ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MAKROFAJLARIN MEKANOİMMÜNİTESİ İLE MEME KANSERİ ARASINDAKİ KARŞILIKLI ETKİLERİN MULTİ-OMİK TEKNİKLER KULLANILARAK KARŞILAŞTIRMALI İNCELENMESİ

Buse SARI

KİMYA ANABİLİM DALI

ANKARA
2022

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

MAKROFAJLARIN MEKANOİMMÜNİTESİ İLE MEME KANSERİ ARASINDAKİ KARŞILIKLI ETKİLERİN MULTİ-OMİK TEKNİKLER KULLANILARAK KARŞILAŞTIRMALI İNCELENMESİ

Buse SARI

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Burak DERKUŞ

Bu çalışmada, değişen mekanik özelliklere sahip hyaluronik asit hidrojellerinden oluşan hücre dışı matris modeli aracılığıyla makrofajların moleküler fenotipini yeniden şekillendirerek mekanoimmünitesinin ayarlanması ve meme kanseri immün mikro çevresindeki etkilerinin karşılıklı olarak incelenmesi amaçlanmıştır. Makrofajlar (RAW 264.7), çeşitli boyutlarda (2-boyutlu ve 3-boyutlu) ve matris sertliğinde hyaluronik asit-tiramin (HA-Tyr) hidrojelleri ile kültürlendi. Daha sonra, insan meme kanseri hücre dizisi olan MCF-7 ile meme kanseri tümör sferoidleri oluşturularak, bu sistemle eş-kültür sistemiyle etkileştirildi. Bu bağlamda, ilgili gen ekspresyon analizleri, transkriptom analizi ve metabolom analizi ile karşılaştırmalı olarak analiz edildi. Sonucunda, makrofaj mekanoimmünitesi ve mekanoimmünitenin meme kanseri ile ilişkisi ayrıntılı olarak incelendi. Makrofaj mekanotransdüksiyonu, YAP, β-aktin immünofloresan boyama, ayrıca mekanotransdüksiyon, immün yanıtlar ve mekanoimmünite ile ilgili genler kullanılarak gen ekspresyon analizi yoluyla incelendi. Karşılıklı olarak, MCF-7 tümör sferoidlerinde tümör baskılayıcı, metastaz ve epitelyal-mezenkimal geçişle ilişkili genler, makrofajların mekanik olarak indüklenen mekanoimmünitesinin tümör oluşumu üzerindeki etkisi gösterildi. Hem makrofajlarda hem de MCF-7 tümör sferoidlerinde metabolik yeniden programlama, metabolom profillemesi ile ayrıca değerlendirildi. Meme kanseri tümör mikro çevresinin matris sertliği ve boyutsallığı gibi biyomekanik özelliklerinin hem makrofajların mekanoimmünitesi hem de meme kanseri tümör sferoidlerinde değişikliklere katkıda bulunduğu ortaya çıkarıldı. Ayrıca sert HA-Tyr hidrojel substratları üzerine kültürlenen makrofajlarda gen ifadelerinin ve metabolik yeniden programlamanın, meme kanseri tümör sferoid modellerinde anti-tümör etkileri ile pro-inflamatuar polarizasyon gösterildi. Bu sonuçlar, meme kanserinde tümör nişi biyomekanik özelliklerinin, makrofajların mekanoimmünitesini ve de meme kanseri hücrelerinin tümörijenezini fiziksel olarak düzenleyebileceğini desteklemektedir.

Aralık 2022, 78 sayfa
Anahtar Kelimeler: Biyomalzeme, Hyalüronik Asit, Matriks Sertliği, Mekanotransdüksiyon, Mekanoimmünite, Mekanoimmünmodülasyon, Makrofaj, Meme Kanseri, Multi-Omik

ABSTR ACT

Master Thesis

A COMPARATIVE INVESTIGATION ON THE RECIPROCAL INFLUENCE BETWEEN MECHANOIMMUNITY OF MACROPHAGES AND BREAST CANCER BY UTILIZING MULTI-OMICS TECHNIQUES

Buse SARI

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Burak DERKUŞ

In this thesis, the purpose of the study was tuning the mechanoimmunity of macrophages and investigating their role in breast cancer microenvironment, reciprocally. By remodeling the molecular phenotype of macrophages through an extracellular matrix model with changing physical properties, mechanoimmunity of macrophages was tuned biomechanically. Macrophages (RAW 264.7) were cultured with different hyaluronic acid-tyramine (HA-Tyr) hydrogels in varied dimension (2-dimensional and 3-dimensional) and matrix stiffness. Afterwards, human breast cancer cell line (MCF-7)-derived tumor spheroids were co-cultured with this system. The results were analyzed comparatively with related gene expressions, transcriptomics, and metabolomics. Macrophage mechanoimmunity and its relation with breast cancer were analyzed in detail. Macrophage mechanotransduction was examined by immunofluorescent staining for YAP, β-actin, gene expression analysis for mechanotransduction and mechanoimmunity-related genes, as well as immune responses by qRT-PCR. Reciprocally, genes involved in tumor suppression, metastasis and epithelial-mesenchymal transition in MCF-7 tumor spheroids were analyzed to reveal the effect of mechanoimmunity of macrophages on the tumorigenesis. Metabolic reprogramming in both macrophages and MCF-7 tumor spheroids were further assessed with metabolomics. Considering the results, it can be concluded that the biomechanical properties of breast tumor microenvironment such as matrix stiffness and dimension contribute to changes in mechanoimmunity of macrophages and tumor spheroids, reciprocally. We further show that gene expressions and metabolic reprogramming in macrophages cultured on stiff HA-Tyr hydrogels demonstrate pro-inflammatory polarization with anti-tumoral effects in breast cancer tumor spheroid models. These results indicate that biomechanical cues of breast cancer tumor niche can co-regulate mechanoimmunity of macrophages and tumorigenesis of breast cancer cells.

December 2022, 78 pages
Key Words: Biomaterial, Hyaluronic Acid-Tyramine, Matrix Stiffness, Mechanotransduction, Mechanoimmunity, Mechanoimmunomodulation, Macrophage, Breast Cancer, Multi-Omic

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın yürütülmesi sırasında desteğini, bilgi ve tecrübelerini benden esirgemeyen, bilimsel duruşunu ve akademik vizyonunu her zaman kendime örnek alacağım değerli danışman hocam sayın Doç. Dr. Burak DERKUŞ'a (Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya ABD),

Yüksek lisans sürecimde manevi desteklerini hissettiğim saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. Emel EMREGÜL'e (Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya ABD) ve Doç. Dr. Sedat ODABAŞ'a (Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya ABD), manevi destekleriyle her zaman yanımda olan tüm arkadaşlarıma, özellikle de laboratuvar arkadaşlarım sevgili Melis IŞIK'a, Dilara KURT'a, Mustafa SÜNGÜ'ye, İpek ERTUĞRUL'a, Süveydanas KOCACIK'a, Öğr. Gör. Fulya ÖZDEMİR'e ve tüm laboratuvar ekibime, beni yüksek lisans eğitimim sırasında maddi olarak destekleyen 2210-A bursiyeri olduğum TÜBİTAK BİDEB'e,

Her koşulda ve her zorlukta bana karşı olan inanç, sevgi, anlayış ve fedakarlıklarıyla kararlarıma saygı duyan, hayatım boyunca hayallerimi gerçekleştirmemi maddi ve manevi olarak destekleyen, aramızda uzak mesafeler olsa da hep yanımda hissettiğim hayattaki en büyük destekçilerim olan ailem, babam Ali SARI'ya, annem Neslihan SARI'ya, kardeşim Sude SARI'ya ve kedim Marcel SARI'ya,

Tüm içtenliğimle teşekkürlerimi ve sevgilerimi sunarım.

Buse SARI
Ankara, Aralık 2022

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI
ETİK ……..i
ÖZET.....ii
ABSTR ACT.....iii
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR.....iv
SİMGELER DİZİNİ.....vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....xi
1. GİRİŞ.....1
2. KURAMSAL TEMELLER.....5
2.1 Mekanobiyoloji.....5
2.1.1 Mekanoimmunoloji.....5
2.1.2 Makrofaj mekanobiyolojisi.....6
2.1.3 Makrofaj metabolizması.....8
2.2 Tümör İmmün Mikro Çevresi (TİMÇ).....8
2.2.1 Makrofajların tümör immün mikro çevresindeki fonksiyonları.....11
2.3 Biyomalzeme-aracılı İmmünoregülasyon.....12
2.3.1 Biyomalzeme-aracılı makrofaj immün karakterinin regülasyonu.....13
2.4 Kanserde Biyomalzeme-Aracılı İmmünoregülasyon.....14
2.5 Meme Kanseri ve Meme Kanseri Metabolizması.....15
2.5.1 Meme kanseri metabolizmasının immün-regülasyonu.....16
2.5.2 Meme kanserinde biyomalzeme-aracılı immün-regülasyon.....17
3. KAYNAK ÖZETLERİ.....18
4. MATERYAL ve YÖNTEM.....22
4.1 Materyal.....22
4.2 Yöntem.....23
4.2.1 HA-Tyr hidrojelasyonu.....23
4.2.2 Taramalı elektron mikroskopisi (SEM).....23
4.2.3 Hücreli örnekler için SEM.....24
4.2.4 Mikromekanik analiz.....24
4.2.5 Hücre kültürü.....24
4.2.5.1 Makrofaj hücrelerinin hidrojellere 2B ve 3B olarak ekilmesi.....25

4.2.5.2 *In vitro* tümör sferoidleri oluşturulması 25
4.2.5.3 2B ve 3B makrofaj hidrojel kültürlerinde XTT hücre canlılığı testi 26
4.2.5.4 Hidrojeller üzerindeki makrofajlarda immünofloresan boyaması ile YAP ve β-aktin ekspresyonunun gözlemlenmesi 26
4.2.5.5 MCF-7 tümör sferoidleri ve RAW 264.7 makrofajları ile 2-boyutlu ve 3-boyutlu HA-Tyr hidrojellerinden oluşan eş-kültür sistemi 27
4.2.5.6 RT-qPCR ile gen ekspresyon analizleri 28
4.2.5.7 Transkriptom analizi 31
4.2.5.8 Metabolom analizi 31
4.2.6 Biyoistatistik ve biyoinformatik analizler 32
5. BULGULAR 34
5.1 HA-Tyr Hidrojelinin Karakterizasyonu 34
5.1.1 SEM analizleri 34
5.1.2 Mikromekanik (Sıkıştırma Testi) analiz 35
5.2 *In vitro* Hücre Kültürü 36
5.2.1 HA-Tyr hidrojellerinin hücresel canlılığa etkisi 36
5.2.2 HA-Tyr hidrojellerinde 2B ve 3B kültürü edilen makrofajlara ait faz-kontrast mikroskopi görüntüleri 37
5.2.3 HA-Tyr hidrojellerinde 2B kültürü edilen makrofajlara ait YAP ve β-aktin immünofloresan görüntüleri 38
5.2.4 Eş-kültür (Transwell) Sistemi 39
5.2.5 RT-qPCR bulguları: makrofajların HA-Tyr hidrojellerinde mekanotransdüksiyon, anti-tümöral, pro-tümöral ve mekanoimmünite ile ilişkili gen ifadelenmeleri 40
5.2.6 Transkriptomiks 46
5.2.7 Metabolomiks 46
5.2.7.1 Çeşitli matris koşullarına yanıt olarak makrofaj metabolomunun plastisitesi 48
5.2.7.2 Tümör sferoidi etkisi altında çeşitli matris koşullarına yanıt olarak makrofaj metabolom analizi 51
5.2.7.3 Mekanik olarak indüklenen makrofajların meme kanseri metabolomuna etkisi 55
6. TARTIŞMA VE SONUÇLAR 60
KAYNAKLAR 71
ÖZGEÇMİŞ 78

SİMGELER DİZİNİ

H_2O_2 Hidrojen Peroksit

Pt Platin

Kısaltmalar

2B	İki Boyut
3B	Üç Boyut
7-AAD	7-aminoaktinomisin-D
Arg1	Arginase 1
BSA	Sığır Serum Albumin
cDNA	Tamamlayıcı DNA
CSF-1R	Koloni Uyarıcı Faktör 1 Reseptörü
DAPI	4',6-Diamidino-2-Fenilindol, Dihidroklorür
DC	Dendritik Hücreler
DMEM-hg	Dulbecco's Modified Eagle's Medium-high glucose
DPBS	Dulbecco'nun Fosfat Tamponlu Salini
DTT	Ditiyotreitol
ECM	Hücre dışı Matris
EDTA	Etilen Diammin Tetraasetik Asit
EMT	Epitelyal-Mezenkimal Geçiş
FAS	Yağ Asidi Sentaz
FBS	Fetal Sığır Serumu
GC-MS	Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi
GelMA	Metakrilat-jelatin
GLS	Glutaminaz
GM-CSF	Granülosit-Makrofaj Koloni Uyarıcı Faktör
HA	Hyaluronik asit
HA-Tyr	Hyaluronik asit-Tiramin
HRP	Yaban Turpu Peroksidaz Enzimi
IFN-γ	Interferon gamma
IL-10	Interleukin-10
IL-12β	Interleukin-12β
IL-13	Interleukin-13
IL-1β	Interleukin-1β
IL-21	Interleukin-21
IL-4	Interleukin-4
IL-8	Interleukin-8
LC-qTOF	Sıvı Kromatografisi-Kuadrapor Uçuş Zamanlı
LPX	Lipopleks
M1	Makrofaj tip 1
M2	Makrofaj tip 2
MA-HA	Hyaluronik asit-Metakriloil
MCF-7	İnsan Epitelyal Meme Kanseri Hücre Hattı
MDSC	Miyeloid kaynaklı baskılayıcı hücreler

miRNA	Mikro RNA
MMP	Matrix metalloproteinase
MMP-2	Matrix metalloproteinase-2
MMP-9	Matrix metalloproteinase-9
mRNA	Mesajcı RNA
MSTFA	N-metil-N-trimetilsilil trifloroasetamid
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
NF-κB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NK Hücreleri	Doğal Öldürücü Hücreler (Natural Killer)
P/S	Penisilin/Streptomisin
p38	p38 Mitogen-activated protein Kinase
PC	Fosfatidilkolin
PDH	Piruvat Dehidrogenaz
PE	Fosfatidiletanolamin
PEG	Polietilenglikol
PEGDA	Polietilenglikol diakrilat
PFA	Paraformaldehit
Piezo1	Piezo Type Mechanosensitive Ion Channel Component 1
PKM2	Piruvat Kinaz M2
PLS-DA	Kısmi En Küçük Kareler-Ayrımcılık Analizi
PS	Fosfatidilserin
RAW 264.7	Fare Makrofaj Hücre Hattı
Rho GTPaz	Ras homologous Guanosine Triphosphatase
RhoA	Ras homolog family member A
RT-qPCR	Ters transkriptaz-kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu
SA	Solidum Aljinat
SDHC	Süksinat Dehidrojenaz Kompleksi
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
STAT6	Signal transducer and activator of transcription 6
TAZ	Transcriptional coactivator with PDZ-binding motif
TCA	Trikarboksilik Asit Döngüsü
TGF-β	Transforming Growth Factor-Beta
TİMÇ	Tümör İmmün Mikro Çevresi
TMÇ	Tümör Mikro Çevresi
TNF-α	Tumor Necrosis Factor alpha
tRNA	Taşıyıcı RNA
TRPV4	Transient receptor potential cation channel subfamily V member 4
Try	Tiramin
TS	Tümör Sferoidi
VEGF	Vascular endothelial growth factor
XTT	[2,3-bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sülfofenil)-2H-tetrazolyum-5 -karboksanilid]
YAP	Yes-Associated Protein

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Makrofaj mekanobiyolojisi 7

Şekil 2.2 Tümör immün mikro çevresi (TİMÇ) 11

Şekil 2.3 Biyomalzeme-aracılı makrofaj immün karakterinin regülasyonu 14

Şekil 5.1 (A) %1 ve %6 HA-Tyr, (B) üzerine makrofaj hücreleri (mor) ekilmiş %1 ve %6 HA-Tyr hidrojellerinin SEM görüntüleri 35

Şekil 5.2 %1 ve %6 HA-Tyr hidrojelleri için gerçekleştirilen sıkıştırma testi sonucunda elde edilen Young Modülü (kPA) değerleri 36

Şekil 5.3 HA-Tyr hidrojelleri üzerindeki (2B) ve içerisindeki (3B) makrofajların 96-saat ve 144-saat zaman noktalarında XTT testi ile belirlenen hücresel canlılık oranları 37

Şekil 5.4 Makrofajların 2B ve 3B, %1 ve %6 HA-Tyr koşullarında, deneyin 1., 3. ve 5. günlerinde faz-kontrast mikroskopisi görüntüleri 38

Şekil 5.5 %1 ve %6 HA-Tyr üzerinde bulunan makrofajlardaki YAP dağılımını (yeşil), □-aktin (yeşil) ile hücrelerin morfolojisini ve DAPI (mavi) nükleer zıt boyamasını gösteren immünofloresan görüntüleri 39

Şekil 5.6 Eş-kültür sisteminin üst bölmesindeki MCF-7 tümör sferoidleri, ve 2B %1 HA-Tyr, 2B %6 HA-Tyr ve 3B %1 HA-Tyr, 3B %6 HA-Tyr koşullarında kültür edilen makrofajlar 40

Şekil 5.7 %1 HA-Tyr – %6 HA-Tyr hidrojelleri üzerinde (2B) kültür edilen makrofaj hücrelerinin (A) tümör sferoidleri ile eş kültürü öncesi ve (B) sonrası pro-tümöral, anti-tümöral, mekanotransdüksiyon ve mekanoimmünite ilişkili gen ekspresyonlarına ait RT-qPCR grafikleri 42

Şekil 5.8 %1 HA-Tyr – %6 HA-Tyr hidrojelleri içine (3B) kültür edilen makrofaj hücrelerinin (A) tümör sferoidleri ile eş kültürü öncesi ve (B) sonrası pro-tümöral, anti-tümöral, mekanotransdüksiyon ve mekanoimmünite ilişkili gen ekspresyonlarına ait RT-qPCR grafikleri 43

Şekil 5.9 Etkileşimsiz kontrol MCF-7 tümör sferoidlerine kıyasla 2B %1, 2B %6, 3B %1 ve 3B %6 HA-Tyr ortamlarındaki makrofajlarla eş kültürlenen MCF-7 tümör sferoidlerinde epitelyal-mezenkimal geçiş belirteçleri olarak N-kaderin ve E-kaderin, meme kanseri metastazı belirteci MMP2 ve tümör süpresör belirteci p53'ün analizlerine ait RT-qPCR grafikleri 45

Şekil 5.10 Makrofajların (A) 3B %6 HA-Tyr – 2B %6 HA-Tyr ve (B) 3B %6 HA-Tyr – 3B %1 HA-Tyr gruplarında karşılaştırmalı transkriptomlarının GO zenginleştirme analizi 46

Şekil 5.11 2B %1 HA-Tyr (kırmızı), 2B %6 HA-Tyr (yeşil), 3B %1 HA-Tyr (Mavi), 3B %6 HA-Tyr (Turkuaz) koşullarındaki makrofajların ve tümör sferoidleriyle eş kültüründen sonra makrofajların 2B %1 HA-Tyr (Pembe), 2B %6 HA-Tyr (Sarı), 3B %1 HA-Tyr (Mor), 3B %6 HA-Tyr (Turuncu) PLS-DA grafiği 47

Şekil 5.12 2B %1 HA-Tyr, 2B %6 HA-Tyr, 3B %1 HA-Tyr, 3B %6 HA-Tyr koşullarındaki makrofajların ve tümör sferoid uygulamasından sonra 2B %1 HA-Tyr, 2B %6 HA-Tyr, 3B %1 HA-Tyr, 3B %6 HA-Tyr koşullarındaki makrofajlarda en çok fark yaratan ilk 100 metabolitin hiyerarşik küme analizi (sıcaklık haritası) 48

Şekil 5.13 Makrofajlarda çeşitli matris koşullarına göre önemli ölçüde yukarı ve aşağı regüle edilen metabolitleri içeren yanardağ grafikleri; (A) 2B %1 – %6 HA-Tyr, (B) 3B %1 – %6 HA-Tyr, (C) %1 HA-Tyr 2B – 3B, ve (D) %6 HA-Tyr 2B – 3B 50

Şekil 5.14 Makrofajlarda farklı matris koşullarında meme kanseri tümör sferoidi uygulamasından önce ve sonra önemli ölçüde yukarı ve aşağı regüle edilen metabolitleri içeren yanardağ grafikleri; (A) 2B %1 HA-Tyr – TS Sonrası (B) 2B %6 HA-Tyr – TS Sonrası, (C) 3B %1 HA-Tyr – TS Sonrası ve (D) 3B %6 HA-Tyr – TS Sonrası 51

Şekil 5.15 Makrofajlarda meme kanseri tümör sferoidleriyle eş-kültüründen sonra farklı matris koşullarında önemli ölçüde yukarı ve aşağı regüle edilen metabolitleri içeren yanardağ grafikleri; (A) TS Sonrası 2B %1 HA-Tyr – 3B %1 HA-Tyr (B) TS Sonrası 2B %6 HA-Tyr – 3B %6 HA-Tyr, (C) TS sonrası 2B %1 HA-Tyr – 2B %6 HA-Tyr, ve (D) 3B %1 HA-Tyr – %6 HA-Tyr 54

Şekil 5.16 Farklı matris koşullarında bulunan makrofajlar ile eş kültürlenen MCF-7 tümör sferoidlerinin metabolik analizi (A) Kontrol MCF-7 TS (Kırmızı), MCF-7 TS (2B, %1 HA-Tyr, yeşil), MCF-7 TS (2B, %6 HA-Tyr, mavi), MCF-7 TS (3B, %6 HA-Tyr, turkuaz), MCF-7 TS (3B, %6 HA-Tyr, pembe) arasındaki metabolomik ayrımı temsil eden PLS-DA skor grafiği (B) Kontrol MCF-7 TS (Kırmızı) ‘e göre MCF-7 TS (2B, %1 HA-Tyr, yeşil), MCF-7 TS (2B, %6 HA-Tyr, mavi), MCF-7 TS (3B, %6 HA-Tyr, turkuaz), MCF-7 TS (3B, %6 HA-Tyr, pembe) farklılaşan ilk 100 metabolitin hiyerarşik küme analizi (sıcaklık haritası) (C) 1 MCF-7 TS (2B, %1 HA-Tyr), 2 MCF-7 TS (2B, %6 HA-Tyr), 3 MCF-7 TS (3B, %1 HA-Tyr), 4 MCF-7 TS (3B, %6 HA-Tyr) ve 5 Kontrol MCF-7 TS grupları arasındaki en önemli derecede farklılaşan ilk 15 metaboliti gösteren VIP skor grafiği (D) Etkilenen metabolik yolakları temsil eden yolak etki analizi grafiği 57

Şekil 5.17 Kontrol MCF-7 tümör sferoidlerine kıyasla makrofajların (A) 2B %1 HA-Tyr, (B) 2B %6 HA-Tyr kültürüyle, (C) 3B %1 HA-Tyr ve (D) 3B %6 HA-Tyr koşullarında eş kültürlenen MCF-7 tümör sferoidindeki yukarı ve aşağı regüle edilen metabolitlerin yanardağ grafikleri 58

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1 qRT-PCR için kullanılan genlerin primer dizileri 30
Çizelge 5.1 Yolak etki analizi bulguları..... 54

1. GİRİŞ

Dünya genelinde, 2020 yılında meme kanseri teşhisi konan 2,3 milyon kadın ve 685.000 meme kanseri kaynaklı ölüm kaydedilmiştir. 2020'nin sonu itibariyle ise meme kanseri teşhisi konan 7,8 milyon kadın hayatta kaldı ve bu da onu dünyanın en yaygın kanseri haline getirdi. Meme kanseri kadınlarda ergenlikten sonra herhangi bir yaşta görülmekle birlikte ileri yaşlarda artan oranlarda görülmektedir (Arnold vd., 2022). Meme kanserinin malign dönüşümü aşamasında, metabolik yeniden programlama ve bağışıklıktan kaçınma, kanserin iki ana özelliğini temsil eder ve kanser hücresi çoğalmasını kolaylaştırır. Son yıllarda, kanser hücrelerinin anormal metabolizması ve immünitesi üzerine çalışmalar kanser tedavisi için odak noktası haline gelmiştir (Faubert, Solmonson, ve DeBerardinis, 2020).

İmmün sistem, immünolojik aktiviteyi ve metabolizmayı etkileyen çevresel sinyaller ile beraber düzenlenmektedir. Doku mikro çevresindeki matris sertliği, hastalıklarda ve immünolojik koşullarda değişmektedir. Ancak, matris sertliğinin immün sistem üzerindeki etkisi yeterince araştırılıp, anlaşılmamıştır. Biyomekanik etkilerin immünite üzerindeki giderek artan önemi göz önüne alındığında, kanser de dahil olmak üzere farklı patolojik durum ve de hastalıkta matris biyomekanik özelliklerinin immün hücreleri üzerindeki etkisini kavramak önem arz etmektedir (Du vd., 2022). Makrofajlar, doğuştan gelen bağışıklığın temel hücreleri olup, birden fazla işlevi olan bütün dokularda kritik rollere sahiptir. Tümör immün mikro çevresinde (TİMÇ), tümör baskılayıcıdan tümör teşvik ediciye kadar geniş bir davranış yelpazesi göstermektedirler ve makrofajların fonksiyonu, uzamsal ve geçici olarak, hipoksi, sitokinler ve metabolitler dahil olmak üzere tümör mikro çevresinden gelen biyomekanik etkilere bağlıdır. Makrofajlarda pro-inflamatuar M1 ve anti-inflamatuar M2 olarak iki tip hücresel polarizasyon görülür. Pro-inflamatuar (M1) hücreleri aynı zamanda kanser hücrelerinin apoptozunu destekleyen anti-tümöral etkilere sahiptir. M1 makrofajları ayrıca metastaz ve tümör büyümesinin baskılayıcıları olarak da görev alırlar (Meli vd., 2019). Anti-tümörijenik makrofajlar, NF-κB (Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells), p38 (p38 MAP Kinase), IL-8 (Interleukin-8), IL1β (Interleukin-1β), IL21 (Interleukin 21), IL12β (Interlukin 12β), TNF−α (tumor necrosis factor

alpha), IFN–γ (Interferon gamma), miRNA29,125,155'in ekspresyonundaki artış ile karakterize edilebilir. Protümörojenik ve anti-inflamatuar makrofaj tip 2 (M2) hücreleri baskın olarak matrisin yeniden şekillenmesinden, doku onarımından ve anjiyogenezin indüklenmesinden sorumlu olan inflamatuar süreçlerde bulunmaktadırlar. Tümör ilerlemesini artırarak tümör destekleyici aktivite sergilerler ve genellikle tümörde en çok bulunan hücre tipleridir. M2 hücreleri, tümör immün kaçışında önemli roller oynar. Bu hücreler ayrıca anjiyogenezi destekler. Anjiyojenik programın uyarılması için sinyal, kanser hücrelerinden makrofajlar sağlanır. Pro-tümörojenik M2 makrofajları, IL4 (Interleukin-4), IL10 (Interleukin-10), IL13 (Interleukin-13), STAT3 (Signal transducer and activator of transcription 3), STAT6 (Signal transducer and activator of transcription 6), VEGF (Vascular endothelial growth factor), miRNA146a, Arg1 (Arginase 1), TGF-β (Tumor Growth Factor Beta) ve MMP'lerin ekspresyonunda artış ile karakterize edilebilir (Boutilier ve Elsawa, 2021).

Tümör mikro çevresinin (TMÇ) homeostazı, malign, endotelyal, stromal ve immün hücreler dahil olmak üzere tüm hücresel ve hücresel olmayan kısımları ve bunların arasındaki etkileşim tarafından yönetilir. Bu karmaşık etkileşimler ayrıca, hem kanser hücrelerine bir enerji kaynağı sağlamak hem de iletişim sinyalleri olarak hücre dışı metabolitleri içermektedir, örneğin, tümörojenik hücreler, immün hücrelerini tümörden kaçırmak için metabolik ürünleri kullanır. TMÇ' de besinler ve oksijen sınırlı miktarlarda bulunur, bu sebeple, tüm hücreler onlar için birbirleriyle rekabet halindedir ve bu sınırlamalar metabolizmayı da modüle eder. Glikolitik metabolizma, laktat salgılanması, NADPH, lipid ve nükleotid biyosentezi, anti-tümörojenik makrofajlarla ilişkilidir. Öte yandan, oksidatif metabolizma, enerji üretimi ve doku onarımı için pro-tümörojenik makrofajlar tarafından kontrol edilir (Vitale, Manic, Coussens, Kroemer, ve Galluzzi, 2019). Tümör mikro çevresinin immün düzenlemesinde makrofajların metabolik heterojenliği ve plastisitesinin daha fazla araştırılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

Hücre dışı matris (ECM) kaynaklı biyofiziksel uyaranların makrofaj davranışlarını etkileyebileceğine dair araştırmalar artarak devam etmektedir. Hücre dışı matrisin

karmaşık ve heterojen yapısına ek olarak değişken ve geçici makrofaj aktivasyonu, doğal tümör mikro çevresinde makrofajların araştırılmasını zorlaştırmaktadır. Bu sebeple, tümör mikro çevresindeki makrofajları incelemek, kanserde mekanoimmün modülasyon açısından önem arz etmektedir. ECM bileşenlerinin anormal birikme durumu ve boyutsal organizasyonundaki değişikliklerin, hücresel ve hücresel olmayan kısımlar arasındaki sinyalizasyon yoluyla meme kanserinde tümör büyümesini ve metastatik ilerlemeyi uyardığı iyi bilinmektedir. Matris sertliği, TMÇ' de tümör ilerlemesinde artış ve makrofaj davranışının mekano kontrolü ile ilgilidir (Hoffmann ve Ponik, 2020). Tümör hücre dışı matrisindeki mekanik etkilerin makrofajların aktivasyonu ve metabolizmasını nasıl düzenlediği hakkında bilgiler oldukça azdır.

Önceki çalışmalarda, malzeme biliminin, makrofajların immün tepkisini modüle etmek için malzemelerin kontrol edilebilirliği ile makrofaj akıbetini düzenlemek için kullanılabileceği gösterilmiştir (Li, Jiang, Li, Gelinsky, ve Gu, 2021). İmmün sistem çevreden gelen uyaranlara yanıt vererek düzenlenmektedir, ECM sertliğinin immün hücrelerin metabolizmasını, fenotipi ve mekanotransdüksiyon yolak ilişkili ekspresyonlar aracılığıyla inflamatuar işlevi modüle ettiği ve doğuştan gelen immün yanıtlarının yönlendirilebilir olduğu gösterilmiştir (Zhang vd., 2020). Makrofajların mekano-yanıtı ise yine matris sertliği ve boyutu gibi matris özellikleri ile yönlendirilmektedir. Bilinen mekanotransdüksiyon yolaklarından YAP (Yes-associated Protein) ve TAZ (Transcriptional coactivator with PDZ-binding motif) makrofajların mekano-regülasyonunda da görevli olmakla beraber, mekanoimmünitesinde Piezo1 (Piezo Type Mechanosensitive Ion Channel Component 1) ve TRPV4 (Transient receptor potential cation channel subfamily V members 4) gibi mekano-sensör kanallarının etkin bir şekilde rol oynadığı ortaya konmuştur (Lee, Du, Winer, Clemente-Casares, ve Tsai, 2022).

