T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN MEME KANSERİNE ETKİLERİNİN *İN VİTRO* ARAŞTIRILMASI

İlkay GÜZEL

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

Danışman

Doç. Dr. Bahadır ÖZTÜRK

KONYA-2020

T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN MEME KANSERİNE ETKİLERİNİN *İN VİTRO* ARAŞTIRILMASI

İlkay GÜZEL

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

Danışman

Doç. Dr. Bahadır ÖZTÜRK

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 19102042 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA-2020

ONAY SAYFASI

ÖNSÖZ

Bu çalışma Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Doç. Dr. Bahadır ÖZTÜRK yönetiminde hazırlanmış olup, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'ne yüksek lisans tezi olarak sunulmuştur.

Hem eğitim sürecimde hem de tez çalışmam sırasında bilgi ve görüşleriyle beni yönlendiren ve her daim yardımcı olan değerli danışmanım Doç. Dr. Bahadır ÖZTÜRK'e çok teşekkür ederim.

Eğitimim için emek veren ve desteğini esirgemeyen Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyeleri, Prof. Dr. Ali ÜNLÜ, Prof. Dr. Hüsamettin VATANSEV, Prof. Dr. Abdullah SİVRİKAYA, Prof. Dr. Fatma Hümeyra YERLİKAYA AYDEMİR, Doç. Dr. Sedat ABUŞOĞLU, Doç. Dr. Esma MENEVŞE ve Uzm. Dr. Fikret AKYÜREK'e çok teşekkür ederim.

Birlikte çalışmaktan keyif aldığım ve her zaman desteğini esirgemeyen değerli dostlarım Gülayşe YILDIZ, Ayşe ŞAHİN ve biyokimya laboratuvarı çalışanları arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Tez çalışmam boyunca her türlü yardım ve desteği sağlayan Fadime OVALI, Fatma AKAT, Eissa ALMAGHREBİ, Mustafa BAYRAKTAR, Hilal TESTİCİ, Hakan VATANSEV ve İlker GÜVEN'e teşekkür ederim.

Beni sevgi ve saygı ile bu günlere getiren, hiçbir zaman desteğini esirgemeyen bu hayattaki en büyük şansım olan aileme ve biricik oğlum Ayaz'a sonsuz teşekkürler.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ ..... **İV**

İÇİNDEKİLER ..... **V**

SİMGELER VE KISALTMALAR ..... **Vİİİ**

ŞEKİLLER VE GRAFİKLER DİZİNİ ..... **X**

TABLOLAR DİZİNİ ..... **Xİ**

ÖZET ..... **Xİİ**

SUMMARY ..... **XİV**

1. GİRİŞ **1**

1.1. Kanser 2

1.2. Hücre Siklusu 4

1.2.1. Hücre Siklusunun Kontrol Mekanizması 6

1.3. Apoptoz 8

1.4. Onkogenler 10

1.4.1. Ras Geni 10

1.4.2. Fosfatidilinositol 3-Kinaz Geni 10

1.5. Tümör Baskılayıcı Genler 11

1.5.1. Retinoblastom (Rb) Geni 11

1.5.2. p53 Geni 11

1.6. Meme Kanseri 12

1.7. Meme Kanseri Epidemiyolojisi 13

1.8. Meme Kanseri ile İlgili Onkogenler ve Tümör Baskılayıcı Genler 14

1.8.1. Büyüme Faktörü Reseptörleri 14

1.8.2. Sinyal İletimi ile İlişkili Genler 15

1.8.3. Meme Kanserinde Etkili Diğer Genler 16

1.8.4. Ailesel Meme Kanseri ve Yatkınlık Genleri 16

1.9. Meme Kanseri Risk Faktörleri 17

1.9.1. Genetik Olmayan (Nongenetic), Değiştirilemez Risk Faktörleri 17

1.9.2. Nongenetik, Değiştirilebilir Risk Faktörleri 18

1.9.3. Genetik Risk Faktörleri 19

1.10. Tedavi 20

1.11. Kök Hücreler 21
1.11.1. Mezenkimal Kök Hücreler 21
1.11.2. Diş Folikülü Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler 22
1.11.3. Mezenkimal Kök Hücrelerin Parakrin Etkisi 23

2. GEREÇ VE YÖNTEM 25

2.1. Çalışma Planının Özeti 25
2.2. Çalışmada Kullanılan Solüsyonlar 26
2.3. Çalışmada Kullanılan Hücre Kültürü Malzemeleri 26
2.4. Kullanılan Cihazlar 27
2.5. Çalışmada Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması 27
2.5.1. DF-MKH' ler için Besiyerinin Hazırlanması 27
2.5.2. Kök Hücre Dondurma Solüsyonunun Hazırlanması 28
2.5.3. Kollajenaz Solüsyonunun Hazırlanması 28
2.5.4. Adipojenik Farklılaşma Besiyerinin Hazırlanması 28
2.5.5. Osteojenik Farklılaşma Besiyerinin Hazırlanması 28
2.5.6. Kondrojenik Farklılaşma Besiyerinin Hazırlanması 29
2.5.7. Oilred O Solüsyonunun Hazırlanması 29
2.5.8. Alizarin Red Solüsyonunun Hazırlanması 29
2.5.9. Alcianblue Solüsyonunun Hazırlanması 29
2.5.10. MTT Stok Çözeltisinin (5 mg/ml) Hazırlanması 29
2.6. Çalışma Planı 29
2.6.1. İnsan Diş Folikülü Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin İzolasyonu 30
2.6.2. İzole Edilen Hücrelerin Pasajlanması 31
2.6.3. İzole Edilen Kök Hücrelerin Karakterizasyonu 32
2.6.4. İzole Edilen Kök Hücrelerin Farklılaştırılması 34
2.6.5. Kök Hücre Koşullu Ortamının (CM) Hazırlanması 35
2.6.6. Hücre Kültürü 36
2.6.7. DF-MSC Koşullu Ortamının MDA-MB 231 Hücre Proliferasyonuna Etkisinin Belirlenmesi 38
2.6.8. DF-MSC Koşul Ortamının MDA-MB 231 Hücre Apoptozuna Etkisinin Belirlenmesi 39

3. BULGULAR 40

3.1. Diş Folikülü Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre İzolasyonu 40
3.2. DF-MKH'lerin Karakterizasyonu ve Farklılaşma Potansiyelinin Değerlendirilmesi 41
3.2.1. DF-MKH Hücrelerin Flow Sitometri Analizi 41
3.2.2. DF-MKH Hücrelerin Adipojenik Yönde Farklılaştırılması. 42
3.2.3. DF-MKH Hücrelerin Osteojenik Yönde Farklılaştırılması. 42
3.2.4. DF-MKH Hücrelerin Kondrojenik Yönde Farklılaştırılması. 43
3.3. DF-MSC Koşul Ortamının Hücre Proliferasyonuna Etkisi 43
3.4. DF-MKH Koşul Ortamının MDA-MB 231 Hücre Hattına Apoptoz Etkisi…….. 44
3.4.1. MDA-MB 231 kontrol hücreleri(24. Saat)..... 45
3.4.2. MDA-MB 231 DF-MKH Koşul Ortam Uygulanan Hücreler(24.saat) 45
3.4.3. MDA-MB 231 Kontrol Hücreleri(48. Saat)..... 46
3.4.5. MDA-MB 231 DF-MKH Koşul Ortam Uygulanan Hücreler(48.saat) 47
4. TARTIŞMA 48
5. SONUÇ VE ÖNERİLER 56
6. KAYNAKLAR 57
7. ÖZGEÇMİŞ 62

SİMGELER VE KISALTMALAR

ATP:	Adenozin trifosfat
Bax:	p53 tümör baskılayıcı proteini kofaktörü
BCL-2:	B-hücre lenfoma protein-2
BRCA1:	Meme kanserine yatkınlık geni 1
BRCA2:	Meme kanserine yatkınlık geni 2
CDK:	Siklin bağımlı kinazlar
CKI:	Siklin bağımlı kinaz inhibitörleri
c-Myc:	Proto-onkogen transkripsiyon faktörü
CO_2:	Karbondioksit
Cyc:	Siklinler
DF-MKH:	Diş folikülü kaynaklı mezenkimal kök hücreler
DMEM:	Dulbecco′s modified eagle′s – medium
DMSO:	Dimetil sülfoksit
DNA:	Deoksiribo nükleik asit
EGFR:	Epidermal büyüme faktörü reseptörü
ER:	Östrojen resptörü
EV :	Hücre dışı vezikül
FBS:	Fetal sığır serumu
FITC:	FloresanİzotiyosiyanatFloresanİzotiyosiyanat
HER2/Neu:	Tirozinkinaz reseptörünü kodlayan protoonkogen
HER2:	İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2
ISCT:	Uluslararası hücre tedavileri topluluğu
M.Ö.:	Milattan önce
MDA MB-231:	İnsan meme kanseri hücre serisi
MDR:	Çoklu ilaç direnci
miRNA:	Mikro ribo nükleik asit
MKH:	Mezenkimal kök hücreler
ml:	Mili litre
mRNA:	Mesajcı ribo nükleik asit
MTT:	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid
Myc:	Transkripsiyon faktörlerini kodlayan protoonkogen
µl:	Mikrolitre

ºC:	Santigrat derece
p53:	Tümör baskılayıcı gen
PBS:	Fosfat tamponlu tuzlu su
PC5:	Phycoerythrin cyanin 5
PC7:	Phycoerythrin cyanin 7
PE:	Phycoerythrin
PI3K:	Fosfatidilinositol-3-kinaz
PR:	Progesteron reseptörü
RB:	Retinoblastoma
RNA:	Ribo nükleik asit
Rpm:	Dakikadaki devir sayısı
TKI:	Tirozin kinaz inhibitör
TNBC:	Üçlü negatif meme kanseri
TNF:	Tümör nekröz faktörü
TNF-α:	Tümör nekroz faktör
WHO:	Dünya sağlık örgütü
%:	Yüzde

ŞEKİLLER VE GRAFİKLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Erkeklerde En Sık Görülen Kanserlerin Toplam Sayısı ve Yüzde Dağılımları.

Şekil 1.2. Kadınlarda En Sık Görülen Kanserlerin Toplam Sayısı ve Yüzde Dağılımları.

Şekil 1.3. Hücre siklusu aşamaları.

Şekil 1.4. Hücre döngüsü kontrol noktaları.

Şekil 1.5. MDA-MB 231 meme kanseri hücre hattı mikroskobik görüntüsü.

Şekil 3.1. DF-MKH' lerin morfolojik görünümü. A) DF-MKH hücrelerinin birinci kültür (P0, 3. gün), B) birinci pasaj sonrası (P1, 3. gün), C-D) sonraki alt kültürlerinin (C: P2, 3. gün; D: P3, 3. gün) invert mikroskobu görüntülerinde, kök hücrelerin fibroblast benzeri morfolojiye sahip oldukları görülmektedir (Büyütme: AX20, B-C-DX10).

Şekil 3.2. Adipojenik farklılaştırma besiyeri ile kültürü yapılan ve sonrasında Oil red o ile boyanan DF-MKH hücrelerinde kırmızı renkte yağ damlacıkları görüldü.

Şekil 3.3. Osteojenik farklılaştırma besiyeri ile kültürü yapılan ve sonrasında alizarin kırmızısı ile boyanan DF-MKH hücrelerinde parlak kırmızı renkte boyanmış osteoblast nodülleri görülmektedir.

Şekil 3.4. Kondrojenik farklılaştırma besiyeri ile kültürü yapılan ve sonrasında Alcian blue ile boyanan DF-MKH hücrelerinde mavi renkli boyanan proteoglikanlar.

Grafik 3.1. DF-MKH hücrelerinin immunofenotipik özelliklerinin flow sitometri sonuçları.

Grafik 3.2. MDA-MB 231 hücre hattına uygulanan farklı konsantrasyon koşul ortamının proliferasyonuna etkisi

Grafik 3.3. MDA-MB 231 kontrol hücreleri (24. Saat)

Grafik 3.4. MDA MB 231 DF-MKH Koşul Ortam Uygulanan hücreler (24. Saat)

Grafik 3.5. MDA-MB 231 kontrol hücreleri (48. Saat)

Grafik 3.6. MDA MB 231 DF-MKH Koşul Ortam Uygulanan hücreler (48. Saat)

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1.1. Apoptoz /Nekroz farklılıkları

Tablo 2.1. Kök hücrelerin karakterizasyon analizinde kullanılan tüpler ve içeriği

Tablo 2.2. MDA-MB 231 için kullanılan Besiyeri bileşenleri

Tablo 3.1. MDA-MB 231 hücre apoptoz değerleri (24.saat)

Tablo 3.2. MDA-MB 231 hücre apoptoz değerleri (48.saat)

ÖZET

T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Mezenkimal Kök Hücrelerin Meme Kanserine Etkilerinin *İn Vitro* Araştırılması

İlkay GÜZEL

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

Doç. Dr. Bahadır ÖZTÜRK

KONYA-2020

Kanser organ veya dokulardaki hücrelerin iç ve dış etkenler nedeniyle meydana gelen mutasyonlar sonucu anormal çoğalmasıdır. Meme kanseri, kadınlarda en yaygın görülen kanser türüdür ve dünya genelinde kadınlarda en sık görülen ölüm nedenlerinden biridir. MDA-MB 231 insan meme adenokarsinomundan türetilmiş ve hücre zarında östrojen reseptörü, progesteron reseptörü ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 ifadelerinin eksikliği ile üçlü negatif meme kanseri olarak tanımlanan ve meme kanseri vakalarının yaklaşık% 15-20'sini oluşturan bir epitel kanser hücre tipidir. Meme kanseri genellikle cerrahi, radyasyon tedavisi, kemoterapi ve hormon tedavisi kombinasyonları, hedefli terapi ve immunoterapi ile tedavi edilir ancak bu tedavilerin yan etkilerinden dolayı günümüzde pek çok araştırma çalışması meme kanseri tedavisi için alternatif tedavi bulmayı amaçlamaktadır.Mezenkimal kök hücreler kordon kanı, Wharton'un jölesi, plasenta, kemik iliği, dişler ve yağ dokusu gibi çeşitli dokulardan izole edilebilir. Mezenkimal kök hücreler, osteoblastlar, adipositler ve kondrositler dahil olmak üzere çeşitli hücre tiplerine farklılaşabilen multipotentstromal hücrelerdir. Mezenkimal kök hücre ve kanser ilişkisi ile ilgili çalışmalar bulunmaktadır ancak bu çalışmalardan elde edilen sonuçlar çelişkilidir. Yaptığımız bu tez çalışmasında insan diş folikülü kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin(DF-MKH) MDA-MB 231 hücresi üzerine proliferasyon ve apoptoz yönünden etkisinin olup olmadığının araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmamızda kullandığımız kök hücreler diş çeperinde bulunan diş folikülü dokusundan izole edildi 3.pasaja getirilen hücrelerin mezenkimal kök hücre karakterizasyonunu yapmak için pozitif ve negatif antikorlar kullanılarak flow sitometride analizleri yapılmıştır. Karakterizasyon analizi sonrası hücrelerin farklılaşma potansiyeli adipojenik, kondrojenik ve osteojenik farklılaşma kitleri uygulanarak mikroskop altında görüntülenmiştir. Her iki analiz sonrasındaki veriler sonucunda izole ettiğimiz kök hücrelerin mezenkimal kök hücre olduğu ispatlanmış ve kanser hücresine koşullandırılmış ortamın uygulama aşamasına geçilmiştir. Proliferasyon testi MTT yöntemi ile, apoptoz analizi ise Annexin V yöntemi ile flow sitometri cihazında çalışılmıştır. DF-MKH'lardan elde edilen %50 doz koşullandırılmış besiyeri ortamı MDA-MB 231 hücre hattında kontrol grubuna göre canlılığı %66,6 ya düşürerek proliferasyonu inhibe etmiştir. Apoptoz analizi sonucunda 24.saatte kontrol grubunun total apoptoz miktarı %12,5 %50 doz

uygulanan hücrelerin ise % 16,5 bulunmuştur.48. saatte kontrol grubunun total apoptoz miktarı %13,1 %50 doz uygulanan hücrelerin ise % 20,35 bulunmuştur ve koşullandırılmış ortam kontrol hücrelerine göre apoptoza götürmüştür .

Anahtar Sözcükler: Apoptoz; Meme kanseri; Mezenkimal kök hücre; Proliferasyon

SUMMARY

T. C.

SELCUK UNIVERSITY

HEALTH SCIENCES INSTITUTE

***In Vıtro* Investıgatıon Of The Effects Of Mesenchımal Stem Cells On Breast Cancer**

İlkay GÜZEL

MASTER THESIS

DEPARTMENT OF MEDICAL BIOCHEMISTRY

Assoc. Dr. Bahadır ÖZTÜRK

KONYA-2020

Cancer is an abnormal proliferation of cells in the organs or tissues as a result of mutations caused by internal and external factors. Breast cancer is the most common type of cancer in women and is one of the most common causes of death in women worldwide. MDA-MB 231 derived from human breast adenocarcinomas and cell membrane estrogen receptor, progesterone receptor, and human epidermal growth factor receptor 2 expression with triple negative breast cancer is defined as the lack of all breast cancers and approximately 15-20% of epithelial cancer is a type of cell that makes up an. Breast cancer, is usually treated with surgery, radiation therapy, combinations of chemotherapy and hormonal therapy, targeted therapy and immunotherapy, but because of the side effects of these treatments today, many research aims to find alternative treatment for breast cancer. Mesenchymal stem cells can be isolated from various tissues, such as cord blood, Wharton's jelly, placenta, bone marrow, teeth, and adipose tissue. Mesenchymal stem cells are multipotent stromal cells that can differentiate into various cell types, including osteoblasts, adipocytes, and chondrocytes. There are studies on the relationship between mesenchymal stem cells and cancer, but the results from these studies are contradictory. In this thesis, we aimed to investigate whether mesenchymal stem cells(DF-MSC) of human dental follicle origin have an effect on MDA-MB 231 cell in terms of proliferation and apoptosis. In our study, the stem cells we used were isolated from the tooth follicle tissue located on the tooth Wall 3. Flow cytometry analysis was performed using positive and negative antibodies to make mesenchymal stem cell characterization of cells brought into the passage. After characterization analysis, the differentiation potential of cells was displayed under the microscope by applying adipogenic, chondrogenic and osteogenic differentiation kits. As a result of the data after both analyses, it was proven that the stem cells that we isolated were mesenchymal stem cells, and the application phase of the environment conditioned on the cancer cell was passed. Proliferation test was studied by MTT method and apoptosis analysis by Annexin V method in flow cytometry device. 50% dose conditioned medium medium obtained from DF-MSCs inhibited proliferation by reducing the viability to 66.6% in MDA-MB 231 cell line compared to the control

group. As a result of the apoptosis analysis, the total apoptosis amount of the control group at 24 hours was 12.5% and 16.5% of the cells dosed with 50%. The amount of total apoptosis per hour was 13.1% in the control group and 20.35% in the cells dosed with 50%, and conditioned environment led to apoptosis compared to the control cells.

Keywords: Apoptosis; Breast cancer; Mesenchymal stem cell; Proliferation

1. GİRİŞ

Günümüzde en önemli sağlık sorunlarından biri olan kanser organ veya dokulardaki hücrelerin iç ve dış etkenler nedeniyle meydana gelen mutasyonlar sonucu anormal çoğalması olarak tanımlanmaktadır (Şen, 2019).

Kanser dünya çapında majör mortalite ve morbidite nedenidir ve 9.6 milyon kişinin 2018 yılında ölüm nedeni olduğu bildirilmektedir(WHO , Xie ve ark 2019). Erkekler ve kadınlarda en sık görülen kanser türlerine bakıldığında akciğer, prostat, kolorektal, mide ve karaciğer kanseri erkeklerde, meme, kolorektal, akciğer, serviks ve tiroid kanseri kadınlarda en yaygın olanlarıdır (WHO).

Meme kanseri, kadınlarda en yaygın görülen kanser türüdür ve dünya genelinde kadınlarda en sık görülen ölüm nedenlerinden biridir(Yanovich ve ark 2018). Meme kanseri, farklı morfolojik özellikler, farklı terapötik seçeneklere değişken yanıt ve farklı klinik sonuçlar gösteren oldukça heterojen bir hastalıktır(Park ve ark 2019).

MDA-MB 231 insan meme adenokarsinomundan türetilmiş ve hücre zarında östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR) ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2) ifadelerinin eksikliği ile üçlü negatif meme kanseri (TNBC) olarak tanımlanan ve meme kanserinin yaklaşık % 15-20'sini oluşturan bir epitel kanser hücre tipidir(Arunasree 2010, Hong ve Fan 2019, Zhang ve ark 2019). Üçlü negatif (TNBC), yüksek heterojenlik, agresif yapı ve tedavi seçeneklerinin bulunmamasından dolayı meme kanserinin en ölümcül alt tipidir ve hormon pozitif meme kanserine kıyasla 40 yaşın altındaki kadınlarda daha sık teşhis edilmektedir (Lee ve ark 2019, Nedeljkovic ve Damjanovic 2019).

Meme kanseri genellikle cerrahi, radyasyon tedavisi, kemoterapi ve hormon tedavisi kombinasyonları, hedefli terapi ve immunoterapi ile tedavi edilir(Board 2002, 2002). Kemoterapi ve radyoterapi gibi konvansiyonel tedavinin yan etkileri meme kanseri hastalarını tedavi etmeyi zorlaştırmaktadır. Geleneksel tedavi ile ilgili en tehdit edici sorunlardan biri çoklu ilaç direncidir (MDR). Bu nedenle, meme kanseri hastasının sağkalım oranı çok yetersizdir. Bu sebeple günümüzde pek çok

araştırma çalışması meme kanseri tedavisi için alternatif tedavi bulmayı amaçlamaktadır (Mitra ve Dash 2018).

Kök hücreler, hayatın embriyonik, fetal ve yetişkin evrelerinde bulunan ve doku ve organların yapı taşları olan farklılaşmış hücrelere yol açan farklılaşmamış hücrelerdir (Kolios ve Moodley 2013). Kök hücreler organizmanın herhangi bir hücresine farklılaşabilme ve kendini yenileme özelliğine sahiptirler (Zakrzewski ve ark 2019).

Mezenkimal kök hücreler (MKH'ler) ilk kez 1960-1970'lerde Friedenstein ve meslektaşları tarafından izole edildi ve nitelendirildi. MKH'lar, osteoblastlar, adipositler ve kondrositler dahil olmak üzere çeşitli hücre tiplerine farklılaşabilen multipotentstromal hücrelerdir (Mohr ve Zwacka 2018). MKH'ların hücre tedavisi ve rejeneratif tıpta umut verici bir strateji olduğu kanıtlanmıştır. Etki mekanizmaları tam olarak açık olmasa da terapötik aktivitelerine bir parakrin etkisi aracılık edebileceği öne sürülmüştür (Linero ve Chaparro 2014).

Literatür incelendiğinde , mezenkimal kök hücre ve kanser ilişkisi ile ilgili çalışmalar yer almaktadır ancak çalışmalar sonucunda elde edilen sonuçlar çelişkilidir. Çalışmamızda insan diş folikülü kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin meme kanseri hücresi üzerine proliferasyon ve apoptoz yönünden etkisinin olup olmadığının araştırılması amaçlanmıştır. Klasik kanser tedavilerine ek alternatif tedavi arayışlarının artması nedeniyle yaptığımız bu çalışmamızla literatüre bu yönde katkıda bulunacağımızı düşünmekteyiz.

1.1. Kanser

Günümüzde en önemli sağlık sorunlarından biri olan kanserin en eski tanımı Mısır papirüslerinde yapılmıştır. Hipokrat (M.Ö. 460-377) vücudu oluşturan organlarda ortaya çıkan ve iyileşmeyen yeni oluşumlar için yunanca yengeç anlamına gelen 'karkinos' ya da "karkinoma", terimlerini kullanmış ve bu terimler ingilizceye çevrilirken de 'cancer' veya 'carcinoma' olarak geçmiş ve günümüzdeki terminolojiyi oluşturmuştur (Sağlam 2014).

