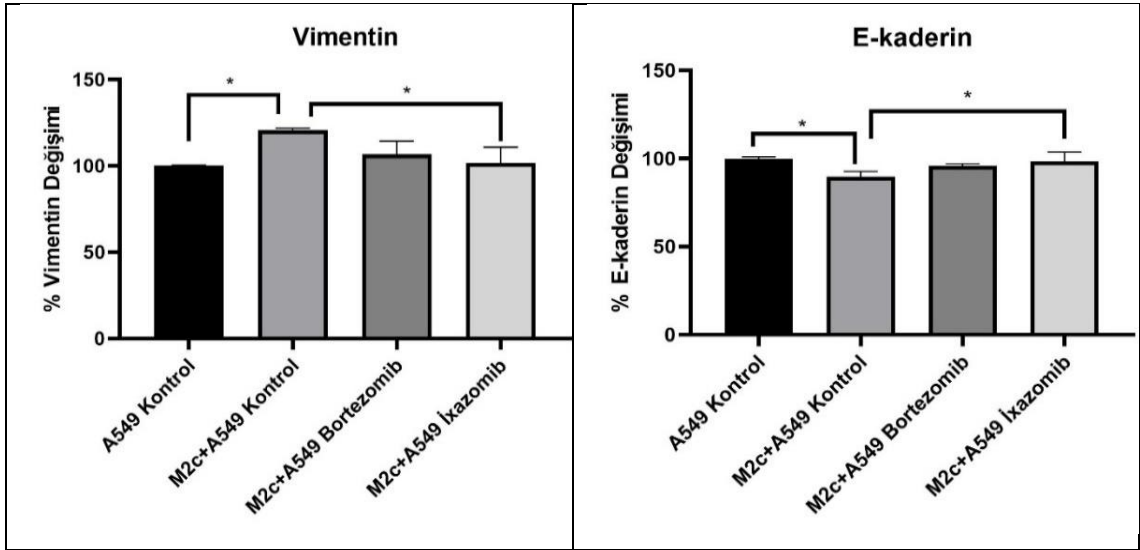
Hem mRNA ekspresyon seviyeleri hemde monoklonal antibody ile belirlenen vimentin ve E-kaderin seviyelerine göre A549 ve M2c makrofaj ko-kültüründe EMT artışına ilişkin bulguların daha anlamlı olduğu belirlenmiştir ($p<0.01^{**}$, $p<0.0001^{****}$). Bu nedenle A549 kontrol ve M2c+A549 kontrol, M2c+A549 bortezomib ve M2c+A549 ixazomib grubunda, vimentin ve E-kaderin monoklonal antibody seviyeleri immünfloresans boyama yöntemi ile görüntülenmiştir. Görüntülemenin ardından istatistiksel değerlendirme için grupların floresan okumaları Cytation 3 Cell Imaging Multi-mode Reader'da yapılmıştır. Sonuçlar **Şekil 5.45, Şekil 46, Şekil 47**'de verilmiştir.



Şekil 5.45. A549 kontrol ve M2c makrofaj ile ko-kültür grubunda bortezomib (IC_{50} : 45 nM) ve ixazomib (IC_{50} : 2 μ M) konsantrasyonlarının vimentin (kırmızı), E-kaderin (yeşil) seviyelerinin immünfloresans görüntüleri (Cytation 3 Cell Imaging Multi-mode Reader'da görüntülenmiş ve 10X objektif kullanılmıştır).



Şekil 5.45. (Devam) A549 kontrol ve M2c makrofaj ile ko-kültür grubunda bortezomib (IC₅₀: 45 nM) ve ixazomib (IC₅₀: 2 µM) konsantrasyonlarının vimentin (kırmızı), E-kaderin (yeşil) seviyelerinin immünfloresans görüntüleri (Cytation 3 Cell İmaging Multi-mode Reader'da görüntülenmiş ve 10X objektif kullanılmıştır).



Şekil 5.46. A549 hücreleri ve M2c makrofaj ko-kültüründe bortezomib (IC₅₀: 45 nM) ve ixazomibin (IC₅₀: 2 µM), vimentin ve E-kaderin seviyelerine etkileri (İmmünofloresan ölçüm, kontrol: %0.1 DMSO, n=3, ortalama±standart sapma, p>0.05, p<0.05*).

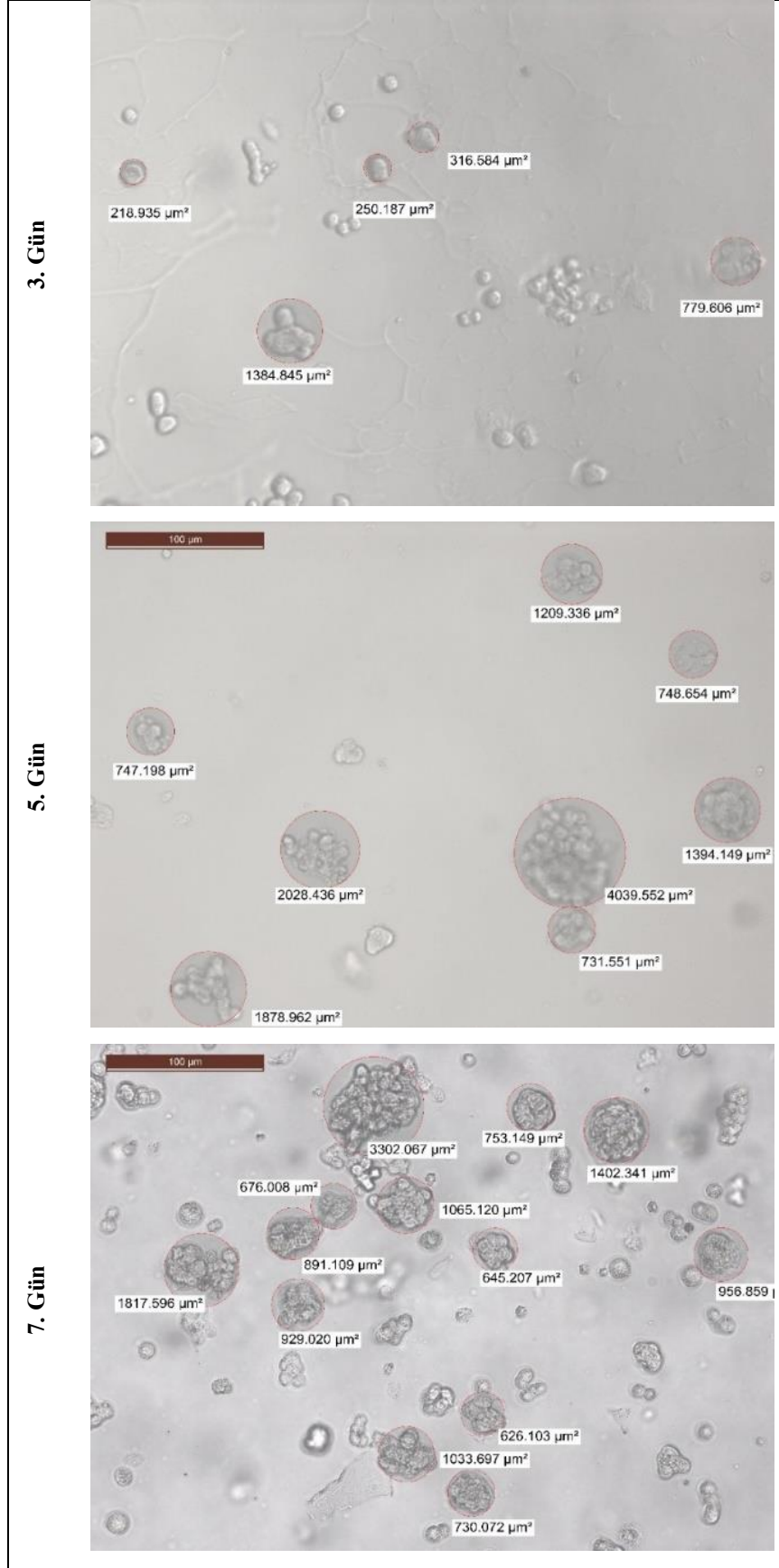
Şekil 45'te A549 kontrol grubuna göre A549+M2c ko-kültür grubunda vimentin seviyeleri (kırmızı) artmış, E-kaderin seviyeleri (yeşil) ise azalmıştır. Şekil 46'da A549 kontrol grubuna göre, A549+M2c ko-kültür grubunda vimentin seviyeleri istatistiksel olarak artış göstermiş artmış (p<0.05*), E-kaderin seviyeleri ise azalmıştır (p<0.05*). M2c+A549 ko-kültüründe bortezomib konsantrasyonunda değişimler istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. M2c+A549 ixazomib grubunda ise vimentin seviyesindeki düşüş ve E-kaderin seviyesinde belirlenen artış istatistiksel olarak anlamlıdır (p<0.05*).

EMT sürecinde E-kaderin ekspresyonu kaybolurken, mezenkimal spesifik belirteç olan vimentin seviyeleri artış gösterir (Varga vd., 2014). Vimentin ve E-kaderin mRNA ekspresyon seviyeleri sonuçlarımıza göre özellikle M2c makrofaj ko-kültürü ile uyarılan A549 hücrelerinde ixazomibin vimentin mRNA ekspresyonlarını önemli derecede azalttığı, M2a ve M2c makrofaj ko-kültüründe ise hem bortezomib hemde ixazomibin E-kaderin mRNA ekspresyonlarını arttırarak EMT'yi azalttığı belirlenmiştir. **Şekil 5.45**'te vimentin ve E-kaderin monoklonal antibody seviyelerini immünofloresans boyama yöntemi ile görüntülediği bulgularımız, özellikle ixazomibin A549+M2c makrofaj ko-kültüründe EMT'nin inhibe olduğunu göstermektedir.