Kanserin terapötik uygulamalarında kullanılmak üzere, mekano-regülasyon yoluyla makrofaj davranışını ve metabolizmasını modüle etme imkânları mevcuttur (Mehla ve Singh, 2019). Kanser üzerine daha etkili tedavi uygulamaları yapılabilmesi adına, tümör mikro çevresi içindeki mekanik dinamiklerin ve metabolik değişikliklerin daha detaylı karakterizasyonuna ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu çalışmada, değişken mikro çevre koşullarına yanıt olarak RAW 264.7 makrofajlarının ve MCF-7 meme kanseri sferoidlerinin metabolom plastisitesini karşılıklı olarak değerlendirmek amaçlanmıştır. Bu amaçla, enzim aracılı oksidatif kenetlenme reaksiyonu ile 2-boyutlu (2B) ve 3-boyutlu (3B), dayanıklı ve biyouyumlu hücre kültürü yapılarının geliştirilmesine olanak sağlamak için tiramin ile fonksiyonel hale getirilmiş hyaluronik asit (HA) hidrojeli HA-Tyr kullanılmıştır (Loebel, D'Este, Alini, Zenobi-Wong ve Eglin, 2015). Ayrıca HA, çoğunlukla meme kanseri tümörojenik dokusunda bulunmaktadır, bu da onu dinamik meme kanseri mikro çevresine yanıt olarak makrofaj davranışlarını ve akıbetini araştırmak için uygun bir platform haline getirir (Schwertfeger, Cowman, Telmer, Turley ve McCarthy, 2015). Yapılan bu tez çalışmasının hipotezi, meme kanseri ECM-mimetik HA-bazlı hidrojellerde hücre dışı matris sertliği ve boyutu mekanik parametrelerine bağlı olarak makrofajların ve meme kanseri mikro dokularının metabolom profillerinin karşılıklı olarak modülasyonu ve moleküler fenotip düzenlemesini araştırmaya dayanmaktadır. Bu yaklaşımı test etmek için, transwell sistemi aracılığıyla hem 2B ve 3B hem de farklı matris sertliklerine sahip HA-Tyr hidrojelleriyle kültürlenen makrofaj hücrelerinin transkript ve metabolit profillerindeki, ayrıca MCF-7 tümör sferoidlerinin gen ekspresyon ve metabolit profillerindeki değişiklikleri karşılıklı ve kıyaslamalı olarak geniş bir yelpazede değerlendirilmiştir.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1 Mekanobiyoloji

Mekanobiyoloji, hücre ve dokularda mekanik ve biyofiziksel kuvvetlerin hücre davranışını, hücre ve doku morfogenezini ve bu süreçlerle kuvvetlerin ilgili hastalıkları nasıl etkilediğine odaklanan bir alandır. Hücreler, çevrelerindeki çeşitli mekanik sinyalleri aktif olarak algılar ve bunlara yanıt verir. Hücreleri çevreleyen hücre dışı matris, karmaşık bir protein ağıdır ve hücrelerin yapışabildiği iskeleti oluşturmaktadır. ECM'in mekanik sertliği, normal hücre fonksiyonunu sağlamada, kök hücre farklılaşmasında ve doku homeostazında kritik şekilde önemlidir. Matris sertliğindeki anormal değişiklikler, kanser gibi çeşitli hastalıkların başlamasına ve ilerlemesine katkıda bulunduğu bilinmektedir. Hücrelerin kuvvetlere ve substrat sertliğine duyarlılığı, doku mühendisliği çalışmalarında önem arz etmektedir. Hücre işlevi ve insan sağlığındaki merkezi önemi göz önüne alındığında, mekanobiyoloji, hücre ve gelişim biyolojisinden biyomühendislik, malzeme bilimi ve biyofiziğe kadar uzanan farklı disiplinlerden araştırmacıların ilgilendiği yeni ve ilgi çeken bir alandır. Mekanosensasyon, bir hücrenin ortamdaki mekanik sinyalleri algılama sürecidir. Mekanotransdüksiyon, ortamdan algılanan biyomekanik sinyallerin, hücre içerisinde biyokimyasal yanıtlara dönüşmesi olayıdır (Jansen vd., 2015).

2.1.1 Mekanoimmunoloji

Mekanik kuvvetler, mekanotransdüksiyon süreci yoluyla biyokimyasal sinyallere dönüştürülmektedir ve immün hücrelerinde birden fazla mekanotransdüksiyon yolağı tespit edilmiştir. Bu tür yolaklar, hücre aktivasyonu, sitokin üretimi, metabolizma, çoğalma ve kaçma dahil olmak üzere önemli hücresel işlevleri etkilemektedir. Makrofajlar gibi birçok doğuştan gelen immün hücresi adezyona ve temasa bağımlıdır, bu da onları ECM sertliğindeki değişiklikler gibi mekanik uyaranlara karşı son derece duyarlı hale getirmektedir (Du vd., 2022). İmmün hücreleri, mekanik uyaranları algılayabilecekleri ve bunlara yanıt oluşturacakları diğer hücrelerle ortak evrimsel olarak korunmuş yolakları barındırırlar. Başlıca mekanosensörler arasında integrinler

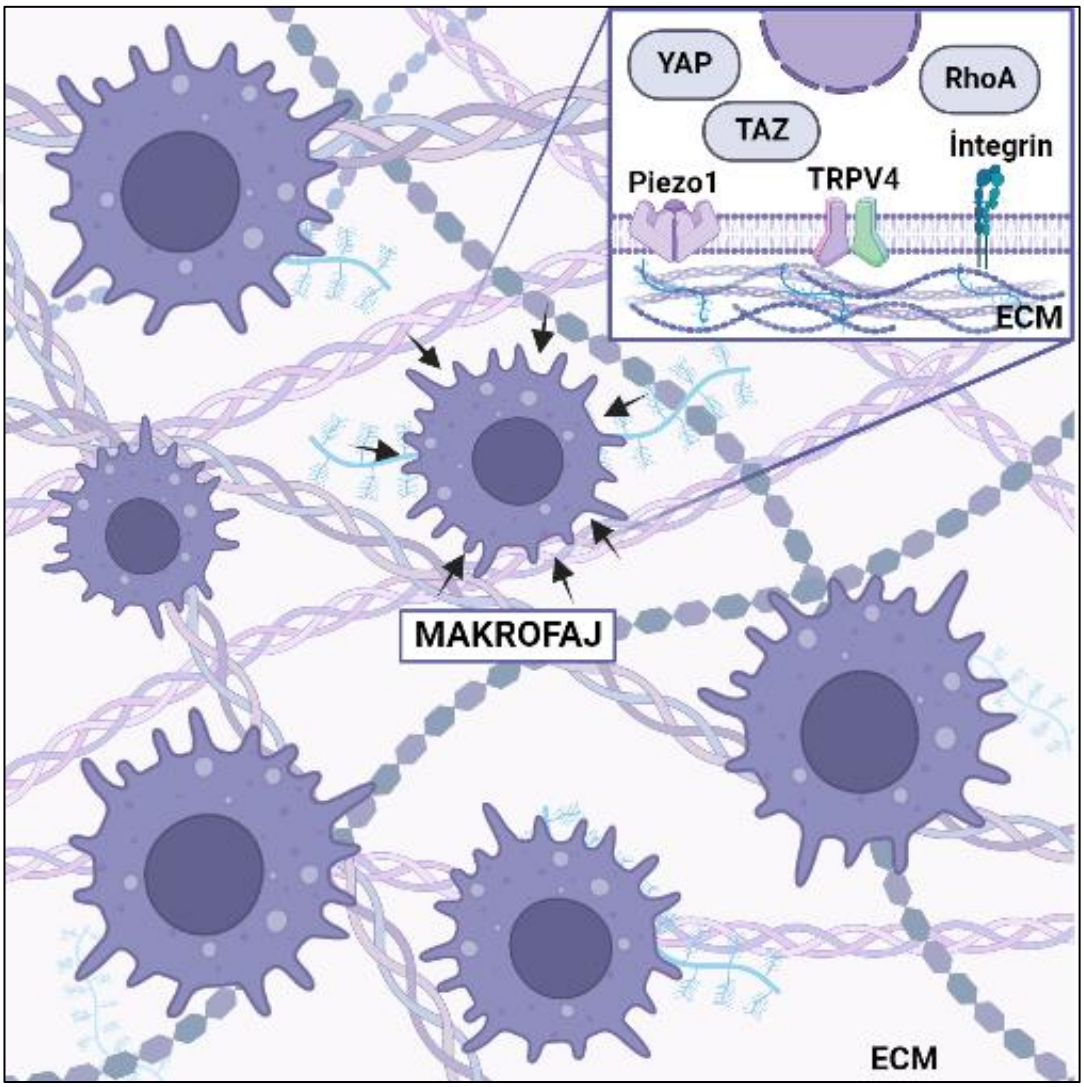
gibi hücresel yapışma molekülleri, iyon kanalları TRPV4 ve mekanik olarak aktive edilmiş katyon iyon kanallarından PIEZO ailesi ve diğer hücre iskeleti bileşenleri bulunmaktadır. Aynı zamanda, hücrelerin aktin dinamikleri büyük ölçüde bir Rho GTPaz ailesi tarafından düzenlenmektedir. Mekanotransdüksiyon aynı zamanda, YAP veya onun homologu, TAZ önemli ikincil aracıları ile yönlendirilebilir (Lee, Du, Winer, Clemente-Casares, ve Tsai, 2022).

2.1.2 Makrofaj mekanobiyolojisi

Makrofajlar, immün yanıtın her aşamasında olduğu kadar doku homeostazının düzenlenmesinde ve doku onarım süreçlerinin düzenlenmesinde de yer alır. Makrofajların fonksiyonel plastisitesi bu nedenle doku homeostazında, onarımında ve yenilenmesinde ve bozulmasında fibrotik hastalıklar, diyabet, nörodejeneratif ve kardiyovasküler hastalıklar ve de kanser dahil olmak üzere birçok inflamatuar hastalığın ilerlemesinde önemli bir rol oynamaktadırlar (Wculek, Dunphy, Heras-Murillo, Mastrangelo, ve Sancho, 2021). Tümör immün mikro çevresinde makrofajlar, bu süreçleri tek başına değil, diğer hücre türleri ve hücre dışı matris (ECM) ile yakın iş birliği içinde düzenlemektedir aynı zamanda birçok fiziksel parametre makrofaj davranışını ve fenotipini düzenler. Makrofaj polarizasyonu, mikro çevresel ve biyokimyasal uyaranlara bağlı aktivasyonu, transkripsiyonel programları tetikleyen fiziksel sinyallere yanıt olarak meydana gelmektedir ve sonuçta fenotipe özgü yüzey belirteçlerinin ekspresyonunu düzenleyerek yanıt oluşturmaktadır. Fibroblastların, kök hücrelerin ve diğer hücre tiplerinin mekanobiyolojisi hakkında son zamanlarda çok şey öğrenilmiş olmasına karşın, makrofajların mekanobiyolojisi henüz çok az bilinmektedir (Wang, Li, Cang, ve Guo, 2019).

Makrofajlarda diğer immün hücrelerde olduğu gibi mekanotransdüksiyon, iyon kanalları Trpv4 ve Piezo ailesi ve integrin aracılı hücre-ECM etkileşimleri, ardından hücre içi Rho GTPazlar ve de mekanotransdüksiyon yolağı olan YAP ve TAZ, yolakları ile düzenlenmektedir (Lee, Du, Winer, Clemente-Casares, ve Tsai, 2022) (Şekil 2.1). Doku mekanik özelliklerinin immün tepkilerini düzenlemedeki fizyolojik veya patofizyolojik rolleri yakın zamana kadar çok az çalışılmış olup, değişen doku mekanik

özelliklerine karşı bu ortamlardaki bağışıklığın nasıl şekillendiği mekanoimmunolojinin konusudur. Makrofajlar, doğuştan immün sistem hücreleri olarak gerek sağlıklı doku gerekse hastalıklı dokuda bulunmakta ve değişen matris koşullarına göre mekanoimmünitesi şekillenir. Makrofaj polarizasyonu ve immün yanıtları, değişken matris özelliklerine cevaben mekanoimmünolojik olarak değişkenlik gösterir (Du vd., 2022).



Şekil 2.1 Makrofaj mekanobiyolojisi

2.1.3 Makrofaj metabolizması

İmmünmetabolizma kavramı, belirli bağlamlarda immün aktivitesi için enerji sağlamanın yanı sıra, bu metabolik adaptasyonların, transkripsiyonel ve transkripsiyon sonrası reaksiyonları kontrol ederek immün hücre fonksiyonlarını da etkilediğini tanımlayan bir kavramdır (Pålsson-McDermott ve O'Neill, 2020). Makrofajlarda, pro-inflamatuar makrofajların (M1) metabolizması başlıca glikolize dayanmakta olup ayrıca trikarboksilik asit (TCA) döngüsünde ve mitokondriyal oksidatif fosforilasyonda değişimler sergilerken, anti-inflamatuar makrofajların metabolizması (M2) mitokondriyal oksidatif fosforilasyonla daha fazla ilişkili olduğu bilinmektedir. Bununla birlikte, yapılan çalışmalar makrofaj metabolizmasının düşünüldüğünden daha karmaşık olduğunu göstermektedir. Makrofajlarda şimdiye kadar incelenmiş olan ve sıkça rastlanılan metabolik yolaklar; arjinin metabolizması, glutamin metabolizması, glikoliz, pentoz-fosfat yolağı, mitokondriyal oksidatif fosforilasyon, trikarboksilik asit döngüsü, yağ asidi sentezi ve yağ asidi oksidasyonu ilişkili yolaklardır (Viola, Munari, Sánchez-Rodríguez, Scolaro, ve Castegna, 2019). Makrofajların M1 ve M2 polarizasyonuna göre farklılaşan immünometabolizma görülmektedir. Arjinin metabolizması, glutamin metabolizması, glikoliz, pentoz-fosfat yolağı, mitokondriyal oksidatif fosforilasyon, trikarboksilik asit döngüsü, yağ asidi sentezi ve yağ asidi oksidasyonu metabolizmaları makrofajların değişken immün fenotipine göre düzenlenmektedir. Tümör mikro çevresindeki makrofajların metabolik özelliklerini anlamak kanserin tedavisinde kullanılmak üzere yeni yaklaşımlar sunabileceğinden oldukça önem arz etmektedir (Liu vd., 2021).

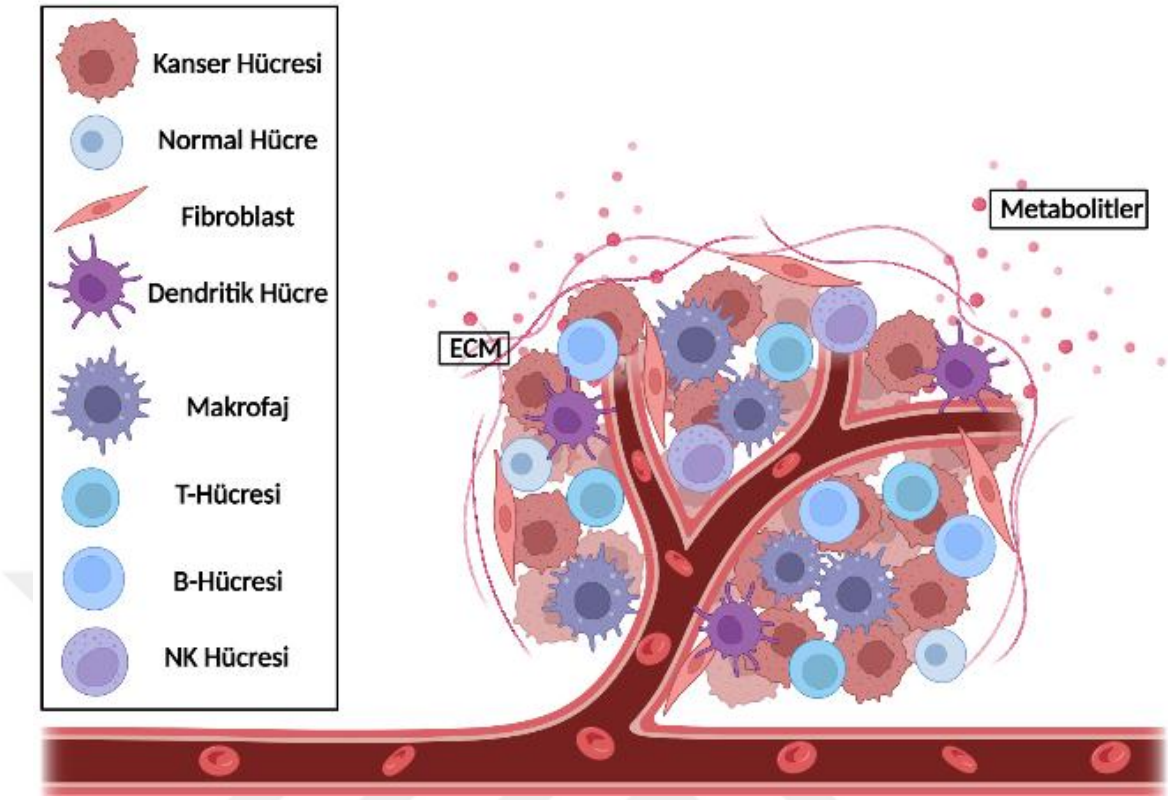
2.2 Tümör İmmün Mikro Çevresi (TİMÇ)

Solid tümörler, yalnızca tümör hücrelerinden değil, aynı zamanda damar sistemi, hücre dışı matris (ECM), metabolitler, stromal ve immün hücrelerinden oluşan karmaşık organ benzeri yapılardır ve tümör immün mikro çevresi (TİMÇ), damar sistemi, hücre dışı matris (ECM), stromal ve immün hücreleri olan T hücreleri, B hücreleri, monosit-makrofajlar, doğal öldürücü (NK) hücreler, dendritik hücrelerden (DC'ler) ve bunların alt kümelerinden meydana gelmektedir (Binnewies vd., 2018) (Şekil 2.2). TİMÇ'nin

baskın hücresel bileşenleri olan tümör hücreleri, TİMÇ'nde önemli bir rol oynar ve tümör antijenlerini salgılayarak veya immün hücrelerinin metabolizmasına elverişli olmayan bir mikro-çevre oluşturarak immün hücrelerinin işlevini doğrudan engelleyebilir ve böylece immün hücre fonksiyonunun inaktivasyonu ve inhibisyonuna sebebiyet verebilir (Chew, Toh, ve Abastado, 2012). TİMÇ'deki ana immün hücreleri olan T hücreleri, tümör hücreleri üzerindeki antijenleri tanır ve bir antitümör bağışıklık tepkisi indüklemektedirler. TİMÇ içindeki T hücrelerinin oranı ve alt kümeleri, tümör ilerlemesini etkileyen başlıca faktörler içerisindedir. Tümörlerde ve tümörü boşaltan lenf düğümlerinde bol miktarda B hücreleri bulunur ve bunlar TİMÇ'nin yaygın immün hücreleridir. Doğuştan gelen lenfosit ailesinin baskın üyeleri olan NK hücreleri, tümörlere karşı güçlü sitolitik aktivite sergileyen bir doğal immün hücreleri sınıfıdır. DC'ler, saf T hücrelerini harekete geçirmekte görevlidir ve efektör hücrelere farklılaşırlar, böylece yabancı antijenleri tanıyarak antitümör immünomodülatör etkiler uygulayabilirler. Tümörü infiltre eden immün hücrelerinin en bol popülasyonu olan tümörle ilişkili makrofajlar, tümörün içinde veya yakınında bulunan makrofajları ifade etmektedir. Makrofajlar, antitümör bağışıklığını destekleyen M1 alt tipi ve tümörün ilerlemesinde rol oynayan M2 alt tipi olmak üzere iki alt tipe farklılaşabilir. Tümör immün mikro çevresinde bulunan immün hücresi-olmayan hücreler tümörün immün regülasyonunda önemli rol oynarlar (Galli vd., 2020). Mezenkimal hücrelerin önemli bir türü olan fibroblastlar, sitokinler, kemokinler, büyüme faktörleri ve hücre dışı matris salgılayarak organ yapısını ve homeostazı korumakta görevlidirler. Kanser-ilişkili fibroblastlar, TİMÇ'deki en önemli hücreler arasındadır ve sitokinlerin yanı sıra kemokinlerin salınımı yoluyla inhibitör işlevi olan immün hücreleri çeker ve harekete geçirir. Ek olarak, fibroblastlar makrofajları, T hücrelerini ve NK hücrelerini tümör stromasına doğru çeker ve aynı zamanda yerleşik makrofajları polarizasyonunu uyarıp, farklılaştırabilirler. Vasküler endotelyal hücreler, TİMÇ'deki başka bir immün olmayan hücre tipidir, T-hücrelerinin infiltrasyonunu baskılayabilirler, böylece immünosupresif bariyeri yüksek oranda eksprese ederler ve bu da tümör gelişimini desteklemektedir (Mao vd., 2021).

TİMÇ'nin diğer elemanları gibi ECM, normal dokulardan önemli ölçüde farklıdır. İntratümöral sinyalizasyon ve taşınma mekanizmaları, metabolizma, oksijenasyon ve

immünojenisite ECM tarafından kontrol edilmektedir (Henke, Nandigama ve Ergün, 2020). Bu düzenleyici kontrole sahip ECM, yalnızca tümörün malignitesini ve büyümesini etkilemekle kalmaz, aynı zamanda kanserin tedaviye yanıtını da etkilemektedir. Tümör ECM'i çeşitli moleküllerden meydana gelmektedir, bunlardan en önemlileri; kollajenler, proteoglikanlar, hyaluronik asit ve lamininlerdir. TMÇ'deki artan kolajen üretimi, yalnızca kolajen kodlayan genlerin artan transkripsiyonunu ve translasyonunu değil, aynı zamanda uygun translasyon sonrası işleme ve kolajen moleküllerinin salgılanması için gerekli olan enzimlerin upregülasyonu ile meydana gelir. ECM'nin önemli bir parçasını oluşturan proteoglikanlar (PG'ler), doğru üretim ve montaj için enzimlere ihtiyaç duyarlar. PG'ler, daha kısa glikozaminoglikan zincirleri (GAG'ler) ile yoğun şekilde glikosile edilmiş bir çekirdek proteinden oluşur. Hyaluronik asit (HA), peptitlere konjuge olmayan bir glikozaminoglikandır (GAG) ve diğer üçünün aksine Golgi aparatında sentezlenmez. Birçok kanserde özellikle de meme kanseri, pankreatik kanser, prostat kanser, kolorektal kanser hatta beyin tümörlerinde HA üretimi artış göstermektedir. Lamininler, normal sağlıklı dokuda bazal membranda bulunur ve genellikle kötü huylu dokuda daha çok miktarda ifadelenmektedir. ECM'nin tümörlerdeki özelliklerini detaylı bir şekilde anlamak, olumsuz etkisine müdahale edecek yaklaşımlar geliştirmek için gereklidir (Henke, Nandigama, ve Ergün, 2020).



Şekil 2.2 Tümör immün mikro çevresi (TİMÇ)

2.2.1 Makrofajların tümör immün mikro çevresindeki fonksiyonları

Tümör mikro çevresi, birden fazla hücre tipini ve sitokinleri içeren karmaşık bir sistemdir. İmmün hücreleri arasında makrofaj özellikle bol miktarda bulunmaktadır ve tümörün progresyonunda boyunca önemli bir rol oynamaktadır. Tümör mikro çevresindeki bağışıklıkla ilişkili hücreler, esas olarak makrofajları, dendritik hücrelerini (DC'ler), miyeloid türevli baskılayıcı hücrelerini (MDSC'ler), T hücrelerini, mast hücrelerini ve doğal öldürücü (NK) hücrelerini içermektedir. Tüm bu hücreler enfeksiyona ve de diğer hastalıklara karşı dirençte kritik rol oynamaktadır. Yapılan çalışmalarda, immün sisteminin tümörijenez üzerinde hem olumlu hem de olumsuz etkileri olduğu ve inflamatuar mikro çevrenin tümörler için önemli bir bileşen olduğu görüşünü kuvvetle desteklemektedir (Labani-Motlagh, Ashja-Mahdavi ve Loskog, 2020).

Makrofajlar tümörlü dokular da dahil hemen hemen tüm dokularda bulunan hücrelerdir. Tümör mikro çevresinin inflamatuar ve tümörojenik özelliklerini düzenleyen önemli bir immün hücresi türüdür. M1-benzeri ve M2-benzeri olmak üzere iki fenotip halinde bulunmaktadır. Tümör immün mikro çevresindeki makrofaj davranışları, başlıca çevresel sinyaller olmak üzere tümör hücreleri, immün hücreleri ve hücre dışı matris parametreleri tarafından yönlendirilmektedir. Makrofajlar, bu tümör immün mikro çevresindeki değişken sinyallere göre, anti-tümöral M1-benzeri ve pro-tümöral M2-benzeri fenotipleri dönüştürerek immün yanıtlarını düzenlemektedir. Makrofajları TMÇ'deki spesifik uyaranlara karşı geri dönüşümlü olarak tepki verme yeteneği ve plastisitesi ile tümör immün mikro çevresinde hem anti-tümöral hem de pro-tümöral rol oynamaktadır (Liu, Geng, Hou ve Wu, 2021).

2.3 Biyomalzeme-aracılı İmmünoregülasyon

İmmün sistemi modüle edebilen malzemelerin mühendisliği, immünolojiyle beraber gelişmekte olan bir alandır. Doğuştan gelen ve edinilmiş immün yanıtlarının manipülasyonu, doku onarımı ve doku yenilenmesi, kanser, otoimmün sendromlar dahil olmak üzere çok çeşitli insan rahatsızlıkları için büyük umut vadetmektedir (Dellacherie, Seo ve Mooney, 2019).

Biyomalzemeler, anti-inflamatuar terapötikleri istenen hücrelere, dokulara ve organlara hedeflemek, ilaç dağıtımını ve anti-inflamatuar etkinliği geliştirmek ve toksisiteyi azaltmak için kullanılabilir. Hedefleme stratejileri, pasif ve aktif hedefleme olarak ikiye ayrılabilir. Pasif hedefleme, ilaçların pasif difüzyon veya konveksiyon yoluyla sızdıran delikli kılcal damarlardan taşınmasıdır. Aktif hedefleme ise inflamatuar molekülleri ve hücreleri biyomateryal bazlı ilaç formülasyonlarının yüzeyine spesifik olarak bağlayan parçaların konjugasyonunu içeren bir yöntemdir. Biyomalzemeler, biyomalzeme-doku entegrasyonunu sağlamak ve immün hücresi davranışını modüle edecek şekilde tasarlanabilir. Özellikle, kontrollü zamanlama ile monositlerin ve makrofajların kasıtlı aktivasyonu ve bunların yara iyileşmesinde yer alan diğer hücre tipleri ile etkileşimlerinin modülasyonu, biyomalzeme etkinliğini artırmak için anahtar stratejiler olarak kullanılmaktadır (Tu vd., 2022). Bu amaçla, biyomalzeme yapısının tasarımı ve

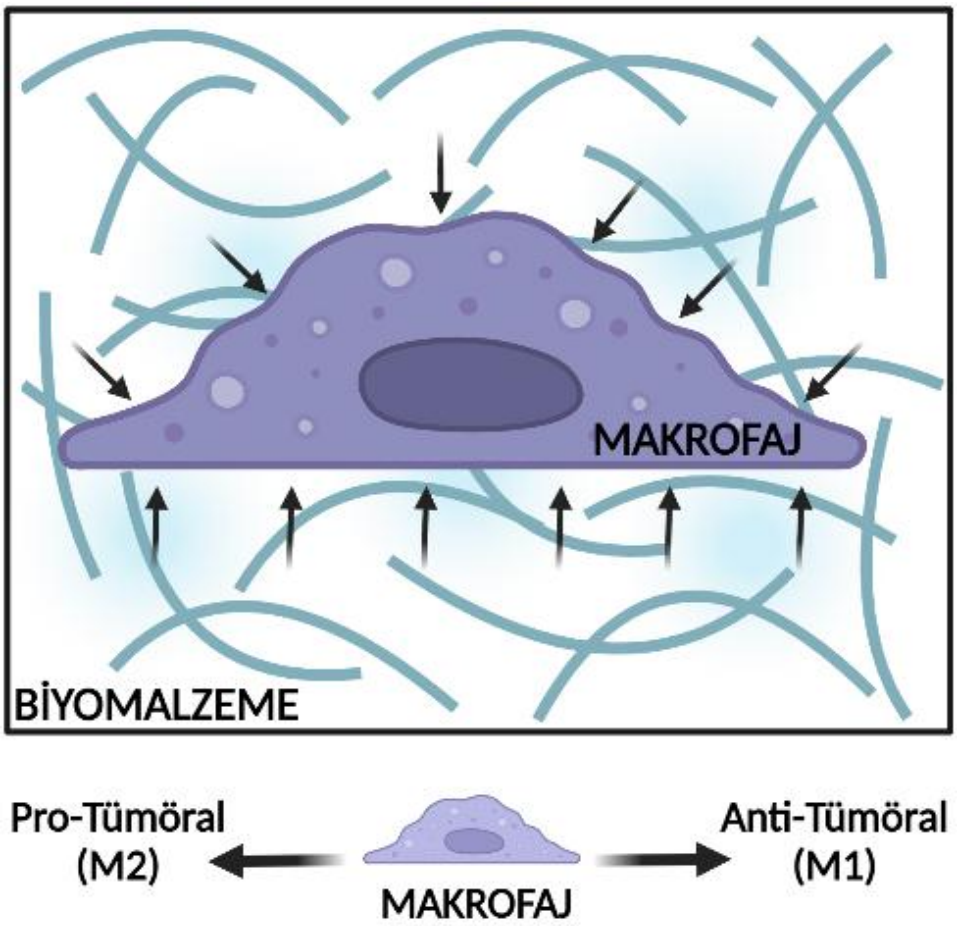
immünomodülatörlerin kontrollü salımı, tipik bir yabancı cisim tepkisini azaltırken gelişmiş doku entegrasyonu ve onarımı ile yara iyileşme tepkisinin maksimize edilmesi için ve makrofaj fenotipini manipüle etmek için de kullanılmaktadır (Andorko & Jewell, 2017).

2.3.1 Biyomalzeme-aracılı makrofaj immün karakterinin regülasyonu

Makrofajlar, biyomateryaller ile immünolojik yanıt açısından en çok çalışılan immün hücrelerdir. Makrofaj aktivasyonu ve fenotipi, substrat sertliği, boyutu ve yüzey özellikleri gibi biyomalzemenin biyofiziksel özellikleri ile değiştirilebilir (Şekil 2.3). Yüksek plastisiteleri nedeniyle, makrofajlar oluşturulan yapı iskeleleri tarafından modüle edilebilir ve biyomekanik çevresel ipuçlarına yanıt olarak immün fenotiplerini değiştirebilir. İmmün hücre yanıtını ve bu hücrelerin doku yenileme aktivitesini yönetebilen biyomalzemelere, yara iyileşmesi ve doku onarımının kontrolü için ihtiyaç duyulmaktadır (Liu ve Segura, 2020).

Makrofajların iki farklı fenotipinin (M1 ve M2) miktarında bir denge olmalıdır, çünkü bu hücrelerin pro ve anti-inflamasyon aktiviteleri aynı zamanda makrofajların anti-tümöral ve pro-tümöral özellikleri bu fenotiplere bağlıdır, makrofaj fenotipi kanser ilerlemesinin ve doku onarımının akıbetini belirler (Şekil 2.3). Bu fenotipik düzenleme, biyomalzeme özelliklerinin ayarlanması ile mümkün kılınabilir (Liu ve Segura, 2020). Biyomalzeme-aracılı oluşturulan matris ortamının boyutsallığı (2-boyutlu ve 3-boyutlu) ya da matris sertliği gibi özellikler ayarlanarak makrofajların immün fenotipi düzenlenmektedir. Örneğin, kollajen-tabanlı biyomalzeme ile artan matris sertliğinde 2-boyutluya kıyasla 3-boyutlu ortamdaki makrofajlarda M2 polarizasyonu indüklenmiştir (Friedemann vd., 2017). Buna karşın, polietilenglikol (PEG) kullanılarak yapılan 3B makrofaj kültürlerinde artan matris sertliğine yanıt olarak hem M1 hem M2 makrofajlarında artış gözlemlenmiştir (Kim vd., 2019). Jelatin-bazlı biyomalzeme üzerine ekilen makrofajlar ile yapılan diğer bir çalışmada artan sertlikle beraber M1 polarizasyonunun indüklendiği gözlenmiştir (Zhuang vd., 2019). Başka bir çalışmada ise, hyaluronik asit-bazlı biyomalzeme içerisindeki makrofajlarda artan matris sertliği ile beraber M2'den M1'e geçiş tespit edilmiştir (Yuan vd., 2021). Sonuç olarak,

makrofajların biyomalzeme-aracılı oluşturulan matris ortamının boyutsallık ve matris sertliği gibi özelliklerine karşı oluşturdukları immün fenotipine dair cevaplar aranmıştır ancak bu konuda bir ortak görüşe ulaşılamamıştır.



