

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**YAĞ DOKUSU KAYNAKLI MEZENKİMAL KÖK HÜCRE
EKSOZOMLARI VE ALFA LİPOİK ASİTİN *İN-VİTRO*
KOŞULLARDA MEME KANSERİ KÖK HÜCRELERİ ÜZERİNE
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Gizem USLU

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

KOCAELİ

2019

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**YAĞ DOKUSU KAYNAKLI MEZENKİMAL KÖK HÜCRE
EKSOZOMLARI VE ALFA LİPOİK ASİTİN *İN-VİTRO*
KOŞULLARDA MEME KANSERİ KÖK HÜCRELERİ ÜZERİNE
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Gizem USLU

Kocaeli Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin

Kök Hücre ve Doku Yenilenmesi Programı için Öngördüğü

BİLİM UZMANLIĞI TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır.

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Zehra Seda HALBUTOĞULLARI

Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinasyon Birimi - Proje No: 2018/112

Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Onay Belge No: KÜ GOKAEK KÜ
GOKAEK 2018/4.24

KOCAELİ

2019

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

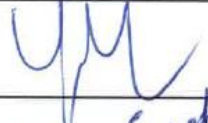
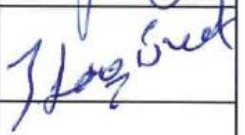
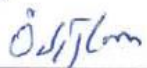
Tez Adı: Yağ Dokusu Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre Eksozomları ve Alfa Lipoik Asitin *in-vitro* Koşullarda Meme Kanseri Kök Hücreleri Üzerine Etkilerinin İncelenmesi

Tez Yazarı: Gizem USLU

Tez savunma tarihi: 02.07.2019

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Zehra Seda HALBUTOĞULLARI

Bu çalışma, sınav kurulumuz tarafından Kök Hücre Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

SINAV KURULU ÜYELERİ		İMZA
ÜNVANI	ADI SOYADI	
Başkan	Prof. Dr. Yusufhan YAZIR	
Üye (Danışman)	Dr. Öğr. Üyesi Zehra Seda HALBUTOĞULLARI	
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Özlem SAĞLAM UÇAR	

Onay

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

.... / / 2019

Prof. Dr. Sema Aşkın KEÇELİ

KOÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZET

Yağ Dokusu Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre Eksozomları ve Alfa Lipoik Asitin *in-vitro* Koşullarda Meme Kanseri Kök Hücreleri Üzerine Etkilerinin İncelenmesi

Amaç: Meme kanseri, kadınlarda en sık görülen kanser türüdür ve kansere bağlı ölümlerin başında gelmektedir. Kanser kök hücrelerinin; tümör gelişimi, tedaviye direnç ve tedavi sonrası tümörün tekrarlanmasından sorumlu olan öncü hücreler olduğu anlaşılmasıyla birlikte, güncel araştırmalar kanser kök hücresi hedefli hücresel tedavilere yönelmiştir. Doğal olarak oluşan bir disülfid molekülü olan alfa lipoik asit (ALA); çeşitli kanser hücre dizilerinde hücre proliferasyonu ve apoptoz üzerinde yararlı etkiler sağladığı bildirilen güçlü bir antioksidandır. Mezenkimal Kök Hücreler (MKH) pek çok dokuda bulunan, multipotent özellikte olan bir erişkin kök hücre grubudur. MKH'ler doku rejenerasyonunda olduğu kadar yeni kanser tedavileri için de umut vaad etmektedir. MKH'lerin parakrin etkilerini eksozomlar aracılı olarak yapıldığı bilinmektedir. Eksozomlar çapı genellikle 30-100 nm olan; nükleik asit ve çeşitli proteinleri içeren mikroveziküllerdir. Nanoboyutlu biyo-taşıyıcılar olan eksozomların hedefe yönelik tasarlanabilmesi, kanser tedavilerinde umut vaatmektedir.

Yöntem: İnsan meme tümör dokusundan meme kanseri kök hücresi (MKKH) ve meme yağ dokusundan mezenkimal kök hücre (iYD-MKH) izolasyonu/karakterizasyonu yapıldı. iYD-MKH'ler iki pasaj boyunca ALA ile kültüre edilerek uyarıldı. Ultrasantrifüj yöntemiyle izole edilen iYD-MKH ve iYD-MKH_{ALA} eksozomlarının protein tayini yapıldı. Bu çalışmada iki ayrı kanser kök hücre vakası için; ALA eklentisinin, MKH ortak kültürünün ve eksozom içeren direk kültür gruplarının olduğu 9 deney grubu oluşturuldu. Gruplar arasındaki proliferasyon, apoptoz ve migrasyon farklılıkları; kantitatif gerçek zamanlı PCR (qRT-PCR), ELİSA, migrasyon deneyi, anneksin V/PI, WST-1 ve immün floresan boyamalar ile ortaya konmuştur.

Bulgular: MKKH, iYD-MKH ve eksozom izolasyon ve karakterizasyonları başarıyla gerçekleştirildi. Yapılan analizlerde, ALA'nın MKKH için canlılığı azaltıcı etkisi gözlenmiştir.

Sonuçlar: ALA ile zenginleştirilmiş iYD-MKH'lerin eksozomlarının ve ALA'nın MKKH üzerine apoptotik, anti-proliferatif ve anti-metastatik etkileri olduğu saptanmıştır.

Anahtar sözcükler: Meme Kanseri, Kanser Kök Hücresi, Mezenkimal Kök Hücre, Alfa Lipoik Asit, Eksozom

ABSTRACT

Analysing *in-vitro* Effects of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Exosomes and Alpha Lipoic Acid on Breast Cancer Stem Cells

Objective: Breast cancer is the most common type of cancer and is one of the leading cancer-related deaths in women. Cancer stem cells; with the recognition that they are the leading tumor cells responsible for tumor development, resistance to treatment, and post-treatment tumor recurrence, recent studies has focused on cancer stem cell-targeted cellular therapies. Alpha lipoic acid (ALA), a naturally occurring disulfide molecule; is a potent antioxidant that has been shown to provide beneficial effects on cell proliferation and apoptosis in a variety of cancer cell lines. Mesenchymal Stem Cells (MSCs) are multipotent adult stem cells and exist on many tissues. MSCs promises hope for novel therapies for tissue degeneration and cancer, as well. It is known that MSCs have paracrine effects through exosomes. Exosomes are usually 30-100 nm in diameter; microvesicles containing nucleic acids and various proteins. Targeted design of exosomes, nano-sized biocarriers is promising in cancer treatments.

Method: Isolation and characterization of breast cancer stem cell (BCSC) and human adipose derived mesenchymal stem cell (hAT-MSC) was performed. hAT-MSCs were stimulated by culturing with ALA for two passages. hAT-MSC and hAT-MSC_{ALA} exosomes isolated by ultracentrifugation method and protein quantification performed. In this study, total of 9 experimental groups in which *in-vitro* ALA insertion, mesenchymal stem cell co-culture and exosome-containing direct culture groups were formed for two different cancer stem cell cases. Proliferation, apoptosis and migration differences between groups were investigated by; quantitative real-time PCR (qRT-PCR), ELISA, migration assay, annexin V / PI, WST-1 and immunofluorescence stainings.

Results: BCSC, hAT-MSC and exosome isolation and characterization were successfully performed. In the analysis, viability reducing effect of ALA for MKKH was observed.

Conclusions: As a result of the experiments, exosomes of ALA-enriched hAT-MSCs have apoptotic, anti-proliferative and anti-metastatic effects on BCSC.

Key words: Breast Cancer, Cancer Stem Cell, Mesenchymal Stem Cell, Alpha Lipoic Acid, Exosome

TEŞEKKÜR

Bir ferdi olmaktan gurur duyduğum KÖGEM ailesine dahil olmama vesile olan ve özgün disiplin anlayışını biz öğrencilerine kazandıran değerli hocam **Prof. Dr. Yusufhan YAZIR**'a tüm katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Tez sürecim boyunca her koşulda bana destek olan, ilmiyle yetiştiren, en iyi şekilde yönlendiren ve yüreklendiren; akademik kimliğinin yanında insani ve ahlaki değerleriyle de örnek aldığım çok kıymetli danışman hocam **Dr. Öğr. Üyesi Zehra Seda HALBUTOĞULLARI**'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimim süresince bilgi ve birikimlerini cömertçe sunan saygı değer hocalarım **Dr. Öğr. Üyesi Gülçin GACAR**, **Dr. Öğr. Üyesi Gökhan DURUKSU**, **Prof. Dr. Murat KASAP** ve **Doç. Dr. Özgür MEHTAP**'a değerli katkıları için teşekkür ederim.

Güzellikle hatırlayacağım anıları paylaştığımız sevgili çalışma arkadaşlarım ve dostlarım; **Leyla KAYIŞ**, **Sema YUSUFOĞLU**, **Ayşegül AÇIKSARI**, **Büşra ÖNCEL DUMAN**, **Ayşegül AYTEKİN**, **Ahmet ÖZTÜRK**, **Ayça ERTÜRK** ve **Deren ASLAN**'a teşekkür ederim.

Beni sevgiyle büyütüp bu günüme getiren, hayat boyu maddi ve manevi desteğini esirgemeyen ve hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan, aldığım her kararda koşulsuz arkamda duran; başta canım annem **Seyhan USLU**, sevgili babam **Kayhan USLU** ve biricik abim **Korhan USLU**'ya sonsuz sevgi ve şükranlarımı sunarım.

Gizem USLU

TEZİN AŞIRMA OLMADIĞI BİLDİRİSİ

Tezimde başka kaynaklardan yararlanılarak kullanılan yazı, bilgi, çizim, çizelge ve diğer malzemeler kaynakları gösterilerek verilmiştir. Tezimin herhangi bir yayından kısmen ya da tamamen aşırma olmadığını ve bir İntihal Programı kullanılarak test edildiğini beyan ederim.

..... / / 2019

Gizem USLU

İmza

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
TEZİN AŞIRMA OLMADIĞI BİLDİRİSİ.....	vii
İÇİNDEKİLER.....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xi
ÇİZİMLER DİZİNİ.....	xv
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xix
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Meme Kanseri.....	1
1.1.1. Memenin Anatomik, Fizyolojik ve Histolojik Yapısı.....	4
1.1.2. Meme Kanserinin Histolojik ve Moleküler Alt Sınıfları	6
1.1.3. Meme Kanseri Kök Hücresi.....	8
1.1.4. Epitelyal Mezenkimal Geçiş	9
1.2. Mezenkimal Kök Hücreler	11
1.3. Alfa Lipoik Asit.....	12
1.4. Eksozomlar	15
1.4.1. Mezenkimal Kök Hücre Kaynaklı Eksozomlar	16
1.4.2. Eksozomların Biyogenezi	16
2. AMAÇ	18
3. YÖNTEM	19
3.1. Meme Tümör Dokusundan Kanseri Kök Hücresi İzolasyonu ve Hücre Kültürü.....	19
3.2. Meme Kanseri Kök Hücresinin Karakterizasyonu	20
3.2.1. Akım Sitometri Analizi.....	21
3.2.2. ALDH Testi	21
3.2.3. Mamosfer Oluşturma Deneyi.....	22
3.3. Meme Yağ Dokudan Mezenkimal Kök Hücre İzolasyonu ve Hücre Kültürü.....	23
3.4. İnsan Yağ Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Karakterizasyonu	24
3.4.1. Akım Sitometrik Analiz.....	24
3.4.2. Farklılaştırma Deneyleri	25
3.5. WST-1 Canlılık Deneyi ile Alfa Lipoik Asit'in Doz Standardizasyonu	26

3.6. Mezenkimal Kök Hücrelerin Alfa Lipoik Asit ile Kültürü	26
3.7. Mezenkimal Kök Hücrelerden Eksozom İzolasyonu ve Karakterizasyonu	27
3.7.1. Eksozomların Akım Sitometri ile İmmünojenotipik Karakterizasyonu	28
3.7.2. Mikro-BCA Testi ile Eksozom Miktar Tayini	29
3.8. Deney Gruplarının Oluşturulması.....	30
3.9. Gen Ekspresyon Analizi	33
3.9.1. Total RNA İzolasyonu	33
3.9.2. cDNA Sentezi	34
3.9.3. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu	34
3.10. WST-1 Canlılık ve Proliferasyon Analizi.....	35
3.11. Anneksin V/PI Apoptoz Tayini	36
3.12. Enzim Bağlı İmmunosorbent Analizi	37
3.13. İmmünfloresan Boyama.....	38
3.14. Migrasyon Deneyi (<i>Wound Healing</i>).....	39
3.15. İstatistiksel Analiz	39
4. BULGULAR.....	40
4.1. Meme Tümör Dokusundan Kanser Kök Hücresi İzolasyonu ve Hücre Kültürü.....	40
4.2. Meme Kanseri Kök Hücresinin Karakterizasyonu	42
4.2.1. Akım Sitometri Analizi.....	42
4.2.2. ALDH Testi	44
4.2.3. Mamosfer Oluşturma Deneyi.....	45
4.3. Meme Yağ Dokudan Mezenkimal Kök Hücre İzolasyonu ve Hücre Kültürü.....	47
4.4. İnsan Yağ Doku Kaynaklı Mezenimal Kök Hücrelerin Karakterizasyonu	50
4.4.1. Akım Sitometri Analizi.....	50
4.4.2. Farklılaştırma Deneyleri	52
4.5. WST-1 Canlılık Deneyi ile Alfa Lipoik Asit'in Doz Standardizasyonu	53
4.6. Eksozomların Akım Sitometri ile İmmünojenotipik Karakterizasyonu	54
4.7. Gen Ekspresyonu Analizi	57
4.8. WST-1 Canlılık ve Proliferasyon Analizi.....	62
4.9. Anneksin V/PI Apoptoz Tayini	63
4.10. ELİSA Analizi	65
4.11. İmmünfloresan Boyama.....	67
4.12. Migrasyon Deneyi (<i>Wound Healing</i>).....	71

5. TARTIŞMA.....	74
5.1. Sınırlılıklar.....	83
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	83
KAYNAKLAR.....	84
ÖZGEÇMİŞ.....	91
EKLER	94



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ALA	Alfa Lipoik Asit
ALDH	Aldehit Dehidrojenaz
BAX	BCL2-Associated X Protein
BCA	Bikinkoninik Asit
BCL2	B Hücreli Lenfoma 2
BCSCs	Breast Cancer Stem Cells
BRCA 1/2	Meme Kanseri Duyarlılık 1/2
BSA	Sığır Serum Albumin
CASP/Kaspaz	Sistein Aspartat Spesifik Proteaz
cDNA	Komplementer Deoksiribonükleik Asit
CK	Sitokeratin
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DCIS	Duktal Karsinoma İn Situ
DHLA	Dihidrolipoik Asit
DMEM/F-12	Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12
DMEM-LG	Dulbecco's Modified Eagle Medium – Low Glucose
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
ECM	Hücre Dışı Matriks
EGF	Epidermal Büyüme Faktörü
ELİSA	Enzim Bağlı İmmunosorbent Analizi
EMT	Epitelyal Mezenkimal Geçiş

ER	Östrojen Reseptör
ESCRT	Endosomal Sorting Complex Required for Transport
FBS	Fetal Sığır Serumu
FGF	Fibroblast Büyüme Faktörü
FITC	Fluoresan izotiyosiyonat
hAT-MSC	Human Adipose Derived Mesenchymal Stem Cell
Her2	İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü 2
HGF	Hepatosit Büyüme Faktörü
HLA-DR	İnsan Lökosit Antijeni-DR
HPRT1	Hipoksantin Fosforibosil Transferaz 1
IDC	İnvaziv Duktal Karsinoma
IF	İmmünfloresan
IGF	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
ILC	İnvaziv Lobüler Karsinoma
ILV	İntralüminal Vezikül
ISCT	Uluslararası Hücresel Tedavi Derneği
ISEV	International Society for Extracellular Vesicles
İGE	İnsani Gelişmişlik Endeksi
iYD-MKH	İnsan Yağ Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre
KKH	Kanser Kök Hücre
K-Ras	Kirsten Sıçan Sarkoma Viral Onkogen Homologu
LCIS	Lobüler Karsinom İn Situ
MFE	Mamosfer Oluşturma Verimliliği

miRNA	Mikro Ribonükleik Asit
MKH	Mezenkimal Kök Hücre
MKKH	Meme Kanseri Kök Hücresi
MCSs	Mesenchymal Stem Cells
MVB	Mikroveziküler Cisim
NF- κ B	Nükleer Faktör Kappa B
Her2	İnsan Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü 2
HRP	Horseradish/Yabanturbu Peroksidaz
PBS	Fosfat Tamponlu Salin Çözeltisi
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PE	R-Fikoeritrin
PI	Propiyum İyodit
PR	Progesteron Reseptörü
RNA	Ribonükleik Asit
TBM	3,3',5,5'-tetrametilbenzidin
TDLU	Terminal Duktal-Lobüler Ünite
TGF- β	Transforme Edici Büyüme Faktörü Beta
TNF α	Tümör Nekroz Faktörü Alfa
TWIST	Basic helix-loop-helix Transcription Factor
ZEB	Zinger Finger E-box-binding
WB	Lökosit
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
WST-1	Suda Çözünür Tetrazolium Tuzu 1

qRT-PCR

Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

7-AAD

7-aktinoaminomisin-D



ÇİZİMLER DİZİNİ

Çizim 1.1. Kadınlarda en yaygın görülen 10 kanser türünün vaka ve ölüm oranlarının yüzdelik dağılımı (Bray ve diğ. 2018).....	1
Çizim 1.2 Kadınlarda en sık görülen kanser türünü ülke bazında gösteren küresel harita (Bray ve ark. 2018).....	2
Çizim 1.3. Meme kanseri gelişiminde etkin risk faktörleri faktörleri.....	4
Çizim 1.4. Memenin anatomisi (www.turkcerrahi.com, Mart 2018).	5
Çizim 1.5. Meme lob ve lobül yapılanması (www.turkcerrahi.com, Mart 2018).....	5
Çizim 1.6. Meme karsinomları ve invazyonu (www.memesaglik.com, Mart 2019).....	6
Çizim 1.7. İnvaziv meme karsinomlarının yüzdelik grafiği	7
Çizim 1.8. Geleneksel kanser tedavilerine karşı KKH hedefli hücrel tedaviler.....	9
Çizim 1.9. EMT III ile metastaz aşamaları (Scheel ve Weinberg 2012).	10
Çizim 1.10. Alfa lipoik asitin moleküler yapısı.	13
Çizim 1.11. Alfa lipoik asitin biyolojik etkinlik mekanizmaları.	14
Çizim 1.12. ALA'nın antioksidan rejenerasyon mekanizması.	14
Çizim 1.13. Eksozomun moleküler yapısı ve içeriği (Jia 2017).	16
Çizim 1.14. Eksozom biyogenezi ve salınımı (Schorey ve diğ. 2015).	17
Çizim 3.1. Meme tümör dokudan MKKH izolasyon basamaklarının şematik gösterimi. ..	20
Çizim 3.2. Meme yağ dokudan İYD-MKH izolasyon basamaklarının şematik gösterimi. 24	
Çizim 3.3. ALA ile kültüre edilen İYD-MKH'lerin eksozom/mikrovezikülleri kapsayan salgı profilindeki değişimin şematik gösterimi.	27
Çizim 3.4. İmmünofenotipleme ile eksozom karakterizasyonunun çalışma prensibi (Lasser ve diğ. 2012).	29
Çizim 3.5. Deney gruplarının şematik gösterimi.	32
Çizim 3.6. Anneksin V/PI hücrel boyama prensibi.(www.dojindo.com, Nisan 2019) ...	36
Çizim 3.7. Anneksin V/PI boyamasıyla akım sitometrik apoptoz analizinin örnek şablonu.(BD Biosciences, 2019)	37
Çizim 3.8. Sandviç ELİSA testinin çalışma prensibi (MyBioSource.com, Nisan 2019). ..	38
Çizim 4.1. İzolasyonu yapılan Vaka 1-MKKH'in pasaj 0 (A1-A2), pasaj 1(B1-B2) ve pasaj 2 (C1-C2) faz-kontrast görüntüleri. Ölçüm çubuğu: 500 µm (A1, B1, C1) ve 200 µm (A2, B2, C2).	40
Çizim 4.2. İzolasyonu yapılan Vaka 2-MKKH'in pasaj 0, pasaj 1 ve pasaj 2 faz-kontrast görüntüleri. Pasaj 0 (A1-A2), Pasaj 1(B1-B2), Pasaj 2 (C1-C2). Ölçüm çubuğu: 500 µm (A1, B1, C1) ve 200 µm (A2, B2, C2).	41
Çizim 4.3. Pasaj 3'te akım sitometri analizi yapılan V1-MKKH (A1-A2) ve V2-MKKH (B1-B2)'lerin faz-kontrast mikroskop görüntüsü. Ölçüm çubuğu: 500 µm (A1, B1) ve 200 µm (A2, B2).....	42
Çizim 4.4. V1-MKKH'lerin akım sitometri ile karakterizasyon analizi.....	43
Çizim 4.5. V2-MKKH'lerin akım sitometri ile karakterizasyon analizi.....	43
Çizim 4.6. V1-MKKH'lerin; ALDH/7AAD, ALDH/CD133, ALDH/PI ikili boyamalarının akım sitometrik ALDH analizi.	44

Çizim 4.7. V2-MKKH'lerin; ALDH/7AAD, ALDH/CD133 ve ALDH/PI ikili boyamalarının akım sitometrik ALDH analizi.	45
Çizim 4.8. Vaka 1 MKKH mamosfer oluşturma deneyi, 7 .gün faz kontrast mikroskop görüntüsü. Jenerasyon 1 (A1-A2), Jenerasyon 2 (B1-B2). Ölçüm çubuğu: 500µm (A1, B1), 200µm (A2, B2).....	46
Çizim 4.9. Vaka 2 MKKH mamosfer oluşturma deneyi , 7 .gün faz kontrast mikroskop görüntüsü. Jenerasyon 1 (A1-A2), Jenerasyon 2 (B1-B2). Ölçüm çubuğu: 500µm (A1, B1), 200µm (A2, B2).....	46
Çizim 4.10. V1-MKKH ve V2-MKKH'lerin Jenerasyon 1 ve jenerasyon 2' de gösterdikleri MFE(%) değerleri.....	47
Çizim 4.11. İzolasyonu yapılan Vaka1-iYD-MKH'in pasaj 0 (A1-A2), pasaj 1 (B1-B2) ve pasaj 2 (C1-C2) faz-kontrast mikroskop görüntüleri. Ölçüm çubuğu: 500 µm (A1, B1, C1) ve 200 µm (A2, B2, C2).	48
Çizim 4.12. İzolasyonu yapılan Vaka 2-iYD-MKH'in pasaj 0 (A1-A2), pasaj 1 (B1-B2) ve pasaj 2 (C1-C2) faz-kontrast mikroskop görüntüleri. Ölçüm çubuğu: 500 µm (A1, B1, C1) ve 200 µm (A2, B2, C2).	49
Çizim 4.13. Pasaj 3'te akım sitometri analizi yapılan V1-iYD-MKH (A1-A2) ve V2-iYD-MKH (B1-B2)'lerin faz-kontrast mikroskop görüntüsü. Ölçüm çubuğu: 500 µm (A1, B1) ve 200 µm (A2, B2).....	50
Çizim 4.14. V1-iYD-MKH'lerin akım sitometri ile karakterizasyon analizi.	51
Çizim 4.15. V2-iYD-MKH'lerin akım sitometri ile karakterizasyon analizi.	51
Çizim 4.16. V1-iYD-MKH'in adipojenik farklılaştırma O (A1-A2) ve kontrol (A3) hücrelerinin oil red O boyaması; osteojenik farklılaştırma (B1-B2) ve kontrol (B3) hücrelerinin alizarin red S (B1-B2) boyaması faz-kontrast mikroskop görüntüleri. Ölçüm çubuğu 500µm (A1, A3, B1, B3) ve 200µm (A2, B2).....	52
Çizim 4.17. V2-iYD-MKH'in adipojenik farklılaştırma O (A1-A2) ve kontrol (A3) hücrelerinin oil red O boyaması; osteojenik farklılaştırma (B1-B2) ve kontrol (B3) hücrelerinin alizarin red S (B1-B2) boyaması faz-kontrast mikroskop görüntüleri. Ölçüm çubuğu 500µm (A1, A3, B1, B3) ve 200µm (A2, B2).....	52
Çizim 4.18. Vaka 1 MKKH ve iYD-MKH'lerinin farklı ALA konsantrasyonlarında gösterdikleri canlılık ve çoğalma grafiği. MKH için seçilmiş güvenli doz (*),MKKH için seçilmiş canlılığı azaltıcı doz (*).	53
Çizim 4.19. Vaka 2 MKKH ve iYD-MKH'lerinin farklı ALA konsantrasyonlarında gösterdikleri canlılık ve çoğalma grafiği. MKH için seçilmiş güvenli doz (*),MKKH için seçilmiş canlılığı azaltıcı doz (*).	54
Çizim 4.20. V1-iYD-MKH eksozomlarının; CD9, CD63 ve CD81 eksozom belirteçlerinin akım sitometri analizi.	55
Çizim 4.21. V1-iYD-MKH _{ALA} eksozomlarının; CD9, CD63 ve CD81 eksozom belirteçlerinin akım sitometri analizi.....	55
Çizim 4.22. V2-iYD-MKH eksozomlarının; CD9, CD63 ve CD81 eksozom belirteçlerinin akım sitometri analizi.	56
Çizim 4.23. V2-iYD-MKH _{ALA} eksozomlarının; CD9, CD63 ve CD81 eksozom belirteçlerinin akım sitometri analizi.....	56

Çizim 4.24. Vaka1 ve Vaka 2, MKKH ve iYD-MKH gruplarının; SNAIL, TWIST, MMP2 ve MMP9 gen ekspresyonu analiz grafikleri.....	58
Çizim 4.25. Vaka1 ve Vaka 2, MKKH ve iYD-MKH gruplarının; CDH1, TGF- β 1 ve IL-6 gen ekspresyonu analiz grafikleri.....	60
Çizim 4.26. Vaka1 ve Vaka 2, MKKH ve iYD-MKH gruplarının; BCL2, BAX, CASP3 ve CASP7 gen ekspresyonu analiz grafikleri.....	61
Çizim 4.27. Vaka 1; MKKH ve iYD-MKH deney gruplarının WST-1 canlılık ve proliferasyon analizi (*P<0.05, **P<0.01).....	62
Çizim 4.28. Vaka 2; MKKH ve iYD-MKH deney gruplarının WST-1 canlılık ve proliferasyon analizi (* P<0.05, ** P<0.01).....	63
Çizim 4.29. Vaka 1 ve Vaka 2 deney gruplarının Anneksin V/PI boyamalarının akım sitometrik apoptoz analizi.....	64
Çizim 4.30. Vaka 1 ve Vaka 2 deney gruplarının Anneksin V/PI apoptoz analizi sonuçlarına göre canlı ve apoptotik hücre grafikleri (* P<0.01).	65
Çizim 4.31. Vaka1 ve Vaka 2 MKKH deney gruplarının; MMP-2, MMP-9 ve TNF- α sitokinlerinin ELİSA analizi (*P<0.05, **P<0.01).	66
Çizim 4.32. Vaka1 ve Vaka 2 MKKH, iYD-MKH deney gruplarının; IL-6 ve TGF- β ELİSA analizi (*P<0.05, **P<0.01).....	67
Çizim 4.33. Vaka 1 MKKH deney gruplarının; çekirdek boyası DAPI (Mavi), MMP-2 (Yeşil) ve MMP-9 (Kırmızı) immünfloresan boyamalarının konfokal mikroskop görüntüleri. MKKH (A), MKKH+20 μ M ALA (B), MKKH+iYD-MKH (C), MKKH+iYD-MKH _{ALA} (D), MKKH+iYD-MKH Ekso (E), MKKH+iYD-MKH _{ALA} Ekso (F). Ölçüm çubuğu: 50 μ m.....	69
Çizim 4.34. Vaka 2 MKKH deney gruplarının; çekirdek boyası DAPI(Mavi), MMP-2 (Yeşil) ve MMP-9 (Kırmızı) immünfloresan boyamalarının konfokal mikroskop görüntüleri. MKKH (A), MKKH+20 μ M ALA (B), MKKH+iYD-MKH (C), MKKH+iYD-MKH _{ALA} (D), MKKH+iYD-MKH Ekso (E), MKKH+iYD-MKH _{ALA} Ekso (F). Ölçüm çubuğu: 50 μ m.....	70
Çizim 4.35. Vaka 1 iYD-MKH (A1), iYD-MKH _{ALA} (A2) ve Vaka 2 iYD-MKH (B1), iYD-MKH _{ALA} (B2) deney gruplarının; çekirdek boyası DAPI(Mavi), MMP-2 (Yeşil) ve MMP-9 (Kırmızı) immünfloresan boyamalarının konfokal mikroskop görüntüleri. Ölçüm çubuğu: 50 μ m.....	71
Çizim 4.36. Vaka 1 MKKH ve iYD-MKH deney gruplarının migrasyon deneyi. MKKH (A1-A2), MKKH+20 μ M ALA (B1-B2), MKKH+iYD-MKH ko-kültür (C1-C2), MKKH+iYD-MKH _{ALA} ko-kültür (D1-D2), MKKH+iYD-MKH-Eksozom (E1-E2), MKKH+iYD-MKH _{ALA} -Eksozom (F1-F2), iYD-MKH iYD-MKH _{ALA} (H1-H2). 0. gün (A1, B1, C1, D1, E1, F1, H1,) ve 2. gün (A2, B2, C2, D2, E2, F2, G2, H2) faz-kontrast mikroskop görüntüleri. Ölçüm çubuğu: 500 μ m.	72
Çizim 4.37. Vaka 2 MKKH ve iYD-MKH deney gruplarının migrasyon deneyi. MKKH (A1-A2), MKKH+20 μ M ALA (B1-B2), MKKH+iYD-MKH ko-kültür (C1-C2), MKKH+iYD-MKH _{ALA} ko-kültür (D1-D2), MKKH+iYD-MKH-Eksozom (E1-E2), MKKH+iYD-MKH _{ALA} -Eksozom (F1-F2), iYD-MKH iYD-MKH _{ALA} (H1-H2). 0. gün (A1, B1, C1, D1, E1, F1, H1,) ve 2. gün (A2, B2, C2, D2, E2, F2, G2, H2) faz-kontrast mikroskop görüntüleri. Ölçüm çubuğu: 500 μ m.	73

Çizim 4.38. Vaka 1 MKKH+3mM ALA (A) ve Vaka 2 MKKH+3mM ALA (B) deney gruplarının 2. gün faz-kontrast mikroskop görüntüleri. Ölçüm çubuğu: 500µm. 73



ÇİZELGELER DİZİNİ

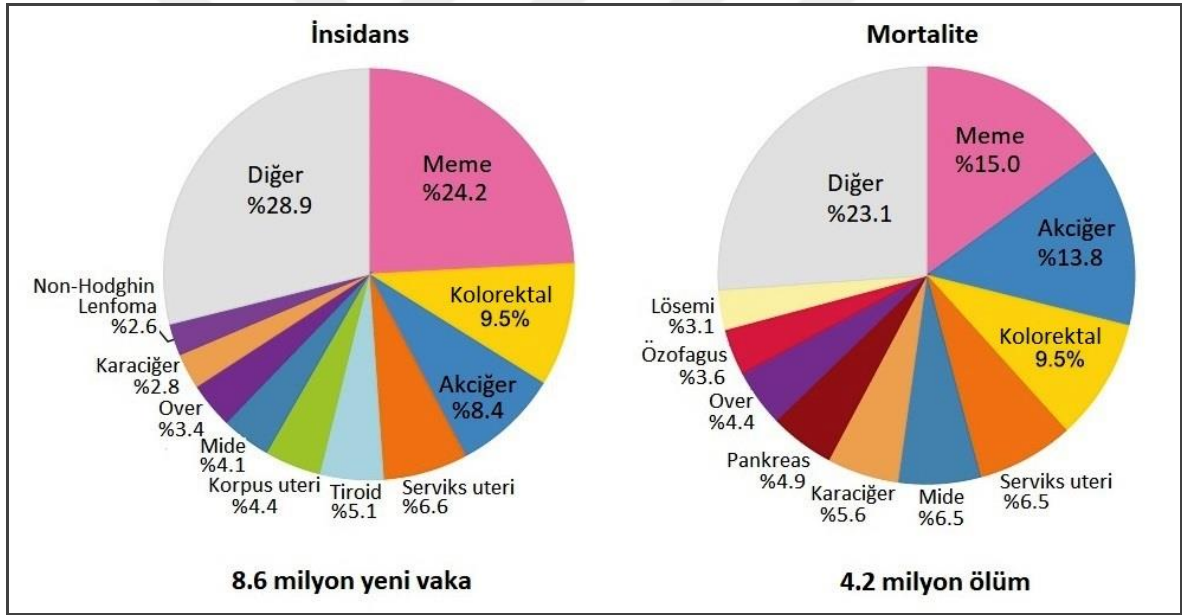
Çizelge 3. 1. IDC tanısı almış Vaka1 ve Vaka 2 hastalarının meme tümörlerinin histopatolojik özellikleri ve Bloom-Richardson derecelendirilmesi.	19
Çizelge 3. 2. MKKH'lerin çoğaltılmasında kullanılan besiyeri içeriği ve miktar/oran tablosu.....	20
Çizelge 3. 3. MKKH'lerin süspansiyon kültüründe kullanılan mamosfer besiyeri içeriği ve miktar/oran tablosu.	22
Çizelge 3. 4. iYD-MKH'lerin çoğaltılmasında kullanılan besiyeri içeriği ve miktar/oran tablosu.....	24
Çizelge 3. 5. Grup isimlerinde geçen kısaltmalar ve açık isimleri.....	30
Çizelge 3. 6. Deney grupları ve besiyeri bileşenleri.....	33
Çizelge 3. 7. Gen ekspresyon analizi yapılan genler ve primerlerinin baz dizilimleri.....	35



1. GİRİŞ

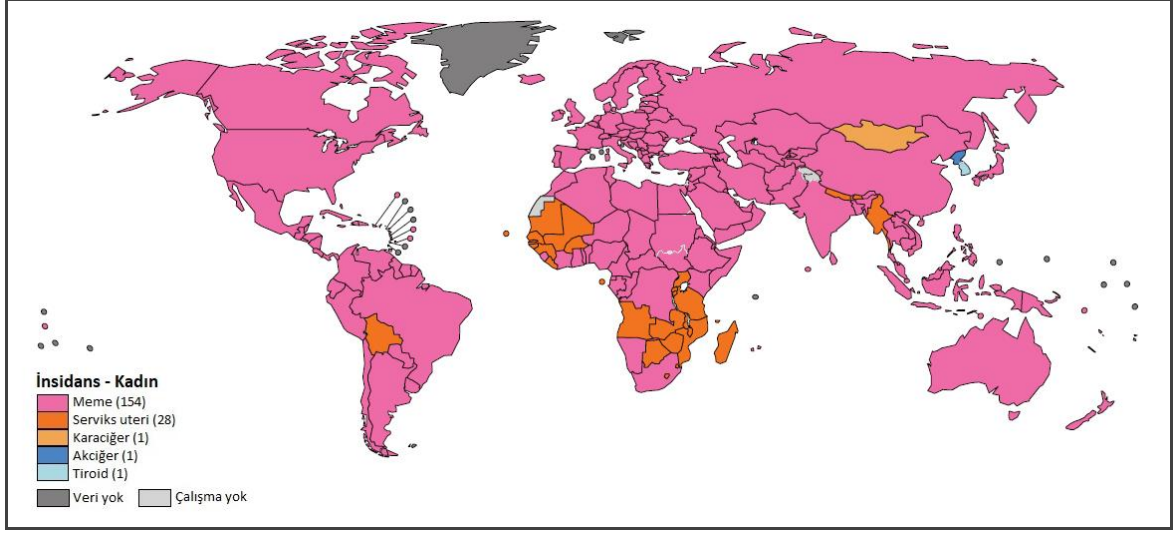
1.1. Meme Kanseri

Meme kanseri, kadınlar arasında en sık görülen kanser olup, her yıl 2,1 milyon kadını etkilemektedir. Epidemiyolojik çalışmalarda %24.2 prevalansı ve %15 mortalite oranıyla kadınlarda kansere bağlı ölümlerin başında gelmektedir (Çizim 1.1). Meme kanseri; insani gelişmişlik endeksi (İGE) yüksek ülkelerde, artmış morbidite oranıyla dikkat çekerken; gelişmekte olan ülkeler yüksek mortalite oranlarıyla önde gelmektedir. Bunun yanında küresel olarak hemen hemen her bölgede meme kanseri oranı artarak devam etmektedir (Çizim 1.2) (Bray ve diğ. 2018). Türkiye'de ise meme kanseri oranı 100.000 kadında 40.6 iken, kadınlarda ortaya çıkan kanser türleri arasında ilk sırada yer almaktadır (Gültekin M/ T.C. Sağlık Bakanlığı 2014).



Çizim 1.1 Kadınlarda en yaygın görülen 10 kanser türünün vaka ve ölüm oranlarının yüzdelerle dağılımı (Bray ve diğ. 2018).

Meme kanseri biyolojik ve klinik açıdan çok heterojen özellikler gösterir. Meme kanserinde kontrolsüz hücre çoğalması genomik instabilite (Mutasyon, amplifikasyon, delesyon, kromozomal anomaliler gibi) ve belirli epitelyal özelliklerin ortadan kalkması gibi değişiklikler sergiler. Bu nedenle kanser gelişiminde rol oynayan moleküler mekanizmaların anlaşılması ileriye dönük kanser terapilerinin geliştirilmesi için önemlidir.



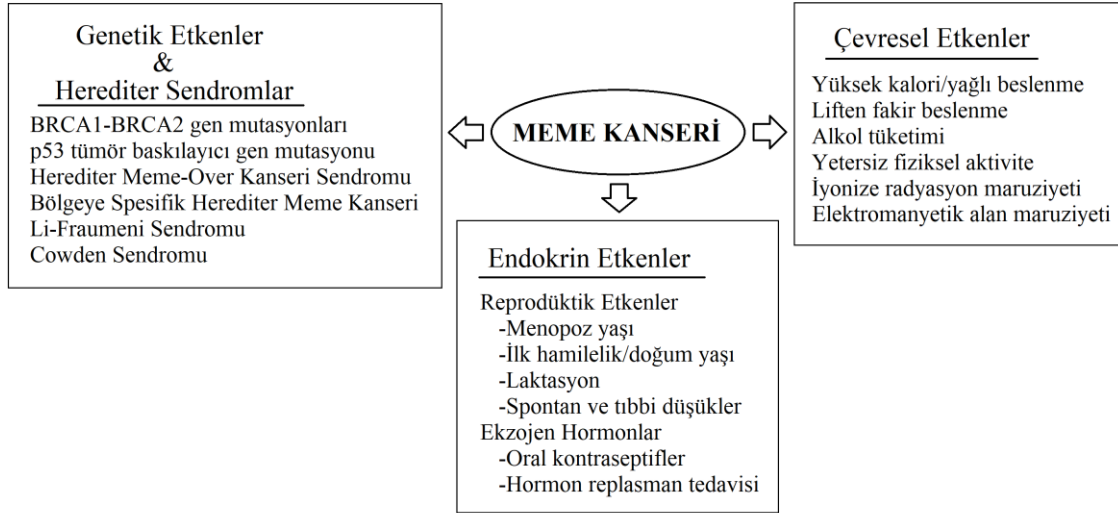
Çizim 1.2 Kadınlarda en sık görülen kanser türünü ülke bazında gösteren küresel harita (Bray ve diğ. 2018).

Meme kanseri, patolojisinin multifaktöriyel temellere dayanmasına bağlı olarak geniş bir risk faktörü ağına sahiptir (Çizim 1.3).

Genetik Etkenler ve Herediter Sendromlar: Genetik etkenler ve herediter sendromlar, tüm meme kanseri olgularının %8-10'unu oluşturmaktadır (Lynch ve diğ. 1984). Meme kanseri aile öyküsü olan kişilerde meme kanserinin ortaya çıkma yaşı daha erken olup, özellikle annesinde meme kanseri olanlarda daha belirgindir. Meme kanseri ile ilişkili olduğu bilinen genlerden ilki; meme kanseri duyarlılık geni 1 (BRCA1)'dir. Otozomal dominant bir gen olan BRCA1, 17. kromozomun uzun kolu (q) üzerine yerleşmiş olup, mutasyonların oluşması sonrası BRCA1 geninin herediter meme kanseri ve over kanserlerinde etyolojik rol oynadığı kabul edilmektedir (Futreal ve diğ. 1994). BRCA1 geninin mutasyona uğramış şeklini taşıyan bir kadında 70 yıllık yaşam süresi boyunca meme kanserine yakalanma riskinin %85 olduğu hesaplanmıştır (Wooster ve diğ. 1994). BRCA2 geni ise 13. kromozom üzerinde yerleşim gösteren ve ön değerlendirmelere göre ailevi olgularda hastalığın erken ortaya çıkmasıyla ilişkilendirilmektedir. BRCA2 mutasyonu taşıyan kadınlarda meme kanseri gelişimi riski %87 olarak hesaplanmıştır. BRCA2 geninin BRCA1'den farklı olarak, artmış over kanseri sıklığı ile bir ilişkisi yoktur (Wooster ve diğ. 1994). Bölgeye spesifik herediter meme kanseri olguları BRCA2 gen mutasyonu ile yakından ilişkilidir. Li-Fraumeni ve Cowden gibi otozomal dominant sendromları da, çeşitli meme malignitelerinin eşlik ettiği genetik sendromlardır.

Endokrin Etkenler: Meme, hormonların kontrolünde olan bir doku olduğu için; meme kanseri gelişiminde hormonların etkisi olduğu düşünülmektedir. Erken menarş yaşı meme kanseri gelişimi için bir risk faktörü olarak kabul edilmektedir ve menarşın her bir yıl geçikmesi, meme kanseri riskini %20 azalttığı kabul edilmektedir (Henderson ve diğ. 1985). Menopoz yaşı da meme kanseri risk faktörleri arasında bir kriter olarak kabul edilmektedir. 45 yaşından önce menopoza giren kadınlarda meme kanseri riski 55 yaşından sonra bu döneme giren kadınların yarısı kadardır ve menopozun her bir yıllık gecikmesi, meme kanseri riskini ortalama %3 oranda artırır (Trichopoulos ve diğ. 1972). Sporadik düşükler ve gebeliğin tıbbi olarak sonlandırılması durumlarında da hormon düzeylerindeki programlı olmayan değişimler, meme kanserinde risk artırıcı faktördür. İlk doğum da meme kanserinin endokrin etkenlerinden biridir. İlk doğumunu 30 yaşından sonra yapan bir kadınlarda, 20 yaşından önce yapan kadınlara göre meme kanserine yakalanma riski 4 kat daha fazla olduğu bildirilmiştir (Veronesi ve diğ. 1995). Uzun süren laktasyon süreci de ovuluar dönem sayısını azaltarak, meme kanserinde koruyucu bir faktör olduğu kabul edilmektedir (Musey ve diğ. 1987). Gebeliğin önlenmesinde ve menopoz sonrası hormon replasman tedavilerinde eksojen hormon (Östrojen, progesteron) kullanımının da meme kanseri riskini arttırdığı yapılan birçok epidemiyolojik çalışma ile gösterilmiştir (Wendy ve diğ. 2008).

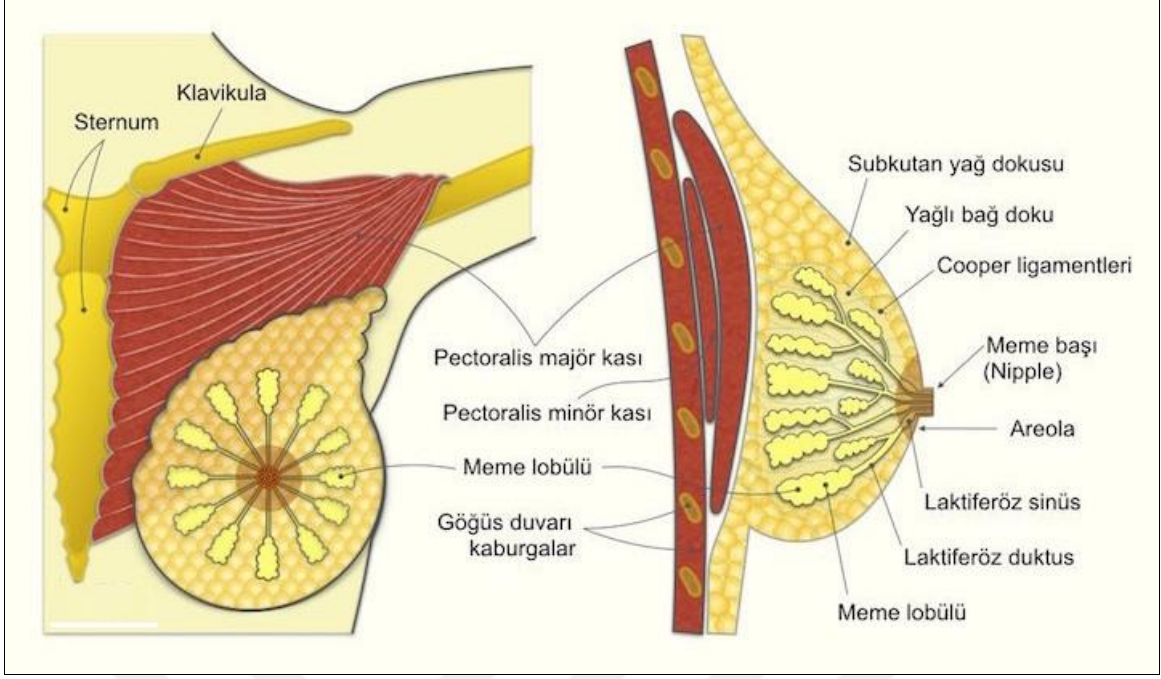
Çevresel Etkenler: Yağdan zengin beslenmenin ve alınan enerji miktarının meme kanseri ile yakından ilişkisi bilinmektedir ve yapılan hayvan deneyleriyle de gösterilmiştir. Beslenmede alınan lif ve bazı vitamin (Vitamin A, C, E, D) miktarının meme kanseri üzerinde koruyucu etkisi olduğu ileri sürülmektedir. Fiziksel aktivite adolesan dönemde menarşı geciktirerek meme kanseri riskini azalttığı gibi, erişkin dönemde düzenli yapılan egzersizlerin de koruyucu etkisi gösterilmiştir. Özellikle genç yaşta maruz kalınan iyonize radyasyon ve elektromanyetik alan, diğer kanserlerde olduğu gibi meme kanseri için de risk faktörünü artırıcı çevresel etkenlerdendir (Topuz ve Aydın 2003).