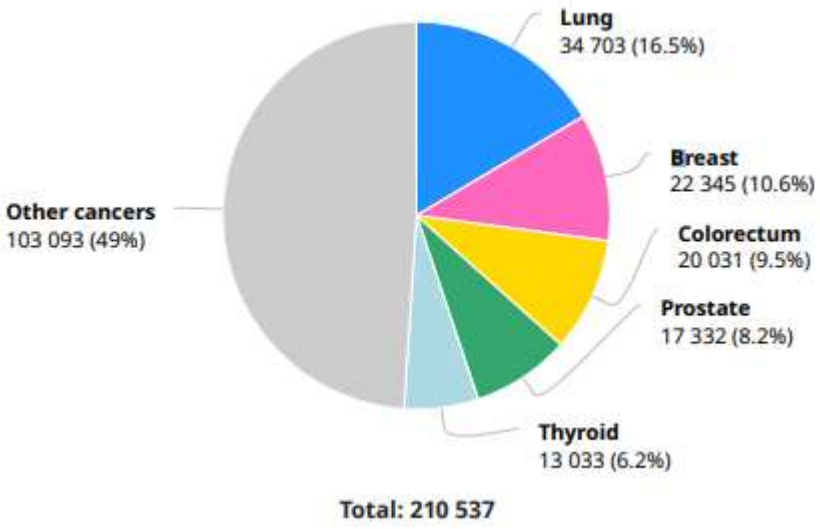
Karsinojenez, büyüme ve gelişmede rol oynayan kilit hücresel yolakları etkileyen genetik değişiklikler ile karakterize çok aşamalı bir süreçtir (Osborne ve

ark 2004). Organ veya dokulardaki hücrelerin iç ve dış etkenler nedeniyle meydana gelen mutasyonlar sonucu anormal çoğalması olarak tanımlanan kanser vücudun her bölümünü etkileyebilir ve özel tedavi gerektiren bir çok alt tipte ortaya çıkabilir(WHO , Şen 2019).

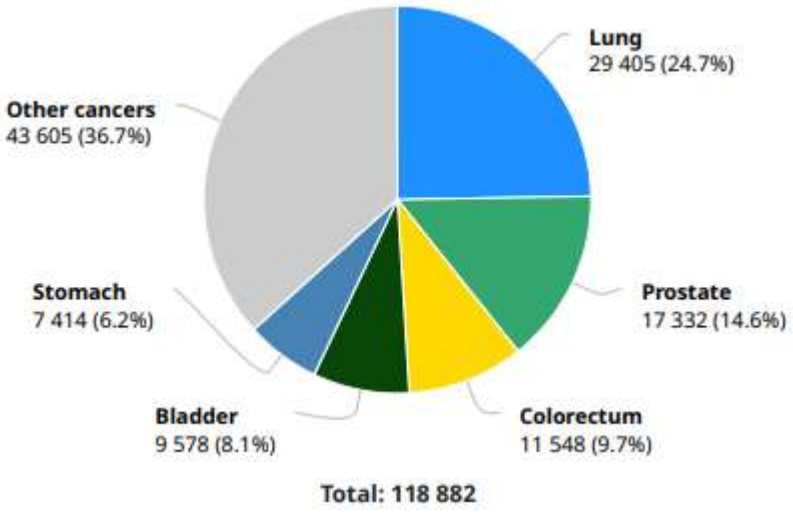
Ölü hücrelerin yenilenmesi ve hasarlı dokuların onarılması amacıyla sağlıklı vücut hücreleri bölünebilme yeteneğine sahiptir ancak bu yetenekleri sınırlıdır, sonsuz bölünemezler. Sağlıklı hücrelerin aksine kanser hücreleri ne zaman ve nerede bölünebileceğini bilme yeteneğine sahip değildir ve kontrolsüz bölünmeye başlar ve çoğalırlar. Kanserleşmiş hücreler bir araya gelerek urları (tümörleri) oluştururlar, tümörler de normal dokuları sıkıştırabilmekte, içine sızabilmekte ya da tahrip edebilmektedirler (Subaşı 2014).

Kanser maddi ve manevi yönden uzun süreli mücadele gerektiren bir hastalıktır ve beraberinde başka sağlık problemlerine de sebep olabilir. Kansere yaş, cinsiyet, dil, din, ırk ayırımı yapmaksızın her yıl dünyada 14 milyon kişi yakalanır ve kanser her yıl 8,2 milyon kişinin ölümüne sebep olmaktadır. Ülkemizdeki durum değerlendirildiğinde 2018 resmi rakamlarına göre bir yıl içerisinde yaklaşık 96.200 erkek ve 67.200 kadının kanser teşhisi aldığı tahmin edilmektedir (Grothe ve Park 2000).

Kanser dünya çapında majör mortalite ve morbidite nedenidir ve 9.6 milyon kişinin 2018 yılında ölüm nedeni olduğu bildirilmektedir(WHO , Xie ve ark 2019). Erkekler ve kadınlarda en sık görülen kanser türlerine bakıldığında akciğer, prostat, kolorektal, mide ve karaciğer kanseri erkeklerde (Şekil 1.1.), meme, kolorektal, akciğer, serviks ve tiroid kanseri kadınlarda (Şekil 1.2.) en yaygın olanlar ıdır(WHO).



Şekil 1.1. ErkeklerdeEn Sık Görülen Kanserlerin Toplam Sayısı ve Yüzde Dağılımları (GLOBOCAN 2018)



Şekil 1.2. Kadınlarda En Sık Görülen Kanserlerin Toplam Sayısı ve Yüzde Dağılımları (GLOBOCAN 2018)

1.2. Hücre Siklusu

Hücre döngüsünün klasik görünümü, Hartwell, Nurse, Hunt ve diğerleri tarafından maya ve deniz kestanelerindeki deneylere öncülük ederek belirlenmiştir(Ingham ve Schwartz 2017). Hücre siklusu, bir hücrenin bölünmeye başlamasından itibaren onu takip eden diğer hücre bölünmesine kadar geçen

zamanda, hücrede gerçekleşen geçici biyokimyasal aktivitelerin ve morfolojik değişikliklerin görüldüğü süreçtir ve genetik olarak birbirine tıpa tıp benzeyen iki hücre oluşumu ile sonuçlanan oldukça düzenli bir döngüdür (Israels ve Israels 2000, Sherr 2000, Canpolat Ağustos 2016). Hücre bölünme döngüsü, belirli bir genomun replikasyonuna ve devamına neden olan en temel hücresel aktivitelerden biridir (Hu ve ark 2019).

Hücre döngüsü birbiriyle bağlantılı iki bölümden meydana gelir. Bunlar ; interfaz (G1, S, G2) ve mitoz (M) bölümleridir (Şekil 1.3.). Hücre bölünme sinyali aldığında bir hazırlık evresine girer ve hücre büyümeye başlar. Bu evreye interfaz evresi denir ve kendi içinde G1, S, G2 olmak üzere üçe ayrılır.

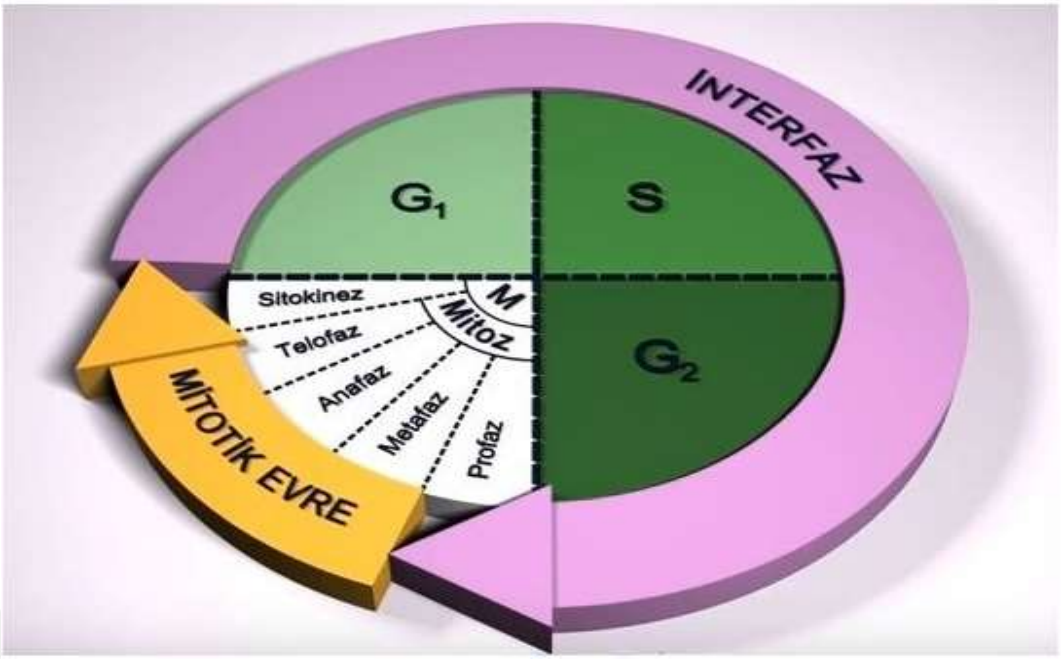
G0 fazında hücre herhangi bir büyüme faktörü ile uyarılmadığı sürece yada bölünme için yeteri kadar büyümemiş ise bu fazda bekler. Hücre metabolik olarak aktif olmasına rağmen hücre dışı faktörler tarafından uyarılmadıkça çoğalmazlar. Hücrenin dinlenme evresidir.

G1 fazında hücre DNA sentezi için gerekli hazırlıkları tamamlar. Bu evrede hücrenin metabolizma hızı, organel sayısı ve ATP sentezi artar. Hücre için gerekli RNA ve proteinlerin sentezi gerçekleşir, büyüme faktörleri aktive olur. Sentez evresi için hazırlık yapılır.

S fazı sentez fazıdır. RNA sentezi devam ederken protein sentezi en yüksek seviyeye ulaşır. DNA replikasyonu gerçekleşir ve hücre içindeki DNA miktarı iki katına çıkar. Sentrozom kendini eşlemeye başlar.

G2 fazında hücre mitoz için hazırlanır. DNA sentezi tamamlanmıştır fakat RNA ve protein sentezi devam eder. Sentrozom kendini eşlemiş olur.

M fazı mitoz bölünmenin gerçekleştiği fazdır. Kromozomlar oluşur. Mitoz bölünme profaz, prometafaz, metafaz, anafaz ve telofaz evrelerinden oluşmaktadır. Son aşamada sitoplazma bölünmesi gerçekleştikten sonra aynı genetik materyale sahip iki yeni hücre meydana gelir. Sürekli bölünen hücrelerde döngü tekrar G1, S, G2, M olarak devam eder (Israels ve Israels 2000, Ingham ve Schwartz 2017).



Şekil 1.3. Hücre siklusu aşamaları.

1.2.1. Hücre Siklusunun Kontrol Mekanizması

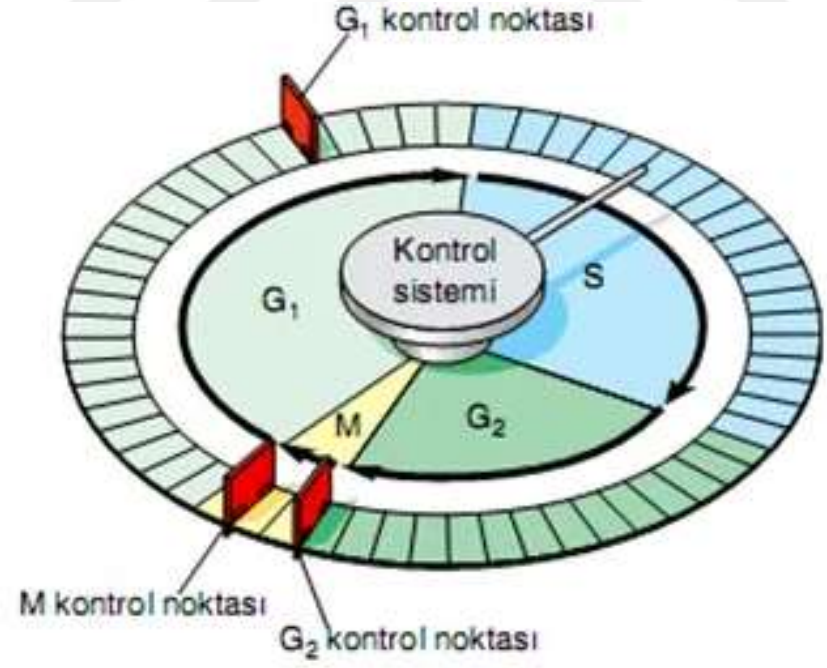
Hücre bölünmesi çeşitli mekanizmalar ile kontrol edilmezse hücreler kontrolsüz olarak bölünüp çoğalmaya başlar ve tümör gelişimine neden olurlar. Bu sebeple DNA'nın bütünlüğünü izlemek, mutasyona uğramış veya hasar görmüş hücrelerin ilerlemesini ve yayılmasını önlemek için hücre siklusundaki evrelerin bölünmesini denetleyen kontrol noktaları vardır. Hücre siklusu siklinler (cyc), siklin bağımlı kinazlar (CDK) ve siklin bağımlı kinaz inhibitörleri (CKI) tarafından kontrol edilir. Kontrol noktaları G1- S geçişinde, G2-M geçişinde ve metafaz-anafaz geçişinde yer alır (Şekil 1.4.). Bu kontrol noktalarında hücrenin siklusa devam edip etmeyeceğine karar verilir.

G1/S kontrol noktası; Hücre döngüsünde geriye dönüşü olmayan nokta S evresidir. Hücre, replikasyon yönünde son kararını vermeden önce, G1/S kontrol noktasında DNA hasarına bakar. DNA hasarı varsa hücre döngüsü durur ve DNA tamir mekanizmaları harekete geçerler. Hücre döngüsünün ilerlemesindeki duraksama DNA tamiri için gerekli zamanı sağlamaktadır. Hasar tamir edilemez ise hücreyi öldürecek olan apoptotik yolaklar aktive edilir. Böylece; G1/S kontrol noktası, DNA hasarı bulunan hücrenin replikasyonunu önlemektedir. Hücre yeterli

büyüklüğe ulaşmışsa ve DNA hasar görmemişse bölünmede duraksama olmadan devam eder.

G2/M kontrol noktası; DNA replikasyonun tamamlanıp tamamlanmadığı, hücrenin güvenli bir şekilde mitoza başlayıp başlayamayacağı ve kardeş kromatidlerin ayrılıp ayrılmayacakları kontrol edilir. DNA'daki hasar replikasyon sonrası da kromatidler ayrılmadığı sürece tamir edilebilir. G2/M kontrol noktası özellikle iyonize radyasyona maruz kalmış olan hücreler için önemlidir, bu tür hücreler G2/M kontrol noktasını aktive edip, G2'de bir duraksamaya neden olurlar. G2/M kontrol noktasındaki hatalar kromozomal anomalilere yol açarlar.

M kontrol noktası; M kontrol noktası en önemli kontrol noktalarındandır. Kromozomların mitotik iğ üzerinde düzenli bir şekilde yer almalarını sağlar. Bu sayede yeni oluşacak hücrelere kromozomların doğru şekilde dağılması sağlanır. Eğer bu aşamada iğ ipliklerinin oluşması ve kromozomların bağlanmasında bir sorun meydana gelirse hücre döngüsü metafaz aşamasında durdurularak hatalı kromozomların yavru hücrelere gitmesi engellenmiş olur(Israels ve Israels 2000, Canpolat Ağustos 2016).



Şekil1.4. Hücre döngüsü kontrol noktaları

Doku homeostazı, hücre proliferasyonu ve hücre ölümü arasındaki mükemmel dengeye bağlıdır. Hücre siklusunda bir faz tamamlanmadan sonraki faza

geçilirse genetik materyal tam ve doğru kopyalanmadığı için hücrede hasar meydana gelebilir. Siklin ve CDK'ların normal görevleri; hücre döngüsünün kontrolüdür, bu moleküllerin aktivitelerinin yanlış düzenlenmesi, hücre proliferasyonunun artışı ve/veya kanser ile sonuçlanır (Vermeulen ve ark 2003).

1.3. Apoptoz

Hücre ölümü, çok hücreli organizmaların gelişimi, doku homeostazı ve bütünlüğünde önemli bir süreçtir. Hücre ölümü iki farklı şekilde görülür ki bunlar apoptoz ve nekrozdur (Jan ve Chaudhry 2019).Apoptoz (a-po-toe-sis) terimi ilk olarak 1972'de Kerr, Wyllie ve Currie tarafından morfolojik olarak farklı bir hücre ölümü formunu tanımlamak için klasik bir makalede kullanılmıştır (Elmore 2007). Apoptoz, normal dokulardaki gelişim ve homeostazda kritik rol oynayan belirgin biyokimyasal ve genetik yolaklarla çok sıkı programlanmış bir hücre ölümü olarak tanımlanmaktadır (Hassan ve ark 2014).

Apoptoz, sadece hücre hasarı veya dış stresin bir sonucu olarak değil, aynı zamanda normal gelişim ve morfogenez sırasında da meydana gelen önemli bir düzenlenmiş ölüm mekanizması olarak tanımlanır. Apoptoz, farklı uygulayıcı ve düzenleyici molekül grupları tarafından sıkıca düzenlenir. Apoptotik hücre ölümünün etki mekanizması tipik olarak kromatin materyalinin yoğunlaşması, çekirdeğinde meydana gelen DNA'nın parçalanması, hücre büzüşmesi, dinamik membran sızması ve hücre dışı matrikse yapışma kaybı ile karakterize edilir. Ayrıca, biyokimyasal değişiklikler arasında; fosfatidilserinin hücre zarı iç yüzeyinden dış yüzeyine doğru yer değiştirmesi ve hücre ölümüne yol açan kaspaz adı verilen sistein aspartil proteazlarının aktivasyonu görülür (Jan ve Chaudhry 2019).

Apoptoz mekanizmalarını anlamak çok önemlidir ve düzensiz apoptozun bir sonucu olarak ortaya çıkan patolojik durumların patogenezinin anlaşılmasına yardımcı olur. Bu mekanizmaların anlaşılması da belirli apoptotik genleri veya yolları hedefleyen ilaçların geliştirilmesine yardımcı olabilir. Kaspazlar, hem başlatıcılar hem de uygulayıcılar oldukları için apoptoz mekanizmasının merkezinde yer alırlar. Kaspazların aktive edilebileceği üç yol vardır. Yaygın olarak bilinen iki başlatma yolu, apoptozun içsel (veya mitokondriyal) ve dışsal (veya ölüm reseptörü) yollarıdır. Her iki yol da sonunda ortak bir yola veya apoptozun yürütme aşamasına

yol açar. Daha az bilinen üçüncü bir başlangıç yolu, endoplazmik retikulum yoludur. Bu endoplazmik retikulum (ER) yolu üçüncü bir yoldur ve daha az bilinir. Kaspaz 12'ye bağlı ve mitokondriden bağımsız olduğuna inanılmaktadır. ER, hipoksi, serbest radikaller veya glikoz açlığı gibi hücresel streslerle yaralandığında, hücrelerde proteinlerin açılması ve protein sentezinin azalması ve TNF reseptörü ile ilişkili faktör 2 (TRAF2) olarak bilinen bir adaptör proteini procaspase-12'den ayrılır, ikincisinin aktivasyonu ile sonuçlanır (Wong 2011).

Hücre ölüm şekillerinden bir diğeri nekrozdur. Nekroz apoptozdan farklı olarak rastgele gelişen ve genler tarafından kontrol edilemeyen düzensiz bir süreçtir. Apoptotik süreç, nekrotik süreçten farklı işler ve zarın sağlam olduğu bu süreçte başta hücre morfolojisi olmak üzere gösterdiği etkiler ayrıdır (Tablo 1.1.)(H 2014).

Tablo 1.1. Apoptoz/Nekroz farklılıkları

Apoptoz		Nekroz
Nedenleri	-Büyüme faktörlerinin eksikliği -Hormonal etkiler -Hafif toksik etkiler	-Anoksi -Fiziksel hasar -Kimyasal hasar
Görülen ilk hücresel değişiklik	-Büzüşme -Kıvrılma	-Şişme
Çekirdekteki değişiklikler	-Yoğunlaşma -Segmentasyon -DNA Fragmentasyonu	---------
Hücre zarındaki değişiklikler	-Yüzeysel uzantılar -Fosfodilserin dağılımında ortaya çıkan değişiklikler	-Düzgünleşme -Liziz
Mitokondrial değişiklikler	--------	-Şişme
Metabolik değişiklikler	-Gen ekspresyonunda aktif değişiklikler(örn;Bcl2,Bax) -Aktif protein sentezi -Proteaz aktivasyonu	---------

1.4. Onkogenler

Hücrelerin büyüme, çoğalma, farklılaşma ve programlanmış hücre ölümü olan apoptoz için aldıkları iletileri hücre membranından başlayarak çekirdeğe kadar sürdürdükleri sinyal ileti mekanizmasında işlev gören birçok proteinin ekspresyonundan sorumlu olan genlere protoonkogen denilmektedir. Hücre büyümesi ve farklılaşmasını düzenleyen proteinleri kodlayan protoonkogenler mutasyonlar veya artmış gen ekspresyonu nedeniyle onkogene dönüşebilirler. Onkogenler, kanser oluşturan genlerdir (Goyns ve Hancock 1991, Konukoğlu 2012).

1.4.1. Ras Geni

Ras, Harvey ve Kirsten sıçan sarkomu virüslerinin genomundan izole edilen retroviral onkogenlerin kapsamlı çalışması sırasında tanımlandı. 1980'lerden bu yana, insan tümör hücre dizilerinde mutasyona uğramış Ras genlerinin bulunması, Ras'ın yapısı ve biyokimyası üzerinde yoğun araştırmalara yol açmıştır. Ras proteinleri, özellikle çeşitli hücresel işlemlerde yer alan sayısız sinyalizasyon kademelerinin ana düzenleyicileri olarak hizmet eden küçük GTP'azlardır (Han ve ark 2017).

Ras mutasyonları insan kanserinde en sık görülen onkojenik olaylardır ve tüm insan kanserlerinin yaklaşık % 30'unda bulunabilir(Barnoud ve ark 2016). Ras ailesinin proteinleri, hücre iskeleti bütünlüğü, proliferasyonu, hücre yapışması, apoptoz ve hücre göçü gibi süreçleri kontrol eden çok çeşitli sinyal yolları için çok önemli moleküler anahtarlardır. Ras ve Ras ile ilişkili proteinlerin ekspresyonu genellikle kanserlerde düzensizleşir, bu da invazyon ve metastazın artmasına ve apoptoz oranının düşmesine neden olur (Calvo ve ark 2017).

1.4.2. Fosfatidilinositol 3-Kinaz Geni

Tümörijenez, proliferatif ve pro-survival sinyalizasyon kaskadlarının aktivasyonuna, genetik anormalliklerin birikmesine ve çeşitli mikro çevresel stres koşullarına adaptasyona büyük ölçüde bağlı olan çeşitli biyolojik süreçlerin karmaşık etkileşimini içeren çok aşamalı bir süreçtir (Koundouros ve Poulogiannis 2018). Fosfatidilinositol-3-kinaz (PI3K) yolu, çoklu malignitelerde yer alan tümör hücresi büyümesi ve hayatta kalmasında rol oynayan en yaygın onkojenik sinyal iletim yoludur (Thapa ve ark 2015, Tran ve ark 2016). PI3K sinyalizasyonu nedeniyle

kanserdeki birçok hücresel süreç düzensizleşir ve tümör gelişimi ve ilerlemesine katkıda bulunur (Mazloumi Gavgani ve ark 2018).