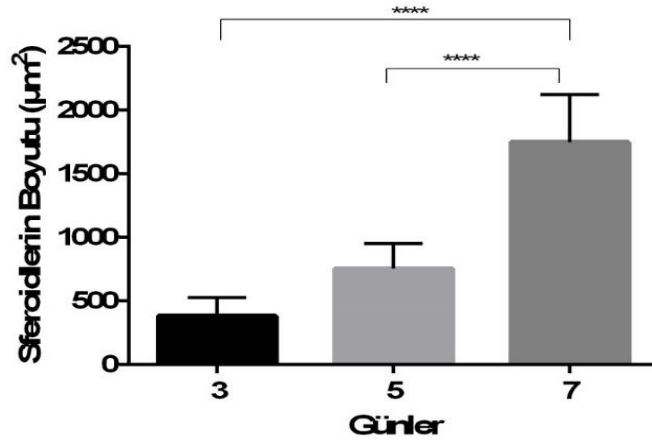
5.2. 3D hücre kültürü çalışmalarının değerlendirilmesi

5.2.1. 3 Boyutlu hücre kültür modelinin oluşturulması

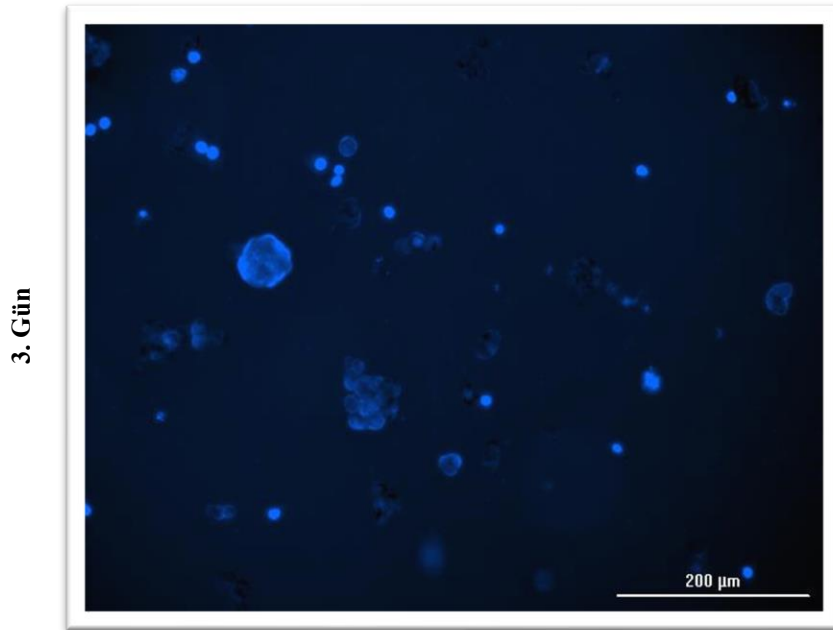
Bu tez çalışmamızda AlgiMatrix® 3D Kültür Sisteminin özel 96 ve 6 kuyucuklu plakaları kullanarak A549 hücrelerinde 3D hücre kültür modeli oluşturulmuştur. Bunun için öncelikle A549 hücrelerinin 96 kuyucuklu plakalara 2×10^4 kuyucuk olacak şekilde ekimi yapılmış ve ekim günü 0. gün olarak kabul edilerek; 3, 5 ve 7. günlerde hücreler fotoğraflanarak oluşan sferoidlerin alanları ölçülmüştür. 3D sferoidlerin alanı Leica DM analiz programı kullanılarak ölçülerek elde edilen verilerden grafik çizilerek istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca yine rastgele seçilen kuyulardaki hücreler 3, 5 ve 7. günlerde, sferoidleri görsel olarak daha belirgin hale getirmek amacıyla Hoechst 33258 ile boyanmış ve Cytation 3 Cell Imaging Multi-Mode Reader'da floresans görüntüleme yapılmıştır. Sonuçlar, **Şekil 5.47, 5.48, 5.49**'da verilmiştir.



Şekil 5.47. A549 hücrelerinin AlginateMatrix plakalarına ekildikten sonra 3, 5 ve 7. günde görüntülenmesi ve sferoid analizi (10X).

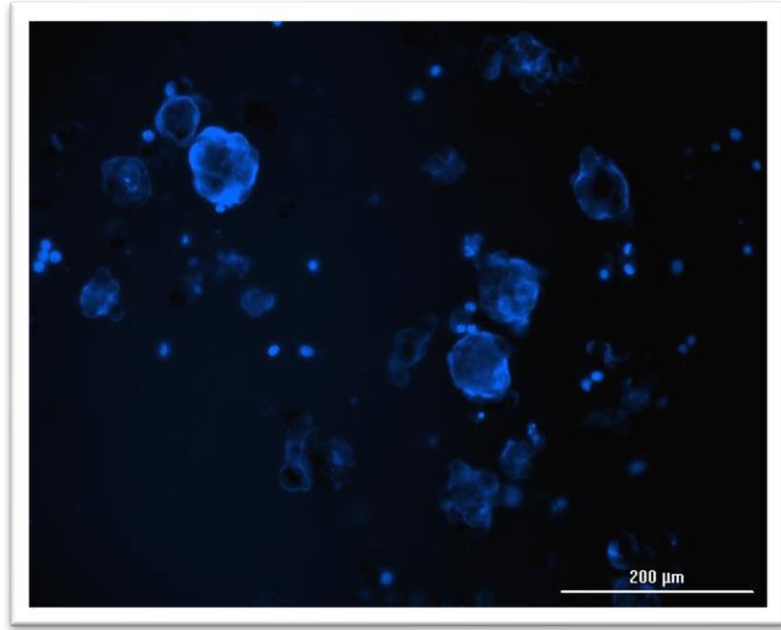


Şekil 5.48. A549 hücrelerinin farklı günlerde çekilen hücre görüntülerinden elde edilen sferoid boyutları (n=25, ortalama±standart sapma, $p < 0.0001$ ****, sferoidlerin alanlarının analizi için rasgele fotoğraflar çekilmiştir. Bu fotoğraflar arasından her bir gün için, en az 5 sferoid bulunan 5 adet fotoğraf olmak üzere toplamda 25 fotoğraf seçilmiştir (0. günde sferoid oluşumu başlamadığı için analize dahil edilmemiştir).

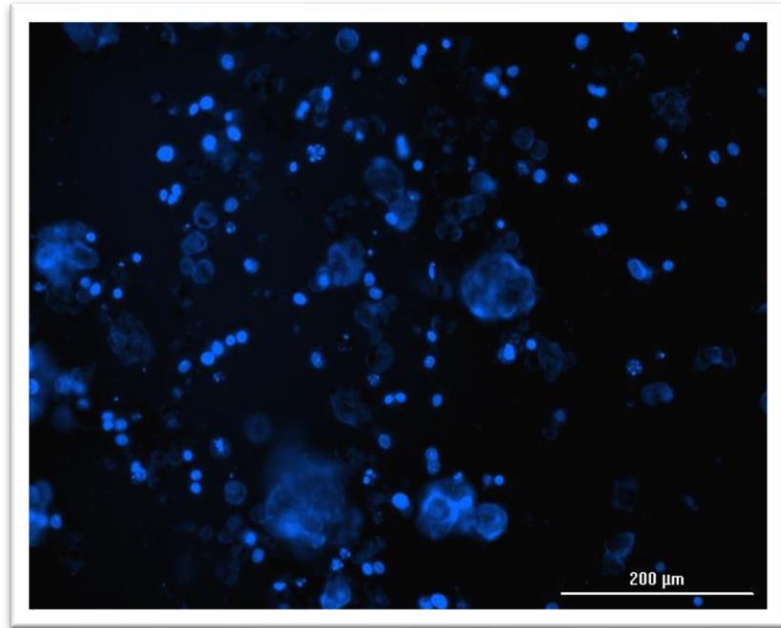


Şekil 5.49. A549 hücrelerinin sferoid oluşumlarının hoechst 33258 ile Cytation 3 Cell İmaging Multi-mode Reader'da floresans olarak görüntülenmesi (10X).

5. Gün



7. Gün



Şekil 5.49. (Devam) A549 hücrelerinin sferoid oluşumlarının hoechst 33258 ile Cytation 3 Cell İmaging Multi-mode Reader'da floresans olarak görüntülenmesi (10X).

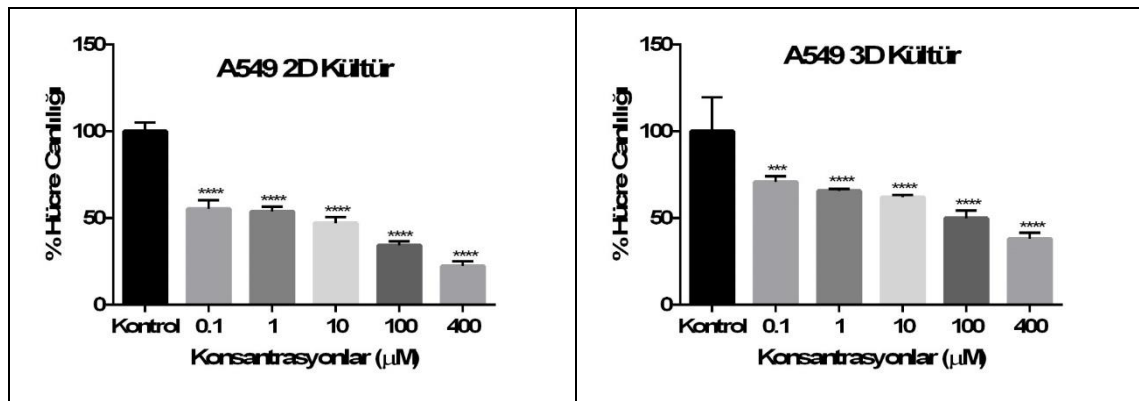
A549 hücrelerinin 96 kuyucuklu AlgiMatrix plakalarına herbir kuyucuğa 2×10^4 hücre gelecek şekilde ekimi yapıldıktan sonra sferoid oluşumları 3. günde gözlenmeye başlanmıştır. **Şekil 5.47** ve **Şekil 5.48**'de görüldüğü üzere sfereoid sayısı ve alanı gün sayısı ile artış göstermiştir. A549 hücrelerinin farklı günlerde çekilen hücre görüntülerinden elde edilen sferoid ölçümleri karşılaştırıldığında (**Şekil 5.47**), 7. günde

sferoidlerin alanı, 3. ve 5. günlere göre istatistiksel olarak artış göstermiştir ($p<0.0001****$).

