



**MİTOKONDRIYAL DİNAMİKLERDEKİ
DEĞİŞİMLERİN KANSER İNDÜKLÜ M2
MAKROFAJ POLARİZASYONUNDAKİ ETKİSİ**

Baraa MEHYO

Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Osman Nuri KELEŞ**

Yüksek Lisans Tezi-2025



SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Graduate School of Health Sciences

**MİTOKONDRIYAL DİNAMİKLERDEKİ DEĞİŞİMLERİN
KANSER İNDÜKLÜ M2 MAKROFAJ
POLARİZASYONUNDAKİ ETKİSİ**

Baraa MEHYO

**Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi**

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Osman Nuri KELEŞ**

**ERZURUM
2025**

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	I
TEŞEKKÜR	IV
ÖZET	V
ABSTRACT.....	VI
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VIII
TABLolar DİZİNİ	IX
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Akciğer Kanseri	3
2.2. Küçük Hücreli Akciğer Kanserinin Moleküler Biyolojisi.....	4
2.3. KHAK'nin Mikroçevresi.....	5
2.4. Makrofajlar	10
2.4.1. Makrofajların Polarizasyonu.....	11
2.4.2. Tümörle İlişkili Makrofajlar.....	11
2.5. Mitokondri.....	15
2.5.1. Mitokondrinin Yapısı.....	15
2.5.2. Mitokondriyal Dinamikler.....	18
2.5.2.1. Füzyon.....	19
2.5.2.2. Fiyon.....	20
2.6. Mitokondri ve Makrofajlar.....	21
2.6.1. Makrofajların Polarizasyonundaki Mitokondrinin Dışsal Etkisi.....	22
2.6.2. Makrofajların Polarizasyonundaki Mitokondrinin İçsel Etkisi.....	23

3. MATERYAL VE METOT.....	26
3.1. Klinik Araştırmalar Etik Kurul Onayı	26
3.2. Hücre Kültür Deneyleri	26
3.3. Deney Gruplarının Oluşturulması.....	26
3.4. THP-1 Hücrelerinin M0 Makrofajlarına Dönüştürülmesi.....	27
3.5. M0 Hücrelerinde Mitokondriyal Füzyon Geni MFN-2'nin siRNA ile Knockdown Edilmesi.....	27
3.6. M0 Makrofajları ile H446 Hücrelerinin Ko-Kültürü.....	28
3.7. siRNA ile MFN-2 Geni Susturulmuř M0 Makrofajları ile H446 Hücrelerinin Ko-Kültürü.....	28
3.8. Gen Ekspresyon Seviyesinin Gerçek Zamanlı PCR Yöntemi ile Analiz Edilmesi..	29
3.8.1. RNA İzolasyonu.....	29
3.8.2. RNA'dan cDNA'ya çevirilmesi.....	30
3.8.3. Gerçek Zamanlı PCR Analizi.....	30
3.9. THP-1 Kaynaklı M0 Hücrelerinde Mitokondriyal Füzyon ve Fisiyonun Rhodamine 123 Boya ile İncelenmesi.....	31
3.10. ELISA Yöntemi ile Makrofajlar Tarafından Salgılanan IL-10 ve TNF- α Sitokin Düzeylerinin Belirlenmesi.....	32
3.11. İstatistiksel Analizler.....	33
4. BULGULAR.....	34
4.1. THP-1 Hücre Hattının M0 Makrofajlara Farklařma Bulguları	34
4.2. Monokültür ve Ko-Kültürde THP-1 Kaynaklı Makrofajlarda Mitokondriyal Dinamiklere Ait Genlerin Ekspresyon Düzeyleri.....	35

4.3. Monokültürde THP-1 Kaynaklı M0 Makrofajlarda MFN-2 Geninin siRNA Knockdown Edilmesinin Mitokondriyel Dinamiklere ve İnflamatuvar Yolaklara ait Genlerin Ekspresyon Düzeyleri.....	37
4.4. Monokültürdeki ve H446 Hücre Hattı ile Ko-Kültüründeki M0 Makrofajlarda MFN-2 Geninin siRNA ile Knockdown Edilmesinin M1 ve M2 Makrofaj Polarizasyonuna Etkileri.....	39
5. TARTIŞMA.....	44
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	49
KAYNAKLAR	50
EKLER	61
EK-1. Etik Bildirim ve İntihal Beyan Formu.....	61
EK-2. Etik Kurul Onay Formu	63

TEŞEKKÜR

Yüksek tezi olarak sunduğum bu çalışmayı , emeği geçen , değerli katkılarıyla yöneten ve tezimin her aşamasında yardımlarını esirgemeyen hocam Sayın Prof. Dr. Osman Nuri KELEŞ'e, saygı ve şükranlarımı sunarım.

Laboratuvar çalışmalarında her koşulda bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım, rehberliğini büyük bir sabırla sunan ve bana yardımlarını esirgemeyen Erzurum Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. Adem KARA hocama ve ekibine derinden saygı ve şükranlarımı sunarım.

Ayrıca uyguladığım biyokimyasal analizlerde yardımlarını esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Mesut Bünyami HALICI, Doç. Dr. Mustafa İLERİTÜRK hocalarıma da saygı ve şükranlarımı sunarım.

Bu çalışmanın 13223 BAP proje numarası ile desteklenmesini sağlayan Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğüne, çalışmalarım sırasında ilgi ve desteklerini esirgemeyen çalışma arkadaşlarıma, yoğun eğitim dönemim boyunca sabırla beni destekleyen aileme teşekkür ederim. Ayrıca, bu çalışma ve tüm başarılarımı, her zaman bu anı görmek isteyen ama maalesef aramızda olmayan değerli annem ve babamın aziz ruhlarına ithaf ediyorum.

Baraa MEHYO

ÖZET

Mitokondriyal Dinamiklerdeki Değişimlerin Kansere İndüklü M2 Makrofaj Polarizasyonundaki Etkisi

Amaç: Bu çalışmada, akut monoblastik lösemi hücre hattı (THP-1) ve küçük hücreli akciğer kanseri (H446) hücre hatlarının ko-kültüründe, makrofajlarda MFN-2 (mitofusin-2) gen ifadesi siRNA ile baskılanarak makrofajlarda meydana gelen mitokondriyal dinamiklerdeki değişimler ve bu değişimlerin M1 ve M2 makrofaj polarizasyonu ve fonksiyonları üzerine etkileri araştırıldı.

Materyal ve Metot: THP-1 kaynaklı M0 makrofajları siKontrol (monokültür), siMFN-2 (monokültür siMFN-2), ko-kültür ve ko-kültür siMFN-2 gruplara ayrıldı. Ko-kültür ve ko-kültür siMFN-2 gruplarındaki M0 makrofajlar H446 hücreleri ile indirekt kültür edildi. Aynı zamanda ko-kültür siMFN-2 ve monokültür siMFN-2 gruplarındaki M0 makrofajlarda siRNA ile MFN-2 geni knockdown edildi. M0, M1 ve M2 makrofaj polarizasyonları CD14, CD86 ve CD206 gen ekspresyonları ölçülerek belirlendi. Makrofajlardaki mitokondriyal dinamiklerdeki yönelimler MFN-2 ve Drp1 ekspresyonları ve immünfloresan boyama ile belirlendi. Makrofaj polarizasyonu ile ilgili sitokinler olan TNF- α ve IL-10 seviyeleri ELİSA yöntemi ve inflamatuvar proteinler olan TLR-4 ve NLRP6 gen ekspresyonları RT-PCR ile analiz edildi.

Bulgular: MFN-2 geninin siRNA yöntemi ile baskılandığı M0 hücrelerde M2 markeri olan CD206 ekspresyonunun azaldığı ve M1 markeri olan CD86 ekspresyonunun arttığı gözlemlendi. Ayrıca H446 hücreleri ile yapılan ko-kültürde M0 hücrelerinin CD206 ekspresyonunun büyük oranda arttığı ve CD86 ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir. MFN-2 knockdown yapılmış M0 hücrelerinin H446 hücreleri ile kokültür edilmesinde ise M1 polarizasyonunun arttığı ve M2 polarizasyonunun azaldığı tespit edildi.

Sonuç: Çalışmamız kanser mikroçevresindeki makrofajlarda mitokondriyal fisyon aracılığıyla M0'dan M1'e fenotip değişimde literatürde daha önce tanımlanmayan yeni bir mekanizma ortaya koymaktadır. Ayrıca, KHAK mikroçevresindeki immün yanıtların modülasyonu için MFN-2'nin potansiyel bir tedavi seçeneği olabileceğini vurgulanmaktadır.

Anahtar Kelimeler: H446, makrofaj polarizasyonu, mitokondriyal dinamikler, THP-1

ABSTRACT

The Effect of Changes in Mitochondrial Dynamics on Cancer-Induced M2 Macrophage Polarization

Aim: This study aims to investigate the changes in mitochondrial dynamics in macrophages and their effects on M1 and M2 macrophage polarization and functions, by silencing MFN-2 (mitofusin-2) gene expression using siRNA in a co-culture system of acute monoclastic leukemia (THP-1) and small cell lung cancer (H446) cell lines.

Material and Method: THP-1-induced M0 macrophages were divided into siControl (monoculture), siMFN-2 (monoculture siMFN-2), co-culture and co-culture siMFN-2 groups. M0 macrophages in co-culture and co-culture siMFN-2 groups were indirectly cultured with H446 cells. At the same time, MFN-2 gene was knocked down with siRNA in M0 macrophages in co-culture siMFN-2 and monoculture siMFN-2 groups. M0, M1 and M2 macrophage polarizations were determined by measuring CD14, CD86 and CD206 gene expressions. The trends in mitochondrial dynamics in macrophages were determined by MFN-2 and Drp1 expressions and immunofluorescence staining. The levels of TNF- α and IL-10, cytokines related to macrophage polarization, were analyzed by the ELISA method, and the gene expressions of inflammatory proteins TLR-4 and NLRP6 were analyzed by RT-PCR.

Results: In M0 cells in which the MFN-2 gene was suppressed by siRNA, it was observed that the expression of the M2 marker CD206 decreased and the expression of the M1 marker CD86 increased. In addition, it was shown that the expression of CD206 in M0 cells was significantly increased and the expression of CD86 decreased in co-culture with H446 cells. In co-culture of MFN-2 knockdown M0 cells with H446 cells, it was determined that the M1 polarization increased and the M2 polarization decreased.

Conclusion: Our study reveals a new mechanism not previously described in the literature for the phenotype change from M0 to M1 via mitochondrial fission in macrophages in the cancer microenvironment. It also emphasizes that MFN-2 may be a potential treatment option for modulation of immune responses in the SCLC microenvironment.

Key Words: H446, macrophage polarization, mitochondrial dynamics, THP-1

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AIF	: Apoptozu indükleyen faktör
ASC	: Apoptozla ilişkili benek benzeri proteini
ASCL1	: Achaete-scute homolog 1
ATP	: Adenozin trifosfat
B7-H1	: Programlanmış hücre ölüm ligandı 1
BAK	: Bcl-2 Homologu antagonisti
BAX	: Bcl-2 ilişkili X Proteini
BCL2	: B hücreli lenfoma 2 onkogeni
CAF	: Kanserle ilişkili fibroblastlar
CCL5	: C-C Motifli kemokin ligandı 5
CCR2	: C-C Kemokin reseptörü tip 2
CTLA-4	: Sitotoksik T lenfosit antijeni 4
CXCL10	: C-X-C Motifli kemokin ligandı 10
CXCL9	: C-X-C Motifli kemokin ligandı 9
CXCR2	: C-X-C Kemokin reseptörü tip 2
DAMP	: Hasarla ilişkili moleküler patern
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DNM1L	: Dinamin-1 benzeri protein
Drp-1	: Dinamin-iliskili protein 1
ECM	: Hücre dışı matriks
EGF	: Epidermal büyüme faktörü
ER	: Endoplazmik retikulum
ER-MITO	: Endoplazmik retikulum-mitokondri temas noktaları
ETC	: Elektron taşıma zinciri
Fis1	: Mitokondriyal fisyon proteini 1
GDP	: Guanozin difosfat
GM-CSF	: Granülosit-Makrofaj koloni uyarıcı faktör
GTP	: Guanozin trifosfat
GTPaz	: GTP'yi parçalayan enzim

Guanozin
Trifosfat

H446	: Küçük hücreli akciğer kanseri hücre hattı
HGF	: Hepatosit büyüme faktörü
ICAM-1	: Hücreler arası adezyon molekülü 1
IL-1	: İnterlökin-1
IL-10	: İnterlökin-10
IL-12	: İnterlökin-12
IL-1β	: İnterlökin 1 beta
IL-23a	: İnterlökin 23a
IL4R	: İnterlökin 4 reseptörü
KHAK	: Küçük hücreli akciğer kanseri
L- OPA1	: Uzun form OPA1
LPS	: Lipopolisakkarit
M0	: THP-1 kaynaklı makrofaj hücreleri
M1	: M1 makrofajları
M2	: M2 makrofajları
M2a	: M2 Makrofaj alt tipi a
M2c	: M2 Makrofaj alt Tipi c
MCP-1	: Monosit chemoattractant protein-1
M-CSF	: Makrofaj büyüme faktörü
Mff	: Mitokondriyal fisyon proteini
MFN-1	: Mitofusin 1
MFN-2	: Mitofusin 2
MHC1	: Major histocompatibility kompleks sınıf 1
MID49	: 49 kDa'lık mitokondri dinamiği proteini
MID51	: 51 kDa'lık mitokondri dinamiği proteini
Miga1	: Mitoguardin 1
Miga2	: Mitoguardin 2
mtDNA	: Mitokondriyal DNA
mtRos	: Mitokondriyal reaktif oksijen türleri
MYC	: Myelositomatozis onkogeni
NADH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid (indirgenmiş form)
NFIB	: Nükleer transkripsiyon faktörü I-B

NF-κB	: Aktive B hücrelerinde nükleer faktör kappa B
NK	: Doğal öldürücü hücre
NKG2DL	: Doğal öldürücü hücre grubu 2 üyesi D ligandları
NLR	: NOD-benzeri reseptörü
NLRP3	: NOD-benzeri reseptör ailesi pirin domain içeren 3
NLRP6	: NOD-benzeri reseptör ailesi pirin domeni içeren 6
NO	: Nitrik oksit
OMM	: Mitokondri dış zarı
OPA1	: Optik atrofi proteini 1
PAMP	: Patojenle ilişkili moleküler patern
PI3K	: Fosfoinozitol 3-kinaz
PMA	: Phorbol 12-myristat 13- acetate
PRR	: Pattern recognition receptor
PTEN	: Fosfataz ve tensin homolog
RB1	: Retinoblastoma 1 geni
ROS	: Reaktif oksijen türleri
rRNA	: Ribozomal ribonükleik asit
RT-PCR	: Revers-transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu
S- OPA1	: Kısa form OPA1
SAM	: Mitokondri dış membranında bulunan sorting and assembly machinery (SAM) protein kompleksi
siRNA	: Küçük İnterferans yapan RNA
TAM	: Tümörler ilişkili makrofajlar
TERT	: Telomeraz ters transkriptaz
TFAM	: Mitokondriyal transkripsiyon faktörü A
TGF-β	: Dönüştürücü büyüme faktörü beta
Th1	: T yardımcı hücre tipi 1
Th2	: T yardımcı hücre tipi 2
THP-1	: Akut monoblastik lösemi hücre hattı
TIM	: İç zar translokazı
TLR-4	: Toll-Like reseptör 4
TME	: Tümör mikroçevresi
TNF-α	: Tümör nekroz Faktör – Alfa

TOM	: Dış zar translokazı
TP53	: Tümör protein 53
TRAF6	: Tümör nekroz faktör reseptörü ile ilişkili faktör 6
Treg	: Düzenleyici T hücresi
tRNA	: Transfer ribonükleik asit
VCAM-1	: Vasküler hücre adezyon molekülü 1
VEGFC	: Vasküler endotelyal büyüme faktörü C



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No

Sayfa No

Şekil 2.1. Küçük hücreli akciğer kanserinin Mikroçevresi.....	9
Şekil 3.1. Monokültür ve ko-kültür deneyleri	28
Şekil4.1. PMA ile uyarılmış ve uyarılmamış THP-1 hücrelerinin görüntüleri.....	34
Şekil 4.2. THP-1 hücre hattında ve 48 saat PMA ile tedavi edilen THP-1 hücrelerinde CD14 geninin ekspresyonunun göreceli değişimi.....	35
Şekil 4.3. Monokültür ve 48 saatlik ko-kültür THP-1 makrofajlarında MFN-2 geninin ekspresyonunun göreceli değişimi.....	36
Şekil 4.4. Monokültür ve 48 saatlik ko-kültür THP-1 makrofajlarında Drp1 geninin ekspresyonunun göreceli değişimi.....	36
Şekil 4.5. siKontrol ve siMFN-2 gruplarında MFN-2 geninin ekspresyonunun göreceli değişimi.....	37
Şekil 4.6. siKontrol ve siMFN-2 gruplarında Drp1 geninin ekspresyonunun göreceli değişimi.....	39
Şekil 4.7. siKontrol ve siMFN-2 gruplarında TLR-4 geninin ekspresyonunun göreceli değişimi.....	39
Şekil 4.8. siKontrol ve siMFN-2 gruplarında NLRP6 geninin ekspresyonunun göreceli değişimi.....	40
Şekil 4.9. THP-1 kaynaklı M0 makrofajlarının floresan mikroskop görüntüleri	41
Şekil 4.10. Farklı koşullarda M0 makrofajlarında CD86 geninin ekspresyonunun göreceli değişimi.....	42
Şekil 4.11. Farklı koşullarda M0 makrofajlarında CD206 geninin ekspresyonunun göreceli değişimi.....	43

Şekil 4.12. siKontrol ve siMFN-2 gruplarında CD206 geninin ekspresyonunun göreceli değişimi.....	44
Şekil 4.13. siKontrol ve siMFN-2 gruplarında CD86 geninin ekspresyonunun göreceli değişimi.....	44
Şekil 4.14. Farklı kültür koşullarındaki M0 makrofajlarında TNF- α miktarları (pg/ml).....	45
Şekil 4.15. Farklı kültür koşullarındaki M0 makrofajlarında IL-10 miktarları (pg/ml).....	46

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo No

Sayfa No

Tablo 3.1. Genlerin forward ve reverse primer dizileri 31



1. GİRİŞ

Dünya çapında kansere bağlı ölümlerin ana nedenlerinden biri akciğer kanseridir, özellikle de hızla gelişmesi , erken metastaz gösteren ve hayatta kalma oranı düşük olmasıyla karakterize ve son derece agresif bir tümör olan küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK)'dir. KHAK, neredeyse erken evrelerde teşhis edilmesi çok zor olan bir kanser türüdür ve hastaların %70'inden fazlasında metastaz gözlemlenir. Bu durum, KHAK'li hastaların düşük sağkalım oranlarının birincil sebebidir (Hiddinga ve ark., 2021). Bu süreçte asıl oyuncu, KHAK'nin mikroçevresinde bulunan tümörle ilişkili makrofajlardır. Özellikle, immünsüpresyon yanıtı oluşturarak tümör gelişiminde önemli rol oynayan M2 makrofajları, KHAK'li hastaların akciğer dokularında yüksek oranda bulunur ve tümörün anjiyogenezi, metastazını ve progresyonuna neden olduğu yakın zamanlarda yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Rao ve ark., 2022). M2 tip makrofajlar, tümör mikroçevresindeki immün hücreler arasında en fazla bulunan hücreler olup, tümör invazyonu , ilerlemesi ve tedaviye direnç göstermesinde önemli rol oynamaktadır (Han ve ark., 2021; Madeddu ve ark., 2022). Makrofajlar, enfeksiyon veya stresli koşullar altında dolaşımdaki monositlerden köken alarak dokulara göç eder, fagositoz, antijen sunumu ve sitokinleri/kemokinleri salgılama gibi önemli işlevleri yerine getirmektedir. Başka deyişle, makrofajlar, inflamasyon gibi doğuştan gelen immün tepkilerin düzenleyicilerinin önemli bir parçasıdır (Lendeckel ve ark., 2022). Tümör mikroçevresindeki M2 makrofajlar, tümör büyüme faktör- β ve interlökin-10 dahil olmak üzere sitokinleri salgılayarak tümörün ilerlemesini desteklerken, M1 makrofajlar , tümör nekroz faktör alfa gibi sitokinler salgılayarak tümör hücrelerine saldırıp yok etmektedir (Yunna ve ark., 2020). Ancak agresif kanser vakalarında, kanser hücreleri farklı mekanizmalarla M2 polarizasyonunu tetikler ve bu oran, kanser türlerine göre değişiklik

gösterebilir. M2 makrofajlarının oranı , kanserin ilerlemesi , metastazı ve sağkalım süresi ile bağlantılıdır; bu oran arttıkça, hayatta kalma olasılığı düşmektedir. Aksine, M1 makrofajlarının oranı arttıkça , kanser büyümesi inhibe edilir ve sağkalım süresi artmaktadır. KHAK mikroçevresinde ise M1 makrofajlarının oranı M2'ye göre çok daha düşüktür, bu da kanserin agresif özelliklerini artırır (Rao ve ark., 2022; Zhang ve ark., 2014). Dolayısıyla KHAK progresyonu önlemek amacıyla, M2 makrofajlarının M1'e dönüşümünü teşvik etmek önemlidir. Bilimsel araştırmalar ilerledikçe, bağışıklık sistemini baskılayan hastalıklar, özellikle kanserin patogeneğinde önemli rol oynayan makrofajların fonksiyonları ve farklılaşma mekanizmaları üzerine yapılan çalışmalar artmaktadır. Sonuç olarak, Makrofajların polarizasyonunda ve alt tiplerinin farklılaşmasında kritik rol oynayan mitokondriyal dinamikler, bu hücrel faaliyetleri düzenleyebilmek için önemli bir mekanizmadır. M2 fenotiplerin yara iyileşmesi ve anti-inflamatuar işlevleri yerine getirebilmesi için mitokondriyal füzyon dinamiğine, M1'lerin ise pro-inflamatuar ürünler (ROS ve NO) salgılayabilmesi için mitokondriyal fisyon dinamiğine geçmeleri gerekmektedir (Li ve ark., 2020). Bu nedenle, mitokondriyal dinamikler, TAM 'ların polarizasyonunun düzenlenmesi ve kontrolüne yönelik ilaçların geliştirilmesinde umut verici bir hedef olmuştur. Bu bilgiler doğrultusunda, çalışmada H446 ile THP-1 hücre hatlarının ko-kültüründe, siRNA yöntemiyle THP-1 kaynaklı makrofajlarda mitokondriyal füzyonun temel düzenleyicisi MFN-2 geninin ekspresyonu baskılandı. Bu baskılamanın mitokondriyal dinamikler üzerindeki etkileri analiz edilerek makrofajların farklılaşması ve fonksiyonları üzerindeki rolü değerlendirildi. Bu bağlamda, çalışmamızda M2 tipi tümörle ilişkili makrofajların (TAM) M1 fenotipine geçişinin desteklenmesiyle küçük hücreli akciğer kanserin gelişiminin inhibe edilmesi amaçlanmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Akciğer Kanseri

Dünya çapında hem kadınlarda hem de erkeklerde kanserin neden olduğu ölümlerinin en yaygın nedeni akciğer kanseridir. 2020 yılında GLOBOCAN veritabanına göre, 2,2 milyon akciğer kanseri vakası kaydedilmiş ve 1,8 milyon hasta akciğer kanseri nedeniyle hayatını kaybetmiştir. Kadınlarda meme ve kolorektal kanserlerden sonra en sık teşhis edilen üçüncü kanser türü , erkeklerde ise en sık teşhis edilen olarak birinci sırada yer almaktadır (Sung ve ark., 2020). Sigara dumanı, genel olarak akciğer kanserlerinin ana etiyolojisidir ve küçük hücreli akciğer kanseri KHAK ile güçlü bir şekilde bağlantılıdır (Wen ve ark., 2011). Yapılan araştırmalar, KHAK'li hastaların %97.5'inin ağır sigara kullandıklarını göstermektedir (Cardona ve ark., 2019). Ayrıca, KHAK riski, sigara bağımlılığının süresi ve tüketilen miktar ile doğru orantılıdır (Wang ve ark., 2019). Nikotin, kanserojen madde olarak sınıflandırılmasa da (Hech ve ark., 1999), tütün dumanı, N-nitrozaminler ve polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH) dahil olmak üzere 60'tan fazla kanserojen madde üreterek yaklaşık on yıllar sonra gen mutasyonlarına yol açmaktadır (Thandra ve ark., 2021). Ek olarak, undekan, piren ve fluoranten gibi ko-karsinojenler, genellikle hücre çoğalmasını uyaran mekanizmalarla sigara dumanı kanserojenlerinin kanserojenliğini artırmaktadır (Megysefalvi ve ark., 2023). Akciğer kanseri yalnızca sigara kullanımıyla sınırlı değildir; marihuana kullanımı, hava kirliliği, fosil yakıtların yanmasından kaynaklanan kanserojen maddeler, arsenik ve radon gazına maruz kalma gibi tütün kullanmayan kişiler için de ciddi risk faktörleri bulunmaktadır (Thandra ve ark., 2021). Akciğer kanserinde, yukarıdaki belirtilen çevresel faktörlerin yanı sıra genetik yatkınlık da önemli bir rol oynamaktadır. Yapılan araştırmalar, Akciğer kanserlerinin %8'inin kalıtsal olduğunu göstermektedir (Kanwal ve ark., 2017). Orta ve Doğu Avrupa'dan yapılan meta-analizlere göre pozitif aile öyküsü

akciğer kanseri riskini 1.7 kat artırmaktadır (Lissowska ve ark., 2010) birinci derece akrabalarla olan aile hikayesinde bu risk 2-4 kat daha fazla artmaktadır (Kanwal ve ark., 2017). Artan risk, bazı genlerin farklı kromozomal bölgeleri ile ilişkilidir; telomeraz ters transkriptaz (TERT) genini içeren 5p15 lokusu, G-protein sinyali düzenleyen 6p21 lokusunu bu riskle ilişkilendirilmektedir (Thandra ve ark., 2021).