Çizim 1.3 Meme kanseri gelişiminde etkin risk faktörleri faktörleri.

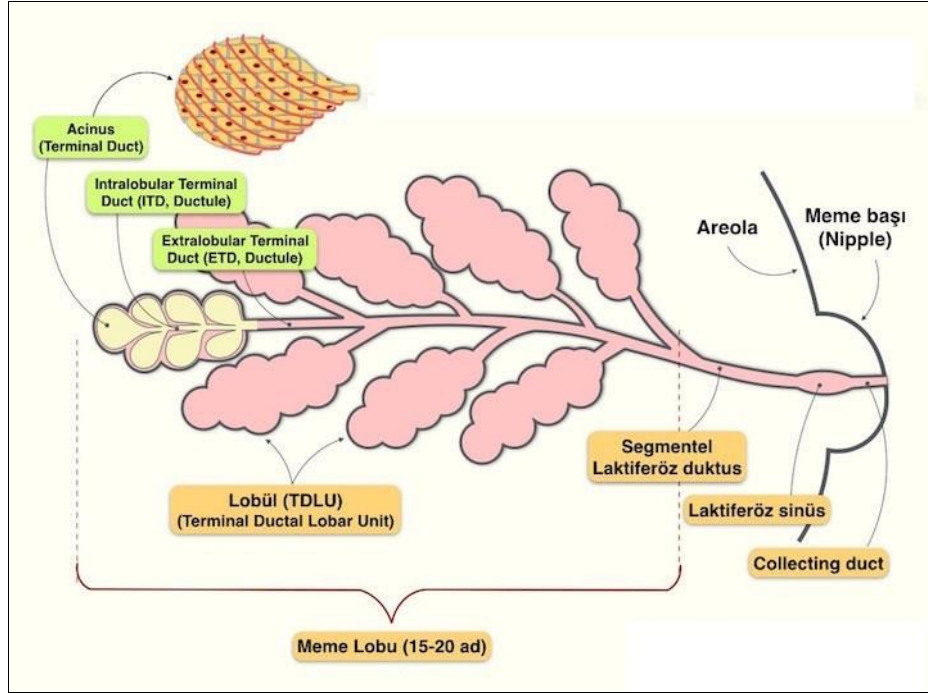
1.1.1. Memenin Anatomik, Fizyolojik ve Histolojik Yapısı

Meme, göğüs ön duvarında gelişmiş modifiye bir ter bezidir. Deri eklerinin ve stromanın evrimi ile memeli sınıfı yenidoğanının immunolojik korunması ve beslenmesi üzerine özelleşmiştir. İnsanlarda göğüs duvarının üst kısmında pektoral kasın üzerinde bir çift meme glandı bulunur. Meme başından 6-10 ana duktus sistemi köken alır. Deriyi örten çok katlı yassı epitel, duktuslarda da devam eder ve sonra birdenbire iki sıralı küboidal epitele dönüşür. Genellikle duktus açıklığında küçük bir keratin tıkaç bulunur. Çevre areola derisi pigmentedir ve düz kas ile desteklenmiştir. Büyük duktusların birbirini izleyen dallanmaları ile sonunda terminal duktal lobüler üniteye ulaşılır (Çizim 1.4). Erişkin kadınlarda terminal duktus bir lobülü oluşturmak için küçük asinüslerden üzüm salkımı şeklinde bir kümeye tomurcuklanır. Her duktal sistem tipik olarak memenin 1/4'ünden fazlasını işgal eder ve sistemler geniş ölçüde bir diğeri ile örtüşürler.



Çizim 1.4. Memenin anatomisi (www.turkcerrahi.com, Mart 2018).

Meme, fetal hayatın 5-6. haftalarından menopoza kadar devam eden anatomik ve fizyolojik değişimlere maruz kalan bir organdır. Puberta ile birlikte kadınlarda meme, meme başı ve areolada meme elemanları, yağ ve bağ dokusundaki artışa bağlı olarak önemli değişiklikler olur.

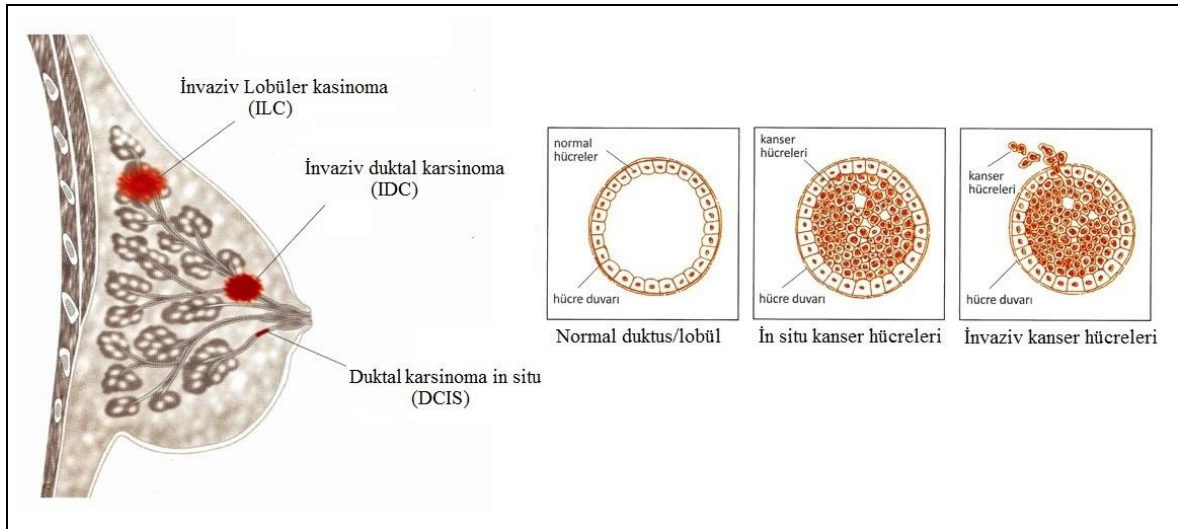


Çizim 1.5. Meme lob ve lobül yapılanması (www.turkcerrahi.com, Mart 2018).

Anterior toraks duvarının süperfisyel fasyası üzerinde yerleşim gösteren meme, tubuloalveolar tipte glandular doku içeren 15-20 adet lobdan oluşur. Lobların her biri 2-4 mm çaplı birer laktifer duktus ile sonlanır. Bunlar, meme başına 0,4-0,7 mm çaplı birer orifise açılırlar. Her bir duktus areolar altında laktifer sinüs dediğimiz dilate bir bölüm içerir. Laktifer duktuslar dallanarak subsegmental ve terminal duktuslara dönüşürler. Terminal duktuslar gevşek bir stroma ile, memenin fonksiyonel ünitesi olan lobüller ise yoğun kollajenöz bir stroma ile çevrelenmişlerdir (Topuz ve Aydınar 2003). Memenin fonksiyonel olarak en aktif bölümü olan terminal duktal-lobüler ünite (TDLU) kısa bir terminal duktus bölümünden ve asinüsten (Alveol) meydana gelir (Çizim 1.5).

1.1.2. Meme Kanserinin Histolojik ve Moleküler Alt Sınıfları

Meme kanseri; farklı histolojik paternler, farklı biyolojik özellikler ve klinik davranışlarla ilişkili, çoklu tümör varlıklarını içeren karmaşık ve heterojen bir hastalıktır. Son yüzyılın başlangıcında hastada meme malignitesi olduğunun bilinmesi yeterliydi ve meme kanser hastalarının tümüne tek tip tedavi uygulanmaktaydı. Zamanla aynı tip kanser tanısı alan hastaların farklı prognoz gösterdiğinin gözlemlenmesi ve son 50 yıldan uzun süredir her geçen gün artan şekilde, patoloğların farklı morfolojik varyantlar tanımlaması, meme kanser sınıflamasının tartışılır olmasına neden olmuştur. Bugün için bilinen ve son yayınlanan dünya sağlık örgütü (WHO) tümör sınıflamasında meme kanserinin 20 major tip ve 18 minör subtıp olmak üzere çok sayıda varyantı bulunmaktadır (Ellis ve diğ. 2003).



Çizim 1.6. Meme karsinomları ve invazyonu (www.memesaglik.com, Mart 2019).

Duktal Karsinoma İn Situ: Duktal karsinoma in situ (DCIS), kanserin süt kanallarının (Laktiferöz duktus) içinde başladığı ve karsinomun kanal ile sınırlı olduğu "non-invaziv"

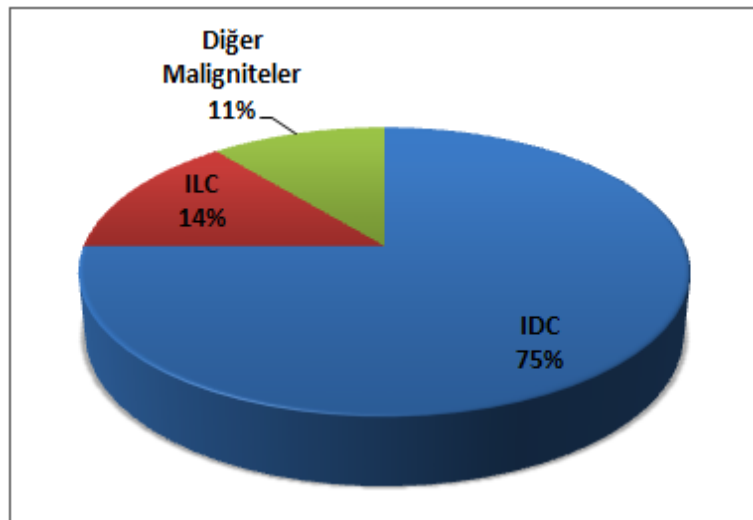
meme kanseri türüdür. DCIS, süt kanalının bazalına, çevre meme dokusuna ya da herhangi bir organa yayılım göstermez.

Lobüler Karsinoma İn Situ: Meme lobülünün, lobül hücrelerin solid proliferasyonu ile dolup genişlemesiyle karakterize, invaziv olmayan, lobüler hiperplazidir. Meme karsinomlarının yalnızca %03-08' ini oluşturur ve genellikle 40-50 yaş aralığındaki (Premenopozal) kadınları etkiler (Tavassoli 1999). LCIS, invaziv meme kanseri oluşumu için risk faktörü ya da öncü lezyon olarak nitelendirilebilir. Olguların %20-30'unda, yaklaşık 20-25 yıl gibi bir zaman dilimi içerisinde invaziv karsinom gelişir (Resen ve diğ. 1978).

İnvaziv Duktal Karsinoma: İnvaziv duktal karsinom (IDC), çevre dokulara invazyon ve akciğer, karaciğer, beyin gibi uzak organlara metastaz yapabilen malign epitelyal tümördür (Tavasoli ve Deville 2003). IDC meme karsinomlarının %75-80'ini oluşturan özel tiplerin herhangi biri içinde sınıflandırılmayan malign meme tümörlerinin en önemli grubudur (Çizim 1.6) (Li ve diğ. 2005).

İnvaziv Lobuler Karsinoma: İnvaziv lobüler karsinoma (ILC) invaziv meme karsinomlarının %5-20 aralığında ortalama %14'ünü oluşturarak, IDC'dan sonra ikinci en sık görülen histolojik alt sınıftır. IDC özellikle gastrointestinal, jinekolojik organlar ve peritona metastaz yapma eğilimindedir (Harris 1984).

Diğer İnvaziv Maligniteler: Musinöz karsinom, medüller karsinom, tübüler ve papiller karsinomlar daha az görülen diğer invaziv meme maligniteleridir (Çizim 1.7).



Çizim 1.7 İnvaziv meme karsinomlarının yüzdeleri grafiği .

Meme kanserinde tümörün moleküler sınıflandırılmasında; östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR), insan epidermal büyüme faktörü 2 (Her2), Ki67 ve sitokeratin (CK) 5/6 belirteçlerinin pozitifliklerine göre belirlenen dört farklı alt sınıfı vardır:

Luminal A: ER (+), PR (+), Her2 (-) ve Ki67 \leq % 14. Bu alt tip, tüm meme kanserlerinin yaklaşık% 40'ını oluşturur ve iyi prognozludur.

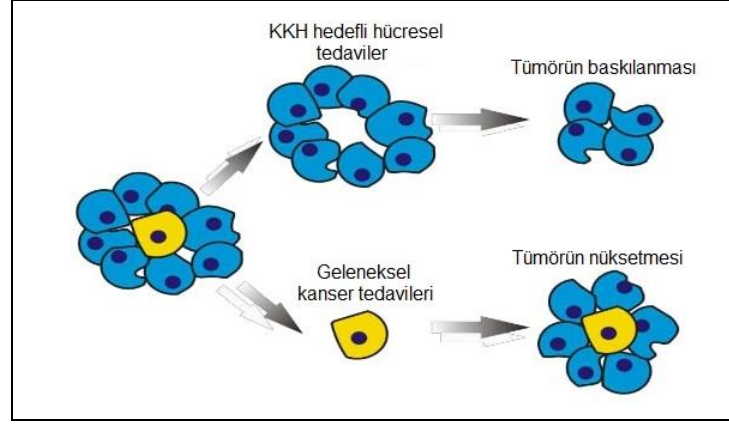
Luminal B: ER (+), PR (+), Her2 (-) ve Ki67 >% 14. Meme kanserlerinin % 20'si luminal B sub-tiptedir. Luminal A tümörlerine göre nispeten kötü prognoza yol açmaktadır. Progresif, ileri tümör derecesi ve lenf düğümlerine metastaz ile ilişkilendirilmektedir.

Her2 pozitif: ER (-), PR (-), Her2 (+) ve Ki67 (yüksek). Bu alt tip meme kanserinin yaklaşık % 10-15'ini oluşturur, Her2 ve proliferasyon ilişkili genlerin yüksek ekspresyonu ile karakterizedir. ER ve PR genellikle negatiftir. Her2 alt tipi tümörler oldukça kötü bir prognoza sahiptir ve sık tekrarlayan metastazlar görülmektedir (Ross ve diğ. 2009).

Bazal benzeri / üçlü negatif: ER (-), PR (-) ve Her2 (-). Bu “bazal benzeri” olarak adlandırılır çünkü yüksek moleküler ifadesi genellikle sitokeratinler (örneğin, CK5 / 6) ve/veya EGFR bazal hücreler/ miyoepitelyal hücrelerde eksprese edilir. Bu alt tip “üçlü negatif” olarak bilinir. Hastalık patolojisi hormon reseptörlerinden kaynaklanmadığı için hormonal tedavilere yanıt vermez. Meme kanserinin bu alt tipi, reseptör pozitif alt tiplere kıyasla oldukça agresif ve kötü bir prognoz sergilemektedir (Perou ve diğ. 2011).

1.1.3. Meme Kanseri Kök Hücresi

Meme tümörleri de diğer solid tümörler gibi kanser kök hücresi (KKH) olarak adlandırılan bir sub-grup içermektedir. Bu KKH'ler; tümörün oluşumu, progresyonu, metastazından sorumlu agresif tümör hücreleridir. KKH'lerinin kanser tedavisine dirençli yapılarından dolayı öldürülmesi güçtür. İlaç tedavisinde direnç gösteren bu grup hücreler, tedavi sonrasında da tümörün nüksetmesine sebep olmaktadır. Bu nedenle yeni tedavi çabaları KKH hedefli hücresel tedavi yöntemlerine yönelmiştir (Çizim 1.8).



Çizim 1.8 Geleneksel kanser tedavilerine karşı KKH hedefli hücresel tedaviler.

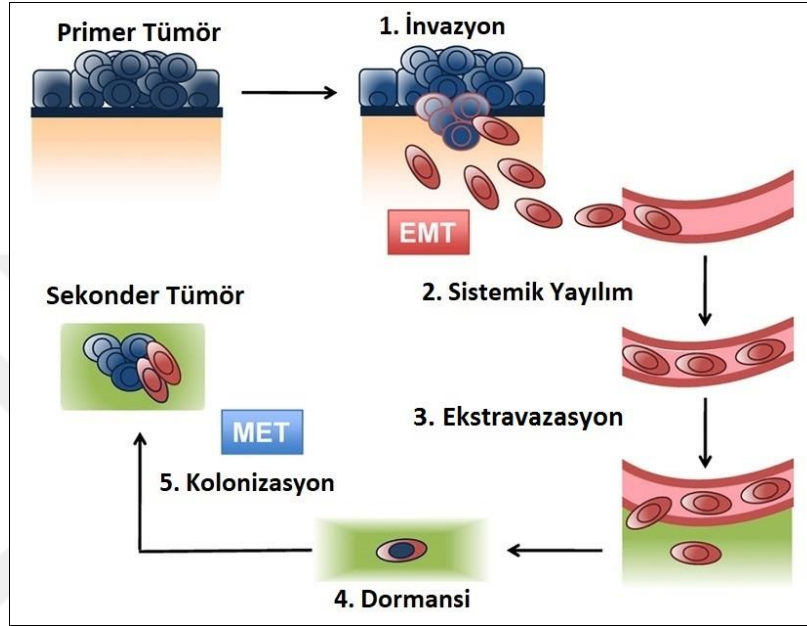
KKH'ler, kendini yenileme, asimetrik bölünme gibi sağlıklı kök hücreler ile benzer özellikler taşımaktadır. Meme kanseri kök hücreleri (MKKH) , 2003 yılında ilk kez Al hajj ve arkadaşları tarafından hücre yüzey belirteçlerine ($CD44^+/CD24^-$) dayandırılarak tanımlanmıştır (Al-Hajj ve diğ. 2003). Ancak son yıllarda yapılan çalışmalarda; kemoterapi ve radyoterapiye dirençle ilişkili olduğu anlaşılan aldehit dehidrogenaz 1 (ALDH1), CD133 ve $CD49f$ de MKKH belirteçleri olarak kabul edilmiştir (Crabtree 2018). MKKH karakterinde görülen bir diğer unsur ise yapışmayan süspansiyon kültürde, sahip oldukları yüksek proliferatif sferoid (mamosfer) oluşturabilme yetenekleridir (Grimshaw ve diğ. 2008).

KKH'lerde; Wnt-katenin, hedgehog, notch sinyal yollarındaki değişim ve bu yollar arasındaki çapraz iletişim ağı etkilidir. Bu yollar kök hücre (CD44, ALDH, OCT4, SOX2), epitelyal mezenkimal geçiş ve ilaç dirençlilik belirteçlerini (ABCG2, ABCC4) artırarak KKH fenotipinin şekillenmesini ve sürdürülmesini sağlamaktadır. Ayrıca kanser hücreleri, anormal telomeraz aktivitesiyle de kendini yenileme özelliğinin koruyabilmektedir (Prieto-Vila ve diğ. 2017). Örneğin; invaziv meme karsinomlarında ~%88-94 telomeraz aktivitesi görülürken, normal meme dokusunda telomeraz aktivitesi bulunmamaktadır (Makki ve diğ. 2015).

1.1.4. Epitelyal Mezenkimal Geçiş

Epitelyal mezenkimal geçiş (EMT), birçok morfolojik ve biyokimyasal değişiklikler sonucu epitel hücrelerinin epitel özelliklerini kaybederek mezenkimal özellikler kazanmalarına sebep olan önemli bir yeniden programlanma mekanizmasıdır. EMT; başta E-kaderin olmak üzere hücresel bağlantı ekspresyonlarının azalması ve sonrasında N-kaderin, vimentin gibi mezenkimal belirteç ekspresyonlarının artışı ile

karakterizedir (Perlikos ve ark. 2013). N-kaderin ekspresyon artışı sonucunda kanser hücrelerinin stromaya doğru göçleri artmaktadır (Leber ve Efferth 2009). Doğal biyolojik süreçte görülen EMT; embriyo implantasyonu ve emriyogenezden sorumlu olduğu gibi (Tip I EMT); yara iyileşmesi, organ fibrozisi ve doku yenilenmesi ile de ilişkilidir (Tip II EMT). Bunların dışında, kanser patolojisinde görülen EMT (Tip III EMT); primer hücrelerinin invazyonu, göçü ve metastazından sorumlu temel mekanizmadır (Çizim 1.9).



Çizim 1.9 EMT III ile metastaz aşamaları (Scheel ve Weinberg 2012).

EMT'nin başlaması ve düzenlenmesinde; SNAIL, TWIST (Basic helix-loop-helix transcription factor) ve ZEB (Zinger finger E-box-binding) olmak üzere üç temel transkripsiyon faktörü etkindir. Bu transkripsiyon faktörleri EMT'nin erken döneminde aktive olur ve merkezi bir göreve sahiptirler. Ayrıca SNAIL, TWIST ve ZEB; EMT III ile metastaza öncü olmasının yanı sıra; immün sistemin baskılanması, kemo-direnç ve tümör nüksü ile de karsinogenezi desteklemektedir (Yadi ve Binhua 2010). Tip III EMT, K-Ras (Kirsten sıçan sarkoma viral onkogen homologu) ve Her2 gibi onkogenik aktivasyonlarla tetiklenebilmektedir. Ayrıca, tümör mikro-çevresinde bulunan kanser-ilişkili fibroblastlar ve immün hücreler gibi stromal hücreler tarafından salınan; TGF- β (Transforme edici büyüme faktörü beta), IGF (İnsülin benzeri büyüme faktörü), HGF (Hepatosit büyüme faktörü), FGF (Fibroblast büyüme faktörü), EGF (Epidermal büyüme faktörü), TNF α (Tümör nekroz faktörü alfa) ve IL-6 (İnterlökin 6) gibi büyüme faktörü/sitokinler de EMT'yi desteklemektedir (Thiery ve diğ. 2009).

1.2. Mezenkimal Kök Hücreler

İlk olarak 1966 yılında Friedenstein ve Patrakova tarafından, sıçan kemik iliğinden stroma hücrelerinin izole edilmesi ile tanımlanmıştır (Barry ve Murphy 2004). MKH'ler çoğu kök hücre gibi kendini yenileyebilme ve çoklu farklılaşma yeteneğine sahiptir. Kemik, kıkırdak, tendon, kas ve yağ doku gibi mezodermal dokuları oluşturan osteoblastlar, kondrositler, miyositler ve adipositlere farklılaşabilmektedir. Ayrıca nöronlar ve endotel hücreleri gibi ektoderm ve endoderm doku hücrelerine de farklılaşabildikleri gösterilmiştir.

Kemik iliği, yağ doku gibi heterojen ortamlardan elde edilen bu hücreler ortak belirteçler ile tanımlanmalıdır. 2008 yılında Uluslararası Hücresel Tedavi Derneği (ISCT)'nin fikir birliğiyle MKH olarak sınıflandırmak için;

- Hücrelerin kültür ortamında plastik yüzeye tutunabilmeleri,
- Yüzeylerinde CD105 (SH2), CD73 (SH3/4) ve CD90 gibi hematopoetik olmayan hücre yüzey belirteçlerini eksprese ederlerken, CD45, CD34, CD14 veya CD11b, CD79 veya CD19 ve HLA-DR (İnsan lökosit antijeni-DR) gibi tipik hematopoetik belirteçleri eksprese etmemeleri,
- İn vitro ortamda kemik, yağ ve kıkırdak hücrelerine farklılaşabilmeleri gerekmektedir (Dominici M ve diğ. 2006).

Güncel hücresel tedavi yöntemleri, kanser dahil olmak üzere pek çok tedavisi olmayan hastalıklar için gelecek vaadeden yaklaşımlardır. Mezenkimal kök hücreler, anti-kanser özellikleri en fazla araştırılmış olan kök hücre türüdür (Tian ve diğ. 2011)

Mezenkimal kök hücreler hasarlı dokuya doğru göç etme, doku tamiri yapabilme, inflamasyonu önleme gibi özel yeteneklerinin yanında, kanser ajanlarının taşınması için de elverişlidir (Ciavarella ve diğ. 2011).

Mezenkimal Kök Hücreler;

- Kendi yenileyebilme,
- Hasarlı dokuya göç etme ve hasarlı dokunun dokunun rejenerasyonu,

- Mezoderm kökenli pek çok doku hücrelerine farklılaşma kapasitesi,
- İmmün reaksiyon oluşturmaması,
- İmmün sistemi düzenleyici sitokinlerin salınımı,
- Tümör bölgesine göç etme yeteneği,

gibi özelliklerinin yanı sıra anti-tümör potansiyeline sahip olduğuna da inanılmaktadır (Ramdasi ve diğ. 2016). MKH'ler vaskülerizasyon oluşumu, immün baskılanması, epitelyal mezenkimal geçiş gibi süreçlere aracılık ederek pro-tümör etkinlik gösterebilmesine karşın, tümör gelişimi için önemli olan Wnt ve Akt yolları üzerinden de anti-tümör etkinlik de göstermektedir (Dai ve diğ. 2011).

Mezenkimal kök hücrelerin anti-tümör etkileri;

- Wnt yolağını baskılar
- Akt yolağını baskılar
- NF- κ B yolağını baskılar (Qiao ve diğ. 2008)
- TRAIL (Tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand) ifadesini düzenler
- Tümör büyümesini baskılayıcı interferon ve interlökinler salgılar (Ren ve diğ. 2008)
- Toksik olmayan öncü antikanser ilacını (prodrug), toksik (aktif) antikanser ilacına dönüştüren enzimler salgılar. MKH'nin bu “farmakolojik pompa özelliği”, tümör hücrelerinin seçilimli olarak öldürülmesinde kullanılabilir (Shah 2012).

MKH'ler bu özellikleriyle kanser hedefli çalışmalar için geniş bir terapötik yelpaze sunar ve araştırmalarda sıklıkla tercih edilmektedir.

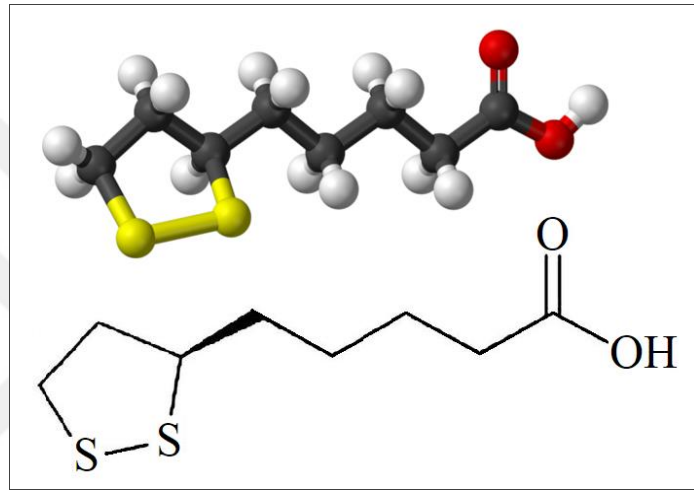
1.3. Alfa Lipoik Asit

Alfa lipoik asit (ALA), mitokondride oktanoik asitten de novo olarak sentezlenen ve birçok multi-enzim kompleksinin metabolizmasının düzenlenmesinde kofaktör görevi gören endojen bir disülfit bileşiğidir (Çizim 1.10) (Packer ve diğ. 2001).

ALA, mitokondriyal α -ketoasit dehidrojenazlar için gerekli bir kofaktördür ve bu nedenle mitokondriyal enerji metabolizmasında kritik bir rol oynar. 1930'lu yıllara kadar

varlığı bilinmiyorken 1937 yılında *Laktobasillus*'un besi ortamında kullanılan patates ekstresinin bir komponenti olarak bulunmuştur. 1951 yılında ise Dr. Reed ve arkadaşları karaciğer rezidüsünün 100 kilogramından saflaştırma yaparak ~30 miligram ALA elde etmiştir. Takip eden yıllarda moleküler yapısı aydınlatılmış ve 1,2 ditiyolen-3 pantotenik asit olarak adlandırılmıştır (Morris ve diğ, 1995).

Son zamanlarda yapılan çalışmalar ALA'nın; inflamasyon, hücresel yaşlanma, kalp damar hastalıkları ve kanser gibi oksidatif stresle ilişkili diğer bozuklukları da kapsayan pek çok patolojik durumu iyileştirebileceğini göstermektedir.



Çizim 1.10. Alfa lipoik asitin moleküler yapısı.

Hem yağda hem de suda çözünebilen tek antioksidan olan ALA;

1. Radikal metabolit üretiminin önlenmesi,
2. Üretilmiş radikallerin uzaklaştırılması,
3. Oluşan hücre harabiyetinin onarılması,
4. Sekonder radikal üreten zincir reaksiyonlarının durdurulması,
5. Endojen antioksidan kapasitenin artırılması (Çizim 1.12)

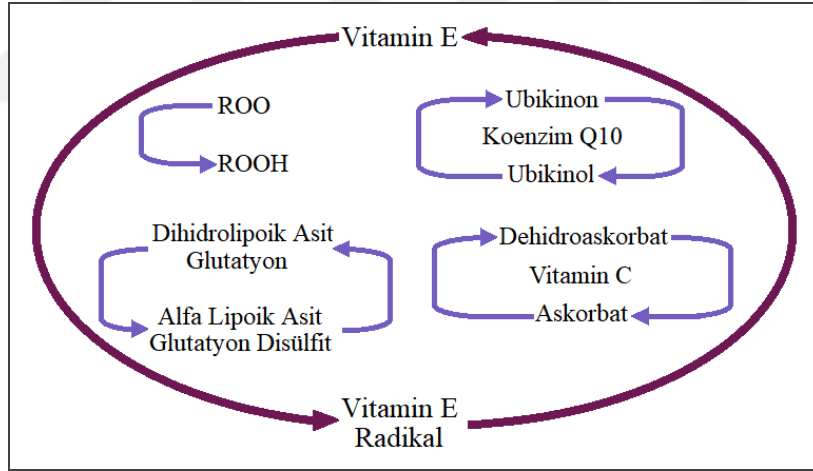
olmak üzere beş ayrı blokta yürüyen antioksidan savunma özelliklerinin tamamına sahip olmasıyla 'Evrensel antioksidan' olarak adlandırılmaktadır (Gutteridge 1995) .

Diğer antioksidanlardan farklı olarak hem okside formu hem de redükte formu olan dihidrolipoik asit (DHLA) güçlü antioksidan etkinlik göstermektedir. ALA'nın her iki formu da *in vitro* ve *in vivo* koşullarda serbest radikal ataklarına karşı koruma yeteneği göstermiştir (Çizim 1.11) (Siangproh ve diğ. 2010).



Çizim 1.11. Alfa lipoik asitin biyolojik etkinlik mekanizmaları.

Alfa lipoik asit suda ve yağda çözünebilirlik özelliğiyle hem hidrofilik hem lipofilik ortamlarda etkinlik gösterebilmektedir. Bu özelliklerden dolayı geniş bir farmakolojik etki potansiyeline sahiptir (Packer ve diğ. 1998) (Çizim 1.12).



Çizim 1.12 ALA'nın antioksidan rejenerasyon mekanizması.

Alfa lipoik asit, normal hücrelerde sitoprotektif özellik gösterirken, transforme hücrelerde hücre döngüsünü durdurucu ve apoptozu başlatıcı etki göstermektedir (Pierce ve diğ. 2000).

Alfa lipoik asitin kanser karşıtı etkinlikleri ve moleküler mekanizmaları:

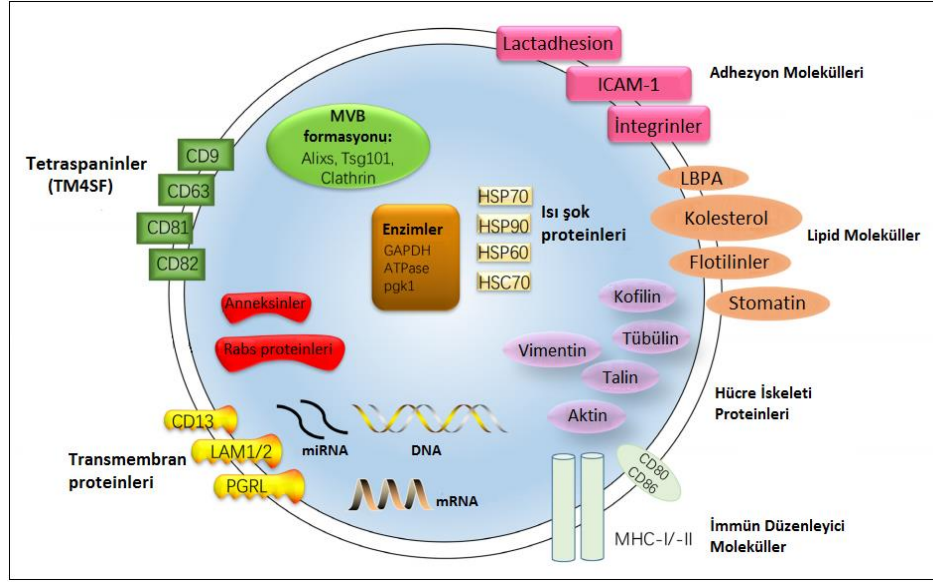
1. Histonların hiperasetilasyonu ile kanser hücrelerinin proliferasyon ve metastazını destekleyen proteinlerin ifadesini baskılar (Burton ve diğ. 2009).

2. Histon inhibisyonu ile kanser hücrelerini apoptoza yönlendirebilmektedir.
3. Kanser hücrelerinin canlılığı, proliferasyonu, invazyonu, metastazında önemli rol oynayan ve tedaviye dirençle ilişkilendirilen NF- κ B (nuclear factor κ B) protein kompleksini baskılar (Goraca ve diğ. 2011).
4. Malign hücrelerde homosistein düzeylerini toksik konsantrasyonlara yükseltebilme kabiliyeti vardır. Bu sayede kanser hücrelerini apoptoza yönlendirebilmektedir.
5. Metalloproteaz aktivitesini azaltarak kanser hücrelerinde migrasyonu engellemektedir (Lee ve diğ. 2010).
6. Antimutajenik ve antiklastojenik özellikler sergiler.

Yakın zamanlarda yapılan çalışmalarda ALA'nın; meme (Li ve ark. 2015), kolon (Damjanovic ve diğ. 2014), akciğer (Michikoshi ve diğ. 2013) tiroid (Jeon ve diğ. 2016), over (Kafara ve diğ. 2015), pankreas (Burton ve diğ. 2009) gibi pek çok tür kanserde hücre proliferasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir. ALA; gerek antioksidan özellikleri, gerek kanser karşıtı etkileriyle hücrel kanser tedavileri için ideal bir ajan olmuştur.

1.4. Eksozomlar

Eksozomlar; proteinler, DNA, mRNA ve kodlamayan RNA'lar da dahil olmak üzere çeşitli molekülleri içeren küçük, hücre dışı zarla kaplı veziküllerdir (Çizim 1.7). Boyutları 30-100 nm çapında olan bu veziküller, endozomal olarak üretilip hücre dışına salınmaktadır ve hücreler arası iletişim için yeni araçları olarak tanımlanmaktadır. Kök hücreler de dahil olmak üzere çok sayıda hücre tipi, ekstraselüler çevreye eksozomlar salgılar ve bunlar tümör mikro ortamının önemli iletişim araçlarıdır (Reza ve diğ. 2016). Yapılan çalışmalar, kök hücreler ile insan tümör hücreleri arasındaki etkileşim mekanizmasının eksozomlar yoluyla biyolojik materyal değişimine dayandığını ortaya koymuştur. Eksozomlar, immünojenite ve toksisitesinin düşük olmasından dolayı diğer nano boyutlu taşıyıcılar arasında idealdir (Wang 2017).



Çizim 1.13. Eksozomun moleküler yapısı ve içeriği (Jia 2017).

1.4.1. Mezenkimal Kök Hücre Kaynaklı Eksozomlar

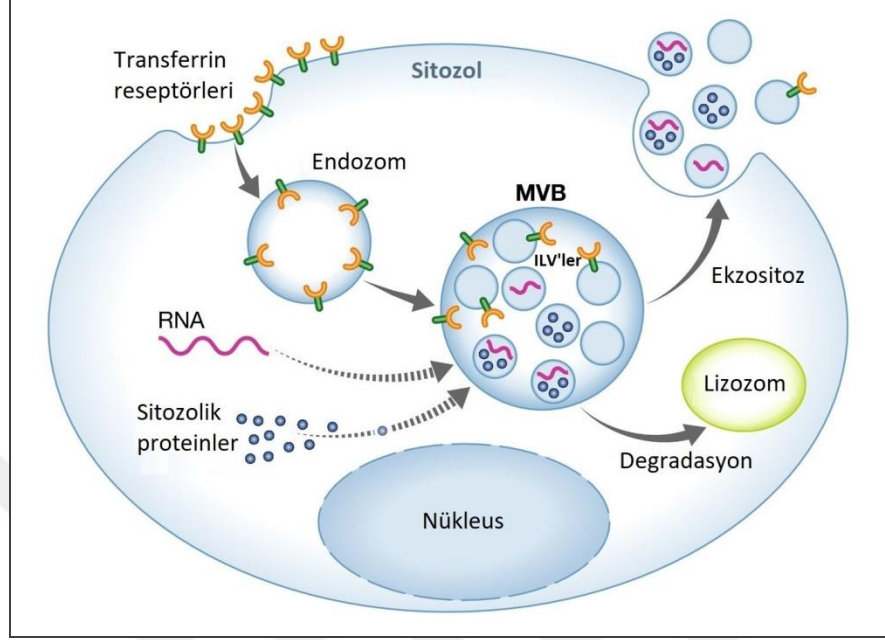
Eksozomlar için bahsetmiş olduğumuz genel özelliklere benzer şekilde, MKH eksozomları da; nükleik asitleri, proteinleri ve lipidleri kapsayan zengin bir içerikle yüklüdür. Bünyesinde; 857 gen ürünü ve 150'den fazla mikroRNA (miRNA) tanımlanmıştır ancak; bu eşsiz içeriğin tek bir eksozom türü tarafından mı taşındığı, yoksa farklı eksozom türleri ile paylaşım halinde mi taşındığı henüz tespit edilememiştir (Lai 2015).

MKH ve insan tümör hücreleri arasındaki etkileşim, eksozomlar da dahil hücre ekstrasvezikülleri yoluyla biyolojik materyalin değişimini dahilinde gerçekleşmektedir. Yapılan bir çalışmada; MKH eksozomlarının 24 saat içinde meme kanseri hücreleriyle ~% 19 oranında entegrasyonunun gerçekleştiğini ortaya çıkarmıştır (Yang 2015). MKH eksozomları; tümör hücreleriyle entegre olarak hücre işlevleri değiştirme ve tümör mikro-ortamını yeniden yapılandırma kabiliyetine sahiptir. Eksozomlar bu özelliğiyle, KKH hedefli eksozom mühendisliği çalışmaları için dikkat çekicidir.

1.4.2. Eksozomların Biyogenez

Eksozomlar, hücre dışı ligandların ve hücre bileşenlerin geri dönüşümü ve yıkımı için önemli olan bir organel olan endozomlardan oluşmaktadır. Plazma membranının içe kıvrılmasıyla oluşan erken endozomlar, olgunlaşıp geç endozomlara dönüştüğünde; membranları internal olarak tomurcuklanır ve spesifik protein, lipid ve sitozol alt grupları içeren intralüminal vezikül (ILV)'ler oluştururlar (Çizim 1.8).

Olgunlaşmış endozomlar [Multiveziküler cisim (MVB)'ler], degrade olmak üzere lizozom organeliyle, ya da ekzozom salınımı yapmak üzere plazma membranı ile füzyon oluşturduğu iki farklı yol izlemektedir.



Çizim 1.14. Ekzozom biyogenezini ve salınımı (Schorey ve diğ. 2015).

MVB'ler ve ILV'ler, toplamda 30 farklı proteinin yer aldığı 'Endosomal sorting complex required for transport (ESCRT)' sisteminin dört kompleksi (ESCRT-0, -I, -II ve -III) ve ilişkili proteinlerle (VPS4, VTA1, ALIX) koordine edilmektedir. Bu dört kompleks ubiquitin işaretli proteinlerin/reseptörlerin endozoma taşınması ve bağlanmasından sorumludur. Bu ubiquitin işaretli proteinlerin endozom üzerindeki birikimi; vezikül oluşumuna yol açan membran daralmasını sağlamaktadır (Luzio ve diğ. 2009). MVB'lerin plazma zarı ile füzyonu ve ekzozom salınımı, hücre içi kalsiyum değişiklikleri dahil olmak üzere; Rab GTPazlar (Rab 11, Rab27, Rab35), SNARE'ler gibi çeşitli mekanizmalar tarafından düzenlenmektedir (Chaineau ve diğ. 2009).

2. AMAÇ

Çalışmanın amaçlarından biri; IDC tanısı almış hastaların tümör dokularından kanser kök hücresi ve yakın çevrede ki sağlıklı yağ dokularından mezenkimal kök hücre izolasyonlarını gerçekleştirerek; bir antioksidan olarak tanımlanan **ALA'nın, MKKH'ler ve iYD-MKH'ler üzerine olan direk etkilerini** saptamaktır.

Aynı vakadan alınacak olan **iYD-MKH'lerin MKKH üzerine olan etkileri** indirek ko-kültür ile saptanacaktır. MKH hücreleri ek olarak ALA ile kültüre edilerek uyarılacak, **ALA ile uyarılmış MKH'lerden elde edilecek olan eksozomların MKKH üzerine apoptotik, anti-proliferatif ve anti-metastatik etkileri** akım sitometri, qRT-PCR analizleri, Anneksin V/PI, ELİSA, IF boyama ve migrasyon deneyleriyle incelenecektir.

Sonuç olarak bu çalışmada; hücrelerin birbirlerine karşı olan indirek/parakrin etkileri ve ALA ile zenginleştirilmiş iYD-MKH eksozomlarının direk etkilerini saptamak amaçlanmaktadır.

3. YÖNTEM

3.1. Meme Tümör Dokusundan Kanser Kök Hücresi İzolasyonu ve Hücre Kültürü

İnvaziv duktal karsinoma tanısı almış iki hastanın (Çizelge 3.1), mastektomi ameliyatı ile çıkarılan tümör kitlesinden ~7-8 mm³ doku parçası hücre izolasyonu yapılmak üzere alındı. Alınan tümör doku, %5 Penisilin-Streptomisin (Pen/Strep- antibiyotik), %10 fetal sığır serumu (FBS) eklentili DMEM-LG içerisinde laboratuvar birimimize getirildi. Tümör doku; Laminar flow kabin (Safe Fast Elite 2150, İtalya) içerisinde, 90 mm çapında steril petriye alındı ve burada %5 Pen/Strep eklentili 10 ml HBSS ile iki defa yıkanarak kan doku ve kan damarları uzaklaştırıldı. Tümör doku yeni bir petriye alındı ve büstri yardımıyla ufak parçalara ayrıldı. Parçalara ayrılmış tümör doku üzerine 4 ml enzim karışımı ilave edildi ve petrideki doku/enzim karışımının tamamı 50 ml falkon tüpe aktarıldı. Tümör doku/enzim karışımı 37°C ayarlı çalkalamalı su banyosu cihazında gece boyu inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda 7 ml inaktivasyon besiyeri (%10 FBS'li DMEM-LG) ilave edilerek enzimatik reaksiyon durduruldu. Hücre/doku süspansiyonu 70 µm süzgeçten geçirilerek, atık doku parçaları uzaklaştırıldı. Hücre süspansiyonu, 1600 rpm'de 5 dakika süreyle santrifüj edildi ve supernatant atılarak enzim uzaklaştırıldı. Hücre peleti MKKH besiyeri ile homojenize edilerek T-25 hücre kültür kabına (SPL Biosciences, Kore) ekildi ve 37 °C, %5 CO₂ koşullarında kültüre edildi. Hücreler, kültür kabı yüzeyini %70-80 oranında kaplayıncaya kadar çoğaltıldı.