Şekil 2.3 Biyomalzeme-aracılı makrofaj immün karakterinin regülasyonu

2.4 Kanserde Biyomalzeme-Aracılı İmmünoregülasyon

Kanser karmaşık yapısı, dinamik doğası, çeşitliliğinden kaynaklı hem araştırılması hem de tedavisi için zorluk oluşturmaktadır. Tümör mikro çevresi ve stromal hücreler, tümörün ilerlemesine ve ayrıca immün sürveyansından kaçışına katkıda bulunabilir (Baghban vd., 2020). Biyomalzemeler, tanımlanmış makro ve mikro ortamlar oluşturmak ve hücreleri ve dokuları *in vitro* ve *in vivo* olarak manipüle etmek amacıyla kullanılabilmesi sayesinde oldukça çok yönlü bir araçtır. Kanser çalışmalarında biyomalzemeler hem terapötik yaklaşımları daha iyi taramak ve yeni terapötik hedefleri

belirlemek için, *in vitro* mimik etmek için bir temel hem de in *vivo* mikro çevreyi modüle etmek, ayrıca kanserli hücrelere ve tümörlere karşı doğrudan terapötik yanıtlar sağlamak için bir araç olarak da kullanılabilmektedir. Kanseri tedavi etmek için immün sistemden yararlanmak, tümörlere karşı spesifik, dayanıklı ve uyarlanabilir reaktivite sağlama potansiyelinden dolayı önem arz etmektedir. İmmün hücrelerinin uyarıcı sinyaller, kanserli hücreler veya diğer immünite düzenleyici hücrelerle karşılaştığı mikro çevre üzerinde biyomalzeme ile kontrol yoluyla yeni kanser tedavi yöntemleri bulunabilir, eski kanser immünoterapi yöntemleri geliştirebilir (Gu ve Mooney, 2015). Bu doğrultuda, kanserin immünoregülasyonu hedeflenerek, biyomalzeme-aracılı anti-kanser ilaç dağıtım sistemleri, immün hücrelerin uyarımını ve kanser durumunda immün hücrelerin aktivasyonunu arttırmaya yönelik kanser aşıları, hidrojeller (e.g. aljinat, fibrin) ve nanomalzemeler geliştirilmektedir (Wang vd., 2020; Zhang vd., 2019; Shen vd., 2017; Verbeke ve Mooney, 2015).

2.5 Meme Kanseri ve Meme Kanseri Metabolizması

Meme kanseri, memedeki hücrelerin kontrolsüz çoğalması sebebiyle oluşan bir hastalıktır. Farklı meme kanseri türleri vardır. İnvaziv duktal karsinom, kanser hücreleri kanallarda başlar ve daha sonra kanalların dışında meme dokusunun diğer bölgelerine doğru büyür. İstilacı kanser hücreleri vücudun diğer bölgelerine de yayılabilir veya metastaz yapabilir. İnvaziv lobüler karsinom, kanser hücreleri lobüllerde başlar ve daha sonra lobüllerden yakındaki meme dokularına yayılır. Bu istilacı kanser hücreleri vücudun diğer bölgelerine de yayılabilir (Anonim, 2021).

Meme kanserinde metabolik yeniden programlama, malignitenin ayırt edici özelliğidir. Glikoliz, NADH ve ATP'nin eşzamanlı üretimi ile glikozun pirüvata dönüştürüldüğü bir dizi reaksiyon gerektirir. Ortaya çıkan pirüvat ya asetil-CoA'ya dönüştürülebilir ve sitrat döngüsüne girebilir veya oksijen miktarı düşükse laktata yol açabilir. Aerobik koşullar altında bile yüksek laktat üretimi ile birlikte yüksek glikoz kullanımı ve glikoliz, birçok kanserin bilinen bir özelliğidir. Glikoz metabolizmasındaki ana değişiklikler, glikoz taşıyıcılarının (GLUT) ve glikolitik enzimler hekzokinaz 2 (HK2), fosfofruktokinaz 1 (PFK1) ve piruvat kinaz M2'nin (PKM2) aşırı ekspresyonunu; TCA döngüsü

değişiklikleri, enzim piruvat dehidrogenaz (PDH) ekspresyonunun azalmasını ve süksinat dehidrojenaz kompleksinin (SDHC) aşırı ekspresyonu ile gerçekleşir; normal hücre metabolizmasına ilişkin diğer metabolik değişiklikler, artan glutaminaz (GLS) ekspresyonu ile birlikte artan glutamin tüketimini, artan lipid sentezini ve yağ asidi sentazının (FAS) aktivitesi ile ilişkilidir. Kanser hücreleri ve stromal hücreler arasındaki devamlı etkileşimler, hücre metabolizmasının ve tümör patofizyolojisinin ayrılmaz bir parçasıdır (Gandhi ve Das, 2019).

2.5.1 Meme kanseri metabolizmasının immün-regülasyonu

Meme kanserinin malignant dönüşüm sürecinde, metabolik yeniden programlama ve immünite iki ana unsurdur. Meme kanseri hücreleri artan glikoz metabolizması yoluyla enerji üretimini desteklemektedir. Lipit metabolizması biyolojik sinyal yolaklarına yardımcı olur ve enerji üretiminin yanında hücre zarlarını oluşturmada görev alır. Amino asit metabolizması, hücresel büyümeyi desteklemede temel protein yapıtaşları ve metabolik düzenleyiciler olarak işlev görür. Tümörle ilişkili immünite, zayıf immünojenisite ve artan immün baskılama yoluyla meme kanseri hücrelerinin hastanın immün yanıtlarından kaçabilmesine olanak sağlar (Zhang, Xu ve Ye, 2020).

Kanser hücrelerinin anormal metabolizması, asitlik, hipoksi ve immünosüpresif metabolitler ile karakterize edilebilen bir ortam yaratır. Bu anormal metabolik mikro çevrede, immün hücreleri besinlerden yoksun kalır ve aktivasyonlarını etkileyen metabolik değişikliklere uğrar. Makrofajlar kanserin ilerlemesinde çok önemli bir rol oynamaktadır. Tümör mikro çevresi etkisi altında, makrofajların fenotipi M1'den (antitümör fenotipi), M2'ye (tümör fenotipini teşvik eden) değişebilir. Metabolizmada M1, anaerobik glikoliz, pentoz-fosfat yolağı ve yağ asidi biyosentezi yoluyla enerji metabolizmasını sürdürürken; M2 ise mitokondriyal oksidatif fosforilasyonla enerji metabolizmasını sürdürmektedir. Makrofajların yanı sıra, T hücreleri de kanser hücrelerine karşı bağışıklık tepkisinde hayati roller oynar. Saf T hücreleri az miktarda glikoz alır ve enerji ihtiyaçlarını karşılamak için mitokondriyal oksidatif fosforilasyonu kullanırken, efektör T hücreleri hızlı proliferasyonu ve işlevi desteklemek için glikoliz ve glutaminolizi indüklemektedir (Zhang, Xu ve Ye, 2020).

2.5.2 Meme kanserinde biyomalzeme-aracılı immün-regülasyon

İmmünoterapi yöntemleri biyomalzemeler ile geliştirilerek uygulama ve hedef dışı yan etki sorunlarını gidermeye, immünomodülatör etkileri artırmaya, farklı moleküllerin sinerjistik etkisini entegre etmeye ve in vivo olarak immün hücrelerini barındırmaya ve manipüle etmeye olanak tanımaktadır. Biyomalzeme-aracılı nano-aşılar, kontrol noktası inhibitör terapilerinden ve makrofajların, T-hücreleri, myeloid türevli baskılayıcı hücrelerin ve dendritik hücrelerin düzenlenmesi için oluşturulan yapı iskeleleri ve biyomalzemelerden meme kanseri immün regülasyonu için yararlanılmaktadır (Yang vd., 2020).

İmmün-regüle edici biyomalzemeler, meme kanserinde terapötik kanser aşılarının geliştirilmesi, anti-kanser ilaçların, kontrol noktası bloke edici inhibitör ajanların ya da sitokinlerin salımında ve makrofajların ve T hücrelerinin modülasyonu için araştırılmakta ve kullanılmaktadır (Koshy ve Mooney, 2016). Örneğin, kontrol noktası inhibitörleri içeren, biyo-uyumlu ve enjekte sonrası jelleşen yapıda sodyum aljinat kullanılarak hazırlanan bir hidrojel sistemi ile meme kanseri tümörlerinde antitümör tepkileri ve tümör büyümesinin etkili inhibisyonu sağlanmıştır (Chao vd., 2018). Hem kemoterapötikleri hem de kontrol noktası inhibitörünü içeren fibrin yapılı hidrojel aracılığıyla fare meme kanseri modelinde etkili bir antitümör etki sağlanmıştır (Zhang vd., 2019). T-hücrelerinin aktivasyonunu sağlamak için, kontrol noktası inhibitör reseptörleri barındıran immünoterapötik nanopartiküller kullanılmıştır ve meme kanseri modelinde tümör büyümesi azaltılmıştır (Mi vd., 2018). Başka bir çalışmada, anti-kanser ilaç ve immün uyarıcı sitokinler yüklü aljinat jellerden oluşan in situ kanser aşısı, dentritik hücreleri uyarmak ve meme kanseri tümörlü bölgesinde yoğunlaştırmak amacıyla oluşturulmuş ve aşının meme kanseri immün mikro çevresini modüle ettiği gösterilmiştir (Wang et al., 2020).

3. KAYNAK ÖZETLERİ

İmmün hücrelerde çevreden gelen mekanik sinyaller ile immün karakterinin düzenlenmesi arasındaki korelasyonun anlaşılması oldukça önemlidir. İmmün hücrelerin, özellikle de makrofajların, mekanoimmunolojisini anlama ve kanser tedavisi amacıyla biyomalzemeler ile akıbetinin kontrolüne yönelik çalışmalar aşağıda özetlenmiştir.

Malzeme biliminin, makrofajların bağışıklık tepkisini modüle etmek için malzemelerin ayarlanabilirliği ile makrofaj kaderini düzenlemek için kullanılabileceğini ortaya koymuştur. İmmün sistemi çevreden gelen uyarılara karşı yanıt vererek düzenlenmektedir. Friedemann vd. (2017) tarafından üç boyutlu (3B) fibriler matrisler, doğal olarak oluşan biyopolimerlere (kollajen I, glikozaminoglikanlar (GAG'ler)) dayalı matris sertleşmesini taklit edecek şekilde tasarlanmıştır. Sonuç olarak, iki boyutlu (2B) ECM üzerindeki makrofajlara kıyasla 3B matrislerde artan matris sertliği ile beraber bir yara iyileştirme fenotipi sunduğu tespit edilmiştir. Aynı zamanda, makrofajların polarizasyonu için ayarlanabilir sertliğe sahip *in vivo* benzeri 3B ECM matrislerinin kullanılmasının önemi vurgulanmıştır. Jiang vd. (2019) tarafından yapılan çalışmada jelatin iskelelerin yapısal ve mekanik özellikleri ile beraber iskelenin gözenek boyutu ve sertliği kriyoprotektanlar aracılığıyla düzenlenmiştir. Makrofajlar bu iskelelerin içerisine gömülüp 3-boyutlu kültür ortamı sağlandıktan sonra, makrofajların jelatin yapı iskelelerinin daha küçük ve daha yumuşak gözeneklerinde pro-inflamatuar fenotip gösterirken, daha büyük ve daha sert gözeneklerde ise anti-inflamatuar fenotip sergilediği görülmüştür. Bu çalışma ile, makrofajların mekanotransdüksiyonu, bir 3B ortam içindeki gözenekler tarafından fiziksel olarak yönlendirilmiştir. Kim vd. (2019) tarafından makrofajlar (RAW264.7), polietilenglikol (PEG) bazlı 3B ortam içinde kapsüllenmesinin ardından, artan seviyelerde matris metaloproteinazlar (MMP) ve M1 polarizasyon işaretleri ile küresel kümeler gözlemlenmiştir. Bunun yanında, bu çalışma ile makrofajların M1 ve M2 belirteçlerinin, sert matriste (4500 Pa) yumuşak matrise (1000 Pa) kıyasla eş zamanlı olarak yukarı regülasyonu tespit edilmiştir. Meli vd. (2020) tarafından yumuşak (1 kPA) ve sert (140 kPA) polietilen glikol diakrilat (PEGDA) hidrojelleri ve fibrinojen-konjuge sentetik poliakrilamid hidrojelleri

yumuşaktan serte 1, 20 ve 280 kPA olmak üzere kullanılarak makrofaj inflamatuar yanıtının, transkripsiyonel koaktivatör YAP aracılığıyla düzenlenebileceği ortaya çıkarılmıştır. Yumuşak hidrojellerde makrofajlar, YAP ekspresyonunu ve çekirdeğe lokalizasyonun azaltarak, sert hidrojellere kıyasla azaltılmış bir inflamasyon göstermiştir. Buna göre, makrofajlarda YAP lokalizasyonu, matris sertliği ve hücre iskeletinin polimerizasyonu ile düzenlenebilmiştir ve de YAP eksikliği sonucunda makrofaj inflamasyonu inhibe edilmiştir. Zhuang vd. (2020)'nin makrofaj davranışı ve immün yanıtları üzerine yaptığı çalışmada, 2, 10 ve 29 kPa değerlerine sahip metakrilat-jelatin (GelMA) hidrojellerinin üzerindeki makrofajlar in vitro olarak araştırılarak, daha sert hidrojeller üzerinde bulunan makrofajların, pro-inflamatuar (M1) fenotipe doğru indüklendiği ve yayılmasında artış görüldüğü sonuçlarına varılmıştır. Aykut vd. (2020) tarafından yapılan çalışmalarda 0.2 kPA ve 50 kPA değerlerine sahip matris sertlikleri kullanılarak mekanik kuvvetler aracılığıyla uyarılan Piezo Tipi Mekanik Duyarlı İyon Kanalı Bileşen 1 (Piezo1) ile kanserde immünosupresif miyelopoiezisin desteklendiği ortaya çıkmıştır. Atcha vd. (2021) tarafından makrofajlarda mekanik olarak aktifleştirilmiş katyon kanalı Piezo1 'in rolü, makrofaj hücrelerinin 1, 20, 40 ve 280 kPa olmak üzere farklı sertliklere sahip poliakrilamid hidrojelleri üzerine ekilerek test edilmiştir. Bulgulara göre, Piezo1, makrofaj polarizasyonunda ve makrofajlar tarafından matris sertliğinin algılanmasında rol oynamaktadır. Makrofajlarda Piezo1 eksikliğinin M2 benzeri tepkiler gösterdiği ayrıca, makrofajlardaki Piezo1 daha sert substratlar üzerinde hücrelerdeki artan kalsiyum akışından sorumlu olduğu, son olaraksa makrofaj immün yanıtının ve aktivasyonunun, matris sertliğine bağlı Piezo1'i indükleyerek düzenlendiği bulunmuştur. Yuan vd. (2021) tarafından kemik iliği kaynaklı makrofajları, solidum aljinat (SA) ve ditiyotreitol (DTT) çapraz bağlı metakrilatlı hyaluronik asitten (MA-HA) oluşan yeni bir 3D hücre kültürü platformunda kültürlendi. IR780'in fototermal etkisinden dolayı hidrojel sertliğinin arttırılması sağlanmak üzere (<50 Pa ila ~1 kPa), faz değişim malzemesi olarak IR780 kullanılmıştır. Makrofaj immün fenotipinin, artan dinamik sertliğe yanıt olarak M2 fenotipinden M1 fenotipine geçtiği ve bu geçişin YAP/TAZ yolağı üzerinden kontrol edildiği görülmüştür. Chakraborty vd. (2021) tarafından matris sertliği 2 ve 50 kPA şeklinde ayarlanan polidimetilsiloksan üzerine dendritik hücreler (DC) ekilerek, DC metabolizmasının, fenotipinin ve immün yanıtlarının Hippo-sinyal yolağı ekspresyonu aracılı modüle ettiği

gösterilmiştir. Buna çalışmada, mekanik kuvvetlerin doğuştan gelen immün yanıtları düzenleyebildiği görülmüştür.

Kanser immünoterapisi uygulamalarında biyomalzemeler ilaç dağıtım sistemleri, immün hücrelerin uyarımını sağlama ya da aynı anda hem ilaç hem de immün hücreleri uyaracak sistemler olarak karşımıza çıkmaktadır. Gao, Xiang, Meng, Liu ve Qi (2013), kanser hücrelerini hedefleyerek daha seçici ve verimli bir ilaç dağıtım sistemi oluşturmak için, tümör mikro çevresine duyarlı polipeptitler (TMSP) ve folat, doksetaksel anti-kanser ilacı yüklü olan nanoyapılı lipidin yüzeyine entegre edilmiştir. Ayrıca, MMP-2 ve MMP-9'a duyarlı bölünebilir peptit dizisi (PVGLIG) ve polianiyonik inhibe edici peptit dizisi (EGGEGGEGG) de eklenerek proteinaza duyarlı parçalanabilir TMSP sistemi oluşturulmuştur. Hücreler, tümör sferoidleri ve fare deneyleriyle TMSP'nin düşük toksisite ile antikanser ilaçların seçici olarak hedeflenmiş dağıtımını sağladığı görülmüştür. Liu vd. (2014), geliştirdikleri DNA/peptit amfifil-yapılı kanser aşısı ile farelerin lenf düğümlerinde T-hücrelerinin birikiminde belirgin artışlara ve gelişmiş anti-tümör etkinliğine yol açtığı sonucuna ulaşmışlardır. Verbeke ve Mooney (2015) bu çalışmada, olgunlaşmalarını veya aktivasyonlarını indüklemeden dendritik hücreleri in vivo olarak yerel olarak zenginleştirme amacına yönelik ilk adım olarak, şişmeyen ve enjekte edilebilir bir gözenekli aljinat hidrojelleri sisteminin geliştirilmesini göstermiştir. Bu jeller ayrıca, güçlü bir dendritik hücre çoğalmasını indükleyen granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktörün (GM-CSF) salınımını kontrol edecek şekilde tasarlanmıştır. In vivo olarak test edilen bu hidrojel sistemiile beraber GM-CSF'nin sürekli salınması ve bu malzemede milyonlarca dentritik hücrenin birikmesini sağlamıştır. Bu çalışma sayesinde, bir polimerik dağıtım sisteminin, yüksek sayıda olgunlaşmamış DC'lerin birikmesine aracılık edebileceğini ve malzeme bazlı, anti-kanser terapötik aşıların geliştirilmesi için temel sağlayabileceği gösterilmiştir. Kranz vd. (2016) tarafından RNA-lipopleksler (RNA-LPX) kullanılarak dentritik hücrelerin etkili bir biçimde in vivo olarak hedeflenebileceği gösterilmiştir. Buna göre, RNA-LPX çeşitli lenfoid dokulara ulaşarak, dentritik hücrelerin ve makrofajların anti-tümörijenik salgılarının artmasına yardımcı olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Shen vd. (2017), kanser kemoimmünoterapisi için tümörle ilişkili makrofajları ve tümör hücrelerini hedefleyebilen bir immüno-uyarıcı ve nano-taşıyıcı pH-duyarlı ilaç iletim

sistemi önerilmiştir. BLZ-945SCNs/Pt adı verilmiş olan bu sistem, tümör dokularında prevasküler bölgelerde parçalanıp, platin-ön ilaç konjuge küçük parçacıkların ve makrofajların koloni uyarıcı faktör 1 reseptörünün (CSF-1R) salımıyla makrofaj hücrelerinin uyaran yapının kanser hücrelerinde apoptozu indüklediği ve tümör mikro çevresini yeniden programladığı gözlemlenmiştir. Wang vd., (2020) tarafından üçlü negatif meme kanseri ortamında dendritik hücrelerinin yoğunlaştırılması için, granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör ve doksorubisin yüklü peritümöral olarak enjekte edilebilen makrogözenekli yapıya sahip aljinat jellerinin, enjeksiyon sonrasındaki dentrik hücrelerinin ve tümöre özgü T hücrelerinin artışı, aynı zamanda makrofajları M1 benzeri bir fenotipe doğru repolarizasyonu ile kanser hücrelerinin ölümünü ve anttümörijenik etkinliği arttırdığı gösterilmiştir.

Yapılan çalışmalarla, makrofajların ve diğer immün hücrelerinin mekanik sinyalleri nasıl "algıladıkları" konusunda cevaplar aranmıştır ancak hem hücre-dışı matriksin karmaşık ve heterojen doğası hem de makrofaj aktivesinin geçici yapısı sebebiyle makrofajlar kendi doğal tümör mikro çevrelerinde çalışılamamıştır. Biyomalzemeler ile kanser ortamında immün hücrelerinin regülasyonu üzerine çok çeşitli çalışmalar yapılmıştır, ancak bunlar genel anlamda çeşitli ilaç ve uyaranlar ile immünite kontrolü üzerinedir. Bu tez çalışması, hücre-dışı matriksin makrofaj aktivasyonunu doğrudan ve dolaylı yoldan nasıl etkilediğini anlama ayrıca kanserde mekanoimmünomodülasyonun aydınlatılması açısından detaylı bir kuramsal yaklaşımdır. Doku mühendisliği ve kanser immünoterapisi uygulamalarında biyomalzeme mekanik karakterlerinin makrofaj davranışı ve immün yanıtı üzerindeki etkileri üzerine uygulamalara da katkı sağlanması bu tezin önemini vurgulamaktadır.

4. MATERYAL ve YÖNTEM

4.1 Materyal

Hyaluronik Asit – Tiramin (HA-Tyr), Matteo D'Este (AO Research Institute, Davos, İsviçre) tarafından daha öncce sentez ve karakterizasyonunun ardından kullanılmak üzere laboratuvara ulaştırılmıştır.

HA-Tyr'nin jelleşmesi için kullanılan yaban turpu peroksidaz enzimi (HRP) ve hidrojen peroksit (H2O2), Sigma-Aldrich (ABD) firmasından temin edilmiştir.

Hidrojellerin mekanik analiz testi ölçümleri CellScale (Kanada) ve SEM görüntüleri FEI 430 Nova NanoSEM (ABD) cihazı ile elde edilmiştir.

Hücre kültürü çalışmaları UV lambalı (254 nm) laminer akış kabininde (Heal Force,) gerçekleştirilmiştir. Hücrelerin çoğaltıldığı ve deneylerin yapıldığı steril doku kültür kapları (Sarstedt, Almanya), ve ultra-az-yapışabilir 96-kuyucuklu plakalar (Corning, ABD), hücre besiyeri olarak kullanılan DMEM-HG (Dulbecco's Modified Eagle's Medium-high glucose), besiyeri katkısı olarak kullanılan L-glutamin, antibiyotik penisilin/streptomisin (P/S), fetal sığır serumu (FBS) ve hücre pasajı işleminde kullanılan DPBS (Dulbecco′s Phosphate Buffered Saline) ve tripsin/EDTA çözeltisi Thermo Fisher firmasından temin edilmiştir. Hücre kültürleri 37ºC sıcaklıkta, %5 CO2, %95 nem ortamını sağlayan bir karbondioksitli inkübatörde (Panasonic, Japonya) gerçekleştirilmiştir.

Hücre canlılığı ve proliferasyonunu incelemek için XTT [2,3-bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sülfofenil)-2H-tetrazolyum-5-karboksanilid] hücresel canlılık kiti (Biological Industries, USA) kullanılmıştır, sonucunda ölçümler UV-spektrofotometre (Multiskan Sky Microplate Spectrophotometer, Thermo Fisher) cihazında yapılmıştır.

İmmünofloresan boyaması için sabitleme, geçirgenlik ve spesifik olmayan bağlanmaları önlemek amacıyla sırasıyla paraformaldehit (PFA, Sigma), Triton X-100 (Sigma) ve Sığır Serumu Albümini (BSA, Sigma) kullanılmıştır. Birincil antikor olarak β-aktin ve YAP (yes-associated protein, Santa Cruz, ABD), ikincil antikor olarak Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher, ABD) ile boyama yapılmıştır. Hücre çekirdekleri DAPI (4',6-Diamidino-2-Fenilindol, Thermo Fisher, ABD) ile boyandı. İmmünofloresan görüntüleri Leica DMIL floresan mikroskobunda gözlemlendi.

RT-qPCR (Kantitatif Ters-Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu) gen ekspresyon çalışmasında tümör sferoidlerinden RNA izolasyonu toplam RNA izolasyon kiti (GeneDireX, ABD), makrofajlardan RNA izolasyonu içinse PureZOL RNA izolasyon reaktifi (Bio-Rad, ABD) kullanılmıştır. Tamamlayıcı DNA (cDNA) sentezi için iScript™ cDNA sentez kiti (Bio-Rad, ABD) kullanılmıştır ve cDNA oluşumu Bio-Rad Thermal Cycler T100 (ABD) cihazıyla gerçekleştirilmiştir. Kullanılan primerler Oligomer Biyoteknoloji (Türkiye) firmasında sentezlenip temin edilmesinin ardından RT-qPCR reaskiyonu Bio-Rad CFX96 cihazı (ABD) ile gerçekleştirilmiştir.

4.2 Yöntem

4.2.1 HA-Tyr hidrojelasyonu

Ağırlıkça %1 ve %6 HA-Tyr çözeltileri hazırlandı ve 2U/ml olacak şekilde HRP enzimi eklendi. Çözeltinin hacimce 1/10'u kadar 2 mM H_2O_2 eklendi ve hidrojelasyon sağlandı.

4.2.2 Taramalı elektron mikroskopisi (SEM)

SEM görüntüleme çalışması, HA-Tyr (ağırlıkça %1 ve %6) hidrojelinin morfolojisinin ve yapısının incelenmesi için yapılmıştır. Hyalüronik asit-tiramin ile elde edilecek ağırlıkça %1 (yumuşak) ve %6 (sert) hidrojeller kritik nokta kurutma (CPD) yöntemi ile

dehidratize edildikten sonra altın/paladyum ile kaplandıktan sonra, 10 kV gerilimde ve farklı büyütmelerde görüntüler elde edilmiştir.

4.2.3 Hücreli örnekler için SEM

SEM görüntüleme çalışması, hyalüronik asit-tiramin (HA-Tyr) hidrojeli üzerindeki (2B) hücrelerin morfolojisinin incelenmesi için yapılmıştır. HA-Tyr hidrojelleri 24-kuyucuklu plakalarda jelleştirilmiştir, ardından ~150.000 hücre jeller üzerine edilip 3 günlük süreyle kültür edilmesinin ardından, hücreler %4 glutaraldehit ile fiksasyona maruz bırakılıp, sabitlendi. Daha sonra, etanol serisi işlemiyle dehidrasyon işlemi gerçekleştirilip, örneklere dondurarak-kurutma işlemi yapılmıştır. Görüntüleme işlemi altın/paladyum ile kaplandıktan sonra, 10 kV gerilimde ve farklı büyütmelerde gerçekleştirilmiştir.

4.2.4 Mikromekanik analiz

Ağırlıkça 1% ve 6% HA-Tyr olarak hazırlanan hidrojellerin mekanik dayanımlarının tespiti için hidrojeller 10 mm yükseklikte ve 8 mm çapta hazırlandıktan sonra basma testi uygulandı. Uygulama, hazırlanan HA-Tyr hidrojellerin 10 kN kapasiteli test cihazının alt plakasına yerleştirilmesiyle ve oda sıcaklığında (25 °C) ve 0.1 mm/dakika hızda sıkıştırılmasıyla gerçekleştirilmiştir. HA-Tyr hidrojelleri üst plaka tarafından deforme olana kadar sıkıştırma kuvveti kaydedilip, ölçüm ardından gerilim-gerinim eğrisi oluşturuldu. Her numunenin sıkıştırma modülü (Young Modülü), gerilim-gerinim eğrisinin lineer alanındaki stres ve gerinimin bir oranı olarak hesaplandı.

4.2.5 Hücre kültürü

RAW264.7 fare makrofaj hücre hattı, hacimce %10 fetal bovin serum (FBS) ve hacimce %1 penisilin-streptomisin (P/S) içeren DMEM (yüksek glikoz) besiyerinde ve 37^{o}C sıcaklık, %5 CO2, %95 nem parametrelerinde inkübatörde kültür edilip, bağıl bolluğa gelinceye kadar 2-3 günde bir besiyeri değişimi yapılarak çoğaltılmıştır. MCF-

7 insan meme kanseri hücreleri ise hacimce %20 FBS ve hacimce %1 P/S içeren DMEM (yüksek glikoz) besiyerinde ve 37^{o}C sıcaklık, %5 CO_2, %95 nem parametrelerinde inkübatörde kültür edilip, bağıl bolluğa gelinceye kadar 2-3 günde bir besiyeri değişimi yapılarak çoğaltılmıştır.

4.2.5.1 Makrofaj hücrelerinin hidrojellere 2B ve 3B olarak ekilmesi

Ağırlıkça %1 ve %6 HA-Tyr çözeltileri hazırlandı ve HRP enzimi ilavesinden önce sterilizasyon amacıyla 1 saat boyunca laminer kabin içerisinde UV ışığa maruz bırakılmıştır. Sonrasında, 2U/ml olacak şekilde HRP enzimi eklendi. 2B hücre kültürü için, kuyucuk içerisindeki çözeltinin hacimce 1/10'u kadar 2 mM H_2O_2 eklendi ve hidrojelasyon sağlandı. Oluşturulan hidrojeller 1 saat boyunca laminer kabin içerisinde UV ışıkta bekletilmesinin ardından DPBS ile yıkama yapılarak hücre ekimine hazırlandı. %90 bağıl bolluğa ulaştığı görülen makrofaj hücreleri scraper ile kaldırılmıştır. Sonra, hücreler üzerine 4 mL besiyeri ilavesi yapılan hücreler santürfüj tüpüne alınarak 1200 devir/dakika hızda 5 dakika süreyle santürfüj edilmiştir. Santürfüjden sonra süpernatant atılmıştır. Hücre pelleti üzerine 1 mL besiyeri eklendi ve hemositometre ile hücre sayımı yapılmıştır. Bu sırada, 3B hücre kültürü için HRP enzimi eklenmiş ağırlıkça %1 ve %6 HA-Tyr çözeltileri de uygun kuyucuklara eklendi, uygun sayıda hücre bu çözeltiler içerisine karıştırılıp hücre ekimi yapılmıştır ve çözeltinin hacimce 1/10'u kadar 2 mM H_2O_2 eklendi, hidrojelasyon sağlandı. 2B hidrojeller üzerine de istenilen hücre yoğunluğunda hücre ekimi yapılmıştır. Besiyeri ilavesi yapılarak analiz süresine kadar hidrojeller üzerine ve içerisine ekilen hücreler, 37°C ve %5 CO_2 içeren ortam şartlarında inkübe edilmiştir ve besiyeri 3 günde bir taze besiyeri ile değiştirilmiştir.

4.2.5.2 *In vitro* tümör sferoidleri oluşturulması

MCF-7 tümör sferoidleri için, bolluğa ulaşan MCF-7 hücreleri tripsin/EDTA ile kültür plastiğinden ayrılarak hemasitometre yardımıyla sayılıp, 10.000 hücre/kuyucuk olacak şekilde 96-kuyucuklu Ultra-Az Yapışabilir Plakalara ekilmesinin ardından 5-gün

boyunca günlük olarak uygun miktarlarda besiyeri eklemesi yapılıp sferoid oluşumu sağlandı.

