

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FARKLI MEME KANSERİ HÜCRE HATLARINDAN ELDE
EDİLEN EKSOZOMLARIN MEZENKİMAL VE STROMAL
HÜCRELER ÜZERİNE ETKİSİ**

Cansu SUBAŞI

Kocaeli Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin
Kök Hücre ve Doku Yenilenmesi Programı için Öngördüğü
BİLİM UZMANLIĞI (YÜKSEK LİSANS) TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır.

KOCAELİ

2014

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FARKLI MEME KANSERİ HÜCRE HATLARINDAN ELDE
EDİLEN EKSOZOMLARIN MEZENKİMAL VE STROMAL
HÜCRELER ÜZERİNE ETKİSİ**

Cansu SUBAŞI

Kocaeli Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin
Kök Hücre ve Doku Yenilenmesi Programı için Öngördüğü
BİLİM UZMANLIĞI (YÜKSEK LİSANS) TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır.

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Gökhan DURUKSU

KOCAELİ

2014

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ




(Tez Onay Sayfası)

Tez adı: **Farklı Meme Kanseri Hücre Hatlarından Elde Edilen Eksozomların Mezenkimal ve Stromal Hücreler Üzerine Etkisi**

Tez yazarı: **Cansu SUBAŞI**
Tez savunma tarihi: **02.07.2014**

Tez Danışmanı: **Yrd. Doç. Dr. Gökhan DURUKSU**

*İş bu çalışma Jürimiz tarafından **Kök Hücre** Anabilim Dalı **Yüksek Lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.*

Tez Savunma Sınavı jüri üyeleri		İmzası
Ünvanı Adı Soyadı		
Üye	Prof. Dr. Erdal KARAÖZ	
Üye	Prof. Dr. Engin ULLUKAYA	
Üye	Yard. Doç. Dr. Gökhan DURUKSU	

ONAY

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

...../...../20

Prof. Dr. Tuncay Çolak
Enstitü Müdürü

ÖZET

Farklı Meme Kanseri Hücre Hatlarından Elde Edilen Eksozomların Mezenkimal ve Stromal Hücreler Üzerine Etkisi

Kanser hücrelerinin büyüme ve çoğalma özellikleri vücut hücreleri ile karşılaştırıldığında farklı karakterler göstermektedirler. Bu hücrelerin kolayca çoğalabilmesi ve tümörü oluşturup vücudun diğer doku ve organlarına göç edebilmesi çeşitli faktörler aracılığıyla gerçekleşmektedir. Bu süreçte, hücreler arası iletişimde ve proteinler ile diğer moleküllerin hücreler arasında taşınmasında rol oynayan plazma membran parçaları olan eksozomların rol aldıkları düşünülmektedir.

Bu çalışmada farklı meme kanser hücrelerinden elde edilen eksozomların stromal hücreler ve kemik iliği mezenkimal kök hücreler (Kİ-MKH) üzerine olan etkilerinin gözlemlenmesi amaçlanmıştır. Bu hedefe yönelik; meme kanseri hücre dizilerinden MCF-7 ve MDA-MB-231 Kİ-MKH ile malign ve sağlıklı meme dokusundan izole edilen stromal hücreler (MMSH ve SMSH) kullanılmıştır. Kİ-MKH ve stromal hücreler beş hücrenin eksozomları ile ortak mikroçevrede büyütülmüştür. Hücrelerin çoğalma özelliği WST-1 yöntemi ve Gerçek-Zamanlı hücre izleme cihazı ile incelenmiştir. Epitel hücre karakterini belirleyebilmek için hücrelere E-cadherin ile immün boyama yapılmış, E-cadherin, COX2, ERBB2 ve CK8 gen ifadeleri için Real Time PCR analizi yapılmıştır.

MCF-7, MDA-MB231 ve MMSH kaynaklı eksozomlar ile ortak kültüre edilen SMSH sayılarında kontrollere oranla belirgin artış saptanmıştır. Bu hücre çoğalma düzeyi MMSH kaynaklı eksozomlar ile ortak kültüre edilen hücrelerde belirgin olarak daha fazla artmıştır. Bir kanserleşme belirteci olan mezenkimden epitele dönüşümü saptamak amacıyla gerçekleştirdiğimiz E-cadherin ile immün boyama örneklerinde pozitif reaksiyonlar tespit edilmiştir. Buna karşın, Kİ-MKH'lerin aynı eksozomlar ile ortak kültür sonrasında çoğalmadıkları tespit edilmiştir. İmmün boyamalarda da belirgin bir reaksiyon gözlemlenmemiştir.

Sonuç olarak, MMSH kaynaklı eksozomların SMSH'leri üzerinde hücre çoğalmı ve epitele dönüşüm potansiyelinde arttırıcı etkileri tümör çevre dokularının en az primer kanser odağı kadar kanserleşme ve invazyonda rolü olabileceğini düşündürmüştür. Ayrıca, primer kanser hücrelerinin de salgıladıkları eksozomlar aracılığıyla SMSH'ler üzerinde kanserleştirme yönünde etkileri nedeniyle tümör çevre dokularının primer kanser hücrelerinden etkilendiği anlaşılmaktadır. Kanser tedavisinde primer odağın yanında çevre dokularında hedefler arasına alınması düşünülmelidir.

Anahtar Kelimeler: Eksozom, meme kanseri, mikroçevre, farklılaşma potansiyeli.

ABSTRACT

The Effect of Exosomes Derived From Different Breast Cancer Cell Lines on Mesenchymal Stem Cells and Stromal Cells

Cancer cells has the capacity for unlimited proliferation, tumor formation and migration into tissues and organs under the influence of a variety of factors compared to the stromal cells. In the sustaining of these processes requiring both the intra-cellular communication and transport of cellular proteins and small molecules, the particles of plasma membrane (exosomes) are considered to play a crucial role.

In this study, we aimed to observe the effects of different exosomes obtained from breast cancer cell lines on bone marrow mesenchymal stem cells (BM-MSCs) and stromal cells. For this purpose, breast cancer cell lines (MCF-7 and MDA-MB-231), human BM-MSCs and stromal cells isolated from both malignant and healthy breast tissue (MBSC and HBSC) were cultured. BM-MSCs and stromal cells were incubated separately in the microenvironment supplemented with exosomes of five cells mentioned above. After then, the proliferation of cells were determined and monitored. Cells were stained with E-cadherin which is used to determine the transformation from mesenchyme to epithelia, after incubation with exosomes.

The number of HBSCs significantly increased after the co-culture with exosomes compared to controls. This effect on cell proliferation was estimated more significantly in MBSC exosomes co-cultured cells. E-cadherin, was detected by immunostaining in this HBSCs' samples with positive reactions. On the other hand, BM-MSCs showed also an increased proliferation rate and E-cadherin staining with lesser extent.

The exosomes of MBSC had the most significant effect on HBSCs. It can be concluded that the transformation potential of these malign cells had the remarkable impact on the tumor developement by promoting mesenchyme-epithelial transition. This event was shown to be derived partially by the exosomes secreted from the malign cells, and all the secreted components of the malign cells has the potential to affect their microenvironment directing to cancer-like processes. According to these data, the components in the tumor microenvironment, should be also focused in the treatment of cancer as well as the primary cells.

Keywords: Exosome , breast cancer, mikroenvironment, differantiation potential.

TEŞEKKÜR

Çalışma konumu belirleyerek bana yeni ufuklar açan, beni her zaman destekleyen ve yardımlarını esirgemeyen, her türlü bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan bölüm başkanım sayın hocam, **Prof. Dr. Erdal KARAÖZ**'e; çalışmam süresince tez danışmanlığımı üstlenen, bilgi ve deneyimlerini benden esirgemeyen hocam **Yrd. Doç. Dr. Gökhan DURUKSU**'ya;

Eğitim sürem boyunca gerek bilimsel gerek manevi anlamda büyük desteğini ve yardımlarını gördüğüm hocam, **Yard. Doç. Dr. Ayla EKER SARIBOYACI**'ya; hiçbir zaman yardımlarını esirgemeyen hocam **Yard. Doç. Dr. Gülçin GACAR**'a teşekkürlerimi sunarım.

Tüm bilgilerini içtenlikle paylaşan, beni her zaman destekleyen çalışma arkadaşlarım ve ablalarım **Uzm. Tıbbi Biyolog Zehra Seda HALBUTOĞULLARI**'na, **Uzm. Biyolog Özlem SAĞLAM**'a ve **Biyolog Gülay ERMAN**'a; yüksek lisans eğitimim boyunca gördüğüm yardımlarını, arkadaşlıklarını ve dostluklarını hiç unutmayacağım **Araş. Gör. Çiğdem İNCİ**'ye ve **Araş. Gör. Ayşegül BAĞLAR**'a teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmamda ve sosyal anlamda sonsuz desteklerini her zaman hissettiğim, tecrübe ve sıcaklıklarıyla her zaman yanımda olan ağabeyim **Tıbbi Lab. Tek. Alparslan OKCU**' ya, hayatım boyunca gerek bilimsel olarak gerekse sıcacık dostluklarıyla her anımda yanımda olan ve olacaklarımdan kuşku bile duymadığım dostlarım **Dr. Ayça AKSOY**' a, **Uzm. Biyolog Gizem TURAÇ**'a ve **Uzm. Biyolog İrem YILMAZ**' a; tüm kalbimle sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Maddi ve manevi desteklerini benden hiç eksik etmeyen büyük özveri ve sabırla bugünlere gelmemi sağlayan canım annem **Serpil SUBAŞI**'ya ve canım babam **Kenan SUBAŞI**'ya sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xiv
1.GİRİŞ ve AMAÇ.....	1
2.GENEL BİLGİLER.....	4
2.1 Kanser Nedir?.....	4
2.1.1 Kanserin Nedenleri?	5
2.1.2 Kanserin Ön Belirtileri	5
2.1.3 Kanserde Erken Tanının Önemi.....	5
2.2 Meme Kanseri.....	6
2.2.1 Risk Faktörleri	7
2.2.2 Meme Kanseri Tipleri	8
2.2.3 Meme Kanserinde Evreleme.....	10
2.2.4 Meme Kanseri Hücre Dizileri (MDA-MB-231, MCF-7).....	11
2.3 Kök Hücreler	12
2.3.1 Kök Hücre Tipleri	14
2.4 Eksozomlar	17
2.4.1 Eksozomlar aracılığıyla hücre-hücre etkileşimi.....	17
2.4.2 Kanser gelişiminde eksozomların etkisi.....	18
2.5 Mikroçevre	19
2.5.1 Mikroçevre bileşenleri.....	19
2.5.2 Tümör mikroçevresi	21

2.5.3	Meme tümör mikroçevresi.....	22
2.5.4	Kök hücre mikroçevresi	22
3.	GEREÇ VE YÖNTEM.....	25
3.1	Mezenkimal kök hücre ve stromal hücrelerin hazırlanışı	25
3.1.1	Sağlıklı ve malign meme dokusu stromal hücrelerinin (SMSH ve MMSH'lerinin) izolasyonu ve kültüre hazırlanması.....	25
3.1.2	Kemik İliği Kökenli Mezenkimal kök hücrelerin (Kİ-MKH) izolasyonu ve kültüre hazırlanması	26
3.1.3	SMSH, MMSH- ve Kİ-MKH'lerin Karakterizasyonu	26
3.2	Akım sitometrik Analiz.....	26
3.3	MCF-7 ve MDA-231 Meme kanseri hücrelerinin kültürü	27
3.4	Eksozomların izolasyonu	27
3.4.1	Eksozomların karakterizasyonu	27
3.5	İmmunohistokimyasal çalışmalar	28
3.6	İmmunofloresan çalışmalar	28
3.7	Örneklerde E-cadherin ekspresyonu	28
3.8	Gen ekspresyon çalışmaları (Real Time PCR).....	29
3.9	Eksozomlarla birlikte ortak kültür	30
3.9.1	WST-1 Proliferasyon Testi.....	30
3.10	İstatistiksel analiz.....	31
4.	BULGULAR.....	31
4.1	Kİ-MKH'ların kültürü.....	31
4.1.1	Kİ-MKH'ların karakterizasyonu.....	32
4.2	Stromal hücrelerin kültürü.....	33
4.2.1	Sağlıklı meme stromal hücrelerinin (SMSH) kültürü	33
4.2.2	SMSH'lerin karakterizasyonu.....	34
4.2.3	Malign meme stromal hücrelerinin (MMSH) kültürü.....	37
4.2.4	MMSH'lerin karakterizasyonu	38
4.3	MCF7 ve MDA-MB-231 insan meme kanseri hücre dizilerinin kültürü.....	41
4.4	Hücrelerin serumsuz medyuma alınması	42
4.5	Eksozomların karakterizasyonu.....	44
4.6	Eksozomlarla ortak kültür	44
4.6.1	Ortak kültür öncesi ve sonrası hücrelerde E-cadherin ekspresyonu	48
4.6.2	Ortak kültür sonrasında WST-1 Proliferasyon Testi.....	51

4.6.3 Ortak kültür sırasında Gerçek-Zamanlı hücre izleme	52
4.6.4 Ortak Kültür Sonrası Real time PCR analizi	53
5.TARTIŞMA.....	58
6.SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	65
Kaynaklar Dizini.....	67
Özgeçmiş.....	70

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
ALDH	: Aldehyde dehydrogenase
ATP	: Adenozin 3'-trifosfat
BAL	: Bronkoalveoler lavaj
BMPs	: Bone morphogenetic proteins
BRCA1	: Breast cancer 1, early onset
BRCA2	: Breast cancer 2, early onset
CAFs	:Kanserle ilişkili fibroblastlar
CK8	: Sitokeratin-8
Cm	: Santimetre
CO ₂	: Karbondioksit
COX1	: Siklooksijenaz-1
COX2	: Siklooksijenaz-2
Dak	: Dakika
DC	: Dendritik hücreler
D-MEM	: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
ECM	: Ekstraselüler matriks
EGF	:Epidermal GroWth Factor
EKH	: Embriyonik Kök Hücre
EMT	: Epitelyum mezenkim geçişi
ER	: Estrogen receptor
FBS	: Fetal Sığır Serumumu
FN	:Fibronektin
HBSS	: Hank's Buffered Salt Solution
HER	: Human epidermal growth factor receptor
HER2	: Receptor tyrosine-protein kinase erbB-2
İSDK	: İn situ duktal kanserler
Kİ-MKH	:Kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücre
KKH	: Kanser kök hücresi
L	: litre
LIF	: Lösemi engelleyici faktör
MCF-7	:Michigan Cancer Foundation-7
MET	: Mezenkimal-epitel geçişi
MKH	: Mezenkimal Kök Hücre
MKH	:Mezenkimal kök hücre
ml	: mililitre
Mm	: milimetre
mM	: milimolar
MMSH	:Malign meme dokusu stromal hücreleri
MVBs	: Multiveziküler cisim
NFkB	: Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
Nm	:Nanometre
PBS	: Fosfat tamponu

PR	: Progesterone receptor
RT	: Radyoterapi
SMSH	: Sağlıklı meme dokusu stromal hücreleri
TGFb	: Transforming growth factor-b
TUİK	: Türk İstatistik Kurumu
Wnt	: Wingless
Mm	: Mikrometre

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1: Pasaj 2 ve pasaj 3 ‘teki Kİ-MKH’ların zıt faz mikroskobunda morfolojik görüntüleri.....	32
Şekil 4.2: Kİ-MKH’lerin akım sitometri yöntemi ile karakterizasyonu	33
Şekil 4.3: Pasaj 2 ve pasaj 3 ‘teki SMSH’lerin zıt faz mikroskobunda morfolojik görüntüleri	34
Şekil 4.4: SMSH’lerin akım sitometri yöntemi ile karakterizasyonu	35
Şekil 4.5: SMSH’lerin immunohistokimyasal yöntemle karakterizasyonu	36
Şekil 4.6: SMSH’lerin immünofloresan yöntemle karakterizasyonu	37
Şekil 4.7: Pasaj 2 ve pasaj 3 ‘teki MMSH’lerinin (A,B) zıt faz mikroskobundaki morfolojik görüntüleri.....	38
Şekil 4.8: MMSH’lerin akım sitometri yöntemiyle karakterizasyonu	39
Şekil 4.9: MMSH’lerin immunohistokimyasal yöntemle karakterizasyonu	40
Şekil 4.10: MMSH’lerin immünofloresan yöntemle karakterizasyonu	41
Şekil 4.11: MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin zıt faz mikroskobundaki morfolojik görüntüleri.....	42
Şekil 4.12: Bir gece serumsuz besiyerinde bekleyen hücrelerin zıt faz mikroskobundaki morfolojik görüntüleri	43
Şekil 4.13: Elde edilen eksozomlarda akım sitometri yöntemiyle CD63 ekspresyonu	44
Şekil 4.14: Eksozomlarla ortak kültür sonrası 1.günde Kİ-MKH’ların zıt faz mikroskobundaki morfolojik görüntüleri	45
Şekil 4.15: Eksozomlarla ortak kültür sonrası 2.günde Kİ-MKH’ların zıt faz mikroskobundaki morfolojik görüntüleri	46
Şekil 4.16: Eksozomlarla ortak kültür sonrası 1.günde SMSH’lerinin zıt faz mikroskobundaki morfolojik görüntüleri	47
Şekil 4.17: Eksozomlarla ortak kültür sonrası 2.günde SMSH’lerinin zıt faz mikroskobundaki morfolojik görüntüleri	48
Şekil 4.18: Hücrelerde ortak kültür yapılmadan önce E-cadherin ekspresyon düzeylerinin immunofloresan yöntemle gösterimi	49
Şekil 4.19: Kİ-MKH’lerinde eksozomlarla ortak kültür sonrası 2.günde E-cadherin ekspresyon düzeylerinin immunofloresan yöntemle gösterimi	50
Şekil 4.20: SMSH’lerinde eksozomlarla ortak kültür sonrası 2.günde E-cadherin ekspresyon düzeylerinin immunofloresan yöntemle gösterimi.....	51
Şekil 4.21: Eksozomlarla ortak kültür sonrası eksozomlar uzaklaştırıldıktan sonra hücrelerdeki çoğalma hızının WST-1 yöntemiyle gösterilmesi.....	52
Şekil 4.22: Eksozomlarla ortak kültür sonrası Gerçek-Zamanlı hücre izleme cihazı ile proliferasyonun gösterilmesi.....	53
Şekil 4.23: SMSH ve Kİ-MKH’leri ile eksozomların ortak kültürü sonucu Real Time PCR analizi ile CK8 gen ekspresyon grafiği.....	54
Şekil 4.24: SMSH ve Kİ-MKH’leri ile eksozomların ortak kültürü sonucu Real Time PCR analizi ile E-Cadherin gen ekspresyon grafiği	55

Şekil 4.25: SMSH ve Kİ-MKH'leri ile eksozomların ortak kültürü sonucu Real Time PCR analizi ile COX2 gen ekspresyon grafiği.....	56
Şekil 4.26: SMSH ve Kİ-MKH'leri ile eksozomların ortak kültürü sonucu Real Time PCR analizi ile ErbB2 gen ekspresyon grafiği.....	57

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1: MDA-MB-231 ve MCF-7 meme kanseri hücre dizilerinin karakteristik özellikleri.....	12
Çizelge 3.1: Real Time PCR analizi ile ifadesi belirlenen genlerin dizileri.....	30

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Kanser, başlıca ölüm nedenlerinden biri olarak kalmayıp kişinin hayat kalitesini de düşüren, işgücü kaybına uğratan bir hastalıktır. Bunlara ek olarak teşhis ve tedavi maliyeti en yüksek hastalıklardan biridir. Halen tüm mekanizmaları anlaşılmamış olan kanser hastalığının aydınlatılması ve her evrede tedavisinin mümkün hale gelebilmesi için bilimsel çalışmalar yoğun bir şekilde devam etmektedir. Kanser, vücudumuzun tüm doku ve organlarında gelişebilir. Türkiye'de Sağlık Bakanlığı'nın verilerine göre en sık görülen kanser türleri; erkeklerde akciğer, mide, lenfoma, gırtlak, lösemi ve deri, kadınlarda da rahim, mide, akciğer, lösemi, lenfoma ve meme kanseridir.

Tüm kanser türlerine bağlı ölümler arasında, akciğer kanserinden sonra meme kanserine bağlı ölümler, ikinci sırada yer almaktadır. Türk İstatistik Kurumu (TUİK) 2007 verilerine göre, 70 milyonu aşan ülkemizde, 100 bin kadından 22'si meme kanserine yakalanmaktadır. Meme kanserinden ölüm oranı 100 bin kadında yaklaşık 10 kişi olarak belirtilmektedir (<http://www.tuik.gov.tr>).

Meme kanseri kadınlarda en sık görülen kanser türüdür ve kansere bağlı ölümlerde ise akciğer kanserinden sonra ikinci sıradadır. Meme kanserinden ölüm oranlarının en yüksek olduğu ülkeler Kuzey Avrupa'da bulunmaktadır (100 binde 22,6). Çin ve Japon kadınlarının meme kanserinden ölüm oranları, Kuzey Avrupalı kadınların tam aksine, en düşük seviyededir. Bu oran Çin'de 100 binde 5,6 iken Japonya'da 8,3'dür. ABD'de tüm yaşamı boyunca her 8 kadından biri, meme kanserine yakalanmaktadır. 2008 yılında ABD'de 182 binden fazla kadına meme kanseri teşhisi konulmuş olup 40 bin civarı kadın da meme kanseri nedeniyle hayatını kaybetmiştir.

Yakın zamana kadar yapılan araştırmalarda, kanser hücrelerinin kendisi üzerine odaklanılmış ve kanser hücrelerini yok etmek amacıyla değişik çalışmalar yapılmıştır. Artık bilinmektedir ki sadece kanser hücrelerinin kendisiyle ilgilenmek kanserden kurtulmaya yetmemektedir. Kanser hücrelerinin buldukları mikroçevredeki diğer hücrelerden beslendiği ve bu hücrelere de etki ettiği son yapılan çalışmalarla gösterilmiştir.

Tümör ve mikroçevresi içerisinde henüz kansere dönüşmemiş normal epitel hücreleri, endotel hücreleri, immün sistem hücreleri, stromal hücreler, mezenkimal kök

hücreler, kanser kök hücreleri, fibroblastlar, hücreleri bir arada tutmayı sağlayan ekstraselüler matriks elemanları ve çok sayıda farklı moleküller bulunmaktadır.

Tümör mikroçevresinde bulunan kanserleşmemiş hücreler, zamanla aynı mikroçevrede bulunmalarından dolayı kanserli hücrelerin salgılarından etkilenerek kanser hücresine benzer özellikler kazanabilirler. Tümör mikroçevresi içerisinde bulunan hücre tiplerinden biri de mezenkimal kök hücrelerdir (MKH). Bu hücreler tümörün büyümesine olanak sağlayacağı gibi tümörü baskılayıcı özellik de gösterebilirler (Clarke ve Fuller, 2006).

Kök hücreler, vücudumuzdaki farklı özelleşmiş hücrelere dönüşebilme kapasitesine sahip, kendini yenileyebilen ve sınırsız çoğalma kapasitesi bulunan öncül hücrelerdir (Hayes, 2006). Dokularda bulunan kök hücre tipi ise erişkin kök hücre diye adlandırdığımız mezenkimal kök hücrelerdir. MKH'lerin, özellikle rejeneratif tıp uygulamaları için en çok ilgi çeken özelliği, bu hücrelerin uygun mikroçevre koşullarında, başta bağlayıcı doku olmak üzere çok çeşitli hücre tiplerine farklılaşabilme potansiyeli varlığının gösterilmiş olmasıdır. Kök hücreler, özelleşmiş hücrelere kaynaklık edebilirler. Bu olaya, farklılaşma (differentiation) denir. Aynı zamanda kök hücrelerin kanser hücreleriyle savaşmak için çeşitli sitokin ve kemokinleri salgıladıkları yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Clarke ve Fuller, 2006). Kök hücrelerin tümör büyümesini baskıladığı yapılan bazı çalışmalarla gösterilmiş olsa da kök hücrelerin tümör büyümesini çeşitli faktörler salgılayarak teşvik edebileceği de gösterilmiştir (Clarke ve Fuller 2006). Tümör mikroçevresi içerisindeki stromal hücreler diğer mikroçevre elemanları gibi tümör gelişimi esnasında kanser hücrelerinden etkilenebilir ve kanserin büyüüp yayılmasına (metastaz) olanak sağlayabilir.

Hücreler mikroçevreyi birçok yolla etkilemektedir ve eksozomlar bu olgudaki aracı etkenlerden bir tanesidir. Eksozomlar birçok hücre tarafından salgılanan hücre dışı ortamın bir alt fraksiyonu olan keseciklerdir (mikrokesecek). Eksozomlar hücreler arası iletişimde önemli bir rol oynarlar ve mRNA, miRNA ve proteinleri taşıyabilme özellikleri vardır (Valadi et al, 2007). Eksozomların hücreler arası iletişimde aracılık ettikleri, fonksiyonel genetik bilgi alışverişinde rol aldıkları, hücre dışı ve hücre içi streste koruyucu görev yaptıkları bilinmektedir ve biyolojik fonksiyonlarının araştırılması devam etmektedir (van der Pol et al, 2012).

Tümör hücreleri tarafından salgılanan eksozomların invazyonda etkili olduğu yapılan çalışmalarla hem in vitro hem de in vivo çalışmalarla gösterilmiştir (Ginestra et al, 1998;1999). Salgılanan eksozomlar aracılığıyla kanser hücrelerinin genetik bilgilerini ya da

kendilerine özgü faktörleri, mikroçevre veya diğer dokularda bulunan hücelere aktardıkları düşünölmektedir. Eksozomlar sayesinde kanser hücelerinin hücre-hücre etkileşimi olmaksızın farklı hüceleri etkileyerek hücelerin kanserleşmesini ve tümörün gelişerek büyümesini sağlayabilecekleri düşünölmektedir.

Çalışmamızda tümör mikroçevresi elemanlarından olan stromal ve kök hücelerin, kanserli hücelerin salgıladıkları eksozomlardan hücre-hücre etkileşimi olmaksızın nasıl etkileneceğini ortak kültürlerle gösterilmesi amaçlanmıştır. Kanserin yayılmasında, kanser hücelerinin göç etmeden eksozomlar aracılığıyla diğer doku ve organları etkileme potansiyeli incelenmiştir. Ayrıca tümör mikroçevresinin kanserli hücelerden ne derece etkilenebileceği araştırılmıştır. Ek olarak kök hücelerin bu salgılara karşı tepkisine odaklanılmıştır.

Kanserin mikroçevresiyle olan iletişiminin anlaşılması kanser hücesini tanımak ve onunla baş edebilmek için önemli bir basamak olacaktır. Mikroçevredeki hüceler arası madde alışverişinin anlaşılması ile tümör içerisindeki kanser hücelerinin mikroçevredeki davranışının bilinmesi bu hücelere karşı yapılacak tedaviyi yönlendirecektir. Gelecekteki kanser tedavi yöntemlerine ışık tutacak ve ortamdaki diğer hücre, doku ve organlara zarar vermeden kanserli hücreden kurtulmak mümkün olabilecektir. Kök hücelelerle veya hücesel tedavi yerine bu hücelerin salgıladıkları eksozomlarla yeni bir tedavi yöntemi geliştirilebilir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Kanser Nedir?

Kanser belirli bir doku veya organdaki hasarlı hücrelerin kontrolsüz bir biçimde üreyerek bir kitle veya tümör oluşturmasıdır. Kanser, vücudumuzda bir hücrenin günün birinde hiçbir kontrol dinlemeden büyüüp çoğalması sonucunda ortaya çıkan bir hastalıktır. Vücudumuz çeşitli organlardan oluşmaktadır ve her organ milyonlarca hücreden meydana gelmektedir. Zaman içinde bu hücreler büyüüp bölünerek o organı yenilemektedirler. Bir hücrenin ne zaman büyüüp bölünmesi gerektiğini hücre çekirdeğinde bulunan genler tayin etmektedir. Bölünmeyi sağlayan genler fazla çalışmaya veya bölünmeyi durduran genler çalışmama başlarsa, hücre durmadan bölünmeyi sürdürmekte ve ortaya bir kitle çıkarmaktadır. Bu kanserli hücreler o organa ait görevlerini yerine getirmedikleri gibi, çevre hücrelerin üstüne baskı yapıp onların ihtiyacı olan maddeleri çalmaya başlamakta ve lenf dolaşımına katılarak bezelere sıçrayarak veya kan dolaşımına katılarak karaciğer, akciğer, kemik gibi diğer organlara gitmektedirler. Kanserin bu şekilde vücudun diğer bölgelerine yayılması olayına **metastaz** adı verilmektedir. Kanserin insanın ölümüne yol açması bu hücrelerin, organların görevini sürdürmesine mani olması ile gerçekleşmektedir.