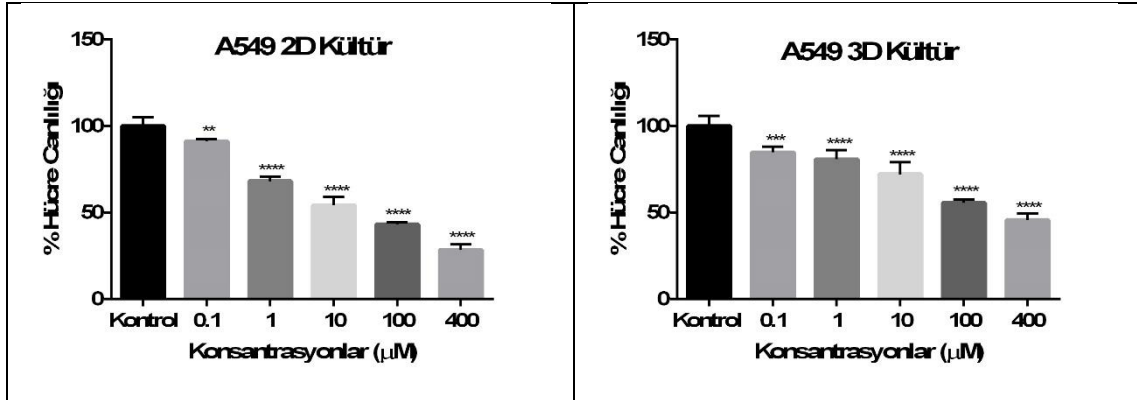
Çalışmamızda, 3D kültür ortamı oluşturmak için ‘AlgiMatrix® 3D Kültür Sistemi’ kullanılmıştır. Bu sistem 3 boyutlu hücre kültürünün oluşumunu kolaylaştıran biyolojik bir iskelet görevi görmektedir. İnsan küçük hücreli olmayan akciğer kanser hücrelerinde (H460, A549, H1650 ve H1650 hücre hatları) yapılan bir çalışmada, 96 ve 6 kuyucuklu plakalara hücreler $1-35 \times 10^3$ or $0.05-6 \times 10^6$ aralığında ekim yapıldıktan sonra tümör sferoidlerinin büyümesi, 4, 9 ve 13. günlerde değerlendirilmiştir. Bizim çalışmamızda ise hergün hücre medyumunun tazelenmesine rağmen hücrelerin 7. günden sonra ölmeye başladığı ve oluşan sferoidlerinde dağıldığı belirlenmiştir. Bu nedenle çalışmamızda bortezomib ve ixazomibin sitotoksik etkilerinin değerlendirilmesi için uygun zaman 7 gün olarak belirlenmiştir (Godugu vd., 2013).

5.2.2. A549 hücrelerinin 2D ve 3D kültürlerinde bortezomib ve ixazomibin sitotoksik etkilerinin karşılaştırılması

A549 hücreleri, 96 kuyucuklu plakalara her bir kuyucukta 2×10^4 hücre (3D kültür plakasına ekilen sayılara paralel olarak) olacak şekilde hem 2D kültür hem 3D kültür plakasına besiyeri ortamında ekilmiş ve 7 gün inkübasyona bırakılmışlardır (3D kültür plakalarında A549 hücrelerinin sferoid oluşumu optimize edilmiş ve 7 gün olarak belirlenmiştir). Daha sonra bortezomib ve ixazomib konsantrasyonları (400, 100, 10, 1, 0.1 μM) 48 saat uygulanarak hücre canlılığına olan etkisi belirlenmiş (Şekil 5.50 ve Şekil 5.51) ve IC_{50} değerleri hem 2D hem 3D kültür ortamları için belirlenmiştir (Tablo 5.14).



Şekil 5.50. 2D ve 3D A549 hücre kültürlerinin 7 gün inkübasyonundan sonra uygulanan bortezomib konsantrasyonlarının WST-1 yöntemine göre hesaplanan 48. saatteki % canlılık değerleri ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi (Kontrol: %0.1 DMSO, $n=8$, ortalama±standart sapma, $p<0.0001****$).



Şekil 5.51. 2D ve 3D A549 hücre kültürlerinin 7 gün inkübasyonundan sonra uygulanan ixazomib konsantrasyonlarının WST-1 yöntemine göre hesaplanan 48. saatteki % canlılık değerleri ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi (Kontrol: %0.1 DMSO, n=8, ortalama±standart sapma, $p<0.01$, $p<0.001$ *** $p<0.0001$ ****).

Tablo 5.15. 2D ve 3D A549 hücre kültür ortamlarında bortezomib ve ixazomibin 48. saatteki IC_{50} değerleri (hücreler her iki kültür ortamında da plakalara 2×10^4 /kuyu olarak ekilmiş ve 7 gün süreyle inkübe edildikten sonra bortezomib ve ixazomib uygulamasına geçilmiştir).

IC ₅₀ Değeri (µM)	2D Hücre Kültür	3D Hücre Kültür
	Ortamı	Ortamı
Bortezomib	6.32 µM	98.6 µM
İxazomib	41,27 µM	353.01 µM

Şekil 5.50 ve 5.51 ve Tablo 5.15'te görüldüğü gibi A549 hücrelerinde 2D ortam 3D kültür ortamında bortezomib ve ixazomibin 48 saatlik inkübasyon sonunda, 3D ortamdaki IC_{50} değeri 2D kültür ortamına göre bortezomib için yaklaşık 15, ixazomib için ise yaklaşık 9 kat yüksek belirlenmiştir.

A549 hücrelerinin 3D kültüre edilmesi ile yapılan bir çalışmada IC_{50} konsantrasyon belirlemesi yapılmadan 100 nM bortezomib konsantrasyonunda apoptotik etkiler belirlenmiş fakat 100 nM bortezomibin 2D kültüre göre 3D kültüründe apoptotik etkileri istatistiksel olarak anlamlı belirlenememiştir (Yang vd., 2009). Yapılan başka bir çalışmada, sisplatin, gempitabin, 5-fluorouracil ve kamptotesin'e ait A549 akciğer kanseri hücrelerinin 2D ve 3D kültür modellerinde belirlenen IC_{50} konsantrasyonları karşılaştırılmıştır. Bu çalışmada, ilaçların IC_{50} konsantrasyonları 2D kültür ortamda sisplatin, gempitabin, 5-fluorouracil ve kamptotesin için sırasıyla 4.20; 2.56; 3.21 ve 1.36 µM olarak belirlenirken, 3D kültür ortamındaki IC_{50} konsantrasyonları sırasıyla 75.79;

87.31, 99.17 ve 89.74 μM olarak bildirilmiş ve A549 3D kültür ortamında IC_{50} değeri yaklaşık olarak en düşük 20, en yüksek 65 kat artış göstermiştir (Godugu vd, 2013).

Bu tez çalışmasında, A549 akciğer kanseri hücrelerinde, 2D ve 3D ortamlarda, bortezomib ve ixazomibin antiproliferatif etkileri belirlenerek, IC_{50} konsantrasyonları ilk kez karşılaştırılmıştır.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Akciğer kanserlerinin başlaması ve metastazı, sadece kanser hücrelerinin genetik ve moleküler özelliklerine değil, aynı zamanda bağışıklık sistemi ile tümör mikro-çevresiyle olan etkileşimine de bağlıdır (Forde vd., 2014). Solid tümörlerde tümör kitlesinin %5-40'ı tümörle ilişkili makrofajlardan oluşmaktadır (Sousa vd., 2015). Tümör ilişkili makrofajlar, kanser hücrelerinin epitelyal-mezenkimal geçişinde önemli rol oynamaktadır Makrofajlar bulundukları ortamdaki uyaranlara bağlı olarak M1 veya M2 makrofajlara farklılaşabilirler (Tsai vd., 2014). Yapılan önceki çalışmalar daha çok M1 makrofaj üzerine yoğunlaşmış, yapılan M2 makrofaj çalışmalarında ise alt tip ayrımı büyük oranda gözatılmemiştir. Özellikle M2c makrofaja ilişkin literatür bilgisinin oldukça kısıtlı sayıda olduğu belirlenmiştir. Bizim çalışmamızda temel hedefimiz insan küçük hücreli olmayan A549 akciğer kanseri hücreleri ile M1, M2a ve M2c makrofaj ko-kültüründe, makrofajların A549 hücrelerine tek başına ve proteazom inhibitörü olan bortezomib ve ixazomib ile proliferasyon, apoptoz ve EMT mekanizması ile ilişkili olarak etkilerini belirlemektir. Bu kapsamda sonuçlarımız aşağıda özetlenmiştir;

Çalışmamızda A549 hücrelerinde 48. saatte IC₅₀ konsantrasyonlarının bortezomib için 45 nM, ixazomib için ise 2 µM olduğu gerçek zamanlı hücre analiz sisteminde araştırılmıştır. Ayrıca bortezomib ve ixazomibin aynı konsantrasyonları THP-1 monosit ve CCD-19Lu sağlıklı akciğer hücrelerinde de denenmiş ve bu hücrelerde önemli bir toksik etki oluşturmadığı belirlenmiştir.

Ko-kültür çalışmalarından önce M0, M1, M2a ve M2c makrofajların polarizasyonu için uygun konsantrasyon ve inkübasyon süresi belirleme çalışmaları yapılmıştır. Bu sonuçlara göre, M0 makrofaja farklılaşma 100 ng/mL PMA ile 24 saat inkübasyon sonunda CD14 ve CD68 seviyeleri belirlenerek; M1 polarizasyonu 20 ng/mL IFN-γ + 20 ng/mL LPS ile 24 saat inkübasyon sonunda CD80 seviyeleri belirlenerek; M2a polarizasyonu 25 ng/mL IL-4 + IL-13 ile 72 saat inkübasyon sonunda CD206 ve CD23 seviyeleri belirlenerek ve M2c polarizasyonu ise 'literatürde ilk defa' 1 µM hidrokortizon ile 72 saat inkübasyon sonucunda CD206 ve CD163 seviyeleri belirlenerek makrofaj optimizasyonları yapılmıştır.

M1, M2a ve M2c makrofaj polarizasyonunu doğrulamak amacıyla araştırılan IL-1β, IL-8, IL-18, CXCL-1, CXCL-3, TGF-β, CCL-22 ve CCL-24 mRNA seviyeleri sonuçlarına göre, literatürde (Hwang vd., 2011; Chanput vd., 2013; Crusz ve Balkwill, 2015; Yeung vd., 2015; Zhang vd., 2018) M1 makrofaj polarizasyonu belirteci olan IL-

1 β , IL-8, IL-18, CXCL-1, CXCL-3 mRNA seviyelerinin M0 makrofaja göre bizim sonuçlarımızda da artış gösterdiği, aynı genlerin M2a ve M2c polarize makrofajlarda ise azaldığı belirlenmiştir. Yine M2 polarize makrofajlara özgü olan TGF- β , CCL-22 ve CCL-24 mRNA ekspresyon seviyeleri M0 makrofaja göre, M2a ve M2c makrofajlarda artış göstererek, M2 polarizasyonunun gerçekleştiğini göstermiştir. Bu sonuçlar arasında özellikle TGF- β mRNA ekspresyonunda belirlenen artış, sonuçlarımız açısından önemlidir. Çünkü yapılan çalışmalarda TGF- β , hem epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT) için önemli faktörlerden biri olduğu hemde TGF- β 'nın EMT'yi indüklemek için bir ajan olabileceğini gösteren çalışmalar mevcuttur (Yang vd., 2017; Dash vd., 2018). Bizim sonuçlarımıza göre de M2a ve M2c makrofajlar ile oluşturulan A549 ko-kültüründe EMT'nin indüklenmesinde, TGF- β 'nın rolü olabileceği öngörülmektedir.