2.2. Küçük Hücreli Akciğer Kanserin Moleküler Biyolojisi

Akciğer kanserlerinin bir alt türü olan küçük hücreli akciğer kanseri KHAK, tüm akciğer kanserlerinin %15'inden daha azını oluşturmalarına rağmen, en ölümcül, agresif, yüksek invaziviteye sahip, hızlı ilerleyen, erken metastaz yapan, düşük sağkalım oranı ve yaygın nekroz ile karakterize bir kanser türüdür (Kim ve ark., 2019; Hiddinga ve ark., 2021). Çoğu vakalar nöroendokrin hücrelerden köken alırken, epitel ve kök hücrelerinden köken alan KHAK hücreleri de bulunmaktadır ve bunlar farklı faktörleri eksprese etmektedir. Bu durum, kanserin oldukça heterojenik olmasına yol açar ve bu özellik, kanserin agresifliğine ve tedaviye dirençli olmasına katkı sağlar. Sigara dumanından yayılan genotoksik maddeler, DNA'yı etkileyerek (Kanwal ve ark., 2017) nokta delesyonları, amplifikasyonları ve heterozigotluk kayıplarına neden olur; bu da genlerin fonksiyon kaybına ve onkogenlerin aktivasyonuna yol açar (Denninghoff ve ark., 2021; Megyesfalvi ve ark., 2023; Wang ve ark., 2019; Works ve ark., 1996).

KHAK'de en çok görülen mutasyonlar, hücre döngüsünü kontrol eden ve tümörü baskılayan TP53, RB1 genlerinde homozigot delesyonlar, hemizigot kayıplardır. Bu ikili inaktivasyon, nöroendokrin hücrenin farklılaşmasında önemli rol oynayan transkripsiyon faktörü achaete-scute homolog 1 (ASCL1) ile etkileşerek tümör progresyonunu başlatmaktadır (Denninghoff ve ark., 2021; Karachaliou ve ark., 2016; Wang ve ark., 2019). KHAK vakalarının %50'sinde, proto-onkogeni olan MYC ailesi genlerinin mutasyonlarına rastlanmaktadır (Kim ve ark., 2019). Ayrıca, hücre apoptozunu

düzenleyen BCL2 proto-onkogeninde tekrarlayan ribozomal RNA mutasyonları, KHAK'nin gelişmesinde önemli rol oynamaktadır (Megyesfalvi ve ark., 2023). Ek olarak, metastatik KHAK, nükleer faktör NFIB amplifikasyonu ile karakterizedir. Bu genlerin aşırı ekspresyonu veya inaktivasyonu, anormal hücre döngülerine yol açarak KHAK hücrelerinin apoptozunu inhibe eder, hızlı proliferasyonunu destekler ve tümör mikroçevresinin oluşmasına katkı sağlar. Kısacası, yukarıda belirtilen genlerin mutasyonları, KHAK'nin ilerlemesini yönlendirmektedir (Chen ve ark., 2023).

2.3. KHAK'nin Mikroçevresi

Artan kanıtlar, tümör mikroçevresinin primer kanserin oluşumu ve progresyonu için önemli bir faktör olduğunu belirtmiştir. Daha doğrusu tümör mikroçevresi, kanser hücrelerinin ilerlemesi için apoptozdan ve immün sisteminden kaçmak için farklı yollar kullanarak kendilerini korumak amacıyla oluşturdukları ortam demektir. Ayrıca, tümör mikro ortamında bulunan hücreler, hastalığın immünoterapilere karşı direncini kazandıran en önemli faktörlerden biri olarak tanımlanmaktadır (Dangaj ve ark., 2019; Jahchan ve ark., 2019; Locati ve ark., 2020).

Bağışıklık hücreleri ve tümör hücreleri arasındaki etkileşimler, tümör mikroçevresini oluşturur. Bu mikroçevre, tümör heterojenliği , evreleri ve özellikleri üzerinde belirleyici bir rol oynar (Hanahan ve ark., 2012). Tümör mikroçevresi (TME), kanser hücreleri, kan damarları, lenfatikler, fibroblastlar, endotel hücreleri, hücre dışı matriks bileşenleri (ECM), bağışıklık hücreleri, sitokinler, kemokinler ve eksozomlar gibi sinyal moleküllerini de dahil olmak üzere tümörü çevreleyen ekosistemdeki çeşitli hücreler ve sinyalleri içermektedir (Binnewies ve ark., 2018; Dangaj ve ark., 2019; Han ve ark., 2021; Joyce ve ark., 2009). Karsinogenez sürecinde kanser hücreleri, immün sistemden kaçmak için farklı yollar kullanarak gelişmektedir ve bu mekanizma kanserin temel özelliklerinden biridir. Bu, immün baskılamak amacıyla pro-inflamatar yada anti-

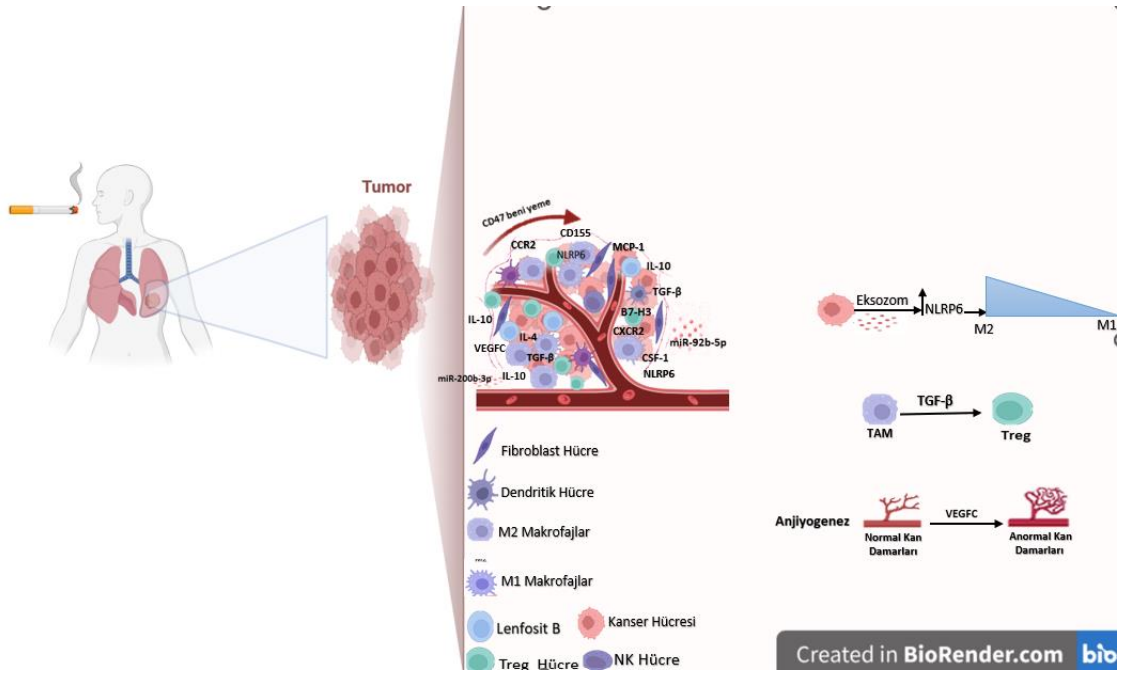
tümörojenik görev yapan M1 makrofajların baskılamasını ve pro-tümörojenik görev yapan M2 makrofajların polarizasyonunu sağlamaktadır. Polarize edilen tümör mikroortamındaki M1 ve M2 makrofajları, tümörle ilişkili makrofajlar (TAMs) olarak adlandırılmaktadır (Nielsen ve ark., 2017). TAM'lar, KHAK'ın mikroçevresindeki en önemli hücrelerden biridir. Birçok çalışma, KHAK'nin progresyonu, metastazını destekleyen ve immün hücrelerin arasında en çok bulunan M2 TAM'lar popülasyonunun olduğunu kanıtlamıştır. Tümör hücreleri, M-CSF faktörünü salgılayarak TAM'ların tümör mikroçevresine sızmasını sağlar (Dora ve ark., 2021; Klein ve ark., 2023; Rao ve ark., 2022). KHAK mikroçevresinde, hem tümör hücreleri hem de tümörle ilişkili makrofajlar, CCR2 reseptörü ve MCP-1 kemokini salgılayarak M2 makrofajlarının polarizasyonunu teşvik eder (Hamilton ve ark., 2016). Ayrıca, tümör anjiyogenezinde ve M2 makrofajlarının polarizasyonunda önemli bir efektörü olan VEGFC ve M2 makrofajlarının aktivasyonu sağlayan IL4R ve CXCR2 gibi kemokin ve interlökin reseptörleri de KHAK mikroçevresinde ifade edilmektedir (Dora ve ark., 2021). KHAK mikroçevresi, kronik enflamasyon, metastaz ve M2 fenotipli makrofajların artışıyla karakterizedir. Bilindiği gibi genel olarak enfekte edilmiş hücrelerinin mitokondriden kaynaklanan ROS üretimi ile apoptozla ilişkili benek benzeri ASC proteini bağımlı NLRP3 enflammasomunun aktifleşmesi, kaspaz-1'i aktif hale getirir ve IL-18, IL-1 β gibi sitokinlerin salınımını sağlar. Bu sitokinler, doğal immün hücreleri tetikleyerek enfekte dokulara geçmelerini sağlar ve NLRP3 ile bağılı enflamasyon başlatılır (Kelley ve ark., 2019; Missiroli ve ark., 2020). Ancak, kanserleşmiş hücreler, mtDNA çeşitli mutasyonları nedeniyle aşırı ROS salınımını kontrol ederek ilerler. Artan ROS, hücre tipine bağılı olarak NLRP3, NLRP6, NLRP1 ve NLRP9 gibi enflammasomları aktif hale getirir ve kronik enflamasyonu tetikler (Missiroli ve ark., 2020; Sharma ve ark., 2016).

KHAK'de, NLRP6 aracılı enflamasyon, tümör migrasyonunda görev alan M2 makrofaj polarizasyonuna teşvik etmektedir. Yapılan çalışma, tümör hücrelerinde M2 makrofaja özgü antijen CD206 ve enflamasyon olan NLRP6 ekspresyonunun metastazlı hastalarda metastaz olmayana göre daha yüksek olduğunu göstermiştir. Yani, KHAK hücrelerinde M2 ve NLRP6 belirteçlerinin ekspresyonu, tümör metastazı ve düşük sağkalımla önemli düzeyde bağlantılıdır (Rao ve ark., 2022). KHAK hücreleri, immün sistemden kaçmak sadece M2 polarizasyonu sağlamakla kalmaz , "beni yeme" sinyali CD47'nin ekspresyonunu artırarak makrofajlardaki baskılayıcı reseptör olan sinyal düzenleyici protein alfa (SIRPa) ile bağlanarak tümörün fagositozunun inhibisyonuna neden olmaktadır (Chen ve ark., 2023; M. Zhang ve ark., 2016). Ek olarak, KHAK hücreleri, immünsüpresyon ortamı oluşturmak amacıyla T hücrelerinin infiltrasyonuna ve aktivasyonuna da etkisi bulunmaktadır. İlk olarak, KHAK kanser hücreleri, MHC1'in düşük veya hiç ekspresyonu olmaması ve MHC2'nin bulunmaması ile karakterizedir. Bu durum, yardımcı ve sitotoksik T hücrelerinin aktivitesinin düşük olmasına ve immün terapilere karşı direnç göstermelerine neden olabilir (He ve ark., 2017; Mahadevan ve ark., 2021). KHAK hücreleri ve tümör stromasındaki matriks hücreleri, bol miktarda vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) salgılayarak vasküler hücre adezyon molekülü 1'i (VCAM-1) ve hücreler arası adezyon molekülü 1'i (ICAM-1) ekspresyonunu aşağı regüle edilmesine neden olmaktadır. Bu durum, sitotoksik T hücre infiltrasyonunun azalmasına neden olmaktadır (Chen ve ark., 2023; Huinen ve ark., 2021). Ayrıca, tümör mikroçevresinde sitotoksik T hücre infiltrasyonuna etki eden kemokinleri de bulunmaktadır , tümör mikro ortamına sitotoksik T hücre infiltrasyonu tetiklemek için immün hücrelerinden CXCL9/CXCL10 ve tümör hücrelerinden CCL5'in birlikte ifade edilmesi gerekmektedir , ancak tümör hücreleri sıklıkla epigenetik baskılama ile CCL5 ekspresyonunu düşürür (Dangai ve ark., 2019). Ancak yüksek CCL5 ekspresyonlu şanslı

SCLC vakaları da bulunmakta ve bunlar daha uzun sağkalımı göstermektedir. Dolayısıyla CCL5 hastalığının sağkalımı için bir belirteç olarak kullanılabilmektedir (Tang ve ark., 2022). KHAK hücrelerinde majör histokompatibilite kompleksi (MHC1, MHC2) ekspresyonu düşük olduğundan tümör bölgesine T hücrelerinin infiltrasyonu da azalmaktadır. Ancak, immün sistemdeki doğal öldürücü (NK) hücreleri, MHC1'in düşük ekspresyonuna sahip hücreleri bile tanıyabilir (Best ve ark., 2020), ama KHAK hücreleri, NK hücrelerinin aktivitesini inhibe edebilme yeteneğine sahiptir. NK hücrelerinin anti-tümör fonksiyonunu yerine getirebilmesi için kanser hücrelerinde NK aktif edici reseptör ligandları (NKG2DL) ifade edilmesi gerekmektedir. Ancak KHAK hücrelerinde NKG2DL'nin ekspresyonu, tüm tümör tipleri arasında en düşük olduğu yapılan çalışmalarla belirlenmiştir (Zhu ve ark., 2021).

Ek olarak, Makrofajlarda ve dentritik hücrelerde bulunan ve KHAK hücreleri tarafından bol miktarda eksprese edilen CD155, T ve NK hücrelerinde bulunan immün reseptörü olan TIGIT ile bağlanması, dentritik hücrelerin antijen sunumunun inhibisyonuna, CTLA-4 gibi T hücrelerin ortak tetikleyici sinyallerinin inhibisyonuna yol açar ve mikroçevrede IL-10 üretimini teşvik eder. Bu şekilde, sitotoksik T ve NK hücrelerinin aktivitesi doğrudan baskılanır ve böylece immün sistem baskılanmış olmaktadır (Chauvin ve ark., 2020; Solomon ve ark., 2018; Xu ve ark., 2019). Ayrıca, T hücrelerinin ortak inhibitör reseptörü olan B7-H3'ün KHAK'de %64,9 oranında bulunması, bu kanser tipinin ne kadar dirençli olduğunu açıklamaktadır (Chauvin ve ark., 2020). Ek olarak, KHAK mikroçevresinde bulunan veziküller eksozom adı verilen kanser hücrelerinin komşu hücrelerle iletişimde fonksiyonel aracılık ederek kanser metastazı ve invazyonunda önemli rol oynamaktadır (Pedersen ve ark., 2022). İnsan göbek damarı endotel hücrelerinin çoğalmasında, tüp oluşumunu ve mikrodamar filizlenmesini artıran eksozomal miR-141, KLF12 yolu ile KHAK'nin anjiyogenezinin tetiklendiğini yapılan

araştırmalar göstermiştir (Yin ve ark., 2021). Diğer bir çalışmada KHAK progresyonuna katkıda bulunan miR-200b-3p, miR-92b-5p ve miR-3124-5p gibi miRNA'lar tanımlanmıştır (Kim ve ark., 2023). KHAK hücrelerinden kaynaklanan eksozomlar, tümörün anjiyonezinin yanı sıra NLRP6/NF- κ B yoluyla M2 makrofajların polarizasyonunu teşvik ettiği ve bu mekanizmanın kanser metastazında önemli bir role sahip olduğu kanıtlanmıştır (Rao ve ark., 2022). Son olarak küçük hücreli akciğer kanserinin mikroçevresinin içeriği anlatan bir şemada Şekil 2.1'de sunulmuştur.



Şekil 2.1. Küçük hücreli akciğer kanserinin mikroçevresi

2.4. Makrofajlar

Vücutta ilk savunma hattı olan doğuştan gelen immünitinin hücrelerinden biridir. Bu hücreler embriyonik yolk kesesi, fetal karaciğer ve dolaşımdaki miyeloid mononükleerler hücrelerden köken almaktadır (Hu ve ark., 2018). Makrofajlar oldukça heterojendir, dokularda yerleşik olan ve sitokinler aracılığıyla aktifleşip enfekte dokulara infiltre eden makrofajlar olmak üzere iki ana sınıfına ayrılmaktadır (Pérez ve ark., 2022). Dokuda yerleşik makrofajlar, bulundukları organa özgü farklı özellikler gösterebilir. Örneğin, akciğerde alveolar ve interstisyel makrofajlar, kemik iliğinde osteomaklar ve osteoklastlar, intraventriküler dokuda ise epipleksus hücreleri bulunmaktadır (Mass ve ark., 2023). Ancak makrofajların heterojenliği sadece dokuda bulunan makrofajlara sınırlı değildir, aynı zamanda, dokuya sızan makrofajlar da son derece plastisitedir ve çeşitli yollar ile farklı fenotiplere dönüşebilir. Makrofajlar, yardımcı Th1 hücrelerinden salınan sitokinlerle M1 makrofajlara ve yardımcı Th2 hücrelerinden salınan sitokinlerle M2 makrofajlara polarize olabilirler (Wager ve ark., 2014). Makrofajlar, patojenlerin, apoptotik hücrelerin, karaciğer ve dalaktaki nötrofillerin ve eritrositlerin fagositozunu gerçekleştirir. Ayrıca, MHC-2 sistemi aracılığıyla antijenleri tanıyıp T hücrelerine sunarak kazanılmış bağışıklık yanıtını aktive eder. Bunun yanı sıra, çeşitli sitokin ve kemokinler salgılayarak bağışıklık yanıtının düzenlenmesine katkıda bulunur. Makrofajlar, inflamasyonun başlatılması ve sonlandırılmasında da önemli rol oynar (Boutillier ve ark., 2021). Ayrıca, dikkat çeken bir diğer fonksiyonları ise tümör mikroçevresindeki rolleriyle ilgilidir. Tümör bölgesine sızan bağışıklık hücreleri arasında en büyük yüzdelik dilimi makrofajlar oluşturur. Fenotiplerine bağlı olarak tümör gelişimini destekleyebilir veya tümör baskılayıcı etki gösterebilirler (Madeddu ve ark., 2022).

2.4.1. Makrofajların Polarizasyonu

Hücrelerde patojenle ilişkili moleküller PAMP'ler veya hücrelerden ROS üretimi , mtDNA gibi hasarla ilişkili moleküller DAMP'lar, doğal immüneyi uyarır ve makrofajların aldıkları uyarıya göre farklı fenotiplere farklılaşır (Missiroli ve ark., 2020; Watanabe ve ark., 2019). İlk olarak, Th1 hücrelerinden salınan interferon gama , sitokinler ve liposakkaritler LPS veya mikroorganizma ürünleri, toll like reseptörleri (TLR) ve GM-CSF aracılığıyla makrofajları aktif hale getirir ve bu, makrofajların M1 fenotipine dönüşmesine yol açar. Aktif olan M1 makrofajlar, tümör nekroz faktör alfa TNF- alfa , interleokin IL-1 α/β , IL-12 ve IL-23 gibi pro-inflamatuar sitokinleri salgılar ve mikrobisid etkiye sahiptir. Ayrıca, bu makrofajlar tümör hücrelerine karşı savaşır ve anti-tümör etkileri gösterir. Ek olarak CD80, CD86 ve CD64 gibi antijenleri de eksprese etmektedir (Murray ve ark., 2017; Wang ve ark., 2019). Makrofajlar , Th2 (Tip2 yardımcı T) hücrelerinden salınan IL-13 , IL-4 gibi sitokinlerle M2 fenotipine farklılaşmaktadır. M2 makrofajları aktiveleştğinde, tümör büyüme faktörü TGF- β ve IL-10 salgılayarak dokulara migrasyonu ve anti-inflamatuar etki sağlamaktadır. M2 makrofajlar ayrıca tümörün ilerlemesi, metastazı ve anjiyogenezinde rol oynar. Bu nedenle, M2 makrofajları genellikle tümörün "dostu" olarak tanımlanır (Sedighzadeh ve ark., 2021). M2 makrofajları, CD206 , CD204 ve CD163 gibi antijenleri eksprese etmektedir (Han ve ark., 2021; Pérez ve ark., 2022).

2.4.2. Tümörle İlişkili Makrofajlar

Tümör bölgesine infiltre eden tüm hücelere tümörle ilişkili hücelere denir; eğer bu hücelere makrofaj ise, tümörle ilişkili makrofajlar (TAM'lar) olarak adlandırılmaktadır. TAM'lar, tümör mikroçevresindeki immün hücelerin çoğunluğunu oluşturur ve yaklaşık tümör kitlesinin yarısını kapsar (Domagala-Kulawik ve ark., 2014; Madeddu ve ark., 2022). Kansere hüceleri, tümörün progresyonunu sağlamak amacıyla

mikro çevresel molekülleri salgılayarak TAM'ların polarize edilmesinde ve aktivasyonunda önemli bir rol oynar (Wu ve ark., 2020). Artan kanıtlar, TAM'ların kanser büyümesi, ilerlemesi ve invazyonunu sağlayan M2 fenotipli makrofajlara benzerlik gösterdiklerini belirtmektedir (Li ve ark., 2018). Öncelikle, TAM'ların tümör hücrelerine karşı sitotoksik etki göstermemesi, reaktif oksijen ara ürünleri (ROI'ler) gibi sitotoksik maddelerin düşük seviyelerde üretilmesinden kaynaklanır. Ayrıca, TAM'ların düşük seviyelerde MHC molekülünü ifade etmesi nedeniyle antijen sunumu ve adaptif immün yanıtın indüklenmemesi söz konusudur. Bunun sonucunda, düşük veya hiç interleukin-12 üretimi ve yüksek seviyelerde IL-10 üretimi gibi M2 fenotipine özgü ortak özellikler sergilerler (Mantovani ve ark., 2002; Sica ve ark., 2006). Birçok kanser türü üzerinde yapılan çalışmalar, TAM'ların ekspresyon seviyesinin tümör progresyonu için bir belirteç olduğunu göstermiştir (Yang ve ark., 2017). Lenfoma (Dave ve ark., 2004) , karaciğer (Budhu ve ark., 2006) ve küçük hücreli ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri gibi katı tümörlerde kötü prognoz ile ilişkili olduğu bulunmuştur (Leader ve ark., 2021; Rao ve ark., 2022). Kanser hücresi, IL-10, IL-6, PGE2, TGF β ve M-CSF ve CCL2, CCL18, CCL17 ve CXCL4 gibi M2 makrofajlarını polarize eden sitokin ve kemokinleri salınarak monositlerin tümör mikroçevresinde M2'ye farklılaşmasını sağlar (Allavena ve ark., 2008; Locati ve ark., 2020; Mantovani ve ark., 2017). Ayrıca, Tümör hücrelerinden salınan histamin, M2 fenotipine benzer makrofajların polarizasyonuna ve T hücresi aktivasyonunun baskılanmasına yol açarak immünoterapiye direnç kazandırır (Li ve ark., 2022). Tümörün ilerlemesinde rol oynayan sadece tümör hücreleri değildir, TAM'lar da önemli bir katkıda bulunur. Daha doğrusu, tümörün gelişimini desteklemek için tümör hücreleri TAM'lar ile birlikte sinerjistik bir etki gösterir. TAM'ların M2 fenotipi, tümör gelişiminin farklı evrelerinde farklı fonksiyonlar üstlenir ve tüm bu fonksiyonlar tümörün ilerlemesini desteklemektedir. IL-6, hepatosit büyüme faktörü (HGF) ve

epidermal büyüme faktörü (EGF) gibi kanser kök hücrelerinin büyümesini destekleyen faktörleri üretirler (Mantovani ve ark., 2022). Ayrıca TAM'ların tümör anjiyogenezinde de rolleri bulunmaktadır. Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri üzerinde yapılan bir çalışma, anjiyogenezi tetikleyen vasküler endotelyal büyüme faktörü-A (VEGF-A) adlı faktörün TAM'lar tarafından üretildiğini kanıtlamıştır (Hwang ve ark., 2020). TAM'lar, tümör hücreleri immün sistemden kaçmak amacıyla immünsüpresif faktörleri salınarak T hücreleri, nötrofiller ve NK gibi anti-tümör immün hücrelerinin fonksiyonunu baskılamaktadır (Li ve ark., 2023).