Kanser, hücrelerde DNA'nın hasarı sonucu hücrelerin kontrolsüz veya anormal bir şekilde büyümesi ve çoğalmasıdır. Günde vücudumuzda (DNA'da) yaklaşık 10.000 mutasyon olmasına rağmen immün sistemimiz her milisaniye vücudumuzu taramakta ve kanserli hücreleri yok etmektedir.

Sağlıklı vücut hücreleri bölünebilme yeteneğine sahiptirler ve ölen hücrelerin yenilenmesi ve yaralanan dokuların onarılması amacıyla bu yeteneklerini kullanmaktadırlar. Fakat bu yetenekleri de sınırlıdır, sonsuz bölünememektedirler. Her hücrenin hayatı boyunca belli bir bölünebilme sayısı vardır. Sağlıklı bir hücre ne zaman ve nerede bölünebileceğini bilme yeteneğine sahipken kanser hücreleri, bu bilinci kaybederek, kontrolsüz bölünmeye başlamakta ve çoğalmaktadırlar. Kanser hücreleri toplanarak **urları (tümörleri)** oluştururlar, tümörler normal dokuları sıkıştırabilirler, içine sızabilmekte ya da tahrip edebilmektedirler.

2.1.1 Kanserin Nedenleri?

- 1.Sigara alkol kullanımı,
- 2.Uzun süre güneş altında kalma,
- 3.Aşırı dozda röntgen ışınına maruz kalma,
- 4.Bazı kimyasal maddeler (katran, benzen, boya maddeleri, asbest, bazı kozmetikler ve deterjanlar)
- 5.Bazı virüsler,
- 6.Hava kirliliği,
- 7.Radyasyona maruz kalma,
- 8.Kötü beslenme alışkanlığı.

2.1.2 Kanserin Ön Belirtileri

- 1.Rahim veya makattan gelen anormal kanama veya akıntı,
- 2.Memede veya vücudun herhangi bir yerinde ortaya çıkan şişlik ve sertlikler,
- 3.İyileşmeyen yaralar,
- 4.Uzun süreli ses kısıklığı ve öksürük,
- 5.Büyük abdest ve idrar alışkanlıklarında değişiklikler,
- 6.Yutma güçlüğü ve hazımsızlık,
- 7.Ben ve siğillerde meydana gelen büyüme, kanama, renk değişikliği, yara olduğunda.

2.1.3 Kanserde Erken Tanının Önemi

- 1.Tedavi şansını artırır.
- 2.Tedaviyi kolaylaştırır.
- 3.Tedavi giderini azaltır.
- 4.Doku ve organ kaybını önler.
- 5.Sakatlık bırakmaz.

2.2 Meme Kanseri

Meme bezi, meme başı çevresinde yer alan 15-20 lobdan oluşur. Memede süt salgısını yapan hücreler tarafından oluşturulan lobül adı verilen birimler birleşerek lobları meydana getirirler. Lobüller birbirlerine süt kanalları ile bağlıdır ve süt kanalları meme basına doğru birleşirler.

Her memenin kan ve lenf damarları vardır. Lenf damarları lenf adı verilen renksiz, enfeksiyon ve hastalıklara karşı savaşmamızı sağlayan hücreler içeren bir sıvıyı taşırlar ve lenf bezlerine boşalırlar. Koltuk altında, köprücük kemiğinin etrafında ve boyunda pek çok lenf bezi bulunmaktadır.

Meme dokusu hormonların etkisi altında gelişir. Bu hormonların başlıcaları ise estrogen ve progesterondur. Salgılanan hormonların etkisi ile süt kanalları, lobüller büyür ve gelişir. Hormonların meme üzerindeki etkilerini göstermek için meme hücreleri üzerinde özel yerlere (reseptörlere) bağlanması gereklidir.

Lobülleri ya da süt kanallarını oluşturan hücrelerin kontrolsüz çoğalması ile gelişen meme kanseri süt kanallarından kaynaklanırsa **duktal karsinoma** adını alır. Lobüler kansere daha seyrek rastlanır ancak lobüler kanserin aynı anda iki memede de olma riski diğer meme kanseri tiplerine göre yüksektir.

Enflamatuvar kanser türünde ise meme sıcak, kırmızı ve hassastır. Bu kanser türünde kanser hücreleri lenf damarlarında tıkanıklığa neden olduğundan meme büyük ve ödemlidir, portakal kabuğuna benzer bir görünüm alabilir. Enflamatuvar kanser daha seyrek görülür fakat hızlı yayılır.

Meme kanseri öncelikle lenf damarları ile koltuk altındaki lenf bezlerine sıçrar. Kanserin meme dışında başka organlara sıçramasına **metastaz yapma** denir. Meme kanseri en çok kemik, akciğer ve karaciğere metastaz yapar (Prof Dr Serdar Turhal Onkoloji Uzmanı).

Meme kanserine hangi etkenlerin neden olduğu kesin olarak bilinmiyor. Ancak günümüze kadar yapılan çalışmalarda, yüksek olasılık gösteren bazı faktörler belirlenmiş bulunuyor. Bazı kadınlarda genetik yatkınlık oluşturan gen mutasyonları (genlerde kansere eğilim yaratan bozukluklar) meme kanseri riskini artırırken, diğerleri kadın olmak dışında bir risk faktörü taşıyor.

2.2.1 Risk Faktörleri

Cinsiyet:

Meme kanseri en sık kadınlarda görülüyor. Erkeklerde görülme oranı, yüzde 1'den daha az.

Yaş:

Meme kanseri çoğunlukla 50 yaş ve üzerinde görülüyor. 35 yaş ve altında rastlanma sıklığı daha az. 2000-2004 yılları arasındaki Amerikalı kadınlardaki meme kanseri insidansı 30-34 yaş grubunda 100 binde 25 iken, 45-49 yaş grubunda 100 binde 190'a ve 70-74 yaş grubunda ise 100 binde 455'e yükseliyor. Herediter (kalıtsal) meme kanseri veya genetik bozukluklar nedeniyle oluşmuş meme kanserleri genç yaşlardaki kadınlarda daha sık görülüyor.

Aile hikâyesi:

Özellikle anne tarafından 1. derece akrabasında (anne, teyze, anneanne, kızı) meme kanseri hikayesi olması önemli bir risk faktörü kabul ediliyor. Bu akrabaların meme kanserine menopoz öncesi yakalanmaları ve/veya çift taraflı meme kanseri olmaları, riski daha da artırıyor.

Östrojen hormonu:

Bir kadın ilk adetini ne kadar erken görürse (örneğin 12 yaştan önce) ve menopoza ne kadar geç girerse (örneğin 55 yaş), meme kanserine yakalanma riski o kadar artıyor. Doğum kontrol hapı kullanmanın da, çok düşük oranda olsa bile meme kanseri riskini artırdığı düşünülüyor.

Menopoz sonrası hormon tedavisi:

Menopoz dönemindeki, sıcak basması gibi sorunların önlenmesi amacıyla kadın hastalıkları ve doğum uzmanlarınca uzun süreli reçete edilen (5 yıl veya daha fazla süreyle) östrojen ve medroksiprogesteron asetat içeren kombine hormon ilaçları, meme kanseri riskini sadece östrojen içeren hormon ilaçlarına kıyasla daha çok artırıyor.

Geçirilmiş meme biyopsisi:

Meme biyopsilerinde saptanan orta dereceli hiperplaziler meme kanseri riskini 1,5-2 kat (hafif derecede), atipik duktal hiperplazi 3-5 kat (orta derecede) ve lobüler karsinoma in situ (yayılma göstermeyen) veya aile hikayesi ile beraber atipik duktal hiperplazi ya da lobüler hiperplazi varlığı riski 8-10 kat (yüksek derecede) artırıyor.

Meme kanseri hikayesi:

Bir kadının bir memesinde daha önce kanser gelişmiş olması, ileride diğer memesinde de kanser gelişmesi riskini yaklaşık 2 kat artırıyor.

Işınlanma (radyoterapi):

Çocukluk çağında başka kanserler nedeniyle (lenf kanseri vb.) göğüs ışınlaması geçirenlerde, meme kanseri görülme sıklığı artırıyor.

Beslenme ve çevre faktörleri:

Yağ bakımından zengin beslenme şekli ve kilo alma, özellikle menopozdaki kadınlarda meme kanseri riskini artırıyor. Alkol kullanımı (günde bir kadehten fazla) yine riski artırırken, sigaranın etkisi hala tartışılıyor. Düzenli egzersiz ve fiziksel aktiviteninse meme kanseri riskini azalttığı biliniyor.

Genetik bozukluklar:

Hereditör (kalıtsal) meme kanseri genleri (BRCA1 ve BRCA2) tüm meme kanserlerinin yüzde 5-10'unu oluşturuyor.

2.2.2 Meme Kanseri Tipleri

Meme kanserinin çeşitli tipleri var. Ancak temel olarak iki ana gruba ayrılıyor; birincisi, **noninvaziv** ya da başka bir deyişle in situ (yayılma göstermeyen) ve ikincisi **invaziv** (yayılma potansiyeli olan) grup.

2.2.2.1 Noninvaziv kanserler

Yayıma göstermeyen (in situ) kanserler de kendi arasında ‘**duktal karsinoma in situ**’ ve ‘**lobüler karsinoma in situ**’ olmak üzere iki gruba ayrılıyor.

Klasik lobüler karsinoma in situ: Her iki memede de 8-10 kat meme kanseri riskini artıran önemli bir bulgu. Bu tür hastalara yakın izlemin yanı sıra tamoksifen gibi koruyucu bazı ilaçlar verilebiliyor veya koruyucu amaçlı her iki meme dokusunu çıkartma (basit mastektomi) şeklinde cerrahi girişimler uygulanabiliyor. Beraberinde plastik cerrahi girişimlerle protez ve benzeri cerrahi rekonstrüktif işlemler eklenmesiyle beraber kozmetik açıdan yüz güldürücü sonuçlar elde edilebiliyor.

İn situ duktal kanserler (İSDK, intraduktal kanser): Çoğu kez muayenede kendini belli etmiyor. Belirtisi; mamografide tespit edilen düzensiz ufak boyutlu kireçlenme bulgusu ve/veya (pleomorfik mikrokalsifikasyon) kanlı/şeffaf tek kanaldan memebaşı akıntısı şeklinde oluyor. İSDK, normal hücrelerden yayılma potansiyeli olan (invaziv) kanser hücrelerine geçiş olarak kabul ediliyor. Kitle oluşturmadığı için, tel ile veya radyoaktif maddelerle işaretlenerek çıkarılıyor. Eğer kanser, tek odaklı bir durumda ise etrafında yeterli temiz doku bırakılıyor. Geri kalan meme dokusuna radyoterapi (RT) uygulandığı zaman hastalık, klinik olarak iyi bir seyir gösteriyor. Eğer memede yaygın olarak bulunuyorsa, tüm meme dokusunun çıkarılması (basit mastektomi) gerekiyor ve bu durumda yüzde 100'e varan oranla tam iyileşme görülüyor. Saf İSKD'de koltukaltı lenf bezlerinin tutulumuna nadir olarak yüzde 1-3 oranında rastlanıyor. Bu nedenle tüm memenin çıkarılacağı hastaların; daha kötü özellikler gösteren (yüksek gradlı vs.) bazı tiplerinde, koltukaltı lenf bezlerinde kanser hücrelerini tutması en muhtemel bekçi lenf bezlerini çıkarmak (sentinel lenf nodu biyopsisi) gerekebiliyor.

2.2.2.2 İnvaziv kanserler

Sütü meme başından dışarı taşıyan meme kanallarını döşeyen hücrelerde gelişen duktal karsinom en sık rastlanan meme kanseri tipi. Bu da yayılma özelliğine göre ayrılıyor: Duktal karsinomun yayılma özelliği yoksa in situ formda, yayılma potansiyeli varsa invaziv formda olduğu biliniyor.

Süt üreten bezlerden (lobül) gelişen kanser **lobüler karsinom** olarak adlandırılıyor. Lobüler karsinom da yayılma özelliğine göre ikiye ayrılıyor. Yayılma özelliği yoksa in situ formda yayılma potansiyeli varsa invaziv formda oluyor.

İnflamatuvar meme kanseri, meme kanserinin en kötü ve hızlı seyreden tipi olarak kabul ediliyor. Memeyi tamamen saran memenin iltihabi hastalıklarıyla karışabiliyor. Kitle belirtisi vermeden yaygın kızarıklık ve sertlikle seyrediyor. Antibiyotik tedavisine rağmen iyileşmeyen memenin iltihabi hastalıklarında mutlaka meme kanserinin akla getirilmesi ve biyopsi alınması gerekiyor.

2.2.3 Meme Kanserinde Evreleme

Evre 0 (karsinoma in situ):

Kanser hücreleri hem yayılma potansiyeli kazanmamış hem de tamamen memede sınırlı kalmıştır.

Evre I:

Kanser hücreleri yayılma potansiyeli kazanmıştır, ancak 2 cm.'den küçüktür ve tamamen memede sınırlı kalmıştır.

Evre IIA:

Memede tümör yoktur, ancak koltukaltı lenf bezlerine kanser yayılmıştır. Ya da a) Tümör 2 cm. veya daha küçük ve koltukaltı lenf bezlerine sızramış veya b) Tümör 2 cm'den büyük ama 5 cm'den küçük ve koltukaltı lenf bezlerine sızramamıştır.

Evre IIB:

Tümör 2 cm'den büyük ama 5 cm'den küçük ve koltukaltı lenf bezlerine sızramış veya tümör 5 cm'den büyük, ancak koltukaltı lenf bezlerine sızramamıştır.

Evre IIIA:

- a) Memede tümör yok veya
- b) Memedeki tümör 2 cm veya daha küçük veya
- c) Tümör 2 cm'den büyük ama 5 cm'den küçük veya

d) 5 cm'den büyüktür. Ek olarak, kanser ya birbirine yapışık olarak koltukaltı lenf bezlerini tutmuştur ya da göğüs kafesi kemiğine yakın lenf bezlerine yayılmış olabilir.

Evre IIIB:

Tümör her boyutta olabilir ve kanser göğüs duvarına ve/veya meme derisine yayılmış ve birbirine yapışık olarak koltukaltı lenf bezlerine sıçramış veya göğüs kafesi kemiği yakınındaki lenf bezlerine yayılmış olabilir.

Evre IIIC:

Memede kanser belirtisi olmayabilir veya tümör herhangi bir boyutta olabilir ve göğüs duvarına ve/veya meme derisine yayılmış olabilir. Ayrıca kanser, köprücük kemiği altı veya üstü lenf bezlerine veya koltukaltı lenf bezlerine ya da göğüs kafesi kemiği yakınındaki lenf bezlerine yayılmış olabilir.

Evre IIIC

Meme kanseri opere edilebilir ve edilemez evrelerde incelenmektedir. Opere edilebilir evrede, meme kanserinde 10 veya üzeri lenf nodu tutulumu mevcuttur. Tutulan lenf bezleri ya köprücük kemiği altındadır ya da koltukaltı ve göğüs kafesi kemiği yakınındaki lenf bezleridir.

Opere edilemez evrede, kanser köprücük kemiği üzeri lenf bezlerine sıçramıştır.

Evre IV:

Kanser hücreleri vücuttaki uzak organlara (kemik, karaciğer, akciğer, beyin) sıçramıştır.

Meme kanserinde de hastalığın hangi evrede olduğunun saptanması, uygulanacak tedavinin planlanmasında önemli rol oynuyor. Hastalığın evresinin belirlenmesiyle oluşturulan tedavi planı, başarı oranını artırıyor (<http://www.memesagligi.com/meme-kanseri/>).

2.2.4 Meme Kanseri Hücre Dizileri (MDA-MB-231, MCF-7)

MCF-7, 1970 yılında 69 yaşında Kafkasyalı bir kadından izole edilen meme kanseri hücre dizisidir. MCF-7 açılımı, Michigan Cancer Foundation-7, olan bu kanser hücre dizisi

1973 yılında Herbert Soule ve arkadaşları tarafından Detroit'teki enstitüde belirlenmiştir (Soule et al, 1973). Michigan Cancer Foundation, günümüzde Barbara Ann Karmanos Cancer Institute olarak bilinmektedir (<http://www.cancer.gov>).

MDA-MB-231, 51 yaşında Kafkasyalı bir kadından izole edilen meme kanseri hücre dizisidir. Plevral efüzyondan elde edilmiş metastatik hücrelerdir (Brinkley et al, 1980).

Çizelge 2.1: MDA-MB-231 ve MCF-7 meme kanseri hücre dizilerinin karakteristik özellikleri.

	ER	PR	HER2	Alt Tipi	Tümör Tipi	Kaynak
MDA-MB-231	-	-	-	Bazal B	Metastatik Adenokarsinom	Plüeral Efüzyon
MCF-7	+	+	-	Luminal	Metastatik Adenokarsinom	Plüeral Efüzyon

2.3 Kök Hücreler

Kök hücreler, henüz farklılaşmamış hücreler olup, kendi kendini yenileme yeteneğine sahiptirler, kaynaklandıkları dokuların özelleşmiş hücrelerine farklılaşabildikleri gibi özel biyolojik sinyallerle fenotipik olarak prekürsöründen farklı özel hücreye farklılaşabilirler.

Kök hücreler, uzun süre bölünebilme ve kendi kendilerini yenileme yeteneğine sahiptirler. Hücrelerin uzun süre bölünebilmesini belirleyen faktörlerden birisi, kromozomların ucunda yer alan, telomer denilen ve binlerce kez tekrarlanan kısa DNA tekrar dizileri (TTAGGG) içerirler. Telomerler, kromozom uçlarının parçalanmasına, diğer kromozomlarla kaynaşmasını engelleyerek kromozomların yapısal bütünlüğünün korunmasını sağlar.

Kök hücreler özelleşmemişlerdir. Bir kök hücre, bir kalp kasında olduğu gibi kanı vücuda pompalamak için komşu hücrelerle birlikte çalışmaz, eritrositlerde olduğu gibi oksijeni dokulara taşıyamaz. Ancak, özelleşmiş hücrelere dönüşmek üzere kaynak oluşturabilir.

Kök hücreler, özelleşmemiş hücelere kaynaklık edebilirler. Bu olaya, **farklılaşma (differentiation)** denir. Kök hücreler birden fazla hücre tipine farklılaşabilirler. Bunun en iyi örneğini döllenmiş yumurta hücresi ya da zigottan itibaren görebiliyoruz. Vücuttaki tüm hücelere dönüşebilecek potansiyele sahip bu ilk embriyonel hücreye **"totipotent"** (herşeyi yapabilen) hücre denmektedir. Bu hücreler sınırsız farklılaşma ve farklı yönlere gidebilme yeteneğine sahip kök hücrelerdir. Erken embriyoner dönemde 4 hücreden 8 hücreye kadar olan tüm blastomerler totipotenttir. Fertilizasyonun yaklaşık 5. gününde bu hücreler **"blastosist"** denilen içi boşluklu hücre topluluklarına dönüşürler.

Blastosistin iç hücre kitlesindeki hücreler (embriyoblastlar), endoderm, ektoderm ve mezodermden köken alan çok farklı hücre çeşidine (yaklaşık 250 çeşit) farklılaşabilirler. Bu özelliğe sahip hücelere **"pluripotent"** hücreler denir. İnsan embriyonik kök hücreleri blastosistin iç hücre kitlesinden elde edilirler ve pluripotenttirler. Gelişimin ilerleyen dönemlerinde (fetal hayat), hücreler biraz daha özel görevlere sahip olup ve erişkin tip kök hücelere dönüşürler. Bu erişkin kök hücreleri tipik olarak yer aldıkları dokunun hücre tiplerini üretirler. Kemik iliği kök hücreleri en iyi örnektir. Biraz daha özelleşmiş bu hücelere **"multipotent"** hücreler denir.

Bir kök hücrenin "lineage" (dizi) değiştirilmesi veya farklılaşması için başlıca 4 alternatif yol mevcuttur. Pluripotent veya multipotent kök hücreler daha sonra belirli hücre dizilerine farklılaşacak progenitor hücreleri oluştururlar.

a. Transdetermination: Belli hücre grubunu oluşturmaya programlanmış bir kök hücrenin, başka bir yönde hücre oluşturmak üzere planlanmış diğer bir kök hücreye değişip, bu prekürsörün hücre tiplerini oluşturmasıdır. Buradaki prekürsör veya kök hücre multipotenttir ve belirlenmiş bir diziyeye irreversibl olarak değişime gitmemiştir.

b. Transdiferansiyasyon: Farklılaşmış (committed) bir hücrenin diğer bir farklılaşmış hücrenin fenotipini almasıdır. Burada hücrenin gen ekspresyon şekli tamamen farklı bir hücre tipine dönüşür. Örneğin normal memeli gelişimi esnasında, özefagusta düz kas hücrelerinin iskelet miyozitlerini oluşturması transdiferansiyasyona örnektir.

c. Dediferansiyasyon: İlk iki terimin toplamını anlatır. Dediferansiyasyon olacak bir hücre farklılaşmış bir hücre veya bir hücre grubunu yapmaya planlanmış bir hücre olabilir. Bu

tür bir hücrenin, diğer bir hücre grubuna farklılaşmasını takiben diğer kola kaymasına dediferansiyasyon denilir. Bu tipte bir farklılaşmaya örnek olarak, semenderlerde ekstremite amputasyonunu takiben myozitlerin farklı hücre gruplarına farklılaşmaları verilebilir.

d. Hücre füzyonu: Deneysel bir örnek tedavi amaçlı klonlama ile gösterilmiştir. Burada, olgun ve bir hücre grubunu oluşturmaya programlanmış hücrenin çekirdeği, çekirdeği çıkarılmış bir ovum içerisine sokularak tekrar programlanabilir ve böylece değişen çevre ile olgun çekirdeğin tekrar programlanması çoğu dokuların oluşumunu sağlar. Benzer şekilde fibroblastların miyoblastlarla füzyonu, fibroblast çekirdeğinde kasa-spesifik mRNA ekspresyonunun artmasına sebep olmuştur. Kemik iliğinden türeyen hücrelerin nonhematopoetik hücreler içerisinde farklılaşmasının hücre füzyonunun bir neticesi olup olmadığını belirlemek üzere, embriyonik kök hücrelerle (EKH) erişkin somatik hücrelerin kokültür çalışmaları başlatılmıştır. Farklılaşmanın örnekleri arasında sinir hücrelerine dönüşen kan hücreleri, insülin üreten karaciğer oval hücreleri ve kalp hücrelerine, kas hücrelerine, kemik hücrelerine dönüşebilen hematopoetik kök hücreleri sayılabilir.

Kök hücreler, hasar gören alıcıya nakil sonrasında kaynak dokuyu işlevsel olarak tekrar çoğaltabilirler. Bu en iyi hematopoetik kök hücrelerde ve yakın geçmişte de karaciğer öncüllerinde ve sinir kök hücrelerinde gösterilmiştir.

Kök hücreler, in vivo koşullarda doku hasarının olmadığı durumlarda bile farklılaşmamış kuşaklara katkı sağlayabilirler. Buna en iyi örnek, embriyonik ya da yakın geçmişte gösterildiği gibi erişkin kök hücrelerinin (nöral ve mezankimal gibi) blastokiste enjekte edildiklerinde farklı hücre tiplerine kaynaklık etmeleri verilebilir.

2.3.1 Kök Hücre Tipleri

Kök hücreler esas itibarıyla iki farklı kaynaktan elde edilirler. Bu kaynaklar embriyonik gelişim sürecinin erken dönemlerinde blastosistin iç hücre kitlesinden elde edilen embriyonik kök hücreler ve embriyonik olmayan kaynaklardan elde edilen kök hücreler olarak belirtilebilir (Karaöz ve Ovalı, 2004). Embriyonik kök hücreler başlı başına bir grubu oluştururken embriyonik olmayan kök hücreler elde edildikleri kaynaklar açısından farklı gruplara ayrılmaktadır.

Embriyonik olmayan kök hücreleri kaynaklarına göre birçok farklı grupta sınıflandırmak mümkündür:

- a)Erişkin kök hücreleri (Doku özgün kök hücre, postnatal kök hücre)
- b)Fetüs kök hücreleri
- c)Kadavradan elde edilen kök hücreler
- d)Partenot hücreleri (Partenogenezis)
- e)Göbek kordonu ve plasenta kök hücreleri (Karaöz ve Ovalı, 2004).

Erişkin kök hücrelerinin, diğer tüm kök hücreler gibi iki önemli özelliği vardır. Birincisi, uzun süre kendilerini kopyalayabilme özelliğine sahiptirler. Erişkin dokulardaki öncü ve özelleşmiş hücrelere farklılaşma yeteneğindedirler. Daha çok elde edildikleri dokuya dönüşme potansiyelleri vardır ve multipotent kök hücrelerdir (İnan Ve Özbilgin, 2009). Erişkin kök hücreler, EKH'lerde var olan teratom oluşturması riski, etik sorunların olmaması ve dokuya özgü olabilmesi nedeniyle, yenileyici tıpta tedaviye yönelik araştırmalarda çok sık olarak tercih edilmektedir.

Erişkin kök hücreler; hematopoietik kök hücreleri, stromal kök hücreler (mezenkimal kök hücreleri), organlarda yerleşik diğer erişkin kök hücreleri şeklinde sınıflandırılmaktadır (Karaöz ve Ovalı, 2004).

Embriyodan, fetal dokulardan, kordon kanından çeşitli kök hücreler izole edilmiştir. Bunun yanında kemik iliği, beyin, deri, göz, kalp, böbrek, akciğer, gastrointestinal sistem, pankreas, karaciğer, meme, over, prostat ve testis gibi memeli erişkin dokularından da kök hücreler izole edilmiştir.

2.3.1.1 Embriyonik Kök Hücreler (EKH)

EKH, blastokistin iç hücre kitlesinden elde edilir, bu kitle vücuttaki bütün dokuların yanı sıra embriyon dışı endoderm, ektoderm, mezoderm ve amniyon gibi dokulara kaynaklık eder. Dolayısıyla bu hücreler pluripotenttir. Kompleman aracılıklı olarak alınan iç hücre kitlesi zemine fare embriyonik fibroblastlarının bulunduğu bir ortama alınır. Bu hücre tabakasına besleyici hücre tabakası (feeder layer) denir ve bu hücreler bölünme ve çoğalma açısından inaktif durumdadırlar, bu hücreler embriyonik kök hücrelerin farklılaşmadan çoğalmasını sağlarlar. Fare EKH'leri besleyici hücre tabakası olmaksızın lösemi engelleyici faktör (LIF) varlığında da farklılaşmadan çoğalabilmektedirler. Alt pasaj yapılarak yaklaşık 6 ay sonra bu iç hücre kitlesinden milyonlarca embriyonik kök hücre serisi elde edilir.

2.3.1.2 Mezenkimal Kök Hücreler

Mezenkimal kök hücreler (MKH'ler), ilk kez fetal buzağı serumu içeren kemik iliğinin ortama yayılması sonrasında kemik hücrelerine ve adipositlere farklılaşan ve fibroblastlara benzeyen yapışkan hücre kolonilerinin geliştiğini gösteren Fridenshtein tarafından tanımlanmıştır (Fridenshtein, 1982). MKH'lerin ana kaynağı kemik iliği olmakla beraber birçok dokudan izole edilebileceği bilinmektedir. Bu dokuların başlıcaları, dental pulpa, sinovial sıvı, adet kanı ve yağ dokuları, kordon kanı ve matriksidir. Bu hücreler buldukları dokularda, 'Mezengenezis hipotezi'ne göre çoğalma, yönelim, seviye ilerleme, farklılaşma aşamalarından geçerek ilgili hücre tipine farklılaşırlar. Böylece vücutta doku onarımının başrol oyuncularını olarak görev alırlar (Karaöz ve Ovalı, 2004).

Kemik iliğindeki mezenkimal öncüllerin sadece mezenkimal öncül hücreler için değil, aynı zamanda kemik iliğinde bulunan hemetopoetik öncüllerin ve mezenkimal kökenli olmayan diğer stromal hücrelerin gelişimi için de uyarıcı / düzenleyici sinyaller üreten stromal bir mikro çevrenin oluşumuna ve işlev görmesine katkı sağladığına ilişkin bulguları teşkil etmektedir (Karaöz ve Ovalı, 2004).

MKH'lerde karakteristik özellik olarak yüzeye yapışabilir olma, kolonizasyon gösterme, yüzey antijen ekspresyonu ve osteojenik, adipojenik, kondrojenik farklılaşma eğilimi sayılabilir. Hücrelerin izolasyon ve kültürünün kolay olması ayrıca yüksek ex vivo potansiyelinin olması bu hücreleri tedavi edici bir araç haline getirmektedir. Bunun yanı sıra tüm dokularda, destek hücreleri olan stromal hücrelerin de kökenini teşkil etmektedirler.