1.5. Tümör Baskılayıcı Genler

Tümör baskılayıcı genlerle ilgili ilk veriler Henry Harris ve arkadaşlarının 1969'ta yapmış oldukları somatik hücre hibridizasyon çalışmalarında elde edilmiştir. Tümör baskılayıcı genler, hücre büyümesini baskılayıcı etkileri ile kanserin gelişmesini önleyen oldukça önemli muhafızlardır. Bu genlerde meydana gelen inaktivasyon kanser patogenezinde önemli rol oynar. Aslında, tümör baskılayıcı genlerin kaybı kanserin oluşumu için gerekli olan onkogen aktivasyonundan daha önemlidir. Çoğu tümör baskılayıcı gen, hücre döngüsünü inhibe ederek, hücreyi farklılaşmaya iterek veya apoptozu tetikleyerek hücrelerin kontrolsüz çoğalmasını engelleyici bir karaktere sahiptir. Bazı tümör baskılayıcı genler ise hücre proliferasyonunu tetikleyen birçok onkogenik sinyal yolaklarının aşırı aktivasyonlarının inhibisyonundan sorumludur. Tümör baskılayıcı genlerde meydana gelebilecek somatik mutasyonlar (nokta mutasyon, missense mutasyon, delesyon vb.), translokasyonlar, epigenetik değişimler ve kromozom aldelesyonlar aracılığıyla gerçekleşen fonksiyon kayıpları, hücrelerin kontrolsüz çoğalmasına, apoptoza karşı direnç kazanmalarına ve neoplastik farklılaşmaların tetiklenmesine yol açarak kanserleşmeyi başlatabilmektedir (Akgün ve ark 2018).

1.5.1. Retinoblastom (Rb) Geni

Retinoblastom (Rb) geni, hücre döngüsü regülasyonu ve tümör oluşumunda en önemli genlerden biridir (Sung ve ark 2007). Retinoblastom geni, normal olarak hücrenin, hücre döngüsünün S fazına girmesini önlemek için işlev gören RB proteinini kodlar. Bir transkripsiyon faktörü olarak işlevini inhibe ederek E2F'ye bağlanır. Bu etkileşim DNA replikasyonu için gerekli genlerin transkripsiyonunu bloke eder ve böylece hücreler hücre döngüsünün G1 fazında kalır (Joyce ve Kasi 2020).

1.5.2. p53 Geni

Apoptoz, programlanmış hücre ölümü sürecidir ve birçok ilaç ve ajan, kanser hücrelerinin çoğunda apoptoza neden olabilir. P53, hücre döngüsü durması ve

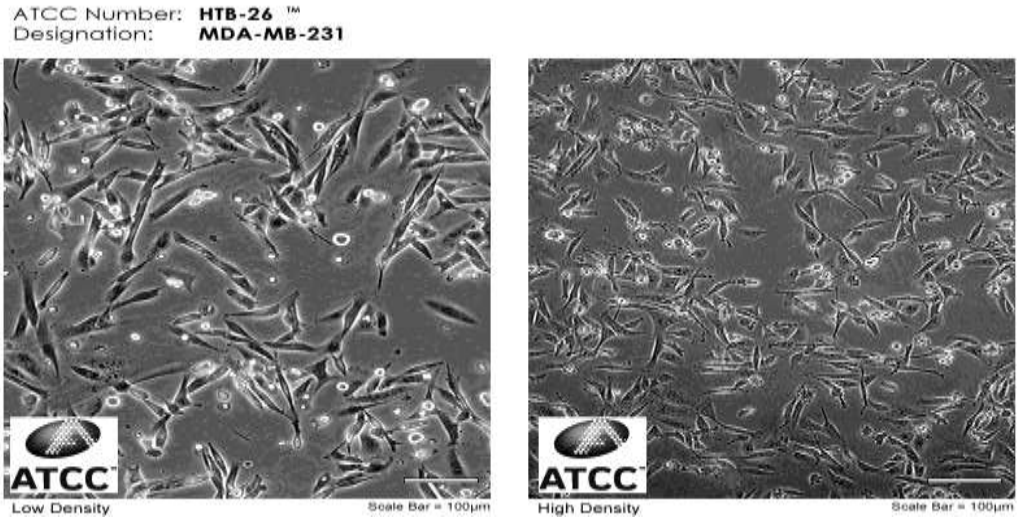
indükleyici apoptoz gibi birçok antikanser özelliğine sahip bir tümör baskılayıcı gendir. p53, proapoptotik ve baskılayıcı antiapoptotik proteinlerin aktivasyonuna yol açan düzenleme ve transkripsiyondan bağımsız sinyal yollarıyla apoptoza neden olabilir (Mazrouei ve ark 2019).p53 proteini, kanser oluşumunu önleyen genomun koruyucusudur (Bourdon 2007).

1.6. Meme Kanseri

Meme dokusu, süt üretiminde yer alan bezler, lobülleri meme ucuna ve yağ dokusuna ve lenfatik dokuya bağlayan kanallardan oluşur. Meme kanseri, memenin herhangi bir bileşeninde düzensiz bir hücre büyümesi olduğunda ortaya çıkar, ancak bu en yaygın olarak lobüllerde görülür. Meme kanseri zamanla gelişir ve in situ(invaziv olmayan) fazdan geçebilir. İn situ veya invaziv olsun, rutin kendi kendine meme muayeneleri, mamografi taraması veya belirti veya semptomlar geliştiğinde tespit edilebilir. Tespit edilebilecek en yaygın fiziksel işaret ağrısız bir meme yumrusudur. Metastazın erken evrelerinde aksiller bölgede şişmiş ve genişlemiş lenf düğümleri olabilir. Kanlı meme başı akıntısı, kızarıklık, şişme, meme deformitesi veya retraksiyonlar daha az yaygın kanıtlardır, ancak meme malignitesinin önemli bir göstergesi ve hastalığın ileri evrelerinde belki daha belirgindir (Winters ve ark 2017).

Meme kanseri, kadınlarda en yaygın görülen kanser türüdür ve dünya genelinde kadınlarda en sık görülen ölüm nedenlerinden biridir (Yanovich ve ark 2018). Meme kanseri, farklı morfolojik özellikler, farklı terapötik seçeneklere değişken yanıt ve farklı klinik sonuçlar gösteren oldukça heterojen bir hastalıktır. Hastaları daha verimli bir şekilde tedavi etmek amacıyla, meme kanseri sınıflamaları geliştirilmiştir (Park ve ark 2019). Meme kanseri tipik olarak immünohistolojik işaretleyiciler (östrojen reseptörü [ER], progesteron reseptörü [PR], HER2 geni ve / veya ERBB2 protein durumu), tümör derecesi ve / veya proliferasyon kullanılarak beş alt tipe ayrılmaktadır. Bu alt tipler; luminal A (ER+, HER2 -, düşük proliferasyon), luminal B HER2− (ER+, HER2 -, yüksek proliferasyon), luminal B HER2+ (ER+, HER2+, yüksek proliferasyon), HER2 zenginleştirilmiş (ER -, HER2+, yüksek proliferasyon) ve üçlü negatif (ER -, PR -, HER2 -, yüksek proliferasyon) meme kanseri olarak isimlendirilmektedir (Bouchal ve ark 2019).

MDA-MB 231 insan meme adenokarsinomundan türetilmiş ve hücre zarında östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR) ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2(HER2) ifadelerinin eksikliği ile üçlü negatif meme kanseri (TNBC)olarak tanımlanan ve meme kanserinin yaklaşık%15-20'sini oluşturan bir epitel kanser hücre tipidir (Arunasree 2010, Hong ve Fan 2019, Zhang ve ark 2019). Üçlü negatif (TNBC), yüksek heterojenlik, agresif yapı ve tedavi seçeneklerinin bulunmamasından dolayı meme kanserinin en ölümcül alt tipidir ve hormon pozitif meme kanserine kıyasla 40 yaşın altındaki kadınlarda daha sık teşhis edilmektedir (Lee ve ark 2019, Nedeljkovic ve Damjanovic 2019). Kemoterapi, uzun süredir metastatik TNBC için tek aktif tedavi olmuştur ancak ne yazık ki, hastalar sıklıkla direnç geliştirdiği için kesin tedavi seçeneği değildir ve yakın zamanda genetik olarak BRCA bulunan hastalar için poliadenozindifosfat-ribozpolimeraz inhibitörlerinin (PARPis) dahil edildiği tedaviler uygulanmaktadır (Caparica ve ark 2019, Nedeljkovic ve Damjanovic 2019).



Şekil 1.5. MDA-MB 231 meme kanseri hücre hattı mikroskobik görüntüsü.

1.7. Meme Kanseri Epidemiyolojisi

Meme kanseri, kadınlar arasında en yaygın görülen kanser ve en önemli ölüm nedenlerinden biridir (Momenimovahed ve Salehiniya 2019). Dünya çapında her yıl yaklaşık 1,7 milyon meme kanseri vakası teşhis edilmekte ya da yaklaşık her 18 saniyede bir yeni bir vaka teşhis edilmektedir. En yaygın olmasının yanı sıra, meme kanseri aynı zamanda dünya çapında kadınlarda kanser ölümünün önde gelen nedenidir.

Ölüm oranları, görülme sıklığından çok daha fazla değişiklik göstermektedir; düşük ve orta gelirli ülkelerde meme kanseri sağ kalımı , yüksek gelirli ülkelere kıyasla anlamlı derecede düşüktür (Winters ve ark 2017). 2018 yılında Monica M Rivera-Franco ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre meme kanseri için beş yıllık sağ kalım oranları, ABD (% 83,9) , İsveç (% 82,0), Japonya (% 81,6) ve Avustralya (% 80,7) gibi ülkelere göre Brezilya (% 58,4), Hindistan (% 52), Cezayir (% 38,8) ve Gambiya (% 12) gibi düşük ve orta gelirli ülkeler için çok daha kötüdür (Rivera-Franco ve Leon-Rodriguez 2018).

Meme kanseri görülme oranı dünyanın farklı bölgelerine göre değişmektedir, Orta Afrika ve Doğu Asya'da 100.000'de 27'den Kuzey Amerika'da 100.000'de 92'ye kadar değişmektedir. Meme kanseri görülme oranının 2050 yılına kadar 3,2 milyona ulaşacağı tahmin edilmektedir. Gelişmiş ülkelerde artan nüfus yaşıyla birlikte, yaşlılarda meme kanseri görülme oranı da artmaktadır (Momenimovahed ve Salehiniya 2019).

1.8. Meme Kanseri ile İlgili Onkogenler ve Tümör Baskılayıcı Genler

İnvaziv meme kanserinin ilerlemesinde ve tedavisinde birçok protoonkogenin ve tümör supresörgenin rol oynadığı gösterilmiştir. Bu genler arasında HER-2 / neu‘nun en önemli proto-onkogen olduğu düşünülmektedir(Moelans ve ark 2010).Etkili olduğu düşünülen diğer protoonkogenler arasında ras ve c-myc geni, tümör baskılayıcı genler arasında da en çok p53 geni incelenmektedir (Erhan 1995).

1.8.1. Büyüme Faktörü Reseptörleri

CerbB–2 (HER2/Neu)

Neu olarak da bilinen C-erbB-2 geni, tirozinkinaz aktivitesine sahip bir transmembran proteinini kodlar. Genellikle embriyonik doku ve bazı normal yetişkin dokularında eksprese edilir. Çalışmalar, bu genin çok çeşitli tümörlerde ekspresyonunun arttığını, tümör malignitesi, metastaz, kemoterapi direnci ve prognoz ile yakından ilişkili olduğunu göstermiştir. C-erbB-2'nin aşırı ekspresyonu ve aktivasyonu malign hücre transformasyonu ile sonuçlanan anormal hücre proliferasyonuna neden olabileceği gibi tümör hücrelerinin kemoterapötik ilaçlara

duyarlılığını da etkileyerek kanser gen terapisi için potansiyel bir hedef olabileceği gösterilmiştir (Liu ve ark 2016, Missaoui ve ark 2019).

Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR)

Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR, HER-1, c-erbB-1), hem normal fizyolojik koşullarda hem de kanserli koşullarda temel rol oynayan yapı ve benzerlik gösteren dörttransmembran büyüme faktörü reseptör proteininden biridir. EGFR geni, 7. Kromozomun kısa kolunda bulunur ve hücre dışı bir EGF bağlayıcı alan, kısa bir transmembran bölge ve ligand ile aktive edilmiş tirozin kinaz aktivitesine sahip bir hücre içi alandan oluşan 170 kDa transmembran proteini kodlar. Epidermal büyüme faktörü (EGF) ve dönüştürücü büyüme faktörü-alfa (TGF-α) ligandlarının etkisiyle EGFR aktive olur. EGFR'yeligand bağlanması reseptör dimerizasyonuyla tirozinkinazın otofosforilasyonuna neden olur. Fosforile tirozin kalıntıları, sinyal dönüştürücülerin ve hücre içi substratların aktivatörlerinin alınması için bağlanma yerleri olarak işlev görür. EGFR dahil HER ailesi sinyal yolları aracılığı ile hücresel proliferasyon, anjiyogenez ve apoptozun inhibisyonu dahil olmak üzere birçok önemli biyolojik süreci kontrol eder (Bhargava ve ark 2005, Mitsudomi ve Yatabe 2010).

1.8.2. Sinyal İletimi ile İlişkili Genler

Farklı dokularda büyümeyi indükleyici steroidlerin ve büyüme faktörlerinin etkileri nükleer protoonkogenler aracılığı ile gerçekleştirilmektedir. Hücrelerin mitojenle etkileşimlerinden kısa bir süre sonra c-fos, c-myc, c-myb ve c-junproto-onkogenleri indüklenir. Bu onkogenlerin indüksiyonu ile hücre proliferasyonu arasında bir bağlantı vardır. Meme kanserinde östrojen ve progesteron ile c-myc, c-fos ve c-junproto-onkogenlerinin aktifleştikleri gösterilmiştir(Öztürk 2006).

c-Myc

c-Myc proteini bir c- *myc* proto-onkogen ürünüdür ve hücre davranışı üzerinde çeşitli etkiler yapar. c-Myc proteini normal hücre döngüsünün ilerlemesinde, terminal farklılaşmasının inhibisyonunda ve programlanmış hücre ölümünün uyarılmasında kritik bir rol oynamaktadır. Yapılan bazı çalışmalarda elde edilen veriler

c- *myc* onkogeninin genetik değişikliklerinin insan meme kanserinin indüksiyonu ve ilerlemesinde önemli bir rol oynadığını göstermektedir(Chrzan ve ark 2001).

1.8.3. Meme Kanserinde Etkili Diğer Genler

Bcl-2 - Apoptoz genleri

Bcl-2 ilk kez 1984'te, malign bir B hücreli lenfoma olan foliküler lenfoma hastalığında tanımlanmıştır (Pekarsky ve ark 2018). Bcl-2, apoptotik hücre ölümünü bloke ederek bir onkogen olarak işlev gören ilk tanımlanmış hücresel proteindir (Pattingre ve Levine 2006). Bcl-2 protein ailesi, apoptozun iç mitokondriyal yolunun düzenlenmesinde hayati bir rol oynar (Binju ve ark 2019). Bcl-2, apoptotik hücre ölümünün önemli bir düzenleyicisidir ve birçok kanserde aşırı eksprese edilir. Bcl-2 kanser gelişimi ve tümör ilerlemesinde hücreleri, kemoterapötik ilaçlar ve ışınlama gibi sitotoksik etkilerden korur (Straten ve Andersen 2010).

Telomeraz

Kromozomların (telomerlerin) uçlarını koruyan hücresel bir ters transkriptaz olan telomeraz, meme kanserlerinin büyük çoğunluğunda (meme karsinomlarının %90'ından fazlası) aktive edilir, ancak normal dokularda aktive edilmez. Normal hücrede ifade edilmediğinden tanı ve tedavi için ilgi çekici bir hedeftir. Meme kanserinde telomerazın rolünü anlamak için yapılan *invitro* deneylerde telomeraz inhibisyonu progresif telomer kısalmasına sebep olur ve sonuçta DNA hasarı meydana gelir. Bu hasar nedeniyle hücrenin büyümesinin durmasına veya hücre ölümüne yol açtığı gözlenmiştir (Herbert ve ark 2001).

1.8.4. Ailesel Meme Kanseri ve Yatkınlık Genleri

Tüm meme ve yumurtalık kanserlerinin yaklaşık %5-10'unun kalıtsal olduğu düşünülmektedir. Meme ve yumurtalık kanserleri, BRCA1 ve -2 genlerindeki mutasyonlarla ilişkilidir (Lax 2017).

BRCA1 ve BRCA2 genleri: BRCA1 geni 1994 yılında klonlandı ve insan kromozomu 17q21'de bulundu. BRCA1 ve BRCA2, iki ayrı tümör baskılayıcı gendir ve DNA onarım işlemlerinin aktivasyonu yoluyla hücresel strese yanıtta önemli rol oynarlar (Paul ve Paul 2014). Bu nedenle, mutasyona bağlı fonksiyon kaybı, diğer

genlerde mutasyon birikmesine ve daha sonra erken yaşta tümör oluşumuna neden olur. Üçlü negatif meme karsinomlarında BRCA germ hattı mutasyonları sıklıkla görülmektedir (Lax 2017).

1.9. Meme Kanseri Risk Faktörleri

Meme kanseri çok faktörlü bir hastalıktır ve bunun oluşumuna çeşitli faktörler katkıda bulunur. Hastalık tüm dünyada ortaya çıksa da, insidansı, mortalitesi ve sağkalım oranları, nüfus yapısı, yaşam tarzı, genetik faktörler ve çevre gibi birçok faktörden kaynaklanabilecek dünyanın farklı bölgelerinde önemli ölçüde değişmektedir. Risk faktörlerindeki değişiklikler, her gün artan meme kanseri prevalansının artmasına neden olmuştur (Momenimovahed ve Salehiniya 2019). Meme kanseri görülme riskini arttıran faktörler;

1.9.1. Genetik Olmayan (Nongenetic), Değiştirilemez Risk Faktörleri

Yaş

Meme kanseri insidansı ve mortalitesi yaşla orantılı olarak artar. Bir vaka kontrol çalışmasında, 50 yaşından büyük olanlarda meme kanseri insidansında artışbulunmuştur. Bununla birlikte, genç kadınlarda meme tümörleri daha büyük boyutlarda, ilerlemiş evrelerde, pozitif lenf bezlerinde ve zayıf sağ kalımla görülür.

Erken Menarş / Geç Menopoz

Menarşta daha genç yaş ve menopozda daha ileriyaş meme kanseri riskini artırır. Meme kanseri riski, 11 yaşından önce menstruasyon başlayan kızlar arasında,13 yaşında başlayanlara kıyasla yaklaşık %20 daha yüksektir. Ayrıca 55 veya daha büyük yaşlarda menopoza giren kadınlar, 50-54 yaş arasında menopoza giren kadınlara kıyasla yaklaşık %12 daha yüksek bir riske sahiptir.

Meme ile ilgili faktörler

Memedeki toplam yoğun doku miktarı anlamına gelen meme yoğunluğu meme kanseri riskini arttırır. % 11-25 meme yoğunluğu olan kadınlara kıyasla, %26-50 veya %50'den büyük meme yoğunluğu olanların sırasıyla, sırasıyla 1,6 veya 2,3 kat daha fazla meme kanseri riski vardır. Emzirme meme kanserine

karşı koruyucu bir faktördür ve birçok araştırmacı laktasyonun meme kanserinin önlenmesindeki rolüne dikkat çekmiştir. Çeşitli çalışmaların sonuçlarına göre, laktasyonun uzunluğu meme kanseri ile ilişkilidir. Laktasyonun koruyucu etkisi, laktasyon süresi uzadıkça artar(Momenimovahed ve Salehiniya 2019).

1.9.2. Nongenetik, Değiştirilebilir Risk Faktörleri

Gelir, eğitim ve sigorta durumu

Son çalışmalarda daha ayrıntılı olarak tartışılan konulardan biri, sosyoekonomik durumun meme kanseri görülme oranındaki rolüdür. Meme kanseri, sosyoekonomik durumu daha yüksek olan kadınlarda daha yüksektir. Düşük eğitim düzeyine sahip bölgelerde yaşayan kadınların metastatik meme kanseri, büyük boyutlu tümör, üçlü negatif tümörler veya yüksek dereceli meme kanseri vakaları görülme olasılığı yüksek eğitim düzeyine sahip bölgelerde yaşayan kadınlara kıyasla daha yüksektir(Winters ve ark 2017, Momenimovahed ve Salehiniya 2019).

Hormonal faktörler

Kontraseptif hapların meme kanseri gelişimindeki rolü çeşitli çalışmalarda ele alınmış ve oral kontraseptif hap kullanımı, meme kanseri gelişme riskinin artmasıyla ilişkilendirilmiştir. Bir vaka kontrol çalışmasının sonucunda, 6 aydan daha uzun süre boyunca ovulasyonu uyarıcı ilaçların kullanılmasının meme kanseri gelişme riskini arttırdığını göstermiştir fakat bu sonuç benzer çalışmalarla doğrulanmamıştır. Menopoz semptomlarını kontrol etmek için kullanılan kombine östrojen ve progestin tedavisi meme kanseri gelişme riskini arttırır(Winters ve ark 2017, Momenimovahed ve Salehiniya 2019).

Sigara

Sigara ve meme kanseri arasındaki ilişki kapsamlı olarak incelenmiştir ancak elde edilen sonuçlar yetersizdir. Daha iyi tasarlanmış epidemiyolojik çalışmalarda elde edilen verilere göre sigara içme prevalansı yüksek ve uzun yıllar sigara kullanım süreleri olan popülasyonlarda meme kanseri ile tütün tüketimi arasında pozitif bir ilişki olduğu gösterilmiştir(Lammert ve ark 2018).

Alkol

Alkol tüketiminin meme kanseri ile ilişkisini ele alan epidemiyolojik çalışmalarda bir doz-tepki ilişkisi olduğu gösterilmektedir. Alkol tüketiminin, meme kanseri için bilinen risk faktörleri olan endojen östrojen seviyelerini arttırdığı gösterilmiştir. Aynı zamanda alkol metabolizmasının ürünlerinin toksik olduğu bilinir ve kansere yol açan DNA modifikasyonlarına neden olduğu varsayılır. Dünyada ve özellikle hızlı ekonomik büyüme gösteren ülkelerde kadınlar arasında alkol tüketiminin arttığı göz önüne alındığında meme kanseri riski için kadınlarda aşırı alkol tüketiminden kaçınılması tavsiye edilir(Coronado ve ark 2011).

Fiziksel aktivite ve beslenme

Gelişmiş ülkelerde yapılan bazı epidemiyolojik çalışmalarda fiziksel aktivitenin meme kanseri riski ile ilişkisi değerlendirilmiş ve çoğunluğunda fiziksel olarak aktif olan kadınlar ile daha az aktif olan kadınlar kıyaslandığında aktif olanlarda % 25 daha düşük meme kanseri riski gözlemlenmiştir(Key ve ark 2003, Friedenreich 2011).

Beslenmenin meme kanseri riski üzerindeki etkilerinin ana hipotezleri obezite ve yüksek miktarda et, süt ürünleri, yağ ve alkol alımının riski artırabileceği ve yüksek miktarda lif, meyve, sebze, antioksidan ve fito-östrojen alımının riski azaltabileceği yönündedir(Key ve ark 2003).

1.9.3. Genetik Risk Faktörleri

Tümör baskılayıcı genler, insan fonksiyonunun ve gelişiminin normal biyofizyolojisi için gereklidir. Tümör baskılayıcı genler, hücre büyümesini ve çoğalmasını düzenlemek ve inhibe etmek için anahtardır. Spesifik proteinler, çok sayıda fonksiyona sahip olan ve DNA onarımı konusunda uzmanlaşmış, apoptozu başlatan, tümör hücresi yapışmasını engelleyen ve metastazı önleyen bu genlerden oluşur. Mutasyonlar, bu genler içinde etkili bir şekilde gerçekleştiremeyen uygunsuz ve işlevsiz proteinlere yol açabilir. Mutasyonlar meydana geldiğinde, tümör oluşumu ve malignite riski artar. Meme kanseri genleri, BRCA1 ve BRCA2 dahil olmak üzere spesifik tümör baskılayıcı genler, genomik bütünlük ve transkripsiyonel düzenleme yoluyla hücresel süreçlerde temeldir. Bu iki gen içinde mutasyonlar meme ve/veya

yumurtalık kanseri gelişimi ile bağlantılıdır. Bu mutasyonlar, maligniteye yol açan kalıtsal veya sporadik bir süreç yoluyla ortaya çıkabilir. BRCA1 ve BRCA2'deki mutasyonların meme ve yumurtalık kanseri için yüksek risk oluşturduğu bilinmesine rağmen, bu risklerin kesin büyüklüğü daha belirsizdir. Ailede meme kanseri öyküsü bulunması da çeşitli çalışmalarda başlıca genetik risk faktörlerinden biri olarak görülmüştür(Mavaddat ve ark 2010).