Yapılan önceki çalışmalar, tümör ilişkili makrofajlarla etkileşimin, kanser hücrelerinin proliferasyonunu ve kemoterapi ajanlarına duyarlılıklarını değiştirebildiğini kanıtlamıştır. Tümör mikroçevresinde bulunan farklı makrofaj alt-tiplerinin (M1, M2a ve M2c gibi), hücre proliferasyonunu farklı şekilde etkileyebileceği açıklanmıştır (Yuan vd., 2015). Çalışmamızda A549 hücreleri ile, M1, M2a ve M2c polarize makrofaj hücreleri ko-kültüründe kullanılan özel bir plaka sayesinde (E-plate insert) aynı kültür ortamında bulunması ve proliferasyonunun gerçek zamanlı olarak ölçülmesi sayesinde çalışmalarımız daha hassas olarak gerçekleşmiştir. M1 polarize makrofajın, 'tek başına' A549 hücre canlılığını azalttığı bulunmuştur. Ayrıca çalışmamız A549 hücreleri ve M1, M2a ve M2c makrofaj ko-kültürlerinde bortezomib ve ixazomibin anti-proliferatif etkilerinin araştırıldığı ilk çalışmadır. Özellikle A549 ile M1 makrofaj ko-kültür grubunda bortezomib ve ixazomibin anti-proliferatif etkisinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu iki sonuç bize literatürde A549 hücreleri ile M1 makrofaj ko-kültüründe etkinliği bilinen sisplatin, etoposid gibi ilaçların, antiproliferatif etkilerinin ve duyarlılığının arttığı bildirilen çalışmalara (Genin vd., 2015; Yuan vd., 2015) paralel olarak, akciğer kanseri mikroçevresinde bulunan tümör ilişkili makrofajların daha çok 'M1 polarize' bulunmasının/sağlanmasının hem anti-proliferatif etkiler hemde kullanılan kemoterapötiklerin etkisini arttırmak açısından önemli bir avantaj olabileceğini göstermektedir.

M1 polarize makrofajın, A549 hücre canlılığını azaltması sonucumuz ile paralel olarak, A549 kontrole göre, A549+M1 makrofaj grubunda özellikle erken apoptoz artışı belirlenmesi sonuçlarımız açısından önemlidir. Ayrıca Annexin V-PI sonuçlarımıza göre,

bortezomib ve ixazomibin A549 tekli kültür grubunda kontrole göre apoptotik etkilerinin istatistiksel olarak aynı olduğu belirlenmiştir. Çalışmamızda tümör mikroçevresinde bulunarak pro-inflamatuvar sitokinlerin artışına sebep olan ve kanser progresyonunu önlediği açıklanan M1 polarize makrofajların (Mosser, 2003; Biswas ve Mantovani, 2010), apoptoz sonuçlarımızı destekleyecek şekilde A549 hücreleri ile ko-kültürü sonucunda, aktif kaspaz-3 seviyelerini arttırmış olması da ilk kez bu tez çalışmasında belirlenmiştir. Kaspaz-3 seviyelerinde en fazla artış M1+A549 bortezomib ve M1+A549 ixazomib polarize makrofaj ile oluşturulan ko-kültür grubunda analiz edilmiştir. Çalışmamız, ixazomibin A549 hücrelerinde kaspaz-3 seviyelerinin değerlendirildiği ilk çalışmadır ve bütün ko-kültür gruplarında ixazomibin kaspaz-3 seviyelerini bortezomibe göre daha fazla arttırdığı belirlenmiştir. İlave olarak, A549 hücrelerinde özellikle M1 makrofaj ko-kültür grubunda, bortezomib ve ixazomibin mitokondrial depolarizasyon artışına sebep olması da A549 hücrelerinde M1 makrofajın proteazom inhibitörü olan bortezomib ve ixazomibin apoptotik etkilerini arttırdığını açıklamaktadır.

Yapılan çalışmalarda TNF- α 'nın TGF- β seviyelerini baskılayarak EMT'yi inhibe ettiği (Dash vd., 2018) ve IL-10 inhibisyonunun ise EMT'yi etkili bir şekilde azalttığı (Suarez-Carmona vd., 2017) bildirilmiştir. Bizim sonuçlarımızda da A549 hücrelerinin M2a ve M2c makrofajlar ko-kültüründe azalan TNF- α ve artan IL-10 seviyelerinin A549 hücrelerinde EMT artışının sebebi olarak gösterilebileceği bulgularımız ile kanıtlanmıştır.

M2a ve M2c makrofaj ile A549 ko-kültür gruplarında, kanser hücrelerinde, vimentin, E-kaderin, fibronektin, NF-kB, VEGF ve CCl-17 mRNA ekspresyon düzeylerine bağlı olarak EMT'nin indüklenmiş olduğu gösterilmiştir. Son yıllarda, tümör büyümesinin ve invazyonunun baskılanması hedeflenmiş ve NF-kB ekseninde odaklanan tedavi yaklaşımları önerilmiştir. Ayrıca tümör mikroçevresindeki makrofaj popülasyonunun, proinflamatuvar 'M1 polarize makrofajlara' yeniden programlanması ile makrofaja anti-tümör özellik kazandırmak amacıyla, 'NF-kB' immünoterapi için bir hedef olarak ön plana çıkmıştır (Yang vd., 2014; Ortega vd., 2016). Çalışmamızda 'bilinen en iyi NF-kB inhibitörlerinden biri olması sebebi ile' seçilen proteazom inhibitörlerinden, bortezomib ve ixazomibin özellikle M2c makrofaj ko-kültürü ile uyarılan A549 hücrelerinde EMT üzerine etkileri vimentin, E-kaderin, NF-kB, CCl-17 ve VEGF mRNA ve protein seviyeleri ile belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre özellikle M2c makrofajın A549 hücrelerindeki EMT'yi M2a makrofaja göre daha çok arttırdığı

bulunmuştur. Ayrıca proteazom inhibitörlerinin EMT üzerine etkisi karşılaştırıldığında, M2 polarize makrofajlar ile indüklenen EMT'nin 'bortezomibe göre ixazomib' ile istatistiksel olarak da daha anlamlı bir şekilde inhibe edildiği sonucuna varılmıştır.

Çalışmamızda A549 akciğer kanseri hücrelerinde, 2D ve 3D ortamlarda, bortezomib ve ixazomibin antiproliferatif etkileri ve IC₅₀ konsantrasyonları ilk kez belirlenerek karşılaştırılmıştır. Bu sonuçlara göre, A549 hücrelerinde bortezomib ve ixazomibin 48 saatlik inkübasyon sonunda, 3D ortamdaki IC₅₀ değeri 2D kültür ortamına göre bortezomib için yaklaşık 15, ixazomib için ise yaklaşık 9 kat yüksek belirlenmiştir. 3D kültür ortamı *in vivo* koşullara daha yakın olduğu için gelecekte yapılacak çalışmalara belirlenen bu konsantrasyonlar ışık tutacaktır.

Tez çalışmamızın en önemli sonuçları biri; THP-1 monosit hücrelerinin PMA ile M0 makrofaja farklılaştırılmasının ardından, çalışmamızın özgün değeri olan ve literatürde ilk kez hidrokortizon kullanılarak M2c polarizasyonunun gerçekleştirilmiş olmasıdır. Literatür çalışmaları sonucunda özellikle M2c polarize makrofaja ait kısıtlı sayıda literatür bilgisi olduğu ve yapılan çalışmalarda THP-1 hücrelerinin M2c makrofaja farklılaştırılması sırasında IL-10 kullanıldığı dikkatimizi çekmiştir. Literatür bilgilerine farmakolojik bir yaklaşımla bakıldığında M2c farklılaşmasında glukokortikoid kullanımının mümkün olabileceği belirtilmesine rağmen bu konuda çalışma yapılmamıştır. Buradan yola çıkarak bu tez kapsamında yaptığımız çalışmalar ile THP-1 kökenli makrofaj hücrelerini (M0 makrofaj) hidrokortizon kullanarak M2c polarize makrofaj haline farklılaştırmayı optimize ettik. Ayrıca bu M2c makrofaj polarizasyonunun A549 hücrelerinde M1 ve M2a makrofaja göre, EMT yolağını diğer makrofajlardan daha fazla indüklemiş olduğu bulgularımız arasındaki önemli sonuçlar arasındadır.

Akciğer tümörü mikroçevresi, malign ve malign olmayan popülasyonlar dahil olmak üzere çok çeşitli hücreleri içermektedir. Bu hücreler, tümör oluşumunun inhibe edilmesine katkı sağlayabileceği gibi tam tersine, tümör büyümesinin ve ilerlemesinin gelişmesine de yol açabileceği bilindiğinden (Jackute vd., 2018), M2c makrofaj ilişkili veriler hem literatüre hemde kanser tedavisi konusundaki bilgilere yeni bakış açısı sağlayacaktır. Akciğer kanserinde hücrelerin, erken metastaz yapabilme kabiliyetinin çok yüksek olması ve mortalitenin büyük çoğunluğunu kanser metastazının oluşturması nedeni ile metastazın inhibisyonu, EMT yolağının inhibisyonu ile yakından ilişkilidir. (Savary vd., 2009).

Sonuç olarak, M1 makrofaj ile ko-kültüründe, A549 hücrelerinde anti-proliferatif ve anti-apoptotik etkilerin yüksek bulunmasına ek olarak M1 makrofaj, bortezomib ve ixazomibin anti-proliferatif ve anti-apoptotik etkilerini arttırmıştır. Ayrıca, M2c makrofaj ile A549 hücrelerinde uyardığımız EMT'nin bortezomibe göre özellikle ixazomib ile daha başarılı şekilde inhibe edilmesi, güncel tedavi yaklaşımı olan proteazom inhibitörlerinden ixazomibin EMT yolağı üzerinde bilinmeyen bir yönünü aydınlatarak immünoterapötik yaklaşımlar olarak değerlendirilebileceğini bu çalışma ile göstermiş olduk.