4.2.5.3 2B ve 3B makrofaj hidrojel kültürlerinde XTT hücre canlılığı testi

RAW264.7 hücrelerinin, HA-Tyr hidrojelleri üzerinde (2B) ve içerisinde (3B) canlılık ve çoğalmalarının zamana bağlı (96 saat ve 144 saat) değişimi yapılan XTT testi ile gözlemlendi. Bu doğrultuda, 96 saat ve 144 saat olarak belirlenen zaman noktalarına ulaşıldığında sadece metabolik olarak aktif bulunan hücrelerde Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat'a (NADPH) bağlı dehidrogenaz enzimleri aracılığı ile XTT tetrazolyum bileşiğininin hücre kültüründe çözünür turuncu renkli formazan kristallerine indirgenmesi prensibiyle yapılan kolorimetrik hücre canlılığı ve proliferasyonu tespit yöntemi XTT kullanılmıştır. Ağırlıkça %1 ve %6 HA-Tyr hidrojelleri ve RAW264.7 hücreleri bölüm 4.2.4.1'deki yöntem kullanılarak 3 tekrarlı olacak şekilde 48-kuyucuklu plaka içerisine hazırlanarak, jel başına 75.000 hücre/hidrojel olacak şekilde RAW264.7 hücreleri ekilmiştir. Hazırlanan örnekler 37°C ve %5 CO_2 içeren ortam şartlarında inkübe edilmiştir. Belirlenen zaman noktalarında, örneklerin bulunduğu kuyucuklardaki besiyeri uzaklaştırılarak 200 µl taze besiyeri ilavesi yapılmıştır. Reaksiyon çözeltisi, 5 mL XTT reaktifine 0,1 mL aktivasyon çözeltisi olacak şekilde hazırlandı. Örneğin bulunduğu her kuyucuğa, 100 µl hazırlanan çözeltiden ilave edilerek 37°C'da %5'lik CO_2 koşullarındaki inkübatörde 2 saat inkübe edilmiştir. Örnekler üzerinden besiyeri-XTT reaksiyon çözeltisini içeren süpernatant toplandı ve yeni bir 96-kuyucuklu plakaya aktarılarak spektrofotometre cihazı ile 490 nm dalga boyunda ölçüm alınarak kaydedilmiştir.

4.2.5.4 Hidrojeller üzerindeki makrofajlarda immünofloresan boyaması ile YAP ve β-aktin ekspresyonunun gözlemlenmesi

Antijen-antikor ilişkisine dayalı immünofloresan boyama (YAP ve β-aktin) yöntemi kullanılarak hücresel davranışlar floresan mikroskobu altında incelendi. Bu amaçla, ağırlıkça %1 ve %6 HA-Tyr hidrojelleri 48-kuyucuklu plaka içerisinde hazırlandı. UV

ışık altında 1 saat sterilizasyondan sonra DPBS ile yıkama yapılan jellere ve jel başına 150 bin hücre/hidrojel olacak şekilde RAW264.7 hücreleri ekilerek 37°C ve %5 CO2 içeren ortam şartlarında 5 gün boyunca inkübe edilmiştir. 5 günlük inkübasyon sürecinin ardından örnekler üzerindeki besiyeri uzaklaştırılarak DPBS ile 3 kez yıkama yapılmıştır. Sonrasında, %4 PFA ilave edilmiştir ve 15 dakika boyunca örnekler oda sıcaklığında inkübe edilerek hücrelerin hidrojellere sabitlenmesi sağlandı. 15 dakika sonunda PFA ortamdan uzaklaştırılıp DPBS ile yıkama yapılmıştır. Ardından geçirgenlik arttırımını sağlamak için %0,1 Triton X-100 eklendi ve örneklerin 15 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübasyonu sağlanmıştır. Son olarak spesifik-olmayan bağlanmaları önlemesi için örneklere %0,1 BSA çözeltisi eklendi ve oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiştir. Yıkama işlemi ardından, birincil antikorlar (YAP ve β-aktin) hacimce 1:200 olacak şekilde DPBS içerisinde hazırlandı ve kuyucuklara eklendi. Birincil antikorları eklenen kuyucuklar 4°C'de gece boyu inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından birincil antikorlar ortamdan uzaklaştırılmıştır ve yıkama işlemi tekrarlanarak ikincil antikor olan Anti-Fare IgG Alexa Fluor 488 hacimce 1:1000 oranında DPBS içerisinde çözülerek, kuyucuklara ilave edilmiştir. 1 saatlik oda sıcaklığında ve karanlık ortam şartlarında inkübasyonun ardından hücrelerin çekirdekleri DAPI ile boyandı ve örnekler floresan mikroskopi ile incelendi.

4.2.5.5 MCF-7 tümör sferoidleri ve RAW 264.7 makrofajları ile 2-boyutlu ve 3-boyutlu HA-Tyr hidrojellerinden oluşan eş-kültür sistemi

24-kuyucuklu plakalarda 2-Boyutlu ve 3-Boyutlu HA-Tyr hidrojelleri ile RAW 264.7 hücrelerinin bölüm 4.2.5.1'te anlatıldığı gibi hazırlanmasının ardından, olşturulan kültürler 5 gün boyunca inkübe edilmiştir. 5. güne gelindiğinde hidrojel kültürlerinin üzerine tümör sferoidlerinin kültür edileceği üst bölme yerleştirilip, bölüm 4.2.5.2'de anlatıldığı şekilde oluşturulan MCF-7 meme kanseri sferoidleri eş-kültür sisteminin üst bölmesi içerisine alındı. Eş-kültür transwell sisteminde immün-kanser hücrelerinin 48 saat süreyle etkileşimi sağlandı.

4.2.5.6 RT-qPCR ile gen ekspresyon analizleri

RT-qPCR, matriks sertliklerinin ve boyutlarının immün hücrelerde yarattığı etkiyi, aynı zamanda bu immün hücrelerin anti- ve pro- tümöral yanıtlar ve mekanoimmünite süreçleri ile ilgili gen ifadelerinin incelenmesi için tümör sferoidleri indüksiyon gerçekleştirilmiştir. Makrofajların ayarlanabilir mekanoimmünitesinin eş-kültür sistemindeki meme kanseri sferoidleri üzerindeki etkilerini görme amacıyla, tümör sferoidlerinde epitelyal-mazenkimal geçiş (EMT), metastaz ve tümör süpresör ilişkili gen ekspresyonları incelendi. Bu amaçla, bölüm 4.2.4.5'te anlatıldığı gibi eş-kültür sistemi oluşturuldu ve inkübasyon sürecinin ardından, makrofaj-hidrojel total ribonükleik asit (RNA) izolasyonu yapılırken makrofajlar için trizol metodu ve tümör sferoidleri içinse ticari ribonükleik asit izolasyon kolonları kullanılmıştır ve toplam RNAlar elde edilmiştir.

Tümör sferoidleri içinden RNA izolasyonu için kit talimatları takip edilmiştir, 2 tekrarlı olacak şekilde hazırlanan örneklerden toplam RNA izole edilmiştir. Tümör sferoidleri lizisi için her bir örnek başına 1 mL RiboEx reaktifi eklenerek homojenizasyon sağlanıncaya kadar pipetleme yapılmıştır ve oda sıcaklığında 5 dakika inkübasyon sağlanarak nükleoprotein komplekslerinin ayrışması sağlandı. Homojenize edilmesinin ardından, örnekler ependorflara aktarıldı ve istenmeyen hücre dışı materyallerin, yüksek moleküler ağırlıklı genetik materyallerin çökmesi 12,000 x rpm'de 10 dakika santrifüj işlemiyle sağlandı. Yeni ependorflara RNA içeren süpernatantlar aktarılmasının ardından hacimce 1 mL RiboEx başına 0,2 mL olacak şekilde kloroform eklemesi gerçekleştirilmiştir, pipetlenen örnekler 12,000 x rpm'de 15 dakika boyunca santrifüjlendi. Yeni bir ependorfa şeffaf süpernatant aktarılarak hacimce 1:1 oranında RBI reaktifi eklendi, pipetlenerek mini spin kolonlara aktarıldı. RNA'ların silika membranlara bağlanması 10,000 x rpm'de 30 saniye santrifüj işlemiyle sağlandı. Daha sonra, sırasıyla SVI ve RNW tamponu ile yıkama işlemleri yapılarak membrandaki RNA'lardan olası kontaminantlar uzaklaştırıldı. Son aşama olarak, RNA'ların silika membranlardan elüsyonu nükleaz içermeyen su ilavesi ile gerçekleştirilmesinin akabinde izole edilen RNA'ların konsantrasyonları NanoDrop spektrofotometre cihazı kullanılarak ölçülmüştür ve RNA konsantrasyonlarından cDNA sentezi için gerekli baz

alınacak konsantrasyon miktarları hesaplandı ve izole edilen RNA'lardan cDNA, cDNA sentez kitinin talimatları uygulanarak her örnek için total hacim 10 µL olacak şekilde 5 µL 5x iScript Reaction Mix eklenmesi süratiyle termal ısıl döngüleyici (PCR) kullanılıp cDNA'ların sentezi gerçekleştirilmiştir. RT-qPCR tekniğiyle beş teknik tekrarlı olacak şekilde, tümör sferoidlerinde belirlenen EMT genleri E-kaderin (epitelyal kaderin), N-kaderin (nöral kaderin), metastaz MMP-2 (matris metalloproteinaz-2) ve tümör süpresör p53 gen ekspresyonu analizleri gerçekleştirilmiştir (Çizelge 4.1).

Makrofajlar içinse, PureZOL RNA izolasyon kiti talimatları izlenmiştir, iki tekrarlı olacak şekilde hazırlanan örneklerden toplam RNA izole edilmiştir. Makrofaj lizisi için her bir örnek başına 1 mL PureZOL reaktifi eklenerek homojenizasyon sağlanıncaya kadar pipetleme yapılmıştır ve nükleoprotein komplekslerinin ayrışması oda sıcaklığında 5 dakika inkübasyon ile gerçekleştirilmiştir. Homojenizasyonun ardından, örnekler ependorflara aktarılmıştır ve 4°C 12,000 x rpm'de 10 dakika boyunca santrifüjlenip polisakkaritlerin, proteinlerin ve hücre dışı materyallerin uzaklaşması sağlanmıştır. Yeni ependorflara alınan RNA içeren süpernatantlara hacimce 1 mL PureZOL başına 0,2 mL olacak şekilde kloroform eklenip, 15 saniye nazikçe çalkalanmasının ardından 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. 4°C 12,000 x rpm'de 15 dakika boyunca santrifüjlendikten hemen sonra üstte kalan sıvı kısımlar yeni ependorflara alındı ve üzerlerine hacimce 1 mL PureZOL başına 0,5 mL olacak şekilde izopropil alkol eklendi, karıştırılıp 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. 4°C 12,000 x rpm'de 10 dakika santrifüjlendikten sonra, RNA'lar beyaz pellet halinde gözlemlendi ve 1 mL %75 etanol ile pelletler yıkandı. Vorteksin ardından, 4°C 7,500 x rpm'de 5 dakika boyunca santrifüjlendi ve süpernatant dikkatlice atıldı. RNA pelleti hava ile 5 dakika kadar kurumaya bırakıldı. Kuruduktan sonra, RNA pelleti uygun miktarda nükleaz içermeyen su ile süspanse edilip, izole edilen RNA'ların konsantrasyonları NanoDrop spektrofotometre cihazı kullanılarak ölçülmüştür. RNA konsantrasyonlarından cDNA sentezi için gerekli baz alınacak konsantrasyon miktarları hesaplanmasını takiben RNA'lardan cDNA, cDNA sentez kitinin talimatları uygulanarak her örnek için total hacim 10 µL olacak şekilde 5 µL 5x iScript Reaction Mix eklenmesi süratiyle termal ısıl döngüleyici (PCR) kullanılıp cDNA'ların sentezi gerçekleştirilmiştir. RT-qPCR tekniğiyle beş teknik tekrarlı olacak şekilde,

makrofajlarda belirlenen mekanotransdüksiyon belirteçleri olan YAP (Yes-associated Protein 1), RhoA (Ras homolog family member A), WWTR1 (WW Domain Containing Transcription Regulator 1, TAZ) ve Piezo1 (Piezo Type Mechanosensitive Ion Channel Component 1) ve TRPV4 (Transient receptor potential cation channel subfamily V member 4). İmmün yanıt belirteçleri olarak, pro-tümörijenik belirteçler olarak IL-10 (Interleukin 10), TGF-β (Transforming Growth Factor Beta), anti-tümörijenik belirteçler olarak TNF-a (Tumour Necrosis Factor alpha), IL-12β (Interleukin 12 beta) genlerinin ekspresyon analizleri gerçekleştirilmiştir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4. 1 qRT-PCR için kullanılan genlerin primer dizileri

Gen	**Oligonükleotidler (5' → 3')**
YAP (fare)	İleri: CCTCGTTTTGCCATGAACCAG Ters: GTTCTTGCTGTTTTCAGCCGCAG
TAZ (WWTR1) (fare)	İleri: GTCACCAACAGTAGCTCAGATCC Ters: GTTGCTGAGGAAGTCTTCTGGAG
RhoA (fare)	İleri: CTTCAGCAAGGACCAGTTCCCA Ters: GGCGGTCATAATCTTCCTGTCC
IL-10 (fare)	İleri: CGGGAAGACAATAACTGCACCC Ters: CGGTTAGCAGTATGTTGTCCAGC
IL-12β (fare)	İleri: TTGAACTGGCGTTGGAAGCACG Ters: CCACCTGTGAGTTCTTCAAAGGC
TGF-β (fare)	İleri: TGATACGCCTGAGTGGCTGTCT Ters: CACAAGAGCAGTGAGCGCTGAA
TRPV4 (fare)	İleri: TCACCGCCTACTATCAGCCACT Ters: GAACAGGACTCCTGTGAAGAGC
PIEZO1 (fare)	İleri: TCATCATCCTTAACCCATGGTG Ters: TGAAGACGATAGCTGTCATCCA
GAPDH (fare)	İleri: CATCACTGCCACCCAGAAGACTG Ters: ATGCCAGTGAGCTCCCGTTCAG
MMP2 (insan)	İleri: AGCGAGTGGATGCCGCCTTTAA Ters: CATTCCAGGCATCTGCGATGAG
E-kaderin (insan)	İleri: GCCTCCTGAAAAGAGAGTGGAAG Ters: TGGCAGTGTCTCTCCAAATCCG
N-kaderin (insan)	İleri: CCTCCAGAGTTTACTGCCATGAC Ters: GTAGGATCTCCGCCACTGATTC
p53 (insan)	İleri: GAGGTTGGCTCTGACTGTACC Ters: TCCGTCCCAGTAGATTACCAC
GAPDH (insan)	İleri: GAACGGGAAGCTTGTCATCAA Ters: ATCGCCCCACTTGATTTTGG

4.2.5.7 Transkriptom analizi

Bölüm 4.2.4.6' da anlatıldığı gibi izole edilen total makrofaj ve total tümör sferoid RNA'ları, RNA konsantrasyon ölçümünün ardından, RNA sekanslama için BMLabosisfirmasına gönderildi ve Illumina HiSeq 2000 cihazı için hizmeti alımı yapılarak transkriptomiks gerçekleştirilmiştir. RNA-Seq analizi ile elde edilen ham okumaların öncelikle FASTQC gibi yazılımlar aracılığıyla kalite kontrolü yapılmıştır. Bu işlem sonrası elde edilen yüksek kaliteye sahip okumalar insan referans genomu ile karşılaştırılmıştır ve her transkript için elde edilecek p-anlamlılık değerleri için FDR (False Discovery Rate) değerleri hesaplandı. Son olarak ise DAVID gibi biyoinformatik analiz programları kullanılarak anlamlı bulunan transkriptlerin hangi biyolojik süreç, moleküler işlev ve biyokimyasal yolakta yer aldığını belirlemek için gen ontoloji (GO) çalışması yapılmıştır.

4.2.5.8 Metabolom analizi

Makrofajlarda mekanosensasyona bağlı olarak değişen immün yanıtlara göre, tümör etkileşimli olup olmama durumuna göre değişen metabolitleri belirlemek için ve makrofaj mekanoimmünitesinin meme kanseri tümör sferoidlerindeki metabolik etkilerini görmek üzere metabolomik analizler gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, %1 ve %6 HA-Tyr hidrojelleri 24-kuyucuklu plaka içerisine 3 tekrarlı olacak şekilde hazırlandı. Yumuşak ve sert matriks üzerinde ve içinde bulunan makrofaj immün hücrelerinin tümör sferoidi ile etkileşimli ve etkileşimsiz metabolit profillerini ayırt etmek için tümör sferoidi ile eş-kültür sistemi olan ve olmayan makrofaj hidrojel kültürleri oluşturuldu. Hidrojel başına 750.000 makrofaj hücresi ekilmiştir, 37°C ve %5 CO_2 içeren ortam koşullarında 5 gün boyunca inkübe edildi. Tümör sferoidleri ile etkileşimli gruplar için bölüm 4.2.4.2'deki gibi oluşturulan meme kanseri tümör sferoidleri eş-kültür sisteminin üst bölmesi içerisine alınarak belirlenen eş-kültür grupları oluşturuldu ve 2 gün daha etkileşim devam ettirilmiştir. Kültür sürecinin sonunda, hidrojel-makrofaj hücre yapıları üzerine metabolizmayı durdurmak amacı ile 1 ppm miristik asit içeren hacimce 1:9 metanol/su solüsyonu eklenerek numuneler homojenize edilmiştir. Metabolizmanın olduğu gibi korunması ve metabolizmaların

durdurulması adına numunelerin bulunduğu plaka 15 saniye boyunca sıvı azota daldırılmıştır. Bu işlemin ardından, pipetleme ile homojenize hale getirilen numuneler ependorflara alınıp etiketlendi ve metabolom analizine kadar -80°C'de muhafaza edilmiştir.

-80 °C'de muhafaza edilen metabolom örnekleri 15 dakika 10,000 x rpm'de santrifüjlenip üst fazda yer alan polar metabolitler yeni ependorf tüplerine alındı ardından metabolit bozunmasını önlemek amacıyla vakumlu santrifüj ile kurutuldu. Kurutulan numunelere metoksiamin hidroklorürün piridindeki çözeltisi ile metoksilatlandı. 37°C'de 30 dakika boyunca N-metil-N-trimetilsilil trifloroasetamid (MSTFA) ve %1 trimetilklorosilan (TMCS) reaktifleri ile türevlendirme yapılmıştır. Türevlendirilen numuneler, silanize şişelere aktarılmıştır ve analiz DB5-MS kolon kullanılarak Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (GC-MS) ve Sıvı Kromatografisi-Kuadrapor Uçuş Zamanlı (LC-qTOF) cihazları kullanılmıştır. Kompleks kromatogramlar ayrıştırılmıştır ve piklerin alıkonma zamanları SpectConnect yazılımı aracılığıyla düzeltildi ardından veri matrisleri elde edildi. Son olarak, elde edilen metabolit pikler alıkonma indeksli Fiehn ve Golm Database kütüphaneleri kullanılarak aydınlatılmıştır.

4.2.6 Biyoistatistik ve biyoinformatik analizler

Gen ekspresyonu ve XTT, tek yönlü ANOVA ile istatiksel olarak analiz edildi, ayrıca Student t-testleri kullanılarak ikili karşılaştırmalar için istatistiksel analizler yapılmıştır, çubuklar ortalama ± SEM'i ve semboller deney tekrar sayısını temsil etmektedir, ilgili grafikler GraphPad Prism 9 (Windows için, GraphPad Yazılımı, San Diego, California ABD, www.graphpad.com) kullanılarak oluşturuldu.

Metabolomik verilerin dekonvolüsyonu için AMDIS (Otomatik Kütle Spektral Dekonvolüsyon ve Tanımlama Sistemi), ardından metabolit tepe noktaları ile veri matrislerini oluşturma amacıyla SpectConnect kullanılarak gerçekleştirildi. Metabolomik veri matrisleri uygun dosya formatında dönüştürülüp MetaboAnalyst5.0'e

yüklenerek toplam alan-ortalama merkezleme ile normalleştirilmesi sağlandı. Bu işlemler sırasında, eksik değerlerin %50'sinden fazlasına sahip herhangi bir metabolit özelliği veri matrisinin dışında tutulmuştur. Son elde edilen veri matrisi, çok değişkenli analiz için SIMCA-P+ (v13.0, Umetrics, İsveç) yazılımına aktarılmıştır, ardından grupların ayrımını gösterme amacıyla Kısmi En Küçük Kareler-Ayrımcılık Analizi (PLS-DA) oluşturuldu. İstenilen metabolitleri daha detaylı ayırt etmek için projeksiyondaki değişken önem (VIP) ve yanardağ grafiklerinden yararlanılmıştır. Son olarak ise web-tabanlı araçlar kullanılarak farklılaşan metabolitler ile yolak analizleri gerçekleştirildi ve hem makrofajların mekanoimmün hücre davranışları hem de meme kanseri tümör sferoidlerinde mekanoimmün ilişkili tümörijenez davranışlarının hangi metabolik yeniden programlama yolakları ile ilişkili olduğu tespit edildi.

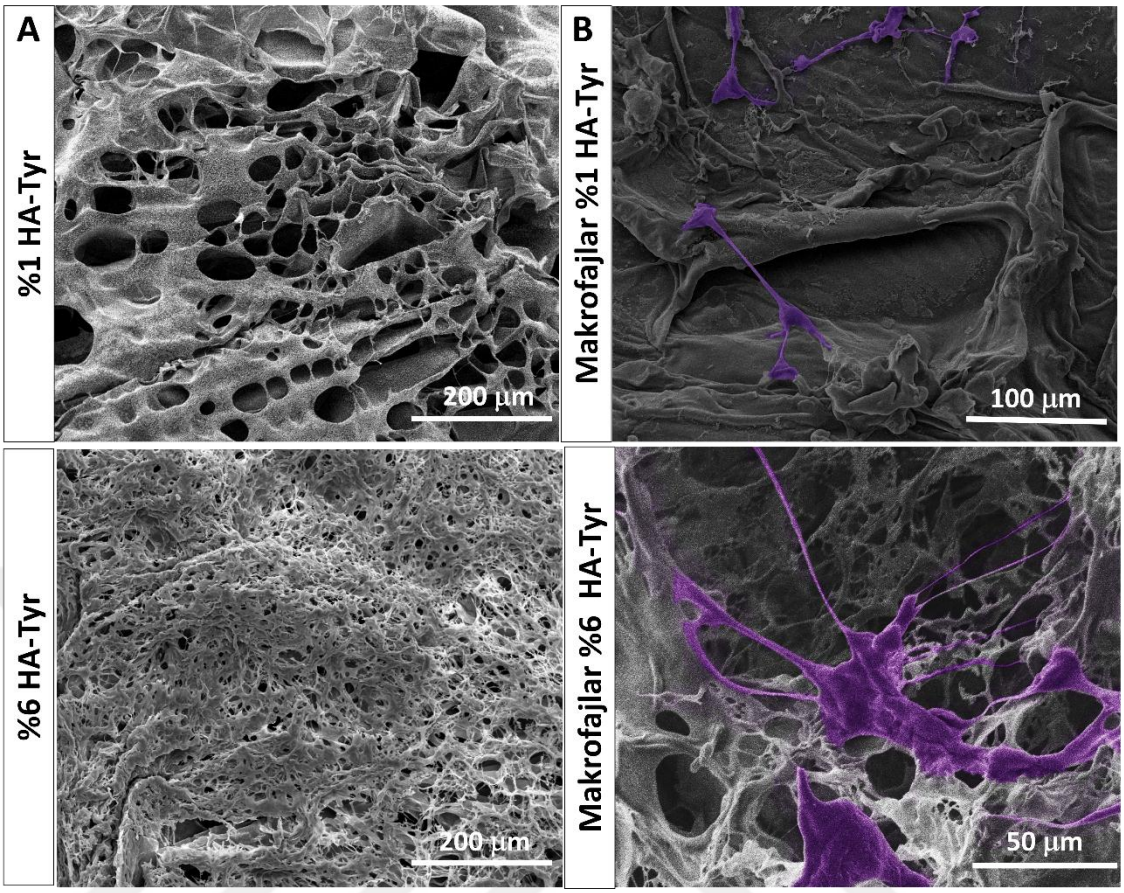
5. BULGULAR

5.1 HA-Tyr Hidrojelinin Karakterizasyonu

Ağırlıkça %1 ve %6 olacak şekilde hazırlanan HA-Tyr çözeltileri 2U/mL HRP enzimi ve ardından 2 mM H_2O_2 ile çapraz bağlanmış ve HA-Tyr hidrojelleri SEM analizi ve mikromekanik teste tabi tutulmuştur.

5.1.1 SEM analizleri

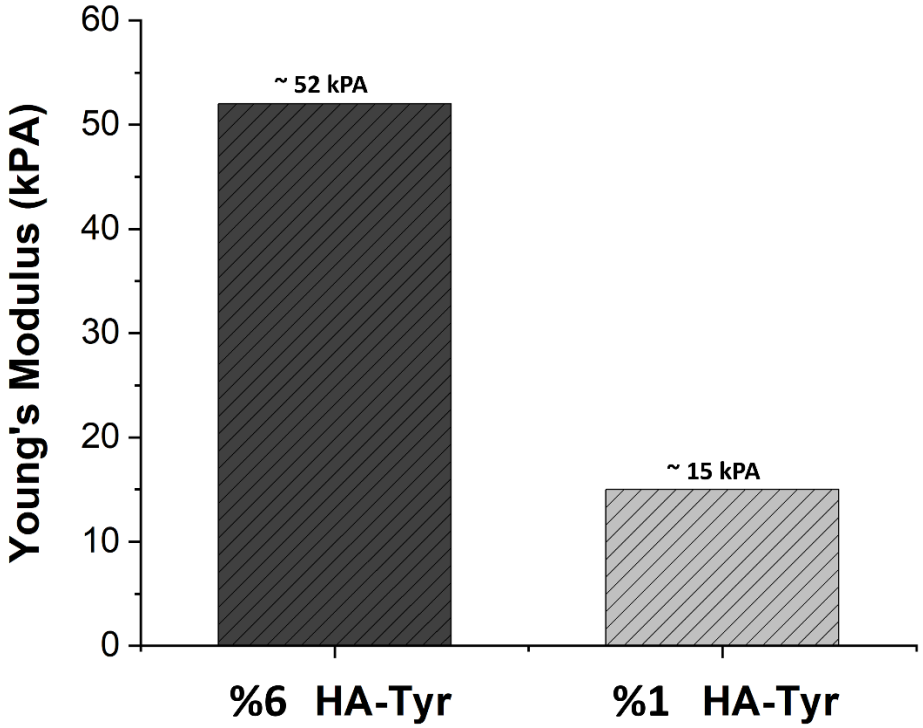
Değişen konsantrasyonun HA-Tyr hidrojellerinde sebep olduğu morfolojik farklılıklar ve gözenek yapısı taramalı elektron mikroskopisi ile incelenmiştir (Şekil 5.1.A), aynı zamanda hazırlanan hidrojeller üzerine makrofajlar ekilerek makrofajların yapışması SEM ile incelenmiştir (Şekil 5.1.B). HA-Tyr hidrojellerininkonsantrasyonu arttıkça gözenek boyutlarında küçülme görülmüştür. Hücreli SEM görüntüleri ile makrofajların meme kanseri hücre dışı matrisinebenzeyen hyaluronik asit içeriği nedeniyle hem %1 HA-Tyr hem de %6 HA-Tyr hidrojellerine yapışabildiğigörülmüştür (Blanco-Fernandez, Gaspar, Engel ve Mano, 2021). Bununla birlikte, makrofajların %6 HA-Tyr hidrojel yüzeyinde %1 HA-Tyr yüzeyinden daha uzun filopodia adı verilen paralel aktin filamentlerini içeren ince hücre yüzeyi çıkıntıları olan yapıları oluşturma eğiliminde olduğu da görülmüştür (Kress vd., 2007).



Şekil 5.1 (A) %1 ve %6 HA-Tyr, (B) üzerine makrofaj hücreleri (mor) ekilmiş %1 ve %6 HA-Tyr hidrojellerinin SEM görüntüleri

5.1.2 Mikromekanik (Sıkıştırma Testi) analiz

HA-Tyr malzemesi, kontrollü mekanik özelliklere sahip hidrojeller geliştirmemize olanak sağladı, buna göre ağırlıkça %1 HA-Tyr'in Young modülü ~15 kPA iken ağırlıkça %6 HA-Tyr'nin Young modülü ~52 kPA olarak bulunmuştur (Şekil 5.2). HA-Tyr ile artan konsantrasyon sonucu artan mekanik dayanım ve matris sertliği gözlemlenmiştir.

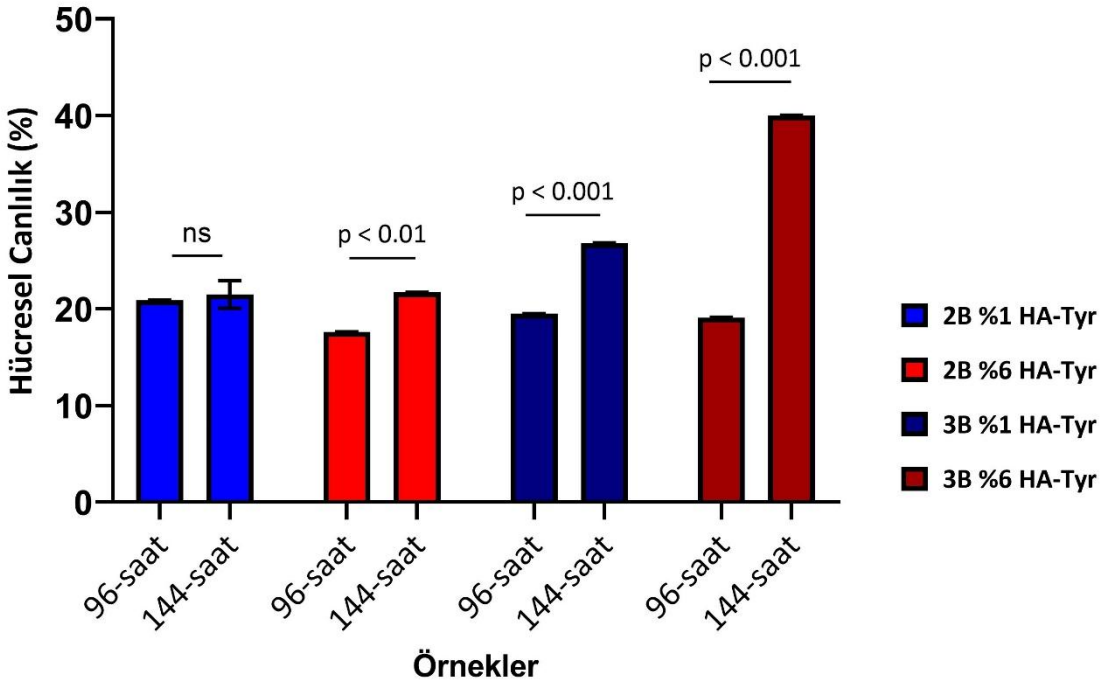


Şekil 5.2 %1 ve %6 HA-Tyr hidrojelleri için gerçekleştirilen sıkıştırma testi sonucunda elde edilen Young Modülü (kPA) değerleri

5.2 *In vitro* Hücre Kültürü

5.2.1 HA-Tyr hidrojellerinin hücresel canlılığa etkisi

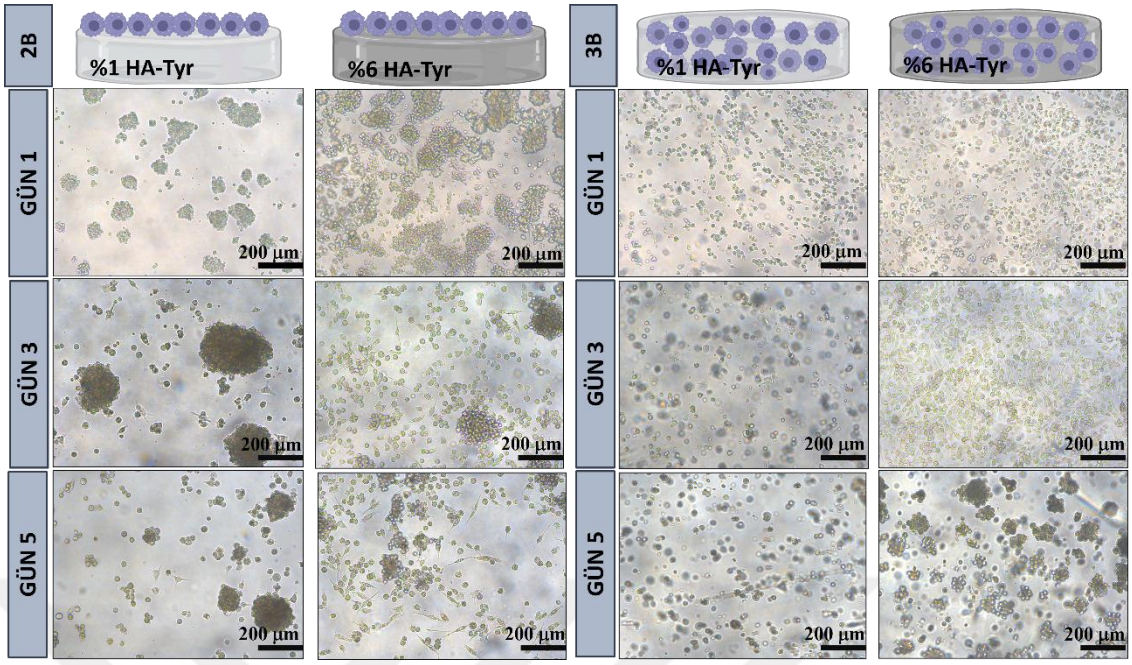
XTT reaktifi ile 2 saat boyunca inkübe edilen makrofaj hücrelerinin, %1 ve %6 HA-Tyr hidrojelleri üzerinde hücresel canlılık ve çoğalma kapasiteleri zamana bağlı (96-saat ve 144-saat) olarak XTT çoğalma testi ile incelenmiş ve sonuçlar yüzdelik olarak hesaplanmıştır (Şekil 5.3). Elde edilen sonuçlara göre, hücresel çoğalmada 2B %1 HA-Tyr'da anlamlı olmayan artış gerek 2B %6 HA-Tyr gerekse de 3B ortamda %6 HA-Tyr hidrojellerinde 96 saatten 144 saate kadar anlamlı olarak artış gözlemlenmiştir.