1.10. Tedavi

Meme kanseri genellikle cerrahi, radyasyon tedavisi, kemoterapi ve hormon tedavisi kombinasyonları, hedefli terapi ve immunoterapi ile tedavi edilir(Board 2002, 2002). Kemoterapi ve radyoterapi gibi konvansiyonel tedavinin yan etkileri meme kanseri hastalarını tedavi etmeyi zorlaştırmaktadır. Geleneksel tedavi ile ilgili en tehdit edici sorunlardan biri çoklu ilaç direncidir (MDR). Bu nedenle, meme kanseri hastasının sağkalım oranı çok yetersizdir. Bu sebeple günümüzde pek çok araştırma çalışması meme kanseri tedavisi için alternatif tedavi bulmayı amaçlamaktadır(Mitra ve Dash 2018).

Ölüm oranının yüksek olduğu meme kanseri tedavisinde uygulanan ana tedavi yöntemleri ile birlikte yeni tamamlayıcı yöntemler, hastalığın iyileşme oranının arttırılmasında önemli rol oynamakta ve hücresel tedavi yaklaşımları neredeyse zorunlu hale gelmektedir. Şüphe yoktur ki, hücresel tedaviler arasında adını son zamanlarda sıkça duyar olduğumuz kök hücreler ve kök hücre tedavileri önemli bir yer tutmaktadır. Kök hücreler arasında ise hedefe yönelik çalışmalarda MKH'ler başı çekmektedir (Yenilmez 2015).

MKH'lerin son on yılda tümör üzerindeki etkilerini araştırmak için kapsamlı çalışmalar yapılmıştır. Bununla birlikte, bu konu halen tartışılmaktadır. Tartışmalı sonuçlar bildirilmiştir. Çeşitli araştırmalar, MKH'ların kanserli hücre sinyalizasyon yolunu etkileyerek tümör progresyonunu ve metastazı desteklediğini göstermiştir, diğer çalışmalar ise MKH'ların hem proliferasyonu hem de apoptozu baskılayabilen yolları etkilediğini göstermektedir (Lin ve ark 2019).

1.11. Kök Hücreler

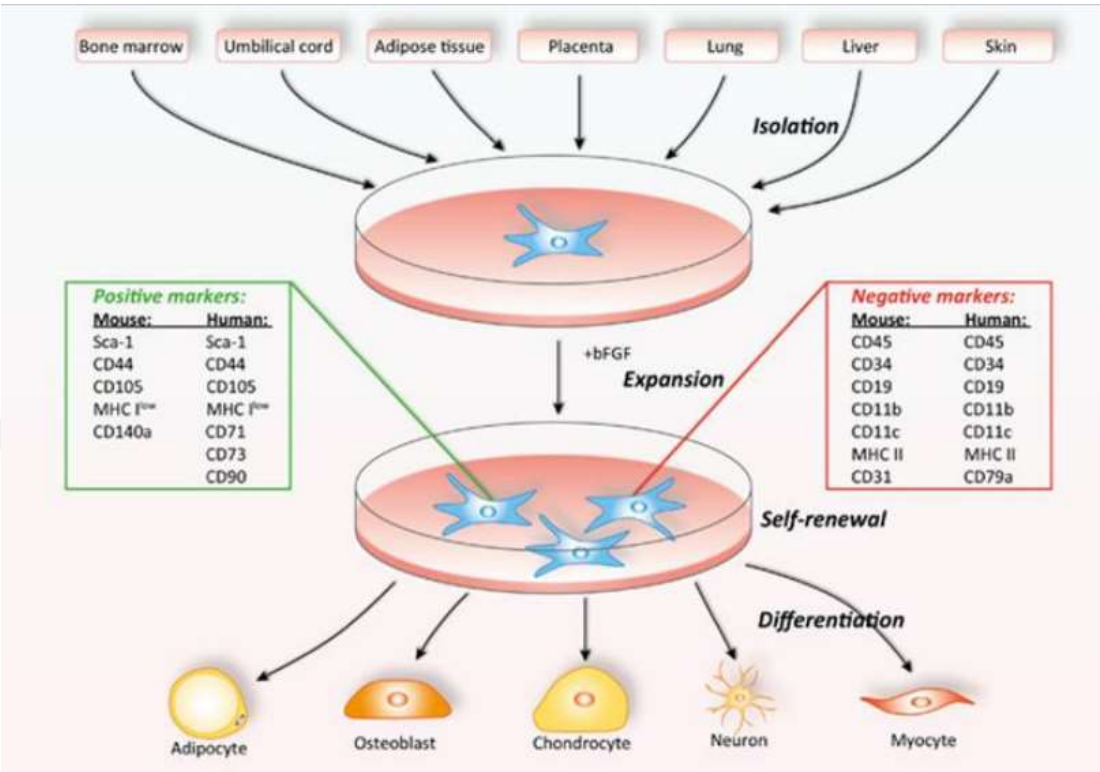
Kök hücreler, hayatın embriyonik, fetal ve yetişkin evrelerinde bulunan ve doku ve organların yapı taşları olan farklılaşmış hücrelere yol açan farklılaşmamış hücrelerdir(Kolios ve Moodley 2013). Kök hücreler organizmanın herhangi bir hücresine farklılaşabilme ve kendini yenileme özelliğine sahiptirler. Tüm kök hücreler farklılaşma potansiyellerine göre totipotent veya omnipotent, pluripotent, multipotent, oligopotent ve unipotent olarak 5 gruba ayrılabilir. Totipotent kök hücreler bir organizmayı oluşturabilecek farklılaşma yeteneğine sahiptir. Pluripotent kök hücreler, embriyonik dokuların dışında bir organizmanın tüm germ tabakalarında oluşan her hücrenin oluşmasına neden olabilir ve bu özelliğinden dolayı aynı zamanda embriyonik kök hücreler olarak da adlandırılır. Multipotent kök hücreler, yetişkin kök hücrelerdir ve köken aldığı hücrelerin belirli soylarını üretebilirler. Multipotent kök hücreler aynı zamanda mezenkimal kök hücreler veya yetişkin kök hücreler olarak bilinmektedir. Oligopotent kök hücreler özgül bir doku içinde kendi kendine yenilenebilir ve 2 veya daha fazla soy oluşturabilen hücrelerdir. Unipotent kök hücreler ise tek bir spesifik hücre tipine kendi kendini yenileyebilen ve farklılaşabilen hücrelerdir(Zakrzewski ve ark 2019).

1.11.1. Mezenkimal Kök Hücreler

MKH'ler ilk kez 1960-1970'lerde Friedenstein ve meslektaşları tarafından izole edildi ve nitelendirildi. Mezenkimal kök hücreler (MKH'lar), osteoblastlar, adipositler ve kondrositler dahil olmak üzere çeşitli hücre tiplerine farklılaşabilen multipotent stromal hücrelerdir (Şekil 1.6.)(Mohr ve Zwacka 2018). Mezenkimal kök hücreler kemik iliği, adipoz doku, sinir doku, dental dokular, umblikal kord, kas dokusu, karaciğer ve deri gibi organizmanın birçok dokusunda bulunur (Şekil 1.6.). Kültür ortamında bu dokulardan mezenkimal kök hücreler izole edilebilir ve çoğaltılabilir (Zıbandeh 2018, Vakhshiteh ve ark 2019).

Uluslararası Hücre Tedavileri Topluluğu (ISCT), MKH'leri tanımlamak için üç kriter kullanmaktadır: İlk olarak, MKH'lar standart kültür koşulları altında plastiğe yapışabilir; ikinci olarak, MKH'lar, endotel, hematopoetik veya CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79a, CD19 ve HLA-DR gibi immünolojik hücre belirteçleri ekspresyonu olmayan CD105, CD73 ve CD90 dahil hücre yüzey

belirteçlerini ifade eder; üçüncü olarak, MKH'lar, uygun uyarıcılara maruz kaldıklarında osteoblastlara, adipositlere ve kondroblastlara farklılaşma yeteneğine sahiptirler (Miki 2018).



Şekil 1.6. MKH'ların izolasyonu, genişlemesi ve farklılaşması (Chen ve ark 2016).

1.11.2. Diş Folikülü Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler

Gelişen diş germini saran mezenkimal doku diş folikülüdür. Dişin kök gelişimi süresince sement, alveolar kemik ve periodontal ligament hücreleri dental folikül kök hücreleri tarafından oluşturulur. Dental folikül ve periodontal ligamentdental dokular içinde en fazla mezenkimal kök hücre kaynağı olan dokulardır. Dental folikül mezenkimal kök hücreleri(DF-MKH) kolay ulaşılabilir olması, ek bir cerrahi işleme gerek kalmadan diş çekim sürecinde elde edilebilir olması, telomeraz aktivitesinin ve kültürde çoğalma potansiyellerinin diğer hücre gruplarına göre yüksek olması nedeniyle avantajlıdır (Liu ve ark 2015).

DF-MKH'ler yüzeylerinde kök hücre yüzey belirteçleri olan CD73, CD90, CD146, CD44, CD105 ifade ederler. Hematopoietik belirteçler olan CD14, CD34,

CD45 ve HLA-DR'yi ifade etmezler. Osteojenik, kondrojenik ve adipojenik farklılaşma potansiyeline sahiptirler (Lymperi ve ark 2013).

1.11.3. Mezenkimal Kök Hücrelerin Parakrin Etkisi

MKH'lerin hücre tedavisi ve rejeneratif tıpta umut verici bir strateji olduğu kanıtlanmıştır. Etki mekanizmaları tam olarak açık olmasa da terapötik aktivitelerine bir parakrin etkisi aracılık edebileceği öne sürülmüştür(Linero ve Chaparro 2014). MKH'lertarafından salınan parakrin sekresyonlar ilk olarak Haynesworth ve arkadaşları tarafından tespit edilmiştir. MKH'ların, komşu hücrelerin etkisini modüle eden büyüme faktörleri, kemokinler ve sitokinler ürettiği ve serbest bıraktığı bildirilmiştir (Xiang ve ark 2009). Bu salgılanan faktörlerin anjiyogenez, apoptoz, nöronal sağkalım ve farklılaşma, hücre dışı matris şekillenmesi, inflamasyon, kanser ilerlemesi ve bağışıklık tepkileri üzerine etkisi olduğu bildirilmiştir. Bu şekilde, MKH'lar doğrudan veya parakrin sekresyonu yoluyla yaralı hücreleri kurtarmak, doku hasarını azaltmak ve son olarak organ onarımını hızlandırmak için rejenerasyona neden olur (Keshtkar ve ark 2018).

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda MKH'ların, hasarlı hücrelere veya dokuya bilgi aktararak ve MKH'lara benzer biyolojik aktivite uygulayarak doku rejenerasyonuna katılan çok sayıda hücre dışı vezikül (EV) salgıladıkları kabul edilmiştir. EV'ler, T hücreleri, B hücreleri, dendritik hücreler, trombositler, mast hücreleri, epitelyal hücreler, endotelyal hücreler, nöronal hücreler, kanserli hücreler, oligodendrositler, Schwann hücreleri, embriyonik hücreler ve MKH'lar dahil olmak üzere çeşitli hücre tipleri tarafından salgılanan zar dolu veziküllerdir. EV'lerin hücre-hücre iletişiminde önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir(Barilani ve ark 2019). Eksozomlar, hedef hücrelere transfer edilen ve salınan genetik materyaller (mRNA, miRNA, pre-miRNA) ve proteinleri içerir. Endozomal kökenli olmalarından dolayı, hemen hemen tüm eksozomlar, kaynak hücrelerin türüne bağlı olmadan, MVB biyogenezinde (Alix ve TSG101), membran taşınması ve füzyonunda (Rab GTPazlar, Anneksinler, flotillin) görevli proteinleri,ısı şoku proteinleri (HSP 70 ve 90), integrinler ve tetraspaninler (CD63, CD9, CD81 ve CD82) gibi molekülleri içerir (Keshtkar ve ark 2018).

Mezenkimal kök hücrelerin yapılan bazı *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda antitümör etkilere sahip olduğuna inanılmasına rağmen MKH'ın tümör metastazı ve etkileşimlerindeki kesin rolü henüz tam olarak anlaşılmamıştır, bu hücrelerin tümörün ilerlemesine katkıda bulunup bulunmadığına veya tümör büyümesini inhibe edip etmediğine ilişkin bazı noktalarda henüz anlaşılmamıştır (Doğan ve ark 2017, de Araújo Farias ve ark 2018). Yapılan çalışmalar, parakrin sinyalizasyonun, MKH'ların, immün yanıtların modülasyonunda ve hastalıkların ilerlemesinde yer almasından sorumlu olduğunu göstermiştir. MKH'lar, çeşitli sitokinler, kemokinler ve hücre dışı EV'lerden oluşan sekretom salınımı yoluyla, mikro-ortamdaki alıcı immün hücrelere düzenleyici mesajları iletir (Zhou ve ark 2019).

Bu tez çalışmasında, insan diş folikülü kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin meme kanseri hücresi üzerine proliferasyon ve apoptoz yönünden etkisinin olup olmadığının araştırılması amaçlanmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, Selçuk Üniversitesi Yerel Etik Kurulu'nun 19.04.2019 tarih ve 70632468-050.01.04 sayılı izni ile onaylanmıştır. Kök hücre izolasyonu için dişfolikül dokuları Selçuk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim dalından gerekli izinler alınarak sağlandı. Kök hücre izolasyonu, immünolojik çalışmalar ve analizler Selçuk Üniversitesi Selçuk Tıp fakültesi Hastanesi Tıbbi Biyokimya araştırma laboratuvarında gerçekleştirildi.

2.1. Çalışma Planının Özeti

Bu amaçla;

1. İnsan Dental Folikül dokusundan kök hücre izolasyonu yapıldı,
2. İzole edilen kök hücrelerin MKH olup olmadığının ortaya konması amacıyla faklılaşma potansiyelleri farklılaşma kitleriyle ve flow sitometri analizleriyle doğrulandı.
3. DF-MKH olduğu doğrulanan hücrelerin varlığında ve yokluğunda insan meme kanseri hücresi olan MDA-MB 231 hücre hattının proliferatif etkisinin olup olmadığı MTT testi ile apoptotik etkisinin olup olmadığı ise Muse Cell Analyzer cihazında akış sitometrisi ile analiz edildi.

Hücre kültürü çalışmalarının tümünde, test edilmiş tek kullanımlık ve steril hücre kültürü malzemeleri kullanıldı ve bütün bu çalışmalar steril koşullarda ve laminar akışlı steril kabin ortamında gerçekleştirildi.

Çalışmamızda kullanılacak olan DF-MKH'ların izolasyonu için diş folikül dokuları Selçuk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Ağız,Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı polikliniklerinde basınç ağrısı,diş yapısı veya pozisyonunun bozuk olması veya ortodontik nedenler ile başvuran 19-25 yaş aralığında olan ve diş çekim endikasyonu uygun görülen 3 bireyden tam gömük yirmi yaş dişi çekimi sırasında steril koşullarda alındı. Diş çekimi sonrası diş folikülü 5 ml'lik steril %1 penisilin/streptomisin içeren fosfat tampon solüsyonu içinde 1 saat içerisinde çalışma yapacağımız laboratuvara ulaştırıldı.

2.2. Çalışmada Kullanılan Solüsyonlar

-DPBS

-PBS

-Penicillin/streptomycin

-DMEM

-Fetalsığır serumu

-Tip I kollajenaz (Gibco 1879368)

-%0,25 tripsin-EDTA solüsyonu

-%0,5 tripan mavisi solüsyonu

-MTT hücre proliferasyon kimyasalı:

-DMSO

-CD73 PE (Beckman coulter)

-CD90 PC5 (Beckman coulter)

-CD105 PC7 (Beckman coulter)

-CD19 FITC (Beckman coulter)

-CD34 PE (Beckman coulter)

-CD11b FITC (Beckman coulter)

-Osteojenik Farklılaşma Kiti (Thermo fisher)

-Adipojenik Farklılaşma Kiti (Thermo fisher)

-Kondrojenik Farklılaşma Kiti (Thermo fisher)

-Oilred O boyası

-Alizarin Red boyası

-Alcian Blue boyası

2.3. Çalışmada Kullanılan Hücre Kültürü Malzemeleri

-Bistüri uçları ve steril pensler

- 0,22 μm filtre

-15 ml falkon

-50 ml falkon

- 25cm2’ lik hücre kültür flaskları

- 75cm2’ lik hücre kültür flaskları

- 6 kuyucuklu plaklar

- 96 kuyucuklu plaklar (Corning® Costar® 96-well plate)

- 5 ml Polystyrenetube
- Tip I kollajen kaplı lameller
- 3 ml' likvial (Kriyotüp)
- Şarjlı pipet pompası (IsoLab, Germany)
- 2µl- 20 µl' lik otomatik pipet
-20µl- 200 µl' lik otomatik pipet
-100µl- 1000 µl' lik otomatik pipet
-Thoma lamı(IsoLab, Tiefedepthprofendeur 0,200mm)
-Lamel (22x22mm)
-Petri Kabı: Corning® 100x20mm Lot:
-Serolojik pipet:
-%70 alkol
-Steril distile su

2.4. Kullanılan Cihazlar

-CO_2inkübatörü: SANYO O_2/CO_2 INCUBATOR MCO-175M
-Laminar akımlı kabin: Steril VBH Compact
-Santrifüj: Sigma 3K30
-Işık mikroskobu: LeicaDmilLed (invertedmicroscope)
-FlowSitometri Cihazı:Muse Cell Analyser
-Buzdolabı (+4 ˚C ve -20˚C): ALTUS AL 302
-40˚C buzdolabı: SANYO MDF-U425
-80˚C buzdolabı: SANYO MDF-U5186S
-Azot tankı: LS 750 LasSystems Taylor-Wharton
-Sıcak su banyosu: WiseBathfuzzysystems
-Hassas terazi
-İnvert Mikroskop
-Buz cihazı

2.5. Çalışmada Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması

2.5.1. DF-MKH' ler için Besiyerinin Hazırlanması

İnsan diş folikül kaynaklı mezenkimal kök hücre izolasyonu için %1 oranında Penisilin/Streptomisin ve %10 oranında FBS ilave edilen DMEM besiyeri

hazırlanarak kullanıldı. Bu hazırlanan solüsyon cDMEM olarak isimlendirildi. Hücrelerin alt kültür işlemlerinde ve hücrelerin çoğalma sürecinde cDMEM solüsyonu taze hazırlanıp kullanıldı.

2.5.2. Kök Hücre Dondurma Solüsyonunun Hazırlanması

İnsan diş folikülünden izole edilen ve üçüncü pasaja kadar çoğaltılan hücreler deney zamanına kadar hücre dondurma solüsyonu içinde -80 C de saklandı. Bu amaçla %10 DMSO ve %90 oranında FBS içeren dondurma solüsyonu hazırlandı.

2.5.3. Kollajenaz Solüsyonunun Hazırlanması

Kollajenaz Tip I solüsyonu hazırlığı için; 4 ml PBS içine 12 mg (3 mg/ml) kollajenaz Tip I tartılarak eklendi ve 0,22 µm' lik filtre ile filtreden geçirildikten sonra steril olarak kullanıma hazır hale getirildi.

2.5.4. Adipojenik Farklılaşma Besiyerinin Hazırlanması

Çalışmamızda kullandığımız adipojenik farklılaşma kiti 100 ml adipojenez farklılaşma bazal besiyeri ile 10 ml adipojenik suplement içermektedir. Çalışma zamanına kadar bazal besiyeri +4ºC de adipojenez suplementte ependorflara 1 ml olacak şekilde alikotlanarak -20ºC de saklandı. Farklılaşma kültür çalışması aşamasında 9 ml bazal besiyeri 1 ml adipojenik suplement ve 5 µl penisilin/streptomisin karıştırılarak adipojenik farklılaşma besiyeri solüsyonu hazırlandı.Bu solüsyon +4ºC de karanlıkta 1 ay süre içinde kullanılabilmektedir.

2.5.5. Osteojenik Farklılaşma Besiyerinin Hazırlanması

Çalışmamızda kullandığımız osteojenik farklılaşma kiti 100 ml osteosit-kondrosit farklılaşma bazal besiyeri ile 10 ml osteojenik suplement içermektedir. Çalışma zamanına kadar bazal besiyeri +4ºC de osteogenez suplementte ependorflara 1 ml olacak şekilde alikotlanarak -20ºC de saklandı. Farklılaşma kültür çalışması aşamasında 9 ml bazal besiyeri 1 ml osteojenik suplement ve 5 µl penisilin/streptomisin karıştırılarak osteojenik farklılaşma besiyeri solüsyonu hazırlandı. Bu solüsyon +4ºC de karanlıkta 1 ay süre içinde kullanılabilmektedir.

2.5.6. Kondrojenik Farklılaşma Besiyerinin Hazırlanması

Çalışmamızda kullandığımız osteojenik farklılaşma kiti 100 ml osteosit-kondrosit farklılaşma bazal besiyeri ile 10 ml kondrojenik suplement içermektedir. Çalışma zamanına kadar bazal besiyeri +4ºC de kondrojenez suplementte ependorflara 1 ml olacak şekilde alikotlanarak -20ºC de saklandı. Farklılaşma kültür çalışması aşamasında 9 ml bazal besiyeri 1 ml kondrojenik suplement ve 5 µl penisilin/streptomisin karıştırılarak kondrojenik farklılaşma besiyeri solüsyonu hazırlandı. Bu solüsyon +4ºC de karanlıkta 1 ay süre içinde kullanılabilmektedir.

2.5.7. Oilred O Solüsyonunun Hazırlanması

Oilred O %3'lük stok solüsyon hazırlamak için;300 mg oilred o 100 ml %99'luk izopropanol içinde çözdürüldü.

2.5.8. Alizarin Red Solüsyonunun Hazırlanması

Alizarin red %0,02'lik solüsyonu hazırlamak için; 1 gram alizarin red 50 ml distile suda çözdürüldü ve 0,22 µm'lik steril filtreden süzülerek kullanıma hazır hale getirildi.

2.5.9. Alcianblue Solüsyonunun Hazırlanması

Alcianblue %0,1'lik solüsyonu hazırlamak için; 10 mg alcianblue 60 ml ethanol ve 40 ml asetik asit içinde çözdürüldü ve 0,22 µm'lik steril filtreden süzülerek kullanıma hazır hale getirildi.

2.5.10. MTT Stok Çözeltisinin (5 mg/ml) Hazırlanması

MTT stok çözeltisi çalışma öncesi 5 mg MTT, 1 ml PBS içinde çözdürülerek taze hazırlandı ve arta kalan çözelti +4°C'de en fazla 4 gün olacak şekilde saklandı.

2.6. Çalışma Planı

1-İnsan diş folikülü kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin izolasyonu
2- İzole edilen hücrelerin pasajlanması ve çoğaltılması
3- İzole edilen kök hücrelerin karakterizasyonu
4- İzole edilen kök hücrelerin farklılaştırılması

4.1- İzole edilen kök hücrelerin osteojenik farklılaştırılması
4.2- İzole edilen kök hücrelerin adipojenik farklılaştırılması
4.3- İzole edilen kök hücrelerin kondrojenik farklılaştırılması
5-Karakterizasyon ve faklılaşma sonucu mezenkimal kök hücre olduğu doğrulanan hücrelerden koşullu ortam elde edilmesi.
6-MDA-MB 231 insan meme kanseri hücresinin çoğaltılması
7- MDA-MB 231 insan meme kanseri hücrelerinin farklı oranlarda mezenkimal kök hücre koşullu ortamlarıyla kültüre edilmesi
8-Analizler
8.1- MDA-MB 231 insan meme kanseri hücrelerinin proliferasyon analizi
8.2- MDA-MB 231 insan meme kanseri hücrelerinin apoptoz analizi

2.6.1. İnsan Diş Folikülü Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin İzolasyonu

Diş çekimi sonrası elde edilen foliküllü diş dokusu %1 penisilin/streptomisin içeren PBS solüsyon içerisine konuldu. Taşıma solüsyonu içerisindeki doku örneği buz içerisinde çalışmanın yapılacağı Selçuk üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Biyokimya Araştırma Laboratuvarına getirildi.