Bilindiği üzere, N-glikanları gibi T hücresi yüzeyi glikanları ve galektinler arasındaki etkileşimler, fonksiyonel olarak T lenfosit ölümünü ve inflamatuvar yanıtları düzenleme kapasitesine sahiptir. TAM'lardan salgılanan IL-10 ile sitotoksik T hücre yüzeyinde ekspresyonu artan N glikanlar ve tümör hücrelerinden salgılanan hücre dışı galaktin-3, T hücrelerinin yüzeyindeki reseptörüne bağlanarak TCR ekspresyonunun down regüle edilmesine ve T hücrelerinin inaktive hale getirilmesine neden olmaktadır. Küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde, galektin-3'ün çoğu vakalarda ekspresyonunun yüksek olduğu belirlenmiştir (Dangaj ve ark., 2019; Guo ve ark., 2020). TAM'lardan salınan IL-10, T hücrelerinin aktivitesini baskılayabilen B7-H1 ekspresyonunu indükler (Kuang ve ark., 2009). TAM'lardan salgılanan TGF- β , yardımcı T hücrelerinin yüzeyindeki PD-1 reseptörünün ekspresyonunu artırarak yardımcı T hücrelerinin immünsüpresif Treg hücrelerine dönüşümünü uyarır (Kos ve ark., 2022). Ayrıca, TAM'lardan salgılanan TGF- β , anti-tümör görev yapan ve M1 makrofajlara repolarizasyonu indükleyen NK hücre fonksiyonunu da inhibe edebilir (Deng ve ark., 2018; Peng ve ark., 2017). Ek olarak, TGF- β sadece T hücrelerine etki etmez, aynı zamanda fibroblastların mezenkimal-mezenkimal geçişini düzenler ve tümörle ilişkili fibroblastların (CAF) aktivasyonunu da artırabilir (Comito ve ark., 2014).

Aktifleştirilmiş CAF'ler, IL-6, GM-CSF ve CCL2 gibi TAM'ları uyarabilen sitokinleri salgılatır, böylece immünsüpresif bir ortam oluşturulmuş olur (Cho ve ark., 2018; Ksiazkiewicz ve ark., 2010). TAM'ların nötrofil hücreleri üzerinde de etkisi vardır. Meme kanseri üzerinde yapılan bir çalışmada, TAM'lardan salınan interlökin-1 β 'nin, tümör mikroçevresine nötrofil infiltrasyonunu sağlayan interlökin-17 üretimini indüklediği ve meme kanserinin metastazını teşvik edilebildiği gösterilmiştir (Kersten ve ark., 2017). Aynı zamanda, tümör mikroçevresine infiltre eden nötrofiler TAN'lar, CCL2 ve CCL17 gibi Treg ve TAM'ların infiltrasyonunu tetikleyen faktörleri salgılayarak tümör gelişiminde ve ilaca karşı dirençta rol oynamaktadır; bu mekanizma hepatoselüler kanserde rastanmıştır (Zhou ve ark., 2016). TAM'ların katı tümör ilerlemesini desteklediği en iyi tanımlanmış mekanizma, metastazı teşvik eden faktörleri salıvererek öncül tümör hücreleri için bir niş oluşturulmasıdır. TAM'lar, katepsinler ve matriks metalloproteinazlar (MMP 2,7,9) gibi hücre dışı matriksinin (ECM) kollajen liflerini parçalayan proteazları ekprese ederek, tümör hücrelerinin dolaşıma girmesi ya da hedef organa geçmesi için tümör mikroçevre metastazı (TMEM) kapıları oluşturarak epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT) mekanizmasını başlatır (Bied ve ark., 2023). Metastazlı KHAK'li hastaların akciğer dokularında çok sayıda M2 makrofajlarının bulunduğu ve tümörün metastazına ve progresyonuna neden olduğu yapılan çalışmalarda kanıtlanmıştır (Rao ve ark., 2022). TAM'ların yukarıda bahsedilen tüm fonksiyonlarına ek olarak, son yıllarda dikkat çeken bir fonksiyonu daha bulunmaktadır. Hücreler arası iletişimi sağlayan ve fonksiyonel araçlar olarak görev yapan TAM'lardan salgılanan ekzozomlar, anjiyogenezi tetikleme, kemorezistans ve tümör hücrelerinin immün kaçışını sağlama gibi, tümör hücrelerinin hayatta kalmasını destekleyen fonksiyonlarında önemli rol oynamaktadır (Han ve ark., 2021). Pankreas duktal adenokarsinomu üzerinde yapılan bir çalışmada, M2 TAM'lardan salınan ekzozomal miR-501-3p, VEGF-A ve VEGFR-2 gibi

anjijojenik faktörlerin ekspresyonunu artırarak kanser hücrelerinin anjiyogenezini sağladığı kanıtlanmıştır (Yin ve ark., 2019). Diğer çalışma, TAM'lardan salgılanan eksozomal miR-21'in mide kanseri hücrelerinde PTEN'i aşağı ederek PI3K/ AKT sinyal yolağının aktivasyonunu artırdığı, bunun da kanser hücrelerinin apoptozunu inhibe ettiği gösterilmiştir (Han ve ark., 2021). Benzer şekilde, başka bir çalışmada, TAM'lardan kaynaklanan eksozom miR-223'ün, PTEN/PI3K/AKT yolunu aktive ederek epitelial over kanseri hücrelerinde ilaç direncini artırdığı gösterilmiştir (Zhu ve ark., 2019).

2.5. Mitokondri

Mitokondri, ökaryotik hücrelerde hayati öneme sahip bir organel olup, biyoenerjinin ana merkezidir. Hücresel solunumun gerçekleşmesi için oksidatif fosforilasyon yolu ile glikozu ATP molekülleri formunda kullanılabilir hücresel enerjiye dönüştürür ve aynı zamanda reaktif oksijen türleri ROS üretme eğilimindedir. Enerji üretimine ek olarak, birçok hücresel fonksiyonda hayati ve önemli rol oynamaktadır (Hogarth ve ark., 2023; Lin ve ark., 2022). Mitokondri, sitokrom c, AIF, gibi çeşitli pro-apoptotik faktörleri salgılayarak Apoptoz ve ferroptoz gibi programlanmış hücre ölümü yollarının başlatılmasına katkıda bulunur (Fricker ve ark., 2018; Kuznetsov ve ark., 2023). Ayrıca, dokunun homeostazını sağlayan bağışıklık tepkisinin kontrolüne de katkıda bulunur. Enfekte edilen hücrenin mitokondrisi, reaktif oksijen ürünleri ve mtDNA gibi "beni kurtar" sinyali olarak adlandırılan hasarla ilişkili molekülleri aşırı salınarak doğal immüitenin indüklenmesine neden olmaktadır (Missiroli ve ark., 2020).

2.5.1. Mitokondrinin Yapısı

Mitokondri, görevlerini yerine getirebilmek için özel bir yapıya sahiptir ve içindeki her organelin bir görevi bulunmaktadır. Dört ana komponentten oluşur: dış zar , iç zar , zarlar arası boşluk ve matrikstir. Mitokondrinin sitoplazmadan ayıran dış zar, porinler adı verilen zar proteinleri aracılığıyla 5.000 Da'dan küçük moleküllerin ve

iyonların seçici olarak geçişini sağlar (Giacomello ve ark., 2020; Kühlbrandt ve ark., 2015). Dış zarın seçici geçirgenliği sayesinde mitokondri, demir, potasyum, magnezyum, sodyum ve kalsiyum gibi moleküllerin matrikse girişini düzenleyerek hücrenin iyon seviyelerinin homeostazını sağlamaktadır (Wang ve ark., 2021). Proteinler gibi büyük moleküllerin zarlar arası boşluğa geçişine izin vermek için dış zarda TOM ve SAM kompleksi olmak üzere özel sistemler bulunmaktadır. Tom70 ve Tom20 olmak üzere TOM reseptör proteinleri aracılığıyla proteinler, TOM40 gözeneklerinden geçip SAM komplekslerine taşınır (Gupta ve ark., 2021; Protasoni ve ark., 2021). Ayrıca, apoptotik sinyallere yanıt olarak mitokondriyal dış zarda bulunan BCL-2 proteinleri BAK ve BAX'ın homo oligomerizasyonu yoluyla dış zar OMM geçirgenliğinin artmasına ve elektron taşıma zincirinde görev alan sitokrom c enziminin sitoplazmaya salınmasına izin vererek, sitoplazmadaki kaspaz 9 enzimini aktifleştirip hücre apoptoz yolağının başlatılmasına neden olur (Pernas ve ark., 2016; Protasoni ve ark., 2021). Ek olarak, dış zar, komşu hücreler arasında iletişim kurabilmek amacıyla iyon yada sinyal alışverişi yapmak için mitokondriyal dış zarı komşu hücrenin endoplazmik retikulum gibi alt organelleriyle membran temas bölgeleri oluşturabilir (Giacomello ve ark., 2020; Gupta ve ark., 2021). Mitokondriyal iç membran, mitokondriyal kristaları oluşturacak şekilde katlanır ve bu kıvrımlar, solunum zincirinin enzimlerinin ve solunum reaksiyonlarında rol oynayan ATP sentaz enzimlerinin yerleşimi için yüzey alanını artırarak oksidatif fosforilasyonu daha verimli hale getirir ve böylece daha fazla ATP sentezinin artmasına neden olur. Kristayı çevreleyen iç zar, gözeneksiz olup küçük moleküllerin bile geçişine izin vermediğinden krista içeriğinin zarlar arası boşluğa salınmasını engeller. İç membran gözeneksiz olsa da, sitoplazma ile matriks arasında iyonların, çözünen maddelerin ve küçük metabolitlerin taşınmasını sağlayan (TIM) adı verilen protein translokazları ve kanal taşıyıcıları içerir (Giacomello ve ark., 2020; Gupta ve ark., 2021). TIM kompleksi

farklı protein aktarılan TIM22 ve TIM23 olmak üzere kompleksleri içermektedir (Cojocaru ve ark., 2023).

Mitokondrinin dış zarındaki TOM ve iç zarındaki TIM kompleksleri, mitokondriyal protein taşınması için sinerjik olarak çalışmaktadır (Gupta ve ark., 2021; Kühlbrandt ve ark., 2015). İç zarla çevrelenen ve uzantıların dışında olan bölme en içteki boşluğa mitokondriyal matriks denir. Bu matrikste, trikarboksilik asit döngüsü , yağ asidi oksidasyonu gibi biyokimyasal metabolizmaları gerçekleşir; dolayısıyla siklofilin D , lipit enzimleri ve NADH sentezi için gerekli sitrik asit döngüsü enzimlerini içerir (Protasoni ve ark., 2021; Wu ve ark., 2023). Ayrıca, hücrenin nükleer DNA'sından ayrı olarak matrikste bulunan ve mitokondrinin en ilginç özelliklerinden biri olan benzersiz bir genom içerir. mtDNA, oksidatif fosforilasyonda görev alan 13 protein , 22 tRNA ve 2 rRNA dahil olmak üzere 37 geni kodlayan, 16.569 baz çiftinden oluşan çift sarmallı dairesel bir DNA molekülüdür (Cojocaru ve ark., 2023; Protasoni ve ark., 2021). Mitokondriyal transkripsiyon faktörü TFAM, nükleotidleri oluşturarak mitokondriyal DNA'nın transkripsiyonunu gerçekleştirir. Tek hücrede yaklaşık 1000 nükleotid bulunur ve her biri mitokondriyal DNA'nın bir kopyasını içerir. Ancak mitokondriyal genom on üç proteini kodlayabilmektedir. Ayrıca, matrikste mitokondriyal ribozomlar bulunduğundan protein translasyonu da gerçekleşir (Gupta ve ark., 2021; Kühlbrandt ve ark., 2015). Mitokondriyal iç ve dış zar arasındaki yaklaşık 20 nm'lik mesafeye zarlar arası boşluk denir. Bu boşluk, mitokondrinin en dar kısmı olsa da proteinlerin girişi için geniş bir yolak oluşturur. Mitokondriye sitoplazmadan gelen tüm matriks proteinlerini , ATP sentezi sürecinde açığa çıkan protonları, dış ve iç zardan geçen iyonları ve molekülleri içerir. Bu boşluğun konumu nedeniyle, aralarından geçen tüm iyonların ve proteinlerin oranlarının düzenlenmesinde rol oynar (Edwards ve ark., 2021; Kühlbrandt ve ark., 2015). Matriks ve sitozol arasında protein ve iyonların değiş tokuş yapması,

apoptozun başlatılması ve solunum reaksiyonlarında açığa çıkan reaktif oksijen türlerinin önlenmesi gibi fonksiyonlara da sahiptir (Herrmann ve ark., 2010). Ayrıca, TOM ve TIM kompleksleri zarlar arası boşluğu kapsamaktadır (Kühlbrandt ve ark., 2015).

2.5.2. Mitokondriyal Dinamikler

Mitokondri, fonksiyonlarını koruyabilmek amacıyla hücrenin enerji ve besin ihtiyacını karşılamak, biyoenerjetik adaptasyonu sağlamak, hücrelerin döngüsünü düzenlemek ve hücrel sınıyallemeye uyum sağlamak için fisyon ve füzyon olmak üzere dinamik süreçler gerçekleştirir (Protasoni ve ark., 2021; Wu ve ark., 2023). Bu iki antagonist dinamikler , mitokondrinin şeklini, dağılımını ve boyutunu kontrol eder ve en önemlisi hücrenin sağkalımına katkıda bulunmaktadır (Tilokani ve ark., 2018). Mitokondriyal füzyon, mitokondrilerin birleşmesiyle tüp benzeri bir yapı oluşturmalarını sağlarken, fisyon ise mitokondrilerin parçalanmasıyla fragmanlar oluşturmalarına neden olur (Protasoni ve ark., 2021). Mitokondriyal dinamikler oldukça kritik bir süreçtir; hem hücrelerin yaşamını sürdürebilmesi hem de yaşlanma ve hücre ölümünün düzenlenmesi açısından önemli. Bu nedenle çift yönlü etkisi nedeniyle "iki ucu keskin bir kılıç" olarak tanımlanabilir (Giacomello ve ark., 2020; Spurlock ve ark., 2020; Wu ve ark., 2023). Ayrıca, mitokondriyal dinamiklerin dikkat çekici bir fonksiyonu da vardır. Enfekte olmuş hücrelerde mitokondriler, reaktif oksijen ürünleri ve mtDNA gibi "beni kurtar" sinyali adlandırılan hasarla ilişkili molekülleri aşırı miktarda salgılayarak doğal immün sistemini uyarır. Böylece hem immün reaksiyonların başlatılmasına hem de pro-inflmatuar ve anti-inflmatuar makrofajların polarizasyonuna katkıda bulunur (Missiroli ve ark., 2020).

2.5.2.1. Füzyon

Mitokondrinin bütünlüğünü, biyokimyasal ve genetik homojenliğini korumak için iki mitokondri birleşerek proteinleri, mtDNA'yı ve lipitleri birbirleriyle değiş tokuş yaparak füzyon dinamiğine geçmektedir (Pernas ve ark., 2016). Füzyon, dinamin

proteinlerinin bir üyesi olan Guanosin Trifosfat GTPaz proteinleri tarafından indüklenmektedir (Protasoni ve ark., 2021). Dış zarın füzyonu mitofusin (MFN-1, MFN-2, Miga1 ve Miga2) proteinleri aracılığıyla gerçekleşirken, iç zarın füzyonu OPA1 proteini tarafından sağlanmaktadır (Pernas ve ark., 2016; Zhang ve ark., 2016). Ayrıca, MFN-2 sadece mitokondriyal dış zarında bulunmaz, aynı zamanda endoplazmik retikulumda da yer alarak mikondri ile arasındaki bağlantıların kontrolünde rol oynar (De Brito ve ark., 2008; Filadi ve ark., 2015; Tilokani ve ark., 2018). MFN-2 yokluğunda, endoplazmik retikulum ile mitokondri arasındaki mesafe artar ve ER ile mitokondri arasındaki kalsiyum ile lipid değişimi azalır. Yani MFN-2, kalsiyum ve lipid dengesinin kontrolünü sağlamaktadır. Miga proteininin yokluğu mitokondrinin bölünmesine yol açarken, Miga'nın aşırı ekspresyonu hem sinek hem de memli hücrelerinde mitokondriyal toplanmaya ve füzyona neden olmaktadır. OMM füzyonu, iki mitokondrinin bağlanması, iki kaynaşmış zar arasındaki mesafenin azalmasıyla zarların kenetlenmesi ve mitofusinlerin GTP hirolizine bağlı konformasyonel değişiklikler sonucunda dış zarın kaynaşması olmak üzere üç adımda gerçekleşmektedir (Brandt ve ark., 2016; Ishihara ve ark., 2004; Legros ve ark., 2002). Mitokondriyal dış zarın füzyonunun ardından, iç zarın füzyonu optik atrofi 1 OPA1 proteini aracılığıyla gerçekleşmektedir. OPA1, ya doğrudan iç mitokondriyal zar IMM ile bağlanır yada zarlar arası boşluk IMS ile bağlanmaktadır. OPA1, IMM'ye bağlandığında , IMM'ye bağlı Yme1 veya Oma1 proteazları tarafından parçalanarak kısa (S- OPA1) ve uzun (L- OPA1) formlarına dönüştürülür. Fakat yalnızca uzun formdaki OPA1, füzyon dinamiğini aktif hale getirebilmektedir (Spurlock ve ark., 2020). OPA1 proteininin görevi sadece füzyonla sınırlı değildir. Aynı zamanda, kristanın iç zara bağlandığı noktaların (kavşakların) oluşumuna ve bunların mitokondriyal dış zarla temasının desteklenmesine katkıda bulunmaktadır. Bu süreç, mitokondriyal temas bölgesi ve krista şekillendirme (MICOS)

sistemi ile koordine edilmektedir (Cadena ve ark., 2021; Spurlock ve ark., 2020). Ek olarak, OPA1 proteini, iç zara özgü olan kardiyolipin lipidi ile etkileşerek, OPA1'e bağlı GTP hidrolizinden sonra IMM'lerin birleşmesini sağlar ve böylece mitokondriyal iç zarın füzyonu gerçekleşir.

2.5.2.2. Fisyon

Fisyon, parçalanma anlamına gelmektedir. Mitokondrinin fisyonu, hücresel şartlara bağlı olarak farklı proteinlerin yardımıyla mitokondrinin morfolojisini değiştirerek parçalandığı sitokastik bir mekanizmadır. Bu süreç, sıklıkla hastalıklar, mitokondriyal disfonksiyon ve hücresel apoptoz ile ilişkili olsa da, aynı zamanda mitofaji yoluyla hasarlı bölümlerin uzaklaştırılmasıyla mitokondrinin homeostazını sağlamaktadır. Bu süreçte, hücre sitozolünde bulunan dinamin adlı bir protein ailesinin bir üyesi olan hücresel dinamin ile ilişkili protein Drp1 önemli bir rol oynamaktadır. Ayrıca, mitokondriyal fisyon faktörü Mff1, fisyon proteini Fis1 ve mitokondriyal dinamik proteinler MID49/MID51 gibi mitokondri dış zarında yer alan proteinler, Drp1 için bir reseptör görevi görmektedir (Kraus ve ark., 2017; Spurlock ve ark., 2020; Wu ve ark., 2023). Bu olayın asıl aktörü, DNM1L geni kodladığı Drp1 proteindir. Drp1, GTP'yi hidroliz ederek GDP'ye dönüştürebilen dinamin ailesinin bir üyesidir. Aynı zamanda mitokondri ve peroksizomların bölünmesinde önemli düzeyde rol oynamaktadır (Ramos ve ark., 2016; Wai ve ark., 2016). Drp1'in kaybı büyük ölçüde mitokondri ve peroksizomların uzamasına neden olmaktadır (Wakabayashi ve ark., 2009). Drp1, hücre içinde sitozolde bulunur ve protein sentezinden sonra, ATP üretimi veya hidrolizini sağlayan mekanizmalar aracılığıyla aktif hale gelir. Daha sonra mikrotübül ve aktin proteinleri yardımıyla mitokondri dış zarına taşınır (Cho ve ark., 2009; Zepeda ve ark., 2014). Drp1, mitokondri dış zarına alındığında Fis1, MID49, MID51 ve Mff adı verilen dört reseptör proteinine bağlanmaktadır (Mears ve ark., 2011; Sesaki ve ark., 2014).

Mitokondri fisyon sürecinde, Drp1 mitokondri dış zarına bağlanarak ayrılması gereken parçanın etrafında dairesel bir halka oluşturur ve membranı daraltarak bölünme sürecini kolaylaştırır. Aynı zamanda GTP hidrolizi, bu kasılmayı hızlandırarak mitokondri bölünmesini tamamlamaktadır (Mears ve ark., 2011; Montessuit ve ark., 2010). Mitokondrinin bölünmesinde yalnızca mitokondriyal komponentler değil, aktin filamentleri ve endoplazmik retikulumunda rol oynamaktadır (Kraus ve ark., 2017). ER-MITO temas bölgesi olarak adlandırılan, mitokondri membranları ile endoplazmik retikulum arasındaki bağlantıları; kalsiyum ve lipid metabolizması, demir homeostazı ve doğuştan gelen immün tepkileri gibi farklı hücresel aktivitelerin düzenlenmesinde kritik bir görev üstlenmektedir (Zhang ve ark., 2023). Mitokondri ve endoplazmik retikulum arasındaki bu bağlantılar, mitokondri fisyon sürecinde de önemli bir rol oynar. ER filamentleri, sadece mitokondri ile temas halinde değildir, aynı zamanda mitokondrinin etrafını sararak sıkıştırır. Çoğu mitokondriyal bölünme, ER-MITO temas bölgelerinde gerçekleşmektedir (Marchi ve ark., 2014; Richter ve ark., 2015). Ayrıca, mitokondri bölündüğünde yeni oluşan mtDNA, yeni mitokondriyal fragmanların içinde kalmaktadır. Dolayısıyla, ER-MITO temas noktaları, hem mtDNA replikasyonunu hem de bölünen mitokondrilerin eşit şekilde dağılmasını düzenlemektedir (Zhang ve ark., 2023).

2.6. Mitokondri ve Makrofajlar

Son on yılda, mitokondrinin immün tepkisindeki rolünün önemi birçok kanıtlarla vurgulanmıştır. Mitokondriye ilişkin anlayışımız, yalnızca enerji üreten bir merkez olmaktan, doğal immünitinin düzenlenmesi için gerekli bir platforma gelişmiştir (Corrêa-da-Silva ve ark., 2018; Ichinohe ve ark., 2013; Tur ve ark., 2017; Zhang ve ark., 2024). Mitokondri, hem bağışıklık tepkisinin başlatılmasına (dışsal etki) hem de düzenlenmesine (içsel etki) katkı sağlamaktadır.