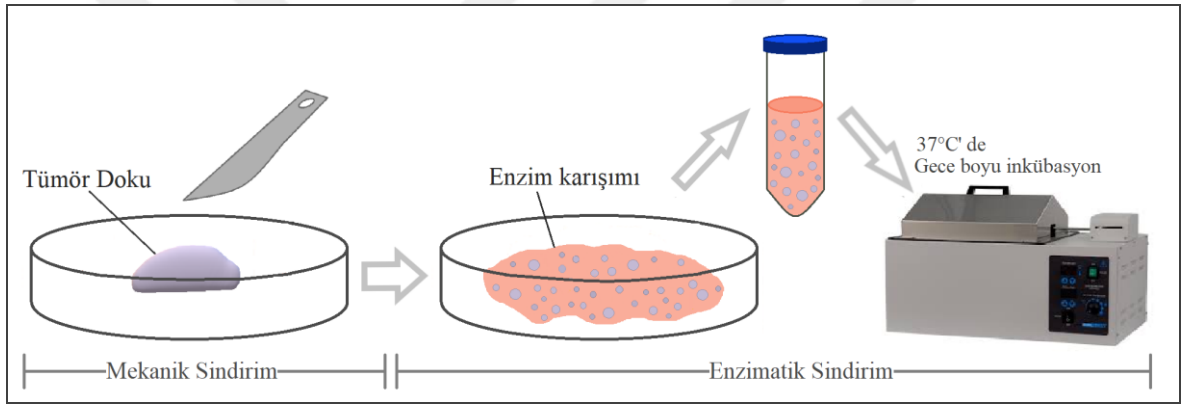
Çizelge 3. 1. IDC tanısı almış Vaka1 ve Vaka 2 hastalarının meme tümörlerinin histopatolojik özellikleri ve Bloom-Richardson derecelendirilmesi.

IDC Vaka 1 (Yaş:57)	IDC Vaka 2 (Yaş:42)
ER :%100 pozitif PR :%95 pozitif Ki67 :%11 pozitif	ER :%80 pozitif PR :%60 pozitif Ki67 :%10 pozitif
Bloom-Richardson Derecelendirme Sistemi	
Tübül formasyon: 2 Nükleer pleomorfizm:2 Mitotik indeks: 2 (12/10 BBA) Toplam skor: 6, Evre: II	Tübül formasyon: 2 Nükleer pleomorfizm:1 Mitotik indeks: 1 (2/10 BBA) Toplam skor: 4, Evre: I

Hücrelerin Pasajlanması: Hücrelerin bulunduğu kültür kabının yüzeyi Ca⁺² Mg⁺² içermeyen PBS ile yıkandıktan sonra kabin yüzeyini kaplayacak miktarda %0.25-Tripsin-EDTA eklendi. 37°C'de ~5 dakika inkübe edilerek kaldırılan hücreler, %10 FBS içeren DMEM/F-12 ile tripsin aktivitesi durduruldu ve hücre süspansiyonu falkon tüpe aktarıldı.

1600 rpm'de 5 dakika santrifüj edilip, supernatantın atılmasıyla tripsin uzaklaştırıldı. Hücre pelleti MKKH besiyeri ile homojenize edildi ve hücre süspansiyonundan alınan örnek, tripan mavisi ile 1:1 oranda karıştırılarak hücre sayım cihazında (BIO-RAD TC20) hücre sayımı yapıldı. MKKH'ler total hücre sayısına göre, MKKH besiyeri ile yeni kültür kaplarına ekildi.

Hücrelerin Dondurulması: Saklanacak olan hücreler ise hücre sayımı sonrasında tekrar santrifüj edildi. Hücre pelleti %38 FBS içeren DMEM/F-12 ile istenilen hacimde ile homojenize edilip kriyoviallere aktarıldı. DMSO (Dimetil sülfoksit) son aşamada yavaşça ilave edildi ve hücreler, içeriği tamamlanan dondurma solusyonu (%5 DMSO , %35 FBS, %60 DMEM/F-12) içerisinde, -152 °C soğutucuda (Sanyo MDF-1156, Japonya) dondurularak muhafaza edildi.



Çizim 3.1 Meme tümör dokudan MKKH izolasyon basamaklarının şematik gösterimi.

Çizelge 3. 2. MKKH'lerin çoğaltılmasında kullanılan besiyeri içeriği ve miktar/oran tablosu.

MKKH Besiyeri Bileşenleri	Miktar/Oran
DMEM/F12 (1:1) (Gibco)	1x
FBS (Gibco)	% 10
Pen/Strep (Capricorn)	% 1
Glutamaks (Gibco)	% 1
İnsülin (Sigma)	4µg/ml
Hidrokortizon (Sigma)	1µg/ml
EGF (Wisent)	10 ng/ml

3.2. Meme Kanseri Kök Hücresinin Karakterizasyonu

Meme tümör dokudan izole edilen hücrelerin, kanser kök hücre olarak tanımlanabilmesi için; akım sitometri analizi, ALDH testi ve mamosfer oluşturma deneylerini kapsayan bir dizi karakterizasyon çalışması yapıldı.

3.2.1. Akım Sitometri Analizi

Akım sitometri analizi, hücrelerin akışkan bir sıvı içindeki, sahip olduğu belirteçlerin özgül antikörlerle işaretlenerek karakterinin belirlenmesinde kullanılan bir tekniktir. Hücreler FITC (Fluoresan izotiyosiyonat), PE (R-Fikoeritrin) gibi florokromlarla işaretli antikör ile inkübe edilir. Floresan ışımaya yoğunluğuna bağlı olarak, süspansiyon halindeki hücrelerin aranan belirtecin pozitifliğine ve büyüklüğüne göre tek hücre düzeyinde kantitatif ölçüm yapan bir sisteme sahiptir.

İzole ettiğimiz V1-MKKH ve V2-MKKH'leri pasaj 3'e geldiklerinde; tripsin enzimi ile kaldırıldı, enzim-inaktivasyon işlemini takiben hücreler sayıldı. Her belirteç için 2×10^5 hücre, polikarbon akım sitometri tüplerine (12x75mm polikarbon) aktarıldı. Hücreler yıkama solüsyonu ile yıkandıktan sonra, belirlenen yüzey belirteçlerine özel fluoresan FITC ve PE – konjuge; CD44, CD73, CD90, CD105, CD13, CD29, CD140b, CD24, anti-HLA DR, anti-sitokeratin, CD45, CD 34, CD15 ve CD14 insan monoklonal antikörleri ile oda ısısında (karanlıkta) 45dakika süreyle inkübe edildi. Süre sonunda tekrar yıkama solüsyonu ilave edildi ve 300g'de 5 dakika süreyle santrifüj edildi. Supernatan atılarak yıkama işlemi tamamlanan hücreler, 350 µl yıkama solüsyonu ile tekrar homojenize edilerek analize hazır hale getirildi. FACS Calibur (BD Biosciences) akım sitometri cihazında okutuldu ve Cell Quest programında (BD Biosciences) analiz işlemleri gerçekleştirildi.

3.2.2. ALDH Testi

İzole edilen V1-MKKH ve V2-MKKH'lerin ALDH enzim aktivite düzeyi, ALDH test kiti (StemCell Technologies-Aldefluor™ Assay Kit, ABD) kullanılarak, üreticinin sunduğu talimatlara göre analiz edildi. Kısaca; MKKH'ler tripsin enzimi ile kaldırıldı ve tek hücre süspansiyonu haline getirildi. Eş zamanlı olarak, periferik kandan insan lökosit hücreleri (WB) elde edildi ve kontrol grubu olarak ALDH testine dahil edildi. Hücre sayımı yapıldı ve 3×10^6 hücre ALDH analizi için ayrılıp, 250g'de 5 dakika santrifüj edildi. Supernatant uzaklaştırıldı ve hücreler 6 ml test tamponu ile homojenize edildi. Propidyum iyodür (PI), 7-aktinoaminomisin-D (7-AAD), dietilaminobenzaldehit (DEAB), verapamil, ALDH/CD133 ve ALDH parametreleri için akım sitometri tüpleri hazırlandı. Hazırlanan hücre süspansiyonu, her bir tüpe 500µl (5×10^5 hücre) olacak şekilde dağıtıldı. DEAB tüpüne 5µl DEAB reaktifi ilave edilip iyice karıştırıldı. PI ve 7-AAD haricindeki diğer tüplere 2.5 µl Aldefluor substratı eklenip iyice karıştırıldı. Bütün tüpler; karanlıkta ve 37 °C'de 45 dakika süreyle inkübe edildi. Süre sonunda hücreler, 250xg'de 5 dakika süreyle

santrifüj edildi. Supernatant atılıp 300 µl test tamponu ile tekrar homojenize edildi. 5'er µl CD133, PI ve 7-AAD probları yine CD133, PI ve 7-AAD tüplerine ilave edildip karıştırıldı. Karanlıkta ve 4° C'de, 20 dakika süreyle inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda 250×g'de 5 dakika süreyle santrifüj edildi. Supernatant uzaklaştırıldı ve hücreler 500µl Aldefluor test tamponu ile tekrar homojenize edilerek analize hazır hale getirildi. FACS Calibur (BD Biosciences) akım sitometri cihazında okutuldu ve Cell Quest programında (BD Biosciences) analiz işlemleri gerçekleştirildi. MKKH'lerin gösterdiği ALDH aktivitesi, negatif kontrol olan DEAB ve verapamil örnekleri ile karşılaştırılarak değerlendirildi.

3.2.3. Mamosfer Oluşturma Deneyi

Kanser kök hücreleri; serumsuz süspansiyon kültür ortamında ve belirli büyüme faktörleri ile kültüre edildiklerinde tümörosfer (Meme kanseri kök hücresi için mamosfer) oluşturma özelliğiyle bilinmektedir. Bu doğrultuda sferoid oluşturma özelliği kanser kök hücrelerinin tanımlanmasında bir kriter olarak kabul edilmektedir.

Mamosfer oluşturma deneyinde; izolasyonu yapılan V1-MKKH ve V2-MKKH'lerinin süspansiyon kültürü yapılarak mamosfer oluşturabilme yetkinlikleri incelendi (Lombardo Y ve diğ. 2015) Deney öncesinde hücrelerin ekileceği 6 kuyucuklu plakalar (Falcon, ABD) %3 agar ile kaplandı. Hücreler, 7×10^3 hücre/cm² olacak şekilde kuyucuklara ekildi ve mamosfer besiyeri (Çizelge 3.3) ile 7 gün boyunca kültüre edildi. Jenerasyon 1 mamosferleri, kültürün 7.günde faz-kontrast mikroskop ile görüntüleme yapılarak incelendi, mamosfer sayımı yapıldı ve $MFE(\%) = \frac{\text{Mamosfer Sayısı} > 40\mu\text{m}}{\text{Ekilen Hücre Sayısı}} \times 100$ formülü ile MFE (Mamosfer Oluşturma Verimliliği) değeri hesaplandı.

Çizelge 3. 3. MKKH'lerin süspansiyon kültüründe kullanılan mamosfer besiyeri içeriği ve miktar/oran tablosu.

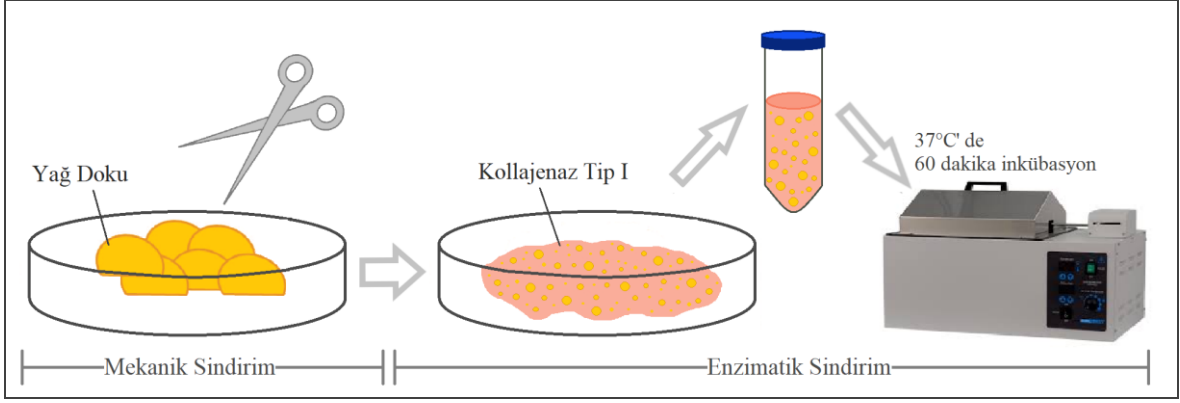
Mamosfer besiyeri	Miktar/Oran
DMEM/F12 (1:1) (Gibco)	1x
Pen/Strep (Capricorn)	% 1
Glutamaks(Gibco)	% 1
Hidrokortizon (Sigma)	1µg/ml
İnsülin (Sigma)	4µg/ml
B-27 (Gibco)	1x
EGF(Wisent)	20 ng/ml
FGF (Wisent)	20 ng/ml
Heparin (Sigma)	4µg/ml

Mamosferlerin Pasajlanması; MFE değeri hesaplanan jenerasyon 1 hücreleri falkon tüpe aktarıldı ve 120×g'de 10 dakika süreyle santrifüj edildi. Supernatant atılıp, mamosfer pellete 500µl tripsin enzimi eklenip pipetaj yapıldı ve 37 ° C'de 3 dakika süreyle inkübe edildi. Hücre süspansiyonu pipetajlanarak, mamosferler tek hücre süspansiyonu haline getirilip, 500 µl FBS ilave edilerek enzimatik reaksiyon durduruldu. Hücre süspansiyonu 500×g'de 5 dakika santrifüj edilip, supernatant uzaklaştırıldı. Hücre pelleti 500µl mamosfer besiyeri ile homojenize edilip hücre sayımı yapıldı. Hücreler; yine agar kaplı 6 kuyucuklu plakalara 7×10³ hücre/cm² olacak şekilde ekimi yapıldı.

Jenerasyon 2 mamosferleri kültürün 7. gününde, faz-kontrast mikroskop ile görüntüleme yapılarak incelendi ve mamosfer sayımı yapılarak MFE(%) değeri hesaplandı. V1-MKKH ve V2-MKKH'lerinin; jenerasyon 1 ve jenerasyon 2 MFE değerleri karşılaştırmalı olarak incelendi.

3.3. Meme Yağ Dokudan Mezenkimal Kök Hücre İzolasyonu ve Hücre Kültürü

İnvaziv duktal karsinoma tanısı almış iki hastanın (MKKH'lerin ede edildiği aynı vericiler), mastektomi ameliyatı ile çıkarılan tümör çevre yağ dokusundan ~12-15 mm³ doku parçası hücre izolasyonu yapılmak üzere alındı. Alınan yağ doku, %5 Penisilin-Streptomisin (Pen/Strep- antibiyotik), %10 FBS eklentili DMEM-LG içerisinde laboratuvar birimimize getirildi. Yağ doku; Steril Laminar flow kabin (Safe Fast Elite 2150, İtalya) içerisinde, 90 mm çapında steril petrilere alındı ve burada %5 Pen/Strep eklentili 10 ml HBSS ile iki defa yıkanarak kan doku ve kan damarları uzaklaştırıldı. Yağ doku yeni bir petriye alındı, pens ve makas yardımıyla mümkün olduğu kadar ufak parçalara ayrıldı. Parçalara ayrılmış yağ doku üzerine 4 ml kollajenaz I enzimi ilave edildi ve petrideki doku/enzim karışımının tamamı 50 ml falkon tüpe aktarıldı. Yağ doku/enzim karışımı 37°C ayarlı çalkalamalı su banyosu cihazında 1 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda 7 ml inaktivasyon besiyeri (%10 FBS'li DMEM-LG) ilave edilerek enzimatik reaksiyon durduruldu. Hücre/doku süspansiyonu 70 µm süzgeçten geçirilerek, atık doku parçaları uzaklaştırıldı. Hücre süspansiyonu, 1600 rpm'de 5 dakika süreyle santrifüj edildi ve supernatant atılarak enzim uzaklaştırıldı. Hücre peleti iYD-MKH besiyeri ile homojenize edilerek T-25 hücre kültür kabına (SPL Biosciences, Kore) ekildi ve 37 °C, %5 CO₂ koşullarında kültüre edildi. Hücreler, kültür kabı yüzeyini %70-80 oranında kaplayıncaya kadar çoğaltıldı. Hücre pasajlama ve dondurma işlemleri MKKH'lerin kültüründe anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi.



Çizim 3.2. Meme yağ dokudan iYD-MKH izolasyon basamaklarının şematik gösterimi.

Çizelge 3. 4. iYD-MKH'lerin çoğaltılmasında kullanılan besiyeri içeriği ve miktar/oran tablosu.

MKH Besiyeri	Miktar/Oran
DMEM/F12 (1:1) (Gibco)	1x
Pen/Strep (Capricorn)	% 1
Glutamaks (Gibco)	% 1
EGF (Wisent)	10 ng/ml

3.4. İnsan Yağ Doku Kaynaklı Mezenimal Kök Hücrelerin Karakterizasyonu

Yağ dokudan elde edilen stromal hücreler, akım sitometri analizi ve farklılaştırma deneyleri kapsamında MKH karakterizasyonu gerçekleştirildi.

3.4.1. Akım Sitometrik Analiz

İzole ettiğimiz V1-iYD-KKH ve V2-iYD-KKH'leri pasaj 3'e geldiklerinde; tripsin enzimi ile kaldırıldı, enzim-inaktivasyon işlemi takiben hücreler sayıldı. Her belirteç için 2×10^5 hücre, akım sitometri tüplerine aktarıldı. Hücreler yıkama solüsyonu ile yıkandıktan sonra, belirlenen yüzey belirteçlerine özel fluoresan FITC ve PE- konjuge; CD73, CD90, CD105, CD44CD13, CD29, CD140b, CD24, anti-HLA- DR, anti-sitokeratin, CD45, CD 34, CD15 ve CD14 insan monoklonal antikorları ile oda ısısında (karanlıkta) 45dakika süreyle inkübe edildi. Süre sonunda tekrar yıkama solüsyonu ilave edildi ve 300g'de 5 dakika süreyle santrifüj edildi. Supernatan atılarak yıkama işlemi tamamlanan hücreler, 350 µl yıkama solüsyonu ile tekrar homojenize edilerek analize hazır hale getirildi. FACS Calibur (BD Biosciences) akım sitometri cihazında okutuldu ve Cell Quest programında (BD Biosciences) analiz işlemleri gerçekleştirildi

3.4.2. Farklılaştırma Deneyleri

İzole edilen V1-iYD-MKH ve V2-iYD-MKH'ler pasaj 3'e geldiklerinde; mezenkimal kök hücre karakterinin minimum kriterlerinden olan, adipojenik ve osteojenik hücelere farklılaşabilme yeteneği, farklılaştırma deneyleri ile incelendi. iYD-MKH'ler 1×10^5 /kuyu hücre olacak şekilde 6 kuyucuklu kültür kaplarında (Falcon, ABD), cam lameller üzerine ekildi ve farklılaşma deneyi için gereken doluluğa ulaşıncaya kadar MKH besiyerinde çoğaltıldı.

Adipojenik Farklılaştırma; Hücreler %80 doluluğa ulaştığında, kültür ortamı adipojenik farklılaştırma besiyeri [DMEM-LG (Capricorn, Almanya), %10 FBS, 1 μ M deksametazon (Sigma, ABD), 200 μ M indometazin (Sigma, ABD), 500 μ M izobutilmetilksantin (IBMX, Sigma, ABD) ve 4 μ g/ml insülin (Sigma, ABD)] ile değiştirildi. Kontrol grubu hücrelerinin kültürü ise MKH besiyeri ile sürdürüldü. Her üç günde bir besiyeri değiştirildi ve üç hafta süresince hücreler gözlemlendi. Süre sonunda besiyeri uzaklaştırılıp, lameller PBS ile 3 kez yıkandı ve takiben; %4 paraformaldehit solusyonunda 20 dakika (4°C'de), izopropanolde (%60) 5 dakika süreyle hücreler fikse edildi. Kontrol grubu hücreler ise -20°C'de metanol ile 10 dakika süreyle fikse edildi.

Adipojenik boyama için; izopropanol (%99) ile Oil Red O solusyonu hazırlandı. Fikse edilen hücreler, hazırlanan Oil Red O boya solusyonunda 50 dakika süreyle boyamaya bırakıldı. Boyanmış lipid damlacıkları ve hücre morfolojisindeki değişimler faz-kontrast mikroskobu (Olympus IX71, Japonya) altında değerlendirilerek, hücrelerin adipojenik farklılaşma düzeyleri incelendi.

Osteojenik Farklılaştırma; Hücreler %90 doluluğa ulaştığında, kültür ortamı adipojenik farklılaştırma besiyeri [DMEM-LG (Capricorn, Almanya), %10 FBS, %1 Pen/Strep, 10^{-8} M deksametazon, 10 nM β -gliserofosfat, ve 50 μ m/ml askorbat-2-fosfat] ile değiştirildi. Kontrol grubu hücrelerinin kültürü ise MKH besiyeri ile sürdürüldü. Her üç günde bir besiyeri değiştirildi ve üç hafta süresince hücreler gözlemlendi. Süre sonunda besiyeri uzaklaştırılıp, lameller PBS ile 3 kez yıkandı ve takiben; %70 etanolde, oda sıcaklığında 5 dakika süreyle hücreler fikse edildi.

Osteojenik boyama için, distile su ile *Alizarin Red-S* boya solusyonu (%0,02) hazırlandı. Boya solusyonunun pH değeri, hidrojen peroksit eklenerek pH 4.1-4.3 olarak ayarlandı. Örnekler PBS ile yıkandıktan sonra, hazırlanmış *Alizarin Red-S* Ali boya solusyonunda 45-60 saniye süreyle boyamaya bırakılıp, tekrar PBS ile yıkama yapıldı.

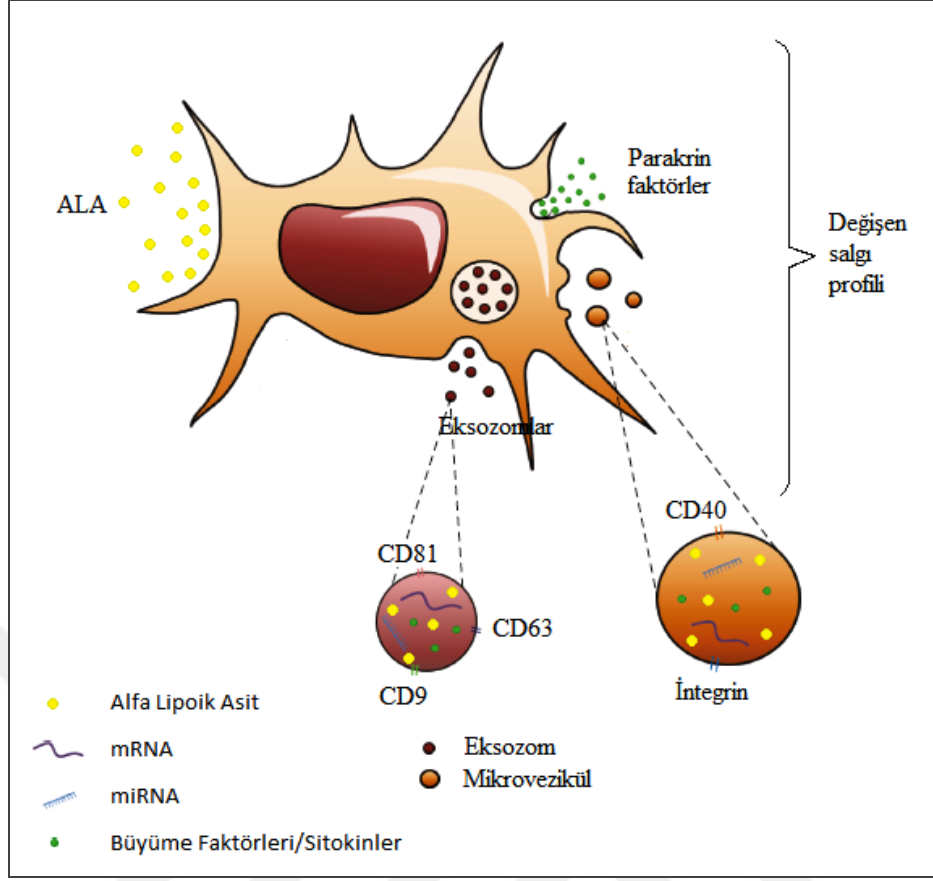
Kalsifiye nodüller ve hücre morfolojisindeki değişimler faz-kontrast mikroskobu (Olympus IX71, Japonya) altında değerlendirilerek, hücrelerin adipojenik farklılaşma düzeyleri incelendi.

3.5. WST-1 Canlılık Deneyi ile Alfa Lipoik Asit'in Doz Standardizasyonu

Stabil tetrazolyum tuzu olan WST-1'in hücre proliferasyonu/canlılığı ile doğru orantılı olarak formazan kristallerine parçalanması ile kültür ortamındaki renk değişiminin optik yoğunluk (OD) ölçümüne dayanan kalorimetrik bir testtir. ALA eklentisi ile kültüre edilecek olan iYD-MKH'ler için optimum dozun belirlenmesinin yanı sıra, aynı dozda ALA'ya maruz bırakılan iYD-MKH ve MKKH'lerin gösterdikleri canlılık profillerini karşılaştırmayı amaçladık. Hücreler, bir kuyucuğa 200µl besiyeri 1×10^4 /kuyucuk hücre ve her konsantrasyon için üçer tekrarlı olacak şekilde 96-kuyucuklu plakalara ekildi. V1 iYD-MKH, V1 MKKH, V2 iYD-MKH, V2 MKKH'ler; 10, 20, 30, 40, 50 µM ve 1, 2, 3, 4, 5 mM ALA ile 3 gün boyunca kültüre edildi. ALA çözücüsü olan etanol, negatif kontrol olarak; en yüksek ALA konsantrasyonundaki (5mM) etanol oranına (%0,5) göre ayarlandı. 3.Gün besiyerleri %10 WST-1 reaktifi (Roche Diagnostics, Almanya) içeren besiyeri ile değiştirildi ve 37 °C ve %5 CO₂ koşullarında 2 saat inkübe edildi. Örneklerin absorbans değerleri, mikropilaka okuyucuda (Versamax, ABD) 450 nm dalga boyunda ölçüldü.

3.6. Mezenkimal Kök Hücrelerin Alfa Lipoik Asit ile Kültürü

iYD-MKH'ler, WST-1 canlılık deneyi ile belirlenen uygun konsantrasyonda ALA ile 2 pasaj (~10-15 gün) boyunca kültüre edildi. Bu süreçte MKH'lerin salgı profilinin değişimiyle birlikte, bileşenleri değişmiş ve ALA ile zenginleşmiş eksozom/mikrovezikül sekresyonu elde etmek amaçlandı (Çizim 3.6). ALA eklentili olarak kültüre edilen MKH'ler, 'iYD-MKH_{ALA}' olarak isimlendirildi.



Çizim 3.3. ALA ile kültüre edilen iYD-MKH'lerin eksozom/mikrovezikülleri kapsayan salgı profilindeki değişimin şematik gösterimi.

3.7. Mezenkimal Kök Hücrelerden Eksozom İzolasyonu ve Karakterizasyonu

Eksozom izolasyonunda; yüksek verim ve saflıkta eksozom izolasyonu sağlayan diferansiye ultrasantrifüleme tekniği kullanıldı. Çalışma prensibi; MKH kültüründen alınan besiyeri, yüksek devirde santrifüj ile merkez kaç kuvvetine maruz bırakılarak; içeriğindeki eksozomların, sahip oldukları yoğunluk, şekil ve boyut farkıyla; büyük biyopartiküller, proteinler ve protein/RNA agregatları gibi veziküler olmayan parçacıklardan ayrıştırılması temeline dayanmaktadır.

iYD-MKH ve iYD-MKH_{ALA} kültür kapları %80 doluluğa ulaştıktan sonra besi ortamları döküldü ve PBS ile iki kez yıkanarak FBS kaynaklı eksozom ve mikroveziküller uzaklaştırıldı. MKH'ler FBS içermeyen besi ortamı:

- iYD-MKH → %1 Pen/Strep ve %1 glutamaks eklentili DMEM/F12
- iYD-MKH_{ALA} →, % Pen/Strep, %1 glutamaks ve 20µM ALA eklentili DMEM/F12

ile 48 saat kültüre edildi. Süre sonunda MKH kültür besiyerleri falkon tüplerde toplandı. Bu aşamada, ön saflaştırma işlemini ve takiben ultrasantrifüjle devam eden bir eksozom saflaştırma protokolü izlendi (Lasser C ve diğ. 2012). Toplanan MKH kültür besiyerleri 300 g'de 10 dakika süreyle santrifüj edilip, supernatant yeni tüplere aktarılıp ölü hücreler uzaklaştırıldı. Takiben 15.000 g'de 20 dakika süreyle santrifüj edilip, supernatant yeni tüplere aktararak, hücresel atıklar uzaklaştırıldı. Supernatant 0.22 µm por boyutlu filtreden (BIOFIL, Çin) geçirilerek, 220 nm'den büyük mikroveziküller uzaklaştırıldı. Ön saflaştırma işlemleri tamamlanan hücre besiyerleri; CS150FNX (Hitachi Himac, Japonya) ultrasantrifüj cihazı ve S50A model rotor kullanılarak 4°C'de, 120.000 g'de ve 70 dakika süreyle ultrasantrifüj işlemi gerçekleştirildi. Supernatant uzaklaştırıldı ve pellet haldeki eksozom az miktarda (~100-600 µl) PBS ile homojenize edildi. V1-iYD-MKH, V1-iYD-MKH_{ALA}, V2-iYD-MKH ve V2-iYD-MKH_{ALA} hücrelerinden elde edilen eksozomlar sırasıyla; V1-iYD-MKH-Ekso, V1-iYD-MKH_{ALA}-Ekso, V2-iYD-MKH-Ekso ve V2-iYD-MKH_{ALA}-Ekso olarak isimlendirildi.

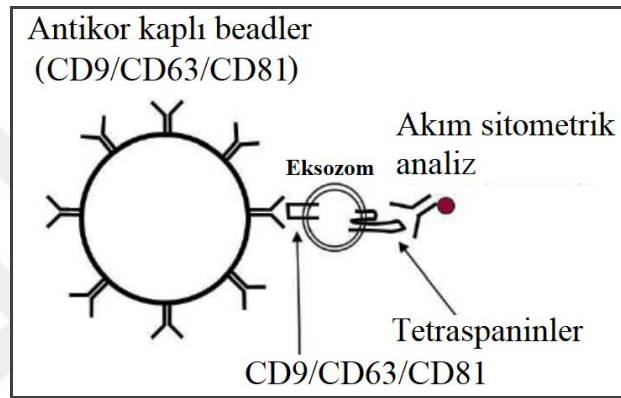
Kullanımı ileri bir tarihte gerçekleşecek olan; MKH kültür besiyerleri ve izole edilen eksozomlar -80°C soğutucuda (Sanyo MDF-U5386S, Japonya) muhafaza edildi.

3.7.1. Eksozomların Akım Sitometri ile İmmünofenotipik Karakterizasyonu

İzolasyonu yapılmış V1-iYD-MKH Ekso, V1-iYD-MKH_{ALA} Ekso, V2-iYD-MKH Ekso ve V2-iYD-MKH_{ALA} Ekso total eksozomlarının bir kısmı, eksozom yüzey belirteçleri olarak bilinen CD 9, CD 63 ve CD 81 fenotiplerinin incelenmesi üzerine akım sitometri analizine alındı.

Test tamponu için %0.1 BSA (Sığır serum albumin) içeren PBS hazırlandı ve 0.22 µm filtreden geçirildi. Her eksozom örneği için; CD 9, CD 63, CD 81 ve izotip kontrol olmak üzere 4 tüp hazırlandı. CD 9 (Invitrogen, Litvanya), CD 63 (Invitrogen, Litvanya), CD 81 (Invitrogen, Litvanya) 'Dynabeads' (Manyetik boncuk) solusyonlarından 20 µl, hazırlanmış tüplere konuldu. Test tamponu ve manyetik ayırıcı (StemCell Technologies) aracılığıyla manyetik boncuklara yıkama işlemi yapıldı. Her bir belirteç için 10 µl eksozom örneği tüplere dağıtıldı. Üzerine 90 µl test tamponu ilave edildi ve orbital çalkalayıcıda (Biosan) +4°C'de gece boyu inkübe edildi ve bu süreçte eksozomlar ile antikörlerle kaplı olan manyetik boncukların kompleks oluşturması sağlandı (Çizim 3.5). Süre sonunda, tüplere 1'er ml test tamponu ilave edilip vortekslendi. Her tüp sırayla manyetik ayırıcıya yerleştirildi ve 2 dakika süreyle eksozomların manyetik boncuklar ile tüp yüzeyine

tutunması sağlandı. Test tamponu uzaklaştırılarak, yıkama işlemi tamamlanan eksozom+manyetik boncuk kompleksleri test tamponuyla yeniden homojenize edildi. Uygun miktarlarda CD9 (BD Biosciences), CD81 (BD Biosciences), CD63 (BD Biosciences) ve IgG1 (BD Biosciences) antikorları ilave edildi ve orbital çalkalayıcı üzerinde, oda ısısında, 45 dakika süreyle inkübe edildi. Antikorlar ile boyanan eksozom+manyetik boncuk komplekslerine; test tamponu ve manyetik ayırıcı aracılığıyla bir kez yıkama işlemi yapıldı. Test tamponu ile yeniden homojenize edilen eksozomlar; FACS Calibur (BD Biosciences) cihazında okutuldu, Cell Quest programında (BD Biosciences) analiz işlemleri gerçekleştirildi.



Çizim 3.4. İmmünofenotipleme ile eksozom karakterizasyonunun çalışma prensibi (Lasser ve diğ. 2012).

3.7.2. Mikro-BCA Testi ile Eksozom Miktar Tayini

Bikinkoninik asit (BCA) yöntemi, alkali çözeltideki proteinlerin 'Biüret' reaktifi ile Cu^{+2} 'den Cu^{+1} 'e indirgenmesi ve protein miktarıyla orantılı olarak, yeşilden mora dönüşen renk değişiminin spektral ölçümüne dayanan kalorimetrik bir testtir.

V1-iYD-MKH, V1-iYD-MKH_{ALA}, V2-iYD-MKH ve V2-iYD-MKH_{ALA} hücre besiyerlerinden elde edilen eksozomların miktar tayini, ticari 'SMART™ micro BCA Protein Assay Kit'(Intron Biotechnology, Kore) ile, üreticinin sunduğu talimatlara uyularak gerçekleştirildi. Kısaca; 96-kuyucuklu plakaya; standart dilüsyonlar ve örnekler yüklendi. Üzerine (1:1) oranda 'Working' solusyon ilave edilip, 37°C ayarlı çalkalamalı inkübatörde (Finepcr-combi-SV120, Kore) 2 saat süreyle inkübe edildi. Eksozom örnekleri, mikrolaka okuyucuda (Versamax, ABD) 562 nm dalga boyunda okutularak kromojenik reaksiyon ölçümü yapıldı. Örneklerin protein konsantrasyonları; ölçülen absorbans değerleri, standart eğrisi ile karşılaştırılarak değerlendirildi.

3.8. Deney Gruplarının Oluşturulması

Deney grupları, Çizelge 3.5'te belirtilen kısaltmalar ile isimlendirildi ve Çizim 3.6'da şematik olarak gösterildi. V1-MKKH ve V2-MKKH'ler 6 kuyucuklu plakalara 2×10^5 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekildi. MKKH/MKH ikili kültür (ko-kültür) grupları için; V1-iYD-MKH, V1-iYD-MKH_{ALA}, V2-iYD-MKH ve V2-iYD-MKH_{ALA}'ler de 4×10^5 hücre/kuyucuk olacak şekilde 0,4µm por boyutlu ayırıcı membranlar (Becton Dickinson, ABD) üzerine ekildi. MKH deney grupları için ise; V1-iYD-MKH, V1-iYD-MKH_{ALA}, V2-iYD-MKH ve V2-iYD-MKH_{ALA}'ler 6 kuyucuklu plakalara 2×10^5 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekildi. Bir gün süreyle ekilen hücrelerin yapışması beklendi. Deney gruplarının besiyeri içerikleri ve miktarları Çizelge 3.6'da belirtildiği gibi hazırlandı. ALA grupları için; 20µM ve 3mM konsantrasyonlarında ALA içeren besiyerleri hazırlandı. Eksozom deney grupları için; Micro-BCA testiyle eksozom konsantrasyonu belirlendikten sonra 50µg Eksozom/ml olacak şekilde besiyeri hazırlandı. Hücreler yapıştıktan sonra grupların besiyerleri Çizelge 3.6'da belirtilen şekilde değiştirildi ve ko- kültür grubu olan kuyucuklara MKH ekili ara membranlar yerleştirilerek deney kuruldu. Deney süresi üç gün olarak belirlendi.

Çizelge 3. 5. Grup isimlerinde geçen kısaltmalar ve açık isimleri.

Kısaltmalar	Açık İsim
V1 / V2	Vaka 1 / Vaka 2
MKKH	Meme Kanseri Kök Hücresi
iYD-MKH	İnsan Yağ Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre
iYD-MKH _{ALA}	Alfa Lipoik Asit ile Uyarılmış İnsan Yağ Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre
iYD-MKH Ekso	İnsan Yağ Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre Eksozomları
iYD-MKH _{ALA} Ekso	Alfa Lipoik Asit ile Uyarılmış İnsan Yağ Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre Eksozomları

MKKH (Kontrol) Grubu: MKKH'lerin standart olarak kültüre edildiği gruptur. MKKH deney gruplarının kontrol grubudur.

MKKH+20 μ M ALA Grubu: MKKH'lerin; MKH'ler için güvenli doz olarak belirlenen 20 μ M ALA ile kültüre edildiği deney grubudur. Bu grup; aynı güvenli dozda ALA'nın MKKH ve iYD-MKH'ler üzerinde yarattığı farklı etkilerin incelenmesi amacıyla oluşturulmuştur.

MKKH+iYD-MKH Grubu: MKKH'lerin, iYD-MKH'ler ile 1:2 oranda indirek ko-kültürünün yapıldığı deney grubudur. Bu grup ile; MKH'lerin MKKH üzerine olan etkilerinin incelenmesinin yanı sıra; MKKH+ iYD-MKH_{ALA} grubunun da kontrolü niteliğindedir.

MKKH+iYD-MKH_{ALA} Grubu: MKKH'lerin, iYD-MKH_{ALA}'ler ile 1:2 oranda indirek ko-kültürünün yapıldığı deney grubudur. Bu grup; ALA ile uyarılmış olan iYD-MKH_{ALA}'lerin MKKH üzerine olan etkileri incelenmesi amacıyla oluşturulmuştur.

MKKH+iYD-MKH Ekso Grubu: MKKH'lerin 50 μ g/ml oranda iYD-MKH eksozomları ile kültüre edildiği deney grubudur. Bu grup iYD-MKH eksozomlarının, MKKH üzerine olan etkilerinin incelenmesinin yanı sıra; MKKH+ iYD-MKH_{ALA} Ekso grubunun da kontrolü niteliğindedir.

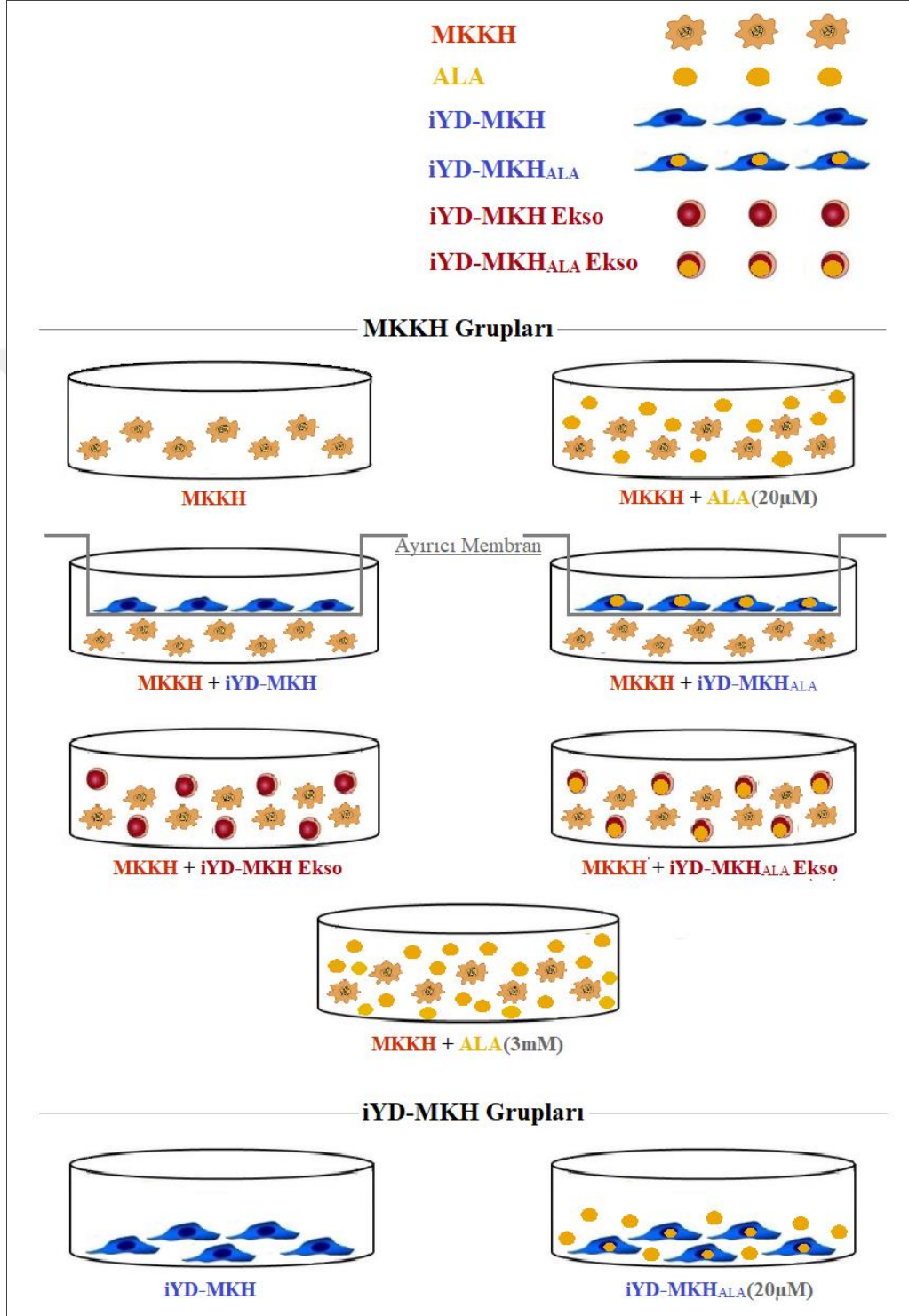
MKKH+iYD-MKH_{ALA} Ekso Grubu: MKKH'lerin 50 μ g/ml oranda iYD-MKH_{ALA} eksozomları ile kültüre edildiği deney grubudur. Bu grup; ALA ile uyarılmış olan iYD-MKH_{ALA} eksozomlarının MKKH üzerine olan etkilerinin incelenmesi amacıyla oluşturulmuştur.

MKKH+3mM ALA Grubu: MKKH'lerin; canlılığı azaltıcı dozu olarak belirlenen 3mM ALA ile kültüre edildiği deney grubudur.

iYD-MKH (Kontrol) Grubu: iYD-MKH'lerin standart olarak kültüre edildiği gruptur. Bu grup MKKH+iYD-MKH ve MKKH+iYD-MKH Ekso gruplarının analiz sonuçlarının değerlendirilmesi açısından önem taşımaktadır. Ayrıca, iYD-MKH_{ALA} deney grubunun kontrol grubudur.

iYD-MKH_{ALA} (+20 μ M ALA) Grubu: iYD-MKH'lerin güvenli doz olarak belirlenen 20 μ M ALA ile kültüre edildiği deney grubudur. Bu grup, MKKH+iYD-MKH_{ALA} ve MKKH+iYD-MKH_{ALA} Ekso gruplarının analiz sonuçlarının değerlendirilmesi açısından

da önem taşımaktadır. Ayrıca, güvenli dozda ALA'nın iYD-MKH'ler üzerine etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.



Çizim 3.5. Deney gruplarının şematik gösterimi.

Çizelge 3. 6. Deney grupları ve besiyeri bileşenleri.

Deney Grupları	Besiyeri Bileşenleri
MKKH (Kontrol)	%10 FBS, %1 Pen/Strep, DMEM/F12
MKKH+20 μ M ALA	%10 FBS, %1 Pen/Strep, 20 μ M ALA, DMEM/F12
MKKH+ iYD-MKH ko-kültür	%10 FBS, %1 Pen/Strep, DMEM/F12
MKKH+ iYD-MKH _{ALA} ko-kültür	%10 FBS, %1 Pen/Strep, DMEM/F12
MKKH+ iYD-MKH Ekso	%10 FBS, %1 Pen/Strep, DMEM/F12, 50 μ g/ml iYD-MKH Eksozomu
MKKH+ iYD-MKH _{ALA} Ekso	%10 FBS, %1 Pen/Strep, DMEM/F12, 50 μ g/ml iYD-MKH _{ALA} Eksozomu
MKKH+3mM ALA	%10 FBS, %1 Pen/Strep, 3 mM ALA, DMEM/F12
iYD-MKH	%10 FBS, %1 Pen/Strep, DMEM/F12
iYD-MKH _{ALA}	%10 FBS, %1 Pen/Strep, 20 μ M ALA, DMEM/F12,

3.9. Gen Ekspresyon Analizi

Gen ekspresyonu analizi için total ribonükleik asit (RNA) izolasyonu, komplementer deoksiribonükleik asit (cDNA) sentezi ve kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu analizini kapsayan bir dizi çalışma gerçekleştirildi.