Dişin çevresini saran folikül dokusu önce 5 dk %70 alkol ile daha sonra %1 penisilin/streptomisin içerikli PBS solüsyonu ile yıkanarak folikül dokusu üzerindeki diş parçaları ve kan temizlendi. Temizlenen folikül dokusu 22 mm'lik bistüri ile diş yüzeyinden ayrılıp petri kabı içerisine alındı. 22 mm'lik bistüri ile doku 0,5 mm ve daha küçük olacak şekilde parçalara bölündü. Parçalanan folikül dokusunun enzimatik parçalanması için 15 ml falkon tüpte kollajenaz tip I solüsyonu hazırlandı. Petri kabındaki parçalanan doku kollajenaz tip I solüsyonu bulunan falkon tüp içerisine aktarıldı ve steril pipetle pipetaj yapılıp homojenize edildi. Hücreler 1500 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant uzaklaştırıldı ve 5 ml cDMEM eklenip pipetaj yapılıp tekrar 1500 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant uzaklaştırıldı ve hücreler 5 ml cDMEM besiyeri ile tekrar süspanse edilip filtreli kapaklı 25 cm^2' lik flakslara (T-25) aktarılıp 37°C, %5 CO_2inkübatörde kültüre edildi.

Hücrelerin çoğalması ve flask tabanına yayılmasını sağlamak için her 2-3 günde bir kültür besiyeri taze hazırlanarak değiştirildi.

2.6.2. İzole Edilen Hücrelerin Pasajlanması

T-25 flasklar içerisinde ilk kültürü yapılan ve 37°C, %5 CO2 inkübatörde inkübe edilen hücreler her 2-3 günde bir invert mikroskopta incelendi. Yaklaşık 10 gün sonrasında hücreler flask tabanında yaklaşık %70-80 yayılım gösterdiğinde pasajlama işlemi yapıldı. Dokudan izole edilip elde edilen ilk kültür sıfırıncı pasaj (P0) kabul edilerek, ilk kültürü takip eden her kültür işlemi sonrası pasaj sayıları P1, P2, P3 şeklinde oluşturuldu.

Hücrelerin pasaja alınması işlemi laminar hava akımlı kabin içerisinde steriliteye dikkat edilerek yapıldı. Öncelikle flasklardaki besiyeri steril pipet aracılığı ile uzaklaştırıldı ve flasklara 3 ml PBS eklenerek flask tabanı yıkandı. Yıkama işleminden sonra flask içerisindeki PBS steril pipet aracılığı ile uzaklaştırılıp flaskiçerisine 750 µl %0,25 Tripsin-EDTA eklenerek flask 37°C inkübatörde 4-5 dakika inkübe edildi. Bu süre içerisinde flask tabanında yapışık olan hücrelerin kalkıp kalkmadığı invert mikroskopta gözlemlendi. Hücrelerin kalktığı görüldüğünde tripsininin aktivasyonunu sağlamak için flask içerisine 4 ml cDMEM eklenerek pipetaj yapılıp homojen hale getirilen hücre süspansiyonu 15 ml'lik falkon tüpe aktarıldı. Flask içerisine tekrar 2 ml CDMEM eklenerek pipetaj yapılıp kalan hücrelerde pipet yardımıyla 15 ml'lik falkon tüpe aktarıldı.1500 rpm'de 5 dk santrifüj yapıldı. Santrifüj işleminden sonra süpernatant uzaklaştırıldı ve 1 ml cDMEM eklenip pipetaj yapılarak hücre süspansiyonu haline getirildi. Hücre sayımı yapmak için hücre süspansiyonundan 10 µl alınarak 1,5 ml'lik ependorfa aktarıldı ve 10 µl tripan mavisi solüsyonu üzerine eklenerek pipetaj yapılıp homojen halde sayıma hazır hale getirildi.

Hücre sayımı thoma lamı kullanılarak yapıldı. Düz bir zemin üzerine thoma lamı yerleştirildi ve sayım yapılacak iki alanıda kaplıyacak şekilde üzerine lamel kapatıldı. Hücre sayımı için ependorfta hazırlanan hücre süspansiyonundan pipet yardımı ile 10 µl çekilerek sayım yapılacak olan thoma lamının iki alanına da yavaşça pipetlendi. Thoma lamındaki hücreler ışık mikroskobunda 10X büyütmede sayıldı. Hücre sayımı yapılırken thoma lamının her iki sayım alanında da 16 büyük karenin 5 büyük karesindeki hücreler sayılıp ortalaması alınıp 1 büyük karede ortalama kaç hücre olduğu hesaplandıktan sonra 1 ml deki hücre sayısı hesaplandı.1

ml deki toplam hücre sayısı; dilüsyon oranı (2), thoma lamının toplam kare sayısı (16) ve hacim sabiti 10^4 (0,1 mm^3 deki sayım) ile çarpılarak hesaplandı.

Hücre sayımı yapıldıktan sonra $5x10^5$ hücre 15 ml'lik falkon içesisinde 8 ml cDMEM ile süspanse edilerek 75 cm2' lik flasklara (T-75) ekildi. Hücre ekilen flasklar 37°C, %5 CO_2'li ortamda inkübatörde kültüre edildi. Hücrelerin besiyeri her 2-3 günde bir taze hazırlanıp değiştirildi. Hücreler flask tabanında %70-80 yayılım gösterdiklerinde yukarıda belirtilen protokole göre işlemler sırasıyla gerçekleştirilerek hücreler bir sonraki pasaja alındı. Hücre kültürüne üçüncü pasaja kadar devam edildi.

2.6.3. İzole Edilen Kök Hücrelerin Karakterizasyonu

İnsan diş dokusundan izole edilen ve pasajlanarak çoğaltılan hücrelerin morfolojisi invert mikroskopta incelendi. Fibroblast benzeri yapıda olan ve flask tabanına yapışan hücrelerin üçüncü pasaj sonunda flask tabanındaki cDMEM besiyeri tamamen çekilip atıldı. Flask tabanını yıkamak için 3 ml PBS solüsyonu eklendi, yıkama işleminden sonra solüsyonun tamamı çekilip atıldı. Flask tabanına 1,5 ml %0,25 tripsin-EDTA solüsyonu eklenip 37°C inkübatörde 4-5 dakika inkübe edildi. Bu süre içerisinde flask tabanında yapışık olan hücrelerin kalkıp kalkmadığı invert mikroskopta gözlemlendi. Hücrelerin kalktığı görüldüğünde tripsininin aktivasyonunu sağlamak için flask içerisine 4 ml cDMEM eklenerek pipetaj yapılıp homojen hale getirilen hücre süspansiyonu 15 ml'lik falkon tüpe aktarıldı. Flask içerisine tekrar 2 ml cDMEM eklenerek pipetaj yapılıp kalan hücrelerde pipet yardımıyla 15 ml'lik falkon tüpe aktarıldı.1500 rpm'de 5 dk santrifüj yapıldı. Hücre sayımı yapmak için hücre süspansiyonundan 10 µl alınarak 1,5 ml'lik ependorfa aktarıldı ve 10 µl tripan mavisi solüsyonu üzerine eklenerek pipetaj yapılıp homojen halde sayıma hazır hale getirildi.

Hücre sayımı thoma lamı kullanılarak yapıldı. Düz bir zemin üzerine thoma lamı yerleştirildi ve sayım yapılacak iki alanıda kaplıyacak şekilde üzerine lamel kapatıldı. Hücre sayımı için ependorfta hazırlanan hücre süspansiyonundan pipet yardımı ile 10 µl çekilerek sayım yapılacak olan thoma lamının iki alanınada yavaşça pipetlendi. Thoma lamındaki hücreler ışık mikroskobunda 10X büyütmede sayıldı. Hücre sayımı yapılırken thoma lamının her iki sayım alanındada 16 büyük karenin 5

büyük karesindeki hücreler sayılıp ortalaması alınıp 1 büyük karede ortalama kaç hücre olduğu hesaplandıktan sonra 1 ml deki hücre sayısı hesaplandı.1 ml deki toplam hücre sayısı; dilüsyon oranı (2), thoma lamının toplam kare sayısı (16) ve hacim sabiti 104 (0,1 mm3 deki sayım) ile çarpılarak hesaplandı.

Flow sitometrik analiz için 4 renkli(FITC, PE, PC5, PC7) cihaz kullanıldı. Flow sitometri cihazında hücrelerin karakterizasyon analizini yapmak için 3 adet flow sitometri tüpü alındı. Birinci tüp kontrol tüpü olarak ikinci ve üçüncü tüp ise kök hücre pozitif (anti-CD90, anti-CD73, anti-CD105) ve negatif (anti-CD11b, anti-CD34, anti-CD19) belirteç antikorlarının analiz edileceği tüp olarak belirlendi. Birinci tüpe 100 µl hücre süspansiyonu eklendi. İkincive üçüncü tüpe Tablo 2.1.'deki listeye göre belirtilen antikorların her birinden eklendi ve antikorların üzerine 100 µl hücre süspansiyonu eklenip homojen hale gelmesi için vortekslendi. Homojen hale getirilen örnekler 15 dk oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edildi. İnkübasyon süresinin sonunda hücrelerin üzerine PBS solüsyonu eklenerek 1500 rpm'de 5 dk santrifüjlendi. Santrifüj sonrası süpernatant atıldı, dipte kalan hücreler PBS solüsyonu ile tekrar süspanse edilip immünofenotipik özelliklerinin belirlenmesi için flow sitometri cihazında yüzey belirteçleri analiz edildi.Analiz aşamasında 10000 ivent okuma yapıldı.Hücre yüzeyinde kök hücre belirteçlerinin pozitiflik oranı %95'in üzerinde olan ve negatiflik oranı %5'in altında olan hücre gruplarından 1 milyon hücre ayrılarak farklılaşma potansiyellerinin belirlenmesi için osteojenik,adipojenik ve kondrojenik farklılaşma analizleri yapıldı.

Tablo 2.1. Kök hücrelerin karakterizasyon analizinde kullanılan tüpler ve içeriği

Antikor Renkleri					
Tüp Adı	FITC	PE	PC5	PC7	Hücre Miktarı
1.Tüp	-	-	-	-	100 µl
2.Tüp	CD11b	CD34	CD90	-	100 µl
3.Tüp	CD19	CD73	-	CD105	100 µl

2.6.4. İzole Edilen Kök Hücrelerin Farklılaştırılması

İzole edilen, üçüncü pasaja kadar çoğaltılan ve flow sitometri cihazında pozitif yüzey belirteçleri %95'in üzerinde olan hücrelerin kök hücre özelliğinin belirlenmesi için farklılaşma kültürleri yapıldı. Farklılaşma kültürleri her bir folikül dokusundan izole edilen üçüncü pasajdaki (P3) hücrelerden 1 milyon hücre kullanılarak yapıldı.

İzole edilen kök hücrelerin adipojenik farklılaştırılması

Adipojenik farklılaşma için 6 kuyucuklu plakların her bir kuyusuna tip I kollajen kaplı steril lameller yerleştirildi. Tip I kollajen kaplı lamellerin her birinin üzerine üçüncü pasajdaki hücreler ekildi. Hücrelerin üzerlerine ilk ekim yapılan gün cDMEM besiyeri eklendi ve 24 saat süreyle lamel yüzeyine yayılması sağlandı.24 saat sonunda lamel yüzeyinde %90-100 yayılıma ulaşan hücrelerin üzerindeki kültür sıvısı çekilip atıldı ve üzerine adipojenik farklılaştırma besiyeri eklendi ve 37°C %5 CO2 inkübatörde 2 gün arayla besiyerleri değiştirilerek 21 gün süreyle kültüre edildi. Kültür süresinin sonunda hücrelerdeki adipositlerin ve kolonilerin oluşumu invert mikroskopta değerlendirildi. Adipojenik farklılaşmanın belirlenmesi için lamele yapışan hücrelerde yağ damlalarını boyayan "Oilred O" solüsyonuyla boyanarak mikroskopta incelendi.Yağ damlaları açık kırmızı renkte gözlemlendi.

İzole edilen kök hücrelerin osteojenik farklılaştırılması

Osteojenik farklılaşma için 6 kuyucuklu plakların herbir kuyusuna tip I kollajen kaplı steril lameller yerleştirildi. Tip I kollajen kaplı lamellerin her birinin üzerine üçüncü pasajdaki hücreler ekildi. Hücrelerin üzerlerine ilk ekim yapılan gün cDMEM besiyeri eklendi ve 24 saat süreyle lamel yüzeyine yayılması sağlandı. 24 saat sonunda lamel yüzeyinde %90-100 yayılıma ulaşan hücrelerin üzerindeki kültür sıvısı çekilip atıldı ve üzerine osteojenik farklılaştırma besiyeri eklendi ve 37°C %5 CO2 inkübatörde 2 gün arayla besiyerleri değiştirilerek 21 gün süreyle kültüre edildi. 21 gün sonunda hücreler ve oluşturdukları kolonilerin osteojenik farklılaşmayı sağlayıp sağlamadıkları invert mikroskopta değerlendirildi. Osteojenik farklılaşmanın belirlenmesi için lamele yapışan hücreler Alizarin kırmızısı

solüsyonuyla boyanarak mikroskopta incelendi ve osteojenik soya farklılaştığı gözlemlendi.

İzole edilen kök hücrelerin kondrojenik farklılaştırılması

Kondrojenik farklılaşma için 6 kuyucuklu plakların herbir kuyusuna tip I kollajen kaplı steril lameller yerleştirildi. Tip I kollajen kaplı lamellerin herbirinin üzerine üçüncü pasajdaki hücreler ekildi. Hücrelerin üzerlerine ilk ekim yapılan gün cDMEM besiyeri eklendi ve 24 saat süreyle lamel yüzeyine yayılması sağlandı. 24 saat sonunda lamel yüzeyinde %90-100 yayılıma ulaşan hücrelerin üzerindeki kültür sıvısı çekilip atıldı ve üzerine kondrojenik farklılaştırma besiyeri eklendi ve 37°C %5 CO2 inkübatör de 2 gün arayla besiyerleri değiştirilerek 21 gün süreyle kültüre edildi. Kültür süresinin sonunda hücrelerdeki kondrosit kolonilerinin oluşumu invert mikroskopta değerlendirildi. Kondrojenik farklılaşmanın belirlenmesi için lamele yapışan hücrelerde kondrositleri boyayan Alcian mavisi solüsyonuyla boyanarak mikroskopta incelendi. Kondrositler ve hücrelerarasında proteoglikanlarınoluşumu ışık mikroskobunda incelendi. Kondrositlerin hücre çekirdeği ve proteoglikanlar koyu mavi renkte izlendi.

2.6.5. Kök Hücre Koşullu Ortamının (CM) Hazırlanması

İnsan diş dokusundan izole edilen hücrelerin flow sitometri de karakterizasyon analizi yapılıp sonrasında adipojenik,osteojenik ve kondrojenik soya farklılaşma kültürü yapıldı. Bu veriler sonucunda izole edilen hücrelerin Uluslararası Hücre Tedavileri Topluluğu (ISCT)'nin kriterlerine uygun olarak elde ettiğimiz hücrelerin dental folikül mezenkimal kök hücre olduğu doğrulanmıştır. Koşullu ortam(CM) doğrulaması yapılan DF-MKH'lar üçüncü pasajları %80 yoğunluğa ulaştıklarında toplandı. CM toplanmasından bir gün önce ortam %10 fetal sığır serumu % 1 penisilin-streptomisin, L-glutamin takviyesiyle hazırlanmış taze DMEM ile değiştirildi.%80 yoğunluğa ulaşan hücrelere taze hazırlanmış DMEM eklendikten 24 saat sonra DF-MSC koşullu ortamı pipet yardımıyla çekilip 15 ml'lik falkon tüpe toplandı. Toplanan ortam, atık doku materyalini ve hücre kalıntılarını uzaklaştırmak için 1500 rpm'de 5 dksantrifüjlendi. Santrifüj sonrası supernatant toplandı ve sonraki deneyler için -20 °C'de saklandı.

2.6.6. Hücre Kültürü

DF-MKH'lardan elde edilen koşullu ortamın meme kanseri hücresi proliferasyonu ve apoptozu üzerine etkilerinin gözlemlenmesi için insan meme kanseri hücresi MDA MB–231 hücre hattı kullanılmıştır. Hücre kültürü çalışmalarında kültüre edilecek hücrelerin in vitro ortamda yaşayıp çoğalabilmeleri için gerekli besiyeri ortamı sağlanmalıdır. Deneylerde kullanılan hücreler farklı besiyerlerinde farklı davranış gösterebilirler. Bu sebeple çalışmamızda kullanacağımız hücre hattına uygun besiyeri malzemelerini belirledik. Çalışmamızda besiyeri ortamı olarak %10 FBS ve %1 penisilin-streptomisin, L-glutamin eklenmiş Dulbecco'nun modifiye edilmiş eagle (DMEM) kullanıldı.

MDA-MB 231 hücre hattı için kullanılan besiyeri bileşenleri Tablo 2.2.'de gösterilmiştir.

Tablo 2.2. MDA-MB 231 için kullanılan Besiyeribileşenleri

Bileşenler	**Miktarlar**
%10 FBS	50 ml
%1 penisilin, streptomisin,L-glutamin	2,5 ml (penisilin/streptomisin) + 2,5 ml (L-glutamin)
DMEM	500 ml

ATCC-HTB-26 kod numaralı, 3822 0000 gümrük tarife numaralı, UNITED STATES menşeili, 16.03.2015 teslim tarihli MDA-MB 231 meme kanseri hücresi, ATCC firmasından satın alındı.

MDA-MB 231 meme kanseri hücresi besiyeri yukarıdaki tablo 2.2'ye göre hazırlandıktan sonra 37 ˚C' de su banyosunda ısıtıldı. Sıvı azot tankından (-196 ˚C) çıkarılan, kriyotüp içinde bulunan, 1 ml hücre, 1 dakikadan az sürede, 37 ˚C' de su banyosunda çözüldü ve içerisinde 5 ml DMEM bulunan 15 ml'lik falkon tüp içerisine aktarıldı. 1500 rpm'de 3 dk santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra üstte kalan süpernatant atıldı ve dipte kalan hücre pelleti üzerine 1 ml DMEM eklenerek pipetaj yapılıp homojen hücre süspansiyonu haline getirildi ve hücre sayımı yapıldı.

Hücre sayımı thoma lamı kullanılarak yapıldı. Düz bir zemin üzerine thoma lamı yerleştirildi ve sayım yapılacak iki alanıda kaplıyacak şekilde üzerine lamel kapatıldı. Hücre sayımı için ependorfta hazırlanan hücre süspansiyonundan pipet yardımı ile 10 µl çekilerek sayım yapılacak olan thoma lamının iki alanına da yavaşça pipetlendi. Thoma lamındaki hücreler ışık mikroskobunda 10X büyütmede sayıldı. Hücre sayımı yapılırken thoma lamının her iki sayım alanında da 16 büyük karenin 5 büyük karesindeki hücreler sayılıp ortalaması alınıp 1 büyük karede ortalama kaç hücre olduğu hesaplandıktan sonra 1 ml deki hücre sayısı hesaplandı.1 ml deki toplam hücre sayısı; dilüsyon oranı (2),thoma lamının toplam kare sayısı (16) ve hacim sabiti 10^4 (0,1 mm^3 deki sayım) ile çarpılarak hesaplandı.

Hücre sayımı yapıldıktan sonra $5x10^5$ hücre 7 ml hücre kültür besiyeri ile sulandırıldı, homojenize edildi ve 100 cm^2'lik petri kabına ekilip nemlendirilmiş, %5 CO_2 içeren ve 37˚C'lik inkübatörde kültüre edildi. Hücre ekimi gerçekleştirilen kültür kapları günlük olarak canlılık, çoğalma ve enfeksiyon açısından değerlendirilmiştir. Her iki günde bir hücre kültür besiyeri değiştirilerek kültür işlemine devam edilmiştir. Kültür kaplarında %80 yoğunluğa ulaşan hücreler pasaja alındı.

Hücrelerin pasaja alınması işlemi laminar hava akımlı kabin içerisinde steriliteye dikkat edilerek yapıldı. Öncelikle petri kabındaki besiyeri steril pipet aracılığı ile uzaklaştırıldı ve içerisine 2 ml PBS eklenerek kültür tabanı yıkandı. Yıkama işleminden sonra kültür kabı içerisindeki PBS steril pipet aracılığı ile uzaklaştırılıp kültür kabı içerisine 1000 µl %0,25 Tripsin-EDTA eklenerek kültür kabı 37°C inkübatörde 4-5 dakika inkübe edildi. Bu süre içerisinde kültür kabı tabanında yapışık olan hücrelerin kalkıp kalkmadığı invert mikroskopta gözlemlendi. Hücrelerin kalktığı görüldüğünde tripsininin aktivasyonunu sağlamak için petri içerisine 4 ml cDMEM eklenerek pipetaj yapılıp homojen hale getirilen hücre süspansiyonu 2 adet 15 ml'lik falkon tüpe aktarıldı. Petri içerisine tekrar 2 ml cDMEM eklenerek pipetaj yapılıp kalan hücrelerde pipet yardımıyla 15 ml'lik falkon tüpe aktarıldı.1500 rpm'de 3 dk santrifüj yapıldı. Santrifüj işleminden sonra falkon tüplerden birinde bulunan hücreler DMEM ile süspanse edilip petri kabına ekilerek hücre kültürüne devam edildi ve diğer falkon tüpdeki hücreler dondurulup stoklandı.

Hücre stoklanması için; tripsinle muamele edilen hücrelerin santrifüjden sonra supernatantları uzaklaştırıldı hücre pelleti üzerine %10 DMSO ve %90 FBS içeren 1200 µl dondurma solüsyonu eklendi pipetaj yapılarak homojen hücre süspansiyonu haline getirildi. 1,5ml'lik 2 adet kriyo tüpe bölünerek -20˚C'ye kaldırıldı. Hücreler daha sonraki deneylerde kullanılmak üzere, -20˚C'de 1 saat bekledikten sonra -80˚C'ye alındı. Uzun süre saklanması gereken hücreler ise -80˚C'den sıvı azot tankına taşındı.

2.6.7. DF-MSC Koşullu Ortamının MDA-MB 231 Hücre Proliferasyonuna Etkisinin Belirlenmesi

DF-MSC koşul ortamı üçüncü pasaja gelmiş yüzey belirteçleri flow sitometri de doğrulanmış ve adipojenik, osteojenik ve kondrojenik farklılaşmaları yapılmış hücreler %80 yoğunluğa ulaştıktan sonra 24 saatlik koşullu ortamı olarak toplandı. Bu toplanan koşullu ortamı DMEM besiyeri ile %50,%40,%30,%20 ve %10 olacak şekilde hazırlanıp MDA-MB 231 hücresinin proliferasyonuna etkisine bakıldı.

96 kuyucuklu steril kültür kaplarına önce 100'er µl DMEM eklendi ve hücre sayımı yapıldıktan sonra her bir kuyucuğa 5.000 hücre olacak şekilde MDA-MB 231 hücre hattından eklendi.24 saat sonra kuyucuklardaki DMEM çekilerek belirlenmiş olan DF-MKH koşullu ortamı doz grupları (%100, %90, %80, %70, %60, %50, %40, %30, %20, %10) hücrelere uygulandı. Analiz 24 ve 48 saat boyunca takip edilerek her saat sonunda her bir kuyucuğa 20 µl MTT (3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolyum bromür) reaktifi koyuldu ve 3-4 saat inkübatörde inkübasyona bırakıldı. Sonrasında kuyucuklardaki MTT uygulanmış besiyeri uzaklaştırılıp 150 µl DMSO eklendi ve karanlıkta 20 dk. boyunca karıştırıcı üzerinde inkübe edildi. İnkübasyon sonunda 570nm dalga boyunda ELISA okuyucu ile her kuyucuğunabsorbansı alındı. İstatistiki açıdan değerlendirilebilmesi için her grup 5'er kuyucukla çalışıldı. Bu kuyucukların absorbanslarının ortalamaları alınarak % canlılıkları hesaplandı. Her doz konsantrasyonu için ölçülen absorbans değerinin, kontrol değerine oranı 100 ile çarpılarak % hücre canlılığı elde edildi.