Şekil 5.3 HA-Tyr hidrojelleri üzerindeki (2B) ve içerisindeki (3B) makrofajların 96-saat ve 144-saat zaman noktalarında XTT testi ile belirlenen hücresel canlılık oranları

5.2.2 HA-Tyr hidrojellerinde 2B ve 3B kültürü edilen makrofajlara ait faz-kontrast mikroskopi görüntüleri

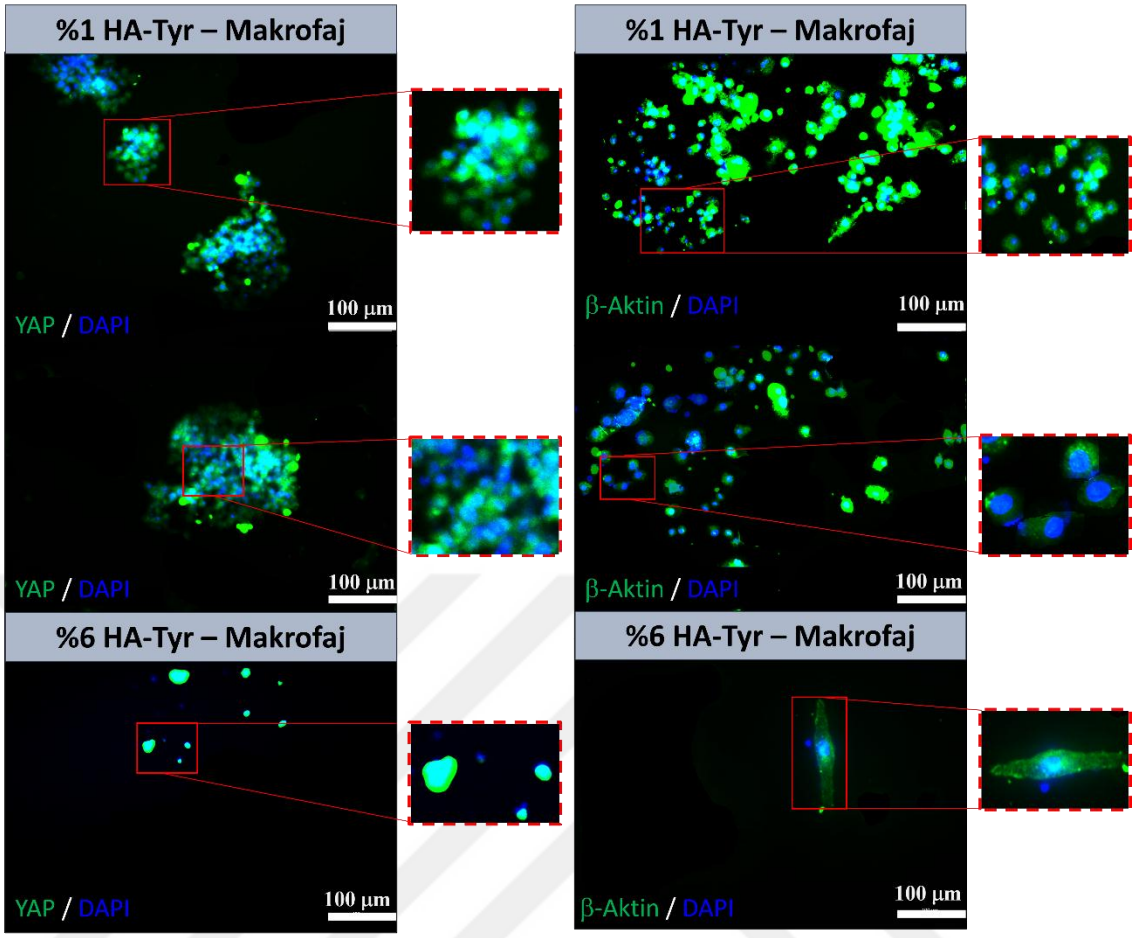
Makrofajlardaki hücre adezyonunu ve morfolojilerini değerlendirmek için %1 ve %6 HA-Tyr hidrojelleri için 2B ve 3B ortamlarda kültürün 1., 3. ve 5. günlerinde faz-kontrast mikroskop görüntüleri elde edilmiştir (Şekil 5.4). Makrofajlar %1 HA-Tyr hidrojelleri üzerindeyken 1. günde kümelenmiş bir morfoloji sergilerken 5. günde tekil ve küresel morfolojiye dönüştüğü görülmüştür. %6 HA-Tyr üzerinde bulunan makrofajlarda ise 1. günde kümelenmiş morfolojideyken, 5. günde filopodial uzantılar iledaha dağılmış bir morfolojide gözlemlenmiştir. Öte yandan makrofajlar, %1 HA-Tyr hidrojelleri içinde küresel ve tekil bir hücre morfolojisi sergilerken, %6 HA-Tyr içinde küresel ancak küçük kümelenmiş morfolojilere sahip makrofajlar olarak görüntülenmiştir.



Şekil 5.4 Makrofajların 2B ve 3B, %1 ve %6 HA-Tyr koşullarında, deneyin 1., 3. ve 5. günlerinde faz-kontrast mikroskopisi görüntüleri

5.2.3 HA-Tyr hidrojellerinde 2B kültürü edilen makrofajlara ait YAP ve β-aktin immünofloresan görüntüleri

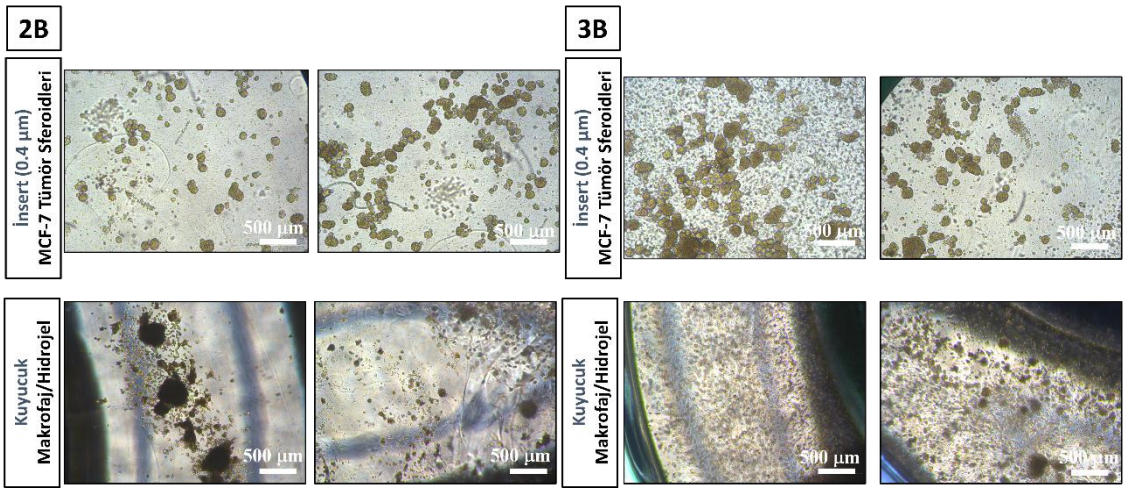
Artan matris sertliğine yanıt veren makrofajlarda YAP'ın duyarlılığını araştırmak amacıyla %1 ve %6 HA-Tyr hidrojelleri üzerinde kültürlenmiş makrofajlar için bir immünofloresan boyaması (YAP ve β-aktin) gerçekleştirildi. IF görüntüleri, yumuşak HA-Tyr hidrojelleri üzerindeki makrofajların sitoplazmasında YAP'ın yayıldığını gösterirken, sert HA-Tyr hidrojelleri üzerindeki makrofajlarda ise artan matris sertliği ile beraber ise çekirdek çevresinde YAP birikimi gözlenmiştir. Küresel hücre morfolojisi, yumuşak matris üzerinde kültürlenen makrofajlarda β-aktin boyaması ile de görüntülendi. β-aktin boyaması sayesinde ayrıca makrofajların matris sertliğine farklı tepki verdiği doğrulanmıştır; makrofajlar sert matris üzerinde uzun morfoloji oluştururken, yumuşak matriste küresel morfoloji oluşturduğu görülmüştür (Şekil 5.5).



Şekil 5.5 %1 ve %6 HA-Tyr üzerinde bulunan makrofajlardaki YAP dağılımını (yeşil), β-aktin (yeşil) ile hücrelerin morfolojisini ve DAPI (mavi) nükleer zıt boyamasını gösteren immünofloresan görüntüleri

5.2.4 Eş-kültür (Transwell) Sistemi

MCF-7 tümör sferoidleri, eş-kültür sisteminin üst bölmesinde kültürlendi, ardından meme tümörü immün mikro çevresini taklit etmek için 2-boyutlu %1 HA-Tyr ve %6 HA-Tyr, 3-boyutlu %1 HA-Tyr ve %6 HA-Tyr koşullarındaki makrofajlar ile eş kültürlendi (Şekil 5.6). Eş-kültür inkübasyon süresinden sonra, makrofajların mekanoimmün-ilişkili metabolik aktivitelerinin kanseri sferoidlerinde tümörijenezi nasıl etkilediğini araştırılmıştır.



Şekil 5.6 Eş-kültür sisteminin üst bölmesindeki MCF-7 tümör sferoidleri, ve 2B %1 HA-Tyr, 2B %6 HA-Tyr ve 3B %1 HA-Tyr, 3B %6 HA-Tyr koşullarında kültür edilen makrofajlar

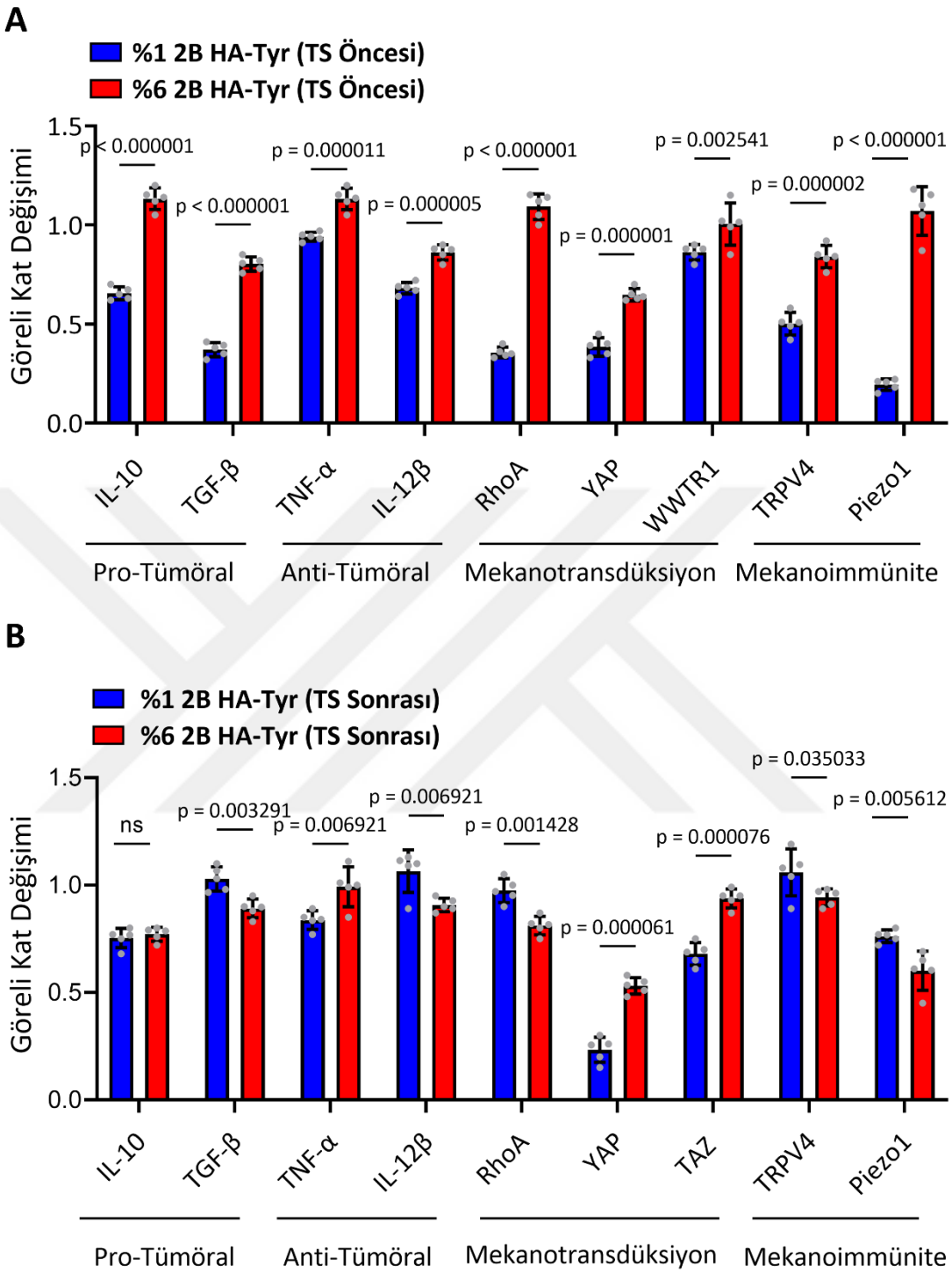
5.2.5 RT-qPCR bulguları: makrofajların HA-Tyr hidrojellerinde mekanotransdüksiyon, anti-tümöral, pro-tümöral ve mekanoimmünite ile ilişkili gen ifadelenmeleri

Meme kanseri tümör sferoidleri uygulamasından önce ve sonra, matris sertliği ve boyutsal farklılıklara yanıt olarak makrofajlardaki anti – ve pro – tümöral, mekanotransdüksiyon ve mekanoimmünitesini anlamak amacıyla pro-tümöral, anti-tümöral yanıt, mekanotransdüksiyon ve mekanoimmünite ilişkili genlerin ifadeleri, 5 günlük kültür periyodundan sonra, RT-qPCR kullanılarak değerlendirilmiştir.

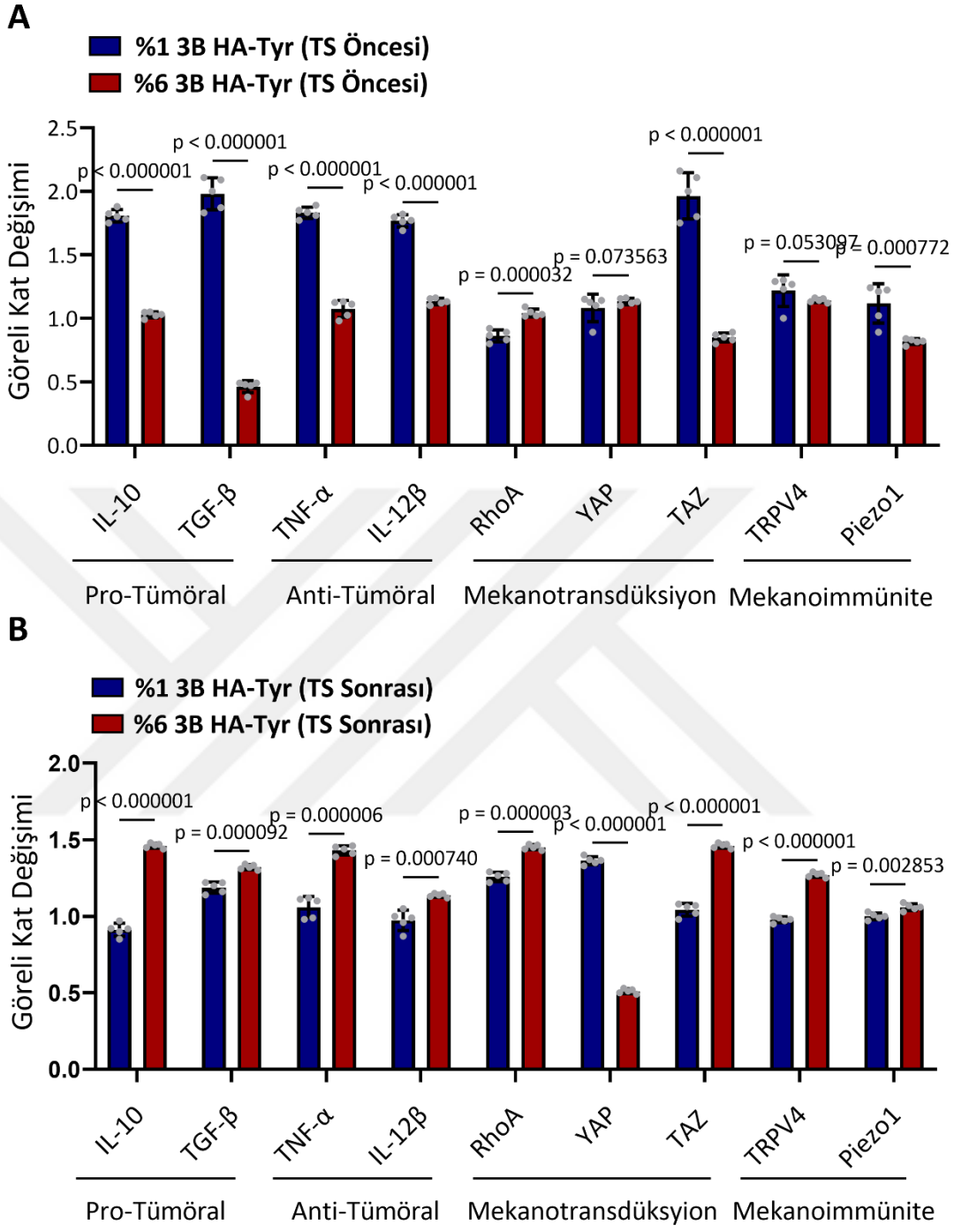
Makrofaj kültürlerinde meme kanseri tümör sferoidi indüksiyonundan önce, 2-boyutlu %1 ve %6 HA-Tyr ortamlarındaki makrofajların pro- tümöral, anti- tümöral, mekanotransdüksiyon ve mekanoimmünitesinin, artan matris sertliğine yanıt olarak önemli ölçüde daha yüksek ekspresyon olduğu gösterdiği gözlendi (Şekil 5.7.A). Meme kanseri tümör sferoidi indüksiyonundan sonra ise, 2-boyutlu %1 ve %6 HA-Tyr ortamlarındaki makrofajların artan matris sertliği ile beraber pro- tümöral aktivitesinde azalma görülürken, anti-tümöral aktivitesinde toplam bir artış gözlemlenmiştir. Mekanotransdüksiyon yolaklarından YAP ve TAZ artarken, makrofaj motilitesinden sorumlu RhoA'da azalma gözlenmiştir ve mekanoimmünite belirteçleri Trpv4 ve Piezo1 de makrofajlarda azalan hareket sonucunda azaldığı gözlemlenmiştir (Şekil 5.7.B).

3-boyutlu %1 ve %6 HA-Tyr ortamlarındaki makrofajlarda, hem pro – tümöral hem de anti – tümöral yanıtlarının, artan sertlikle birlikte önemli ölçüde daha düşük ifade edildiği görülmüştür . Makrofajların 3B ortamında mekanotransdüksiyon ilişkili RhoA'nın artan matris sertliği ile önemli ölçüde yukarı regülasyonu, YAP'ta önemli olmayan değişiklik ve TAZ'da aşağı regülasyonu şeklinde gözlenmiştir. Mekanoimmünite ilişkili TRPV4 anlamlı olmayan bir şekilde azalırken Piezo1, hidrojellerin artan sertliğiyle beraber makrofajlarda önemli ölçüde azaldığı görülmüştür (Şekil 5.8.A).

Tümör sferoid indüksiyonundan sonra, 3-boyutlu %1 ve %6 HA-Tyr ortamlarındaki makrofajların pro- ve anti – tümöral tepkileri, artan sertlikle birlikte önemli ölçüde daha yüksek ifade edildiği görülmüştür. Mekanotransdüksiyon ilişkili gen ekspresyonlarına bakıldığında, artan matris sertliği sonucunda RhoA ve TAZ'ın önemli ölçüde yukarı regülasyonu ile YAP'ın aşağı regülasyonu olarak gözlenmiştir. 3B ortamdaki makrofajlarda mekanoimmünite genleri TRPV4 ve Piezo1, tümör sferoidi indüksiyonundan sonra, artan matris sertliği ile artan ifadelenme göstermiştir (Şekil 5.8.B).



Şekil 5.7 %1 HA-Tyr – %6 HA-Tyr hidrojelleri üzerinde (2B) kültür edilen makrofaj hücrelerinin (A) tümör sferoidleri ile eş kültürü öncesi ve (B) sonrası pro-tümöral, anti-tümöral, mekanotransdüksiyon ve mekanoimmünite ilişkili gen ekspresyonlarına ait RT-qPCR grafikleri



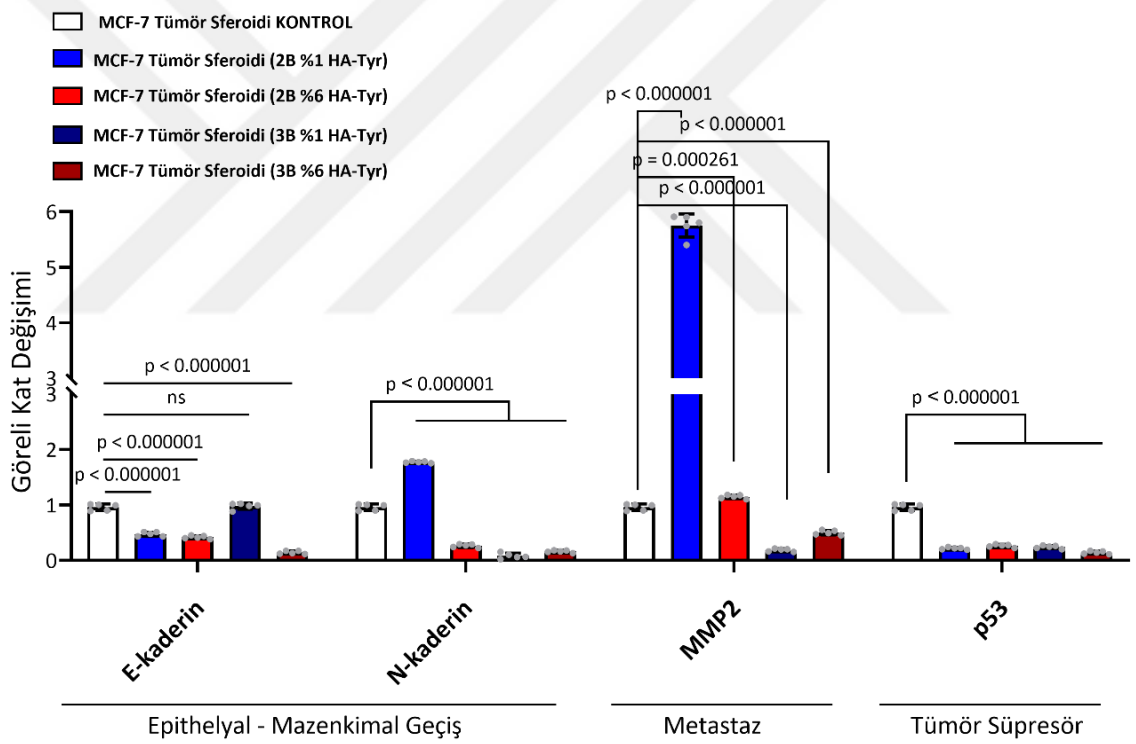
Şekil 5.8 %1 HA-Tyr – %6 HA-Tyr hidrojelleri içine (3B) kültür edilen makrofaj hücrelerinin (A) tümör sferoidleri ile eş kültürü öncesi ve (B) sonrası pro-tümöral, anti-tümöral, mekanotransdüksiyon ve mekanoimmünite ilişkili gen ekspresyonlarına ait RT-qPCR grafikleri

Eş kültür inkübasyon süresinden sonra, makrofajların mekanoimmün aktivitelerinin meme kanseri sferoidlerinde tümörijenezi nasıl etkilediğini araştırmak için E-kaderin, N-kaderin, MMP-2 ve p53 gen ekspresyonları incelenmiştir. Makrofaj kültürleriyle eş kültürlenmeyen MCF-7 sferoidleri kontrol olarak kullanılarak, 2-boyutlu %1 – %6 HA-Tyr ve 3-boyutlu %1 – %6 HA-Tyr ortamlarındaki makrofajlar ile eş kültürlenen MCF-7 tümör sferoidleri ile gen ekspresyon analizleri gerçekleştirilmiştir.

E-kaderin ifadelenmesinin 2-boyutlu %1 – %6 HA-Tyr ve 3-boyutlu %6 HA-Tyr ortamlarındaki makrofajlar ile eş kültürlenen MCF-7 tümör sferoidlerinde kontrole kıyasla önemli ölçüde aşağı regüle edildiği görülürken, 3-boyutlu %1 HA-Tyr ortamındaki makrofajlar ile eş kültürlenen MCF-7 tümör sferoidlerinde, kontrole göre önemli ölçüde fark olmadığı görülmüştür. N-kaderin, 2boyutlu %6 HA-Tyr, 3-boyutlu %1 HA-Tyr, 3-boyutlu %6 HA-Tyr ortamlarındaki makrofajlar ile eş kültürlenen MCF-7 tümör sferoidlerinde önemli ölçüde aşağı regüle edilmiştir. 2-boyutlu %1 HA-Tyr ortamındaki makrofajlar ile eş kültürlenen MCF-7 tümör sferoidinde, N-kaderin yukarı regüle edildiği görülmüştür.

Kanserde E-kaderinin aşağı regüle ve N-kaderinin yukarı regüle edilmesi epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT) olduğunu işaret etmektedir (Loh vd., 2019). Eş-kültür sisteminde, kontrole kıyasla 2-boyutlu %1 ve %6 HA-Tyr ayrıca 3-boyutlu %6 HA-Tyr ortamındaki makrofajlarla eş kültürlenen tümör sferoidlerinde azalan E-kaderin ifadelenmesi tespit edilmiştir. N-kaderin ifadelenmeleri 2-boyutlu %1 HA-Tyr ortamındaki makrofajlar ile eş kültürlenen tümör sfroidlerinde kontrole kıyasla artan ifadelenme sergilerken, 2-boyutlu %6 HA-Tyr, 3-boyutlu %1 ve %6 HA-Tyr ortamındaki makrofajlar ile eş kültürlenen tümör sfroidlerinde azalan ifaladelenme göstermiştir. Son olarak, E-kaderin ve N-kaderin oranlarına bakıldığında %1 HA-Tyr matrisi içerisindeki (3B) ve %6 HA-Tyr matrisi üzerindeki (2B) makrofajlarla eş kültürlenen tümör sferoidlerinde E-kaderin ifadelenmesi yukarı regüle edilirken N-kaderin ifadelenmesinden aşağı regüle edildiği görülmüştür.

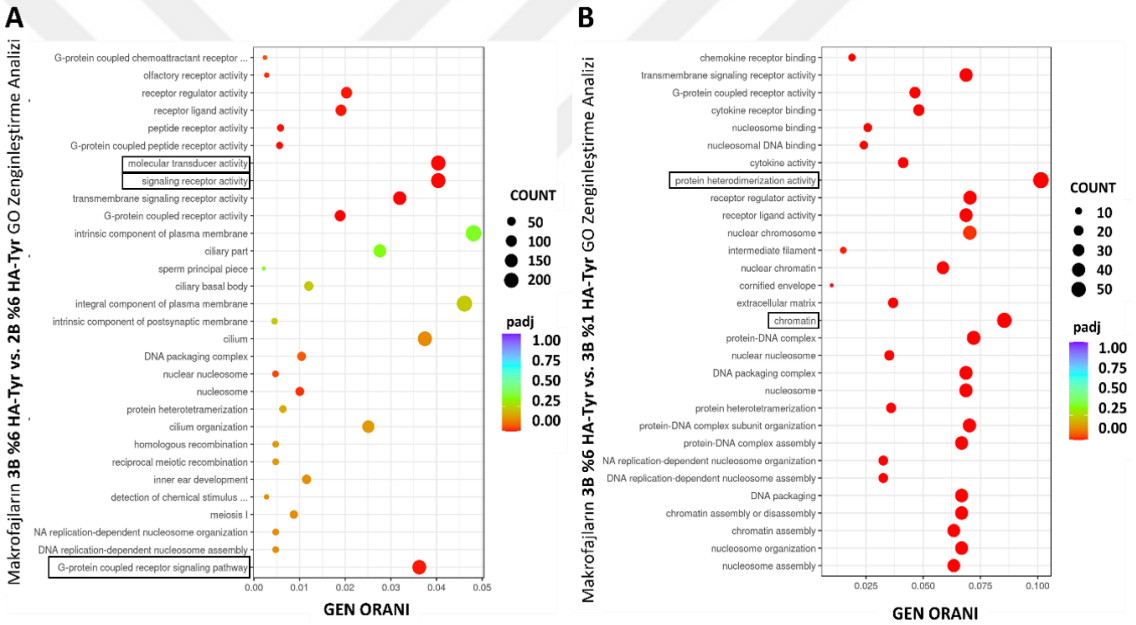
MMP2, kanser hücrelerinde saldırganlığı, invazyonu ve anjiyogenezi teşvik ettiğinden meme kanserindeki metastatik kaskadlarda önemli bir role sahiptir (Egeblad ve Werb, 2002). Kontrole kıyasla, 2-boyutlu %1 ve %6 HA-Tyr ortamlarındaki makrofajlar ile eş kültürlenen tümör sferoidlerinde, MMP-2 önemli ölçüde yukarı regüle edilirken, 3-boyutlu %1 ve %6 HA-Tyr ortamlarındaki makrofajlar ile eş kültürlenen tümör sferoidlerinde aşağı regüle edildiği görülmüştür. 2-boyutlu HA-Tyr kültür ortamında bulunan makrofajlarla eş kültürlenen tümör sferoidlerinde, artan matris sertliği ile beraber, azalan MMP-2 ifadelenmesi görülürken, 3-boyutlu HA-Tyr kültür ortamında bulunan makrofajlarla eş kültürlenen tümör sferoidlerinde artan matris sertliği ile beraber artan MMP-2 ifadelenmesi görülmüştür.



Şekil 5.9 Etkileşimsiz kontrol MCF-7 tümör sferoidlerine kıyasla 2B %1, 2B %6, 3B %1 ve 3B %6 HA-Tyr ortamlarındaki makrofajlarla eş kültürlenen MCF-7 tümör sferoidlerinde epitelyal-mezenkimal geçiş belirteçleri olarak N-kaderin ve E-kaderin, meme kanseri metastazı belirteci MMP2 ve tümör süpresör belirteci p53'ün analizlerine ait RT-qPCR grafikleri

5.2.6 Transkriptomiks

Makrofajlarda hücre kültürünün boyutsal etkisini araştırmak adına sert matriste ve 2B/3B koşullarında kültür edilen hücrelerin transkriptomları kıyaslanarak gen ontoloji çalışması gerçekleştirilmiştir. Buna göre, moleküler transdüser aktivitesi, sinyal reseptör aktivitesi ve G-protein bağlı reseptör yolağı ile ilişkili genlerin ifadelenmesinin arttığı gözlemlendi (Şekil 5.10.A). Makrofajlarda matris sertliği etkisi incelemesi içinse 3B koşullarda yumuşak ve sert HA-Tyr matrisler kıyaslanarak gen ontoloji çalışması yapılmıştır. Protein heterodimerizasyon aktivitesi ve kromatin ile ilişkili genlerin oranları önemli ölçüde farklılaştığı tespit edilmiştir (Şekil 5.10.B).