MKH'lerin kesin bir yüzey belirteçleri olmamakla birlikte bu hücreler klinik veya araştırma amaçlı kullanılmadan önce akım sitometrisi yöntemiyle mutlaka CD 13, CD 29, CD 44, CD 90, CD 73, CD 105, CD 46, CD 166, HLA ABC pozitif; CD 3, CD 8, CD 11b, CD 14, CD 15, CD 19, CD 33, CD 34, CD 45, CD 117 ve HLA-DR negatif olmaları açısından karakterize edilmelidir (Dominici et al, 2006).

MKH'lar, mikroçevre olarak adlandırılan bir yörede ve erişkinde kemik iliği, kalp, böbrek, beyin, deri, göz, gastrointestinal sistem, karaciğer, pankreas, akciğer, meme, over, prostat ve testis gibi organlarda tespit edilmiştir.

MKH'lar, adı geçen organda kendilerine ait bir mikroçevre içerisinde kısa veya uzun bir süre dinlenmede kalabilirler. Bunlar, özel mikroçevre içerisinde yüksek telomeraz aktivitesine sahip oldukları halde EKH'lerle karşılaştırıldıklarında daha kısıtlı bir farklılaşma

potansiyelleri vardır ve daha sınırlı sayıda progenitör hücre oluştururlar. MKH'lar, mikroçevrelerindeki değişiklikleri takiben proliferere olabilirler veya daha olgun ve dokuya özel hücre tiplerine farklılaşabilirler.

MKH'ların kendi kendilerini yenilemeleri esnasında, her bir kök hücre simetrik olarak bölünmeyle iki benzer kardeş kök hücreleri oluşturur. Aksine, farklılaşma esnasında kök hücrenin asimetrik bölünmesi ise, bir kardeş kök hücre ile bir kardeş ara geçiş kök hücre oluşturmasını gerektirir. Erişkin kök hücreleri, özellikle hematopoetik kök hücreler, bazı fizyolojik veya patolojik koşullarda dolaşım yoluyla diğer uzak dokulara yayılabilirler.

2.4 Eksozomlar

Eksozomlar bir çok hücre tarafından salgılanan hücre dışı ortamın bir alt fraksiyonu olan veziküllerdir ve 40- 100 nm bir çapa sahiptirler. Eksozomlar iki tabakalı bir lipit içerisinde ve transmembran proteinlerinin dış etkileri ile hücre dışı ortama maruz kalmaları sebebiyle kapalı sitoplazmaya eşdeğerdirler. Eksozomlar endozomların belirli bir popülasyonunu oluşturur, içeri doğru bölme lümeni içine tomurcuklanmasıyla multiveziküler cisim (MVBs) adını alır.

Eksozomlar hücre kültürü süpernatantlarında ve farklı biyolojik sıvılarda bulunurlar, normal veya patolojik koşullar altında birçok hücre tarafından salgılandıkları bilinmektedir. Şimdiye kadar eksozomların B hücreleri, dendritik hücreler (DC), T-hücreleri, mast hücreleri, epitel hücreleri gibi bugün incelenen bütün hücreler tarafından salgılandığı ve trombosit ve bronkoalveoler lavaj gibi fizyolojik sıvılarda (BAL,) serum, idrar, meme sütü, beyin omurilik sıvısı, tükürük ve malign efüzyonlarda mevcut olduğu tespit edilmiştir (Suntres et al, 2013).

Mikroveziküllerden (30-120 nm) daha küçük olduğu düşünülen eksozomlar hücre tipine özgü proteinler ve moleküller sentezlerler bunlar farklı kökenli eksozomlara özgü belirteçleri oluştururlar. CD63, CD9, CD81 gibi tetraspanin aile üyeleri, flotillin, CD82, Tsg101, Alix ve diğer endozomal kompleksleri de eksprese ederler (Camussi and Quesenberry, 2013; Azmi et al, 2013).

2.4.1 Eksozomlar aracılığıyla hücre-hücre etkileşimi

Hücre sel dengesi korumak için ya da hücre dışı patojenlere yanıt vermek için, hücreler genellikle ligand-reseptör etkileşimleri veya nanotüpler gibi hücre sel "köprü" aracılığıyla çözünür faktörlerin salgılanması sırasında bilgi alışverişini değiştirirler. Ancak,

artan kanıtlar tüm hücreler arasındaki genetik cross-talkta eksozomlar ve mikroveziküllerin önemli ölçüde katkıda bulunduğunu gösterir. Eksozomlar ve mikroveziküller farklı hücre tipleri arasında güçlü bir genetik bilgi aktarımı kaynağıdır. Fiziksel temas yerine mikroveziküller ile hedef hücre üzerine biyoaktif bir kargo boşaltma/aktivasyon etkisi sağlanabilir. CD63 hücre yüzey ifadesine neden olsa da temel olarak hücre içi keseciklerin (eksozomlar) membranıyla ilişkilidir ve bu gen tümör gelişimiyle de ilişkilidir (Entrez Gene: CD63 CD63 molecule). MCF-7 ve MDA-MB-231 eksozomlarında CD63 ekspresyonunun daha fazla görülmüş olması bu proteinin tümör gelişimiyle ilişkili olduğunu göstermiştir (Azmi et al, 2013).

2.4.2 Kanser gelişiminde eksozomların etkisi

Eksozomlar fizyolojik koşullar altında salgılanmalarına rağmen bir hastalığın oluşum aşamalarında da salgılanırlar. Tümör hücreleri tarafından salgılanan eksozomların invazyonda etkili olduğu yapılan çalışmalarla hem *in vitro* hem de *in vivo*da gösterilmiştir (Ginestra et al, 1998), (Ginestra et al, 1999). İlk kez 1978 yılında kanser hastalarında eksozom varlığı belgelenmiştir, Hodgkin hastalığı olan bir hastadan alınan dalak nodülleri ve lenf düğümleri kültürlerinde eksozomlar tanımlanmıştır (Friend et al, 1978). Yaklaşık on yıl sonra; plazma zar türevi olan veziküllerin yüksek düzeyde metastatik olan fare melanoma hücrelerinden (F10) kendiliğinden döküldüğü ve daha az metastatik etkiye sahip olan B16 fare melanoma hücreleri (F1) ile kaynaşarak bu hücrelerin akciğere metastaz yapmasını sağladıkları anlaşılmıştır (Poste and Nicolson, 1980). Bu çalışmaların her ikisi de göstermiştir ki kanser ilerlemesinin araştırılmasında en önemli üzerinde durulması gereken aşamalardan biri de eksozomların etkinliğidir.

Tümör hücrelerinden salgılanan mikroveziküller çözünür proteinlerin (Iero et al, 2008), nükleik asitlerin (Skog et al, 2008), fonksiyonel transmembran proteinlerinin (DelConde et al, 2005), kemokin reseptörlerinin (Mack et al, 2000), doku faktörlerinin (Del Conde et al., 2005) ve epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2) gibi reseptör tirozin kinazların (Al-Nedawi et al.2008; Sanderson et al., 2008) transferini kolaylaştırır (Muralidharan-Chari et al, 2010).

2.5 Mikroçevre

2.5.1 Mikroçevre bileşenleri

2.5.1.1 Ekstrasellüler Matriks

ECM laminin, fibronektin (FN), tip IV kolajen, Entactin / nidogen ve proteoglikanlar gibi birçok proteinden oluşmaktadır. ECM içindeki gömülü hücelere ve onu çevreleyen dokulara yapısal destek sağlamak üzere işlev görür ve aynı zamanda büyüme faktörleri ve sitokinlerin bir rezervuarı olarak görev görür.

Tümör gelişimi sırasında ECM değişebilir, çünkü tümör hücreleri ve fibroblastlar tarafından ECM proteinlerinin salgılanması değiştirilmiş olur ve ECM'nin post-translasyonel modifikasyonları ve proteolitik ECM yeniden şekillenmesi meydana gelir. Bu ECM değişiklikleri tümör ilerlemesi sırasında tümör hücreleri içinde hücre içi sinyalizasyon yoluyla değiştirilmiş hücre-ECM yapıştırıcı etkileşimleri ve/veya matriste sertlik gibi mimari değişiklikleri oluşturacak derin bir etkiye sahip olabilir. Ayrıca, invasiv carsinoma geçiş aşamalarından olan hiperplazi sırasında kollejen tip I'in mimari yapısında kademeli bir değişim meydana gelir. Bu değişen mimari yapı, hücrelerin kollejen lifler boyunca migrasyonunu sağlayarak veya integrin sinyalleri arttırarak invazyonu arttırabilir.

2.5.1.2 Stromal hücreler

Mikroçevrenin hücresel kompozisyonu; mezenkimal kökenli hücreler (fibroblastlar), enflamatuvar / immün hücreleri, endotel hücreleri (damar) ve adipositleri içerir. Tümör gelişimi aşamalarında, bu stromal hücrelerin davranışı tümör hücrelerinden giderek etkilenir ve stromal hücreler modifiye olur. Sonunda, bu aktifleştirilmiş stromal hücreler, tümör hücrelerinin yayılmasını kolaylaştırır.

2.5.1.3 Fibroblastlar

Tümör mikroçevresinin büyük bir hücre bileşeni stromaya yapısal çerçeve sağlamak için işlev gören fibroblastlar ile temsil edilir. Fibroblastlar, normal koşullar altında, aktif olmayan, hareketsiz bir durumda olsa da, doku yenilenmesi gereken yara iyileşmesi ve enflamasyon gibi fizyolojik koşullar altında aktive edilirler ve yüksek proliferatif özelliğe erişirler. Aktive olan fibroblastlar ECM bileşiminin modülasyonunda önemli bir rol

oynamaktadır. Sadece kollajen, laminin ve FN gibi matris bileşenleri sentezlemek değil, aynı zamanda metaloproteazlar gibi matris-parçalayıcı enzimler üretme kabiliyetleri de bulunmaktadır.

Tümörün mikro-ortamı içinde fibroblastlar, tümörün parakrin etkisi ile aktive edilir ve α -smooth muscle actin üretimi ile karakterize edilen bu hücreler kanserle ilişkili fibroblastlar (cafs) olarak adlandırılır. Cafs yerel fibroblastlardan elde edilir, ama aynı zamanda perisitlerden ve vasküler düz kas hücrelerinden, kemik iliğinden türetilmiş mezankimal hücrelerden kaynaklanabilir veya epithelial-mesenchymal transition/endothelial-mesenchymal geçişin bir sonucu olarak oluşabilirler.

2.5.1.4 Immun/Inflamator hücreler

Doğuştan gelen bağışıklık hücreleri çeşitli myeloid hücrelerden türetilmiş (örneğin, makrofajlar, mast hücreleri ve nötrofiller) olup sadece yabancı patojenlere karşı savunma için sorumlu değildir aynı zamanda, doku gelişimi ve onarımına da katılmaktadırlar. Makrofajlar, kemo-çekiciler sayesinde tümörlerin içine alınırlar ve kanser hücreleri ile savaşmak için koloni uyarıcı faktör-1, SDF-1, monosit kemotaktik protein-1 ve VEGF gibi çeşitli kemoatraktantları üretirler.

2.5.1.5 Endotel hücreler

Tümörün sürekli büyümesi ve ilerlemesi büyüyen tümörün vaskularizasyonu ile sonuçlanan anjiyojenik sürecinin aktivasyonunu gerektirir. Bu işlem, 'anjiyojenik anahtar' olarak adlandırılır ve tümör mikroçevresi içinden, tümörün kendisinden veya kemik iliği içinde endotel öncü hücrelerinden uyarıcı sinyallere yanıt olarak ortaya çıkabilir. Tümör damar yoğunluğu tümör davranışı veya saldırganlığının bir göstergesi değildir ve normal damarın aksine tümör kan damarları düzensiz ve genişlemiştir. Buna ek olarak, tümörler içindeki perivasküler hücreler gevşek endotel hücreleri ile ilişkilidir ve tüm bu değişiklikler, anormal dercede düşük kan içeren sızan kan damarları ile sonuçlanır.

2.5.1.6 Adipositler

Meme dokusunun mikroçevresinde baskın stromal hücre türlerinden biri olan adipositler, meme stromasına ek olarak, kemik iliğinde de önemli bir kurucu hücre tipidir, sıklıkla göğüs kanseri ilerlemesinde sırasında metastazı teşvik edici özellikleri vardır.

Adipositler yakın zamana kadar büyük ölçüde bir enerji deposu olarak kabul edilirdi, ama şimdi hormonları üreten endokrin hücreler, büyüme faktörleri ve sitokinler 'Adipokinler' olarak adlandırılmaktadırlar. Gerçekten de, leptin, adiponektin, hepatosit büyüme faktörü, kollajen VI, IL-6 ve TNF- α içeren adipokinlerin meme bezi içinde duktal gelişim ve devamlılık için çok önemli olduğu bilinmektedir (Matrisian, 2007).

2.5.2 Tümör mikroçevresi

Tümör ve mikroçevresi içerisinde henüz kansere dönüşmemiş normal epitelyum hücreleri, fibroblastlar, kan damarlarını oluşturan hücreler, kan dolaşımıyla gelen immün sistem hücreleri, hücreleri bir arada tutmayı sağlayan ekstraselüler matriks elemanları ve çok sayıda molekül bulunmaktadır. Bu moleküllerden bazıları kemokin ve sitokin olarak adlandırılan büyüme faktörleridir.

Tümör hücreleri ile tümörü çevreleyen hücreler arasındaki iletişim tümörün gelişimine katkıda bulunur. Bu nedenle normal hücreden iyi huylu hücreye, iyi huyludan malign hücreye, malignden metastatik hücreye dönüşüm sadece tümörün kendi içindeki hücrelerdeki değişime bağlı değil tümörün etrafındaki hücrelerdeki değişimle de alakalı bir durumdur.

Örneğin, cildin dış epitel hücreleri. Epitel hücrelerinin altında epitel hücrelerini desteklemek için bağ dokusu adı verilen destek doku bulunur. Eğer cilt kanseri olunursa ne olur? Epitel hücreleri normal davranışlarını kaybederler ve kontrolsüz çoğalmaya başlarlar, mutasyonlar birikmeye başlar ve kendi büyüme sinyalleri gelişmeye başlar. Epitel hücreleri bunları yaparken stroma denilen destekleyici yapı uygun ortam sağlar. Sonuç olarak bir tümör stroma ve malign tümör hücrelerinin ikisini de içerir.

Kanserin önemli işaretlerinden ikisi tümörü çevreleyen mikroçevreye bağlıdır. Bunlardan biri, anjiyogenez diğeri kanser hücresinin istilası ve metastazıdır. Anjiyogenez tümöre oksijen kaynağı vermek için kan damarları oluşturur. İnvazyon ve metastaz tümöre diğer alanlara istila ve vücudun farklı bölgelerine seyahat becerisi kazandırır. Eğer bir kanser hücresi bu özel özelliklere sahip olmasaydı, büyümeye devam etmesi mümkün olmazdı.

Normal bir hücre iyi huylu bir tümöre dönüştüğünde büyümeyi düzenleyecek bazı özelliklerini kaybeder fakat iyi huylu bir tümör istila ve metastaz özelliğine sahip değildir. Metastaz ve istilanın meydana gelebilmesi için çok fazla mutasyon olması gerekir.

Mutasyonlar kanserli hücelere kan yoluyla taşınma ve uzak bölgelere gitme yeteneği verir (Matrisian, 2007).

2.5.3 Meme tümör mikroçevresi

Normal göğüs kanalı, epitel hücre tabakası üretmek ve bazal membran eklemekle görevli miyoepitelial hücelerle çevrili bir lümeden oluşur. Meme mikroçevresini endotel ve bağışıklık sistemi hüceleri, fibroblastlar ve adipositler dahil olmak üzere, hücre dışı matriks (ECM) ve çok sayıda stromal hücre tipleri oluşmaktadır.

Meme kanseri duktal epiteliden türetilmiş maligniteler ile heterojen bir grup oluşturur. Bu kanserlerin mikroçevresi tümör ilerleme ve terapötik yanıtta kritik bir katılımcı olarak kabul edilir. Son veriler anlamlı olarak hastalığın ilerlemesi sırasında mikroçevredeki hücelerde epigenetik değişiklikler olduğunu göstermiştir ve bu da bir gen ifadesi olarak ortaya çıktığında tedavi için biyomarkerlar keşfedilebilir ve hedef olarak bu hücelerin araştırılması düşünülebilir. Gerçekten de, tümör stromasında türetilen gen ekspresyon profili, klinik sonuçlar ile bağlantılı olmuştur.

Microçevre bileşenleri makrofajlar, myoepitelial ve endotel hüceleri ve birkaç ECM molekülleri de dahil olmak üzere, meme kanalı morfolojilerinde bu hücelerin tümünün kritik rolleri vardır. Benzer şekilde, tümör mikroçevresi giderek kanserin önemli bir düzenleyicisi olarak kabul edilmektedir.

2.5.3.1 Myoepitelyal hücelerin önemi

Meme kanserinin invaziv ilerlemesinin önemli özelliği myoepitel tabakası ve bazal membran kaybıdır. İn vitro ko-kültür ve ksenograft modelleri kullanılarak yapılan çalışmaların her ikisi de, normal miyoepitelial hücelerin tümör büyümesini inhibe ettiği gösterilmiştir (Place et al, 2011; Mao et al, 2013).

2.5.4 Kök hücre mikroçevresi

Kök hücre mikroçevresi kök hüceler ile etkileşime giren, hücre kaderini düzenleyen kök hücelerinin bulunduğu bir mikroçevre anlamına gelir. Kök hücre mikroçevresi içinde çeşitli faktörler kök hücre özelliklerini düzenlemek için önemlidir: hücre-hücre kök hüceler arası etkileşimleri, kök hüceler ile kök hüceler arası etkileşim ve komşu farklılaşmış hüceler etkileşimi, kök hücre ve yapışma molekülleri arasındaki etkileşim, hücre dışı matriks

bileşenleri, oksijen gerginliği, büyüme faktörleri, sitokinler, ve pH değeri arasındaki etkileşimler de dahil olmak üzere çevrenin fizikokimyasal doğası, iyonik kuvvet ATP gibi (örneğin Ca^{2+} + konsantrasyon) ve metabolitleri de önemlidir. Kök hücreler ve niş, gelişim ve yetişkinlik dönemi sırasında birbirlerini teşvik ederler ve karşılıklı olarak birbirlerine korurlar.

Son çalışmalar meme kanseri de dahil olmak üzere birçok kanserde kök hücre özelliği gösteren bir alt popülasyonun varlığını göstererek kanser kök hücresi (KKH) hipotezi için güçlü bir kanıt oluşturmuştur. Bu hücreler metastaza aracılık edebilir ve kemoterapi ve radyasyona karşı gösterdikleri göreceli dirençle tedavinin kötüye gitmesine yol açabilirler. Bazı çalışmalar KKH ile epitelyum mezenkim geçişi (EMT) arasında yakın bir ilişki olduğunu işaret etse de (Mani et al, 2008), diğer çalışmalar EMT ve KKH'lerini birbirinden bağımsız olduğunu öne sürmektedir (Tsuji et al, 2008).

EMT işlemi kanser ilerlemesi ile bağlantılı biyolojik süreçlerden biri olmasının yanı sıra embriyogenezde de önemli bir rol oynamaktadır (Thiery et al, 2009). EMT sırasında epitel hücreler hücre-hücre bağlantılarını kaybederler, sitoskeletal biçimini değiştirir bu da polaritenin kaybına sebep olup mezenkim bir morfoloji meydana gelmesine sebep olmaktadır (Moreno-Bueno et al, 2008).

EMT geri dönüşümlü bir olaydır ve mezenkimal-epitel geçişi (MET) sırasında oluşan epitelyal fenotip hücre polaritesinin düzeni ve E-cadherin ekspresyonu ile karakterize edilir. İlginç olarak KKH'lerini düzenlediği bilinen Notch, hedgehog, Wingless (Wnt), transforming growth factor- β (TGF β) ve nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF κ B) gibi bazı sinyal yolları EMT 'yi indüklemeye kapasitesine sahiptirler (Shin et al, 2010; Takebe et al, 2011; Yoo et al, 2011). Bununla birlikte KKH'lerini düzenleyen bone morphogenetic proteins (BMPs) ve human epidermal growth factor receptor (HER) gibi diğer yolları da MET oluşumunu artırır (Korkaya et al, 2012; Samavarchi-Tehrani et al, 2010). KKH, EMT ve MET arasındaki ilişkinin tam olarak açıklanabilmesi için daha ileri çalışmaların yapılması gerekmektedir.

İnsan meme kanserinde tümörle ilişkili kök hücreler hücre yüzey belirteçleri olan CD24(-), CD44 (+) 'ün ekspresyon profilleri ile tanımlanır. Normal ve malign meme kanseri kök hücrelerinin ikisi de aldehide dehidrogenase (ALDH) enzimini eksprese ederler.

Meme bezinde luminal epitelyal hücreler E-cadherin eksprese ederken myoepitel hücreler P-cadherin eksprese ederler.

Mikroveziküller (MV) normal ve malign plazma hücre membranlarının her ikisinden de elde edilmiştir. Bu yapıların büyüklükleri 0,1 µm den 1 µm ye kadar değişebilir ve bileşimleri kaynaklandığı hücreye bağlı olarak değişebilir. Mikroveziküller çeşitli hücre yüzey proteinleri ve yağları eksprese ederler aynı zamanda nükleik asitler ve proteinler gibi sitoplazma içi molekülleri de içerirler. Mikroveziküller tümör biyolojisine farklı yönleriyle katılabilirler, anjiyogenez, immün cevaplardan kaçış, metastatik potansiyel ve in vivo ve vitroda kan pıhtılaşmasının aktivasyonu gibi.

Birkaç çalışma gösterdiği MV'lerin taşıdığı reseptör hücrelere fonksiyon kazandırabilecek moleküller farklı hücre popülasyonları arasında değişiklik gösterebilir örneğin, tümör hücrelerinden elde edilen MV'ler nükleik asitlerin, fonksiyonel transkripsiyon faktörlerinin, kemokin reseptörlerinin, büyüme faktörü reseptörlerinin ve diğer transmembran proteinlerinin ve ilave biyoaktif moleküllerin transferini sağlayabilirler (Lima et al, 2013).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Mezenkimal kök hücre ve stromal hücrelerin hazırlanışı

3.1.1 Sağlıklı ve malign meme dokusu stromal hücrelerinin (SMH ve MMSH'lerinin) izolasyonu ve kültüre hazırlanması

Meme kanseri hastalarından ameliyat sonrası alınan tumor dokusu ve meme küçültme ameliyatları sonrasında alınan dokular, içerisinde %5 oranında Penicilline-Streptomycine ilave edilen kalsiyum magnezyum içermeyen Hank's balanced salt solusyonu (HBSS; Gibco) bulunan steril kaplara koyulmuştur. Meme dokusundan stromal hücrelerin izolasyonu için; laboratuara gelen tümör ve meme dokusu %1 oranında penisilin-streptomisin içeren HBSS ile birkaç kez yıkama işleminden geçirilerek makasla 1cm³'lük küçük parçalara ayrılmıştır. Yıkama işleminden sonra dokular makas yardımıyla mins edilmiş ve üzerine hazırlanan Tumor- Dissociation Enzyme (ATP-tumoechemosensitivity Assay, DCS innovative-system) solüsyonundan 5 ml koyularak doku örnekleri 37°C çalkalamalı su banyosunda 60dk bekletilmiştir. Takip eden santrifüj sonrasında süpernatant atılıp pelet 5ml HBSS ile sulandırılarak hücre süzgeci ile süzölmüş ve tekrar 5dk santrifüj edilmiştir. Süre sonunda 5ml HBSS eklenerek 1800 rpm'de 5dk santrifüj edilmiştir. Bu işlem iki kez tekrarlanıp süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra oluşan pelet üzerine %10 oranında FBS ve %1 oranında penisilin-streptomisin içeren H-DMEM kültür besiyerinden 1ml eklenip pipetaj yapılarak 25cm²'lik kültür kabına ekimi yapılmıştır. Gerekli miktarda kültür besiyeri koyulduktan sonra 37 °C, %5 CO₂ ve nemli ortamda kültüre edilmiştir. 48 saat sonra besiyeri değiştirilerek yüzen tüm hücreler uzaklaştırılmıştır. Haftada iki kez besiyeri değişimi tekrarlanmıştır. Flaskın tabanı yaklaşık %80 oranında hücreler ile kaplanınca (konfluent) tripsinizasyon işlemiyle yapışan hücreler kaldırılıp yeniden kültüre edilmişler ve bu ilk pasaj (sub-kültür) olarak değerlendirilmiştir. Bu işlemler üçüncü pasaja kadar tekrarlanmış ve 3. pasajın sonunda elde edilen hücrelerin karakterizasyon çalışmalarına başlanılmıştır.

3.1.2 Kemik İliği Kökenli Mezenkimal kök hücrelerin (Kİ-MKH) izolasyonu ve kültüre hazırlanması

İnsan kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinin izolasyonu için iliyak kemik iliği aspiratından Kocaeli Üniversitesi'nden hasta bilgilendirme, onam ve etik kurul onayı alındıktan sonra MKH'ler izole edilmiştir. İliyak kemik iliği aspiratı 1:3 oranında PBS ile dilüe edilmiş ve ficoll-histopaque gradient (1,077g/mL) santrifüjleme yöntemiyle ayırım yapılmıştır. Düşük yoğunluklu mononükleer hücreler toplanmıştır. PBS ile 2 kez yıkanmış ve kültür kaplarına ekilmiştir. 72 saat sonra yüzen tüm hücreler atılmış ve yeni medyum ilavesi yapılmıştır. Haftada iki kez olmak üzere bu işlem tekrarlanmış ve flaskın tabanı yaklaşık %80 oranında hücreler ile kaplanınca (konfluent) (ki yaklaşık olarak 14-25. günler arasında) tripsinizasyon işlemiyle yapışan hücreler kaldırılıp yeniden kültüre edilmiş ve bu ilk pasaj (sub-kültür) olarak değerlendirilmiştir. Bu işlemler üçüncü pasaja kadar tekrarlanmış ve 3. pasajın sonunda elde edilen hücrelerin karakterizasyon çalışmasına başlanmıştır.

3.1.3 SMSH, MMSH- ve Kİ-MKH'lerin Karakterizasyonu

Sağlıklı ve malign meme stromal hücreleri ile insan kemik iliği MKH'leri kültür kabına yapışma özellikleri sayesinde izole edilmiş ve yapışan hücrelerin morfolojik özellikleri çalışma süresince zıt faz mikroskobu ile incelenmiştir. İmmunofenotipik özelliklerin belirlenmesi için akım sitometrik analiz çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

3.2 Akım sitometrik Analiz

Analizler, her alt-kültür işlemi sonrasında (P1'den P3'e kadar) ve *FACS Calibur* akım sitometri cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Hücreler tripsinizasyon işlemi ile kaldırılıp, hücre sayımı yapılarak hücre sayısı belirlendikten sonra (yaklaşık olarak 8×10^6 hücre) PBS içinde homojenize edilip belirlenen hücre yüzey işaretleyicilerine özel fluoresan izotiyosiyonat (FITC)- ve fikoeritrin (PE)-konjuge monoklonal antikorlar; CD29 (BD; Kat.No.555443), CD45 (345809), CD44 (555479), CD106 (551146), CD90 (555596) ve CD73 (550257) ve uygun izotip kontrollerinden 10µl eklenerek inkübe edilmiştir (oda ısısında-karanlıkta-45 dak.). İnkübasyon sonrası yıkama solüsyonu (%0.1 sodyum azid içeren PBS) eklenerek santrifüj edilerek (5dk. 1780 rpm) 400 µl hücre yıkama solüsyonu ile

resüspanse edilmiştir. Hazırlanan hücre süspansiyonu FACS Calibur akış sitometri cihazında okutulmuş ve analizi *BD Cell Quest TM* programı ile gerçekleştirilmiştir.

3.3 MCF-7 ve MDA-231 Meme kanseri hücrelerinin kültürü

Hazır meme kanser hücre dizileri olan MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri farklı besi ortamlarında kültüre edilerek çoğaltılmıştır. MCF-7 hücreleri %10 FBS, 10µg/ml insulin ve %0,2 primocin içeren H-DMEM besiyerinde; MDA hücreleri ise %10 FBS ve %0,2 primocin içeren H-DMEM besiyerinde kültüre edilerek çoğaltılmıştır.