2.6.1. Makrofajların Polarizasyonundaki Mitokondrinin Dışsal Etkisi

İlk savunma hattı, doğuştan gelen bağışıklık tepkisinin en önemli oyuncularını olan makrofajların, tehlikeli uyaranlara verdikleri yanıtla başlar. Genellikle, makrofajlar ve diğer doğuştan gelen immün hücrelerin üzerinde bulunan Toll-like reseptörler TLR'ler, nükleotid-bağlayıcı oligomerizasyon domain-like reseptörler NLR'ler ve C-tipi lektin reseptörleri dahil olmak üzere PRR reseptörleri aracılığıyla lipoproteinler, mikrobiyal nükleik asitler ve karbonhidratlar gibi patojenle ilişkili moleküller PAMP'lar veya strese maruz kalan ya da nekrotik hücrelerden salınan ATP, mtROS, mtDNA ve kardiyolipin gibi hasarla ilişkili moleküller DAMP'ları tanımlayıp ayırt edebilirler ve bağışıklık reaksiyonunu aktif hale getirebilirler (Missiroli ve ark., 2020; Tur ve ark., 2017). Ligandlarla etkileşime girdikten sonra, PRR'ler çeşitli sinyal yollarını tetikler. Bunlar arasında nükleer faktör-kappa B (NF- κ B), interferon düzenleyici faktörler IRF'ler ve mitojenle aktif olan protein kinazlar (MAPK'ler) bulunur. Bu sinyal yolları, proinflamatuar sitokinlerin, kemokinlerin, tip I interferonların (IFN'ler) ve kostimülatör moleküllerin transkripsiyonunu aktif hale getirerek güçlü bir immün yanıtın oluşmasında önemli rol oynamaktadır (Tur ve ark., 2017). Mitokondri, immün sistemin aktivasyonunda önemli bir oyuncu olarak tanımlanmaktadır. Enfeksiyona maruz kalan hücrelerde artan ROS seviyeleri, mitokondriyal membran bütünlüğünü bozarak, mtROS, peptitler, mtDNA ve kardiyolipin gibi hasarla ilişkili moleküllerin DAMP'lar salınmasına yol açmaktadır (Zhang ve ark., 2024; Zhou ve ark., 2011). Mitokondri, hasarla ilişkili molekülleri üretmede en çok tanımlanan organeldir. Disfonksiyonlu mitokondrinin en önemli belirteci, aşırı mitokondriyal reaktif oksijen türleri ve DNA'sının salınmasıdır. Mitokondriden salınan DNA ve ROS, toll-like reseptör ailesini aktif eder ve inflammatuar bir yanıt tetikler. Ayrıca mitokondriyal ROS, NLRP3'e bağımlı enflamasyonu aktif eder ve makrofajlarda pro-inflamatuar yanıtın oluşturmada rol oynar (Zhang ve ark., 2024).

Yani bu süreçlerde önemli rolleri olan ana etmen mitokondridir. Mitokondri, sadece ROS üretmekle kalmaz, aynı zamanda ROS salınımı ile meydana gelen hücresel değişikliklere yanıt vermekten de sorumludur (Missiroli ve ark., 2020). Enfekte hücrelerden salınan ROS ile makrofajlarda TLR sinyal yollarının aktivasyonu üzerine TLR sinyallemesinin bir bileşeni olan tümör nekroz faktörü reseptörü ile ilişkili faktör 6 (TRAF6), mitokondriyal solunum zinciri düzeyinde yer alan ECSIT proteini ile etkileşerek, ETC I'nin parçalanmasına mtROS üretiminin artmasına neden olur. Bu durum, mitojenle aktifleşen protein kinaz (MAPK) aktivitesine TNF-a gibi inflamatuvar sitokinlerin üretimine yol açar. Yani mtROS, makrofajları M1'e polarize ederek immün sistemin aktivasyonunda rol oynamaktadır (Ramond ve ark., 2019; West ve ark., 2011; Zhang ve ark., 2024).

2.6.2. Makrofajların Polarizasyonundaki Mitokondrinin İçsel Etkisi

Mitokondriyal fisyon ve füzyon olarak bilinen mitokondri dinamikleri, hücre içindeki mitokondri yapısını şekillendirmek ve kontrol etmek amacıyla birlikte çalışmaktadır. Bu süreçler, hem mitokondrinin hem de hücrenin kalitesinin korunmasında, hücre farklılaşmasında ve hücresel strese yanıt vermede çok önemli bir rol oynamaktadır (Afroz ve ark., 2023; Li ve ark., 2020). Mitokondriyal fisyon ve füzyon dengesi, enfeksiyona yanıt olarak makrofajların efektör fonksiyonunu artırmak amacıyla değişebilmektedir. Yapılan çalışma, viral enfeksiyonlara karşı makrofajlardaki mitokondrilerin birleşerek (füzyon), bakteriyel enfeksiyonlara ise parçalanarak (fisyon) yanıt verdiğini göstermiştir (Tiku ve ark., 2020). Ayrıca füzyon ve fisyon dinamikleri, makrofajların pro- ve anti-inflamatuvar yanıtlarının düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Yapılan in vitro çalışmalar, makrofajların alt tiplerine farklılaşmasında ve fonksiyonlarında mitokondriyal dinamiklerin etkili olduğunu ortaya koymuştur. M1 fenotipli makrofajlarda Drp1 ifadesinin yüksek olması nedeniyle fisyonun baskın olduğu

ve bunun da ROS ve NO üretimini sağladığı gösterilmiştir. Buna karşılık, M2a ve M2c makrofajlarında mitokondriyal füzyonun baskın olduğu, bunun da mitokondriyal fonksiyonları koruyarak yara iyileşmesi ve anti-inflamatuar gibi fonksiyonların yerine getirebilmesi, hücre aktivitesi ve canlılığının sürdürülmesinde önemli rol oynamaktadır (Li ve ark., 2020). Bu mekanizmalarda temel rol oynayan, farklı genler tarafından eksprese edilen füzyon ve fisyon proteinleridir. Artan kanıtlar, mitokondriyal dinamiklerdeki proteinlerin susturulması veya down regüle edilmesi yoluyla makrofaj fonksiyonlarının kontrol edebileceğini kanıtlamaktadır. Örneğin, Gao ve arkadaşları, miyeloid immün hücrelerde mitokondriyal dış zarın füzyonunda rol alan Miga2'nin susturulmasının makrofajlarda mitokondriyal fisyonun artmasına neden olduğunu, bunun da M1 fenotipli makrofaj polarizasyonunu artırarak IL-12 üretimini yükseltip IL-10 ve IL-23a üretimini azalttığını göstermiştir. Sonuç olarak, pro-inflamatuar yanıtın teşvik edildiğini kanıtlamıştır (Gao ve ark., 2017). Takeshi Ichinohe ve arkadaşları, makrofajlarda mitokondriyal iç zarın füzyonunda rol alan MFN-2'nin rolü açıklamaktadır. Makrofajlarda MFN-2'nin down regüle edilmesinin, influenza virüsü enfeksiyonu sırasında makrofajlarda IL-1 β ve NLRP3 bağımlı enflamasyon aktivasyonunu azalttığını göstermiştir (Ichinohe ve ark., 2013). Sangjun Park ve arkadaşları, makrofajlarda Drp1'in baskılanmasının NLRP3 bağımlı inflamasyon ve hücre ölümü üzerindeki etkisini de araştırmışlardır. Drp1'in baskılanmasının, LPS uyarımı sonrasında makrofajlardaki mitokondri uzamasını, piroptotik hücre ölümünü, NLRP3 bağımlı kaspaz-1 aktivasyonunu ve IL-1 β salınımını artırdığını göstermiştir (Park ve ark., 2015). Ayrıca, Ying Wang ve arkadaşları, makrofajların efferozitoz yada apoptotik hücrelerin temizlenmesi adı verilen mekanizmasında Drp1'in önemli bir rol oynadığını ortaya koymuştur. Makrofajlarda Drp1'in susturulması, apoptotik hücrelere maruz kalan makrofajlarda mitokondrinin çok az bölünmesi yani kusurlu bir fisyon

olması gibi, fagosom oluşumunu ve lizozomlarla birleşmesini sağlayan sitozolik kalsiyum seviyelerini de düşürmüştür. Bu durum, kusurlu bir efferozitoza yol açarak fagositöz yeteneğinin azalmasına neden olmuştur. (Wang ve ark., 2017). Ancak başka çalışma, mitokondriyal füzyonda rol alan MFN-1'in yokluğunun, makrofajların efferozitoz yeteneğini artırdığını da bildirmiştir (Xie ve ark., 2020). Makrofajların farklılaşması ve fonksiyonları üzerinde etkili olan mitokondriyal dinamiklerin yanı sıra, mitokondrinin enerji üretimi için gereken metabolik mekanizmalar da makrofaj fenotipini belirlemede önemli rol oynamaktadır. M1fenotipli makrofajlar aerobik glikoliz yoluyla enerji üretirken, M2 fenotipli makrofajlar oksidatif fosforilasyon ve yağ asidi metabolizmasını kullanarak enerji üretmektedir (Ramond ve ark., 2019; Wang ve ark., 2022). Syam Nair ve arkadaşları, LPS ile uyarılan mikrogliyal makrofajlarda mitokodriyal fisyonun indüklenmesi sonucunda, enerji üretiminin oksidatif fosforilasyondan glikolize kaydığını göstermiş. Ayrıca farmakolojik bir inhibitör olan Mdivi ile mitokondriyal fisyon inhibe edildiğinde, bu metabolik yolun tersine çevrildiği ve hücrelerden salgılanan pro-inflamatuar kemokin ve sitokinlerin azaldığını kanıtlamıştır (Nair ve ark., 2019).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Klinik Araştırmalar Etik Kurul Onayı

“Mitokondriyal Dinamiklerdeki Değişimlerin Kanseri İndüklü M2 Makrofaj Polarizasyonuna Etkisi” adlı alışma, Atatürk Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu’nun 02.05.2023 tarihli 3. toplantısında alınan 68 numaralı karar ile etik kurallara uygun bulunmuştur.

3.2. Hücre Kültür Deneyleri

Çalışmamızda, küçük hücreli akciğer kanseri hücre hattı (H446, ATCC; USA) ve akut monoblastik lösemi hücre hattı (THP-1, ATCC; USA) kullanıldı. THP-1 ve H446 hücreleri, %1 Penisillin-Streptomisin, %1 L-Glutamin ve %10 FBS içeren RPMI-1640 besiyerinde, 37°C ve %5 CO₂ inkübatörde kültüre edildi. Farklı deney ve testler yapabilmek üzere, yapışkan özelliikte olan H446 hücreleri tripsin-EDTA ile kültür ortamından kaldırıp toplanırken, süspansiyon özelliğine sahip THP-1 hücreleri, ortamdan doğrudan santrifüj ile toplanmıştır.

3.3. Deney Gruplarının Oluşturulması

Dört ayrı deney grubu oluşturulmuştur;

- I. siKontrol (monokültür): THP-1 hücreleri 50 ng/ml forbol 12-miristat 13-asetat (PMA) ile elde edilmiş M0 makrofajlar.
- II. siMFN-2 (monokültür siMFN-2): siRNA ile mitokondriyal geni MFN-2 knockdown elde edilmiş M0 makrofajlar.
- III. Ko-kültür:PMA ile dönüştürölmüş M0 makrofajlar ve H446 hücre hatları
- IV. Ko-kültür siMFN-2: siRNA ile mitokondriyal geni MFN-2 knockdown elde edilmiş M0 makrofajlar ve H446 hücre hatları.

3.4. THP-1 Hücrelerinin M0 Makrofajlarına Dönüştürülmesi

Deneylerden 72 saat önce, THP-1 hücrelerinin M0 makrofajlara dönüştürülmesine başlandı. Altı kuyucuklu plakasına 350.000-400.000 THP-1 hücresi ekilip, PMA'nın final konsantrasyonu 50 ng/ml olacak şekilde muamele ederek 48 saat inkübe edildi. Bu süre içinde, THP-1 hücreleri süspansiyon özelliğini kaybederek adherent hale geldi ve M0 makrofajlarına dönüştü. 48 saatlik inkübasyondan sonra, PMA içermeyen besiyeri ile değiştirildi ve 24 saat boyunca inkübe edildi.

3.5. M0 Hücrelerinde Mitokondriyal Füzyon Geni MFN-2'nin siRNA ile Knockdown Edilmesi

Deneylerden 72 saat önce, 6 kuyucuklu bir plaka üzerine 350.000-400.000 THP-1 hücresi ekilip 50 ng/ml PMA ile muamele edilerek M0 makrofajlarına dönüştürüldü. Ardından, siRNA (Eco-Tech-EGS100) kiti aşağıdaki protokölüne göre gen susturma işlemi uygulandı. Öncelikle, aktif ve kontrol mix çözeltileri buz üzerinde çözündürüldü. Tek bir kuyucuk için hesaplanan karışımlar şu şekilde hazırlandı:

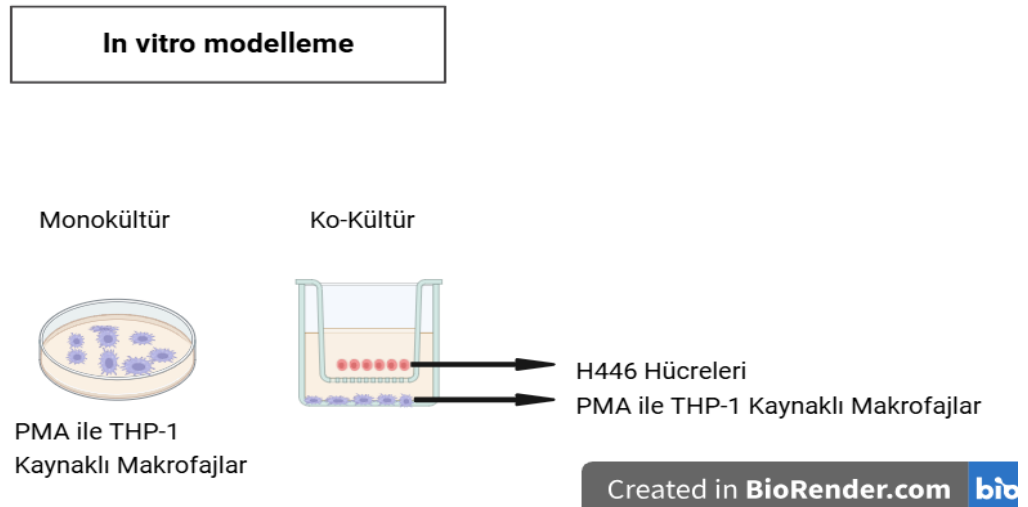
aktif grup: 1µl aktif mix, 1µl 2x reaksiyon buffer, 300 µl dilüsyon buffer, 1µl enkapsülasyon buffer.

kontrol grup: 1µl kontrol mix, 1µl 2x reaksiyon buffer, 300 µl dilüsyon buffer, 1µl enkapsülasyon buffer.

Hazırlanan EndoGenius suppressor-kontrol ve suppressor-aktif karışımları oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi. Daha sonra, 6 kuyucuklu plakadaki her kuyucuğa 300 µl olacak şekilde eklendi. 48 saat boyunca inkübe edildikten sonra, PCR gibi gen ekspresyon testleri yapılmak üzere hücreler scraper ile kaldırılarak toplandı. Ayrıca, M0 hücreleri tarafından salgılanan sitokonlerin miktarını belirlemek amacıyla makrofajların kültür besiyeri toplandı ve ELİSA testi ile analiz edildi .

3.6. M0 Makrofajları ile H446 Hücrelerinin Ko-Kültürü

Ko-kültür sistemi, 24 kuyucuklu plakalar üzerine yerleştirilmiş 0.4 μ M gözenekli bir hücre kültürü transwell inserti (NEST insert ,725121) kullanılarak oluşturulmuştur. Ko-kültür deneyi başlamadan önce THP-1 hücreleri monokültür koşullarında farklılaştırıldı. İlk olarak, THP-1 hücreleri (1×10^5 hücre/ml) transwell insertinin alt bölgesine ekildi ve farklılaşmalarını indüklemek amacıyla 48 saat boyunca 50 ng/ml PMA ile muamele edildi. Ardından, PMA içermeyen RPMI-1640 besiyerinde 24 saat süreyle kültürde bekletildi. Bu süreçte, H446 hücreleri (5×10^4 hücre/ml) transwell insertinin üst bölgesine ekildi ve 24 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyonun ardından, H446 hücrelerini içeren insertler, THP-1 kaynaklı M0 makrofajlarının bulunduğu 24 kuyucuklu plakaların üzerine yerleştirildi ve oluşturulan ko-kültür sistemi, 48 saat boyunca inkübe edildi. 48 saatlik kültür süresinin ardından, M0 ve H446 hücreleri, RT-PCR gibi gen ekspresyon testleri için toplandı. Ayrıca, M0 hücreleri tarafından salgılanan sitokonlerin miktarını belirlemek amacıyla M0 makrofajların kültür besiyeri toplandı ve ELİSA testi ile analiz edildi. Ko-kültür ve monokültür koşullarında uygulanan deney yöntemi Şekil 3.1'de gösterilmektedir.



Şekil 3.1. Monokültür ve ko-kültür deneyleri

3.7. siRNA ile MFN-2 Geni Knockdown Edilmiş M0 Makrofajları ile H446

Hücrelerinin Ko-Kültürü

Ko-kültür sistemi, 24 kuyucuklu plakalar üzerine yerleştirilmiş 0.4 µM gözenekli bir hücre kültürü transwell inserti (NEST insert, 725121) kullanılarak oluşturulmuştur. İlk olarak, THP-1 hücreleri (1×10^5 hücre/ml) transwell insertinin alt bölmesine ekildi ve yukarıdaki açıklandığı gibi dönüştürme protokolu uygulandı. Ardından, MFN-2 mitokondriyal füzyon geni siRNA yöntemi ile gen susturma yapıldı. Bu süreçte, H446 hücreleri (5×10^4 hücre/ml) transwell insertinin üst bölmesine ekildi ve H446 hücrelerini içeren insertler, THP-1 kaynaklı M0 makrofajlarının bulunduğu 24 kuyucuklu plakaların üzerine yerleştirildi ve oluşturulan ko-kültür sistemi, 48 saat boyunca inkübe edildi. 48 saatlik kültür süresinin ardından, M0 ve H446 hücreleri, RT-PCR gibi gen ekspresyon testleri için toplandı. Ayrıca, M0 hücreleri tarafından salgılanan sitokonlerin miktarını belirlemek amacıyla M0 makrofajların kültür besiyeri toplandı ve ELİSA testi ile analiz edildi.

3.8. Gen Ekspresyon Seviyesinin Gerçek Zamanlı PCR Yöntemi ile Analiz Edilmesi

3.8.1. RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu için deney tamamlandığında, hücreleri tripsin ile kaldırıldı ve 3000 g x 5 dakika santrifüj edildi. RNA izolasyonu, üretici firmanın protokolüne göre EcoPure total RNA kit (Eco-Tech, E2075) ile yapıldı. İlk adımda, örnekleri santrifüj edildikten sonra oluşan pelletin üzerine her bir örnek için 400 µl lizis buffer ve 4 µl merkaptotanol eklendi. Karışım, 30 saniye boyunca vortekslenerek parçalandı. Ardından her bir örneğe eklenen lizis buffer miktarı kadar 400 µl %96'lık etanol eklenerek tekrar 30 saniye vortekslenip homojenize edildi. Her bir tüpten 700 µl alınarak spin kolona aktarıldı ve 12.000 g x 30 saniye santrifüj edildi. Kolonun altında biriken sıvı

uzaklaştırıldıktan sonra, kolona 400 µl wash buffer 1 eklendi ve 12.000 g x 30 saniye santrifüj edildi. Santrifüj sonrası kolonun altında biriken sıvı uzaklaştırılarak 500 µl wash buffer 2 eklenip 12.000 g x 30 saniye santrifüj edildi. Santrifüj sonrası kolonun altında biriken sıvı uzaklaştırıldı ve tekrar 200 µl wash buffer 2 eklenerek 12.000 g x 30 saniye santrifüj edildi. Son santrifüj işlemi tamamlandıktan sonra, alttaki tüp çıkarılarak kolon DNaz/Rnaz içermeyen bir eppendorf tüpüne yerleştirildi. Spin kolonun tam ortasına 50 µl elution eklenip oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edildi ve ardından 12.000 g x 30 saniye santrifüj edildi. Tüpün dibinde oluşan sıvı, izole edilen RNA'dır. Örneklerden izole edilen RNA'ların konsantrasyonu, NanoDrop (Bio-Tek Instruments Epoch, USA) cihazında ölçüldü ve -80°C'de muhafaza edildi.

3.8.2. RNA'dan cDNA'ya Çevirilmesi

Komplementer DNA sentezi, EcoScript 5x First Strand cDNA sentez kiti (Eco-Tech, ERT50) protokolü kullanılarak gerçekleştirildi. cDNA'nın final konsantrasyonu 200 ng /µl olacak şekilde, RNA örneklerinden farklı miktarlarda alınarak 0.5 ml PCR tüplerine transfer edildi. Her tüpe 4 µl EcoScript 5x First Strand cDNA sentez karışımı eklendi ve toplam hacim 20 µl olacak şekilde nükleaz içermeyen su eklendi. Kitin talimatlarına uygun olarak, her bir RNA örneği için reaksiyon karışımları hazırlandı ve tüm adımlar buz üzerinde gerçekleştirildi. Daha sonra, numuneler Gradient PCR (SensoQuest LabCycler) cihazında 42°C'de 120 dakika, 85°C'de 5 dakika ve 4°C'de 1 dakika inkübe edilerek RNA'nın komplementer DNA'ya çevirilmesi sağlandı. Elde edilen cDNA'nın konsantrasyonu, NanoDrop (Bio-Tek Instruments Epoch) cihazında ölçüldü ve -20°C'de muhafaza edildi.

3.8.3. Gerçek Zamanlı PCR Analizi

CD14, CD86, CD206, Drp-1, MFN-2, TLR-4, NLRP6 genlerinin göreceli değişim mRNA seviyeleri, qRT-PCR yöntemiyle ölçüldü (Tablo 3.1). Bu işlem için ilgili genlerin primerleri, DNaz/RNaz içermeyen su, SYBER® Green Master Mix (2x) ve cDNA'lar, üretici firmanın protokolüne göre 10 µl'lük bir reaksiyon karışımı buz üzerine hazırlandı. qRT-PCR reaksiyonu, Qiagen Rotor Gene Q cihazında 95°C'de 5 saniye, 60°C'de 30 saniye ve 72°C'de 20 saniye olarak çalıştırıldı. Reaksiyon sonrası, gen ifadeleri β-aktin referans alınarak $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemi ile hesaplandı.

Tablo 3.1. Genlerin forward ve reverse primer dizileri

Gene	Sequences (5'-3')
CD14	F: TGCTTGTTGCTGCTGCTG R: CGTGGTCGCAGAGACGTG
CD86	F: GTGCTGCTCCTCTGAAGATT R: ATTGGCATGGCAGGTCTG
CD206	F: TGCAATCTGCGTACCACTTG R: CCATGTATACGCTACTAGGCAAT
Drp-1	F: AGCAGCGGAAAGAGCTCA R: CTCCGGGTGACAATTCCAGT
MFN-2	F: AGGCCACAGAGCTAGAAAGT R: GCCTGGTTCTGAAGCTGG
TLR-4	F: GTGTGAAATCCAGACAATTGAAG R: AAGGTAGAGAGGTGGCTTAGG
NLRP6	F: CGCTGTTTCTCAGCAAAAAGGA R: CTGGAAGCTCTGGTCGATGA
β-Aktin	F: GTTTGAGACCTTCAACACCC R: GGATAGCACAGCCTGGATAG

3.9. THP-1 Kaynaklı M0 Hücrelerinde Mitokondriyal Füzyon ve Fisyonun Rhodamine 123 Boya ile İncelenmesi

Deneylerden 72 saat önce, 24 kuyucuklu plaka üzerine kuyucuk başına 25.000 THP-1 hücreleri ekilip M0 makrofajlarına dönüştürüldü. Ardından, MFN-2 mitokondriyal füzyon geninin susturulması için siRNA yöntemi uygulanıp H446 hücreleri ile ko-kültür yapıldı ve 48 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresinin sonunda, hücreler aşağıdaki protokole göre Rhodamine 123 boyası ile boyandı.

Öncelikle, Rhodamine 123 boyası (AATBİO, 62669-70-9) DMSO içerisinde 5mM olacak şekilde çözülerek stok solüsyonu hazırlandı. Daha sonra, bu stok solüsyon HHBS ile 25 µM olacak şekilde seyreltilerek çalışma solüsyonu elde edildi. Deneylerin tamamlanmasının ardından, hücrelerin besiyeri uzaklaştırıldı ve PBS ile yıkandı. Ardından, her kuyucuğa 200 µl çalışma solüsyonu eklenerek hücreler 30 dakika inkübe edildi ve floresan mikroskobu (Zeiss Axio Scope A1) ile görüntülendi.

3.10. ELISA Yöntemi ile Makrofajlar Tarafından Salgılanan IL-10 ve TNF- α Sitokin Düzeylerinin Belirlenmesi

M0 makrofajların kültür besiyerindeki sitokin düzeylerini belirlemek için, insan IL-10 (Reed Biotech, RE3187HF) ve insan TNF- α (Reed Biotech, RE1060H) kitleri kullanılarak, üretici firmanın önerdiği protokoller doğrultusunda ELISA testi uygulandı. ELISA kitleri, Sandwich-ELISA presibine göre kullanıldı. Deneyler tamamlandıktan sonra, M0 makrofajların kültür besiyeri 1000g x 20 dk santrifüj edilerek üst faz toplandı. Öncelikle kitler +4°C'den çıkarılıp, oda sıcaklığında bekletildi. Kitlerde bulunan sitokin standartları, protkole göre 1 ml numune seyreltme çözeltisi ile çözüldü. TNF- α standardı 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56, 0.78 pg/ml , IL-10 standardı ise, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.57 pg/ml olacak şekilde seri seyreltme ile hazırlandı. 96 kuyucuklu mikro ELISA plakası üzerinde blank , numune ve seyreltilmiş standartlar için kuyucuklar belirlendi.