Tez çalışmamız sürecinde ileriki çalışmalar ile, EMT yolağının ardından M2c ile ilişkili verileri arttırmak amacıyla anti-metastatik, anti-anjiyojenik mekanizmalar üzerine daha kapsamlı araştırmaların yapılması ve etkilerin belirlenmesinin önemli olması nedeniyle önermiş olduğumuz 'Proteazom İnhibitörleri Bortezomib ve İxazomib'in M2c Polarize Makrofaj ile Oluşturulan A549 Akciğer Kanseri Ko-Kültür Modelinde Metastaz/inflamasyon Birlikteliğinin Araştırılması' isim ve konulu TÜBİTAK 1002 projesi kapsamında (proje no: 319S088) kabul edilmiştir. Hem tez hemde sonuçlanacak proje verilerimiz ışığında M2c makrofaj ve ixazomib ilişkili ile daha ileri moleküler mekanizmalar üzerine çalışılabileceği ve M2 makrofajları M1 makrofaja yeniden programlamanın akciğer kanseri tedavisine yeni ışık tutabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKÇA

- Acrani, G. O., Gomes, R., Proença-Módena, J. L., da Silva, A. F., Carminati, P. O., Silva, M. L., Santos, R. I., Arruda, E. (2010). Apoptosis induced by Oropouche virus infection in HeLa cells is dependent on virus protein expression. *Virus Research*, 149(1), 56–63.
- Amann, A., Zwierzina, M., Gamerith, G., Bitsche, M., Huber, J. M., Vogel, G. F., Blumer, M., Koeck, S., Pechriggl, E. J., Kelm, J. M., Hilbe, W., Zwierzina, H. (2014). Development of an innovative 3D cell culture system to study tumour--stroma interactions in non-small cell lung cancer cells. *Plos One*, 9(3), e92511.
- Anderson, C. F. and Mosser, D. M. (2002). A novel phenotype for an activated macrophage: the type 2 activated macrophage. *Journal of Leukocyte Biology*, 72(1), 101–106.
- Augello, G., Modica, M., Azzolina, A., Puleio, R., Cassata, G., Emma, M. R., Di Sano, C., Cusimano, A., Montalto, G., Cervello, M. (2018). Preclinical evaluation of antitumor activity of the proteasome inhibitor MLN2238 (ixazomib) in hepatocellular carcinoma cells. *Cell Death & Disease*, 9(2), 28.
- Bastiaan-Net, S., Chanput, W., Hertz, A., Zwittink, R. D., Mes, J. J., Wichers, H. J. (2013). Biochemical and functional characterization of recombinant fungal immunomodulatory proteins (rFIPs). *International Immunopharmacology*, 15(1), 167–175.
- Biswas, S. K. and Mantovani, A. (2010). Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nature immunology*, 11(10), 889–896.
- Bongiovanni, B., Mata-Espinosa, D., D'Attilio, L., Leon-Contreras, J. C., Marquez-Velasco, R., Bottasso, O., Hernandez-Pando, R., Bay, M. L. (2015). Effect of cortisol and/or DHEA on THP1-derived macrophages infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*, 95(5), 562–569.
- Bremnes, R. M., Veve, R., Gabrielson, E., Hirsch, F. R., Baron, A., Bemis, L., Gemmill, R. M., Drabkin, H. A., Franklin, W. A. (2002). High-throughput tissue microarray analysis used to evaluate biology and prognostic significance of the E-cadherin pathway in non-small-cell lung cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 20(10), 2417–2428.

- Carmichael, J., DeGraff, W. G., Gazdar, A. F., Minna, J. D., Mitchell, J. B. (1987). Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Research*, 47(4), 936–942.
- Cascone, T., Morelli, M. P., Morgillo, F., Kim, W. Y., Rodolico, G., Pepe, S., Tortora, G., Berrino, L., Lee, H. Y., Heymach, J. V., Ciardiello, F. (2008). Synergistic anti-proliferative and pro-apoptotic activity of combined therapy with bortezomib, a proteasome inhibitor, with anti-epidermal growth factor receptor (EGFR) drugs in human cancer cells. *Journal of Cellular Physiology*, 216(3), 698–707.
- Chaffer, C. L. and Weinberg, R. A. (2011). A perspective on cancer cell metastasis. *Science*, 331(6024), 1559–1564.
- Chanput, W., Mes, J. J., Savelkoul, H. F., Wichers, H. J. (2013). Characterization of polarized THP-1 macrophages and polarizing ability of LPS and food compounds. *Food & Function*, 4(2), 266–276.
- Chanput, W., Mes, J. J., Wichers, H. J. (2014). THP-1 cell line: an in vitro cell model for immune modulation approach. *International immunopharmacology*, 23(1), 37–45.
- Chattopadhyay, N., Berger, A. J., Koenig, E., Bannerman, B., Garnsey, J., Bernard, H., Hales, P., Maldonado Lopez, A., Yang, Y., Donelan, J., Jordan, K., Tirrell, S., Stringer, B., Xia, C., Hather, G., Galvin, K., Manfredi, M., Rhodes, N., Amidon, B. (2015). KRAS Genotype Correlates with Proteasome Inhibitor Ixazomib Activity in Preclinical In Vivo Models of Colon and Non-Small Cell Lung Cancer: Potential Role of Tumor Metabolism. *Plos One*, 10(12), e0144825.
- Chauhan, D., Tian, Z., Zhou, B., Kuhn, D., Orlowski, R., Raje, N., Richardson, P., Anderson, K. C. (2011). In vitro and in vivo selective antitumor activity of a novel orally bioavailable proteasome inhibitor MLN9708 against multiple myeloma cells. *Clinical Cancer Research*, 17(16), 5311–5321.
- Chen, F., Castranova, V., Shi, X., Demers, L. M. (1999). New insights into the role of nuclear factor-kappaB, a ubiquitous transcription factor in the initiation of diseases. *Clinical Chemistry*, 45(1), 7–17.
- Chen, W., Zheng, R., Baade, P. D., Zhang, S., Zeng, H., Bray, F., Jemal, A., Yu, X. Q., He, J. (2016). Cancer statistics in China, 2015. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 66(2), 115–132.
- Chen, D. S., Mellman, I. (2013). Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity*, 39(1), 1–10.

- Chen, J. J., Lin, Y. C., Yao, P. L., Yuan, A., Chen, H. Y., Shun, C. T., Tsai, M. F., Chen, C. H., Yang, P. C. (2005). Tumor-associated macrophages: the double-edged sword in cancer progression. *Journal of Clinical Oncology*, 23(5), 953–964.
- Kuo, C. T., Hsu, M. J., Chen, B. C., Chen, C. C., Teng, C. M., Pan, S. L., Lin, C. H. (2008). Denbinobin induces apoptosis in human lung adenocarcinoma cells via Akt inactivation, Bad activation, and mitochondrial dysfunction. *Toxicology Letters*, 177(1), 48–58.
- Chitambar, C. R., and Purpi, D. P. (2010). A novel gallium compound synergistically enhances bortezomib-induced apoptosis in mantle cell lymphoma cells. *Leukemia Research*, 34(7), 950–953.
- Choy, M. M., Zhang, S. L., Costa, V. V., Tan, H. C., Horrevorts, S., Ooi, E. E. (2015). Proteasome Inhibition Suppresses Dengue Virus Egress in Antibody Dependent Infection. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(11), e0004058.
- Chu, Y. Y., Ko, C. Y., Wang, S. M., Lin, P. I., Wang, H. Y., Lin, W. C., Wu, D. Y., Wang, L. H., Wang, J. M. (2017). Bortezomib-induced miRNAs direct epigenetic silencing of locus genes and trigger apoptosis in leukemia. *Cell Death & Disease*, 8(11), e3167.
- Cohen G. M. (1997). Caspases: the executioners of apoptosis. *The Biochemical Journal*, 326 (Pt 1), 1–16.
- Cui, Y., and Guo, G. (2016). Immunomodulatory function of the tumor suppressor p53 in host immune response and the tumor microenvironment. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(11), 1942.
- Crusz, S. M. and Balkwill, F. R. (2015). Inflammation and cancer: advances and new agents. *Nature Reviews. Clinical Oncology*, 12(10), 584–596.
- Dash, S., Sarashetti, P. M., Rajashekar, B., Chowdhury, R., Mukherjee, S. (2018). TGF- β 2-induced EMT is dampened by inhibition of autophagy and TNF- α treatment. *Oncotarget*, 9(5), 6433–6449.
- de Waal Malefyt, R., Figdor, C. G., Huijbens, R., Mohan-Peterson, S., Bennett, B., Culpepper, J., Dang, W., Zurawski, G., de Vries, J. E. (1993). Effects of IL-13 on phenotype, cytokine production, and cytotoxic function of human monocytes. Comparison with IL-4 and modulation by IFN-gamma or IL-10. *Journal of Immunology*, 151(11), 6370–6381.

- Dehai, C., Bo, P., Qiang, T., Lihua, S., Fang, L., Shi, J., Jingyan, C., Yan, Y., Guangbin, W., Zhenjun, Y. (2014). Enhanced invasion of lung adenocarcinoma cells after co-culture with THP-1-derived macrophages via the induction of EMT by IL-6. *Immunology Letters*, 160(1), 1–10.
- Denisenko, T. V., Budkevich, I. N., Zhivotovsky, B. (2018). Cell death-based treatment of lung adenocarcinoma. *Cell Death & Disease*, 9(2), 117.
- Denlinger, C. E., Keller, M. D., Mayo, M. W., Broad, R. M., Jones, D. R. (2004). Combined proteasome and histone deacetylase inhibition in non-small cell lung cancer. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 127(4), 1078–1086.
- Dikmen, M., Öztürk, S. E., Cantürk, Z., Ceylan, G., Karaduman, A. B., Yamaç, M. (2020). Anticancer and antimetastatic activity of *Hypomyces chrysospermus*, a cosmopolitan parasite in different human cancer cells. *Molecular Biology Reports*, 47(5), 3765–3778.
- Dutaud, D., Aubry, L., Henry, L., Levieux, D., Hendil, K. B., Kuehn, L., Bureau, J. P., Ouali, A. (2002). Development and evaluation of a sandwich ELISA for quantification of the 20S proteasome in human plasma. *Journal of Immunological Methods*, 260(1-2), 183–193.
- Engür, S. and Dikmen, M. (2017). The evaluation of the anti-cancer activity of ixazomib on Caco2 colon solid tumor cells, comparison with bortezomib. *Acta Clinica Belgica*, 72(6), 391-398.
- Engür, S., Dikmen, M., Öztürk, Y. (2016). Comparison of antiproliferative and apoptotic effects of a novel proteasome inhibitor MLN2238 with bortezomib on K562 chronic myeloid leukemia cells. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 38(2), 87-97.
- Faubel, S. and Edelstein, C. L. (2005). Caspases as drug targets in ischemic organ injury. Current drug targets. *Immune, Endocrine and Metabolic Disorders*, 5(3), 269–287.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D. M., Forman, D., Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in Globocan 2012. *International Journal of Cancer*, 136(5), E359–E386.
- Finnin, M., Hamilton, J. A., Moss, S. T. (1999). Characterization of a CSF-induced proliferating subpopulation of human peripheral blood monocytes by surface

- marker expression and cytokine production. *Journal of Leukocyte Biology*, 66(6), 953–960.
- Fischbach, C., Kong, H. J., Hsiong, S. X., Evangelista, M. B., Yuen, W., Mooney, D. J. (2009). Cancer cell angiogenic capability is regulated by 3D culture and integrin engagement. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(2), 399–404.
- Foey, A. D. (2014). Macrophages—masters of immune activation, suppression and deviation. *Immune Response Activation*, 121-149.
- Forde, P. M., Kelly, R. J., Brahmer, J. R. (2014). New strategies in lung cancer: translating immunotherapy into clinical practice. *Clinical Cancer Research*, 20(5), 1067–1073.
- Frankland-Searby, S., and Bhaumik, S. R. (2012). The 26S proteasome complex: an attractive target for cancer therapy. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1825(1), 64–76.
- Furie, R., Toder, K., Zapantis, E. (2015). Lessons Learned From the Clinical Trials of Novel Biologics and Small Molecules in Lupus Nephritis. *Seminars in Nephrology*, 35(5), 509–520.
- Gadina, M., Gazaniga, N., Vian, L., Furumoto, Y. (2017). Small molecules to the rescue: Inhibition of cytokine signaling in immune-mediated diseases. *Journal of Autoimmunity*, 85, 20-31.
- Gao, D., Vahdat, L. T., Wong, S., Chang, J. C., Mittal, V. (2012). Microenvironmental regulation of epithelial-mesenchymal transitions in cancer. *Cancer Research*, 72(19), 4883–4889.
- Gatti, R., Belletti, S., Orlandini, G., Bussolati, O., Dall'Asta, V., Gazzola, G. C. (1998). Comparison of annexin V and calcein-AM as early vital markers of apoptosis in adherent cells by confocal laser microscopy. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 46(8), 895–900.
- Genin, M., Clement, F., Fattaccioli, A., Raes, M., Michiels, C. (2015). M1 and M2 macrophages derived from THP-1 cells differentially modulate the response of cancer cells to etoposide. *BMC Cancer*, 15, 577.
- Ghosh, S., May, M. J., Kopp, E. B. (1998). NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annual review of immunology*, 16, 225–260.