3.4 Eksozomların izolasyonu

Kİ-MKH, SMSH, MMSH, MCF-7 ve MDA-231 hücrelerinden eksozom izolasyonu için hücreler T75 hücre kültür kaplarına ekilmiştir. Hücreler hücre kültür kabının tabanına yapıştıktan ve %70 kabın tabanını kapladıktan sonra mevcut besiyeri alınarak yerine FBS içermeyen besiyeri eklenmiştir. Hücre kültürü için kullanılan fetal sığır serumu (FBS) yüksek oranda eksozom içerdiğinden çapraz kontaminasyonu engellemek için hücreler serumsuz besiyerinde bir gece bekletilmiştir. Bir gece FBS içermeyen besiyerinde kültür edildikten sonra besiyeri toplanmıştır. PureExo Exosome İzolasyon kiti (Kat. #: P100) kullanılarak besi ortamına 1:2 oranında kit içerisindeki solüsyondan eklenmiştir. +4’de bir gece inkübasyondan sonra 10000 rpmde bir saat santrifüj edilmiş ve pelet formunda eksozomlar izole edilmiştir. Elde edilen eksozomlar -20’de iki hafta -80’de ise iki haftadan daha fazla saklanabilmektedir.

3.4.1 Eksozomların karakterizasyonu

Kİ-MKH, SMSH, MMSH, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinden izole edilen eksozomlar, eksozom yüzey belirteci olan CD63 (556020) antikoruna ile inkübe edilerek akım sitometri cihazıyla analiz edilmiştir.

3.4.1.1 BCA Protein Tayini

İzole edilen eksozomlarda protein varlığını gösterebilmek amacıyla BCA yöntemi ile protein tayini gösterilmiştir. Eksozom kiti ile eksozomlar elde edildikten sonra elde edilen peletten 20 µl alınarak hazırlanan 200 µl çalışma solüsyonuna (196 µl Bicinchoninic asit + 4 µl CuSO₄) eklenerek 37°C ‘de bir saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında 562 nm de

spektrofotometre ile renk değişimi ölçülmüş ve BSA standartı ile protein miktarı hesaplanmıştır.

3.5 İmmunohistokimyasal çalışmalar

İmmunohistokimyasal çalışmalarda, Ultravision Detection System Large Volume Anti-Polyvalent, HRP (TP-125-HL) (RTU) ve ABC Staining System (for use goat primary antibodies) immunohistokimya kitleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Uygun dilüsyonlarda hazırlanan; CD44 (MS-668-P), Connexin 43 (sc-59949), C-fos (sc-52), Osteonectin (AB1858), Vimentin (MS-129-P) ve CD105 (MS-1290-P) primer antikorlarıyla 1 saat inkübasyondan sonra immunohistokimyasal kit prosedürü aynen uygulanıp son aşamada Large Volume AEC kromojenle (Large Volume Substrat System-AEC Substrat Kit-(TA-125-HA)) enzim kompleksi görünür hale getirildi, Hematoxylin,Gill's Formulation 2 ile çekirdek zıt boyaması gerçekleştirilip kurutulmuş preparatlar Crystal Mounting Medium ile kapatılıp Leica DMI 4000 Microsystems ışık mikroskobunda analiz edilip görüntüledi (Negatif kontroller için, aynı yöntem uygulanmış fakat primer antikor yerine PBS kullanılmıştır).

3.6 İmmunofloresan çalışmalar

İmmunofloresan çalışmalarda, methanolle -20'de fiksasyondan sonra örnekler blok serumlarla 30 dk inkübe edilmiştir, daha sonra uygun dilüsyonlarda hazırlanan; CD29 (MS-596-P), Fibronectin (sc-8422), GFAP (MS-280-P), CD146 (sc-28667), Tenascin-c (sc-20932), CD45 (sc-25590), Cytokeratin 19 (sc-33119) ve Trophinin (sc-80002) primer antikorlarıyla +4 de bir gece bekletilen örnekler yine uygun dilüsyonlarda hazırlanan FITC (sc-2024, sc-2010) ve TR (sc-sc-2780) işaretli sekonder antikorlarla 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra örnekler UltraCruz™ Mounting Medium (sc-249414) ',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) ile kapatılıp Leica DMI 4000 Microsystems floresan mikroskobunda analiz edilip görüntülenmiştir (Negatif kontroller için, aynı yöntem uygulanmış fakat primer antikor yerine PBS kullanılmıştır).

3.7 Örneklerde E-cadherin ekspresyonu

İmmunofloresan çalışmalarla E-cadherin (sc-7870) primer antikoruyla ve bu antikora uygun floresan işaretli sekonder antikor ile deney ve kontrol grupları boyanarak E-cadherin pozitif hücre tesbiti yapılmıştır.

3.8 Gen ekspresyon çalışmaları (Real Time PCR)

Hücrelerde kanser hücrelerine benzeyecek epitel yönde bir farklılaşmayı gözlemleyebilmek için epitel/kanser belirteçlerinin gen ekspresyonları incelenmiştir. Değişimlerin gen düzeyindeki analizi için gerçek zamanlı-PCR yöntemi kullanılmıştır. E-Cadherin, COX2, ERBB2, CK8 genlerinin ekspresyon düzeylerindeki değişimler hesaplanmıştır. Bu amaçla, kemik iliği, sağlıklı ve malign meme stromal doku kaynaklı hücrelerden total RNA izolasyonları RNA İzolasyon Kiti (High Pure RNA Isolation Kit; Roche, Mannheim, Almanya) ile gerçekleştirilmiştir. İzolasyondan sonra RNA konsantrasyonu picodrop spektrofotometre ile ölçülerek ve 0,5 µg total RNA olacak şekilde cDNA'ya (Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit; Roche) çevrim gerçekleştirilmiştir. Her bir 20 ul reaksiyon içerisinde; 10 ul SYBR boyası içeren master karışımı (LC480 SYBR Master Mix-I, Roche), 1 µl Primer çifti karışımı, 0,5 µl cDNA ve 8,5 µl distile su olacak miktarda eklenmiştir. Örnekler en az üç tekrar olacak şekilde ilgili genlerin primerleri ile LC480 cihazı (Roche) ile çoğalmaları incelemiştir. PCR koşulları; 95°C'de 10 dakika inkübasyon, takibinde 45 döngü 95°C'de 10 saniye, 60°C'de 30 saniye ve 72°C'de 60 saniye şeklinde uygulanmıştır. Sonuçlar ActB referans genine göre normalize edilmiştir. Grafiklerde ikinci türev azami değer değişimine göre C_p değeri hesaplanmıştır ve değerlendirmeler kontrol gruba göre yapılmıştır.

Çizelge 3.1: Real Time PCR analizi ile ifadesi belirlenen genlerin dizileri.

Gen	Primer dizi
E-cadherin	F:GTCACTGACACCAACGATAATCCT
	R:TTTCAGTGTGGTGATTACGACGTTA
CK8	F:CCTACAGGAAGCTGGA
	R:GCTCAGACCAATAGCC
COX2	F: GAATCATTCACCAGGCAAATTG
	R: TTTCTGTACTGCGGGTGGAAC
ERBB2	F: AGCCGCGAGCACCCAAGT
	R: TTGGTGGGCAGGTAGGTGAGTT
ActB	F: TTCTACAATGAGCTGCGTGTG
	R: GGGGTGTTGAAGGTCTCAA

3.9 Eksozomlarla birlikte ortak kültür

Kİ-MKH ve SMSH'leri altı kuyucuklu hücre kültür kaplarına ekilmiştir. Hücre kültür kabında bu hücreler %70 yoğunluğa ulaştıktan sonra Kİ-MKH, SMSH, MMSH, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinden elde edilen eksozomlar besiyeri içerisinde bu hücreler üzerine direkt olarak verilmiştir. Dört gün sonra bu hücreler kültür kabından RNA izolasyonu için tripsinasyon ile kaldırılmıştır. Altı kuyucuklu hücre kültür kaplarının bir kısmına immünolojik boyama amacıyla cam tabaka konulmuştur. İki gün sonra cam tabaka üzerinde hücreler fikse edilerek immunofluoresan boyama için hazırlanmıştır.

3.9.1 WST-1 Proliferasyon Testi

Hücreler eksozomlar ile birlikte 48 saat kültüre edildikten sonra edildikten sonra ortamdaki eksozomlar uzaklaştırılmış ve hücreler %0,25 tripsin ile kaldırılarak 96 kuyucuklu kültür kaplarına beş tekrar olacak sayıda ekilmişlerdir. 48. Saat sonunda hücre çoğalma hızlarının belirlenmesi amacıyla ekimin hemen sonrasında ve 24 saat kültüre edildikten sonra hücre sayıları belirlenmiştir. Bu amaçla WST-1 ((4-(3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-

5-tetrazolio)-1,3-benzene disulfonate; Roche) testi kullanılmıştır. WST-1/hücre ortamı karışımı (1:10) 100 µl hücre /kuyucuk olacak şekilde eklenmiştir. WST-1 içeren kuyucuklar 1.5 saat sonra 480 nm dalga boyunda mikrolaka okuyucu (VersaMax Microplate Reader, Molecular Devices, USA) kullanılarak ölçölmüştür. Sonuçlar Microsoft Excel'de grafiksel olarak değerlendirilmiştir.

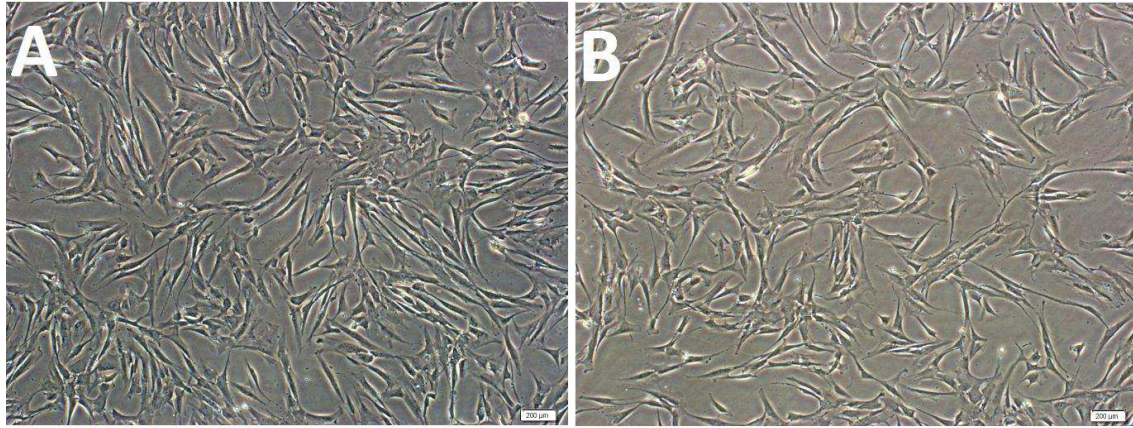
3.10 İstatistiksel analiz

Sonuçların istatistiksel analizleri SPSS 10.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA) programı ile yapılmıştır. Veriler eşli t-testi ve çoklu analizler için Newman–Keuls metodu ile test edilmişlerdir. Her deney en az üç kez tekrar edilmiştir. Deney ve kontrol grupları arasındaki fark $p<0,05$ olduğunda anlamlı ve $p<0,01$ olduğunda ileri derece anlamlı olarak ifade edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1 Kİ-MKH'ların kültürü

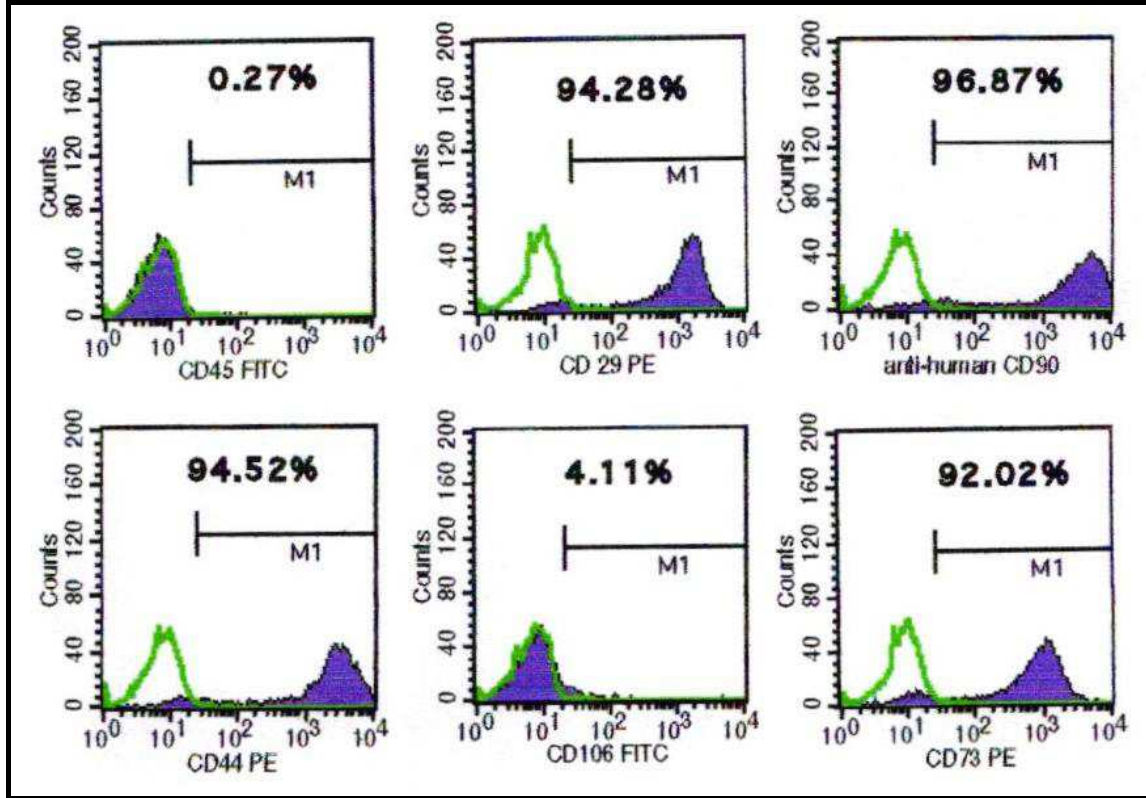
İzole edilen Kİ-MKH'lar pasaj üçe kadar çoğaltılmış ve hücrelerin morfolojileri mikroskop altında gözlemlenmiştir (**Şekil 4.1**). Yapılacak olan ortak kültürler ve eksozom izolasyonu için yeterli sayıda elde edildikten sonra kalan hücreler dondurulmuştur. Hücrelerin morfolojileri MKH karakterine uygun özellikte görülmüştür.



Şekil 4.1: Pasaj 2 ve pasaj 3 'teki Kİ-MKH'ların (A,B) zıt faz mikroskopunda morfolojik görüntüleri (Bar çubukları: A-B 200µm).

4.1.1 Kİ-MKH'ların karakterizasyonu

MKH belirteci olarak bilinen (CD29, CD44, CD45, CD73, CD90, CD106) antikorlarla Kİ-MKH'ların karakterizasyonu akım sitometri yöntemiyle incelenmiştir (**Şekil 4.2**). Akım sitometri analizi sonucunda Kİ-MKH'larda mezenkimal kök hücre belirteçlerden CD29 (%94.28), CD90 (%96.87), CD44 (%94.52) ve CD73'ün (%92.02) yüksek oranda eksprese oldukları hematopoetik kök hücre belirteçlerinden CD45 (%0.27) ve CD106'nın (%4,11) ise %5 den az ekspresyonu olduğu görülmüştür.

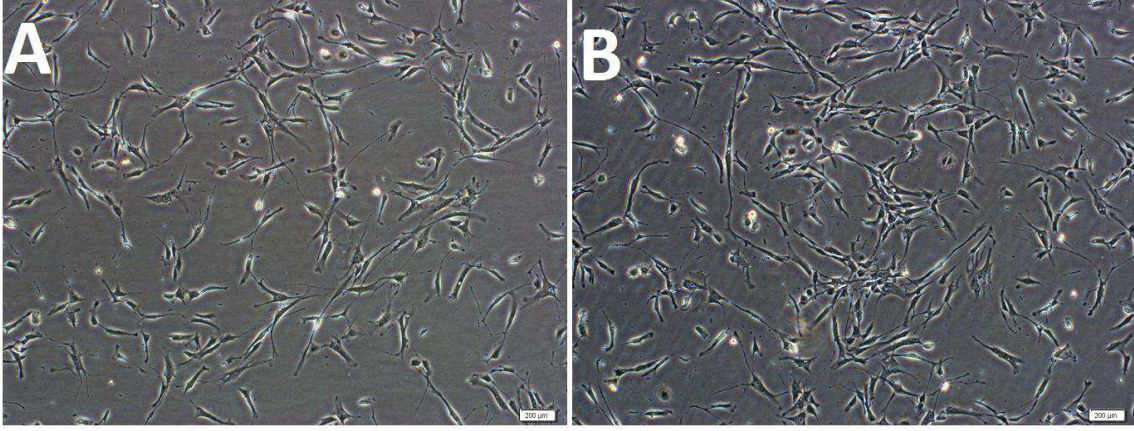


Şekil 4.2: KI-MKH'lerin akım sitometri yöntemi ile karakterizasyonu.

4.2 Stromal hücrelerin kültürü

4.2.1 Sağlıklı meme stromal hücrelerinin (SMSh) kültürü

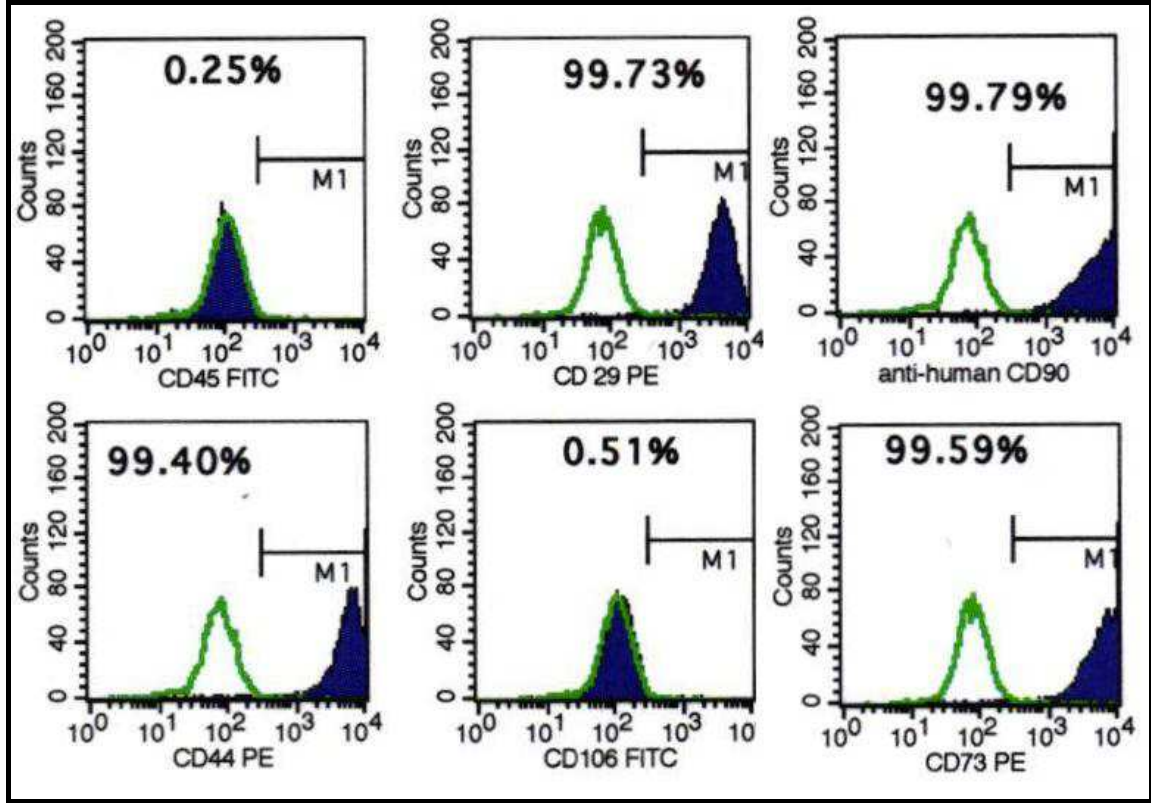
Meme kanseri olmayan hastaların meme dokusundan alınan dokudan elde edilen stromal hücreler pasaj üçe kadar çoğaltılmıştır. Kültürdeki hücreler mikroskop altında takip edilmiştir (Şekil 4.3). SMSh'leri morfolojileri MKH'lere benzer özellikte gözlemlenmiştir.



Şekil 4.3: Pasaj 2 ve pasaj 3 'teki SSMH'lerin (A,B) zıt faz mikroskobunda morfolojik görüntüleri (Bar çubukları: A-B 200µm).

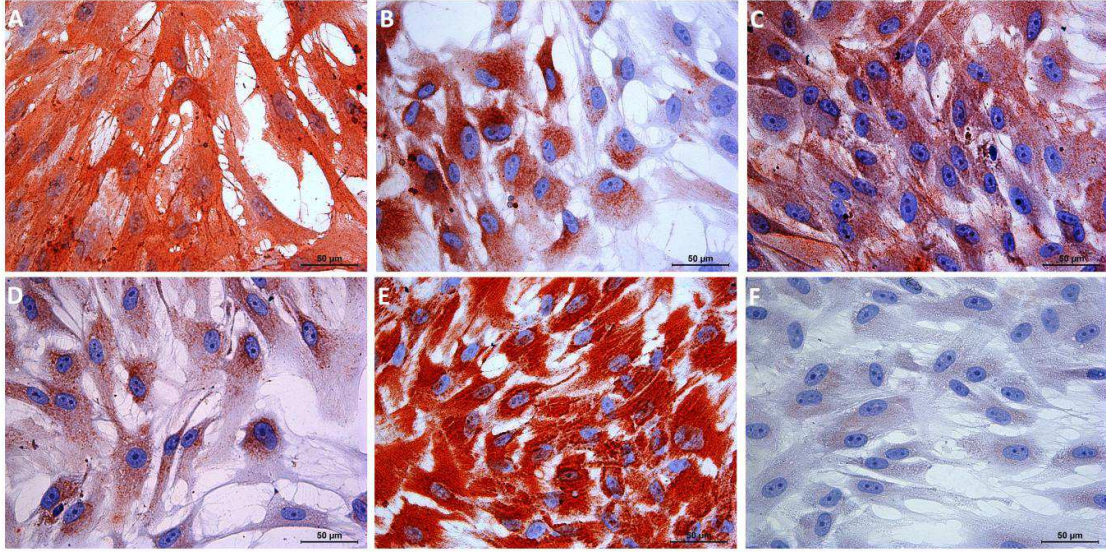
4.2.2 SSMH'lerin karakterizasyonu

MKH belirteci olarak bilinen (CD29, CD44, CD45, CD73, CD90, CD106) antikorlarla SSMH'lerinin karakterizasyonu akım sitometri yöntemiyle incelenmiştir (**Şekil 4.4**). SSMH'lerinin akım sitometri analizi sonucunda mezenkimal kök hücre belirteçlerden CD29 (%99.73), CD90 (%99.79), CD44 (%99.40) ve CD73'ün (%99.59) yüksek oranda eksprese oldukları hematopoetik kök hücre belirteçlerinden CD45 (%0.25) ve CD106'nın (%0.51) ise %5 den az ekspresyonu olduğu görülmüştür.



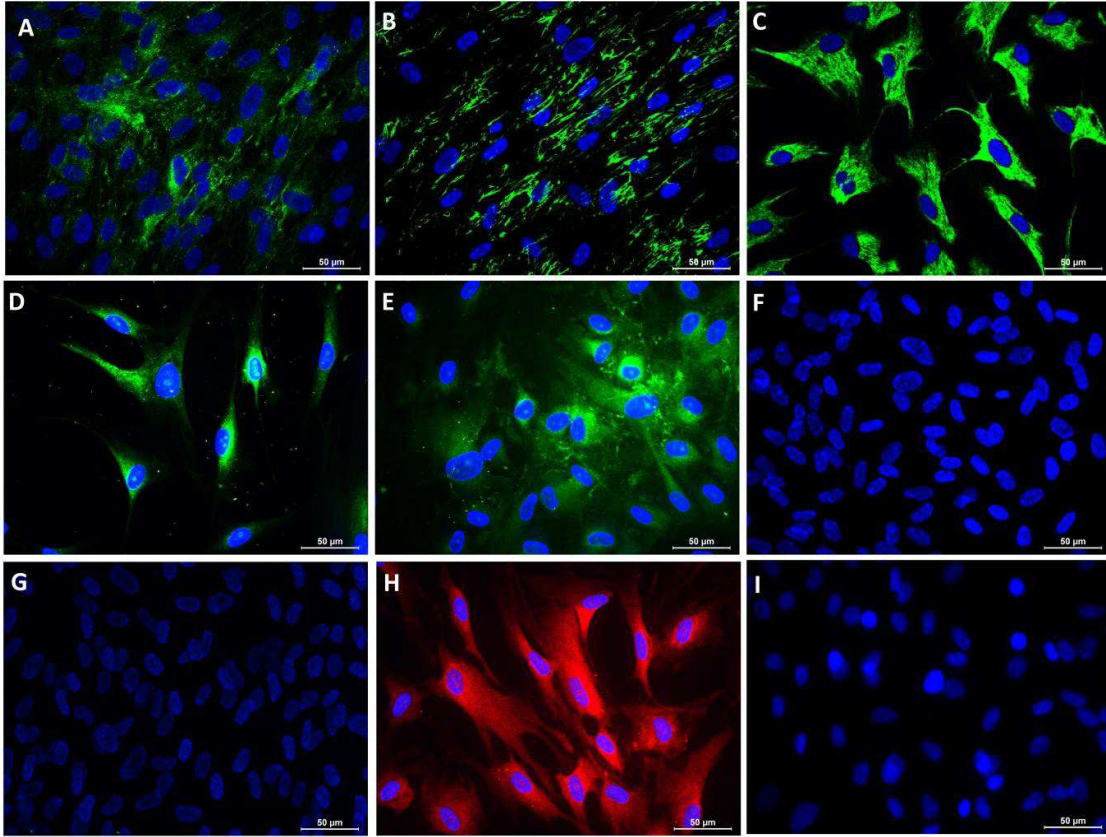
Şekil 4.4: SSMH'lerin akım sitometri yöntemi ile karakterizasyonu.

SMSH'lerin immunohistokimyasal yöntemle karakterizasyonu; CD44, Connexin 43, C-fos, Osteonectin, Vimentin ve CD105 gibi mezenkimal kök hücrelerde eksprese olduğu bilinen belirteçlerle boyanarak yapılmış ve ışık mikroskobu ile çekilen fotoğraflarla bu belirteçlerin pozitiflikleri gözlenmiştir (**Şekil 4.5**).



Şekil 4.5: SMSH'lerin immunohistokimyasal yöntemle karakterizasyonu (A)CD44 (B)CONNEXIN43 (C)C-FOS (D)OSTEONECTIN (E)VİMENTİN (F)CD105.

SMSH'lerinde yapılan immunofloresan boyamalar sonucu CD29, Fibronektin, Gfap, CD146, ve Trophinin gibi belirteçlerde pozitiflik görülürken CD45, CK19 ve E-Cadherin gibi belirteçlerde pozitiflik görülmemiştir (**Şekil 4.6**).



Şekil 4.6: SSMH'lerin immüno Floresan yöntemle karakterizasyonu. (A)CD29. (B)FİBRONEKTİN (C)GFAP (D)CD146 (E)TENASCİN (F)CD45 (G)CK19 (H) TROPHİNİN (I) E CADHERİN.