3.9.1. Total RNA İzolasyonu

Total RNA gelişmiş yapılı canlı hücresinin %1.1 kadarını kapsadığı bilinmektedir. Örnek olarak tipik bir memeli hücresi 10-15 μ g total RNA içermektedir (Sarıkaya A, 2008). Bütünlüğü korunmuş ve yüksek saflıkta gerçekleştirilen RNA izolasyonu gen

anlatımı çalışmalarının oldukça önemli aşamalarından biridir. Çalışmanın gen ekspresyonu analizi için öncelikle total RNA izolasyonu ve takiben cDNA sentezi gerçekleştirildi.

Ön Hazırlık: Deney sonunda (3.gün) hücreler tripsin enzimiyle kaldırıldı ve her bir deney grubu için $\sim 4 \times 10^5$ hücre ependora alındı. Hücre süspansiyonları santrifüj edildi (1600 rpm/5 dk) supernatant atılıp, 1000 μ l PBS ile homojenize edildi. Hücre süspansiyonu tekrar santrifüj edildi (1600 rpm/5 dk) ve supernatant atıldı.

RNA izolasyon işlemi ticari 'GenJET RNA Purification Kit'(Thermo Scientific, Litvanya) kit ile, üreticinin sunduğu protokole uygun olarak gerçekleştirildi. Kısaca; Peletler 200 μ l PBS ile homojenize edildi ve üzerine 600 μ l lizis tamponu ilave edilip karıştırıldı (vorteks, pipetaj). 350 μ l etanol ilave edildi, karıştırıldı ve filtrelili tüplere aktarıldı. 12000 rpm'de 1 dakika süreyle santrifüj edildi. Filtreden süzülen alt sıvı döküldü, filtreler yeni tüplere aktarılıp 3 kez yıkama işlemi yapıldı. Son aşamada; filtreler ependorf tüplere aktarıldı, üzerine 50 μ l su eklendi. 1 dakika bekledikten sonra 12000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilerek RNA saf bir şekilde ependorf tüpe toplandı. Elde edilen RNA'ların konsantrasyonları picodrop spektrofotometre ile ölçüldü Artan total RNA örnekleri -80°C soğutucuda (Sanyo MDF-U5386S, Japonya) muhafaza edildi.

3.9.2. cDNA Sentezi

cDNA sentezi ticari kit (RevertAid First Standard cDNA Synthesis Kit, Thermo Scientific, Litvanya) kullanılarak, üreticinin sunduğu protokole uyularak gerçekleştirildi. Total RNA örnekleri 1'er μ g olacak şekilde PCR tüplerine aktarıldı, 1 μ l Oligo DT primer ve uygun saflıkta su, toplam hacim 8.4 μ l olacak şekilde eklendi. 65°C 'de 10 dakika süreyle PCR cihazında (TaKaRa Biotechnology, Japonya) inkübe edildi. Bu süreçte primerlerin ısı ile denatüre olan RNA örneklerine bağlanması sağlandı. Süre sonunda örnekler buz üzerine alındı ve uygun miktarlarda; reaksiyon tamponu, ters transkriptaz enzimi, dNTP karışımı ve Rnase inhibitörü eklendi. Tekrar PCR cihazına alınan örnekler, 55°C 'de 30 dakika uzama reaksiyonu ve hemen ardından 85°C 'de 5 dakika süreyle enzimin inaktivasyonu sağlandı. Sentezlenen cDNA örnekleri gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu kurulancaya kadar -20°C 'de muhafaza edildi.

3.9.3. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR) yöntemiyle deney gruplarında; TGF- β , SNAIL1, TWIST, CDH1, MMP-2, MMP-9, CASP-3, CASP-7, BCL-2 ve BAX genlerinin transkripsiyon düzeyinde ekspresyon/ regülasyon

mekanizmaları incelendi. Her örnek için uygun miktarlarda cDNA, master mix (RealQ Plus Master Mix Green, Ampliqon) ve sudan oluşan karışım hazırlandı. Primerler ve hazırlanmış olan cDNA karışımı 96 kuyucuklu PCR plakalarına yüklendi. Kurulan reaksiyonlar sonrasında, gerçek zamanlı PCR (LightCycler-II 480, Roche, Mannheim, Almanya) cihazında, ilgili genlerin çoğalmaları takip edildi ve elde edilen Cp sonuçları doğrultusunda referans gene (HPRT1) oranlanarak göreceli olarak analizleri yapıldı. Kullanılan primerlerin baz dizilimleri Çizelge 3.4’te gösterilmiştir.

Çizelge 3. 7. Gen ekspresyon analizi yapılan genler ve primerlerinin baz dizilimleri.

Gen	Açık İsim	Primer Baz Dizilimi (5'→3')
TGF-β	Transforme Edici Büyüme Faktörü Beta 1	L- cgactactacgccaaggaggt R- tgcttgaactgtcatagattcg
IL-6	İnterlökin 6	L- caggagcccagctatgaact R- gaaggcagcaggcaacac
SNAI1	Snail Ailesi Transkripsiyonel Baskılayıcı 1	L- tacagcgagctgcaggact R- atctccggaggtgggatg
TWIST	Twist Ailesi BHLH Transkripsiyon Faktörü 1	L- agctacgccttctcggctc R- ccttctctggaacaatgacatc
CDH1	E-Kaderin 1	L- aggggtctgtcatggaaggt R- gcggcattgtaggtgtca
MMP-2	Matriks Metalloproteinaz 2	L- ccccaaacggacaagag R- cttcagcacaacagggtgc
MMP-9	Matriks Metalloproteinaz 9	L- gaaccaatctcaccgacagg R- gccacccgagtgaaccata
CASP-3	Kaspaz 3 - Apoptoz İlişkili Sistein Proteaz 3	L- ttgtggaattgatgcgtgat R- ggctcagaagcacacaaca
CASP-7	Kaspaz 7 - Apoptoz İlişkili Sistein Proteaz 7	L- gctgacttcctcttcgecta R- caaacccaggagcctcttct
BCL-2	B Hücreli Lenfoma 2	L- gcacctgcacacctggat R- agggccaactgagcaga
BAX	BCL-2 İlişkili X	L- catcatgggctggacattg R- gggacatcagtcgcttcagt
HPRT1	Hipoksantin Fosforibosil Transferaz 1 (Referans gen)	L- tgaccttgattattttgcatacc R- cgagcaagacgttcagtct

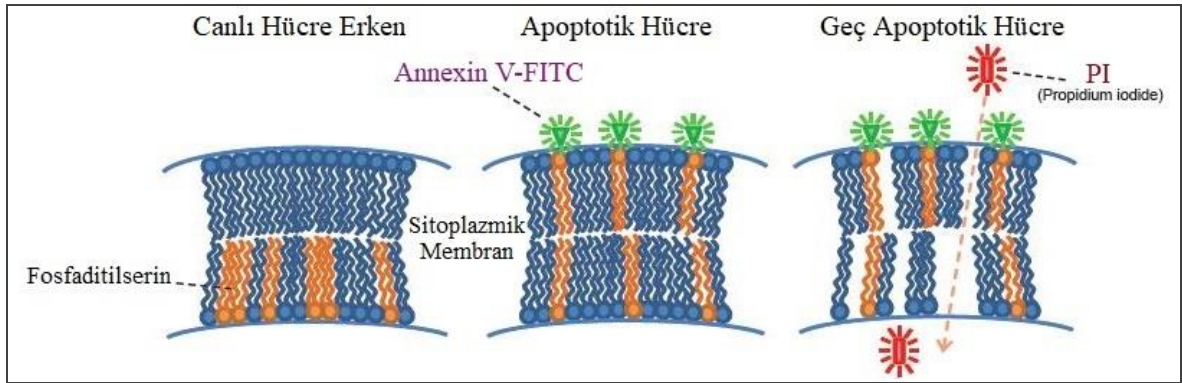
3.10. WST-1 Canlılık ve Proliferasyon Analizi

WST-1 yöntemiyle, Çizim 3.5’te tanımlanan tüm deney grupların; hücre canlılık ve proliferasyon düzeyleri belirlendi. Deneyin son gününde (3. gün); hücre kültür besiyerleri, %10 oranda WST-1 (Roche Diagnostics, Almanya) reaktifi içeren besiyeri ile değiştirildi ve 37 °C, %5 CO₂ koşullarında 2 saat süreyle inkübe edildi. Süre sonunda, 6-kuyucuklu

plakaların her kuyucuğundan 200 µl besiyeri örneği çekilip üçlü tekrarlar halinde 96 kuyucuklu plakalara yüklendi. Örneklerin absorbands değerleri, mikroparka okuyucuda (Versamax, ABD) 450 nm dalga boyunda ölçüldü.

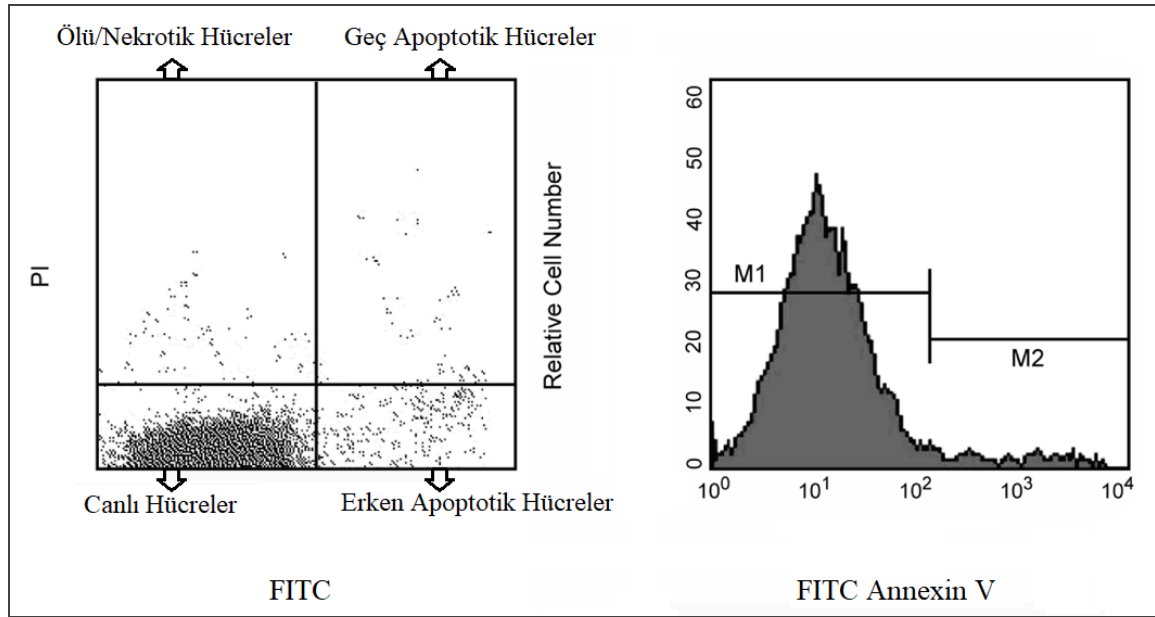
3.11. Anneksin V/PI Apoptoz Tayini

Anneksin V/PI apoptoz tayini, apoptoz sürecine girmiş hücrelerdeki Fosfaditilserin (PS) in hücre membran yerleşimindeki değişimin ve membran bütünlüğündeki bozulmanın saptanmasını temel alan bir testtir.



Çizim 3.6. Anneksin V/PI hücresel boyama prensibi.(www.dojindo.com, Nisan 2019)

Fosfaditilserin (PS) molekülü sağlıklı ve canlı hücrelerde hücre membranının sitoplazmik yüzeyinde olmasına karşın; erken apoptotik ve apoptotik hücrelerde membranın dış yüzeyinde yerleşim gösterir. FITC florokrom işaretli anneksin V molekülü; apoptotik sürece girmiş hücrelerin, membranın ekstraselüler alanına geçmiş olan PS'ne bağlanmaktadır. Propidyum iyodür (PI) canlı ve ölü hücre tanımlanmasında kullanılan standart bir akım sitometri canlılık probudur. Membran bütünlüğüne sahip canlı hücreler, PI'ı hücre içine almazken; ölü ve hasarlı hücreler, bozulmuş membran bütünlüğüyle PI'e karşı geçirgendir (Çizim 3.6). Bu anlamda FITC Annexin V için pozitif, PI için negatif hücreler erken apoptotik hücrelerdir. Hem FITC Annexin V hem de PI için negatif boyanan hücreler canlıdır ve ölçülebilir bir apoptoz süreci geçirmemektedir. FITC Annexin V için pozitif, PI için negatif hücreler erken apoptotik hücrelerdir. Hem FITC Anneksin V hem de PI için pozitif boyanan hücreler ise nekrotik/ölü hücrelerdir (Çizim 3.7).

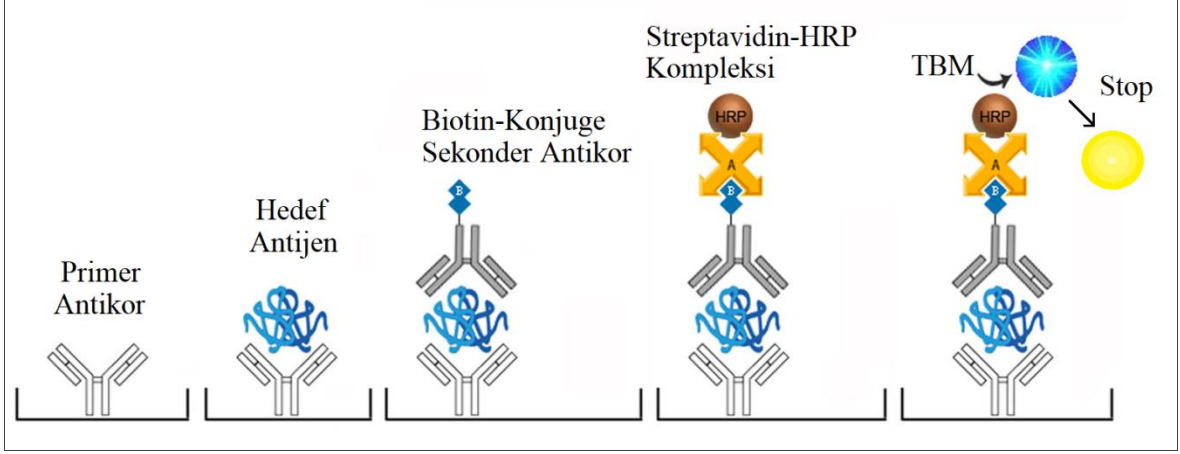


Çizim 3.7. Anneksin V/PI boyamasıyla akım sitometrik apoptoz analizinin örnek şablonu (BD Biosciences, 2019).

Bu çalışmadaki deney gruplarının Anneksin V/PI apoptoz tayini, ticari kit(BD Bioscience- FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I, ABD) kullanılarak, üretici firmanın sunduğu protokole uyularak gerçekleştirildi. Kısaca; tripsini-EDTA ile hücreler kaldırıldı ve her grup için 3×10^5 hücre soğuk PBS ile yıkandı. Hücre pelletleri 100 μ l 'Binding Buffer' ile tekrar homojenize edildi. FITC AnneksinV ve PI boya eklenip; oda sıcaklığında 20 dakika süreyle inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda 300 μ l 'Binding Buffer' eklenerek reaksiyon durduruldu ve FACSCalibur (BD Biosciences) akım sitometre cihazında okutuldu, Cell Quest programı (BD Biosciences) ile analiz işlemleri gerçekleştirildi

3.12. Enzim Bağlı İmmunosorbent Analizi

Enzim Bağlı İmmunosorbent Analizi (ELİSA); enzim ile işaretli antikor (konjugat) ve substrat kullanılarak, örnek materyalde bulunan hedef proteinin varlığını ya da miktarını belirlemede kullanılan immünojenik bir yöntemdir. 'Sandviç ELİSA' yöntemine uyumlu ticari kitler kullanılarak gerçekleştirilen çalışmada, deney gruplarının hücre kültürü supernatantlarından alınan örneklerin; TGF- β (Arigo Biolaboratories, Tayvan), IL-6 (Arigo Biolaboratories, Tayvan), TNF- α (Arigo Biolaboratories, Tayvan), MMP-2 (YL Biotech, Çin) ve MMP-9 (YL Biotech, Çin) proteinlerinin miktar tayini yapıldı.



Çizim 3.8 Sandviç ELİSA testinin çalışma prensibi (MyBioSource.com, Nisan 2019).

Deneyler, çalışmada kullanılan kitlerin üretici firmalarının sunduğu talimatlara uyularak gerçekleştirildi. Kısaca (Çizim 3.8); hedef proteine özgü primer monoklonal antikor kaplı kuyucuklara standart dilüsyonlar ve örnekler yüklendi. İnkübasyon sürecinde hedef proteinler (antijenler) primer antikorlara bağlanmış oldu. Yıkama işlemiyle, örnekteki hedef molekül haricindeki diğer moleküller uzaklaştırıldı. Takiben, hedef proteine özgü biotin-konjuge sekonder antikor solusyonu ilave edildi; böylece bir epitoptan primer antikora bağlanmış durumda olan hedef proteinler diğer epitop(lar)tan da sekonder antikora bağlanmış oldu. Yıkama işlemiyle serbest (bağlanmamış) sekonder antikorlar uzaklaştırıldı. Takiben Streptavidin-Yabanturbu ‘*Horseradish*’ Peroksidaz (HRP) solusyonu ilave edildi. İnkübasyon sürecinde avidin-biotin afinitesiyle birlikte sekonder antikor-HRP konjugatı oluşturuldu. Yıkama işlemiyle, konjugat oluşturmamış serbest HRP uzaklaştırıldı. HRP substratı olan 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin (TBM) substrat solusyonu ilave edildi. HRP’ın TMB ile olan kromojenik enzim reaksiyonu sonucu, hedef proteinin miktarıyla doğru orantılı olarak renk değişimi gerçekleşti. İnkübasyon süresi sonunda ‘Stop’ solusyonu ilave edilerek reaksiyonu durduruldu. ELİSA plakası, mikrolaka okuyucuda (Versamax, ABD) 450 nm dalga boyunda okutularak kromojenik reaksiyon ölçüldü. Örneklerin protein konsantrasyonları; ölçülen absorbans değerleri, standart eğrisi ile karşılaştırılarak değerlendirildi.

3.13. İmmünfloresan Boyama

Çizim 3.5’te tanımlanan deney grubu hücrelerinin, MMP-2 ve MMP-9 fenotipleri ikili (*Double*) immünfloresan boyama yapılarak incelendi. İmmünfloresan boyama için cam lameller üzerine ekilmiş hücrelerin kültür besiyerleri, deneyin sonunda (3.gün) çekilip, soğuk PBS ile 3 kez yıkama işlemi yapıldı. Hücreler, %4 paraformaldehit solusyonunda

+4°C'de 20 dakika süreyle fikse edildi. Örnekler PBS ile yıkandıktan sonra, özgün olmayan arka plan boyanmasının önüne geçmek için, %2 blok serum (Abcam) içeren PBS'de 25 dakika süreyle inkübe edildi. Süre sonunda blok serum solusyonu bir pipet aracılığıyla, lamel kenarlarından nazikçe geri çekildi. Uygun dilusyon oranlarında MMP-2 (Thermo Scientific) ve MMP-9 (Abcam) primer antikoları eklenip, +4°C'de gece boyu inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda lameller PBS ile 3 kez yıkandıktan sonra uygun floresan işaretli sekoder antikolarla oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. Örneklerin kuruması beklenip, DAPI ile kapatıldı. Boyama yapılan örnekler, konfokal mikroskop (LEICA SP8 LIGHTNING, Almanya) altında incelendi.

3.14. Migrasyon Deneyi (*Wound Healing*)

Wound Healing; hücre migrasyonu/invazyonunun iki boyutlu olarak incelendiği bir yöntemdir. Bu yöntemde; tek hücre tabakası üzerinde bir cisim vasıtasıyla çizik oluşturulur ve ~2-3 gün hücrelerin çizilmiş bölgeye migrasyonu izlenir.

6 kuyucuklu plakalara ekili deney grubu hücreleri, %70-80 doluluğa ulaştığında, hücre tabakası üzerinde 200 µl pipet ucu vasıtasıyla düz bir çizik oluşturuldu. 0. ve 2. gün ışık mikroskop görüntüleri incelendi, fotoğraf çekildi. 0. ve 2. gün görüntüleri arasındaki fark, gruplar arasında karşılaştırılarak değerlendirildi.

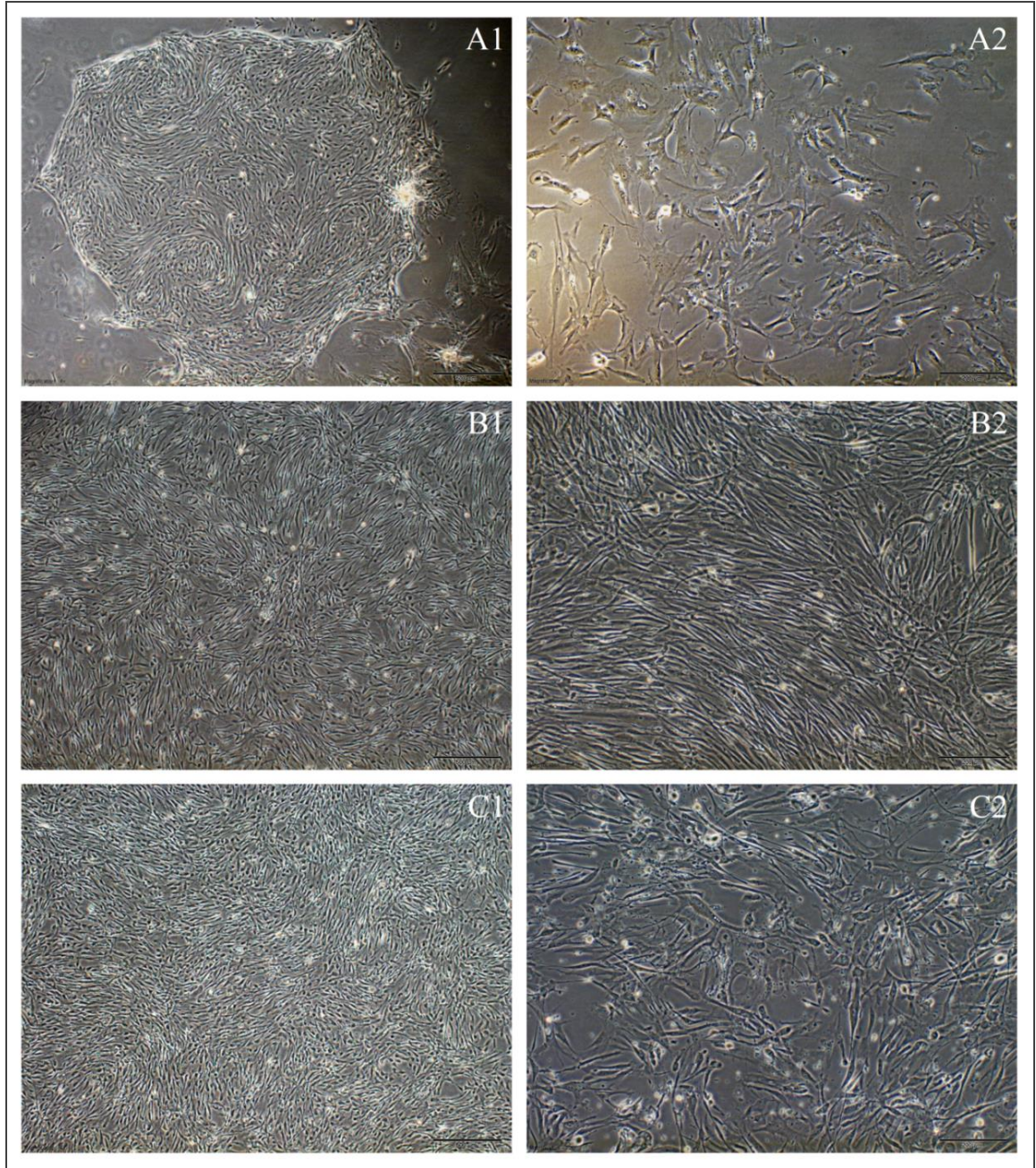
3.15. İstatistiksel Analiz

Sonuçların istatistiksel analizlerinde SPSS10.0 (SPSS, Chicago, ABD) programı kullanılmıştır. Veriler eşli t-testi ve çoklu analizler için Newman-Keuls metodu ile test edilmiştir. Her deney grubu en az üç tekrardan oluşmaktadır. Deney ve kontrol grupları arasındaki fark $p < 0.05$ olduğunda anlamlı ve $p < 0.01$ olduğunda ileri derece anlamlı olarak ifade edilmiştir.

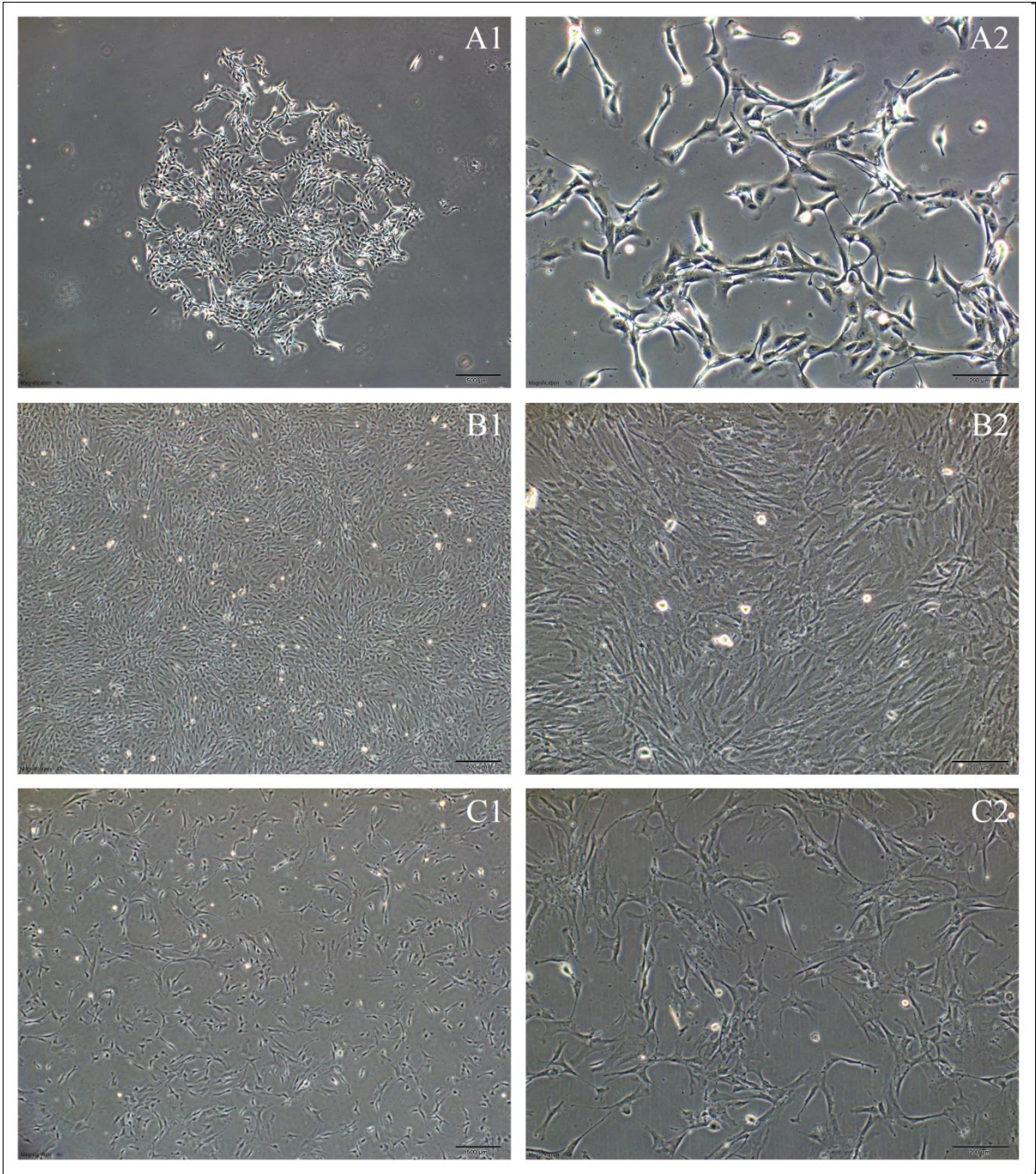
4. BULGULAR

4.1. Meme Tümör Dokusundan Kanser Kök Hücresi İzolasyonu ve Hücre Kültürü

Meme tümör dokudan izole ettiğimiz MKKH'ler yapışan kültür olarak çoğaltılmış ve kültür boyunca düzenli olarak faz-kontrast mikroskop altında görüntülenip morfolojileri incelenmiştir (Çizim 4.1 ve Çizim 4.2). MKKH'ler kültür süresince, ileri pasajlarda dahi oldukça hızlı çoğaldıkları gözlemlendi.



Çizim 4.1. İzolasyonu yapılan Vaka 1-MKKH'in pasaj 0 (A1-A2), pasaj 1(B1-B2) ve pasaj 2 (C1-C2) faz-kontrast görüntüleri. Ölçüm çubuğu: 500 μm (A1, B1, C1) ve 200 μm (A2, B2, C2).



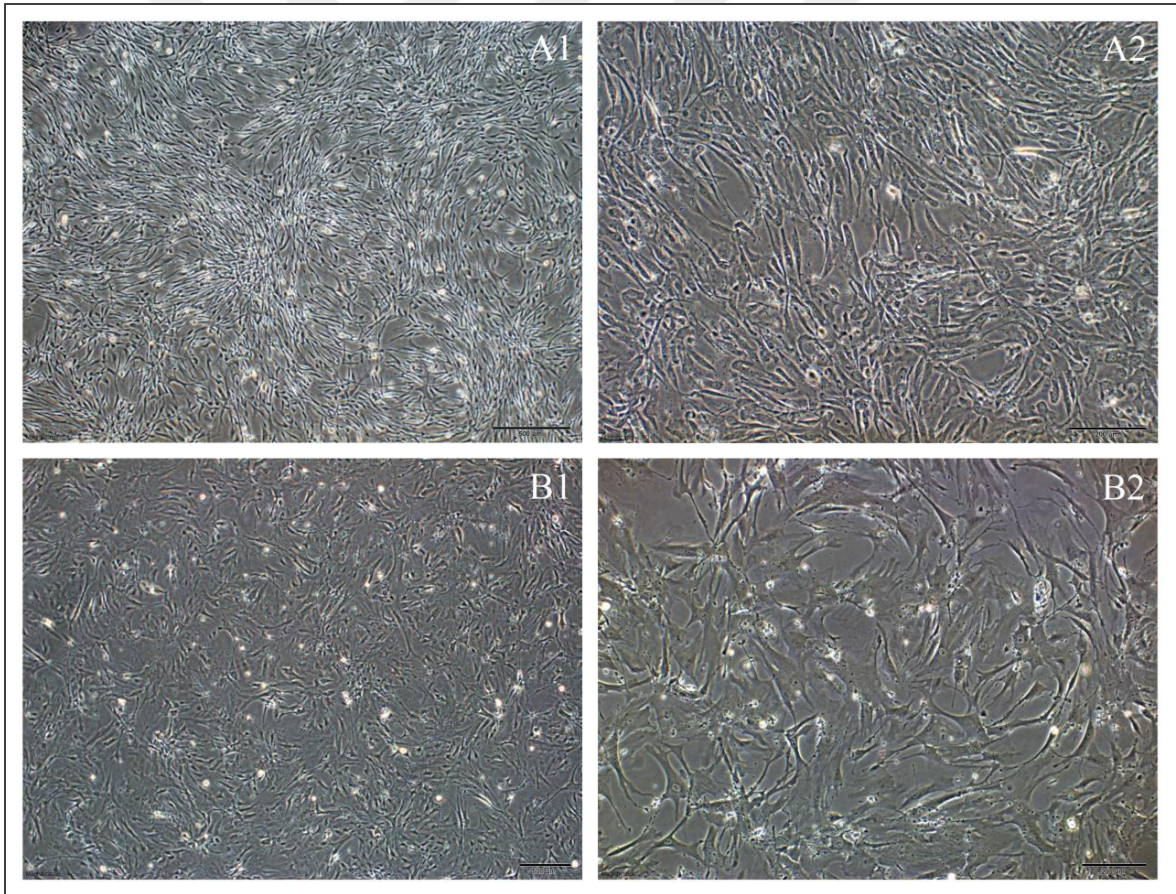
Çizim 4.2. İzolasyonu yapılan Vaka 2-MKKH'in pasaj 0, pasaj 1 ve pasaj 2 faz-kontrast görüntüleri. Pasaj 0 (A1-A2), Pasaj 1(B1-B2), Pasaj 2 (C1-C2). Ölçüm çubuğu: 500 µm (A1, B1, C1) ve 200 µm (A2, B2, C2).

4.2. Meme Kanseri Kök Hücresinin Karakterizasyonu

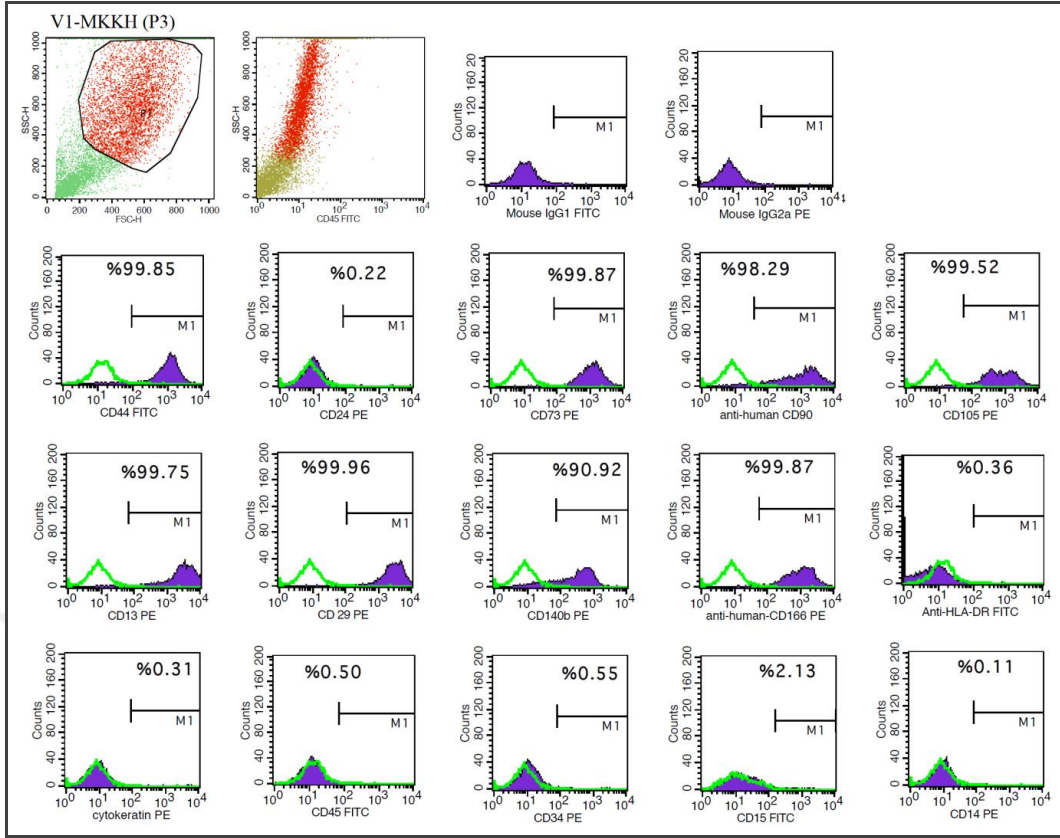
Tümör dokudan elde edilen kanser hücreleri; akım sitometri analizi, ALDH testi ve mamosfer oluşturma deneyleri kapsamında KKH karakterizasyonu yapıldı.

4.2.1. Akım Sitometri Analizi

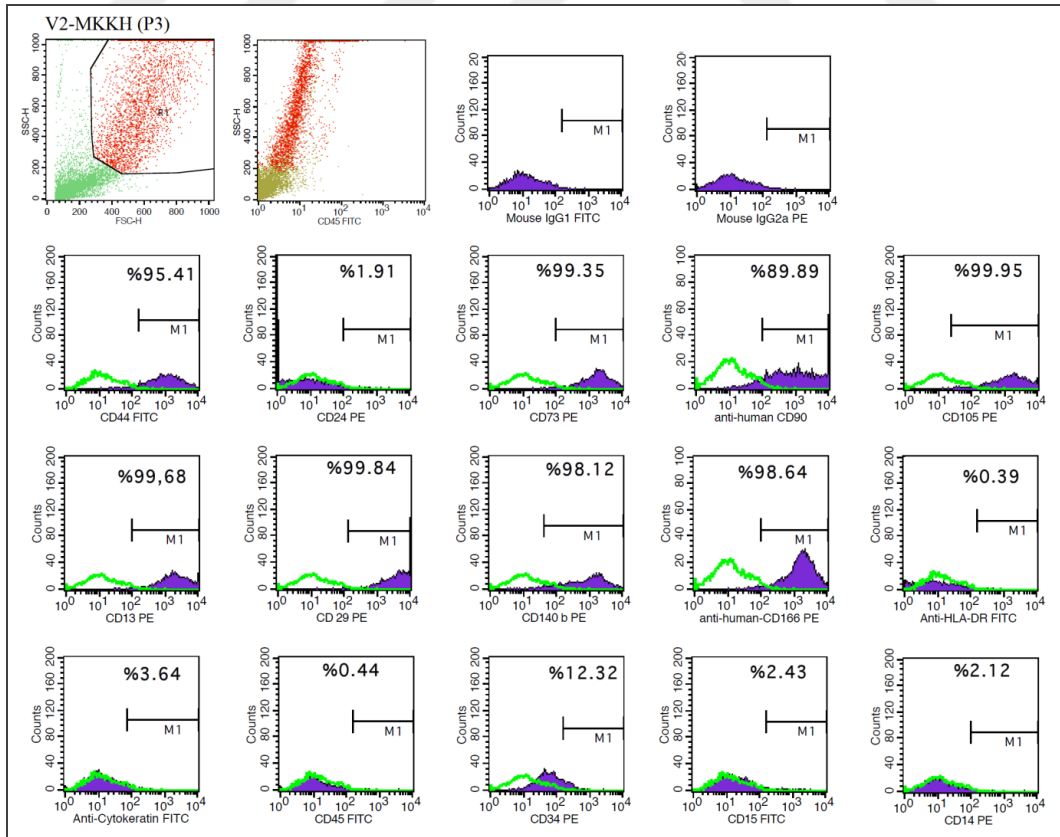
İzole edilen V1-MKKH ve V2-MKKH'leri pasaj 3'e geldiklerinde (Çizim 4.3); kanser kök hücresi olarak tanımlanması için pozitif olması; CD44, CD73, CD90, CD105, CD13, CD29, CD140b ve negatif olmasını beklenen; CD24, HLA DR, sitokeratin, CD45, CD 34, CD15, CD14 belirteçlerinin hücrel ifadesi incelendi. **CD44⁺/CD24⁻** Meme kanseri kök hücre fenotipi sergilemiş olmasının yanı sıra; CD73, CD90, CD105, CD13, CD29 ve CD140b kök hücre belirteçleri de yüksek pozitiflik göstermiştir. HLA-DR, sitokeratin, CD45, CD 34, CD15 ve CD14 gibi hematopoetik ve epitelyal hücre belirteçleri de negatif bulunmuştur (Çizim 4.4. ve Çizim 4.5).



Çizim 4.3. Pasaj 3'te akım sitometri analizi yapılan V1-MKKH (A1-A2) ve V2-MKKH (B1-B2)'lerin faz-kontrast mikroskop görüntüsü. Ölçüm çubuğu: 500 µm (A1, B1) ve 200 µm (A2, B2).



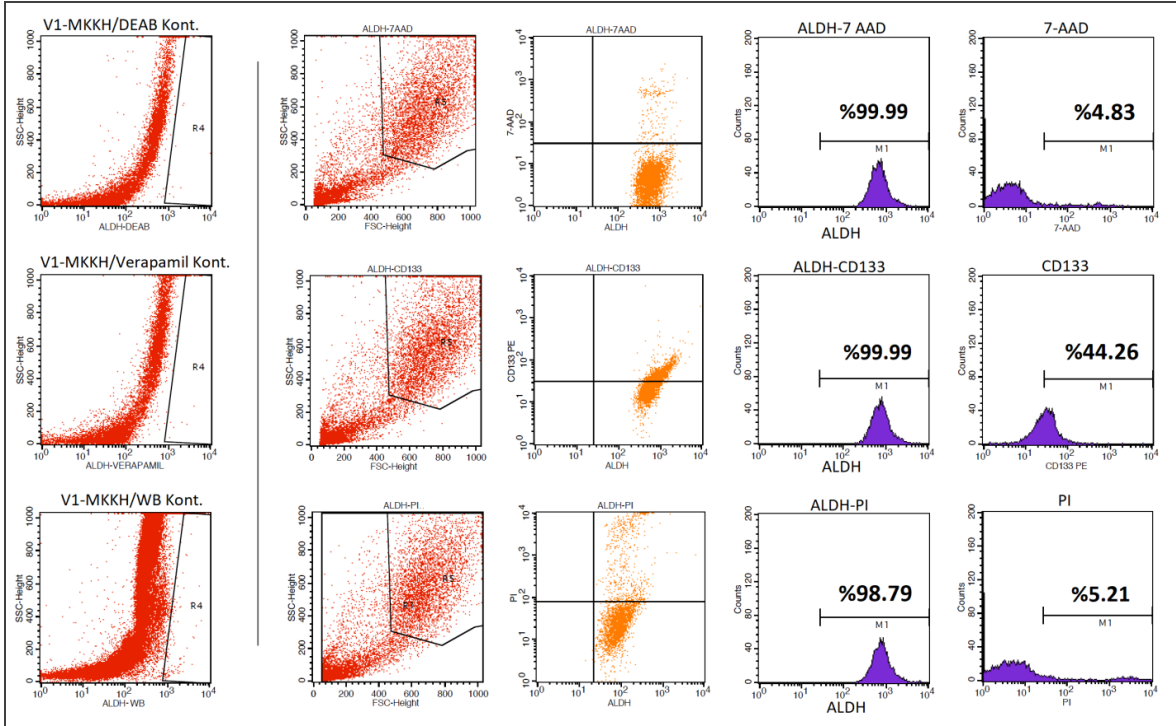
Çizim 4.4. V1-MKKH'lerin akım sitometri ile karakterizasyon analizi.



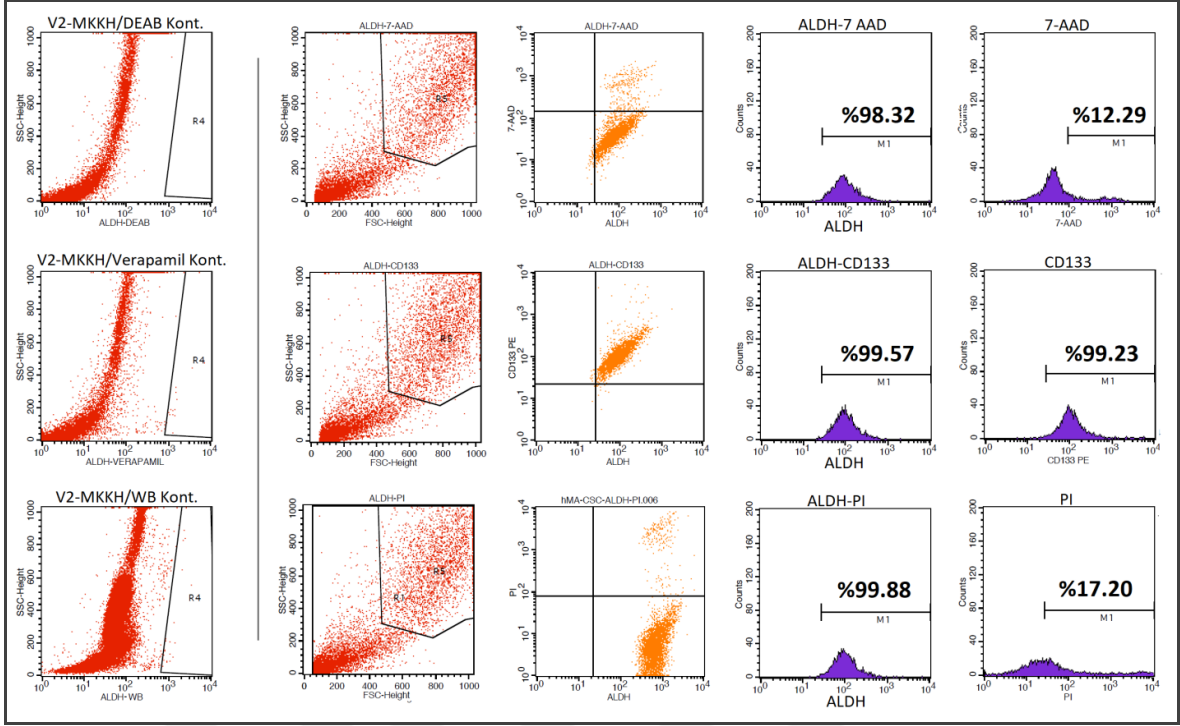
Çizim 4.5. V2-MKKH'lerin akım sitometri ile karakterizasyon analizi.