Her kuyucuğa toplam 100 µl olacak şekilde, 25 µl örnek veya standart ve 75 µl biyotinlenmiş antikor (Ab) çalışma solüsyonu eklendi. Tüm standartlar ve örnekler ikişer tekrarlı olarak yapıldı. Ardından, 96 mikrolaka kapatıcı ile kapatılarak 37°C'de 90 dakika inkübe edildi. İnkübasyon süresi tamamlandıktan sonra, plaka ters çevrilerek solüsyon uzaklaştırıldı. Her kuyucuğa 300 µl yıkama tamponu eklenerek 30 saniye bekletildi ve ardından her kuyudan yıkama tamponu aspire edildi. Bu yıkama işlemi üç defa tekrarlandı. Daha sonra, her kuyucuğa 100 µl HRP konjugat çalışma solüsyonu eklenerek mikrolaka kapatıcı ile kapatıldı ve 37°C'de 60 dakika inkübe edildi. İnkübasyonun ardından, tekrar üç defa yıkama işlemi uygulandı ve her kuyucuğa 100 µl substrat reaktifi eklendi. Mikrolaka tekrar kapatılarak 37°C'de 15-20 dakika inkübe edildi. Reaksiyonun durdurulması için her kuyucuğa 50 µl stop solüsyonu eklendi. Son olarak, optik yoğunluk (OD) değerleri 450 nm dalga boyunda mikrolaka okuyucu ile okutuldu.

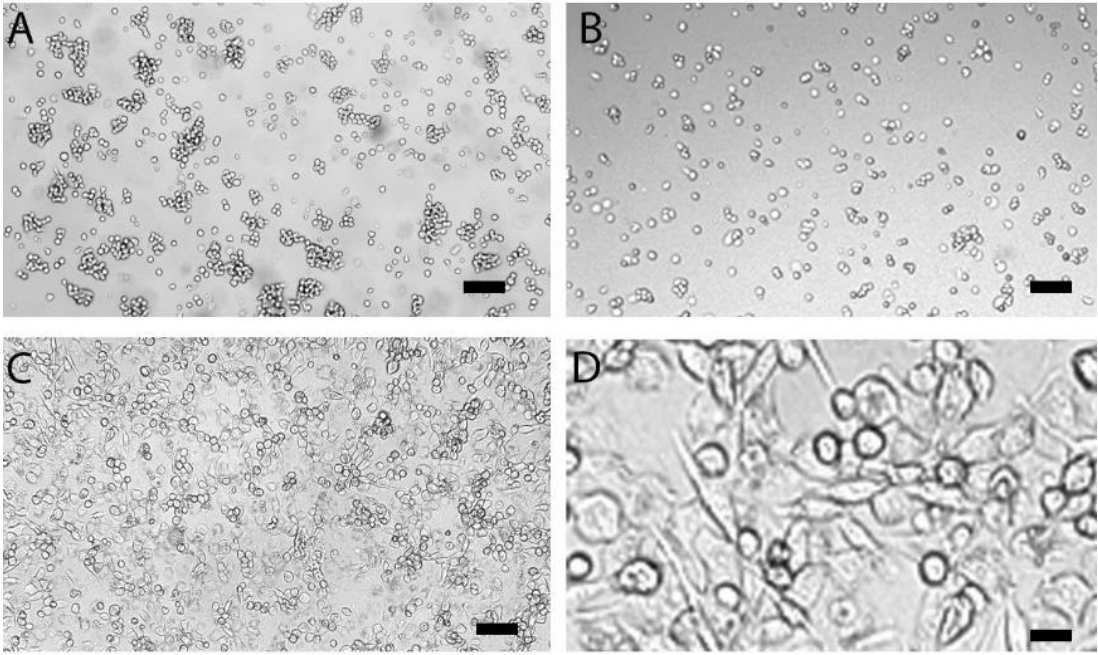
3.11. İstatistiksel Analizler

Deneyler, 3 tekrarlı olacak şekilde yapıldı, veriler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verildi. İkili grupların karşılaştırılmasında bağımsız örneklem t testi kullanılarak değerlendirilirken ikiden fazla olan grupların karşılaştırılmasında tek yönlü Anova testi ve LSD post-hoc testi kullanıldı. $p < 0.05$ değerleri anlamlı olarak kabul edildi. qRT-PCR analizlerinde sonuçlar $2^{-(\Delta\Delta CT)}$ yöntemine göre hesaplandı ve $p < 0.0001$ değerleri anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. THP-1 Hücre Hattının M0 Makrofajlara Farklılaşma Bulguları

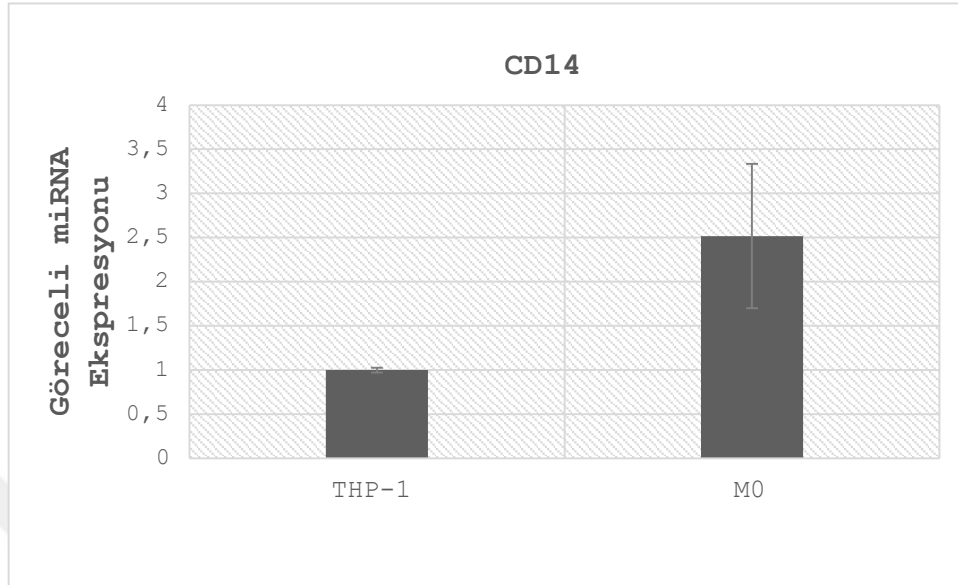
Çalışmada kullanılan THP-1 hücrelerinin M0 makrofaja farklılaşması, THP-1 hücrelerine 50 ng/ml PMA eklenerek 0, 24, 48 saatlik süre sonunda gözlemlenmiştir (Şekil 4.1). PMA uygulanmayan THP-1 hücreleri normal yuvarlak morfoloji gösterirken (Şekil 4.1.A), 24 saat PMA ile uyarılan THP-1 hücrelerinde uzantılar gözlemlendi (Şekil 4.1.B). 48 saat PMA ile inkübasyondan sonra THP-1 hücreleri çoğunlukla M0 makrofajlara dönüştüğü ve uzamış iğsi hücre morfolojisine sahip oldukları, adezyonun arttığı tespit edildi (Şekil 4.1.C, D).



Şekil 4.1. (A) THP-1 hücrelerin görüntüsü , (B) PMA uygulamasından 24 saat sonra THP-1 hücre görüntüsü, (C,D) PMA uygulamasından 48 saat sonra THP-1 hücre görüntüsü. A (10x objektif, ölçek: 200µm); B (10x objektif, ölçek: 200µm) ; C(10x objektif, ölçek: 200µm) ; D(40x objektif, ölçek: 50µm).

48 saat boyunca PMA ile muamele edilen THP-1 hücreleri ile PMA uygulanmamış THP-1 hücreleri karşılaştırıldığında, M0 makrofaj reseptörü olan CD14

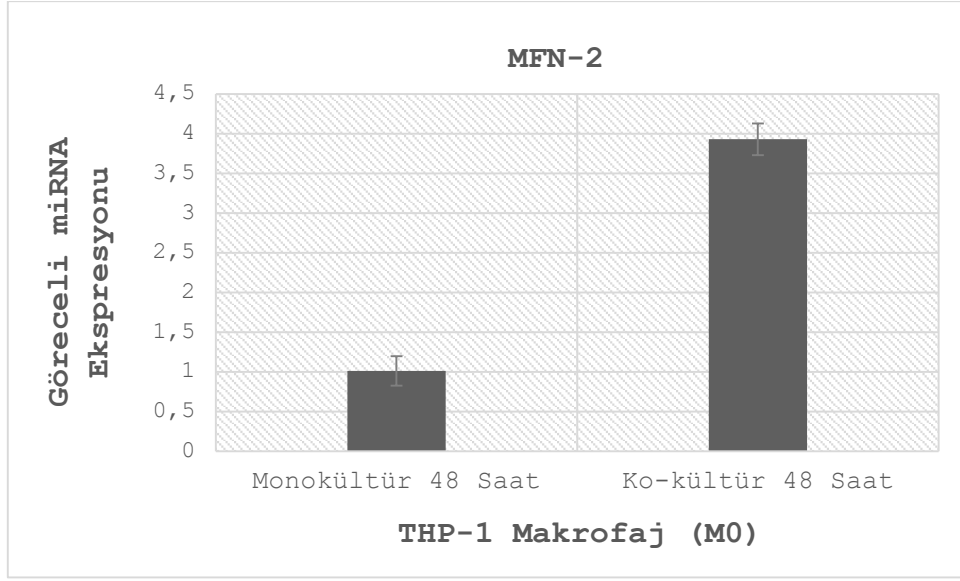
ekspresyonunun istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı tespit edilmiştir ($p=0.033$; Şekil 4.2).



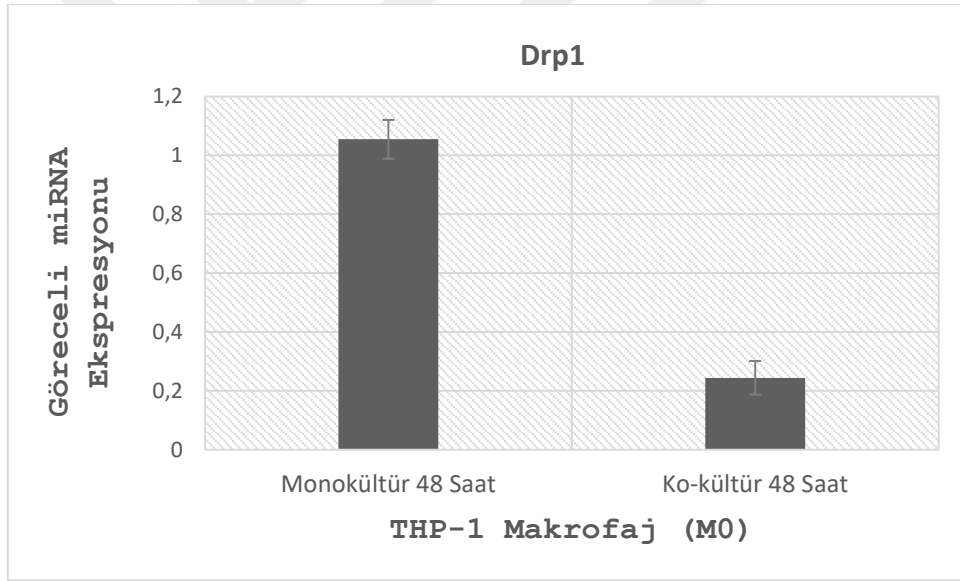
Şekil 4.2. THP-1 hücre hattında ve 48 saat PMA ile tedavi edilen THP-1 hücrelerinde CD14 geninin ekspresyonun göreceli değişimi.

4.2. Monokültür ve Ko-Kültürde THP-1 Kaynaklı Makrofajlarda Mitokondriyal Dinamiklere Ait Genlerin Ekspresyon Düzeyleri

0.4 μ M yarıçapına sahip transwell insertleri kullanılarak oluşturulan ko-kültür sisteminde, insan küçük hücreli akciğer kanseri hücreleri ile THP-1 makrofajları 48 saat bekletilerek incelenmiştir. 48 saat kültürde bekletilen THP-1 makrofajlarında MFN-2 gen ekspresyonunun monokültürdeki THP-1 makrofajlarına kıyasla arttığı gözlemlendi ($p \leq 0.0001$; Şekil 4.3). Buna karşılık, 48 saat kültürde bekletilen THP-1 makrofajlarında mitokondriyal fisyonunda görevli olan Drp1 gen ekspresyonunun monokültürdeki THP-1 makrofajlarına göre azaldığı tespit edildi ($p \leq 0.004$; Şekil 4.4).



Şekil 4.3. Monokültür ve 48 saatlik ko-kültür THP-1 makrofajlarında MFN-2 geninin ekspresyonunun göreceli değişimi

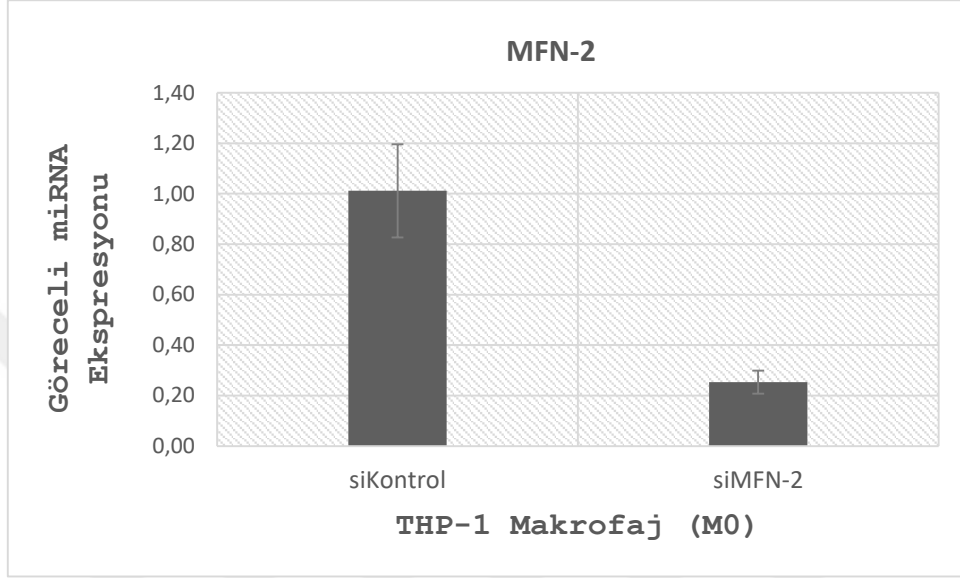


Şekil 4.4. Monokültür ve 48 saatlik ko-kültür THP-1 makrofajlarında Drp1 geninin ekspresyonunun göreceli değişimi

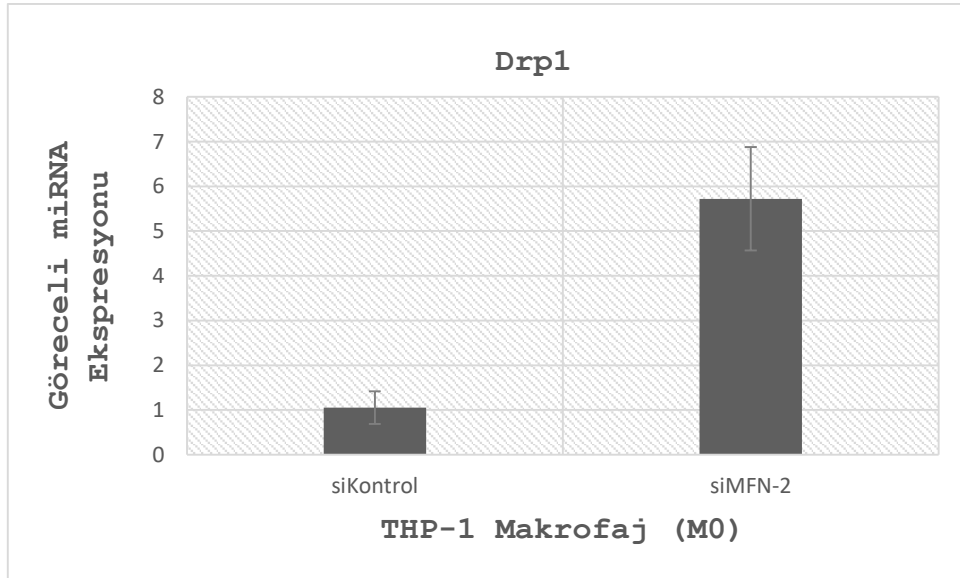
4.3. Monokültürde THP-1 Kaynaklı M0 Makrofajlarda MFN-2 Geninin siRNA ile Knockdown Edilmesinin Mitokondriyal Dinamiklere ve İnflamatuvar Yolaklara ait Genlerin Ekspresyon Düzeyleri

siMFN-2 grubunda THP-1 kaynaklı M0 makrofajlarında MFN-2 geni küçük interferans RNA (siRNA) yöntemiyle baskılandı ve bu gruptaki MFN-2 gen ekspresyonu

THP-1 kaynaklı M0 makrofajlarına (siKontrol) kıyasla anlamlı düzeyde azaldığı tespit edildi ($p \leq 0.002$; Şekil 4.5). Buna karşılık, siMFN-2 grubunda mitokondriyal fisyonunda görevli olan Drp1 gen ekspresyonunun THP-1 kaynaklı M0 makrofajlarına (siKontrol) göre arttığı belirlendi ($p \leq 0.0001$; Şekil 4.6).

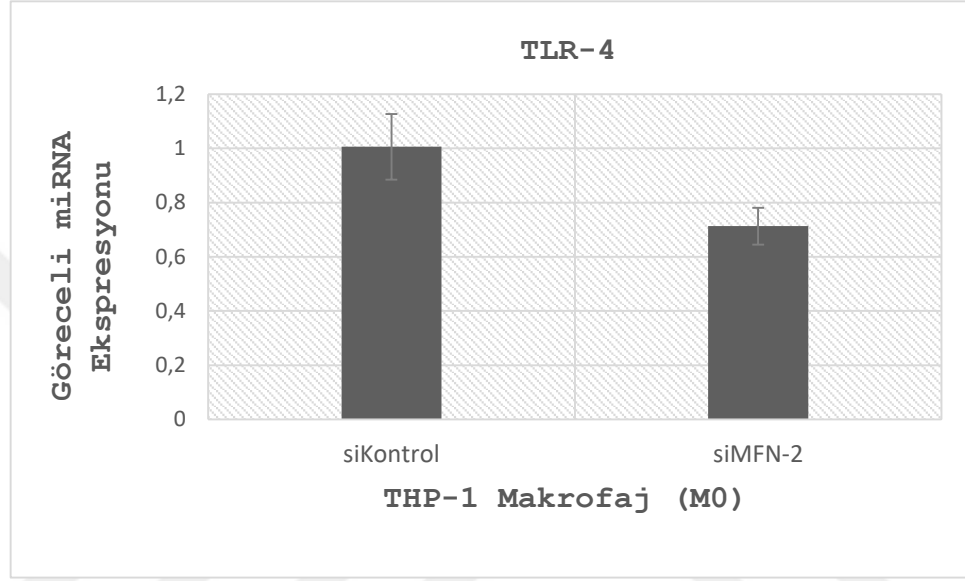


Şekil 4.5. siKontrol ve siMFN-2 gruplarında MFN-2 geninin ekspresyonunun göreceli değişimi

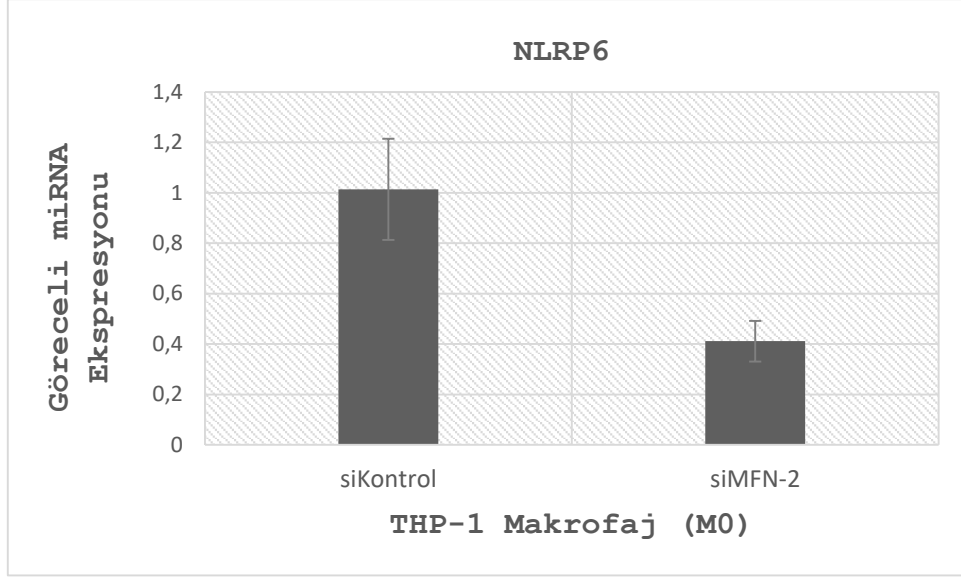


Şekil 4.6. siKontrol ve siMFN-2 gruplarında Drp1 geninin ekspresyonunun göreceli değişimi

THP-1 M0 Makrofajları aktive edildiğinde, çeşitli pro- ve anti-inflamatuar yolların mRNA ekspresyon düzeyleri PCR ile analiz edildi. MFN-2'nin baskılanması sonucunda, THP-1 kaynaklı M0 makrofajlarında TLR-4 reseptör geninde ($p \leq 0.006$; Şekil 4.7) ve NLRP6 inflammasom geni ekspresyonunda önemli bir azalma gözlemlendi ($p \leq 0.001$; Şekil 4.8).

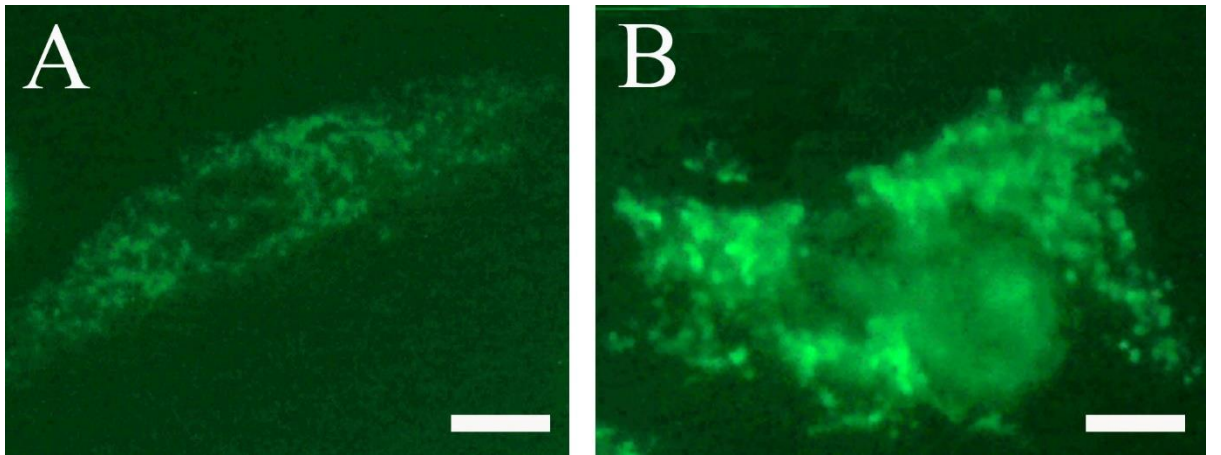


Şekil 4.7. siKontrol ve siMFN-2 gruplarında TLR-4 geninin ekspresyonunun göreceli değişimi



Şekil 4.8. siKontrol ve siMFN-2 gruplarında NLRP6 geninin ekspresyonunun göreceli değişimi

siMFN-2 grubunda (Şekil 4.9.B) THP-1 kaynaklı M0 makrofajlarında mitokondriyal füzyonda rol oynayan MFN-2 geni küçük interferans RNA (siRNA) yöntemiyle knockdown edilmesine bağlı olarak bu gruptaki MFN-2 gen ekspresyonunun azalması ve mitokondriyal fisyonunda görevli olan Drp1 gen ekspresyonunun artması sonucu de gösterildiği gibi kontrol grubuna (siKontrol, Şekil 4.9.A) kıyasla mitokondriyal füzyondan fisyon dönüşüm artmıştır.