- Gibbons Johnson, R. M. and Dong, H. (2017). Functional Expression of Programmed Death-Ligand 1 (B7-H1) by Immune Cells and Tumor Cells. *Frontiers in Immunology*, 8, 961.
- Godugu, C., Patel, A. R., Desai, U., Andey, T., Sams, A., Singh, M. (2013). AlgiMatrix™ based 3D cell culture system as an in-vitro tumor model for anticancer studies. *Plos One*, 8(1), e53708.
- Gordon, S. and Martinez, F. O. (2010). Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity*, 32(5), 593-604.
- Guarda, G., Braun, M., Staehli, F., Tardivel, A., Mattmann, C., Förster, I., Farlik, M., Decker, T., Du Pasquier, R. A., Romero, P., Tschopp, J. (2011). Type I interferon inhibits interleukin-1 production and inflammasome activation. *Immunity*, 34(2), 213–223.
- Gupta, S. C., Sundaram, C., Reuter, S., Aggarwal, B. B. (2010). Inhibiting NF- κ B activation by small molecules as a therapeutic strategy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1799(10-12), 775-787.
- Gyorki, D. E., Asselin-Labat, M. L., van Rooijen, N., Lindeman, G. J., Visvader, J. E. (2009). Resident macrophages influence stem cell activity in the mammary gland. *Breast Cancer Research*, 11(4), R62.
- Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646–674.
- Hanke, N. T., Imler, E., Marron, M. T., Seligmann, B. E., Garland, L. L., Baker, A. F. (2018). Characterization of carfilzomib-resistant non-small cell lung cancer cell lines. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 144(7), 1317-1327.
- He, H., Xu, J., Warren, C. M., Duan, D., Li, X., Wu, L., Iruela-Arispe, M. L. (2012). Endothelial cells provide an instructive niche for the differentiation and functional polarization of M2-like macrophages. *Blood*, 120(15), 3152–3162.
- Hou, S. Y., Wu, S. Y., Chiang, C. M. (2002). Transcriptional activity among high and low risk human papillomavirus E2 proteins correlates with E2 DNA binding. *Journal of Biological Chemistry*, 277(47), 45619-45629.
- Hsu, Y. L., Chen, C. Y., Lin, I. P., Tsai, E. M., Kuo, P. L., Hou, M. F. (2012). 4-Shogaol, an active constituent of dietary ginger, inhibits metastasis of MDA-MB-231 human breast adenocarcinoma cells by decreasing the repression of NF- κ B/Snail on RKIP. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(3), 852–861.

- Huang, X., Li, Y., Fu, M., Xin, H. B. (2018). Polarizing Macrophages In Vitro. *Methods in Molecular Biology*, 1784, 119–126.
- Huber, M. A., Azoitei, N., Baumann, B., Grünert, S., Sommer, A., Pehamberger, H., Kraut, N., Beug, H., Wirth, T. (2004). NF-kappaB is essential for epithelial-mesenchymal transition and metastasis in a model of breast cancer progression. *The Journal of Clinical Investigation*, 114(4), 569–581.
- Hwang, W. L., Yang, M. H., Tsai, M. L., Lan, H. Y., Su, S. H., Chang, S. C., Teng, H. W., Yang, S. H., Lan, Y. T., Chiou, S. H., Wang, H. W. (2011). SNAIL regulates interleukin-8 expression, stem cell-like activity, and tumorigenicity of human colorectal carcinoma cells. *Gastroenterology*, 141(1), 279–291.e2915.
- Iijima T. (2006). Mitochondrial membrane potential and ischemic neuronal death. *Neuroscience Research*, 55(3), 234–243.
- Iwasaki, A. and Medzhitov, R. (2010). Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science*, 327(5963), 291–295.
- Jackute, J., Zemaitis, M., Pranys, D., Sitkauskienė, B., Miliauskas, S., Vaitkienė, S., Sakalauskas, R. (2018). Distribution of M1 and M2 macrophages in tumor islets and stroma in relation to prognosis of non-small cell lung cancer. *BMC Immunology*, 19(1), 3.
- Jang, M. H., Kim, H. J., Kim, E. J., Chung, Y. R., Park, S. Y. (2015). Expression of epithelial-mesenchymal transition-related markers in triple-negative breast cancer: ZEB1 as a potential biomarker for poor clinical outcome. *Human Pathology*, 46(9), 1267–1274.
- Johnson, D. E. (2015). The ubiquitin–proteasome system: opportunities for therapeutic intervention in solid tumors. *Endocrine-Related Cancer*, 22(1), T1-T17.
- Karin, M. and Ben-Neriah, Y. (2000). Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annual Review of Immunology*, 18, 621–663.
- Karin, M., Cao, Y., Greten, F. R., Li, Z. W. (2002). NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nature Reviews Cancer*, 2(4), 301–310.
- Kim J. B. (2005). Three-dimensional tissue culture models in cancer biology. *Seminars in Cancer Biology*, 15(5), 365–377.
- Savary, K., Termén, S., Thuault, S., Keshamouni, V., Moustakas, A. (2009). Epithelial–mesenchymal transition as a mechanism of metastasis. In *Lung cancer metastasis* (pp. 65-92). New York, NY: Springer.

- Dong, H. (2018). Immune system and cancer, Markovic, S. N. (Ed.). (2018). The Basics of Cancer Immunotherapy (1-19). Switzerland: Springer.
- Koopman, G., Reutelingsperger, C. P., Kuijten, G. A., Keehnen, R. M., Pals, S. T., Van Oers, M. H. (1994). Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood*, 84(5), 1415–1420.
- Kupperman, E., Lee, E. C., Cao, Y., Bannerman, B., Fitzgerald, M., Berger, A., Yu, J., Yang, Y., Hales, P., Bruzzese, F., Liu, J., Blank, J., Garcia, K., Tsu, C., Dick, L., Fleming, P., Yu, L., Manfredi, M., Rolfe, M., Bolen, J. (2010). Evaluation of the proteasome inhibitor MLN9708 in preclinical models of human cancer. *Cancer Research*, 70(5), 1970–1980.
- Li, J., Deng, Z., Wang, Z., Wang, D., Zhang, L., Su, Q., Lai, Y., Li, B., Luo, Z., Chen, X., Chen, Y., Huang, X., Ma, J., Wang, W., Bi, J., Guan, X. (2015). Zipper-interacting protein kinase promotes epithelial-mesenchymal transition, invasion and metastasis through AKT and NF- κ B signaling and is associated with metastasis and poor prognosis in gastric cancer patients. *Oncotarget*, 6(10), 8323–8338.
- Li, X. W. and Yang, J. R. (2012). Effects of Secoisolariciresinol Diglucoside Combined With Bortezomib on Induction of Apoptosis in Lung Cancer Cell Line A549. *Journal of Chinese Medicinal Materials*, 35(2), 248–253.
- Lian, Z., Niwa, K., Gao, J., Tagami, K., Mori, H., Tamaya, T. (2003). Association of cellular apoptosis with anti-tumor effects of the Chinese herbal complex in endocrine-resistant cancer cell line. *Cancer Detection and Prevention*, 27(2), 147–154.
- Limame, R., Wouters, A., Pauwels, B., Fransen, E., Peeters, M., Lardon, F., De Wever, O., Pauwels, P. (2012). Comparative analysis of dynamic cell viability, migration and invasion assessments by novel real-time technology and classic endpoint assays. *Plos One*, 7(10), e46536.
- Liu, Y., Stewart, K. N., Bishop, E., Marek, C. J., Kluth, D. C., Rees, A. J., Wilson, H. M. (2008). Unique expression of suppressor of cytokine signaling 3 is essential for classical macrophage activation in rodents in vitro and in vivo. *Journal of Immunology*, 180(9), 6270–6278.
- Liu, M., Tang, X., Ding, J., Liu, M., Zhao, B., Deng, Y., Song, Y. (2019). A Sialylated-Bortezomib Prodrug Strategy Based on a Highly Expressed Selectin Target for the Treatment of Leukemia or Solid Tumors. *Pharmaceutical Research*, 36(12), 176.

- Luqman, S., and Pezzuto, J. M. (2010). NFκB: a promising target for natural products in cancer chemoprevention. *Phytotherapy Research*, 24(7), 949–963.
- Mantovani, A., Bottazzi, B., Colotta, F., Sozzani, S., Ruco, L. (1992). The origin and function of tumor-associated macrophages. *Immunology Today*, 13(7), 265–270.
- Mantovani, A., Sozzani, S., Locati, M., Allavena, P., Sica, A. (2002). Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends in Immunology*, 23(11), 549–555.
- Mantovani, A., Schioppa, T., Porta, C., Allavena, P., Sica, A. (2006). Role of tumor-associated macrophages in tumor progression and invasion. *Cancer Metastasis Reviews*, 25(3), 315–322.
- Mantovani, A., Sica, A., Locati, M. (2007). New vistas on macrophage differentiation and activation. *European Journal of Immunology*, 37(1), 14–16.
- Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A., Balkwill, F. (2008). Cancer-related inflammation. *Nature*, 454(7203), 436–444.
- Mantovani, A., Vecchi, A., Allavena, P. (2014). Pharmacological modulation of monocytes and macrophages. *Current Opinion in Pharmacology*, 17, 38–44.
- Mantovani, A. and Allavena, P. (2015). The interaction of anticancer therapies with tumor-associated macrophages. *The Journal of Experimental Medicine*, 212(4), 435–445.
- Martinez, F. O., Helming, L., Gordon, S. (2009). Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annual Review of Immunology*, 27, 451–483.
- McLoed, A. G., Sherrill, T. P., Cheng, D. S., Han, W., Saxon, J. A., Gleaves, L. A., Wu, P., Polosukhin, V. V., Karin, M., Yull, F. E., Stathopoulos, G. T., Georgoulas, V., Zaynagetdinov, R., Blackwell, T. S. (2016). Neutrophil-Derived IL-1β Impairs the Efficacy of NF-κB Inhibitors against Lung Cancer. *Cell Reports*, 16(1), 120–132.
- Mellman, I., Coukos, G., Dranoff, G. (2011). Cancer immunotherapy comes of age. *Nature*, 480, 480–489.
- Micalizzi, D. S., Farabaugh, S. M., Ford, H. L. (2010). Epithelial-mesenchymal transition in cancer: parallels between normal development and tumor progression. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 15(2), 117–134.