% Hücre canlılığı = (Aö/Ak) x 100 (Aö: Örneğin absorbansı; Ak: Kontrol grubunun absorbansı)

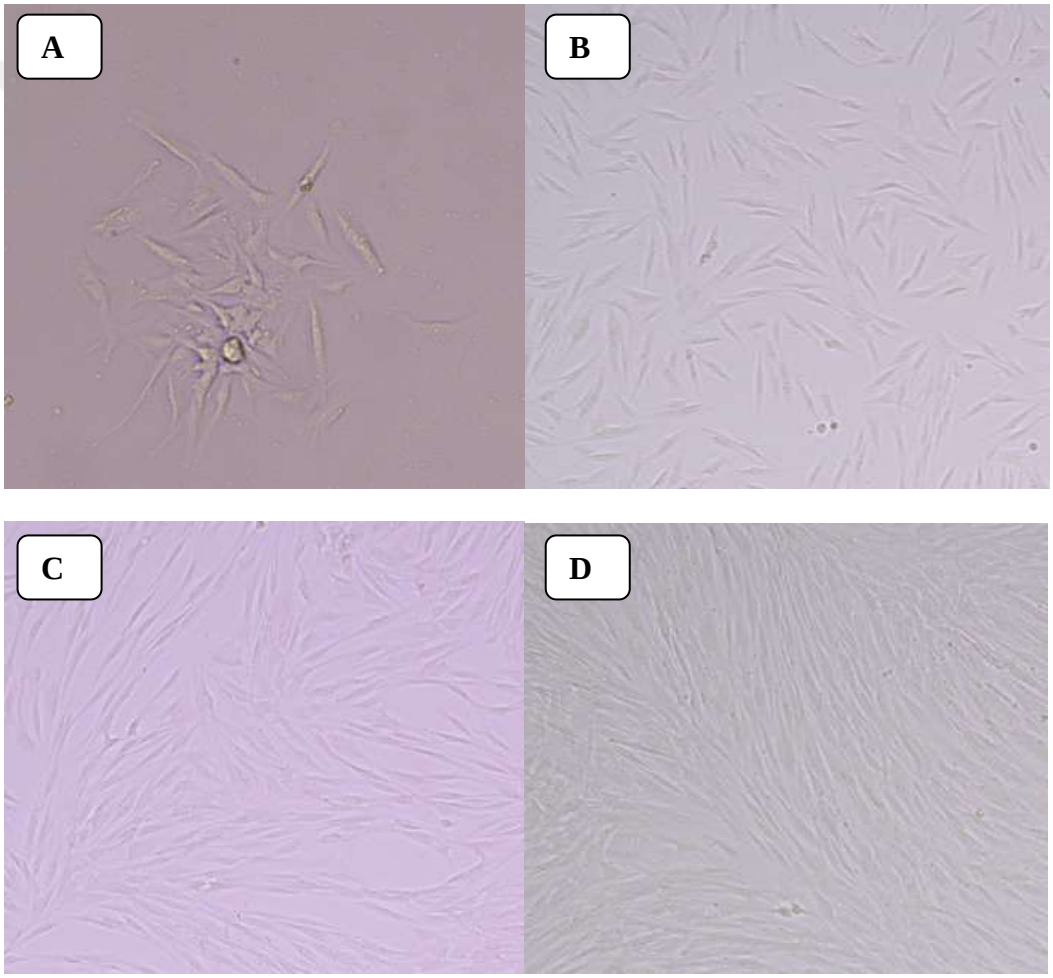
2.6.8. DF-MSC Koşul Ortamının MDA-MB 231 Hücre Apoptozuna Etkisinin Belirlenmesi

6 kuyucuklu steril kültür kaplarına önce 2000'er µl DMEM eklendi ve hücre sayımı sapıldıktan sonra her bir kuyucuğa 25.000 hücre olacak şekilde MDA-MB 231 hücre hattından eklendi.24 saat sonra kuyucuklardaki DMEM çekilerek belirlenmiş olan DF-MKH koşul ortam doz grupları (%50, %40, %30, %20, %10) hücrelere uygulandı. Apoptoz analizi için 24 ve 48 saat boyunca takip edilerek her saat sonunda hücre kuyucuklarında ki dozlu besiyeri uzaklaştırıldı. Kuyucuklara 1 ml PBS solüsyonu eklenerek yıkama işlemi yapıldı ardından kuyucuklara 250 µl %0,25 Tripsin-EDTA eklenerek kültür kabı 37°C inkübatörde 4-5 dakika inkübe edildi. Bu süre içerisinde kültür kabı tabanında yapışık olan hücrelerin kalkıp kalkmadığı invert mikroskopta gözlemlendi. Hücrelerin kalktığı görüldüğünde tripsininin aktivasyonunu sağlamak için kuyucuk içerisine 1 ml cDMEM eklenerek pipetaj yapılıp homojen hale getirilen hücre süspansiyonu 1,5 ml'lik ependorf tüplere aktarıldı. 1500 rpm'de 3 dk santrifüj yapıldı. Santrifüj işleminden sonra supernatant uzaklaştırılıp 100 µl cDMEM ile hücre pelleti homojen hale getirildi ve üzerine 100 µl Muse Annexin V-Dead Cell(Katolog no:MCH100105) analiz kitinden eklenip pipetaj yapılıp karanlıkta 20 dk inkübe edildi. İnkübasyonun ardından Luminex Muse hücre analiz cihazında apoptoz analizi gerçekleştirildi.

3. BULGULAR

3.1. Diş Folikülü Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre İzolasyonu

Kök hücreler diş folikül dokusundan izole edildikten sonra T-25 cm2' lik flasklara ekildi ve hücrelerin morfolojik özellikleri invert mikroskop ile incelenerek takip edildi. Birinci kültürde hücrelerin hızlıca çoğaldıkları ve flask yüzeyinde kümeleşme şeklinde çoğaldıkları görüldü (Şekil). Hücreler yaklaşık %70-80 yayılım gösterdikten sonra birinci pasaja alınarak T-75 cm2' lik flasklara pasajlandı. Pasajlama işleminden sonra hücreler 4-5 gün içerisinde flask yüzeyini kapladı ve bir sonraki pasaja alındı.

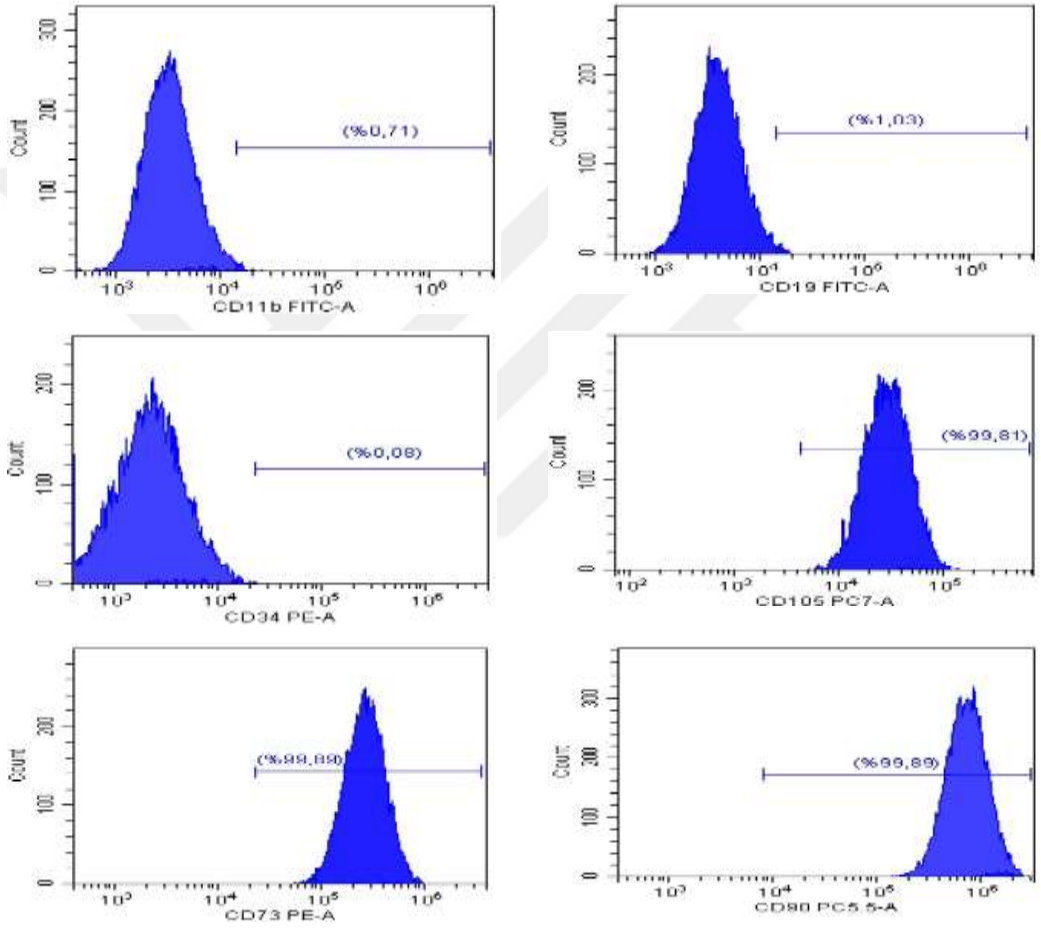


Şekil 3.1. DF-MKH' lerin morfolojik görünümü. A) DF-MKH hücrelerinin birinci kültür (P0, 3. gün), B) birinci pasaj sonrası (P1, 3. gün), C-D) sonraki alt kültürlerinin (C: P2, 3. gün; D: P3, 3. gün) invert mikroskobu görüntülerinde, kök hücrelerin fibroblast benzeri morfolojiye sahip oldukları görülmektedir (Büyütme: AX20, B-C-DX10)

3.2. DF-MKH'lerin Karakterizasyonu ve Farklılaşma Potansiyelinin Değerlendirilmesi

3.2.1. DF-MKH Hücrelerin Flow Sitometri Analizi

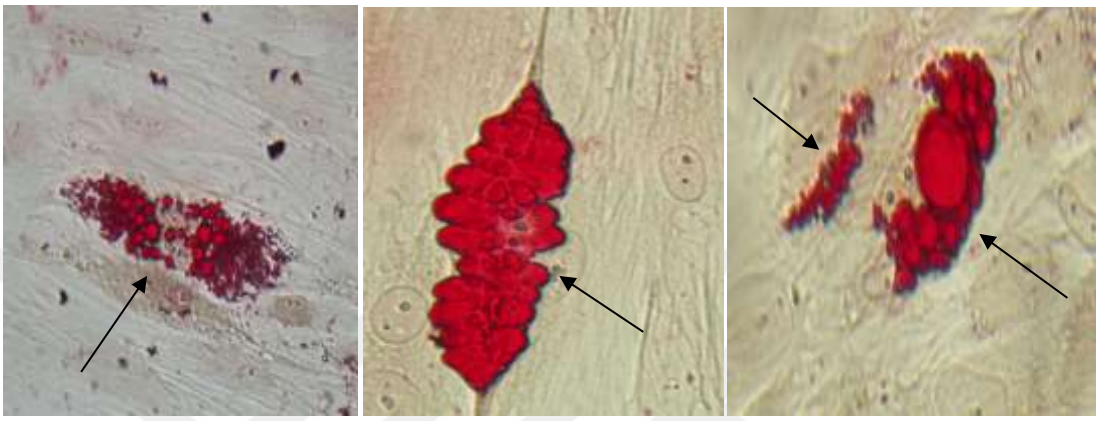
DF-MKH hücrelerinin flowsitometrik analizleri sonucunda hematopoetik kök hücre belirteci olan CD11b (%0,71), CD19 (%1,03) ve CD34 (%0,08) negatif ekspresyon gösterirken, MKH' lara özgü CD105 (%99,81), CD73 (%99,89) ve CD90 (%99,89)'ı yüzeylerinde bulundurdukları görüldü (Grafik 3.1.).



Grafik 3.1. DF-MKH hücrelerinin immunofenotipik özelliklerinin flowsitometri sonuçları.

3.2.2. DF-MKH Hücrelerin Adipojenik Yönde Farklılaştırılması.

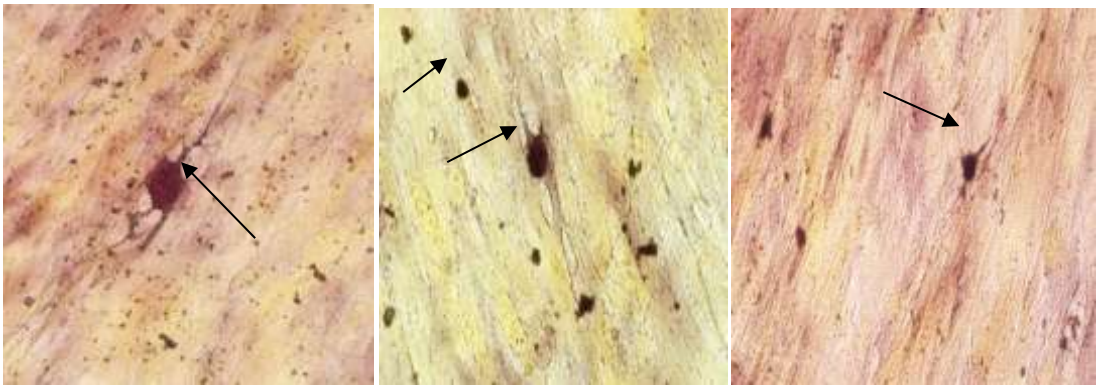
Adipojenik yönde farklılaştırmak için adipojenik besiyerinde 21 gün süre ile kültürleri yapıldı ve DF-MKH hücrelerinin adiposit benzeri hücrelere farklılaştıkları gösterildi.Adipojenik besiyeriyle kültür başlangıcından 21.gün sonunda Oilred O ile boyama yapıldı ve sonrasında kırmızı renkte hücre içi yağ damlacıkları görüldü (Şekil 3.2.).



Şekil 3.2. Adipojenik farklılaştırma besiyeri ile kültürü yapılan ve sonrasında Oilred o ile boyanan DF-MKH hücrelerinde kırmızı renkte yağ damlacıkları görüldü.

3.2.3. DF-MKH Hücrelerin Osteojenik Yönde Farklılaştırılması.

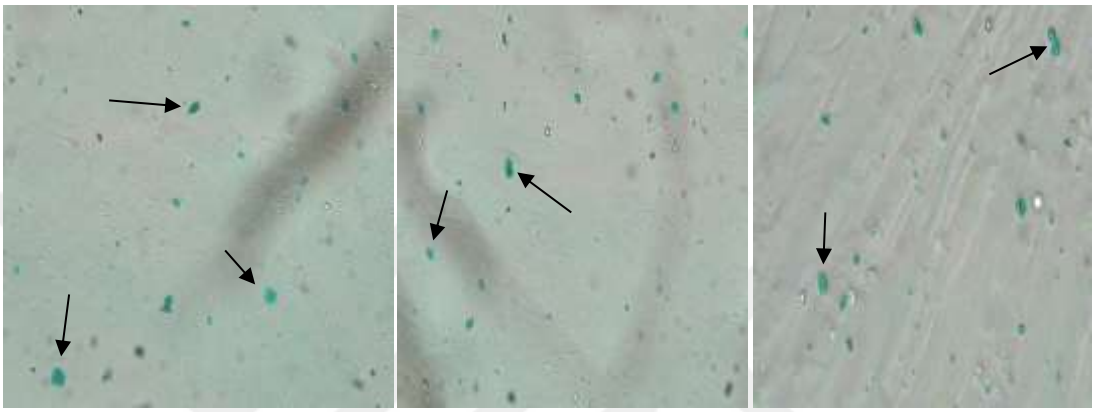
Osteojenik yönde farklılaştırmak için osteojenik besiyerinde 21 gün süre ile kültürleri yapıldı ve DF-MKH hücrelerinin osteoblast benzeri hücrelere farklılaştıkları gösterildi. Osteojenik besiyeriyle kültür başlangıcından 21.gün sonunda alizarin kırmızısı ile boyama yapıldı ve sonrasında kırmızı renkte osteoblast hücreleri görüldü (Şekil 3.3.).



Şekil 3.3. Osteojenik farklılaştırma besiyeri ile kültürü yapılan ve sonrasında alizarin kırmızısı ile boyanan DF-MKH hücrelerinde parlak kırmızı renkte boyanmış osteoblast nodülleri görülmektedir.

3.2.4. DF-MKH Hücrelerin Kondrojenik Yönde Farklılaştırılması.

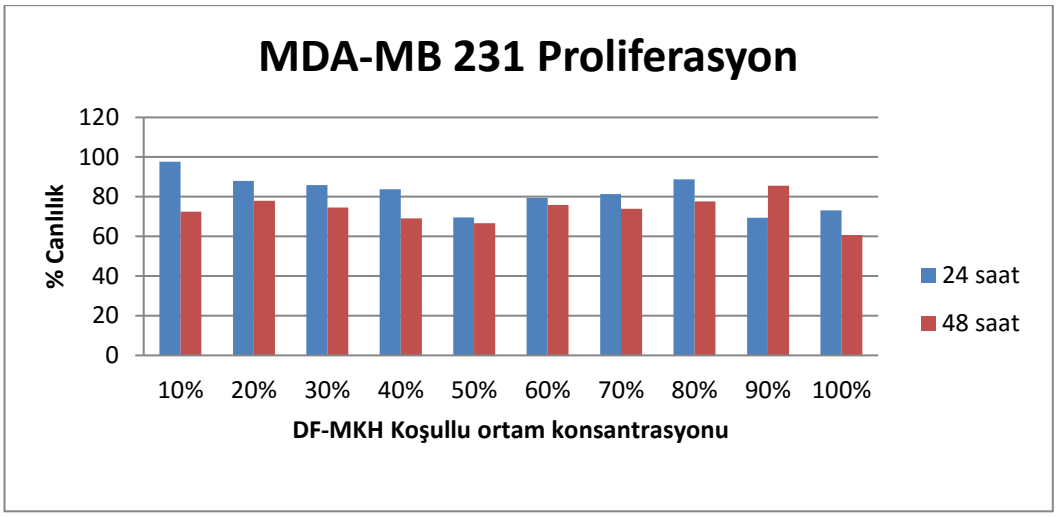
Kondrojenik yönde farklılaştırmak için kondrojenik besiyerinde 21 gün süre ile kültürleri yapıldı ve DF-MKH hücrelerinin kondrosit benzeri hücrelere farklılaştıkları gösterildi. Kondrojenik besiyeriyle kültür başlangıcından 21.gün sonunda alcian blue ile boyama yapıldı ve sonrasında hücrelerde kondrositler tarafından üretilen proteoglikanların mavi renkte boyandığı görüldü (Şekil 3.5.).



Şekil 3.4. Kondrojenik farklılaştırma besiyeri ile kültürü yapılan ve sonrasında Alcianblue ile boyanan DF-MKH hücrelerinde mavi renkli boyanan proteoglikanlar

3.3. DF-MSC Koşul Ortamının Hücre Proliferasyonuna Etkisi

DF-MKH koşul ortamının MDA-MB 231 hücre proliferasyonuna konsantrasyon ve zaman bağımlı etkisi MTT (3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolyum bromür) hücre canlılık testiyle analiz edildi. Belirlenen farklı konsantrasyon koşul ortam ile muamele edilen hücrelerin proliferasyonu 24 ve 48 saat boyunca takip edildi. Koşul ortamının hücre hattındaki etkisi çizilen konsantrasyon-canlılık grafiğinde gösterildi (Grafik 3.2.).



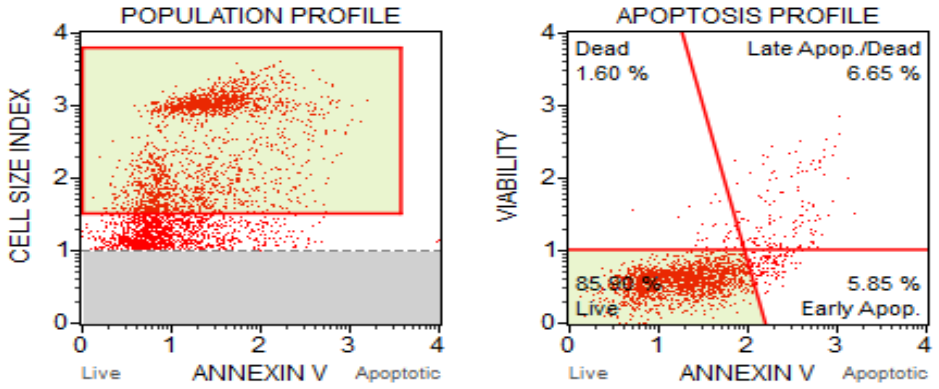
Grafik 3.2. MDA-MB 231 hücre hattına uygulanan farklı konsantrasyon koşul ortamının proliferasyonuna etkisi.

% canlılık-konsantrasyon grafiğinden yararlanarak MDA-MB 231 hücre hattına koşullu ortamın apoptoz etkisinin analizi için her iki saatte bir proliferasyona etkisi gözlemlenerek % 50 DF-MKH koşul ortam konsantrasyonu belirlendi.

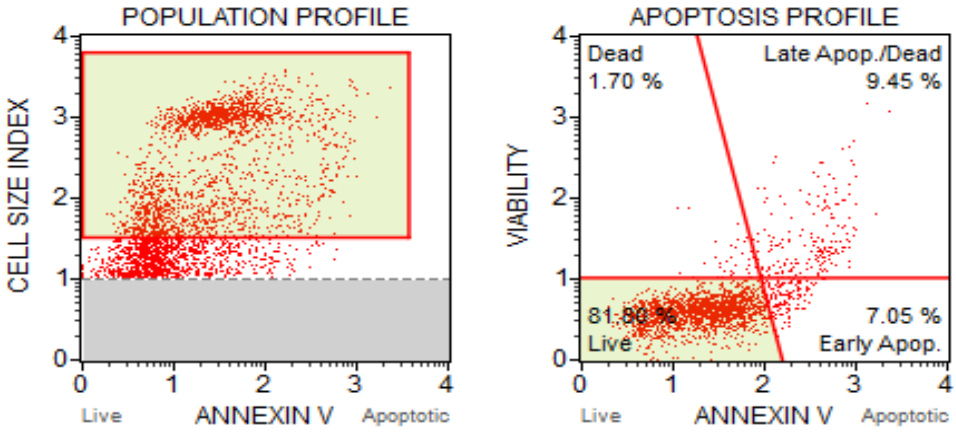
3.4. DF-MKH Koşul Ortamının MDA-MB 231 Hücre Hattına Apoptoz Etkisi

MDA-MB 231 hücre hattına uygulanan DF-MKH koşul ortamı deneylerinde Annexin V kiti kullanılarak flow sitometri cihazında (Muse® Cell Analyzer) analiz yapıldı. Kontrol hücreleri kullanılarak cihaz kalibrasyonu yapıldı ve hücreler cihaza tanıtıldı.24. saatte ve 48. saatte, kontrol (sadece hücre) ve DF-MKH koşul ortamı (% 50 konsantrasyon) uygulanan hücrelerin apoptoz analizleri yapıldı(Şekil 3.6.). Annexin V ile canlı hücreler, erken apoptotik hücreler ve geç apoptotik hücreler belirlendi.