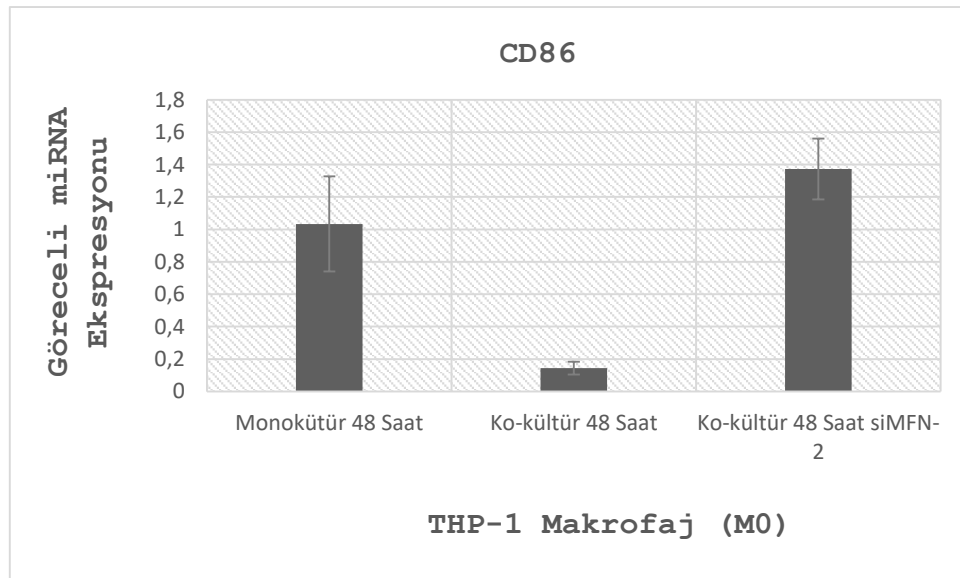


Şekil 4.9. (A) THP-1 kaynaklı M0 makrofajlarının floresan mikroskop görüntüsü (siKontrol), (B) 48 saat boyunca MFN-2 geni knockdown edilmiş THP-1 kaynaklı M0 makrofajlarının floresan mikroskop görüntüsü (siMFN-2). Hücre mitkondrisi yeşil

(Rhodamine 123, 528 nm). A (20x objektif, ölçek: 20µm)); B (40x objektif, ölçek: 50µm).

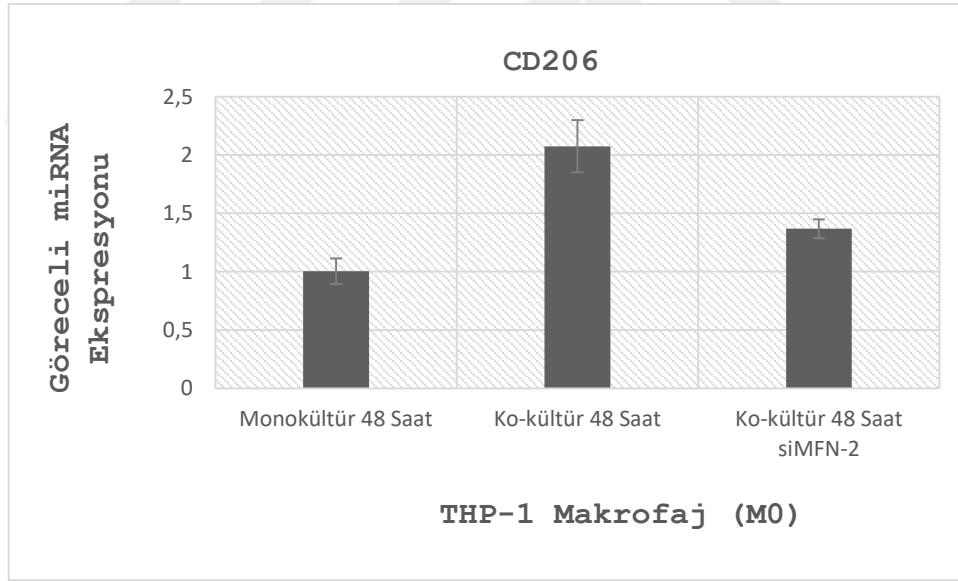
4.4. Monokültürdeki ve H446 Hücre Hattı ile Ko-Kültüründeki M0 Makrofajlarda MFN-2 Geninin siRNA ile Knockdown Edilmesinin M1 ve M2 Makrofaj Polarizasyonuna Etkileri

CD86 reseptörü, genellikle M1 makrofajlarında eksprese edilmektedir. H446 hücreleri ile ko-kültür edilen M0 makrofajları, monokültürdeki THP-1 kaynaklı M0 makrofajları ile karşılaştırıldığında CD86 ekspresyonunda belirgin bir azalma gözlemlendi ($p<0.0001$). Bu durum, M1 makrofajlarının azalmasına işaret etmektedir. Ko-kültür 48 saat siMFN-2 grubundaki M0 makrofajları ile ko-kültür 48 saat grubundaki M0 makrofajlar ile kıyaslandığında CD86 ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlendi ($p<0.0001$), bu da M0 makrofajların M1 makrofajlara polarizasyonunun arttığını göstermektedir. Monokültürdeki M0 makrofajlar ile kıyaslandığında ko-kültür yapılan MFN-2 geni knockdown edilmiş makrofajlarda CD86 ekspresyonunda artış gözlemlendi ($p<0.044$; Şekil 4.10).



Şekil 4.10. Farklı koşullarda (monokültür, H446 hücreleri ile ko-kültür ve siMFN-2 + H446 hücreleri ile ko-kültürü) M0 makrofajlarında CD86 geninin ekspresyonunun göreceli değişimi

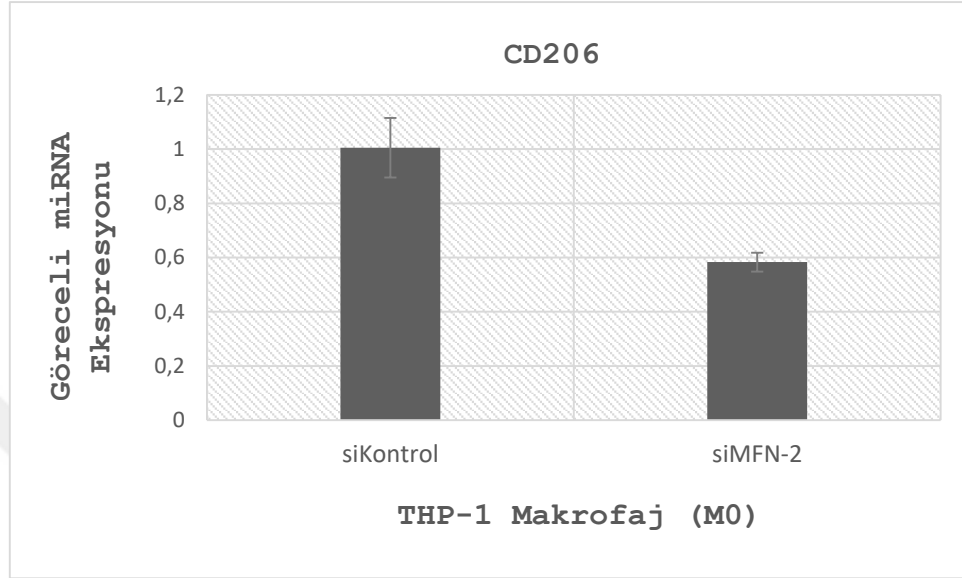
CD206 geni, genellikle M2 makrofajlarında eksprese edilmektedir. H446 hücreleri ile ko-kültür edilen M0 makrofajları, PMA 48 saat boyunca muamele edilmiş THP-1 kaynaklı M0 makrofajları grubu ile karşılaştırıldığında, CD206 ekspresyonunda belirgin bir artış gözlemlendi ($p<0.0001$). Bu durum, M2 makrofajlarının artmasına işaret etmektedir. MFN-2 geni baskılanmış ve H446 hücreleri ile ko-kültür edilmiş M0 makrofajlarında ise, H446 hücreleri ile ko-kültür edilmiş M0 makrofajları grubu ile kıyaslandığında CD206 ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalış gözlemlendi ($p<0.0001$), bu da M2 makrofajlarının azaldığını göstermektedir. Monokültürdeki M0 makrofajlar ile kıyaslandığında ko-kültür yapılan MFN-2 geni baskılanmış makrofajlarda CD206 ekspresyonunda artış gözlemlendi ($p<0.009$; Şekil 4.11).



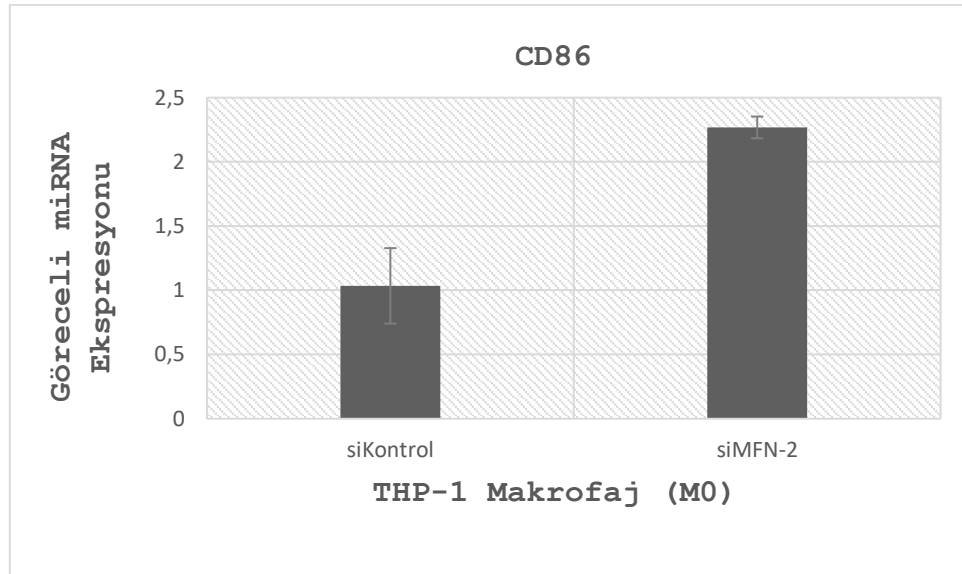
Şekil 4.11. Farklı koşullarda (monokültür, H446 hücreleri ile ko-kültür ve siMFN-2 + H446 hücreleri ile ko-kültürü) M0 makrofajlarında CD206 geninin ekspresyonunun göreceli değişimi

THP-1 kaynaklı makrofajlarda MFN-2 geni küçük interfering siRNA ile down regüle edildiğinde (siMFN-2), M2 makrofaj belirteci CD206 geninin ekspresyonunun THP-1 kaynaklı makrofajlarda (siKontrol) grubuna kıyasla anlamlı düzeyde azaldığı

gözlemlenmiştir ($p < 0.0001$; Şekil 4.12). Buna karşılık, M1 makrofaj belirteci CD86 geninin ekspresyonu ise siMFN-2 grubunda siKontrol grubuna göre önemli ölçüde artış göstermektedir ($p < 0.0001$; Şekil 4.13).

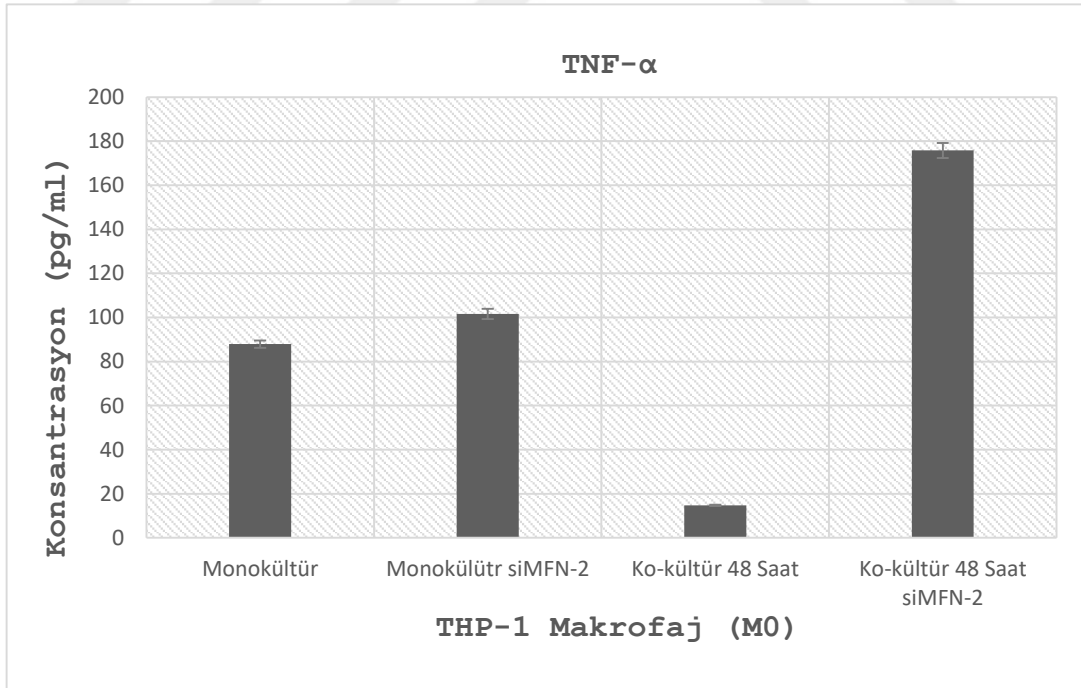


Şekil 4.12. siKontrol ve siMFN-2 gruplarında CD206 geninin ekspresyonunun göreceli değişimi



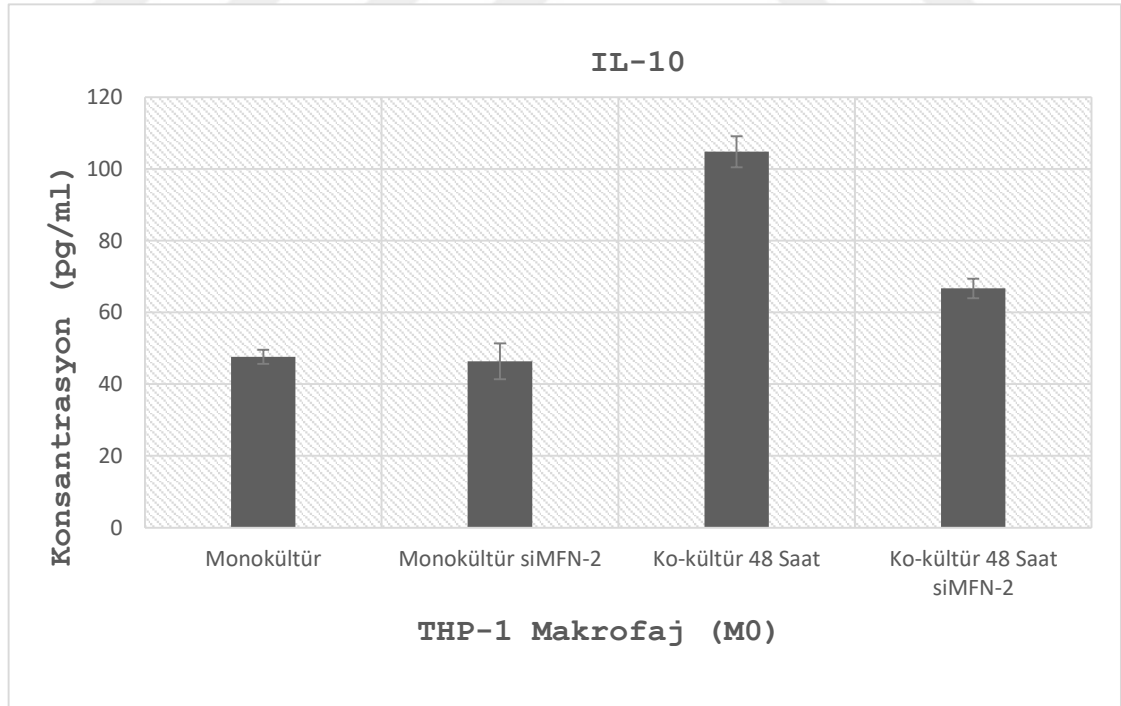
Şekil 4.13. siKontrol ve siMFN-2 gruplarında CD86 geninin ekspresyonunun göreceli değişimi

Bu çalışmada oluşturulan deney gruplarında M1 makrofajlardan salgılanan pro-inflamatuar bir sitokin olan TNF- α düzeyleri kültür besiyerinde ELISA yöntemi ile analiz edilmiştir. Tüm gruplar arasında istatistiksel anlamlı fark gözlemlenmiştir. H446 hücre hattı ile 48 saat boyunca ko-kültüre edilmiş M0 makrofajların kültür medyumunda TNF- α düzeyleri diğer tüm gruplara göre anlamlı bir azalış gösterdi ($p<0.0001$). H446 hücre hattı ile 48 saat boyunca ko-kültüre edilmiş MFN-2 knockdown edilen M0 makrofajların kültür medyumunda TNF- α düzeyleri diğer tüm gruplara göre anlamlı bir artış gösterdi ($p<0.0001$). THP-1 kaynaklı M0 makrofajlar (monokültür), MFN-2 geninin baskılandığı M0 makrofaj (monokültür siMFN-2), H446 hücre hattı ile 48 saat boyunca ko-kültüre edilmiş M0 makrofaj, MFN-2 geninin baskılandığı ve ko-kültüre edilmiş M0 makrofaj gruplarındaki medyumlarda ölçülen TNF- α miktarları sırasıyla, 87.88 ± 1.70 pg/ml, 101.59 ± 2.36 pg/ml, 14.64 ± 0.29 pg/ml, 175.77 ± 3.40 pg/ml olarak belirlendi (Şekil 4.14).



Şekil 4.14. Farklı kültür koşullarda (monokültür, monokültür siMFN-2, H446 hücreleri ile ko-kültür 48 saat, siMFN-2 + H446 hücreleri ile ko-kültürü) M0 makrofajlarında TNF- α miktarları (pg/ml)

Çalışmada oluşturulan deney gruplarında M2 makrofajlardan salgılanan ve hem anti-inflamatuar hem de tümör progresyonu ve metastazında rol oynayan bir sitokin olan IL-10 düzeyleri kültür besiyerinde ELISA yöntemi ile ölçülmüştür. THP-1 kaynaklı M0 makrofajlar (monokültür) ile MFN-2 geninin baskılandığı M0 makrofajların (monokültür siMFN-2) kültür medyumundaki IL-10 seviyeleri arasında bir fark gözlemlenmedi ($p>0.689$). Diğer tüm gruplar arasında istatistiksel anlamlı fark gözlemlenmiştir. H446 hücre hattı ile 48 saat boyunca ko-kültüre edilmiş M0 makrofajların kültür medyumunda IL-10 düzeyleri diğer tüm gruplara göre anlamlı bir artış gösterdi ($p<0.0001$). THP-1 kaynaklı M0 makrofajlar (monokültür), MFN-2 geninin baskılandığı M0 makrofaj (monokültür siMFN-2), H446 hücre hattı ile 48 saat boyunca ko-kültüre edilmiş M0 makrofaj, MFN-2 geninin baskılandığı ve ko-kültüre edilmiş M0 makrofaj gruplarında IL-10 miktarları sırasıyla, 47.62 ± 1.20 pg/ml, 46.37 ± 4.97 pg/ml, 104.76 ± 4.30 pg/ml, 66.67 ± 2.74 pg/ml olarak analiz edildi (Şekil 4.15).



Şekil 4.15. Farklı kültür koşullarda (monokültür, monokültür siMFN-2, H446 hücreleri ile ko-kültür 48 saat, siMFN-2 + H446 hücreleri ile ko-kültürü) M0 makrofajlarında IL-10 miktarları (pg/ml)

5. TARTIŞMA

Küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK), yüksek invazivite ve metastazı potansiyeli nedeniyle ölümcül bir hastalık olmasına rağmen, spesifik mekanizmaları tam olarak aydınlatılamamıştır. Artmakta olan kanıtlar, immünomodülasyonun uzak metastatik mikro ortamın oluşumu için kritik bir faktör olduğunu göstermiştir (Feng ve ark., 2019; Maddison ve ark., 2017). Ayrıca, tümör mikroçevresindeki M0 makrofajların polarizasyon durumunun bu süreçte önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir. M0 makrofajların alternatif aktivasyonu, tümör hücresi invazyonu, anjiyogenez ve bağışıklık baskılanması dahil olmak üzere çoklu malign süreçlerle ilişkilidir (Zhou ve ark., 2017). Malignitenin belirtilerinden biri, M0'ların pro-imflamatuar (M1) fenotipten immünsüpresif (M2) fenotipe polarizasyonudur. Tümörlerde birlikte var olan iki farklı alt küme, değişen tümör mikro ortamına adapte olur ve immünoregülatör ipuçları ile yeniden eğitilebilir. Bu olayı, TAM'ları M1 benzeri bir fenotipe yönlendirmeyi amaçlayan terapiler geliştirmeye yönelik ilgiyi artırmıştır. Bununla birlikte, bu süreci düzenlemek için şimdiye kadar sadece birkaç molekül tanımlanmıştır (Lin ve ark., 2015). M2 polarizasyonunun, kolorektal kanser, pankreas kanseri ve mide kanseri gibi çoklu malignitelerde ve küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde (KHAK dışı) metastazı teşvik ettiği bildirilmiştir (Lu ve ark., 2020; Zhao ve ark., 2020; Zhang ve ark., 2019). Yapılan araştırmada, THP-1 insan akut monoblastik lösemi hücre hattına PMA uygulanarak, in vivo ortamda izole edilen peritoneal makrofajlara benzer özellikler taşıyan makrofajlar elde edilmiştir (Chen ve ark., 2010). Bir başka çalışmada ise, 20-200 ng/ml arasındaki farklı PMA konsantrasyonları kullanılarak 48 ve 72 saatlik inkübasyonlarda, M0 makrofajlar markeri olan CD14 arttığı gösterilmiştir (Starr ve ark., 2018). Bu bulgular doğrultusunda, çalışmamızda THP-1 hücrelerinin 50 ng/ml PMA ve 48 saatlik inkübasyon ile farklılaştırılması sonucu elde edilen M0 makrofajlarında CD14

geninin ekspresyonunun artırdığını doğruladık. Bu şekilde farklılaşan M0 makrofajların tümör mikroçevresiyle etkileşim potansiyeline sahip olmasından tümör biyolojisi çalışmalarında model sistem olarak önemini artırmaktadır. Bu kapsamda, tümör mikroçevresinde makrofaj polarizasyonunun metastaz üzerindeki etkilerini anlamak, kanser ilerleyişine dair yeni bilgiler elde edilmesi açısından kritik bir öneme sahiptir. Guo ve arkadaşlarının , küçük hücreli olmayan akciğer kanserin üzerinde yaptıkları çalışmada, PMA uyarılan THP-1 türevli makrofajların A549 ve NCI-H1975 hücreleri ile ko-kültür edilmesi sonucunda, tümör mikroçevresinde M2 makrofaj markeri olan CD206'nın arttığı ve buna bağlı olarak tümör metazasına neden olduğunu göstermiştir (Guo ve ark., 2019). Ayrıca Liu ve arkadaşları karaciğer kanserin üzerinde yaptıkları invitro çalışma , SK-HEP-1 ve HA22T ile birlikte ko-kültüre alınan PMA ile uyruan THP-1 hücrelerinde Arginase-1, CD163 , TGF- β ve CD206 gibi M2 makrofaj belirteci olan yüksek düzeyde eksprese edildiğini ve M1 belirteci olan CD86, NOS2 , TNF- α ve CCR7 genlerin ekspresyonunun anlamlı derecede azaldığını göstermiştir (Liu ve ark., 2020).

Literatürdeki bulgular , invivo modelde gözlemlenen M2 makrofajlarının metastazı artırıcı etkisinin ve tümör mikroçevresinde makrofaj polarizasyonunun önemli bir rol oynadığını, kontrollü bir in vitro ko-kültür modeli kullanılarak da doğrulanabileceğini ortaya koymaktadır. Bu mekanizmayı daha ayrıntılı inceleyebilmek ve spesifik hücrel etkileşimleri değerlendirebilmek için, çalışmamızda KHAK hücre hattı H446 ve PMA ile indüklenen THP-1 türevli M0 makrofajları, ko-kültür edilerek tümör mikroçevresinin makrofaj polarizasyonuna etkisini inceledik. Literatürle uyumlu olarak, H446 hücrelerinden salınan sinyallerin M0 hücrelerinin M2 hücrelerine polarize ettiğini hem artan CD206 geninin ekspresyonu hemde artan anti-inflamatur sitokinlerin seviyeleri ile doğruladık. Buna karşılık, pro-inflamatur TNF- α sitokinleri ile M1 fenotipine özgü CD86 geninin ekspresyonunda belirgin bir azalma tespit ettik.