4.2.2. ALDH Testi

ALDH testinde yapılan tüm ikili boyamalarda ALDH enzim aktivitesi %99 üzeri pozitif bulunmuştur. CD133 ifadesi ise V1-MKKH'de %44.26 iken, V1-MKKH'de %99.23 olarak bulunmuştur. 7-AAD ve PI değerleri V1-MKKH'de daha az gözlenirken, her iki vakada da ~%13'lerin altında bulunmuştur (Çizim 4.6 ve Çizim 4.7). Yapılan ALDH testi; CD133 pozitifliğiyle de, izolasyonu yapılan tümör hücrelerinin kanser kök hücreleri fenotipinde olduğunu destekleyen nitelikte değerler ile sonuçlanmıştır.



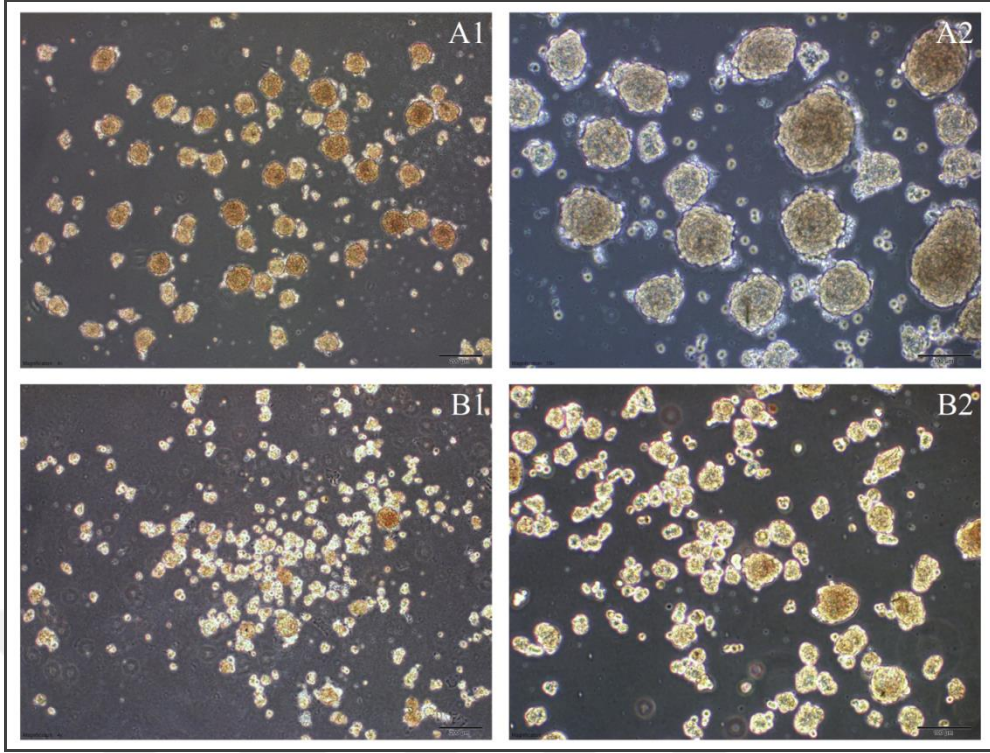
Çizim 4.6. V1-MKKH'lerin ALDH/7AAD, ALDH/CD133, ALDH/PI ikili boyamalarının akım sitometrik ALDH analizi.



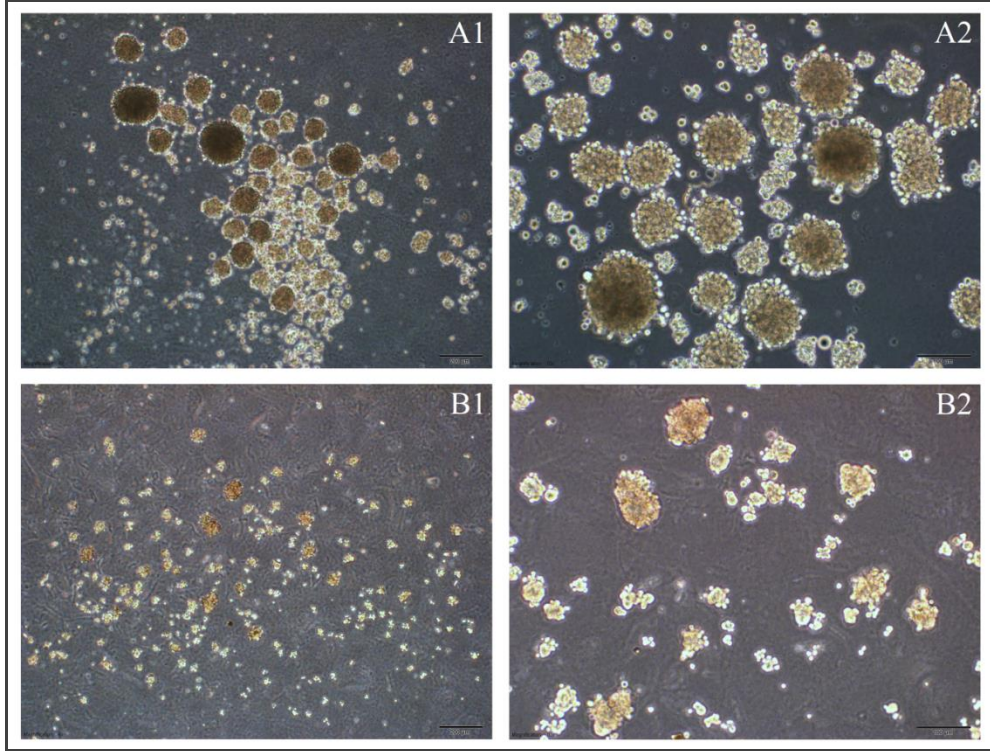
Çizim 4.7. V2-MKKH'lerin; ALDH/7AAD, ALDH/CD133 ve ALDH/PI ikili boyamalarının akım sitometrik ALDH analizi.

4.2.3. Mamosfer Oluşturma Deneyi

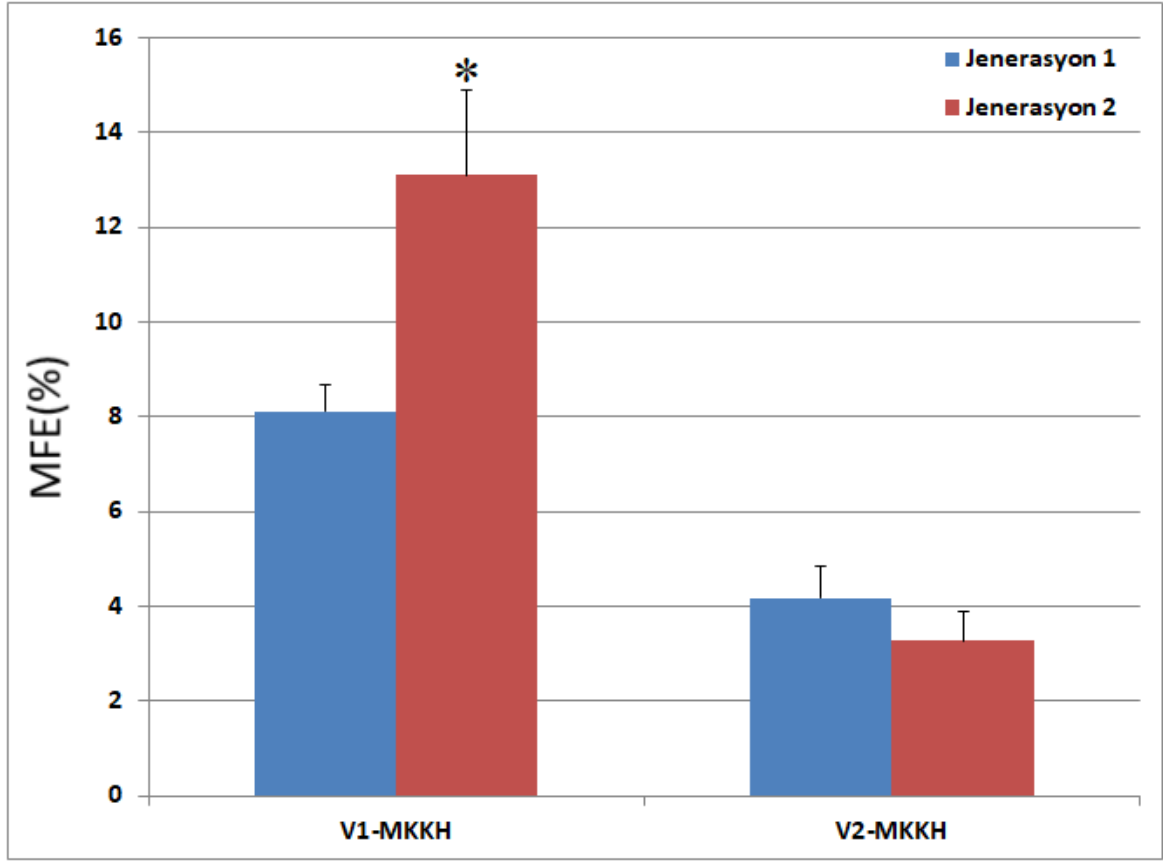
Kanser kök hücreleri izolasyonu sonrası karakterizasyonu için kullanılan mamosfer oluşturma yetkinlikleri değerlendirilmiştir. Vaka 1 ve Vaka 2 MKKH'lerinin Jenerasyon 1 ve Jenerasyon 2'de mamosfer sayımı yapılmış MFE (%) değerleri hesaplanmıştır. Her iki vakanın da mamosfer oluşturabildiği gözlenmiştir (Çizim 4.8 ve Çizim 4.9). Vakalar karşılaştırıldığında; V1-MKKH'nin MFE değeri daha yüksek olduğu saptanmıştır. V1-MKKH'de Jenerasyon 2'de Jenerasyon 1'e oranla anlamlı artış görülmüştür (Çizim 4.10).



Çizim 4.8. Vaka 1 MKKH mamosfer oluşturma deneyi, 7 .gün faz kontrast mikroskop görüntüsü. Jenerasyon 1 (A1-A2), Jenerasyon 2 (B1-B2). Ölçüm çubuğu: 500µm (A1, B1), 200µm (A2, B2).



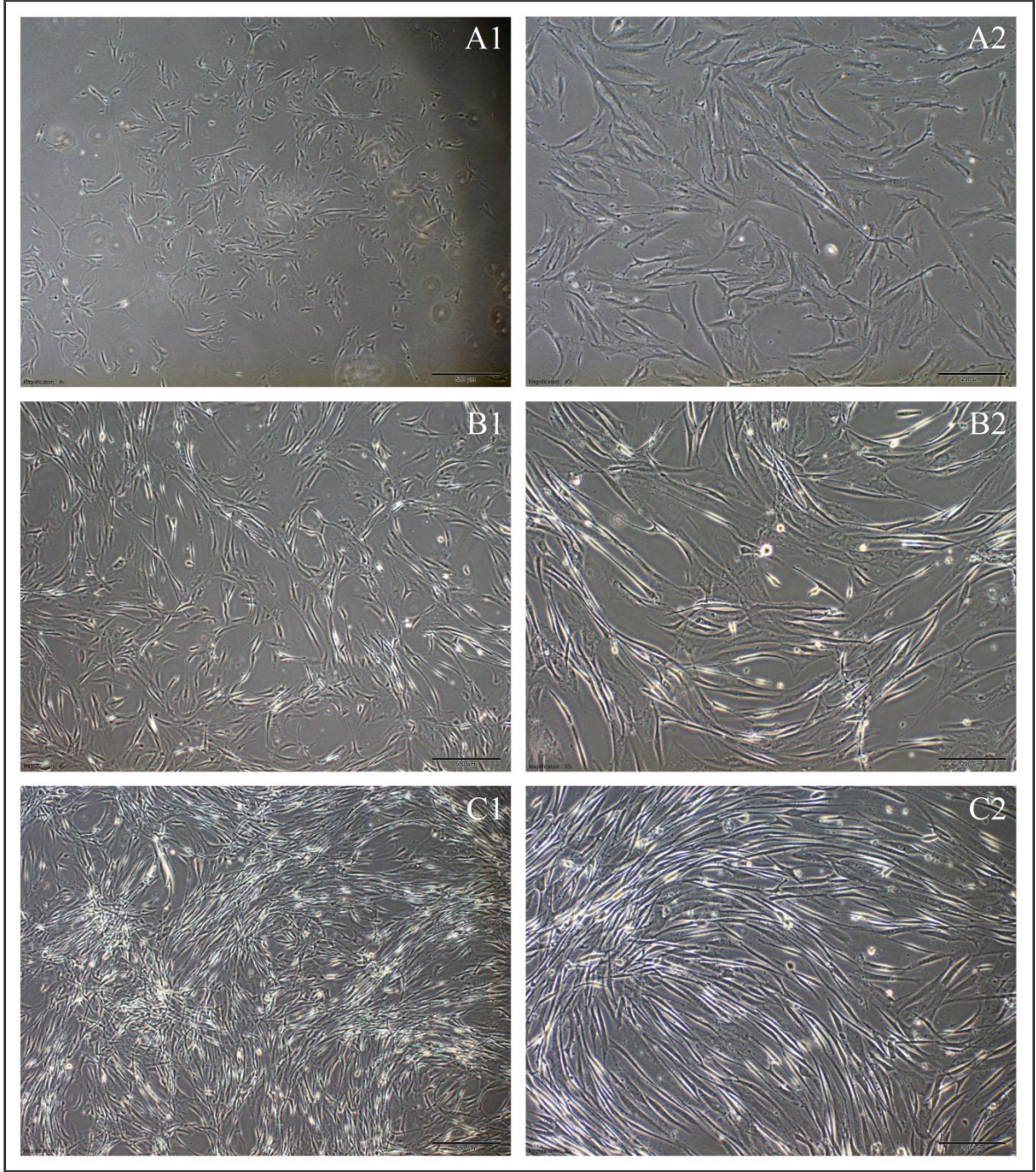
Çizim 4.9. Vaka 2 MKKH mamosfer oluşturma deneyi , 7 .gün faz kontrast mikroskop görüntüsü. Jenerasyon 1 (A1-A2), Jenerasyon 2 (B1-B2). Ölçüm çubuğu: 500µm (A1, B1), 200µm (A2, B2).



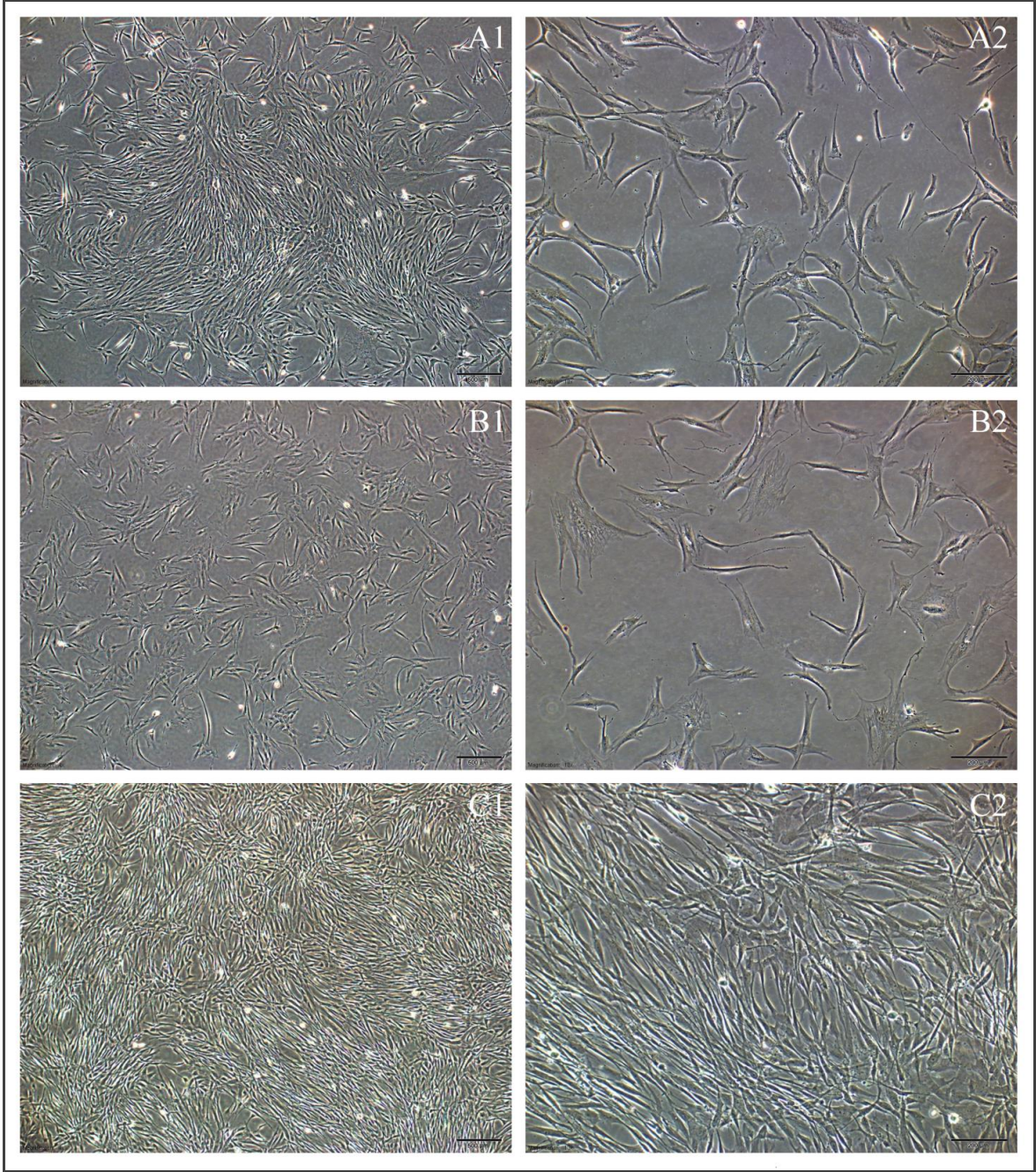
Çizim 4.10. V1-MKKH ve V2-MKKH'lerin Jenerasyon 1 ve jenerasyon 2' de gösterdikleri MFE(%) değerleri.

4.3. Meme Yağ Dokudan Mezenkimal Kök Hücre İzolasyonu ve Hücre Kültürü

Meme yağ dokudan izole edilen iYD-MKH'ler yapışan kültür olarak çağaltılmış ve kültür boyunca düzenli olarak faz-kontrast mikroskop altında görüntülenip morfolojileri incelenmiştir (Çizim 4.11 ve Çizim 4.12). iYD-MKH'ler morfolojik yapı ve yüksek proliferasyon özellikleriyle mezenkimal kök hücre fenotipine uyumlu görülmüştür. Özellikle V2-iYD-MKH'ler ileri pasajlara kadar da yüksek proliferatif özelliğini korumuştur.



Çizim 4.11. İzolasyonu yapılan Vaka1-iYD-MKH'in pasaj 0 (A1-A2), pasaj 1 (B1-B2) ve pasaj 2 (C1-C2) faz-kontrast mikroskop görüntüleri. Ölçüm çubuğu: 500 µm (A1, B1, C1) ve 200 µm (A2, B2, C2).



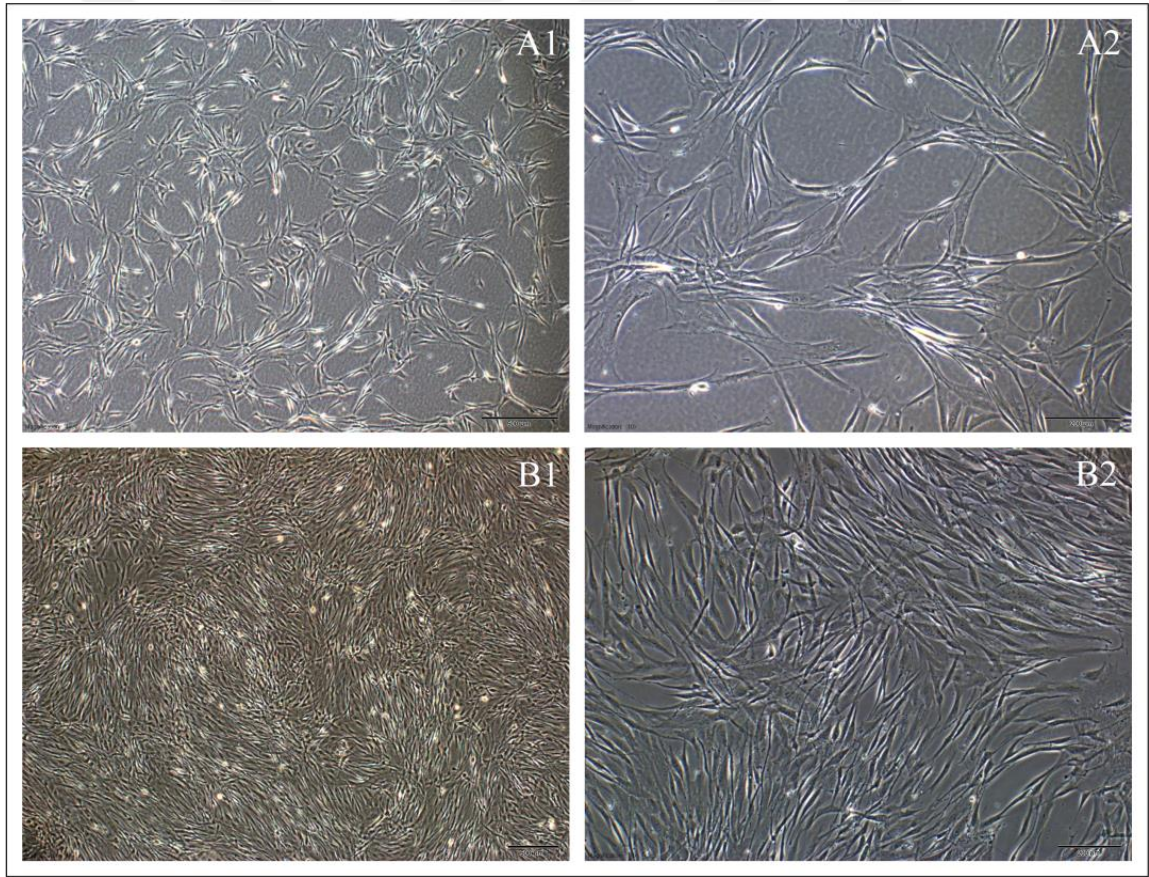
Çizim 4.12. İzolasyonu yapılan Vaka 2-iYD-MKH'in pasaj 0 (A1-A2), pasaj 1 (B1-B2) ve pasaj 2 (C1-C2) faz-kontrast mikroskop görüntüleri. Ölçüm çubuğu: 500 µm (A1, B1, C1) ve 200 µm (A2, B2, C2).

4.4. İnsan Yağ Doku Kaynaklı Mezenimal Kök Hücrelerin Karakterizasyonu

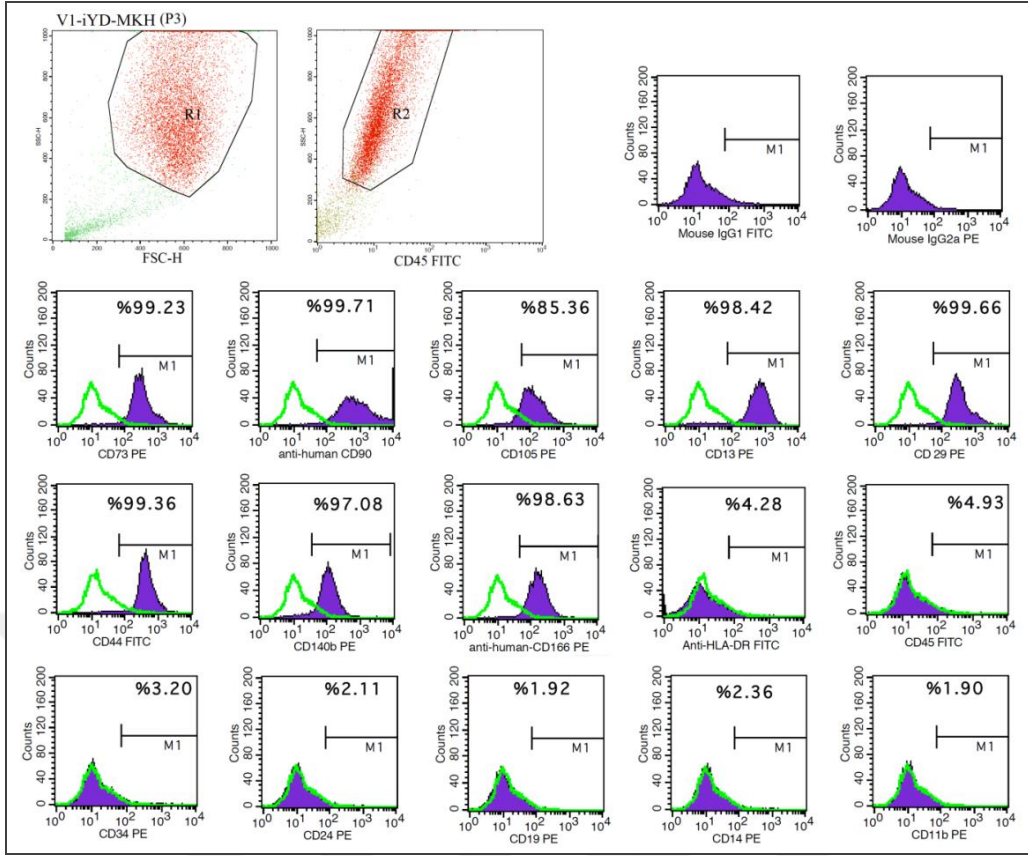
Yağ dokudan elde edilen stromal hücreler, akım sitometri analizi ve farklılaştırma deneyleri kapsamında MKH karakterizasyonu gerçekleştirildi.

4.4.1. Akım Sitometri Analizi

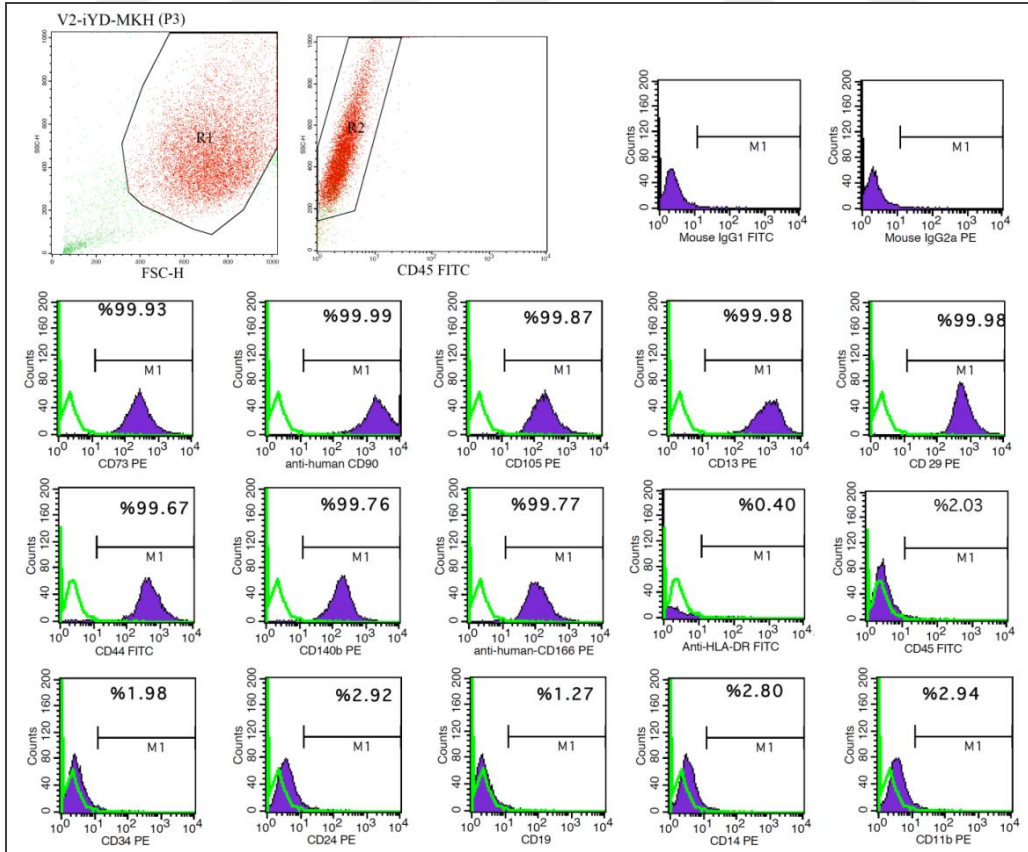
İzole edilen V1-iYD-MKH ve V2- iYD-MKH'ler pasaj 3'e geldiklerinde (Çizim 4.13) akım sitometri analizine alındı. CD73, CD90, CD105, CD13, CD29, CD140b ve CD166 mezenkimal kök hücre belirteçlerinde yüksek (~%85-99) pozitif ifade gösterirken; HLA DR, CD45, CD 34, CD24, CD19, CD14 ve CD11b gibi hematopoetik ve epitelyal hücre belirteçlerinin ifadesi negatif (~%0,4-4,9) olarak saptandı. Yapılan akım sitometri analizi sonuçları neticesinde izole edilen stromal hücreler, mezenkimal kök hücre olarak tanımlandı (Çizim 4.14 ve Çizim 4.15).



Çizim 4.13. Pasaj 3'te akım sitometri analizi yapılan V1-iYD-MKH (A1-A2) ve V2-iYD-MKH (B1-B2)'lerin faz-kontrast mikroskop görüntüsü. Ölçüm çubuğu: 500 μ m (A1, B1) ve 200 μ m (A2, B2).



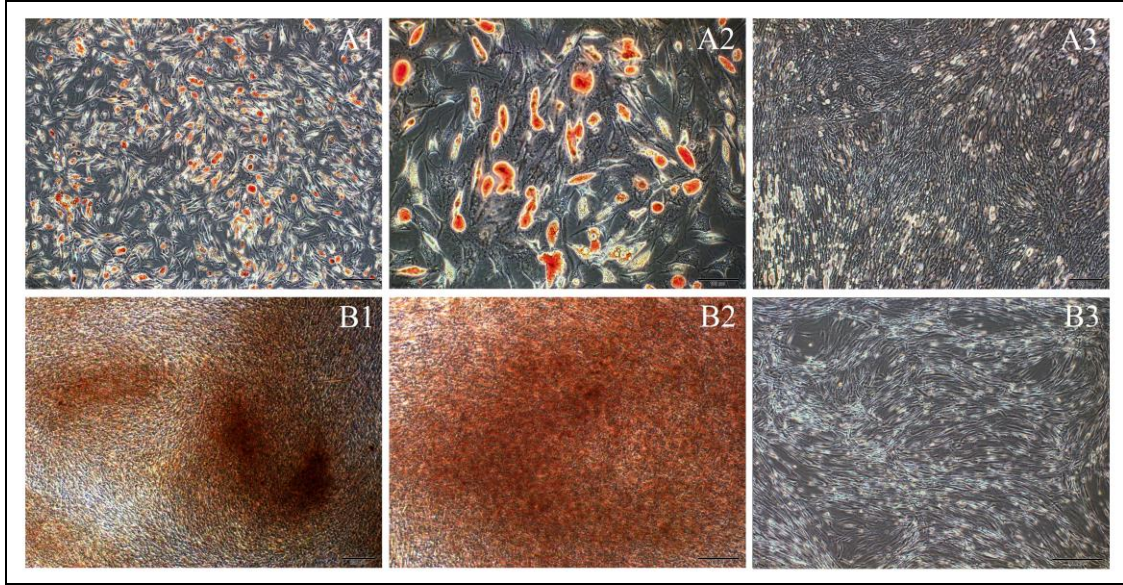
Çizim 4.14. V1-iYD-MKH'lerin akım sitometri ile karakterizasyon analizi.



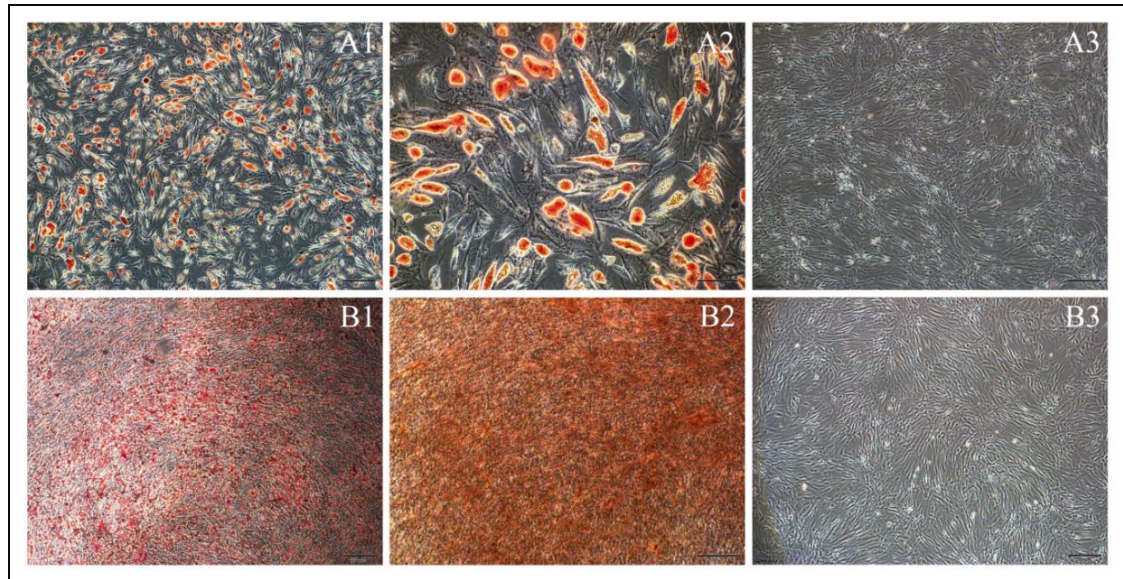
Çizim 4.15. V2-iYD-MKH'lerin akım sitometri ile karakterizasyon analizi.

4.4.2. Farklılaştırma Deneyleri

İzole edilen iYD-MKH'ler pasaj 3'e geldiklerinde, 3 hafta süren farklılaştırma deneyinin ardından yapılan adipojenik ve osteojenik boyamalarda saptanan pozitiflik, farklılaştırmaların başarılı olduğunu kanıtlamıştır (Çizim 4.16 ve Çizim 4.17). Farklılaştırma deneylerinden elde ettiğimiz sonuçlara göre iYD-MKH'ler mezenkimal kök hücre olarak tanımlanmıştır.



Çizim 4.16. V1-iYD-MKH'in adipojenik farklılaştırma O (A1-A2) ve kontrol (A3) hücrelerinin oil red O boyaması; osteojenik farklılaştırma (B1-B2) ve kontrol (B3) hücrelerinin alizarin red S (B1-B2) boyaması faz-kontrast mikroskop görüntüleri. Ölçüm çubuğu 500µm (A1, A3, B1, B3) ve 200µm (A2, B2).

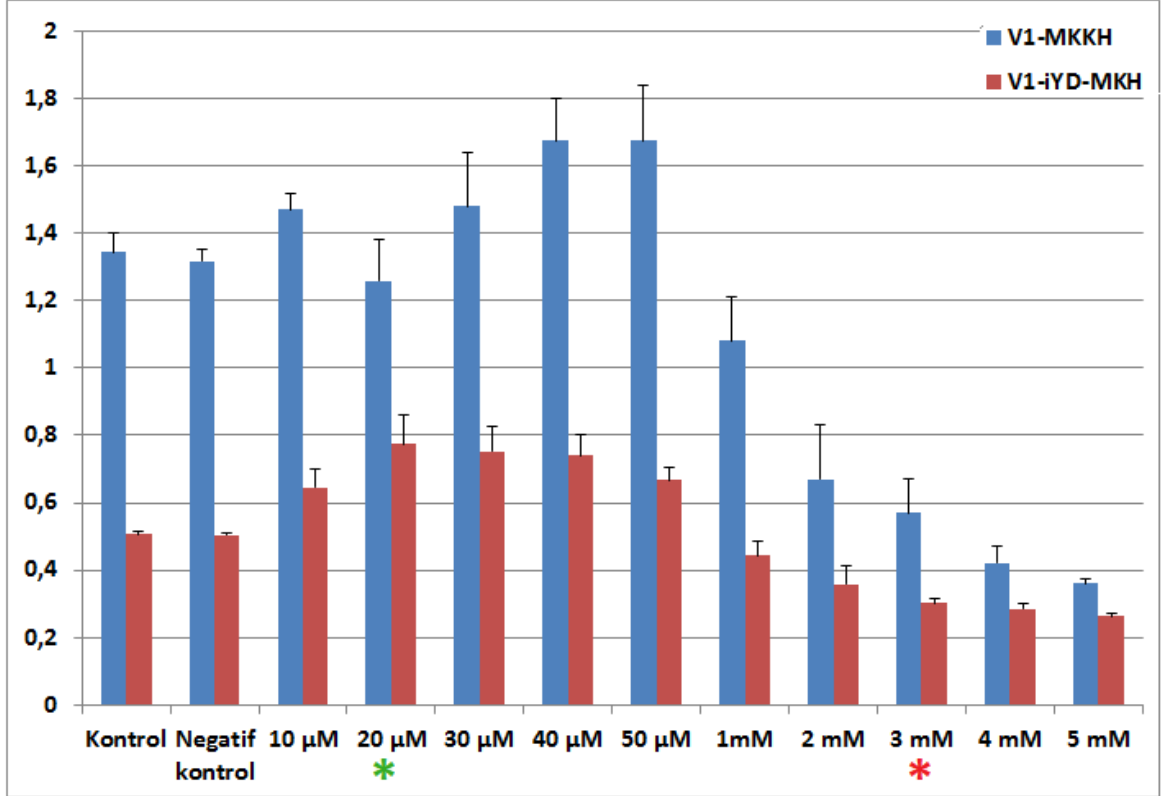


Çizim 4.17. V2-iYD-MKH'in adipojenik farklılaştırma O (A1-A2) ve kontrol (A3) hücrelerinin oil red O boyaması; osteojenik farklılaştırma (B1-B2) ve kontrol (B3) hücrelerinin alizarin red S (B1-B2) boyaması faz-kontrast mikroskop görüntüleri. Ölçüm çubuğu 500µm (A1, A3, B1, B3) ve 200µm (A2, B2).

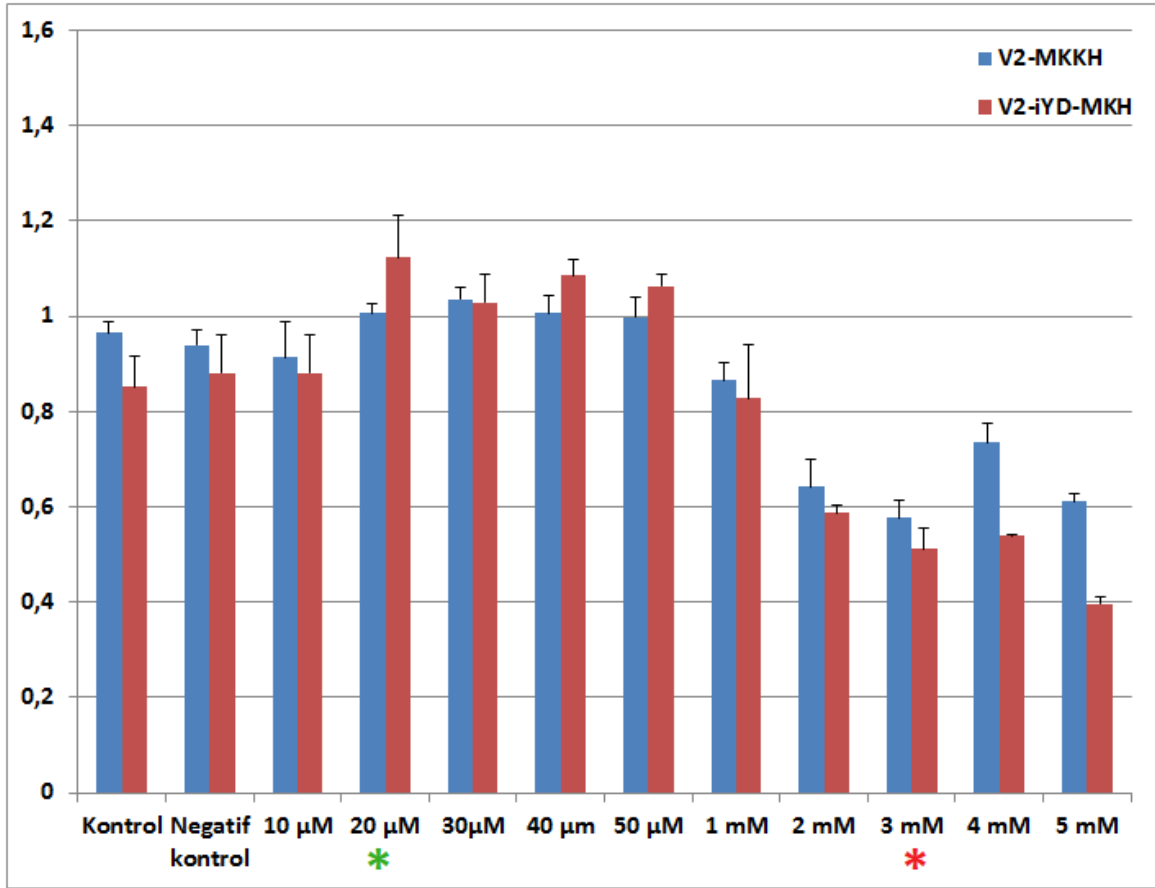
hücrelerinin alizarin red S (B1-B2) boyaması faz-kontrast mikroskop görüntüleri. Ölçüm çubuğu 500µm (A1, A3, B1, B3) ve 200µm (A2, B2).

4.5. WST-1 Canlılık Deneyi ile Alfa Lipoik Asit'in Doz Standardizasyonu

WST-1 canlılık deneyinde her iki vakanın iYD-MKH'leri için, 20µM ALA konsantrasyonu güvenli doz olarak belirlenmiştir. MKKH'ler için ise 3mM ALA konsantrasyonu canlılığı azaltıcı doz olarak belirlenmiştir.



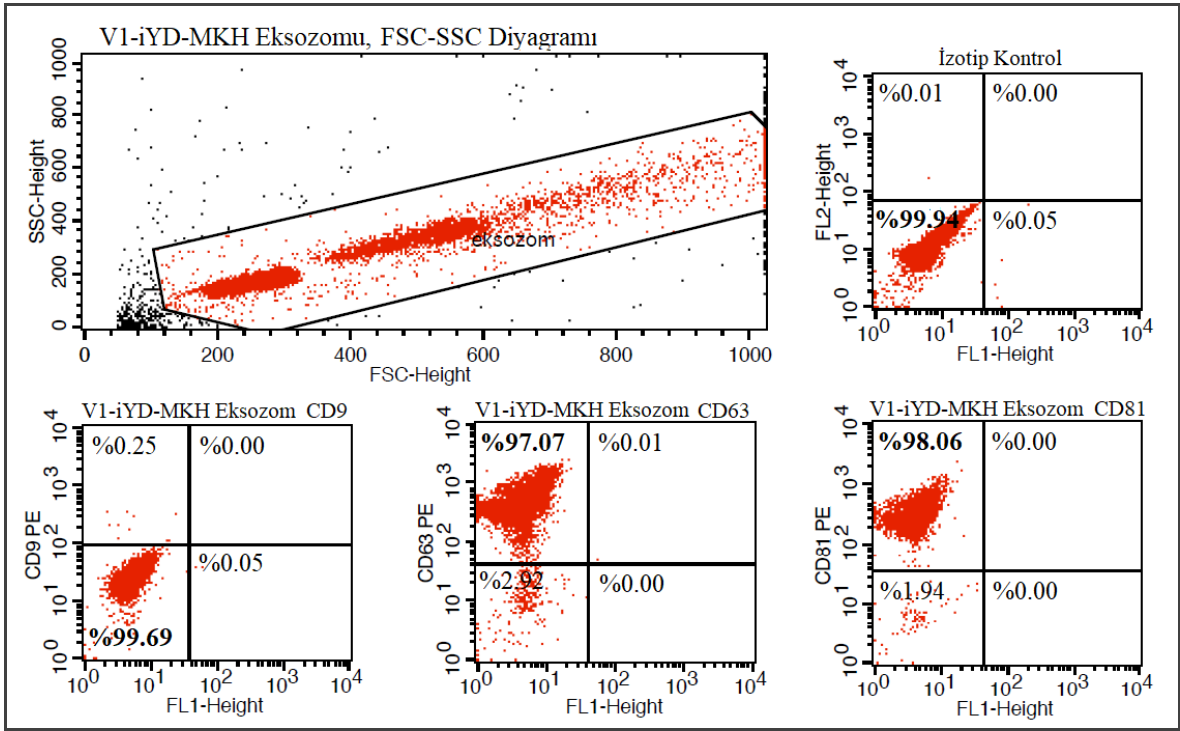
Çizim 4.18. Vaka 1 MKKH ve iYD-MKH'lerinin farklı ALA konsantrasyonlarında gösterdikleri canlılık ve çoğalma grafiği. MKH için seçilmiş güvenli doz (*),MKKH için seçilmiş canlılığı azaltıcı doz (*).