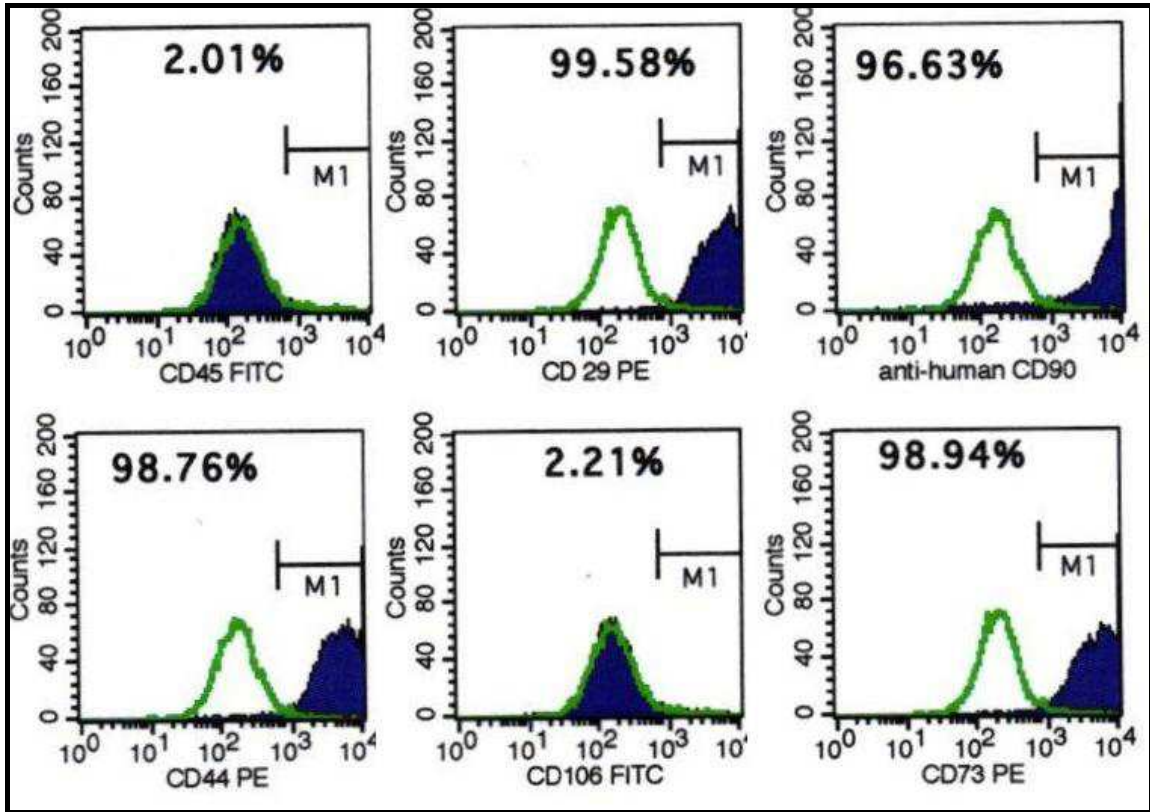
4.2.3 Malign meme stromal hücrelerinin (MMSH) kültürü

Meme tümör dokusundan elde edilen ve kanser hücreleriyle ilişkili olduğu düşünülen stromal hücreler SSMH'leri ile aynı koşullarda ve aynı besiyeri ortamında kültüre edilmiştir. Kültür kabının tabanına yapışan hücrelerin morfolojileri mikroskop altında gözlemlenmiştir (Şekil 4.7).

Şekil 4.7: Pasaj 2 ve pasaj 3 ‘teki MMSH’lerinin (A,B) zıt faz mikroskobundaki morfolojik görüntüleri (Bar çubukları: A-B 200µm).

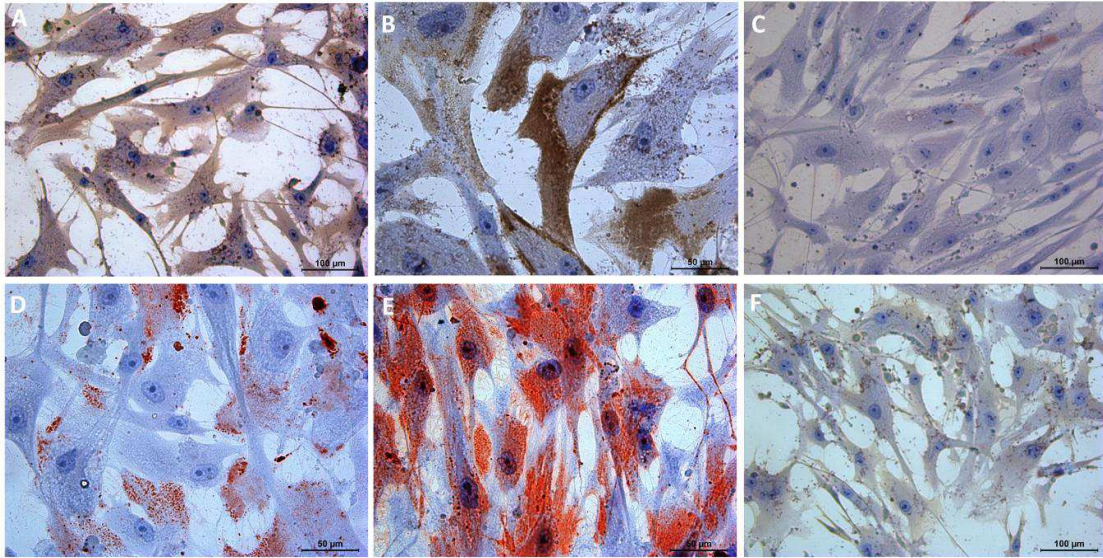
4.2.4 MMSH’lerin karakterizasyonu

MKH belirteci olarak bilinen (CD29, CD44, CD45, CD73, CD90, CD106) antikorlarla MMSH’lerinin karakterizasyonu akım sitometri yöntemiyle incelenmiştir. MMSH’lerinin akım sitometri analizi sonucunda mezenkimal kök hücre belirteçlerinden CD29 (%99.58), CD90 (%96.63), CD44 (%98.76) ve CD73’ün (%98.94) yüksek oranda eksprese oldukları hematopoetik kök hücre belirteçlerinden CD45 (%2,01) ve CD106’nın (%2.21) ise %5 den az ekspresyonu olduğu görülmüştür (Şekil 4.8).



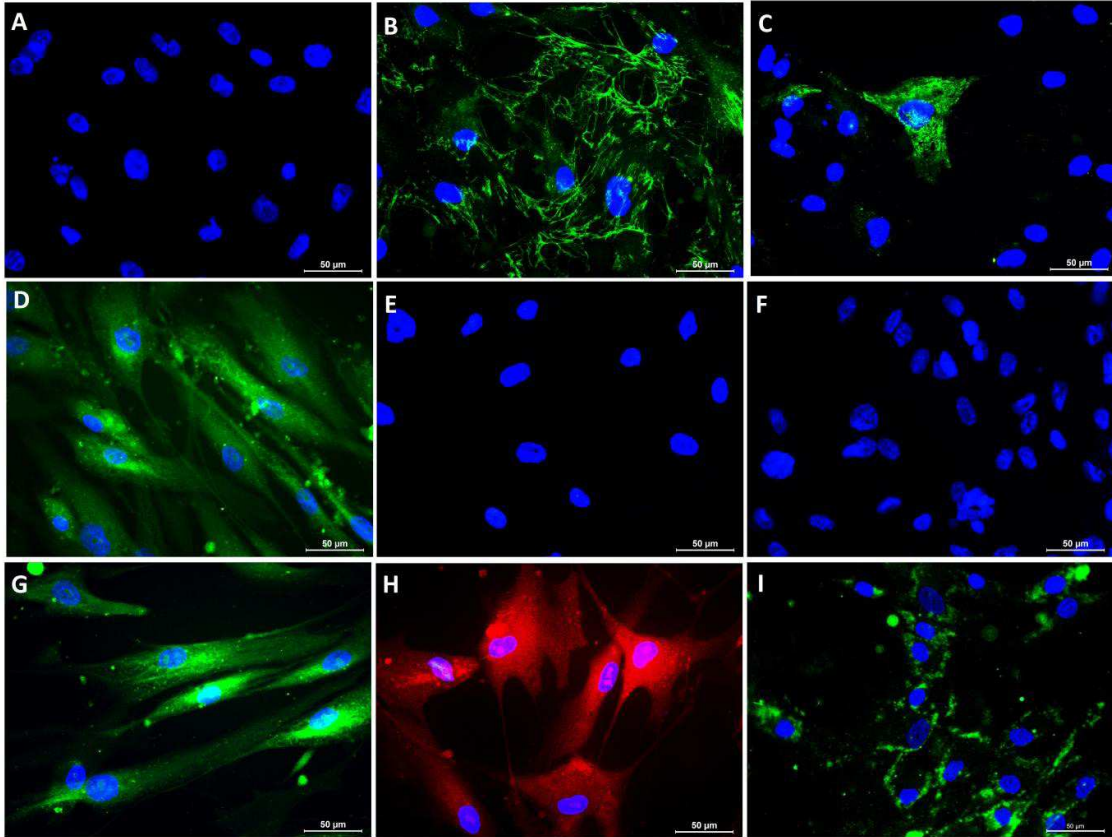
Şekil 4.8: MMSH’lerin akım sitometri yöntemiyle karakterizasyonu.

MMSH'lerin immunohistokimyasal yöntemle karakterizasyonu; CD44, Connexin 43, Osteonectin, Vimentin ve CD105 gibi mezenkimal kök hücrelerde eksprese olduğu bilinen belirteçlerle boyanarak yapılmış ve ışık mikroskobu ile çekilen fotoğraflarla bu belirteçlerin pozitiflikleri gözlenmiştir (Şekil 4.9).



Şekil 4.9: MMSH'lerin immunohistokimyasal yöntemle karakterizasyonu (A) CD44 (B) CONNEXIN43 (C) C-FOS (D) OSTEONECTIN (E) VİMENTİN (F) CD105.

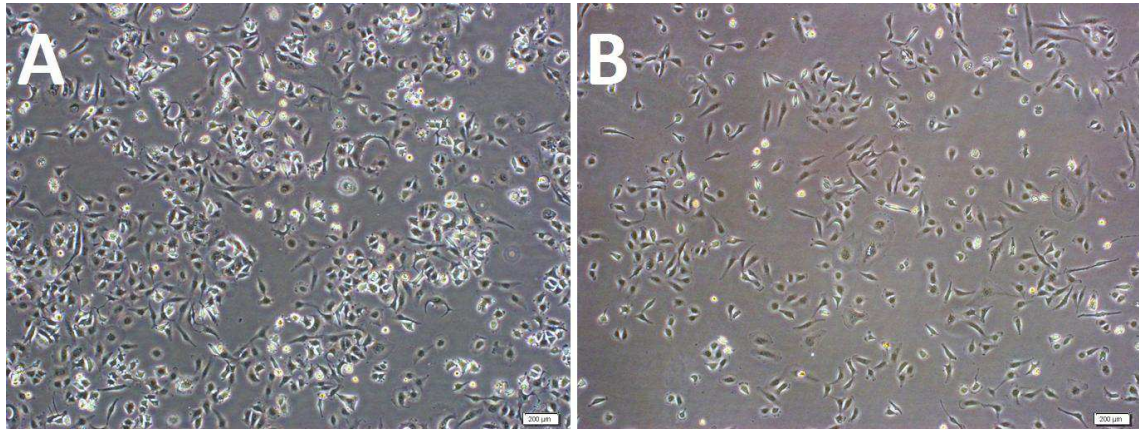
MMSH'lerinde yapılan immunofloresan boyamalar sonucu, Fibronektin, GFAP, CK19, E-Cadherin, CD146, ve Trophinin gibi belirteçlerde pozitiflik görülürken CD45 ve CD29 gibi belirteçlerde pozitiflik görülmemiştir (Şekil 4.10).



Şekil 4.10: MMSH'lerin immünofloresan yöntemle karakterizasyonu. (A) CD29. (B) FİBRONEKTİN. (C) GFAP. (D) CD146. (E) TENASCİN. (F) CD45. (G) CK19. (H) TROPHİNİN. (I) E CADHERİN.

4.3 MCF7 ve MDA-MB-231 insan meme kanseri hücre dizilerinin kültürü

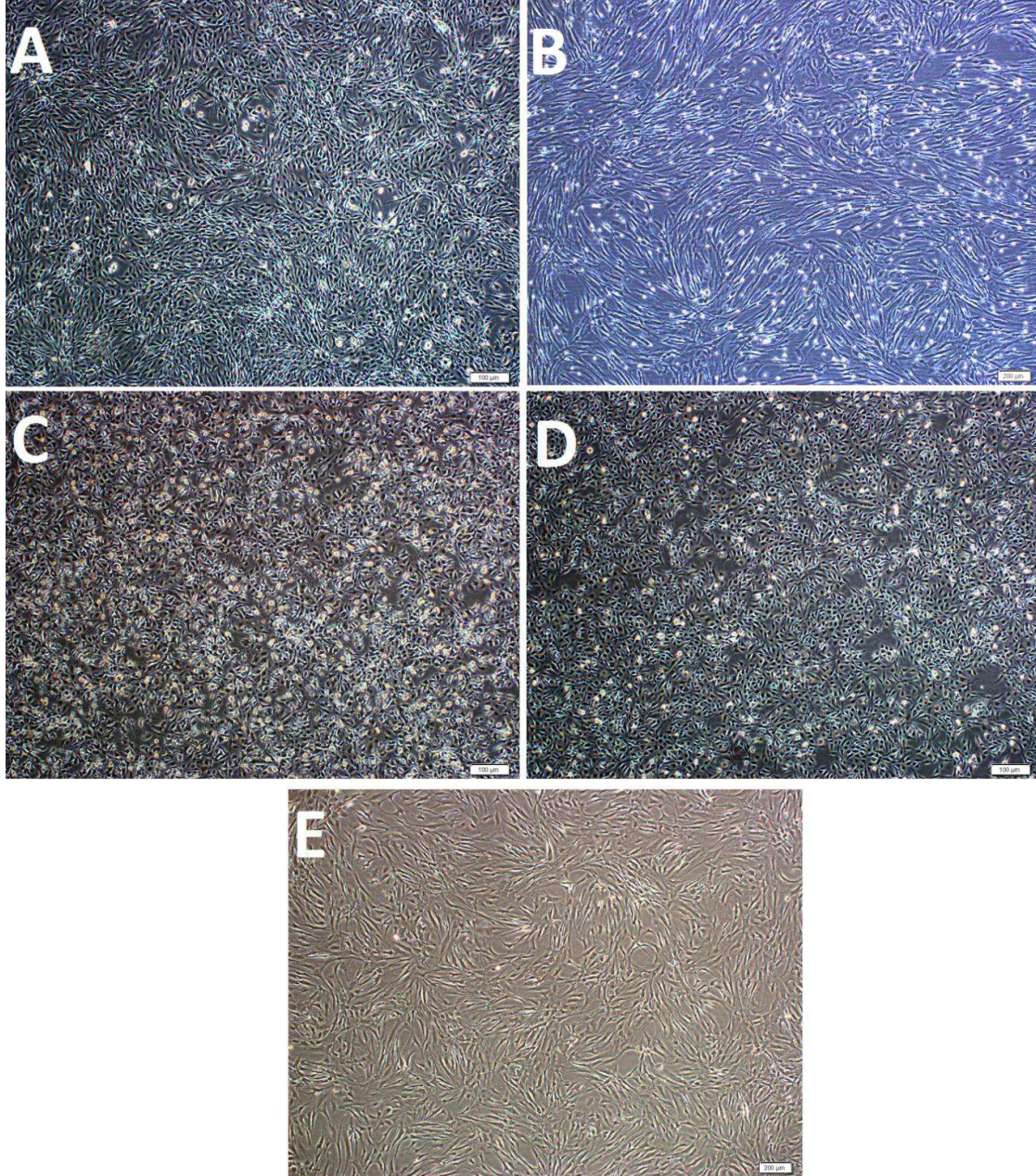
MCF7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre dizileri belirlenen besi yerlerinde uygun şekilde çoğaltılmıştır. Kültür kabındaki çoğalmaları ve büyümeleri mikroskop altında incelenmiştir (**Şekil 4.11**).



Şekil 4.11: (A) MCF-7 ve (B) MDA-MB-231 hücrelerinin zıt faz mikroskopundaki morfolojik görüntüleri (Bar çubukları: A-B 200µm).

4.4 Hücrelerin serumsuz medyuma alınması

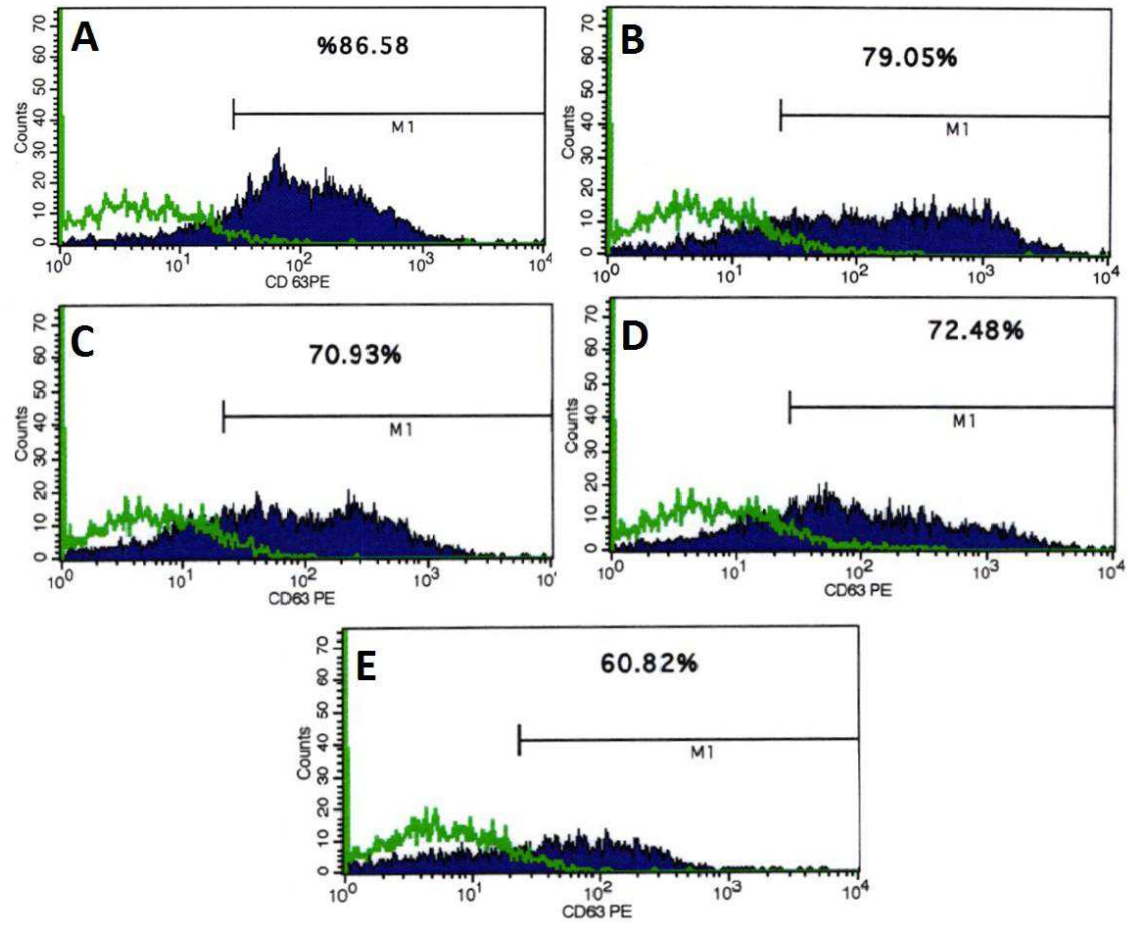
Elde edilen hücrelerden eksozom izolasyonu yapabilmek için kültürdeki hücreler bir gece serumsuz (FBS) besiyerinde bekletilmiştir. Serumdan gelebilecek her türlü maddeyi devre dışı bırakmak ve saf eksozom izolasyonu sağlamak amacıyla hücre kültür kabının tabanında belirli bir yoğunluğa ulaşan hücreler bir gece serumsuz besiyerine alınmıştır. Serumsuz besiyerinde bir gece bekletildikten sonra hücreler mikroskop altında yoğunlukları ve canlılıklarının kontrol edilmesi için incelenmiştir (**Şekil 4.12**).



Şekil 4.12: Bir gece serumsuz besiyerinde bekleyen hücrelerin zıt faz mikroskobundaki morfolojik görüntüleri (A)SMSH, (B)MMSH, (C)MCF-7, (D)MDA-MB-231, (E) Kİ-MKH. (Bar çubukları: A-100 μm , B- 200 μm , C-100 μm , D-100 μm , E-200 μm).

4.5 Eksozomların karakterizasyonu

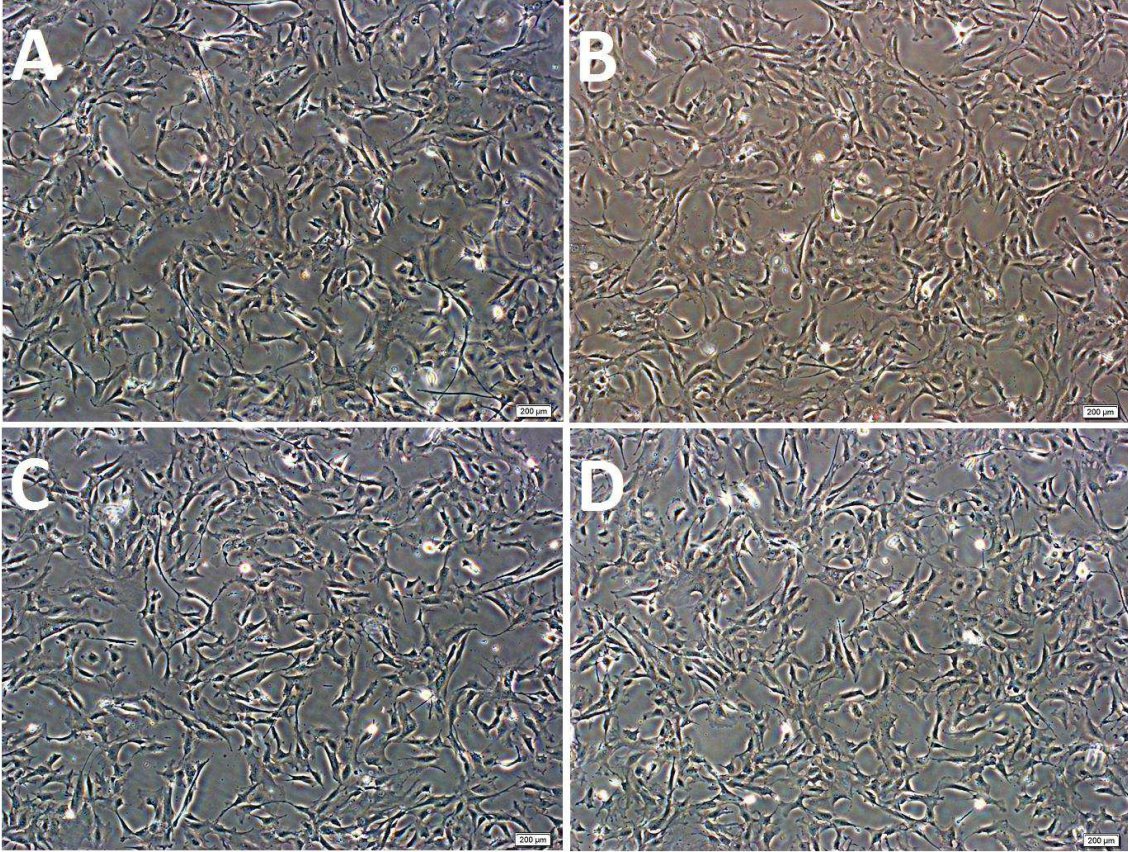
PureExo® Exosome Isolation kit (from cell culture media) ile izolasyonu yapılan eksozomların karakterizasyonu, eksozom belirteci olan CD63 ekspresyonu bakımından akım sitometrik yöntemle incelenmiştir (Şekil 4.13).



Şekil 4.13: Elde edilen eksozomlarda akım sitometri yöntemiyle CD63 ekspresyonu (A) MCF-7, (B) MDA-MB-231, (C) MMSH, (D) SMSH, (E) Kİ-MKH.

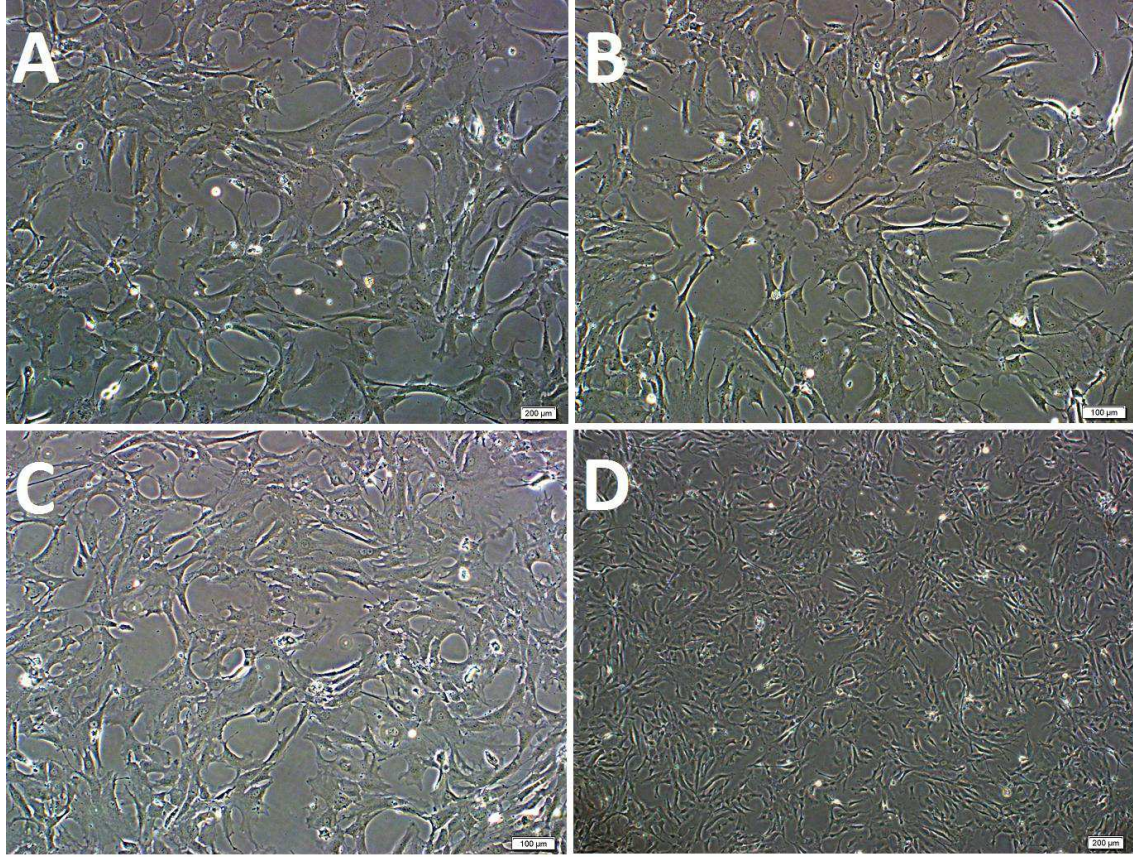
4.6 Eksozomlarla ortak kültür

Kİ-MKH ve SMSH'leri 6 kuyucuklu hücre kültür kaplarına ekilmiş ve kabın tabanına yapışıp belirli bir yoğunluğa ulaştıktan sonra eksozomlarla direk olarak ortak kültüre alınmıştır. Ortak kültüre alınan eksozomlar MCF7, MDA-MB-231, MMSH, Kİ-MKH ve SMSH'lerinden elde edilmiştir. Ortak kültürün devam ettiği günlerde Kİ-MKH ve SMSH'lerindeki morfolojik değişimler mikroskop altında izlenmiştir. Ortak kültürün 1. gününde farklı eksozomlarla inkübe edilen Kİ-MKH'lardaki morfolojik değişimler (**Şekil 4.14**) kontrol olarak kullanılan Kİ-MKH eksozomları ile ortak kültüre göre değerlendirilmiştir.



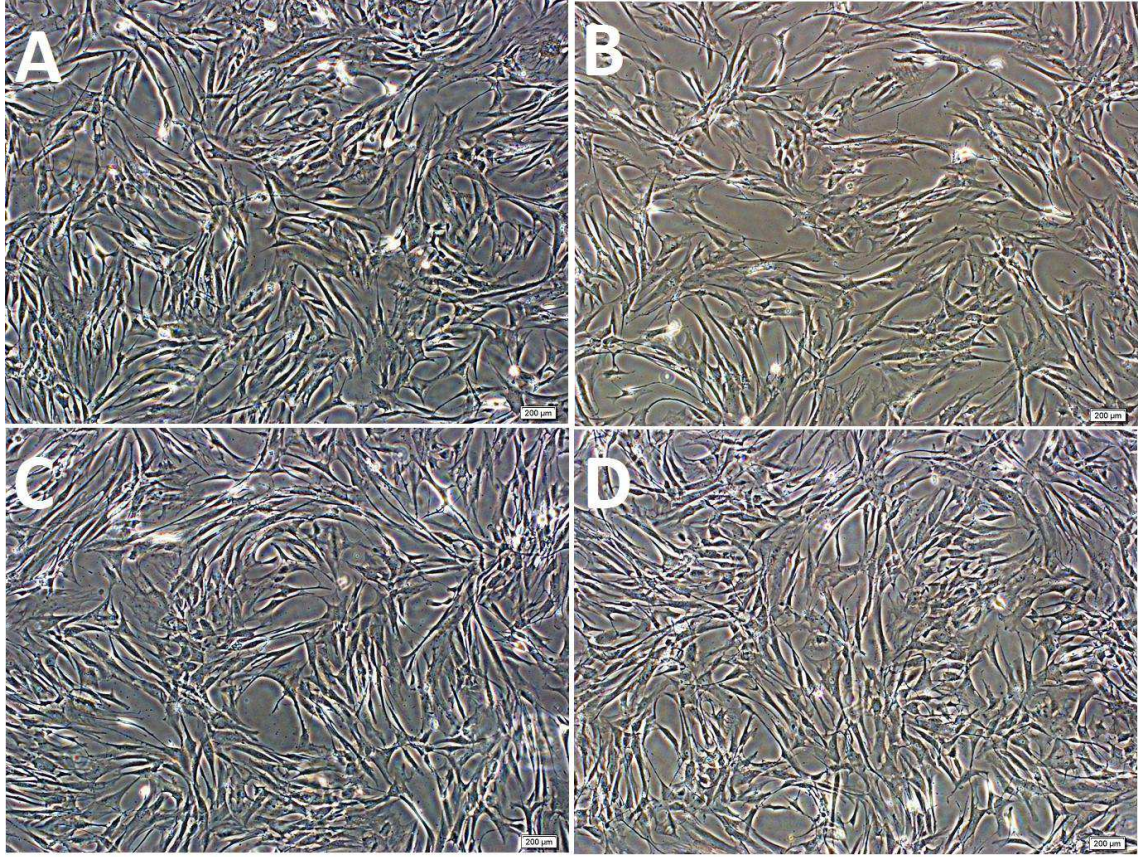
Şekil 4.14: Eksozomlarla ortak kültür sonrası 1.günde Kİ-MKH'ların zit faz mikroskobundaki morfolojik görüntüleri. (A) MCF7 eksozomları (B) MDA-MB-231 eksozomları (C) MMSH eksozomları (D) Kontrol,Kİ-MKH eksozomları. (Bar çubukları: A, B, C, D-200 µm).