- Mills, C. D., Kincaid, K., Alt, J. M., Heilman, M. J., Hill, A. M. (2000). M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *Journal of Immunology*, 164(12), 6166–6173.
- Mitra, M., Mohanty, C., Harilal, A., Maheswari, U. K., Sahoo, S. K., Krishnakumar, S. (2012). A novel in vitro three-dimensional retinoblastoma model for evaluating chemotherapeutic drugs. *Molecular Vision*, 18, 1361–1378.
- Mittal, D., Gubin, M. M., Schreiber, R. D., Smyth, M. J. (2014). New insights into cancer immunoediting and its three component phases--elimination, equilibrium and escape. *Current Opinion in Immunology*, 27, 16–25.
- Mizutani, H., Okano, T., Minegishi, Y., Matsuda, K., Sudoh, J., Kitamura, K., Noro, R., Soeno, C., Yoshimura, A., Seike, M., Gemma, A. (2010). HSP27 modulates epithelial to mesenchymal transition of lung cancer cells in a Smad-independent manner. *Oncology Letters*, 1(6), 1011–1016.
- Moon, K., Lee, H. G., Baek, W. K., Lee, Y., Kim, K. S., Jun, J. H., Kim, J. Y., Joo, C. K. (2017). Bortezomib inhibits proliferation, migration, and TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition of RPE cells. *Molecular Vision*, 23, 1029–1038.
- Moreau, P., Richardson, P. G., Cavo, M., Orlowski, R. Z., San Miguel, J. F., Palumbo, A., Harousseau, J. L. (2012). Proteasome inhibitors in multiple myeloma: 10 years later. *Blood*, 120(5), 947–959.
- Mortenson, M. M., Schlieman, M. G., Virudachalam, S., Bold, R. J. (2004). Effects of the proteasome inhibitor bortezomib alone and in combination with chemotherapy in the A549 non-small-cell lung cancer cell line. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 54(4), 343–353.
- Mosser D. M. (2003). The many faces of macrophage activation. *Journal of Leukocyte Biology*, 73(2), 209–212.
- Mosser, D. M. and Edwards, J. P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature reviews. Immunology*, 8(12), 958–969.
- Muz, B., Ghazarian, R. N., Ou, M., Luderer, M. J., Kusdono, H. D., Azab, A. K. (2016). Spotlight on ixazomib: potential in the treatment of multiple myeloma. *Drug Design, Development and Therapy*, 10, 217–226.
- Nieto, M. A. (2011). The ins and outs of the epithelial to mesenchymal transition in health and disease. *Annual review of cell and developmental biology*, 27, 347-376.

- Ohtaki, Y., Ishii, G., Nagai, K., Ashimine, S., Kuwata, T., Hishida, T., Nishimura, M., Yoshida, J., Takeyoshi, I., Ochiai, A. (2010). Stromal macrophage expressing CD204 is associated with tumor aggressiveness in lung adenocarcinoma. *Journal of Thoracic Oncology*, 5(10), 1507–1515.
- Orlowski, R. Z., Baldwin, A. S., Jr (2002). NF-kappaB as a therapeutic target in cancer. *Trends in Molecular Medicine*, 8(8), 385–389.
- Ortega, R. A., Barham, W., Sharman, K., Tikhomirov, O., Giorgio, T. D., Yull, F. E. (2016). Manipulating the NF-κB pathway in macrophages using mannosylated, siRNA-delivering nanoparticles can induce immunostimulatory and tumor cytotoxic functions. *International Journal of Nanomedicine*, 11, 2163–2177.
- Özkay, Y., Yurttaş, L., Dikmen, M., Engür, S. (2016). Synthesis and antiproliferative activity evaluation of new thiazole–benzimidazole derivatives using real-time cell analysis (RTCA DP). *Medicinal Chemistry Research*, 25(3), 482–493.
- Pan, Y., Guo, X., Yang, Z., Chen, S., Lei, Y., Lin, M., Wang, L., Feng, C., Ke, Z. (2016). AEG-1 activates Wnt/PCP signaling to promote metastasis in tongue squamous cell carcinoma. *Oncotarget*, 7(2), 2093–2104.
- Papageorgis, P., and Stylianopoulos, T. (2015). Role of TGFβ in regulation of the tumor microenvironment and drug delivery. *International Journal of Oncology*, 46(3), 933–943.
- Pesic, M. and Greten, F.R. (2016) Inflammation and cancer: tissue regeneration gone awry. *Current Opinion Cell Biology*, 43, 55–61.
- Podo, F., Buydens, L. M., Degani, H., Hilhorst, R., Klipp, E., Gribbestad, I. S., Van Huffel, S., van Laarhoven, H. W., Luts, J., Monleon, D., Postma, G. J., Schneiderhan-Marra, N., Santoro, F., Wouters, H., Russnes, H. G., Sørlie, T., Tagliabue, E., Børresen-Dale, A. L., FEMME Consortium (2010). Triple-negative breast cancer: present challenges and new perspectives. *Molecular Oncology*, 4(3), 209–229.
- Pollard J. W. (2008). Macrophages define the invasive microenvironment in breast cancer. *Journal of Leukocyte Biology*, 84(3), 623–630.
- Qian, B. Z. and Pollard, J. W. (2010). Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell*, 141(1), 39–51.
- Raff M. (1998). Cell suicide for beginners. *Nature*, 396(6707), 119–122.

- Roepman, P., Schlicker, A., Tabernero, J., Majewski, I., Tian, S., Moreno, V., Snel, M. H., Chresta, C. M., Rosenberg, R., Nitsche, U., Macarulla, T., Capella, G., Salazar, R., Orphanides, G., Wessels, L. F., Bernards, R., Simon, I. M. (2014). Colorectal cancer intrinsic subtypes predict chemotherapy benefit, deficient mismatch repair and epithelial-to-mesenchymal transition. *International Journal of Cancer*, 134(3), 552–562.
- Sahoo, R. K., Gothwal, A., Rani, S., Nakhate, K. T., Gupta, U. (2020). PEGylated Dendrimer Mediated Delivery of Bortezomib: Drug Conjugation versus Encapsulation. *International Journal of Pharmaceutics*, 584, 119389.
- Sawa-Wejksza, K., and Kandefer-Szerszeń, M. (2018). Tumor-Associated Macrophages as Target for Antitumor Therapy. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 66(2), 97–111.
- Semren, N., Habel-Ungewitter, N. C., Fernandez, I. E., Königshoff, M., Eickelberg, O., Stöger, T., Meiners, S. (2015). Validation of the 2nd generation proteasome inhibitor oprozomib for local therapy of pulmonary fibrosis. *Plos One*, 10(9).
- Shanker, A., Brooks, A. D., Tristan, C. A., Wine, J. W., Elliott, P. J., Yagita, H., Takeda, K., Smyth, M. J., Murphy, W. J., Sayers, T. J. (2008). Treating metastatic solid tumors with bortezomib and a tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor agonist antibody. *Journal of the National Cancer Institute*, 100(9), 649–662.
- Sher, T., Dy, G. K., Adjei, A. A. (2008). Small cell lung cancer. *Mayo Clinic Proceedings*, 83(3), 355–367.
- Shishodia, S. and Aggarwal, B. B. (2002). Nuclear factor- κ B activation: a question of life or death. *BMB Reports*, 35(1), 28-40.
- Shulepko, M. A., Bychkov, M. L., Shlepova, O. V., Shenkarev, Z. O., Kirpichnikov, M. P., Lyukmanova, E. N. (2020). Human secreted protein SLURP-1 abolishes nicotine-induced proliferation, PTEN down-regulation and α 7-nAChR expression up-regulation in lung cancer cells. *International Immunopharmacology*, 82, 106303.
- Sica, A. and Bronte, V. (2007). Altered macrophage differentiation and immune dysfunction in tumor development. *The Journal of Clinical Investigation*, 117(5), 1155-1166.

- Siegel, R. L., Miller, K. D., Jemal, A. (2019). Cancer statistics, 2019. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 69(1), 7–34.
- Slee, E. A., Adrain, C., Martin, S. J. (2001). Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(10), 7320–7326.
- Smith, D. C., Kalebic, T., Infante, J. R., Siu, L. L., Sullivan, D., Vlahovic, G., Kauh, J. S., Gao, F., Berger, A. J., Tirrell, S., Gupta, N., Di Bacco, A., Berg, D., Liu, G., Lin, J., Hui, A. M., Thompson, J. A. (2015). Phase 1 study of ixazomib, an investigational proteasome inhibitor, in advanced non-hematologic malignancies. *Investigational New Drugs*, 33(3), 652–663.
- Solinas, G., Germano, G., Mantovani, A., Allavena, P. (2009). Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. *Journal of Leukocyte Biology*, 86(5), 1065–1073.
- Song, J., Feng, L., Zhong, R., Xia, Z., Zhang, L., Cui, L., Yan, H., Jia, X., Zhang, Z. (2017). Icariside II inhibits the EMT of NSCLC cells in inflammatory microenvironment via down-regulation of Akt/NF- κ B signaling pathway. *Molecular Carcinogenesis*, 56(1), 36–48.
- Sousa, S., Brion, R., Lintunen, M., Kronqvist, P., Sandholm, J., Mönkkönen, J., Kellokumpu-Lehtinen, P. L., Lauttia, S., Tynninen, O., Joensuu, H., Heymann, D., Määttä, J. A. (2015). Human breast cancer cells educate macrophages toward the M2 activation status. *Breast Cancer Research*, 17(1), 101.
- Stein, M., Keshav, S., Harris, N., Gordon, S. (1992). Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *The Journal of Experimental Medicine*, 176(1), 287–292.
- Suarez-Carmona, M., Lesage, J., Cataldo, D., Gilles, C. (2017). EMT and inflammation: inseparable actors of cancer progression. *Molecular Oncology*, 11(7), 805–823.
- Sueki, A., Matsuda, K., Iwashita, C., Taira, C., Ishimine, N., Shigeto, S., Kawasaki, K., Sugano, M., Yamamoto, H., Honda, T. (2014). Epithelial-mesenchymal transition of A549 cells is enhanced by co-cultured with THP-1 macrophages under hypoxic conditions. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 453(4), 804–809.