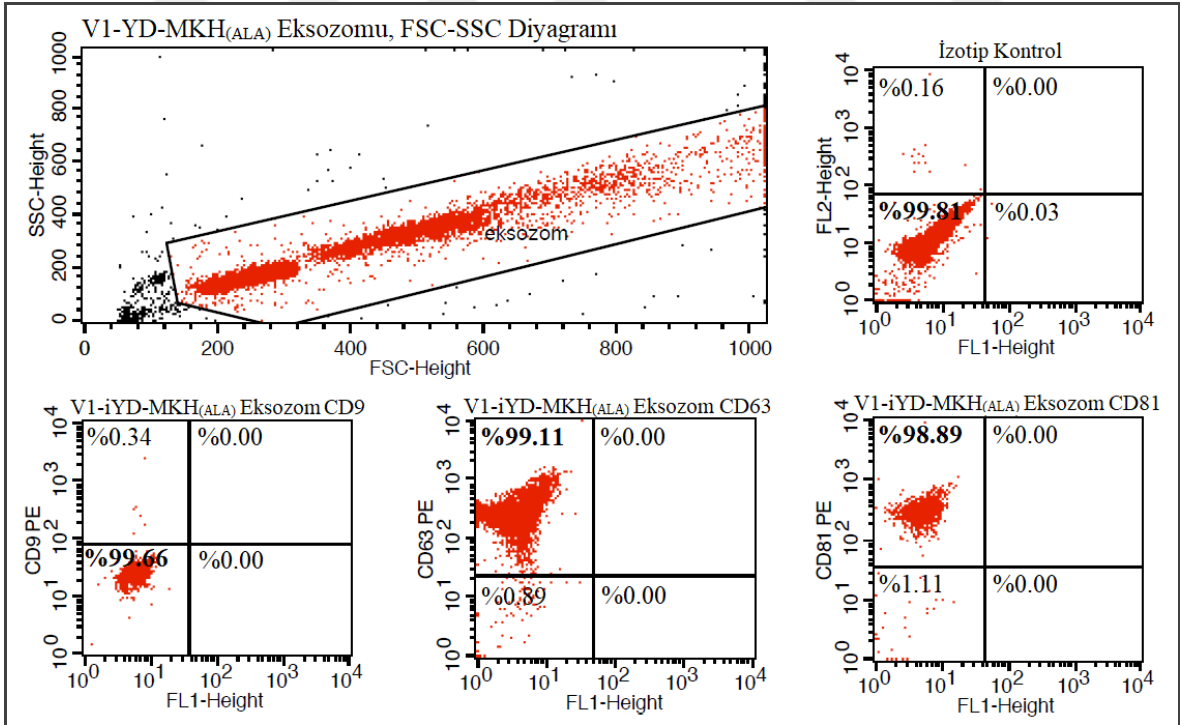
Çizim 4.19. Vaka 2 MKKH ve iYD-MKH'lerinin farklı ALA konsantrasyonlarında gösterdikleri canlılık ve çoğalma grafiği. MKH için seçilmiş güvenli doz (*),MKKH için seçilmiş canlılığı azaltıcı doz (*).

4.6. Eksozomların Akım Sitometri ile İmmünofenotipik Karakterizasyonu

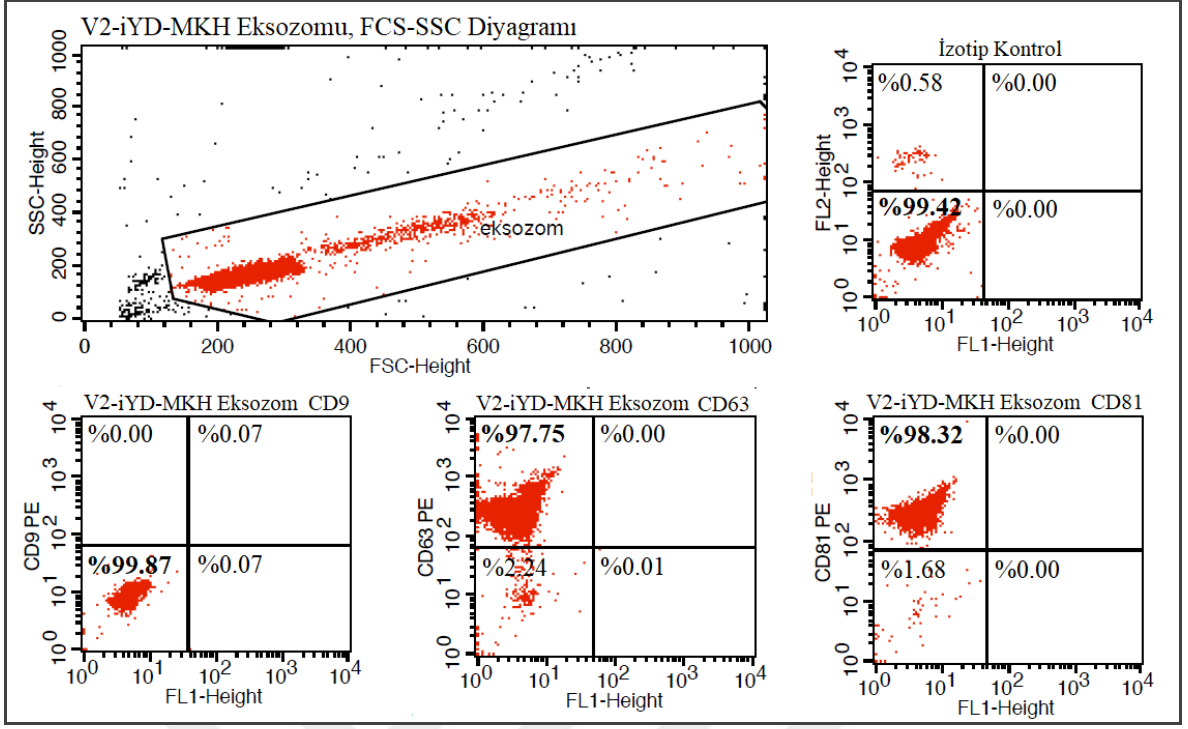
V1-iYD-MKH, V1-iYD-MKH_{ALA}, V2-iYD-MKH ve V1-iYD-MKH_{ALA} hücrelerinden izole edilen eksozomların; CD9, CD63 ve CD81 yüzey belirteçleri akım sitometri yöntemi ile immünofenotipik karakterizasyonu gerçekleştirildi. Yapılan analizler her dört eksozom grubu için de benzer şekilde sonuçlanmıştır. CD9 yüzey belirtecinin pozitifliği, her dört eksozom grubu için de ~%1-0,5'lerin altında bulunarak negatif olarak değerlendirilmiştir. Buna karşın; CD63 ve CD81 yüzey belirteçleri; her dört eksozom grubunda ~%97-99 oranla yüksek pozitiflik göstermiş ve elde edilen MKH sekretomunun, eksozom karakterinde olduğu belirlenmiştir (Çizim 4.20, Çizim 4.21, Çizim 4.22, Çizim 4.23).



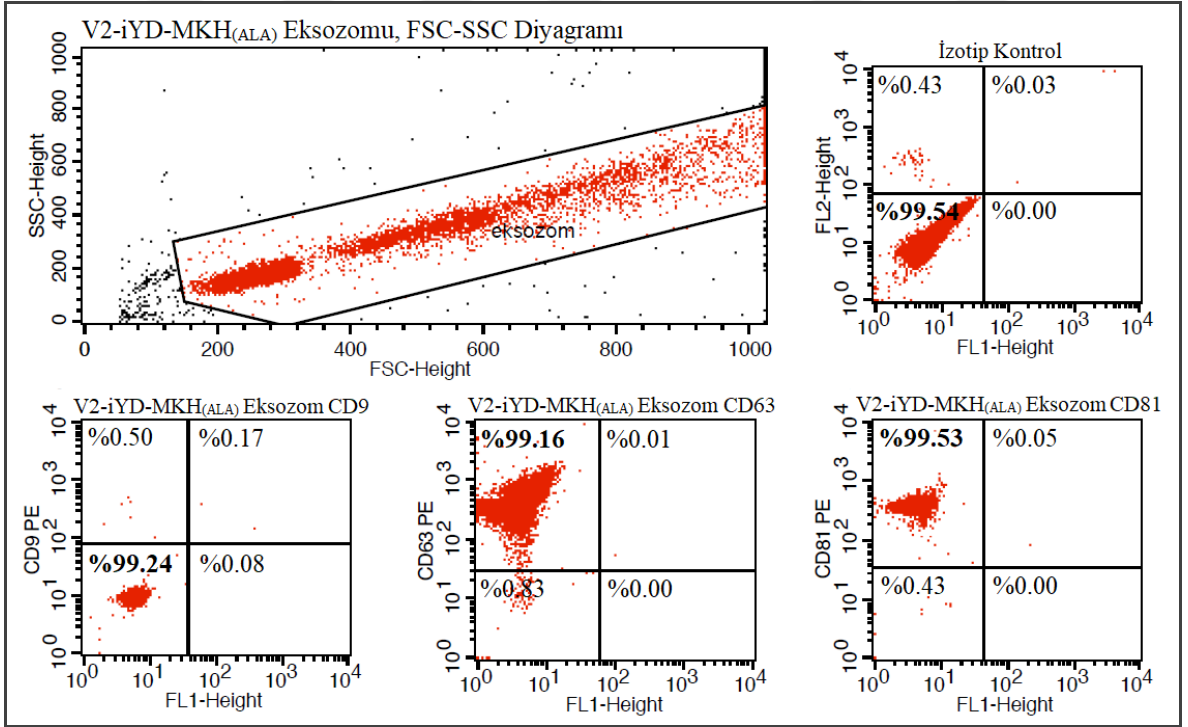
Çizim 4.20. V1-iYD-MKH eksozomlarının; CD9, CD63 ve CD81 eksozom belirteçlerinin akım sitometri analizi.



Çizim 4.21. V1-iYD-MKH_{ALA} eksozomlarının; CD9, CD63 ve CD81 eksozom belirteçlerinin akım sitometri analizi.



Çizim 4.22. V2-iYD-MKH eksozomlarının; CD9, CD63 ve CD81 eksozom belirteçlerinin akım sitometri analizi.

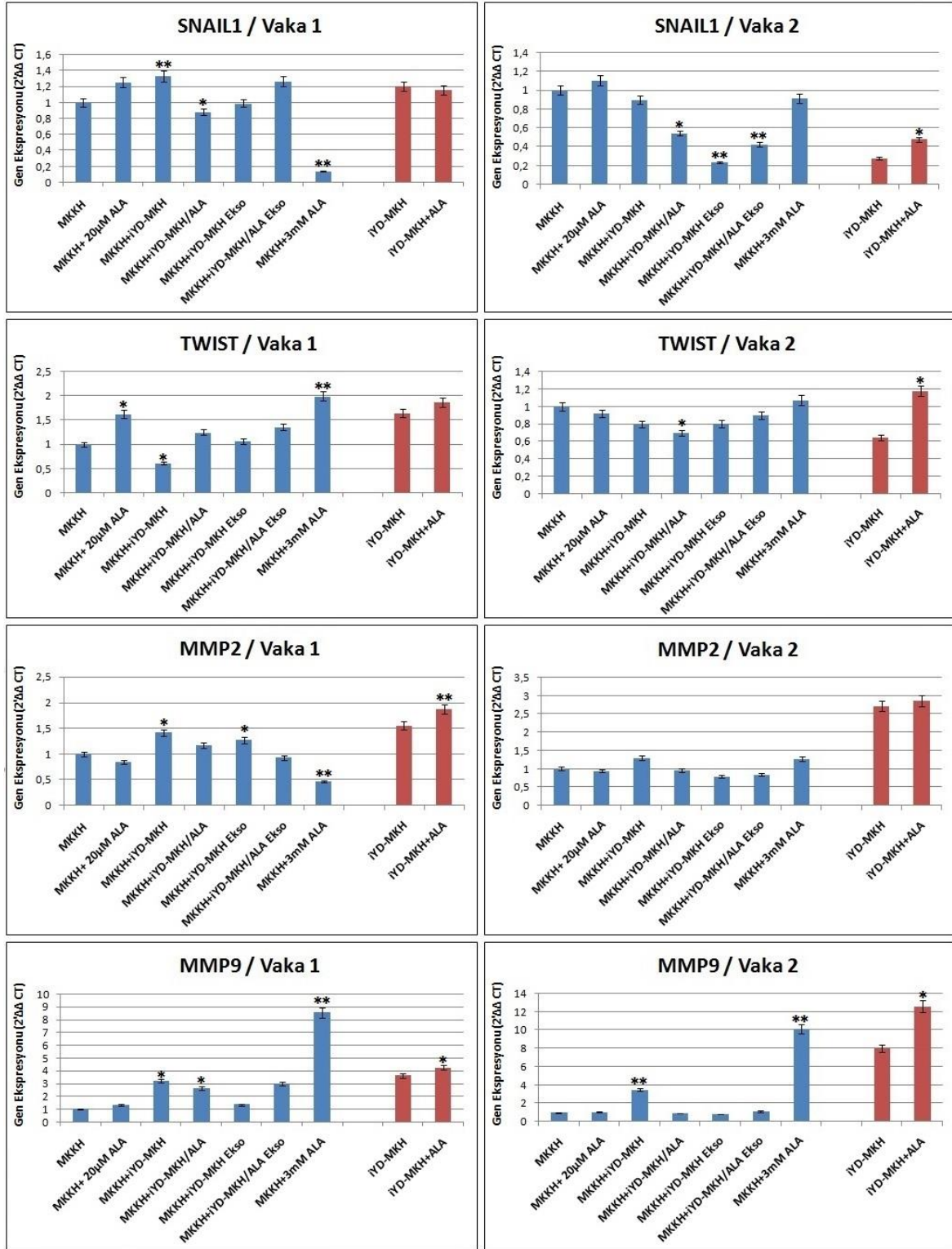


Çizim 4.23. V2-iYD-MKH_{ALA} eksozomlarının; CD9, CD63 ve CD81 eksozom belirteçlerinin akım sitometri analizi.

4.7. Gen Ekspresyonu Analizi

SNAIL1 gen ekspresyonu analizinde V1-MKKH+iYD-MKH ve V2-iYD-MKH_{ALA} gruplarında anlamlı artış görülürken; V1-MKKH+iYD-MKH_{ALA}, V1-MKKH+3mM ALA, V2-MKKH+iYD-MKH_{ALA}, V2-MKKH+iYD-MKH Ekso ve V2-MKKH+iYD-MKH_{ALA} Ekso gruplarında anlamlı bir azalma görülmüştür. TWIST gen ekspresyonu analizinde V1-MKKH+20 μ M ALA, V1-MKKH+3mM ALA ve V2-iYD-MKH_{ALA} gruplarında anlamlı artış görülürken; V1-MKKH+iYD-MKH ve V2-MKKH+iYD-MKH_{ALA} gruplarında anlamlı bir azalma görülmüştür. MMP2 gen ekspresyonu analizinde V1-MKKH+iYD-MKH ve V1-iYD-MKH Ekso gruplarında anlamlı artış görülürken; V1-MKKH+3mM ALA grubunda anlamlı bir azalma görülmüştür. MMP9 gen ekspresyonu analizinde V1-MKKH+iYD-MKH, V1-MKKH+iYD-MKH_{ALA}, V1-MKKH+3mM ALA, V2-MKKH+iYD-MKH V2-MKKH+3mM ALA ve V2- iYD-MKH_{ALA} gruplarında anlamlı artış görülmüştür (Çizim 4.24).

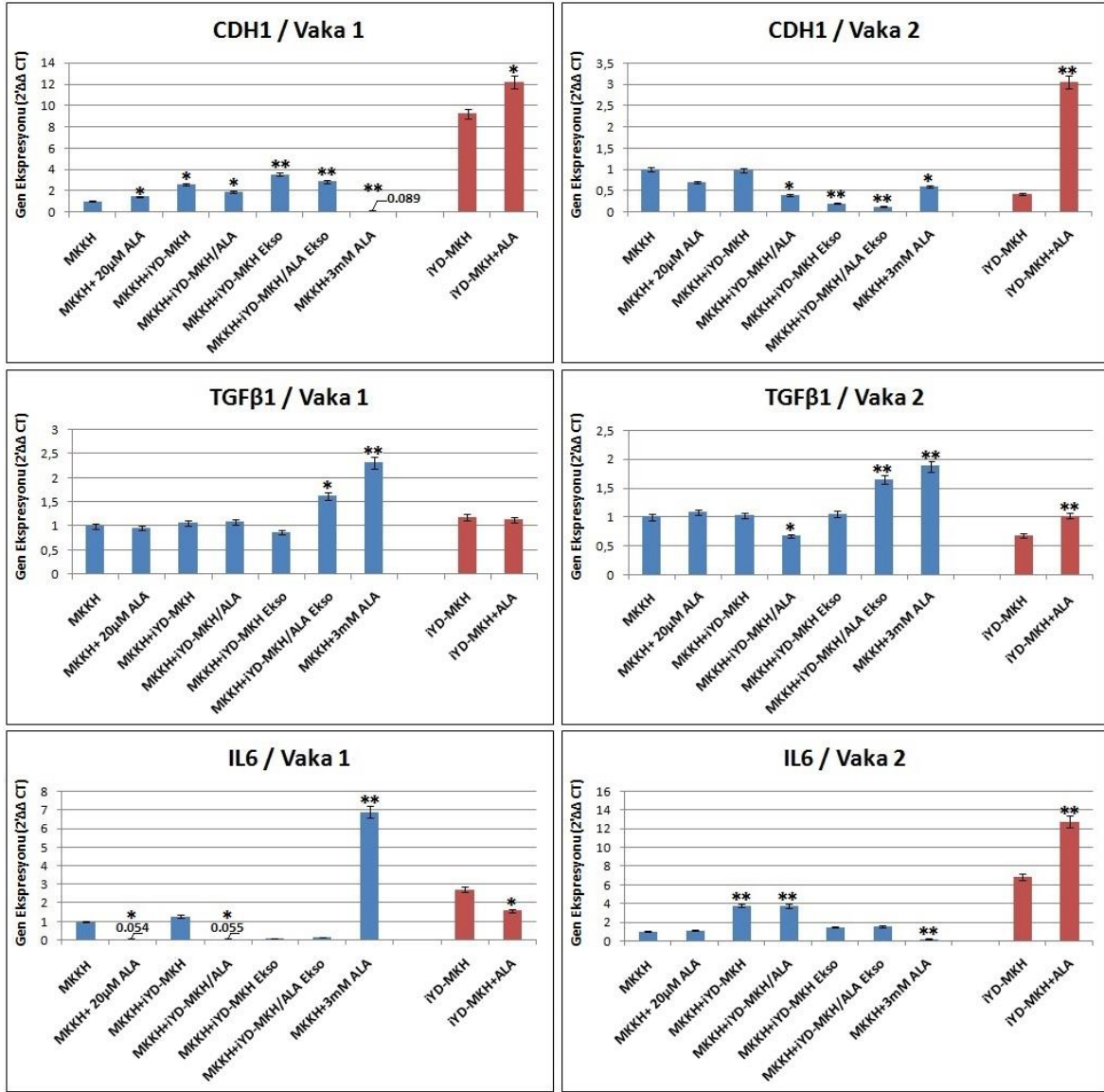
CDH1 gen ekspresyonu analizinde V1-MKKH+20 μ M ALA, V1-MKKH+iYD-MKH, V1-MKKH+iYD-MKH_{ALA}, V1-MKKH+iYD-MKH Ekso, V1-MKKH+iYD-MKH_{ALA} Ekso, V1-iYD-MKH_{ALA} ve V2-iYD-MKH_{ALA} gruplarında anlamlı artış görülürken; V1-MKKH+3mM ALA, V2- MKKH+iYD-MKH_{ALA}, V2-MKKH+iYD-MKH Ekso, V2- MKKH+iYD-MKH_{ALA} Ekso ve V2-MKKH+3mM ALA gruplarında anlamlı bir azalma görülmüştür. TGF- β 1 gen ekspresyonu analizinde, V1-MKKH+iYD-MKH_{ALA} Ekso, V1-MKKH+3mM ALA, V2-MKKH+iYD-MKH_{ALA} Ekso, V2-MKKH+3mM ALA ve V2-iYD-MKH_{ALA} gruplarında anlamlı artış görülürken; MKKH+iYD-MKH_{ALA} grubunda anlamlı bir azalma görülmüştür. IL-6 gen ekspresyonu analizinde V1-MKKH+3mM ALA, V2-MKKH+iYD-MKH, V2-MKKH+iYD-MKH_{ALA} ve V2-iYD-MKH_{ALA} gruplarında anlamlı artış görülürken; V1-MKKH+20 μ M ALA, V1-MKKH+iYD-MKH_{ALA} ve V2-MKKH+3mM ALA gruplarında anlamlı bir azalma görülmüştür (Çizim 4.25).



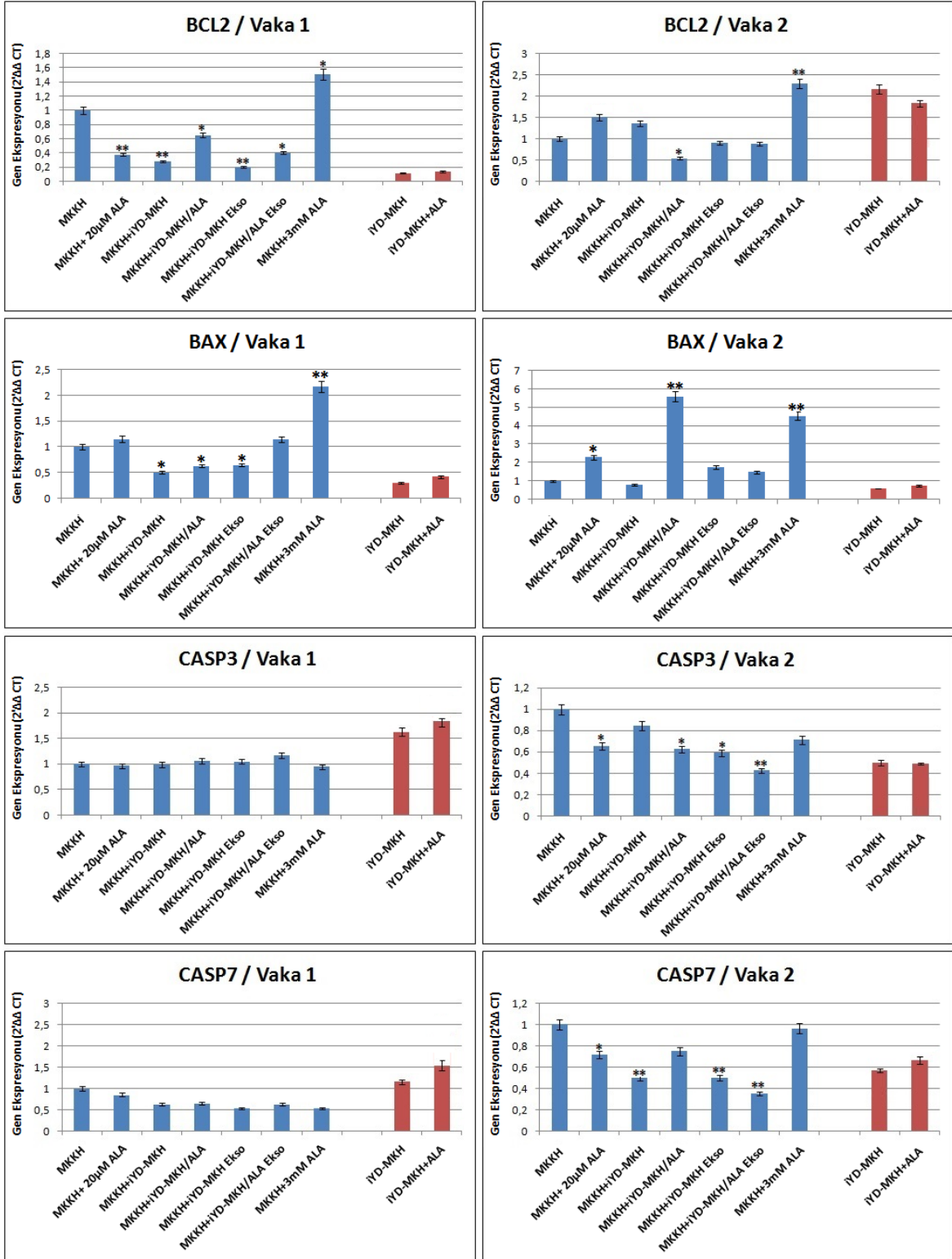
Çizim 4.24. Vaka 1 ve Vaka 2, MKKH ve iYD-MKH gruplarının; SNAIL, TWIST, MMP2 ve MMP9 gen ekspresyonu analiz grafikleri.

BCL2 gen ekspresyonu analizinde V1-MKKH+3mM ALA ve V2-MKKH+3mM ALA gruplarında anlamlı artış görülürken; V1-MKKH+20μM ALA, V1-MKKH+iYD-MKH,

V1-MKKH+iYD-MKH_{ALA}, V1-MKKH+iYD-MKH Ekso, V2-MKKH+iYD-MKH_{ALA} Ekso gruplarında anlamlı bir azalma görülmüştür. BAX gen ekspresyonu analizinde V1-MKKH+3mM ALA, V2-MKKH+20µM ALA, V2-MKKH+iYD-MKH_{ALA} ve V2-MKKH+3mM ALA gruplarında anlamlı artış görülürken; V1-MKKH+iYD-MKH, V1-MKKH+iYD-MKH_{ALA} ve V1-MKKH+iYD-MKH Ekso gruplarında anlamlı bir azalma görülmüştür. CASP3 gen ekspresyonu analizinde V2-MKKH+20µM ALA, V2-MKKH+iYD-MKH_{ALA}, V2-MKKH+iYD-MKH Ekso ve V2-MKKH+iYD-MKH_{ALA} Ekso gruplarında anlamlı bir azalma görülürken, Vaka 1 deney gruplarında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. CASP7 gen ekspresyonu analizinde V2-MKKH+20µM ALA, V2-MKKH+iYD-MKH, V2-MKKH+iYD-MKH Ekso ve V2-MKKH+iYD-MKH_{ALA} Ekso gruplarında anlamlı bir azalma görülürken, Vaka 1 deney gruplarında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır (Çizim 4.26).



Çizim 4.25. Vaka 1 ve Vaka 2, MKKH ve iYD-MKH gruplarının; CDH1, TGF-β1 ve IL-6 gen ekspresyonu analiz grafikleri.

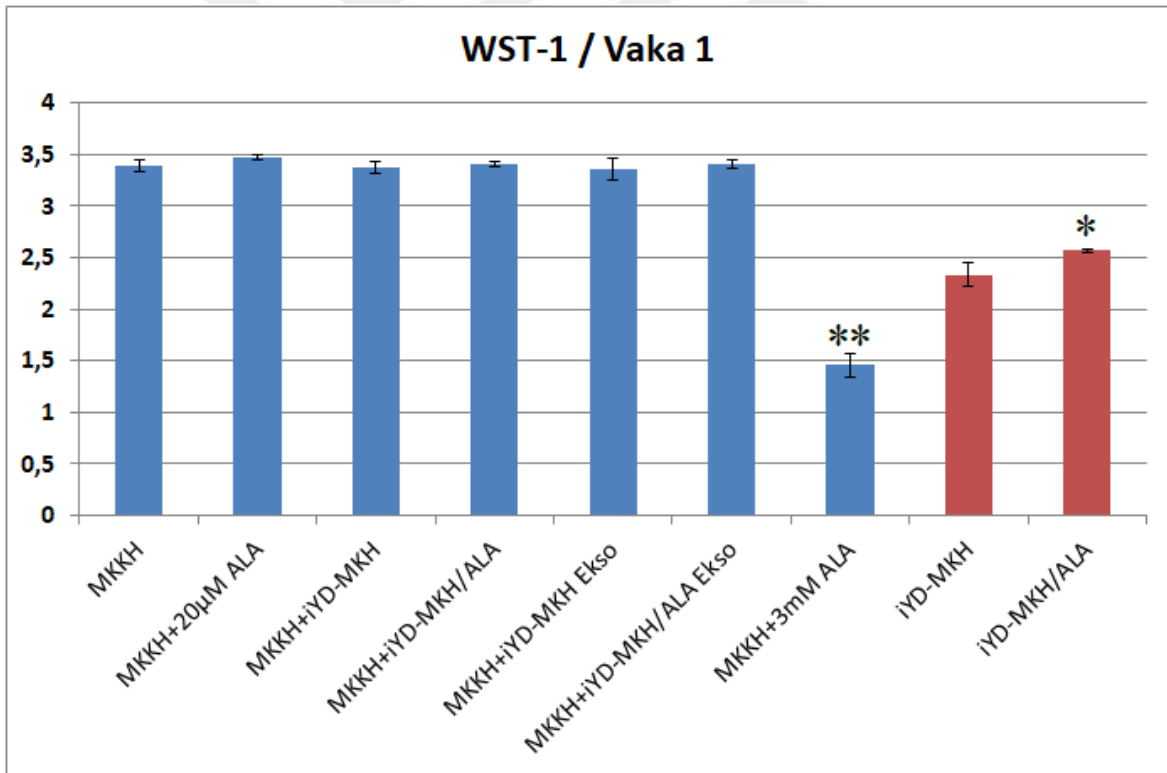


Çizim 4.26. Vaka 1 ve Vaka 2, MKKH ve iYD-MKH gruplarının; BCL2, BAX, CASP3 ve CASP7 gen ekspresyonu analiz grafikleri.

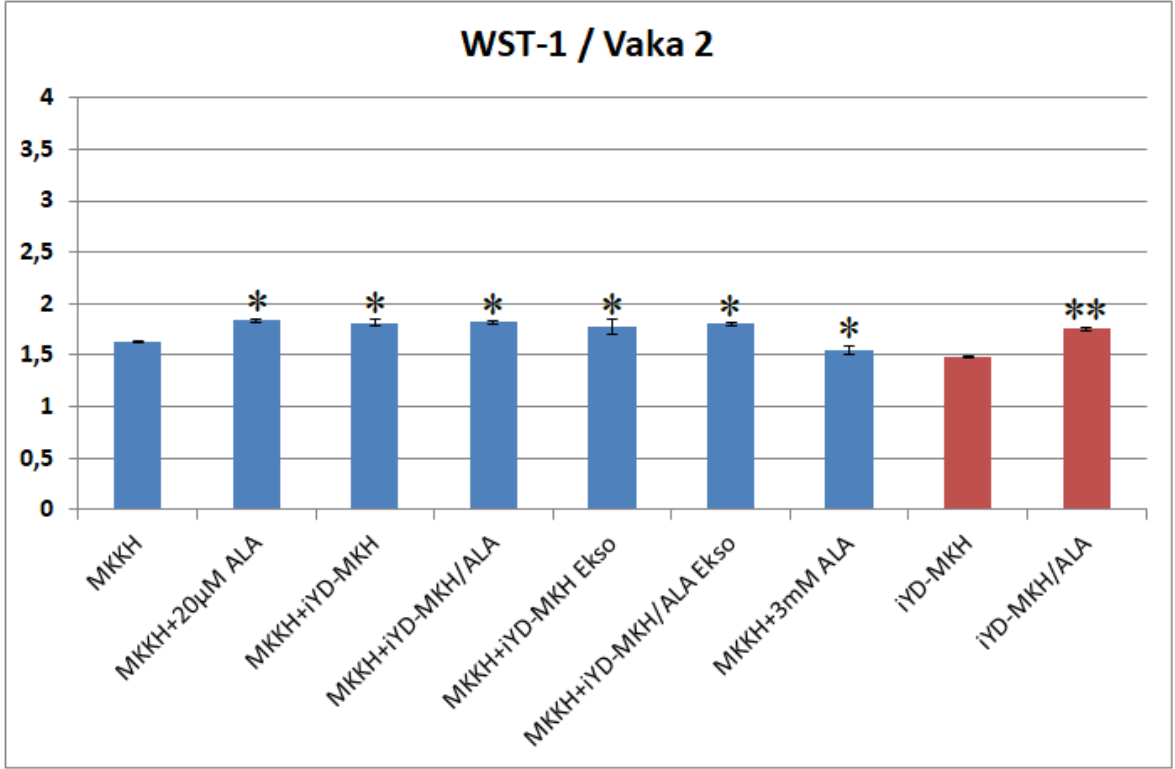
4.8. WST-1 Canlılık ve Proliferasyon Analizi

Deney gruplarına yapılan WST-1 deneyinde; Vaka 1; MKKH+20 μ M ALA, MKKH+iYD-MKH, MKKH+iYD-MKH_{ALA}, MKKH+iYD-MKH Ekso ve MKKH+iYD-MKH_{ALA} Ekso gruplarında kontrol grubu olan MKKH'e göre anlamlı bir fark bulunamazken; MKKH+3Mm ALA grubu hücre canlılığında, ileri derecede anlamlı ($P<0.01$) bir azalma görülmüştür. Vaka 1; iYD-MKH_{ALA} grubu hücre canlılığında, kontrol grubu iYD-MKH'e göre anlamlı ($P<0.05$) artış görülmüştür (Çizim 4.27).

Vaka 2; MKKH+20 μ M ALA, MKKH+iYD-MKH, MKKH+iYD-MKH_{ALA}, MKKH+iYD-MKH Ekso ve MKKH+iYD-MKH_{ALA} Ekso gruplarındaki hücre canlılığında, kontrol grubu MKKH'e göre anlamlı artış bulunurken; MKKH+3Mm ALA grubu hücre canlılığında anlamlı azalma görülmüştür. Vaka 2; iYD-MKH_{ALA} grubu hücre canlılığında, kontrol grubu iYD-MKH'e göre ileri derece anlamlı bir artış görülmüştür (Çizim 4.28).



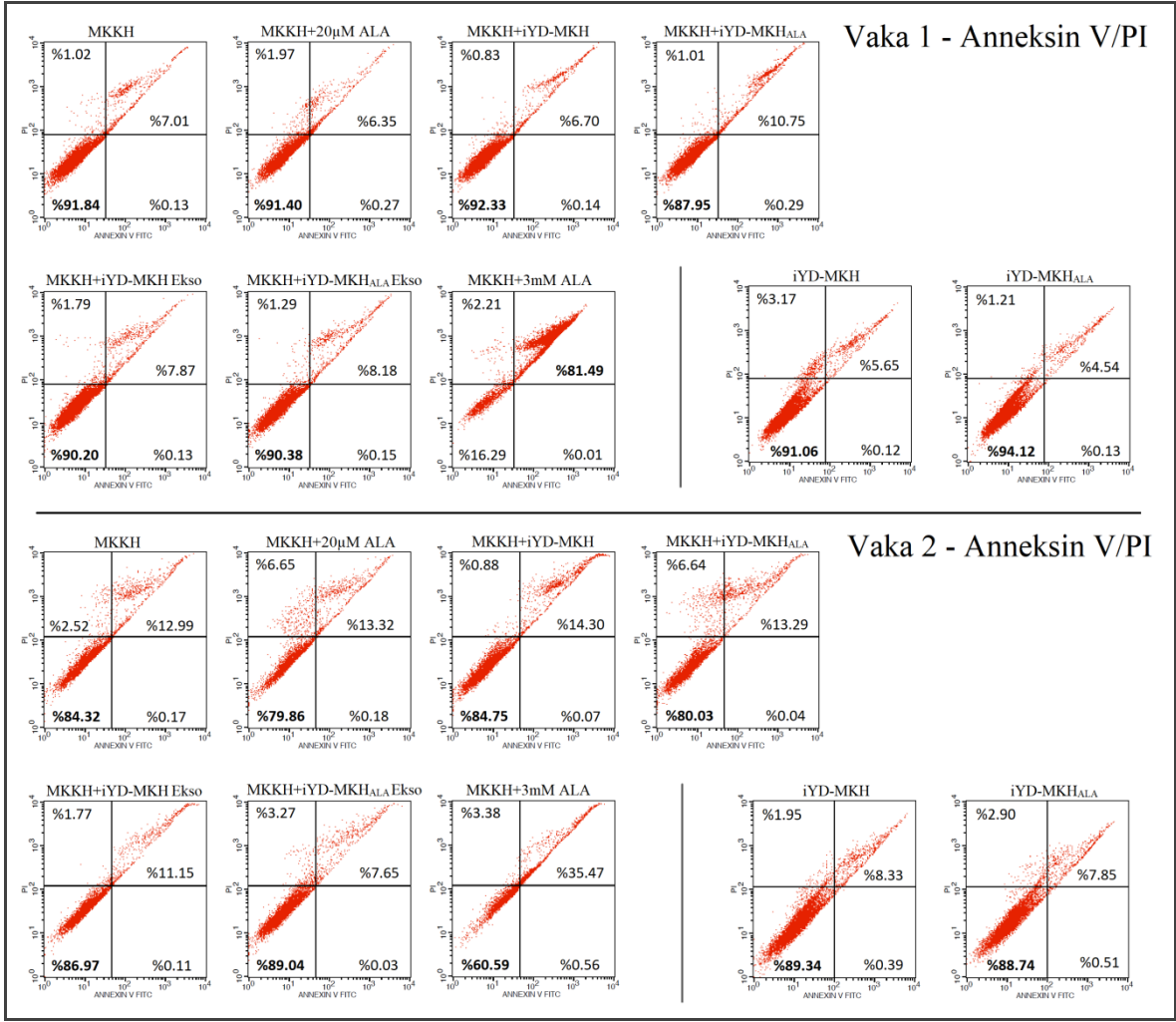
Çizim 4.27. Vaka 1; MKKH ve iYD-MKH deney gruplarının WST-1 canlılık ve proliferasyon analizi (* $P<0.05$, ** $P<0.01$).



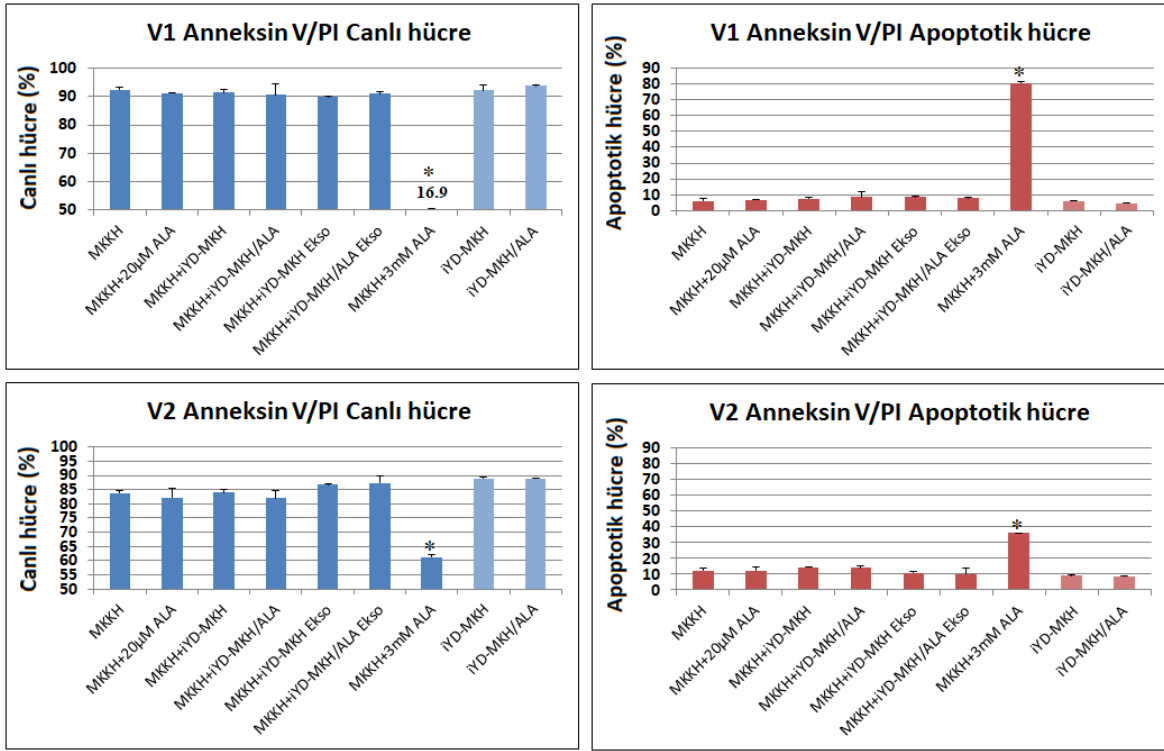
Çizim 4.28. Vaka 2; MKKH ve iYD-MKH deney gruplarının WST-1 canlılık ve proliferasyon analizi (* P<0.05, ** P<0.01).

4.9. Anneksin V/PI Apoptoz Tayini

Yapılan Anneksin V/PI apoptoz tayininde her iki vakada da; MKKH+20µM ALA, MKKH+iYD-MKH, MKKH+iYD-MKH_{ALA}, MKKH+iYD-MKH Ekso, MKKH+iYD-MKH_{ALA} Ekso grupları MKKH kontrol grubuna görece anlamlı bir değişim görülmezken; MKKH+3mM ALA grubundaki artmış apoptotik hücre ve korale olarak azalmış hücre canlılığı ileri derecede anlamlı bulunmuştur. Her iki vakada da; iYD-MKH ve iYD-MKH_{ALA} gruplarının apoptoz ve canlılık parametrelerinde anlamlı bir farklılık görülmemiştir (Çizim 4.29 ve Çizim 4.30).



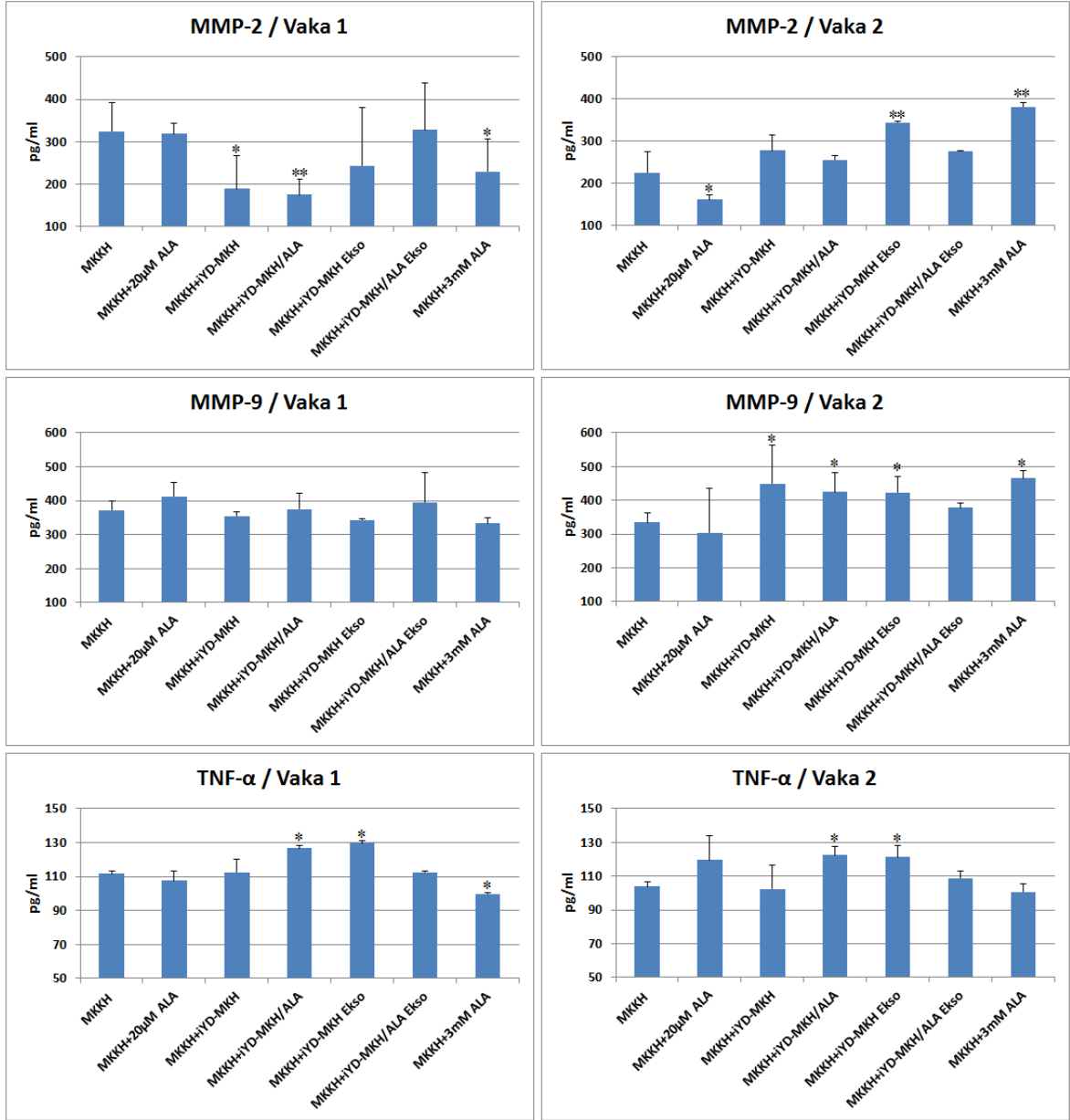
Çizim 4.29. Vaka 1 ve Vaka 2 deney gruplarının Annexin V/PI boyamalarının akım sitometrik apoptoz analizi.



Çizim 4.30. Vaka 1 ve Vaka 2 deney gruplarının Anneksin V/PI apoptoz analizi sonuçlarına göre canlı ve apoptotik hücre grafikleri (* P<0.01).