24 saatlik apoptoz analiz sonuçlarına göre; MDA-MB 231 kontrol hücrelerin canlılığı %85,9 erken apoptoz miktarı % 5,85 ve gec apoptoz miktarı % 6,65 bulunmuştur. DF-MKH koşul ortamı uygulanmış MDA-MB 231 hücrelerinde ise hücre canlılığı % 81,8 erken apoptoz miktarı % 7,05 ve gec apoptoz miktarı % 9,45 bulunmuştur (Grafik 3.3,Grafik 3.4. ve Tablo 3.1. de görüldüğü gibi)



Grafik 3.3. MDA-MB 231 kontrol hücreleri(24. Saat)

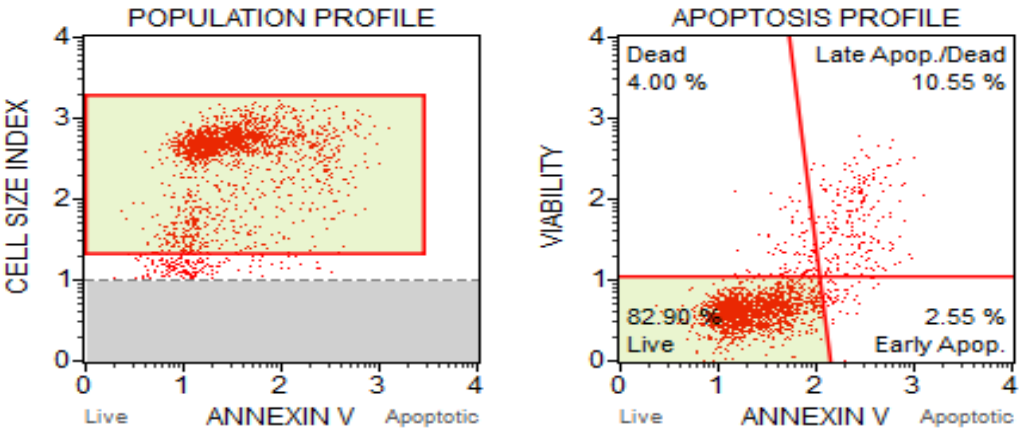


Grafik 3.4. MDA-MB 231 DF-MKH Koşul Ortam Uygulanan Hücreler(24.saat)

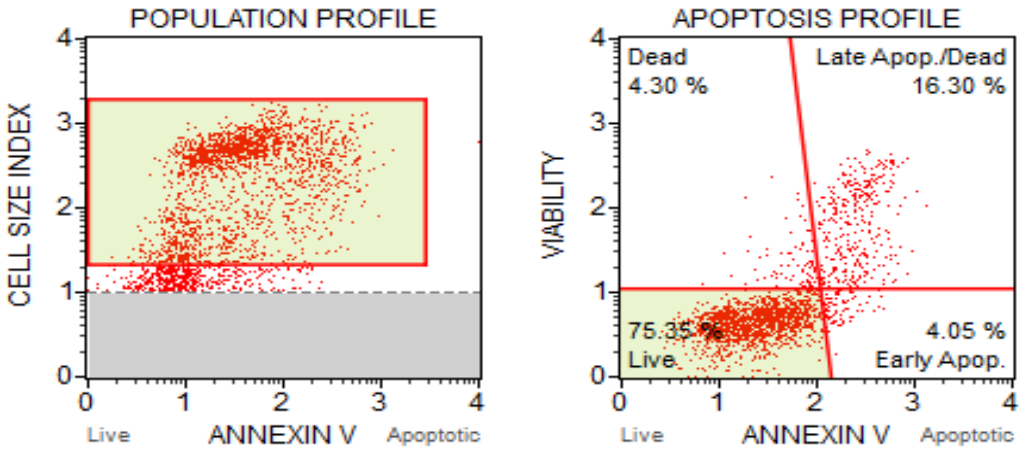
Tablo 3.1.MDA-MB 231 hücre apoptoz değerleri (24.saat)

	Canlı	**Erken Apoptotik**	**Geç Apoptotik**	**Debris**	**Total Apoptotik**
Kontrol	%85.90	%5.85	%6.65	%1.60	%12.50
DF-MSC koşul ortam	%81.80	%7.05	%9.45	%1.70	%16.50

48 saatlik apoptoz analiz sonuçlarına göre; MDA-MB 231 kontrol hücrelerin canlılığı %82,9 erken apoptoz miktarı % 2,55 ve gec apoptoz miktarı % 10,55 bulunmuştur. DF-MKH koşul ortamı uygulanmış MDA-MB 231 hücrelerinde ise hücre canlılığı % 75,35 erken apoptoz miktarı % 4,05 ve gec apoptoz miktarı % 16,3 bulunmuştur (Grafik 3.5,Grafik 3.6. ve Tablo 3.2. de görüldüğü gibi).



Grafik 3.5. MDA-MB 231 Kontrol Hücreleri(48. Saat)



Grafik 3.6. MDA-MB 231 DF-MKH Koşul Ortam Uygulanan Hücreler(48.saat)

Tablo 3.2. MDA-MB 231 hücre apoptoz değerleri (48.saat)

	Canlı	**Erken Apoptotik**	**Geç Apoptotik**	**Debris**	**Total Apoptotik**
Kontrol	% 82.90	%2.55	%10.55	%4	%13.10
DF-MSC koşul ortam	%75.35	%4.05	%16.30	%4.30	%20.35

Sonuçlara göre; DF-MKH koşul ortamı uygulanmış MDA-MB 231 hücrelerinde kontrol hücrelerine göre, apoptoz oranında artış görülmüş ve 48.saatteki grubun apoptoz oranı 24.saatteki grubun apoptoz oranına göre artış göstermiştir .

4. TARTIŞMA

Meme kanseri, kadınlarda en yaygın görülen kanser türüdür ve dünya genelinde kadınlarda en sık görülen ölüm nedenlerinden biridir. Her hastada ve hatta hastalığın her evresinde farklı genotipik ve fenotipik özellikler gösteren meme kanseri insan hücrelerinin sadece fiziksel fonksiyonunu değil aynı zamanda kişinin hayat standardına da önemli ölçüde etki göstermektedir(Yanovich ve ark 2018).Bu gözlemler ışığında, ölüm oranının yüksek olduğu meme kanseri tedavisinde uygulanan ana tedavi yöntemleri ciddi fonksiyonel bozukluklara veya şekil bozukluğuna neden olabilecek seçici olmayan tekniklerine dayanır. Bu tedavi sonrası bozukluklar ve standart tedavilerin yetersiz kalması nedeni ile yeni tamamlayıcı yöntemler, hastalığın iyileşme oranının arttırılmasında önemli rol oynamakta ve hücresel tedavi yaklaşımları neredeyse zorunlu hale gelmektedir. Hücresel tedavi yaklaşımında fonksiyonel veya yapısal doku onarımı özelliği dışında immunmodülatör, pro-anjiyonik, pro-survival ve anti-apoptotik etkileriyle MKH'lar dikkat çekmiştir. Bu yönde yapılan çalışmalar sonucunda MKH'ların hem proliferatif hemde anti-tümörijenik etkileri literatürde bildirilmiştir (Zimmerlin ve ark 2013, Yenilmez 2015).

Hücre tedavisi, kanser de dahil olmak üzere çok çeşitli patolojilerin tedavi olasılığını ortaya çıkaran bir tıbbi alandır. Hücre terapisi, kanser de dahil olmak üzere bir dizi hastalık için yeni tedavi yöntemleri sunma potansiyeline sahiptir ve terapötik transgenleri iletmek için deneysel olarak kök hücreler ve özellikle MKH'lar kullanılmıştır(Albarenque ve ark 2011). Son yıllarda MKH'ların tümör üzerindeki etkilerini araştırmak için kapsamlı çalışmalar yapılmıştır. Ancak, bu konu hala tartışılmaktadır. Çeşitli çalışmalar, MKH'ların sinyal yolunu etkileyerek tümör ilerlemesini ve metastazını teşvik ettiğini gösterirken, diğer çalışmalar MKH'ların hem proliferasyonu hem de apoptozu baskılayabilen yolları etkilediğini göstermektedir (Lin ve ark 2019).

MKH'lar kordon kanı, Wharton'un jölesi, plasenta, kemik iliği, dişler ve yağ dokusu gibi çeşitli doğum sonrası bölgelerden ve dokulardan izole edilebilir. Diş dokuları, MKH kaynağı olarak umut verici dokulardır. Dental dokulardaki MKH'ların diğer dokulara farklılaşma potansiyeli vardır. Diş dokusu SHED'ler, DPSC'ler, DFSC'ler, apikal papilla mezenkimal kök hücreler (APSC'ler) ve

PDLSC'ler içeren diş MKH'ları sağlayabilir. Dental doku MKH'ları, kolayca erişilebilir bir kaynağı temsil eder ve diğer doku hücre hatlarına farklılaşma potansiyeline sahiptir ve çeşitli hastalıkları tedavi etmek için kullanılabilir. Bu hücreler, diğer hücre tiplerinden farklı olarak minimal invazivlikle ekstrakte edilebilir ve bu nedenle kolayca erişilebilir (Yildirim ve ark 2016).

CM, hücre kaynaklı sekretom ve veziküler elementlerin rejeneratif ortamını temsil eder. Sekretom, hücre dışı boşluğa salgılanan faktörler/moleküller kümesi olarak tanımlanır. Bu faktörler arasında diğerleri arasında çözünür proteinler, serbest nükleik asitler, lipitler ve hücre dışı veziküller bulunur. MKH'ların hem in vitro hem de in vivo indüklediği pro- veya anti-tümör etkisi ile ilgili çelişkili sonuçlar açıklanmıştır. MKH işlevselliğiyle ilgili bu tutarsızlıklar, daha homojen popülasyonu izole etmek için spesifik belirteçlerin bulunmamasından kaynaklanıyor olabilir. Bu bulgular CM'nin etkisinin MKH'ın kaynağına bağlı olabileceği hipotezini desteklemektedir. Son yapılan çalışmalarda MKH'lar tarafından üretilen sitokinler, büyüme faktörleri, mikroRNAlar, proteazomlar ve eksozomlar dahil olmak üzere çok çeşitli biyoaktif faktörler sayısız fizyolojik sürecin düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir (Vizoso ve ark 2017).

Yapılan *in vitro*ve *in vivo* çalışmalar farklı kaynaklardan izole edilen MKH'ların farklı kanser türlerinde farklı etki gösterdiğini bildirmiştir.

Alaa T. Alshareeda ve ark. tarafından yapılmış bir çalışmada plasental türevli koryonikvillus kaynaklı MKH'ların (KVMKH) MDA-MB 231 meme kanseri hücresi üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Başarılı bir şekilde izole edilen KVMKH'ların flow sitometri de pozitif ve negatif yüzey belirteç analizi yapılmış ve farklılaşma potansiyeli test edilerek MKH olduğu doğrulanmıştır. KVMKH'ların MDA-MB 231 hücrelerinin proliferasyonuna etkisini test etmek için MDA-MB231 hücreleri, bir transwell membran kullanılarak doğrudan temas yoluyla KVMKH'lar ile muamele edilmiş. Daha sonra, xCELLigence sistemi ve Boyden odacığı göç deneyi kullanılarak gerçek zamanlı bir hücre çoğalması deneyi gerçekleştirilmiş. Her iki testten elde edilen veriler, KVMKH'ların MDA-MB231 hücrelerinin proliferasyonunu ve göçünü önemli ölçüde azalttığını ortaya koymuştur (Alshareeda ve ark 2018).

Bizim çalışmamızda da aynı hücre hattı kullanmamıza rağmen MKH kaynağımızın farklı olması ve kanser hücresine uyguladığımız dozların MKH kaynaklı CM olması nedeniyle bu çalışmaya kıyasla proliferasyonda önemli bir değişiklik görülmemiştir.

Yi-ChiaWu ve ark. tarafından yapılmış bir çalışmada adipoz doku kaynaklı MKH'lardan elde edilmiş CM'nin MCF-7, MDA-MB231 ve MDA-MB468 hücre hatlarındaki apoptoz üzerine etkisi incelenmiştir. Adipoz doku kaynaklı MKH'lar ameliyat edilen hastalardan elde edilen subkutan yağ dokusu kalıntılarından izole edilmiş. Kanserli MCF-7, MDA-MB231 ve MDA-MB468 hücre çizgileri ve bir kanserli olmayan M10/H184B5F5 hücre çizgisi, analiz için varyant konsantrasyonlarında adipoz doku kaynaklı MKH'lardan türetilmiş koşullandırılmış ortam (CM) ile 72 saat kültürlenmiş. Kültür sonunda proliferasyon ve canlılık analizi flow sitometride propidyum iyodür (PI) boyaması kullanılarak tespit edilmiş. Analiz sonucunda koşullandırılmış ortamın MCF-7, MDA-MB231 ve MDA-MB468 hücre hatlarında apoptozu tetikleyerek hücre canlılığını önemli ölçüde azalttığı gözlemlenmiş. Buna karşılık, M10/H184B5F5 hücrelerinde düşük CM konsantrasyonunda hücre ölümü yerine hücre proliferasyonu tespit edilmiş ve en yüksek CM konsantrasyonuna maruz bırakıldığında bile hücre ölümü gözlenmemiş. Sonuç olarak da kanserli ve kanserli olmayan meme hücrelerinin adipoz dokudan türetilen türetilen CM'ye farklı tepki verdiğini göstermiştir (Wu ve ark 2019).

Bizim çalışmamızda da aynı hücre hattı ve kaynağı farklı olmasına rağmen koşullu ortam kullandık ancak uygulama yöntemi benzer olsa bile kaynağa göre farklı etkilerin çıkabileceği düşüncesine sonuçlarımız kanıt olabilir.

Guo-hu Di ve ark. tarafından yapılmış bir çalışmada yaşlanmış ve genç insan göbek kordon mezenkimal kök hücrelerinin (UCMSC) meme kanseri hücre hatlarındaki (MDA-MB 231 ve MCF 7) tümör hücre göçü ve çoğalması üzerine etkisi incelenmiştir. UCMSC'lerin yaşlanması için kültüre alındıktan sonra seri olarak 40'ın üzerinde pasaja geçirilmiş ve MKH yaşlanmasını öldürücü olmayan bir oksidatif stres dozu uygulanmış. MKH yaşlanması β-galaktosidaz boyaması ile gösterilmiş. Genç ve yaşlı MKH'ların şartlandırılmış ortamı (CM) elde etmek için 6 kuyucuklu kültür kabına kuyucuk başına $1x10^5$ hücre olacak şekilde ekilmiş ve 24 saat inkübe edildikten sonra CM toplanıp santrifüj edilip 0.22 µm'lik steril filtreden

geçirilip deney için hazır hale getirilmiş. Meme kanseri hücre proliferasyonunu incelemek için hücre hatları 96 kuyucuklu kültür kabına ekilmiş yaşlı ve genç MKH'ların koşul ortamıyla muamele edilip analiz edilmiş. Analizler sonucunda yaşlı MKH'ların şartlandırılmış ortamı ile muamele edilen meme kanseri hücrelerinin proliferasyonunun genç MKH'ların şartlandırılmış ortamı ile muamele edilen meme kanseri hücrelerine göre arttığı gözlenmiş. Sonuç olarak MKH'lar ve meme kanseri hücreleri arasında doğrudan temas olmadığından, yaşlanmayan MKH'lardan salgılanan otokrin veya parakrin faktörlerinin büyük olasılıkla bu artıştan sorumlu olduğu tahmin edilmiş. Yaşlı hücrelerin de IL-6 / STAT-3 sinyal yolundan kaynaklı kanseri teşvik eden aktivite gösterdikleri belirtilmiş (Di ve ark 2014).

Bizim çalışmamızda MKH olduğu doğrulanmış 3.pasajdaki genç hücrelerden elde edilen koşullu ortam kullanıldı ve proliferasyonda önemli bir değişiklik görülmedi. Bu çalışma ışığında aynı yöntemle yaşlı DF-MKH'lardan elde edilen koşullu ortam çalışılarak kıyaslama yapılabilir.

YuanWangve ark. tarafından yapılmış bir çalışmada insan göbek kordon kaynaklı MKH'lardan elde edilen koşullu ortamın meme kanseri in vivo tümör modelinde anjiyogenezdeki rolü incelenmiş. Öncelikle in vivo tümör modeli oluşturmak için bir grup fareye sadece meme kanseri hücre serisi olan MCF7 enjekte edilmiş bir grubada elde edilen koşullu ortam ile farklı oranlarda karıştırılmış MCF7 enjekte edilmiş. Enjeksiyon sonucunda tüm farelerde enjeksiyon bölgelerinde büyüyen tümörler gelişmiş ve koşullu ortam ile birleştirilmiş MCF7 grubunda yalnızca MCF7 tümör hücreleri ile enjekte edilen gruba göre daha büyük tümörlerin geliştiği gözlemlenmiş. Yapılan analizler sonucunda tümör bölgesindeki büyümenin MCF7 hücrelerdekindeki proliferasyona bağlı olduğu gözlenlenmiş. Buna karşılık aynı şekilde yapılan MDA-MB 231 in vivo modelinde insan göbek kordon kaynaklı MKH'lardan elde edilen koşullu ortamın tümör büyümesini etkilemediği gözlemlenmiş. Sonuç olarak, elde edilen verilerin göbek kordon kaynaklı MKH'ların, proanjiyojenik sitokinler CXCL1 ve CXCL8 salgılayarak BCC'lerin ilerlemesinde prokarsinojenik bir rol oynadığını göstermiştir (Wang ve ark 2017).

XiaoheLuo ve ark. tarafından yapılmış bir çalışmada MKH'lar ve tümör hücreleri arasındaki karmaşık diyaloğu daha da tanımlamak için insan göbek kordon kaynaklı MKH'lardan elde edilen koşul ortamın meme ve yumurtalık kanseri

hücreleriyle birlikte kültür edilip kanser hücreleri üzerine etkisi incelenmiş. İzole edilip immün fenotip analizi ve farklılaşma analizi yapıldıktan sonra UC-MKH'ların koşullu ortamı elde edilmiş ve insan meme kanseri hücresi MDA-MB-231 ve insan yumurtalık kanseri hücresi IGROV1 ile dolaylı kültürleri yapılmış. Kültür sonrası yapılan analizlerde meme ve yumurtalık kanseri hücrelerinin proliferasyon oranında ve apoptoz oranlarında kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığında önemli bir fark görülmemiş (Luo ve ark 2018).

YuanWang, Xiaohe Luo ve ark. kullandıkları hücre hatları ve hücreye uyguladıkları koşullu ortam yöntemi MKH kaynağı farklı olmasına rağmen benzerlik göstermektedir. Elde edilen sonuçlara bakıldığında bizim sonuçlarımızla benzerdir. Buna göre; aynı kaynaktan elde edilmiş MKH ların farklı kanser hücre hatlarında farklı etkilere sebep olacağı belirtildiği gibi farklı kaynaktan elde edilen MKH koşullu ortamı aynı kanser hücre hattında aynı etki gösterebilir diyebiliriz.

Hamideh Salehive ark. tarafından yapılmış bir çalışmada kanser tedavisinde kullanılan terapötik ajanların mezenkimal kök hücreler aracılığı ile tümöre taşınıp sonuç olarak ilaçların terapötik konsantrasyonlarda lokal olarak verildiğinde ilacın MCF 7 meme kanseri hücresi üzerindeki etkisi incelenmiş. Bu çalışmada MKH kaynağı olarak diş pulpa mezenkimal kök hücre (DP-MKH) ve kemik iliği mezenkimal kök hücre (Kİ-MKH) kullanılmış ve kanser tedavisinde kullanılan ilaçlardanda paklitaksel kullanılmış. Yapılan çalışmada öncelikle MCF-7 meme kanseri hücre hattı üzerinde canlılığı azalttığı bilinen paklitakselin DP-MKH ve Kİ-MKH üzerindeki etkisi ve paklitaksel ile yüklenmiş DP-MKH'lardan MCF-7 meme kanseri hücrelerine salınan in vitro şartlandırılmış ortam kullanılarak indüklenen sitotoksik hasar analiz edilmiş. Paklitaksel ile muamele sonrasında yapılan MTT canlılık analizi sonucunda Kİ-MKH ve MCF-7 hücrelerine kıyasla DP-MKH'lar daha yüksek bir canlılık göstermiş ve bir sonraki analiz olan MCF-7 paklitaksel tedavisinde aracı taşıyıcı olarak DP-MKH'lar kullanılmış. Meme kanseri hücreleri (MCF-7 hücreleri), DP-MKH'lar tarafından salınan paklitakseli içeren kültür ortamında (yani koşullandırılmış ortam (CM)) 3 saat süreyle inkübe edilmiş ve süre sonunda Raman konfokal mikroskopta incelenerek hücre apoptozunun bir yolu olarak sitokrom c'nin mitokondriden salınımı gözlemlenerek MCF-7 hücrelerindeki başlayan apoptoz gözlenlenmiş. Sonuç olarak yapılan sitotoksik analizlerde DP-

MKH'ların aynı koşullar altında Kİ-MKH'lara kıyasla PTX sitotoksisitesine karşı daha dirençli bulunduğunu göstermiştir ve kanser hücrelerine karşı hedeflenmiş ilaç verilmesi için DP-MKH enjeksiyonu, sistemik PTX iletiminin yan etkilerinden kaçınmak ve tedavinin etkinliğini arttırmak için umut verici bir yaklaşım olarak gösterilmiş (Salehi ve ark 2018).

Bizim izole ettiğimiz MKH'ların da dental doku kaynaklı olması nedeniyle kanser tedavisinde kullanılan ilaçlara karşı diğer doku kaynaklı MKH'lara göre daha dirençli olabilir. Benzer çalışmalar planlanarak kemoterapotik ilaçların yan etkilerinin azaltılması ve lokal tedavi yöntemleri konusunda literatüre katkı sağlanabilir.

Doğanve ark. tarafından yapılmış bir çalışmada dental pulpa MKH'larından elde edilmiş koşullu ortamın PC-3 prostat kanser hücre hattı üzerindeki etkileri proliferasyon ve göç analizleriyle incelenmiş. MKH'lar diş pulpa dokusundan izole edilmiş ve immüno fenotip karakterisazyon analizi ve farklılaşma analizleri yapılarak izole edilen hücrelerin MKH olduğu gösterilmiş. DP-MKH lar kültürde %80 konfluent olduğu zaman ortam toplanarak PC-3 hücrelerine uygulanacak olan koşullu ortam elde edilmiş. PC-3 hücrelerine toplanan koşullu ortamın farklı konsantrasyonları (%10, %20, %30, %40, %50) uygulanmış ve uygulamadan 24 saat sonra MTT canlılık testi ile analiz edilmiş. Sonuç olarak DP-MKH'lar PC-3 hücrelerini çevrelemiş ve prostat kanseri hücrelerinin hücre çoğalmasını arttırdığı gözlemlenmiş (Doğan ve ark 2017).

Daha önce yapılmış çalışmalarda farklı kanser hücre hatları üzerinde farklı dokulardan elde edilmiş MKH'ların hücre-hücre ko-kültür, MKH'lardan elde edilmiş koşul ortam yada MKH'lardan elde edilmiş hücre dışı veziküller olan eksozom kaynaklı çalışmalar vardır. Bu çalışmalarda kanser hücresi proliferasyonu ve apoptozu üzerine çelişkili etkileri ortaya konmuştur ancak MKH kaynağı olarak diş folikül dokusu kullanılan araştırmalar yok denecek kadar azdır.

Çalışmamızda MDA-MB 231 meme kanseri hücre hattına diş folikül dokusundan izole edilmiş ve invitro kültür ortamında elde edilmiş olan koşul ortam uygulanmıştır. Kullandığımız hücre hattı üzerine DF-MKH kaynaklı koşul ortamın proliferasyon ve apoptoz etkisi ile ilgili çalışma yapılmamış olması çalışmamıza

özgünlük kazandırmaktadır. Çalışmamızın proliferasyon sonuçlarına göre; DF-MKH kaynaklı CM'nin kontrol grubuna kıyasla çok etkili olmadığı gözlenmiştir. CM'nin 24 ve 48 saat beraber ele alındığında hücre canlılığı üzerindeki en etkili konsantrasyonu %50 olarak bulunmuştur.

MDA-MB 231 meme kanseri hücre hattına %50 konsantrasyonda 24 saat ve 48 saat CM uygulaması sonrasında yapılan apoptoz çalışması sonuçlarına göre; total apoptotik hücre miktarında artış gözlenmiştir. 24 saat için kontrol grubunda total apoptotik hücre miktarı %12,50 iken DF-MKH kaynaklı CM uygulanmış hücrelerde total apoptotik hücre miktarı %16,50 dir. Kontrol grubu ile CM uygulanan hücrelerin total apoptotik hücre miktarı karşılştırıldığında %4 artış gözlemlenmiştir.48 saat için kontrol grubunda total apoptotik hücre miktarı %13,10 iken DF-MKH kaynaklı CM uygulanmış hücrelerde total apoptotik hücre miktarı %20,35 dir. Kontrol grubu ile CM uygulanan hücrelerin total apoptotik hücre miktarı karşılştırıldığında %7,25 artış gözlemlenmiştir.

MDA-MB 231 meme kanseri hücresine uygulanan aynı konsantrasyon CM'nin 24 ve 48. saatteki apoptotik etkisi karşılaştırıldığında 48.saatteki total apoptotik hücre miktarının fazla olduğu görülmüştür.