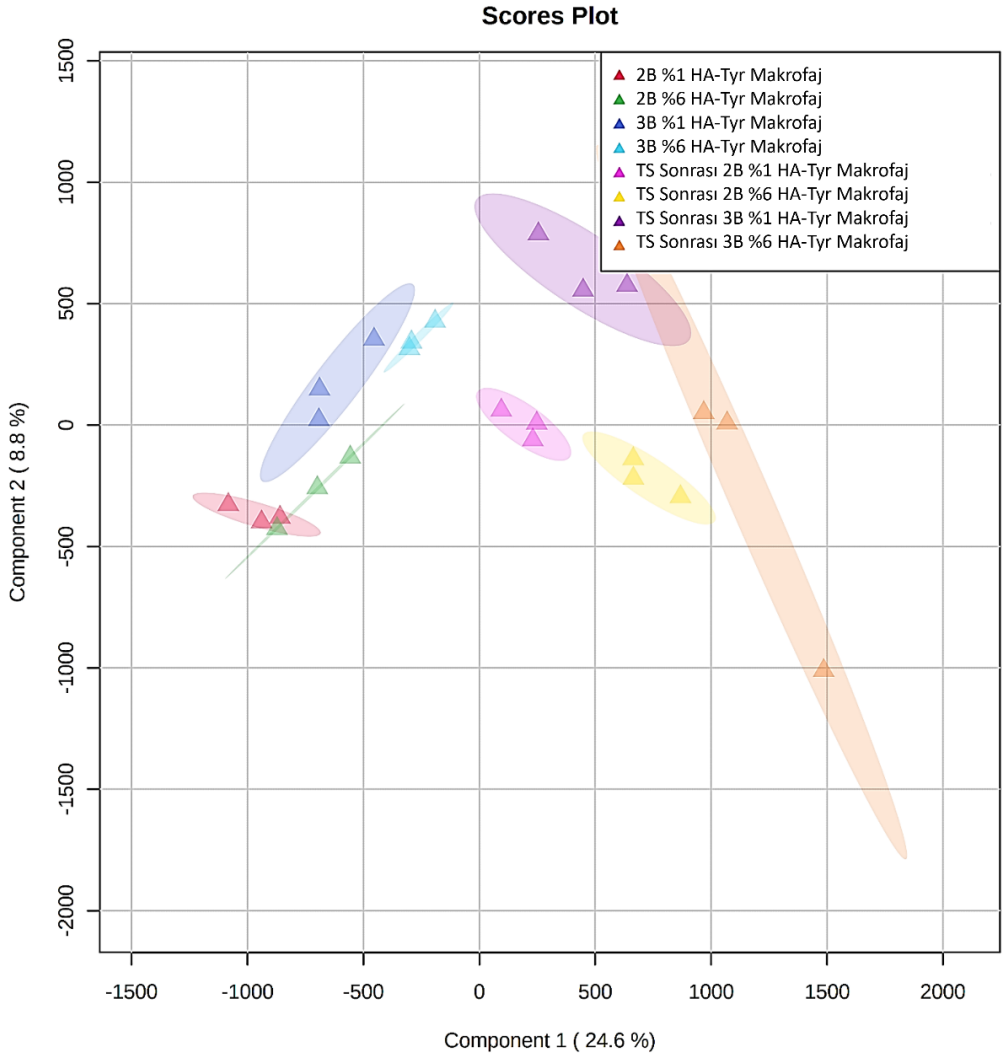


Şekil 5.10 Makrofajların (A) 3B %6 HA-Tyr – 2B %6 HA-Tyr ve (B) 3B %6 HA-Tyr – 3B %1 HA-Tyr gruplarında karşılaştırmalı transkriptomlarının GO zenginleştirme analizi

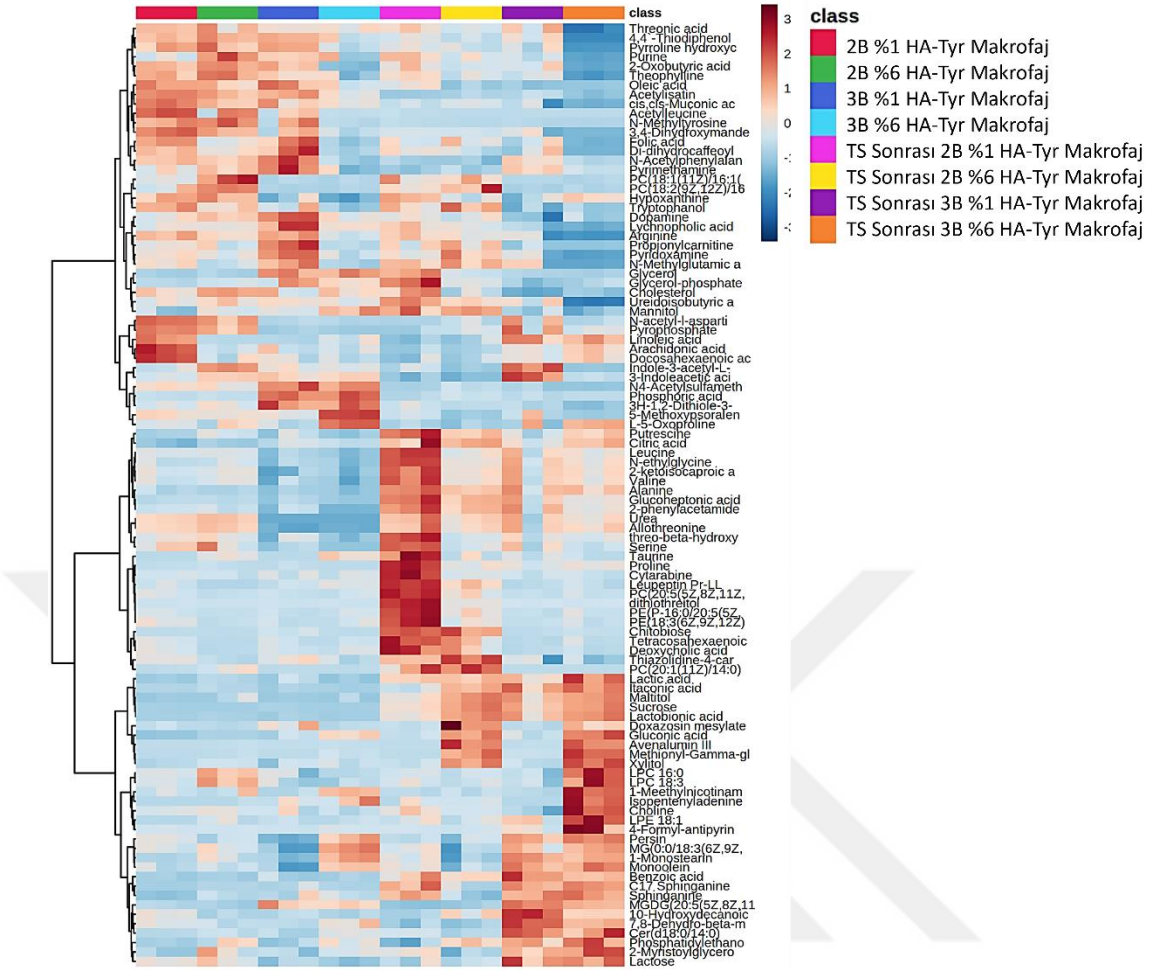
5.2.7 Metabolomiks

Makrofaj plastisitesinin metabolomik mekanizmalarını belirlemek için, %1 HA-Tyr (yumuşak) ve %6 HA-Tyr (sert) hidrojeller üzerindeki (2B) ve içindeki (3B) makrofajların ve ayrıca meme kanseri tümör sferoidleri ile eş-kültürlenen makrofajlarda metabolomda meydana gelen değişimin etkisi sıvı kromatografisi (GC-MS) ve ayrıca

dört kutuplu uçuş süresi kütle spektrometrisi (LC-qTOF-MS) ile kapsamlı bir şekilde incelendi. Kısmi en küçük kareler ayrım analizi (PLS-DA) skor grafikleri ile gösterildiği üzere, meme kanseri sferoidleri ile indüklenen ve indüklenmeyen, 2B/3B yumuşak (%1 HA-Tyr) ve sert (%6 HA-Tyr) kültür ortamlarının metabolik profilleri arasında kesin bir ayrım gözlemlenmiştir (Şekil 5.11). Hiyerarşik küme analizi (sıcaklık haritası) ile tüm gruplar arasında en çok farklılaşan 100 metabolit profilinin sıcaklık haritası oluşturulmuş ve gruplar arasında belirgin olarak farklılaşan metabolitler gözlenmiştir (Şekil 5.12).



Şekil 5.11 2B %1 HA-Tyr (kırmızı), 2B %6 HA-Tyr (yeşil), 3B %1 HA-Tyr (Mavi), 3B %6 HA-Tyr (Turkuaz) koşullarındaki makrofajların ve tümör sferoidleriyle eş kültüründen sonra makrofajların 2B %1 HA-Tyr (Pembe), 2B %6 HA-Tyr (Sarı), 3B %1 HA-Tyr (Mor), 3B %6 HA-Tyr (Turuncu) PLS-DA grafiği



Şekil 5.12 2B %1 HA-Tyr, 2B %6 HA-Tyr, 3B %1 HA-Tyr, 3B %6 HA-Tyr koşullarındaki makrofajların ve tümör sferoid uygulamasından sonra 2B %1 HA-Tyr, 2B %6 HA-Tyr, 3B %1 HA-Tyr, 3B %6 HA-Tyr koşullarındaki makrofajlarda en çok fark yaratan ilk 100 metabolitin hiyerarşik küme analizi (sıcaklık haritası)

5.2.7.1 Çeşitli matris koşullarına yanıt olarak makrofaj metabolomunun plastisitesi

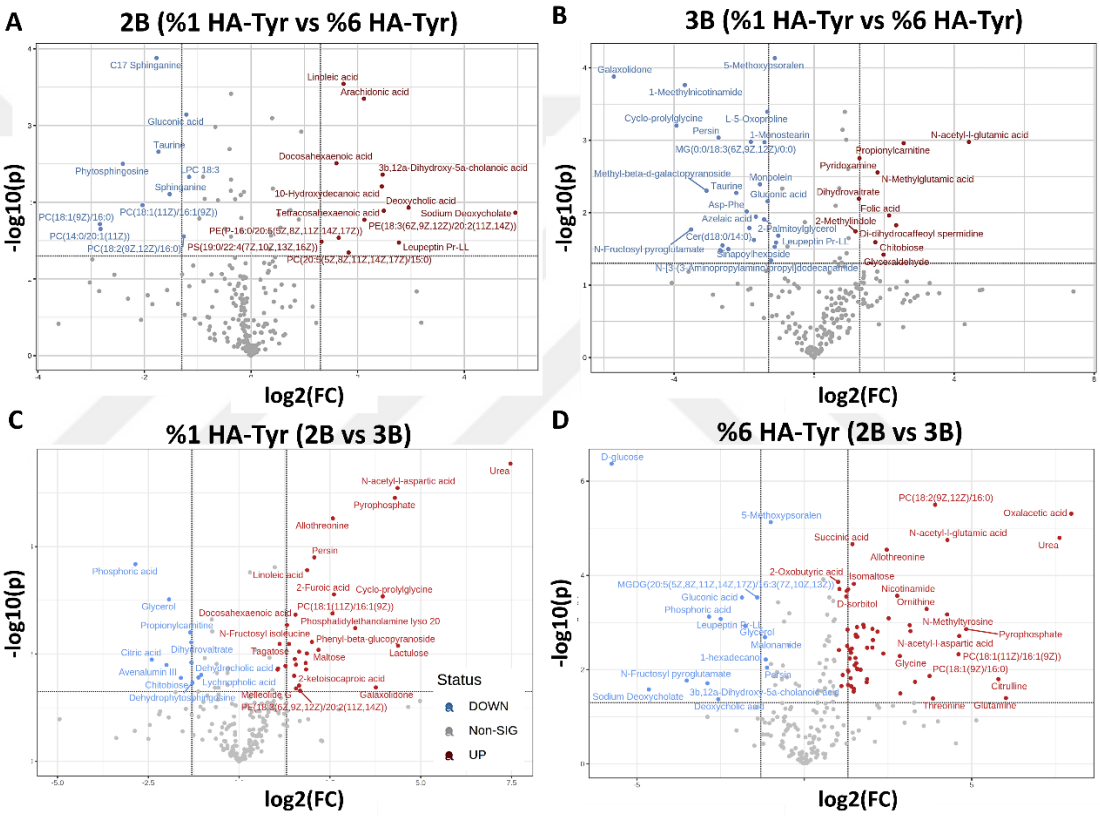
%1– %6 HA-Tyr hidrojellerinde 2B ve 3B koşullarda kültürlenen makrofajlardaki farklılaşan metabolitlerin karşılaştırmasını gösteren yanardağ grafikleri, makrofaj metabolom profillerinin matris koşullarına bağlı değişimi hakkında ayrıntılı bir analizini sunmak amacıyla oluşturuldu (Şekil 5.13). Matris sertliğinin makrofajlardaki metabolik değişiklikler üzerindeki etkisini anlamak için %1 ve %6 HA-Tyr üzerinde (2B) kültür edilen makrofajların metabolomları karşılaştırılmıştır.. Lipid metabolizmasının yeniden programlanmasıyla ilgili metabolitlerin (örn. Araşidonik asit ve PE (18:3/20: 2,

fosfatidilserin (PS) (19:0/22:4), Fosfatidiletanolamin (PE) (P-16:0/20:5)), Fosfatidilkolin (PC) (20:5 /15:0)) artan matriks sertliği ile (%6 HA-Tyr) ağırlıklı olarak yukarı regüle edildiği görülmüştür. Yağ asidi metabolizması (örn. Linoleik asit, Dokosaheksaenoik asit) ve kolesterol metabolizması (örn. 3b, 12a – Dihidroksi – 5a – kolanoik asit, 10 hidroksidekanoik asit) ile ilgili metabolitlerin ise yukarı regülasyonu tespit edilmiştir (Şekil 5.13.A). Yolak etki analizine göre, bir yağ asidi metabolizması olarak bilinen linoleik asit ve gliserofosfolipid metabolizması yolaklarının 2B kültür ortamındaki makrofajlarda artan matris sertliğiyle yeniden düzenlendiği doğrulandı (Çizelge 5.1).

%1 HA-Tyr matris içindeki (3B) makrofajlar %6 HA-Tyr matris içindeki makrofajlar ile karşılaştırıldığında ise, amino asit metabolizması yeniden programlamayla ilişkili metabolitlerin (örn. N-asetil-L-glutamik asit, N-metil glutamik asit, Folik asit) yanında enerji (örn. Propiyonilkarnitin) ve karbonhidrat metabolizması (örn. Gliseraldehit) ilişkili metabolitler de yukarı regüle edilmiştir (Şekil 5.13.B). Yolak etki analizine göre de arjinin metabolizması, valin, lösin ve izolösin, amino asit metabolizma yolakları, ağırlıklı olarak 3B ortamdaki makrofajlarda artan matris sertliğine yanıt olarak aktive edildiği görülmüştür (Çizelge 5.1).

Hücre kültürü matris boyutsallığının makrofaj metabolik değişiklikler üzerindeki belirlemek için, öncelikle %1 HA-Tyr matrisi üzerinde (2B) ve içinde (3B) kültürlenen makrofajlar karşılaştırılmıştır. Amino asit metabolizmasının yukarı regülasyonu (örn. kaproik asit, Üre) ve lipit metabolizması (örn. PC (18:1/16:1), Fosfatidiletanolamin lizo 20, PE (18:3 /20:2)) metabolitleri %1 HA-Tyr 2B'tan 3B'a geçince yukarı regüle edildiği görülmüştür ve karbonhidrat metabolizmasının yeniden programlanması (örn. Maltoz, Laktüloz, Tagatoz) ve yağ asidi metabolizmasının yeniden programlanmasıyla ilişkili metabolitlerin (pirofosfat, linoleik asit) 2B'tan 3B'a farklılaştığı da tespit edilmiştir (Şekil 5.13.C). Yolak etki analizine bakıldığında, yağ asidi metabolizma yolakları olarak linoleik asit metabolizmasının yumuşak (%1 HA-Tyr) matrisin 2B kültür ortamından 3B kültür ortamına makrofajlarda yeniden programlandığı gözlemlenmiştir (Çizelge 5.1). %6 HA-Tyr üzerinde (2B) ve içinde (3B) kültürlenen makrofajlar karşılaştırıldığında ise, amino asit metabolizmasının yeniden

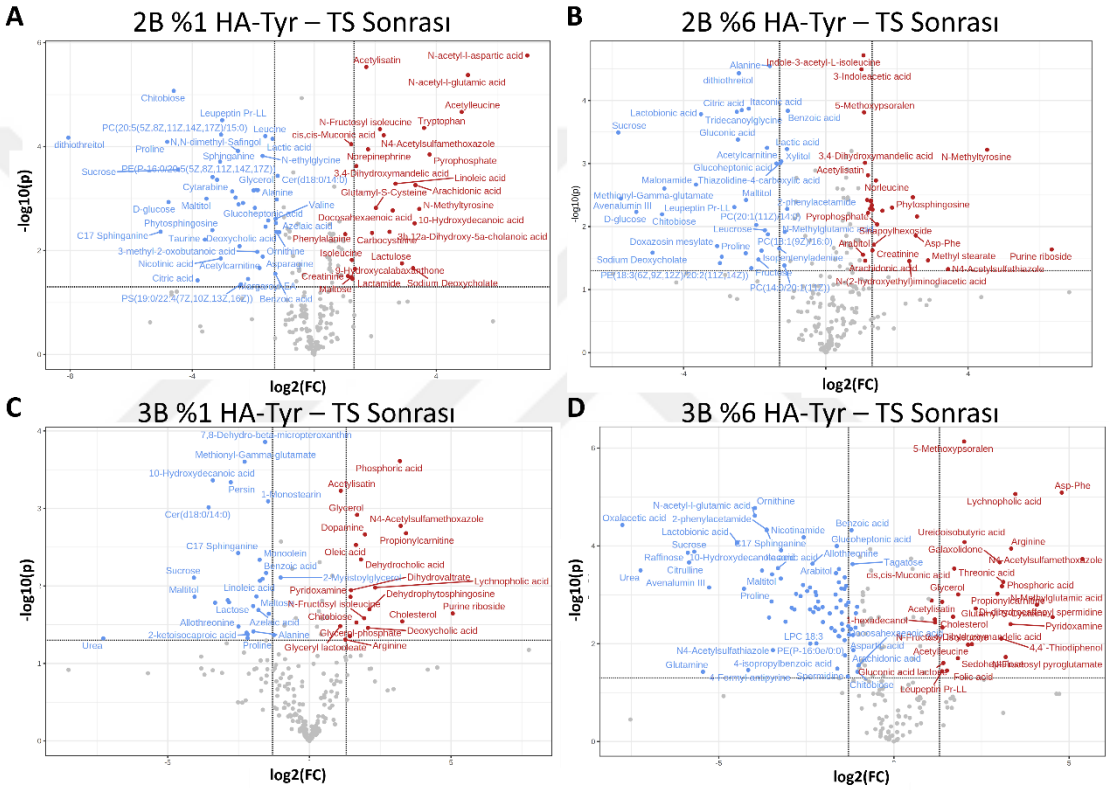
programlanmasıyla ilgili metabolitler (örn. Oksaloasetik asit, Oksobütirik asit, N-metiltirozin, N-asetil-L-aspartik asit, Glutamin, Allotreonin, Treonin), ayrıca enerji metabolizması (örn. İzomaltoz, D-sorbitol ve Nikotinamid) yeniden programlama metabolitleri 2B'tan 3B'a yukarı regüle edildiği anlaşılmıştır (Şekil 5.13.D). Yolak etki analizine bakıldığında, makrofajların %6 HA-Tyr 2B kültüründen 3B kültürüne, arjinin, aminoaçil-tRNA ve valin, lösin ve izolösin biyosentezi metabolizma yolaklarının uyarıldığı tespit edilmiştir (Çizelge 5.1).



Şekil 5.13 Makrofajlarda çeşitli matris koşullarına göre önemli ölçüde yukarı ve aşağı regüle edilen metabolitleri içeren yanardağ grafikleri; (A) 2B %1 – %6 HA-Tyr, (B) 3B %1 – %6 HA-Tyr, (C) %1 HA-Tyr 2B – 3B, ve (D) %6 HA-Tyr 2B – 3B

5.2.7.2 Tümör sferoidi etkisi altında çeşitli matris koşullarına yanıt olarak makrofaj metabolom analizi

Değişen matris koşullarının yanında MCF-7 tümör sferoid indüksiyonu altındaki makrofaj metabolom yeniden programlama mekanizmalarını araştırmak için, 2-boyutlu ve 3-boyutlu, %1 ve %6 HA-Tyr ortamlarındaki makrofajlarda değişen metabolitlerin ikili karşılaştırmasını içeren yanardağ grafikleri oluşturulmuştur (Şekil 5.14).



Şekil 5.14 Makrofajlarda farklı matris koşullarında meme kanseri tümör sferoidi uygulamasından önce ve sonra önemli ölçüde yukarı ve aşağı regüle edilen metabolitleri içeren yanardağ grafikleri; (A) 2B %1 HA-Tyr – TS Sonrası (B) 2B %6 HA-Tyr – TS Sonrası, (C) 3B %1 HA-Tyr – TS Sonrası ve (D) 3B %6 HA-Tyr – TS Sonrası

Makrofajlardaki metabolik değişikliklerde tümör oluşumunun etkisini araştırmak için, %1 HA-Tyr üzerindeki (2B) makrofajların, meme kanseri tümör sferoidi öncesi ve sonrası olarak karşılaştırılmıştır. Amino asit metabolizmasının yeniden programlanmasıyla ilgili metabolitlerin (örn. N-asetil-L-aspartik asit, N-asetil-L-glutamik asit, Asetilisatin, Asetil lösin, Triptofan, N-fruktosil izolösin, Glutamil-S-

Sistein, İzolösin, Fenilalanin, Karbosistein) yukarı regüle edildiği görülmüştür (Şekil 5.14.A). Yolak etki analizi sonuçlarında valin, lösin ve izolösin metabolizma yolağının ağırlıklı olarak yumuşak matris üzerine kültürlü makrofajlarda meme kanseri tümörü sferoidinin indüksiyonu sonrası stimüle edildiği doğrulanmıştır (Çizelge 5.1).

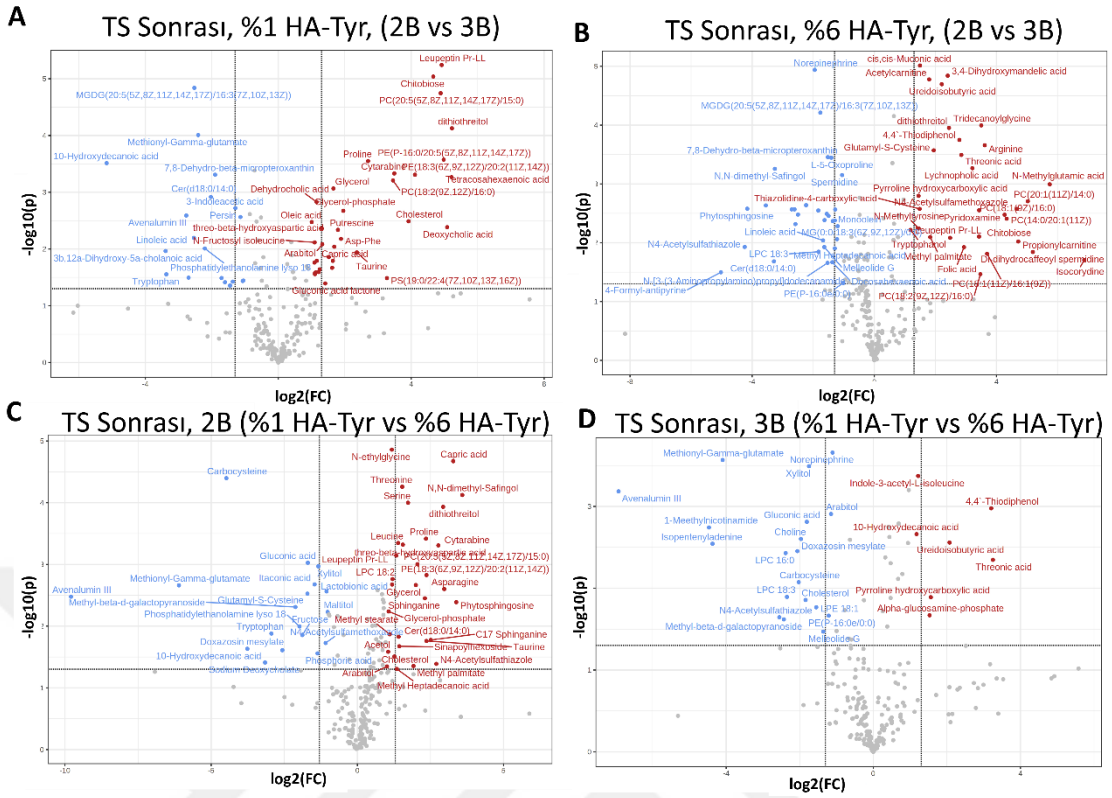
%6 HA-Tyr üzerindeki (2B) makrofajların meme kanseri tümör sferoidi öncesi ve sonrası olarak karşılaştırıldığında ise, amino asit metabolizmasının yeniden programlanmasıyla ilgili metabolitlerin (örn. İndol-3-asetil-L-izolösin, 3-indolasetik asit, aspartil-fenilalanin, kreatinin, pürin ribosit, N-(2 hidroksietil) iminodiasetik asit) yanında yağ asidi metabolizmasının yeniden programlanmasıyla ilgili (örn. Fitosfingosin, Araşidonik Asit, Metil Stearat, pirofosfat) metabolitler yukarı regüle edilmiştir (Şekil 5.14.B). Yolak etki analizine göre, alanin, aspartat ve glutamat amino asit metabolizması ve yağ asidi metabolizması meme kanseri tümör sferoidi uygulaması sonrasında sert matris üzerindeki makrofajlarda ağırlıklı olarak uyarılan yolaklardır (Çizelge 5.1).

%1 HA-Tyr matris içinde (3B) kültürlenen makrofajlar meme kanseri tümör sferoid uygulamasının ardından, amino asit metabolizmasının yeniden programlanmasıyla ilişkili ve kolesterol metabolizması metabolitlerinin (örn., Fosforik Asit, Gliserol, N4-Asetilsülfametoksazol, Oleik Asit, Piridoksamin, N-Fruktosil İzolösin, Kolesterol, Pürin Ribosit, Arjinin, Gliserol Fosfat) yukarı regüle edildiği görülmüştür (Şekil 5.14.C). Yolak etki analizi ile, meme kanseri tümör sferoidinden sonra yumuşak matris içinde kültürlü makrofajlarda ağırlıklı olarak arjinin metabolizma yolaklarının uyarıldığı doğrulanmıştır (Çizelge 5.1). Bunun yanında, %6 HA-Tyr matris içinde (3B) kültürlenen makrofajlarda, amino asit metabolizması ilgili metabolitlerin (örn., Arjinin, aspartil-fenilalanin, Treonik Asit, N-Metil Glutamik Asit, Folik Asit, Piridoksamin, Asetil Lösin, Asetilisatin) yukarı regüle edilmiş olduğu görülmüştür (Şekil 5.14.D). Meme kanseri tümör sferoidleri sonrası sert matris içindeki kültürlü makrofajlarda aminoaçil-tRNA, valin, lösin ve izolösin ve arjinin metabolizması yolaklarının uyarıldığı yolak etki analizi sonuçlarıyla desteklendi (Çizelge 5.1).

Meme kanseri sferoidi uygulamasından sonra makrofajlardaki metabolik değişiklikler üzerindeki boyutsal etkiyi belirlemek için, %1 HA-Tyr hidrojeli üzerinde (2B) ve içinde (3B) kültürlenen makrofajlar, meme kanseri tümör sferoidleri ile eş kültürleri sonrasında karşılaştırılmıştır. Yağ asidi metabolizmasına ait metabolitler (örn. PE (18:3/20:2), Gliserol, Gliserol Fosfat, PC (20:5/15:0), PS (19:0/22:4), PE(P-16:0/20:5), Dehidrokolik Asit, Kaprik Asit, Oleik Asit, Tetrakosaheksaenoik Asit) ve amino asit metabolizmasına ait metabolitler (N-fruktosil-beta-hidroksi aspartik asit, N-fruktosil izolösin, prolin) yukarı regüle edildiği tespit edildi (Şekil 5.15.A). Bunların, yağ asidi metabolizması yeniden programlama yolaklarından linoleik asit metabolizması ve aminoaçil-tRNA biyosentezi ile ilgili olduğu yolak etki analizi ile ortaya çıkarıldı (Çizelge 5.1).

Meme kanseri tümör sferoidi uygulamasından sonra boyutsal etkiyi belirlemek için, %6 HA-Tyr hidrojeli ile üzerinde (2B) ve içinde (3B) kültürlenen makrofajlar ise, yağ asidi metabolizmasıyla ilişkili metabolitlerin (PC (18:1/16:1), PC (14:0/20:1), PC (20:1/14:0), PC (18:1/16:0), PC (18:2/16:0), Tridecanoylglycine) yukarı regüle edildiği görülmüştür (Şekil 5.15.B). Yolak etki analizi aracılığıyla doymamış yağ asidi ve linoleik asit metabolizmalarının biyosentezi doğrulanmıştır (Çizelge 5.1).

Tümör sferoidleri ile eş kültürlenen makrofajlarda meydana gelen metabolik değişiklikler üzerinde matris sertliğinin etkisini ortaya çıkartmak için %1 ve %6 HA-Tyr üzerinde (2B) kültür edilen makrofajların metabolomları karşılaştırılmıştır ve yanardağ grafikleri oluşturulmuştur. Lipid metabolizmasının yeniden programlanmasıyla ilişkili metabolitlerin (örn. PC (20:5/15:0), PE (18:3/20:2), Lizofosfadilkolin LPC (18:2), Gliserol, Fitosfingosin, Sfinganin, Gliserol-Fosfat, C17 Sfinganin, Kolesterol, Metil Palmitat) yukarı regüle edildiği gözlemlenmiştir. Bu doğrultuda yolak etki analizi yoluyla, sfingolipid ve gliserofosfolipid metabolizmaları bulunmuştur (Çizelge 5.1). Bu etki 3B ortamda incelendiğinde ise amino asit metabolizmasının yeniden programlanmasıyla ilişkili metabolitlerin yukarı regüle edildiği görülmüştür (Şekil 5.15.D). Yolak etki analizi sonuçlarında, valin, lösin ve izolösin biyosentezi ve glisin, serin ve treonin metabolizmaları tespit edilmiştir (Çizelge 5.1).