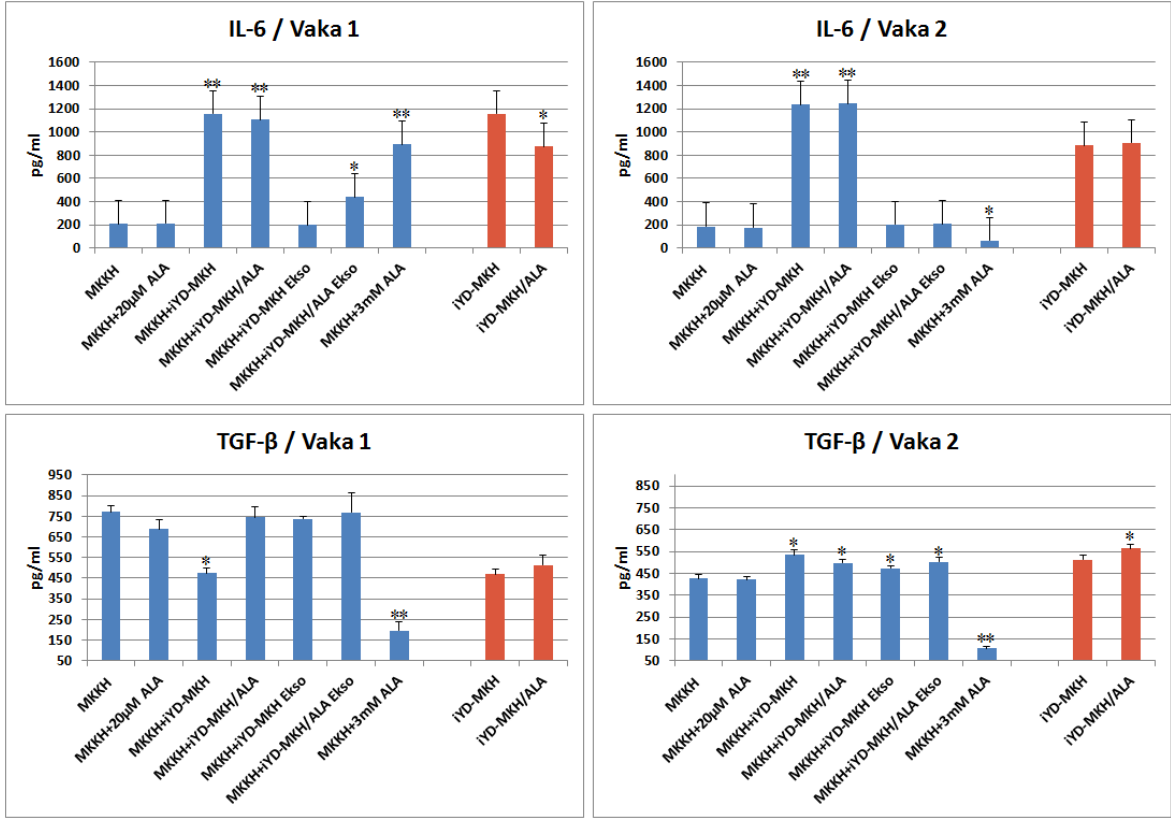
4.10. ELİSA Analizi

MMP-2 ELİSA analizinde V2-MKKH+iYD-MKH Ekso ve V2-MKKH+3mM ALA gruplarında anlamlı artış görülürken; V1-MKKH+iYD-MKH, V1-MKKH+iYD-MKH_{ALA}, V1-MKKH+3mM ALA ve V2-MKKH+20µM ALA gruplarında anlamlı bir azalma görülmüştür. MMP-9 ELİSA analizinde V2-MKKH+iYD-MKH, V2-MKKH+iYD-MKH_{ALA}, V2-MKKH+iYD-MKH Ekso ve V2-MKKH+3mM gruplarında anlamlı artış görülürken; iki vakanın deney gruplarında da anlamlı bir azalma görülmemiştir. TNFα ELİSA analizinde V1-MKKH+iYD-MKH_{ALA}, V1-MKKH+iYD-MKH Ekso, V1-MKKH+iYD-MKH_{ALA} ve V2-MKKH+iYD-MKH Ekso gruplarında anlamlı artış görülürken; V1-MKKH+3mM ALA grubunda anlamlı bir azalma görülmüştür (Çizim 4.31).



Çizim 4.31. Vakal ve Vaka 2 MKKH deney gruplarının; MMP-2, MMP-9 ve TNF- α sitokinlerinin ELİSA analizi (*P<0.05, **P<0.01).

IL-6 ELİSA analizinde V1-MKKH+iYD-MKH, V1-MKKH+iYD-MKH_{ALA}, V1-MKKH+iYD-MKH_{ALA} Ekso, V1-MKKH+3mM ALA, V2-MKKH+iYD-MKH ve V2-MKKH+iYD-MKH_{ALA} gruplarında anlamlı artış görülürken; V1-iYD-MKH_{ALA} ve V2-MKKH+3mM ALA gruplarında anlamlı bir azalma görülmüştür. TGF- β ELİSA analizinde V2-MKKH+iYD-MKH, V2-MKKH+iYD-MKH_{ALA}, V2-MKKH+iYD-MKH Ekso, V2-MKKH+iYD-MKH_{ALA} Ekso ve V2-iYD-MKH_{ALA} gruplarında anlamlı artış görülürken; V1-MKKH+iYD-MKH, V1-MKKH+3mM ALA ve V2-MKKH+3mM ALA gruplarında anlamlı bir azalma görülmüştür (Çizim 4.32).



Çizim 4.32 Vaka1 ve Vaka 2 MKKH, iYD-MKH deney gruplarının; IL-6 ve TGF-β ELİSA analizi (*P<0.05, **P<0.01).

4.11. İmmünfloresan Boyama

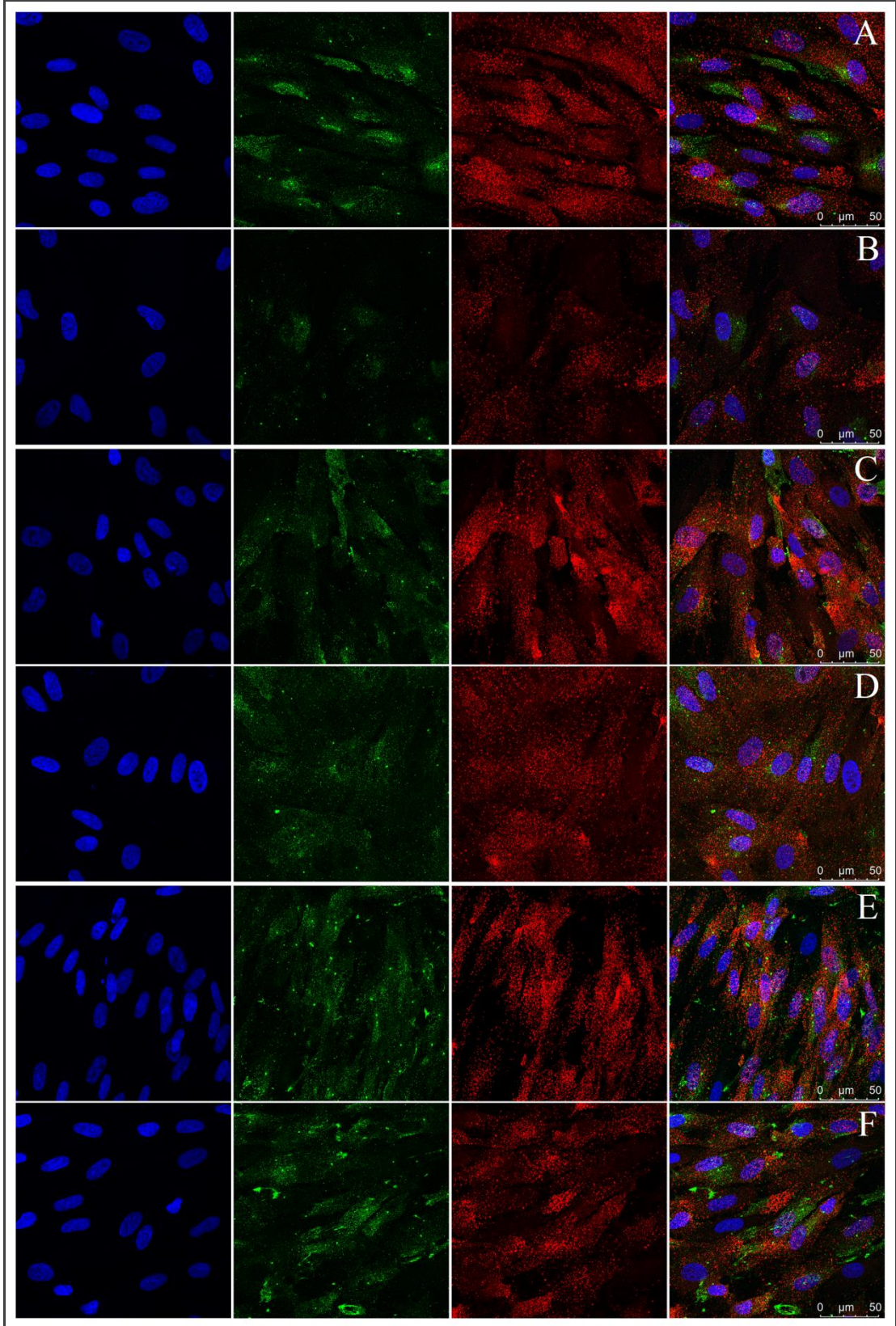
İmmünfloresan boyama sonuçlarında genel bakışta her iki vaka MKKH'ler için hem MMP-2 hem MMP-9 boyamalar pozitif bulunurken, Vaka 1 MKKH'lerde bu pozitifliğin daha fazla olduğu görülmüştür. Her iki vakanın deney grupları karşılaştırıldığında gruplar arasındaki değişimlerde benzerlik bulunmuştur (Çizim 4.32 ve Çizim 4.33).

Vaka 1 ve Vaka 2'nin MKKH+20µM ALA grubuna bakıldığında; güvenli dozda ALA eklentisinin MKKH'lerde hem MMP-2 hem MMP-9 ifadesinde azalma ile sonuçlandığı görülmüştür. Vaka 1 MKH ko-kültür gruplarında anlamlı bir fark bulunamazken; Vaka 2 ko-kültür gruplarının her ikisinde de kontrole oranla MMP-2 ve MMP-9 boyamalarında belirgin azalma gözlenmiştir. Eksozom deney gruplarında kontrol grubuna oranla MMP-2 boyamasında artış gözlenmiştir. Vaka1'in her iki eksozom grubunda da MMP-2 boyamasında artış gözlenirken, MMP-9 boyamasında anlamlı bir fark bulunamamıştır. Vaka 2 eksozom gruplarının her ikisinde de kontrole oranla MMP-2 ve MMP-9 boyamalarında belirgin azalma bulunurken; MKKH+iYD-MKH_{ALA} Ekso

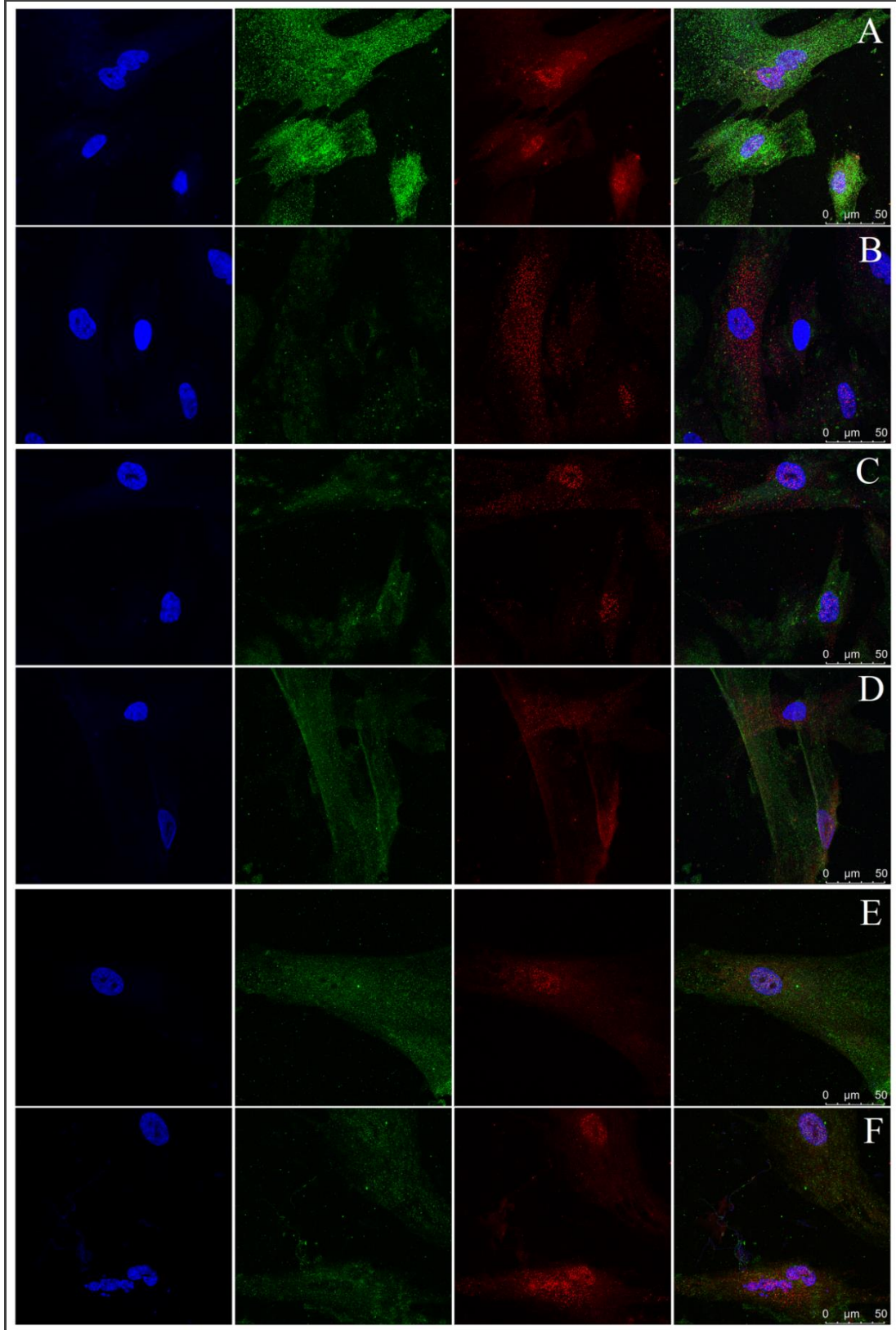
grubunda, MKKH kontrole oranla görülen MMP-2 boyamasındaki azalma, MKKH+iYD-MKH Ekso grubundaki azalmadan daha fazla bulunmuştur.

MKH deney gruplarında Vaka 1 ve Vaka 2 boyamaları benzeri benzer şekilde sonuçlanmıştır. Her iki vakada da; iYD-MKH_{ALA} deney grubunda, kontrol olan iYD-MKH grubuna oranla MMP-2 ve MMP-9 boyamalarında belirgin artış gözlenmiştir (Çizim 4.35).

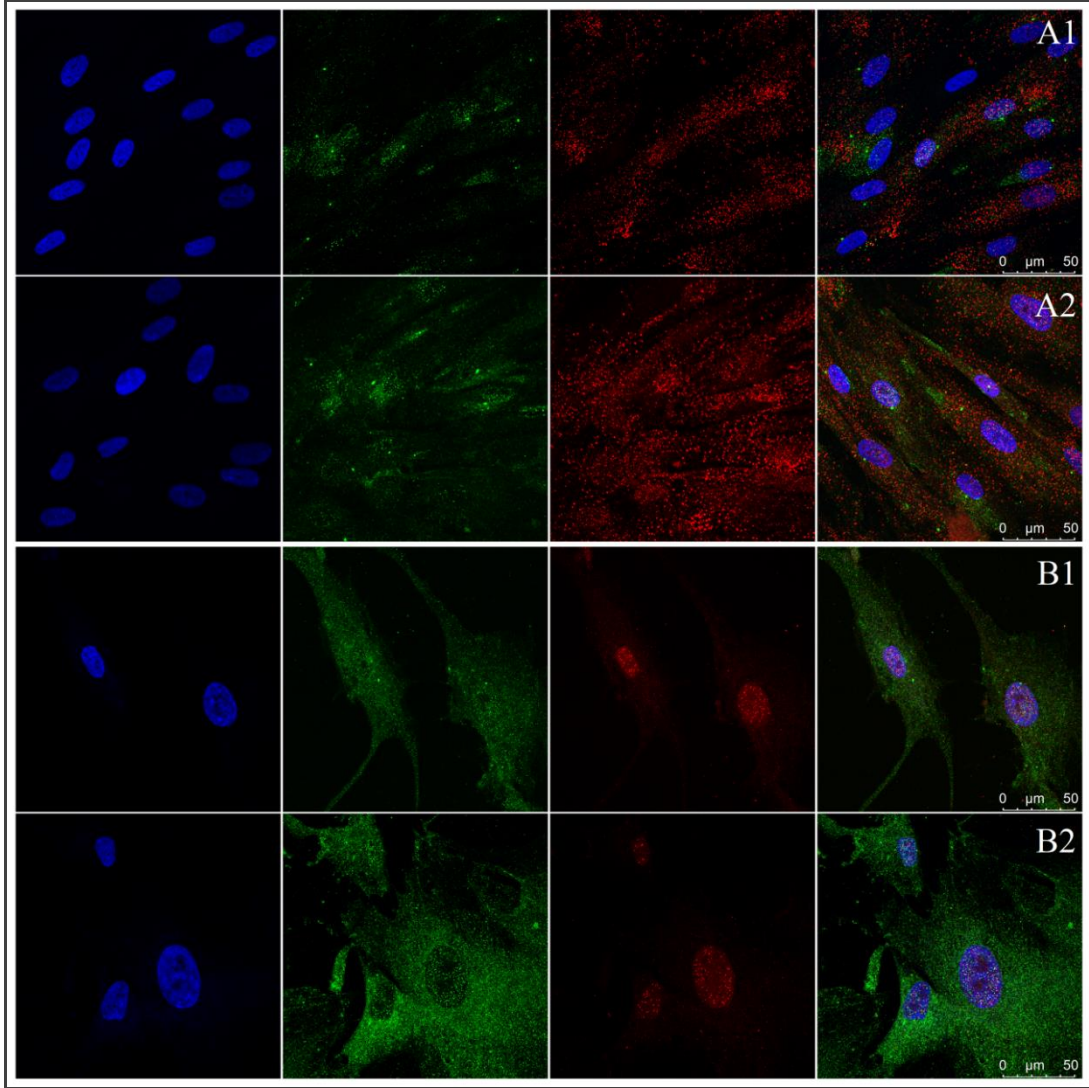




Çizim 4.33. Vaka 1 MKKH deney gruplarının; çekirdek boyası DAPI (Mavi), MMP-2 (Yeşil) ve MMP-9 (Kırmızı) immünfloresan boyamalarının konfokal mikroskop görüntüleri. MKKH (A), MKKH+20 μ M ALA (B), MKKH+iYD-MKH (C), MKKH+iYD-MKH_{ALA} (D), MKKH+iYD-MKH Ekso (E), MKKH+iYD-MKH_{ALA} Ekso (F). Ölçüm çubuğu: 50 μ m.



Çizim 4.34. Vaka 2 MKKH deney gruplarının; çekirdek boyası DAPI(Mavi), MMP-2 (Yeşil) ve MMP-9 (Kırmızı) immünfloresan boyamalarının konfokal mikroskop görüntüleri. MKKH (A), MKKH+20µM ALA (B), MKKH+iYD-MKH (C), MKKH+iYD-MKH_{ALA} (D), MKKH+iYD-MKH Ekso (E), MKKH+iYD-MKH_{ALA} Ekso (F). Ölçüm çubuğu: 50µm.



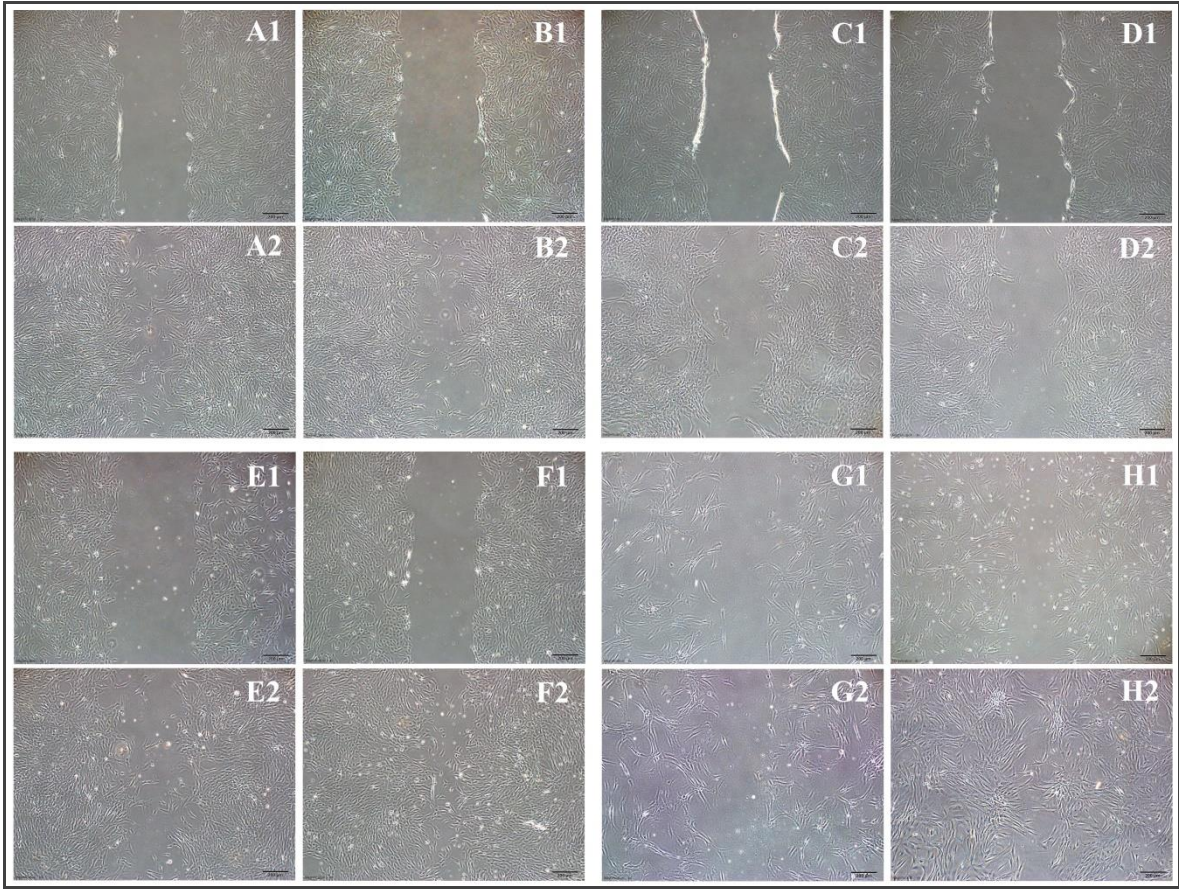
Çizim 4.35. Vaka 1 iYD-MKH (A1), iYD-MKH_{ALA} (A2) ve Vaka2 iYD-MKH (B1), iYD-MKH_{ALA} (B2) deney gruplarının; çekirdek boyası DAPI(Mavi), MMP-2 (Yeşil) ve MMP-9 (Kırmızı) immünfloresan boyamalarının konfokal mikroskop görüntüleri. Ölçüm çubuğu: 50µm.

4.12. Migrasyon Deneyi (*Wound Healing*)

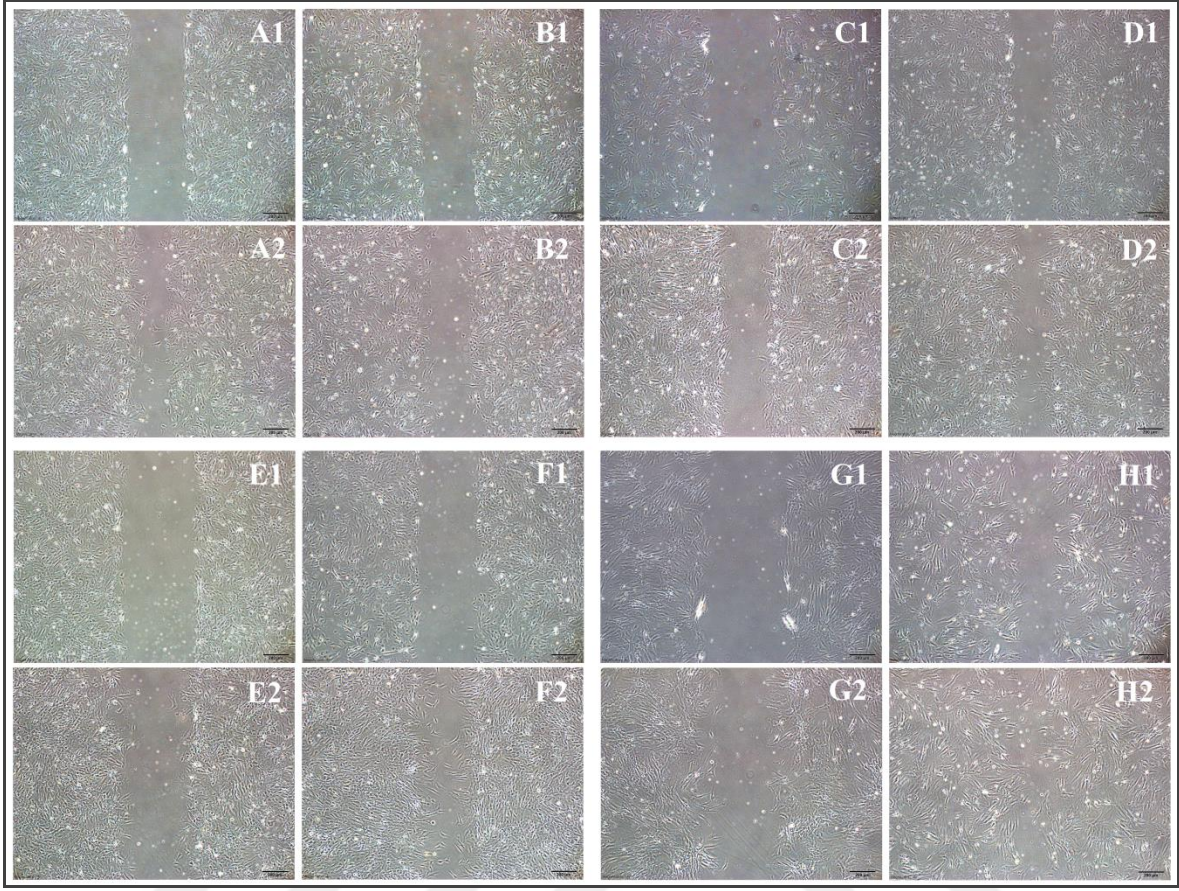
6 kuyucuklu plakalara ekili hücreler %70-80 doluluğa ulaştığında pipet ucu yardımıyla, hücrelerin yapıştığı kültür yüzeyinde çizikler oluşturuldu. Migrasyon deneyinin 0. ve 2. günlerinde faz-contrast mikroskop görüntüsü alınarak, hücrelerin çizilmiş bölgeye olan migrasyonları gruplar arasında karşılaştırmalı olarak değerlendirildi.

Genel bakışta; V1-MKKH'lerin migrasyon yeteneği, nispeten V2-MKKH'lerden daha gelişmiş olarak gözlemlendi. Kültürdeki 20µM ALA eklentisi, hem vaka 1 hem vaka 2 grubu için; MKKH'lerde migrasyonu azaltıcı etki göstermiş olmasına karşın, iYD-MKH'lerde migrasyonu artırıcı etki gösterdi. Vaka 1'de; MKKH'lerin, iYD-MKH ve iYD-

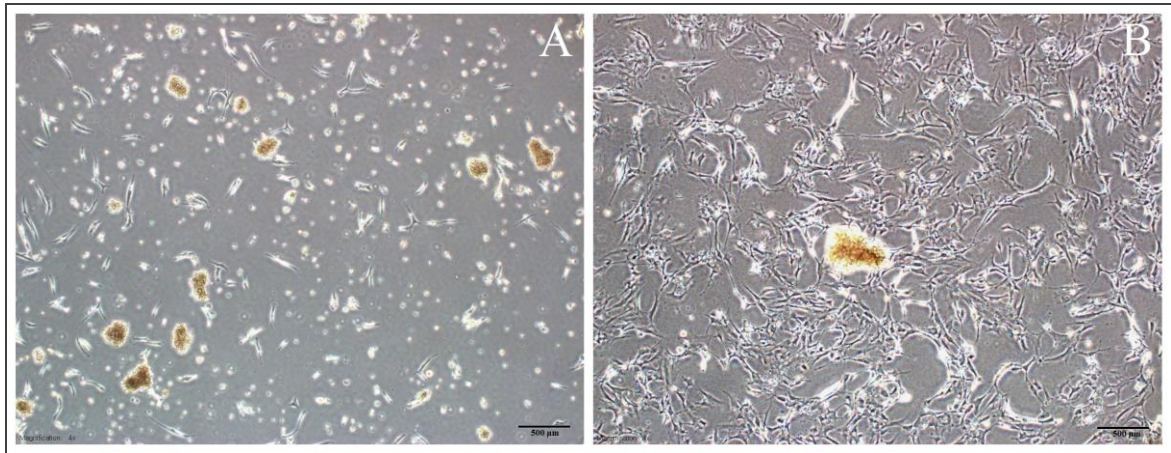
MKH_{ALA} ile ortak kültürü migrasyonu azaltıcı etki gösterirken; Vaka 2’de anlamlı bir fark görülmedi. Her iki vakada da; iYD-MKH eksozomları MKKH migrasyonu üzerine azaltıcı etki gösterirken, iYD-MKH_{ALA} eksozomlarının belirgin bir etkisi görülmedi (Çizim 4.36 ve Çizim 4.37). ‘MKKH+3mM ALA’ deney grubu canlılığı azaltıcı ALA dozunun etkisi ile migrasyon deneyi için gerekli olan %70-80 doluluğa ulaşamadığından dolayı migrasyon deneyine alınmadı (Çizim 4.38).



Çizim 4.36. Vaka 1 MKKH ve iYD-MKH deney gruplarının migrasyon deneyi. MKKH (A1-A2), MKKH+20µM ALA (B1-B2), MKKH+iYD-MKH ko-kültür (C1-C2), MKKH+iYD-MKH_{ALA} ko-kültür (D1-D2), MKKH+iYD-MKH-Eksozom (E1-E2), MKKH+iYD-MKH_{ALA}-Eksozom (F1-F2), iYD-MKH iYD-MKH_{ALA}(H1-H2). 0. gün (A1, B1, C1, D1, E1, F1, H1,) ve 2. gün (A2, B2, C2, D2, E2, F2, G2, H2) faz-kontrast mikroskop görüntüleri. Ölçüm çubuğu: 500µm.



Çizim 4.37. Vaka 2 MKKH ve iYD-MKH deney gruplarının migrasyon deneyi. MKKH (A1-A2), MKKH+20 μ M ALA (B1-B2), MKKH+iYD-MKH ko-kültür (C1-C2), MKKH+iYD-MKH_{ALA} ko-kültür (D1-D2), MKKH+iYD-MKH-Eksozom (E1-E2), MKKH+iYD-MKH_{ALA}-Eksozom (F1-F2), iYD-MKH iYD-MKH_{ALA} (H1-H2). 0. gün (A1, B1, C1, D1, E1, F1, H1,) ve 2. gün (A2, B2, C2, D2, E2, F2, G2, H2) faz-kontrast mikroskop görüntüleri. Ölçüm çubuğu: 500 μ m.



Çizim 4.38. Vaka 1 MKKH+3mM ALA (A) ve Vaka 2 MKKH+3mM ALA (B) deney gruplarının 2. gün faz-kontrast mikroskop görüntüleri. Ölçüm çubuğu: 500 μ m.

5. TARTIŞMA

Meme kanseri, kadınlarda en sık görülen malignitedir ve karsinomaya bağlı ölümlerinin başında gelmektedir. Meme kanserinin dünya üzerindeki insidansı her geçen yıl %0.05 oranda artış göstermektedir (DeSantis ve diğ. 2013). Meme kanseri olan hastalarda tümör nüksü, metastaz hızı ve mortalitesi yüksektir. Meme kanserinin, memede lenfatik damarların mevcudiyetinden dolayı organlara yayılımı kolaydır ve akciğerlerin, karaciğerin, beyinin ve diğer organların etkilenmesiyle sonuçlanan yüksek oranda metastaz ile karakterizedir (Hai 2017). Tanı ve tedavide yeni gelişmelerin artmasına rağmen, günümüzde hala önemli bir morbidite ve mortalite nedenidir (Işıkdöğün ve diğ. 2003).

MKH'ler ve MKH eksozomları; kanser dahil pek çok hastalığa yönelik tasarlanabilmesi ve immünojenik olmaması gibi önemli terapötik özelliklere sahiptirler. ALA; meme (Kuban ve diğ. 2017), over (Kafara ve diğ. 2015), kolorektal (Dorsam ve diğ. 2015) ve akciğer (Puchsaka ve diğ. 2016) gibi çeşitli kanser hücre dizileri üzerinde kanser karşıtı özellikleri gösterilmiş, güçlü bir antioksidandır.

Bu çalışmada ALA'nın MKKH'ler ve iYD-MKH'ler üzerine direk etkisi; ALA ile uyarılmış iYD-MKH'lerin indirek ve ALA ile zenginleştirilmiş iYD-MKH eksozomlarının MKKH üzerine direk etkileri incelenmiştir. İki IDC tanısı almış hastanın tümör dokusundan MKKH izolasyonu başarıyla yapılmış, kültür ortamındaki morfolojileri ve çoğalmaları takip edilmiştir. Vaka 1 MKKH'lerin kültür koşullarında Vaka 2 MKKH'lere kıyasla daha hızlı çoğalması, WST-1 canlılık deneyinde daha proliferatif özellik sergilemesi ve IF boyama sonuçlarında daha yoğun MMP2-MMP9 boyama göstermiş olmasıyla daha agresif bir kanser kök hücresi profili sergilemiştir. Bu durumu vericilerin kanser derecelendirmesinden ve tümör histopatolojik özelliklerindeki farktan ileri geldiğini düşünmekteyiz (Bak. Çizelge 3.1). V1-MKKH ve V2-MKKH'ler akım sitometri analizlerinde CD44⁺/CD24⁻ karakteriyle kanser kök hücresi olarak tanımlanmıştır (Bak. Çizim 4.4 ve Çizim 4.5). KKH'lerdeki yüksek ALDH ekspresyonu; ilaç dirençliliği ve tümör nüksü ile ilişkilendirilmektedir. Yapılan çalışmalar yüksek ALDH ekspresyonunun, meme kanseri hastalarında kötü prognozla korele olduğunu göstermiştir. ALDH ayrıca; benzer özellikler gösteren malign kök hücreleri sağlıklı kök hücrelerden ayırıcı bir belirteçtir (Ginestier ve diğ. 2007). CD133 ise solid tümör kanser kök hücrelerinde pozitif görülen bir başka KKH biyobelirtecidir ve pek çok mekanizmayla KKH'leri modüle eder (Paige ve Aoran 2018). Çalışmada izole edilen tümör hücrelerine yapılan ALDH

analizinde ikili ALDH/CD133 boyaması yapılmış; analiz sonucunda Vaka1 ve Vaka 2 MKKH'ler yüksek pozitiflik göstererek ALDH/CD133 bakımından da kanser kök hücresi özelliği sergilemiştir (Bak. Çizim 4.6, Çizim 4.7). KKH'lerin sferoid oluşturma özelliklerine dayanılarak, mamosfer oluşturma deneyi MKKH karakterizasyonu için bir kriter olarak kabul edilmektedir. Çalışmada elde edilen Vaka 1 ve Vaka 2 MKKH'ler hem Jenerasyon 1'de hem Jenerasyon 2'de mamosfer oluşumu göstermişlerdir (Bak. Çizim 4.8 ve Çizim 4.9). Ancak vakalar karşılaştırıldığında V1-MKKH MFE değerinin V2-MKKH'den daha yüksek olduğu saptanmıştır. Jenerasyonlar arası MFE değerleri karşılaştırıldığında; V1-MKKH Jenerasyon 2'de Jenerasyon 1'e oranla anlamlı artış görülürken, V2-MKKH Jenerasyon 2'de Jenerasyon 1'e oranla azalma görülmüştür. (Bak. Çizim 4.10). Bu sonuç da iki vakanın kanser kök hücreleri arasındaki malignite farkını doğrular niteliktedir.

MKKH'lerin elde edildiği, IDC tanılı aynı vericilerin sağlıklı meme yağ dokusundan; başarılı bir şekilde iYD-MKH izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Hücreler iğsi formda fibroblast benzeri MKH morfolojileriyle ve kültür ortamında gösterdiği yüksek çoğalma kapasitesiyle MKH özelliklerine uyumlu olduğu gözlenmiştir (Bak. Çizim 4.11 ve Çizim 4.12). Ancak vakalar arası karşılaştırma yapıldığında; Vaka 2 iYD-MKH'lerin kültür koşullarında Vaka 1 iYD-MKH'lere kıyasla daha hızlı çoğalmış ve WST-1 canlılık deneyinde de görüldüğü gibi daha proliferatif özellik sergilemiştir (Bak. Çizim 4.18 ve Çizim 4.19). Vakalar arası iYD-MKH'lerdeki bu farkın; Vaka 2 vericisinin Vaka 1 vericisinden daha genç olmasından ileri geldiğini düşünmekteyiz. Hücrelerin akım sitometri karakterizasyonunda; CD73, CD90, CD105, CD13, CD29, CD140b ve CD166 mezenkimal kök hücre belirteçlerinde yüksek pozitif ifade gösterirken; HLA-DR, CD45, CD 34, CD24, CD19, CD14 ve CD11b gibi hematopoetik ve epitelyal hücre belirteçlerinin ifadesi negatif olarak saptandı (Bak. Çizim 4.14 ve Çizim 4.15). Hücreler farklılaştırma karakterizasyonu için 3 hafta süreyle adipojenik ve osteojenik farklılaştırma deneyine alındılar. Takiben yapılan adipojenik ve osteojenik boyamalarda saptanan pozitiflik, farklılaştırmaların başarılı olduğunu kanıtlamıştır (Bak. Çizim 4.16 ve Çizim 4.17). İzole edilen stromal hücreler; akım sitometri analizi ve farklılaştırma deneyleri neticesinde mezenkimal kök hücre olarak tanımlanmıştır.

WST-1 canlılık deneyinde; iYD-MKH'ler için güvenli ALA dozu 20 μ M olarak saptanmıştır (Bak. Çizim 4.18 ve Çizim 4. 19). Hücreler 20 μ M ALA ile iki pasaj boyunca kültüre edilerek her iki vaka için de iYD-MKH_{ALA} hücre grubu oluşturulmuştur. ALA ile

uyarılmış olan iYD-MKH_{ALA}'ler ve uyarılmamış iYD-MKH'ler; istenen miktarda eksozom elde etmeye yetecek şekilde çoğaltıldı. Ultrasantrifüj yöntemiyle hücre supernatantlarından eksozom izolasyonu yapıldı. İzole edilen eksozomların CD9, CD63 ve CD81 tetraspanin belirteçleri akım sitometrik olarak incelenmiş ve immünfenotipleme karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Eksozom karakterizasyonu analizlerinde; V1-iYD-MKH, V1-iYD-MKH_{ALA}, V2-iYD-MKH ve V2-iYD-MKH_{ALA}'lerden elde edilmiş olan dört eksozom grubunun da CD63 ve CD81 eksozom belirteçleri bakımından yüksek pozitiflik göstermesine karşın CD9 ifadeleri negatif bulunmuştur (Bak. Çizim 4.20, Çizim 4.21, Çizim 4.22, Çizim 4.23). CD9 literatürde bir eksozom belirteci olarak geçiyor olsa da yaygın olarak hematopoetik ve epitelial hücrelerde ifade edilmektedir (Brosseau ve diğ. 2018). Bu anlamda; MKH'lerden elde edilen eksozomlarda CD9 ifadesinin negatif bulunması, aslında MKH'lerin yüzey belirteci olarak CD9 ifadesinin olmamasından kaynaklanmaktadır.

Bu çalışmada; EMT, apoptoz ve metastaz ilişkili genlerin ifadelerinde meydana gelen değişimler incelendi. SNAIL1 gen ifadesinde Vaka1'de MKKH+3mM ALA grubunda anlamlı düşüş görülmesine karşın, TWIST ifadelerinde MKKH+3mM ALA nispeten artış söz konusudur. SNAIL ve TWIST'in; EMT'nin düzenlenmesinden sorumlu olan iki temel transkripsiyon faktörü olmasına rağmen aynı gruptaki gen ifadesi düzeyleri farklı bulunmuştur. Bu durum; TWIST'in EMT sürecindeki E-kaderini baskılama mekanizmasını, SNAIL'den bağımsız olarak gerçekleştiriyor olmasından ileri geldiğini düşünmekteyiz (Lamouille ve diğ. 2014). Vaka 2 MKKH+iYD-MKH_{ALA} grubunda hem SNAIL hem TWIST ifadesi bakımından anlamlı düşüş saptanmıştır. Bu durum ALA ile uyarılmış olan MKH'lerin MKKH'ler üzerinde EMT baskılayıcı şekilde etki ettiğini göstermektedir. Vaka 2 iYD-MKH_{ALA} grubunda, kontrolü olan V2-iYD-MKH grubuna oranla SNAIL ve TWIST gen ekspresyonlarında anlamlı artış söz konusudur (Bak Çizim 4.24).

MMP-2 ve MMP-9 birçok biyolojik süreçte hayati rol oynayan önemli proteazlardır. MMP-9, birçok hücre dışı matriks (ECM) proteinlerinin parçalayarak ECM'nin yeniden yapılanmasını sağlar. MMP-9'un tümör invazyonu, metastaz ve anjiyogeneze rol oynadığı ve tümör mikro-ortamını düzenlediği bulunmuştur. Bazı yeni araştırmalarda, MMP-9'un çeşitli spesifik kanserlerde biyobelirteç olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (Huang 2018). MMP-2 ve MMP-9, meme kanseri dokularında yüksek oranda eksprese edilir ve lenf bezi metastazı ve tümör evrelemesi ile yakın ilişkilidir (Li ve diğ.

2017). Bu çalışmada; primer tümör dokudan elde edilen kanser kök hücresi dizilerinde MMP-2 ve MMP-9 gen ifadeleri yüksek bulunmuştur. Öncelikle, canlılığı azaltıcı doz 3mM ALA'nın V1-MKKH'de MMP-2 gen ifadesinin azaldığı ve her iki vakada da 3mM ALA için MMP-9 gen ifadesinin anlamlı derecede arttığı saptanmıştır. iYD-MKH grubu kontrole göre her iki vakada da MMP-2 ve MMP-9 gen ifadelerinde anlamlı derecede artmıştır. Buna karşın iYD-MKH_{ALA} gruplarında, iYD-MKH gruplarına göre azalma gözlenmiştir (Bak. Çizim 4.24). Bu bulgu 20µM ALA'nın; tümör niş hücresi olan MKH'lerin MKKH'leri üzerine olan metastatik etkisini azalttığını kanıtlar niteliktedir. ELİSA analizinde Vaka 1 MKKH+20µM ALA grubunda MMP-9 ve MMP-2 miktarında anlamlı artış görülürken; Vaka 2 MKKH+20µM ALA grubunda ise anlamlı azalma görülmüştür. Vaka 1 MKKH+iYD-MKH_{ALA} Ekso deney grubunda MMP-2 ve MMP-9 ELİSA analizlerinde anlamlı artış görülürken; Vaka 2 MKKH+iYD-MKH_{ALA} Ekso grubunda anlamlı azalma saptanmıştır. ELİSA sonuçlarına bağlı olarak, 20µM ALA ve ALA ile zenginleştirilmiş eksozom eklentisinin MKKH üzerindeki etkilerinin vakalar arasında farklılık gösterdiği sonucuna varmaktayız. MMP-2 ELİSA analizinde her iki vakanın MKKH+iYD-MKH_{ALA} ko-kültür grubunda da anlamlı azalma saptanmıştır (Bak. Çizim 4.31).

İmmünfloresan boyama sonuçlarında her iki vaka MKKH'ler için de hem MMP-2 hem MMP-9 boyamalar pozitifken, Vaka 1 MKKH'lerde pozitifliğin daha fazla olduğu görülmüştür. Aradaki bu farkın, V1-MKKH'lerin V2-MKKH'ler daha agresif ve metastatik olması ile ilişkilendirmekteyiz. Her iki vakada da MKKH+20µM ALA grubuna bakıldığında; 20µM ALA eklentisinin MKKH'lerde hem MMP-2 hem MMP-9 ifadesinde azalma ile sonuçlandığı görülmüştür. Bu bulgu ile 20µM ALA eklentisinin, MKKH'lerde metastatik özelliği baskıladığı saptanmıştır. Buna karşın; MKH'lerdeki 20µM ALA eklentisinin, MKKH'ler üzerindeki MMP-2 baskılama özelliğini daha da arttırmış olduğu sonucuna varmaktayız. Her iki vakanın da MKH gruplarını incelediğimizde 20µM ALA ile kültüre edilen iYD-MKH_{ALA} grubunda MMP-2 ve MMP-9 boyamalarında belirgin artış gözlemlenmiştir (Bak. Çizim 4.35). 20µM güvenli dozda ALA'nın MKKH'lerde migrasyonu/metastazı azaltıcı etki gösterirken, iYD-MKH'lerde migrasyonu artırıcı etki göstermesi IF boyama çalışmamızın çarpıcı sonuçlarından biridir. Vaka1 MKH ko-kültür gruplarında anlamlı bir fark bulunamazken; Vaka 2 ko-kültür gruplarının her ikisinde de kontrole oranla MMP-2 ve MMP-9 boyamalarında belirgin azalma gözlenmiştir. Eksozom deney gruplarında kontrol grubuna oranla MMP-2 boyamasında artış gözlenmiştir.