Ortak kültürün 2. gününde farklı eksozomlarla inkübe edilen Kİ-MKH'lardaki morfolojik değişimler (Şekil 4.15) kontrol olarak kullanılan Kİ-MKH eksozomları ile ortak kültüre göre değerlendirilmiştir.



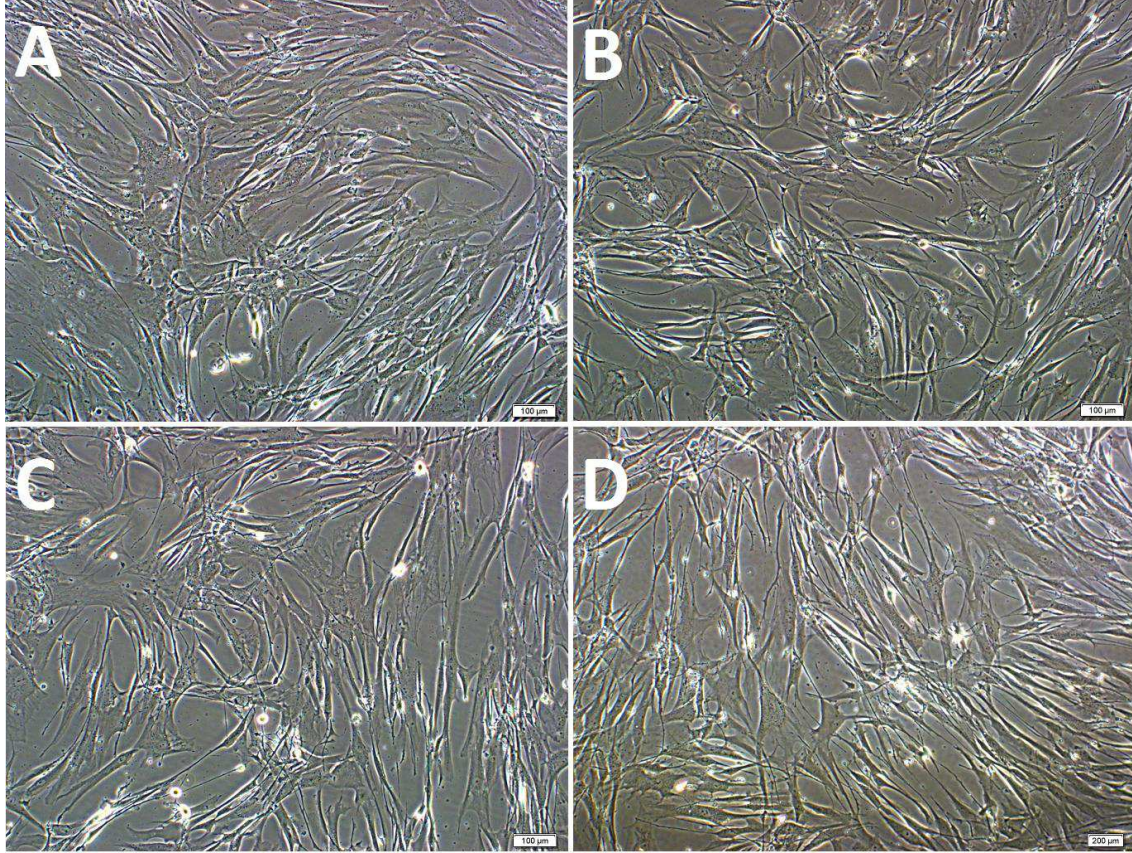
Şekil 4.15: Eksozomlarla ortak kültür sonrası 2.günde Kİ-MKH'ların zıt faz mikroskopundaki morfolojik görüntüleri. (A) MCF7 eksozomları (B) MDA-MB-231 eksozomları (C) MMSH eksozomları (D) Kontrol,Kİ-MKH eksozomları. (Bar çubukları: A, D-200 µm, B, C-100 µm).

Ortak kültürün 1. gününde farklı eksozomlarla inkübe edilen SMSH'lerinin morfolojileri mikroskop altında gözlemlenmiştir (Şekil 4.16). Kontrol olarak kullanılan SMSH'lerinin eksozomları ile ortak kültüre göre değerlendirilmiştir.



Şekil 4.16: Eksozomlarla ortak kültür sonrası 1.günde SMSH'lerinin zıt faz mikroskopundaki morfolojik görüntüleri. (A) MCF7 eksozomları (B) MDA-MB-231 eksozomları (C) MMSH eksozomları (D) Kontrol, SMSH eksozomları. (Bar çubukları: A, B, C, D-200 µm).

Ortak kültürün 2. gününde farklı eksozomlarla inkübe edilen SMSH'lerinin morfolojileri mikroskop altında gözlemlenmiştir (**Şekil 4.17**). Kontrol olarak kullanılan SMSH'lerinin eksozomları ile ortak kültüre göre değerlendirilmiştir.

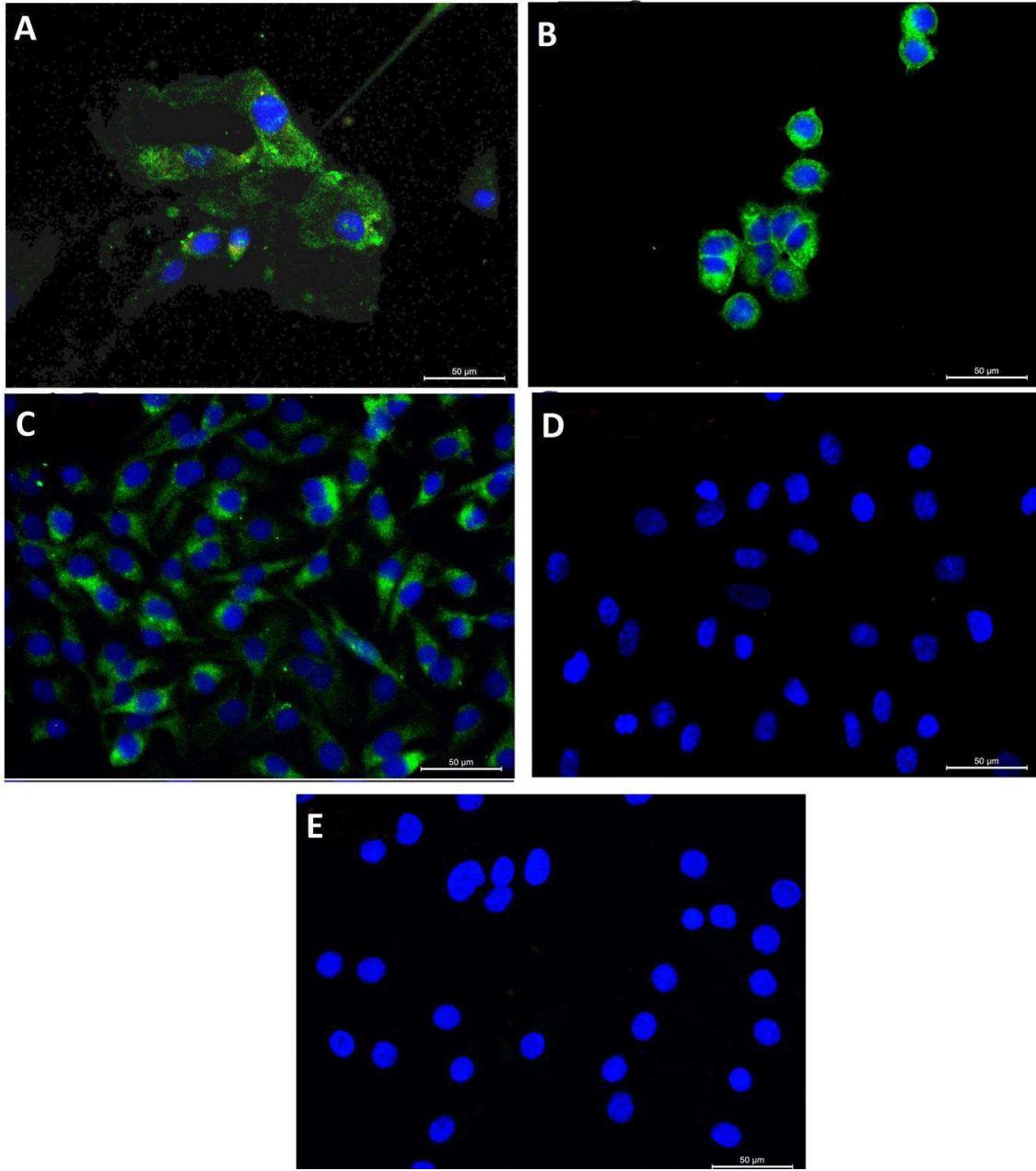


Şekil 4.17: Eksozomlarla ortak kültür sonrası 2.günde SMSH'lerinin zıt faz mikroskopundaki morfolojik görüntüleri. (A) MCF7 eksozomları (B) MDA-MB-231 eksozomları (C) MMSH eksozomları (D) Kontrol, SMSH eksozomları. (Bar çubukları: A, B, C-100 µm, D-200 µm).

4.6.1 Ortak kültür öncesi ve sonrası hücrelerde E-cadherin ekspresyonu

Epitel hücre belirteci olan E-cadherinin Kİ-MKH ve SMSH'lerinde eksozomlarla ortak kültür sonrası değişimi immünofloresan boyama yöntemi kullanılarak incelenmiştir. Ortak kültür yapılmadan önceki E-cadherin ekspresyonuyla ortak kültür sonrası E-cadherin ekspresyonunun farklı olduğu görülmüştür (**Şekil 4.18**). SMSH ve Kİ-MKH'lerde

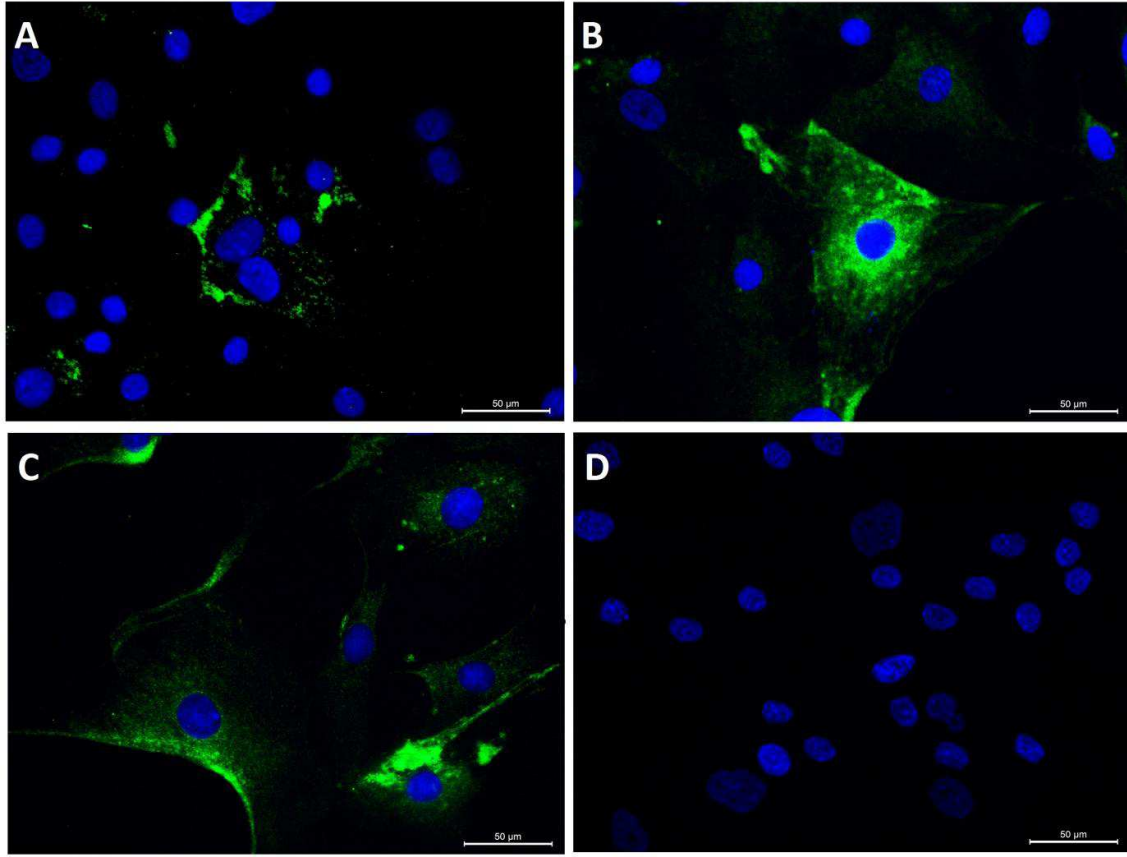
eksozomlarla ortak kültür yapılmadan önce E-cadherin ekspresyonu görülmezken MMSH, MDA-MB-231 ve MCF-7 hücrelerinde ekspresyon belirgin bir şekilde görülmüştür.



Şekil 4.18: Hücrelerde ortak kültür yapılmadan önce E-cadherin ekspresyon düzeylerinin immunofloresan yöntemle gösterimi (A) MMSH (B) MCF-7 (C) MDA-MB-231 (D) SSMH (E) Kİ-MKH. (Bar çubukları: A, B, C, D, E-200 µm).

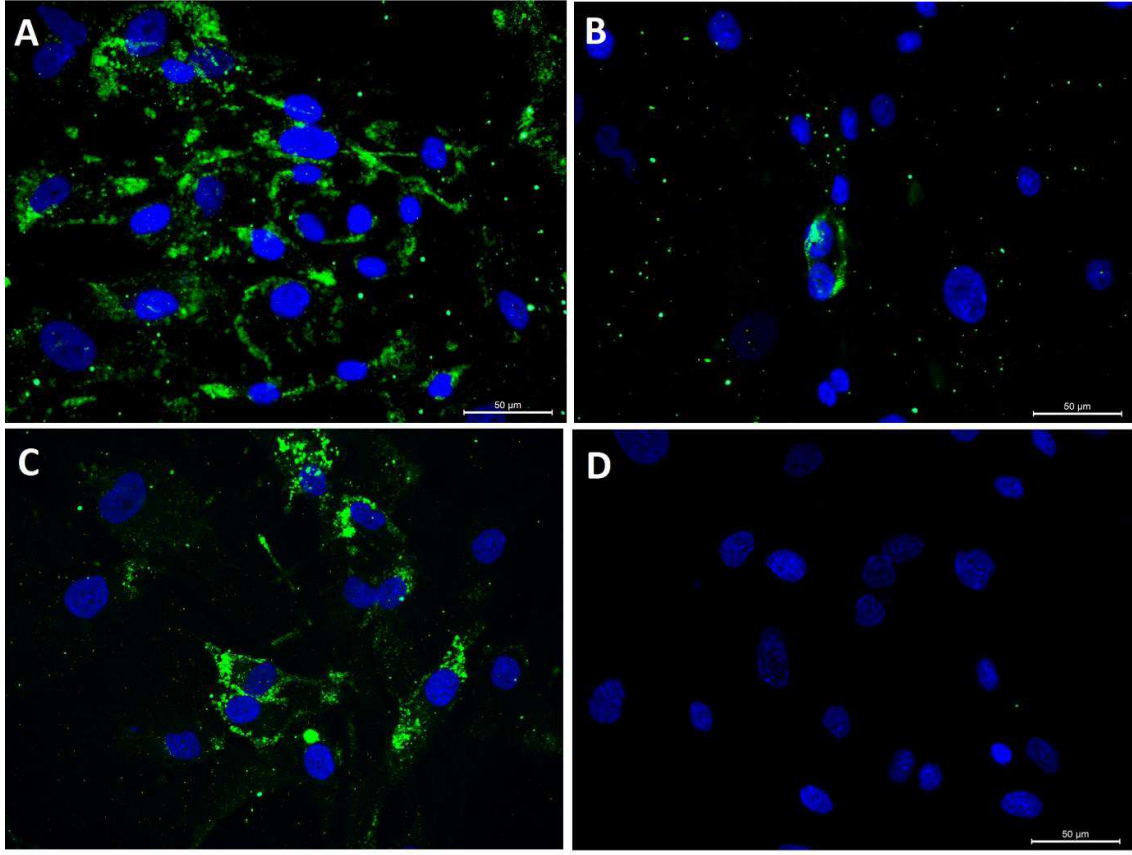
Eksozomlarla ortak kültür sonrası 2.günde Kİ-MKH'larda MMSH eksozomları, MCF-7 eksozomları,ve MDA-MB-231 eksozomları ile ortak kültürde E-cadherin ekspresyonu

gözlenirken kontrol olarak kullanılan Kİ-MKH eksozomları ile ortak kültürde ekspresyon gözlenmemiştir (Şekil 4.19).



Şekil 4.19: Kİ-MKH'lerinde eksozomlarla ortak kültür sonrası 2.günde E-cadherin ekspresyon düzeylerinin immunofloresan yöntemle gösterimi (A) MMSH eksozomları (B) MCF-7 eksozomları (C) MDA-MB-231 eksozomları (D) Kİ-MKH eksozomları. (Bar çubukları: A, B, C, D, E-50 µm).

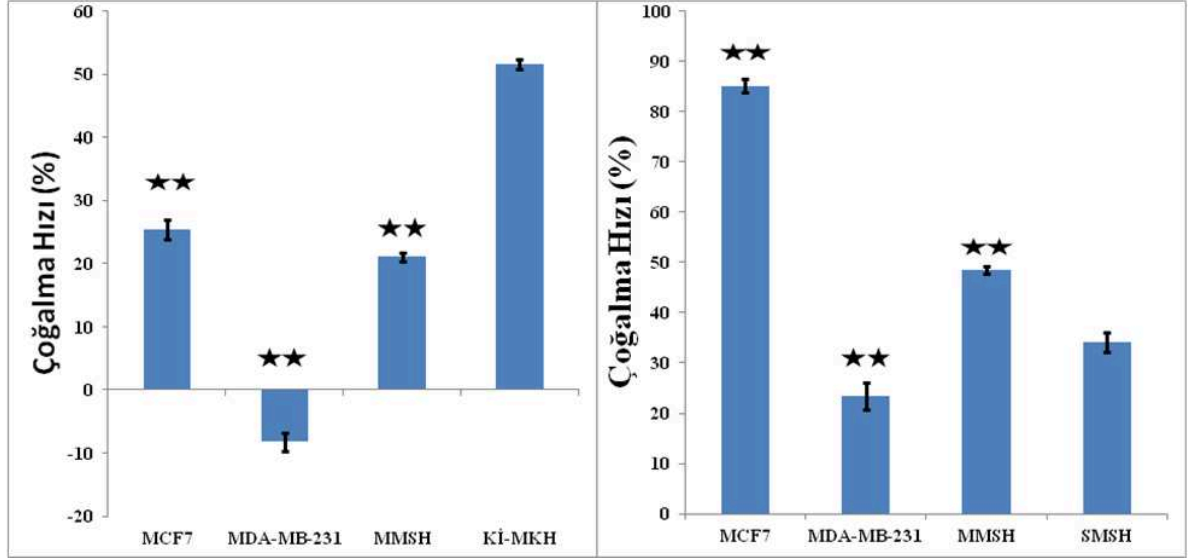
Eksozomlarla ortak kültür sonrası 2.günde SMSH'lerde MMSH eksozomları, MCF-7 eksozomları, ve MDA-MB-231 eksozomları ile ortak kültürde E-cadherin ekspresyonu gözlenirken kontrol olarak kullanılan SMSH eksozomları ile ortak kültürde ekspresyon gözlenmemiştir (Şekil 4.20).



Şekil 4.20: SMSH'lerinde eksozomlarla ortak kültür sonrası 2.günde E-cadherin ekspresyon düzeylerinin immunofloresan yöntemle gösterimi. (A) MMSH eksozomları (B) MCF-7 eksozomları (C) MDA-MB-231 eksozomları (D) SMSH eksozomları. (Bar çubukları: A, B, C, D, E-50 μ m).

4.6.2 Ortak kültür sonrasında WST-1 Proliferasyon Testi

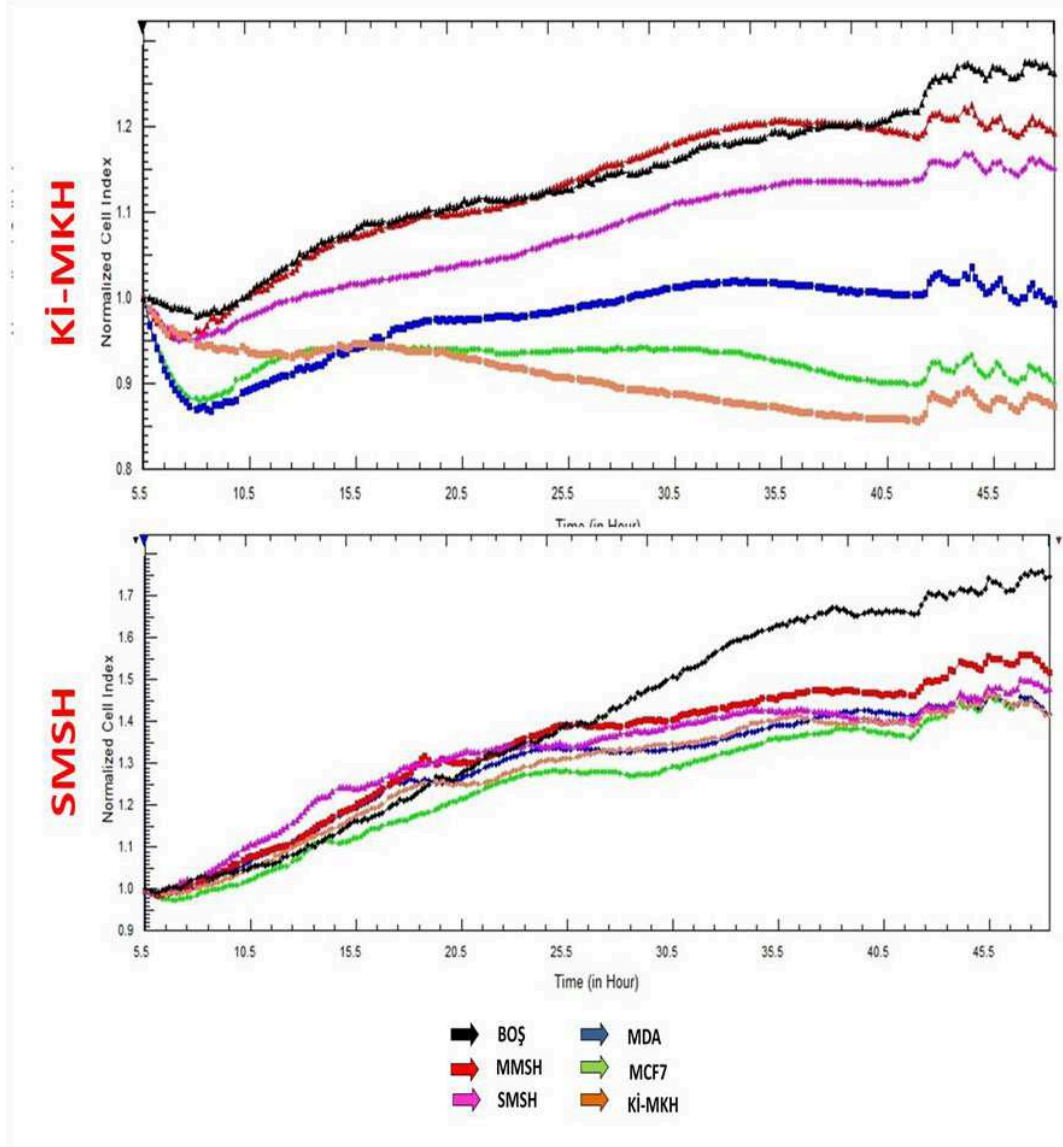
Eksozomlarla ortak kültür sonrası 0 ve 1.günlerde hücrelerin çoğalma kapasiteleri WST-1 yöntemiyle incelenmiştir (**Şekil 4.21**). 0. günde SMSH'lerde MMSH'lerin eksozomları ile birlikte proliferasyonun Kİ-MKH'ların MMSH'lerin eksozomları ile birlikte kültürüne göre anlamlı derecede arttığı görülmüştür ($p=0.0069$). Ortak kültürün 1. gününde SMSH'lerde MMSH'lerin eksozomları ile birlikte proliferasyonun ileri derecede anlamlı olarak arttığı görülmüştür ($p<0.001$). SMSH'lerde, Kİ-MKH'ların ortak kültürlerine göre MCF-7 ($p=0.0029$) ve MDA-MB-231 ($p=0.0013$) eksozomları ile kültür sonucu proliferasyonda anlamlı derecede artış olduğu görülmüştür.



Şekil 4.21: Eksozomlarla ortak kültür sonrası eksozomlar uzaklaştırıldıktan sonra hücrelerdeki çoğalma hızının WST-1 yöntemiyle gösterilmesi ($p < 0.001$).

4.6.3 Ortak kültür sırasında Gerçek-Zamanlı hücre izleme

Eksozomlarla ortak kültür edilen SMSH'leri ve Kİ-MKH'lerin çoğalmaları 1 gün boyunca gerçek zamanlı hücre izleme cihazıyla (RTCA-DP, ACEA Biosciences) takip edilmiştir (Şekil 4.22). Kİ-MKH ve SMSH'lerde MMSH eksozomları ile ortak kültür sonucu en fazla proliferasyon eğrisinin olduğu gözlemlenmiştir.

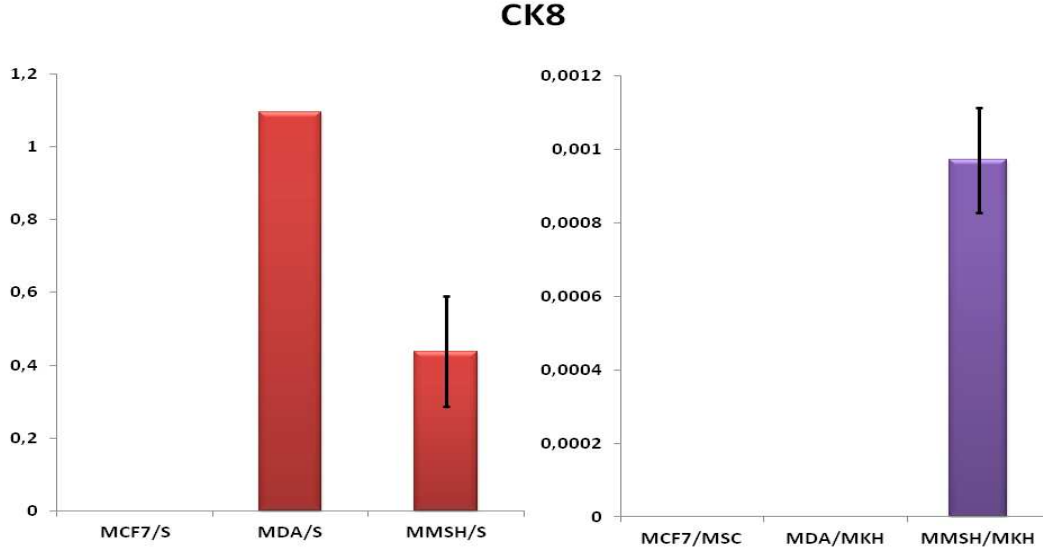


Şekil 4.22:Eksozomlarla ortak kültür sonrası Gerçek-Zamanlı hücre izleme cihazı ile proliferasyonun gösterilmesi. 0 ve 1.günlerde hücrelerin çoğalma kapasiteleri WST-1 sonuçlarını desteklemek amacıyla Gerçek-Zamanlı hücre izleme cihazı (RTCA-DP, ACEA Biosciences) ile incelenmiştir.