Mitokondriler, biyogenez ve fisyon ve füzyon gibi zıt süreçler yoluyla morfolojilerini değiştirebilen hücresel enerji üreticileridir (Youle ve ark., 2012). Dinamik mitokondriyal ağların korunması, sinyal transdüksiyonu, ATP üretimi, demir-kükürt kümesi biyogenezisi ve kalsiyum tamponlama üzerinde kritik etkileri vardır (Otera ve ark., 2011) . Mitokondriyal morfoloji değişimi ayrıca hücre hayatta kalması, apoptoz ve hücresel metabolik homeostazda da rol oynar (Wallace ve ark., 2010), hem dış zar (OM) hem de iç zar (IM), mitokondriyal füzyon ve fisyonda rol alır. Mitofusin 1 ve 2 (MFN-1, MFN-2), OM füzyonu ve mitokondriyal morfolojinin korunması için esastır, Optik atrofi 1 (OPA1), IM füzyonunu kontrol eder ve Mfn1 eksiklikleri nedeniyle mitokondriyal disfonksiyona sahip hücreleri korur (Santel ve ark., 2001). Mitoguardin 1 olarak da bilinen FAM73a ve FAM73b adlı iki OM proteini, mitokondriyal füzyon için gereklidir ve mitokondriyal fosfolipaz D (MitoPLD) aracılığıyla fosfolipid metabolizmasını düzenleyerek işlev görür (Zhang ve ark., 2016). Mitokondri, makrofajlar ve diğer bağışıklık hücrelerinin aktivasyonunu, farklılaşmasını ve hayatta kalmasını düzenlemede kritik öneme sahiptir (Wang ve ark., 2021). Oksidatif metabolizma, trikarboksilik asit döngüsünde değişiklikler, mitokondriyal membran potansiyeli, mitokondriyal reaktif oksijen türlerinin ve mitokondriyal DNA'nın salınımı ve mitokondriyal ultrastrüktürün dönüşümü dahil olmak üzere çeşitli ekstrasellüler sinyallere yanıt olarak mitokondriyal metabolizma ve fizyolojisindeki değişiklikler, makrofajların aktivasyon durumunun temelini oluşturur (Angajala ve ark., 2018). Mitokondri, füzyon, fisyon ve krista yeniden şekillenmesi dengesini koruyarak normal fizyolojik fonksiyonları koruyan son derece dinamik organellerdir (Eisner ve ark., 2018). Son yıllarda yapılan çalışmalar, mitokondriyal dinamiklerin ve metabolik mekanizmaların yalnızca enerji metabolizmasını değil, aynı zamanda bağışıklık hücrelerinin farklılaşması ve fonksiyonel aktivitesini de etkileyebileceğini ortaya koymuştur. Mitokondri aracılı metabolik değişiklikler, immün

hücre polarizasyonu, özellikle lenfosit homeostazı ve bellek T hücresi üretimi ile ilişkilidir (Buck ve ark., 2016). Th1, Th2 ve Th17 alt popülasyonlarına farklılaşması, mitokondriyal oksidatif fosforilasyondan (OXPHOS) ziyade glikolizi tercih eder ve T regülatör (Treg) hücrelerinin, lipid metabolizmasına ve OXPHOS'a bağlı olan farklı metabolik talepleri vardır (Vander windt ve ark., 2012). Makrofajların polarizasyonu da Makrofajların polarizasyonu da farklı metabolik yolları içerir, aerobik glikoliz M1 makrofajları için önemlidir ve yağ asidi oksidasyonu (FAO) ile yönlendirilen mitokondriyal oksidatif fosforilasyon M2 makrofajlarının farklılaşması için önemlidir (Huang ve ark., 2014; Odegaard ve ark.,2011). Remonde ve arkadaşları yaptıkları çalışma, bakteri ile enfeksiyon koşullar altında M0 makrofajı mitokondrilerinin fisyon dinamiğine geçip M1 makrofaja farklılaşarak pro-inflamatuar yanıt verdiği , anti-inflamatuar görevi yapabilmek için mitokondri birbirine birleşip füzyon dinamiğine geçer ve M2 makrofaja farklılaştığını kanıtladı (Ramond ve ark., 2019). Ayrıca Gao Z ve arkadaşları yaptıkları çalışmada mitokondriyal dinamiklerin makrofaj farklılaşmasını yönlendirmekte görevini özellikle vurgulamıştır. Fare makrofajlarında mitokondriyal füzyonda rol alan FAM73b geninin knockdown edilmesinin mitokondriyal bölünmenin artmasına neden olduğu ve TLR sinyalleri aracılığıyla M1 fenotipli makrofajların polarizasyonu, IL-12 üretilmesinin artmasına ve IL-10 ve IL-23a üretilmesinin azalmasına neden olduğu ve buna bağlı olarak FAM73b geni, tümöre karşı immün sistemin aktifleştirildiğinin sağladığını kanıtlamıştır (Gao ve ark., 2017).

Yukarıdaki bilgiler ışığında makrofaj polarizasyonunda etkili olabileceğini düşündüğümüz mitokondriyal dinamiklerin (füzyon ve fisyon) etkisini çalışmamızda araştırdık. Bu amaçla, M0 hücrelerinde mitokondriyal füzyonda görev alan MFN-2 geninin ekspresyonu siRNA aracılığıyla baskıladık ve makrofaj polarizasyonundaki etkisini araştırdık.

MFN-2 knockdown edilen M0 makrofajlarında , M0 makrofajlarına kıyasla pro-inflamatuar M1 polarizasyonunun arttığı , CD86 geninin ekspresyonundaki yükselişi ve pro-inflamatuar TNF- α sitokinlerinin düzeylerin artışıyla belirledik. Tam aksine, anti-inflamatuar M2 polarizasyonunun azaldığını, CD206 geninin ekspresyonundaki azalışı ve anti-inflamatuar IL-10 sitokinlerinin düzeylerin düşüşüyle gösterdik.

Ayrıca tümör mikroçevresinde bulunan TAM'lardaki MFN-2 rolünü açıkladık. MFN-2 geninin ekspresyonu, H446 hücreleriyle M0 makrofajı ko-kültür grubunda, monokültür grubuna kıyasla arttı ve bu artış, hem M2 markeri olan CD206 geninin ekspresyonunun hemde anti-inflamatuar sitokini olan IL-10 seviyelerinin paralel olarak arttığını belirledik. Bu durum, MFN-2 artması, M2 polarizasyonu ile ilişkili olduğunu düşündürür. Buna karşılık mitokondriyal fisyonunda önemli rolü olan Drp-1 geninin ekspresyonu, ko-kültür grubunda, monokültüre göre önemli düzeyde azaldı ve bu azalış, hem M1 markeri olan CD86 geninin ekspresyonunun hemde pro-inflamatuar sitokini olan TNF- α seviyelerinin paralel olarak azaldığını gösterdik. Bu da Remond ve arkadaşları, M2 makrofajlarında füzyon ve M1 makrofajlarında fisyon baskın olduğu açıkladıkları sonuçları ile uyumludur. Ek olarak, H446 hücreleri ile ko-kültür edilen ve MFN-2 knockdown yapılan M0 makrofajları, H446 hücreleriyle ko-kültür edilen M0 makrofajlarına kıyasla M1 markeri olan CD86 geninin ekspresyonu ve pro-inflamatuar M1 makrofajları ile ilişkili TNF- α sitokin seviyelerinin belirgin bir şekilde arttığını tespit ettik ve buna karşılık, M2 markeri olan CD206 geninin ekspresyonu ve anti-inflamatuar M2 makrofajları ile ilişkili IL-10 sitokin seviyelerinin azaldığını belirledik.

Mitokondriyal füzyonun M2 polarizasyonundaki rolünü anlamak amacıyla, NLRP6 inflammasom yolağına etkisini değerlendirdik. MFN-2 knockdown M0 makrofajlarında, M0 grubuna göre NLRP6 ekspresyonunun azaldığını, bu da M2 polarizasyonundaki düşüşle paralel olduğunu belirledik . Bu bulgu , Rao ve arkadaşlarının

KHAK'taki inflammasom aktivasyonu üzerine yaptığı çalışma ile uyumludur (Rao ve ark, 2022). Ayrıca, LPS reseptörü olan TLR-4 sinyal yolağı üzerinde MFN-2'nin etkisini incelediğimizde, ilginç bir şekilde MFN-2 knockdown yapılan M0 makrofajlarında , M0 grubuna göre, TLR-4 geninin ekspresyonunda bir azalma gözlemledik.

Bu çalışma, mitokondriyal dinamiklerin makrofaj polarizasyonu üzerindeki belirleyici rolünü ortaya koymaktadır. MFN-2'nin baskılanmasının, M1 fenotipini destekleyerek tümör mikroçevresindeki bağışıklık tepkisini güçlendirebileceğini göstermektedir.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu sonuçlar, mitokondriyal dinamiklerin makrofaj polarizasyonunu ve tümör mikroçevresinde bağışıklık düzenlemeyi nasıl şekillendirdiğine dair yeni kanıtlar sunmaktadır. MFN-2'nin makrofaj polarizasyonundaki kritik rolü, özellikle tümör ilişkili makrofajların (TAM) yeniden programlanmasını hedefleyen immünoterapötik stratejiler için önemli bir hedef olabileceğini düşündürmektedir. Bu bağlamda, MFN-2 geninin inhibisyonunun, bağışıklık sisteminin tümöre karşı aktivasyonunu artırabilecek potansiyel bir yaklaşım olarak değerlendirilebileceği öne sürülebilir.

Gelecekteki çalışmalar ile, tümör mikroçevresinde makrofajlarda mitokondriyal füzyonu baskılayan ajanlar geliştirilmesi, klinik kullanım için daha fazla potansiyel hedef sağlamak üzere KHAK'de çalışılmalıdır. Genel olarak, M1 makrofaj polarizasyonu üzerine yapılan bu araştırma, KHAK metastazının önlenmesinde yeni bir yön sağlayabilir.

KAYNAKLAR

- Afroz, S. F., Raven, K. D., Lawrence, G. M., Kapetanovic, R., Schroder, K., & Sweet, M. J. (2023). Mitochondrial dynamics in macrophages: divide to conquer or unite to survive?. *Biochemical Society Transactions*, 51(1), 41-56.
<https://doi.org/10.1042/bst20220014>
- Allavena, P., Sica, A., Solinas, G., Porta, C., & Mantovani, A. (2008). The inflammatory micro-environment in tumor progression: the role of tumor-associated macrophages. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 66(1), 1-9.
<https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2007.07.004>
- Angajala, A., Lim, S., Phillips, J. B., Kim, J. H., Yates, C., You, Z., & Tan, M. (2018). Diverse roles of mitochondria in immune responses: novel insights into immunometabolism. *Frontiers in Immunology*, 9, 1605.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01605>
- Best, S. A., Hess, J. B., Souza-Fonseca-Guimaraes, F., Cursons, J., Kersbergen, A., Dong, X., ... & Sutherland, K. D. (2020). Harnessing natural killer immunity in metastatic SCLC. *Journal of Thoracic Oncology*, 15(9), 1507-1521
<https://doi.org/10.1016/j.jtho.2020.05.008> .
- Bied, M., Ho, W. W., Ginhoux, F., & Blériot, C. (2023). Roles of macrophages in tumor development: a spatiotemporal perspective. *Cellular & Molecular Immunology*, 20(9), 983-992. <https://doi.org/10.1038/s41423-023-01061-6>
- 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.
<https://doi.org/10.1038/s41591-018-0014-x>

- Boutillier, A. J., & Elsawa, S. F. (2021). Macrophage polarization states in the tumor microenvironment. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(13), 6995. <https://doi.org/10.3390/ijms22136995>
- Brandt, T., Cavellini, L., Kühlbrandt, W., & Cohen, M. M. (2016). A mitofusin-dependent docking ring complex triggers mitochondrial fusion in vitro. *Elife*, 5, e14618. <https://doi.org/10.7554/elife.14618>
- Buck, M. D., O'Sullivan, D., Geltink, R. I. K., Curtis, J. D., Chang, C. H., Sanin, D. E., ... & Pearce, E. L. (2016). Mitochondrial dynamics controls T cell fate through metabolic programming. *Cell*, 166(1), 63-76. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.035> .
- Budhu, A., Forgues, M., Ye, Q. H., Jia, H. L., He, P., Zanetti, K. A., ... & Wang, X. W. (2006). Prediction of venous metastases, recurrence, and prognosis in hepatocellular carcinoma based on a unique immune response signature of the liver microenvironment. *Cancer cell*, 10(2), 99-111. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.06.016>
- Cadena, L. R., Gahura, O., Panicucci, B., Zíková, A., & Hashimi, H. (2021). Mitochondrial contact site and cristae organization system and F1Fo-ATP synthase crosstalk is a fundamental property of mitochondrial cristae. *Mosphere*, 6(3), e00327-21. <https://doi.org/10.1128/msphere.00327-21>
- Cardona, A. F., Rojas, L., Zatarain-Barrón, Z. L., Ruiz-Patiño, A., Ricaurte, L., Corrales, L., ... & Arrieta, O. (2019). Multigene mutation profiling and clinical characteristics of small-cell lung cancer in never-smokers vs. heavy smokers (Geno1. 3-CLICaP). *Frontiers in Oncology*, 9, 254. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00254>

- Chauvin, J. M., & Zarour, H. M. (2020). TIGIT in cancer immunotherapy. *Journal for Immunotherapy of Cancer*, 8(2). <https://doi.org/10.1136/jitc-2020-000957>
- Chen, F. L., Yang, Z. H., Wang, X. C., Liu, Y., Yang, Y. H., Li, L. X., ... & Hu, R. M. (2010). Adipophilin affects the expression of TNF- α , MCP-1, and IL-6 in THP-1 macrophages. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 337, 193-199. <https://doi.org/10.1007/s11010-009-0299-7>
- Cho, H., Seo, Y., Loke, K. M., Kim, S. W., Oh, S. M., Kim, J. H., ... & Williams, D. R. (2018). Cancer-stimulated CAFs enhance monocyte differentiation and protumoral TAM activation via IL6 and GM-CSF secretion. *Clinical Cancer Research*, 24(21), 5407-5421. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-18-0125>
- Cojocaru, K. A., Luchian, I., Goriuc, A., Antoci, L. M., Ciobanu, C. G., Popescu, R., ... & Foia, L. G. (2023). Mitochondrial dysfunction, oxidative stress, and therapeutic strategies in diabetes, obesity, and cardiovascular disease. *Antioxidants*, 12(3), 658. <https://doi.org/10.3390/antiox12030658>
- Comito, G., Giannoni, E., Segura, C. P., Barcellos-de-Souza, P., Raspollini, M. R., Baroni, G., ... & Chiarugi, P. (2014). Cancer-associated fibroblasts and M2-polarized macrophages synergize during prostate carcinoma progression. *Oncogene*, 33(19), 2423-2431 <https://doi.org/10.1038/onc.2013.191>.
- Corrêa-da-Silva, F., Pereira, J. A., de Aguiar, C. F., & de Moraes-Vieira, P. M. (2018). Mitoimmunity—when mitochondria dictates macrophage function. *Cell Biology International*, 42(6), 651-655 <https://doi.org/10.1002/cbin.10921>
- Dangaj, D., Bruand, M., Grimm, A. J., Ronet, C., Barras, D., Duttagupta, P. A., ... & Coukos, G. (2019). Cooperation between constitutive and inducible chemokines enables T cell engraftment and immune attack in solid tumors. *Cancer cell*, 35(6), 885-900. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2019.05.004>

- Dave, S. S., Wright, G., Tan, B., Rosenwald, A., Gascoyne, R. D., Chan, W. C., ... & Staudt, L. M. (2004). Prediction of survival in follicular lymphoma based on molecular features of tumor-infiltrating immune cells. *New England Journal of Medicine*, 351(21), 2159-2169 <https://doi.org/10.1056/nejmoa041869>
- De Brito, O. M., & Scorrano, L. (2008). Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. *Nature*, 456(7222), 605-610 <https://doi.org/10.1038/nature07534>.
- Denninghoff, V., Russo, A., de Miguel-Pérez, D., Malapelle, U., Benyounes, A., Gittens, A., ... & Rolfo, C. (2021). Small cell lung cancer: state of the art of the molecular and genetic landscape and novel perspective. *Cancers*, 13(7), 1723. <https://doi.org/10.3390/cancers13071723>
- Domagala-Kulawik, J., Osinska, I., & Hoser, G. (2014). Mechanisms of immune response regulation in lung cancer. *Translational Lung Cancer Research*, 3(1), 15. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2218-6751.2013.11.03>
- Dora, D., Rivard, C., Yu, H., Pickard, S. L., Laszlo, V., Harko, T., ... & Lohinai, Z. (2021). Characterization of tumor-associated macrophages and the immune microenvironment in limited-stage neuroendocrine-high and-low small cell lung cancer. *Biology*, 10(6), 502. <https://doi.org/10.3390/biology10060502>
- Edwards, R., Eaglesfield, R., & Tokatlidis, K. (2021). The mitochondrial intermembrane space: the most constricted mitochondrial sub-compartment with the largest variety of protein import pathways. *Open Biology*, 11(3), 210002. <https://doi.org/10.1098/rsob.210002>
- Eisner, V., Picard, M., & Hajnóczky, G. (2018). Mitochondrial dynamics in adaptive and maladaptive cellular stress responses. *Nature Cell Biology*, 20(7), 755-765. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0133-0>

- Feng, W., Dean, D. C., Hornicek, F. J., Shi, H., & Duan, Z. (2019). Exosomes promote pre-metastatic niche formation in ovarian cancer. *Molecular Cancer*, 18(1), 124. <https://doi.org/10.1186/s12943-019-1049-4>
- Filadi, R., Greotti, E., Turacchio, G., Luini, A., Pozzan, T., & Pizzo, P. (2015). Mitofusin 2 ablation increases endoplasmic reticulum–mitochondria coupling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(17), E2174-E2181. <https://doi.org/10.1073/pnas.1504880112>
- Fricker, M., Tolkovsky, A. M., Borutaite, V., Coleman, M., & Brown, G. C. (2018). Neuronal cell death. *Physiological Reviews*, 98(2), 813-880. <https://doi.org/10.1152/physrev.00011.2017>
- Gao, Z., Li, Y., Wang, F., Huang, T., Fan, K., Zhang, Y., ... & Jin, J. (2017). Mitochondrial dynamics controls anti-tumour innate immunity by regulating CHIP-IRF1 axis stability. *Nature Communications*, 8(1), 1805. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01919-0>
- Giacomello, M., Pyakurel, A., Glytsou, C., & Scorrano, L. (2020). The cell biology of mitochondrial membrane dynamics. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 21(4), 204-224. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0210-7>
- Guo, Y., Shen, R., Yu, L., Zheng, X., Cui, R., Song, Y., & Wang, D. (2020). Roles of galectin-3 in the tumor microenvironment and tumor metabolism. *Oncology Reports*, 44(5), 1799-1809. <https://doi.org/10.3892/or.2020.7777>
- Guo, Z., Song, J., Hao, J., Zhao, H., Du, X., Li, E., ... & Wang, Q. (2019). M2 macrophages promote NSCLC metastasis by upregulating CRYAB. *Cell Death & Disease*, 10(6), 377. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1618-x>

- Gupta, A., & Becker, T. (2021). Mechanisms and pathways of mitochondrial outer membrane protein biogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1862(1), 148323. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2020.148323>
- Gupta, A., & Becker, T. (2021). Mechanisms and pathways of mitochondrial outer membrane protein biogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1862(1), 148323. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2020.148323>
- Hamilton, G., Rath, B., Klameth, L., & Hochmair, M. J. (2016). Small cell lung cancer: Recruitment of macrophages by circulating tumor cells. *Oncoimmunology*, 5(3), e1093277. <https://doi.org/10.1080/2162402x.2015.1093277>
- Han, C., Zhang, C., Wang, H., & Zhao, L. (2021). Exosome-mediated communication between tumor cells and tumor-associated macrophages: implications for tumor microenvironment. *Oncoimmunology*, 10(1), 1887552. <https://doi.org/10.1080/2162402x.2021.1887552>
- Hanahan, D., & Coussens, L. M. (2012). Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell*, 21(3), 309-322. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.02.022>
- He, Y., Rozeboom, L., Rivard, C. J., Ellison, K., Dziadziuszko, R., Yu, H., ... & Hirsch, F. R. (2017). MHC class II expression in lung cancer. *Lung Cancer*, 112, 75-80. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2017.07.030>
- Hecht, S. S. (1999). Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 91(14), 1194-1210. <https://doi.org/10.1093/jnci/91.14.1194>
- Herrmann, J. M., & Riemer, J. (2010). The intermembrane space of mitochondria. *Antioxidants & Redox Signaling*, 13(9), 1341-1358. <https://doi.org/10.1089/ars.2009.3063>

- Hiddinga, B. I., Raskin, J., Janssens, A., Pauwels, P., & Van Meerbeeck, J. P. (2021). Recent developments in the treatment of small cell lung cancer. *European Respiratory Review*, 30(161). <https://doi.org/10.1183/16000617.0079-2021>
- Hogarth, K., Tarazi, D., & Maynes, J. T. (2023). The effects of general anesthetics on mitochondrial structure and function in the developing brain. *Frontiers in Neurology*, 14, 1179823. <https://doi.org/10.3389/fneur.2023.1179823>
- Hu, K., Jin, Y., Chroneos, Z., Han, X., Liu, H., & Lin, L. (2018). Macrophage functions and regulation: roles in diseases and implications in therapeutics. *Journal of Immunologyresearch*, 2018(7590350), 7590350. <https://doi.org/10.1155/2018/7590350>
- Huang, S. C. C., Everts, B., Ivanova, Y., O'sullivan, D., Nascimento, M., Smith, A. M., ... & Pearce, E. J. (2014). Cell-intrinsic lysosomal lipolysis is essential for alternative activation of macrophages. *Nature Immunology*, 15(9), 846-855. <https://doi.org/10.1038/ni.2956>
- Huinen, Z. R., Huijbers, E. J., van Beijnum, J. R., Nowak-Sliwinska, P., & Griffioen, A. W. (2021). Anti-angiogenic agents—overcoming tumour endothelial cell anergy and improving immunotherapy outcomes. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 18(8), 527-540. <https://doi.org/10.1038/s41571-021-00496-y>
- Hwang, I., Kim, J. W., Ylaya, K., Chung, E. J., Kitano, H., Perry, C., ... & Hewitt, S. M. (2020). Tumor-associated macrophage, angiogenesis and lymphangiogenesis markers predict prognosis of non-small cell lung cancer patients. *Journal of Translational Medicine*, 18, 1-15. <https://doi.org/10.1186/s12967-020-02618-z>
- Ichinohe, T., Yamazaki, T., Koshiba, T., & Yanagi, Y. (2013). Mitochondrial protein mitofusin 2 is required for NLRP3 inflammasome activation after RNA virus

- infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(44), 17963-17968. <https://doi.org/10.1073/pnas.1312571110>
- Ishihara, N., Eura, Y., & Mihara, K. (2004). Mitofusin 1 and 2 play distinct roles in mitochondrial fusion reactions via GTPase activity. *Journal of Cell Science*, 117(26), 6535-6546. <https://doi.org/10.1242/jcs.01565>
- Jahchan, N. S., Mujal, A. M., Pollack, J. L., Binnewies, M., Sriram, V., Reyno, L., & Krummel, M. F. (2019). Tuning the tumor myeloid microenvironment to fight cancer. *Frontiers in Immunology*, 10, 1611. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01611>
- Joyce, J. A., & Pollard, J. W. (2009). Microenvironmental regulation of metastasis. *Nature Reviews Cancer*, 9(4), 239-252. <https://doi.org/10.1038/nrc261>
- Kanwal, M., Ding, X. J., & Cao, Y. (2017). Familial risk for lung cancer. *Oncology Letters*, 13(2), 535-542. <https://doi.org/10.3892/ol.2016.5518>
- Karachaliou, N., Pilotto, S., Lazzari, C., Bria, E., de Marinis, F., & Rosell, R. (2016). Cellular and molecular biology of small cell lung cancer: an overview. *Translational Lung Cancer Research*, 5(1), 2. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2218-6751.2016.01.02>
- Kelley, N., Jeltama, D., Duan, Y., & He, Y. (2019). The NLRP3 inflammasome: an overview of mechanisms of activation and regulation. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(13), 3328. <https://doi.org/10.3390/ijms20133328>
- Kersten, K., Coffelt, S. B., Hoogstraat, M., Verstegen, N. J., Vrijland, K., Ciampricotti, M., ... & de Visser, K. E. (2017). Mammary tumor-derived CCL2 enhances pro-metastatic systemic inflammation through upregulation of IL1 β in tumor-