- Szot, C. S., Buchanan, C. F., Freeman, J. W., Rylander, M. N. (2011). 3D in vitro bioengineered tumors based on collagen I hydrogels. *Biomaterials*, 32(31), 7905–7912.
- Tam, W. L., and Weinberg, R. A. (2013). The epigenetics of epithelial-mesenchymal plasticity in cancer. *Nature Medicine*, 19(11), 1438.
- Thiery J. P. (2003). Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies. *Current Opinion in Cell Biology*, 15(6), 740–746.
- Thiery, J. P., Acloque, H., Huang, R. Y., and Nieto, M. A. (2009). Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*, 139(5), 871-890.
- Tibbitt, M. W., Anseth, K. S. (2009). Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3D cell culture. *Biotechnology and Bioengineering*, 103(4), 655–663.
- Tomasetti, C., Li, L., Vogelstein, B. (2017). Stem cell divisions, somatic mutations, cancer etiology, and cancer prevention. *Science*, 355(6331), 1330–1334.
- Tsai, J. H., and Yang, J. (2013). Epithelial–mesenchymal plasticity in carcinoma metastasis. *Genes & Development*, 27(20), 2192-2206.
- Tsai, M. J., Chang, W. A., Huang, M. S., Kuo, P. L. (2014). Tumor microenvironment: a new treatment target for cancer. *ISRN Biochemistry*, 2014.
- Tu, G. W., Shi, Y., Zheng, Y. J., Ju, M. J., He, H. Y., Ma, G. G., Hao, G. W., Luo, Z. (2017). Glucocorticoid attenuates acute lung injury through induction of type 2 macrophage. *Journal of Translational Medicine*, 15(1), 181.
- Van Ginderachter, J. A., Movahedi, K., Hassanzadeh Ghassabeh, G., Meerschaut, S., Beschin, A., Raes, G., De Baetselier, P. (2006). Classical and alternative activation of mononuclear phagocytes: picking the best of both worlds for tumor promotion. *Immunobiology*, 211(6-8), 487–501.
- Varga, J., De Oliveira, T., Greten, F. R. (2014). The architect who never sleeps: tumor-induced plasticity. *FEBS Letters*, 588(15), 2422–2427.
- Varin, A., and Gordon, S. (2009). Alternative activation of macrophages: immune function and cellular biology. *Immunobiology*, 214(7), 630-641.
- Veeranki, S., Duan, X., Panchanathan, R., Liu, H., Choubey, D. (2011). IFI16 protein mediates the anti-inflammatory actions of the type-I interferons through suppression of activation of caspase-1 by inflammasomes. *Plos One*, 6(10).
- Verreck, F. A., de Boer, T., Langenberg, D. M., van der Zanden, L., Ottenhoff, T. H. (2006). Phenotypic and functional profiling of human proinflammatory type-1 and

- anti-inflammatory type-2 macrophages in response to microbial antigens and IFN- γ - and CD40L-mediated costimulation. *Journal of Leukocyte Biology*, 79(2), 285–293.
- Voortman, J., Chęcińska, A., Giaccone, G. (2007). The proteasomal and apoptotic phenotype determine bortezomib sensitivity of non-small cell lung cancer cells. *Molecular Cancer*, 6(1), 73.
- Wang, R., Zhang, J., Chen, S., Lu, M., Luo, X., Yao, S., Liu, S., Qin, Y., Chen, H. (2011). Tumor-associated macrophages provide a suitable microenvironment for non-small lung cancer invasion and progression. *Lung Cancer*, 74(2), 188–196.
- Wang, Y., Shi, J., Chai, K., Ying, X., P Zhou, B. (2013). The role of snail in EMT and tumorigenesis. *Current Cancer Drug Targets*, 13(9), 963–972.
- Wang, D., Xu, Q., Yuan, Q., Jia, M., Niu, H., Liu, X., Zhang, J., Young, C. Y., Yuan, H. (2019). Proteasome inhibition boosts autophagic degradation of ubiquitinated-AGR2 and enhances the antitumor efficiency of bevacizumab. *Oncogene*, 38(18), 3458–3474.
- Wang, P., Wang, H., Huang, Q., Peng, C., Yao, L., Chen, H., Qiu, Z., Wu, Y., Wang, L., Chen, W. (2019). Exosomes from M1-polarized macrophages enhance paclitaxel antitumor activity by activating macrophages-mediated inflammation. *Theranostics*, 9(6), 1714–1727.
- Wu, G., Li, H., Ji, Z., Jiang, X., Lei, Y., Sun, M. (2014). Inhibition of autophagy by autophagic inhibitors enhances apoptosis induced by bortezomib in non-small cell lung cancer cells. *Biotechnology Letters*, 36(6), 1171–1178.
- Yang, T. M., Barbone, D., Fennell, D. A., Broaddus, V. C. (2009). Bcl-2 family proteins contribute to apoptotic resistance in lung cancer multicellular spheroids. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular biology*, 41(1), 14–23.
- Yang, J., Hawkins, O. E., Barham, W., Gilchuk, P., Boothby, M., Ayers, G. D., Joyce, S., Karin, M., Yull, F. E., Richmond, A. (2014). Myeloid IKK β promotes antitumor immunity by modulating CCL11 and the innate immune response. *Cancer Research*, 74(24), 7274–7284.
- Yang, Y., Luo, N. S., Ying, R., Xie, Y., Chen, J. Y., Wang, X. Q., Gu, Z. J., Mai, J. T., Liu, W. H., Wu, M. X., Chen, Z. T., Fang, Y. B., Zhang, H. F., Zuo, Z. Y., Wang, J. F., Chen, Y. X. (2017). Macrophage-derived foam cells impair endothelial barrier

- function by inducing endothelial-mesenchymal transition via CCL-4. *International Journal of Molecular Medicine*, 40(2), 558–568.
- Yao, G., Ling, L., Luan, J., Ye, D., Zhu, P. (2007). Nonylphenol induces apoptosis of Jurkat cells by a caspase-8 dependent mechanism. *International Immunopharmacology*, 7(4), 444–453.
- Yeung, O. W., Lo, C. M., Ling, C. C., Qi, X., Geng, W., Li, C. X., Ng, K. T., Forbes, S. J., Guan, X. Y., Poon, R. T., Fan, S. T., Man, K. (2015). Alternatively activated (M2) macrophages promote tumour growth and invasiveness in hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology*, 62(3), 607–616.
- Yu, L., Li, K., Zhang, X. (2017). Next-generation metabolomics in lung cancer diagnosis, treatment and precision medicine: mini review. *Oncotarget*, 8(70), 115774.
- Yuan, A., Hsiao, Y. J., Chen, H. Y., Chen, H. W., Ho, C. C., Chen, Y. Y., Liu, Y. C., Hong, T. H., Yu, S. L., Chen, J. J., Yang, P. C. (2015). Opposite Effects of M1 and M2 Macrophage Subtypes on Lung Cancer Progression. *Scientific Reports*, 5, 14273.
- Zappa, C., Mousa, S. A. (2016). Non-small cell lung cancer: current treatment and future advances. *Translational Lung Cancer Research*, 5(3), 288–300.
- Ziegler-Heitbrock, H. W., Fingerle, G., Ströbel, M., Schraut, W., Stelter, F., Schütt, C., Passlick, B., Pforte, A. (1993). The novel subset of CD14⁺/CD16⁺ blood monocytes exhibits features of tissue macrophages. *European Journal of Immunology*, 23(9), 2053–2058.
- Ziegler-Heitbrock H. W. (1996). Heterogeneity of human blood monocytes: the CD14⁺ CD16⁺ subpopulation. *Immunology Today*, 17(9), 424–428.
- Zhang, Q., Zhang, Y., Li, K., Wang, H., Li, H., Zheng, J. (2015). A Novel Strategy to Improve the Therapeutic Efficacy of Gemcitabine for Non-Small Cell Lung Cancer by the Tumor-Penetrating Peptide iRGD. *Plos One*, 10(6), e0129865.
- Zhang, Y., Shi, L., Mei, H., Zhang, J., Zhu, Y., Han, X., Zhu, D. (2015). Inflamed macrophage microvesicles induce insulin resistance in human adipocytes. *Nutrition & Metabolism*, 12(1), 21.
- Zhang, Q., Lenardo, M. J., Baltimore, D. (2017). 30 years of NF- κ B: a blossoming of relevance to human pathobiology. *Cell*, 168(1-2), 37-57.
- Zhang, B. C., Li, Z., Xu, W., Xiang, C. H., Ma, Y. F. (2018). Luteolin alleviates NLRP3 inflammasome activation and directs macrophage polarization in

- lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 cells. *American Journal of Translational Research*, 10(1), 265–273.
- Zhang, L. L., Zhang, L. F., Shi, Y. B. (2018). Down-regulated paxillin suppresses cell proliferation and invasion by inhibiting M2 macrophage polarization in colon cancer. *Biological Chemistry*, 399(11), 1285-1295.
- Zhang, J., Muri, J., Fitzgerald, G., Gorski, T., Gianni-Barrera, R., Masschelein, E., D'Hulst, G., Gilardoni, P., Turiel, G., Fan, Z., Wang, T., Planque, M., Carmeliet, P., Pellerin, L., Wolfrum, C., Fendt, S. M., Banfi, A., Stockmann, C., Soro-Arnáiz, I., Kopf, M., De Bock, K. (2020). Endothelial Lactate Controls Muscle Regeneration from Ischemia by Inducing M2-like Macrophage Polarization. *Cell Metabolism*, 31(6), 1136–1153.e7.
- Wei, X., Zhou, P., Lin, X., Lin, Y., Wu, S., Diao, P., Xie, H., Xie, K., Tang, P. (2014). MLN2238 synergizes BH3 mimetic ABT-263 in castration-resistant prostate cancer cells by induction of NOXA. *Tumour Biology*, 35(10), 10213–10221.
- Zhou, J., Cheng, H., Wang, Z., Chen, H., Suo, C., Zhang, H., Zhang, J., Yang, Y., Geng, L., Gu, M., Tan, R. (2019). Bortezomib attenuates renal interstitial fibrosis in kidney transplantation via regulating the EMT induced by TNF- α -Smurf1-Akt-mTOR-P70S6K pathway. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 23(8), 5390–5402.
- Zhou, Y., Zhang, T., Wang, X., Wei, X., Chen, Y., Guo, L., Zhang, J., Wang, C. (2015). Curcumin Modulates Macrophage Polarization Through the Inhibition of the Toll-Like Receptor 4 Expression and its Signaling Pathways. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 36(2), 631–641.