4.6.4 Ortak Kültür Sonrası Real time PCR analizi

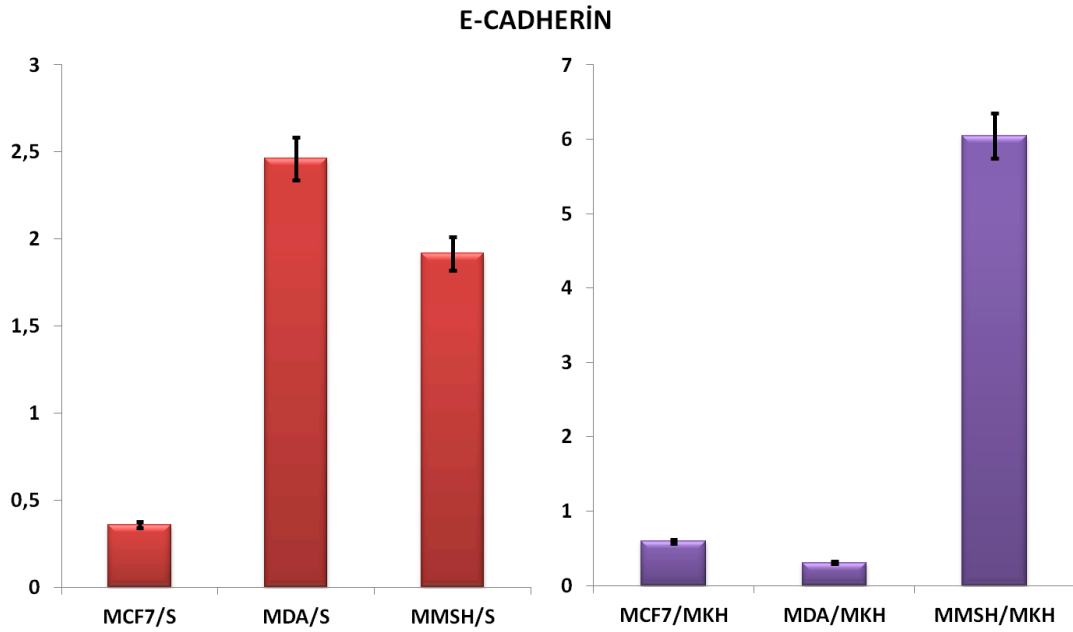
SSMH ve Kİ-MKH'leri ile eksozomların ortak kültürü sonucu Real Time PCR analizi ile CK8 gen ekspresyonu analizi yapılmıştır (**Şekil 4.23**). SSMH (S) lerle eksozomların ortak kültürü sonucu yapılan CK8 analizi sonucu MDA-MB-231 eksozomları

ile birlikte CK8 ekspresyonunun arttığı görülmüştür. Kİ-MKH'ların eksozomlarla kültründe ise CK8 ekspresyonu görülmemiştir.



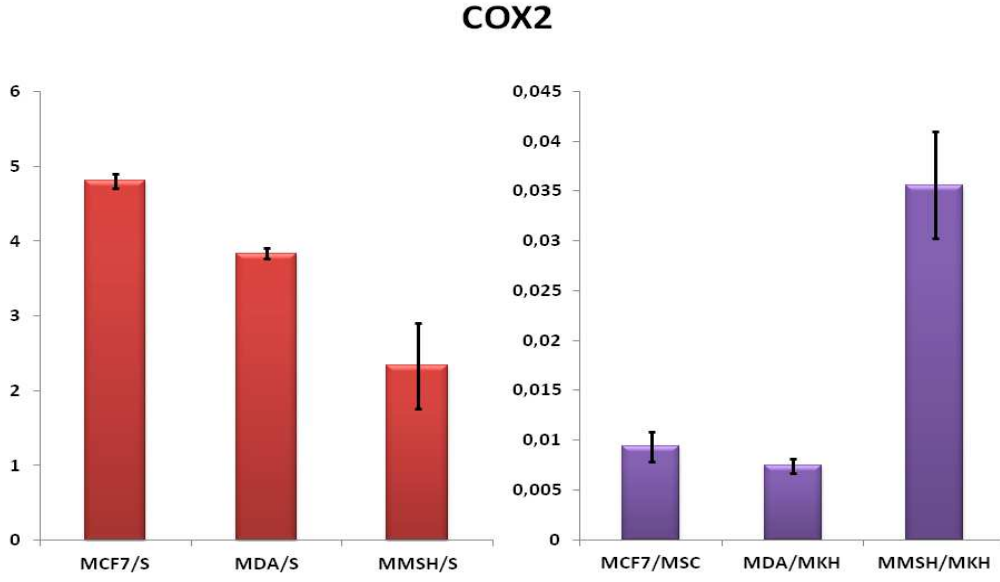
Şekil 4.23: SSSH ve Kİ-MKH'leri ile eksozomların ortak kültrü sonucu Real Time PCR analizi ile CK8 gen ekspresyon grafiği.

SSSH ve Kİ-MKH'leri ile eksozomların ortak kültrü sonucu Real Time PCR analizi ile E-cadherin gen ekspresyonu analizi yapılmıştır (**Şekil 4.24**). SSSH'lerde MDA-MB-231 ve MMSH eksozomları ile ortak kültrü sonrası E-cadherin ekspresyonu artarken Kİ-MKH'larda MMSH eksozomları ile ortak kültrüde belirgin olarak ekspresyon artmıştır.



Şekil 4.24: SMDH ve KI-MKH'leri ile eksozomların ortak kültürü sonucu Real Time PCR analizi ile E-Cadherin gen ekspresyon grafiği.

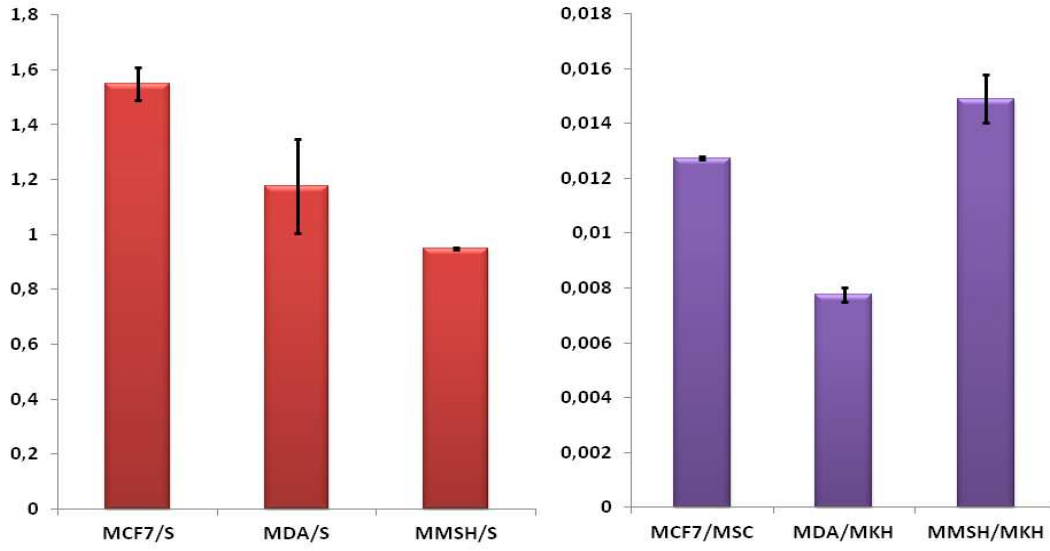
SMDH ve KI-MKH'leri ile eksozomların ortak kültürü sonucu Real Time PCR analizi ile Cox2 gen ekspresyonu analizi yapılmıştır (**Şekil 4.25**). SMDH'lerde MDA-MB-231 MCF-7 ve MMSH eksozomları ile ortak kültür sonrası Cox2 ekspresyonu artarken KI-MKH'larda MDA-MB-231 MCF-7 ve MMSH eksozomları ile ortak kültür sonrası Cox2 ekspresyonu belirgin olarak azalmıştır.



Şekil 4.25: SSMH ve Kİ-MKH'leri ile eksozomların ortak kültürü sonucu Real Time PCR analizi ile COX2 gen ekspresyon grafiği.

SSMH ve Kİ-MKH'leri ile eksozomların ortak kültürü sonucu Real Time PCR analizi ile ERB2B gen ekspresyonu analizi yapılmıştır (**Şekil 4.26**). SSMH'lerde MDA-MB-231 ve MCF-7 eksozomları ile ortak kültür sonrası ERB2B ekspresyonu artarken Kİ-MKH'larda MDA-MB-231, MCF-7 ve SSMH eksozomları ile ortak kültür sonrası ERB2B ekspresyonu belirgin olarak azalmıştır.

ERBB2



Şekil 4.26: SMSH ve Kİ-MKH'leri ile ekzozomların ortak kültürü sonucu Real Time PCR analizi ile ErbB2 gen ekspresyon grafiği.

5. TARTIŞMA

Tümör mikroçevresinin meme kanseri üzerinde kanseri başlatma, büyütme, göç, metastaz ve terapötik direnci artırma gibi özellikleri olduğu önceden gösterilmiştir (Mao et al, 2013). Bu nedenle bu çalışmada primer meme tümör dokusundan elde edilen MMSH'leri ve sağlıklı meme dokusundan elde edilen SMSH'lere odaklanılmıştır. Kanser mikroçevresine içinde yer aldığı dokuya bağlı olarak birçok hücre tipi yer aldığından primer meme kanserinden elde edilen hücreler arasında mezenkimal ve epitel benzeri hücreler gözlemlenmiştir. Bu hücreler onlara özgü belirteçlerle tanımlanmış ve farklı gen ekspresyon profillerine sahip oldukları gösterilmiştir (Gudjonsson et al, 2002). Mikroçevrede bulunan bu kök hücrelerin kanserli hücrelerden etkilendikleri düşünülerek Kİ-MKH hücreleri bu çalışmada kullanılmıştır. Kanser hücreleri ile ilişkili eksozomların stromal ve mezenkimal kök hücreler üzerindeki etkilerinin araştırılmasıyla eksozomun tümör gelişimi üzerindeki etkisi incelenmiştir. Mikroçevrenin içerisinde bulunan hücrelerin birbirlerinden etkilenmeleri hücre-hücre etkileşimiyle olduğu kadar hücrelerin ortama saldıkları eksozomlar aracılığıyla da gerçekleştiğinden tümör gelişimi üzerinde göz ardı edilemeyecek etkilerinin olduğu bu çalışmada gösterilmiştir. Son yapılan çalışmalar eksozomların hücre-hücre etkileşimi olmaksızın hücrelerin birbirinden etkilenmesinde önemli roller üstlendiklerini kanıtlamaktadır. Eksozomların hücrelerarası iletişimde görev alarak hücre polaritesi, farklılaşma, göç, kemoterapi direnci, immünoregülasyon, enflamasyon, pıhtılaşma, anjiyojenez, ve kanser metastazı gibi olguları etkiledikleri yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (Lee et al, 2011). Tümör kaynaklı eksozomların stromal hücreler üzerine etkisi adipoz doku kaynaklı kök hücreler ve meme kanseri hücrelerinden elde edilen eksozomların birlikte stromal hücreler üzerine uygulanmasıyla incelenmiş ve eksozom verilen adipoz doku kaynaklı kök hücrelerin a-SMA ekspresyonunu azaltarak tümörle ilişkili myofibroblastların fenotipini sergilediklerini görülmüştür (Cho et al, 2012).

Bu çalışmada kanser hücrelerinden elde ettiğimiz eksozomların mikroçevre içerisinde bulunan stromal hücrelere ve MKH'lari üzerinde farklılaşma, çoğalma ve gen ekspresyonları bakımından etkilerinin anlaşılması için SMSH'leri ve Kİ-MKH'lar üzerine kanser hücresi kaynaklı eksozomları eklenerek bu kültür ortamındaki değişiklikler araştırılmıştır. İnsan meme kanseri hücre dizileri MCF-7 ve MDA-MB-231 bu çalışmada kullanılmıştır.

Kİ-MKH, SMSH ve MMSH'lerini in-vitro koşullarda kültüre edildiğinde pasaj iki ve üçteki morfolojik görüntülerinde her bir hücre hattında MKH benzeri hücreler elde edildiği gözlemlenmiş, bu hücrelerin MKH belirteci olarak bilinen (CD29, CD44, CD73, CD90) belirteçleri ifade etikleri akım sitometri yöntemiyle gösterilmiştir. Akım sitometri sonuçlarını desteklemek amacıyla yapılan immünohistokimyasal ve immunofloresan boyama yöntemleriyle MKH belirteçlerinin ekspresyonlarına bakılmıştır. İmmünohistokimyasal boyamalarda CD44, connexin 43, C-fos, osteonectin, vimentin ve CD105 belirteçlerinin ekspresyonları incelenmiştir. Bu üç hücrenin mezenkim karakterine sahip olduğu gösterilmesine rağmen MMSH'lerin diğer iki hücreden bazı yönlerden ayrı olduğu bulunmuştur. SMSH ve MMSH'leri arasında karşılaştırmalı olarak incelendiğinde bu belirteçlerden CD44, connexin 43, osteonectin, vimentin ve CD105'in Kİ-MKH'larda olduğu gibi iki hücre dizisinde de pozitif iken c-Fos 'un MMSH'lerinde negatif olduğu görülmüştür.

İmmunofloresan boyamalarda CD29, fibronectin, GFAP, CD146, tenascin-c, CD45, sitokeratin 19, trophinin ve E-cadherin belirteçlerinin ekspresyonları SMSH ve MMSH'leri arasında karşılaştırıldığında bu belirteçlerden fibronectin, GFAP, CD146 ve trophininin her iki hücre dizisinde de pozitif olduğu, hematopoetik kök hücre belirteci olan CD45'in de negatif olduğu saptanmıştır. Epitel hücre belirteçleri, sitokeratin 19 ve E-cadherinin, ise MMSH'de pozitif olmasına rağmen SMSH'lerinde negatif oldukları belirlenmiştir. Bazı belirteçlerin SMSH'lerinde negatif olup MMSH'lerinde pozitif olması stromal hücrelerin kanserli hücrelerden mikroçevre içerisinde etkilendiğini işaret edebilir. Deneyde kullanılan meme kanseri hücre dizileri epitel hücre karakteri taşıdığından MMSH'lerinin de epitel özellik göstermesi bu hücrelerin kanser hücrelerinden etkilenerek farklılaşma yönüne gitmiş olabileceği düşünülmektedir.

Kİ-MKH ve SMSH'lerinin besiyeri içerisine eklenen eksozomlarla iki gün ortak kültürde hücreler bekletilmiş ve ortak kültür sonucunda hücrelerin morfolojisinde herhangi bir değişiklik olup olmadığı araştırılmıştır. Hücrelerdeki morfolojik değişimlere bakıldığında birinci günde MCF-7, MDA-MB-231 ve MMSH eksozomlarının Kİ-MKH'lerinde epitel benzeri birkaç hücre gözlenirken kontrol olarak kullanılan Kİ-MKH eksozomlarının ortak kültüründe herhangi bir morfolojik değişim gözlenmemiştir. Kültürün ikinci gününde MCF-7, MDA-MB-231 ve MMSH eksozomlarının Kİ-MKH'leri ile kültüründe epitel benzeri hücrelerin varlığı gözlenirken kontrol olarak kullanılan Kİ-MKH eksozomlarının ortak kültüründe herhangi bir morfolojik değişim gözlenmemiştir.

Kanser hücre hatları ve tümör dokusu stromal hücrelerinden salınan eksozomlardan etkilenerek Kİ-MKH'lerinin epitel benzeri hücrelere farklılaşması MKH'ların mikroçevredeki kanserli hücrelerin eksozomlarından etkilendiğini göstermektedir. SMSH'lerindeki morfolojik değişimlere bakıldığında Kİ-MKH'lerdeki gibi bir etki görülmüş fakat MMSH'lerinin eksozomları ile ortak kültürde epitel benzeri hücre sayısının daha fazla olduğu görülmüştür. Kontrol olarak kullanılan SMSH eksozomları ile ortak kültürde ise herhangi bir epitel benzeri hücre görülmemiştir.

Eksozomlar ile yaptığımız ortak kültürde kanser hücre hatlarından elde ettiğimiz eksozomların sağlıklı hücreler üzerinde etkisi kanser benzeri bir dönüşüm ile göstermesi beklenmiştir. Hareketli, kutuplu veya iğ şeklinde mezenkimal hücrelerden epitelyum adı verilen düzlemsel ve polarize hücrelere dönüşümü mezenkim-epitel geçişi (MET) olarak adlandırılmaktadır ve geri dönüşümlü biyolojik bir süreçtir. Sabit ve apikal-polarize özelliği, sıkı bağlantı kurma ve E-cadherin gibi hücre-hücre yapışma belirteçleri ile karakterize edilen epitel hücrelerin aksine mezenkimal hücreler, hücre-hücre teması yapmazlar, vimentin, fibronektin ve N-cadherin gibi belirteçleri eksprese ederler. MET'in normal gelişim süreci, kanser metastazı ve uyarılmış pluripotent kök hücrelerin yeniden programlanması durumunda meydana geldiği gösterilmiştir (Baum et al, 2008, Thiery 2002, Hugo et al, 2007). E-cadherin tümörün metastaz potansiyelini iki ayrı yolla etkiler; primer tümör içerisinde doğrudan hücrelerin birbirlerine tutunmalarını arttırarak ve dolaylı olarak b-katenin sinyalizasyonu aracılığıyla kansere teşvik edici genlerin ekspresyonunu etkileyerek (Ponce et al, 2014). E-cadherin kalsiyum bağımlı homotipik hücre-hücre adezyonu ve epitel hücrelerinin normal fenotipi muhafaza edilmesinde rol oynayan bir zar glikoprotein olduğundan E-cadherin ekspresyonunun azalması meme kanserinin invazyonunun artması ile ilişkilendirilir.

Ortak kültürün ikinci günü sonunda Kİ-MKH ve SMSH 'lerinde E-cadherin ekspresyonu immunofloresan boyama yöntemiyle araştırılmıştır. Ortak kültüre alınmadan önce hücrelerde yapılan E-cadherin boyamalarında MMSH, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde E-cadherin pozitif boyanması gözlenirken SMSH'leri ve Kİ-MKH'lerinde herhangi bir pozitiflik gözlenmemiştir. MMSH, MCF-7 ve MDA-MB-231 eksozomları ile birlikte ortak kültür sonrasında Kİ-MKH'lerinde E-cadherin ekspresyonunun az da olsa varlığı görülmüştür. Kontrol olarak kullanılan Kİ-MKH eksozomları ile ortak kültürde ise herhangi bir boyanma görülmemiştir. SMSH'lerinde MMSH, MCF-7 ve MDA-MB-231 eksozomları ile birlikte kültür sonrası E-cadherin ekspresyonunun Kİ-MKH'lerinde

olduğundan daha fazla olduğu görülmüştür. Kontrol olarak kullanılan SMSH eksozomları ile ortak kültürde ise herhangi bir boyanma görülmemiştir. Kİ-MKH'ların kültür sonunda E-cadherin ekspresyon seviyeleri çok düşük olmakla birlikte MMSH eksozomları ile ortak kültür sonrası ekspresyonun daha fazla olduğu dikkat çekmiştir. Kanser karakter kazanan stromal hücrelerin MKH'ları etkileyebileceği ve mikroçevrede bu hücrelerin zamanla kanser hücresi özellikleri kazanabileceği göz ardı edilmemelidir.

Ortak kültür sonrası yapılan E-cadherin gen ekspresyonu analizi sonucunda, SMSH'lerinin MDA-MB-231 ve MMSH eksozomları ile kültüründe E-cadherin ekspresyonunun oldukça yüksek olduğu görülmüştür. MCF-7 eksozomları ile SMSH'lerinin kültüründe ise daha az bir ekspresyonu gözlenmiştir. Stromal hücreler meme kanseri hücre dizilerinden ve MMSH'lerinden etkilenerek eksozomlarla ortak kültür sonrası Kİ-MKH'lerine göre daha kuvvetli epitel karakter kazanmıştır. Deneyde ortak kültür sonrası Kİ-MKH'lerinde E-cadherin ekspresyonunun daha az görülmesinin sebebi olarak kök hücrelerin bu eksozomlara karşı koymak için bir mekanizma geliştirmiş olabileceği düşünülmüştür.

Tümör kaynaklı eksozomların tümörogeneze arabuluculuk ederek kemik iliğini etkilemesi ile metastazı geliştirdiği belirtilmiştir (Peinado et al, 2012). Tümörün ilerlemesi kanser hücrelerinin birbirleriyle ve mikroçevrelerinde bulunan komşuları normal hücrelerle iletişimine bağlıdır. İnsan kanser hücrelerinden elde edilen eksozomlar kanser hücreleri arasında sinyal proteinlerinin taşınması ve invazif aktiviteye katkıda bulunmaları sebebiyle dikkat çekmektedirler. Kanser hücresinden kaynaklanan eksozomlar çeşitli hücre sistemlerinde işlev bozukluğu ve apoptozisi uyarabileceği bildirilmiştir (Aharon ve Brenner, 2009). Marc A. Antonyak ve arkadaşları 2011 de yaptıkları bir çalışmada eksozomların onkogeneze de önemli bir rol oynayabileceği üzerinde durmaktadırlar. İki farklı insan kanser hücre dizisinden (MDA-MB-231 meme karsinoma hücreleri ve U87 glioma hücreleri) elde ettikleri eksozomların normal fibroblastlar ve epitelyal hücreler üzerine kanser hücrelerinin özelliklerini aktardıkları bu çalışma ile gösterilmiştir (Antonyak et al, 2011).

Eksozomlarla ortak kültür edilen Kİ-MKH ve SMSH'lerinde hücrelerin çoğalma kapasiteleri üzerindeki etkilerini görebilmek amacıyla WST-1 Proliferasyon Testi yapılmıştır. Hücre çoğalma analizi sonucunda SMSH'lerinde Kİ-MKH hücrelerine göre daha fazla çoğalma görülmüştür. MMSH'lerinin eksozomları ile SMSH'lerinin ortak kültürü sonucu SMSH'lerinde MCF-7 ve MDA-MB-231 eksozomları ile ortak kültürdekinden daha yüksek bir çoğalma olduğu gözlenmiştir. Buna karşın Kİ-MKH'lerinde çoğalmada yavaşlama hatta

durma gözlenmiştir. Kontrol olarak kullanılan SMSH'leri ve Kİ-MKH'ların eksozomları ile ortak kültür sonucunda artışta anlamlı bir fark görülmemiştir. WST-1 sonuçlarını desteklemek amacıyla Gerçek-Zamanlı hücre izleme cihazı ile incelenmiş ve WST-1 sonuçları ile karşılaştırıldığında yine Kİ-MKH ve SMSH'lerinin MMSH'leri eksozomları ile birlikte çoğalmalarının diğer eksozomlara göre daha fazla arttığı görülmüştür. Bu sonuç, primer dokudan izole edilen MMSH'lerinin hücreler üzerindeki etkisinin kanser hücre hatlarına nazaran daha kuvvetli olduğu söylenebilir. Bu etki kanser hücresi olmayan ama tümör mikroçevresinden alınmış stromal hücrelerin kanser hücresinden etkilendiğini ve bu stromal hücrelerin aynı ortamı paylaştığı diğer hücreleri de eksozomlar aracılığı ile etkilediğinin bir göstergesidir.

Çoğalmanın yanında ilgili belirteçler ile kanser özelliklerinin kazanımı incelenmiştir. Gen ekspresyon analizlerinde CK8, COX-2, E-cadherin ve ERBB2 genlerinin ekspresyonlarına bakılmıştır. CK8 (sitokeratin-8 veya keratin-8) duktal meme karsinomadan lobular meme karsinomaya farklılaşmada ifade edilen bir belirteçtir (Moriya et al, 2006). Sonuçlarımızda CK8 ekspresyonu Kİ-MKH ile eksozomların ortak kültüründe gözlenmezken, SMSH'lerinde MDA-MB-231 ve MMSH eksozomları ile ortak kültürde eksprese olduğu görülmüştür. SMSH'lerinin MCF-7 eksozomları ile ortak kültüründe ise CK8 ekspresyonu görülmemiştir. Kİ-MKH'larda CK8 ekspresyonunun görülmemesi meme kanseri ileri safhalarında bu belirtecin ifade olması ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. MKH'ların aynı zamanda kanser hücrelerinden etkilenmemek için savunma mekanizması geliştirdiği de düşünülmektedir.

COX-2 temelde dokularda sınırlı düzeyde ifade edilmekte (Williams et al, 1999; Herschman 1996). Ancak COX2 sitokinler, büyüme faktörleri, onkojenler gibi pek çok uyarıyla indüklenebilmekte ve inflamatuvar yanıtın önemli bir parçasıdır. COX-2'nin bazal durumlarda, dokulardaki düzeyi çok az ya da saptanamayacak düzeydedir. Değişik organ ve sistemlerde COX-2 farklı fonksiyonlar üzerine etkilidir. COX-2 upregulasyonu özellikle kolon kanserlerinde dikkat çekicidir. COX-2 normal kolonik mukozada tayin edilemezken kolorektal adenokarsinomların %85' inde artmış olarak bulunur. Benzer olarak COX-2 immunhistokimyasal olarak normal meme dokusunda bulunmazken, meme karsinomlarının %40'ında yüksek oranda ifade ettiği bildirilmiştir. Bunlar ve diğer organların kanserlerine ait benzeri veriler COX2 upregulasyonunun insan karsinomlarında sık bir bulgu olduğunu göstermektedir (Boland et al, 2004; Ristimaki et al, 2002).

Deneyde COX-2 gen ekspresyonunun SMSH'leri ile eksozomların ortak kültüründe yüksek oranda ifadesi olduğu görülmüştür. Özellikle MCF-7 ve MDA-MB-231 eksozomları ile ortak kültürdeki SMSH'lerinde MMSH eksozomlarına oranla daha yüksek bir COX-2 ekspresyonu görülmüştür. Kİ-MKH'larla eksozomların ortak kültüründe ise COX-2 ekspresyon çok az miktarda gözlenmiştir. En fazla COX-2 ekspresyonu Kİ-MKH ve MMSH eksozomları ile ortak kültürde görülmüştür. Önemli bir nokta olarak, hücre kültürlerinde yapılan çalışmalar yüksek COX-2 ekspresyonunun epitelyal hücrelerin hücre-dışı-matrikse yapışmasını kolaylaştırdığı ve hücreleri apoptoza dayanıklı hale getirerek tümörojenik potansiyel kazandırdığı gösterilmiştir. Bu fenotipik değişiklikler yüksek seçici COX-2 inhibitörleri verilerek geriye döndürülmüştür (Tsuji ve DuBois, 1995). COX-2 ekspresyonunun SMSH'lerinin meme kanseri hücre dizileri ve MMSH eksozomları ile ortak kültüründe yüksek olmasının sebebi bu hücrelerin epitel karakter kazanmaya başlaması ile tümörojenik özelliğe yaklaşmış olabilecekleri düşünülmüştür. COX-2'nin tümör oluşumunda kanser hücrelerinin apoptoza karşı direnç kazandırarak sürecin desteklenmesine neden olduğu bildirilmiştir (Dempke et al, 2001). WST-1 sonuçlarının gösterdiği gibi apoptoz sürecinde bu hücrelerin COX-2 ile paralel olarak direnç gösterdiği ve proliferasyonlarını arttırdığı görülmüştür. Meme karsinomlarında artmış COX2 protein seviyeleri farklı çalışmalarda %17 ile %84 arasında değişmekle birlikte yaklaşık olarak %40 civarında tespit edilmiştir (Boland et al, 2004; Ristimaki et al, 2002).

COX-2 protein daha çok tümör epitelyumunda bulunmakla birlikte ihmal edilebilir düzeyde normal epitelde de bulunmaktadır. Kİ-MKH'lar ve eksozomlarla yapılan ortak kültürde ise çok az seviyede ekspresyon olması normal hücrelerde de bu genin az da olsa eksprese olduğunun bir göstergesi olarak düşünülmüştür. Kİ-MKH'larla MMSH eksozomları ile ortak kültürde MDA-MB-231 ve MCF-7 eksozomları ile ortak kültüre oranla daha fazla COX-2 ekspresyonu görülmesi de tümör stromasında bu genin daha fazla ifade edildiğini gösteren bir kanıt olarak düşünülmüştür. COX-2 upregulasyonu transgenik farelerin ve kemirgenlerin karsinojene bağlı meme tümörlerinde de tespit edilmiştir (Hamid et al,1999; Robertson et al 1998).