- associated macrophages. *Oncoimmunology*, 6(8), e1334744.
<https://doi.org/10.1080/2162402x.2017.1334744>
- Kim, D. H., Park, H., Choi, Y. J., Im, K., Lee, C. W., Kim, D. S., ... & Rho, J. K. (2023). Identification of exosomal microRNA panel as diagnostic and prognostic biomarker for small cell lung cancer. *Biomarker Research*, 11(1), 80.
<https://doi.org/10.1186/s40364-023-00517->
- Klein, S., Schulte, A., Arolt, C., Tolkach, Y., Reinhardt, H. C., Buettner, R., & Quaas, A. (2023). Intratumoral abundance of M2-macrophages is associated with unfavorable prognosis and markers of T-cell exhaustion in small cell lung cancer patients. *Modern Pathology*, 36(10), 100272.
<https://doi.org/10.1016/j.modpat.2023.100272>
- Kos, K., Salvagno, C., Wellenstein, M. D., Aslam, M. A., Meijer, D. A., Hau, C. S., ... & de Visser, K. E. (2022). Tumor-associated macrophages promote intratumoral conversion of conventional CD4⁺ T cells into regulatory T cells via PD-1 signalling. *Oncoimmunology*, 11(1), 2063225.
<https://doi.org/10.1080/2162402x.2022.2063225>
- Kraus, F., & Ryan, M. T. (2017). The constriction and scission machineries involved in mitochondrial fission. *Journal of Cell Science*, 130(18), 2953-2960.
<https://doi.org/10.1242/jcs.199562>
- Ksiazkiewicz, M., Gottfried, E., Kreutz, M., Mack, M., Hofstaedter, F., & Kunz-Schughart, L. A. (2010). Importance of CCL2-CCR2A/2B signaling for monocyte migration into spheroids of breast cancer-derived fibroblasts. *Immunobiology*, 215(9-10), 737-747.
<https://doi.org/10.1016/j.imbio.2010.05.019>

- Kuang, D. M., Zhao, Q., Peng, C., Xu, J., Zhang, J. P., Wu, C., & Zheng, L. (2009). Activated monocytes in peritumoral stroma of hepatocellular carcinoma foster immune privilege and disease progression through PD-L1. *The Journal of Experimental Medicine*, 206(6), 1327. <https://doi.org/10.1084/jem.20082173>
- Kuznetsov, A. V., & Ausserlechner, M. J. (2023). Research of mitochondrial function, structure, dynamics and intracellular organization. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(1), 886. <https://doi.org/10.3390/ijms24010886>
- Kühlbrandt, W. (2015). Structure and function of mitochondrial membrane protein complexes. *BMC Biology*, 13, 1-11. <https://doi.org/10.1186/s12915-015-0201-x>
- Leader, A. M., Grout, J. A., Maier, B. B., Nabet, B. Y., Park, M. D., Tabachnikova, A., ... & Merad, M. (2021). Single-cell analysis of human non-small cell lung cancer lesions refines tumor classification and patient stratification. *Cancer Cell*, 39(12), 1594-1609. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2021.10.009>
- Legros, F., Lombès, A., Frachon, P., & Rojo, M. (2002). Mitochondrial fusion in human cells is efficient, requires the inner membrane potential, and is mediated by mitofusins. *Molecular Biology of The Cell*, 13(12), 4343-4354. <https://doi.org/10.1091/mbc.e02-06-0330>
- Lendeckel, U., Venz, S., & Wolke, C. (2022). Macrophages: Shapes and functions. *ChemTexts*, 8(2), 12. <https://doi.org/10.1007/s40828-022-00163-4>
- Li, H., Huang, N., Zhu, W., Wu, J., Yang, X., Teng, W., ... & Li, Y. (2018). Modulation the crosstalk between tumor-associated macrophages and non-small cell lung cancer to inhibit tumor migration and invasion by ginsenoside Rh2. *BMC Cancer*, 18, 1-12. <https://doi.org/10.1186/s12885-018-4299-4>

- Lin, J., & Epel, E. (2022). Stress and telomere shortening: Insights from cellular mechanisms. *Ageing Research Reviews*, 73, 101507. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2021.101507>
- Lin, L., Lin, H., Wang, L., Wang, B., Hao, X., & Shi, Y. (2015). miR-130a regulates macrophage polarization and is associated with non-small cell lung cancer. *Oncology Reports*, 34(6), 3088-3096. <https://doi.org/10.3892/or.2015.4301>
- Lissowska, J., Foretova, L., Dąbek, J., Zaridze, D., Szeszenia-Dabrowska, N., Rudnai, P., ... & Boffetta, P. (2010). Family history and lung cancer risk: international multicentre case-control study in Eastern and Central Europe and meta-analyses. *Cancer Causes & Control*, 21, 1091-1104., <https://doi.org/10.1007/s10552-010-9537-2>
- Liu, G., Ouyang, X., Sun, Y., Xiao, Y., You, B., Gao, Y., ... & Chang, C. (2020). The miR-92a-2-5p in exosomes from macrophages increases liver cancer cells invasion via altering the AR/PHLPP/p-AKT/ β -catenin signaling. *Cell Death & Differentiation*, 27(12), 3258-3272. <https://doi.org/10.1038/s41418-020-0575-3>
- Locati, M., Curtale, G., & Mantovani, A. (2020). Diversity, mechanisms, and significance of macrophage plasticity. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 15(1), 123-147. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-012418-012718>
- Lu, C. S., Shiau, A. L., Su, B. H., Hsu, T. S., Wang, C. T., Su, Y. C., ... & Shieh, G. S. (2020). Oct4 promotes M2 macrophage polarization through upregulation of macrophage colony-stimulating factor in lung cancer. *Journal of Hematology & Oncology*, 13, 1-16. <https://doi.org/10.1186/s13045-020-00887-1>

- Maddison, P. (2017). Effects of aspirin on small-cell lung cancer mortality and metastatic presentation. *Lung Cancer*, 106, 67-69.
<https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2017.01.018>
- Madeddu, C., Donisi, C., Liscia, N., Lai, E., Scartozzi, M., & Macciò, A. (2022). EGFR-mutated non-small cell lung cancer and resistance to immunotherapy: role of the tumor microenvironment. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(12), 6489. <https://doi.org/10.3390/ijms23126489>
- Mahadevan, N. R., Knelson, E. H., Wolff, J. O., Vajdi, A., Saigí, M., Campisi, M., ... & Barbie, D. A. (2021). Intrinsic immunogenicity of small cell lung carcinoma revealed by its cellular plasticity. *Cancer Discovery*, 11(8), 1952-1969.
<https://doi.org/10.1158/2159-8290.cd-20-0913>
- Mantovani, A., Allavena, P., Marchesi, F., & Garlanda, C. (2022). Macrophages as tools and targets in cancer therapy. *Nature Reviews Drug Discovery*, 21(11), 799-820.
- Marchi, S., Patergnani, S., & Pinton, P. (2014). The endoplasmic reticulum–mitochondria connection: one touch, multiple functions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1837(4), 461-469. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2013.10.015>
- Mass, E., Nimmerjahn, F., Kierdorf, K., & Schlitzer, A. (2023). Tissue-specific macrophages: how they develop and choreograph tissue biology. *Nature Reviews Immunology*, 23(9), 563-579. <https://doi.org/10.1038/s41577-023-00848-y>
- Mears, J. A., Lackner, L. L., Fang, S., Ingberman, E., Nunnari, J., & Hinshaw, J. E. (2011). Conformational changes in Dnm1 support a contractile mechanism for mitochondrial fission. *Nature Structural & Molecular Biology*, 18(1), 20-26.
<https://doi.org/10.1038/nsmb.1949>
- Missiroli, S., Genovese, I., Perrone, M., Vezzani, B., Vitto, V. A., & Giorgi, C. (2020). The role of mitochondria in inflammation: from cancer to neurodegenerative

- disorders. *Journal of Clinical Medicine*, 9(3), 740.
<https://doi.org/10.3390/jcm9030740>
- Montessuit, S., Somasekharan, S. P., Terrones, O., Lucken-Ardjomande, S., Herzig, S., Schwarzenbacher, R., ... & Martinou, J. C. (2010). Membrane remodeling induced by the dynamin-related protein Drp1 stimulates Bax oligomerization. *Cell*, 142(6), 889-901. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.08.017>
- Murray, P. J. (2017). Macrophage polarization. *Annual Review of Physiology*, 79(1), 541-566. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-022516-034339>
- Nair, S., Sobotka, K. S., Joshi, P., Gressens, P., Fleiss, B., Thornton, C., ... & Hagberg, H. (2019). Lipopolysaccharide-induced alteration of mitochondrial morphology induces a metabolic shift in microglia modulating the inflammatory response in vitro and in vivo. *Glia*, 67(6), 1047-1061. <https://doi.org/10.1002/glia.23587>
- Naon, D., Zaninello, M., Giacomello, M., Varanita, T., Grespi, F., Lakshminaranayan, S., ... & Scorrano, L. (2016). Critical reappraisal confirms that Mitofusin 2 is an endoplasmic reticulum-mitochondria tether. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(40), 11249-11254.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1606786113>
- Nielsen, S. R., & Schmid, M. C. (2017). Macrophages as key drivers of cancer progression and metastasis. *Mediators of Inflammation*, 2017(1), 9624760.
<https://doi.org/10.1155/2017/9624760>
- Odegaard, J. I., & Chawla, A. (2011). Alternative macrophage activation and metabolism. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 6(1), 275-297.
<https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-011110-130138>

- Otera, H., & Mihara, K. (2011). Molecular mechanisms and physiologic functions of mitochondrial dynamics. *The Journal of Biochemistry*, 149(3), 241-251. <https://doi.org/10.1093/jb/mvr002>
- Park, S., Won, J. H., Hwang, I., Hong, S., Lee, H. K., & Yu, J. W. (2015). Defective mitochondrial fission augments NLRP3 inflammasome activation. *Scientific Reports*, 5(1), 15489. <https://doi.org/10.1038/srep15489>
- Pedersen, S., Jensen, K. P., Honoré, B., Kristensen, S. R., Pedersen, C. H., Szejniuk, W. M., ... & Falkmer, U. (2022). Circulating microvesicles and exosomes in small cell lung cancer by quantitative proteomics. *Clinical Proteomics*, 19(1), 2. <https://doi.org/10.1186/s12014-021-09339-5>
- Peng, L. S., Zhang, J. Y., Teng, Y. S., Zhao, Y. L., Wang, T. T., Mao, F. Y., ... & Zhuang, Y. (2017). Tumor-associated monocytes/macrophages impair NK-cell function via TGFβ1 in human gastric cancer. *Cancer Immunology Research*, 5(3), 248-256. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.cir-16-0152>
- Pérez, S., & Rius-Pérez, S. (2022). Macrophage polarization and reprogramming in acute inflammation: a redox perspective. *Antioxidants*, 11(7), 1394. <https://doi.org/10.3390/antiox11071394>
- Pernas, L., & Scorrano, L. (2016). Mito-morphosis: mitochondrial fusion, fission, and cristae remodeling as key mediators of cellular function. *Annual Review of Physiology*, 78(1), 505-531. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021115-105011>
- Protasoni, M., & Zeviani, M. (2021). Mitochondrial structure and bioenergetics in normal and disease conditions. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(2), 586. <https://doi.org/10.3390/ijms22020586>

- Ramond, E., Jamet, A., Coureuil, M., & Charbit, A. (2019). Pivotal role of mitochondria in macrophage response to bacterial pathogens. *Frontiers in Immunology*, 10, 2461. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02461>
- Ramos, E. S., Larsson, N. G., & Mourier, A. (2016). Bioenergetic roles of mitochondrial fusion. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1857(8), 1277-1283. <https://doi.org/10.1016/j.bbabbio.2012.02.033>
- Rao, X., Zhou, X., Wang, G., Jie, X., Xing, B., Xu, Y., ... & Zhou, R. (2022). NLRP6 is required for cancer-derived exosome-modified macrophage M2 polarization and promotes metastasis in small cell lung cancer. *Cell Death & Disease*, 13(10), 891. <https://doi.org/10.1038/s41419-022-05336-0>
- Richter, V., Singh, A. P., Kvansakul, M., Ryan, M. T., & Osellame, L. D. (2015). Splitting up the powerhouse: structural insights into the mechanism of mitochondrial fission. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72, 3695-3707. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-1950-y>
- Santel, A., & Fuller, M. T. (2001). Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin. *Journal of Cell Science*, 114(5), 867-874. <https://doi.org/10.1242/jcs.114.5.867>
- Sedighzadeh, S. S., Khoshbin, A. P., Razi, S., Keshavarz-Fathi, M., & Rezaei, N. (2021). A narrative review of tumor-associated macrophages in lung cancer: regulation of macrophage polarization and therapeutic implications. *Translational Lung Cancer Research*, 10(4), 1889. <https://doi.org/10.21037/tlcr-20-1241>
- Sesaki, H., Adachi, Y., Kageyama, Y., Itoh, K., & Iijima, M. (2014). In vivo functions of Drp1: lessons learned from yeast genetics and mouse knockouts. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1842(8), 1179-1185. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.11.024>

- Sharma, D., & Kanneganti, T. D. (2016). The cell biology of inflammasomes: Mechanisms of inflammasome activation and regulation. *The Journal of Cell Biology*, 213(6), 617. <https://doi.org/10.1083/jcb.201602089>
- Sica, A., Larghi, P., Mancino, A., Rubino, L., Porta, C., Totaro, M. G., ... & Mantovani, A. (2008, October). Macrophage polarization in tumour progression. In *Seminars in Cancer Biology* (Vol. 18, No. 5, pp. 349-355). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2008.03.004>
- Solomon, B. L., & Garrido-Laguna, I. (2018). TIGIT: a novel immunotherapy target moving from bench to bedside. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 67(11), 1659-1667. <https://doi.org/10.1007/s00262-018-2246-5>
- Spurlock, B., Tullet, J. M. A., Hartman IV, J. L., & Mitra, K. (2020). Interplay of mitochondrial fission-fusion with cell cycle regulation: Possible impacts on stem cell and organismal aging. *Experimental Gerontology*, 135, 110919. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2020.110919>
- Starr, T., Bauler, T. J., Malik-Kale, P., & Steele-Mortimer, O. (2018). The phorbol 12-myristate-13-acetate differentiation protocol is critical to the interaction of THP-1 macrophages with Salmonella Typhimurium. *PloS One*, 13(3), e0193601. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193601>
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209-249. <https://doi.org/10.3322/caac.21834>
- Thandra, K. C., Barsouk, A., Saginala, K., Aluru, J. S., & Barsouk, A. (2021). Epidemiology of lung cancer. *Contemporary Oncology/Współczesna Onkologia*, 25(1), 45-52. <https://doi.org/10.5114/wo.2021.103829>

- Tiku, V., Tan, M. W., & Dikic, I. (2020). Mitochondrial functions in infection and immunity. *Trends in Cell Biology*, 30(4), 263-275.
<https://doi.org/10.1016/j.tcb.2020.01.006>
- Tilokani, L., Nagashima, S., Paupe, V., & Prudent, J. (2018). Mitochondrial dynamics: overview of molecular mechanisms. *Essays in Biochemistry*, 62(3), 341-360.
<https://doi.org/10.1042/ebc20170104>
- Tur, J., Vico, T., Lloberas, J., Zorzano, A., & Celada, A. (2017). Macrophages and mitochondria: a critical interplay between metabolism, signaling, and the functional activity. *Advances in Immunology*, 133, 1-36.
<https://doi.org/10.1016/bs.ai.2016.12.001>
- Van der Windt, G. J., & Pearce, E. L. (2012). Metabolic switching and fuel choice during T-cell differentiation and memory development. *Immunological Reviews*, 249(1), 27-42. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065x.2012.01150.x>
- Wager, C. L., & Wormley Jr, F. L. (2014). Classical versus alternative macrophage activation: the Ying and the Yang in host defense against pulmonary fungal infections. *Mucosal Immunology*, 7(5), 1023-1035.
<https://doi.org/10.1038/mi.2014.65>
- Wai, T., & Langer, T. (2016). Mitochondrial dynamics and metabolic regulation. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 27(2), 105-117.
<https://doi.org/10.1016/j.tem.2015.12.001>
- Wakabayashi, J., Zhang, Z., Wakabayashi, N., Tamura, Y., Fukaya, M., Kensler, T. W., ... & Sesaki, H. (2009). The dynamin-related GTPase Drp1 is required for embryonic and brain development in mice. *The Journal of Cell Biology*, 186(6), 805. <https://doi.org/10.1083/jcb.200903065>

- Wallace, D. C. (2010). Mitochondrial DNA mutations in disease and aging. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 51(5), 440-450.
<https://doi.org/10.1002/em.20586>
- Wang, S., Zimmermann, S., Parikh, K., Mansfield, A. S., & Adjei, A. A. (2019, August). Current diagnosis and management of small-cell lung cancer. In *Mayo Clinic Proceedings* (Vol. 94, No. 8, pp. 1599-1622). Elsevier.
<https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2019.01>.
- Watanabe, S., Alexander, M., Misharin, A. V., & Budinger, G. S. (2019). The role of macrophages in the resolution of inflammation. *The Journal of Clinical Investigation*, 129(7), 2619-2628. <https://doi.org/10.1172/jci124615>
- Wen, J., Fu, J. H., Zhang, W., & Guo, M. (2011). Lung carcinoma signaling pathways activated by smoking. *Chinese Journal of Cancer*, 30(8), 551.
<https://doi.org/10.5732/cjc.011.10059>
- West, A. P., Brodsky, I. E., Rahner, C., Woo, D. K., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., ... & Ghosh, S. (2011). TLR signalling augments macrophage bactericidal activity through mitochondrial ROS. *Nature*, 472(7344), 476-480.
<https://doi.org/10.1038/nature09973>
- Works, C. R., & Gallucci, B. B. (1996, November). Biology of lung cancer. In *Seminars in Oncology Nursing* (Vol. 12, No. 4, pp. 276-284). WB Saunders.
[https://doi.org/10.1016/s0749-2081\(96\)80026-x](https://doi.org/10.1016/s0749-2081(96)80026-x)
- Wu, J. Y., Huang, T. W., Hsieh, Y. T., Wang, Y. F., Yen, C. C., Lee, G. L., ... & Kuo, C. C. (2020). Cancer-derived succinate promotes macrophage polarization and cancer metastasis via succinate receptor. *Molecular Cell*, 77(2), 213-227.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.10.023>

- Xie, J. H., Li, Y. Y., & Jin, J. (2020). The essential functions of mitochondrial dynamics in immune cells. *Cellular & Molecular Immunology*, 17(7), 712-721.
<https://doi.org/10.1038/s41423-020-0480-1>
- Xu, Y., Cui, G., Jiang, Z., Li, N., & Zhang, X. (2019). Survival analysis with regard to PD-L1 and CD155 expression in human small cell lung cancer and a comparison with associated receptors. *Oncology Letters*, 17(3), 2960-2968.
<https://doi.org/10.3892/ol.2019.9910>
- Yang, L., & Zhang, Y. (2017). Tumor-associated macrophages: from basic research to clinical application. *Journal of Hematology & Oncology*, 10, 1-12.
<https://doi.org/10.1186/s13045-017-0430-2>
- Yin, L., Liu, X., Shao, X., Feng, T., Xu, J., Wang, Q., & Hua, S. (2021). The role of exosomes in lung cancer metastasis and clinical applications: an updated review. *Journal of Translational Medicine*, 19(1), 312.
<https://doi.org/10.1186/s12967-021-02985-1>
- Youle, R. J., & Van Der Bliek, A. M. (2012). Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science*, 337(6098), 1062-1065. <https://doi.org/10.1126/science.1219855>
- Yunna, C., Mengru, H., Lei, W., & Weidong, C. (2020). Macrophage M1/M2 polarization. *European Journal of Pharmacology*, 877, 173090.
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173090>
- Zepeda, R., Kuzmicic, J., Parra, V., Troncoso, R., Pennanen, C., Riquelme, J. A., ... & Lavandero, S. (2014). Drp1 loss-of-function reduces cardiomyocyte oxygen dependence protecting the heart from ischemia-reperfusion injury. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 63(6), 477-487.
<https://doi.org/10.1097/fjc.0000000000000071>

- Zhang, M., He, Y., Sun, X., Li, Q., Wang, W., Zhao, A., & Di, W. (2014). A high M1/M2 ratio of tumor-associated macrophages is associated with extended survival in ovarian cancer patients. *Journal of Ovarian Research*, 7, 1-16.
<https://doi.org/10.1186/1757-2215-7-19>
- Zhang, Y., Wu, Y., Zhang, M., Li, Z., Liu, B., Liu, H., ... & Li, X. (2023). Synergistic mechanism between the endoplasmic reticulum and mitochondria and their crosstalk with other organelles. *Cell Death Discovery*, 9(1), 51
<https://doi.org/10.1038/s41420-023-01353-w>
- Zhang, Y., Ye, F., Fu, X., Li, S., Wang, L., Chen, Y., ... & Li, P. (2024). Mitochondrial regulation of macrophages in innate immunity and diverse roles of macrophages during cochlear inflammation. *Neuroscience Bulletin*, 40(2), 255-267.
<https://doi.org/10.1007/s12264-023-01085-y>
- Zhao, S., Mi, Y., Guan, B., Zheng, B., Wei, P., Gu, Y., ... & Li, D. (2020). Tumor-derived exosomal miR-934 induces macrophage M2 polarization to promote liver metastasis of colorectal cancer. *Journal of Hematology & Oncology*, 13, 1-19.
<https://doi.org/10.1186/s13045-020-00991-2>
- Zhou, Q., Xian, M., Xiang, S., Xiang, D., Shao, X., Wang, J., ... & He, Q. (2017). All-trans retinoic acid prevents osteosarcoma metastasis by inhibiting M2 polarization of tumor-associated macrophages. *Cancer Immunology Research*, 5(7), 547-559.
<https://doi.org/10.1158/2326-6066.cir-16-0259>
- Zhou, R., Yazdi, A. S., Menu, P., & Tschopp, J. (2011). A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature*, 469(7329), 221-225.
<https://doi.org/10.1038/nature09663>
- Zhou, S. L., Zhou, Z. J., Hu, Z. Q., Huang, X. W., Wang, Z., Chen, E. B., ... & Zhou, J. (2016). Tumor-associated neutrophils recruit macrophages and

T-regulatory cells to promote progression of hepatocellular carcinoma and resistance to sorafenib. *Gastroenterology*, 150(7),1646-1658.

<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.02.040>

Zhu, M., Huang, Y., Bender, M. E., Girard, L., Kollipara, R., Eglenen-Polat, B., ... & Akbay, E. A. (2021). Evasion of innate immunity contributes to small cell lung cancer progression and metastasis. *Cancer Research*, 81(7), 1813-1826.

<https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-20-2808>

Zhu, X., Shen, H., Yin, X., Yang, M., Wei, H., Chen, Q., ... & Li, Y. (2019). Macrophages derived exosomes deliver miR-223 to epithelial ovarian cancer cells to elicit a chemoresistant phenotype. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 38, 1-14. <https://doi.org/10.1186/s13046-019-1095-1>

EKLER

EK-1. Etik Bildirim ve İntihal Beyan Formu



SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Graduate School of Health Sciences

ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU¹

Öğrencinin Adı ve Soyadı	Baraa MEHYO
Öğrencinin Numarası	
Ana Bilim Dalı	Histoloji ve Embriyoloji
Öğrencinin Kayıtlı Olduğu Program Türü	Yüksek Lisans

Yukarıda bilgileri verilen tezin intihal tespit yazılımıyla (Turnitin) yapılan tarama sonucunda elde edilen benzerlik oranları aşağıdaki gibidir. Beyan edilen bilgilerin doğru olduğunu, aksi hâlde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ve beyan ederiz.

Bölümler	Benzerlik Oranı	Maksimum Benzerlik Oranları
I. Giriş	% 0	% 15
II. Genel Bilgiler	% 3	% 35
III. Materyal ve Metod	%11	% 35
IV. Bulgular	%5	% 15
V. Tartışma	%0	% 20

Not: Yedi kelimeye kadar benzerlikler ile Başlık, Kaynakça, İçindekiler, Teşekkür, Dizin ve Ekler kısımları tarama dışı bırakılabilir. Yukarıdaki azami benzerlik oranları yanında tek bir kaynaktan olan benzerlik oranlarının %5'den büyük olmaması gerekir.

EK-2. Etik Kurul Onay Formu



**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ TIP
FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR
ETİK KURULU**



Bölümü : Dekanlık
Servisi : Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
Sayı : B.30.2.ATA.0.01.00/332
Konu : Etik Kurul Kararı

02.05.2023

Sayın Doç. Dr. Osman Nuri KELEŞ
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
Öğretim Üyesi

Değerlendirilmek üzere Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'na başvuruda bulunduğunuz
"Mitokondriyal Dinamiklerdeki Değişimlerin Kansere İndüklü M2 Makrofaj
Polarizasyonundaki Etkisi" isimli bilimsel tez çalışmasına ait Kurul Kararı ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.



**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ TIP
FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR
ETİK KURULU**



KARAR

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	AÇIK ADRESİ:	Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı
	TELEFON	
	FAKS	
	E-POSTA	
SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI		
ARAŞTIRMACININ AÇIK ADI		Mitokondriyal Dinamiklerdeki Değişimlerin Kansere İndüklü M2 Makrofaj Polarizasyonundaki Etkisi
KARAR BİLGİLERİ	Toplantı Sayısı:3 Karar No:68	Tarih:02.05.2023
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve çalışmanın bütçesinin BAP tarafından karşılanması koşulu ile yapılmasında bilimsel ve etik açıdan sakınca olmadığına oy birliği ile karar verildi.	
	Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik kapsamında yer alan araştırmalar/çalışmalar için Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'ndan izin alınması gerekmektedir. Araştırmacıya çalışmalarında başarılar dileriz.	