Vakal'in her iki eksozom grubunda da MMP-2 boyamasında artış gözlenirken, MMP-9 boyamasında anlamlı bir fark bulunamamıştır (Bak. Çizim 4.33 ve Çizim 4.34). Vaka 2 eksozom gruplarının her ikisinde de kontrole oranla MMP-2 ve MMP-9 boyamalarında belirgin azalma bulunurken; MKKH+iYD-MKH_{ALA} Ekso grubunda, MKKH kontrole oranla görülen MMP-2 boyamasındaki azalmanın, MKKH+iYD-MKH Ekso grubundaki azalmadan daha fazla olduğu gözlenmiştir (Bak. Çizim 4.34).

TNF- α apoptoz, nekroz, immün hücre aktivasyonu süreçlerindeki etkinliğiyle anti-tümör özellikler sergilediği gibi; anjiyogenez ve migrasyon süreçlerini de destekleyerek pro-tümör olarak da davranabilmektedir. Ancak bazı çalışmalar kanser ve kansere bağlı komplikasyonlarda tedavi edici özelliği olduğu bildirilmiştir (Wajant 2009). Çalışmamızda elde edilen qRT-PCR sonuçlarında TNF- α gen ifadesinin çok düşük ve/veya hiç olmadığını görülmüştür (Sonuçlar gösterilmemiştir). ELİSA analizinde iki vakada da; yalnızca MKKH+iYD-MKH_{ALA} ve MKKH+iYD-MKH Ekso gruplarında TNF- α miktarında ki artış anlamlı saptanmış olsada gen ifadelerinde olduğu gibi protein sentezinde çok düşük olduğu gözlenmiştir. (Bak. Çizim 4.31). TNF- α bulgularımız doğrultusunda hem MKH'lerin hem de MKKH'lerin bu yolağı kullanmadığı görülmektedir.

Kanser hücrelerindeki E-kaderin ekspresyon seviyesi; tümör derecesi ve evresiyle ters orantılıdır (Kim ve diğ. 2016). E-kaderin gen (CDH1) ekspresyonu analizinde; Vaka 1 MKKH+20 μ M ALA, MKKH+iYD-MKH, MKKH+V1-iYD-MKH_{ALA}, V1-MKKH+iYD-MKH Ekso, V1-MKKH+iYD-MKH_{ALA} Ekso deney gruplarında anlamlı artış bulunurken; Vaka 2 MKKH+iYD-MKH_{ALA}, MKKH+iYD-MKH Ekso, MKKH+iYD-MKH_{ALA} Ekso deney gruplarında anlamlı azalma bulunmuştur. Vaka 1 için anlamlı artışın ve Vaka 2'de kontrol grubuna göre anlamlı azalmaların saptandığı bulgular; bize ALA, kökültür ve eksozomların daha agresif seyreden V1-MKKH'ler üzerindeki tümör baskılayıcı etkinin daha fazla olduğunu göstermiştir. Ayrıca CDH1 gen ekspresyonlarında her iki vakanın da; MKKH+3mM ALA grubunda anlamlı azalma görülürken, iYD-MKH_{ALA} grubunda anlamlı artış bulunmuştur (Bak. Çizim 4.24).

TGF- β , kanser kök hücrelerinde E-kaderini baskılayarak EMT'yi başlatır ve invaziv karakter kazandırır. Bunun yanında kanser kök hücrelerinin diğer doku ve organlara metastazını desteklemektedir. Ayrıca tümör anjiyogenezinin oluşumunda da etkin rol oynamaktadır (Moses 2011). Deney gruplarının TGF- β gen ekspresyonu analizinde Vaka 2 MKKH+iYD-MKH_{ALA} ko-kültür grubunda anlamlı azalma görülmüştür. Ayrıca TGF- β

gen ekspresyonu ve ELİSA analizlerinde Vaka 2 iYD-MKH_{ALA} grubunda da kontrole oranla anlamlı artış söz konusudur. Her iki vakanın da MKKH+iYD-MKH_{ALA} Ekso ve MKKH+3mM ALA gruplarında TGF- β gen ekspresyonu analizinde anlamlı artış saptanmıştır. Buna karşın; ELİSA analizinde her iki vakanın da MKKH+3mM ALA deney grubunda TGF- β miktarında anlamlı azalma saptanmıştır (Bak. Çizim 4.24 ve Çizim 4.32). Yakın zamanda yapılmış bir çalışmada ALA'nın meme kanseri kök hücre hatları üzerinde TGF- β yolağını baskılayıcı etki gösterdiği bildirilmiştir (Tripathy ve diğ. 2018). Çalışmamızda elde edilen primer meme kanseri kök hücrelerinde de, 3mM ALA'nın TGF- β yolağı üzerinden EMT ve metastazı baskıladığı sonucuna varmaktayız.

Başlıca inflamatuvar sitokinlerden olan IL-6; çeşitli mediyatörler aracılığıyla kanser hücrelerinin proliferasyonunu, sağ kalımını ve metastatik özelliğini desteklemektedir. IL-6; iyi huylu (benign) tümör dokuyu, kötü huylu (malign) tümör dokuya dönüştürebilmektedir (Depner ve diğ. 2014). Ayrıca tümör mikro-çevresindeki IL-6 sinyalizasyonu, kanser hücrelerinin immün sistemden kaçışını ve anjiyogenezi sağlamaktadır (Fisher ve diğ. 2014). Vaka 1 IL-6 gen ekspresyonu analizinde MKKH+20 μ M ALA, MKKH+iYD-MKH_{ALA} ve iYD-MKH_{ALA} gruplarında anlamlı azalma görülürken; MKKH+3mM grubunda ileri derecede anlamlı artış söz konusudur. Farklı olarak; ELİSA sonuçlarında MKKH+iYD-MKH, MKKH+iYD-MKH_{ALA} ve MKKH+iYD-MKH_{ALA} Ekso gruplarının IL-6 miktarında anlamlı artış saptanmıştır (Bak. Çizim 4.25). iYD-MKH'ler ile birlikte kültüre edilen MKKH'lerde (özellikle V2'de) IL-6 hem gen hem protein düzeyinde artmışken, ALA ile uyarılmış ve uyarılmamış eksozomlarla kültüre edilen MKKH'lerde bu etki görülmemiş, tersine IL-6 ifadeleri azalmıştır. Vaka-1 ELİSA/IL-6 grafiğinde; ko-kültür gruplarının supernatantlarında IL-6 miktarlarındaki anlamlı artışın MKKH'den ziyade MKH kaynaklı olduğunu düşünmekteyiz. Vaka 2 IL-6 gen ekspresyonu analizinde MKKH+iYD-MKH, MKKH+iYD-MKH_{ALA} ko-kültür ve iYD-MKH_{ALA} gruplarında anlamlı artış görülürken; MKKH+3mM grubunda ise anlamlı azalma saptanmıştır. Benzer şekilde IL-6 ELİSA analizlerinde de MKKH+iYD-MKH ve MKKH+iYD-MKH_{ALA} ko-kültür gruplarında anlamlı artış görülürken; MKKH+3mM grubunda ise anlamlı azalma saptanmıştır (Bak. Çizim 4.32). 3mM ALA eklentisinin, farklı vakaların MKKH'lerinin hem ELİSA hem de gen ekspresyonu analizlerinde IL-6 ifadesi üzerinde farklı etkiler gösterdiği gözlenmiştir. Bu sonucun vakalar arası varyasyondan kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Kaspaz-3 ve kaspaz-7 apoptoz sürecinde, sitoplazmik proteinler ve nükleer DNA'nın yıkımından sorumlu hücre içi sistein proteazlardır. Vaka 1 kaspaz-3, kaspaz-7 gen ifadelerinde anlamlı bir değişim saptanmamıştır. Vaka 2'de MKKH+20 μ M ALA, MKKH+iYD-MKH_{ALA}, MKKH+iYD-MKH Ekso ve MKKH+iYD-MKH_{ALA} Ekso deney gruplarının kaspaz-3 ekspresyonu düzeylerinde anlamlı azalma görülmüştür. Vaka 2, kaspaz-7 gen ifadesi analizlerinde ise; MKKH+20 μ M ALA, MKKH+iYD-MKH, MKKH+iYD-MKH Ekso ve MKKH+iYD-MKH_{ALA} Ekso gruplarında anlamlı azalma görülmüştür (Bak. Çizim 4.26). Apoptotik belirteçlerdeki bu azalmanın, MKH'lerin anti-apoptotik özelliğinden kaynaklı olabileceğini öngörmekteyiz. Kaspaz-3 ve kaspaz-7 gen ekspresyonu sonuçlarını yorumladığımızda; ALA ile zenginleştirilmiş olmasına bakılmaksızın tüm MKH ko-kültür ve eksozom gruplarının her iki vakada da gen düzeyinde MKKH'lerde kaspaz 3 ve 7 için beklenen apoptotik bir etki görülmemiştir. Ancak Annexin V-PI analizlerinde özellikle 3mM için apoptotik etki nettir.

BCL-2 ve BAX, apoptozun düzenlenmesinde rol oynayan bir gen ailesinin antagonist olarak çalışan iki ayrı üyesidir. BCL-2; lenfoma, meme, kolon, akciğer ve deri gibi çeşitli kanser türlerinde aşırı ifade olan bir onkogendir (McDonnell ve diğ. 1996). BAX geni, P53 proteinin aktivasyonunu sağlayan Bax proteinini kodlayan, pro-apoptotik ve tümör baskılayıcı bir genidir. Hücrelerdeki BAX/BCL-2 oranı apoptoz süreci için belirleyicidir (Periman ve diğ. 1999). BCL-2 ve Bax genlerinin ifadelerinde Vaka 1 ve Vaka 2 arasında varyasyonlar bulunmaktadır. BCL-2 gen ekspresyonu analizleri Vaka 1'de; MKKH+20 μ M ALA, MKKH+iYD-MKH, MKKH+iYD-MKH_{ALA} ve MKKH+iYD-MKH Ekso gruplarında anlamlı azalma görülmesine karşın, Vaka 2 gruplarındaki azalma anlamlı görülmemiştir. Her iki vakanın da MKKH+iYD-MKH_{ALA} deney grubunda BCL-2 onkogen ekspresyonunda anlamlı azalma saptanmıştır. İlginç olarak yine her iki vakada da; MKKH+3mM ALA grubunda anti veya pro-apoptik özelliğine bakmaksızın hem BCL-2 hem BAX gen ifadesindeki artışlar anlamlıdır. BAX gen ekspresyonu analizleri Vaka 1'de; MKKH+iYD-MKH, MKKH+iYD-MKH_{ALA} ve MKKH+iYD-MKH Ekso deney gruplarında anlamlı azalma saptanırken, her iki vakanın da MKKH+3mM ALA grubunda anlamlı artış bulunmuştur. BAX gen ekspresyonu sonuçlarına göre 3mM ALA'nın, MKKH'leri apoptoza sürüklediği açıkça görülmektedir. Ayrıca Vaka 2'nin MKKH+20 μ M ALA ve MKKH+iYD-MKH_{ALA} deney gruplarında da BAX ekspresyonunda anlamlı artış saptanmıştır (Bak. Çizim 4.26).

Yapılan Anneksin V/PI apoptoz analizinde her iki vakada da; MKKH+20 μ M ALA, MKKH+iYD-MKH, MKKH+iYD-MKH_{ALA}, MKKH+iYD-MKH Ekso, MKKH+iYD-MKH_{ALA} Ekso gruplarında MKKH kontrol grubuna göre anlamlı bir değişim görülmezken; MKKH+3mM ALA grubunun apoptoz düzeyinde ileri derecede anlamlı artış saptanmıştır. Annexin V/PI bulgularımız 3mM ALA'nın şüphe götürmez bir şekilde kanser kök hücrelerini apoptoza götürdüğünü destekler niteliktedir. Ayrıca 3mM ALA'nın Vaka 1'de ~%91'lerde olan canlılık oranını ~%16'lara indirirken, Vaka 2'de ~%84'lerde olan canlılığı ~%65'lere indirdiği gözlenmiştir (Bak. Çizim 4.30). Bu bulgu 3mM ALA'nın; daha agresif olan V1-MKKH üzerinde canlılığı azaltıcı etkisinin, V2-MKKH'ye göre daha fazla (~4 kat) olduğunu göstermektedir.

WST-1 canlılık ve proliferasyon deneyi de Anneksin V/PI apoptoz analizini destekler şekilde; her iki vakada MKKH+3mM ALA grubunun canlılığında anlamlı azalma saptanmıştır. Ayrıca yine her iki vakada da iYD-MKH_{ALA} deney grubunun canlılığında, kontrol iYD-MKH grubuna oranla anlamlı artış görülmüştür. Ayrıca Vaka 2 MKKH+20 μ M ALA, MKKH+iYD-MKH, MKKH+iYD-MKH_{ALA}, MKKH+iYD-MKH Ekso ve MKKH+iYD-MKH_{ALA} Ekso gruplarındaki hücre canlılığında, kontrol grubu MKKH'e göre anlamlı artış bulunmuştur. WST-1 deneyinde 3 mM ALA'nın MKKH'lerin canlılık ve proliferasyonunu azalttığı, 20 μ M ALA'nın ise MKH'lerin canlılık ve proliferasyonunda arttırıcı etki gösterdiği saptanmıştır (Bak. Çizim 4.27 ve çizim 4.28).

Migrasyon deneyinde ilk olarak vakalar arası yaptığımız değerlendirmede Vaka 1 MKKH'lerin migrasyon yeteneği, nispeten Vaka 2 MKKH'lerden daha gelişmiş olarak gözlenmiştir. Kültürdeki 20 μ M ALA eklentisi, hem Vaka 1 hem Vaka 2 grubu için; MKKH'lerde migrasyonu azaltıcı etki göstermiş olmasına karşın, iYD-MKH'lerde migrasyonu arttırıcı etki gösterdi. Bu bulgu ile ALA'nın, MKKH ve iYD-MKH üzerine farklı etkiler gösterdiği gerçeği bir kez daha kanıtlanmıştır. Vaka 1'de; MKKH'lerin, iYD-MKH ve iYD-MKH_{ALA} ile ortak kültürü migrasyonu azaltıcı etki gösterirken; Vaka 2'de anlamlı bir fark görülmedi. Her iki vakada da; iYD-MKH eksozomları MKKH migrasyonu üzerine azaltıcı etki gösterirken, iYD-MKH_{ALA} eksozomlarının belirgin bir etkisi görülmedi (Bak. Çizim 4.36 ve Çizim 4.37). Migrasyon deneyi bulgularımız, MMP-2/MMP-9 IF boyama sonuçlarını da destekler nitelikte bulunmuştur.

Deney gruplarında, WST-1 canlılık deneyi, Anneksin V/PI apoptoz, IF boyama, migrasyon deneyleri arasında korelasyon bulunmaktadır ve analiz sonuçları birbirini

destekler niteliktedir. Ancak gen ekspresyonu ve ELİSA analizlerinde deney gruplarındaki farklılıkların örnek sayısının artırılması durumunda istatistiksel olarak daha anlamlı bulunabileceğini öngörmekteyiz.

Yaptığımız analizlerle elde ettiğimiz bulgulara dayanarak ALA'nın meme kanseri kök hücrelerinin çoğalmasını engellediği ve apoptoza yönlendirdiğini saptadık. ALA'nın güçlü bir anti-kanser ajan olduğunu ve meme kanseri vakalarında hem çoğalmayı hem metastazı önlemek için ALA'nın kullanılabilirliğini öngörmekteyiz. SNAIL ve TWIST gen ekspresyonu analizlerinde ve MMP-2 ELİSA sonuçlarında iYD-MKH_{ALA} ko-kültürünün ve iYD-MKH eksozomlarının MKKH'ler üzerindeki EMT baskılayıcı etkisi dikkat çekicidir. MMP-2 ve MMP-9 gen ekspresyonları için, MKKH+iYD-MKH gruplarında MKKH kontrole göre anlamlı artışın saptanması, MKKH'lerin parakrin etkisinden kaynaklı olduğunu; MKKH'leri ile birlikte iYD-MKH'lerin MMP-2/ MMP-9 proteaz aktivitesini arttırmış olabileceğini öngörmekteyiz. Gen ekspresyonu analizlerinde MKH deney gruplarında da, MKKH gruplarına göre MMP-2/ MMP-9 proteaz ifadesinin daha fazla olduğu görülmektedir. MKKH'lerin normal koşullarda iYD-MKH'leri metastatik ihtiyacı doğrultusunda uyarabilirken, 20µM ALA varlığında MKH'lerden bu desteği sağlayamamaktadır. Ek olarak; eksozom deney gruplarında da hücrelerin birbirlerine olan etkisi değil; kültür sonrası salgılanan eksozomların direk etkisi görülmektedir. Sonuç olarak; eksozom deney gruplarında; ko-kültür gruplarına göre MMP-2/ MMP-9 ekspresyonlarında anlamlı azalma olduğu görülmektedir. Kokültür gruplarında MKH'lerden salgılanan önemli sitokinlerden IL-6'nın qRT-PCR ve ELİSA sonuçları eksozomların etkisini destekler niteliktedir. MKKH'ler iYD-MKH ile kokültürlerinde hem gen hem protein düzeyinde IL-6 anlamlı derecede fazlayken; eksozom gruplarında EMT'yi destekleyen bu sitokinin anlamlı derecede az olduğu görülmüştür.

Sonuç olarak; çalışmadaki bulgulara dayanarak ALA'nın meme kanseri kök hücrelerinin migrasyonunu, çoğalmasını engellediği ve apoptoza yönlendirdiği saptanmıştır. ALA'nın güçlü bir anti-kanser ajan olduğunu ve meme kanseri vakalarında hem çoğalmayı hem metastazı önlemek için ALA'nın kullanılabilirliğini öngörmekteyiz. Ek olarak iYD-MKH eksozomlarının, ortak kültürlerin tersine anti-metastatik etkisinin olduğu saptanmıştır. Çalışmamızda vakalar arası varyasyonlar görülmektedir. Bulgularımız hücresel tedavilerde de kişi bazlı tedavi protokolleri geliştirilmesi gerektiğini, kanser derecelendirilmesinin bu sonuçlar üzerinde etkili olabileceğini göstermektedir.

5.1. Sınırlılıklar

Çalışmanın daha fazla vaka ile yapılması vakalar arasındaki varyasyonları azaltacaktır. Bu şekilde elde edilen sonuçların toplumun geneline uyarlanması daha sağlıklı bir şekilde gerçekleşecektir.

Eksozom karakterizasyonunda, akım sitometri analizine ilaveten elektron mikroskopisi ile eksozom boyut analizinin yapılması izolasyonumuzun validasyonunu destekleyen bir analiz olacaktır. qRT-PCR ile gen düzeyinde gerçekleştirdiğimiz analizleri, protein düzeyinde ELİSA ve IF yöntemleri ile karşılaştırdık ve sonuçlarımızın ek olarak western blot ile desteklenmesi çalışmamızın etki faktörünü arttıracaktır. Yapmış olduğumuz in-vitro deneylere ek olarak, in-vivo deneylerin yapılması elde edilen sonuçları daha ileri bir noktaya taşıyacaktır.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

MKKH ve iYD-MKH izolasyonları, karakterizasyon deneyleriyle de desteklenerek başarıyla gerçekleştirilmiştir. Ancak hücrelerin yüzey belirteçlerine göre özgün seçim yapılarak ayrıştırılma tekniklerinin kullanılması daha saf hücre soylarının elde edilmesini sağlayacaktır.

Kurulmuş 3 günlük deney sürecince amaçlandığı gibi; ALA, MKH ve eksozomların MKKH'ler üzerine olan etkileri incelendi. Ancak çalışma daha uzun süreli (5 gün, 7 gün vs.) deneyleri de içeren gruplarla desteklenerek daha uzun vadeli olarak incelenebilir. Çalışmada kurulan 1:2 oranda MKKH: iYD-MKH ko-kültür deney grupları 1:1, 1:3 gibi farklı oranlardaki çalışma gruplarıyla desteklenebilir.

Elde edilen bulgularda ALA ile zenginleştirilmiş eksozomların kanser hücreleri üzerinde belli bir etkisi olduğu gösterilmiştir. Ancak bu çalışmada ALA'nın etki mekanizmasının ayrıntılı incelenmesine yer verilememiştir. Tersine mühendislik yaklaşımları ile ya da ileri analizleri de içeren (Proteomiks vs.) multidisipliner çalışmalarla desteklenebilir.

KAYNAKLAR

- Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF: Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100(7): 3983-8. Epub 2003 Mar 10.
- Bloom HJ. Prognosis in carcinoma of the breast. *Br J Cancer*; 1950;4:259-88.
- Bloom HJ, Richardson WW. Histological grading and prognosis in breast cancer: a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. *Br J Cancer*. 1957; 11: 359-77.
- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I ve diğ. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018; 68(6): 394-424.
- Berkson BM, Rubin DM, Berkson AJ. Revisiting the ALA/N (alpha-lipoic acid/low-dose naltrexone) protocol for people with metastatic and nonmetastatic pancreatic cancer: a report of 3 new cases. *Integr Cancer Ther*. 2009;8(4):416-22.
- Chaineau M, Danglot L, Galli T. Multiple roles of the vesicular-SNARE TI-VAMP in post-Golgi and endosomal trafficking. *FEBS Lett*. 2009 3; 583(23): 3817-26.
- Ciavarella S, Dominici M, Dammacco F ve diğ. Mesenchymal Stem Cells: A New Promise in Anticancer Therapy. *Stem Cells Dev*. 2011; 20(1): 1-10
- Crabtree JS, Miele L. Breast Cancer Stem Cells. *Biomedicines*. 2018; 6(3).
- Ren C, Kumar S, Chanda D ve diğ. Cancer gene therapy using mesenchymal stem cells expressing interferon-beta in a mouse prostate cancer lung metastasis model. *Gene Ther*. 2008; 15(21): 1446-53.
- Dai LJ, Moniri MR, Zeng ZR ve diğ. Potential implications of mesenchymal stem cells in cancer therapy. *Cancer Lett*. 201; 1; 305(1): 8-20.
- Damnjanovic I, Kocic G, Najman S ve diğ. Chemopreventive potential of alpha lipoic acid in the treatment of colon and cervix cancer cell lines. *Bratisl Lek Listy*. 2014;115(10):611-6.

Depner S, Lederle W, Gutschalk C ve diğ. Cell type specific interleukin-6 induced responses in tumor keratinocytes and stromal fibroblasts are essential for invasive growth. *Int J Cancer*. 2014;135(3):551-62.

DeSantis C, Ma J, Bryan L, Jemal A. Breast cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin*. 2014; 64(1): 52-62.

Dominici M, Le Blanc K, Mueller I ve diğ. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006; 8(4): 315-7.

Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*; 1991; 19: 403-10.

Ellis IO, Cornelisse CJ, Schnitt SJ ve diğ. Invasive breast carcinomas. In: Tavassoli FA, Devilee P, editors. WHO Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs. *Lyon: IARC Press*. 2003; 13-19.

Fisher DT, Appenheimer MM, Evans SS. The two faces of IL-6 in the tumor microenvironment. *Semin Immunol*. 2014; 26(1): 38-47.

Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI ve diğ. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation*. 1968; 6(2): 230-47.

Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E ve diğ. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell*. 2007; 1(5): 555-67.

Gora A, Huk-Kolega H, Piechota A ve diğ. Lipoic acid - biological activity and therapeutic potential. *Pharmacol Rep*. 2011;63(4):849-58.

Grimshaw MJ, Cooper L, Papazisis K, ve diğ. Mammosphere culture of metastatic breast cancer cells enriches for tumorigenic breast cancer cells. *Breast Cancer Res*. 2008;10:R52.

Gültekin M, Bozbaş M. Türkiye Kanser İstatistikleri. T.C. Sağlık Bakanlığı, Halk Sağlığı Kurumu. 2014.

Hai Li, Zhenwei Qiu, Feng Li ve diğ. The relationship between MMP-2 and MMP-9 expression levels with breast cancer incidence and prognosis. *Oncol Lett.* 2017; 14(5): 5865–5870.

Harris M, Howell A, Chrissohou M ve diğ. A comparison of the metastatic pattern of infiltrating lobular carcinoma and infiltrating duct carcinoma of the breast. *Br J Cancer.* 1984; 50: 23-306: 230–247.

Henderson BE, Pice Mc, Ross RK ve diğ. Do regular ovulatory cycles increase breast cancer risk? *Cancer.* 1985; 56:1206-794.

Huang H. Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) as a Cancer Biomarker and MMP-9 Biosensors: Recent Advances. *Sensors (Basel).* 2018; 27; 18(10).

Işıkdoğan A, Zinciroğlu SB, Dirier A ve diğ. Metastatik meme kanserinde birinci basamak tedavide antrasiklin içeren kombinasyon kemoterapi sonuçlarımız. *Dicle Tıp Dergisi.* 2003; 30: 1-4.

Jeon MJ, Kim WG, Lim S ve diğ. Alpha lipoic acid inhibits proliferation and epithelial mesenchymal transition of thyroid cancer cells. *Mol Cell Endocrinol.* 2016 Jan;419:113-23.

Jia Y, Chen Y, Wang Q ve diğ.. Exosome: emerging biomarker in breast cancer. *Oncotarget.* 2017; 20; 8(25): 41717-41733.

22.

Kafara P, Icard P, Guillamin M ve diğ. Lipoic acid decreases Mcl-1, Bcl-xL and up regulates Bim on ovarian carcinoma cells leading to cell death. *J Ovarian Res.* 2015; 8: 36-49.

Kim SA, Inamura K, Yamauchi M ve diğ. Loss of CDH1 (E-cadherin) expression is associated with infiltrative tumour growth and lymph node metastasis. *Br J Cancer.* 2016;114(2):199-206.

Kuban-Jankowska A, Gorska-Ponikowska M, Wozniak M. Lipoic acid decreases the viability of breast cancer cells and activity of PTP1B and SHP2. *Anticancer Res.* 2017;37:2893-2898

Lai RC, Yeo RWY, Lim SK. Mesenchymal stem cell exosomes. *Semin Cell Dev Biol.* 2015; 40: 82-8.

Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014; 15(3): 178-96.

Lasser C, Eldh M, Lötvall J. Isolation and characterization of RNA-containing exosomes. *J Vis Exp.* 2012; 9; (59): e3037.

Leber MF ve Efferth T. Molecular principles of cancer invasion and metastasis. *Int J Oncol.* 2009; 34: 881–95.

Lee HS, Na MH, Kim WK. alpha-Lipoic acid reduces matrix metalloproteinase activity in MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Nutr Res.* 2010;30(6):403-9.

Li CI, Uribe DJ, Daling JR. Clinical characteristics of different histologic types of breast cancer. *Br J Cancer.* 2005; 93:1046-52.

Li H, Qiu Z, Li F ve diğ. The relationship between MMP-2 and MMP-9 expression levels with breast cancer incidence and prognosis. *Oncol Lett.* 2017; 14(5): 5865–5870.

Lombardo Y, Giorgio A, Coombes CR ve diğ. Mammosphere formation assay from human breast cancer tissues and cell lines. *J Vis Exp.* 2015; 22;(97).

Luzio JP, Piper SC, Bowers K ve diğ.. ESCRT proteins and the regulation of endocytic delivery to lysosomes. *Biochem Soc Trans.* 2009 Feb; 37(Pt 1): 178-80.

Makki J, Myint O, Wynn, AA ve diğ. Expression distribution of cancer stem cells, epithelial to mesenchymal transition, and telomerase activity in breast cancer and their association with clinicopathologic characteristics. *Clin. Med. Insights Pathol.* 2015, 8, 1–16.

Meme Sağlığı Kulübü. Erişim:4 Mart 2019, www.memesaglik.com.

McDonnell TJ, Beham A, Sarkiss M ve diğ. Importance of the Bcl-2 family in cell death regulation. *Experientia.* 1996; 52(10-11): 1008-17.

Michikoshi H, Nakamura T, Sakai K ve diğ. α -Lipoic acid-induced inhibition of proliferation and met phosphorylation in human non-small cell lung cancer cells. *Cancer Lett.* 2013;335(2):472-8.

Morris TW, Reed KE, Cronan JE. Lipoic acid metabolism in Escherichia coli: the IpIA and libB genes define redundant pathways for ligation of lipoyl groups to apoprotein. *J Bacteriol.* 1995; 177(1): 1-10.

Musey VC, Collins DC, Brogan DR ve diğ. Long term effects of a first pregnancy on the hormonal environment: estrogens and androgens. *J Clin Endocrinol Metab.* 1987;64(1):111-8

Tavasoli FA, Deville P. Pathology and genetics: tumors of the breast and female genital organs; WHO classification of tumours. IARC Press, Lyon, 2003.

Trichopoulos D, Mac Marhon B, Cole P. The menopause and breast cancer risk. *JNCI.* 1972; 48: 605-609.

Türk Cerrahi Derneği. Erişim: 17 Mart 2019. www.turkcerrahi.com

Packer L. Alpha-lipoic acid: A metabolic antioxidant which regulates NF-kappa B signal transduction and protects against oxidative injury. *Drug Metab Rev.* 1998; 30(2): 245

Perlman H, Zhang X, Chen MW ve diğ. An elevated bax/bcl-2 ratio corresponds with the onset of prostate epithelial cell apoptosis. *Cell Death Differ.* 1999; 6(1): 48-54.

Perlikos F, Harrington KJ, Syrigos KN. Key molecular mechanisms in lung cancer invasion and metastasis: A comprehensive review. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2013; 87(1): 1-11.

Perou CM. Molecular stratification of triple-negative breast cancers. *Oncologist.* 2011;16 Suppl 1:61-70.

Prieto-Vila M, Takahashi RU, Usuba W ve diğ. Drug Resistance Driven by Cancer Stem Cells and Their Niche. *Int J Mol Sci.* 2017;18(12).

Ramdasi S, Sarang S, Viswanathan C. Potential of Mesenchymal Stem Cell based application in Cancer. *Int J Hematol Oncol Stem Cell Res.* 2015; 9(2): 95–103.

Reza AMMT, Choi YJ, Yasuda H ve diğ. Human adipose mesenchymal stem cell-derived exosomal-miRNAs are critical factors for inducing anti-proliferation signalling to A2780 and SKOV-3 ovarian cancer cells. *Sci Rep.* 2016; 6: 38498.

Sarıkaya A. Total RNA İzolasyonu. Temizkan G, Arda N (Ed). Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler. Nobel Kitabevleri, İstanbul, 2008.

Scheels C, Weinberg R. Cancer stem cells and epithelial–mesenchymal transition: Concepts and molecular links. *Semin Cancer Biol.* 2012; 22(5-6): 396-403.

Siangproh W, Rattanarat P, Chailapakul O. Reverse-phase liquid chromatographic determination of α -lipoic acid in dietary supplements using a borondoped diamond electrode. *J Chromatogr A.* 2010; 1217(49): 7699-705.

Tavassoli FA: Pathology of The Breast (2. baskı). Appleton and Lange, Stamford, 1999.

Thiery JP, Acloque H, Huang RY ve diğ.. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell.* 2009;139(5): 871-90.

Topuz E, Aydiner A, Dinçer M (Ed) Meme Kanseri. Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 2003.

Reed LJ. A trail of research from lipoic acid to alpha-keto acid dehydrogenase complexes. *J Biol Chem.* 2001; 276(42): 38329-36.

Rosen PP, Lieberman PH, Braun DW ve diğ. Lobular carcinoma in situ of the breast detailed analysis of 99 patients with average follow-up 24 years. *Am J Surg Pathol.* 1978; 2(3): 225-51.

Packer, L. Kraemer, K.; Rimbach, G. Molecular aspects of lipoic acid in the prevention of diabetes complications. *Nutrition.* 2001, 17, 888–895.

Glumac PM, LeBeau AM. The role of CD133 in cancer: a concise review. *Clin Transl Med.* 2018; 7(1): 18.

Puchsaka P, Chaotham C, Chanvorachote P. α -Lipoic acid sensitizes lung cancer cells to chemotherapeutic agents and anoikis via integrin β 1/ β 3 downregulation. *Int J Oncol.* 2016; 49: 1445-1456.

Tian LL, Yue W, Zhu F, Li S, Li W. Human Mesenchymal Stem Cells Play a Dual Role on Tumor Cell Growth In Vitro and In Vivo. *J Cell Physiol.* 2011; 226(7): 1860-7.

Tomita H, Tanaka K, Tanaka T ve diğ. Aldehyde dehydrogenase 1A1 in stem cells and cancer. *Oncotarget.* 2016; 7(10): 11018-32.

Topal Sarıkaya A, RNA'nın İzolasyonu ve Analizi. Temizkan G, Arda N (Ed) *Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler*. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2008.

Tripathy J, Tripathy A, Thangaraju M ve diğ. α -Lipoic acid inhibits the migration and invasion of breast cancer cells through inhibition of TGF β signaling. *Life Sci*. 2018 ;207:15-22.

Veronesi U, Goldhirsch A, Yarnold J. Breast Cancer. Oxford University Press, Oxford, 1995.

Vlassov AV, Magdaleno S, Setterquist R ve diğ. Exosomes: Current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. *Biochim Biophys Acta*. 2012; 1820(7): 940-8.

Yadi Wu and Binhua P. Zhou. SNAIL More Than EMT. *Cell Adh Migr*. 2010 Apr-Jun; 4(2): 199–203.

Yang Y, Bucan V, Baehre H ve diğ. Acquisition of new tumor cell properties by MSC-derived exosomes. *Int J Oncol*. 2015; 47(1): 244-52.

Qiao L, Zhao TJ, Wang FZ ve diğ. NF-kappaB downregulation may be involved the depression of tumor cell proliferation mediated by human mesenchymal stem cells. *Acta Pharmacol Sin*. 2008; 29(3): 333-40

Wajant H. The role of TNF in cancer. *Results Probl Cell Differ*. 2009; 49: 1-15.

Wendy Y, Chen MD MPH. Exogenous and endogenous hormones and breast cancer. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2008; 22(4): 573–585.

ÖZGEÇMİŞ

1. Bireysel Bilgiler

Adı Soyadı: Gizem USLU

Doğum yeri ve tarihi: İzmit 18.07.1993

Uyruğu: T.C.

Medeni durumu: Bekar

İletişim adresi: Dumlupınar Mh. Kahramanlar Cad. İkizler Sk.
İkizler Apt. No:120, 1. Giriş, A Blok, Daire:3,
Derince - KOCAELİ

Telefon: 0538 675 69 42

2. Eğitimi

09.2016-Devam ediyor **Yüksek Lisans**

Kocaeli Üniversitesi, Kök Hücre AD.

Kök Hücre ve Doku Yenilenmesi Programı

Kocaeli – TÜRKİYE

10.2011-07.2015

Lisans

Avrasya Üniversitesi

Fen-Edebiyat Fakültesi

Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü

Trabzon – TÜRKİYE

09.2007-06-2011

Lise

19 Mayıs Lisesi

Fen Bilimleri

Yabancı Dili: İngilizce

3. Bilimsel Etkinlikler

a) Aldığı burslar / Proje bilgileri

Erişkin Kök Hücreler Kullanılarak Deneysel Spinal Musküler Atrofi Hayvan Modelinin Oluşturulması ve İşlevselliğinin Gösterilmesi, 1003 - Öncelikli Alanlar (2. Aşama), Burslu, Yürürlükte, SBAG - Sağlık Bilimleri Araştırma Destek Grubu, ARDEB, 216S467

b) Uluslararası Bilimsel Etkinliklerde Bildiriler

Zehra Seda HALBUTOĞULLARI, Gizem USLU, Gülçin GACAR, Ahmet ÖZTÜRK, Gökhan DURUKSU, Yusufhan YAZIR. EGF and Hypoxic Conditions in Human Adipose Derived Mesenchymal Stem Cells Improve Survival and Protects From Aging, Sözlü Sunum (Tam metin bildiri), International Hippocrates Congress on Medical and Health Sciences, 1-3 Mart 2019, 122 - 135.

c) Ulusal Bilimsel Etkinliklerde Bildiriler

Gizem USLU, Zehra Seda HALBUTOĞULLARI, Gülçin GACAR, N. Zafer UTKAN, Yusufhan YAZIR. Breast Cancer Stem Cell Isolation From Primary Tumor and Performing Characterization With Suitable Mammosphere and ALDH assay, Sözlü Sunum, 7. Multidisipliner Kanser Araştırma & 1. Temel Onkoloji Kongresi, 11-14 Ekim 2018, 72.

d) Projeler



1. EGF ve Hipoksik Koşulların İnsan Yağ Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin etkilerinin İncelenmesi, Yürütülen Kuruluş: Kök hücre ve Gen Tedavileri Araştırma ve Uygulama Merkezi (KÖGEM), Destekleyen Kurum: Kocaeli Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi.
2. Yağ Dokusu Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre Eksozomları ve Alfa Lipoik Asitin *in-vitro* Koşullarda Meme Kanseri Kök Hücreleri Üzerine Etkilerinin İncelenmesi, Yürütülen Kuruluş: Kök hücre ve Gen Tedavileri Araştırma ve Uygulama Merkezi (KÖGEM), Destekleyen Kurum: Kocaeli Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi.

e) Bilimsel Toplantılardaki Görevler

1. XXI. Kök Hücre ve Doku Mühendisliği Kursu: Temel Teknikler ve Moleküler Biyoloji Uygulamaları. Düzenleme kurulu üyesi. 17-21 Ekim 2016, Kocaeli.
2. XXII. Kök Hücre ve Doku Mühendisliği Kursu: Temel Teknikler ve Moleküler Biyoloji Uygulamaları. Düzenleme kurulu üyesi. 3-7 Temmuz 2017, Kocaeli.
3. XXIII. Kök Hücre ve Doku Mühendisliği Kursu: Temel Teknikler ve Moleküler Biyoloji Uygulamaları. Düzenleme kurulu üyesi. 2-6 Ekim 2017, Kocaeli.
4. XXIV. Kök Hücre ve Doku Mühendisliği Kursu: Temel Teknikler ve Moleküler Biyoloji Uygulamaları. Düzenleme kurulu üyesi. 19-23 Şubat 2018, Kocaeli.
5. XXV. Kök Hücre ve Doku Mühendisliği Kursu: Temel Teknikler ve Moleküler Biyoloji Uygulamaları. Düzenleme kurulu üyesi. 2-6 Nisan 2018, Kocaeli.
6. XXVI. Kök Hücre ve Doku Mühendisliği Kursu: Temel Teknikler ve Moleküler Biyoloji Uygulamaları. Düzenleme kurulu üyesi. 10-14 Haziran 2019, Kocaeli.

EKLER

Ek 1. Etik Kurul Onay Formu

	T.C. KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ			
GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU				
Etik Kurul Bilgileri	Adı	Kocaeli Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu		
	Adres	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Ara Kat 41380 Umuttepe Yerleşkesi /KOCAELİ		
	Telefon	0262 303 74 50		
	Faks	0262 303 74 63		
	E-Posta	gokaetikkurul@kocaeli.edu.tr		
Başvuru Bilgileri	Araştırmanın Adı	Yağ Dokusu Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre Eksozomları ve alfa lipik asit'in in-vitro koşullarda, meme kanseri kök hücreleri üzerine etkilerinin incelenmesi		
	Araştırma Proje Numarası	KÜ GOKAEK 2018/103		
	Sorumlu Araştırmacı Unvanı/Adı/Soyadı	Yrd. Doç. Dr. Z. Seda HALBUTOĞULLARI		
	Sorumlu Araştırmacının Uzmanlık Alanı			
	Araştırma Merkezi	Kocaeli Üniversitesi Kök Hücre AD		
	Destekleyici	KÜ BAPB		
	Araştırmanın Türü	Yüksek Lisans Tezi		
	Araştırmaya Katılan Merkezler	Tek Merkezli <input checked="" type="checkbox"/>	Çok Merkezli <input type="checkbox"/>	Ulusal <input type="checkbox"/>
Değerlendirilen Belgeler	Belge Adı	Var	Yok	Açıklama
	Başvuru Dilekçesi	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	Başvuru Formu	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	Araştırmanın Türü	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Rutin Muayene Sırasında Elde Edilmiş Materyallerle Yapılacak Araştırma/Hücre veya doku kültürü çalışması
	Araştırma Protokolü	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	Kullanılacak Form Örnekleri	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	Aydınlatılmış Onam Formu	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	Araştırma Bütçesi	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	Literatür Örneği	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	Taahhütname	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	Biyolojik Materyal Transfer Anlaşması	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	İzin Belgeleri	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	Başhekimlik Onayı	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	Özgeçmişler	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	Değişiklik Bilgi Formu	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	Proje Sonuç Formu	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Diğer	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
KÜ Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Onay Formu				
		Belge Kodu	Rev. Tarihi / No.su	Sayı
		Onay Formu	18.10.2017/KÜGÖEK01.2	1/2

Ek 1. Etik Kurul Onay Formu (Devam)

Karar Bilgileri	Karar No: <u>KÜ GOKAEK 2018/4.24</u> Proje No: <u>2018/103</u> Tarih: <u>7/10/2018</u>								
	Yrd. Doç. Dr. Z. Seda HALBUTOĞULLARI sorumluluğunda yapılan ve yukarıda bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler, araştırmanın gerekçesi, amacı, yaklaşım ve yöntemleri, gönüllüler için beklenen yarar ve riskler dikkate alınarak değerlendirilmiş ve araştırmanın ilgili protokol doğrultusunda belirtilen merkezlerde yürütülmesi etik açıdan, <input checked="" type="checkbox"/> Uygun bulunmuştur. <input type="checkbox"/> Eksikliklerin tamamlanması koşulu ile uygun bulunmuştur.* <input type="checkbox"/> Uygun bulunmamıştır.*								
Dayanakları	Hasta Hakları Yönetmeliği (01.08.1998/23420); Biyoloji ve Tıbbın Uygulanması Bakımından İnsan Hakları ve İnsan Haysiyetinin Korunması Sözleşmesi; İnsan Hakları ve Biyotıp Sözleşmesinin Uygun Bulunduğuna Dair Kanun (09.12.2003/25311); Biyotıp Araştırmalarına İlişkin İnsan Hakları ve Biyotıp Sözleşmesine Ek Protokolün Onaylanmasının Uygun Bulunduğuna Dair Kanun (29.03.2011/27899); İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik (13.04.2013/28617); Tıbbi Cihaz Klinik Araştırmaları Yönetmeliği (06.09.2014/29111); Dünya Tıp Birliği Helsinki Bildirgesi; İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu; Türk Tabipleri Birliği Hekimlik Meslek Etiği Kuralları; Türk Tabipleri Birliği Araştırma Etiği Bildirgesi								
Etik Kurul Üyeleri									
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile İlgili		Toplantıda Bulunma		İmza
Prof. Dr. Kadir Babaoğlu Başkan	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof. Dr. İ. Erdem Okay Üye	Genel Cerrahi	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Haluk Emre Özel Üye	Restoratif Diş Tedavisi	Kocaeli Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Özlem Yıldız Gündoğdu Üye	Çocuk ve Ergen Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Canan Baydemir Üye	Biyostatistik	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Semil Selcen Göçmez Üye	Farmakoloji	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Yusufhan Yazır Üye	Histoloji ve Embriyoloji	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	İlşikli
Yrd. Doç. Dr. Aşkhan Akpınar Raportör	Tıp Tarihi ve Etik	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Ceyla Eraldemir Üye	Biyokimya	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
* Gerekece ve öneriler:									

Tez Denetleme Listesi

- Kapak ve iç kapak sayfalarında BİLİM UZMANLIĞI ya da DOKTORA şeklinde elde edilen unvanlar yazıldı (Kapak sayfasına danışman adı yazılmamalıdır).
- Kapak sayfasına mezun olunan PROGRAMIN (Anabilim dalının değil) adı yazıldı.
- Tez kapağı sırt kısmına kılavuzda belirtilen çizimde (yazının yönüne dikkat!) ad, program,yıl yazıldı.
- Onay sayfası uygun çizimde hazırlandı (kazanılan unvanlar BİLİM UZMANLIĞI ya da DOKTORA olmalıdır) imzalatıldı (Enstitü Müdürü'nün imzası da gereklidir, imzaların aynı renk kalemle atılmasına dikkat edilmelidir).
- Dizinler kılavuzda belirtildiği gibi sıralandı.
- Ön sayfalara i, ii, iii şeklinde Roma rakamları konuldu.
- Sayfa numaraları kılavuzda belirtildiği şekilde konuldu.
- Sayfa düzeni kılavuzda belirtildiği şekilde yapıldı.
- Ana metin yazı boyutu 12 olacak biçimde basıldı.
- Dipnot yazı boyutu 10 olacak şekilde basıldı.
- Ana metin satır aralığı 1.5 olacak şekilde yazıldı.
- Kaynaklar abecesel sıralamaya göre yazıldı.
- Kaynak gösterme ilkelerine ve yazım kurallarına uyuldu.
- Ekler kılavuzda belirtildiği gibi verildi.

... / ... / 2019

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Zehra Seda HALBUTOĞULLARI

İmza