Şekil 5.15 Makrofajlarda meme kanseri tümör sferoidleriyle eş-kültüründen sonra farklı matris koşullarında önemli ölçüde yukarı ve aşağı regüle edilen metabolitleri içeren yanardağ grafikleri; (A) TS Sonrası 2B %1 HA-Tyr – 3B %1 HA-Tyr (B) TS Sonrası 2B %6 HA-Tyr – 3B %6 HA-Tyr, (C) TS sonrası 2B %1 HA-Tyr – 2B %6 HA-Tyr, ve (D) 3B %1 HA-Tyr – %6 HA-Tyr

Çizelge 5.1 Yolak etki analizi bulguları

Örnek	Etkilediği Metabolik Yolaklar
Makrofaj **2B %1 HA-Tyr vs. 2B %6 HA-Tyr**	▪ Linoleik Asit Metabolizması ▪ Gliserofosfolipid Metabolizması
Makrofaj **3B %1 HA-Tyr vs. 3B %6 HA-Tyr**	▪ Valine, Lösin ve İzolösin Biyosentezi ▪ Arjinin Biyosentezi
Makrofaj **2B %1 HA-Tyr vs. 3B %1 HA-Tyr**	▪ Linoleik Asit Metabolizması

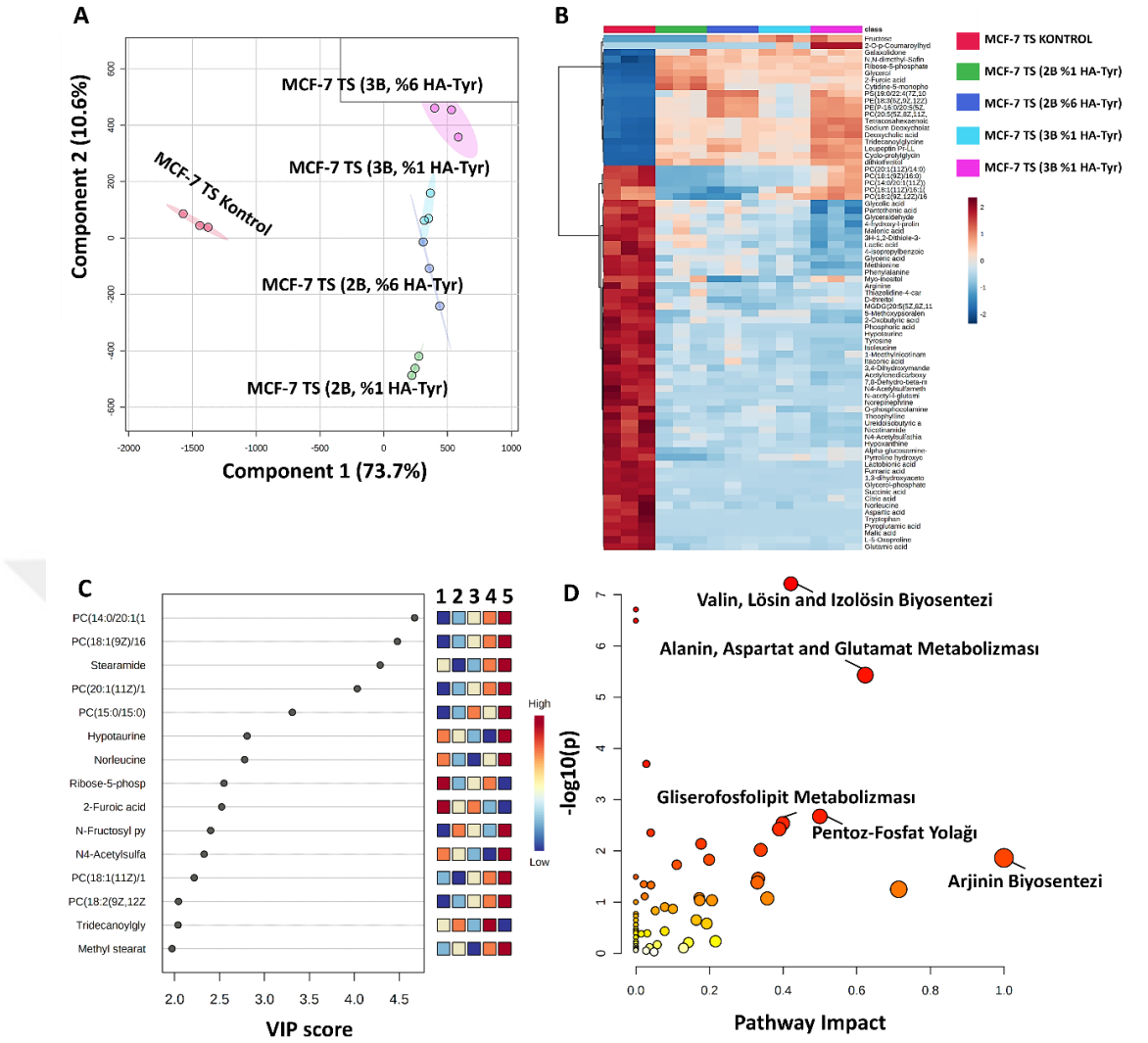
Çizelge 5.2 Yolak etki analizi bulguları (devam)

Örnek	Etkilediği Metabolik Yolaklar
Makrofaj **2B %6 HA-Tyr vs. 3B %6 HA-Tyr**	▪ **Arjinin Biyosentezi** ▪ **Aminoaçil-tRNA Biyosentezi** ▪ **Valine, Lösin ve İzolösin Biyosentezi**
Makrofaj **2B %1 HA-Tyr vs. TS Sonrası 2B %1 HA-Tyr**	▪ Valine, Lösin ve İzolösin Biyosentezi
Makrofaj **2B %6 HA-Tyr vs. TS Sonrası 2B %6 HA-Tyr**	▪ Alanin, Aspartat ve Glutamat Metabolizması ▪ Yağ Asidi Metabolizması
Makrofaj **3B %1 HA-Tyr vs. TS Sonrası 3B %1 HA-Tyr**	▪ Arjinin Biyosentezi
Makrofaj **3B %6 HA-Tyr vs. TS Sonrası 3B %6 HA-Tyr**	▪ Arjinin Biyosentezi ▪ Aminoaçil-tRNA Biyosentezi ▪ Valine, Lösin ve İzolösin Biyosentezi
Makrofaj TS Sonrası **2B %1 HA-Tyr vs. 3B %1 HA-Tyr**	• Aminoaçil-tRNA Biyosentezi ▪ Linoleik Asit Metabolizması
Makrofaj TS Sonrası **2B %6 HA-Tyr vs. 3B %6 HA-Tyr**	▪ Doymamış Yağ Asitlerinin Biyosentezi ▪ Linoleik Asit Metabolizması
Makrofaj TS Sonrası **2B %1 HA-Tyr vs. 2B %6 HA-Tyr**	▪ Sfingolipid Metabolizması ▪ Gliserofosfolipid Metabolizması
Makrofaj TS Sonrası **3B %1 HA-Tyr vs. 3B %6 HA-Tyr**	▪ Valine, Lösin ve İzolösin Biyosentezi ▪ Glisin, Serin ve Treonin Metabolizması

5.2.7.3 Mekanik olarak indüklenen makrofajların meme kanseri metabolomuna etkisi

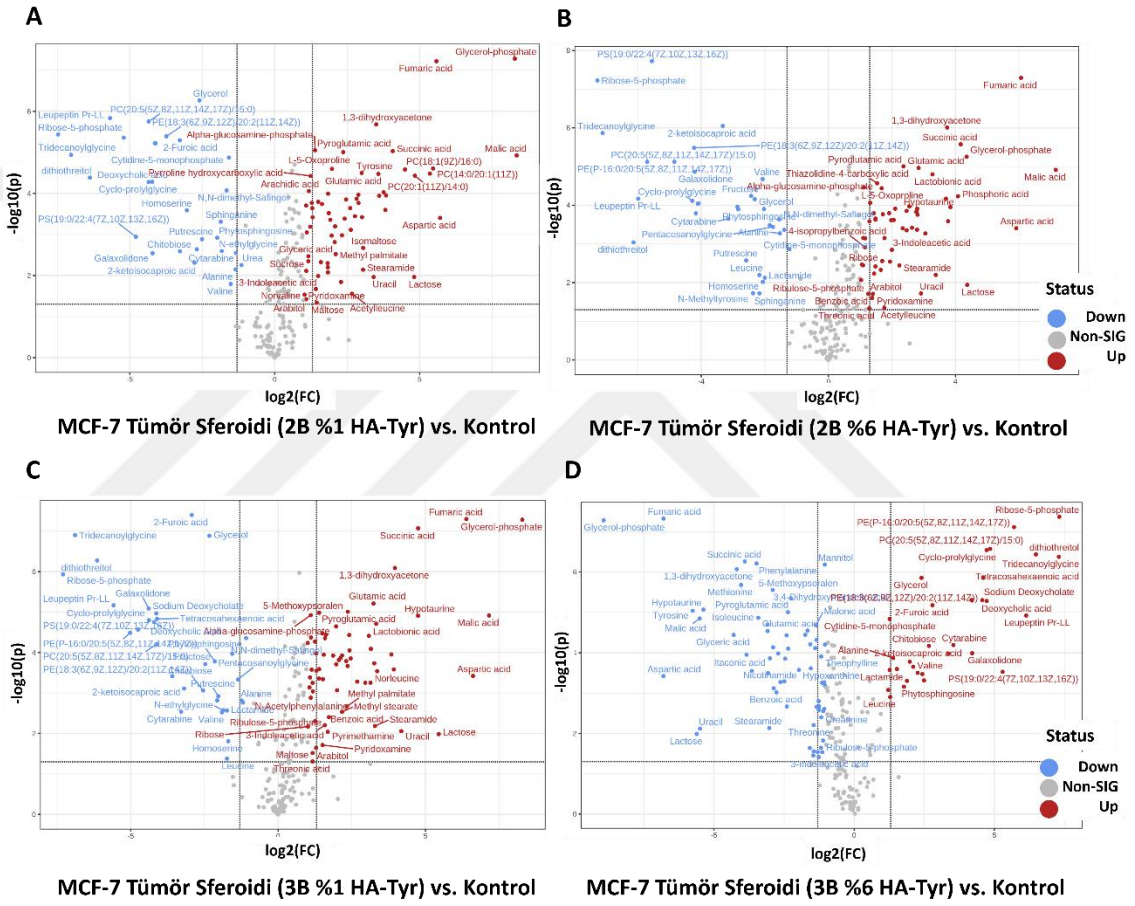
Doğal meme kanseri ECM'ini modellemek için hyalüronik asit bazlı HA-Tyr hidrojelin matris özelliklerini ayarlayarak makrofajların mekanoimmünitesinin meme tümörü immün mikro çevresini modüle edip etmediğini anlamak adına, makrofajlarla eş-kültür edilen meme kanseri sferoidleri için de detaylı metabolomik analizler gerçekleştirilmiştir.

Makrofajlarla eş-kültür edilmemiş MCF-7 sferoidi kontrol grubu olarak (MCF-7 TS Kontrol) kullanılmıştır. Makrofajlarla eş-kültürlenen MCF-7 sferoidlerinin (MCF-7 TS (2B %1 HA-Tyr), MCF-7 TS (2B %6 HA-Tyr), MCF-7 TS (3B %1 HA-Tyr), MCF-7 TS (3B %6 HA-Tyr)) metabolik profilleri arasında net bir ayrımla elde edilen kısmi en küçük kareler ayrım analizi (PLS-DA) skor grafiğinde gösterilmiştir (Şekil 5.16.A). MCF-7 TS Kontrol grubu ve makrofajlarla eş-kültürlenen MCF-7 sferoidlerinin metabolik profilleri karşılaştırıldığında en fazla farklılaşan 100 metabolit için hiyerarşik küme analizi sıcaklık haritasında belirgin ayrımlar gözlemlendi (Şekil 5.16.B). Gruplar arasında en önemli ölçüde değişen 15 metabolit, Projeksiyondaki Değişken Önemi (VIP) grafikleri ile gösterildi (Şekil 5.16.C). Buna göre, MCF-7 TS (2B %1 HA-Tyr), MCF-7 TS (2B %6 HA-Tyr) MCF-7 TS (3B %1 HA-Tyr) ve MCF-7 TS (3B %6 HA-Tyr) gruplarının MCF-7 TS Kontrol ile karşılaştırılması sonucunda, lipit metabolizmasıyla ilişkili fosfatidilkolinler (örn. tridekanoil glisin, metil stearat, PC (14:0/20:1), PC (18:1/ 16:0), PC (20:1/14:0), PC (15) :0/15:0)) ve N4 asetil sülfanilamid, N-fruktosil piroglutamat, hipotaurin, norlösin gibi amino asit metabolizmasıyla ilgili metabolitler, aşağı regüle edildiği görülmüştür. Yolak etki analizi bulgularında valin, lösin ve izolösin, arjinin ve alanin, aspartat, glutamat metabolizmaları, pentoz-fosfat yolağı ve gliserofosfolipid metabolizma yollarının meme kanseri sferoidlerinde yeniden programlandığı ortaya koyuldu (Şekil 5.16.D).



Şekil 5.16 Farklı matris koşullarında bulunan makrofajlar ile eş kültürlenen MCF-7 tümör sferoidlerinin metabolik analizi (A) Kontrol MCF-7 TS (Kırmızı), MCF-7 TS (2B, %1 HA-Tyr, yeşil), MCF-7 TS (2B, %6 HA-Tyr, mavi), MCF-7 TS (3B, %6 HA-Tyr, turkuaz), MCF-7 TS (3B, %6 HA-Tyr, pembe) arasındaki metabolomik ayrımı temsil eden PLS-DA skor grafiği (B) Kontrol MCF-7 TS (Kırmızı) 'e göre MCF-7 TS (2B, %1 HA-Tyr, yeşil), MCF-7 TS (2B, %6 HA-Tyr, mavi), MCF-7 TS (3B, %6 HA-Tyr, turkuaz), MCF-7 TS (3B, %6 HA-Tyr, pembe) farklılaşan ilk 100 metabolitin hiyerarşik küme analizi (sıcaklık haritası) (C) **1** MCF-7 TS (2B, %1 HA-Tyr), **2** MCF-7 TS (2B, %6 HA-Tyr), **3** MCF-7 TS (3B, %1 HA-Tyr), **4** MCF-7 TS (3B, %6 HA-Tyr) ve **5** Kontrol MCF-7 TS grupları arasındaki en önemli derecede farklılaşan ilk 15 metaboliti gösteren VIP skor grafiği (D) Etkilenen metabolik yolakları temsil eden yolak etki analizi grafiği

Makrofajlardaki biyomalzeme aracılı düzenlenen mekanoimmün yanıtların meme kanseri mikro çevresi üzerindeki etkisini değerlendirmek için, Kontrol MCF-7 TS tümör sferoidlerine kıyasla makrofajların 2B %1 HA-Tyr, 2B %6 HA-Tyr kültürüyle, 3B %1 HA-Tyr ve 3B %6 HA-Tyr kültürüyle eş-kültürlenen MCF-7 meme kanseri sferoidindeki farklılaşan metabolitlerin ikili karşılaştırmasını içeren yanardağ grafikleri oluşturuldu (Şekil 5.17).



Şekil 5.17 Kontrol MCF-7 tümör sferoidlerine kıyasla makrofajların (A) 2B %1 HA-Tyr, (B) 2B %6 HA-Tyr kültürüyle, (C) 3B %1 HA-Tyr ve (D) 3B %6 HA-Tyr koşullarında eş kültürlenen MCF-7 tümör sferoidindeki yukarı ve aşağı regüle edilen metabolitlerin yanardağ grafikleri

Kontrol tümör sferoidlerine kıyasla 2B %1 HA-Tyr makrofajlar ile eş-kültürlenen tümör sferoidinde lipid ve yağ asidi metabolizmasıyla ilişkili metabolitlerin (örn. Gliserol-Fosfat, Malik Asit, Fumarik Asit, 1,3-Dihidroksiaseton, PC (18:1/16:0), PC (20:1/14:0), Arakidik Asit, Gliserik Asit, Metil Palmitat) daha yüksek kat değişikliğiyle yukarı

regülasyonu gösterilmiştir (Şekil 5.17.A). Öte yandan, 2B %6 HA-Tyr makrofajlarla eş-kültürlenen tümör sferoidlerinde, lipid metabolizmasıyla ilişkili metabolitlerin (örn., PS (19:0/22:0), PC (20:5/15:0), PE (18:3/) 20:2), PE (P-16:0/20:5), Tridekanoilglisin, Sfinganin, N, N-Dimetilsafingol, Gliserol, Fitosfingosin) kontrol tümör sferoidlerinden daha yüksek kat değişikliği ile aşağı regülasyonu görülmüştür (Şekil 5.17.B). Kontrol tümör sferoidine kıyasla 3B %1 HA-Tyr makrofajlar ile eş-kültürlenen tümör sferoidlerinde, lipid metabolizmasıyla ilişkili metabolitlerin (örn., PS (19:0/22:4), PE (P-16:0/20:5), PC (20:5/15:0), PE (18:3/) 20:2), Fitosfingosin, N, N-Dimetil-Safingol, Gliserol, Ditiyotreitol, Tetrakosaheksaenoik Asit) aşağı regüle edildiği görülmüştür (Şekil 5.17.C). 3B %6 HA-Tyr makrofajlar ile eş-kültürlenen tümör sferoidlerinde ise amino asit metabolizmasıyla ilişkili metabolitlerin (örn., Lösin, Laktamid, Aspartik Asit, L5-oksoprolin, Valin, Hipotaurin, Tridekanoilprolilglisin, Deoksikolik Asit, 2-Ketoizokaproik Asit, Asetil Lösin, Fumarik Asit, Alfa Glukozamin Fosfat) ve lipid metabolizmasıyla ilişkili metabolitlerin (örn., PE(P-16:0/20:5), PC(20:5/15:0), PS (19:0/ 22:4), PE (18:3/20:2), Gliserol, Fitosfingosin) kontrol tümör sferoidlerinden daha yüksek bir kat değişikliği ile yukarı regülasyonu tespit edilmiştir (Şekil 5.17.D).

6. TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Bu çalışmada, meme kanseri immün mikro çevresindeki makrofajların, mekanoimmünolojik mekanizmaları ve tümörigenezi karşılıklı olarak MCF-7 tümör sferoidlerinin (TS'ler) ve RAW264.7 makrofajlarının eş-kültürlenmesi yoluyla incelenmiştir. Meme kanserini bir TİMÇ modeli olarak tercih edilmesinin temel nedeni, sağlıklı meme dokusuna kıyasla dinamik olarak matris sertleşmesi görülen meme tümörü mikro çevresindeki biyofiziksel etkilerin aracılık ettiği agresif bir malignite ve karmaşık bir immünite olmuştur (Place, Jin, Huh ve Polyak, 2011). Ek olarak, meme tümörü ECM'nin ana elementlerinden biri olan hyaluronik asit, tiramin ile fonksiyonelleştirilen hyaluronik asit (HA-Tyr) hidrojelleri kullanılarak tümör mikro çevresi taklit edilmiştir (Schwertfeger, Cowman, Telmer, Turley ve McCarthy, 2015). Tümör mikro çevresini taklit eden HA-Tyr hidrojelleri, makrofajlar için mekanik olarak ayarlanabilir 2B ve 3B, yumuşak (%1 HA Tyr) ve sert (%6 HA-Tyr) hidrojel yapıları halinde kullanılmıştır. Oluşturulan hidrojellerin, hücrelerin hidrojel içerisinde hareketi için önemli bir faktör olan gözenekli yapı, taramalı elektron mikroskobu altında incelendiğinde bu jellerin gözenekli bir yapı sergiledikleri, bunun yanında, yumuşak HA-Tyr daha büyük ve yüksek yoğunluklu mikrogözeneklere sahip bir yapıya sahipken, sert HA-Tyr ise küçük ve düşük yoğunluklu mikro gözeneklere sahip bir mikro yapı sergilediği gösterilmiştir (Şekil 5.1.A) (Ahearne, 2014). Makrofaj hücreleriyle gerçekleştirilen SEM görüntüleri ile, makrofajların meme tümörü ECM-mimetik hyaluronik asit içeriğinden dolayı, yumuşak ve sert HA-Tyr hidrojellerine yapışabildiği de desteklenmiştir (Şekil 5.1.B).

HA-Tyr malzemesi sayesinde, kontrol edilebilir mekanik özelliklere ve Young Modulüne sahip olan ~15 kPA mekanik dayanıma sahip %1 HA-Tyr ve ~52 kPA mekanik dayanıma sahip sert %6 HA-Tyr hidrojeller geliştirilmiştir (Şekil 5.2). Bu özellik meme kanseri mimetik özelliğinin yanı sıra kontrol edilebilir matris özellikleri sağlaması açısından da önemlidir (Loebel, D'Este, Alini, Zenobi-Wong, & Eglin, 2015).

Makrofajların HA-Tyr hidrojelleriyle, hücre proliferasyonunu ve hücresel canlılığını test etmek için XTT testi gerçekleştirilmiştir, 96 saatten 144 saate kadar yumuşak veya

sert ve 2B veya 3B HA-Tyr hidrojel kültürlerinin makrofajların canlılığını ve çoğalmasını önemli ölçüde desteklediği tespit edilmiştir (Şekil 5.3). Sonuç olarak, bu çalışma süresince HA-Tyr, hücre-malzeme etkileşimlerini ve meme kanseri tümör mikro çevresindeki hücrelerin mekanotransdüksiyonunu araştırmak üzere model bir malzeme olarak kullanılmıştır.

Tümör immün mikro çevresi biyofiziksel parametreleri hücre-ECM ilişkilerini düzenlerken hücresel morfoloji, büyüme, hayatta kalma ve toplu hücre davranışlarında da önemli rollere sahiptir (Henke, Nandigama ve Ergün, 2020). Makrofajlardaki hücre adezyonunu ve morfolojilerini değerlendirmek için yumuşak veya sert ve 2B veya 3B HA-Tyr hidrojel kültürlerindeki makrofajlar, faz-kontrast mikroskopisi ile gözlenmiştir (Şekil 5.4). Gözlemlerimiz ışığında, makrofaj immün hücre morfolojilerinin matris sertliğine ve boyutsal parametrelere yanıt verdiği makrofajlar arasındaki farklılıklar ile ispatlanmıştır. 2B'da, artan sertlikle daha uzanmış bir morfoloji gözlenmiştir, makrofajların uzanan morfolojisi, M2 pro-tümöral makrofaj fenotipi ile ilişkili olabilir. 3B ortamda ise artan sertliğe yanıt olarak, makrofajlarda M1 anti-tümöral özelliği temsilen küresel kümelenme morfolojisi görülmüştür (Escolano vd., 2021).

Transkripsiyonel regülatör YAP, biyofiziksel uyarılar yoluyla makrofajın immün yanıtında önemli rol oynamaktadır (Meli vd., 2019). Artan sertliğe yanıt veren makrofajlarda YAP'ın duyarlılığını araştırılmıştır. Yumuşak HA-Tyr hidrojelleri üzerinde hücreler kültürlendiğinde makrofajların sitoplazmasında YAP'ın yayıldığını gösterirken, matris sertliği arttığında ise çekirdek çevresinde biriktiği IF görüntüleri ile gösterilerek artan matris sertliğinin makrofaj mekanotransdüksiyonunu uyardığı desteklenmiştir (Dupont vd., 2011). Yumuşak matris üzerinde kültürlenen makrofajlarda küresel hücre morfolojisi ve sert matris üzerinde uzanan şekli, hücre iskeletinin β-aktin boyaması ile görüntülenerek makrofajların matris sertliğine verdiği farklı morfolojik tepkiler ve mekanotransdüksiyonu doğrulanmıştır (Şekil 5.5).

MCF-7 tümör sferoidleri eş-kültür sisteminin üst bölmesinde, ve alt bölmede 2-boyutlu ve 3-boyutlu

%1 – %6 HA-Tyr hidrojel koşullarındaki makrofajlar olacak şekilde kurulan eş kültür sistemi meme tümörü immün mikro çevresini taklit etmek için oluşturulmuştur (Şekil 5.6).

Tümör sferoid indüksiyonundan önce 2B makrofaj kültürlerinde, HA-Tyr hidrojelleri üzerindeki makrofajların pro- tümöral, anti- tümöral, mekanotransdüksiyon ve mekanoimmünitesinin, artan matris sertliğine yanıtla beraber önemli ölçüde daha yüksek ifadelendiği gösterilmiştir, bu sonuçlar önceki raporlarla tutarlılık göstermektedir (Meli vd., 2020; Dutta, Goswami ve Rahaman, 2020; Atcha vd., 2021) (Şekil 5.7.A).

Tümör sferoid indüksiyonundan sonra, 2-boyutlu kültür edilen bu makrofajlarda artan matris sertliği ile beraber toplam pro-tümöral ile ilişkili gen ifadeleri (IL-10 önemli ölçüde değişmedi ve TGF-β ▪ ▪ ▪ ▪ ▪ ▪) önemli ölçüde azaldı, anti-tümöral TNF-α ifadelenmesi önemli ölçüde artmıştır. Bunun yanında, anti-tümöral IL-12β ifadesi azalmıştır bu azalmanın sebebinin önceki çalışmalara göre, TNF-α'daki yüksek ifadelenmenin IL-12β ifadesini baskılaması olduğu söylenebilir (Ma vd., 2015) (Şekil 5.7.B).

Bu makrofajlarda, YAP ve TAZ yolağı ile mekanotransdüksiyon, artan sertliğe yanıt olarak artarken (Meli vd., 2020), RhoA ifadesi azalış görülmüştür, makrofaj hareketliliği ve anti-tümöral immün yanıtlar RhoA'da azalma yoluyla yukarı regüle edilmiştir (Königs vd., 2014). Bu makrofajların immün yanıtlarını ve makrofajların M1-M2 spektrumunu düzenlemesiyle bilinen mekanoimmünite belirteçleri TRPV4 ve Piezo1'de, tümör sferoidlerinden sonra artan matris sertliği ile ve M2-benzeri pro-tümöral yanıtlar aşağı regülasyonu ile beraber azalmıştır (Meli vd., 2020; Dutta, Goswami ve Rahaman, 2020) (Şekil 5.7.B).

Meme tümörü büyümesinde pro-tümöral fonksiyonlara sahip anti-inflamatuar yanıtlar, artan matris sertliği ile 3B ortamda kültürlenen makrofajlarda azalan ifadelenme göstermiştir. Makrofajların hem pro- hem de anti- tümöral yanıtlarındaki azalma,

mekanotransdüksiyon ve mekanoimmünite mekanizmaları yoluyla modüle edilebilirliği bu çalışmada gösterilmiştir: RhoA ekspresyonunun yukarı ifadelenmesi, makrofajlarda azalan motilite (Königs vd., 2014), TAZ aynı zamanda tümör süpresör rolüne sahip olduğundan (Shen vd., 2022), azalması pro-tümöral tepkilere neden olmuştur. Tümör sferoid – makrofaj kültürlerine indüklenmesinden önce artan sertlik ile ekspresyon da 3B'da azalmıştır ve Piezo-1 ile mekanoimmünite azalmasıyla anti-inflamatuar yanıtların azaldığı bilinmektedir (Atcha vd., 2021) (Şekil 5.8.A).

Tümör sferoidinden sonra makrofajlarda 3B durumda hem pro- hem de anti-tümörijenik yanıtların artması, artan mekanotransdüksiyon ve mekanoimmünite mekanizmaları ile düzenlenmiştir. Makrofajlarda, artan matris sertliği sonucu azalan motilite ile ilişkili olarak RhoA'nın yukarı ifadelenmesi ve azalan anti-inflamatuar yanıt vermiştir (Königs vd., 2014). YAP ve TAZ aracılı mekanotransdüksiyon pro-inflamatuar ve anti-tümöral makrofajların artışıyla tümör mikro çevresini düzenlemiştir. Artan matris sertliği ile beraber tümör sferoid indüksiyonundan sonra, artan TAZ ile ilişkili pro-tümöral fonksiyonlar (Shen vd., 2022) ve YAP makrofajların pro-tümöral rollerinde artışla ilgili azaltılmış bir ekspresyon göstermiştir (Meli vd., 2020). Bu gen ekspresyonu verileri, makrofajlar tarafından ifade edilen anti- ve pro-tümöral tepkilerin, hücre dışı matris ve boyutsal farklılıklar sonucu mekanotransdüksiyon ve mekanoimmünite mekanizmaları yoluyla düzenlendiğini göstermektedir (Şekil 5.8.B).

Sonuç olarak, makrofajlar tarafından ifadelenen anti- ve pro-tümöral fonksiyonlar, mekanotransdüksiyon ve mekanoimmünite genleri de meme kanseri tümör sferoidi varlığında değişen ifadelenme göstermiştir.

Meme kanseri tümör sferoidleriyle yapılan gen ekspresyon analizlerine bakıldığında, eş-kültür inkübasyon süresinden sonra, makrofajların mekanoimmün metabolik aktivitelerinin meme kanseri tümör sferoidlerinde tümörijenezi nasıl etkilediğini araştırmak için E-kaderin, N-kaderin, MMP-2 ve p53 gen ekspresyonları incelenmiştir (Şekil 5.9).

Hücre – hücre ve hücre – hücre dışı matris adezyonlarına, aktin hücre iskeletini kateninlerle bağlayan kaderinler aracılık eder. E-kaderin tipik olarak epitel hücrelerinde ifade edilirken, mezenkimal hücrelerde N-kaderin birincil olarak ifade edilmektedir. Kanser hücrelerinde E-kaderin ve N-kaderin arasındaki "kaderin değişimi", tümörijenez düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. Meme kanseri gibi epitelyal kanser hücrelerinde E-kaderin kaybı, N-kaderinin yukarı regüle edildiği ve E-kaderinin aşağı regüle edildiği epitelyal- mezenkimal geçişe (EMT) sebebiyet verir (Loh vd., 2019). MCF-7 tümör sferoidi 2B %6 HA-Tyr ve 3B %1 HA-Tyr gruplarında, N-kaderin, E-kaderine kıyasla aşağı regüle edilirken, N-kaderin, 3B %6 HA-Tyr sferoidinde yukarı regüle edilmiştir. Yani epitelyal-mezenkimal geçiş, MCF-7 tümör sferoidi (2B %1 HA-Tyr), MCF-7 tümör sferoidi (3B %6 HA-Tyr) indüklenmiştir. Bu nedenle, yumuşak ortam içinde ve sert substrat üzerindeki makrofajlar sayesinde, meme tümörü sferoidlerinde EMT'nin aşağı regülasyonu gerçekleşmiştir.

Matris metalloproteinaz-2 (MMP2), kanserde saldırganlığı, invazyonu ve anjiyogenezi teşvik ederek meme kanserindeki metastatik kaskadlarda bir role sahiptir (Egeblad ve Werb, 2002). Kontrol grubuna kıyasla, 2B %1 – 2B %6 HA-Tyr makrofajlarla eş kültürlenen MCF-7 tümör sfroidi gruplarında MMP-2 önemli ölçüde yukarı regüle edilirken, 3B %1– 3B %6 HA-Tyr kültürlenen makrofajlarla eş kültürlenen MCF-7 tümör sferoidi gruplarında ise aşağı regüle edilmiştir. Matris sertliği etkisine bakıldığında ise, artan matris sertliği sonucunda HA-Tyr hidrojelleri üzerinde 2B kültürlenen makrofajlar, tümör sferoidlerinde MMP2 ekspresyonunu baskılarken, artan matris sertliği sonucunda HA-Tyr hidrojelleri içindeki 3B kültürlenen makrofajlar ise, tümör sferoidlerinde MMP2 ekspresyonunu arttırmıştır. Meme kanseri tümör sferoidlerinin metastatik faaliyetler, HA-Tyr hidrojelleri içindeki makrofajlarla sertliğin arttırılmasıyla artarken, HA-Tyr hidrojelleri üzerindeki makrofajların sertliğinin artmasıyla azalmıştır.

Tümör baskılayıcı p53, tümörün ilerlemesini yönlendirir ve p53'ün olmaması, tümör başlangıcını ve ilerlemesini sağlar (Bieging, Mello ve Attardi, 2014). Kontrole göre p53 ifadelenmesi, 2B %1 – 2B %6 HA-Tyr MCF-7 tümör sferoidi gruplarında ve 3B %1– 3B %6 HA-Tyr kültürlenen makrofajlarla eş kültürlenen MCF-7 tümör sferoidi

gruplarında önemli ölçüde aşağı regüle edilmiştir bu nedenle, meme kanseri tümör sferoidlerindeki tümörijenez genel anlamda tüm makrofaj gruplarıyla varlığını sürdürmüştür.

Meme kanseri tümör sferoidleri ile gerçekleştirilen gen ekspresyon sonuçları, meme kanseri tümör sferoidlerinin makrofajların mekanik olarak kontrol edilen mekanoimmünitesindeki değişiklikleri algılayabildiğini ve bunlara yanıt verebildiğini göstermiştir.