İnsan meme kanserlerindeki COX-2 yüksek ifadesi hastalığın agresyonu, artmış tümör boyutu, yüksek tümör derecesi, artmış mitoz sayısı, hormon reseptör negatifliği ve HER2 (human epidermal growth factor receptor 2; c-ERBB2) ifadesindeki artış ile bazı parametrelerle uyumluluk göstermektedir (Boland et al, 2004; Wulfing et al, 2003; Ristimaki

et al, 2002; Oshima et al, 1996). Gen ekspresyonu sonuçlarımızda ERBB2 ve COX-2 gen ekspresyonları birbiri ile uyumlu görülmüştür.

ERBB2 (HER2) insan meme kanserlerinde sık ifade edilen bir gendir. C-erbB-2 onkogeni normal hücrelerde tek kopya halinde olup 17.kromozomda lokalizedir.. HER2, epidermal büyüme faktörü reseptör (EGFR/ERBB) ailesinin bir üyesidir. ERBB2 gen ekspresyonu sonucunda da COX-2 ile hemen hemen aynı ekspresyon profili görülmüştür. Kİ-MKH'lerinin eksozomlarla kültüründe az bir ekspresyon görülürken SMSH'lerinin eksozomlarla kültüründe ERBB2 ekspresyonunun yüksek oranda olduğu görülmüştür. Bu onkogenin yüksek ifadesi agrasif tipteki meme kanserinde, kanserin ilerlemesi ve gelişiminde önemli rol oynadığı gösterilmiştir. En yüksek ERBB2 ekspresyonu da metastatik meme kanseri hücre dizileri olan MDA-MB-231 ve MCF-7 eksozomları ile SMSH'lerin ortak kültüründe görülmüştür. MMSH eksozomları ile SMSH'lerinin ortak kültüründe ERBB2 ekspresyonunun varlığının, stromal hücrelerin kanser hücrelerinden etkilendiğinin bir göstergesi olabileceği düşünülmüştür. Son yıllarda bu protein meme kanseri hasta vakalarının yaklaşık %30'u için bir belirteç ve tedavi için önemli bir hedef haline gelmiştir (Mitri et al, 2012).

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Karmaşık kanser türlerine karşı tedavide başarı; tümör içindeki farklı bileşenlerin arasındaki etkileşimlerin inceliklerini tam olarak anlamamıza bağlıdır. Kanser hücrelerinden tümör içerisine ve tümör mikroçevresine salınan moleküllerin mikroçevredeki diğer hücreleri etkilemesinde rolü olan faktörlerin bilinmesi bu hücrelerin çevresindeki hücreleri kendine benzetmesine ve kanserin metastazının önlenmesine olanak sağlayacaktır. Hücrelerin mikroçevrelerine salgıladıkları ve salgılandığı hücrenin antijen açısından birer kopyası olan eksozomlar önemli fonksiyonları olan ve hücre içi ve hücre dışı iletişimde büyük rol oynayan küçük partiküllerdir. Eksozomların hücreler arası iletişimde büyük bir öneme sahip olması bu partiküller üzerine yapılan çalışmaların artmasına sebep olmuştur. Kanser hücrelerinin etki mekanizmasının anlaşılabilmesi için bu hücrelerden salgılanan eksozomların araştırılması gerekmektedir. Neoplastik hücrelerden salgılanan eksozomların antijen açısından orijinal hücrelerin birer kopyası olmaları eksozomların kanser immünoterapisinde kullanımı için umut vaad etmektedir (Suntres et al, 2013).

Meme kanseri hücrelerinin stromal ve kök hücreler üzerine etkisinin anlaşılması için doğrudan kanser hücrelerinin ve mikroçevrede bulunan kanserle ilişkili olduğu düşünülen hücrelerin eksozomları ile yapılan ortak kültür sonucunda hücre-hücre etkileşimi olmaksızın eksozomlar aracılığıyla stromal ve kök hücrelerin kanser hücrelerinden etkilendiği gösterilmiştir. E-cadherin immün boyamaları, WST-1 hücre çoğalma analizi sonuçları ve gen ifadelerine göre Kİ-MKH'lerin kanser hücre eksozomlarından SMSH'leri ile karşılaştırıldığında daha az etkilendikleri görülmüş, kök hücrelerin kansere karşı direnç gösterdikleri ve çoğalmalarını yavaşlatarak kanser hücrelerinin salgılarından gelebilecek etkiyi azaltmaya çalıştıkları gözlemlenmiştir. MMSH'lerinin eksozomları ile yapılan ortak kültürde hücre çoğalımının, E-cadherin ekspresyonunun ve E-cadherin gen ifadesinin kanser hücre dizilerinin eksozomları ile ortak kültüre göre fazla olması mikroçevredeki kanserden etkilenen hücrelerin salgıladıkları eksozomlarla ortamdaki diğer hücreleri etkileyebileceklerini göstermiştir. Mikroçevredeki hücreler tümör içerisindeki kanser hücrelerinden etkilenip çevrelerindeki sağlıklı hücrelere eksozomları aracılığıyla kanser hücre karakteri kazandırabilirler.

Eksozomlar farklı hücre tipleri arasında güçlü bir genetik bilgi aktarımı kaynağıdır. Eksozomların daha iyi anlaşılması ve tam olarak mekanizmasının çözümlenmesi ile kanser hücrelerinin ve mikroçevredeki diğer hücrelerin birbirleri ile

etkileşim basamakları anlaşılabilir ve kansere karşı hücrelerin verecekleri tepkiler ile kanserin hücrelere yapacağı etkilerin önüne geçilebilmek için tedavi yöntemleri geliştirilebilir. Kanser tedavisinde kanser hücrelerinin yok edilmesi hedeflenirken mikroçevredeki diğer hücrelerin de kanser hücrelerine benzer özellikler kazandığı düşünülmelidir.

KAYNAKLAR

- Aharon A, Brenner B. (2009). Microparticles, thrombosis and cancer. *Best Pract Res Clin Haematol* 22: 61-69.
- Al-Nedawi, K., Meehan, B., Micallef, J., Lhotak, V., May, L., Guha, A. and Rak, J. (2008). Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. *Nat. Cell Biol.* 10, 619-624.
- Antonyak MA, Li B, Boroughs LK, Johnson JL, Druso JE, Bryant KL, Holowka DA, Cerione RA. (2011). Cancer cell-derived microvesicles induce transformation by transferring tissue transglutaminase and fibronectin to recipient cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108(12):4852-7.
- Azmi AS, Bao B, Sarkar FH. (2013). Exosomes in cancer development, metastasis, and drug resistance: a comprehensive review. *Cancer Metastasis Rev.* 32(3-4):623-42.
- Baum B, Settleman J, Quinlan MP. (2008). Transitions between epithelial and mesenchymal states in development and disease. *Semin Cell Dev Biol.* 19(3):294-308.
- Boland GP, Butt IS, Prasad R, Knox WF, Bundred NJ. (2004). COX-2 expression is associated with an aggressive phenotype in ductal carcinoma in situ. *Br J Cancer,* 90:423-429.
- Brinkley BR, Beall PT, Wible LJ, Mace ML, Turner DS, Cailleau RM. (1980). Variations in cell form and cytoskeleton in human breast carcinoma cells in vitro. *Cancer Res.* 40(9):3118-29.
- Brown JR, DuBois RN. (2005). COX-2: a molecular target for colorectal cancer prevention. *J Clin Oncol.* 23(12):2840-55.
- Camussi G, Quesenberry PJ. (2013). Perspectives on the Potential Therapeutic Uses of Vesicles. *Exosomes microvesicles intech,* Vol. 1, 6.
- Cho JA, Park H, Lim EH, Lee KW. (2012). Exosomes from breast cancer cells can convert adipose tissue-derived mesenchymal stem cells into myofibroblast-like cells. *Int J Oncol.* 40(1):130-8.
- Clarke MF, Fuller M. (2006). Stem cells and cancer: two faces of eve. *Cell.* 124(6):1111-5.
- Del Conde I, Shrimpton CN, Thiagarajan P, López JA. (2005). Tissue-factor-bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation. *Blood.* 106(5):1604-11.
- Dempke W, Rie C, Grothey A, Schmol HJ. (2001). Cyclooxygenase-2: a novel target for cancer chemotherapy? *J Cancer Res Clin Oncol.* 127(7):411-7.
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 8(4):315-7.
- Entrez Gene: CD63 CD63 molecule.
- Fridenshtein AI. (1982). Stromal bone marrow cells and the hematopoietic microenvironment. *Arkh Patol.* 44(10):3-11.
- Friend, C., Marovitz, W., Henie, G., Henie, W., Tsuei, D., Hirschhorn, K., Holland, J. G. and Cuttner, J. (1978). Observations on cell lines derived from a patient with Hodgkin's disease. *Cancer Res.* 38, 2581-2591.
- Ginestra A, La Placa MD, Saladino F, Cassarà D, Nagase H, Vittorelli ML. (1998). The amount and proteolytic content of vesicles shed by human cancer cell lines correlates with their in vitro invasiveness. *Anticancer Res.* 18(5A):3433-7.
- Ginestra A, Miceli D, Dolo V, Romano FM, Vittorelli ML. (1999). Membrane vesicles in ovarian cancer fluids: a new potential marker. *Anticancer Res.* 19(4C):3439-45.
- Hamid R, Singh J, Reddy BS, Cohen LA. (1999). Inhibition by dietary menhaden oil of cyclooxygenase- 1 and - 2 in N- nitrosomethylurea- induced rat mammary tumors. *Int J Oncol,* 14:523-528.
- Hayes, R. (2006) *Stem Cells and Public Policy,* 4-5. USA The Century Foundation Press.
- Herschman HR. (1996). Prostaglandin synthase 2. *Biochim Biophys Acta.* 1299(1):125-40.
- <http://www.cancer.gov>

<http://www.memesagligi.com/meme-kanseri/>

Hugo H, Ackland ML, Blick T, Lawrence MG, Clements JA, Williams ED, Thompson EW. (2007). Epithelial--mesenchymal and mesenchymal--epithelial transitions in carcinoma progression. *J Cell Physiol.* 213(2):374-83.

Iero, M., Valenti, R., Huber, V., Filipazzi, P., Parmiani, G., Fais, S. and Rivoltini, L. (2008). Tumour-released exosomes and their implications in cancer immunity. *Cell Death Differ.* 15, 80-88.

İnan S.Özbilgin K, Kök Hücre Biyolojisi, Sağlıkta Birikim Dergisi, Cilt:1, Sayı:5.

Karaöz, E., Ovalı, E. (2004). Kök Hücreler, 1-15. Türkiye:Derya Kitapevi.

Korkaya H, Kim G, Davis A, Malik F, Henry NL, Ithimakin S, Quraishi AA, Tawakkol N, D'Angelo R, Paulson AK, Chung S, Luther T, Paholak HJ, Liu S, Hassan KA, Zen Q, Clouthier SG, Wicha MS. (2012). Activation of an IL6 inflammatory loop mediates trastuzumab resistance in HER2+ breast cancer by expanding the cancer stem cell population. *Mol Cell.* 47(4):570-84.

Lee TH, D'Asti E, Magnus N, Al-Nedawi K, Meehan B, Rak J. (2011). Microvesicles as mediators of intercellular communication in cancer--the emerging science of cellular 'debris'. *Semin Immunopathol.* 33(5):455-67.

Lima LG, Leal AC, Vargas G, Porto-Carreiro I, Monteiro RQ. (2013); Intercellular transfer of tissue factor via the uptake of tumor-derived microvesicles. *Thromb Res;* 132(4):450-6.

Mack, M., Kleinschmidt, A., Bruhl, H., Klier, C., Nelson, P. J., Cihak, J., Plachy, J., Stangassinger, M., Erfle, V. and Schlondorff, D. (2000). Transfer of the chemokine receptor CCR5 between cells by membrane-derived microparticles: a mechanism for cellular human immunodeficiency virus 1 infection. *Nat. Med.* 6, 769-775.

Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, Brooks M, Reinhard F, Zhang CC, Shipitsin M, Campbell LL, Polyak K, Briskin C, Yang J, Weinberg RA. (2008). The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell.* 133(4):704-15.

Mao Y, Keller ET, Garfield DH, Shen K, Wang J. (2013). Stromal cells in tumor microenvironment and breast cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 32(1-2):303-15.

Matrisian L. (2007). The Tumor Microenvironment, *Scientists on Science:* 1-4.

Mitri Z, Constantine T, O'Regan R. (2012). The HER2 Receptor in Breast Cancer: Pathophysiology, Clinical Use, and New Advances in Therapy. *Chemother Res Pract.* 743193.

Moreno-Bueno G, Portillo F, Cano A. (2008). Transcriptional regulation of cell polarity in EMT and cancer. *Oncogene.* 27(55):6958-69.

Moriya T, Kasajima A, Ishida K, Kariya Y, Akahira J, Endoh M, Watanabe M, Sasano H. (2006). New trends of immunohistochemistry for making differential diagnosis of breast lesions. *Med Mol Morphol.* 39(1):8-13.

Muralidharan-Chari V, Clancy JW, Sedgwick A, D'Souza-Schorey C. (2010). Microvesicles: mediators of extracellular communication during cancer progression. *J Cell Sci.* 123(Pt 10):1603-11.

Oshima M, Dinchuk JE, Kargman SL, Oshima H, Hancock B, Kwong E, Trzaskos JM, Evans JF, Taketo MM. (1996). Suppression of intestinal polyposis in Apc716 knockout mice by inhibition of cyclooxygenase 2 (COX-2). *Cell.* 87:803-809.

Ovalı E. Laboratuarda Kök Hücre. *Atı Teknoloji.*

Peinado H, Alečković M, Lavotshkin S, Matei I, Costa-Silva B, Moreno-Bueno G, Hergueta-Redondo M, Williams C, Garcia-Santos G, Ghajar C, Nitadori-Hoshino A, Hoffman C, Badal K, Garcia BA, Callahan MK, Yuan J, Martins VR, Skog J, Kaplan RN, Brady MS, Wolchok JD, Chapman PB, Kang Y, Bromberg J, Lyden D. (2012). Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat Med.* 18(6):883-91.

Place AE, Jin Huh S, Polyak K. (2011). The microenvironment in breast cancer progression: biology and implications for treatment. *Breast Cancer Res.;* 13(6):227.

Ponce E, Louie MC, Sevigny MB. (2014). Acute and chronic cadmium exposure promotes E-cadherin degradation in MCF7 breast cancer cells. *Mol Carcinog.*

- Ristimaki A, Sivula A, Lundin J, Lundin M, Salminen T, Haglund C, Joensuu H, Isola J. (2002). Prognostic significance of elevated cyclooxygenase-2 expression in breast cancer. *Cancer Res*, 62:632-635.
- Robertson FM, Parrett ML, Joarder FS, Ross M, Abou-Issa HM, Alshafie G, Harris RE. (1998). Ibuprofen-induced inhibition of cyclooxygenase isoform gene expression and regression of rat 40 mammary carcinomas. *Cancer Lett*, 122:165-175.
- Samavarchi-Tehrani P, Golipour A, David L, Sung HK, Beyer TA, Datti A, Woltjen K, Nagy A, Wrana JL. (2010). Functional genomics reveals a BMP-driven mesenchymal-to-epithelial transition in the initiation of somatic cell reprogramming. *Cell Stem Cell*. 7(1):64-77.
- Sanderson, M. P., Keller, S., Alonso, A., Riedle, S., Dempsey, P. J. and Altevogt, P. (2008). Generation of novel, secreted epidermal growth factor receptor (EGFR/ErbB1) isoforms via metalloprotease-dependent ectodomain shedding and exosome secretion. *J. Cell Biochem*. 103, 1783-1797.
- Shin SY, Rath O, Zebisch A, Choo SM, Kolch W, Cho KH. (2010). Functional roles of multiple feedback loops in extracellular signal-regulated kinase and Wnt signaling pathways that regulate epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Res*. 70(17):6715-24.
- Skog, J., Wurdinger, T., van Rijn, S., Meijer, D. H., Gainche, L., Sena-Esteves, M., Curry, W. T., Jr, Carter, B. S., Krichevsky, A. M. and Breakefield, X. O. (2008). Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat. Cell Biol*. 10, 1470-1476.
- Soule HD, Vazquez J, Long A, Albert S, Brennan M. (1973). A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst*. 51(5):1409-16.
- Suntres ZE, Smith MG, Heravi MF, Hu J, Zhang X, Wu Y, Zhu H, Wang J, Zhou J, Kou WP. (2013). *Therapeutic Uses of Exosomes*. Intech, Vol.1,5.
- Takebe N, Warren RQ, Ivy SP. (2011). Breast cancer growth and metastasis: interplay between cancer stem cells, embryonic signaling pathways and epithelial-to-mesenchymal transition. *Breast Cancer Res*. 13(3):211.
- Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. (2009). Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*. 139(5):871-90.
- Thiery JP. (2002). Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer*. 2(6):442-54.
- Tsuji T, Ibaragi S, Shima K, Hu MG, Katsurano M, Sasaki A, Hu GF. (2008). Epithelial-mesenchymal transition induced by growth suppressor p12CDK2-AP1 promotes tumor cell local invasion but suppresses distant colony growth. *Cancer Res*. 68(24):10377-86.
- Tsujii, M., DuBois, R. N. (1995). Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase-2. *Cell*. 83, 493-501.
- Turhal S. *Meme Kanseri*. Kitapçık.
- van der Pol E, Böing AN, Harrison P, Sturk A, Nieuwland R. (2012). Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles. *Pharmacol Rev*. 64(3):676-705.
- Williams CS, Mann M, DuBois RN. (1999). The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer, and development. *Oncogene* 18(55):7908-16.
- Wulfing P, Diallo R, Muller C, Wulfing C, Poremba C, Heinecke A, Rody A, Greb RR, Bocker W, Kiesel L. (2003). Analysis of cyclooxygenase-2 expression in human breast cancer: high throughput tissue microarray analysis. *J Cancer Res Clin Oncol*, 129:375-382.

ÖZGEÇMİŞ

1. Bireysel Bilgiler

Adı Soyadı: Cansu SUBAŞI

Doğum yeri ve tarihi: İzmit -10.08.1988

Uyruğu: TC

Medeni Durumu: Bekar

İletişim Adresi: Turgut Mah. Helvacı sok. No:63 İzmit/KOCAELİ

Telefonu: 0543 8334975

E-posta Adresi: cansusbs@hotmail.com

2. Eğitimi

09/2011 – 07/2014 **Yüksek Lisans**

Kocaeli Üniversitesi, Kök Hücre Anabilim Dalı, Kök Hücre ve Doku Yenilenmesi Programı-
Kocaeli/TÜRKİYE

09/2005 – 06/2009 **Lisans**

Gazi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü-
Ankara /TÜRKİYE

09/2001 – 06/2005 **Lise**

Mimar Sinan Süper Lisesi
Kocaeli/TÜRKİYE

Yabancı dili: İngilizce

6. Bilimsel Etkinlikler

Seçilmiş yayınlar

1. Demircan PÇ, Sarıboyacı AE, Ünal ZS, Gacar G, Subaşı C, Karaoz E. Immunoregulatory Effects of Human Dental Pulp-Derived Stem Cells on T Cells: Comparison of Transwell Co-Culture and Mixed Lymphocyte Reaction. *Cytotherapy*, 13(10):1205-20, 2011.
2. Karaöz E, Kabataş S, Ay B, Okçu A, Subaşı C, Duruksu G, Müslüman M, Civelek E. Reduction of Lesion in Injured Rat Spinal Cord and Partial Functional Recovery of Motility after Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cell Transplantation, *Turkish Neurosurgery*, 22(2):207-17, 2012.
3. Yılmaz S, Inandiklioglu N, Yildizdas D, Subasi C, Acikalin A, Kuyucu Y, Bayram İ, Topak A, Tanyeli A, Duruksu G, Karaoz E. Mesenchymal stem cell: Does it work in an experimental model with acute respiratory distress syndrome? *Stem Cell Rev and Reports* (in Press).
4. Karaoz E, Okcu A, Ünal ZS, Subasi C, Sağlam O, Duruksu G. Adipose tissue derived mesenchymal stem cells efficiently differentiate into insulin producing cells in pancreatic islet microenvironment both in vitro and in vivo. *Cytotherapy*, 2013 Feb 3.
5. Cakici C, Buyrukcu B, Duruksu G, Haliloglu AH, Aksoy A, Isik A, Uludag O, Ustun H, Subasi C, Karaoz E. Recovery of fertility in azoospermia rats after injection of adipose-tissue-derived mesenchymal stem cells: the sperm generation. *Biomed Res Int*. 2013;2013:529589.
6. Aydın A, Duruksu G, Erman G, Subaşı C, Aksoy A, Unal ZS, Karaöz E. Neurogenic differentiation capacity of subacromial bursal tissue-derived stem cells. *J Orthop Res*. 2014 Jan;32(1):151-8.

Aldığı burslar

Pankreatik Adacık Neogenezinden Sorumlu Genlerin (MAFA, NGN3, PAX4) Öncül Kök Hücrelere Aktarılmasıyla Fonksiyonel İnsülin Üreten Hücrelerin Eldesi ve Doku Mühendisliği Yaklaşımı (TÜBİTAK Proje No: 112S125).

Ödüller

1-1. Uluslararası Katılımlı Kök Hücre Araştırmaları Kongresi Sözlü Bildiri Ödülü 1.si

Çakıcı C, Buyrukçu B, Aksoy A, Haliloğlu A, Duruksu G, Uludağ O, Oymaker A, Işık A, **Subaşı C**, Karaöz E, infertil erkek sıçanlarda adipoz doku kaynaklı MKH'lerin testise enjeksiyonu ile sperm elde edilmesi, 1. Uluslararası Katılımlı Kök Hücre Kongresi, OP-8, S170, 28 Eylül-2 Ekim 2011, Sakarya.

2-1. Uluslararası Katılımlı Kök Hücre Araştırmaları Kongresi Sözlü Bildiri Ödülü 2.si

Karaöz E, Kabataş S, Ay B, Okçu A, **Subaşı C**, Duruksu G, Müslüman M, Civelek E, Infiltrated Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells In The Injured Rat Spinal Cord Reduces Lesion And Impacts Partially Functionally Recovery, 1. Uluslararası Katılımlı Kök Hücre Kongresi, OP-22, S185, 28 Eylül-2 Ekim 2011, Sakarya.

3-Türkiye Oftalmoloji Derneği (TOD) 45. Ulusal Kongresi, En İyi Araştırma 2. Ödülü

Emre E, Yüksel N, Çağlar Y, Pirhan D, **Subaşı C**, Duruksu G, Erman G, Karaöz E, Yıldız K. Deneysel Glokomda İntravitreal Olarak Uygulanan Kök Hücrelerin Nöron Koruyucu Etkisi. Türkiye Oftalmoloji Derneği (TOD) 45. Ulusaş Kongresi 5-9 Ekim,2011, Girne-KKTC.

4- 38. Ulusal Hematoloji Kongresi, Genç Katılımcı Ödülü.

Aksoy A, **Subaşı C**, Ünal ZS, Mehtap Ö, Erman G, Karaöz E. Sağlıklı Ve Multiple Myeloma Olgularının Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerinin Osteojenik Farklılaştırma Potansiyelinin Karşılaştırmalı Olarak İncelenmesi, 38. Ulusal Hematoloji Kongresi, s43, 31 Ekim- 3Kasım 2012, Antalya.

5-III. Kök Hücre Sempozyumu Sözlü Bildiri 2.si

Ünal ZS, Cengiz M, Sağlam Ö, **Subaşı C**, Karaöz E.Nöral Kök Hücre İzolasyonu, Çoğalma ve Farklılaşmasında Hücre Dışı Matriks Proteinlerinin Önemi, III. Kök Hücre Sempozyumu, s04, 30Kasım-1Aralık 2012, Marmara Üniversitesi, İstanbul.

6-Uluslar arası Katılımlı 1.Kök Hücre ve Hücrel Tedaviler Kongresi Mansiyon Ödülü
3.sü

Cansu Subaşı, Gökhan Duruksu, Erdal Karaöz.Farklı Meme Kanser Hücrelerinden Elde Edilmiş Eksozomların Meme Stroma ve Kemik İliği Kaynaklı Kök Hücrelerinde Kanserleştirme Potansiyeli. Uluslar arası Katılımlı 1.Kök Hücre ve Hücrel Tedaviler Kongresi 20-23 Mart, 2014, Kocaeli.

7-VI.Dr. Aysun-Ahmet KÜÇÜKEL Tıp Ödülleri, Temel Tıp Bilimleri Ödülü

Karaoz E, Okcu A,Ünal ZS, **Subasi C**, Sağlam O, Duruksu G.Adipose tissue derived mesenchymal stem cells efficiently differentiate into insulin producing cells in pancreatic islet microenvironment both *in vitro* and *in vivo*. Güven Hastanesi Tıp Ödülleri 5 Nisan, 2014, Ankara.

8-Uluslar arası Katılımlı 1.Kök Hücre ve Hücrel Tedaviler Kongresi Süreyya Tahsin Özel Ödülü

Yılmaz İ, Sarıboyacı A.E, Okçu A, **Subaşı C**, Karaöz E. Pankreatik Adacık Mikroçevresinde Kültüre Edilen Fare Embriyonik Kök Hücrelerin İnsülin Üreten Hücrelere Farklılaşma Potansiyeli, **1.Kök Hücre ve Hücrel tedaviler Kongresi, S-01, 20-23 Mart 2014, Kocaeli.**

9-Uluslar arası Katılımlı 1.Kök Hücre ve Hücrel Tedaviler Kongresi Sözlü Bildiri Ödülü
1.si

Turac G, Duruksu G, **Subaşı C**, Karaöz E. Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerde Rekombinant Tirozin Hidroksilaz Ekspresyonunun Nörojenik Farklılaşma Potansiyeli Üzerindeki Etkisi, **1.Kök Hücre ve Hücresel tedaviler Kongresi, S-21, 20-23 Mart 2014, Kocaeli.**

Projeleri

Pankreatik Adacık Neogenezinden Sorumlu Genlerin (MAFA, NGN3, PAX4) Öncül Kök Hücrelere Aktarılmasıyla Fonksiyonel İnsülin Üreten Hücrelerin Eldesi ve Doku Mühendisliği Yaklaşımı (TÜBİTAK Proje No: 112S125).

Verdiği konferans ya da seminerler

- 1)IX. Temel Kök Hücre Teknikleri ve Moleküler Biyoloji Uygulamaları Kursu Düzenleme Kurulu Üyesi, 22-26 Mart 2010, Kocaeli.
- 2)X. Temel Kök Hücre Teknikleri ve Moleküler Biyoloji Uygulamaları Kursu Düzenleme Kurulu Üyesi, 14-18 Haziran 2010, Kocaeli.
- 3)XI. Temel Kök Hücre Teknikleri ve Moleküler Biyoloji Uygulamaları Kursu Düzenleme Kurulu Üyesi, 11-15 Ekim 2010, Kocaeli.
- 4)XII. Temel Kök Hücre Teknikleri ve Moleküler Biyoloji Uygulamaları Kursu Düzenleme Kurulu Üyesi, 29 Kasım-3 Aralık 2010, Kocaeli.
- 5)XIII. Temel Kök Hücre Teknikleri ve Moleküler Biyoloji Uygulamaları Kursu Düzenleme Kurulu Üyesi, 13-17 Aralık 2010, Kocaeli.
- 6)XIV. Temel Kök Hücre Teknikleri ve Moleküler Biyoloji Uygulamaları Kursu Düzenleme Kurulu Üyesi, 21-25 Mart 2011, Kocaeli.

- 7)XV. Temel Kök Hücre Teknikleri ve Moleküler Biyoloji Uygulamaları Kursu (Kocaeli Üniversitesi-Türk Histoloji ve Embriyoloji Derneği ve TÜBİTAK Destekli) Düzenleme Kurulu Üyesi, 09-13 Mayıs 2011, Kocaeli.
- 8)XVI. Temel Kök Hücre Teknikleri ve Moleküler Biyoloji Uygulamaları Kursu Düzenleme Kurulu Üyesi, 28 Kasım-2 Aralık 2011, Kocaeli.
- 9)XVII. Temel Kök Hücre Teknikleri ve Moleküler Biyoloji Uygulamaları Kursu Düzenleme Kurulu Üyesi, 24-28 Eylül 2012, Kocaeli.
- 10)XVIII. Temel Kök Hücre Teknikleri ve Moleküler Biyoloji Uygulamaları Kursu Düzenleme Kurulu Üyesi, 05-09 Kasım 2012, Kocaeli.
- 11)1.Kök Hücre ve Hücresel tedaviler Kongresi Temel Kök Hücre Teknikleri Kursu Düzenleme Kurulu Üyesi (Hücre Kültüründe İmmunohistokimyasal ve İmmunofloresan Boyama Yöntemleri Sunumu). 1.Kök Hücre ve Hücresel tedaviler Kongresi, 20-23 Mart 2014, Kocaeli.