Yaptığımız literatür incelemesindeki çalışmalardaki elde edilen sonuçların değişkenlik göstermesi ve kullandığımız hücre hattı ile ilgili farklı doku kaynaklı MKH uygulaması sonucu elde edilen verilerle çalışma sonucumuzun farklılık göstermesi farklı kaynaklardan elde edilen MKH'ların biyolojik özelliklerinin de farklı olabileceği ile açıklanabilir. Farklı kaynaklardan alınan MKH'ların biyolojik özelliklerindeki farklılıkları anlamak, farklı tedavi gereksinimleri verilen klinik uygulamalarda daha uygun hücre kaynaklarının seçimine rehberlik edebilir ve klinik tedavi ve bilimsel araştırmalarda daha güvenli ve daha verimli kök hücrelerinin seçilmesine yardımcı olur. Yapılan çalışmalarda farklı kaynaklardan türetilen MKH popülasyonları, benzer fenotipler sergilemelerine rağmen, çoğalma kapasitelerinde ve immünomodülatör yeteneklerinde değişkenlik gösterdiği bildirilmiştir(Li ve ark 2018). Çalışmalarda kullanılacak saf MKH'leri veya uygun terapötik genlerle modifiye edilmiş MKH'ları belirlerken uygulanacak dozaj, izolasyonyeri, uzun dönem in vitro kültür pasajlarına bağlı MKH'ların olası dönüşümleri ve terapötik

genleri MKH'lara transfekte etmek için kullanılan viral vektör seçimi dikkatle düşünülmelidir (Lazennec ve Lam 2016).

MKH'ların kanserdeki rolünde; sitokinler, kemokinler ve büyüme faktörleri dahil olmak üzere bu hücrelerin ürettiği çözünür faktörler aracılık ettiği gösterilmiştir (Whiteside 2018). Çalışmamızda elde ettiğimiz verilere sebep olan yolak ile ilgili net bir çalışmamız bulunmamaktadır. İlerde yapacağımız çalışmalarda CM içeriğinde bulunan sitokinlerin analizi yapılarak bu konuda daha net bilgi elde edeceğimizi düşünüyoruz.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yaptığımız bu tez çalışmasında, DF-MKH kaynaklı koşullandırılmış ortamın MDA MB-231 meme kanseri hücre hattında proliferasyon ve apoptoz üzerine etkisi incelenmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlar ile, DF-MKH kaynaklı koşullandırılmış ortamın MDA MB-231 hücrelerinde kontrol grubuna göre %33,4 oranında proliferasyonu inhibe ettiği ve hücreleri %4 oranında apoptoza götürdüğü görülmüştür. Meme kanserinde halihazırda kullanılan standart tedavilerin yan etkilerinin olması alternatif tedavi seçeneklerinin bulunmasının önemini arttırmaktadır. Yaptığımız literatür taraması ve tez çalışmamız sonucunda DF-MKH kaynaklı koşullandırılmış ortamın kanserdeki hücresel tedavide kullanılabilmesi için elde ettiğimiz veriler yetersizdir.

Bu çalışmaya ek olarak yapacağımız ileriki çalışmalarla tez sonuçlarımızı destekleyici veriler elde etmeyi hedeflemekteyiz. Hedeflerimiz doğrultusunda elde ettiğimiz verilerin kanser hastalarında sağ kalım oranını arttıracak, standart tedavilere alternatif hücresel tedaviler alanında literatüre katkı sağlamayı hedeflemekteyiz.

6. KAYNAKLAR

Akgün Ş, Kucuksayan H, Akca H, 2018. Kanser Moleküler Biyolojisi 12. Bölüm Tümör Baskılayıcı Genler, p.

Albarenque SM, Zwacka RM, Mohr A, 2011. Both human and mouse mesenchymal stem cells promote breast cancer metastasis. Stem Cell Res, 7, 2, 163-71.

Alshareeda AT, Rakha E, Alghwainem A, Alrfaei B, Alsowayan B, Albugami A, Alsubayyil AM, Abomraee M, Mohd Zin NK, 2018. The effect of human placental chorionic villi derived mesenchymal stem cell on triple-negative breast cancer hallmarks. PloS one, 13, 11, e0207593-e.

Arunasree KM, 2010. Anti-proliferative effects of carvacrol on a human metastatic breast cancer cell line, MDA-MB 231. Phytomedicine, 17, 8-9, 581-8.

Barilani M, Peli V, Cherubini A, Dossena M, Dolo V, Lazzari L, 2019. NG2 as an Identity and Quality Marker of Mesenchymal Stem Cell Extracellular Vesicles. Cells, 8, 12, 1524.

Barnoud T, Donninger H, Clark GJ, 2016. Ras Regulates Rb via NORE1A. The Journal of biological chemistry, 291, 6, 3114-23.

Bhargava R, Gerald WL, Li AR, Pan Q, Lal P, Ladanyi M, Chen B, 2005. EGFR gene amplification in breast cancer: correlation with epidermal growth factor receptor mRNA and protein expression and HER-2 status and absence of EGFR-activating mutations. Modern pathology, 18, 8, 1027-33.

Binju M, Amaya-Padilla MA, Wan G, Gunosewoyo H, Suryo Rahmanto Y, Yu Y, 2019. Therapeutic Inducers of Apoptosis in Ovarian Cancer. Cancers (Basel), 11, 11.

Board PDQATE, 2002. Breast Cancer Treatment (PDQ(R)): Health Professional Version. In: PDQ Cancer Information Summaries. Eds. Bethesda (MD): National Cancer Institute (US), p.

Board PDQATE, 2002. Breast Cancer Treatment (PDQ(R)): Patient Version. In: PDQ Cancer Information Summaries. Eds. Bethesda (MD): National Cancer Institute (US), p.

Bouchal P, Schubert OT, Faktor J, Capkova L, Imrichova H, Zoufalova K, Paralova V, Hrstka R, Liu Y, Ebhardt HA, Budinska E, Nenutil R, Aebersold R, 2019. Breast Cancer Classification Based on Proteotypes Obtained by SWATH Mass Spectrometry. Cell reports, 28, 3, 832-43.e7.

Bourdon JC, 2007. p53 and its isoforms in cancer. British journal of cancer, 97, 3, 277-82.

Calvo G, Saenz D, Simian M, Sampayo R, Mamone L, Vallecorsa P, Batlle A, Casas A, Di Venosa G, 2017. Reversal of the Migratory and Invasive Phenotype of Ras-Transfected Mammary Cells by Photodynamic Therapy Treatment. J Cell Biochem, 118, 3, 464-77.

Canpolat F, (Ağustos 2016). Cell Cycle And Apoptosıs.

Caparica R, Lambertini M, de Azambuja E, 2019. How I treat metastatic triple-negative breast cancer. ESMO Open, 4, Suppl 2, e000504.

Chen Q, Shou P, Zheng C, Jiang M, Cao G, Yang Q, Cao J, Xie N, Velletri T, Zhang X, Xu C, Zhang L, Yang H, Hou J, Wang Y, Shi Y, 2016. Fate decision of mesenchymal stem cells: adipocytes or osteoblasts? Cell death and differentiation, 23, 7, 1128-39.

Chrzan P, Skokowski J, Karmolinski A, Pawelczyk T, 2001. Amplification of c-myc gene and overexpression of c-Myc protein in breast cancer and adjacent non-neoplastic tissue. Clin Biochem, 34, 7, 557-62.

Coronado GD, Beasley J, Livaudais J, 2011. Alcohol consumption and the risk of breast cancer. Salud Publica Mex, 53, 5, 440-7.

de Araújo Farias V, Carrillo-Gálvez AB, Martín F, Anderson P, 2018. TGF-β and mesenchymal stromal cells in regenerative medicine, autoimmunity and cancer. Cytokine Growth Factor Rev, 43, 25-37.

Di G-H, Liu Y, Lu Y, Liu J, Wu C, Duan H-F, 2014. IL-6 secreted from senescent mesenchymal stem cells promotes proliferation and migration of breast cancer cells. PloS one, 9, 11, e113572-e.
Doğan A, Demirci S, Apdik H, Apdik EA, Şahin F, 2017. Dental pulp stem cells (DPSCs) increase prostate cancer cell proliferation and migration under in vitro conditions. Tissue Cell, 49, 6, 711-8.
Doğan A, Demirci S, Apdik H, Apdik EA, Şahin F, 2017. Dental pulp stem cells (DPSCs) increase prostate cancer cell proliferation and migration under in vitro conditions. Tissue and Cell, 49, 6, 711-8.
Elmore S, 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. Toxicologic pathology, 35, 4, 495-516.
Erhan PDY, 1995. Meme Kanserinde Onkogenler ve Tümör Süpresör Genler.
Friedenreich CM, 2011. Physical activity and breast cancer: review of the epidemiologic evidence and biologic mechanisms. Recent Results Cancer Res, 188, 125-39.
Goyns MH, Hancock BW, 1991. Importance of oncogene research to the cancer clinician. Clin Oncol (R Coll Radiol), 3, 3, 168-76.
Grothe B, Park TJ, 2000. Structure and function of the bat superior olivary complex. Microsc. Res. Tech., 51, 4, 382-402.
H A, 2014. Apoptosis and cell cycle. Ege Tıp Dergisi / Ege Journal of Medicine 2014;53(1):60-64.
Han CW, Jeong MS, Jang SB, 2017. Structure, signaling and the drug discovery of the Ras oncogene protein. BMB reports, 50, 7, 355-60.
Hassan M, Watari H, AbuAlmaaty A, Ohba Y, Sakuragi N, 2014. Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. BioMed research international, 2014, 150845-.
Herbert BS, Wright WE, Shay JW, 2001. Telomerase and breast cancer. Breast cancer research : BCR, 3, 3, 146-9.
Hong Y, Fan D, 2019. Ginsenoside Rk1 induces cell cycle arrest and apoptosis in MDA-MB-231 triple negative breast cancer cells. Toxicology, 418, 22-31.
Hu X, Eastman AE, Guo S, 2019. Cell cycle dynamics in the reprogramming of cellular identity. FEBS Lett.
Ingham M, Schwartz GK, 2017. Cell-Cycle Therapeutics Come of Age. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology, 35, 25, 2949-59.
Israels ED, Israels LG, 2000. The cell cycle. Oncologist, 5, 6, 510-3.
Jan R, Chaudhry G-ES, 2019. Understanding Apoptosis and Apoptotic Pathways Targeted Cancer Therapeutics. Advanced pharmaceutical bulletin, 9, 2, 205-18.
Joyce C, Kasi A, 2020. Cancer, Tumor-Suppressor Genes. In: StatPearls. Eds. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, StatPearls Publishing LLC., p.
Keshtkar S, Azarpira N, Ghahremani MH, 2018. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: novel frontiers in regenerative medicine. Stem cell research & therapy, 9, 1, 63-.
Key TJ, Allen NE, Spencer EA, Travis RC, 2003. Nutrition and breast cancer. Breast, 12, 6, 412-6.
Kolios G, Moodley Y, 2013. Introduction to Stem Cells and Regenerative Medicine. Respiration, 85, 1, 3-10.
Konukoğlu PDD, 2012. Onkogen Ve Kanser. http://194.27.141.99/dosya-depo/ders-notlari/dildar-konukoglu/ONKOGEN%20VE%20KANSER.pdf.
Koundouros N, Poulogiannis G, 2018. Phosphoinositide 3-Kinase/Akt Signaling and Redox Metabolism in Cancer. Frontiers in oncology, 8, 160-.
Lammert J, Grill S, Kiechle M, 2018. Modifiable Lifestyle Factors: Opportunities for (Hereditary) Breast Cancer Prevention - a Narrative Review. Breast care (Basel, Switzerland), 13, 2, 109-14.

Lax SF, 2017. [Hereditary breast and ovarian cancer]. Pathologe, 38, 3, 149-55.
Lazennec G, Lam PY, 2016. Recent discoveries concerning the tumor - mesenchymal stem cell interactions. Biochim Biophys Acta, 1866, 2, 290-9.
Lee KL, Kuo YC, Ho YS, Huang YH, 2019. Triple-Negative Breast Cancer: Current Understanding and Future Therapeutic Breakthrough Targeting Cancer Stemness. Cancers (Basel), 11, 9.
Li J, Xu S-Q, Zhao Y-M, Yu S, Ge L-H, Xu B-H, 2018. Comparison of the biological characteristics of human mesenchymal stem cells derived from exfoliated deciduous teeth, bone marrow, gingival tissue, and umbilical cord. Molecular medicine reports, 18, 6, 4969-77.
Lin W, Huang L, Li Y, Fang B, Li G, Chen L, Xu L, 2019. Mesenchymal Stem Cells and Cancer: Clinical Challenges and Opportunities. BioMed research international, 2019, 2820853-.
Linero I, Chaparro O, 2014. Paracrine effect of mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue in bone regeneration. PloS one, 9, 9, e107001-e.
Liu J, Yu F, Sun Y, Jiang B, Zhang W, Yang J, Xu GT, Liang A, Liu S, 2015. Concise reviews: Characteristics and potential applications of human dental tissue-derived mesenchymal stem cells. Stem cells, 33, 3, 627-38.
Liu W, Cao L, Zuo G, 2016. Influence of chitosan nanoparticle-mediated C-erbB-2 gene silencing on invasion and apoptosis of Hep-2 cells. Genetics and molecular research: GMR, 15, 4.
Luo X, Huang S, He N, Liu C, Chen Y, Liu Y, Mi X, Li N, Sun P, Li Z, Xiang R, Su W, 2018. Inflammatory Human Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cells Promote Stem Cell-Like Characteristics of Cancer Cells in an IL-1β-Dependent Manner. BioMed research international, 2018, 7096707-.
Lymperi S, Ligoudistianou C, Taraslia V, Kontakiotis E, Anastasiadou E, 2013. Dental Stem Cells and their Applications in Dental Tissue Engineering. The open dentistry journal, 7, 76-81.
Mavaddat N, Antoniou AC, Easton DF, Garcia-Closas M, 2010. Genetic susceptibility to breast cancer. Molecular oncology, 4, 3, 174-91.
Mazloumi Gavgani F, Smith Arnesen V, Jacobsen RG, Krakstad C, Hoivik EA, Lewis AE, 2018. Class I Phosphoinositide 3-Kinase PIK3CA/p110α and PIK3CB/p110β Isoforms in Endometrial Cancer. International journal of molecular sciences, 19, 12, 3931.
Mazrouei R, Raeisi E, Lemoigne Y, Heidarian E, 2019. Activation of p53 Gene Expression and Synergistic Antiproliferative Effects of 5-Fluorouracil and β-escin on MCF7 Cells. Journal of medical signals and sensors, 9, 3, 196-203.
Miki T, 2018. Stem cell characteristics and the therapeutic potential of amniotic epithelial cells. American Journal of Reproductive Immunology, 80, 4, e13003.
Missaoui N, Landolsi H, Mestiri S, Essakly A, Abdessayed N, Hmissa S, Mokni M, Yacoubi MT, 2019. Immunohistochemical analysis of c-erbB-2, Bcl-2, p53, p21WAF1/Cip1, p63 and Ki-67 expression in hydatidiform moles. Pathology-Research and Practice, 215, 3, 446-52.
Mitra S, Dash R, 2018. Natural Products for the Management and Prevention of Breast Cancer. Evid Based Complement Alternat Med, 2018, 8324696.
Mitsudomi T, Yatabe Y, 2010. Epidermal growth factor receptor in relation to tumor development: EGFR gene and cancer. The FEBS journal, 277, 2, 301-8.
Moelans CB, de Weger RA, Monsuur HN, Vijzelaar R, van Diest PJ, 2010. Molecular profiling of invasive breast cancer by multiplex ligation-dependent probe amplification-based copy number analysis of tumor suppressor and oncogenes. Mod Pathol, 23, 7, 1029-39.
Mohr A, Zwacka R, 2018. The future of mesenchymal stem cell-based therapeutic approaches for cancer - From cells to ghosts. Cancer Lett, 414, 239-49.

Momenimovahed Z, Salehiniya H, 2019. Epidemiological characteristics of and risk factors for breast cancer in the world. Breast cancer (Dove Medical Press), 11, 151-64.
Nedeljkovic M, Damjanovic A, 2019. Mechanisms of Chemotherapy Resistance in Triple-Negative Breast Cancer-How We Can Rise to the Challenge. Cells, 8, 9.
Osborne C, Wilson P, Tripathy D, 2004. Oncogenes and tumor suppressor genes in breast cancer: potential diagnostic and therapeutic applications. Oncologist, 9, 4, 361-77.
Öztürk PDM, 2006. İ. Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri,Meme Kanseri. Meme Kanserinin Genetiꢀi ve Risk Faktörleri.
Park S-Y, Choi J-H, Nam J-S, 2019. Targeting Cancer Stem Cells in Triple-Negative Breast Cancer. Cancers, 11, 7, 965.
Pattingre S, Levine B, 2006. Bcl-2 inhibition of autophagy: a new route to cancer? Cancer Res, 66, 6, 2885-8.
Paul A, Paul S, 2014. The breast cancer susceptibility genes (BRCA) in breast and ovarian cancers. Frontiers in bioscience (Landmark edition), 19, 605-18.
Pekarsky Y, Balatti V, Croce CM, 2018. BCL2 and miR-15/16: from gene discovery to treatment. Cell death and differentiation, 25, 1, 21-6.
Rivera-Franco MM, Leon-Rodriguez E, 2018. Delays in Breast Cancer Detection and Treatment in Developing Countries. Breast cancer : basic and clinical research, 12, 1178223417752677-.
Sağlam Ö, 2014. MDA-MB-231 Kanser Hücrelerinin Çoğalması Üzerine Malign Meme Dokusu Stromal Hücrelerinin Etkisi Ve miRNA İlişkisi, DOKTORA TEZİ.
Salehi H, Al-Arag S, Middendorp E, Gergely C, Cuisinier F, Orti V, 2018. Dental pulp stem cells used to deliver the anticancer drug paclitaxel. Stem cell research & therapy, 9, 1, 103-.
Sherr CJ, 2000. The Pezcoller Lecture: Cancer Cell Cycles Revisited. Cancer Research, 60, 14, 3689.
Straten Pt, Andersen MH, 2010. The anti-apoptotic members of the Bcl-2 family are attractive tumor-associated antigens. Oncotarget, 1, 4, 239-45.
Subaşı C, 2014. Farklı Meme Kanseri Hücre Hatlarından Elde Edilen Eksozomların Mezenkimal Ve Stromal Hücreler Üzerine Etkisi, BİLİM UZMANLIĞI (YÜKSEK LİSANS) TEZİ, Kocaeli Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
Sung YH, Kim HJ, Lee HW, 2007. Identification of a novel Rb-regulated gene associated with the cell cycle. Mol Cells, 24, 3, 409-15.
Şen DSK, 2019. Sağlık algısı ile kanser taraması farkındalığı arasındaki ilişki, Tıpta uzmanlık tezi, T.C. Sağlık Bilimleri Üniversitesi,Tepecik sağlık uygulama ve araştırma merkezi aile hekimliği kliniği.
Thapa N, Choi S, Tan X, Wise T, Anderson RA, 2015. Phosphatidylinositol Phosphate 5-Kinase Iγ and Phosphoinositide 3-Kinase/Akt Signaling Couple to Promote Oncogenic Growth. The Journal of biological chemistry, 290, 30, 18843-54.
Tran P, Nguyen C, Klempner SJ, 2016. Targeting the Phosphatidylinositol-3-kinase Pathway in Gastric Cancer: Can Omics Improve Outcomes? International neurourology journal, 20, Suppl 2, S131-S40.
Vakhshiteh F, Atyabi F, Ostad SN, 2019. Mesenchymal stem cell exosomes: a two-edged sword in cancer therapy. Int J Nanomedicine, 14, 2847-59.
Vermeulen K, Berneman ZN, Van Bockstaele DR, 2003. Cell cycle and apoptosis. Cell Prolif, 36, 3, 165-75.
Vizoso FJ, Eiro N, Cid S, Schneider J, Perez-Fernandez R, 2017. Mesenchymal Stem Cell Secretome: Toward Cell-Free Therapeutic Strategies in Regenerative Medicine. International journal of molecular sciences, 18, 9, 1852.
Wang Y, Liu J, Jiang Q, Deng J, Xu F, Chen X, Cheng F, Zhang Y, Yao Y, Xia Z, Xu X, Su X, Huang M, Dai L, Yang Y, Zhang S, Yu D, Zhao RC, Wei Y, Deng H, 2017. Human Adipose-

Derived Mesenchymal Stem Cell-Secreted CXCL1 and CXCL8 Facilitate Breast Tumor Growth By Promoting Angiogenesis. Stem Cells, 35, 9, 2060-70.
Whiteside TL, 2018. Exosome and mesenchymal stem cell cross-talk in the tumor microenvironment. Seminars in immunology, 35, 69-79.
https://www.who.int/cancer/en/ Erişim. Erişim adresi.
Winters S, Martin C, Murphy D, Shokar NK, 2017. Breast Cancer Epidemiology, Prevention, and Screening. Prog Mol Biol Transl Sci, 151, 1-32.
Wong RSY, 2011. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. Journal of experimental & clinical cancer research : CR, 30, 1, 87-.
Wu Y-C, Wang W-T, Huang L-J, Cheng R-Y, Kuo Y-R, Hou M-F, Lai C-S, Yu J, 2019. Differential Response of Non-cancerous and Malignant Breast Cancer Cells to Conditioned Medium of Adipose tissue-derived Stromal Cells (ASCs). International journal of medical sciences, 16, 6, 893-901.
Xiang M-x, He A-n, Wang J-a, Gui C, 2009. Protective paracrine effect of mesenchymal stem cells on cardiomyocytes. Journal of Zhejiang University. Science. B, 10, 8, 619-24.
Xie M, Liu J, Tsao R, Wang Z, Sun B, Wang J, 2019. Whole Grain Consumption for the Prevention and Treatment of Breast Cancer. Nutrients, 11, 8.
Yanovich G, Agmon H, Harel M, Sonnenblick A, Peretz T, Geiger T, 2018. Clinical Proteomics of Breast Cancer Reveals a Novel Layer of Breast Cancer Classification. Cancer research, 78, 20, 6001-10.
Yenilmez EN, 2015. İnsan kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücrelerin insan meme kanseri hücre hattı üzerine immünolojik etkilerinin in vitro ortamda araştırılması, p.
Yildirim S, Zibandeh N, Genc D, Ozcan EM, Goker K, Akkoc T, 2016. The Comparison of the Immunologic Properties of Stem Cells Isolated from Human Exfoliated Deciduous Teeth, Dental Pulp, and Dental Follicles. Stem cells international, 2016, 4682875-.
Zakrzewski W, Dobrzyński M, Szymonowicz M, Rybak Z, 2019. Stem cells: past, present, and future. Stem cell research & therapy, 10, 1, 68-.
Zhang B, Shetti D, Fan C, Wei K, 2019. miR-29b-3p promotes progression of MDA-MB-231 triple-negative breast cancer cells through downregulating TRAF3. Biological research, 52, 1, 38-.
Zhou Y, Yamamoto Y, Xiao Z, Ochiya T, 2019. The immunomodulatory functions of mesenchymal stromal/stem cells mediated via paracrine activity. Journal of clinical medicine, 8, 7, 1025.
Zıbandeh N, 2018. Atopik dermatit'li hastalarda dental folikül kök hücrelerin naive t lenfositlerin th1 ve th2 yönünde farklılaşması üzerine etkisi.
Zimmerlin L, Park TS, Zambidis ET, Donnenberg VS, Donnenberg AD, 2013. Mesenchymal stem cell secretome and regenerative therapy after cancer. Biochimie, 95, 12, 2235-45.

ÖZGEÇMİŞ

1990 yılında Karaman ili Ermenek ilçesinde doğdu. İlkokul eğitimini Ermenek'te lise eğitimini Mersin Tarsus Sağlık Meslek Lisesinde tamamladı. Selçuk Üniversitesi Sağlık Hizmetleri MYO Okulu Tıbbi Laboratuvar Bölümünden mezun olduktan sonra Atatürk Üniversitesi Acil Yardım ve Afet Yönetimi lisans programından mezun oldu. 17.02.2019 tarihi itibari ile Selçuk Üniversitesi Tıbbi Biyokimya Laboratuvarında Sağlık Teknisyeni kadrosunda çalışmaya devam etmektedir. Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü/Tıbbi Biyokimya ABD'nda yüksek lisansı devam etmektedir.