Makrofajların 3B %6 HA-Tyr karşı 2B %6 HA-Tyr ve 3B %6 HA-Tyr karşı 3B %1 HA-Tyr transkriptomlarının gen ontoloji analizi bulgularına dayanarak 3B %6 HA-Tyr karşı 2B %6 HA-Tyr kıyaslamasında (Şekil 5.10): Moleküler transdüser aktivitesi, sinyal reseptör aktivitesi ile ilgili genler aracılığı ile ve G – protein coupled receptors (GPCR) yolağı genleriyle bağlantılı hücre – dışı değişiklere dayalı makrofaj aktivasyonu, makrofajın farklılaşması ve fonksiyonlarındaki düzenleme artışı olduğu görülmüştür (Wang, Iyer, Lyons, Körner ve Wei, 2019). 3B %6 HA-Tyr karşı 3B %1 HA-Tyr karşılaştırılmasında makrofajlarda protein metabolizmasındaki regülasyon ve hücresel farklılaşma ile ilişkili olarak artan protein heterodimerizasyon aktivitesi ve makrofajlara hücresel programlar arasında hızla geçiş yapma yeteneği ve fenotip plastisitesini etkileme yeteneğini epigenetik değişiklikler ile mümkün kılınmaktadır ve epigenetik regülasyon ile ilişkili kromatin genlerinin oranlarının önemli ölçüde farklılaştığı görülmüştür (Chen, Yang, Wei ve Wei, 2019).

Metabolom analizlerine geçildiğinde, meme kanseri sferoidleri ile indüklenen ve indüklenmeyen, 2B/3B yumuşak (%1 HA-Tyr) ve sert (%6 HA-Tyr) kültür ortamlarının metabolik profilleri arasında kesin bir ayrım hem PLS-DA skor grafikleri ile (Şekil 5.11) hem de sıcaklık haritası ile gösterildi (Şekil 5.12).

Makrofajlardaki metabolik değişiklikler üzerindeki matris sertliğinin etkisini aydınlatmak için, 2B kültürlenen makrofajlar yumuşak matris vs sert matris olarak karşılaştırıldı (Şekil 5.13.A). Uyarılan yağ asidi metabolizması olarak linoleik asit ve

gliserofosfolipid metabolizma yolakları, membran yeniden modellemesi ve makrofajların inflamatuar fenotipi, önceki lipidomik çalışmalarına göre lipid metabolizmasının yeniden programlanmasıyla düzenlendiği görülmüştür (Dennis vd., 2010; Batista-Gonzalez, Vidal, Criollo ve Carreño, 2020). Hücre zarının yeniden modellenmesinin yanı sıra, gliserofosfolipidler, gliserolipidler ve prenoller, makrofajların pro-inflamatuar tepkilerine yönelik uyarılar üzerine modüle edilir, ayrıca M1 makrofajları, gelişmiş bir yağ asidi metabolizması yeniden programlaması gösterir (Dennis vd., 2010). 3B kültürlü makrofajlarda ise görülen arjinin metabolizmasının yeniden programlanması, pro-tümöral fonksiyona sahip M2 anti-inflamatuar polarizasyon durumu ile ilişkilidir (Liu vd., 2021) ve ayrıca görülen dallı zincirli amino asitler olarak valin, lösin ve izolösin biyosentezinin makrofajlarda anti-inflamatuar fonksiyonu desteklenmiştir (Lee vd., 2017) (Şekil 5.13.B) (Çizelge 5.1).

%1 HA-Tyr matriste 2B'dan 3B'a makrofajlarda, gelişmiş pro-inflamatuar yanıtları ile ilişkili yağ asidi metabolizmalarından linoleik asit metabolizması yeniden programlanması görülmüştür (Morgan vd., 2021) (Şekil 5.13.C). %6 HA-Tyr matriste 2B'dan 3B'a makrofajlarda ise (Şekil 5.13.D), makrofajlarında pro-tümöral fonksiyonlarla anti-inflamatuar immün yanıtları ile ilişkili arjinin, aminoaçil-tRNA ve valin, lösin ve izolösin biyosentez metabolizma yolakları uyarılmıştır (Liu vd., 2021; Nie, Sun, Fu ve Yu, 2019; Cambeiro-Pérez vd., 2021). Matris boyutunun makrofajlar üzerindeki etkisine ilişkin bu bulgular, makrofajların immünomodülasyonunun, yumuşak matris ile 2B'dan 3B'ya düzenlenebileceğini makrofajlardaki metabolomik yeniden programlamanın, anti-tümörijenik davranışla ilişkili pro-inflamatuar immün yanıtı indüklediğini göstermektedir (Çizelge 5.1).

Meme kanseri sferoidinden önce ve sonra yumuşak matris üzerinde 2B kültürlü makrofajlarda (Şekil 5.14.A), dallı zincirli amino asitler olan valin, lösin ve izolösin metabolik yolakları ile pro-tümöral işlevi desteklemiştir (Cambeiro-Pérez vd., 2021). Sert matris üzerindeki 2B kültürlü makrofajlarda (Şekil 5.14.B) meme kanseri sferoidlerinin etkisinden sonra pro-inflamatuar ve anti-tümöral olan M1 makrofajları alanin, aspartat ve glutamat amino asit metabolizmasının yeniden programlanması ile düzenlenmiştir (Mehla ve Singh, 2019). Ayrıca, M1 makrofajlarda, yağ asidi

metabolizmasının yeniden programlanması yoluyla gelişmiş bir modülasyon gösterilmiştir (Batista-Gonzalez, Vidal, Criollo ve Carreño, 2020). M2 pro-tümöral polarizasyonu ile ilişkili olarak arjinin metabolizması yolağı, yumuşak matris ile 3B kültür edilen makrofajlarda tümör sferoidinden sonra indüklenmiştir. Sert matris ile 3B kültür edilen makrofajlarda pro-tümöral fonksiyona sahip anti-inflamatuar polarizasyon durumu makrofajlarda tümör sferoid sonrası aminoaçil-tRNA, valin, lösin izolösin ve de arjinin metabolizma yolakları ağırlıklı olarak uyarılmıştır (Nie, Sun, Fu ve Yu, 2019; Cambeiro-Pérez vd., 2021; Liu vd., 2021) (Çizelge 5.1).

Meme kanseri tümör sferoidleriyle eş-kültürlenen tüm makrofaj kültürleri kendi aralarında kıyaslanmıştır ve makrofajların pro- ve anti-inflamatuar fenotipi tümör sferoidlerinden sonra yumuşak matriste 2B vs 3B olarak karşılaştırıldığında (Şekil 5.15.A), M1 fenotipi ile ilişkili yağ asidi metabolizması yeniden programlama yolaklarından linoleik asit ve M2- fenotipi ile ilişkili aminoaçil-tRNA biyosentezi yolağı, diğer yandan sert matriste 2B vs 3B olarak karşılaştırıldığında ise (Şekil 5.15.B) yağ asidi metabolizmasının yeniden programlanması, makrofajların artmış pro-inflamatuar tepkileri ile ilişkili doymamış yağ asitleri ve linoleik asit metabolizması tespit edilmiştir (Nie, Sun, Fu ve Yu, 2019; Morgan vd., 2021).

Boyutsal kıyaslamanın ardından gerçekleştirilen matris sertliği etkisi kıyaslamalarında, tümör sferoidleri indüklenmesinin ardından 2B ortamda artan matris sertliği ile beraber makrofajlarda (Şekil 5.15.C) ağırlıklı olarak membran yeniden şekillenmesine ek olarak, makrofajların anti-tümöral fonksiyonlara sahip pro-inflamatuar fenotipine yönelik sfingolipid metabolizması ve gliserofosfolipid metabolizması ilişkili metabolitlerde artış görülmüştür (Dennis vd., 2010). Meme kanseri tümör sferoidlerinin indüklenmesinden sonra 3B – kültürlenmiş makrofajlarda ise artan matris sertliğine yanıt olarak makrofajlarda (Şekil 5.15.D) pro-tümöral işlevi destekleyen dallı zincirli amino asitler olarak valin, lösin ve izolösin (Cambeiro-Pérez vd., 2021), anti-tümöral fonksiyonları ile glisin, serin ve treonin metabolizması görülmüştür (Chen et al., 2020) (Çizelge 5.1).

Metabolom profillemelerine dayanan yanardağ grafikleri ile yapılan bu detaylı ve karşılaştırmalı analizler sonucunda makrofajların tümörigenezindeki immün yanıtlarının ve tümör ilerlemesini düzenleyici fonksiyonlarının, hücre dışı matrislerindeki biyomekanik uyaranlar yoluyla düzenlendiği ortaya çıkarılmıştır. HA-Tyr hidrojeli üzerindeki makrofajlarda, meme kanseri tümör sferoidleri ile indüklenmiş olsun veya olmasın, artan matris sertliği ile anti-tümöral etki ile pro-inflamatuar yanıta doğru metabolik bir yeniden programlama sergilendi, bu sonuçlar önceki gen ekspresyon verilerimizi desteklemiştir.

Makrofaj kültürü ile etkileşmeyen MCF-7 tümör sferoidleri kontrol grubu olarak (MCF-7 TS Kontrol) ve 2B %1 – %6 HA-Tyr ve 3B %1 HA-Tyr – %6 HA-Tyr koşullarındaki makrofajlar ile eş kültürlenen MCF-7 tümör sferoidlerinin metabolik profilleri arasında net bir ayrımla elde edilen kısmi en küçük kareler ayrım analizi (PLS-DA) skor grafiğinde (Şekil 5.16.A) ve ilk 100 değişmiş metaboliti hiyerarşik bir küme analizinde sıcaklık haritasında belirgin ayrımlar gözlemlendi (Şekil 5.16.B). Tümör sferoidleri grupları arasındaki en önemli şekilde değişen 15 metaboliti gösteren VIP grafiğine göre (Şekil 5.16.C), kanserde hücre büyümesi, bölünmesi ve hayatta kalmasından sorumlu lipid metabolizmasıyla ilişkili ve amino asit metabolizmasıyla ilişkili metabolitlerin kontrole göre kıyaslandığında makrofajlar kültürleri ile eş kültürlenen tümör spheroidlerinde aşağı regüle edildiği görülmüştür (Snaebjornsson, Janaki-Raman ve Schulze, 2020; Wei, Liu, Cheng, Yu ve Yi, 2021). Meme kanseri tümör sferoidleriyle yapılan metabolom profillemesinde yolak etki analizi (Şekil 5.16.D), hem tümör malignitesine destek olma hem de immünmetabolizma düzenleyici rolüyle, kanser hücrelerinin hayatta kalmasını, çoğalmasını ve malignitesini sürdürmede önemli belirleyici yolaklar olan valin, lösin ve izolösin, glutamin amino asid metabolizmasıyla bağlantılı olan alanin, aspartat, glutamat metabolizmalarının yanı sıra arjinin metabolizması (Wei, Liu, Cheng, Yu ve Yi, 2021), tümör büyümesi ve ilerlemesi sırasında membran biyosentezi için gliserofosfolipid metabolizması (Koundouros ve Poulogiannis, 2019) ve kontrolsüz çoğalma sırasında nükleik asit sentezini sürdürmek için yağ asitlerinin üretimi ve de NADPH için pentoz-fosfat yolağının meme kanseri tümör sferoidlerinde yeniden programlandığı görülmüştür (Jin ve Zhou, 2019).

Membranın yeniden modellenmesindeki önemli rollerinin yanı sıra, ikincil haberciler ve kanser hücrelerinin enerji üretiminde yakıt kaynakları olarak da önemli olan yağ asidi metabolizmasıyla alakalı metabolitler kontrole kıyasla yumuşak matris üzerindeki makrofajlarla indüklenen tümör sferoidinde artış göstermiştir (Şekil 5.17.A). Sert matris üzerinde makrofajlarla indüklenen tümör sferoidlerinde ise (Şekil 5.17.B), makrofajlarda mekanoimmünite kaynaklı anti-tümöral yanıtlar sonucunda, tümör ilerlemesinde aşağı regülasyonunun uyarıldığı lipid metabolizmasıyla ilişkili metabolitlerin kontrol tümör sferoidlerinden daha yüksek kat değişikliği ile aşağı regülasyonu ile gösterilmiştir (Koundouros ve Poulogiannis, 2019). 3B kültürdeki makrofajlarda, yumuşak matris içinde makrofajlarla indüklenen tümör sferoidinde kontrole kıyasla (Şekil 5.17.C), makrofajlardan kaynaklı anti-tümöral yanıtlar ile beraber tümör ilerlemesinde aşağı regülasyonu ile ilişkili lipid metabolizması metabolitleri göreceli olarak daha yüksek kat değişikliği ile aşağı regüle edilmiştir. Sert matris içindeki makrofajlarla indüklenen tümör sferoidinde (Şekil 5.17.D), bol miktarda amino asit metabolizmasının yeniden programlanması, daha yüksek proliferasyon oranı, artan malignite ve kanserin immün regülasyonu ile ilişkili amino asit metabolizması ve kontrolsüz karsinojenez proliferasyonu sırasında nükleik asit sentezini koruyarak tümör büyümesi ve membran biyosentezinde rol alan lipid metabolizmasıyla ilişkili metabolitlerin yukarı regülasyonu kontrol tümör sferoidlerinden daha yüksek bir kat değişikliği ile elde edilmiştir (Snaebjornsson, Janaki-Raman ve Schulze, 2020; Wei, Liu, Cheng, Yu ve Yi, 2021).

Bu veriler ile makrofajların mekanoimmünitesindeki değişikliklere bağlı olarak meme kanseri tümörlerinde metabolik yeniden programlamanın olduğu gösterilmiştir. Beklendiği gibi, sert hidrojel üzerindeki makrofajlar, ağırlıklı olarak ve önceki sonuçlarımızla tutarlı olarak, tümör sferoidleri üzerinde anti-tümörijenik etkilere sahip pro-inflamatuar yanıtlar göstermiştir.

Bu çalışmada sonuç olarak, meme tümörü mikro çevresinin matris sertliği ve boyutsallığının biyomekanik özelliklerinin, karşılıklı olarak meme kanseri tümör sferoidlerindeki tümörijenez ile makrofajların mekanoimmünitesi arasındaki metabolik etkileşimler ortaya çıkarılmıştır. Ayrıca sert hyaluronik asit bazlı hidrojeller üzerinde

kültürlenen makrofajlardaki gen ifadelerinin ve metabolik yeniden programlamanın, diğerlerinin aksine meme kanseri tümör sferoid modellerinde ağırlıklı olarak anti-tümör etkileri ile pro-inflamatuar polarizasyonu indüklemiştir. Ayrıca, matris sertliği ve boyutu tarafından yönlendirilen makrofajların transkripsiyonel ve metabolik değişiklikler ve meme kanseri tümör sferoidlerinin metabolik ve gen ekspresyon profilleri ile desteklenmiştir. Bu sonuçlar ışığında, meme kanseri tümör nişinin biyomekanik özelliklerinin, makrofajların mekanoimmünitesi ile beraber meme kanseri hücrelerinin tümörijenezini biyofiziksel olarak düzenlenebileceği gösterilmiştir.

KAYNAKLAR

Ahearne, M. 2014. Introduction to cell–hydrogel mechanosensing. Interface Focus, 4(2), 20130038.

Andorko, J. I., ve Jewell, C. M. 2017. Designing biomaterials with immunomodulatory properties for tissue engineering and regenerative medicine. Bioengineering & Translational Medicine, 2(2), 139–155.

Anonymous. 19 Kasım 2021. Web Sitesi: https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer.html, Erişim Tarihi: 28 Kasım 2022.

Arnold, M., Morgan, E., Rumgay, H., Mafra, A., Singh, D., Laversanne, M., . . . Soerjomataram, I. 2022. Current and future burden of breast cancer: Global Statistics for 2020 and 2040. The Breast, 66, 15-23.

Atcha, H., Jairaman, A., Holt, J. R., Meli, V. S., Nagalla, R. R., Veerasubramanian, P. K., . . . Liu, W. F. 2021. Mechanically activated ion channel Piezo1 modulates macrophage polarization and stiffness sensing. Nature Communications, 12(1).

Aykut, B., Chen, R., Kim, J. I., Wu, D., Shadaloey, S. A. A., Abengozar, R., . . . Miller, G. 2020. Targeting Piezo1 unleashes innate immunity against cancer and infectious disease. Science Immunology, 5(50).

Baghban, R., Roshangar, L., Jahanban-Esfahlan, R., Seidi, K., Ebrahimi-Kalan, A., Jaymand, M., . . . Zare, P. 2020. Tumor microenvironment complexity and therapeutic implications at a glance. Cell Communication and Signaling, 18(1).

Batista-Gonzalez, A., Vidal, R., Criollo, A., ve Carreño, L. J. 2020. New Insights on the Role of Lipid Metabolism in the Metabolic Reprogramming of Macrophages. Frontiers in Immunology, 10.

Bieging, K. T., Mello, S. S., ve Attardi, L. D. 2014. Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression. Nature Reviews Cancer, 14(5), 359–370.

Binnewies, M., Roberts, E. W., Kersten, K., Chan, V., Fearon, D. F., Merad, M., . . . Krummel, M. F. 2018. Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy. Nature Medicine, 24(5), 541–550.

Blanco- Fernandez, B., Gaspar, V. M., Engel, E., ve Mano, J. F. 2021. Proteinaceous Hydrogels for Bioengineering Advanced 3D Tumor Models. Advanced Science, 8(4), 2003129.

Boutilier, A. J., ve Elsawa, S. F. 2021. Macrophage polarization states in the tumor microenvironment. International Journal of Molecular Sciences, 22(13), 6995.

Cambeiro-Pérez, N., González-Gómez, X., González-Barreiro, C., Pérez-Gregorio, M. R., Fernandes, I., Mateus, N., . . . Martínez-Carballo, E. 2021. Metabolomics Insights of the Immunomodulatory Activities of Phlorizin and Phloretin on Human THP-1 Macrophages. Molecules, 26(4), 787.

Chakraborty, M., Chu, K., Shrestha, A., Revelo, X. S., Zhang, X., Gold, M. J., . . . Winer, D. A. 2021. Mechanical Stiffness Controls Dendritic Cell Metabolism and Function. Cell Reports, 34(2), 108609.

Chen, S., Xia, Y., He, F., Fu, J., Xin, Z., Deng, B., . . . Ren, W. 2020. Serine Supports IL-1β Production in Macrophages Through mTOR Signaling. Frontiers in Immunology, 11.

Chen, S., Yang, J., Wei, Y., ve Wei, X. 2019. Epigenetic regulation of macrophages: from homeostasis maintenance to host defense. Cellular & Molecular Immunology, 17(1), 36–49.

Chew, V., Toh, H. C., ve Abastado, J. P. 2012. Immune Microenvironment in Tumor Progression: Characteristics and Challenges for Therapy. Journal of Oncology, 2012, 1–10.

Dellacherie, M. O., Seo, B. R., ve Mooney, D. J. 2019. Macroscale biomaterials strategies for local immunomodulation. Nature Reviews Materials, 4(6), 379–397.

Dennis, E. A., Deems, R. A., Harkewicz, R., Quehenberger, O., Brown, H. A., Milne, S. B., . . . Subramaniam, S. 2010. A Mouse Macrophage Lipidome. Journal of Biological Chemistry, 285(51), 39976–39985.

Du, H., Bartleson, J. M., Butenko, S., Alonso, V., Liu, W. F., Winer, D. A., ve Butte, M. J. 2022. Tuning immunity through tissue mechanotransduction. Nature Reviews Immunology.

Dupont, S., Morsut, L., Aragona, M., Enzo, E., Giulitti, S., Cordenonsi, M., . . . Piccolo, S. 2011. Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. Nature, 474(7350), 179–183.

Dutta, B., Goswami, R., ve Rahaman, S. O. 2020. TRPV4 Plays a Role in Matrix Stiffness-Induced Macrophage Polarization. Frontiers in Immunology, 11.

Egeblad, M., ve Werb, Z. 2002. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. Nature Reviews Cancer, 2(3), 161–174.

Escolano, J. C., Taubenberger, A. V., Abuhattum, S., Schweitzer, C., Farrukh, A., del Campo, A., . . . Guck, J. 2021. Compliant Substrates Enhance Macrophage Cytokine Release and NLRP3 Inflammasome Formation During Their Pro-Inflammatory Response. Frontiers in Cell and Developmental Biology, 9.

Faubert, B., Solmonson, A., ve DeBerardinis, R. J. 2020. Metabolic reprogramming and cancer progression. Science, 368(6487).

Friedemann, M., Kalbitzer, L., Franz, S., Moeller, S., Schnabelrauch, M., Simon, J. C., . . . Franke, K. 2017. Instructing Human Macrophage Polarization by Stiffness and Glycosaminoglycan Functionalization in 3D Collagen Networks. Advanced Healthcare Materials, 6(7), 1600967.

Galli, F., Aguilera, J. V., Palermo, B., Markovic, S. N., Nisticò, P., ve Signore, A. 2020. Relevance of immune cell and tumor microenvironment imaging in the new era of immunotherapy. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research, 39(1).

Gandhi, N., ve Das, G. 2019. Metabolic Reprogramming in Breast Cancer and Its Therapeutic Implications. Cells, 8(2), 89.

Gao, W., Xiang, B., Meng, T. T., Liu, F., & Qi, X. R. 2013. Chemotherapeutic drug delivery to cancer cells using a combination of folate targeting and tumor microenvironment-sensitive polypeptides. Biomaterials, 34(16), 4137–4149.

Gu, L., ve Mooney, D. J. 2015. Biomaterials and emerging anticancer therapeutics: engineering the microenvironment. Nature Reviews Cancer, 16(1), 56–66.

Henke, E., Nandigama, R., ve Ergün, S. 2020. Extracellular Matrix in the Tumor Microenvironment and Its Impact on Cancer Therapy. Frontiers in Molecular Biosciences, 6.

Hoffmann, E. J., ve Ponik, S. M. 2020. Biomechanical contributions to macrophage activation in the tumor microenvironment. Frontiers in Oncology, 10.

Jansen, K. A., Donato, D. M., Balcioglu, H. E., Schmidt, T., Danen, E. H., ve Koenderink, G. H. 2015. A guide to mechanobiology: Where biology and physics meet. Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, 1853(11), 3043–3052.

Jiang, S., Lyu, C., Zhao, P., Li, W., Kong, W., Huang, C., . . . Du, Y. 2019. Cryoprotectant enables structural control of porous scaffolds for exploration of cellular mechano-responsiveness in 3D. Nature Communications, 10(1).

Jin, L., ve Zhou, Y. 2019. Crucial role of the pentose phosphate pathway in malignant tumors (Review). Oncology Letters.

Kim, M., Lee, S., ve Ki, C. S. 2019. Cellular Behavior of RAW264.7 Cells in 3D Poly(ethylene glycol) Hydrogel Niches. ACS Biomaterials Science & Engineering, 5(2), 922–932.

Koshy, S. T., ve Mooney, D. J. 2016. Biomaterials for enhancing anti-cancer immunity. Current Opinion in Biotechnology, 40, 1–8.

Koundouros, N., & Poulogiannis, G. 2019. Reprogramming of fatty acid metabolism in cancer. British Journal of Cancer, 122(1), 4–22.

Königs, V., Jennings, R., Vogl, T., Horsthemke, M., Bachg, A. C., Xu, Y., . . . Hanley, P. J. 2014. Mouse Macrophages Completely Lacking Rho Subfamily GTPases (RhoA, RhoB, and RhoC) Have Severe Lamellipodial Retraction Defects, but Robust Chemotactic Navigation and Altered Motility. Journal of Biological Chemistry, 289(44), 30772–30784.

Kranz, L. M., Diken, M., Haas, H., Kreiter, S., Loquai, C., Reuter, K. C., . . . Sahin, U. 2016. Systemic RNA delivery to dendritic cells exploits antiviral defence for cancer immunotherapy. Nature, 534(7607), 396–401.

Kress, H., Stelzer, E. H. K., Holzer, D., Buss, F., Griffiths, G., & Rohrbach, A. 2007. Filopodia act as phagocytic tentacles and pull with discrete steps and a load-dependent velocity. Proceedings of the National Academy of Sciences, 104(28), 11633–11638.

Labani-Motlagh, A., Ashja-Mahdavi, M., & Loskog, A. 2020. The Tumor Microenvironment: A Milieu Hindering and Obstructing Antitumor Immune Responses. Frontiers in Immunology, 11.

Lee, J. H., Park, E., Jin, H. J., Lee, Y., Choi, S. J., Lee, G. W., . . . Paik, H. D. 2017. Anti-inflammatory and anti-genotoxic activity of branched chain amino acids (BCAA) in lipopolysaccharide (LPS) stimulated RAW 264.7 macrophages. Food Science and Biotechnology, 26(5), 1371–1377.

Lee, M., Du, H., Winer, D. A., Clemente-Casares, X., ve Tsai, S. 2022. Mechanosensing in macrophages and dendritic cells in steady-state and disease. Frontiers in Cell and Developmental Biology, 10.

Li, J., Jiang, X., Li, H., Gelinsky, M., ve Gu, Z. 2021. Tailoring materials for modulation of macrophage fate. Advanced Materials, 33(12), 2004172.

Liu, H., Moynihan, K. D., Zheng, Y., Szeto, G. L., Li, A. V., Huang, B., . . . Irvine, D. J. 2014. Structure-based programming of lymph-node targeting in molecular vaccines. Nature, 507(7493), 519–522.

Liu, J., Geng, X., Hou, J., ve Wu, G. 2021. New insights into M1/M2 macrophages: key modulators in cancer progression. Cancer Cell International, 21(1).

Liu, Y., ve Segura, T. 2020. Biomaterials-Mediated Regulation of Macrophage Cell Fate. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 8.

Liu, Y., Xu, R., Gu, H., Zhang, E., Qu, J., Cao, W., . . . Cai, Z. 2021. Metabolic reprogramming in macrophage responses. Biomarker Research, 9(1).

Loebel, C., D'Este, M., Alini, M., Zenobi-Wong, M., ve Eglin, D. 2015. Precise tailoring of tyramine-based hyaluronan hydrogel properties using DMTMM conjugation. Carbohydrate Polymers, 115, 325–333.

Loh, C. Y., Chai, J., Tang, T., Wong, W., Sethi, G., Shanmugam, M., . . . Looi, C. 2019. The E-Cadherin and N-Cadherin Switch in Epithelial-to-Mesenchymal Transition: Signaling, Therapeutic Implications, and Challenges. Cells, 8(10), 1118.

Ma, X., Yan, W., Zheng, H., Du, Q., Zhang, L., Ban, Y., . . . Wei, F. 2015. Regulation of IL-10 and IL-12 production and function in macrophages and dendritic cells. F1000Research, 4, 1465.

Mao, X., Xu, J., Wang, W., Liang, C., Hua, J., Liu, J., . . . Shi, S. 2021. Crosstalk between cancer-associated fibroblasts and immune cells in the tumor microenvironment: new findings and future perspectives. Molecular Cancer, 20(1).

Mehla, K., ve Singh, P. K. 2019. Metabolic Regulation of Macrophage Polarization in Cancer. Trends in Cancer, 5(12), 822–834.

Meli, V. S., Atcha, H., Veerasubramanian, P. K., Nagalla, R. R., Luu, T. U., Chen, E. Y., . . . Liu, W. F. 2020. YAP-mediated mechanotransduction tunes the macrophage inflammatory response. Science Advances, 6(49).

Meli, V. S., Veerasubramanian, P. K., Atcha, H., Reitz, Z., Downing, T. L., ve Liu, W. F. 2019. Biophysical regulation of macrophages in health and disease. Journal of Leukocyte Biology, 106(2), 283-299.

Morgan, P. K., Huynh, K., Pernes, G., Miotto, P. M., Mellett, N. A., Giles, C., . . . Lancaster, G. I. 2021. Macrophage polarization state affects lipid composition and the channeling of exogenous fatty acids into endogenous lipid pools. Journal of Biological Chemistry, 297(6), 101341.

Nie, A., Sun, B., Fu, Z., ve Yu, D. 2019. Roles of aminoacyl-tRNA synthetases in immune regulation and immune diseases. Cell Death & Disease, 10(12).

Pålsson-McDermott, E. M., ve O'Neill, L. A. J. 2020. Targeting immunometabolism as an anti-inflammatory strategy. Cell Research, 30(4), 300–314.

Place, A. E., Jin Huh, S., ve Polyak, K. 2011. The microenvironment in breast cancer progression: biology and implications for treatment. Breast Cancer Research, 13(6).

Ricketts, T. D., Prieto-Dominguez, N., Gowda, P. S., ve Ubil, E. 2021. Mechanisms of Macrophage Plasticity in the Tumor Environment: Manipulating Activation State to Improve Outcomes. Frontiers in Immunology, 12.

Schwertfeger, K. L., Cowman, M. K., Telmer, P. G., Turley, E. A., ve McCarthy, J. B. 2015. Hyaluronan, Inflammation, and Breast Cancer Progression. Frontiers in Immunology, 6.

Shen, H., Zhang, Y., Kramer, E. D., Katsuta, E., Wan, Y., Chen, Y., . . . Zhang, J. 2022. Loss-of-function of the hippo transducer TAZ reduces mammary tumor growth through a myeloid-derived suppressor cell-dependent mechanism. Cancer Gene Therapy, 29(11), 1791–1800.

Shen, S., Li, H. J., Chen, K. G., Wang, Y. C., Yang, X. Z., Lian, Z. X., . . . Wang, J. 2017. Spatial Targeting of Tumor-Associated Macrophages and Tumor Cells with a pH-Sensitive Cluster Nanocarrier for Cancer Chemoimmunotherapy. Nano Letters, 17(6), 3822–3829.

Snaebjornsson, M. T., Janaki-Raman, S., ve Schulze, A. 2020. Greasing the Wheels of the Cancer Machine: The Role of Lipid Metabolism in Cancer. Cell Metabolism, 31(1), 62–76.

Tu, Z., Zhong, Y., Hu, H., Shao, D., Haag, R., Schirner, M., . . . Leong, K. W. 2022. Design of therapeutic biomaterials to control inflammation. Nature Reviews Materials, 7(7), 557–574.

Verbeke, C. S., & Mooney, D. J. 2015. Injectable, Pore-Forming Hydrogels for In Vivo Enrichment of Immature Dendritic Cells. Advanced Healthcare Materials, 4(17), 2677–2687.

Viola, A., Munari, F., Sánchez-Rodríguez, R., Scolaro, T., ve Castegna, A. 2019. The Metabolic Signature of Macrophage Responses. Frontiers in Immunology, 10.

Vitale, I., Manic, G., Coussens, L. M., Kroemer, G., ve Galluzzi, L. 2019. Macrophages and metabolism in the tumor microenvironment. Cell Metabolism, 30(1), 36-50.

Wang, J., Li, D., Cang, H., ve Guo, B. 2019. Crosstalk between cancer and immune cells: Role of tumor- associated macrophages in the tumor microenvironment. Cancer Medicine, 8(10), 4709–4721.

Wang, X., Iyer, A., Lyons, A. B., Körner, H., ve Wei, W. 2019. Emerging Roles for G-protein Coupled Receptors in Development and Activation of Macrophages. Frontiers in Immunology, 10.

Wculek, S. K., Dunphy, G., Heras-Murillo, I., Mastrangelo, A., ve Sancho, D. 2021. Metabolism of tissue macrophages in homeostasis and pathology. Cellular & Molecular Immunology, 19(3), 384–408. https://doi.org/10.1038/s41423-021-00791-9

Wei, Z., Liu, X., Cheng, C., Yu, W., ve Yi, P. 2021. Metabolism of Amino Acids in Cancer. Frontiers in Cell and Developmental Biology, 8.

Yang, F., Shi, K., Jia, Y. P., Hao, Y., Peng, J. R., ve Qian, Z. Y. 2020. Advanced biomaterials for cancer immunotherapy. Acta Pharmacologica Sinica, 41(7), 911–927.

Yuan, P., Luo, Y., Luo, Y., ve Ma, L. 2021. A “sandwich” cell culture platform with NIR-responsive dynamic stiffness to modulate macrophage phenotypes. Biomaterials Science, 9(7), 2553–2561.

Zhang, D., Xu, X., ve Ye, Q. 2020. Metabolism and immunity in breast cancer. Frontiers of Medicine, 15(2), 178–207.

Zhang, X., Kim, T., Thauland, T. J., Li, H., Majedi, F. S., Ly, C., . . . Li, S. 2020. Unraveling the mechanobiology of immune cells. Current Opinion in Biotechnology, 66, 236-245.

Zhuang, Z., Zhang, Y., Sun, S., Li, Q., Chen, K., An, C., . . . Wang, H. 2020. Control of Matrix Stiffness Using Methacrylate–Gelatin Hydrogels for a Macrophage-Mediated Inflammatory Response. ACS Biomaterials Science & Engineering, 6(5), 3091–3102.